

## РОЛЬ БЕТА-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ И АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В ПРОЦЕССЕ АДАПТАЦИИ ГЕМОЦИТОВ СРЕДИЗЕМНОМОРСКОЙ МИДИИ (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*) К ГИПООСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ \*

Ткачук А. А., Кладченко Е. С., Андреева А. Ю.

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,

г. Севастополь, Российская Федерация,

e-mail: [aatkachuk86@gmail.com](mailto:aatkachuk86@gmail.com)

**Аннотация:** Осмотический гомеостаз является одной из фундаментальных основ выживания гидробионтов, обитающих в прибрежных экосистемах Мирового океана. У двустворчатых моллюсков стресс, вызванный колебанием солёности воды, может индуцировать секрецию нейромедиаторов, включая катехоламины. Гемоциты, циркулирующие в гемолимфе двустворчатых моллюсков, имеют на поверхности клеточной мембраны адренорецепторы, но фундаментальные знания о воздействии катехоламинов на функции клеток гемолимфы, а также механизмы их осморегуляции изучены слабо. В настоящей работе было исследовано влияние эпинефрина и активатора растворимой аденилатциклазы — форсколина на осмотическую стойкость гемоцитов промыслового двустворчатого моллюска средиземноморской мидии (*Mytilus galloprovincialis*). Также изучено влияние этих веществ на способность клеток гемолимфы мидий к регуляторному снижению объёма в ответ на гипоосмотический стресс. В условиях эксперимента *in vitro* показано, что стимуляция гемоцитов мидий эпинефрином (25 мкМ) и форсколином (20 мкМ) не оказывала влияния на данный параметр осмотической стойкости гемоцитов средиземноморской мидии. Установлено, что стимуляция форсколином не влияет на скорость и интенсивность регуляторного снижения объёма гемоцитов в ответ на гипоосмотическое набухание, в то время как инкубация с эпинефрином ингибировала способность клеток гемолимфы мидий восстанавливать объём в гипоосмотических условиях. Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что аденилатцикласный сигнальный путь задействован в регуляции процессов восстановления объёма гемоцитов мидий в ответ на гипоосмотический стресс.

**Ключевые слова:** солёностный стресс, средиземноморская мидия, эпинефрин, форсколин, осморегуляция

### Введение

Прибрежные воды Мирового океана подвержены резким колебаниям абиотических факторов среды [Lange, Klingbeil, Burchard, 2020]. Солёность является одним из ключевых факторов, определяющих выживание гидробионтов в водных экосистемах [Evans, Kültz, 2020; Tian et al., 2020]. На уровень солёности большое влияние оказывают штормы, приливно-отливные процессы, особенности гидрологического режима рек и др. Вышеуказанные факторы приводят к циклическим и резким изменениям солёности воды. В наибольшей степени колебаниям солёности прибрежных вод подвержены организмы литоральной зоны, в частности двустворчатые моллюски [Lange, Klingbeil, Burchard, 2020; Pourmozaffar et al., 2020].

\*Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 22-26-00165 «Функциональный и иммунный статус двустворчатых моллюсков — объектов мариккультуры в условиях действия факторов глобальных изменений климата» и частично в рамках государственного задания №1023033000140-3-1.6.16 (FNNZ-2024-0035) «Механизмы функционирования иммунной системы двустворчатых моллюсков и физиологические основы её адаптации к абиотическим, биотическим и антропогенным факторам окружающей среды».

Двустворчатые моллюски являются осмоконформерами, т. е. осмолярность гемолимфы изменяется в соответствии с колебаниями внешней солёности [Pourmozaffar et al., 2020; Tan et al., 2022; Medeiros, Faria, Souza, 2020]. Выживание, рост и размножение двустворчатых моллюсков в условиях солёностного стресса, в отличие от позвоночных, обеспечивается за счёт внутриклеточных осморегуляторных механизмов [Pourmozaffar et al., 2020]. Свободно циркулирующие клетки гемолимфы (гемоциты) играют ключевую роль в иммунной системе, восстановлении тканей и раковины, пищеварении, дыхании и др. [Ballina et al., 2022]. Колебания осмолярности гемолимфы в условиях солёностного стресса приводят к изменениям объёма гемоцитов за счёт перемещения молекул воды и осмолитов через их клеточную мембрану [Wu et al., 2020; Pérez-Velasco, Manzano-Sarabia, Hurtado-Oliva, 2022]. Показано, что гемоциты некоторых двустворчатых моллюсков (*Mytilus galloprovincialis* [Torre et al., 2013], *M. edulis* [Maar et al., 2015], *Magallana gigas* [Naceur et al., 2016], *Crassostrea angulata*, *C. virginica* [Pourmozaffar et al., 2020], *Anadara kagoshimensis* [Kladchenko et al., 2022]) обладают механизмами регуляции объёма для поддержания функций в условиях солёностного стресса. Процессы, ответственные за восстановление клеточного объёма после осмотического набухания или сжатия, называются, соответственно, регуляторным уменьшением объёма (regulatory volume decrease, RVD) и регуляторным увеличением объёма (regulatory volume increase, RVI) [Larsen, Hoffmann, 2020]. Предыдущие исследования показали, что солёность влияет на функции гемоцитов двустворчатых моллюсков, что приводит к нарушению иммунного статуса организма [Pourmozaffar et al., 2020]. Так, в работе Жозейна и коллег [Jauzein, Donaghy, Volety, 2013] показано, что пониженная солёность вызвала у моллюска *Macrocallista nimbosa* увеличение объёма клеток и лизосомальных компартментов, снижение способности к фагоцитозу, развитие окислительного стресса и гибель гемоцитов. Также гипоосмотический стресс ингибировал фагоцитарную активность, приводил к угнетению активности внутриклеточных эстераз и снижению жизнеспособности гемоцитов у тихоокеанской устрицы *M. gigas* [Gagnaire et al., 2006]. Бассел с коллегами в работе [Bussell et al., 2008] обнаружили, что солёностный стресс может привести к значительному снижению числа эозинофильных гемоцитов и ингибированию фагоцитарной способности у мидии *M. edulis*.

Резкое изменение солёности среды сопряжено с развитием классической стресс-реакции в организме двустворчатого моллюска, что стимулирует выброс нейромедиаторов стресса [Wei et al., 2022; Coates, Söderhäll, 2021]. Важную роль в регуляции физиологической активности и повышении индивидуальной адаптивности моллюсков к окружающей среде играют механизмы реакции на стресс, модулируемые нейроэндокринной системой. Гемоциты имеют специфические рецепторы к высвобождаемым нейроэндокринной системой нейромедиаторам, в частности катехоламинам. Исследования Лакоста и его коллег [Lacoste et al., 2001] показали, что норадреналин (наиболее важный катехоламин у моллюсков) синтезируется гемоцитами двустворчатых моллюсков и высвобождается в гемолимфу во время реакции физиологического стресса. Известно, что у большинства видов животных передача сигнала через  $\beta$ -адренорецепторы осуществляется путём активации цАМФ-зависимой протеинкиназы А, однако внутриклеточные сигнальные пути в гемоцитах двустворчатых моллюсков исследованы крайне слабо. Неизвестно также, влияет ли выброс катехоламинов на механические свойства клеточной мембраны гемоцитов, в частности их осмотическую стойкость. Исследования на низших позвоночных свидетельствуют, что осмотическая стойкость эритроцитов может меняться под воздействием адреналина, а также активаторов протеинкиназы А [Andreyeva et al., 2021].

Таким образом, цель настоящей работы заключается в исследовании влияния катехоламинов и активатора растворимой аденилатциклазы форсколина на осмотическую стойкость и динамику регуляторного снижения объёма (RVD) в ответ на гипоосмотический стресс у клеток гемолимфы двустворчатого моллюска *M. galloprovincialis*.

## Материалы и методы

Средиземноморские мидии *M. galloprovincialis* (размер  $(84,7 \pm 1,5)$  мм, вес  $(31,2 \pm 2,8)$  г,  $n = 70$ ) были получены на марикультурной ферме в районе г. Севастополя (ООО «Марикультура»). Для адаптации к лабораторным условиям (концентрация кислорода  $7\text{--}8$  мг·л<sup>-1</sup>, рН = 8,2, температура  $18\text{--}20$  °С) моллюсков содержали в пластиковых аквариумах ёмкостью  $50\text{--}70$  л, оборудованных системой аэрации и фильтрации воды, в течение недели. Далее из синуса заднего мускула-замыкателя раковины у моллюсков стерильным шприцем отбирали пробу гемолимфы ( $0,5\text{--}2,0$  мл). Клетки гемолимфы трижды отмывали в стерильной морской воде на рефрижераторной центрифуге Eppendorf 5430R (500 g, 5 мин). После первой отмывки брали пробу надосадочной жидкости (100 мкл) для оценки осмолярности гемолимфы на осмометре OsmoSpecial 1 (Astori, Италия). По окончании отмывки гемоциты ресуспендировали в стерильной морской воде (концентрация клеток от  $2 \cdot 10^6$  до  $4 \cdot 10^6$  кл·мл<sup>-1</sup>) для анализа методом лазерной дифракции.

Регистрация процесса лизиса гемоцитов и изменений их объёма при осмотической стимуляции проводилась в измерительной кювете лазерного анализатора Ласка-ТМ («Биомедсистемс», Россия) при температуре  $13$  °С. Осмотический тест гемоцитов проводили путём серийных разведений суспензий гемоцитов в стерильной морской воде (1 мл) дистиллированной водой (по  $1\text{--}2$  мл) с постепенным снижением осмолярности суспензии и добавлением соответствующего объёма гемоцитов для поддержания постоянной концентрации клеток. За физиологическую осмолярность принимали осмолярность гемолимфы моллюсков (солёность  $18$  ‰, осмолярность  $(460,0 \pm 2,0)$  мОсм·л<sup>-1</sup>). Осмотический тест проводился в диапазоне осмолярности от  $460$  до  $20$  мОсм·л<sup>-1</sup>. Для количественного анализа кривой осмотической стойкости (регистрация в течение 30 мин) на программном обеспечении лазерного анализатора «Ласка-ТМ» проводили анализ параметров Н10, Н50 и Н90, соответствующих величине осмолярности среды, при которой происходил лизис  $10$ ,  $50$  и  $90$  % клеток в суспензии соответственно [Kladchenko et al., 2022; Kladchenko et al., 2023; Makhro et al., 2016].

Для определения способности гемоцитов мидий регулировать свой объём после осмотического набухания в условиях *in vitro* проводили моделирование гипоосмотического стресса. Анализ кинетики регуляторных изменений объёма гемоцитов в условиях осмотического стресса проводили при помощи метода лазерной дифракции. Инициация реакции RVD в ответ на гипоосмотическое набухание осуществлялась следующим образом: осмолярность среды в 1 мл суспензии гемоцитов моллюсков (концентрация клеток от  $2 \cdot 10^6$  до  $4 \cdot 10^6$  кл·мл<sup>-1</sup>, осмолярность  $(460,0 \pm 2,0)$  мОсм·л<sup>-1</sup>) резко снижали до  $(216,0 \pm 4,0)$  мОсм·л<sup>-1</sup> путём добавления дистиллированной воды (1 мл) и эквивалентного количества клеток (для сохранения постоянства их концентрации в измерительной кювете). Далее изменения объёма клеток в суспензии контролировали в течение 60 мин.

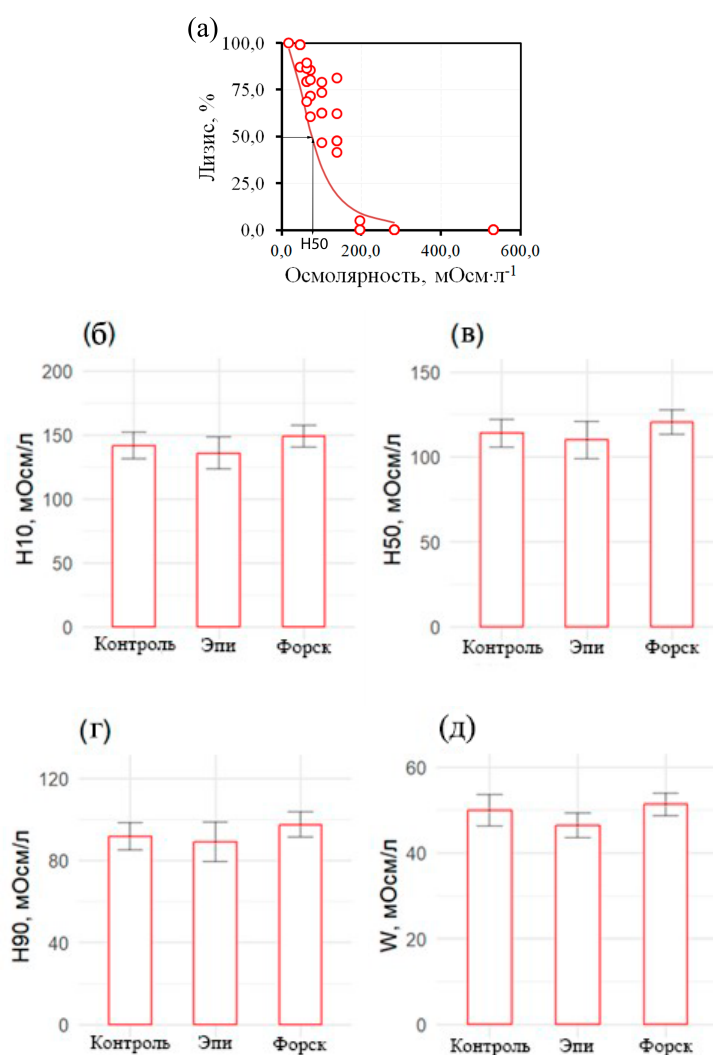
Для определения роли аденилатциклазного сигнального пути в регуляции осмотически зависимых изменений объёма гемоцитов применяли стимуляцию гемоцитов мидий (*in vitro*) эпинефрином (финальная концентрация в пробе  $25$  мкМ [Andreyeva et al., 2021]) и форсколином (финальная концентрация в пробе  $20$  мкМ [Andreyeva et al., 2021]).

Расчёт объёма гемоцитов и доли лизированных клеток в суспензии проводили с использованием программного обеспечения лазерного анализатора LaSca\_32.

Различия между контрольной и экспериментальной группами оценивались с помощью непараметрического U-критерия Манна — Уитни. Данные были представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка. Результаты считались статистически значимыми, если вероятность ошибки первого рода (P) была меньше  $0,05$ .

## Результаты

Осмолярность гемолимфы мидий соответствовала осмолярности морской воды при 18 ‰ и составила  $(460,0 \pm 2,0)$  мОсм·л<sup>-1</sup>. Постепенное снижение осмолярности среды приводило к набуханию гемоцитов. Лизис гемоцитов начинался при среднем уровне осмолярности среды  $(141,9 \pm 10,4)$  мОсм·л<sup>-1</sup>, когда лизировало 10 % гемоцитов мидий (параметр Н10), достигнув максимального объёма набухания клеток (рисунок 1, а, б). Лизис 50 % клеток в суспензии (рисунок 1, а, в) наблюдался при средней осмолярности в  $(114,7 \pm 8,8)$  мОсм·л<sup>-1</sup>. Полный лизис гемоцитов (параметр Н90), соответствующий лизису 90 % клеток в суспензии (рисунок 1, а, г), наступал при осмолярности среды  $(92,7 \pm 7,5)$  мОсм·л<sup>-1</sup>. Стимуляция гемоцитов мидий эpineфрином (25 мкМ) и форсколином (20 мкМ) не оказывала достоверного влияния на параметры их осмотической стойкости по сравнению с контрольной группой, а также не влияла на ширину распределения кривой осмотической стойкости (параметр W) (рисунок 1, д).

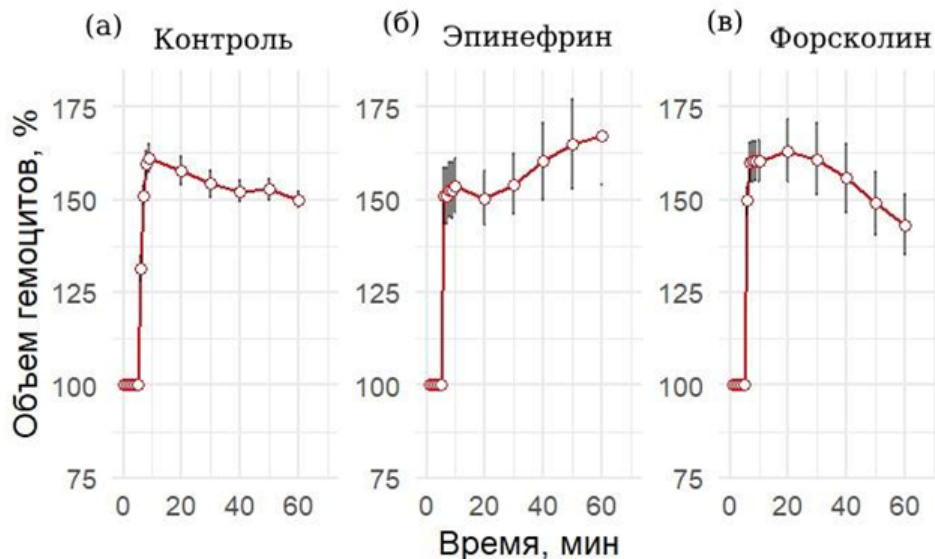


**Рис. 1.** Стимуляция гемоцитов средиземноморской мидии эpineфрином (25 мкМ) и форсколином (20 мкМ) не влияет на их осмотическую стойкость: (а) — кривая осмотической стойкости контрольной группы (отсутствие стимуляции клеток), (б) — лизис 10 % клеток (параметр Н10), (в) — лизис 50 % клеток (параметр Н50), (г) — лизис 90 % клеток (параметр Н90), (д) — ширина распределения кривой осмотической стойкости (параметр W). Различия между контрольной и экспериментальной группами оценивались с помощью непараметрического U-критерия Манна — Уитни. Данные были представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка ( $n = 10$ )

При моделировании реакции RVD в ответ на гипоосмотическое набухание снижение осмолярности среды с  $(460,0 \pm 2,0)$  до  $(216,0 \pm 4,0)$  мОсм·л<sup>-1</sup> приводило к резкому (в течение 1–2 мин) набуханию гемоцитов мидий — средний объём клеток составлял  $(161,95 \pm 4,25)$  % относительно их исходного объёма ( $p < 0,05$ ). Спустя 4 минуты набухания объём гемоцитов начинал постепенно снижаться и по истечении периода записи (60 мин) составлял  $(149,9 \pm 2,0)$  % относительно исходного объёма (рисунок 2, а). Таким образом, хотя объём гемоцитов не восстановился до исходных значений (до набухания), он достоверно снизился ( $p < 0,05$ ). Это свидетельствует о наличии у гемоцитов мидий способности к RVD, что является классическим ответом на гипоосмотический стресс, присущим клеткам животных.

В условиях стимуляции эпинефрином (концентрация в пробе 25 мкМ) гипоосмотический стресс также приводил к резкому (в течение 2 мин) росту объёма гемоцитов мидий на  $(150,8 \pm 7,5)$  % относительно исходного объёма клеток (рисунок 2, б). Далее объём гемоцитов достоверно не снижался и в конце экспериментального периода (60 мин) составлял  $(167,2 \pm 13,3)$  % относительно исходного объёма.

Стимуляция гемоцитов мидий форсколином не влияла на динамику процесса RVD у гемоцитов мидий (рисунок 2, в). В течение первых двух минут после снижения осмолярности до  $(210,3 \pm 6,2)$  мОсм·л<sup>-1</sup> клетки гемолимфы резко увеличились в объёме до  $(160,0 \pm 5,2)$  % относительно уровня нормальной осмолярности. Затем объём гемоцитов начинал постепенно снижаться и в конце 60-минутной записи составлял  $(143,2 \pm 8,3)$  % ( $p < 0,05$ ). Таким образом, показатели динамики процесса восстановления объёма гемоцитов мидий не отличались от контрольных параметров.



**Рис. 2.** Эпинефрин блокирует способность гемоцитов к регуляторному снижению объёма (RVD) при гипоосмотическом стрессе: (а) — контрольная динамика RVD, (б) — RVD при стимуляции клеток эпинефрином (25 мкМ), (в) — RVD при стимуляции клеток форсколином (20 мкМ). Различия между контрольной и экспериментальной группами оценивались с помощью непараметрического U-критерия Манна — Уитни. Данные были представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка ( $n = 10$ )



## Обсуждение

Широкий диапазон солёностной толерантности двустворчатых моллюсков обеспечивается преимущественно клеточными механизмами адаптации [Velez et al., 2016; Carregosa et al., 2014; Pourmozaffar et al., 2020]. В нашем предыдущем исследовании мы показали, что гемоциты анадары (*Anadara kagoshimensis*) более устойчивы к гипоосмотическому стресс-тесту в сравнении с эритроцитами низших позвоночных [Kladchenko et al., 2023]. В настоящей работе параметры кривой осмотической стойкости мидий были выше по значениям, чем у позвоночных животных [Andreyeva et al., 2021], однако отличались меньшей стабильностью в сравнении с анадарой. В контрольной группе лизис 50 % гемоцитов наступал при снижении осмолярности среды в 4–5 раз, в то время как 50 % гемоцитов анадары подвергалось лизису при снижении осмолярности среды в 10–12 раз [Kladchenko et al., 2023]. С другой стороны, для эритроцитов водных позвоночных H50 наблюдался при снижении осмолярности примерно в 4 раза [Andreyeva et al., 2018; Demanche, 1980; Andreyeva et al., 2019]. Следовательно, хотя средиземноморская мидия имеет схожий с анадарой солёностный ареал, гемоциты мидии обладают меньшей осмотической стойкостью по сравнению с гемоцитами анадары. Это, вероятно, может свидетельствовать о более высокой чувствительности данного вида двустворчатых моллюсков к кратковременным колебаниям солёности среды.

В ответ на изменения солёности двустворчатые моллюски демонстрируют классический стресс-ответ, который включает также изменение концентрации катехоламинов в гемолимфе [Pankhurst, 2011]. Вместе с тем роль эpineфрина в регуляции механических свойств мембран гемоцитов, т. е. стабильности, эластичности, текучести, изучена относительно слабо. У позвоночных воздействие эpineфрина на эритроциты инициируется его связыванием с  $\beta$ -адренорецепторами с последующей активацией аденилатциклазы [Pretini et al., 2019]. Мы обнаружили, что стимуляция эpineфрином и форсколином не влияла на осмотическую стабильность гемоцитов мидий. В то время как у карася (*Carassius carassius*) аналогичная инкубация эритроцитов с эpineфрином и форсколином приводила к изменению их осмотической стабильности [Andreyeva et al., 2021]. Роль катехоламин-зависимой передачи сигналов в регуляции свойств мембран эритроцитов была также показана у млекопитающих, где воздействие агонистов  $\beta$ -адренорецепторов вызывало существенные сдвиги в текучести и эластичности мембран [Tuvia et al., 1999; Muravyov et al., 2011]. В настоящей работе мы обнаружили, что осмотическая стабильность гемоцитов мидии не зависит от активации протеинкиназы А, поскольку клетки, обработанные форсколином и эpineфрином, не демонстрировали существенных изменений по всем четырём параметрам кривой осмотической стабильности (H10, H50, H90 и W) по сравнению с контрольной группой.

Мы также показали, что объём гемоцитов мидий в гипоосмотических условиях достоверно снижался, однако полного восстановления исходных размеров клеток в период эксперимента не произошло. Спустя 60 мин реализации ответа RVD объём гемоцитов снизился на 10–12 %. Степень восстановления объёма после гипоосмотического набухания гемоцитов мидий в ответ на гипоосмотический стресс была наименее выраженной в сравнении с гемоглобинсодержащими гемоцитами двустворчатых моллюсков [Kladchenko et al., 2022] и низшими позвоночными [Andreyeva et al., 2019; Andreyeva et al., 2018]. Вместе с тем наибольшее снижение объёма, как и в случае с эритроцитами низших позвоночных, происходило в течение первых 15–20 мин после гипоосмотического набухания, а в дальнейшем процесс замедлялся [Andreyeva et al., 2019; Andreyeva et al., 2018]. Механизмы, лежащие в основе реакции RVD у моллюсков, до конца неясны. Бреганте с соавторами предположили, что процесс RVD в гемоцитах *M. galloprovincialis* может осуществляться так же, как и в эритроцитах низших позвоночных, — за счёт активации  $K^+Cl^-$  котранспортера [Bregante et al., 2016].

Хотя добавление эпинефрина и форсколина не повлияло на осмотическую стабильность гемоцитов мидий, некоторые клеточные реакции осморегуляции, в частности регуляторное снижение объёма в ответ на гипоосмотический стресс, по всей видимости, чувствительны к катехоламинам. Форсколин не оказывал значимого влияния на динамику и продолжительность реакции RVD, в то время как эпинефрин ингибировал реакцию RVD в гемоцитах мидий. Эти различия, вероятно, связаны с тем фактом, что эпинефрин активирует только рецепторсвязывающие аденилатциклазы, в то время как форсколин, в свою очередь, способствует активации всех клеточных аденилатциклаз. Интересно, что у *C. carassius* реакция RVD эритроцитов в гипоосмотической среде не зависела ни от наличия эпинефрина, ни форсколина в среде [Andreyeva et al., 2021]. Дифференцированный ответ гемоцитов мидий при стимуляции эпинефрином и форсколином свидетельствует о том, что внутриклеточная регуляция процессов восстановления объёма клеток гемолимфы в гипоосмотических условиях имеет также другие пути активации и ингибирования. Однако для точного их определения необходимы дальнейшие исследования.

### Выводы

Таким образом, результаты проведенной серии экспериментов позволили сделать вывод, что аденилатциклязный сигнальный путь задействован в регуляции процессов восстановления объёма гемоцитов мидий в ответ на гипоосмотический стресс, однако не влияет на их осмотическую стойкость. Стимуляция клеток гемолимфы моллюсков эпинефрином останавливала процесс RVD. Дальнейшее исследование механизмов нейроэндокринной регуляции функций в организме двустворчатых моллюсков и роли этого пути в адаптации их к колебаниям солёности может помочь в развитии аквакультуры двустворчатых моллюсков, поскольку расположение ферм в прибрежной зоне предполагает возможность резких колебаний условий и сопряжённое с этим возникновение стресса у посадочного материала.

### Список литературы

1. Andreyeva A. Yu., Kladchenko E. S., Sudnitsyna J. S., Krivchenko A. I., Mindukshev I. V., Gambaryan S. Protein kinase A activity and NO are involved in the regulation of crucian carp (*Carassius carassius*) red blood cell osmotic fragility // *Fish Physiology and Biochemistry*. – 2021. – Vol. 47, iss. 4. – P. 1105–1117. – <https://doi.org/10.1007/s10695-021-00971-4>
2. Andreyeva A. Yu., Skverchinskaya E. A., Gambaryan S., Soldatov A. A., Mindukshev I. V. Hypoxia inhibits the regulatory volume decrease in red blood cells of common frog (*Rana temporaria*) // *Comparative Biochemistry and Physiology. Pt. A: Molecular & Integrative Physiology*. – 2018. – Vol. 219/220. – P. 44–47. – <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.02.016>
3. Andreyeva A. Yu., Soldatov A. A., Krivchenko A. I., Mindukshev I. V., Gambaryan S. Hemoglobin deoxygenation and methemoglobinemia prevent regulatory volume decrease in crucian carp (*Carassius carassius*) red blood cells // *Fish physiology and biochemistry*. – 2019. – Vol. 45, iss. 6. – P. 1933–1940. – <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00689-4>
4. Ballina N. R., Maresca F., Cao A., Villalba A. Bivalve haemocyte subpopulations: a review // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – Art. 826255. – <https://doi.org/10.3389%2Ffimmu.2022.826255>
5. 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, iss. 12. – Art. e0167972. – <https://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0167972>
6. Bussell J. A., Gidman E. A., Causton D. R., Gwynn-Jones D., Malham S. K., Jones M. L. M., Reynolds B., Seed R. Changes in the immune response and metabolic fingerprint of the mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus) in response to lowered salinity and physical stress // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. – 2008. – Vol. 358, iss. 1. – P. 78–85. – <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.01.018>

7. Carregosa V., Velez C., Soares A. M., Figueira E., Freitas R. Physiological and biochemical responses of three *Veneridae* clams exposed to salinity changes // *Comparative Biochemistry and Physiology Pt. B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 2014. – Vol. 177/178. – P. 1–9. – <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.08.001>
8. Coates C. J., Söderhäll K. The stress – immunity axis in shellfish // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2021. – Vol. 186. – Art. 107492. – <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107492>
9. Demanche R. The osmotic fragility of red blood cells of marine animals: a comparative study : diss. : theses. – [Williamsburg, USA], 1980. – <https://dx.doi.org/doi:10.21220/s2-1jmc-wk51>
10. Evans T. G., Kültz D. The cellular stress response in fish exposed to salinity fluctuations // *Journal of Experimental Zoology Pt. A: Ecological and Integrative Physiology*. – 2020. – Vol. 333, iss. 6. – P. 421–435. – <https://doi.org/10.1002/jez.2350>
11. 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 Immunology*. – 2006. – Vol. 20, iss. 4. – P. 536–547. – <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.07.003>
12. Jauzein C., Donaghy L., Volety A. K. Flow cytometric characterization of hemocytes of the sunray venus clam *Macrocallista nimbosa* and influence of salinity variation // *Fish & Shellfish Immunology*. – 2013. – Vol. 35, iss. 3. – P. 716–724. – <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.003>
13. Kladchenko E. S., Andreyeva A. Y., Mindukshev I. V., Gambaryan S. Cellular osmoregulation of the ark clam (*Anadara kagoshimensis*) hemocytes to hyposmotic media // *Journal of Experimental Zoology. Pt. A: Ecological and Integrative Physiology*. – 2022. – Vol. 337, iss. 5. – P. 434–439. – <https://doi.org/10.1002/jez.2578>
14. Kladchenko E. S., Gostyukhina O. L., Soldatov A. A., Rychkova V. N., Andreyeva A. Yu. Functional changes in hemocytes and antioxidant activity in gills of the ark clam *Anadara kagoshimensis* (Bivalvia: Arcidae) induced by salinity fluctuations // *Comparative Biochemistry and Physiology Pt. B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 2023. – Vol. 264. – Art. 110810. – <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2022.110810>
15. Lacoste A., Malham S. K., Cueff A., Poulet S. A. Noradrenaline modulates oyster hemocyte phagocytosis via a  $\beta$ -adrenergic receptor – cAMP signaling pathway // *General and Comparative Endocrinology*. – 2001. – Vol. 122, iss. 3. – P. 252–259. – <https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7643>
16. Lange X., Klingbeil K., Burchard H. Inversions of estuarine circulation are frequent in a weakly tidal estuary with variable wind forcing and seaward salinity fluctuations // *Journal of Geophysical Research: Oceans*. – 2020. – Vol. 125, iss. 9. – Art. e2019JC015789. – <https://doi.org/10.1029/2019JC015789>
17. Larsen E. H., Hoffmann E. K. Volume regulation in epithelia // *Basic Epithelial Ion Transport Principles and Function* / eds: K. L. Hamilton, D. C. Devor. – Second ed. – [Switzerland] : Springer, 2020. – Vol. 1. – P. 395–460. – [https://doi.org/10.1007/978-3-030-52780-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-52780-8_11)
18. Maar M., Saurel C., Landes A., Dolmer P., Petersen J. K. Growth potential of blue mussels (*M. edulis*) exposed to different salinities evaluated by a Dynamic Energy Budget model // *Journal of Marine Systems*. – 2015. – Vol. 148. – P. 48–55. – <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2015.02.003>
19. Makhro A., Huisjes R., Verhagen L. P., Del Mar Mañu-Pereira M., Llaudet-Planas E., Petkova-Kirova P., Wang J., Eichler H., Bogdanova A., Van Wijk R., Vives-Corrons J.-L., Kaestner L. Red cell properties after different modes of blood transportation // *Frontiers in Physiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 288. – <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00288>
20. Medeiros I. P. M., Faria S. C., Souza M. M. Osmoionic homeostasis in bivalve mollusks from different osmotic niches: physiological patterns and evolutionary perspectives // *Comparative Biochemistry and Physiology. Pt. A: Molecular & Integrative Physiology*. – 2020. – Vol. 240. – Art. 110582. – <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.110582>



21. Muravyov A. V., Koshelev V. B., Fadukova O. E., Tikhomirova I. A., Maimistova A. A., Bulaeva S. V. The role of red blood cell adenylyl cyclase activation in changes of erythrocyte membrane microrheological properties // *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology*. – 2011. – Vol. 5, iss. 2. – P. 128–134. – <https://doi.org/10.1134/S1990747811020036>
22. Naceur C. B., Maxime V., Mansour H. B., Le Tilly V., Sire O. Oyster's cells regulatory volume decrease: a new tool for evaluating the toxicity of low concentration hydrocarbons in marine waters // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2016. – Vol. 133. – P. 327–333. – <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.07.030>
23. Pankhurst N. W. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective // *General and Comparative Endocrinology*. – 2011. – Vol. 170, iss. 2. – P. 265–275. – <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.07.017>
24. Pérez-Velasco R., Manzano-Sarabia M., Hurtado-Oliva M. Á. Effect of hypo- and hypersaline stress conditions on physiological, metabolic, and immune responses in the oyster *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia: Ostreidae) // *Fish & Shellfish Immunology*. – 2022. – Vol. 120. – P. 252–260. – <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.11.033>
25. Pourmozaffar S., Tamadoni Jahromi S., Rameshi H., Sadeghi A., Bagheri T., Behzadi S., Gozari M., Reza Zahedi M., Abrari Lazarjani S. The role of salinity in physiological responses of bivalves // *Reviews in Aquaculture*. – 2020. – Vol. 12, iss. 3. – P. 1548–1566. – <https://doi.org/10.1111/raq.12397>
26. Pretini V., Koenen M. H., Kaestner L., Fens M. H. A. N., Schiffelers R. M., Bartels M., Van Wijk R. Red blood cells: chasing interactions // *Frontiers in Physiology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 945. – <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00945>
27. Tan K., Fu W., Zhang H., Ma H., Li S., Zheng H. Intraspecific hybridization as a mitigation strategy of low salinity in marine bivalve noble scallop *Chlamys nobilis* // *Aquaculture*. – 2022. – Vol. 552. – Art. 738037. – <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738037>
28. Tian L., Tan P., Yang L., Zhu W., Xu D. Effects of salinity on the growth, plasma ion concentrations, osmoregulation, non-specific immunity, and intestinal microbiota of the yellow drum (*Nibea albiflora*) // *Aquaculture*. – 2020. – Vol. 528. – Art. 735470. – <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735470>
29. Torre A., Trischitta F., Corsaro C., Mallamace D., Faggio C. Digestive cells from *Mytilus galloprovincialis* show a partial regulatory volume decrease following acute hypotonic stress through mechanisms involving inorganic ions // *Cell Biochemistry and Function*. – 2013. – Vol. 31, iss. 6. – P. 489–495. – <https://doi.org/10.1002/cbf.2925>
30. Tuvia S., Moses A., Gulayev N., Levin S., Korenstein R.  $\beta$ -Adrenergic agonists regulate cell membrane fluctuations of human erythrocytes // *The Journal of Physiology*. – 1999. – Vol. 516, iss. 3. – P. 781–792. – <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0781u.x>
31. Velez C., Figueira E., Soares A. M. V. M., Freitas R. Combined effects of seawater acidification and salinity changes in *Ruditapes philippinarum* // *Aquatic Toxicology*. – 2016. – Vol. 176. – P. 141–150. – <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.016>
32. Wei H., Chen M., Deng Z., Zhao W., Li Y., Fang W., Ma Z., Wang Yu, Yu G. Immune and antioxidant responses of pearl oyster *Pinctada maxima* exposed to acute salinity stress // *Aquaculture Research*. – 2022. – Vol. 53, iss. 6. – P. 2439–2447. – <https://doi.org/10.1111/are.15761>
33. Wu F., Falfushynska H., Dellwig O., Piontkivska H., Sokolova I. M. Interactive effects of salinity variation and exposure to ZnO nanoparticles on the innate immune system of a sentinel marine bivalve, *Mytilus edulis* // *Science of the Total Environment*. – 2020. – Vol. 712. – Art. 136473. – <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136473>

**THE ROLE OF THE ADENYLATE CYCLASE SIGNALING PATHWAY  
IN THE ADAPTATION OF THE MEDITERRANEAN MUSSEL (*MYTILUS  
GALLOPROVINCIALIS*) HEMOCYTES TO HYPOOSMOTIC STRESS**

**Tkachuk A. A., Kladchenko E. S., Andreyeva A. Yu.**

*A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation,  
e-mail: aatkachuk86@gmail.com*

**Abstract:** Osmotic homeostasis is one of the fundamental bases for the survival of hydrobionts living in coastal ecosystems of the world ocean. In bivalves, stress induced by fluctuations in water salinity can induce the secretion of neurotransmitters, including catecholamines. Hemocytes circulating in the hemolymph of bivalves have adrenoreceptors on the cell membrane surface, but the basic knowledge of the effects of catecholamines on hemolymph cell functions as well as their osmoregulatory mechanisms is poorly understood. In the present study, the effects of epinephrine and the soluble adenylate cyclase activator forskolin on the osmotic resistance of hemocytes from the commercial bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* were investigated. The effect of these substances on the ability of bivalve hemolymph cells to undergo a regulatory volume reduction in response to hypoosmotic stress was also studied. It was shown in vitro that stimulation of mussel hemocytes with epinephrine (25  $\mu$ M) and forskolin (20  $\mu$ M) had no effect on this parameter of osmotic resistance of Mediterranean mussel hemocytes. It was found that forskolin stimulation did not affect the rate and intensity of the regulatory decrease in hemocyte volume in response to hypoosmotic swelling, whereas incubation with epinephrine inhibited the ability of mussel hemolymph cells to restore volume under hypoosmotic conditions. The results of the present work indicate that the adenylate cyclase signaling pathway is involved in the regulation of mussel hemocyte volume restoration in response to hypoosmotic stress.

**Keywords:** salt stress, Mediterranean mussel, epinephrine, forskolin, osmoregulation

Сведения об авторах

Ткачук Анастасия Александровна	младший научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, aatkachuk86@gmail.com
Кладченко Екатерина Сергеевна	кандидат биологических наук, научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, kladchenko_ekaterina@bk.ru
Андреева Александра Юрьевна	кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, andreevaal@gmail.com

*Поступила в редакцию 21.07.2023 г.  
Принята к публикации 26.01.2024 г.*