

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ  
ГИДРОБИОЛОГИЯ

УДК 594.133–111.3:612.22

DOI: [10.21072/eco.2022.23.03](https://doi.org/10.21072/eco.2022.23.03)

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ГЕМОЛИМФЫ ДВУСТВОРЧАТОГО  
МОЛЛЮСКА АНАДАРЫ БРОУТОНА (*ANADARA BROUGHTONII*)  
В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИПОКСИИ \***

**Андреева А. Ю., Кладченко Е. С., Кухарева Т. А., Рычкова В. Н.**  
ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,  
г. Севастополь, Российская Федерация,  
e-mail: [andreevaal@gmail.com](mailto:andreevaal@gmail.com)

**Аннотация:** В настоящее время актуальным направлением исследований в области физиологии водных организмов является оценка потенциального негативного воздействия последствий глобальных изменений климата на различные виды гидробионтов. Среди ключевых факторов, оказывающих прямое воздействие на водные организмы, обитающие в прибрежной зоне Мирового океана, на клеточном и молекулярном уровнях, доминирующая роль принадлежит гипоксии. В настоящей работе исследовано влияние кратковременной (24 ч) и длительной (72 ч) гипоксической нагрузки на клеточный состав гемолимфы, морфологию гемоцитов и внутриклеточное содержание активных форм кислорода (АФК) у промыслового двустворчатого моллюска анадары Броутона (*Anadara broughtonii*). В условиях эксперимента *in vivo* показано, что гипоксическая нагрузка не приводит к изменению клеточного состава гемолимфы анадар, а также не оказывает воздействия на морфологию гемоцитов. Вместе с тем кратковременная гипоксия (24 ч) приводит к снижению уровня продукции АФК гемоцитами. Продолжительный недостаток кислорода был сопряжён с восстановлением уровня АФК в амёбоцитах анадары, в то время как в эритроцитах уровень продукции АФК оставался ниже показателей контроля. Результаты настоящей работы свидетельствуют о наличии у анадары Броутона механизмов компенсации нехватки кислорода, которые позволяют поддерживать эффективность клеточных иммунных реакций гемоцитов за счёт восстановления способности к генерации АФК в период длительной гипоксии.

**Ключевые слова:** гипоксия, двустворчатые моллюски, гемолимфа, гемоциты, активные формы кислорода.

### Введение

В настоящий момент распространение гипоксии в Мировом океане считается одним из основных факторов, определяющих снижение биологического разнообразия прибрежных экосистем. Наиболее существенным является формирование периодических или перманентных гипоксических акваторий в шельфовой континентальной зоне, поскольку она интенсивно используется для рыбного промысла и ведения аквакультурного хозяйства [Díaz, 2010; Turner et al., 2016]. Шельфовые макроорганизмы, среди которых многие имеют важное промысловое значение, как правило, характеризуются низкой степенью устойчивости к дефициту кислорода. Около 50 % прибрежных морских видов животных гибнут при содержании растворённого кислорода менее  $\sim 70$  мкмоль  $\cdot$  кг<sup>-1</sup> [Vaquer-Sunyer, Duarte, 2008].

---

\*Работа проводилась в рамках госзадания № 121102500161-4 «Закономерности организации иммунной системы промысловых гидробионтов и исследование влияния факторов внешней среды на функционирование их защитных систем».

Двустворчатые моллюски являются основными объектами массового выращивания в аквакультуре, многие виды считаются промысловыми и активно добываются в шельфовой зоне морей России и мира [Wijsman et al., 2019]. При этом, учитывая особенности их местообитания (литораль, небольшие глубины прибрежной зоны), а также прикрепленный образ жизни, данная группа организмов считается потенциально уязвимой для гипоксии [Tan, Zhang, Zheng, 2020]. Вместе с тем для многих промысловых видов двустворчатых моллюсков границы адаптивного потенциала к изменениям содержания растворённого кислорода остаются неисследованными. Устойчивость организма к гипоксии, как правило, ассоциирована со снижением биосинтеза белка, угнетением активности ферментов цикла Кребса и истощением запасов и продукции АТФ [Gorr et al., 2010]. Как следствие — дефицит кислорода может приводить к ослаблению питания моллюсков, снижению скорости роста личинок и взрослых особей. Пониженные концентрации растворённого кислорода негативно отражаются на выживаемости и скорости метаморфоза у личиночных стадий моллюсков [Welker et al., 2013]. Гипоксические условия зачастую ассоциированы с повышенным риском повреждения клеток [Hermes-Lima et al., 2015] и нарушениями их функций [Hermes-Lima et al., 2015]. Вышеуказанные эффекты отмечены у различных видов мидий (*Perna viridis*, *Mytilus coruscus*) и хамелий (*Chamelea gallina*) [Wang et al., 2012; Wang et al., 2014; Sui et al., 2016; Pampanin et al., 2002]. Показано, что глобальные изменения климата способствуют распространению и возникновению очагов заболеваний среди гидробионтов [Marcogliese, 2008]. Причиной снижения иммунитета двустворчатых моллюсков считается ухудшение их функционального состояния: изменение клеточного состава гемолимфы, уменьшение способности гемоцитов генерировать активные формы кислорода (АФК), ингибирование их фагоцитарной активности, рост смертности гемоцитов [Gagnaire et al., 2006; Wang et al., 2012].

В последние годы внимание исследователей сконцентрировано на оценке негативных последствий воздействия гипоксии на функциональное состояние коммерчески значимых видов двустворчатых моллюсков [Turner et al., 2016; Mackenzie et al., 2014]. Анадара Броутона (*Anadara broughtonii*) интенсивно выращивается в Китае, Японии и Корее [Wang et al., 2021]. В России анадара Броутона добывается на Дальнем Востоке и экспортируется в страны Азии [Афейчук, 2020]. Анадары населяют относительно стабильные по условиям сублиторальные зоны, где зарываются в песчаные и мягкие грунты. Аналогично другим бентосным организмам анадары часто испытывают периодический или стабильный дефицит кислорода вследствие интенсивной антропогенной нагрузки на прибрежные воды [Silina, 2006]. Особенностью этого вида моллюсков является наличие в гемолимфе гемоглобинсодержащих гемоцитов — эритроцитов [Kim et al., 2020]. Очевидно, что гемоглобин играет ключевую роль в процессе дыхания гемоцитов, что делает анадару Броутона интересным объектом исследования в области изучения особенностей клеточной адаптации к гипоксии.

Целью настоящей работы было исследование влияния гипоксии различной продолжительности на клеточный состав гемолимфы и морфофункциональные показатели гемоцитов анадары Броутона (*A. broughtonii*).

### Материалы и методы

В работе использовали взрослых особей анадары (*A. broughtonii*, Schrenck, 1867) обоих полов (длина створки  $90,5 \pm 8,0$  мм; масса с учётом раковин  $226,6 \pm 10,9$  г;  $n = 35$ ). Моллюсков отлавливали в прибрежной акватории Амурского залива (г. Владивосток,  $43^{\circ}11'58.4''N$   $131^{\circ}55'09.4''E$ ) в июне 2021 г. В период акклимации к лабораторным условиям (1 неделя) моллюсков помещали в 50-литровые аквариумы с искусственной морской водой (солёность  $33,0 \pm 0,5$  ‰), температуре  $20 \pm 1$  °С, рН 8,0 и концентрации растворённого кислорода  $7,8-8,3$  мг  $O_2 \cdot л^{-1}$ . Во время акклимационного периода моллюсков ежедневно кормили смесью микроводорослей.

Для моделирования экспериментальной гипоксии моллюсков разделили случайным образом на 3 группы по 10 особей. Контрольную группу содержали в аквариумах при условиях, соответствующих периоду акклимации. Экспериментальную гипоксию создавали в 80-литровых герметичных пластиковых аквариумах (плотность посадки 3–5 особей на 10 л воды). Концентрацию растворённого кислорода в аквариумах с моллюсками снижали путём барботаж газобразным азотом в течение 10–15 мин до достижения уровня 1,5–1,9 мг·л<sup>-1</sup>. Время инкубации в условиях гипоксии составляло 24 ч и 72 ч. Концентрацию кислорода в воде контролировали в течение всего экспериментального периода при помощи кислородомера Ohaus Starter 300 D (США) и поддерживали на постоянном уровне за счёт периодической аэрации. Каждые 24 ч в экспериментальных аквариумах производили замену не менее половины воды для удаления продуктов обмена. По окончании экспериментального периода воздействия гипоксии проводили забор гемолимфы.

Гемолимфу (2–4 мл) отбирали из экстрапалиальной полости стерильным пластиковым шприцем объёмом 1 мл с иглой 22-го калибра. В работе использовали индивидуальные образцы клеток. После забора образцы гемолимфы немедленно помещали в стерильные пластиковые пробирки. Все манипуляции с клетками проводили при температуре 4 °С для предотвращения склеивания и агрегации гемоцитов. Образцы гемолимфы были отфильтрованы от крупных фрагментов и агрегатов (диаметр ячейки фильтра 20 мкм) и отцентрифугированы на рефрижераторной центрифуге Eppendorf 5430R (500 g, 5 мин). Клетки трижды отмывали от плазмы в эквивалентном объёме стерильной морской воды. По окончании отмывки часть концентрированных клеток гемолимфы моллюсков (1–2 мкл) использовали для приготовления мазков. Оставшуюся часть гемоцитов ресуспензировали в стерильной морской воде (концентрация клеток 2–4·10<sup>6</sup> кл.·мл<sup>-1</sup>) для анализа методом проточной цитометрии.

Мазки клеток гемолимфы фиксировали и окрашивали по комбинированному методу Паппенгейма (Мая — Грюнвальда и Романовского — Гимзы) [Золотницкая, 1987]. Идентификацию клеток гемолимфы, а также их морфометрический анализ проводили на флуоресцентном микроскопе Biomed PR-2 Lum (Россия) в проходящем свете. Клетки фотографировали на камеру Levenhuk C NG Series и анализировали с использованием компьютерной программы ImageJ 1.44r. Для каждого гемоцита проводили измерение наибольшего диаметра (без учёта псевдоподий), а также диаметра ядра. На каждом мазке проанализировано не менее 1000 клеток. Ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) рассчитывали по следующей формуле (1):

$$\text{ЯЦО} = \text{диаметр ядра} / \text{диаметр гемоцита}. \quad (1)$$

Измерения цитометрических показателей гемоцитов моллюсков, а также определение клеточного состава гемолимфы проводили на проточном цитометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США), оборудованном однофазным аргоновым лазером (длина волны 488 нм). Для определения типов гемоцитов в гемолимфе моллюсков суспензию клеток окрашивали флуоресцентным зондом SYBR Green I (Merck, Germany). Финальная концентрация красителя в пробе составляла 10 мкМ, время окрашивания — 30 мин в темноте при 4 °С. Клеточный состав гемолимфы определяли на основании распределения клеток по величине условного размера (прямое светорас рассеяние, FS) и уровня гранулярности (боковое светорас рассеяние, SS).

Уровень спонтанной (нестимулированной) продукции АФК гемоцитами моллюсков анализировали на основании интенсивности окрашивания клеток 2, 7-дихлорофлуоресцеин диацетатом (DCF-DA) (Merck, Germany). Рабочий раствор DCF-DA готовили путём разведения в диметилсульфоксиде (концентрация красителя 1 мМ·л<sup>-1</sup>) и хранили при температуре –20 °С. Суспензию гемоцитов (1 мл) инкубировали с раствором DCF-DA (финальная концентрация красителя

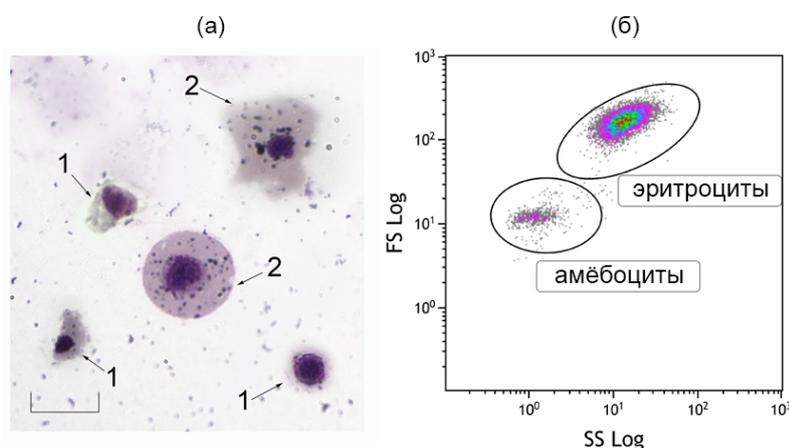
в пробе  $10 \text{ мкМ} \cdot \text{л}^{-1}$ ) в течение 30 минут в темноте при  $4^\circ \text{C}$ . Величину флуоресценции оценивали на однопараметрической гистограмме в канале FL1 цитометра (зелёный спектр флуоресценции).

Уровень смертности гемоцитов определяли при помощи окрашивания клеток йодистым пропидием (PI). Для окрашивания гемоцитов 10 мкл рабочего раствора PI ( $200 \text{ мкМ} \cdot \text{л}^{-1}$ ) (Sigma Aldrich, Germany) добавляли к 1 мл суспензии клеток и инкубировали в течение 30 мин в темноте при  $4^\circ \text{C}$ . Доля мёртвых клеток в суспензии определялась на однопараметрической гистограмме флуоресценции красителя в канале FL2 проточного цитометра (жёлтая область спектра).

Нормальность распределения признаков проверяли при помощи теста Колмогорова — Смирнова. Различия между группами анализировали с помощью программного обеспечения RStudio версии 4.1.0 (R Core Team, 2021). Распределение функциональных и морфометрических показателей гемоцитов не подчинялось нормальному закону распределения, поэтому данные анализировали при помощи непараметрического критерия Манна — Уитни. Различия считали достоверными при  $p \leq 0,05$ . Данные представлены в виде среднего  $\pm$  ошибка среднего ( $M \pm SE$ ).

## Результаты

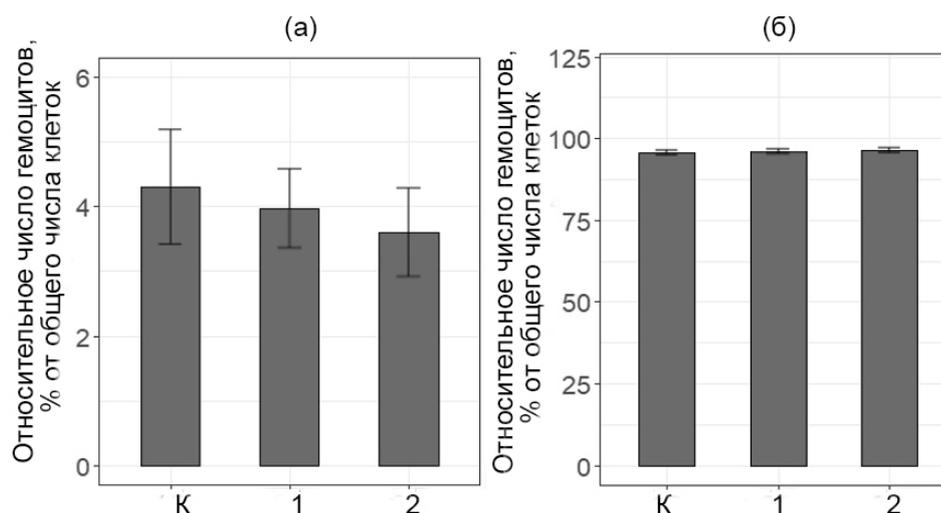
В гемолимфе анадары присутствуют 2 типа клеток: крупные гранулярные эритроциты и мелкие агранулярные амёбоциты (рис. 1). Клетки с наименьшим диаметром ( $6,2 \pm 0,1 \text{ мкм}$ ), амёбоциты, характеризовались высоким ЯЦО ( $0,60 \pm 0,01$ ), были округлой или неправильной формы, крупное ядро ( $3,7 \pm 0,1 \text{ мкм}$ ) располагалось ацентрично и занимало большую часть базофильной цитоплазмы (рис. 1а). У некоторых клеток цитоплазма имела эозинофильную окраску. У данного типа клеток гранулы в цитоплазме не визуализировались.



**Рис. 1.** Клеточный состав гемолимфы анадары Броутона (*A. Broughtonii*); (а) — морфология гемоцитов: 1 — амёбоциты различной аффинности, 2 — гемоглобинсодержащие эритроциты различной формы, линейка 10 мкм; (б) — распределение гемоцитов методом проточной цитометрии по относительному размеру и уровню гранулярности

Наиболее крупные клетки гемолимфы (средний диаметр  $16,1 \pm 0,1 \text{ мкм}$ ), эритроциты, содержали гемоглобин, имели овальную, округлую либо амебоидную форму, в базофильной цитоплазме присутствовали многочисленные (до 40 штук) гранулы. Эритроциты формировали большинство гемоцитов в суспензии, их доля составляла  $95,6 \pm 0,9 \%$  от общего числа клеток. Доля амёбоцитов в гемолимфе не превышала  $7,2 \%$  и составляла в среднем  $4,3 \pm 0,8 \%$ .

В результате воздействия гипоксии (24 ч и 72 ч) в гемолимфе *A. broughtonii* отмечалась тенденция к снижению доли амёбоцитов в суспензиях клеток, однако различия между экспериментальными группами были недостоверны (рис. 2).



**Рис. 2.** Клеточный состав гемолимфы анадары Броутона (*A. broughtonii*) в условиях недостатка кислорода: (а) — доля амёбоцитов, (б) — доля эритроцитов; К — нормоксия, 1 — 24 ч гипоксии, 2 — 72 ч гипоксии

Анализ клеток гемолимфы анадар, подвергшихся воздействию недостатка кислорода, не засвидетельствовал выраженного эффекта на морфометрические характеристики гемоцитов. Размеры эритроцитов и амёбоцитов, а также значения ЯЦО соответствовали значениям клеток моллюсков контрольной группы (табл. 1).

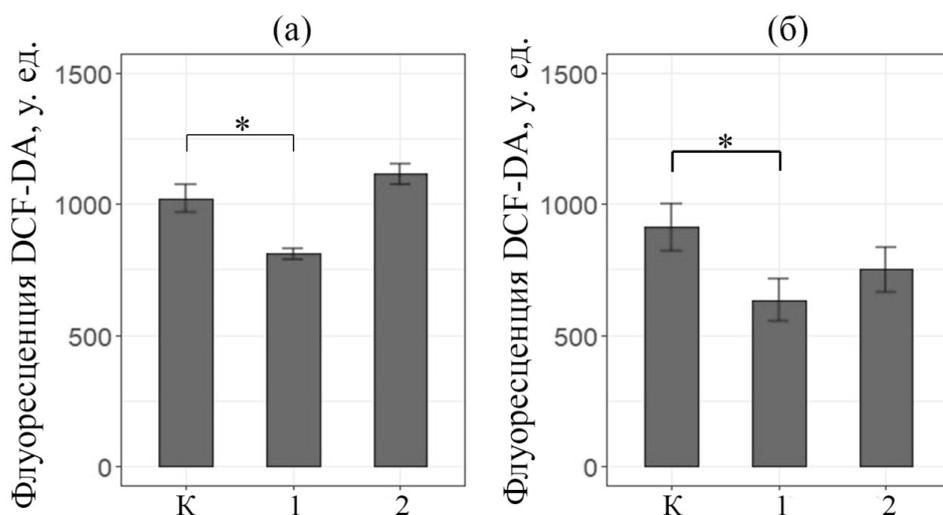
**Таблица 1**

**Морфометрические характеристики гемоцитов *A. broughtonii* в условиях ранжированной гипоксии**

| Группа   | Эритроциты          |                   |               | Амёбоциты           |                   |             |
|----------|---------------------|-------------------|---------------|---------------------|-------------------|-------------|
|          | Диаметр клетки, мкм | Диаметр ядра, мкм | ЯЦО           | Диаметр клетки, мкм | Диаметр ядра, мкм | ЯЦО         |
| контроль | 16,1 ± 0,1          | 3,90 ± 0,02       | 0,200 ± 0,002 | 6,1 ± 0,1           | 3,7 ± 0,1         | 0,60 ± 0,01 |
| 24 ч     | 18,0 ± 0,1          | 4,50 ± 0,02       | 0,300 ± 0,001 | 6,3 ± 0,1           | 4,2 ± 0,1         | 0,70 ± 0,01 |
| 72 ч     | 16,7 ± 0,1          | 4,10 ± 0,02       | 0,200 ± 0,001 | 6,6 ± 0,2           | 3,7 ± 0,1         | 0,60 ± 0,01 |

В условиях нормоксии доля мёртвых гемоцитов составила  $3,9 \pm 0,7$  %. Инкубация в условиях гипоксии не приводила к увеличению смертности гемоцитов в гемолимфе: доля мёртвых клеток в пробах составляла  $1,8 \pm 1,1$  % и  $3,8 \pm 0,6$  % спустя 24 ч и 72 ч дефицита кислорода соответственно.

У амёбоцитов и эритроцитов ( $p \leq 0,05$ ) анадары (*A. broughtonii*), находящейся под воздействием кратковременной гипоксии (24 ч), отмечалось значительное снижение уровня флуоресценции DCF-DA. При этом эритроциты оказались более чувствительными к гипоксическому воздействию, поскольку у них изменения во внутриклеточной концентрации АФК были более выраженными в сравнении с амёбоцитами. Спустя 72 ч воздействия недостатка кислорода уровень спонтанной продукции АФК в амёбоцитах и эритроцитах вернулся к уровню нормоксии (рис. 3).



**Рис. 3.** Спонтанная продукция АФК гемоцитами *A. broughtonii* в условиях ранжированной гипоксии: (а) — уровень АФК в амёбоцитах, (б) — уровень АФК в эритроцитах, \* — различия достоверны при  $p < 0,05$ . Анадары находились в условиях гипоксии ( $1,5\text{--}1,9 \text{ мг } \text{O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$ ) в течение 24 ч и 72 ч. На оси абсцисс представлены опытные группы: К — контроль (нормоксия), 1 — гипоксия 24 ч, 2 — гипоксия 72 ч

### Обсуждение

Известно, что колебания условий водной среды, возникающие вследствие глобальных изменений климата, могут приводить к существенным сдвигам клеточного состава гемолимфы двустворчатых моллюсков [Matozzo, Marin, 2011]. В частности, многочисленные лабораторные исследования свидетельствуют о влиянии гипоксии на соотношение типов гемоцитов в гемолимфе двустворок. Так, в условиях экспериментальной гипоксии (24 ч при  $2,6 \text{ мг } \text{O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$ ) происходило увеличение доли агранулоцитов в гемолимфе *Magallana gigas* [Sussarellu et al., 2010]. В противоположность этим результатам экспериментальная гипоксия (24 ч при  $0,3 \text{ мг } \text{O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$ ) приводила к снижению доли агранулоцитов и увеличению доли гранулоцитов у мидий *M. galloprovincialis* [Andreyeva, Efremova, Kukhareva, 2019]. В отличие от перечисленных видов моллюсков, в гемолимфе представителей рода анадар, в частности *A. kagoshimensis*, помимо амёбоцитов, присутствует ещё один клеточный тип — эритроциты, содержащие гемоглобин [Kladchenko et al., 2020]. Однако, по результатам настоящего исследования, у анадары Броутона гипоксия не индуцировала изменений клеточного состава гемолимфы и не оказывала влияния на морфологические характеристики клеток, о чём свидетельствуют размерные характеристики гемоцитов, а также сходные значения ЯЦО у контрольной и экспериментальной групп. В литературе отсутствует информация о механизмах прямого воздействия недостатка кислорода на размеры и форму клеток беспозвоночных, хотя у устриц *M. gigas* отмечались нарушения формы гемоцитов при гипоксии (24 ч и 72 ч при  $2,2 \text{ мг } \text{O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$ ) [Andreyeva et al., 2021]. Вероятно, наблюдаемые изменения размеров клеток гемолимфы моллюсков, а также клеточного состава гемолимфы при гипоксическом воздействии являются следствием системных перестроек организма, а также вторичными процессами, возникающими в самих клетках в условиях нехватки кислорода. Принимая во внимание это предположение, очевидно, что реакция организма анадары на недостаток кислорода не была сопряжена с генерализованными изменениями функционального состояния моллюска, приводящими к сдвигам в системе гемолимфы.

Вместе с тем снижение способности гемоцитов к спонтанной продукции АФК, наблюдаемое спустя 24 ч экспериментальной гипоксии у всех клеток гемолимфы анадар, может свидетельствовать об уменьшении эффективности клеточного иммунного ответа в условиях кратковременного недостатка кислорода, поскольку индукция окислительного взрыва является основным механизмом нейтрализации патогенов у двустворок [Nappi, Ottaviani, 2000; Ghiselli et al., 2021]. Ранее было показано, что длительная гипоксия может приводить к уменьшению фоновой продукции АФК в гемоцитах мидий *P. viridis* [Wang et al., 2012]. При этом авторы отмечали угнетение остальных маркеров иммунного статуса гемоцитов, таких как способность к фагоцитозу, эстеразная активность и уровень лизосомальных ферментов. Однако, по данным настоящего эксперимента, более длительное (72 ч) нахождение в воде с низким содержанием кислорода, напротив, привело к восстановлению спонтанной продукции АФК и в эритроцитах, и в амёбоцитах анадар. При этом известно, что АФК в гемоцитах двустворчатых моллюсков образуются в результате деятельности дыхательной цепи митохондрий [Heise et al., 2003]. Между интенсивностью дыхания в клетках гемолимфы и способностью к генерации АФК отмечена прямая взаимосвязь [Donaghy et al., 2015]. Очевидно, что гипоксическая нагрузка сопряжена с угнетением клеточного дыхания, что, вероятно, обусловило снижение уровня спонтанной продукции АФК в гемоцитах анадары в первые сутки эксперимента. С другой стороны, известно, что представители рода *Anadara* в условиях дефицита кислорода способны задействовать альтернативные источники энергии, позволяющие компенсировать потребности метаболизма на фоне снижения окислительного фосфорилирования [Солдатов и др., 2009]. Результаты настоящего исследования косвенным образом согласуются с этими данным, поскольку снижение уровня спонтанной продукции АФК эффективно компенсировалось у всех типов клеток гемолимфы при продолжительной гипоксии.

Как видно из данных, гипоксическая нагрузка не оказывала влияния на размерные характеристики клеток гемолимфы анадары Броутона, а также не приводила к изменениям её клеточного состава. Отсутствие выраженных изменений в системе гемолимфы моллюсков свидетельствует об умеренном уровне испытываемого стресса в результате воздействия недостатка кислорода. Вместе с тем гипоксическая нагрузка, очевидно, была сопряжена с угнетением клеточного иммунного ответа в условиях кратковременного недостатка кислорода и стабилизацией уровня АФК в гемоцитах при длительной гипоксии. Последнее, вероятно, сопряжено с наличием у анадары Броутона механизмов компенсации недостатка кислорода, обеспечивающих поддержание функций клеток в период дефицита кислорода.

### Список литературы

1. Афейчук Л. С. Состояние промысловых скоплений анадары Броутона (*Anadara Broughtonii*) в заливе Петра Великого (Японское море) по материалам 2019 года // Природные ресурсы, их современное состояние, охрана, промысловое и техническое использование : материалы XI нац. (всерос.) науч.-практ. конф. (24–25 марта 2020 г.) / Камчат. гос. техн. ун-т ; редкол.: В. И. Карпенко [и др.]. – Петропавловск-Камчатский : КамчатГТУ, 2020. – С. 6–10.
2. Золотнищкая Р. П. Методы гематологических исследований // Лабораторные методы исследования в клинике : справочник / под ред. В. В. Меньшикова. – Москва : Медицина, 1987. – С. 106–148.
3. Солдатов А. А., Андреев Т. И., Сысоева И. В., Сысоев А. А. Тканевая специфика метаболизма у двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis* Вг. в условиях экспериментальной аноксии // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2009. – Т. 45, № 3. – С. 284–289.

4. Andreyeva A. Yu., Efremova E. S., Kukhareva T. A. Morphological and functional characterization of hemocytes in cultivated mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and effect of hypoxia on hemocyte parameters // Fish & shellfish immunology. – 2019. – Vol. 89. – P. 361–367. – <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.017>
5. Andreyeva A. Yu., Gostyukhina O. L., Kladchenko E. S., Vodiasova E. A., Chelebieva E. S. Acute hypoxic exposure: effect on hemocyte functional parameters and antioxidant potential in gills of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* // Marine Environmental Research. – 2021. – Vol. 169. – P. 105389. – <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105389>
6. Díaz R. J. Agriculture's impact on aquaculture: hypoxia and eutrophication in marine waters // Advancing the aquaculture agenda : workshop proc. / OECD. – Paris : OECD, 2010. – <https://doi.org/10.1787/9789264088726-en>
7. Donaghy L., Hong H. K., Jauzein C., Choi K. S. The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs // Fish and shellfish immunology. – 2015. – Vol. 42, iss. 1. – P. 91–97. – <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.030>
8. Gagnaire B., Soletchnik P., Madec P., Geairon P., Le Moine O., Renault T. Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters // Aquaculture. – 2006. – Vol. 254, iss. 1/4. – P. 606–616. – <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.008>
9. Ghiselli F., Iannello M., Piccinini G., Milani L. Bivalve molluscs as model systems for studying mitochondrial biology // Integrative and Comparative Biology. – 2021. – Vol. 61, iss. 5. – P. 1699–1714. – <https://doi.org/10.1093/icb/icab057>
10. Gorr T. A., Wichmann D., Hu J., Hermes-Lima M., Welker A. F., Terwilliger N., Wren J. F., Viney M., Morris S., Nilsson G. E., Deten A., Soliz J., Gassmann M. Hypoxia tolerance in animals: biology and application // Physiological and Biochemical Zoology. – 2010. – Vol. 83, iss. 5. – P. 733–752. – <https://doi.org/10.1086/648581>
11. Heise K., Puntarulo S., Pörtner H. O., Abele D. Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress // Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Toxicology and Pharmacology. – 2003. – Vol. 134, iss. 1. – P. 79–90. – [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00212-0](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00212-0)
12. Hermes-Lima M., Moreira D. C., Rivera-Ingraham G. A., Giraud-Billoud M., Genaro-Mattos T. C., Campos É. G. Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: revisiting the proposal two decades later // Free Radical Biology and Medicine. – 2015. – Vol. 89. – P. 1122–1143. – <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.156>
13. Kladchenko E. S., Andreyeva A. Yu., Kukhareva T. A., Soldatov A. A. Morphologic, cytometric and functional characterisation of *Anadara kagoshimensis* hemocytes // Fish & Shellfish Immunology. – 2020. – Vol. 98. – P. 1030–1032. – <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.061>
14. Kim J. H., Lee H. M., Cho Y. G., Shin J. S., You J. W., Choi K. S., Hong H. K. 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. – Vol. 160. – P. 111654. – <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111654>
15. Mackenzie C. L., Lynch S. A., Culloty S. C., Malham S. K. Future oceanic warming and acidification alter immune response and disease status in a commercial shellfish species, *Mytilus edulis* L. // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, iss. 6. – P. e99712. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099712>
16. Marcogliese D. J. The impact of climate change on the parasites and infectious diseases of aquatic animals // OIE Revue scientifique et technique. – 2008. – Vol. 27, iss. 2. – P. 467–484. – <https://doi.org/10.20506/rst.27.2.1820>

17. *Matozzo V., Marin M. G.* Bivalve immune responses and climate changes: is there a relationship? // *Invertebrate survival journal*. – 2011. – Vol. 8, iss. 1. – P. 70–77.
18. *Nappi A. J., Ottaviani E.* Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates // *BioEssays*. – 2000. – Vol. 22, iss. 5. – P. 469–480. – [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(200005\)22:5<469::AID-BIES9>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(200005)22:5<469::AID-BIES9>3.0.CO;2-4)
19. *Pampanin D. M., Ballarin L., Carotenuto L., Marin M. G.* Air exposure and functionality of *Chamelea gallina* haemocytes: effects on haematocrit, adhesion, phagocytosis and enzyme contents // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*. – 2002. – Vol. 131, iss. 3. – P. 605–614. – [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00512-8](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00512-8)
20. *Silina A. V.* Spatial heterogeneity and long-term changes in bivalve *Anadara broughtoni* population: influence of river run-off and fishery // *Ocean Science Journal*. – 2006. – Vol. 41, iss. 4. – P. 211–219. – <https://doi.org/10.1007/BF03020624>
21. *Sui Ya., Kong H., Shang Yu., Huang X., Wu F., Hu M., Lin D., Lu W., Wang Yo.* Effects of short-term hypoxia and seawater acidification on hemocyte responses of the mussel *Mytilus coruscus* // *Marine pollution bulletin*. – 2016. – Vol. 108, iss. 1/2. – P. 46–52. – <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.001>
22. *Sussarellu R., Fabioux C., Le Moullac G., Fleury E., Moraga D.* Transcriptomic response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia // *Marine genomics*. – 2010. – Vol. 3, iss. 3/4. – P. 133–143. – <https://doi.org/10.1016/j.margen.2010.08.005>
23. *Tan K., Zhang H., Zheng H.* Selective breeding of edible bivalves and its implication of global climate change // *Reviews in Aquaculture*. – 2020. – Vol. 12, iss. 4. – P. 2559–2572. – <https://doi.org/10.1111/raq.12458>
24. *Turner L. M., Alsterberg C., Turner A. D., Girisha S. K., Rai A., Havenhand J. N., Venugopal M. N., Karunasagar I., Godhe A.* Pathogenic marine microbes influence the effects of climate change on a commercially important tropical bivalve // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6, iss. 1. – P. 1–10. – <https://doi.org/10.1038/srep32413>
25. *Vaquer-Sunyer R., Duarte C. M.* Thresholds of hypoxia for marine biodiversity // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105, iss. 40. – P. 15452–15457. – <https://doi.org/10.1073/pnas.0803833105>
26. *Wang Yo., Hu M., Cheung S. G., Shin P. K. S., Lu W., Li J.* Immune parameter changes of hemocytes in green-lipped mussel *Perna viridis* exposure to hypoxia and hyposalinity // *Aquaculture*. – 2012. – Vol. 356/357. – P. 22–29. – <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.001>
27. *Wang Yo., Hu M., Li Q., Li J., Lin D., Lu W.* Immune toxicity of TiO<sub>2</sub> under hypoxia in the green-lipped mussel *Perna viridis* based on flow cytometric analysis of hemocyte parameters // *Science of the total environment*. – 2014. – Vol. 470/471. – P. 791–799. – <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.060>
28. *Wang Yi., Zheng Yi., Dong J., Zhang X.* Two-sided effects of prolonged hypoxia and sulfide exposure on juvenile ark shells (*Anadara broughtonii*) // *Marine Environmental Research*. – 2021. – Vol. 169. – P. 105326. – <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105326>
29. *Welker A. F., Moreira D. C., Campos É. G., Hermes-Lima M.* Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*. – 2013. – Vol. 165, iss. 4. – P. 384–404. – <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.04.003>
30. *Wijsman J. W. M., Troost K., Fang J., Roncarati A.* Global production of marine bivalves. Trends and challenges // *Goods and services of marine bivalves* / eds: A. C. Smaal [et al.]. – Cham, Switzerland : Springer, 2019. – P. 7–26. – [https://doi.org/10.1007/978-3-319-96776-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-96776-9_2)

**FUNCTIONAL PARAMETERS OF THE BIVALVE MOLLUSK ARK SHELL (*ANADARA BROUGHTONII*) HEMOLYMPH UNDER EXPOSURE TO HYPOXIA**

**Andreyeva A. Yu., Kladchenko E. S., Kukhareva T. A., Rychkova V. N.**

*A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation,  
e-mail: [andreevaal@gmail.com](mailto:andreevaal@gmail.com)*

**Abstract:** Investigation of negative consequences of significant climate change on various types of aquatic organisms is an actual area of physiological research. Among key factors directly influencing aquatic organisms inhabiting coastal waters of the World Ocean at cellular and molecular levels, hypoxia plays a major role. In the present work, we studied the effect of short-term (24 h) and long-term (72 h) hypoxia on hemolymph cellular composition, hemocyte morphology, and intracellular reactive oxygen species (ROS) content in the commercial bivalve (*Anadara broughtonii*). Under the experiment *in vivo*, we showed that hypoxia is not associated with shifts in the hemolymph cellular composition of the ark shell, and also does not affect the morphology of hemocytes. At the same time, short-term hypoxia (24 h) lead to a decrease in the level of ROS production by hemocytes. Results of the present work indicate that ark shell possesses mechanisms that compensate oxygen deficiency; these mechanisms allow maintaining the efficacy of hemocyte cellular immune reactions by recovery of the level of spontaneous ROS production under prolonged hypoxia.

**Keywords:** hypoxia, bivalves, hemolymph, hemocytes, reactive oxygen species.

Сведения об авторах

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| Андреева<br>Александра<br>Юрьевна    | кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», <a href="mailto:andreevaal@gmail.com">andreevaal@gmail.com</a> |
| Кладченко<br>Екатерина<br>Сергеевна  | научный сотрудник ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», <a href="mailto:kladchenko_ekaterina@bk.ru">kladchenko_ekaterina@bk.ru</a>                          |
| Кухарева<br>Татьяна<br>Александровна | кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», <a href="mailto:altali@yandex.ru">altali@yandex.ru</a>         |
| Рычкова<br>Валентина<br>Николаевна   | младший научный сотрудник ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», <a href="mailto:novitsky_valya@mail.ru">novitsky_valya@mail.ru</a>                          |

*Поступила в редакцию 14.06.2022 г.*

*Принята к публикации 09.08.2022 г.*