

УДК 594.1+576.3

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ГЕМОЛИМФЫ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *ANADARA BROUGHTONII* (SCHRENCK, 1867) (ЯПОНСКОЕ МОРЕ)

© 2023 г. Е. С. Кладченко<sup>1</sup>\*, Т. А. Кухарева<sup>1</sup>, В. Н. Рычкова<sup>1</sup>, Э. С. Челебиева<sup>1</sup>, А. Ю. Андреева<sup>1</sup>

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

\*e-mail: [kladchenko\\_ekaterina@bk.ru](mailto:kladchenko_ekaterina@bk.ru)

Поступила в редакцию 30.08.2022 г.

После доработки 09.01.2023 г.

Принята к публикации 26.01.2023 г.

Клетки гемолимфы анадары Броутона *Anadara broughtonii* исследовали с помощью световой микроскопии, проточной цитометрии и градиентного центрифугирования. Все три метода анализа позволили идентифицировать в гемолимфе двустворчатого моллюска *A. broughtonii* два основных типа клеток – крупные гранулярные эритроциты и небольшие агранулярные амебоциты. Эритроциты составили  $95.6 \pm 0.9\%$  от общего количества клеток гемолимфы. Эритроциты представляли собой гемоглобин-содержащие клетки с большим числом гранул в цитоплазме, низким ядерно-цитоплазматическим отношением (ЯЦО) и более низкой интенсивностью клеточного дыхания по сравнению с амебоцитами. Амебоциты – клетки преимущественно неправильной формы с высоким ЯЦО, не содержащие или содержащие не более 10 гранулярных включений в цитоплазме. Все типы гемоцитов, обнаруженные в гемолимфе анадары, продемонстрировали одинаковую способность к спонтанной продукции активных форм кислорода. Впервые показано, что эритроциты анадары Броутона способны к фагоцитозу, однако они поглощали в среднем в 2 раза меньше частиц зимозана ( $5.3 \pm 0.1$  шт.), чем амебоциты ( $10.3 \pm 0.7$  шт.).

**Ключевые слова:** анадара, гемоциты, фагоцитоз, активные формы кислорода

**DOI:** 10.31857/S0134347523030087, **EDN:** SBJWRE

Двустворчатый моллюск анадара Броутона *Anadara broughtonii* (Schrenck, 1867) – массовый вид и ценный объект прибрежного промысла в Приморском крае Российской Федерации (Афейчук, 2021). Несмотря на широкое распространение анадары, экономическая эффективность ее разведения может зависеть от факторов окружающей среды. Стрессовые факторы в первую очередь способствуют подавлению наиболее энергозатратных функций организма, таких как способность к иммунному ответу. Колебания температуры воды, солености и концентрации кислорода, а также патогены и загрязнения могут стать причиной вспышки заболеваний на фермах и массовой гибели моллюсков (Rosa et al., 2015; Parisi et al., 2017). Для снижения рисков негативного влияния абиотических, биотических и антропогенных факторов среды на продуктивность хозяйств марикультуры необходимо на регулярной основе контролировать не только численность, но и физиологический статус моллюсков, в частности состояние их иммунной системы.

Гемоциты как клетки, участвующие в транспорте веществ, пищеварении, заживлении тканей

и неспецифическом клеточном иммунном ответе, являются общепринятым модельным объектом для оценки общего функционального статуса организма двустворчатых моллюсков (Анисимова, 2013; Mello et al., 2012; Bachère et al., 2015; Mattozzo et al., 2016). Наиболее целесообразна комплексная оценка показателей неспецифического иммунитета (Kolyuchkina, Ismailov, 2011; Novoa, Figueras, 2012; Gerdol et al., 2018), проводимая с применением методов проточной цитометрии и световой микроскопии (Allam et al., 2002; Travers et al., 2008). Проточная цитометрия позволяет быстро оценить функциональные характеристики гемоцитов, такие как уровень генерации активных форм кислорода (АФК), фагоцитарная активность, скорость пролиферации и т.д. Вместе с тем для интерпретации результатов исследования необходима четкая классификация клеток гемолимфы, основанная не только на морфологической, но и на функциональной характеристике гемоцитов.

Клеточные типы гемолимфы стали предметом обсуждений в 1970-х годах, однако до настоящего времени нет единого мнения об их классифика-

ции (De la Ballina et al., 2022). Клеточный состав гемолимфы двустворчатых моллюсков и морфофизиологические особенности гемоцитов могут варьировать в достаточно широком диапазоне как среди представителей одного семейства, так и среди особей одного вида, что следует учитывать при анализе и интерпретации данных (Cao et al., 2003; Donaghy et al., 2009; Andreyeva et al., 2019; Kim et al., 2020; Kladchenko et al., 2022). Это разнообразие частично можно объяснить истинными межвидовыми различиями, но в большинстве случаев оно скорее связано с отсутствием унификации критериев и экспериментальных схем. В преобладающем числе работ выделение тех или иных типов гемоцитов основано на морфологических особенностях клеток, а именно гранулярности или окраске цитоплазмы (базофильной или эозинофильной) (Анисимова, 2013; Funakoshi, 2000; De la Ballina et al., 2022; Fonseca et al., 2022).

Ряд авторов выделяют дополнительные подтипы, основываясь на размерных характеристиках клеток, например, малые, средние и крупные гемоциты (Присный и др., 2011; Ford et al., 1994; De la Ballina et al., 2022). Функциональная характеристика гемоцитов, хотя и является предметом изучения, выбирается авторами в качестве основного критерия для их классификации лишь в некоторых работах. Комбинация классического морфологического подхода с методом проточной цитометрии и дальнейшее сопоставление морфофункциональных особенностей гемоцитов у разных видов *Vivalvia* могут стать фундаментальной основой для общей номенклатуры клеток гемолимфы двустворчатых моллюсков.

С точки зрения классификации гемоцитов *Vivalvia* наиболее “проблемной” группой являются представители семейства Arcidae. Сведения о клетках их гемолимфы фрагментарны, и большинство данных ограничивается описанием морфотипов гемоцитов на основании световой и электронной микроскопии (Cohen, Nemhauser, 1980; Holden et al., 1994; De Zwaan et al., 1995; Novitskaya, Soldatov, 2013; Zhou et al., 2013, 2017, 2019; Nameed et al., 2018). В зависимости от выбранного критерия, у гемоглобин-содержащих моллюсков выделяли от 2 до 5 типов клеток (Rodrick, Ulrich, 1984; Holden et al., 1994; Kolyuchkina, Ismailov, 2011; Dang et al., 2013; Zhou et al., 2013, 2017, 2019; Nameed et al., 2018; Kim et al., 2020). Отдельно стоит отметить подход к классификации гемоцитов *A. broughtonii* Чжоу с соавторами (Zhou et al., 2013, 2017, 2019), которые провели идентификацию типов клеток в гемолимфе *Scapharca broughtonii* (= *A. broughtonii*) по аналогии с классификацией клеток крови позвоночных, выделив 3 типа — эритроциты, лейкоциты и тромбоциты. Прямое сопоставление морфологических и функциональных характеристик гемоцитов представителей семей-

ства *Arcidae* с особенностями системы крови позвоночных можно объяснить наличием гемоглобина в эритроцитах анадары. На этом основании ряд авторов приходит к выводу, что основной функцией эритроцитов анадары, как и эритроцитов позвоночных, является транспорт кислорода, при этом исключается их роль в иммунном ответе (Dang et al., 2013; Kim et al., 2020; De la Ballina et al., 2022). Однако, согласно литературным данным, доля эритроцитов у анадары составляет более 80% от общего числа гемоцитов (Dang et al., 2013). У двустворчатых моллюсков отсутствует специфический иммунитет, поэтому маловероятно, что преобладающий тип клеток не задействован в иммунном ответе.

Слабая изученность функциональной роли клеток гемолимфы анадары и отсутствие оценки степени участия гемоцитов в реализации иммунного ответа определили цель настоящей работы — исследовать особенности морфологии и функциональной специализации клеток гемолимфы *A. broughtonii*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Взрослых особей *Anadara broughtonii* обоих полов (длина створки  $80.5 \pm 9.0$  мм, масса  $216.5 \pm 12.9$  г,  $n = 15$ ) отлавливали в прибрежной зоне зал. Петра Великого, Японское море ( $42.46^\circ$  N,  $131.51^\circ$  E) в июне 2021 г. Для акклиматизации к лабораторным условиям моллюсков помещали на 7 сут в 50-литровые аквариумы с искусственной морской водой (соленость  $33.0 \pm 0.5\text{‰}$ ) и содержали при температуре воды  $15 \pm 1^\circ\text{C}$ , pH 8.0 и концентрации растворенного кислорода 7.9–8.3 мг  $\text{O}_2/\text{л}$ . Гемолимфу (2–4 мл) отбирали из экстрапалиальной полости моллюсков. В работе использовали индивидуальные образцы клеток. После забора образцы гемолимфы немедленно помещали в стерильные пластиковые пробирки. Все манипуляции с клетками проводили при температуре  $4^\circ\text{C}$  для предотвращения склеивания и агрегации гемоцитов. Образцы гемолимфы отфильтровывали от крупных фрагментов и агрегатов (диаметр ячейки фильтра 20 мкм, Minisart® PA, Sartorius, Германия) и центрифугировали в рефрижераторной центрифуге Eppendorf 5430R (Германия) (500 г, 5 мин). Клетки трижды отмывали от плазмы в эквивалентном объеме стерильной морской воды (500 г, 5 мин). По окончании отмывки часть (1–2 мл) концентрированных клеток гемолимфы моллюсков использовали для приготовления мазков и разделения клеток в градиенте плотности для последующего морфометрического анализа. Оставшуюся часть гемоцитов ресуспендировали в стерильной морской воде (концентрация клеток  $2\text{--}4 \times 10^6$  кл/мл) для анализа методом проточной цитометрии.

*Метод оптической микроскопии*

Окраску мазков проводили по комбинированному методу Паппенгейма. Мазки анализировали при помощи люминесцентного микроскопа Biomed PR-2 Lum (Россия), оборудованного камерой Levenhuk C NG Series (США). Диаметр клетки (без учета псевдоподий) и ядра измеряли в программе ImageJ 1.44 р. На каждом мазке подсчитывали минимум 1000 клеток. Ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{ЯЦО} = \frac{\text{Диаметр ядра}}{\text{Диаметр гемоцита}}.$$

*Метод проточной цитометрии*

Измерения проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США), оборудованном однофазным аргоновым лазером (длина волны 488 нм). Каждое измерение выполняли в трех повторностях. Для каждого измерения записывали 50000 событий. Об изменении характера флуоресценции красителей и светорассеяния клеток судили по безразмерным двухпараметрическим логарифмическим диаграммам в программе Kaluza Analysis 2.0.

Гемоциты дифференцировали от дебриса по интенсивности флуоресценции красителя SYBR Green I (Merck, Германия). Финальная концентрация красителя в пробе составила 10 мкМ, гемоциты соответствовали пику флуоресценции красителя. Окраску проводили в течение 30 мин в темноте при 4°C и анализировали на проточном цитофлуориметре. Для определения размеров гемоцитов прибор калибровали перед каждым анализом с помощью флуоресцентных латексных микрочастиц (Merck, Германия). Идентификацию типов гемоцитов анадары проводили на основании распределения клеток по величине условного размера (прямое светорассеяние, FS) и гранулярности (боковое светорассеяние, SS) на двухпараметрических точечных диаграммах.

Уровень спонтанной (нестимулированной) продукции АФК гемоцитами моллюсков анализировали на основании интенсивности окрашивания клеток красителем 2',7'-дихлорофлуоресцеин диацетат (DCF-DA) (Sigma-Aldrich, США); 1 мл суспензии гемоцитов инкубировали с 10 мкл раствора DCF-DA в течение 30 мин в темноте. Финальная концентрация красителя в пробе составила 10 мкМ. Интенсивность флуоресценции красителя анализировали в канале FL1.

Величину мембранного потенциала митохондрий определяли на основании оценки уровня флуоресценции гемоцитов, окрашенных флуоресцентным зондом родамин 123 (Rh123) (Sigma-Aldrich, США). Суспензию гемоцитов (1 мл) ин-

кубировали с 10 мкл Rh123 в течение 45 мин в темноте (финальная концентрация красителя в пробе составила 0.1 мг/мл). Интенсивность флуоресценции клеток оценивали в канале FL1 проточного цитофлуориметра.

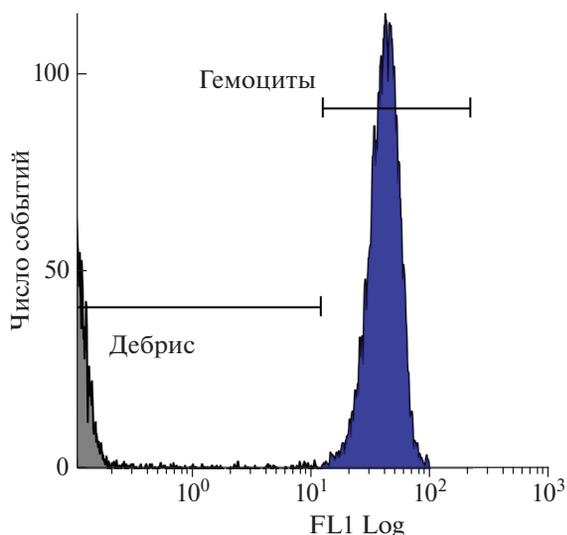
Жизнеспособность гемоцитов определяли с использованием флуоресцентного красителя йодистого пропидия (PI) (Sigma-Aldrich, США). К 1 мл суспензии гемоцитов добавляли 10 мкл раствора PI и инкубировали в темноте в течение 30 мин при 4°C. Долю мертвых клеток в общем числе гемоцитов оценивали по гистограмме флуоресценции PI в канале FL2 проточного цитофлуориметра.

*Метод конфокальной микроскопии*

Для оценки способности гемоцитов фагоцитировать чужеродные частицы применяли флуоресцентно-меченый зимозан (Abcam, Великобритания). Интенсивность фагоцитоза оценивали согласно протоколу производителя. Суспензию гемоцитов (10 мкл) разводили в 90 мкл стерильной морской воды и инкубировали с раствором зимозана (40 мкл) в течение 90 мин при температуре 20°C в темноте. По окончании времени инкубации гемоциты трижды отмывали от частиц зимозана в эквивалентном объеме стерильной морской воды (5 мин, 400 г) и проводили прижизненную микрофотосъемку на конфокальном микроскопе Leica Stellaris 5 (Leica Microsystems, Германия). Фотосъемку осуществляли в проходящем свете с использованием флуоресцентного фильтра (488 нм), для визуализации границ клеток делали микрофотографии с помощью метода фазового контраста. На микрофотографиях визуально оценивали способность разных типов гемоцитов к фагоцитозу.

*Метод градиентного центрифугирования*

Разделение гемоцитов при помощи изоосмотического сорбента Percoll (Sigma-Aldrich, США) проводили согласно рекомендациям производителя путем создания градиента плотности и центрифугирования пробирок объемом 1.5 мл при 15000 g в течение 20 мин (центрифуга Eppendorf 5430R, Германия). После создания плотностного градиента (10, 20, 30 и 40% Percoll) поверх рабочего раствора сорбента в пробирки наслаивали 0.25 мл суспензии гемоцитов для последующего центрифугирования в течение 10 мин при 800 g. Слои клеток каждого градиента отбирали в отдельные пробирки объемом 1.5 мл. Отмывку гемоцитов от частиц сорбента производили в эквивалентном объеме стерильной морской воды в течение 10 мин при 200 g (3 раза). Полученные суспензии клеток каждой фракции анализировали на про-



**Рис. 1.** Распределение гемоцитов двустворчатого моллюска *Anadara broughtonii*, окрашенных SYBR Green I, по содержанию ДНК: FL1 – интенсивность флуоресценции в канале FL1 проточного цитофлуориметра.

точном цитофлуориметре Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США).

#### Статистическая обработка данных

Статистическую обработку проводили с помощью программного обеспечения RStudio версия 4.1.0. Нормальность распределения проверяли при помощи теста Колмогорова-Смирнова. Данные световой микроскопии подчинялись нормальному закону распределения, поэтому для выявления различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA). Достоверность результатов проверяли при помощи критерия Тьюки с доверительным интервалом 95%. Данные по функциональным показателям гемоцитов не подчинялись нормальному закону распределения, поэтому их анализировали при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни. Результаты выражали как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Клеточный состав гемолимфы *Anadara broughtonii*

Гемоциты, согласно данным проточной цитометрии, имели высокий коэффициент вариации (CV) диплоидного пика ДНК –  $22.1 \pm 1.2\%$  (рис. 1). Доля мертвых гемоцитов в образцах не превышала 2%.

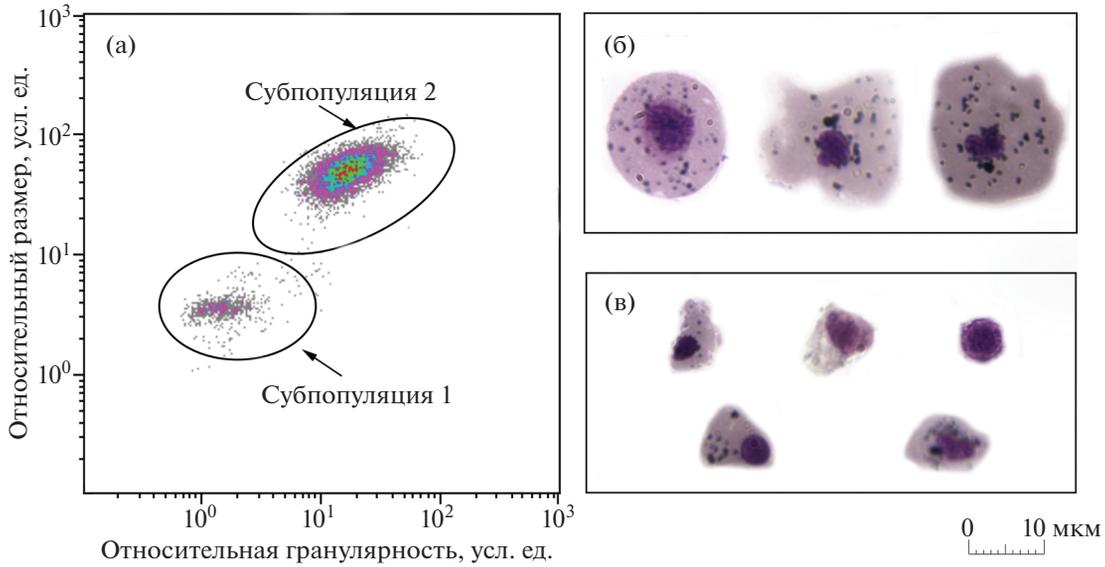
В гемолимфе анадары с помощью цитометрического и микроскопического анализа идентифи-

цированы 2 типа клеток: амебоциты и эритроциты (рис. 2а). Амебоциты (рис. 2в) – клетки наименьшего размера с диаметром в пределах от 4.5 до 8 мкм (в среднем  $6.2 \pm 0.1$  мкм) (рис. 3а). Они характеризовались высоким ЯЦО ( $0.6 \pm 0.01$ ) (рис. 3в), имели преимущественно округлую, реже амебовидную форму и ацентрично расположенное ядро диаметром  $3.7 \pm 0.1$  мкм (рис. 3б), занимающее большую часть базофильной цитоплазмы. У некоторых клеток цитоплазма имела эозинофильную окраску, гранулы в цитоплазме большинства из них отсутствовали. Однако среди клеток встречались единичные амебоциты, содержащие до 10 гранулярных включений.

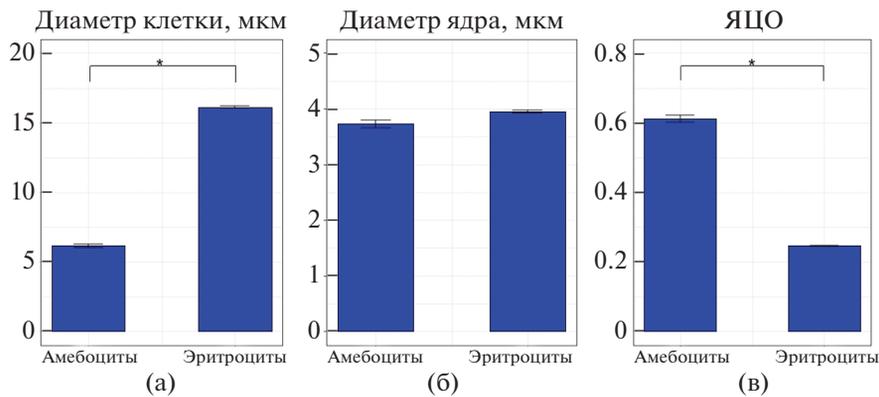
Наиболее крупные клетки гемолимфы – эритроциты (рис. 2б) – имели овальную, округлую либо амебовидную форму и базофильную цитоплазму, содержащую до 50 гранул. Средний диаметр клеток этого типа составил  $16.1 \pm 0.1$  мкм, минимальный – 10 мкм, а максимальный – 24 мкм. Средний диаметр эритроцитов достоверно отличался от среднего диаметра амебоцитов ( $p \leq 0.05$ ,  $n = 15$ ) (рис. 3а). Небольшое относительно цитоплазмы округлое ядро эритроцитов (средний диаметр  $3.9 \pm 0.02$  мкм) (рис. 3б), располагалось ацентрично (рис. 2б). ЯЦО составило  $0.3 \pm 0.002$  (рис. 3в).

Методом проточной цитометрии также выявлены две субпопуляции клеток, которые достоверно отличались по показателям относительного размера и уровня гранулярности ( $p \leq 0.05$ ,  $n = 15$ ) (рис. 4). Согласно данным калибровки латексными микросферами, средний диаметр клеток субпопуляции 1 соответствовал 5–8 мкм. Эта субпопуляция, предположительно состоящая из амебоцитов, была гетерогенной по значениям FS и SS. Клетки, входящие в ее состав, имели диаметр меньший, чем клетки субпопуляции 2, и невысокий уровень гранулярности. Вытянутость облака распределения клеток по оси SS (рис. 2а) свидетельствует о большом разбросе уровня гранулярности клеток в субпопуляции. Доля амебоцитов в гемолимфе составила  $4.4 \pm 0.9\%$ . Субпопуляция 2 также была неоднородна по значениям прямого и бокового светорассеяния и имела сравнительно высокие значения показателя FS, что соответствовало среднему диаметру клеток 13–16 мкм. Клетки субпопуляции 2 были идентифицированы как эритроциты, их доля составила  $95.6 \pm 0.9\%$  от общего числа клеток.

В результате центрифугирования в градиенте плотности Percoll в гемолимфе анадары выделены 2 фракции клеток (рис. 5). Нижняя фракция (40% Percoll), согласно микроскопическому анализу, сформирована преимущественно гранулярными клетками – эритроцитами, а верхняя (30% Percoll) – мелкими агранулярными клетками. В каждом слое присутствовали единичные клетки



**Рис. 2.** Клеточный состав гемолимфы двустворчатого моллюска *Anadara broughtonii*: а – распределение клеток гемолимфы на основании прямого (относительный размер) и бокового (относительная гранулярность) светорассеяния, субпопуляции клеток выделены овалами и обозначены цифрами 1 и 2; б – микрофотографии эритроцитов; в – амебоцитов.



**Рис. 3.** Размерные характеристики (а – диаметр клетки, б – диаметр ядра, в – ЯЦО) клеток гемолимфы двустворчатого моллюска *Anadara broughtonii*. \*Различия между группами достоверны при  $p < 0.05$ .

нетипичного размера: мелкие эритроциты обнаружены в верхнем градиентном слое, а крупные агранулоциты – в нижнем. Анализ методом проточной цитометрии каждой из двух фракций гемолимфы показал, что субпопуляция 1 на цитограммах соответствует клеткам верхней фракции, т.е. преимущественно амебоцитам, в то время как наиболее массовая субпопуляция 2 сформирована в основном эритроцитами из нижней фракции.

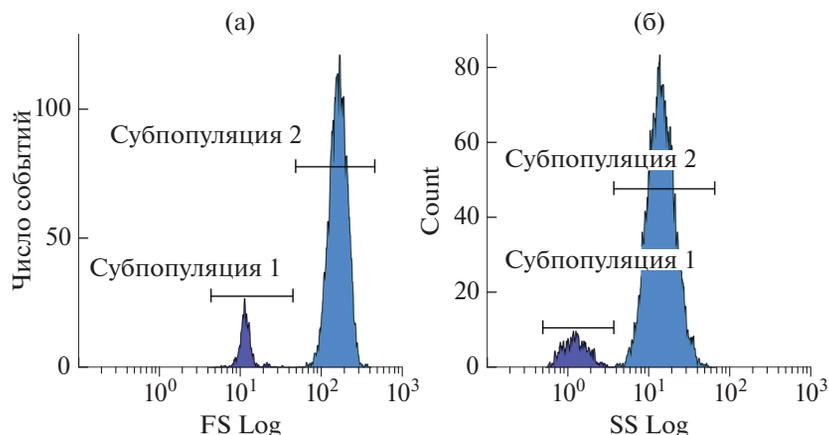
*Функциональные показатели гемоцитов*

Уровень продукции АФК, который оценивали по флуоресценции красителя DCF-DA, для крупных клеток субпопуляции 2 составил  $91.1 \pm 5.3$  усл. ед., для

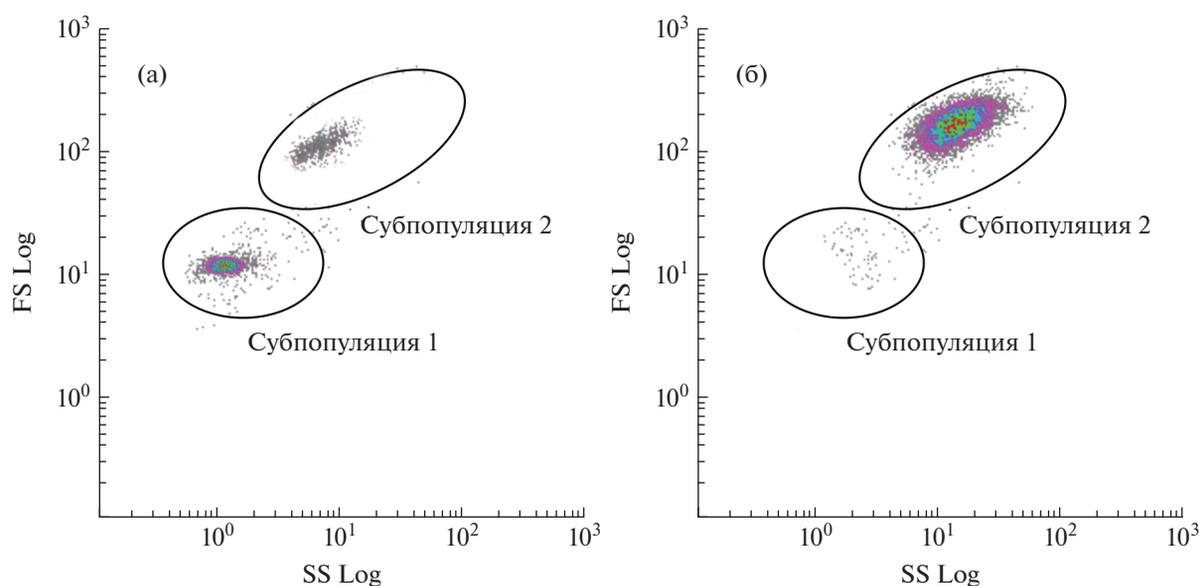
мелких клеток субпопуляции 1 –  $102.2 \pm 9.0$  усл. ед. (рис. 6а). Однако различия не были достоверны ( $p \geq 0.05$ ,  $n = 15$ ).

Наиболее высокая интенсивность клеточного дыхания ( $215.5 \pm 11.4$  усл. ед.) характерна для амебоцитов – агранулярных клеток субпопуляции 1, у которых уровень флуоресценции Rh123 более чем в 2 раза выше, чем у гранулярных клеток субпопуляции 2 – эритроцитов ( $98.5 \pm 6.6$  усл. ед.) ( $p \leq 0.05$ ,  $n = 15$ ) (рис. 6б).

В настоящем исследовании показано, что оба типа гемоцитов анадары способны к поглощению частиц зимозана (рис. 7). При этом способность к фагоцитозу у амебоцитов была выше, чем у эритроцитов: амебоциты поглощали в среднем  $10.3 \pm 0.7$  шт.



**Рис. 4.** Цитометрический анализ субпопуляций клеток гемолимфы двустворчатого моллюска *Anadara broughtonii*: а – условный диаметр клеток, б – уровень гранулярности клеток.



**Рис. 5.** Цитометрический анализ клеточных фракций гемолимфы двустворчатого моллюска *Anadara broughtonii*, полученных методом градиентного центрифугирования в разделяющей среде Percoll: клетки верхней (а) и нижней (б) фракций.

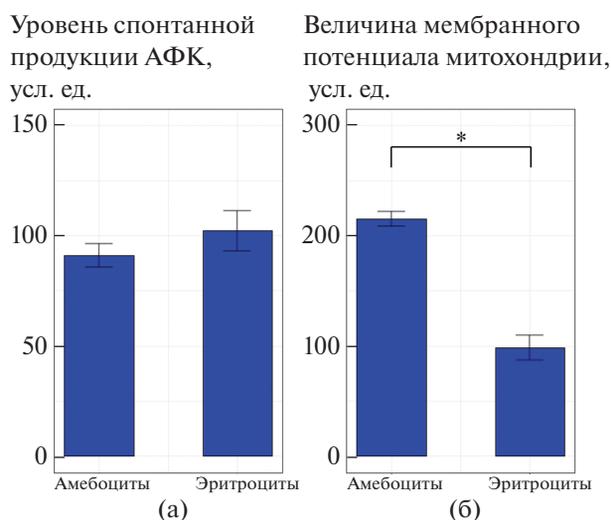
частиц зимозана, в то время как эритроциты –  $5.3 \pm 0.1$  шт.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В зависимости от принципа, положенного в основу классификации клеток, в гемолимфе представителей рода *Anadara* выделяют от 2 до 5 типов гемоцитов (Rodrick, Ulrich, 1984; Holden et al., 1994; Kolyuchkina, Ismailov, 2011; Dang et al., 2013; Nameed et al., 2018; Kim et al., 2020; Zhou et al., 2013, 2017, 2019). На основании результатов световой микроскопии, проточной цитометрии и градиентного центрифугирования мы идентифи-

цировали в гемолимфе *A. broughtonii* 2 типа гемоцитов: амебоциты и эритроциты.

Обнаруженные на мазках наиболее мелкие клетки – амебоциты – формировали субпопуляцию 1 на цитометрических диаграммах и составляли верхнюю фракцию в градиенте плотности Percoll. Этот тип клеток упоминается во всех работах по описанию клеточного состава гемолимфы гемоглобин-содержащих моллюсков *Anadara trapezia*, *A. kagoshimensis*, *A. broughtonii* и *Tegillarca granosa* (см.: Dang et al., 2013; Kim et al., 2020). Морфологические профили амебоцитов анадары Броутона, описанные в настоящей работе, по большинству признаков близки к агранулоцитам



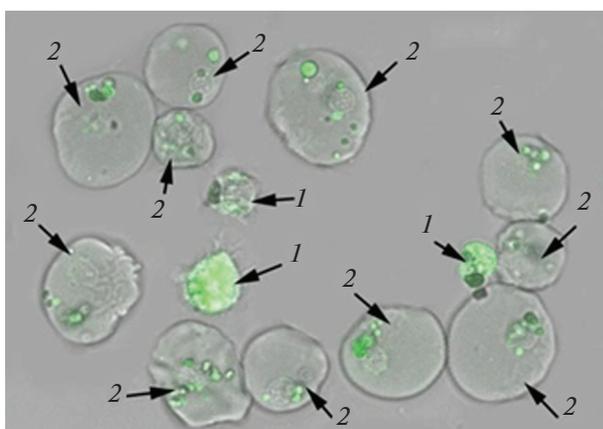
**Рис. 6.** Функциональные особенности гемоцитов двустворчатого моллюска *Anadara broughtonii*: а – различия в способности гемоцитов разных субпопуляций (амебоцитов и эритроцитов) к продукции АФК; б – различия в мембранном потенциале митохондрий гемоцитов разных субпопуляций (амебоцитов и эритроцитов). \*Различия между группами достоверны при  $p < 0.05$ .

других видов двустворчатых моллюсков (Wang et al., 2017). Описанные нами размеры и морфологические особенности амебоцитов также схожи с характеристиками гиалиноцитов и гранулоцитов *A. broughtonii*, *A. kagoshimensis* и *T. granosa* (см.: Kim et al., 2020), а также амебоцитов *A. trapezia* (см.: Dang et al., 2013).

Многочисленные крупные эритроциты *A. broughtonii*, содержащие большое количество гранул, формировали субпопуляцию 2 и обнаруживались в составе нижней фракции в градиенте плотности Percoll. Считается, что наличие большого числа включений с гемоглобином свидетельствует о том, что эритроциты анадары являются специализированными клетками, осуществляю-

щими транспорт кислорода (Wang et al., 2020). Для *Scapharca inaequivalvis* показано (Holden et al., 1994), что, аналогично эритроцитам других беспозвоночных и низших позвоночных, гемоглобин-содержащие клетки гемолимфы моллюска имеют развитую внутреннюю структуру, включая крупное ядро, шероховатый эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и многочисленные митохондрии.

В то же время, согласно результатам нашего исследования, эритроциты анадары Броутона по своим морфофункциональным свойствам в целом близки к непигментированным/слабопигментированным гранулоцитам других видов двустворчатых моллюсков (Wang et al., 2017). Ранее показано (Dang et al., 2013), что из всех амебоцитов двустворчатых моллюсков, в частности мидий и устриц, лишь blastopod-like agranulocytes не участвуют в реализации клеточного иммунного ответа, тогда как гранулярные клетки в большей степени, чем агранулоциты, способны к фагоцитозу, продукции защитных пептидов и генерации АФК (Hegaret et al., 2003; Nakahara et al., 2009). Нами обнаружено, что оба типа гемоцитов анадары – амебоциты и эритроциты – в равной степени способны к продукции АФК. Это может свидетельствовать, что эритроциты анадары, как и амебоциты, участвуют в иммунном ответе. Фагоцитарная активность эритроцитов анадары в отношении частиц зимозана, впервые установленная в настоящей работе, подтверждает это предположение и косвенно согласуется с литературными данными о повышении экспрессии генов, кодирующих субъединицы гемоглобина в гемоцитах гемоглобин-содержащих моллюсков в ответ на



**Рис. 7.** Микрофотографии реакции *in vitro* фагоцитоза клеток гемолимфы двустворчатого моллюска *Anadara broughtonii*: 1 – амебоциты, 2 – эритроциты.

инвазию патогенов и стимуляцию иммунной системы.

Таким образом, принципиальное отличие клеточного состава гемолимфы анадары от других представителей двустворчатых моллюсков, например устриц и мидий, состоит в наличии гемоглобин-содержащих эритроцитов, обладающих определенными морфологическими особенностями. Однако следует отметить, что, несмотря на эти различия, общие признаки, в первую очередь наличие гранул в цитоплазме, низкое ЯЦО и функциональные активности, сходные с таковыми амeboцитов, объединяют эритроциты анадары с гранулоцитами других двустворчатых моллюсков. Полученные в работе факты заставляют шире взглянуть на проблему морфологической и функциональной классификации гемоцитов внутри класса Bivalvia, они могут стать подтверждением гипотезы о единстве происхождения разных типов гемоцитов, которая выдвинута ранее в отношении двустворчатых моллюсков, не содержащих гемоглобин (Анисимова и др., 2022; Mix, 1976; Ottaviani et al., 1998; Rebelo et al., 2013). Наличие особенностей, проявляющихся в присутствии пигментов в клетках гемолимфы, разной интенсивности грануляции цитоплазмы и окраски гранул гемоцитов, вероятно, свидетельствует о существовании эволюционно закрепленной специализации некоторых типов гемоцитов, обеспечивающей адаптацию конкретных видов к особенностям среды обитания.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания № 121102500161-4 “Закономерности организации иммунной системы промысловых гидробионтов и исследование влияния факторов внешней среды на функционирование их защитных систем”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Анисимова А.А. Морфофункциональные параметры гемоцитов в оценке физиологического состояния двустворчатых моллюсков // Биол. моря. 2013. Т. 39. № 6. С. 389–399.

Анисимова А.А., Дягилева М.Н., Карушева О.А. и др. Состав и кинетика клеточной популяции гемоцитов у двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) // Биол. моря. 2022. Т. 48. № 4. С. 251–261.

Афейчук Л.С. Оценка состояния промысловых скопленных анадары Броутона (*Anadara broughtonii*) в заливе Петра Великого (Японское море) по результатам мониторинга 2010–2020 годов // Национальная (всероссийская) научно-практическая конференция “Природные ресурсы, их современное состояние, охрана, промышленное и техническое использование”. Камчатский государственный технический университет. 2021. № 12. С. 11–15.

Присный А.А., Пигалева Т.А., Кулько С.В. Морфофункциональные особенности гемоцитов сухопутных брюхоногих моллюсков // Фундаментальные исследования. 2011. № 5. С. 206–210.

Allam B., Ashton-Alcox K.A., Ford S.E. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs // Fish Shellfish Immunol. 2002. V. 13. № 2. P. 141–158.

Andreyeva A.Y., Efremova E.S., Kukhareva T.A. et al. Morphological and functional characterization of hemocytes in cultivated mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and effect of hypoxia on hemocyte parameters // Fish Shellfish Immunol. 2019. V. 89. P. 361–367.

Bachère E., Rosa R.D., Schmitt P. et al. The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view // Fish Shellfish Immunol. 2015. V. 46. № 1. P. 50–64.

Cao A., Mercado L., Ramos-Martinez J.I. et al. Primary cultures of hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* Lmk.: expression of IL-2R $\alpha$  subunit // Aquaculture. 2003. V. 216. № 1–4. P. 1–8.

Cohen W.D., Nemhauser I. Association of centrioles with the marginal band of a molluscan erythrocyte // J. Cell Biol. 1980. V. 86. № 1. P. 286–291.

Dang C., Cribb T.H., Osborne G. et al. Effect of a hemiuroid trematode on the hemocyte immune parameters of the cockle *Anadara trapezia* // Fish Shellfish Immunol. 2013. V. 35. № 3. P. 951–956.

De la Ballina N.R., Maresca F., Cao A. et al. Bivalve hemocyte subpopulations: A Review // Frontiers in Immunology. 2022. V. 13.

De Zwaan A., Isani G., Cattani O., Cortesi P. Long-term anaerobic metabolism of erythrocytes of the arcid clam *Scapharca inaequivalvis* // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1995. V. 187. № 1. P. 27–37.

Donaghy L., Kim B.K., Hong H.K. et al. Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis* // Fish Shellfish Immunol. 2009. V. 27. № 2. P. 296–301.

Fonseca V.B., Cruz B.P., da Silva S.S. et al. Morphological characterization of hemocytes of the brown mussel *Perna perna*: an update // Fish Shellfish Immunol. 2022. V. 120. P. 139–141.

- Ford S.E., Ashton-Alcox K.A., Kanaley S.A. Comparative cytometric and microscopic analyses of oyster hemocytes // *J. Invertebr. Pathol.* 1994. V. 64. № 2. P. 114–122.
- Funakoshi S. Studies on the classification, structure and function of hemocytes in bivalves // *Bull. Natl. Res. Inst. Aquac. (Jpn.)*. 2000. V. 29. P. 1–103.
- Gerdol M., Gomez-Chiarri M., Castillo M.G. et al. Immunity in molluscs: recognition and effector mechanisms, with a focus on Bivalvia // *Adv. Immunol.* Springer Cham. 2018. P. 225–341.
- Hameed A., Muhammad F., Muhammad A.A. et al. Morphological and structural characterization of blood cells of *Anadara antiquata* // *Iran. J. Fish. Sci.* 2018. V. 17. № 3. P. 613–619.
- 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 // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2003. V. 293. № 2. P. 249–265.
- Holden J.A., Pipe R.K., Quaglia A., Ciani G. Blood cells of the arcid clam, *Scapharca inaequalvis* // *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 1994. V. 74. № 2. P. 287–299.
- 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 // *Mar. Pollut. Bull.* 2020. V. 160. Article 111654.
- Kladchenko E.S., Andreyeva A.Y., Kukhareva T.A. Effect of ranged short-term hypoxia on functional and morphological parameters of hemocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2022. V. 58. № 1. P. 45–53.
- Kolyuchkina G.A., Ismailov A.D. Morpho-functional characteristics of bivalve mollusks under the experimental environmental pollution by heavy metals // *Oceanology*. 2011. V. 51. № 5. P. 804.  
<https://doi.org/10.1134/S0001437011050092>
- Matozzo V. Aspects of eco-immunology in molluscs // *Invertebr. Surviv. J.* 2016. V. 13. № 1. P. 116–121.
- Mello D.F., De Oliveira E.S., Vieira R.C. et al. Cellular and transcriptional responses of *Crassostrea gigas* hemocytes exposed *in vitro* to brevetoxin (PbTx-2) // *Mar. Drugs*. 2012. V. 10. № 3. P. 583–597.
- Mix M.C. A general model for leukocyte cell renewal in bivalve mollusks // *Mar. Fish. Rev.* 1976. V. 38. № 10. P. 37–41.
- Nakahara Y., Shimura S., Ueno C. et al. Purification and characterization of silkworm hemocytes by flow cytometry // *Dev. Comp. Immunol.* 2009. V. 33. № 4. P. 439–448.
- Novitskaya V.N., Soldatov A.A. Peculiarities of functional morphology of erythroid elements of hemolymph of the bivalve mollusk *Anadara inaequalvis*, the Black Sea // *Hydrobiol. J.* 2013. V. 49. № 6. P. 64–71.
- Novoa B., Figueras A. Immune responses in molluscs and their implications for disease control // *Infectious Disease in Aquaculture*, Cambridge: Woodhead Publishing, 2012. P. 88–110.
- Ottaviani E., Franchini A., Barbieri D., Kletsas D. Comparative and morphofunctional studies on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes: Presence of two aging-related hemocyte stages // *Ital. J. Zool.* 1998. V. 65. № 4. P. 349–354.
- Parisi M.G., Mauro M., Sarà G., Cammarata M. Temperature increases, hypoxia, and changes in food availability affect immunological biomarkers in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* // *J. Comp. Physiol. B.* 2017. V. 187. № 8. P. 1117–1126.
- Rebelo M.d.F., Figueiredo E.d.S., Mariante R.M. et al. New insights from the oyster *Crassostrea rhizophorae* on bivalve circulating hemocytes // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 2. art. ID e57384.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057384>
- Rodrick G.E., Ulrich S.A. Microscopical studies on the hemocytes of bivalves and their phagocytic interaction with selected bacteria // *Helgoländer Wiss. Meeresunters.* 1984. V. 37. № 1. P. 167–176.
- Rosa I.C., Garrido R., Re A. et al. Sensitivity of the invasive bivalve *Corbicula fluminea* to candidate control chemicals: the role of dissolved oxygen conditions // *Sci. Total Environ.* 2015. V. 536. P. 825–830.
- Travers M.A., Da Silva P.M., Le Goïc N. et al. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes // *Fish Shellfish Immunol.* 2008. V. 24. № 4. P. 400–411.
- Wang W., Li M., Wang L. et al. The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas* // *Dev. Comp. Immunol.* 2017. V. 67. P. 221–228.
- Wang Y., Zhou S., Liu T. et al. De novo transcriptome analysis of stressed blood clam (*Anadara broughtonii*) and identification of genes associated with hemoglobin // *Genes Genomics*. 2020. V. 42. № 2. P. 189–202.
- Zhou L., Yang A., Liu Z. et al. Changes in hemolymph characteristics of ark shell *Scapharca broughtonii* dealt with *Vibrio anguillarum* challenge *in vivo* and various of anticoagulants *in vitro* // *Fish Shellfish Immunol.* 2017. V. 61. P. 9–15.
- Zhou L., Yang A., Wang Q. et al. Studies on the hemocytes types and their immunological functions in bloody clam (*Scapharca broughtonii*) // *J. Fish. China*. 2013. V. 37. № 4. P. 599–606.
- Zhou L., Zhao D., Wu B. et al. Ark shell *Scapharca broughtonii* hemocyte response against *Vibrio anguillarum* challenge // *Fish Shellfish Immunol.* 2019. V. 84. P. 304–311.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.039>

## Morphological Analysis of the Hemolymph Cell Composition in the Bivalve Mollusk *Anadara broughtonii* Schrenck, 1867 (Sea of Japan)

E. S. Kladchenko<sup>a</sup>, T. A. Kukhareva<sup>a</sup>, V. N. Rychkova<sup>a</sup>, E. S. Chelebieva<sup>a</sup>, and A. Yu. Andreyeva<sup>a</sup>

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

The hemolymph cells of the ark clam *Anadara broughtonii* were examined using light microscopy, flow cytometry and gradient centrifugation. All three methods of analysis made it possible to identify two main types of cells in the hemolymph of the ark clam *Anadara broughtonii* – large granular erythrocytes and small agranular amebocytes. Erythrocytes accounted for  $95.6 \pm 0.9\%$  of the total number of hemolymph cells. Erythrocytes were hemoglobin-containing cells with a great number of granules in the cytoplasm, a low nuclear-cytoplasmic ratio (NCR) and a lower intensity of cellular respiration compared to amebocytes. Amebocytes are cells of predominantly irregular shape with a high number of cells that do not contain or contain no more than 10 granular inclusions in the cytoplasm. All types of hemocytes found in the ark clam hemolymph demonstrated the same ability to spontaneously produce reactive oxygen species. For the first time, it has been shown that red blood cells of the ark clam *Anadara broughtonii* are capable of phagocytosis. At the same time, amebocytes absorbed on the average two times more zymosan particles ( $10.3 \pm 0.7$  pcs.), compared to erythrocytes ( $5.3 \pm 0.1$  pcs.).

**Keywords:** ark clams, hemocytes, phagocytosis, reactive oxygen species