——— ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ——

УДК 594.1-111.1-15:546.221.1

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭРИТРОИДНЫХ КЛЕТОК ГЕМОЛИМФЫ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА ANADARA KAGOSHIMENSIS (ТОКИNAGA, 1906) В УСЛОВИЯХ СЕРОВОЛОРОДНОЙ НАГРУЗКИ

© 2022 г. А. А. Солдатов<sup>1, 2, \*</sup>, Е. С. Кладченко<sup>1</sup>, В. Н. Рычкова<sup>1</sup>, Т. А. Кухарева<sup>1</sup>, А. О. Лантушенко<sup>2</sup>, Я. В. Мегер<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, Севастополь 299011, Россия

> <sup>2</sup>Севастопольский государственный университет, Севастополь 299053, Россия \*e-mail: alekssoldatov@yandex.ru Поступила в редакцию 15.03.2022 г. После доработки 28.06.2022 г. Принята к публикации 30.06.2022 г.

В условиях эксперимента исследовали влияние сероводородной нагрузки (СН) на морфофункциональные характеристики эритроидных элементов гемолимфы двустворчатого моллюска Anadara kagoshimensis (Tokunaga, 1906). Работа выполнена на взрослых особях с высотой раковины 26–38 мм. Контрольную группу животных содержали в аквариуме с концентрацией кислорода 7.0–7.1 мг O<sub>2</sub>/л (нормоксия). Экспериментальную группу подвергали действию СН, создаваемой при растворении в воде Na<sub>2</sub>S до финальной концентрации 6 мг S<sup>2-</sup>/л. Спустя сутки концентрация кислорода в воде составляла 1.8 мг О2/л, а сероводород не был обнаружен. Часть моллюсков подвергли повторной сероводородной нагрузке, добавив Na<sub>2</sub>S до конечной концентрации 9 мг S<sup>2–</sup>/л. К концу вторых суток в воде регистрировали 1.9 мг S<sup>2-</sup>/л и следовую концентрацию кислорода 0.03 мг O<sub>2</sub>/л. Сочетанное действие сульфидов и гипоксии разной интенсивности вызвало ряд однозначных изменений в функциональном состоянии эритроидных клеток анадары: увеличился мембранный потенциал митохондрий при одновременном сокращении их числа в клетках; на фоне повышения продукции активных форм кислорода снизилась осмотическая стойкость эритроцитов. В связи с повышением содержания макроцитов в гемолимфе существенно увеличился среднеклеточный объем. В эритроцитах снизилось число содержащих гематин зернистых включений, которые массово переместились в гемолимфу моллюска. Предполагается, что совокупность этих процессов направлена на нейтрализацию высоких концентраций сульфидов в среде.

*Ключевые слова:* моллюски, *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906), сероводород, гемолимфа, эритроидные элементы

DOI: 10.31857/S0134347522060122

Нарушение баланса между окислением органического вещества и поступлением кислорода приводит к формированию в водной толще устойчивых во времени редокс-зон (Маслов, Подковыров, 2018). Для них характерно анаэробное разложение органического вещества, которое в сочетании с бактериальным восстановлением сульфатов приводит к локальному повышению концентрации сероводорода (Affonso et al., 1998; Völkel, Berenbrink, 2000). В этом отношении Черное море является наиболее наглядным примером (Беляев, Совга, 1991). Его водная толща, за исключением глубин до 150–200 м, постоянно заражена сероводородом. К подобным акваториям можно отнести ряд норвежских фиордов, впадину Карьяко в Карибском море и др. (Peterson, Haug, 2006). Относительно устойчивые зоны с повышенной концентрацией сульфидов на шельфе могут формироваться из-за отсутствия сквозной вертикальной конвекции и образования локальных зон гниения мертвого органического вещества (Орехова, Коновалов, 2018). В ряде случаев причиной этого явления становится апвеллинг, приводящий к поступлению богатых сульфидами глубинных вод в прибрежную зону (Орехова, Коновалов, 2018).

Сероводород токсичен для большинства организмов с аэробным типом дыхания. Это связано с его способностью ингибировать цитохром-*c*-оксидазу дыхательной цепи митохондрий клеток (Cooper, Brown, 2008) и переводить гемсодержашие белки (гемоглобин, миоглобин) в сульфидпроизводную форму, которая исключает связывание и транспорт кислорода (Bagarinao, 1992; Grieshaber, Völkel, 1998). Показана способность сульфидов ингибировать экспрессию транскрипционного фактора, индушируемого гипоксией (hypoxic-inducible factor, HIF) (Wu et al., 2012). Однако многие организмы проявляют выраженную устойчивость к присутствию сероводорода в воде. К ним можно отнести, например, пресноводных рыб семейства Poeciliidae из сероводородных источников на юге Мексики (Tobler et al., 2008, 2011). обитающего в застойных водах Амазонки сома Hoplosternum littorale (см.: Brauner et al., 1995), отдельные виды нематод, обнаруженных в зоне черноморского хемоклина (Sergeeva et al., 2021), а также ряд двустворчатых моллюсков, толерантных к повышенным концентрациям сульфидов (Miyamoto, Iwanaga, 2017).

Природа устойчивости гидробионтов к присутствию сульфидов в воде до конца не установлена. В некоторых работах рассмотрены участие сульфилокисляющей микрофлоры, поселяющейся на респираторных поверхностях, и ее роль в нейтрализации сероводородной нагрузки (Stewart, Cavanaugh, 2006), способность ряда организмов переводить сульфиды в тиосульфаты (Bagarinao, Vetter, 1993). В ряде работ отмечено наличие в гемолимфе гидробионтов особого транспортного белка и нечувствительных к сероводороду гемоглобинов (Arp, Childress, 1981, 1983), а также присутствие в эритроцитах некоторых видов зернистых включений, содержащих гематин, которые способны окислять сульфиды (Vismann, 1993; Holden et al., 1994).

Двустворчатый моллюск Anadara kagoshimensis (Tokunaga, 1906) — вид-вселенец, появившийся в Черном море в конце 1960-х годов. В условиях эксперимента его особи показали устойчивость не только к острым формам гипоксии и аноксии (Cortesi et al., 1992), но и к сероводородной нагрузке (Miyamoto, Iwanaga, 2017; Nakano et al., 2017). Ранее в эритроцитах этого моллюска описаны зернистые включения и показано их участие в процессах адаптации анадары к повышенным концентрациям сульфидов (Солдатов и др., 2018). В настоящей работе продолжены исследования по изучению влияния повышенных концентраций сульфидов на эритроидные клетки гемолимфы A. kagoshimensis.

Цель работы — при помощи методов проточной цитометрии, светооптической и конфокальной микроскопии исследовать особенности морфологии и функционального состояния эритроидных клеток гемолимфы *A. kagoshimensis* в условиях повышенных концентраций сульфидов и развивающейся на этом фоне внешней гипоксии разной интенсивности.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследование выполнено на взрослых особях *Anadara kagoshimensis*, собранных в июне 2021 г. в б. Ласпи (Крым). Высота раковины моллюсков (от замка до края створки) составляла от 26 до 38 мм.

#### Схема эксперимента

Контрольную группу моллюсков содержали в воде с концентрацией кислорода 7.0-7.1 мг О<sub>2</sub>/л (нормоксия) (группа 1). Экспериментальную группу подвергали действию сероводорода. В воде с моллюсками (группа 2) растворяли Na<sub>2</sub>S до финальной концентрации 6 мг S<sup>2-</sup>/л. Экспозиция составляла 24 ч. Присутствие в воде сульфидиона приводило к ее защелачиванию, которое компенсировали внесением 0.1н HCl. Значения рН удерживали на уровне 8.2-8.3. В результате взаимодействия сульфид-иона с кислородом содержание обоих газов в воде аквариума понижалось. Спустя 24 ч концентрация кислорода в воде составляла 1.8 мг  $O_2/л$ , а сероводород не был обнаружен. Через 24 ч у семи моллюсков взяли образцы гемолимфы. Еще 7 особей (группа 3) подвергли повторной сероводородной нагрузке. В воду аквариума вносили Na<sub>2</sub>S до финальной концентрации 9 мг S<sup>2-</sup>/л. Спустя 24 ч в воде аквариума были отмечены следы кислорода (0.03 мг  $O_2/\pi$ ), а уровень сероводорода составлял 1.9 мг S<sup>2-</sup>/л. У моллюсков, подвергшихся повторной сероводородной нагрузке, также были отобраны образцы гемолимфы.

Содержание кислорода в воде контролировали при помощи оксиметра DO Meter ST300D RU (Ohaus, США). Значения pH измеряли на pH-метре InoLab pH 720 (Германия). Концентрацию сульфид-иона в воде определяли потенциометрически с применением сульфидселективного сенсора "MSBS" (Нидерланды).

### Проточная цитометрия

Гемолимфу отбирали стерильным шприцем из экстрапаллиальной полости моллюска, трижды отмывали в стерилизованной морской воде в течение 5 мин (500 g) и фильтровали через фильтр с диаметром ячейки 20 мкм для удаления частиц неклеточной природы (Зуева и др., 2020; Zeng et al., 2021). Процедуру выполняли при низкой температуре (4—5°С), препятствующей образованию агрегатов клеток, и проводили микроскопический контроль за процессом агрегирования. После отмывки часть концентрата клеток использовали для приготовления мазков. Оставшиеся клетки ресуспензировали в морской воде (концентрация гемоцитов  $1-2 \times 10^6$  кл/мл).

404

Для идентификации типов клеток на проточном цитометре Beckman Coulter FC500 готовую суспензию окрашивали ДНК-красителем SYBR Green I (Sigma Aldrich, США) (финальная концентрация в пробе 10 мкмоль/л, время инкубации составляло 40 мин в темноте при температуре 4°С). Типы гемоцитов классифицировали на основании относительного размера (по величине прямого рассеяния FSC) и уровня гранулярности цитоплазмы (по величине бокового рассеяния SSC).

Способность гемоцитов к спонтанной продукции активных форм кислорода оценивали по флуоресценции красителя 2-7-дихлорфлуоресцеин-диацетата (DCF-DA, Sigma Aldrich, США). Для этого 1 мл суспензии гемоцитов инкубировали с 10 мкл раствора DCF-DA в течение 40 мин в темноте при температуре 4°С. Финальная концентрация красителя в пробе составляла 10 мкмоль/л. Флуоресценцию красителя анализировали на канале FL1 (экстинкция – 485 нм, эмиссия – 525 нм).

Изменения мембранного потенциала митохондрий (МПМ) в эритроцитах контролировали, измеряя интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных родамином 123 (R123) (Molecular Probes, США). Эритроциты R123 окрашивали в течение 10 мин. Концентрация красителя в пробе составляла 2.5 мкл/л. Интенсивность флуоресценции красителя определяли на канале FL1 (экстинкция – 508 нм, эмиссия – 528 нм).

#### Осмотическая стойкость эритроцитов

Осмотическую резистентность клеток красной крови оценивали с помощью метода лазерной дифракции (Kladchenko et al., 2022). Для количественного описания осмотической хрупкости гемоцитов A. kagoshimensis использовали точки 10% (H<sub>10</sub>), 50% (H<sub>50</sub>) и 90% (H<sub>90</sub>) гемолиза, отражавшие осмолярность среды, при которой наблюдался лизис 10, 50 и 90% клеток в образце. В работе использовали лазерный анализатор микрочастиц LaSca-TM (BioMedSystems, Россия) (Mindukshev et al., 2016; Миндукшев и др., 2019). Полученную информацию обрабатывали с помощью оригинального программного обеспечения LaSca 32 v.1498. Величину осмолярности растворов контролировали, используя криоосмометр OsmoSpecial 1 (Astori, Italy).

#### Конфокальная микроскопия

Для оценки количества митохондрий в эритроидных клетках использовали конфокальный микроскоп Stellaris 5 (Leica, Germany). Клеточную суспензию окрашивали красителем R123, инкубация длилась 30 мин. Препараты просматривали при длине волны лазера 530 нм. Число митохондрий оценивали как количество светящихся точек, приходившихся на одну клетку. При этом учитывали размеры очага свечения. Крупные точки рассматривали как скопление двух митохондриальных единиц. На каждом препарате просматривали не менее 500 эритроидных клеток. На основании полученных данных определяли среднее число митохондрий, приходившихся на один эритроцит.

#### Светооптическая микроскопия

Мазки гемолимфы окрашивали комбинированным методом Паппенгейма (Золотницкая, 1987) и анализировали при помощи светового микроскопа PR-2 Lum (Biomed, Russia), оборудованного камерой С NG Series (Levenhuk, China). Большой и малый диаметры клеток ( $C_1$  и  $C_2$ ) и ядер ( $N_1$  и  $N_2$ ) измеряли по фотографиям в программе ImageJ 1.44 р у 100 клеток на каждом мазке. На основании полученных значений по известным алгоритмам рассчитывали среднеклеточный объем ( $V_c$ ) (Houchin et al., 1958), объем ядра ( $V_n$ ) (Ташкэ, 1980) и толщину клетки (h) (Чижевский, 1959):

$$V_c = 0.7012 \left(\frac{C_1 + C_2}{2}\right)^2 h + V_n;$$
  
$$V_n = \frac{\pi N_1 N_2^2}{6};$$
  
$$h = 1.8 + 0.0915 (C_1 - 7.5).$$

Одновременно на мазках гемолимфы из расчета на 1000 клеток определяли число макроцитов и клеток с низким содержанием гранулярных включений (менее 30 единиц на клетку).

Статистические сравнения выполнены на основе непараметрического критерия Манна—Уитни. Результаты представлены как  $M \pm m$ . В работе использовали стандартный пакет Grapher (версия 11).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Проточная цитометрия

По относительному размеру клеток и уровню гранулярности в гемолимфе моллюска выделены два типа гемоцитов: эритроциты и амебоциты (рис. 1). Эритроциты явно преобладали, на их долю приходилось более 85% клеточной массы. Повышение интенсивности флуоресценции DCF-DA (рис. 2) подтвердило, что сероводородная нагрузка вызвала увеличение продукции активных форм кислорода эритроцитами. Рост наблюдался уже в первые сутки эксперимента (группа 2) и становился еще более выраженным после повторной



**Рис. 1.** Соотношение гемоцитов в гемолимфе анадары: а – распределение клеточных типов по показателю относительного размера (FS Log) и относительной гранулярности (SS Log); б – зависимость относительного числа амебоцитов в гемолимфе от величины сероводородной нагрузки; в – зависимость относительного числа эритроцитов в гемолимфе от величины сероводородной нагрузки; группа 1 – контроль; группа 2 – сутки после внесения  $Na_2S$ ; группа 3 – двое суток после внесения  $Na_2S$ .

сероводородной нагрузки (группа 3). Прирост интенсивности флуоресценции DCF-DA по сравнению с таковой в контрольной группе моллюсков в целом составил 33-34% (p < 0.05).

О величине МПМ эритроцитов судили по интенсивности флуоресценции родамина R123 (рис. 2). Основное увеличение МПМ отмечено на вторые сутки эксперимента (группа 3). Его значения в 2.3 раза (p < 0.01) превышали контрольные величины. В первые сутки (группа 2) различия были выражены слабо.

# Осмотическая стойкость

Популяция эритроидных клеток по признаку осмотической стойкости в гемолимфе анадары была сравнительно гетерогенна. Первые признаки лизиса ( $H_{10}$ ) были отмечены при 145.9 ± 23.3 мОсм/кг, а завершение ( $H_{90}$ ) – при 39.2 ± 4.5 мОсм/кг (табл. 1). Диапазон резистентности варьировал в пределах 79–134 мОсм/кг. Основная масса клеток разрушалась ( $H_{50}$ ) при 72.3 ± 19.2 мОсм/кг.

Рост значений H<sub>10</sub> показал, что под влиянием сероводородной нагрузки осмотическая стой-

БИОЛОГИЯ МОРЯ том 48 № 6 2022



**Рис. 2.** Интенсивность флуоресценции DCF-DA (а) и R123 (б) эритроцитарных взвесей анадары. Группа 1 – контроль, группа 2 – сутки после внесения Na<sub>2</sub>S, группа 3 – двое суток после внесения Na<sub>2</sub>S.

кость клеток в первые сутки эксперимента (группа 2) понижалась. При этом увеличивалось число высоко устойчивых к осмотическому шоку эритроцитов ( $H_{90}$ ). Полный лизис происходил при 13.4 ± 3.0 мОсм/кг, что в 3 раза (p < 0.05) ниже контрольных значений. Диапазон осмотической резистентности был более широким (145—181 мОсм/кг), это отражало рост гетерогенности эритроидной популяции клеток в присутствии сероводорода.

На вторые сутки эксперимента (группа 3) популяция эритроидных клеток была более однородной. Первые признаки лизиса ( $H_{10}$ ) зарегистрированы при 130.2 ± 11.1 мОсм/кг. Доля высокоустойчивых к лизису клеток ( $H_{90}$ ) оставалась на уровне, отмеченном в первые сутки (19.4 ± 2.8 мОсм/кг), т.е. диапазон резистентности был более узким — 97—125 мОсм/кг. При этом устойчивость к осмотическому шоку основной группы клеток ( $H_{50}$ ) оставалась низкой — 49.6 ± 5.1 мОсм/кг, что составляло лишь 32% от контрольных значений.

#### Конфокальная микроскопия

Окраска клеточной взвеси эритроцитов родамином R123 позволила визуализировать митохондриальные единицы в клетках (рис. 3). В контрольной серии (группа 1) на один эритроцит в среднем приходилось  $7.2 \pm 0.3$  митохондрий. Сероводородная нагрузка оказала негативное влияние на состояние эритроидных клеток. Число митохондрий в них равномерно понижалось:  $4.4 \pm 0.1$ (группа 2) и  $3.5 \pm 0.1$  (группа 3).

#### Светооптическая микроскопия

Эритроциты гемолимфы анадары представляют собой крупные округлые клетки (рис. 4а). Продольный ( $C_1$ ) и поперечный ( $C_2$ ) диаметры имеют близкие значения: 18.9 ± 0.6 и 16.1 ± 0.5 мкм. Средний объем клетки ( $V_c$ ) составляет 678.5 ± 52.0 мкм<sup>3</sup>. Ядро компактное, с высокой долей гетерохроматина, что отражает низкую функциональную активность данной структуры. Форма ядра эллипсоидная ( $N_1 = 5.5 \pm 0.1$  мкм;  $N_2 = 4.1 \pm 0.1$  мкм), объем  $V_n = 50.1 \pm 3.1$  мкм<sup>3</sup>; обычно оно располо-

Таблица 1. Показатели осмотической стойкости эритроидных клеток в норме и в условиях сероводородной нагрузки

Степень лизиса	Длительность эксперимента		
	контроль (группа 1)	24 ч (группа 2)	48 ч (группа 3)
H <sub>10</sub>	$145.9\pm23.3$	$176.3 \pm 15.1$	$130.2 \pm 11.1$
H <sub>50</sub>	$72.3\pm19.2$	$47.8\pm7.7$	$49.6 \pm 5.1$
H <sub>90</sub>	$39.2\pm4.5$	$13.4 \pm 3.0$	$19.4 \pm 2.8$



Рис. 3. Число митохондрий в эритроидных элементах гемолимфы анадары: а – изменение числа R123-положительных митохондрий в условиях сероводородной нагрузки (группа 1 – контроль, группа 2 – сутки после внесения Na<sub>2</sub>S, группа 3 – двое суток после внесения Na<sub>2</sub>S); б – флуоресцентная микроскопия эритроидных элементов гемолимфы, окрашенных R123 (стрелка указывает на функционально активную митохондрию).



**Рис. 4.** Морфологические особенности эритроидных элементов гемолимфы анадары: а – общий вид; б – макроцит; в – клетка с низким содержанием гранулярных включений, менее 30 единиц на клетку.

жено в центре клетки. Цитоплазма ацидофильная с высоким содержанием гемоглобина и большим числом мелких зернистых включений. Внесение Na<sub>2</sub>S в воду аквариума, где содержались моллюски, привело к значительному росту объема клетки и ее ядра (группа 2) (рис. 5). Увеличение составило 24.3 и 30.1% (p < 0.05). На вторые сутки эксперимента (группа 3) картина была противоположной.

Анализ морфологических особенностей эритроцитов показал значительный рост числа макроцитов в гемолимфе моллюска (p < 0.05) в условиях сероводородной нагрузки (первые сутки эксперимента, группа 2) (рис. 4б, 6). Одновременно по-

БИОЛОГИЯ МОРЯ том 48 № 6 2022

вышалось и число клеток с низким уровнем зернистых включений (рис. 4в, 6), однако эти различия были статистически незначимы.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Внесение в воду аквариума Na<sub>2</sub>S привело к существенной модификации условий водной среды, в которой находились особи анадары. Сначала сероводородная нагрузка была нейтрализована присутствием кислорода. Спустя 24 ч (группа 2) сульфиды в воде не были обнаружены, а содержание кислорода понизилось до 1.8 мг O<sub>2</sub>/л, что соответствовало условиям умеренной гипоксии



**Рис. 5.** Объем эритроцитов (а) гемолимфы анадары и их ядер (б). Группа 1 – контроль; группа 2 – сутки после внесения Na<sub>2</sub>S; группа 3 – двое суток после внесения Na<sub>2</sub>S.



**Рис. 6.** Содержание макроцитов (а) и клеток с низким содержанием гранулярных включений (б) в гемолимфе анадары. Группа 1 – контроль; группа 2 – сутки после внесения Na<sub>2</sub>S; группа 3 – двое суток после внесения Na<sub>2</sub>S.

(Rosenberg et al., 2001). Повторное внесение  $Na_2S$  привело практически к полному исчезновению кислорода в воде (0.03 мг  $O_2/л$ ) с сохранением сульфидов на уровне 1.9 мг  $S^{2-}/л$  (группа 3).

Из представленной информации следует, что организму анадары приходилось адаптироваться сначала к условиям кратковременного действия Na<sub>2</sub>S и умеренной гипоксии, а затем к условиям аноксии и продолжительному действию сульфидов.

Анализ функционального состояния митохондрий эритроидных клеток гемолимфы анадары показал отсутствие каких-либо значимых изменений в состоянии органоида в условиях умеренной гипоксии (группа 2). Значения МПМ фактически совпадали с контрольными величинами. При аноксии (группа 3) значения МПМ увеличились более чем в 2 раза, что отражает явное функциональное напряжение. Такая реакция вполне ожидаема. Известно, что анадара длительный период времени способна находиться в условиях аноксии (Zwaan, Babarro, 2002; Солдатов и др., 2009) и удерживать норму потребления кислорода при крайне низком его содержании в среде (Cortesi et al., 1992). Последнее возможно лишь при наличии высокого сродства к кислороду у цитохромоксидазы, что свойственно толерантным к острым формам гипоксии видам (Pierron et al., 2012). Не следует исключать из внимания тот факт, что митохондрии видов, устойчивых к сульфидам, способны использовать эти соединения в качестве субстрата окисления для продукции АТФ, что может привести к росту значений МПМ, как это показано для калифорнийского фундулюса Fundulus parvipinnis (см.: Bagarinao, Vetter, 1990). Процесс утилизации Na<sub>2</sub>S протекает только при его относительно низкой концентрации, что в принципе совпадает с условиями наших экспериментов.

Согласно результатам, полученным при помощи конфокальной микроскопии, токсическая сероводородная нагрузка значительно сокращала число митохондрий в эритроцитах анадары как на первом, так и на втором этапах эксперимента (группы 2 и 3). Показано, что сульфиды способны связываться с цитохромоксидазой, ограничивая ее взаимодействие с кислородом (Cooper, Brown, 2008; Cao et al., 2011). Данный процесс фактически блокирует клеточное дыхание и останавливает функционирование дыхательной цепи митохондрий (гистотоксическая гипоксия). Последнее может сопровождаться лизисом органоидов, что, по-видимому, и наблюдалось. Однако, как следует из результатов настоящей работы, это затрагивало не все митохондрии, часть из них продолжала функционировать, о чем свидетельствовало увеличение их мембранного потенциала. Следовательно, организм анадары способен частично компенсировать СН.

Сероводородная нагрузка приводит к увеличению продукции активных форм кислорода (АФК) в эритроидных клетках анадары, что подтверждалось усилением интенсивности флуоресценции DCF-DA. Необходимо отметить, что эритроидные клетки наряду с выполнением газотранспортной функции являются важным компонентом системы иммунитета моллюска. Уровень АФК в них присутствует постоянно (Кіт et al., 2020; Kladchenko et al., 2020). Известно, что сульфиды индуцируют образование метгемоглобина у рыб (Affonso et al., 2002), которое сопровождается генерацией супероксидного анион-радикала. Данный механизм, возможно, присутствует и у анадары, в гемолимфе которой достаточно высокое содержание эритроцитарного гемоглобина (Новицкая, Солдатов, 2011). АФК должны усиливать процессы перекисного окисления липидов в мембранных структурах эритроцитов. Косвенным подтверждением этого стало снижение осмотической стойкости клеток в первые сутки эксперимента (H<sub>10</sub>). Сероводород нарушает состояние цитоплазматических мембран эритроидных форм, о чем свидетельствует агрегирование эритроцитов. Для анадары это показано нами ранее в условиях экспериментальной сероводородной нагрузки (Солдатов и др., 2018).

Сульфидная нагрузка сопровождалась значительным увеличением объема эритроидных клеток и их ядер (более 20%). Можно допустить, что это следствие развития внешней гипоксии: вначале умеренной (группа 2), затем острой (группа 3). Подобная реакция в условиях дефицита кислорода отмечена у многих видов костистых рыб (Nikinmaa et al., 1987; Holk, 1996; Jensen et al., 1998; Новицкая, Солдатов, 2011). Она получила название "swelling" (набухание) и определяется выбросом адреналина в систему циркуляции (Salama, Nikinmaa, 1990; Val et al., 1998). Последний связывается с β-адренорецепторами клеток и активизирует Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-антипорт, позволяющий стабилизировать величину внутриклеточного рН. Однако подобную схему интерпретации полученных данных невозможно принять в качестве окончательного объяснения, так как этот механизм определяет рост объема клетки не более чем на 5-6% (Nikinmaa et al., 1987). В нашем случае увеличение объема превысило 20% и происходило на фоне роста содержания в гемолимфе макропитов диаметром более 22 мкм. Появление этих клеточных форм, по-видимому, и определило столь значительное увеличение объема эритроидных клеток.

Появление макроцитов в гемолимфе моллюска в условиях сульфидной нагрузки, вероятно, определяется снижением осмотической стойкости и, как следствие, гидратацией цитоплазмы и набуханием клеток. В дальнейшем это может привести к лизису клеток, как отмечено ранее у анадары в условиях повышенных концентраций сульфидов в воде (Солдатов и др., 2018), или стать началом апоптотических изменений, в результате которых клетка после набухания распадается на отдельные фрагменты (апоптотические тельца) (Манских, 2007). В обоих случаях это должно приводить к освобождению зернистых включений.

Зернистые включения эритроидных клеток в значительном количестве содержат гематины (Vismann, 1993; Holden et al., 1994), которые обладают выраженной окислительной способностью, позволяющей им вступать в реакцию с сероводородом (Vismann, 1993). Продуктом данного взаимодействия может быть образование нестойкого сульфида трехвалентного железа, который в присутствии кислорода окисляется с образованием атомарной серы:

$$2\mathrm{Fe}^{3+} + 3\mathrm{S}^{2-} \to \mathrm{Fe}_2\mathrm{S}_3,$$

БИОЛОГИЯ МОРЯ том 48 № 6 2022

$$2Fe_2S_3 + 3O_2 = Fe_2O_3 + 6S^{\circ}$$
.

Показано, что толерантные к сероводородной нагрузке морские беспозвоночные могут накапливать атомарную серу (Powell et al., 1980). Подобный процесс, вероятно, происходит и в организме анадары. Следует также обратить внимание на содержание в гемолимфе анадары эритроидных клеток с пониженным числом зернистых включений. Их количество увеличивалось в присутствии в воде сульфидов. Это позволяет допустить, что эритроциты способны целенаправленно выводить зерна гематина в гемолимфу для нейтрализации Na<sub>2</sub>S.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Функциональные эффекты присутствия сульфидов в воде развиваются у анадары на фоне внешней гипоксии разной интенсивности. Они выражаются в увеличении мембранного потенциала митохондрий при одновременном сокрашении их числа в эритроидных клетках. Снижается осмотическая стойкость эритроцитов на фоне повышения продукции активных форм кислорода. Повышение содержания макроцитов в гемолимфе приводит к существенному увеличению среднеклеточного объема. В эритроидных клетках снижается число содержащих гематин зернистых включений, так как они массово поступают в гемолимфу моллюска. Допускается, что данная совокупность процессов направлена на нейтрализацию высоких концентраций сульфидов в воде.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование осмотической резистентности гемоцитов анадары после воздействия сероводородной нагрузки выполнено в рамках государственной программы AAAA-A18-118021490093-4. Оценку морфометрических и функциональных характеристик гемоцитов (МПМ и продукция активных форм кислорода) проводили в рамках проекта РФФИ 20-04-00037. Конфокальная микроскопия выполнена в рамках Стратегического проекта № 121121700318-1.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беляев В.И., Совга Е.Е. Сероводород в Черном море не взорвется // Пробл. экол. 1991. № 10. С. 47–57.
- Золотницкая Р.П. Методы гемотологических исследований // Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Ред. В.В. Меньшикова. М.: Медицина. 1987. С. 106–148.
- Зуева Н.В., Гришуткин Н.В., Зуев Ю.А. и др. Оценка экологического состояния системы реки Паз по гидроботаническим показателям: Материалы VI Международ. конф. молодых ученых, 1–5 сентября 2020 г. Петрозаводск: ФИЦ "Карельский научный центр РАН", Институт водных проблем Севера КарНЦ РАН.
- Манских В.Н. Пути гибели клетки и их биологическое значение // Цитология. 2007. Т. 49. № 11. С. 909–915.
- Маслов А.В., Подковыров В.Н. Редокс-статус океана 2500-500 млн лет назад: современные представления // Литология и полезные ископаемые. 2018. № 3. С. 207-231. https://doi.org/10.7868/S0024497X18030023
- Миндукшев И.В., Судницына Ю.С., Скверчинская Е.А. и др. Ингибирование реакций эритроцитов на осмотический, аммонийный и окислительный стресс в условиях гипоксии // Биолог. мембраны. 2019. Т. 36. № 5. С. 358–372. https://doi.org/10.1134/S1990747819040081
- Новицкая В.Н., Солдатов А.А. Эритроидные элементы гемолимфы Anadara inaequivalvis (Mollusca: Arcidae) в условиях экспериментальной аноксии: функциональные и морфометрические характеристики // Мор. экол. журн. 2011. Т. Х. № 1. С. 56–64.
- Орехова Н.А., Коновалов С.К. Кислород и сульфиды в донных отложениях прибрежных районов севастопольского региона Крыма // Океанология. 2018. Т. 58. № 5. С. 739–750. https://doi.org/10.1134/S0030157418050106
- Солдатов А.А., Андреенко Т.И., Сысоева И.В., Сысоев А.А. Тканевая специфика метаболизма у двустворчатого моллюска Anadara inaequivalvis Вг. в условиях экспериментальной аноксии // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2009. Т. 45. № 3. С. 284–289.
- Солдатов А.А., Кухарева Т.А., Андреева А.Ю., Ефремова Е.С. Эритроидные элементы гемолимфы двустворчатого моллюска Anadara kagoshimensis (Tokunaga, 1906) в условиях сочетанного действия гипоксии и сероводородной нагрузки // Биол. моря. 2018. Т. 44. № 6. С. 390–394.
- *Ташкэ К.* Введение в количественную цитологическую морфологию. Бухарест: Изд-во АН Социал. Респ. Румынии. 1980. 291 с.
- *Чижевский А.Л.* Структурный анализ движущейся крови. М.: Изд-во АН СССР. 1959. 474 с.
- *Affonso E.G., Polez V.L.P., Correa C.F.* Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia // Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol. 2002. V. 133. P. 375–382.

https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00127-8

*Affonso E.G., Polez V.L.P., Correa C.F.* Metabolic and blood responses of *Hoplosternum littorale* (Siluriformes, Callichthyidae) exposed to acute hydrogen sulfide // Proc.

БИОЛОГИЯ МОРЯ том 48 № 6 2022

Int. Congr. Biol. Fish "Fish Response to Toxic Environments". Baltimore MD: Towson Univ. 1998. P. 153–167.

- Arp A.J., Childress J.J. Blood function in the hydrothermal vent vestimentiferan tube worm // Science. 1981. V. 213. P. 342–344. https://doi.org/10.1126/science.213.4505.342
- Arp A.J., Childress J.J. Sulfide binding by the blood of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* // Science. 1983. V. 219. P. 295–297. https://doi.org/10.1126/science.219.4582.295
- Bagarinao T. Sulfide as an environmental factor and toxicant: tolerance and adaptations in aquatic organisms // Aquat. Toxicol. 1992. V. 24. P. 21–62. https://doi.org/10.1016/0166-445X(92)90015-F
- Bagarinao T., Vetter R.D. Oxidative detoxification of sulfide by mitochondria of the California killifish Fundulus parvipinnis and the speckled sanddab Citharichthys stigmaeus // J. Comp. Physiol. B. 1990. V. 160. P. 519–527. https://doi.org/10.1007/BF00258979
- Bagarinao T., Vetter R.D. Sulphide tolerance and adaptation in the California killifish, Fundulus parvipinnis, a salt marsh resident // J. Fish Biol. 1993. V. 42. P. 729–748. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1993.tb00381.x
- Brauner C.J., Ballantyne C.L., Randall D.J., Val A.L. Air breathing in the armoured catfish (Hoplosternum littorale) as an adaptation to hypoxic, acidic, and hydrogen sulphide rich waters // Can. J. Zool. 1995. V. 73. P. 739–744.

https://doi.org/10.1139/z95-086

Cao Y., Wang H.G., Cao Y.Y. et al. Inhibition effects of protein-conjugated amorphous zinc sulfide nanoparticles on tumor cells growth // J. Nanopar. Res. 2011. V. 13. № 7. P. 2759.

https://doi.org/10.1007/s11051-010-0163-4

- Cooper C.E., Brown G.C. The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance // J. Bioenerg. Biomemebr. 2008. V. 40. P. 533–539. https://doi.org/10.1007/s10863-008-9166-6
- Cortesi P., Cattani O., Vitali G. et al. Physiological and biochemical responses of the bivalve Scapharca inaequivalvis to hypoxia and cadmium exposure: Erythrocytes versus other tissues // Sci. Total Environ., in Marine Coastal Eutrophication, Proceedings of an International Conference. Bologna, Italy. 21–24 March, 1990, 1992, P. 1041–1053. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-89990-3.50090-0

*Grieshaber M.K., Völkel S.* Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide // Annu. Rev. Physiol. 1998. V. 60. P. 33–53.

https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.33

- Holden J.A., Pipe R.K., Quaglia A., Ciani G. Blood cells of the arcid clam, Scapharca inaequivalvis // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 1994. V. 74. № 2. P. 287–299. https://doi.org/10.1017/S0025315400039333
- *Holk K.* Effects of isotonic swelling on the intracellular Bohr factor and the oxygen affinity of trout and carp blood // Fish Physiol. Biochem. 1996. V. 15. P. 371–375. https://doi.org/10.1007/BF01875579

БИОЛОГИЯ МОРЯ том 48 № 6 2022

- Houchin D.N., Munn J.I., Parnell B.L. A method for the measurement of red cell dimensions and calculation of mean corpuscular volume and surface area // Blood. 1958. V. 13. № 12. P. 1185–1191. https://doi.org/10.1182/blood.V13.12.1185.1185
- Jensen F.B., Fago A., Weber R.E. Hemoglobin structure and function // Fish Physiol. 1998. V. 17. P. 1–40. https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60257-5
- Kim J.H., Lee H.M., Cho Y.G. et al. Flow cytometric characterization of the hemocytes of blood cockles Anadara broughtonii (Schrenck, 1867), Anadara kagoshimensis (Lischke, 1869), and Tegillarca granosa (Linnaeus, 1758) as a biomarker for coastal environmental monitoring // Marine Pollution Bulletin. 2020. V. 160. P. 111654. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111654
- Kladchenko E.S., Andreyeva A.Y., Kukhareva T.A., Soldatov A.A. Morphologic, cytometric and functional characterisation of Anadara kagoshimensis hemocytes // Fish Shellfish Immunol. 2020. V. 98. P. 1030–1032. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.061
- Kladchenko E.S., Andreyeva A.Y., Mindukshev I.V., Gambaryan S. Cellular osmoregulation of the ark clam (Anadara kagoshimensis) hemocytes to hyposmotic media // J. Exp. Zool. Part A: Ecol. Integr. Physiol. 2022. P. 1–6.

https://doi.org/10.1002/jez.2578

- Mindukshev I., Kudryavtsev I., Serebriakova M. et al. Flow cytometry and light scattering technique in evaluation of nutraceuticals // Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity. 2016. P. 319–332. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00024-3
- Miyamoto Y., Iwanaga C. Effects of sulphide on anoxiadriven mortality and anaerobic metabolism in the ark shell Anadara kagoshimensi // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 2017. V. 97. Iss. 2. P. 329–336. https://doi.org/10.1017/S0025315416000412
- Nakano T., Yamada K., Okamura K. Duration rather than frequency of hypoxia causes mass mortality in ark shells Anadara kagoshimensis // Mar. Pollut. Bull. 2017. V. 125. № 1–2. P. 86–91. https://doi.org/ https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.073
- Nikinmaa M., Cech J.J., Ryhaenen L., Salama A. Red cell function of carp (*Cyprinus carpio*) in acute hypoxia // J. Exp. Biol. 1987. V. 47. № 1. P. 53–58.
- Peterson L.C., Haug G.H. Variability in the mean latitude of the Atlantic Intertropical Convergence Zone as recorded by riverine input of sediments to the Cariaco Basin (Venezuela) // Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology. 2006. V. 234. № 1. P. 97–113. https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2005.10.021
- Pierron D., Wildman D.E., Hüttemann M. et al. Cytochrome-c-oxidase: Evolution of control via nuclear subunit addition // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1817. № 4. P. 590–597. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2011.07.007
- Powell E.N., Crenshow M.A., Rieger R.W. Adaptations to sulfide in sulfide-system meiofauna. Endproducts of sulfide detoxification in three turbellarians and a gastrotrich // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1980. V. 2. P. 169–177. https://booksite.elsevier.com/9780123748553/01~BIB.PDF
- Rosenberg R., Nilsson H.C., Diaz R.J. Response of benthic fauna and changing sediment redox profiles over a hy-

poxic gradient // Estuar. Coastal Shelf Sci. 2001. V. 53. P. 343–350. https://doi.org/10.1006/ecss.2001.0810

- Salama A., Nikinmaa M. Effect of oxygen tension on catecholamine-induced formation of cAMP and on swelling of carp red blood cells // Am. J. Physiol.: Cell Physiol. 1990. V. 259. P. C723–C726. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1990.259.5.C723
- Sergeeva N.G., Ürkmez D., Revkova T. Meiobenthic nematodes at the deep oxic/anoxic boundary of the Black Sea (Istanbul Strait Outlet Area) with new records for Turkey // Reg. Stud. Mar. Sci. 2021. V. 46. Article № 101904. https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101904
- Stewart F.J., Cavanaugh C.M. Bacterial endosymbioses in Solemya (Mollusca: Bivalvia) – model systems for studies of symbiont-host adaptation // Antonie van Leeuwenhoek. 2006. V. 90. P. 343–360. https://doi.org/10.1007/s10482-006-9086-6
- *Tobler M., DeWitt T.J., Schlupp I.* Toxic hydrogen sulfide and dark caves: phenotypic and genetic divergence across two abiotic environmental gradients in *Poecelia mexicana* // Evolution. 2008. V. 62. P. 2643–2649. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00466.x
- Tobler M., Palacios M., Chapman L.J. et al. Evolution in extreme environments: replicated phenotypic differentiation in livebearing fish inhabiting sulfidic springs //

Evolution. 2011. V. 65. № 8. P. 2213–2228. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01298.x

- Val A.L., De Menezes G.C., Wood C.M. Red blood cell adrenergic responses in Amazonian teleosts // J. Fish Biol. 1998. V. 52. P. 83–93. № 1. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb01554.x
- Vismann B. Hematin and sulfide removal in hemolymph of the hemoglobin-containing bivalve Scapharca inaequivalvis // Mar. Ecol.: Prog. Ser. 1993. V. 98. P. 115–122. https://doi.org/10.3354/meps098115
- Völkel S., Berenbrink M. Sulphaemoglobin formation in fish: a comparison between the haemoglobin of sulphide-sensitive rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) and of the sulphide-tolerant common carp (Cyprinus carpio) // J. Exp. Biol. 2000. V. 203. P. 1047–1058. https://doi.org/10.1242/jeb.203.6.1047
- Wu B., Teng H., Yang G. Hydrogen sulfide inhibits the translational expression of hypoxia-inducible factor-1α // Br. J. Pharmacol. 2012. V. 167. P. 1492–1505. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02113.x
- Zeng Y., Huo Y., Yang H. Immunological assays of hemocytes in the Northern Quahog *Mercenaria mercenaria* // Fish Shellfish Immunol. 2021. V. 118. P. 261–269. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.09.006
- Zwaan A., Babarro J.M.F. Anoxic survival potential of bivalves: (arte)facts // Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol. 2002. V. 131. № 3. P. 615–624. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00513-X

# Morphofunctional Characterisitics of Erythroid Cells of the Hemolymph of the Bivalve Anadara kagoshimensis (Tokunaga, 1906) under Hydrogen Sulfide Load

A. A. Soldatov<sup>*a*, *b*</sup>, E. S. Kladchenko<sup>*a*</sup>, V. N. Rychkova<sup>*a*</sup>, T. A. Kukhareva<sup>*a*</sup>, A. O. Lantushenko<sup>*b*</sup>, and Ya. V. Meger<sup>*b*</sup>

<sup>a</sup>A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, RAS, Sevastopol 299011, Russia

<sup>b</sup>Sevastopol State University, Sevastopol 299053, Russia

The effect of hydrogen sulfide load (HSL) on the morphological and functional characteristics of erythroid elements of the hemolymph of the bivalve mollusk *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) was studied under experimental conditions. The experiment was performed on adults with a shell height of 26–38 mm. The control group of animals was kept in an aquarium with an oxygen concentration of 7.0–7.1 mg  $O_2/L$  (normoxia). The experimental group was exposed to the action of HSL created by dissolving  $Na_2S$  in water to a final concentration of 6 mg 6 mr  $S^{2-}/L$ . A day later, the oxygen concentration in the water was 1.8 mg  $S^{2-}/L$ , and hydrogen sulfide was not detected. Some of the mollusks were re-stressed with hydrogen sulfide by adding  $Na_2S$  to a final concentration of 9 mg  $S^{2-}/L$ . By the end of the second day, 1.9 mg  $S^{2-}/L$  were recorded with a trace oxygen concentration of 0.03 mg  $O_2/L$  in water. The combined effect of sulfides and hypoxia of varying intensity caused a number of unambiguous changes in the functional state of erythroid cells of the ark clams: the membrane potential of mitochondria increased, while the number of mitochondria in cells decreased; against the background of increase production of reactive oxygen species, the osmotic resistance of erythrocytes decreased. Due to the increase in the content of macrocytes in the hemolymph, the average cell volume increased significantly. In erythrocytes, the number of hematin-containing granular inclusions decreased, they massively moved into the hemolymph of the mollusk. It is assumed that the combination of these processes is aimed at neutralization of high concentrations of sulfides in the environment.

Keywords: mollusks, Anadara kagoshimensis (Tokunaga, 1906), hydrogen sulfide, hemolymph, erythroid elements