

## ВЛИЯНИЕ КРАТКОСРОЧНОГО ИЗМЕНЕНИЯ СОЛЕННОСТИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕМОЦИТОВ СРЕДИЗЕМНОМОРСКОЙ МИДИИ

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

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН  
просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: dlavrichenko01@gmail.com  
Поступила в редакцию 29.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0652

**Аннотация.** В настоящей работе при помощи методов проточной цитометрии и лазерной дифракции проведен анализ функционального состояния гемоцитов (осмотическая хрупкость, соотношение типов клеток в гемолимфе, способность к продукции активных форм кислорода – АФК) средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), акклиматизированных к низкой (6 ‰, 10 ‰, 14 ‰) и высокой солёности (24 ‰, 30 ‰). Акклимация к различной солёности приводила к разнонаправленному изменению клеточного состава гемолимфы мидий, наиболее выраженный эффект наблюдался при низкой солёности. При этом, как в условиях низкой, так и высокой солёности отмечен рост внутриклеточной концентрации АФК в гемоцитах, что может свидетельствовать о развитии окислительного стресса. Кроме этого, при всех изменениях солёности был зафиксирован сдвиг кривой осмотической хрупкости. Результаты настоящей работы показали, что средиземноморская мидия обладает выраженной толерантностью к кратковременным (48 ч) колебаниям солёности, при этом снижение солёности сопровождалось более выраженными функциональными изменениями. В свою очередь сдвиг кривой осмотической стойкости свидетельствует об участии клеточных механизмов осморегуляции у средиземноморских мидий при адаптации к краткосрочному изменению солёности.

**Ключевые слова:** гемоциты, клеточный состав гемолимфы, активные формы кислорода, солёность, осмотическая хрупкость.

Солёность считается одним из основных экологических факторов, влияющих на функциональное состояние двустворчатых моллюсков. Согласно прогнозам Межправительственной группы экспертов по изменению климата в ближайшие годы ожидается увеличение частоты экстремальных осадков [1], стоки которых в прибрежные морские участки могут привести к резким колебаниям солёности. Среди возможных последствий колебания солёности выделяют сокращение видового разнообразия и исчезновение крупных видов гидробионтов, в том числе являющихся объектами добычи или культивирования в мировой пищевой промышленности [2,3]. Наибольшее значение солёность имеет для прибрежных экосистем и эстуариев, где сконцентрированы марихозяйства [4]. В отличие от открытых вод, солёность прибрежных акваторий значительно меняется в связи с колебаниями температуры, действием осадков, приливов и отливов, штормов [5,6], а также с ростом глобальной средней температуры поверхности моря и таянием ледяных шапок и ледников [7,8].

Морские двустворчатые моллюски составляют около 14 % объёмов мировой добычи водных биологических ресурсов. При этом более 89% глобального производства моллюсков осуществляется путем аквакультурного выращивания. [9] Вместе с тем, эффективность аквакультуры моллюсков во многом определяется состоянием водной среды, и дальнейшее развитие отрасли возможно только с учетом глобальных проблем Мирового океана, таких как колебание солёности. [10]

В настоящем исследовании мы оценили ряд параметров, связанных с иммунитетом (клеточный состав гемолимфы, способность к спонтанной продукции АФК, доля мертвых гемоцитов гемоцитов), после воздействия гипо- и гиперсолённых стрессовых условий окружающей среды на двустворчатого моллюска *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819).

Двустворчатые моллюски размещались в пластиковых аквариумах ёмкостью 50-70 л, оборудованных системой аэрации и фильтрации воды (концентрация кислорода 7-8 мг л<sup>-1</sup>, рН = 8,2, температура 18-20 °С) на период адаптации не менее 1 недели. Мидии были разделены на 5 групп: контроль (18 ‰), опытные гипосолёные (6 ‰, 10 ‰, 14 ‰), опытные гиперсолёные (24 ‰, 30 ‰). Снижение солёности в экспериментальных аквариумах достигалось путем постепенного разбавления воды в аквариумах дистиллированной водой со скоростью 2 ‰ в сутки. Повышение солёности осуществляли путем ежедневного добавления морской соли в аквариумы со скоростью 2 ‰ в сутки. После достижения желаемого уровня солёности (6 ‰, 10 ‰, 14 ‰, 24 ‰, 30 ‰) моллюски содержались в данных условиях в течение 2 дней, а затем производился сбор проб и анализ показателей. На протяжении всего эксперимента, включая период акклиматизации к лабораторным условиям, для удаления метаболитов ежедневно меняли воду, с сохранением значения солёности. Моллюсков кормили смесью микроводорослей (*Tetraselmis viridis* (штамм IBSS-25) из коллекции Отдела биотехнологии и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ, 5-10 мл смеси на каждые 50 литров аквариумной воды). Гемолимфа отбиралась по стандартным протоколам [11]. Непосредственно сразу после отбора анализировали клеточный состав гемолимфы, способность гемоцитов к продукции активных форм кислорода и осмотическую хрупкость гемоцитов при помощи методов проточной цитометрии и лазерной дифракции.

Для идентификации типов клеток в гемолимфе готовую суспензию окрашивали ДНК-красителем SYBR Green I (финальная концентрация в пробе 10 мкмоль л<sup>-1</sup>, время инкубации – 40 мин в темноте). Содержание ДНК в гемоцитах мидий анализировали на основании гистограмм распределения флуоресценции красителя в канале FL1.

Оценка способности гемоцитов к спонтанной продукции активных форм кислорода проводилась методом проточной цитометрии по флуоресценции красителя 2-7-дихлорфлуоресцеин-диацетата (DCF-DA). 1 мл суспензий гемоцитов инкубировали с 10 мкл раствора DCF-DA в течение 40 мин в темноте. Финальная концентрация красителя в пробе составляла 10 мкмоль л<sup>-1</sup>. Флуоресценция красителя анализировалась в канале FL1.

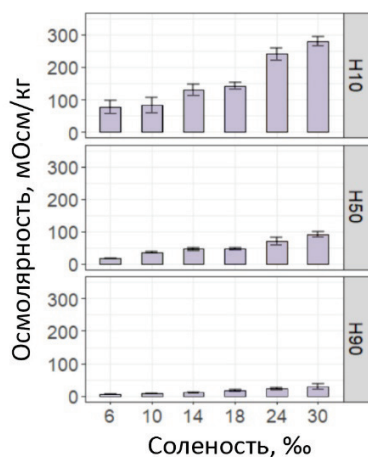
Долю мертвых гемоцитов в суспензии определяли при помощи флуоресцентного красителя propidium iodide (PI). К 1 мл суспензии гемоцитов добавляли 10 мкл раствора PI (Sigma Aldrich) и инкубировали в темноте в течение 40 мин при 4 °С. Процент мертвых гемоцитов от общего числа клеток оценивали по гистограммам флуоресценции PI в канале FL2 цитометра.

Степень гемолиза определяли на основе регистрации рассеянного частицами света под разными углами [12-14]. Исследование осмотической хрупкости проводили путем серийных разведений клеточных суспензий дистиллированной водой (по 1-2 мл) с постепенным снижением осмолярности и добавлением соответствующего объема гемоцитов для поддержания константы концентрации клеток. На каждой ступени разбавления осмолярность контролировали криоскопическим осмометром OsmoSpecial 1 (Astori, Италия). Диапазон осмолярности от 461 до 55 мОсм/кг был использован для построения классической кривой осмотической хрупкости [15]. Процент гемолиза рассчитывали исходя из 100% -ного гемолиза на наиболее гипоосмотической стадии теста - 55 мОсм л<sup>-1</sup>. Для количественного описания осмотической хрупкости гемоцитов использовалась точка 10% гемолиза (Н10), 50% гемолиза (Н50) и 90% гемолиза отражающие осмолярность среды, при которой наблюдается лизис 10%, 50% и 90% клеток в образце, соответственно [16]. Ширину распределения гемоцитов по осмотической хрупкости (W), характеризующую однородность клеточной популяции, рассчитывали, как  $W = H10 - H90$  (мОсм/кг).

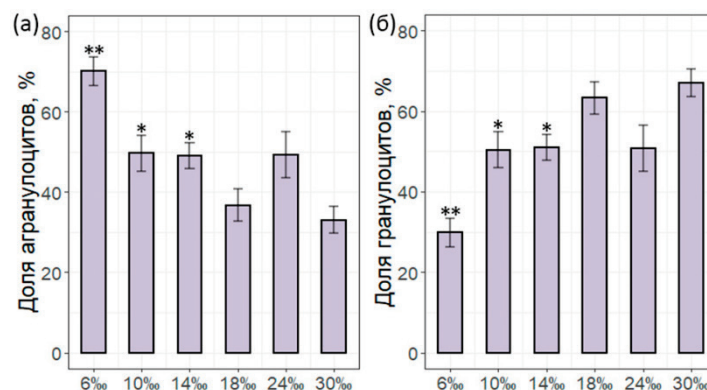
Широкий диапазон соленостной толерантности двустворчатых моллюсков обеспечивается преимущественно клеточными механизмами адаптации [7,17]. У мидий, находящихся в гипоосмотических условиях (опытные группы 6 ‰, 10 ‰, 14 ‰), отмечено снижение показателя Н50 кривой осмотической стойкости: лизис 50 % клеток в суспензии наблюдался при более низких значениях осмолярности среды. Так, при солености 14 ‰ показатель Н50 составил 46,2±4,0 мОсм/кг ( $p > 0,05$ ), при солености 10 ‰ - 35,7±3,0 мОсм/кг, а при 6 ‰ – 16,4±2,0 мОсм/кг ( $p < 0,05$ ). В условиях экспериментального повышения солености (опытные группы 24 ‰, 30 ‰) лизис гемоцитов мидий начинался при более высоких значениях осмолярности. В экспериментальной группе, инкубированной при солености 24 ‰, Н50 был равен 70,6±11,4 мОсм/кг, а после воздействия солености 30 ‰ – 90,0±9,1 мОсм/кг (рис. 1).

Аналогичным образом при гипоосмотической нагрузке в гемоцитах мидий сдвигались и значения Н90 и Н10 кривой осмотической стойкости. В контрольной группе моллюсков Н90 было равно 15,8±3,3 мОсм/кг. Гипоосмотический стресс приводил к снижению данного показателя: при солености 14 ‰ он был равен 9,7±1,9 мОсм/кг, при 10 ‰ – 6,7±1,8 мОсм/кг, а при 6 ‰ – 4,9±0,8 мОсм/кг. Обратная тенденция наблюдалась в группе моллюсков, испытывающих экспериментальное повышение солености. В опытных группах 24 ‰ и 30 ‰ лизис 90 % гемоцитов отмечался при 21,6±5,2 мОсм/кг и 28,5±7,8 мОсм/кг соответственно.

У мидий контрольной группы в гемолимфе агранулоциты и гранулоциты составляли около 50 %. В условиях гиперосмотической нагрузки (группа 24 ‰) доля гранулоцитов снижалась до 37 ‰ ( $p < 0,05$ ), однако у мидий, акклиматизированных к солености 30 ‰, клеточный состав гемолимфы не отличался от контроля (18 ‰). В



**Рисунок 1.** Сдвиг параметров осмотической хрупкости гемоцитов *M. galloprovincialis* после акклимации к условиям к различной солености



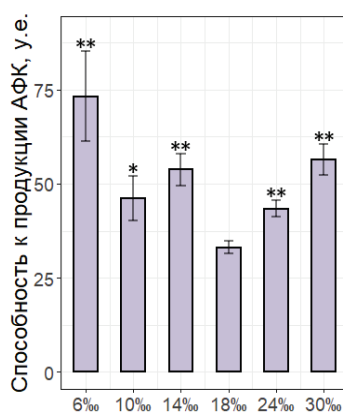
**Рисунок 2.** Клеточный состав гемолимфы *M. galloprovincialis* в условиях акклимации к различной солености. (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ ). (а) – относительная доля агранулоцитов, (б) – относительная доля гранулоцитов

условиях гипоосмотической нагрузки у мидий, подвергшихся воздействию солености 14 ‰ и 10 ‰, не зафиксировано статистически значимых изменений в клеточном составе гемолимфы, однако, при наименьшей экспериментальной солености (6 ‰) у моллюсков отмечалось достоверное снижение доли гранулоцитов более чем в 1.8 раза относительно контроля ( $p < 0,05$ ).

Эффективность клеточного иммунного ответа мидий в условиях экспериментальных колебаний солености определялась по уровню продукции в гемоцитах активных форм кислорода (АФК) методом проточной цитометрии на основании анализа интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных красителем DCF-DA. У всех опытных групп в гемоцитах отмечалось достоверное увеличение спонтанной продукции АФК ( $p < 0,05$ ). Интересно, что чем больше отличалась соленость в опытной группе от контроля, тем выше были показатели флуоресценции красителя DCF-DA, что свидетельствовало о высокой концентрации АФК в цитоплазме гемоцитов. Наибольший рост продукции АФК отмечался при экспериментальном снижении солености (в особенности в группе 6 ‰) ( $p < 0,05$ ). Рост уровня внутриклеточного содержания АФК при изменении солености среды был характерен и для агранулоцитов, и для гранулоцитов мидий. Исходя из полученных данных, выявлено, что колебания солености оказывают существенное воздействие на показатели клеточного иммунного ответа гемоцитов мидий.

Доля мертвых гемоцитов в суспензиях определялась на основании цитометрического анализа флуоресценции клеток, окрашенных красителем йодистый пропидий (propidium iodide, PI). Уровень смертности гемоцитов в контрольной (18 ‰) и опытных группах (засоление и распреснение среды) не превышал 4 ‰ и достоверно не различался. Таким образом, вероятно, кратковременные изменения солености не приводят к гибели клеток гемолимфы мидий.

Колебания солености среды были ассоциированы с достоверными изменениями клеточного состава гемолимфы в различных опытных группах, сравнительный анализ не выявил единого тренда в наблюдаемых различиях - ни в отношении направлении сдвига клеточного состава (преобладание определенного типа клеток), ни во взаимосвязи с направлением изменений солености (распреснение, или засоление). Вероятно, наблюдаемые изменения клеточного состава гемолимфы мидий являлись следствием сторонних процессов, и не зависели напрямую от колебаний солености среды. Известно, что физиологический стресс как неспецифическая реакция организма возникает при действии любых неблагоприятных факторов среды, и зачастую сопровождается избыточной продукцией АФК (супероксидный анион и перекись водорода), которые обладают высокой



**Рисунок 3.** Влияние экспериментальных колебаний солености на уровень спонтанной продукции АФК в гемоцитах мидий (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ )

цитотоксичностью по своей природе окисляя липиды, белки, нуклеиновые кислоты [18]. В частности, изменение солености, также может способствовать увеличению выработки АФК, что влияет на функциональные показатели гемоцитов моллюсков - уровень генерации АФК, осмотическую стойкость, интенсивность дыхания [19]. В настоящем исследовании показано, что акклимация моллюсков к гипоосмотической среде приводит к сдвигу осмотической кривой в сторону жесткости, в то время как постепенное увеличение солености сопровождается смещением кривой в сторону увеличения осмотической хрупкости гемоцитов. Среди неспецифических (нетоксических) причин, влияющих на деформируемость мембран клеток животных, выделяют окислительный стресс [20]. Вместе с тем, в нашем исследовании увеличение уровня внутриклеточных АФК гемоцитами не сопровождалось ростом их хрупкости. В группе моллюсков, содержащихся в условиях низкой солености, увеличение уровня АФК в гемоцитах не приводило к снижению показателя максимального набухания клеток гемолимфы перед лизисом. Отсутствие изменений в свойствах мембраны может объясняться высокой активностью антиоксидантного комплекса в гемоцитах мидий и эффективной нейтрализацией избыточных АФК, продуцируемых в результате изменений солености. Учитывая, что доля мертвых гемоцитов в суспензиях клеток также не менялась, можно предположить, что, изменения показателей осмотической стойкости гемоцитов связаны с внутриклеточной адаптацией клеток к сдвигу осмолярности внешней среды, то есть о наличии у мидий клеточных механизмов соленостной адаптации.

Таким образом, колебания солености среды были ассоциированы с достоверными изменениями клеточного состава гемолимфы мидий, которые, однако, не имели общих закономерностей. Вероятно, наблюдаемые изменения в относительной доли гранулоцитов и агранулоцитов в гемолимфе мидий являлись следствием функционального ответа организма на изменение осмолярности, и не зависели напрямую от колебаний солености среды. Хотя снижение солености до 6 ‰ не было связано с гибелью моллюсков в эксперименте, наблюдаемые изменения в системе гемолимфы, свидетельствует о неспособности мидий компенсировать негативное воздействие распреснения. Наименьшие изменения отмечались в экспериментальном диапазоне солености 14-24 ‰, что, вероятно, является неким допустимым пределом кратковременных изменений солености для данного вида моллюсков.

*Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 22-26-00165 «Функциональный и иммунный статус двустворчатых моллюсков-объектов марикультуры в условиях действия факторов глобальных изменений климата».*

#### **Список литературы / References:**

1. Hoegh-Guldberg O., Jacob D. et al. Impacts of 1.5 °C global warming on natural and human systems. *Global warming of 1.5° C*, 2018.
2. Zonn I.S. Environmental issues of the Caspian. *The Caspian sea environment*, 2005, pp. 223-242.
3. Zaitsev Y. *Introduction to the Black Sea Ecology*, 2008.
4. Barbier E.B., Hacker S.D., Kennedy C., Koch E.W., Stier A.C., Silliman B.R. The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecological monographs*, 2011, vol. 81, no. 2, pp. 169-193.
5. Chen K., Kuang C., Wang L., Chen K., Han X., Fan J. Storm surge prediction based on long short-term memory neural network in the East China Sea. *Applied Sciences*, 2021, vol. 12, no. 1, p. 181.
6. Coughlan M., Cronin P., Ryan F. Survey research: Process and limitations. *International Journal of Therapy and Rehabilitation*, 2009, vol. 16, no. 1, pp. 9-15.
7. Velez C., Figueira E., Soares A.M., Freitas R. Native and introduced clams biochemical responses to salinity and pH changes. *Science of the Total Environment*, 2016, vol. 566, pp. 260-268.
8. Velez C., Figueira E., Soares A.M., Freitas R. Combined effects of seawater acidification and salinity changes in *Ruditapes philippinarum*. *Aquatic Toxicology*, 2016, vol. 176, pp. 141-150.
9. Wijsman J.W. M., Troost K., Fang J., Roncarati A. Global production of marine bivalves. Trends and challenges. *Goods and services of marine bivalves*, 2019, pp. 7-26.
10. Ahmed N., Thompson S., Glaser M. Global aquaculture productivity, environmental sustainability, and climate change adaptability. *Environmental management*, 2019, vol. 63, pp. 159-172.
11. 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.
12. Mindukshev I.V., Krivoshlyk V.V., Dobrylko I.A., Goncharov N.V., Vivulanets E.V., Kuznetsov S.V., Krivchenko A.I. Abnormalities of elastic and transporting properties of red blood cells under development of apoptosis. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2010, vol. 4, pp. 22-31.
13. Gambaryan S., Subramanian H., Kehrler L., Mindukshev I., Sudnitsyna J., Reiss C., Rukoyatkina N., Friebe A., Sharina I., Martin E., Walter U. Erythrocytes do not activate purified and platelet soluble guanylate cyclases even in conditions favourable for NO synthesis. *Cell Communication and Signaling*, 2016, vol. 14, pp. 1-12.
14. Sudnitsyna J.S., Skvertchinskaya E.A., Dobrylko I.A., Nikitina E.R., Krivchenko A.I., Gambaryan S.P., Mindukshev I.V. Human erythrocyte ammonium transport is mediated by functional interaction of ammonium (RhAG) and anion (AE1) transporters. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2016, vol. 10, pp. 301-310.

15. Singh T.S., Verma T.N. An assessment study of using Turel Kongreng (river mussels) as a source of heterogeneous catalyst for biofuel production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2019, vol. 20, p. 101185.
16. Makhro A., Huisjes R., Verhagen L. P. et al. Red cell properties after different modes of blood transportation. *Frontiers in physiology*, 2016, vol. 7, p. 288.
17. 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 Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, vol. 177, pp. 1-9.
18. Huang H.-Y., Lin Y.-C.-D., Li J. et al. miRTarBase 2020: updates to the experimentally validated microRNA–target interaction database. *Nucleic acids research*, 2020, vol. 48, no. D1, pp. D148-D154.
19. Suski M.Sc.J.M., Lebieczinska M., Bonora M., Pinton P., Duszynski J., Wieckowski M.R. Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. *Mitochondrial bioenergetics: Methods and protocols*, 2018, pp. 357-381.
20. Mohanty J.G., Nagababu E., Rifkind J.M. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Frontiers in physiology*, 2014, vol. 5, p. 84

#### THE EFFECT OF SHORT-TERM SALINITY CHANGES ON THE FUNCTIONAL FEATURES OF MEDITERRANEAN MUSSEL HEMOCYTES

Lavrichenko D.S., Tkachuk A.A., Kladchenko E.S., Andreeva A. Yu.

FRC “A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, RAS

*Nakhimov Ave. Nakhimova, 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: dlavrichenko01@gmail.com*

Received 29.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0652

**Abstract.** In this work, using the methods of flow cytometry and laser diffraction, the analysis of the functional state of hemocytes (osmotic fragility, the ratio of cell types in the hemolymph, the ability to produce ROS) was carried out of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), acclimatized to low (6 ‰, 10 ‰, 14 ‰) and high salinity (24 ‰, 30 ‰). Acclimation to different salinity led to a multidirectional change in the cellular composition of the hemolymph of mussels, the most pronounced effect was observed at low salinity. At the same time, both in conditions of low and high salinity, an increase in the intracellular concentration of ROS in hemocytes was noted, which may indicate the development of oxidative stress. In addition, with all changes in salinity, a shift in the osmotic fragility curve was recorded. The results of this work showed that the Mediterranean mussel has a pronounced tolerance to short-term (48 h) fluctuations in salinity, while the decrease in salinity was accompanied by more pronounced functional changes. In turn, the shift in the osmotic resistance curve indicates the involvement of cellular mechanisms of osmoregulation in Mediterranean mussels in adapting to short-term changes in salinity.

**Key words:** hemocytes, hemolymph cellular composition, reactive oxygen species, salinity, osmotic fragility.