

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»

На правах рукописи

Кладченко Екатерина Сергеевна

АККЛИМАЦИЯ МОЛЛЮСКА-ВСЕЛЕНЦА
ANADARA KAGOSHIMENSIS (TOKUNAGA, 1906)
К УСЛОВИЯМ ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

Специальность 1.5.16– гидробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Солдатов Александр Александрович

Севастополь 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Соленость как ведущий экологический фактор.....	12
1.2 Влияние солености на функциональное состояние морских организмов ..	14
1.3 Механизмы адаптации двустворчатых моллюсков к изменению солености	22
1.4 Классификация клеток гемолимфы двустворчатых моллюсков.....	25
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	34
2.1 Материалы	34
2.2 Отбор гемолимфы и пробоподготовка.....	36
2.3 Идентификация клеточных типов гемолимфы <i>A. kagoshimensis</i>	37
2.3.1 Метод оптической микроскопии	37
2.3.2 Метод проточной цитометрии	38
2.3.3 Метод градиентного центрифугирования	40
2.4 Моделирование гипо- и гиперосмотических условий	40
2.5 Оценка осмотической стойкости гемоцитов <i>A. kagoshimensis</i>	42
2.6 Моделирование реакции регуляторного увеличения объема в условия гипоосмотической нагрузки	45
2.7 Моделирование реакции регуляторного снижения объема в условиях гиперосмотической нагрузки	46
2.8 Статистический анализ результатов исследования	47
ГЛАВА 3 КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ ГЕМОЛИМФЫ <i>A. KAGOSHIMENSIS</i>	48
3.1 Морфометрическая характеристика клеток гемолимфы	48
3.2 Идентификация типов гемоцитов методом проточной цитометрии	52
3.3 Классификация гемоцитов на основе распределения клеток в градиенте плотности Перколл.....	57

3.4 Обсуждение результатов исследования.....	59
ГЛАВА 4 ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ГИПО- И ГИПЕРОСМОТИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕМОЦИТОВ <i>A. KAGOSHIMENSIS</i>	64
4.1 Осмолярность гемолимфы	64
4.2 Изменения клеточного состава гемолимфы	66
4.3 Морфометрические характеристики гемоцитов	67
4.4 Способность гемоцитов генерировать окислительный взрыв	72
4.5 Мембранный потенциал митохондрий	74
4.6 Уровень смертности клеток	76
4.7 Обсуждение результатов исследования.....	77
ГЛАВА 5 КЛЕТОЧНЫЕ РЕАКЦИИ НА ИЗМЕНЕНИЕ СОЛЕННОСТИ МОЛЛЮСКА <i>A. KAGOSHIMENSIS</i>	82
5.1 Осмотическая стойкость клеток	82
5.2 Регуляторное снижение объема гемоцитов <i>A. kagoshimensis</i> в гипоосмотических условиях.....	87
5.3 Регуляторное увеличение объема гемоцитов <i>A. kagoshimensis</i> в условиях гиперосмотической нагрузки	88
5.4 Обсуждение результатов исследования.....	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	92
ВЫВОДЫ	97
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	99
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	101

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования и степень разработанности темы исследования

Соленость считается одним из основных экологических факторов, влияющих на функциональное состояние двустворчатых моллюсков [55; 73; 75]. Согласно прогнозам Межправительственной группы экспертов по изменению климата, в ближайшие годы ожидается увеличение частоты экстремальных осадков, стоки которых в прибрежные морские участки могут привести к резким колебаниям солености. С другой стороны, интенсивное испарение может привести увеличению солености [104; 116]. При этом прогностические модели изменения климата не могут дать оценку направленности изменений солености Мирового океана. Общие признаки указывают на то, что соленость будет изменяться согласно региональным особенностям. Среди возможных последствий, колебания солености выделяют: сокращение видового разнообразия и исчезновение крупных видов гидробионтов, являющихся объектами добычи или культивирования в мировой пищевой промышленности [20; 23; 25]. Наибольшее значение соленость имеет для прибрежных экосистем и эстуариев, где сконцентрированы марикультурные фермы.

Двустворчатые моллюски являются основными объектами массового выращивания в аквакультуре. Моллюски способны адаптироваться к изменению солености только в определенном диапазоне. Многие исследования показали, что изменения солености влияют на секрецию гормонов частоту сердечных сокращений и темп роста [242; 127; 23] двустворчатых моллюсков. Низкая соленость значительно снижает общее количество гемоцитов и способность к иммунному ответу [39; 158; 167; 77]. При этом границы адаптивного потенциала коммерчески значимых или перспективных объектов марикультуры к изменениям солености остаются неисследованными. В связи с чем, ощущается острая необходимость

проведения фундаментальных исследований в области изучения влияния факторов климатических изменений на иммунную систему моллюсков.

Anadara kagoshimensis (Tokunaga, 1906) считается перспективным объектом для культивирования в Крыму. Анадара обычно обитает вблизи устьев рек на мягких субстратах, таких как глина и песок [5]. Естественный ареал *A. kagoshimensis* – Индийский и Тихий океан с соленостью до 35 ‰ [123]. Пути интродукции анадары в Черное море до конца не известны, вероятно, моллюск был занесен вместе с балластными водами в 60-х годах 20 века. В настоящее время двустворчатый моллюск успешно адаптировался к солености Черного моря и Азовского морей (14‰). *A. kagoshimensis* считается перспективным объектом для выращивания в условиях марикультуры в Черноморском регионе [2]. Основываясь на данных распространения *A. kagoshimensis* нельзя оценить влияние соленостного стресса на физиологическое состояние моллюска. Вместе с тем, стрессовые факторы окружающей среды, такие как изменение солености, могут приводить к подавлению реакций неспецифического иммунного ответа [75; 190; 186; 40; 185; 76]. Известно, что основу клеточного иммунного ответа двустворчатых моллюсков составляют гемоциты, циркулирующие в гемолимфе [102; 214]. Оценка морфологических и функциональных показателей гемоцитов является общераспространенным методом оценки влияния факторов окружающей среды на функциональное состояние моллюсков [13; 38; 45]. В связи с этим, оценка морфофункционального статуса клеток гемолимфы в условиях колебания солености позволит дать интегральную характеристику состояния *A. kagoshimensis*.

Кроме этого, не раскрыты механизмы, обеспечивающие *A. kagoshimensis* продолжительную и успешную адаптацию к колебаниям солености. Учитывая, что осмолярность внутренней среды моллюсков напрямую определяется внешними условиями, очевидно, что основу адаптации видов к изменению солености составляют клеточные реакции. Так, галотолерантность моллюсков в первую очередь определяется способностью клеток регулировать свой объем после осмотического набухания или сжатия. Быстрое набухание в ответ на

гипоосмотический шок и сжатие в ответ на гиперосмотический стресс с последующим регуляторным уменьшением объема (RVD) или увеличением (RVI) является общей чертой большинства эукариотических клеток. Механизмы реализации клеточных адаптивных изменений объема в условиях осмотического стресса хорошо исследованы у позвоночных [175; 162]. По аналогии с эритроцитами крови позвоночных, которые являются основным объектом в этой области, вопрос о возможности регуляции объема гемоцитов моллюсков представляет значительный научный интерес в плане сравнительно-эволюционных исследований.

Цель и задачи исследования

Исследовать реакции клеток гемолимфы двустворчатого моллюска-вселенца *A. kagoshimensis*, обеспечивающие широкий диапазон осмотической толерантности, при его акклимации к условиям осмотического стресса.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить морфофункциональные особенности гемоцитов гемолимфы *A. kagoshimensis* с использованием методов светооптической микроскопии, проточной цитометрии и разработать на этой основе их классификацию.

2. Исследовать в условиях *in vivo* влияние гипер- и гипоосмотических условий морской среды на морфофункциональные характеристики гемоцитов *A. kagoshimensis*.

3. Оценить осмотическую стойкость гемоцитов *A. kagoshimensis* на основе метода лазерной дифракции.

4. В условиях *in vitro* исследовать процессы регуляции клеточного объема у гемоцитов *A. kagoshimensis* в условиях гипер- и гипоосмотических нагрузок.

Объект исследования – двустворчатый моллюск *A. kagoshimensis*.

Предмет исследования – влияние осмотического стресса на морфометрические и функциональные показатели гемоцитов *A. kagoshimensis*.

Методология и методы исследования.

Исследования проведены на экспериментальных моделях в условиях *in vivo* (на моллюсках *A. kagoshimensis*) и *in vitro* (на гемоцитах). Гематологические и

оптические методы применялись для проведения исследования морфофункциональных характеристик гемоцитов. Цитофлуорометрические методы для определения способности к продукции активных форм кислорода, мембранного потенциала митохондрий, соотношения клеточных типов и состояния мембран гемоцитов. Методы лазерной дифракции для оценки осмотической хрупкости клеток и моделирования регуляторного снижения и увеличения объема.

Научная новизна.

Впервые выполнена идентификация гемоцитов *A. kagoshimensis*, основанная на морфологических и функциональных критериях. Описаны два типа клеток гемолимфы: агранулярные (амебоциты) и гранулярные (эритроциты). Показано, что предварительная акклимация двустворчатых моллюсков в гипо- и гиперосмотических условиях приводит к сдвигу кривой осмотической стойкости, что свидетельствует о наличии у *A. kagoshimensis* механизмов изменения стратегии соленостной адаптации. Впервые показано, что гемоглобинсодержащие гемоциты *A. kagoshimensis* способны восстанавливать объем в условиях гипо- и гиперосмотического стресса.

Теоретическая значимость.

Результаты исследований, проведенных в настоящем проекте, являются фундаментальной основой, раскрывающей возможные последствия краткосрочного изменения солености для марикультуры в Черноморском регионе. В результате проделанной работы установлено наличие у гемоцитов компенсаторных механизмов регуляции объема после осмотической нагрузки. Данное направление исследований чрезвычайно актуально, поскольку многие виды двустворчатых моллюсков обладают широким диапазоном галотолерантности, при этом, внутриклеточные механизмы устойчивости к колебаниям солености среды остаются неясными у данной систематической группы. Следовательно, настоящие фундаментальные исследования механизмов реализации клеточной адаптации объема гемоцитов к соленостному стрессу позволяют углубить знания о физиологии клеток гемолимфы двустворчатых моллюсков.

Практическая значимость.

В результате проделанной работы исследованы границы галотолерантности *A. kagoshimensis*. Оценка влияния изменений солености на клеточные функциональные и морфологические показатели гемоцитов *A. kagoshimensis* позволяет оценить перспективность их выращивания в контексте толерантности к колебаниям солености, обусловленным глобальным изменением климата. Кроме этого, результаты исследования могут быть использованы для корректировки методики адаптации моллюсков для культивирования в гипо- и гиперосмотическим условиях.

Положения, выносимые на защиту:

1. В гемолимфе *A. kagoshimensis* присутствует два типа гемоцитов, характеризующиеся специфическими морфометрическими и функциональными признаками: амебоциты и эритроциты.

2. Соленостный стресс стимулирует процессы клеточного дыхания в гемоцитах *A. kagoshimensis*, о чем свидетельствует рост мембранного потенциала митохондрий.

3. Осмотическая стойкость гемоцитов *A. kagoshimensis* определяется условиями предварительной акклимации. Гипоосмотическая среда повышает стойкость клеток к осмотическому шоку, гиперосмотическая среда, напротив, снижает ее.

4. Клетки гемолимфы *A. kagoshimensis* способны к реакции компенсации изменения объема в ответ на действие осмотического стресса. Гемоциты реагируют на гипоосмотические условия активацией процессов RVD, гиперосмотические условия, в свою очередь, сопровождаются развитием реакции RVI.

Соответствие паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.16 – гидробиология, в частности пункту 1: «Исследование влияния факторов водной среды на гидробионтов в природных и лабораторных условиях с целью установления пределов толерантности и оценки устойчивости водных организмов в

условиях изменяющихся физико-химических свойств природных вод», а также пункту 2 паспорта: «Исследование экологических основ жизнедеятельности гидробионтов – их питания, водно-солевого и энергетического обмена, закономерностей роста и развития, особенностей».

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается релевантностью выборок экспериментальных животных, современными методами исследования, использованием объективных и адекватных моделей эксперимента, общепринятых методов статистической обработки, а также соответствием с ранее опубликованными теоретическими данными. Исследование клеточных механизмов адаптации *A. kagoshimensis* к условиям осмотического стресса проводилось в рамках проекта №19-34-50080 под руководством д.б.н. Миндукшева И.В., результаты которого успешно прошли экспертизу РФФИ. Кроме этого, большинство полученных в ходе выполнения диссертационной работы данных апробированы на всероссийских и международных конференциях, а также опубликованы в высокорейтинговых рецензируемых научных изданиях и реферируемых базами РИНЦ, Web of Science и Scopus.

Апробация результатов работы

Результаты работы докладывались на всероссийских и международных научных конференциях: XI Всероссийская онлайн-школа-семинар для молодых ученых, студентов и аспирантов «Современная гидробиология: глобальные проблемы Мирового океана» (г. Севастополь, 28 сентября – 2 октября 2020 г.); V Всероссийская научная конференция молодых ученых «Комплексные исследования Мирового океана» (г. Калининград, 18-22 мая 2020г.); 24 Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века»; Изучение водных и наземных экосистем: история и современность: международная научная конференция, посвящённая 150-летию Севастопольской биологической станции — Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского и 45-летию НИС «Профессор Водяницкий» (г. Севастополь, 13-18 сентября 2021 г.); XII

Всероссийская научно-практическая конференция для молодых учёных по проблемам водных экосистем, посвященная 150-летию Севастопольской биологической станции — ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН» «ПОНТ ЭВКСИНСКИЙ — 2021» (г. Севастополь, 20-24 сентября 2021 г.); Международная конференция Морская биология в 21 веке: достижения и перспективы развития (к 100-летию со дня рождения академика Алексея Викторовича Жирмунского) (г. Владивосток, 6-8 октября 2021 г.).

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в планировании и постановке эксперимента. Все основные результаты исследования получены и обработаны автором самостоятельно. Автор лично анализировал и интерпретировал полученные результаты. Автором осуществлен анализ публикаций по проблематике диссертации и подготовлена рукопись диссертации. Написание статей по теме диссертации осуществлялось вместе с соавторами.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 12 печатных работ, из них 5 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 6 индексируются в базах WoS (Scopus) и 6 тезисов докладов.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста, состоит из введения, 5 разделов, выводов и списка литературы, включающего 257 источников (в том числе иностранных - 255). Работа иллюстрирована 6 таблицами и 41 рисунком.

Благодарности

Автор выражает благодарность своему научному руководителю д.б.н. Солдатову Александра Александровичу за многолетнее руководство и помощь в подготовке диссертационной работы. Глубокая признательность коллективу лаборатории клеточных механизмов гомеостаза крови Института эволюционной физиологии и биохимии имени И. М. Сеченова РАН за помощь в освоении метода

лазерной дифракции и предоставлении условий для выполнения работ. Искреннюю благодарность автор приносит д.б.н. Игорю Викторовичу Миндукшеву (ИЭФБ РАН) и д.б.н. Степану Петровичу Гамбарян (ИЭФБ РАН) за ценные рекомендации, консультацию и всестороннюю помощь. Автор благодарит Валентину Николаевну Рычкову и к.б.н. Татьяну Александровну Кухареву за помощь в постановке эксперимента; к.б.н. Андрея Борисовича Боровкова и к.б.н. Галину Семеновну Минюк за предоставление культур микроводорослей; к.б.н. Гулина Максима Борисовича за предоставления солемера, необходимого для проведения экспериментальных работ; к.б.н. Вялову Оксану Юрьевну и Щурова Сергея Вячеславовича за предоставление моллюсков для исследования. Автор приносит благодарность к.б.н. Владимиру Сергеевичу Муханову и Евгению Геннадиевичу Сахонь за содействие в проведении экспериментальных работ на проточном цитометре, а также к.б.н. Анастасию Олеговну Лантушенко (СевГУ) за предоставление доступа в ЦКП Севастопольского государственного университета. Автор благодарит к.б.н. Элину Сергеевну Челебиеву за всестороннюю помощь и дружескую поддержку. Отдельную благодарность автор выражает к.б.н. Александре Юрьевне Андреевой за творческое вдохновение, а также неоценимую помощь в проведении экспериментальных работ и интерпретации полученных данных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В данном разделе диссертационной работы проанализированы математические модели глобального изменения климата. Описаны экологические и физиологические последствия гипоосмотических и гиперосмотических изменений солености различной длительности. Дана характеристика гидробионтам с точки зрения механизмов адаптации к изменениям солености.

1.1 Соленость как ведущий экологический фактор

Под соленостью подразумевают суммарное содержание всех растворенных в воде минеральных веществ. Природные воды делятся на пресные (соленость до 1 ‰), солоноватые (1,0-30 ‰), соленые или морские (30-40 ‰) и ультрагалинные или пересоленные (более 40 ‰).

Гиперсоленая среда – это воды с соленостью выше морской (около 40 ‰). Есть два основных типа гиперсоленой среды [196; 255]. Первые — это внутренние соленые озера или моря, которые представляют собой более или менее постоянные водоемы, не имеющие выхода к морю. Типичными примерами являются Большое соленое озеро и озеро Моно на западе США, Мертвое море в Израиле, озеро Магади в Кении, Аральское море в Средней Азии и пруд Дон Жуан в Антарктиде. Соленость в этом типе водоемов может достигать 400‰. Вторая категория гиперсоленых водоемов включает приливные бассейны. Такая гиперсоленая среда создается в прибрежных районах и устьях рек, когда бассейны изолируются от приливного потока на длительные периоды времени, а испарение концентрирует

оставшиеся соли [176; 179; 227]. Пресные воды, в свою очередь, подразделяются на гипогалинные (менее 0,5 ‰) и олигогалинные (0,5-1,0 ‰), а солоноватые - на мезогалинные (1-18 ‰) и полигалинные (18-30 ‰).

Промышленная и техногенная деятельность может приводить к засолению или распреснению водоемов. Например, в результате работы предприятий по опреснению морской воды происходит локальное засоление прибрежных вод [67]. Интенсивное использование морской воды приводит к сбросу сточных вод с высокой соленостью, и как следствие к повышению концентрации соли в сточных водах на 15–45 %, в то время как концентрация соли в морской воде обычно составляет 25–35 ‰ [219]. Кроме того, некоторые отрасли промышленности, например, нефтяная, полиграфическая, бумажная, химическая, сбрасывают большое количество сточных вод, которые содержат концентрированный солевой раствор, стойкие или токсичные органические загрязнители. В последние десятилетия приток соленых и гиперсоленых сточных вод на очистные сооружения значительно увеличился и составляет до 5% от общемировых стоков [137].

Согласно прогнозу Межправительственной группы экспертов по изменению климата в ближайшие годы ожидается увеличение частоты экстремальных осадков [104]. Изменения количества осадков являются следствием антропогенного изменения климата из-за более высокого уровня влажности в атмосфере, связанного с повышением глобальной температуры [232]. Эти изменения не будут одинаковыми по всему миру [116; 188], ожидается, что регионы, которые уже являются влажными, станут более влажными, а засушливые регионы станут более засушливыми [231]. В сочетании с этими изменениями прогнозируется увеличение или уменьшение общего количества осадков. Например, годовое количество осадков в Европе в целом снизилось, но количество экстремальных летних осадков увеличилось [49], и, по прогнозам, такая тенденция будет сохраняться в дальнейшем [116]. Экстремальные осадки были определены как потенциальная угроза глобальным экосистемам, особенно в регионах со средиземноморским климатом [94]. Воздействие на экосистему в результате изменения количества осадков,

особенно несезонных осадков, вероятно, будет наиболее заметным в эстуариях. Поступление пресной воды из рек и экстремальные осадки могут способствовать локальному снижению концентрации солей в литоральной зоне [138]. С другой стороны, антропогенная нагрузка может привести к локальному засолению. Концентрация солей в литоральной зоне может повышаться в результате выветривания горных пород или деятельности предприятий по добыче солей [41]. Последнее подтверждается математическими моделями, подготовленными на основании многолетних мониторинговых исследований [20]. Так, согласно исследованиям Баера и Антонова глобальное изменение климата приводит к повышению солености в субтропических регионах и снижению концентрации солей в умеренных широтах [19; 35].

Соленость - один из основных стрессовых факторов окружающей среды для гидробионтов [10; 183; 132; 225]. Жизнь в морской воде существует в широком диапазоне солености: от 7‰ в Балтийском море до 35‰ в океанических водах и более 40‰ в гиперсоленых водоемах. Однако изменение солености может выходить за пределы осмотической толерантности гидробионтов, что приведет к нарушению функционирования экосистем и снижению биоразнообразия [190; 234; 25; 3; 44]. В особенности под угрозой окажутся бентосные виды, например двустворчатые моллюски, не способные к активному перемещению. В связи с чем, поступление соли или опреснение, вызванное антропогенными источниками в сочетании с изменением климата, считается наиболее важным фактором, влияющим на водные экосистемы.

1.2 Влияние солености на функциональное состояние морских организмов

Физиологические последствия осмотического стресса могут различаться в зависимости от стратегии адаптации организма к колебанию солености и

экологической пластичности данного фактора. В зависимости от механизмов соленостной адаптации выделяют осморегуляторов и осмоконформеров [68; 130]. К осморегуляторам относится большинство видов рыб, а к осмоконформерам акулы, миксины, скаты и беспозвоночные, в том числе двустворчатые моллюски. Осморегуляторы осуществляют анизосмотическое внеклеточное регулирование путем транспорта осмолитов через эпителий жабр, что позволяет поддерживать осмотический гомеостаз внеклеточной жидкости организма [68; 130]. Другая группа организмов – осмоконформеры - не способна поддерживать осмотический гомеостаз внеклеточной жидкости. Как следствие, клетки осмоконформеров испытывают осмотический стресс при изменении солености окружающей среды [55; 71; 198]. Осмоконформеры адаптируются к изменениям солености окружающей среды путем изоосмотической внутриклеточной регуляции посредством активации механизмов регуляции объема клеток [71; 198; 47; 46; 72; 9]. В зависимости от диапазона соленостной толерантности осмоконформеры и осморегуляторы подразделяются на эвригалинные и стеногалинные виды. Среда со стабильной соленостью населяют стеногалинные виды, имеющие узкие пределы соленостной толерантности, а с переменной - эвригалинные, имеющие широкий диапазон соленостной толерантности. Эвригалинные осморегуляторы обладают механизмами, которые контролируют динамические изменения в стратегии осморегуляции от активного поглощения соли до выделения соли и от выделения воды до удержания воды. Эти механизмы включают:

- сигнализацию об изменении солености окружающей среды, которые нарушают гомеостаз воды и соли в организме,
- сигнальные сети, которые кодируют информацию о направлении и величине изменения солености
- эффекторы изменения проницаемости эпителия.

Способность осмоконформеров к адаптации в условиях соленостных колебаний напрямую связана с его способностью регулировать объем клеток при осмотическом стрессе [71].

Большинство рыб приспособлены к тому, чтобы выдерживать некоторую степень соленостного стресса. Эвригалинные рыбы хорошо адаптируются к изменениям осмотических концентраций. Например, инкубация в гипоосмотических условиях (до 6‰) и возвращение без акклиматизации к контрольным значениям солености (32‰) не оказало влияния соотношение ионы плазмы атлантической трески (*Gadus morhua*) [22]. С другой стороны, колебание солености может оказать влияние на репродуктивный цикл многих видов рыб [93]. Было показано, что солевой стресс оказывает двунаправленное воздействие на иммунный ответ: он может подавлять или усиливать некоторые иммунные параметры в зависимости от дозы и продолжительности воздействия [85; 57; 201; 202]. После заражения длиннорылой рыбы-иглы (*Syngnathus typhle*) бактериями рода *Vibrio* усиливалась пролиферация лимфоцитов и экспрессировались гены, ответственные за иммунный ответ. После инкубации в гиперосмотических условиях при 30‰ (контроль 18 ‰), бактериальное заражение не приводило к активации иммунного ответа [31]. Осмотический стресс может оказать воздействие не только на врожденный иммунитет, но и на воспалительные, стрессовые и адаптивные иммунные ферменты [4; 96]. Связанные со стрессом ферменты, такие как глутатион-S-трансферазы, играют очень важную роль в клеточной детоксикации широкого спектра эндогенных и экзогенных соединений [156; 66].

К организмам осморегуляторам относится большинство видов костистых рыб. Независимо от солености окружающей среды осмолярность жидких сред организма осморегуляторов остается постоянной: приблизительно на уровне 300-400 мОсм/кг. В зависимости от условий обитания различают стратегии осморегуляции в пресной и морской воде. Так для осмотического гомеостаза костным рыбам пресных вод необходимо предотвращать пассивную потерю солей и накопление воды. Напротив, морские костные рыбы имеют физиологические механизмы удержания воды и секреции солей в окружающую среду.

Механизмы адаптации к изменениям солености окружающей среды представителей осморегуляторов хорошо изучены. Известно, что у костистых рыб за адаптацию к изменению внешней солености отвечают жабры (эксекреция или секреция Na^+ или Cl^- хлоридными клетками), структурные элементы почки (продукция гипотонической или гипертонической мочи), кишечник (дополнительная реабсорбция Na^+ и Cl^-) и поверхностный эпителий (снижение проницаемости для воды) [146]. Осмолярность внутренних жидкостей морских костистых рыб остается слегка гипоосмотическими по отношению к окружающей морской воде. Они испытывают некоторую потерю воды и поддерживают осмотическую последовательность, активно поглощая морскую воду и выделяя излишки солей через жабры и почки [68; 69].

Напротив, внутренняя среда пресноводных костистых рыб слегка гиперосмотична по отношению к окружающей пресной воде. Они осуществляют процессы осморегуляции, поглощая относительно небольшое количество воды, выделяя большое количество разбавленной мочи. Воду и соли получают через жабры [68].

Кроме этого, у позвоночных хорошо изучены механизмы клеточной регуляции объема. Пути поддержания клеточного объема подразделяются на два типа: регуляторное снижение объема (RVD) и регуляторное увеличение объема (RVI) [15; 50; 105; 83]. В исследованиях процессов регуляции объема клеток эритроциты низших позвоночных являются наиболее распространенным модельным объектом [83]. При попадании в гипотоническую среду происходит немедленное набухание эритроцитов рыб и лягушек, что далее сопровождается постепенным возвратом клеток к исходному объему [228; 15]. Реакция RVD осуществляется за счет выведения из клеток ионов калия и хлора вместе с осмотически связанной водой через K^+-Cl^- симпорт и K^+-H^+ антипорт. RVI – обратный процесс входа в клетку гидратированных ионов натрия через Na^+/H^+ обменник, а также Na^+ , K^+ и Cl^- котранспорт [50; 83; 105].

Морские миксины и пластинчатожаберные представляют собой небольшое число видов рыб, являющихся осмоконформерами. Концентрация NaCl в жидкостях организма миксины примерно равна концентрации в морской воде [200]. Однако у пластинчатожаберных она вдвое меньше, чем у морской воды, и осмотическая разница создается за счет активного накопления органических осмолитов [251]. Пластинчатожаберные поддерживают разницу в содержании NaCl (относительно морской воды) за счет активной секреции NaCl через ректальную железу. Среди осмоконформеров особый интерес представляют двустворчатые моллюски.

Известно, что выращивание в анизоосмотических условиях негативно влияет на функциональное состояние двустворчатых моллюсков [42]. Умеренный, но длительный соленостный стресс может приводить к массовой гибели моллюсков [56]. Снижение солености ниже 15‰ в течение трех дней подряд было достаточно, чтобы вызвать гибель *Cerastoderma edule* и *Venerupis corrugata*, тогда как в среднем требовалось 9 дней, чтобы вызвать гибель *Ruditapes philippinarum*. Аналогичным образом, значения солености ниже 5 ‰ в среднем в течение четырех дней подряд приводили к почти полной смертности *C. edule* и *V. senegalensis* и значительной смертности *R. philippinarum* [181]. Снижение солености ниже 5‰ в течение 3,5 суток (84 часа) приводило к массовой смертности *C. edule* и *Scrobicularia plana* [237]. Субоптимальные условия засоления так же приводили к массовой гибели *R. philippinarum*, *Ruditapes decussatus*, *Crassostrea virginica*, *Nodipecten nodosus* и *Amarilladesma mactroides* [187]. Большинство авторов делает вывод, что снижение солености ниже 15‰ является критической для морских двустворчатых моллюсков, обитающих при солености около 25‰ [237; 87; 56]. Вместе с тем, суточное снижение солености ниже 15‰ не сопровождалось массовой гибелью моллюсков, но привело к снижению двигательной активности у *R. decussatus*, *V. corrugata* и *R. philippinarum* [243]. Кроме этого, снижение солености до 15‰ и содержание особей в данных условиях в течение недели не приводила гибель моллюсков *S. plana* [29].

Многие пресноводные и морские двустворчатые моллюски (*Cyclina sinensis* (Gmelin, 1791), *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758), *Haliotis laevigata* (Donovan, 1808), *Rochia nilotica* (Linnaeus, 1767), *Magallana gigas* (Thunberg, 1793), *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850), *S. plana* и *C. edule*) так же способны адаптироваться к гиперосмотическим условиям [153; 135]. *Corbicula fluminea* (O. F. Müller, 1774), обитающий при солености 1,5‰, акклиматизировался к гиперосмотическим условиям (5, 10 и 15 ‰) [29]. Экспозиция *Mytella strigata* (Hanley, 1843) в гиперосмотических условиях (22 и 40 ‰) в течение 28 дней привела к гибели менее 10 % особей [253].

Считается, что длительное содержание моллюсков в условиях низкой и высокой солености, не приводящей к гибели моллюсков, подавляет скорости роста [197; 191; 129]. Снижение скорости роста в условиях осмотического стресса обычно объясняют более высокими физиологическими затратами, связанными с процессами осморегуляции. [149]. Так, при солености 35 ‰ у *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) снижалась метаболическая активность, а противоположная реакция наблюдалась при солености 14 ‰ [73]. Снижение темпов роста также связывают со снижением скорости фильтрации в результате ограничения водообмена с окружающей средой. Наиболее распространенной реакцией морских моллюсков на изменение солености является снижение функциональной активности. Когда изменяется соленость, частота дыхания уменьшается и поддерживается на сравнительно низком уровне. Исследования Т. Вердельхоса с соавторами показали, что двигательная активность моллюсков снижается по мере отклонения солености от контрольных значений (*S. plana*: 20–30 ‰; *C. edule*: 20–25 ‰). После достижения определенного порога солености смертность моллюсков резко возрастала - 10‰ для *S. plana* и ниже 15 ‰ для *C. edule* [237]. Эффективность фильтрации снижается при низкой солености у морского двустворчатого моллюска *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) [238]. Скорость дыхания *T. squamosa* также уменьшалась при воздействии низкой солености [150]. Скорость и степень нормализации функциональной активности зависят от величины внешнего воздействия и адаптационных

возможностей видов. Скорость потребления кислорода восстанавливается через 1 день у *Littorina saxatilis* (Olivi, 1792) и через 6 дней у *L. obtusata*. Полностью восстанавливается только у более эвригалинных видов моллюсков *L. saxatilis*. Показано, что для стеногалинных видов моллюсков уровень потребления кислорода значительно ниже контрольного значения даже после 22 дней акклиматизации к пониженной солености [28].

Акклиматизация к низкой солености может не сопровождаться изменениями уровня потребления кислорода [129]. Последнее может свидетельствовать об отсутствии увеличения затрат на поддержание метаболизма при осмотическом стрессе. Кроме этого, у *M. trossulus* повышение солености до 33 ‰ и снижение до 7 ‰ не приводили к снижению темпов роста мягких тканей [191]. Изменение солености может применяться в качестве подходящего инструмента для борьбы с патогенами и предотвращения вспышек заболеваний у коммерческих видов двустворчатых моллюсков [97]. Однако, не смотря на примеры успешной акклиматизации, стрессовые условия окружающей среды могут приводить к подавлению иммунитета двустворок [239] и к развитию окислительного стресса [44; 235]. Показано, что у *R. philippinarum* после инкубации при 14 и 35 ‰ увеличивается активность антиоксидантных ферментов, в том числе супероксиддисмутазы и каталазы. При этом соленостный стресс подавлял способность гемоцитов к продукции активных форм кислорода (АФК) [235]. Результаты лабораторных и полевых исследований продемонстрировали взаимосвязь между вариациями уровня солености и заражением двустворчатых моллюсков [81; 190]. Инкубация в анизоосмотических условиях снизила устойчивость моллюсков к таким патогенам как *Marteilia sydneyi* (Perkins and Wolf, 1976), *Vibrio parahaemolyticus* (Fujino, Okuno, Nakada, Aoyama, Fukai, Mukai and Ueho, 1951) Sakazaki, Iwanami and Fukumi, 1963, *OsHV-1* и *Vibrio tapetis* (Borrego, Castro, Luque, Paillard, Maes, Garcia and Ventosa, 1996) [75; 190; 186; 40; 185; 76]. У устриц (*Ostrea edulis* Linnaeus, 1758), содержащихся в течение 7 дней при различных уровнях солености (32, 25 и 16 ‰), самая высокая соленость способствовала росту

бактериального патогена *Listonella anguillarum* (Bergeman, 1909) MacDonell and Colwell, 1985, увеличивала количество крупных гранулоцитов и снижала способность к продукции АФК гемоцитами [97]. У *M. galloprovincialis* количество циркулирующих гемоцитов значительно увеличилось у мидий, подвергшихся воздействию солености 40 ‰ в течение 24 часов, тогда как процент фагоцитарных гемоцитов существенно не изменился [152]. Пониженная соленость приводит к смертности гемоцитов у *M. gigas* [76; 77]. У морского ушка *Haliotis diversicolor* (Reeve, 1846) обнаружили низкое количество гемоцитов при низкой солености и низкую фагоцитарную способность гемоцитов как при пониженной [48], так и при повышенной солености. Бассел Ю.А. с соавторами [39] продемонстрировали, что у мидий (*M. edulis*), содержащихся в течение двух дней при пониженной солености (16 ‰), наблюдалось значительное снижение количества гемоцитов, процент эозинофилов и фагоцитарной активности по сравнению с мидиями, содержащимися при солености 32 ‰ (контроль) [39]. Рейд Х.И. с соавторами [190] обнаружили, что общее число циркулирующих гемоцитов значительно увеличивается с повышением солености от 20 ‰(контроль) до 40 ‰ у *R. Philippinarum* [190].

Гемоциты принимают участие в реализации иммунного ответа. Клеточный иммунный ответ включает в себя фагоцитоз, инкапсуляцию и деструкцию патогенов за счет выброса активных форм кислорода или ферментативного расщепления [239; 214]. Кроме этого гемоциты принимают участие в транспорте питательных веществ, пищеварении и заживлении тканей [131; 159]. Изменение параметров клеточного иммунитета обычно оценивают по соотношению типов гемоцитов, способности к продукции АФК, фагоцитарной активности, нарушениям клеточного цикла и морфометрическим изменениям клеток [192]. Показано, что после 2-х часового периода инкубации *in vitro* при 0,3 ‰ увеличился процент смертности гемоцитов *M. gigas*. Аналогичный результат получен после 18-ти часовой инкубации при 6,5 ‰ [76]. В работе М. Перригалт с соавторами зафиксировано значительное увеличение общего количества гемоцитов и процента мертвых клеток *Mercenaria mercenaria*

(Linnaeus, 1758) после инкубации в гипоосмотических условиях (17 ‰) в течение двух месяцев [185].

1.3 Механизмы адаптации двустворчатых моллюсков к изменению солености

Большинство двустворчатых моллюсков являются осмоконформерами, так как осмолярность жидкости их тела изменяется в соответствии с изменением солености окружающей среды. Моллюски обладают рядом осморегуляторных механизмов, позволяющих справляться как с гипо-, так и с гиперосмотическим стрессом. Бергер с соавторами показали наличие двух относительно независимых систем адаптации к экстремальным (устойчивость) и умеренным (толерантность) изменениям солености окружающей среды [28]. Известно, что на организменном уровне моллюски реагируют на изменение солености закапыванием в донные отложения, активным перемещением из неблагоприятной зоны, а так же изоляцией мягких тканей путем закрытия створок [97; 242; 210]. Такая изоляция позволяет отделить внутренние жидкости от внешней среды. Следовательно, моллюски могут непродолжительное время сохранять постоянство осмолярности внутренних жидкостей. В основном способность длительное время изолировать мантийную полость определяет устойчивость моллюсков к краткосрочным экстремальным изменениям солености окружающей среды.

Закрытие раковины как ответ на стресс происходит благодаря активности периферических детекторов, расположенных на головных щупальцах, мантийных гребнях и поверхностях сифонов [187]. Существует два типа этих детекторов: осморцепторы, чувствительные к осмотическому давлению, и специальные рецепторы, чувствительные к изменениям концентрации ионов натрия [204].

Ограничивающие факторы для длительной изоляции тканей моллюсков от соленостного стресса окружающей среды – накопление продуктов метаболизма и постепенно развивающаяся функциональная гипоксия. Уровень устойчивости моллюсков к изменениям солености окружающей среды во многом коррелирует с устойчивостью к гипоксическим условиям [238; 241]. Поддержание гомеостатического состояния в условиях отсутствия водообмена с окружающей средой возможно в течение ограниченного времени. Это означает, что моллюски, в отличие от типичных организмов осмоконформеров, поддерживают осмотический баланс не за счет активного переноса осмолитов. Стратегия моллюсков заключается во временном торможении водно-солевого обмена.

Толерантность моллюсков определяется клеточными и молекулярными механизмами адаптации. К ним относятся обратимые изменения синтеза белка и РНК, изменение структуры множества молекулярных форм различных ферментов и регуляция ионного содержания и объема клеток. Однако процессам осморегуляции на клеточном уровне уделено мало внимания [26; 79]. В результате снижения осмолярности клетки могут набухать, а увеличение осмолярности вызывает их сжатие [187]. Считается, что двустворчатые моллюски поддерживают объем клеток путем регулирования пула свободных аминокислот и ионного обмена [210]. Некоторые аминокислоты (аланин, глицин и пролин), их производные (таурин 2-аминоэтансульфоновой кислоты) и метиламины способствуют регуляции осмотического давления в клетках [124]. С другой стороны, неорганические осмолиты отвечают за адаптацию к быстрым изменениям солености [187]. Многочисленные исследования показали, что изменение содержания свободных аминокислот (СА), которые функционируют как органические осмолиты, в тканях вносят заметный вклад в регуляцию внутриклеточной осмолярности и объема клеток двустворчатых моллюсков [187]. Более того, установлено, что преобладающие типы СА различаются у разных видов двустворчатых моллюсков-осмоконформеров. Например, у моллюска *Mya arenaria* (Linnaeus, 1758) глицин оказался доминирующей СА, тогда как аланин был самой распространенной СА у

Corbicula japonica (Prime, 1864) и балтийского моллюска *Macoma balthica* (Linnaeus, 1758) [92; 209]. Лин с соавторами обнаружили, что таурин является преобладающей СА *Meretrix lusoria* (Röding, 1798), что согласуется с результатами нескольких других исследований, которые показали, что таурин является наиболее распространенным осмолитом моллюсков [110; 124; 230].

Неорганические ионы (Na^+ , K^+ , Cl^-) считаются основными осмолитами при адаптации двустворчатых моллюсков к быстрым изменениям солености. Снижение внешней осмолярности приводит к высвобождению KCl по каналам K^+ и Cl^- и котранспортеру K-Cl . Кроме того, концентрации NaCl и KCl могут быть увеличены с помощью котранспортера Na-K-2Cl и обменников Na^+/H^+ и $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ в ответ на гиперосмотические условия [106]. Следовательно, адаптация солености двустворчатых моллюсков во многом зависит от их способности регулировать объем клеток путем накопления или уменьшения количества осмолитов.

Вместе с тем, согласно литературным данным, не все типы клеток моллюсков способны регулировать объем. Клетки пищеварительной железы *M. galloprovincialis* при снижении осмолярности с 1100 до 800 мОсм/кг демонстрировали небольшое уменьшение объема [228]. На нескольких модельных объектах (*M. californianus*, *Geukensia demissa* Dillwyn, 1817, *Mytilus trossolus* A. Gould, 1850) показано, что клетки жабр, мантии и гемолимфы не регулируют свой объем при воздействии гипотонического стресса [228; 172]. Гемоциты выполняют функции иммунного ответа, пищеварения, транспорта и заживления тканей [8]. Однако способность клеток гемолимфы регулировать объем все еще остается предметом обсуждения. Согласно результатам работы Нефелда Д. С. [125] гемоциты двустворчатых моллюсков (*G. demissa*) не способны к регуляторному изменению объема. С другой стороны, осмотически индуцированные перемещения ионов калия через клеточную мембрану гемоцитов *M. galloprovincialis* были аналогичны тем, которые наблюдались в эритроцитах позвоночных во время восстановления объема после гипосмотического набухания [104]. Авторы [104] предположили, что в предыдущих исследованиях [125] не зафиксированы изменения объема гемоцитов в

гипосмотической среде из-за используемых методических подходов (световая микроскопия), которые не позволяли точно оценить объем клеток. Несмотря на большое число исследований, посвященных влиянию соленостного стресса на функциональное состояние двустворчатых моллюсков и механизмов их адаптации, до сих пор остается ряд нерешенных вопросов. В частности, имеющейся информации недостаточно для утверждения о наличии или отсутствии реакции RVD и RVI у гемоцитов, хотя широкий диапазон галотолерантности многих видов, может свидетельствовать о совершенных механизмах адаптации к гипер- и гипоосмотической нагрузке на клеточном уровне.

1.4 Классификация клеток гемолимфы двустворчатых моллюсков

Идентификация типов клеток гемолимфы обычно основана на различных морфологических и функциональных характеристиках. Гранулярность цитоплазмы - основной критерий классификации гемоцитов моллюсков при помощи метода световой микроскопии [13; 102]. Кроме этого, авторы оценивают окраску и гранулярных включений (базофильная, эозинофильная, ацидофильная), размерные характеристики, ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) и форму клеток [102; 178]. Также детально охарактеризована ультраструктура выделенных морфологических типов гемоцитов. Вместе с тем, описание морфотипов гемоцитов не дает представления об их функциональной роли. Общепринятым методом, используемым для функциональной характеристики гемоцитов, является проточная цитометрия [119; 126]. Классификация гемоцитов и их функциональные особенности различны у представителей двустворчатых моллюсков. Основные типы клеток у представителей двустворчатых моллюсков представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Классификация, структура и функции гемоцитов двустворчатых моллюсков

Вид	Метод	Типы гемоцитов	Характеристика клеток	Ссылка
<i>Mytilus edulis</i> Linnaeus, 1758	световая микроскопия, электронная микроскопия, проточная цитометрия	базофилы	способны к агрегации, содержат крупные прозрачные вакуоли, имеют низкое ЯЦО	[133]
		эозинофильные гранулоциты	содержат большое число эозинофильных гранул и неокрашенных везикул	
		гранулоциты	содержит больше число базофильных гранул	
<i>Perna viridis</i> Linnaeus, 1758	световая микроскопия, электронная микроскопия, проточная цитометрия	гиалиноциты	содержат мелкие гранулы в цитоплазме, высокое ЯЦО	[241]
		полугранулоциты	большое ядро, но ЯЦО ниже, чем у гиалиноцитов	
		гранулоциты	эозинофильная окраска, большое число гранул в цитоплазме, большой запас гликогена	
<i>Perna viridis</i> Linnaeus, 1758	проточная цитометрия	гиалиноциты	в меньшей степени способны к фагоцитозу и генерации АФК. Эстеразная активность и содержание лизосом ниже, чем у гранулоцитов	[137]
		гранулоциты	выше процент фагоцитоза, эстеразная активность, способность к продукции АФК и содержание лизосом в сравнении с гиалиноцитами	
<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819	проточная цитометрия, световая микроскопия и градиентное центрифугирование	агранулоциты	небольшие клетки с высоким ЯЦО, преимущественно не содержат гранулы в цитоплазме и не способны к образованию псевдоподий	[13]
		гранулоциты	крупные клетки, преимущественно амeboидной формы с ацентричным ядром, в большей степени способны к продукции АФК	

Продолжение таблицы 1

Вид	Метод	Типы гемоцитов	Характеристика клеток	Ссылка
<i>Perna perna</i> (Linnaeus, 1758)	просвечивающая электронная микроскопия, проточная цитометрия	гиалиноциты	клетки округлой формы, не содержат гранул, ядро расположено в центре	[70]
		полугранулоциты	округлые или яйцевидные клетки, цитоплазма содержит гранулы, ядро централизовано или ацентрично.	
		гранулоциты	клетки круглой или овальной формы, цитоплазма содержит большое число гранулярных включений, ядро расположено ближе к периферической области.	
		бластоподобные клетки	клетки круглой формы, не содержат гранулы в цитоплазме, ядро расположено преимущественно в центре клетки.	
<i>Saccostrea glomerata</i> (Gould, 1850)	световая и электронная микроскопия	гемобластоподобные клетки	небольшие клетки с крупным ядром, в цитоплазме содержится слабо развитый эндоплазматический ретикулум и небольшое число митохондрий	[6]
		гиалиноциты	крупные клетки с низким ЯЦО, обладали способностью к фагоцитозу и агглютинации	
		гранулоциты	большие клетки, содержали большое число гранул в цитоплазме, обладали наибольшей способностью к фагоцитозу	

Продолжение таблицы 1

Вид	Метод	Типы гемоцитов	Характеристика клеток	Ссылка
<i>Saccostrea kegaki</i> Torigoe and Inaba, 1981	световая микроскопия, проточная цитометрия	бластоподобные клетки	не содержат гранул, не способны к фагоцитозу, имеют низкую окислительную активность	[108]
		гиалиноциты	цитоплазма содержит немногочисленные гранулы и способны образованию псевдоподий	
		гранулоциты	содержат многочисленные гранулы и способны к образованию псевдоподий	
<i>Ostrea circumpicta</i> Pilsbry, 1904	световая микроскопия, проточная цитометрия	бластоподобные клетки	не содержат гранул, не способны к фагоцитозу, имеют низкую окислительную активность	[108]
		гиалиноциты	цитоплазма содержит немногочисленные гранулы и способны образованию псевдоподий	
		гранулоциты	содержат многочисленные гранулы и способны к образованию псевдоподий	
<i>Magallana gigas</i> Thunberg, 1793	проточная цитометрия, световая микроскопия и градиентное центрифугирование	агранулоциты	маленькие клетки, не содержат гранулы в цитоплазме	[240]
		полугранулоциты	средний диаметр, небольшое кол-во гранул	
		гранулоциты	самые крупные клетки, содержат крупные гранулы в цитоплазме, преимущественно способны к фагоцитозу и инкапсуляции, продуцируют АФК и NO	
<i>Hyotissa hyotis</i> Linnaeus, 1758	световая микроскопия, проточная цитометрия	бластоподобные клетки	не содержат гранул, не способны к фагоцитозу, имеют низкую окислительную активность	[108]

Продолжение таблицы 1

Вид	Метод	Типы гемоцитов	Характеристика клеток	Ссылка
<i>Hyotissa hyotis</i> Linnaeus, 1758	световая микроскопия, проточная цитометрия	гиалиноциты	цитоплазма содержит немногочисленные гранулы и способны образованию псевдоподий	[108]
		гранулоциты	содержат многочисленные гранулы и способны к образованию псевдоподий	
<i>Cristaria plicata</i> Leach, 1814	световая, фазово- контрастная и электронная микроскопия	агранулоциты	не содержат гранул или содержат единичные гранулы	[247]
		гранулоциты	содержат большое число гранулярных включений, способны к фагоцитозу	
<i>Pinctada imbricata fucata</i> A. Gould, 1850	световая микроскопия, электронная микроскопия, проточная цитометрия	малые гиалиноциты	не содержат гранул	[141]
		большие гиалиноциты	не содержат гранул, клетки больше в диаметре, в сравнении с малыми гиалиноцитами	
		гранулоциты	имеют округлую или неправильную форму, маленькое ЯЦО, в сравнении с другими типами клеток, способны к образованию псевдоподий, цитоплазма содержит большое число гранулярных включений	
<i>Anadara broughtonii</i> Schrenck, 1867	электронная микроскопия	эритроциты	цитоплазма содержит большое количество частиц гемоглобина	[257]
		лейкоциты	клетки сферической формы, способны к фагоцитозу	
		тромбоциты	длинные веретенообразные клетки	

Авторы выделяют от двух до четырех основных типов гемоцитов у различных видов двустворчатых моллюсков. Различия в характеристике гемоцитов объясняются выбранным автором методом анализа и принципом, положенным в

основу классификации клеток [101; 240]. Вместе с тем, внутри семейств различия в классификации клеток минимальны.

В семействе *Mutilidae* морфологический подход позволил выделить от одного до 5 типов гемоцитов [43; 102]. Методами световой и электронной микроскопии у *M. californianus*: идентифицированы малые базофильные, большие базофильные и большие гранулярные ацидофильные клетки [27], описаны два типа гемоцитов у *M. edulis* и *M. galloprovincialis*: гранулоциты (крупные клетки, содержащие гранулы) и агранулоциты (более мелкие клетки с однородной цитоплазмой) [43; 178]. Ряд авторов на основании размера гранул или их окраски (базофильная или эозинофильная) разделяют гранулоциты *M. edulis* на два дополнительных подкласса [115], а у *M. galloprovincialis* - на три [102]. Классификация форменных элементов гемолимфы средствами проточной цитометрии так же подтверждает наличие двух основных типов клеток [178].

В семействе *Ostreidae* на основании морфологических характеристик выделяют три типа гемоцитов [108; 13; 14]. Наименьший тип клеток – агранулоциты или бластоподобные клетки, характеризуются высоким ЯЦО и сферической формой клетки. Гиалиноциты представляют собой более крупные клетки, в сравнении с агранулоцитами. Данный тип гемоцитов способен к образованию псевдоподий, их цитоплазма может содержать вакуоли различного размера. Круглое или овальное ядро гиалиноцитов расположено в центре клетки. Наибольший тип клетки в гемолимфе устриц – гранулоциты. Данный тип гемоцитов имеет преимущественно амебоидную форму, способен к образованию псевдоподий. Бобовидное ядро расположено на периферии клетки, цитоплазма содержит множество гранулярных включений. Ультраструктурные клеточные особенности гранулоцитов сходны с макрофагами позвоночных [118]. Данный тип клеток имеет большое число митохондрий и лизосом, шероховатую клеточную мембрану, высокий уровень внутриклеточных цитокинов и активных форм кислорода. В то время как агранулярные клетки характеризовались большим клеточным ядром с деформированным и конденсированным гетерохроматином, прикрепленным к

ядерной оболочке, меньшим числом митохондрий и лизосом, в сравнении с гранулярными клетками.

Методом проточной цитометрии так же выделяют 3 субпопуляции клеток [194; 221; 14; 17] на основании относительного размера (FS) и гранулярности (SS): гранулоциты (высокий FS и SS), гиалиноциты (средний FS и SS) и агранулоциты. Известно, что гранулоциты играют важную роль в иммунной защите (фагоцитоз, продукция АФК и антимикробных пептидов) устриц, в то время как другие субпопуляции также могут участвовать в иммунных функциях [147; 14; 17].

Исследованию клеток гемолимфы у моллюсков-представителей семейства Arcidae посвящено сравнительно мало работ. Имеющаяся в литературе информация ограничивается описанием морфотипов клеток гемолимфы на основании анализа методом световой микроскопии [107; 95]. Согласно морфологическому критерию у *Lunarca ovalis* (Bruguière, 1789) выделяют 3 типа клеток (гранулярные, агранулярные и эритроциты) [193] у представителей видов *A. kagoshimensis* и *Anadara trapezia* (Deshayes, 1839) 2 типа клеток: гемоглобин содержащие эритроциты и непигментированные амебоциты или белые клетки [122; 107; 53]. На основании гранулярности цитоплазмы и разветвленности псевдоподий выделяют 3 подкласса амебоцитов [107]. При этом основное внимание исследователей сосредоточено на изучении гемоглобин содержащих клеток с применением методов оптической и электронной микроскопии [177]. Функциональная специализация клеток гемолимфы *A. kagoshimensis* остается слабо изученной. Основываясь на имеющихся в литературе данных, не представляется возможным получить информацию о степени участия гемоцитов *A. kagoshimensis* в реализации иммунного ответа, а также иных функциях, характерных для клеток гемолимфы двустворчатых моллюсков.

Проанализировав литературные данные по характеристике гемоцитов моллюсков, можно выделить две основные группы клеток: агранулярные и гранулярные (рисунок 1).

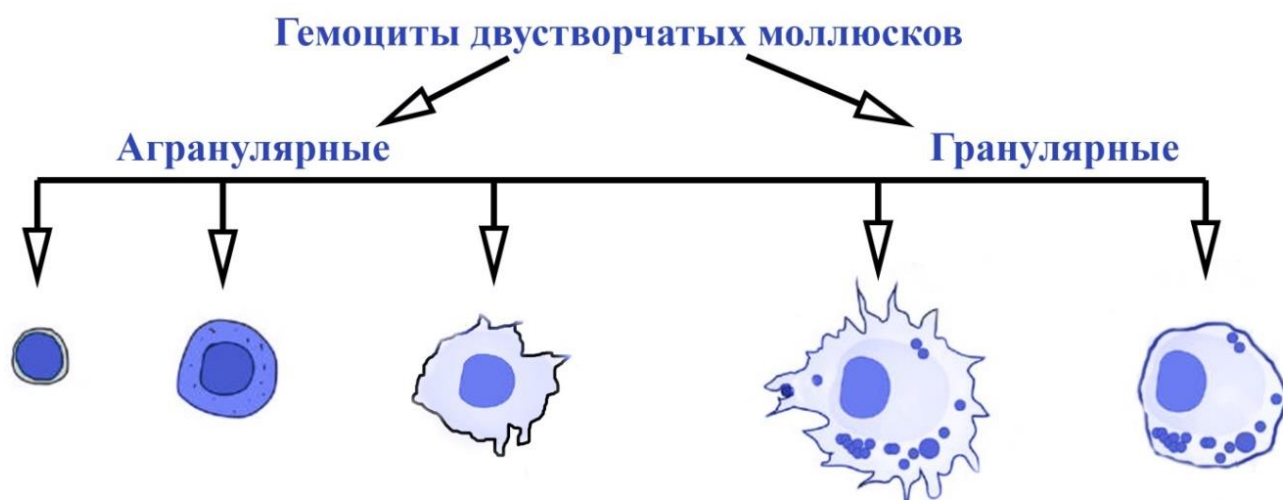


Рисунок 1 — Схема классификации гемоцитов двустворчатых моллюсков по морфологическим признакам

Агранулярные клетки включают агранулоциты, бластоподобные клетки, гиалиноциты (устрицы) и амёбоциты (анадары). Данный тип клеток характеризуется высоким ЯЦО и отсутствием или небольшим числом гранул в цитоплазме. Также агранулярные гемоциты преимущественно не содержат псевдоподии. Отличительной особенностью гранулярных клеток является содержание большого числа включений в цитоплазме. Данный тип клеток обычно имеет амёбовидную форму с большим числом псевдоподий, однако могут встречаться округлые клетки. Ядро гранулярных клеток смещено к периферии клетки и обычно имеет бобовидную форму.

Соленость Мирового океана с одной стороны снижается из-за таяния ледников, с другой - повышается из-за интенсивного испарения. Различия в направленности изменения климата объясняются региональными особенностями.

Гидробионты способны адаптироваться к определенному диапазону изменения солености. Вместе с тем, изменение солености может выходить за пределы осмотической толерантности гидробионтов, что приведет к нарушению функционирования экосистем и снижению биоразнообразия. В особенности под угрозой находятся малоподвижные бентосные виды моллюсков. У двустворчатых моллюсков осмолярность плазмы зависит от солености окружающей среды. Однако, в отличие от акул, миксин и скатов - типичных осмоконформеров, моллюски могут непродолжительное время сохранять постоянство осмолярности внутренних жидкостей путем изоляции мягких тканей. Однако длительная адаптация к изменению солености при помощи описанного выше механизма невозможна. Следовательно, эвригалинные двустворчатые моллюски имеют широкий диапазон соленостной толерантности благодаря механизмам объемной регуляции клеток за счет транспорта органических и неорганических осмолитов. Особый интерес в этом случае представляют механизмы объемной регуляции клеток, выполняющих функции транспорта, питания, заживления тканей и иммунного ответа – гемоцитов. Настоящая работа посвящена исследованию акклимации к изменению солености и способности гемоцитов эвригалинного двустворчатого моллюска *A. kagoshimensis* к объемной регуляции в условиях гипер- и гипоосмотической нагрузки.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящей главе диссертационной работы дается общая характеристика объекта исследования, описывается процедура сбора и содержания моллюсков. Представлена информация о методике оценки осмотической стойкости клеток и реакции изменения средноклеточного объема. Описаны экспериментальные схемы моделирование гипо- и гиперосмотических условий в эксперименте *in vitro*, а так же методика отбора и пробоподготовки образцов гемолимфы. Представлена схема моделирование реакции объёмных изменений гемоцитов в гипо- гиперосмотических условиях.

2.1 Материалы

Работа выполнена в течение 2018 - 2021 гг. в отделе физиологии животных и биохимии ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», а также частично в лаборатории сравнительной физиологии дыхания ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН» в рамках проекта №19-34-50080 «Особенности осморегуляции гемоцитов двустворчатого моллюска анадара, *Anadara kagoshimensis*», получившего поддержку РФФИ по результатам отбора научных проектов в качестве победителя конкурса на лучшие научные проекты, выполняемые молодыми учеными под руководством кандидатов и докторов наук в научных организациях Российской Федерации («Мобильность»).

Объектом исследования являлись двустворчатые моллюски (*A. kagoshimensis*). Анадара принадлежит к семейству Arcidae. В работе исследовано 80 особей массой

17,6±1,9 г и диаметром створки 30,5±1,0 мм. Моллюсков собирали осенью 2019, 2020 и весной 2021 в прибрежной акватории г. Севастополь (температура воды 15-20°C, соленость 17-18 ‰, содержание кислорода 7,2 - 8,5 мг/л).

Моллюсков доставляли в лабораторию в пластиковых контейнерах без воды. В лаборатории моллюсков рассаживали в аквариумы, плотность посадки составляла 3-5 литров на особь. В аквариумах поддерживались условия близкие к месту отбора материала: температура – 23,3±0,1 °С, соленость – 18,2±0,02 ‰, рН 8,1±0,01, содержание кислорода – 7,7±0,1 мг/л (рисунок 2).

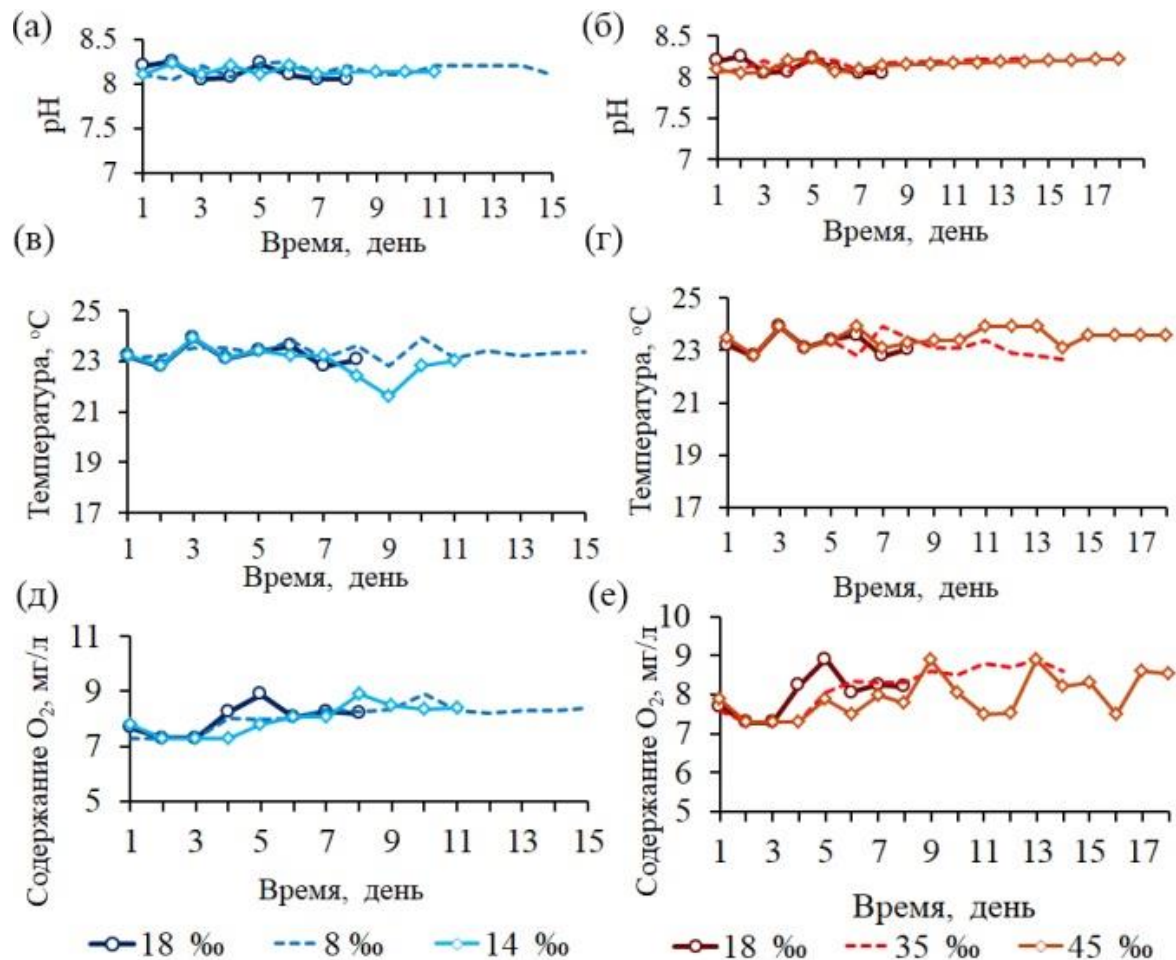


Рисунок 2 — Экспериментальные условия в аквариумах при моделировании гипо- и гиперосмотической нагрузки: (а) и (б) – Значения рН морской воды в гипо- и гиперосмотических условиях, (в) и (г) – Температура воды в аквариуме при гипо- и гиперосмотических условиях, (д) и (е) – Содержание растворенного кислорода при гипо- и гиперосмотических условиях.

Содержание кислорода и температуру воды контролировали при помощи портативного кислородомера с температурным датчиком ST300D (Ohaus, США). Соленость и pH контролировали при помощи портативного кондуктометра-солемера sensION 5 HACH (США) и pH-метра ST2100-F (Ohaus, США). На протяжении всего эксперимента, включая период акклимации к лабораторным условиям, для удаления метаболитов ежедневно меняли воду, с сохранением значения солености. Моллюсков кормили смесью микроводорослей (*Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) R.E.Norris, Hori and Chihara, 1980, штамм IBSS-25 из коллекции Отдела биотехнологии и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ, 5-10 мл смеси на каждые 50 литров аквариумной воды). Температура воды, содержание кислорода и значение pH поддерживалось на уровне контроля в течение всего экспериментального периода (рисунок 2).

2.2 Отбор гемолимфы и пробоподготовка

Для изучения морфофункциональных особенностей гемоцитов в условиях гипо- и гиперосмотической нагрузки у анадары шприцом из экстрапалиального пространства отбирали 1-2 мл гемолимфы. Аликвоту отобранной гемолимфы центрифугировали в течение 5 минут при 500g в центрифуге Eppendorf 5810R (Германия) и температуре 10 °C. Надосадочную жидкость отбирали для оценки осмолярности на осмометре OsmoSpecial 1 (Astori, Италия). Гемоциты ресуспензировали, затем дважды отмывали в искусственной морской воде (5 минут, 500g, 10 °C). Осмолярность искусственной морской воды соответствовала осмолярности воды, в которой инкубировались моллюски. Перед дальнейшим анализом для удаления агрегатов суспензию гемоцитов фильтровали через фильтр с диаметром ячейки 20 мкм.

2.3 Идентификация клеточных типов гемолимфы *A. kagoshimensis*

Клетки гемолимфы *A. kagoshimensis* идентифицировали на основании морфометрических (окраска, наличие гранул в цитоплазме, линейные характеристики) и функциональных особенностей (способность к продукции АФК, мембранный потенциал митохондрий) при помощи метода проточной цитометрии и оптической микроскопии. Объем обработанного материала представлен в таблице 2.

Таблица 2 — Объем и характеристика материала, обработанного при идентификации клеточных типов в гемолимфе *A. kagoshimensis*

Виды анализа	Морфометрический анализ	Цитометрический анализ				
		SGI	Rh123	DCF-DA	PI	Проба без окраски
Число проб	60	60	15	15	15	15
Число измерений	36000	180	45	45	45	45
Число клеток	18000	-	-	-	-	-

Примечание: SGI - ДНК-краситель SYBR Green I; Rh123 – краситель родамин 123; DCF-DA – краситель 2-7-дихлорфлуоресцеин-диацетат; PI – краситель йодистый пропидий

2.3.1 Метод оптической микроскопии

Окраска мазков проводилась по комбинированному методу Паппенгейма (Май-Грюнвальд и Романовского-Гимза). Нефиксированный мазок гемолимфы помещали в рабочий раствор Май-Грюнвальда на 2 минуты, затем промывали дистиллированной водой и помещали в раствор Романовского-Гимза на 15 минут. После окрашивания препараты промывали водой и высушивали на воздухе. Мазки

анализировались при помощи светового микроскопа (Biomed PR-2 Lum), оборудованного камерой (Levenhuk C NG Series). Наибольший диаметр клетки (без учета псевдоподий) и ядра измерялся в программе ImageJ 1.44 p, на каждом мазке подсчитывали не менее 100 клеток каждого типа. Ядерно-цитоплазматическое отношение рассчитывалось по следующей формуле 1 [121]:

$$\text{ЯЦО} = D_{\text{я}} / D_{\text{к}} \quad (1)$$

где ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение,

$D_{\text{я}}$ – наибольший диаметр ядра,

$D_{\text{к}}$ – наибольший диаметр клетки без учета псевдоподий.

2.3.2 Метод проточной цитометрии

Анализ проводили на проточном цитометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США), оборудованном однофазным аргоновым лазером (длина волны 488 нм). Для анализа методом проточной цитометрии готовили суспензию с концентрацией гемоцитов $1-2 \cdot 10^6$ клеток на мл. При оценке цитометрических показателей измерение проводилось в 3х проворностях (таблица 3).

Готовую суспензию гемоцитов окрашивали ДНК-красителем SYBR Green I (SGI). Финальная концентрация SGI в пробе - 10 мкмоль/л. Окрашенные клетки инкубировали 40 мин в темноте при 4°C. Содержание ДНК в гемоцитах анадары анализировали на основании гистограмм распределения флуоресценции красителя в канале FL1 при помощи программы Flowing Software 5.2. Ось абсцисс на гистограмме распределения флуоресценции красителя отображала содержание ДНК в клетках, а ось ординат – число клеток. Идентификацию клеточных типов проводили среды событий положительных по SGI по показателям FS и SS.

Таблица 3 — Объем обработанного материала при оценке влияния осмотического стресса на морфологические и функциональные особенности гемоцитов

Виды анализа	Анализ препаратов гемолимфы	Тест осмотической стойкости	Цитометрический анализ				
			SGI	Rh123	DCF-DA	PI	Проба без окраски
Число проб	50	50	50	50	50	50	50
Число измерений	20000	50	150	150	150	150	150
Число клеток	10000	-	-	-	-	-	-

Примечание: SGI - ДНК-краситель SYBR Green I; Rh123 – краситель родамин 123; DCF-DA – краситель 2-7-дихлорфлуоресцеин-диацетат; PI – краситель йодистый пропидий

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 при 4 °С. Финальная концентрация красителя в пробе составляла 10 мкмоль/л. Флуоресценцию красителя анализировалась в канале FL1.

Смертность гемоцитов определяли при помощи йодистого пропидия (PI). К 1 мл суспензии гемоцитов добавляли 10 мкл раствора PI (Sigma Aldrich) и инкубировали в темноте в течение 40 мин при 4 °С. Долю мертвых гемоцитов в общем числе гемоцитов оценивали по гистограммам флуоресценции PI в канале FL2 цитометра.

Влияния гипо- и гиперосмотической нагрузки на мембранный потенциал митохондрий клеток гемолимфы оценивали по изменению интенсивности флуоресценции гемоцитов, окрашенных красителем родамин 123 (Rh123) (Sigma Aldrich). Rh123 является специфическим митохондриальным красителем. Краситель широко используется для измерения мембранного потенциала митохондрий [142]. 1

мл суспензии гемоцитов инкубировали с 10 мкл/мл Rh123 при 4° С в темноте в течение 40 мин. Концентрация красителя в пробе составляла 0,1 мг/мл. Определение интенсивности флуоресценции красителя проводили на канале FL1.

2.3.3 Метод градиентного центрифугирования

Популяции гемоцитов анадары разделяли изопикническим центрифугированием в прерывистом градиенте плотности Percoll (Sigma-Aldrich, США), в соответствии с протоколом [173], используемым для гемоцитов моллюсков. 0,5 мл суспензии гемоцитов наслаивали на 1,5 мл прерывистого градиента и центрифугировали при 800 g в течение 10 мин на центрифуге Elmi CM-80 (Россия). Клетки, сконцентрированные на каждом слое, собирали в отдельные пробирки, разбавляли искусственной морской водой и дважды промывали для удаления Percoll в течение 5 минут при 500g в центрифуге Eppendorf 5810R (Германия) и температуре 10 °С. Аликвоту от полученных суспензий использовали для проточного цитометрического анализа и морфометрического исследования методом световой микроскопии. Методом проточной цитометрии определяли соотношение клеточных типов. На препаратах гемолимфы оценивали линейные характеристики гемоцитов. В каждой из выделенных фракций проводили измерение линейных характеристик (диаметр ядра и диаметр клетки).

2.4 Моделирование гипо- и гиперосмотических условий

В течение первых 7 дней двустворчатые моллюски содержались при солености 18 ‰ (рисунок 3). Затем моллюсков разделили на 5 групп по 10 особей в

каждой. Контрольная группа содержалась при солености 18‰, экспериментальные при 8 ‰, 14 ‰, 35 ‰ и 45 ‰.

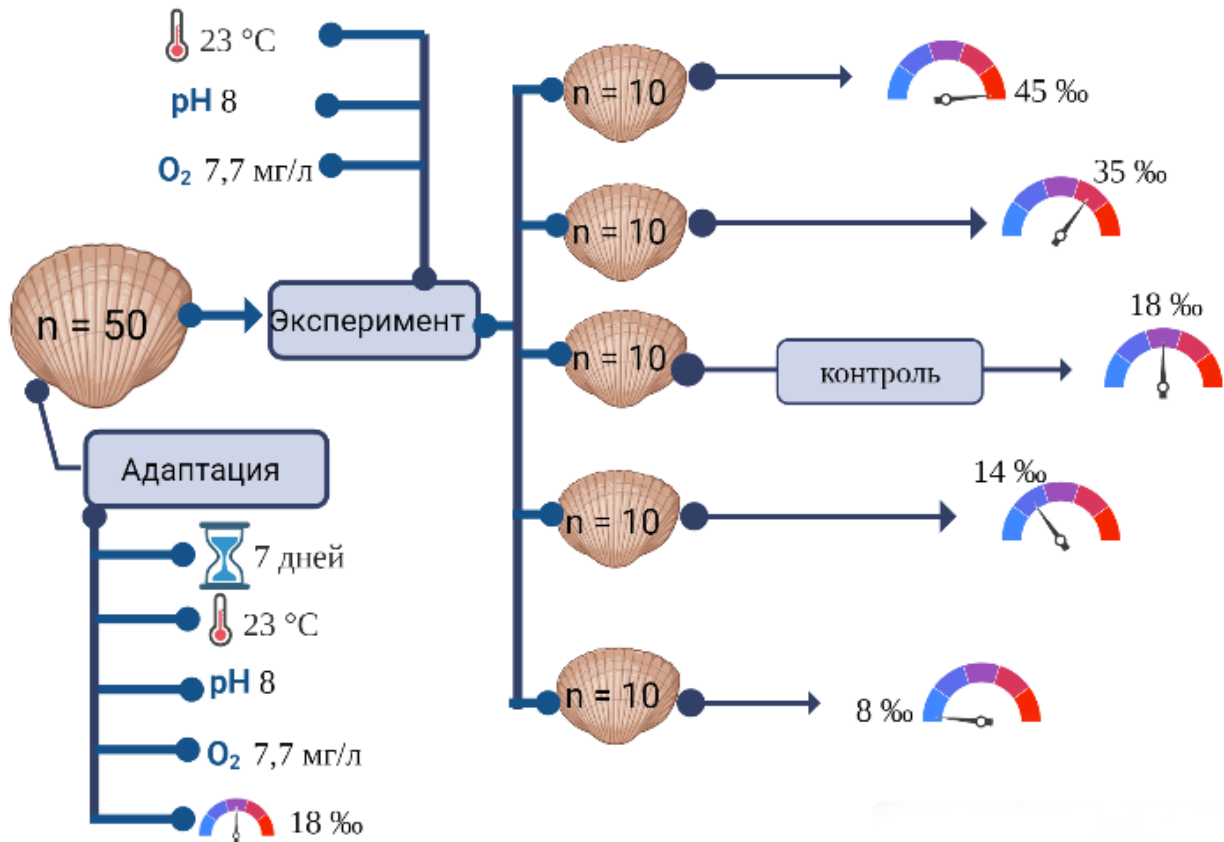


Рисунок 3 — Схема эксперимента по оценки адаптивного потенциала двустворчатого моллюска к изменению солености

Экспериментальное снижение солености (точки 14 ‰ и 8 ‰) достигалось путем разбавления морской воды дистиллированной со скоростью $1,3 \pm 0,6$ ‰ в сутки (рисунок 4). Моллюсков выдерживали в заданных экспериментальных условиях 2 дня. Для достижения солености до 35 ‰ и 45 ‰ в экспериментальные аквариумы постепенно добавляли соль (Red sea salt, France). Соленость повышалась со скоростью $2,5 \pm 0,7$ ‰ в сутки. После достижения солености 35 ‰ (через 6 дней, без учета периода адаптации к лабораторным условиям) и 45 ‰ (еще через 4 дня) экспозиция составляла 2 дня. Затем у двустворчатых моллюсков отбиралась гемолимфа, которая анализировалась методом оптической микроскопии (см. п.2.3.1) и проточной цитометрии (см. п.2.3.2).

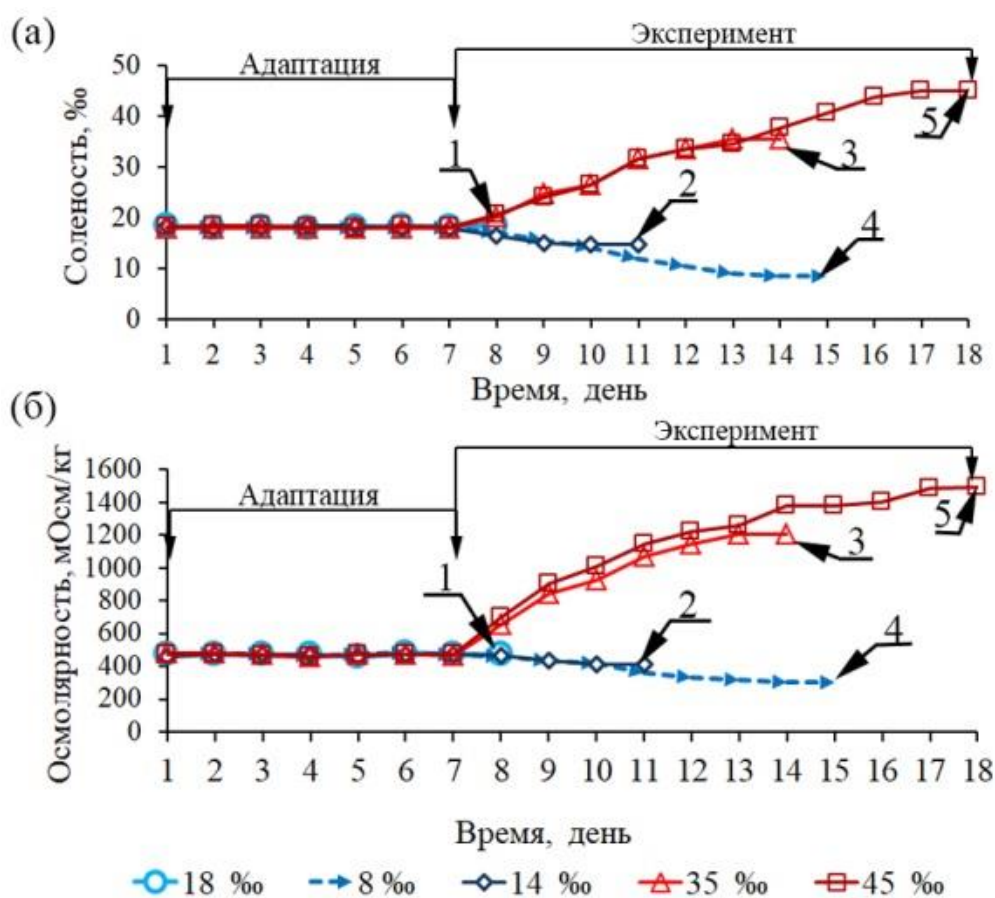


Рисунок 4 — Моделирование снижения и увеличения солености в условиях эксперимента:

1 – 5 точки отбора проб. (а) – Изменение солености морской воды на протяжении периода адаптации к лабораторным условиям и моделирования условий гипер- и гипоосмотического стресса. (б) – Осмолярность морской воды в условиях эксперимента.

2.5 Оценка осмотической стойкости гемоцитов *A. kagoshimensis*

Классический тест на осмотическую хрупкость выполняется спектрофотометрическим методом. Степень гемолиза регистрируют в ряде гипотонических растворов NaCl [7; 151; 205]. Основным недостатком метода

является его трудоемкость. В настоящей диссертационной работе для оценки осмотической стойкости клеток и изменений среднечелочного объема использовали метод лазерной дифракции (рисунок 9-10). Объем отработанного материала представлен в таблице 3. Измерения проводили на лазерном анализаторе микрочастиц (Ласка-Т, BioMedSystems, Россия), оборудованном лазерным диодом (длина волны - 670 нм) [164; 162; 163; 15; 217]. Рабочий объем кюветы 1 мл, термостатирование кюветы в диапазоне 5 – 50°C, задаваемый диапазон оборотов мешалки: 600-4000 об./мин.

Лазерный свет проходит через кювету с суспензией гемоцитов, и интенсивность света, рассеянного клетками (интенсивность лазерного рассеяния, LSI), определяется непрерывно при малых (0–4°) и широких (5–12°) углах. Увеличение объема клеток характеризуется малоугловым рассеянием, а гемолиз - уменьшением обоих углов, малых и широких [162]. Данные, полученные методом лазерной дифракции, анализировали с помощью оригинального программного обеспечения LaSca_32 v.1498.

Степень гемолиза определяли на основе регистрации рассеянного частицами света под разными углами [162]. Исследование осмотической хрупкости проводили путем серийных разведений клеточных суспензий (рисунок 5) 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). Этапы снижения солености в тесте осмотической резистентности представлены на рисунке 6. За физиологическую осмолярность принимали осмолярность гемолимфы моллюсков каждой из конкретных групп. Таким образом, в контрольной группе моллюсков диапазон осмолярности от 461 до 20 мОсм/кг был использован для построения классической кривой осмотической хрупкости

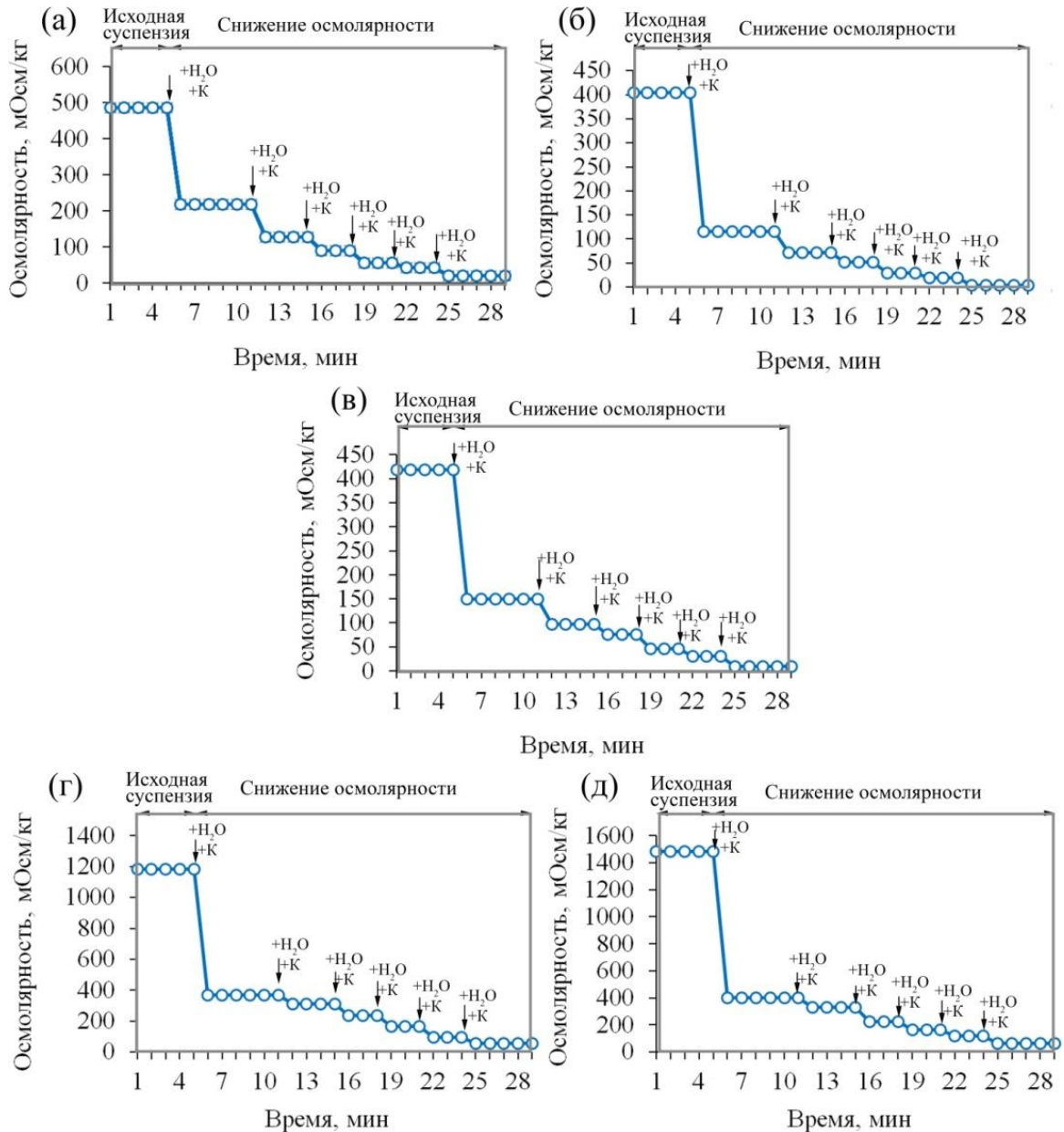


Рисунок 5 — Оценка осмотической резистентности гемоцитов анадарты методом лазерной дифракции

(а) – контрольная группа, (б) – после инкубации моллюсков к 14‰, (в) – 8‰, (г) – 35‰ и (д) – 45‰. Стрелками показаны точки снижения солёности путем одновременного добавления дистиллированной воды (+H₂O) и суспензии клеток (+К) для сохранения постоянной концентрации гемоцитов в кювете в течении всего экспериментального периода

. После предварительной акклимации в гипоосмотических условиях 14 ‰ и 8 ‰ за физиологическую осмолярность принимали 412 мОсм/кг и 298 мОсм/кг,

соответственно. После акклимации в гиперосмотических условиях 35 ‰ и 45 ‰ проведение теста на осмотическую хрупкость начиналось при осмолярности 1200 мОсм/кг и 1500 мОсм/кг. Методика акклимации *A. kagoshimensis* к гипо- и гиперосмотическим условиям представлена в п.2.4. настоящего раздела диссертационной работы.

Процент гемолиза рассчитывали исходя из 100% -ного гемолиза на наиболее гипоосмотической стадии теста - 20 мОсм/кг. Для количественного описания осмотической хрупкости гемоцитов *A. kagoshimensis* использовалась точка 50% гемолиза (H50), отражающая осмолярность среды, при которой наблюдается лизис 50% клеток в образце [151]. Кроме этого, оценивали точку 10% гемолиза (H10) и 90% гемолиза, осмолярность при которой лизировало 10% и 90% гемоцитов, соответственно.

2.6 Моделирование реакции регуляторного увеличения объема в условия гипоосмотической нагрузки

Реакцию RVD моделировали по методике, описанной Андреевой А.Ю. [15] и модифицированной для двустворчатых моллюсков (рисунок 6). В течение 5 минут суспензию инкубировали в кювете при температуре 10 °С и постоянном перемешивании (1500 об./мин). Затем осмолярность морской воды в кювете была снижена с 461 мОсм/кг до 216 мОсм/кг путем добавления дистиллированной воды (1,5 мл) и соответствующего объема суспензии гемоцитов для поддержания постоянной концентрации клеток в экспериментальной кювете ($1-2 \cdot 10^6$ клеток на мл суспензии). После добавления воды осмолярность в кювете контролировали на осмометре OsmoSpecial 1 (Astori, Италия). Оценку изменения объема фиксировали непрерывно в течение 15 мин. Данные малоуглового светорассеяния при

осмолярности 461 мОсм/кг принимались за контрольное значение. Увеличение объема определяли как процент от контроля.

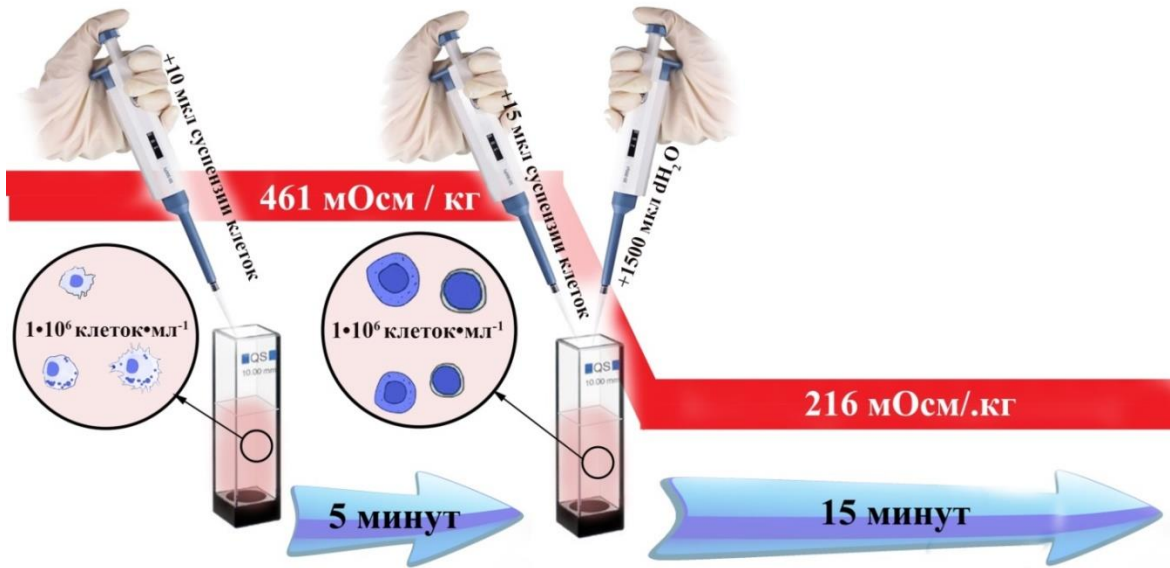


Рисунок 6 — Схема моделирования реакции RVD гемоцитов *A. kagoshimensis* в условиях гипоосмотической нагрузки

2.7 Моделирование реакции регуляторного снижения объема в условиях гиперосмотической нагрузки

Реакцию RVI моделировали по методике, описанной Хофман [105], модифицированной для двустворчатых моллюсков (рисунок 7). Как и в случае моделирования реакции RVD, в течение первых 5 минут суспензия клеток выдерживалась при контрольных значениях солености. После истечения времени инкубации осмолярность морской воды в кювете была увеличена с 461 мОсм/кг до 760 мОсм/кг путем добавления концентрированного раствора NaCl. Одновременно вместе с солевым раствором в кювету добавляли суспензию клеток для сохранения постоянной концентрации в кювете. Изменения фиксировали в течение 15 минут по интенсивности лазерного рассеяния на малых углах ($0-4^\circ$).

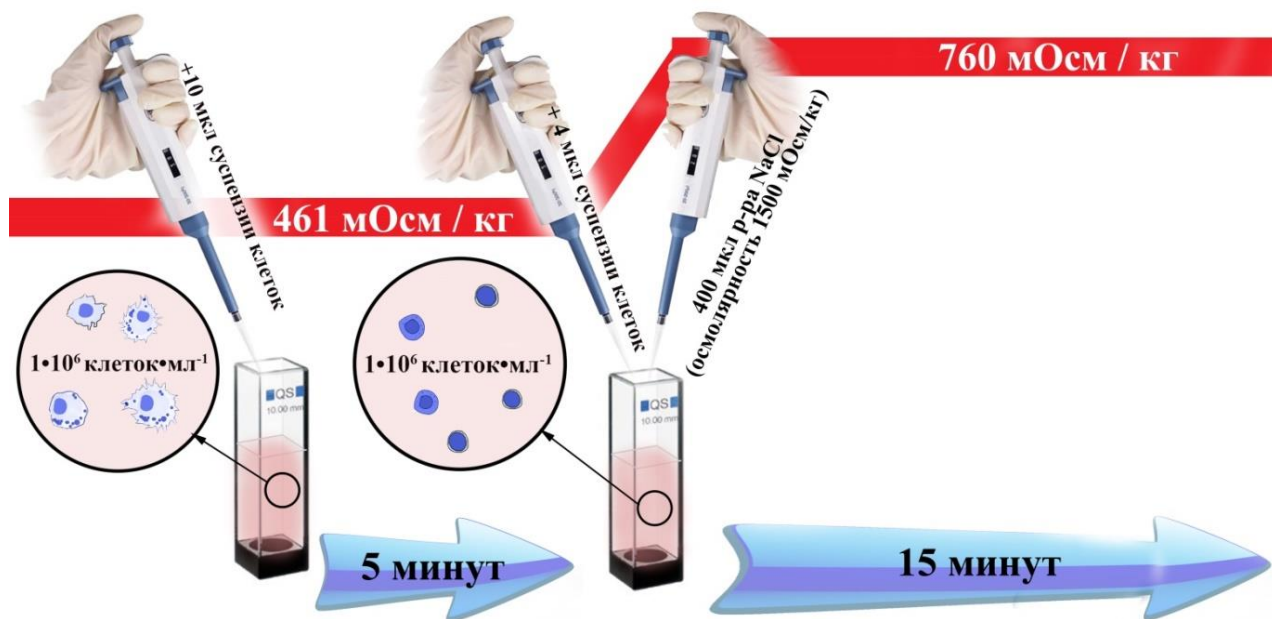


Рисунок 7 — Схема эксперимента по моделированию реакции RVI гемоцитов *A. kagoshimensis* в условиях гиперосмотической нагрузки

2.8 Статистический анализ результатов исследования

Нормальность распределения проверяли при помощи теста Колмогорова-Смирнова. Различия между группами анализировали с помощью программного обеспечения RStudio версия 4.1.0 [189]. Данные световой микроскопии и изменения объемных характеристик гемоцитов подчинялись нормальному закону распределения, поэтому анализировались с использованием дисперсионного анализа (ANOVA) для определения значимости данных. Достоверность результатов проверяли при помощи критерия Тьюки с доверительным интервалом 95%. Распределение функциональных показателей гемоцитов не подчинялся нормальному закону распределения, поэтому данные анализировали при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни. Результаты выражены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

ГЛАВА 3 КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ ГЕМОЛИМФЫ *A. KAGOSHIMENSIS*

В настоящей главе диссертационной работы дана классификация гемоцитов анадары при помощи методов проточной цитометрии, световой микроскопии и градиентного центрифугирования. Охарактеризованы морфологические и размерные характеристики выделенных морфотипов клеток. Описаны особенности популяций клеток гемолимфы к продукции активных форм кислорода и мембранного потенциала митохондрий.

3.1 Морфометрическая характеристика клеток гемолимфы

На мазках гемолимфы анадары на основании гранулярности цитоплазмы, способности к образованию псевдоподий и диаметра клетки и ядра, идентифицировано три морфотипа клеток (рисунок 8).

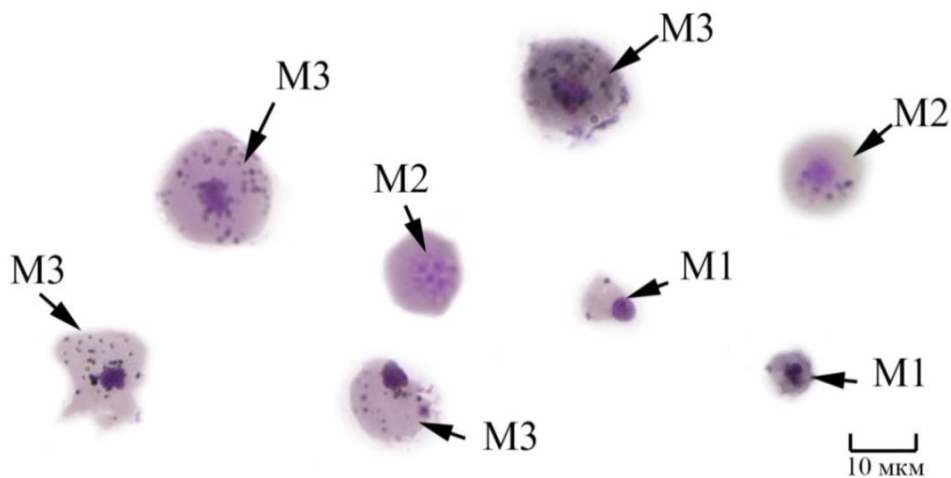


Рисунок 8 — Микрофотографии клеток гемолимфы *Anadara kagoshimensis*: M1, M2, M3 – морфотипы клеток

Окраска мазков проводилась по комбинированному методу Паппенгейма. Мазки анализировались при помощи светового микроскопа (Biomed PR-2 Lum), оборудованного камерой (Levenhuk C NG Series).

Первый морфотип (M1) клеток характеризовался наименьшим диаметром, в сравнении с другими морфологическими типами – $7,8 \pm 0,8$ мкм (рисунок 9).

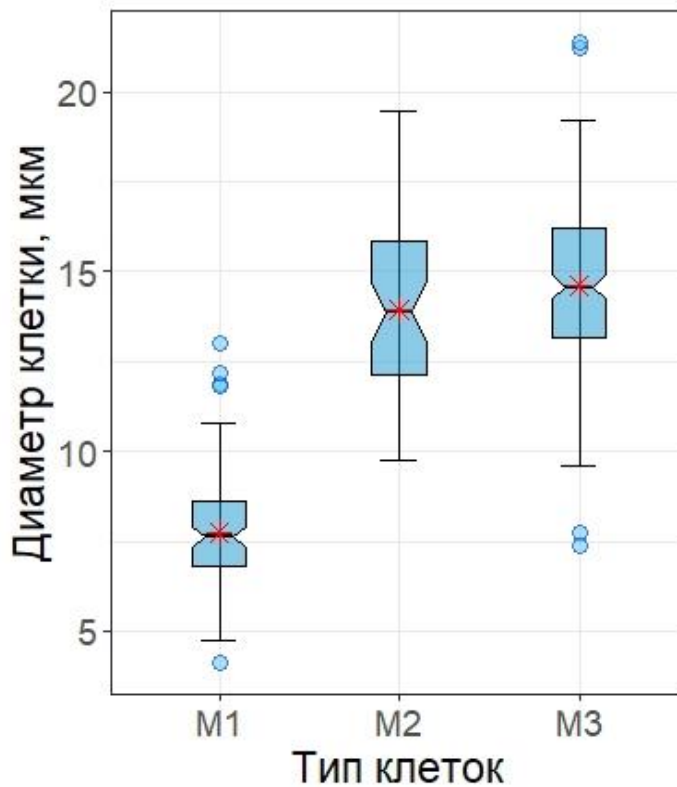


Рисунок 9 — Диаметр морфотипов гемоцитов *A. kagoshimensis*:

(а) наибольший диаметр клетки без учета псевдоподий, (б) наибольший диаметр ядра, (в) ядерно-цитоплазматическое отношение клеток.

На диаграммах изображен интерквартильный размах диаметров трех морфологических типов клеток, среднее значение (красная звездочка), медиана метрических характеристик клетки и 95% доверительный интервал.

Ядро диаметром $5,3 \pm 0,5$ мкм (рисунок 10) занимало большую часть клетки, обуславливая высокое значение ЯЦО – $0,7 \pm 0,1$ (рисунок 11). Цитоплазма M1, как правило, была базофильной, реже – эозинофильной, преимущественно без включений. M1 имели округлую форму, однако встречались вытянутые клетки с ацентричным ядром (рисунок 10). Наиболее крупные клетки – морфотип 3 (M3), со

средним диаметром $14,6 \pm 0,5$ мкм (рисунок 10) были преимущественно эллиптической формы, хотя обнаруживались и амебоподобные округлые элементы (рисунок 8).

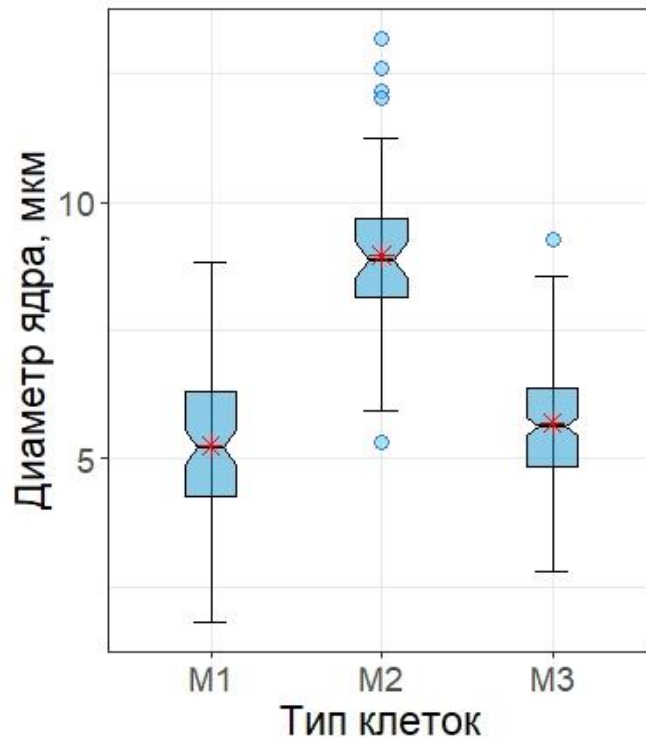


Рисунок 10 — Диаметр ядер, выделенных морфотипов гемоцитов *A. kagoshimensis*

У M3 преобладала базофильная окраска. Цитоплазма содержала до 40 оптически плотных включений (рисунок 8). Ядра диаметром $5,7 \pm 0,4$ мкм (рисунок 10) располагались ацентрично, имели бобовидную или округлую форму. ЯЦО данного типа клеток составило $0,4 \pm 0,03$ (рисунок 11)

Гемоциты второго морфотипа (M2) имели средний диаметр $13,9 \pm 2,0$ мкм (рисунок 9), в сравнении с M1 и M3. Цитоплазма клеток M2 преимущественно не содержала включений и имела эозинофильную окраску (рисунок 8), сравнительно крупное ядро (рисунок 12б) с высоким содержанием эухроматина ($8,9 \pm 1,3$ мкм) располагалось преимущественно в центре клетки. ЯЦО клеток второго типа в 1,9 раз превышал ЯЦО клеток первого типа.

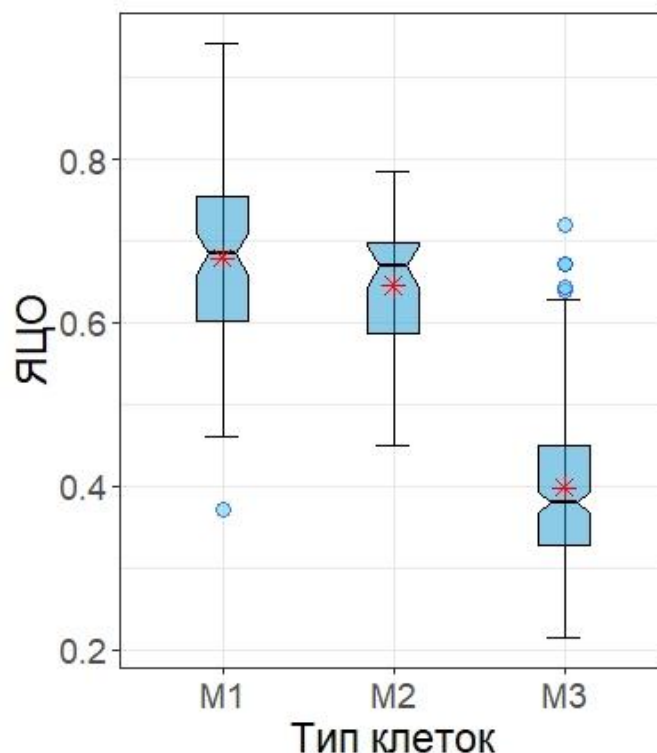


Рисунок 11 — Ядерно-цитоплазматическое отношение морфотипов гемоцитов *A. kagoshimensis*

Распределение гемоцитов по размерным характеристикам значительно перекрывалось между типами клеток (рисунок 12). На гистограмме распределения по метрическим параметрам клеток формируется две основные популяции M1 и M3. Распределение M2 практически полностью перекрывается одной из морфологических групп. Так, диаметр клетки M1 достоверно отличался от диаметров M2 и M3 ($p < 0,05$), в то время как достоверных различий между последними не зафиксировано. Диаметр ядра M2 достоверно отличался от диаметров M1 и M3 ($p < 0,05$). Различия размерных характеристик ядер M1 и M3 были статистически достоверными. По показателю ЯЦО достоверно отличались M1 от M3 и M2 от M3 ($p < 0,05$).

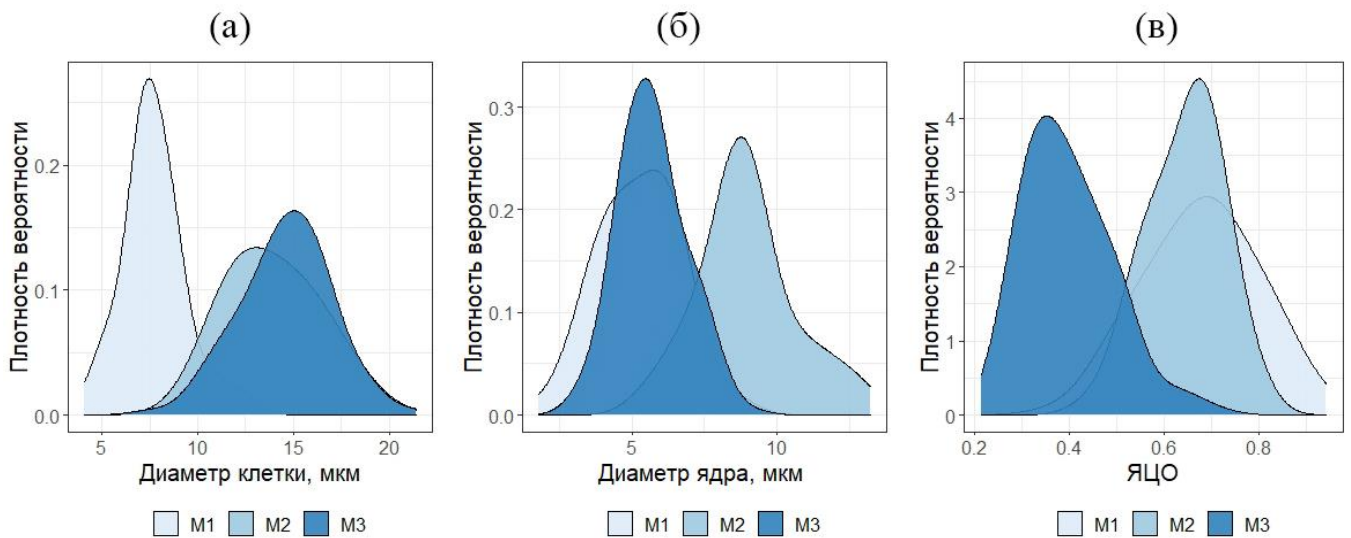


Рисунок 12 — Распределение размерных характеристик гемоцитов *A. kagoshimensis* по морфологическим типам.

(а) – наибольший диаметр гемоцитов; (б) – наибольший диаметр их ядер; (в) – ЯЦО клеток: М1, М2, М3 – морфотипы клеток

3.2 Идентификация типов гемоцитов методом проточной цитометрии

Пик флуоресценции красителя SGI гемоцитов характеризовался относительно высоким коэффициентом вариации (CV) – $26,1 \pm 1,4$ % (рисунок 12а). На основании распределения SGI положительных клеток (рисунок 13 а) по FS и SS было идентифицировано две субпопуляции клеток (рисунок 13 б) с различным относительным размером и уровнем гранулярности (рисунок 15, 16).

Различия по значениям светорассеяния между субпопуляциями гемоцитов были статистически достоверны ($p < 0,05$). В гемолимфе анадары преобладали крупные клетки, их количество составляло $85,9 \pm 2,8$ %.

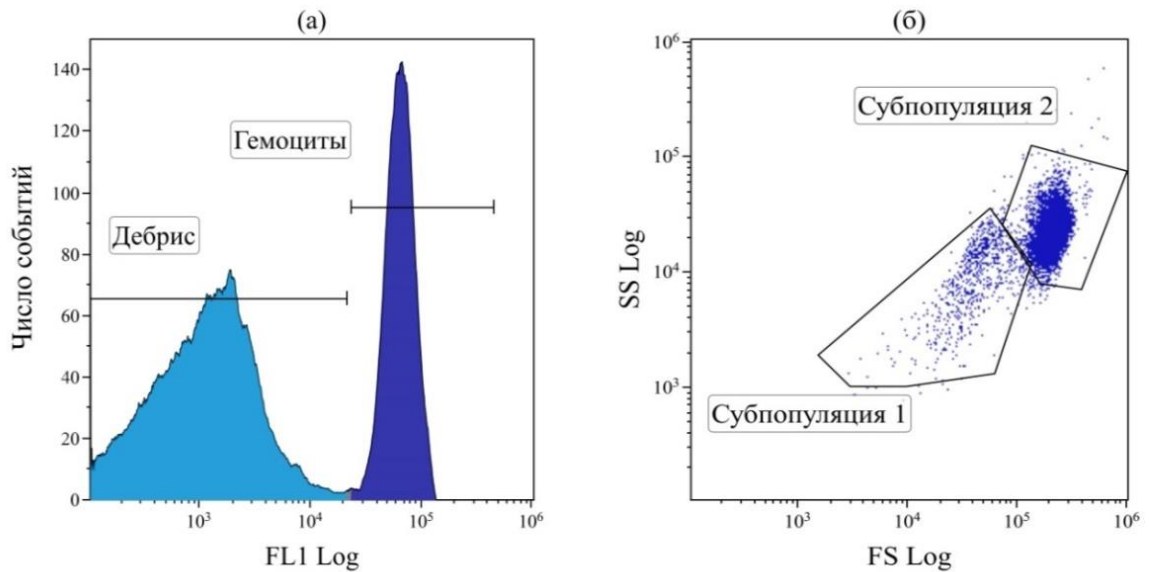


Рисунок 13 — Идентификация типов гемоцитов *A. kagoshimensis* методом проточной цитометрии

(а) Гистограмма содержания ДНК в гемоцитах *A. kagoshimensis*. Клетки инкубировали с SGI в течение 40 мин в темноте (финальная концентрация красителя в пробе 10 мкМ). (б) Распределение клеток гемолимфы *A. kagoshimensis* на основании величин FS и SS показывающее две субпопуляции гемоцитов.

Во всех анализируемых образцах присутствовало незначительное количество мертвых клеток (положительных по PI), доля которых не превышала 2 % (рисунок 14).

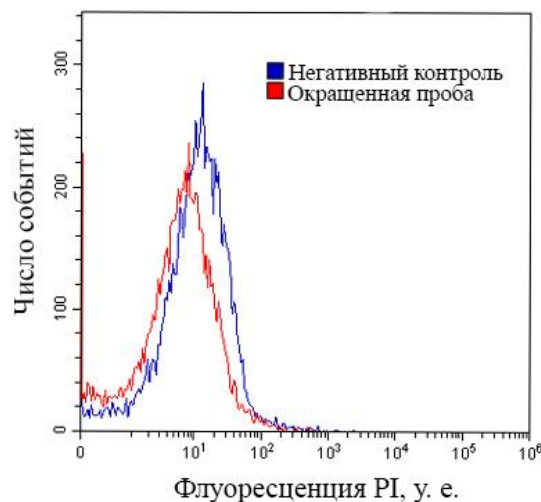


Рисунок 14 — Пример анализа доли мертвых гемоцитов в суспензии

График (рисунок 14) представляет собой наложение гистограмм неокрашенной суспензии гемоцитов (негативный контроль, красный график) и окрашенной суспензии (красный график). Долю мертвых гемоцитов подсчитывали как % относительно общего числа клеток.

На основании гранулярности цитоплазмы, относительного размера, способности к продукции АФК и мембранного потенциала выделено две субпопуляции гемоцитов. Субпопуляция 1 (С1) была неоднородна по значениям прямого (рисунок 15) и бокового рассеяния (рисунок 16) и имела сравнительно низкие значения показателей FS, что соответствовало среднему диаметру клеток 6-7 мкм, согласно данным калибровки протокола латексными микрочастицами.

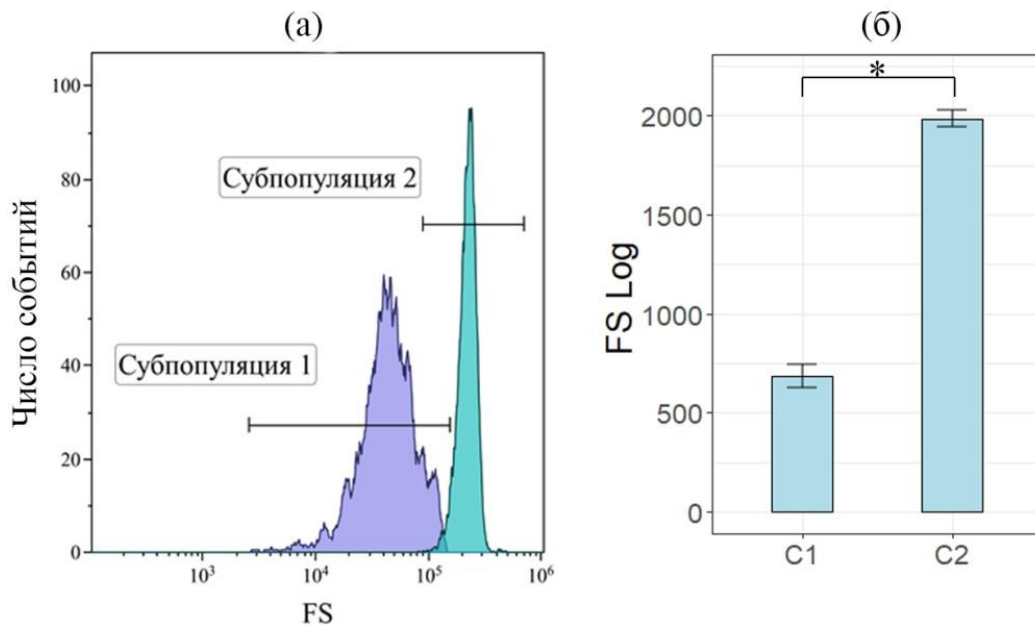


Рисунок 15 — Относительный размер клеток в выделенных субпопуляциях гемоцитов *A. kagoshimensis*.

(а) Гистограмма распределения клеток по относительному размеру (FS), показывающая две субпопуляции гемоцитов.

(б) Различия гемоцитов анадары по показателю относительного размера (FS):
C1- субпопуляция 1, C2 – субпопуляция 2

* - различия между субпопуляциями статистически достоверны, $p \leq 0,05$ (n=15)

Субпопуляция 2 (C2) популяция, характеризовалась более высокими показателями относительного размера (рисунок 15) и гранулярности (рисунок 16) в сравнении с мелкими клетками. Средний диаметр клеток соответствовал 13-14 мкм. Вытянутость облака распределения клеток по оси SS свидетельствовала о большом разбросе уровня гранулярности клеток в субпопуляции.

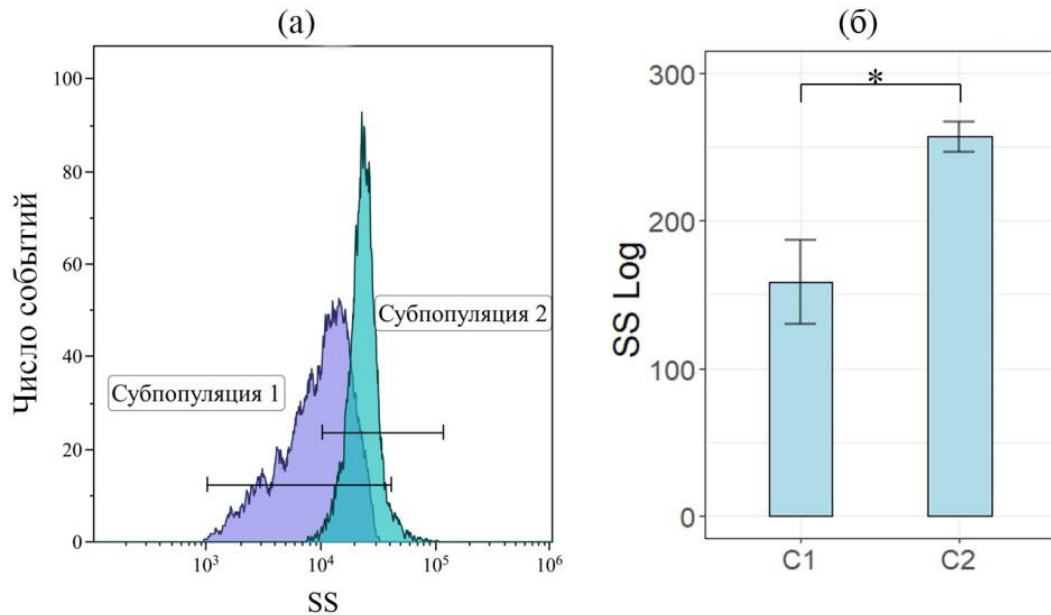


Рисунок 16 — Характеристика гемоцитов *A. kagoshimensis* по показателю относительной гранулярности.

(а) Гистограмма распределения клеток по относительной гранулярности (SS), показывающая две субпопуляции гемоцитов.

(б) Относительная гранулярность выделенных субпопуляций гемоцитов:

C1- субпопуляция 1, C2 – субпопуляция 2

* - различия между субпопуляциями статистически достоверны, $p \leq 0,05$ ($n=15$)

Обе субпопуляции клеток характеризовались выраженной способностью генерировать окислительный взрыв. Флуоресценцией красителя DCF-DA – $547,3 \pm 39,7$ у.е. для крупных гранулярных клеток (C2) и $560,4 \pm 35,3$ у.е. для мелких агранулярных клеток (C1) (рисунок 17). Различия во флуоресценции красителя статистически не достоверны.

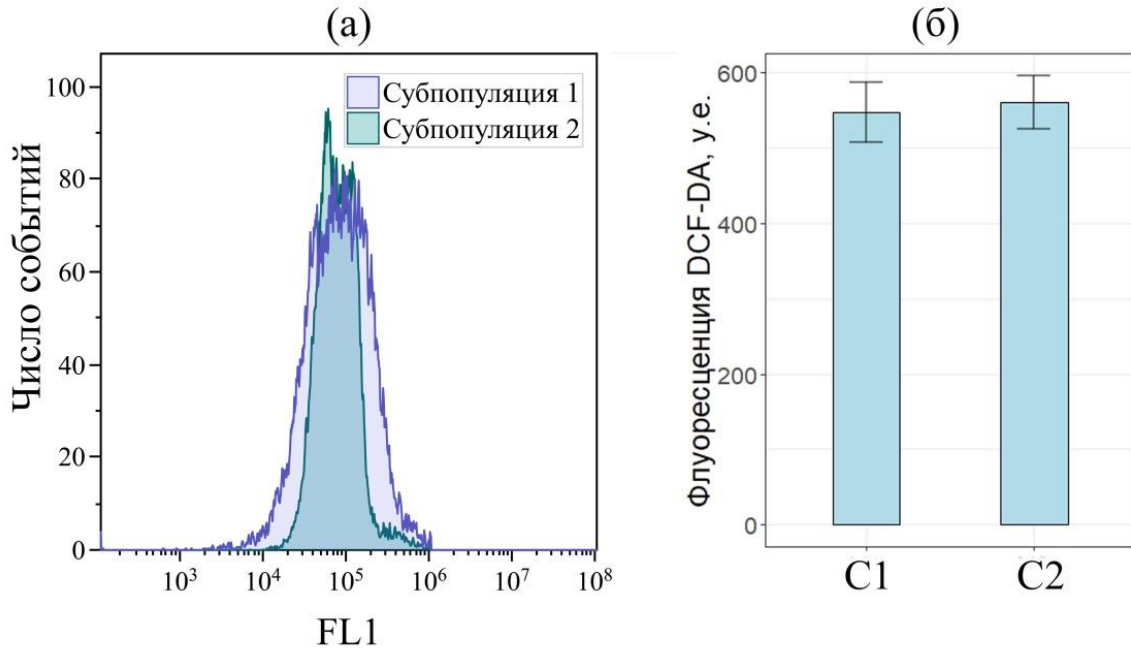


Рисунок 17 — Способность гемоцитов *A. kagoshimensis* к генерации окислительного взрыва

(а) Гистограмма распределения флуоресценции красителя DCF (б) Способность гемоцитов к продукции АФК:

C1 – субпопуляция 1, C2 – субпопуляция 2. Способность гемоцитов к спонтанной продукции АФК оценивали по флуоресценции клеток, окрашенных красителем DCF-DA. Финальная концентрация красителя в пробе составляла 10 мкмоль/л. Флуоресценция красителя анализировалась в канале FL1 (зеленая область спектра).

Популяции клеток значительно различались по флуоресценции красителя Rh123 ($p < 0,05$). Митохондриальный потенциал крупных клеток (C2) составлял $131,0 \pm 18,3$ у.е. Флуоресценция красителя Rh123 для клеток C1 была в два раза ниже, в сравнении с клетками C2, что составило $67,3 \pm 9,1$ у.е. (рисунок 18).

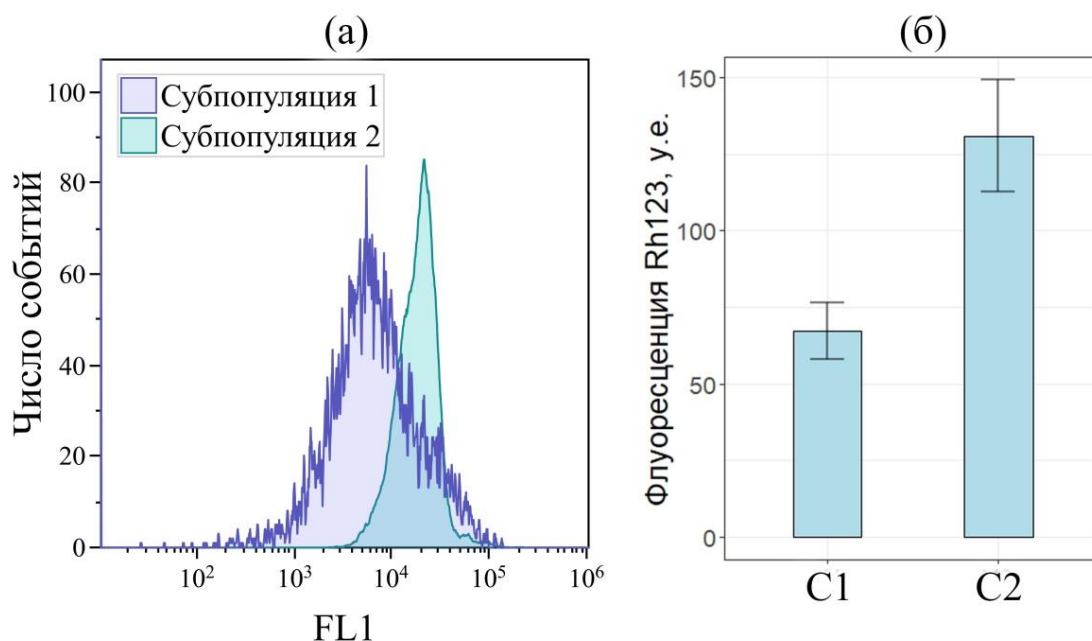


Рисунок 18 — Характеристика мембранного потенциала митохондрий гемоцитов *A. kagoshimensis*

(а) Гистограмма распределения выделенных субпопуляций гемоцитов по флуоресценции красителя Rh123. (б) Различия в мембранном потенциале выделенных субпопуляций: C1 – субпопуляция 1, C2 – субпопуляция 2.

Мембранный потенциал митохондрий гемоцитов анадары оценивали по флуоресценции клеток, окрашенных красителем Rh123. Концентрация красителя в пробе составляла 0,1 мг/мл.

3.3 Классификация гемоцитов на основе распределения клеток в градиенте плотности Перколл

В результате центрифугирования в градиенте плотности гемолимфы анадары было выделено 3 фракции клеток (рисунок 19). На мазках гемолимфы фракционированных клеток оценивали морфометрические параметры выделенных ранее морфотипов (рисунок 19 б-ж).

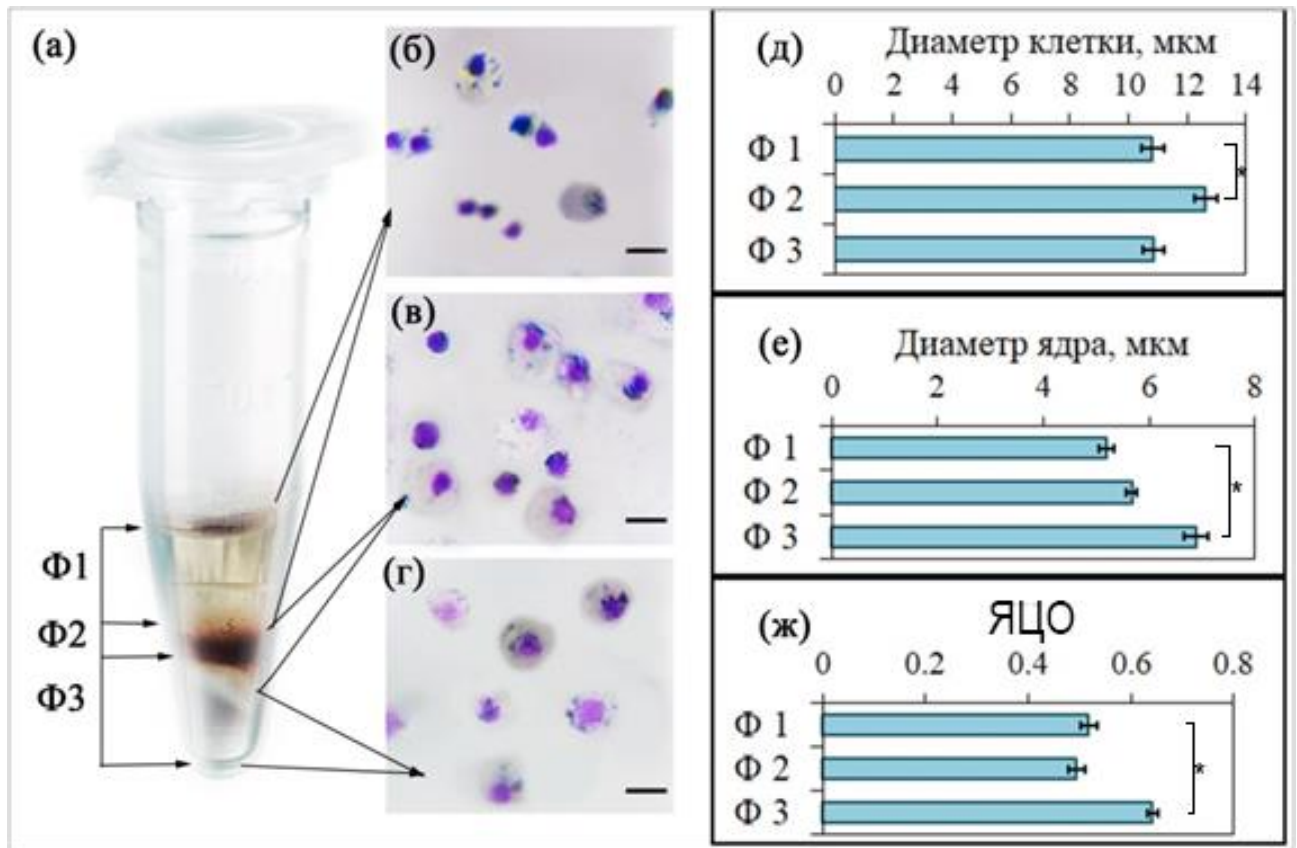


Рисунок 19 — Фракционирование гемолимфы *A. kagoshimensis*:

(а) – фракции гемолимфы в градиенте плотности Percoll; (б), (в), (г) – препараты фракций, показывающие их морфологические особенности; (д) – диаметры клеток в выделенных фракциях; (е) – диаметр ядра фракций гемоцитов; (ж) – ядерно-цитоплазматическое отношение гемоцитов в выделенных фракциях.

М1 и М3 присутствовали во всех выделенных фракциях, М2 встречался только в последней фракции. В первой фракции преобладали клетки диаметром $10,8 \pm 0,4$ мкм со сравнительно небольшим ядром ($5,2 \pm 0,1$ мкм), а во второй более крупные клетки ($12,6 \pm 0,5$ мкм) с ядром $5,7 \pm 0,1$ мкм в диаметре. Как следствие, и в первых двух фракциях ЯЦО гемоцитов было равно $0,5 \pm 0,02$. В третьей фракции размеры клеток приблизительно соответствовали первой фракции ($10,9 \pm 0,4$ мкм), а ядро было значительно крупнее ($6,9 \pm 0,2$ мкм), различия статистически достоверны ($p < 0,05$). Кроме этого, клетки третьей фракции имели более высокое ЯЦО – $0,6 \pm 0,01$ ($p < 0,05$).

Методом проточной цитометрии по показателям прямого и бокового размера оценивали соотношение типов гемоцитов. В каждой из выделенных фракций

встречались клетки всех выделенных субпопуляций. По мере возрастания концентрации Percoll численность C1 снижалась, а численность C2 возрастала (рисунок 20).

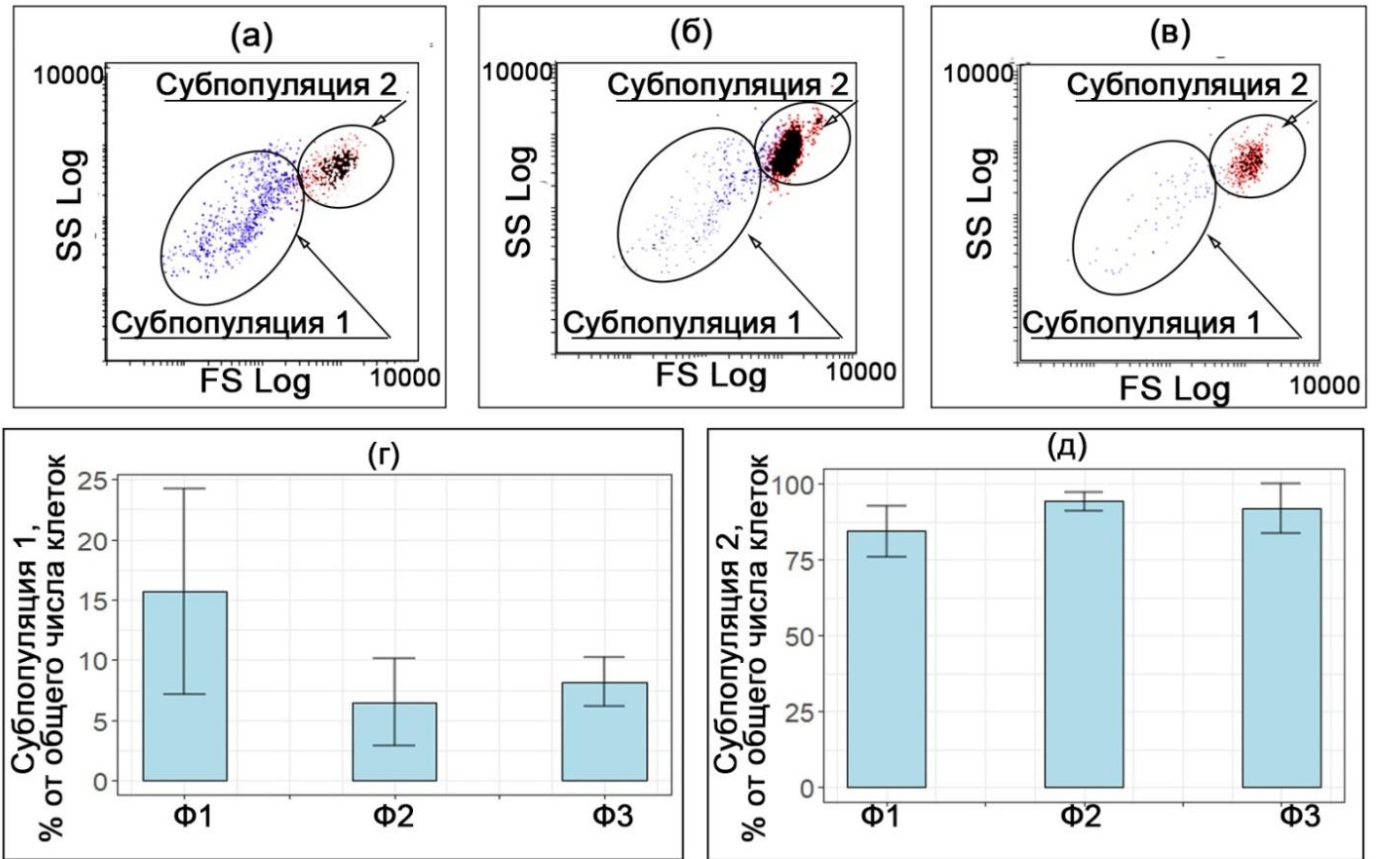


Рисунок 20 — Клеточный состав фракций Percoll:

(а) - распределение SGI положительных клеток фракции 1 по FS/SS;

(б) - распределение фракции 2 по FS/SS; (в) - распределение клеток фракции 3 по FS/SS; (г) – распределение C1 по фракциям; (д) – распределение C2 по фракциям

3.4 Обсуждение результатов исследования

В гемолимфе анадары, в зависимости от метода идентификации, было выделено 2-3 типа клеток, что в целом согласуется с аналогичными данными, полученных для других видов двусторчатых [27; 59; 193]. По данным калибровки

протокола цитометра при помощи микрочастиц, С1 соответствует М1 - типу гемоцитов с наименьшим диаметром. Морфологические характеристики М1 соответствуют амебоцитам анадары, описанным ранее в литературе [122; 107; 53]. Неоднородность распределения амебоцитов по FS и SS свидетельствует о наличии в популяции нескольких подтипов, которые, однако, невозможно идентифицировать на основании использованных методов.

С2 на гистограмме FS/SS включает в себя клетки М2 и М3. Вероятно, вытянутость облака распределения клеток типа по оси SS обусловлена различиями в размере ядра между М2 и М3 гемоцитов, а также содержанием большого количества включений в клетках М3. По своим морфологическим характеристикам тип клеток М3 соответствует гранулярным гемоцитам мидий и устриц или эритроцитам анадары, описанным в литературе [122; 107; 53; 177], а М2 схож с гиалиноцитами устриц [128; 14]. Известно, что форма и размер гемоцитов моллюсков варьируют в достаточно широких пределах [14; 18; 16; 103]. Сравнительный анализ размерных характеристик гемоцитов *A. kagoshimensis* показал, что диаметр М3 (4,1 -12,9 мкм) и их ядер (2,8 – 9,3 мкм) сопоставимы с гранулоцитами и гемигранулоцитами, а диаметр М1 (7,4 – 21,4 мкм) и их ядер (1,8 – 8,8 мкм) сопоставимы с гемобластами, агранулоцитами и гиалиноцитами других видов моллюсков (таблица 4). Диаметры клеток М2 (9,7-19,5 мкм) сопоставимы с линейными характеристиками гиалиноцитов и гранулоцитов, при этом диаметры их ядер (5,3 -13,2 мкм) сопоставимы с агранулоцитами и гиалиноцитами. Описанные закономерности так же характерны для показателя ЯЦО. Однако, поскольку М2 и М3 нельзя разделить методами отличными от световой микроскопии, в настоящей работе они рассматриваются исключительно как подтипы С2.

Морфологические характеристики агранулярных клеток или амебоцитов анадары (сравнительно небольшие размеры клеток, большое ядро и ЯЦО) полностью соответствуют литературному описанию агранулярных или базофильных клеток мидий и устриц [60; 43; 42]. В свою очередь, ацентричное ядро и небольшое ЯЦО, наличие включений в цитоплазме и способность к формированию амебоидной

формы гранулярных эритроцитов аналогичны характеристикам гранулоцитам мидий и устриц [178; 8; 42; 128]. Что согласуется с утверждением о наличии у моллюсков двух основных морфотипов гемоцитов – агранулоцитов и гранулоцитов [13; 14; 17; 102].

Таблица 4 — Линейные размеры эритроцитов различных видов моллюсков

Вид	Тип клетки	Диаметр клетки	Диаметр ядра	ЯЦО	Источник
<i>Modiolus kurilensis</i> F. R. Bernard, 1983	Гемобласты	$6,0 \pm 0,3$	Нет данных	Нет данных	[103]
	Агранулоциты	$11,4 \pm 0,6$	Нет данных	Нет данных	
	Гемигранулоциты	$15,5 \pm 0,4$	Нет данных	Нет данных	
	Гранулоциты	$14,5 \pm 0,4$	Нет данных	Нет данных	
<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819	Агранулоциты	$8,0 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,01$	[16]
	Гранулоциты	$12,7 \pm 0,4$	$5,5 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,02$	
<i>Anodonta anatina</i> Linnaeus, 1758	Гранулоциты	$13,61 \pm 1,55$	$5,57 \pm 0,50$	$0,41 \pm 0,05$	[103]
	Гиалиноциты	$10,5 \pm 0,7$	$5,7 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,1$	
<i>Anodonta cygnea</i> Linnaeus, 1758	Гранулоциты	$15,2 \pm 2,5$	$5,84 \pm 1,1$	$0,4 \pm 0,1$	[103]
	Гиалиноциты	$8,9 \pm 1,1$	$6,4 \pm 1,1$	$0,7 \pm 0,1$	
<i>Magallana gigas</i> Thunberg, 1793	Агранулоциты	$9,1 \pm 0,1$	$5,5 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,01$	[14]
	Гиалиноциты	$9,7 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,01$	
	Гранулоциты	$11,1 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,01$	

Однако, эритроциты анадары отличаются от гранулоцитов других представителей двустворчатых моллюсков наличием гемоглобина. Наличие клеток,

содержащих дыхательный пигмент, повышает кислородную емкость гемолимфы и позволяет лучше адаптироваться к гипоксическим и аноксическим условиям [122]. Показано, что в условиях нормоксии ($6-7 \text{ мгО}_2 \text{ л}^{-1}$) анадара потребляет в 5-6 раз меньше кислорода, чем черноморская мидия (*M. galloprovincialis*), а при аноксии активно использует белковые субстраты [211].

В нашем исследовании гранулярных клеток мембранный потенциал митохондрий был значительно выше, в сравнении с агранулярными. Данный результат согласуется с исследованиями, проводимыми на *M. lusoria* и *O. edulis* [248; 233]. С другой стороны, у *M. gigas* гемоциты не различались по данному показателю [59], а у *P. viridis* мембранный потенциал гранулярных клеток был значительно ниже, в сравнении с агранулярными [60]. Считается, что флуоресценция красителя напрямую зависит от количества и активности митохондрий [248]. Различие в мембранном потенциале гемоцитов *A. kagoshimensis*, вероятно связано, с наличием в эритроцитах большего числа митохондрий. Последнее подтверждается результатами исследования ультраструктуры гемоцитов двустворчатых моллюсков [257; 193; 224; 218]. Кроме этого, гранулярные гемоциты моллюсков обычно в большей степени способны к фагоцитозу, что также обуславливает содержание большего числа митохондрий, в сравнении с агранулярными клетками [113].

Гемоциты большинства двустворчатых моллюсков продуцируют АФК, которые участвуют в неспецифической иммунной защите, проявляя цитотоксическую активность [171; 98]. Окислительная активность гемоцитов наблюдалась у *M. galloprovincialis*, *A. trapezia*, *Magallana ariakensis* (Fujita, 1913), *M. gigas* [171; 98]. Наши результаты подтверждают наличие окислительной активности в гемоцитах *A. kagoshimensis*. Несмотря на то, что гранулоциты двустворчатых моллюсков считаются более эффективными в клеточном иммунном ответе по сравнению с агранулоцитами [8], в настоящей работе мы не наблюдали значимых различий в флуоресценции DCF-DA между типами гемоцитов. Амебоциты, вероятно, разделяют защитные функции с эритроцитами и клетками

промежуточного типа. Аналогичные результаты продемонстрировали гемоциты *A. trapezia* [53].

Таким образом, методом проточной цитометрии и световой микроскопии выделено два основных типа клеток гемолимфы *A. kagoshimensis* – небольшие агранулярные и крупные гранулярные. Гемолимфа *A. kagoshimensis* в основном состояла из крупных гранулярных клеток, второй составлял менее 15%. Оба исследуемых типа клеток проявляли одинаковую способность к формированию окислительного взрыва, но статистически значимо отличались по показателю мембранного потенциала митохондрий.

ГЛАВА 4 ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ГИПО- И ГИПЕРОСМОТИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕМОЦИТОВ *A. KAGOSHIMENSIS*

Двустворчатые моллюски относятся к организмам осмоконформерам, поэтому колебание солености оказывает непосредственное воздействие на их клеточные системы. Гемоциты выполняют функцию транспорта, питания, заживления тканей, а также участвуют в иммунном ответе и в формировании раковины. В настоящей главе диссертационной работы приводятся результаты исследования влияния краткосрочного гипер- и гипоосмотического стресса на клетки гемолимфы двустворчатого моллюска, распространенного в водах с соленостью от 12‰ до 35‰. Экспериментальная схема подробно рассмотрена ранее (см. главу 2). Для исследования влияния соленостного стресса на морфологические и функциональные особенности гемоцитов использовали методы проточной цитометрии и световой микроскопии. При характеристике мембранного потенциала митохондрий и способности к продукции АФК применяли Rh123 и DCF-DA. Состояние клеточных мембран оценивали при помощи красителя PI. В условиях акклимации к лабораторным условиям не было зафиксировано гибели моллюсков. Воздействие и гипер-, и гипоосмотического стресса также не привело к гибели анадары.

4.1 Осмолярность гемолимфы

Осмолярность гемолимфы анадары соответствовала осмолярности морской воды на протяжении всего эксперимента (рисунок 21). В контрольной группе моллюсков (инкубация при солености 18 ‰) осмолярность гемолимфы была равна

493,4±1,5 мОсм/кг, при осмолярности морской воды – 470,0 мОсм/кг. Гипоосмотические условия приводили к постепенному снижению осмолярности гемолимфы, при 8‰ достигали 395,0±298,0 мОсм/кг, в условиях осмолярности морской воды 298 мОсм/кг. В гиперосмотических условиях осмолярность гемолимфы увеличивалась (в сравнении с контрольными условиями) и при максимальной солености (45‰) составил 1446,1±46,2 мОсм/кг. Осмолярность морской воды, в которой инкубировали данную группу моллюсков, была равна 1500 мОсм/кг.

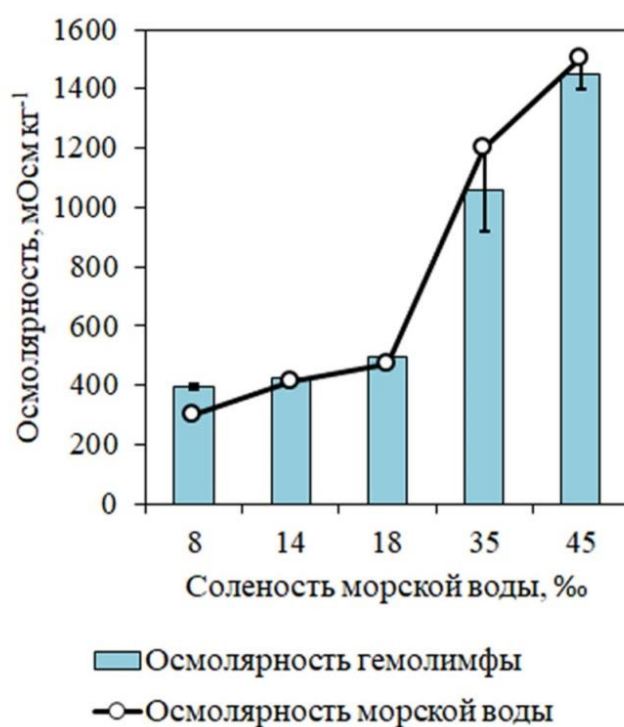


Рисунок 21 — Изменение осмолярности гемолимфы после гипо- и гиперосмотического воздействия

Снижение солености достигалось за счет постепенного разбавления морской воды дистиллированной. Уровень солености был увеличен постепенным добавлением соли Red Sea salt (Франция). Осмолярность морской воды и гемолимфы контролировали с помощью осмометра (OsmoSpecial 1, Astori Tecnica, Италия). Соленость контролировали при помощи портативного кондуктометра-солемера sensION 5 HACH (США). В каждой экспериментальной группе проводило 10 измерений солености и осмолярности.

4.2 Изменения клеточного состава гемолимфы

У контрольной группы в гемолимфе преобладали гранулярные клетки ($91,4 \pm 1,64\%$), относительное число агранулярных клеток составило $8,6 \pm 1,6\%$. Гипоосмотическая нагрузка привела к снижению доли агранулярных клеток (рисунок 22), при солёности 8 ‰ данный показатель был равен $1,9 \pm 0,6\%$ ($p < 0,05$). Доля гранулярных клеток составила $98,2 \pm 0,6\%$ ($p < 0,05$). Снижение солёности до 14 ‰ не приводило к изменению клеточного состава гемолимфы. В условиях гиперосмотического стресса у моллюсков также снижалась доля агранулярных клеток до $3,0 \pm 0,6\%$ при увеличении солёности до 45 ‰ ($p < 0,05$). Процентное содержание гранулярных клеток составило $97,0 \pm 0,6\%$ ($p < 0,05$), соответственно. Повышение солёности до 35 ‰ не сопровождалось изменением клеточного состава гемолимфы анадары.

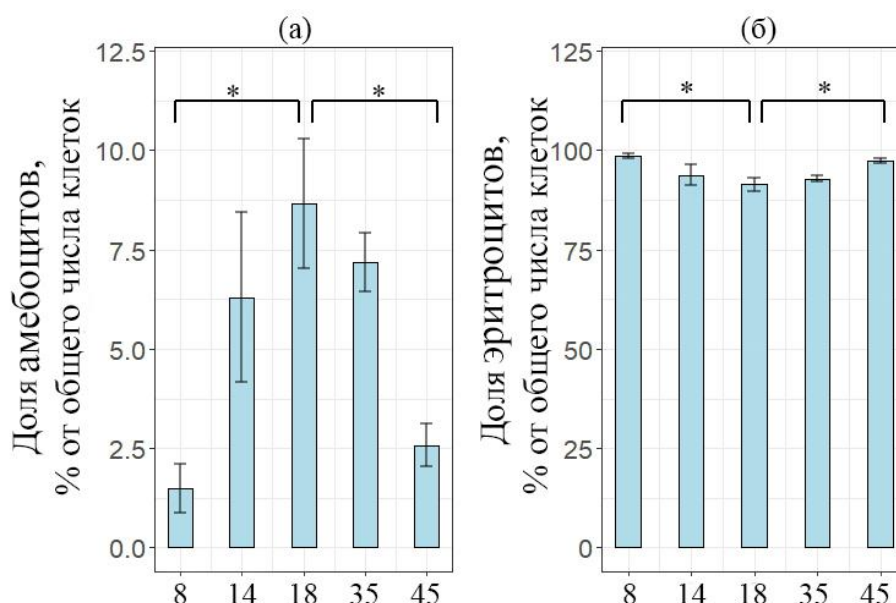


Рисунок 22 — Изменение соотношения агранулярных (а) и гранулярных гемоцитов в гипо- и гиперосмотических условиях.

Соотношение клеточных типов оценивали по графику распределения клеток по показателям FS и SS. * - достоверно относительно контроля ($p \leq 0,05$, $n=10$).

4.3 Морфометрические характеристики гемоцитов

На препаратах гемолимфы контрольной группы моллюсков выделено два типа клеток – крупные гранулярные клетки (эритроциты) и мелкие агранулярные клетки (амебоциты). Морфологические (рисунок 23) и морфометрические (таблица 7) особенности гемоцитов соответствовали описанным в главе 3 настоящей работы. Амебоциты – наименьший тип клеток, характеризующийся округлой формой и отсутствием гранулярных включений. Эритроциты – крупные клетки, в сравнении с эритроцитами. Данный тип клеток способен к образованию псевдоподий, а их цитоплазма содержит большое число гранулярных включений.

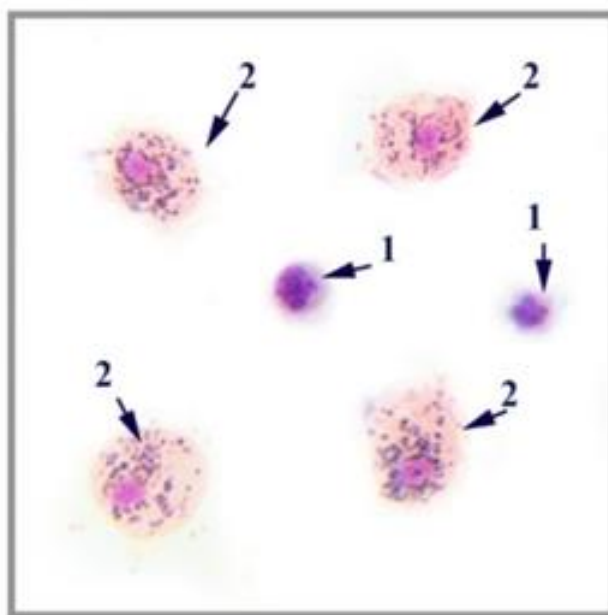


Рисунок 23 — Морфологические особенности гемоцитов контрольной группы моллюсков, инкубированных при солености 18 ‰

1 – агранулярные клетки (амебоциты), 2 – гранулярные клетки (эритроциты).

Окраска мазков проводилась по комбинированному методу Паппенгейма. Мазки анализировались при помощи светового микроскопа (Biomed PR-2 Lum), оборудованного камерой (Levenhuk C NG Series).

Гипоосмотический стресс не повлиял на морфологические особенности агранулярных клеток (рисунок 24). Вместе с тем, гипоосмотическая нагрузка приводила к увеличению числа эритроцитарных теней. В контрольной группе моллюсков доля разрушенных клеток не превышала 5% от общего числа гемоцитов. В гипоосмотических условиях доля эритроцитарных теней равномерно увеличивалась: при солёности 8‰ их число было более чем в 3,5 раза выше контрольных значений и составило $18,2 \pm 0,5\%$ от общего числа гемоцитов.

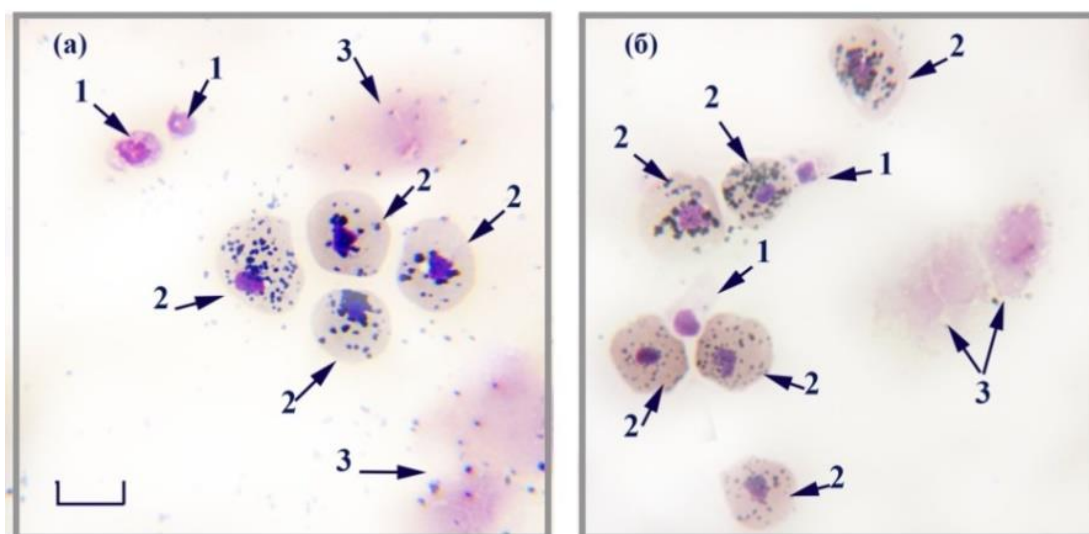


Рисунок 24 — Изменение морфологических характеристик гемоцитов *A. kagoshimensis* после инкубации в гипоосмотических условиях 8‰ (а) и 14‰ (б), 1 – агранулярные клетки (амебоциты), 2 – гранулярные клетки (эритроциты), 3 – эритроцитарные тени. Шкала – 10 мкм

Инкубация в гиперосмотических условиях не сопровождалась увеличением доли эритроцитарных теней, но оказала влияние на морфологические характеристики гемоцитов. После инкубации моллюсков при солёности 35‰ гранулярные включения гемоцитов были преимущественно смещены ближе к ядру (рисунок 25 а). Дальнейшее повышение солёности до 45‰ привело к равномерному распределению гранулярных включений по цитоплазме клеток (рисунок 25 б).

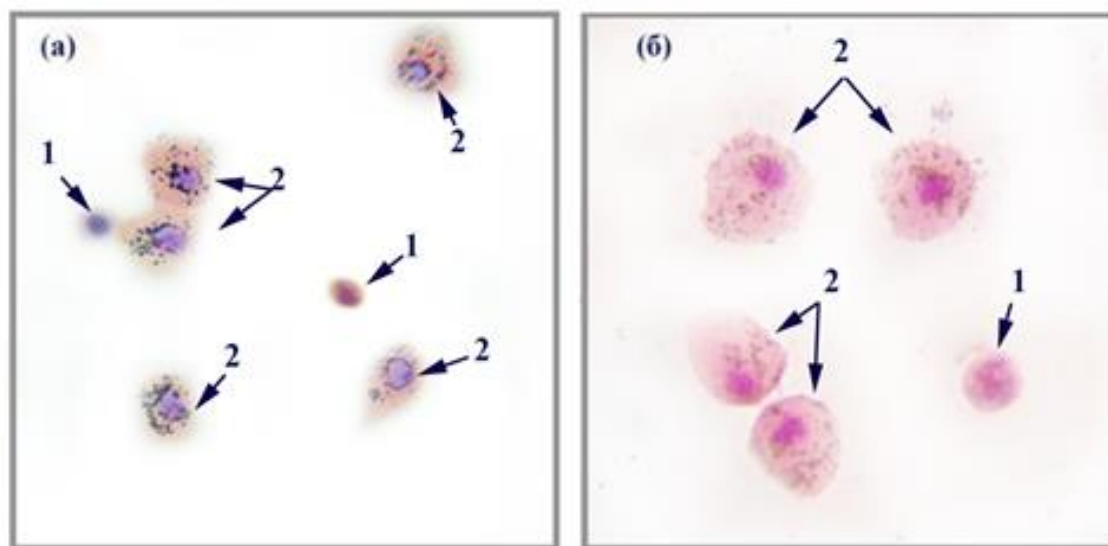


Рисунок 25 — Изменение морфологических характеристик гемоцитов *A. kagoshimensis* после инкубации в гиперосмотических условиях (а) – гемолимфа моллюсков, после инкубации в гиперсоленых условиях - 35‰, (б) – после инкубации при 45‰.

1 – агранулярные клетки (амебоциты), 2 – гранулярные клетки (эритроциты),
3 – эритроцитарные тени

Размерные характеристики гемоцитов соответствовали морфометрическим особенностям клеток, описанным в главе 3. В контрольной группе диаметр агранулоцитов составил $7,1 \pm 0,2$ мкм. Гранулярные клетки контрольной группы моллюсков были крупнее, по сравнению с агранулярными ($15,8 \pm 0,6$ мкм). Снижение солености не приводило к значительному изменению размерных характеристик агранулярных клеток, при солености 14‰ он был равен $7,8 \pm 0,2$ мкм, а при 8‰ - $7,2 \pm 0,4$ мкм (рисунок 26а). Гиперосмотические условия приводили к уменьшению диаметра амебоцитов до $6,4 \pm 0,2$ мкм при солености 35‰ ($p < 0,05$), а при повышении солености до 45‰ диаметр клеток вернулся на уровень контрольных значений и составил $7,0 \pm 0,4$ мкм.

Изменение солености не оказало влияния на диаметр гранулярных клеток (рисунок 26 б).

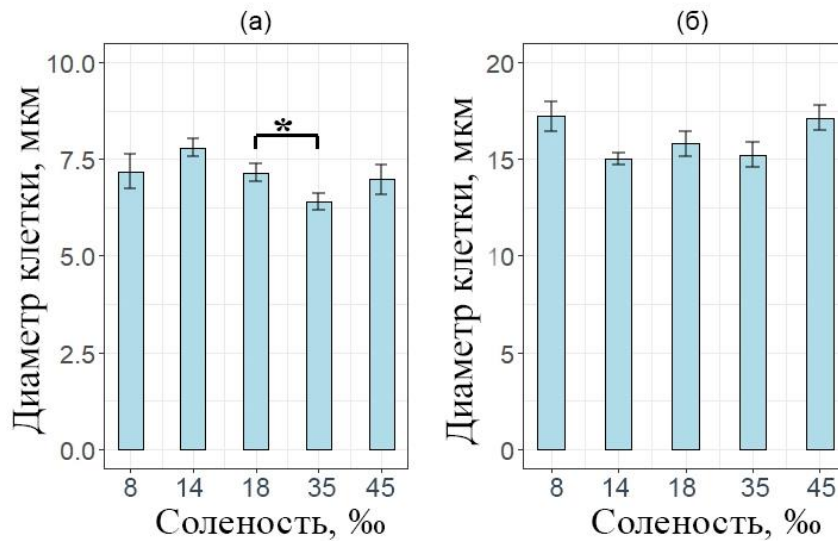


Рисунок 26 — Изменение диаметра клетки агранулярных (а) и гранулярных (б) гемоцитов после акклимации в условиях гипер- и гипоосмотической нагрузки
*-достоверно относительно контроля ($p \leq 0,05$).

Диаметр ядра агранулярных клеток контрольной группы составил $4,3 \pm 0,1$ мкм. Гипоосмотическая нагрузка не оказала влияния на размер ядер амебоцитов (рисунок 27 а). При солености 8‰ данный показатель соответствовал уровню контроля и составлял $4,4 \pm 0,1$ мкм. Снижение солености до 14‰ индуцировало увеличение диаметра ядер гранулярных клеток с $4,3 \pm 0,1$ мкм (контроль) до $4,8 \pm 0,1$ мкм ($p < 0,05$). Повышение солености привело к снижению размерных характеристик ядра агранулярных клеток (рисунок 27 а).

У группы моллюсков, инкубированных в условиях солености 35‰, диаметр ядра равен $3,7 \pm 0,1$ мкм ($p < 0,05$), а у группы 45‰ диаметр ядра статистически не отличался от контроля ($3,9 \pm 0,2$ мкм). Повышение солености до 35‰ не привело к статистически значимым различиям в размерных характеристиках диаметра ядра гранулярных клеток. Дальнейшее повышение солености сопровождалось увеличением линейных параметров данного показателя (рисунок 27 б), при 45‰ диаметр ядер гранулярных клеток был равен $4,9 \pm 0,1$ мкм ($p < 0,05$).

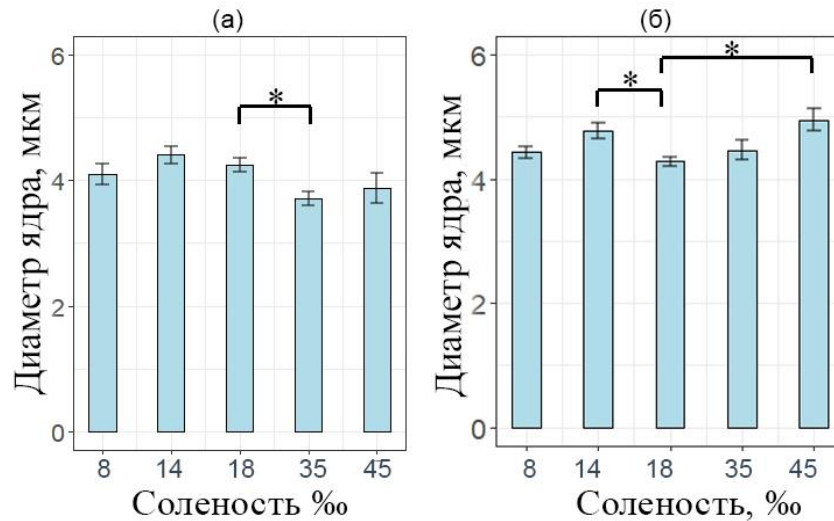


Рисунок 27 — Изменение диаметра ядер агранулярных (а) и гранулярных (б) гемоцитов анадары после воздействия гипо- и гиперосмотической нагрузки:

*-достоверно относительно контроля ($p \leq 0,05$)

Все изменения диаметра агранулярных клеток и их ядер имели, в основном, прямопропорциональную зависимость, что определило отсутствие статистически значимых изменений ЯЦО (рисунок 28 а).

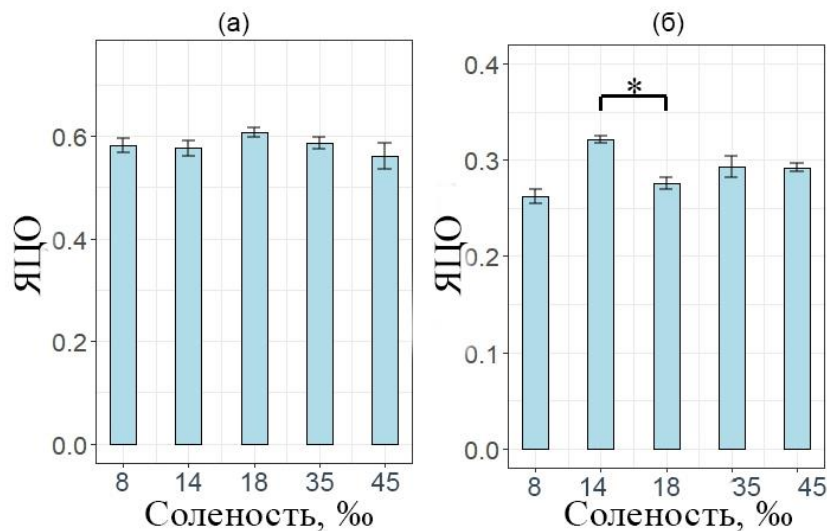


Рисунок 28 — Изменение ядерно-цитоплазматического отношения агранулярных (а) и гранулярных (б) гемоцитов анадары после гипер- и гипоосмотического стресса.

ЯЦО клеток оценивалось как отношение наибольшего диаметра ядра к наибольшему диаметру клетки без учета псевдоподий. *-достоверно относительно контроля ($p \leq 0,05$).

Вместе с тем, при снижении солености до 14‰ ЯЦО гранулярных клеток было на 17% (рисунок 28 б) выше в сравнении с уровнем контроля ($p < 0,05$). Дальнейшее снижение солености до 8 ‰ сопровождалось восстановлением данного показателя до уровня контрольных значений.

4.4 Способность гемоцитов генерировать окислительный взрыв

Снижение солености привело к увеличению общей способности гемоцитов к продукции АФК (рисунок 29).

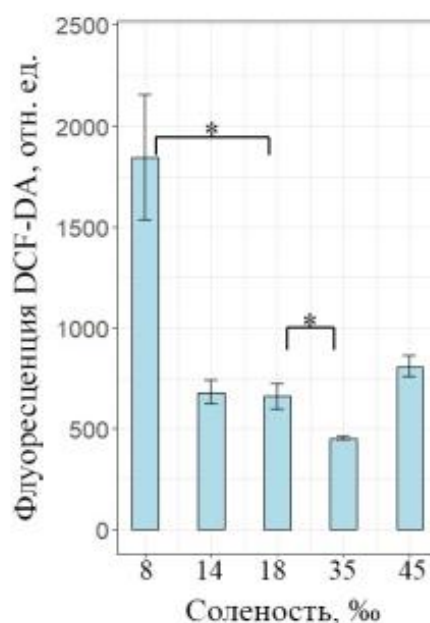


Рисунок 29 — Влияние засоления и снижения солености на общий уровень внутриклеточных АФК в гемоцитах *A. kagoshimensis*

Способность гемоцитов к спонтанной продукции АФК оценивали по флуоресценции клеток, окрашенных красителем DCF-DA. Финальная концентрация красителя в пробе составляла 10 мкмоль/л. Флуоресценция красителя анализировалась в канале FL1 (зеленая область спектра).

*-достоверно относительно контроля ($p \leq 0,05$, $n=10$).

При солёности 8‰ данный показатель был выше контрольных значений более чем в 3 раза. Повышение солёности до 35‰ привело к подавлению способности гемоцитов анадары продуцировать активные формы кислорода: общая флуоресценция DCF-DA снизилась в 1,6 раза и составила $447,5 \pm 39,1$ у.е. После повышения солёности до 45‰ общая флуоресценция DCF-DA соответствовала уровню контроля – $825,2 \pm 40,2$ у.е. Описанные закономерности были характерны как для гранулярных, так и для агранулярных гемоцитов. Вместе с тем, повышение солёности оказывало более выраженное действие на способность к продукции АФК агранулярных гемоцитов (рисунок 30).

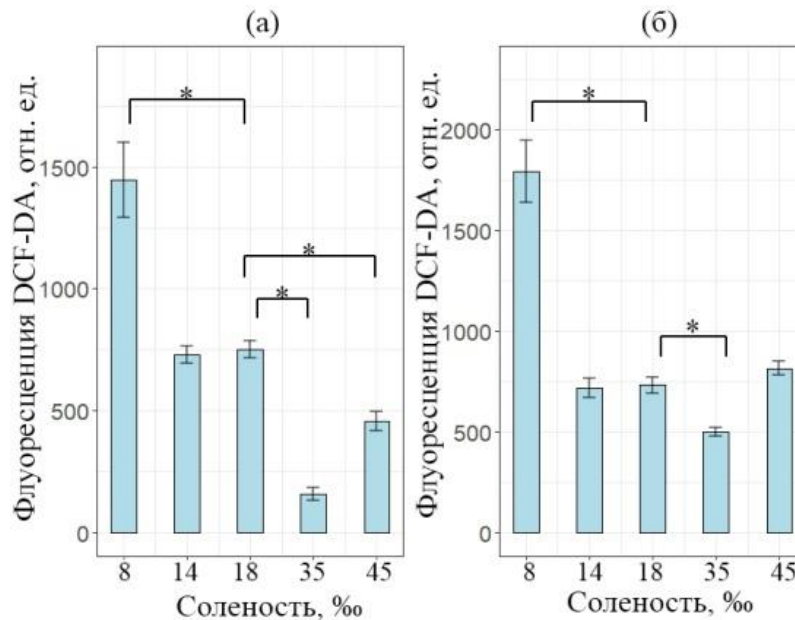


Рисунок 30 — Влияние засоления и снижения солёности на уровень внутриклеточных АФК в гемоцитах *A. kagoshimensis*:

(а) – уровень внутриклеточных АФК в агранулярных гемоцитах, (б) – уровень внутриклеточных АФК в гранулярных клетках. *-достоверно относительно контроля ($p \leq 0,05$, $n=10$).

Повышение солёности до 35‰ привело к снижению уровня флуоресценции DCF-DA агранулярных клеток более, чем в 6,5 раза ($p < 0,05$). Не смотря на значительное увеличение уровня АФК при дальнейшем повышении солёности (в 2,8 раза по сравнению с солёностью 35‰), данный показатель остался ниже

контрольных значений в 1,4 раза ($p < 0,05$). У моллюсков, содержащихся при солености 35‰, уровень флуоресценции DCF-DA гранулярных клеток снизился в 1,5 раза в сравнении с уровнем контроля ($p < 0,05$). Вместе с тем, у группы моллюсков, содержащихся при солености 45‰, данный показатель соответствовал уровню контроля.

4.5 Мембранный потенциал митохондрий

У контрольной группы моллюсков флуоресценция Rh123 была равна $124,3 \pm 15,5$ у.е. Гипоосмотическая нагрузка сопровождалась увеличением мембранного потенциала митохондрий гемоцитов анадары (рисунок 31).

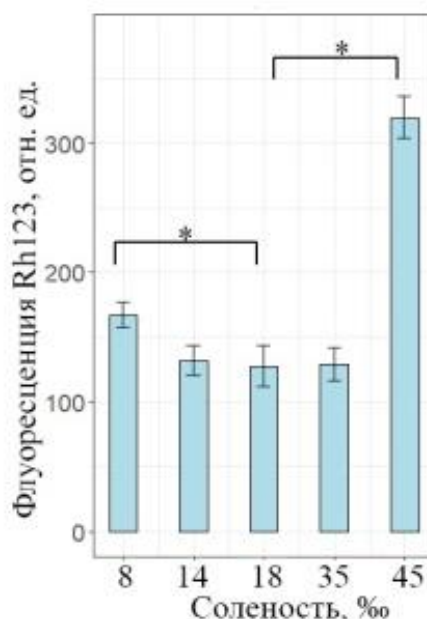


Рисунок 31 — Влияние осмотического стресса на мембранный потенциал митохондрий гемоцитов *A. kagoshimensis*, оцениваемый по флуоресценции красителя Rh123. Концентрация красителя в пробе составляла 0,1 мг/мл.

Флуоресценция красителя анализировалась в канале FL1.

*-достоверно относительно контроля ($p \leq 0,05$, $n=10$).

Наиболее выраженный эффект зафиксирован у группы моллюсков, содержащийся при солености 8‰, флуоресценция Rh123 увеличилась более, чем в 1,2 раза и составила $169,0 \pm 9,3$ у.е. Гиперосмотическая нагрузка также приводила к усилению общей флуоресценции Rh123 (рисунок 31), при солености 45‰ данный показатель составил $319,6 \pm 16,2$ у.е. Тенденция изменений общего мембранного потенциала соответствовала направлению изменений данного показателя у отдельных типов гемоцитов (рисунок 32).

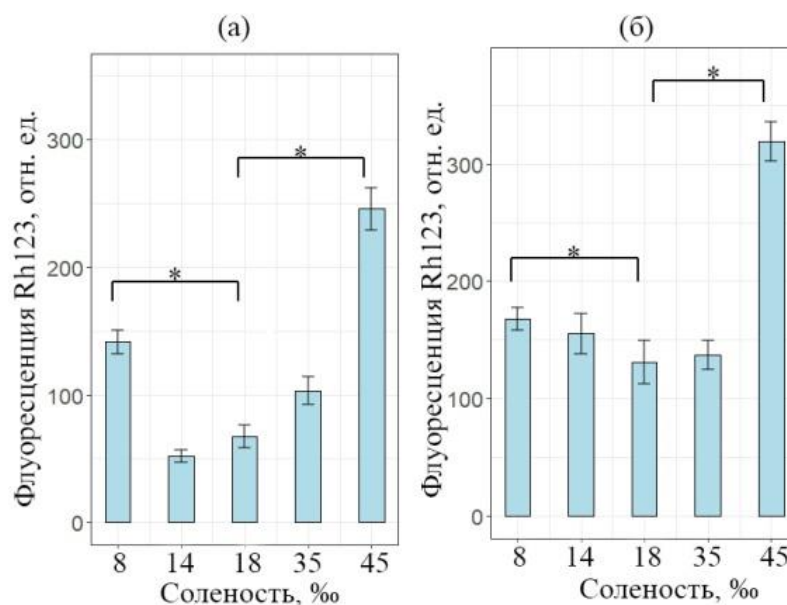


Рисунок 32— Влияние осмотического стресса на мембранный потенциал митохондрий гемоцитов *A. kagoshimensis*, оцениваемый по флуоресценции Rh123 (а) - общая флуоресценция Rh123, (б) – мембранный потенциал агранулярных клеток, (в) – мембранный потенциал гранулярных клеток.

*-достоверно относительно контроля ($p \leq 0,05$, $n=10$).

Снижение солености до 14‰ не сопровождалось изменениями интенсивности флуоресценции Rh123, дальнейшее снижение до 8‰ привело к ее увеличению в 2 раза для агранулярных (рисунок 32 а), и в 1,2 раза для гранулярных клеток (рисунок 32 б). У группы моллюсков, содержащийся при солености 35‰ мембранный потенциал митохондрий статистически не отличался от контрольной группы. Повышение солености до 45‰ привело к увеличению мембранного потенциала

митохондрий агранулярных клеток в 3,5 раза (рисунок 32 а) и в 2,2 раза – гранулярных (рисунок 32 б).

4.6 Уровень смертности клеток

Соленостный стресс, исследованный в настоящем эксперименте, не оказал существенного влияния на уровень смертности гемоцитов, изменения носили характер тенденции (рисунок 33).

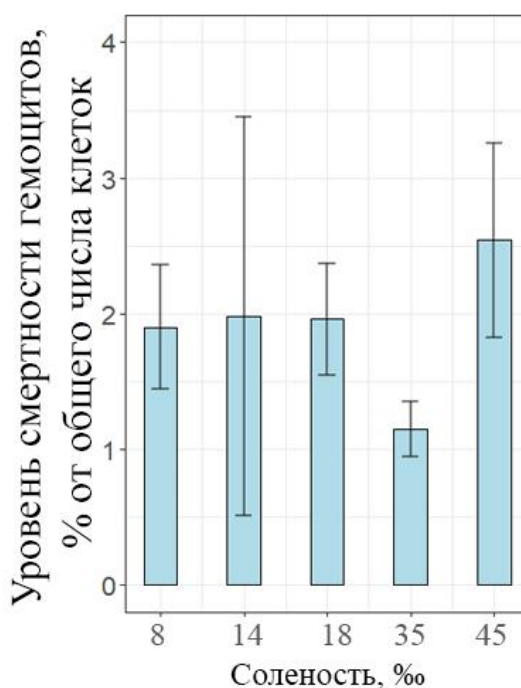


Рисунок 33 — Влияние осмотического стресса на уровень смертности гемоцитов *A. kagoshimensis*.

Уровень смертности оценивали по флуоресценции клеток, окрашенных PI

Относительное число клеток, положительных по PI, не превышало 3% от общего числа клеток. У контрольной группы моллюсков зафиксировано $2,0 \pm 0,4\%$ клеток с поврежденной мембранной. При солености 35‰ данный показатель незначительно снизился и составил $1,2 \pm 0,2\%$. Наибольший уровень смертности

гемоцитов зафиксирован при солёности 45‰ – $2,5 \pm 0,7$ % от общего числа клеток. В гипоосмотических условиях уровень солёности в среднем составил 2 %.

4.7 Обсуждение результатов исследования

Изменение солёности в настоящем эксперименте не сопровождалось гибелью двустворчатых моллюсков. 100 % выживаемость свидетельствует об акклимации анадары к непродолжительному солёностному стрессу. В естественной среде моллюски выдерживают кратковременные колебания солёности за счёт закрытия створок и сохранения постоянства осмолярности внутренней среды [160; 210; 45; 42]. Маловероятно, что в нашем исследовании отсутствие смертности объясняется акклимацией за счёт прекращения водообмена с окружающей средой, поскольку осмолярность гемолимфы всех экспериментальных групп соответствовала осмолярности морской воды, в которой содержались моллюски. Данный результат согласуется с исследованием влияния гиперосмотической нагрузки на эвригалинного моллюска *Brachidontes pharaonis* (P. Fischer, 1870). *B. pharaonis* сохранял фильтрационную активность при повышении солёности с 37 до 55 ‰ [199]. Можно предположить наличие у анадары механизмов солёностной адаптации, позволяющих сохранять водообмен с окружающей средой и выдерживать непродолжительное изменение солёности. Вместе с тем, осмотический стресс привел к ряду морфологических и функциональных характеристик гемоцитов.

В результате изменения солёности в настоящем эксперименте изменилось соотношение типов гемоцитов. Снижение доли амебоцитов может свидетельствовать об их меньшей осмотической стойкости, в сравнении с эритроцитами. С другой стороны, мы не зафиксировали увеличения уровня смертности гемоцитов. Последнее может объясняться способностью гемоцитов двустворчатых моллюсков к фагоцитозу и удалению из гемолимфы мертвых или поврежденных клеток [134].

В нашем исследовании изменение солености не оказало влияния на морфологические особенности гемоцитов. О влиянии солености на морфологические особенности гемоцитов моллюсков известно относительно мало. Было показано, что при повышении солености до 45 ‰ происходили множественные нарушения на уровне цитоскелета гемоцитов у *Haliotis rufescens* (Swainson, 1822) и *Haliotis cracherodii* (Leach, 1814). Форма клетки при этом изменялась, появлялись многочисленные ложноножки, ядро становилось ацентричным [155]. У некоторых видов двустворчатых наблюдали изменения фагоцитарной активности гемоцитов и снижение их подвижности [190; 76], что также свидетельствует о перестройке цитоскелета. Не смотря на отсутствие морфологических изменений гемоцитов, в нашем исследовании зафиксированы незначительные изменения диаметра клеток. Так, гиперосмотическая нагрузка привела к уменьшению размера агранулярных клеток при солености 35 ‰, а затем к восстановлению размера при солености 45 ‰. Адаптация к соленостному стрессу у осмоконформеров осуществляется за счет клеточных механизмов осморегуляции. Вероятно, морфометрические изменения гемоцитов *A. kagoshimensis*, наблюдаемые в настоящем эксперименте, могли быть следствием внутриклеточных перестроек, связанных с клеточной адаптацией к гиперосмотической среде. Аномальный клеточный объем может влиять на форму гемоцитов и их адгезионные свойства, и, как следствие, снижать их способность к иммунному ответу [15]. Регулирование объема клеток в гипер и гипоосмотических условиях необходимо для стабильного функционирования гемоцитов в условиях соленостного стресса. Клетки, попадающие в гиперосмотическую среду, сжимаются и активируют RVI. При попадании в гипоосмотическую среду клетки набухают, затем активируется реакция RVD. Наличие RVI и RVD у клеток двустворчатых моллюсков все еще остается предметом обсуждения [195]. В случае отсутствия у моллюсков механизмов корректировки клеточного объема, после сжатия или набухания может произойти апоптоз или лизис клеток [34]. Известно, что норадреналин может вызывать апоптоз в гемоцитах в ответ на стрессовые факторы окружающей среды, например,

изменение солености [119]. Так, гиперосмотический стресс привел к снижению общего числа гемоцитов и увеличению апоптотических клеток в гемолимфе *Haliotis discus hannai* (Ino, 1953) [253]. Данное утверждение согласуется с исследованием М. Годкен и соавторов, в котором повышение осмолярности индуцировало увеличение частоты апоптоза у *C. virginica* и *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819) [84; 213; 214].

Снижение солености до 14‰ не повлияло на мембранный потенциал митохондрий и способность к продукции АФК гемоцитами. Дальнейшее снижение солености (до 8‰), в свою очередь, индуцировало увеличение мембранного потенциала митохондрий. Согласно концепции Соколовой с соавторами [208] отсутствие изменений мембранного потенциала митохондрий характеризуется как оптимальное энергетическое состояние организма. Увеличение данного показателя свидетельствует о компенсаторном ответе и умеренном стрессе на изменения солености, а снижение характерно для физиологического угнетения. Отсутствие изменений мембранного потенциала митохондрий при солености 14‰ может характеризоваться как оптимальное состояние организма. Изменения при солености 8‰ характерны для умеренного стресса. На фоне увеличения мембранного потенциала митохондрий растет флуоресценция DCF-DA. Данное изменение закономерно, поскольку считается, что митохондрии являются основным источником АФК в гемоцитах моллюсков [207]. Способность к генерации окислительного взрыва играет ключевую роль в иммунном ответе двустворчатых моллюсков [226; 148; 79]. Вместе с тем избыточная продукция АФК, превышающая антиоксидантную защиту, приводит к окислительному повреждению клеток [48; 89; 246]. Вследствие этого, стрессовые факторы окружающей среды часто ассоциированы с повышенным риском повреждения клеток [100] и нарушениями их функций. Показано, что соленостный стресс приводит к уменьшению общего числа гемоцитов у двустворчатых моллюсков [245; 39; 241; 190; 48; 79].

Изменения, происходящие при повышении солености, также характерны для умеренного стресса. Соленость 35‰ не оказала влияния на мембранный потенциал митохондрий, вместе с тем, значительно снизилась способность гемоцитов к

генерации окислительного взрыва. Данный результат согласуется с исследованием [79], в котором не обнаружили значительной разницы в способности продукции АФК между 25 и 35 ‰. С другой стороны, гиперосмотический стресс приводил к увеличению продукции АФК гемоцитами моллюсков *Veneridae* [45]. Вероятно, в нашем исследовании снижение способности гемоцитов к генерации окислительного взрыва носит характер адаптации за счет подавления энергозатратных иммунных функций. Последнее утверждение согласуется со снижением устойчивости моллюсков к патогенам в условиях осмотического стресса [75; 190; 186; 40; 185; 79]. Дальнейшее повышение солености индуцировало увеличение мембранного потенциала митохондрий, и, как следствие, восстановлению способности гемоцитов к генерации окислительного взрыва. Следовательно, если при солености 35‰ покрытие дополнительной потребности в энергии осуществлялось за счет снижения энергетических затрат, то при повышении солености до 45‰ функция иммунного ответа не подавляется, а усиливается мембранный потенциал митохондрий.

Адаптивная реакция *A. kagoshimensis* на солевой стресс связана со сдвигами в функциональном состоянии гемоцитов. В настоящей работе мы оценили клеточный состав гемолимфы и морфологию гемоцитов анадары, подвергшейся солевому стрессу. Показано, что солевой стресс сопровождался изменением клеточного состава гемолимфы, а также влиял на форму и диаметр гемоцитов. Отмеченные изменения наблюдались на фоне усиления продукции АФК, как следствие развития окислительного стресса и повышения риска повреждения клеток. Гиперосмотические условия подавляли способности гемоцитов к генерации окислительного взрыва. В свою очередь, увеличение мембранного потенциала митохондрий в условиях гипо- и гиперосмотического стресса, свидетельствует об

умеренном соленостном стрессе. Результаты настоящей работы наглядно демонстрируют широкий адаптивный потенциал анадары к гиперосмотическому стрессу.

ГЛАВА 5 КЛЕТОЧНЫЕ РЕАКЦИИ НА ИЗМЕНЕНИЕ СОЛЕННОСТИ МОЛЛЮСКА *A. KAGOSHIMENSIS*

Клеточные механизмы, ответственные за устойчивость к изменениям солености, остаются неясными для двустворчатых моллюсков несмотря на то, что этот вопрос является критически важным для коммерчески культивируемых или перспективных для марикультуры видов. Такие виды двустворчатых моллюсков часто интродуцируют в регионы, отличающиеся от естественной среды обитания режимом солености. В настоящей главе диссертационной работы методом лазерной дифракции был проведен анализ изменения объема гемоглобинсодержащих гемоцитов анадары (*A. kagoshimensis*) после гипо- и гиперосмотической акклимации. Так же была оценена осмотическая стойкость гемоцитов у моллюсков, после инкубации в гипо- и гиперосмотических условиях.

5.1 Осмотическая стойкость клеток

Постепенное снижение осмолярности среды приводило к набуханию гемоцитов (рисунок 34). В контрольной группе максимальное набухание гемоцитов перед лизисом было равно $115,0 \pm 3,5$ % при солености $272,2 \pm 23,1$ мОсм/кг. Предварительная акклимация в гипосмотических условиях не оказала влияния на показатель максимального набухания гемоцитов. После акклимации к солености 14‰ максимальная степень набухания составила $108,3 \pm 4,9$ % (при солености $269,0 \pm 13,7$ мОсм/кг). Воздействие солености 8‰ в эксперименте *in vivo* так же не оказало существенного влияния на данный показатель. Максимальная степень набухания перед лизисом составила $111,9 \pm 4,8$ % при осмолярности

281,3±14,8 мОсм/кг. После предварительной акклимации в гиперосмотических условиях процент набухания гемоцитов перед лизисом был больше контрольных значений. В группе, инкубированной при солености 35‰, максимальная степень набухания клеток составила 180,3±4,9 % (при осмолярности 853,8±27,1 мОсм/кг), а после 45‰ – 162,3±11,3 % (при осмолярности 1011,0±16,2 мОсм/кг).

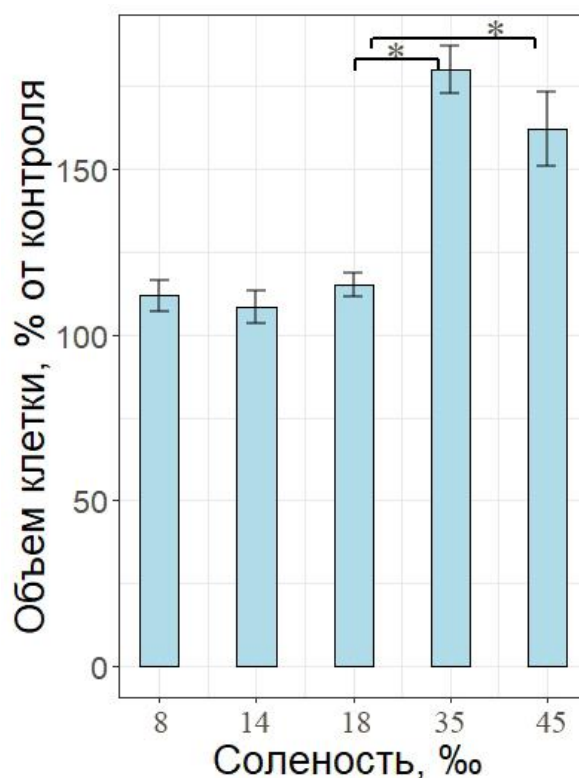


Рисунок 34 — Максимальное набухание гемоцитов перед лизисом

Максимальное набухание гемоцитов представлено в проценте от объема клеток в условиях физиологической осмолярности гемолимфы для каждой из конкретных групп. Осмолярность контролировали на каждом этапе разбавления с помощью осмометра (OsmoSpecial 1, Astori Tecnica, Италия). * - статистически значимые различия при $p < 0,05$.

Дальнейшее снижение солености приводило к постепенному лизису гемоцитов (рисунок 35). В контрольной группе Н50 (42,3±3,1 мОсм/кг) был в 11,7 раза ниже осмолярности плазмы моллюсков (493,4±1,5 мОсм/кг). Полный лизис гемоцитов анадары происходил при осмолярности 20 мОсм/кг.

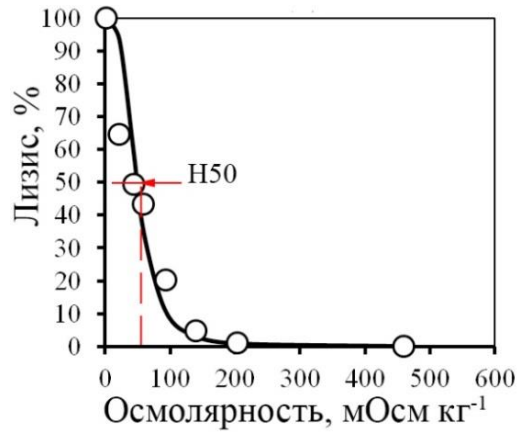


Рисунок 35 — Осмотическая стойкость гемоцитов *A. kagoshimensis*, содержащейся при солености 18‰

За контрольные условия принималась осмолярность гемолимфы 461 мОсм/кг. Красной стрелкой указана осмолярность, при которой лизировало 50% клеток

Инкубация моллюсков в гипоосмотических условиях значительно снижала осмотическую хрупкость клеток (рисунок 36), другими словами, повышала жесткость гемоцитов. H50 для моллюсков, инкубированных при солености 14‰, составил $33,2 \pm 5,0$ мОсм/кг ($p > 0,05$), а при 8‰ – $15,7 \pm 2,0$ мОсм/кг ($p < 0,05$).

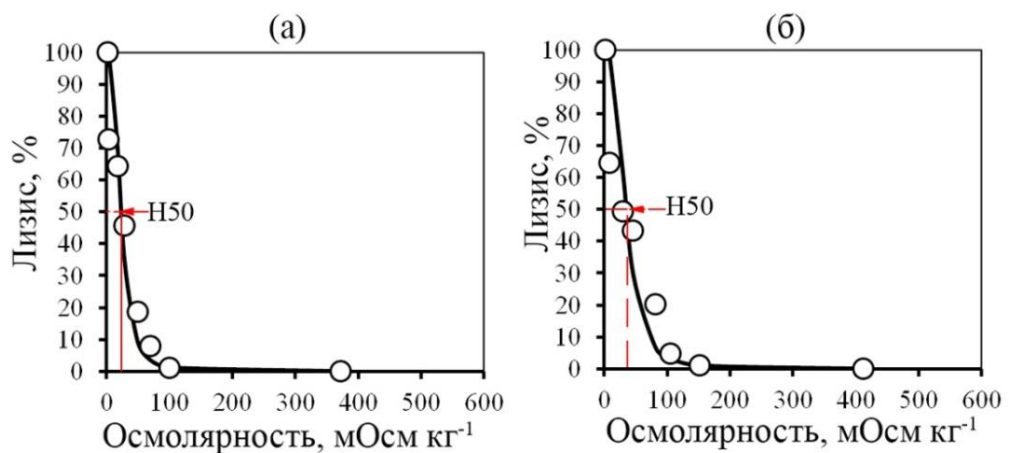


Рисунок 36 — График осмотической хрупкости гемоцитов *A. kagoshimensis* после инкубации моллюсков в условиях гипоосмотического стресса при 8‰(а) и 14‰ (б)

За контрольные условия принималась осмолярность гемолимфы моллюсков, инкубированных при солености 14‰ и 8‰ - 426 и 395 мОсм/кг, соответственно

После воздействия гиперосмотических условий (солености 35 и 45‰), гемоциты были более осмотически хрупкими (рисунок 37), в сравнении с контролем ($p < 0,05$). В экспериментальной группе, инкубированной при солености 35‰, H_{50} был равен $93,6 \pm 10,4$ мОсм/кг, а после воздействия солености 45‰ – $124,0 \pm 9,1$ мОсм/кг.

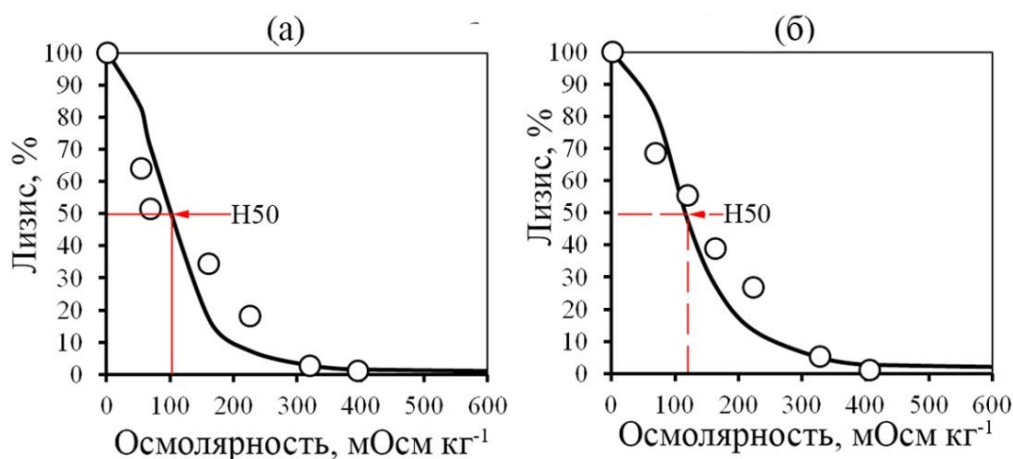


Рисунок 37 — График осмотической хрупкости гемоцитов *A. kagoshimensis* после инкубации в гиперосмотических условиях, 35‰ (а) и 45‰ (б).

За контрольные условия принималась осмолярность гемолимфы моллюсков, инкубированных при солености 35‰ и 45‰ - 1055 и 1446 мОсм/кг, соответственно

В зависимости от солености, в которой инкубировались моллюски, отличалось начало лизиса клеток и конец лизиса (рисунок 38, 39). Снижение солености до 14‰ не оказало влияния на данный показатель, H_{10} для данной группы моллюсков составил $161,8 \pm 23,3$ мОсм/кг. У моллюсков, инкубированных при солености 8‰, лизис клеток начинался при меньшей осмолярности - H_{10} был равен $77,7 \pm 19,4$ мОсм/кг. Инкубация в условиях гиперсолености приводила к началу лизиса при большей осмолярности, так H_{50} у моллюсков после воздействия солености 35‰ был равен $247,1 \pm 25,5$ мОсм/кг, а после 45‰ – $268,9 \pm 15,6$ мОсм/кг.

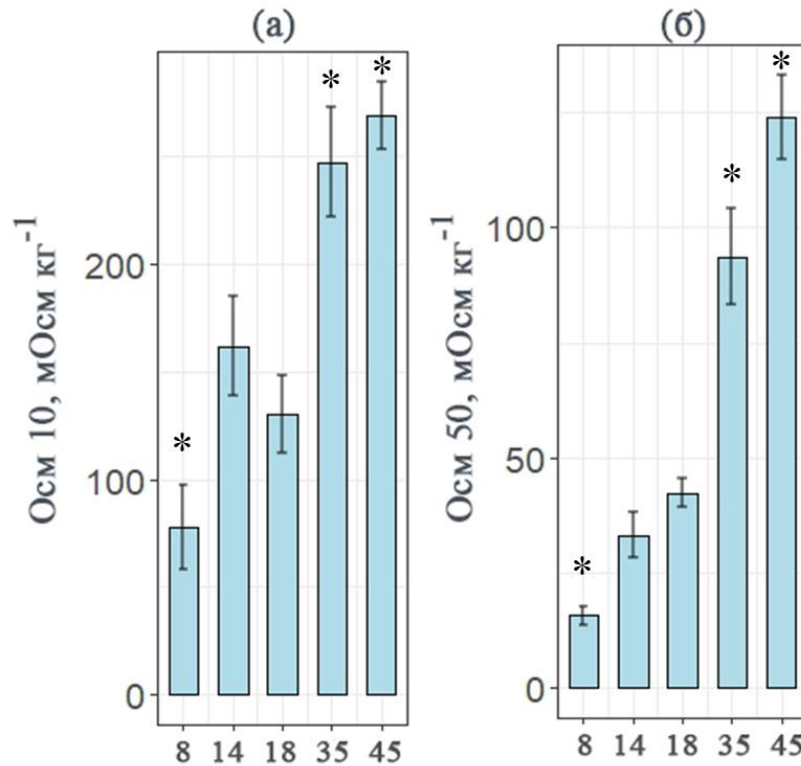


Рисунок 38 — Влияние инкубации двустворчатых моллюсков в условиях гипо- и гиперсолености на осмотическую хрупкость гемоцитов:

(а) – оценка эффектов снижения и увеличения солености в точке N10, (б) – в точке N50

* - статистически значимые различия, по сравнению с контролем, при $p < 0,05$

В контрольной группе моллюсков N90 было равно $15,4 \pm 3,3$ мОсм/кг (рисунок 39 а). Гипоосмотический стресс приводил к снижению данного показателя, при солености 14‰ он был равен $7,7 \pm 1,9$ мОсм/кг, а при 8‰ – $3,4 \pm 0,7$ мОсм/кг. Обратная тенденция наблюдалась в группе моллюсков, инкубированных в гиперосмотических условиях. После воздействия солености 35 и 45‰ N90 было равно $36,6 \pm 6,2$ мОсм/кг и $58,5 \pm 8,9$ мОсм/кг (рисунок 39 а). Вместе с тем, снижение солености в условиях *in vivo* эксперимента не оказывала статистически значимого воздействия на ширину распределения графика осмотической хрупкости (W) (рисунок 39 б). У группы моллюсков, инкубированных в гиперосмотических условиях, данный показатель был в 1,8 раза выше ($210,5 \pm 24,2$ мОсм/кг – для 35‰ и $210,4 \pm 19,9$ мОсм/кг – для 45‰), по сравнению с контролем ($114,7 \pm 20,5$ мОсм/кг).

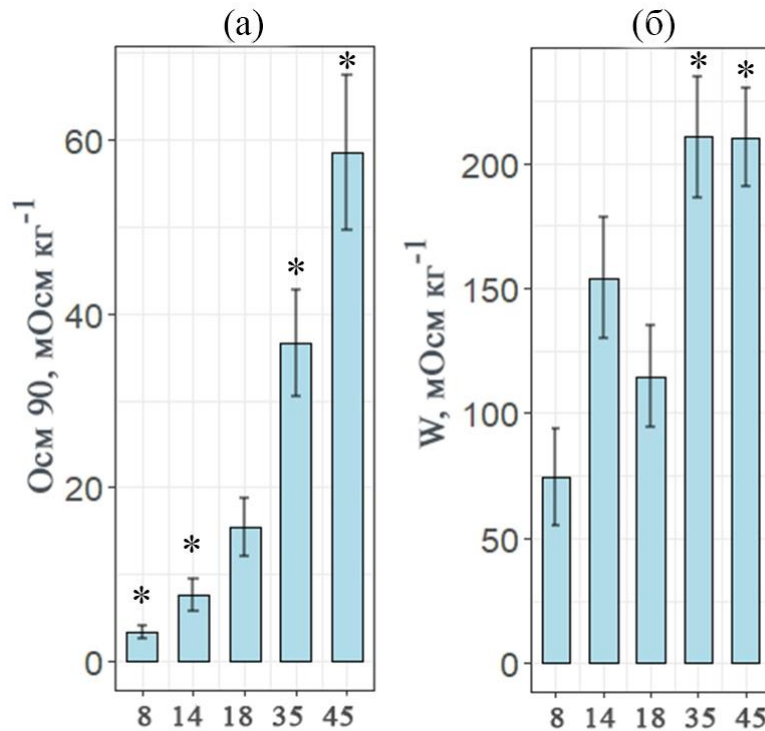


Рисунок 39 — Влияние инкубации двустворчатых моллюсков в условиях гипо- и гиперсолености на осмотическую хрупкость гемоцитов:

(а) – оценка эффектов снижения и увеличения солености

в точке Н90, (б) – оценка ширины распределения графика осмотической

хрупкости. * - статистически значимые различия, по сравнению с контролем, при $p < 0,05$

$<0,05$

5.2 Регуляторное снижение объема гемоцитов *A. kagoshimensis* в гипоосмотических условиях

На снижение осмолярности среды в экспериментальной кювете с 461 мОсм/кг (физиологическая осмолярность у моллюсков при солености 18 ‰) до 216 мОсм/кг (гипоосмотический шок) гемоциты *A. kagoshimensis* ответили быстрым набуханием и последующим снижением объема (рисунок 40). Увеличение объема гемоцитов было статистически значимо ($p < 0,05$). Максимальный размер гемоцитов был на

71,5 ± 15,2% от контроля выше исходного уровня. Затем объем клеток снизился: в конце экспериментального периода (15 минут) объем гемоцитов составил 37,3±10,5% от контроля. В конце экспериментального периода гемоциты восстановили объем более чем на 30%, изменения статистически достоверны ($p < 0,05$).

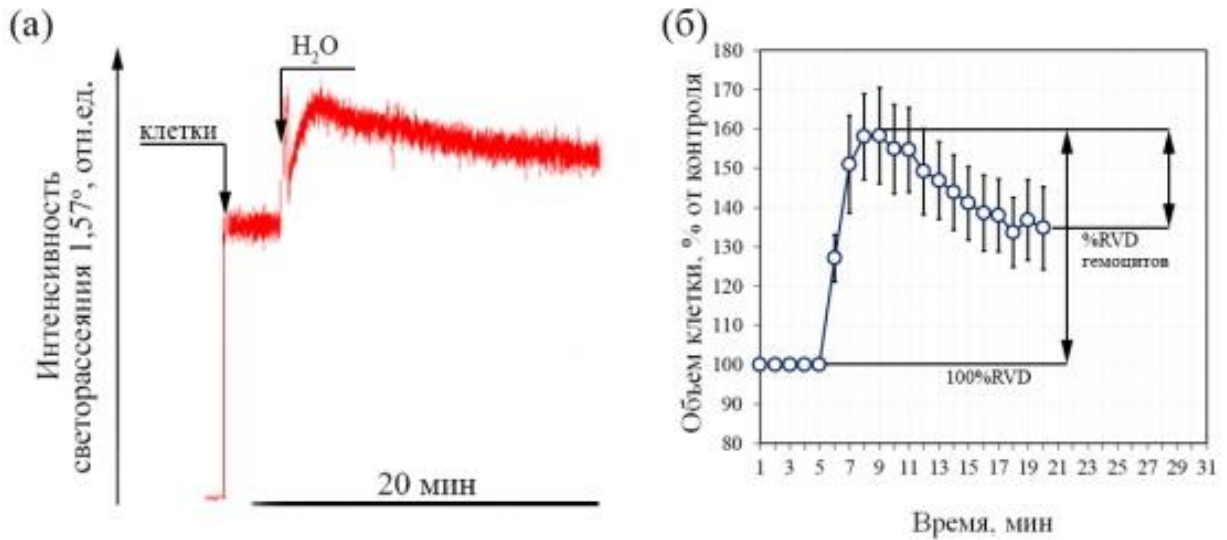


Рисунок 40 — Способность гемоцитов *A. kagoshimensis* к регуляторному снижению объема в условиях осмотического стресса:

(а) – оригинальная запись кинетики изменения объема гемоцитов, (б) – график реакции RVD гемоцитов анадары в условиях гипоосмотического стресса. Изменения объема проводили на лазерном анализаторе микрочастиц Ласка-ТМ по изменению интенсивности светорассеяния в 1,57° в течении 15 минут. Увеличение сигнала соответствует увеличению объема гемоцитов, а снижение – уменьшению их объема.

5.3 Регуляторное увеличение объема гемоцитов *A. kagoshimensis* в условиях гиперосмотической нагрузки

Увеличение осмолярности морской воды с 461 мОсм/кг (физиологическая осмолярность у моллюсков при солености 18 ‰) до 760 мОсм/кг

(гиперосмотический шок) гемоциты моллюсков ответили быстрым сжатием (рисунок 41). При максимальном сжатии размер гемоцитов составил $67,5 \pm 2,4$ % от уровня контроля.

В течение 15 минут инкубации при сохранении осмолярности на уровне 760 мОсм/кг клетки постепенно восстанавливали объем, в конце экспериментального периода размер клеток составил $79,8 \pm 4,2$ % от контроля. В течение экспериментальной экспозиции после гиперосмотической стимуляции гемоциты анадары восстановили средноклеточный объем на 15% от контроля, изменения статистически достоверны ($p < 0,05$).

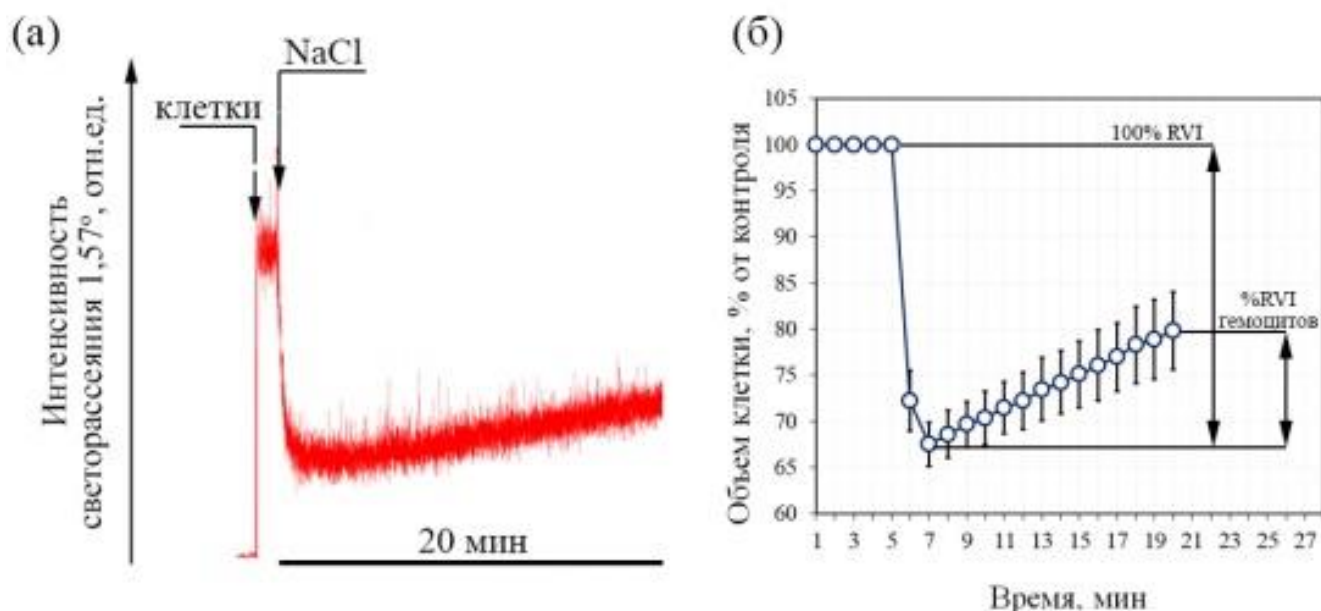


Рисунок 41 — Способность гемоцитов *A. kagoshimensis* к регуляторному увеличению объема в условиях осмотического стресса:

(а)– запись кинетики изменения объема гемоцитов, (б) – график реакции RVI гемоцитов анадары в условиях гиперосмотического стресса.

5.4 Обсуждение результатов исследования

Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что гемоциты анадары более осмотически стойкие клетки, в сравнении с эритроцитами лягушек, морских и

пресноводных рыб [15]. Физиологическая осмолярность гемолимфы анадары при солености 18 ‰ (460-500 мОсм/кг) была почти равна морской воде (461 мОсм/кг), в отличие от низших позвоночных, у которых осмолярность плазмы существенно ниже (230-290 мОсм/кг у пресноводных костистых рыб и 300-350 мОсм/кг у морских рыб) [15]. Величина H50 гемоцитов *A. kagosimensis* контрольной группы была в 10 раз ниже нормальной осмолярности гемолимфы. В то время как для эритроцитов позвоночных H50 наблюдался при снижении физиологической осмолярности примерно в 4 раза [15].

Содержание моллюсков в условиях гипо- и гиперосмотического стресса привело к сдвигу кривой осмотической стойкости клеток. Данный результат, вероятно, свидетельствует о наличии механизмов переключения стратегии соленостной адаптации. Известно, что эвригантные рыбы имеют молекулярные сенсоры, чувствительные к изменению солености, которые запускают механизмы корректировки осморегуляторной стратегии [125; 90]. К таким молекулярным сенсорам относится акцептор транскрипции осмотического стресса 1 (OSTF1), сигнальные пути фосфолипазы C (PLC) и митоген-активируемая протеинкиназа (МАРК) [125]. Исследования транскриптомов жабр *C. sinensis* и мантии двух видов мидий (*M. galloprovincialis* и *Xenostrobus securis* Lamarck, 1819) после воздействия низкой солености также подтверждает наличие осмотических сенсоров у двустворчатых моллюсков [174; 254].

Результаты нашей работы показывают, что набухание гемоцитов анадары в ответ на гипоосмотический стресс сопровождается частичным регуляторным снижением объема. Регуляция объема гемоцитов у двустворчатых моллюсков до конца не выяснена. Вместе с тем, известно, что клетки жабр способны снижать свой объем в условиях осмотического стресса [170, 228, 172]. Бреганте с соавторами предположили, что реакция RVD в гемоцитах *M. galloprovincialis* может осуществляться за счет активации K^+ - Cl^- котранспорта [37]. Многие авторы предполагают, что реакция RVD у двустворчатых моллюсков осуществляется за счет органических осмолитов, таких как таурин и бетаин [117; 228]. Вместе с тем,

Торре А. с соавторами не зафиксировали различий в спектрах ЯМР *M. galloprovincialis* между контрольной группой клеток и после инкубации в гипоосмотических условиях [228].

Согласно результатам настоящей работы, гемоциты анадары способны регулировать свой объем в условиях осмотического стресса. При повышении осмолярности гемоциты быстрее сжимаются, но при этом реакция RVI протекает медленнее, чем реакция RVD. Более низкая скорость восстановления объема в гиперосмотических условиях, в сравнении с гипоосмотическими, показана для нематоцитов *Aiptasia mutabilis* (Gravenhorst, 1831) [154]. Авторы предполагают, что различия в скорости протекания данных реакций связаны с активацией механизмов фосфорилирования при RVI [154]. Во многих клетках регуляция объема контролируется протеинкиназами, простагландинами, лейкотриенами, компонентами цитоскелета и Ca^{2+} [105]. Вместе с тем для нематоцитов *A. mutabilis* показано, что способность к RVI не зависит от содержания внешнего Ca^{2+} , в то время как после связывания внутриклеточного Ca^{2+} происходило ингибирование RVI [154].

Инкубация моллюсков в условиях соленостного стресса привела к сдвигу кривой осмотической стойкости гемоцитов. Данный результат свидетельствует о способности гемоцитов *A. kagoshimensis* изменять стратегию соленостной адаптации. В ходе эксперимента показано, что гемоциты анадары способны к частичному восстановлению клеточного объема, как в условиях гипоосмотического стресса, так и в условиях гиперосмотического стресса. Механизмы коррекции клеточного объема требуют дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа проведена с целью исследования диапазона осмотической толерантности эвригалинного двустворчатого моллюска, перспективного для марикультуры в черноморском регионе – *A. kagoshimensis*. Влияние соленостного стресса оценивали по изменениям, происходящим на уровне клеток гемолимфы – гемоцитов. На основании морфологических характеристик, размера и гранулярности цитоплазмы выделено два основных типа клеток – небольшие агранулярные клетки (амебоциты) и большие гранулярные клетки (эритроциты). Основным типом клеток в гемолимфе анадары являлись эритроциты. Как для агранулярных, так и для гранулярных гемоцитов характерна выраженная способность к генерации окислительного взрыва. Кроме этого, эритроциты анадары обладали более высоким мембранным потенциалом митохондрий. Гемоциты большинства двустворчатых моллюсков продуцируют АФК, которые участвуют в неспецифической иммунной защите, проявляя цитотоксическую активность. Наши результаты подтверждают наличие окислительной активности в гемоцитах *A. kagoshimensis*. Несмотря на то, что гранулоциты двустворчатых моллюсков считаются более эффективными в клеточном иммунном ответе по сравнению с агранулоцитами, в настоящей работе мы не наблюдали существенных различий во флуоресценции DCF-DA между типами гемоцитов. Таким образом, амебоциты, вероятно, разделяют защитные функции с эритроцитами.

Обнаружено, что снижение солености до 8 ‰ и увеличение до 45 ‰ не вызывает гибель моллюсков, но приводит к ряду характерных изменений морфофункциональных характеристик гемоцитов:

1. Происходит постепенное увеличение метаболической активности гемоцитов.
2. Изменяется способность к продукции АФК гемоцитами.
3. Предварительная акклимация в гипо- и гиперосмотических условиях приводит к сдвигу кривой осмотической стойкости гемоцитов.

4. В условиях осмотического стресса гемоциты анадары способны к восстановлению объема.

Снижение солености до 14‰ не оказало влияния на морфологические, морфометрические и функциональные параметры гемоцитов *A. kagoshimensis* (соотношение клеточных типов, способность к генерации окислительного взрыва и мембранный потенциал митохондрий). Как показали полученные результаты, наиболее выраженное влияние на исследованные показатели оказала соленость 8‰: выявлено повышение митохондриального потенциала и существенный рост уровня АФК в гемоцитах. Наблюдаемый нами рост мембранного потенциала свидетельствует об интенсификации клеточного дыхания в гемоцитах и повышении уровня энергообеспечения в этих условиях. Вероятно, гемоциты повышают ресурс энергии, обеспечивая развитие компенсаторного ответа на гипоосмотический стресс. Как отмечают Соколова с соавторами [208], в стрессовых условиях окружающей среды моллюски могут увеличивать свои энергетические затраты в качестве механизма клеточной защиты, позволяя организму успешно адаптироваться к таким условиям. Рост уровня АФК на фоне увеличения мембранного потенциала митохондрий является закономерным процессом, поскольку митохондрии считаются основным источником АФК в гемоцитах [220].

Повышение солености до 35‰ привело, в отличие от гипоосмотических условий, к подавлению способности гемоцитов анадары продуцировать АФК на фоне сохранения мембранного потенциала митохондрий. Вероятно, для поддержания нормального метаболизма нет необходимости в росте мембранного потенциала митохондрий и интенсификации обмена веществ.

С дальнейшим ростом солености до 45‰ мембранный потенциал митохондрий увеличился в несколько раз, что свидетельствует о наращивании энергии в клетке для преодоления действия гиперсоленостного стресса. Столь значительный рост мембранного потенциала митохондрий при 45‰, вероятно, способствовал стабилизации энергетического статуса анадары. Последнее утверждение подтверждается восстановлением способности гемоцитов к продукции

АФК. Вероятно, засоление среды до 45‰, в отличие от гипосоленостных условий (8‰), не вызывает у анадары выраженного стрессового состояния, о чем свидетельствует рост энергетического потенциала в гемоцитах моллюска, стабилизация уровня АФК. Вероятно, засоление среды до 45‰, в отличие от гипосоленостных условий (8‰), не вызывает у анадары выраженного стрессового состояния, о чем свидетельствует рост энергетического потенциала в гемоцитах моллюска, стабилизация уровня АФК.

Известно, что физиологический стресс как неспецифическая реакция организма возникает при действии любых неблагоприятных факторов среды, и выражается, как правило, в образовании таких АФК, как супероксидный анион и перекись водорода [112]. В частности, изменение солености как один из видов стресса, также может способствовать увеличению выработки АФК. Вместе с тем, увеличение мембранного потенциала, следовательно, и поддержание процессов аэробного метаболизма, позволяет предположить, что выявленные нами реакции в ответ на пониженную, так и повышенную соленость, являются адаптивной реакцией на осмотический стресс.

Широкий диапазон соленостной толерантности двустворчатых моллюсков обеспечивается преимущественно клеточными механизмами адаптации [120]. Так, известно, что гемоциты анадары более осмотически стойкие клетки в сравнении с эритроцитами низших позвоночных [120]. В настоящем исследовании показано, что предварительная акклимация в условиях гипоосмотического стресса приводит к сдвигу осмотической кривой в сторону жесткости гемоцитов, а гиперосмотические условия - в сторону осмотической хрупкости гемоцитов. Наряду с этим, ряд авторов считает, что условия пониженной солености приводят к дисбалансу в производстве АФК и их атаке на липидные мембраны, и, следовательно, вызывают окислительное повреждение клеток [235, 236]. Известно, кислородные радикалы способны повреждать фосфолипиды и белки, и следовательно влиять на структуру мембран [114; 139]. Именно в гипоосмотической среде нами выявлен значительный рост уровня АФК в гемоцитах. Известно, что АФК способны повреждать фосфолипиды

клеточной мембраны и белки, и, следовательно, влиять на их свойства [139; 114]. В нескольких исследованиях показано, что окислительный стресс влияет на гомеостаз катионов эритроцитов и как следствие, снижает деформируемость мембран [166]. Согласно данной теории выявленный нами окислительный стресс при солёности 8‰ должен приводить к снижению осмотической стойкости гемоцитов. Вместе с тем, в нашем исследовании увеличение уровня внутриклеточных АФК не сопровождалось увеличением хрупкости эритроцитов. H50 был в 10-12 раз ниже осмолярности гемолимфы в каждой из исследуемых групп. Кроме этого, в группе моллюсков, содержащихся в условиях низкой солёности, увеличение уровня АФК не сопровождалось снижением показателя максимального набухания перед лизисом. Следовательно, изменение показателей осмотической стойкости в нашем исследовании не связаны с окислительным стрессом. Отсутствие изменений в свойствах мембраны может объясняться нейтрализацией АФК антиоксидантной системой гемоцитов. В свою очередь, сдвиг кривой осмотической стойкости связан с изменением солёности окружающей среды, в которой инкубировались моллюски. Вероятно, гемоциты анадары способны адаптироваться к осмотическому стрессу на клеточном уровне, изменяя свойства мембраны в зависимости от солёности окружающей среды. Механизмы переключения процессов солёностной адаптации известны и хорошо исследованы для эвригалинных рыб. Эвригалинные рыбы имеют молекулярные сенсоры, чувствительные к изменению солёности, которые запускают механизмы корректировки осморегуляторной стратегии [125; 90]. Вместе с тем, в отличие от двустворчатых моллюсков, рыбы адаптируются за счёт переноса ионов в жабрах и других важных осморегуляторных органах [203]. При этом, инкубация рыб в условиях низкой солёности приводит к снижению осмотической стойкости эритроцитов [21; 12]. Способность двустворчатых моллюсков переключать механизмы солёностной адаптации слабо изучена. Вместе с тем, исследования транскриптома жабр *C. sinensis* и мантии двух видов мидий (*M. galloprovincialis* и *X. securis*) после воздействия низкой солёности также подтверждает наличие осмотических сенсоров у двустворчатых моллюсков [174; 254]. Вероятно,

организмы осмоконформеры (моллюски) имеют схожие с осморегуляторами (рыбами) молекулярные сенсоры, позволяющие переключать стратегию соленостной адаптации. Однако, в случае рыб, данные сенсоры активируют системные механизмы соленостной адаптации, а у моллюсков – клеточные.

Таким образом, в настоящей работе впервые описаны морфологические и функциональные особенности клеточных типов гемолимфы *A. kagoshimensis*. Исследованы изменения морфологических и функциональных особенностей гемоцитов после акклимации к гипо- и гиперосмотическим условиям. Впервые показано, что эластичность мембраны гемоцитов, и как следствие, их осмотическая стойкость, зависят от условий солености, в которой инкубировали моллюсков. Данный результат свидетельствует о способности изменять стратегию соленостной адаптации после предварительной акклимации в условия гипо- и гиперосмотического стресса. Кроме этого, показано, что в основе широко диапазона соленостной адаптации *A. kagoshimensis* лежат клеточные механизмы коррекции объема. Результаты настоящей работы обеспечивают основу, которая значительно расширит понимание влияния солености на функциональный статус клеток гемолимфы. Будущие исследования могут быть сосредоточены на изучении механизмов реализации RVI и RVD гемоцитами двустворчатых моллюсков.

ВЫВОДЫ

1. Выделено два основных типа клеток гемолимфы *A. kagoshimensis* – небольшие агранулярные (амебоциты) и крупные гранулярные (гемоглобин содержащие эритроциты). Гемолимфа *A. kagoshimensis* преимущественно состояла из крупных гранулярных клеток, второй тип клеток составлял менее 15%.

2. Амебоциты и эритроциты анадары обладают способностью к спонтанной продукции АФК, при этом эритроциты характеризуются более высокой интенсивностью клеточного дыхания.

3. Соленостный стресс не оказал существенного влияния на морфологические и размерные характеристики гемоцитов *A. kagoshimensis*.

4. Гипоосмотический стресс был ассоциирован с интенсификацией процессов лизиса гемоцитов *A. kagoshimensis*, на фоне развития окислительного стресса в клетках. Гиперосмотические условия среды, напротив, приводили к снижению внутриклеточной концентрации АФК в гемоцитах.

5. Снижение и повышение солености среды повышали мембранный потенциал митохондрий, что отражает усиление процессов окислительного метаболизма в гемоцитах *A. kagoshimensis*.

6. Осмотическая стойкость гемоцитов *A. kagoshimensis* зависит от солености окружающей среды. У моллюсков, адаптированных к гипоосмотическим условиям, лизис клеток происходит при более низкой осмолярности. Акклимация к гиперосмотическим условиям, напротив, снижает осмотическую стойкость клеток. Процессы лизиса клеток развиваются при более высокой осмолярности инкубационной среды.

7. Гемоциты двустворчатого моллюска *A. kagoshimensis* способны корректировать клеточный объем в условиях осмотического стресса. Нб-содержащие гемоциты реагируют на гипосмотические условия активацией ответа

RVD. Гиперосмотические условия приводят к активации ответа RVI.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

CV – коэффициент вариации

DCF-DA - 2-7-дихлорфлуоресцеин-диацетат

FL1 - зеленой область спектра, 525 нм

FSC – forward scattering channel (канал прямого светорассеивания)

H10 – точка 10% гемолиза

H50 – точка 50% гемолиза

H90 – точка 90% гемолиза

МАРК - митоген-активируемая протеинкиназа

OsHV-1 – Остридовироз герпеса

OSTF1 - акцептор транскрипции осмотического стресса 1

PI – йодистый пропидий

PLC - сигнальные пути фосфолипазы

Rh123 – родамин 123

RVD – регуляторное увеличение объема

RVI – регуляторное снижение объема

SGI - SYBR Green I

SSC – side scattering channel (канал бокового светорассеивания)

АФК – активные формы кислорода

Д_к – наибольший диаметр клетки без учета псевдоподий

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

Д_я – наибольший диаметр ядра

M1 – морфологический тип 1

M2 – морфологический тип 2

M3 – морфологический тип 3

C1 – субпопуляция 1

S2 – субпопуляция 2

СА – свободные аминокислоты

у.е. – условные единицы измерения

ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение

W – ширина распределения графика осмотической хрупкости

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жаворонкова, А. М. Характеристика аллометрического роста двустворчатого моллюска анадары (*Anadara inaequalvis*) Керченского пролива / А. М. Жаворонкова, А. П. Золотницкий // Экосистемы. – 2014. – №. 10 (29). – С. 128-133.
2. Яхонтова, И. В. Марикультура моллюсков на Черноморском побережье России / И. В. Яхонтова, Ж. Т. Дергалева // Рыбпром: технологии и оборудование для переработки водных биоресурсов. – 2008. – №. 2. – С. 45-47.
3. Abbaspour M. Investigation of lake drying attributed to climate change / M. Abbaspour, A. H. Javid, S. A. Mirbagheri, F. G. Ahmadi, P. Moghimi // International Journal of Environmental Science and Technology. — 2012. — Vol. 9 —P. 257–266. <https://doi.org/10.1007/s13762-012-0031-0>
4. Abo-Al-Ela H.G. The extent to which immunity, apoptosis and detoxification gene expression interact with 17 alpha-methyltestosterone / H.G. Abo-Al-Ela, A.F. El-nahas, S. Mahmoud, E.M. Ibrahim // Fish & shellfish immunology. – 2017. – Vol. 60. – P. 289-298. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.057>
5. Acarli S. Growth and Survival of *Anadara inaequalvis* (Bruguiere, 1789) in Sufa Lagoon, Izmir, Turkey / S. Acarli, A. Lok, S. Yigitkurt // Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh. – 2012. –Vol. 64 — Article no. 20623.
6. Aladaileh S. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function / S. Aladaileh, S.V. Nair, D. Birch, D.A. Raftos // Journal of invertebrate pathology. – 2007. – Vol. 96. – iss. 1. – P. 48-63 <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.011>
7. Aldrich K. J. Comparison of erythrocyte osmotic fragility among amphibians, reptiles, birds and mammals / K. J. Aldrich, D. K. Saunders, L. M. Sievert, G.Sievert //

Transactions of the Kansas Academy of Science. – 2006. – Vol. 109. – iss. 3. – P. 149-158
[https://doi.org/10.1660/0022-8443\(2006\)109\[149:COEOFA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1660/0022-8443(2006)109[149:COEOFA]2.0.CO;2)

8. Allam B. Immune responses to infectious diseases in bivalves / B. Allam, D. Raftos // Journal of invertebrate pathology. – 2015. – Vol. 131. – P. 121-136.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.005>

9. Amado E.M. Different abilities to regulate tissue hydration upon osmotic challenge in vitro, in the cephalopods *Octopus vulgaris* and *O. insularis* / E.M. Amado, L.R. Souza-Bastos, E.A.G. Vidal, T.S. Leite, C.A. Freire // Marine and Freshwater Behaviour and physiology. — 2015. — Vol.48. — iss. 3. — P. 205–211.
<https://doi.org/10.1080/10236244.2015.1024078>

10. Ambily Nath I. V. Diversity in transcripts and translational pattern of stress proteins in marine extremophiles / I. V. Ambily Nath, L. Bharathi // Extremophiles. — 2011 — Vol. 15 iss. 2. — P. 129-153. <https://doi.org/10.1007/s00792-010-0348-x>

11. Anderson R.S. Reactive Oxygen Species and Antimicrobial Defenses of Invertebrates: A Bivalve Model. / Ed. G. Beck, M. Sugumaran, E.L. Cooper. — Phylogenetic Perspectives on the Vertebrate Immune System. Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol 484. Springer, Boston, MA, 2001. — P. 131-139.
https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1291-2_12

12. Andreeva, A. Comparative analysis of the osmotic resistance of erythrocytes in different in the ecology Teleostei / A. Andreeva, I. Ryabtseva, I. Rudneva, V. Shaida, N. Lamash, A. Dmitrieva // Biological Communications. – 2013. – Vol. 4. – P. 3–13

13. Andreyeva A. Y. Acute hypoxic exposure: Effect on hemocyte functional parameters and antioxidant potential in gills of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* / A. Y. Andreyeva, O. L. Gostyukhina, E. S. Kladchenko, E. A. Vodiasova, E. S. Chelebieva // Marine Environmental Research. — 2021 — Vol. 169. — Article no. 105389.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105389>

14. Andreyeva A. Y. Functional Characterization of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* (Bivalvia: Ostreidae), Hemocytes Under Normoxia and Short-Term Hypoxia / A. Y. Andreyeva, E. S. Kladchenko, O. Y. Vyalova, T. A. Kukhareva // Turkish

Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. — 2021 — Vol. 21 iss. 3. — P. 125-133
https://doi.org/10.4194/1303-2712-v21_3_03

15. Andreyeva A. Y. Hypoxia inhibits the regulatory volume decrease in red blood cells of common frog (*Rana temporaria*). / A. Y. Andreyeva, E. A. Skverchinskaya, S. Gambaryan, A. A. Soldatov, I. V. Mindukshev // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology. – 2018. – Vol. 219. – P. 44-47
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.02.016>

16. Andreyeva A. Y. Morphological and functional characterization of hemocytes in cultivated mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and effect of hypoxia on hemocyte parameters / A. Y. Andreyeva, E. S. Efremova, T. A. Kukhareva // Fish and shellfish immunology. – 2019. – Vol. 89. – P. 361-367.

17. Andreyeva A. Y. Shift in functional and morphological parameters of the Pacific oyster hemocytes after exposure to hypoxia / A. Y. Andreyeva, E. S. Kladchenko, T. A. Kukhareva // Regional Studies in Marine Science. — 2021 — Vol. 48. — Article no. 102062. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.102062>

18. Anisimova A. A. Flow cytometric and light microscopic identification of hemocyte subpopulations in *Modiolus kurilensis* (Bernard, 1983)(Bivalvia: Mytilidae) / A. A. Anisimova.//Russian Journal of Marine Biology. – 2012. – Vol. 38. – iss. 5. – P. 406-415

19. Antonov J. I. Steric sea level variations during 1957–1994: Importance of salinity / J. I. Antonov, S. Levitus, T. P. Boyer // Journal of Geophysical Research: Oceans – 2002 – Vol. 107. – iss. C12 – Article no. SRF-14. <https://doi.org/10.1029/2001JC000964>

20. Aretxabaleta A. L. Regime changes in global sea surface salinity trend / A. L. Aretxabaleta, K. W. Smith, T. S. Kalra // Journal of Marine Science and Engineering — 2017 — Vol. 5 iss. 4 — Article no. 57. <https://doi.org/10.3390/jmse5040057>

21. Arihan, O. Erythrocyte fragility in pearl mullet (*Alburnus tarichi* Guldenstadt, 1814) during migration from highly alkaline water to freshwater / O. Arihan, B. Kaptaner, E. Kankaya // Fresenius Environmental Bulletin. – 2017. – Vol. 26. – iss. 3. – P. 2325-2329

22. Árnason T. Effects of salinity and temperature on growth, plasma ions, cortisol and immune parameters of juvenile *Atlantic cod* (*Gadus morhua*) / T. Árnason, B. Magnadóttir, B. Björnsson, A. Steinarsson, B. T. Björnsson // *Aquaculture* — 2013 — Vol. 380 — P. 70-79 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.11.036>
23. Bakhmet I. N. The effect of salinity change on the heart rate of *Mytilus edulis* specimens from different ecological zones / I. N. Bakhmet, V. J. Berger, V. V. Khalaman // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* — 2005 — Vol. 318 iss. 2 — P. 121-126 <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.11.023>
24. Ballantyne J. S., Chamberlin, M. E. Regulation of cellular amino acid levels / Ed. E. Strange. — In *Cellular and molecular physiology of cell volume regulation*. CRC Press, Boca Raton, 2020. — P. 111-122. <https://doi.org/10.1201/9780367812140>
25. Balushkina E. V. Effect of abiotic and biotic factors on the structural and functional organization of the saline lake ecosystems / E. V. Balushkina, S. M. Golubkov, M. S. Golubkov, L. F. Litvinchuk N. V. Shadrin // *Zhurnal Obshchei Biologii* — 2009 — Vol. 70 — P. 504–514
26. Bamber S. D. Does sustained tolerance of reduced salinity seawater alter phagocytosis efficiency in haemocytes of the blue mussel *Mytilus edulis* (L.)? / S. D. Bamber // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. — 2018. — Vol. 500. — P. 132-139. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2017.07.006>
27. Bayne C. J. Hemolymph functions in *Mytilus californianus*: the cytochemistry of hemocytes and their responses to foreign implants and hemolymph factors in phagocytosis / C. J. Bayne, M. N. Moore, T. H. Carefoot, R. J. Thompson // *Journal of Invertebrate Pathology*. — 1979. — Vol. 34. — iss. 1. — P. 1-20 [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(79\)90048-X](https://doi.org/10.1016/0022-2011(79)90048-X)
28. Berger V. J. Mechanisms of salinity adaptations in marine molluscs / V. J. Berger, A. D. Kharazova // *Interactions and adaptation strategies of marine organisms*. — Springer, Dordrecht. — 1997. — P. 115-126 https://doi.org/10.1007/978-94-017-1907-0_12
29. Bertrand C. Eco-physiological responses to salinity changes across the freshwater-marine continuum on two euryhaline bivalves: *Corbicula fluminea* and

Scrobicularia plana / C. Bertrand, S. Devin, C. Mouneyrac, L. Giambérini // *Ecological Indicators* — 2017. — Vol. 74. — P. 334-342.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.11.029>

30. Birnie-Gauvin K. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review / K. Birnie- Gauvin, , D. Costantini, , S. J. Cooke, , W. G. Willmore // *Fish and Fisheries* — 2017. — Vol. 18. iss. 5 — P. 928-942
<https://doi.org/10.1111/faf.12215>

31. Birrer S. C. Salinity change impairs pipefish immune defence / S. C. Birrer, T. B. Reusch, O. Roth // *Fish and shellfish immunology* — 2012 — Vol. 33 iss. 6 — P. 1238-1248 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.028>

32. Bitoun M. Gene expression of taurine transporter and taurine biosynthetic enzymes in hyperosmotic states / M. Bitoun, M. Tappaz // *Advances in Experimental Medicine and Biology* — 2000. — Vol. 483. — P. 239– 248. https://doi.org/10.1007/0-306-46838-7_26

33. Bonzi L. C. The time course of molecular acclimation to seawater in a euryhaline fish / L. C. Bonzi, A. A. Monroe, R. Lehmann, M. L. Berumen, T. Ravasi, C. Schunter // *Scientific reports* — 2021. — Vol. 11 iss. 1 — P. 1-16.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-97295-3>

34. Bortner C. D. Ions, the movement of water and the apoptotic volume decrease / C. D. Bortner, J. A. Cidlowski // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2020. — Vol. 8. — Article no. 1415 <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.611211>

35. Boyer T. P. Linear trends in salinity for the World Ocean, 1955-1998 / T. P. Boyer, S. Levitus, J. I. Antonov, R. A. Locarnini, H. E. Garcia // *Geophysical Research Letters* — 2005. — Vol. 32 iss. 1. — Article no. L01604.
<https://doi.org/10.1029/2004GL021791>

36. Braby C. E. Following the heart: temperature and salinity effects on heart rate in native and invasive species of blue mussels (genus *Mytilus*). / C. E. Braby, G. N. Somero // *Journal of Experimental Biology* — 2006. — Vol. 209 iss. 13 — P. 2554-2566.
<https://doi.org/10.1242/jeb.02259>

37. Bregante M. Osmoregulated chloride currents in Hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* / M. Bregante, , A. Carpaneto, , V. Piazza, F. Sbrana, M. Vassalli, M. Faimali, F. Gambale //Plos one. – 2016. – Vol. 11. – iss. 12. — Article no. e0167972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167972>
38. Burg M. B. Cellular response to hyperosmotic stresses / M. B. Burg, J. D. Ferraris, N. I. Dmitrieva, // Physiological reviews — 2007 — Vol. 87 iss. 4 — P. 1441-1474. <https://doi.org/10.1152/physrev.00056.2006>
39. Bussell J. A. Changes in the immune response and metabolic fingerprint of the mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus) in response to lowered salinity and physical stress / J. A. Bussell, E. A. Gidman, D. R. Causton, D. Gwynn-Jones, S. K. Malham, M. L. M. Jones, R. Seed // 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>
40. Butt D. Immunosuppression in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*) and QX disease in the Hawkesbury River, Sydney / D. Butt, D. Raftos // Marine and Freshwater Research. — 2007. — Vol. 58. — iss. 2. — P. 213-221. <https://doi.org/10.1071/MF06080>
41. Cañedo-Argüelles M. Salinisation of rivers: an urgent ecological issue / M. Canedo-Argüelles, B. J. Kefford, C. Piscart, N. Prat, R.B. Schäfer, C. J. Schulz //Environmental pollution. — 2013. — Vol. 173. — P. 157-167. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.10.011>
42. Cao F. Study on adaptability of juveniles of *Meretrix meretrix* Linnaeus to salinity / F. Cao, Z. Liu, L. Jie // Bulletin of Marine Science — 2010 — Vol. 29 — P. 156–160
43. Carballal M. J. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis* / M. J. Carballal, C. López, C. Azevedo, A. Villalba // Journal of invertebrate pathology. — 1997. — Vol. 70. — iss. 2. — C. 96-105 <https://doi.org/10.1006/jipa.1997.4670>
44. Carrasco N. K. Development of a halotolerant community in the St. Lucia Estuary (South Africa) during a hypersaline phase / N. K. Carrasco, R. Perissinotto //

PLoS ONE — 2012 — Vol. 7 — Article no. e29927.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029927>

45. Carregosa V. Physiological and biochemical responses of three *Veneridae* clams exposed to salinity changes / V. Carregosa, C. Velez, A. M. Soares, E. Figueira, R. Freitas // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 2014. – Vol. 177. – P. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.08.001>

46. Castellano G. C. Maintenance of ionic gradients and tissue hydration in the intertidal sea cucumber *Holothuria grisea* under hypo- and hyper-salinity challenges / G. C. Castellano, I. A. Santos, C. A. Freire // *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. — 2018. — Vol. 98. — iss. 2. — P. 325-332. <https://doi.org/10.1017/S0025315416001314>

47. Castellano G. C. Volume regulation of intestinal cells of echinoderms: putative role of ion transporters (Na⁺/K⁺-ATPase and NKCC) / G. C. Castellano, M. M. Souza, C. A. Freire // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* — 2016 — Vol. 201 — P. 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.07.006>

48. Cheng W. The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels / W. Cheng, F. M. Juang, J. C. Chen, // *Fish and shellfish immunology* — 2004 — Vol. 16. — iss. 3 — P. 295-306 [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(03\)00111-6](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(03)00111-6)

49. Christensen O. B. Intensification of extreme European summer precipitation in a warmer climate / O. B. Christensen, J. H. Christensen // *Global and Planetary Change*. – 2004. – Vol. 44. – iss. 1-4. – P. 107-117. <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2004.06.013>

50. Cossins A. R. Volume-sensitive transport systems and volume homeostasis in vertebrate red blood cells / A. R. Cossins, J. S. Gibson // *The Journal of experimental biology*. — 1997. — Vol. 200. — iss. 2 — P. 343-352. <https://doi.org/10.1242/jeb.200.2.343>

51. Cravatte S. Observed freshening and warming of the western Pacific warm pool / S. Cravatte, T. Delcroix, D. Zhang, M. McPhaden, J. Leloup // *Climate Dynamics* — 2009 — Vol. 33. — iss. 4 — 565-589. <https://doi.org/10.1007/s00382-009-0526-7>

52. Curry R. A change in the freshwater balance of the Atlantic Ocean over the past four decades / R. Curry, B. Dickson, I. Yashayaev // *Nature* — 2003 — Vol. 426. — iss. 6968 — P. 826-829. <https://doi.org/10.1038/nature02206>

53. Dang C. Effect of a hemiuroid trematode on the hemocyte immune parameters of the cockle *Anadara trapezia* / C. Dang, T. H. Cribb, G. Osborne, M. Kawasaki, A. S. Bedin, A. C. Barnes // *Fish and shellfish immunology*. — 2013. — Vol. 35. — iss. 3. — P. 951-956. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.010>

54. Dasgupta S. The impact of aquatic salinization on fish habitats and poor communities in a changing climate: evidence from southwest coastal Bangladesh / S. Dasgupta, M. Huq, M. G. Mustafa, M. I. Sobhan, D. Wheeler // *Ecological Economics* — 2017. — Vol. 139 — P. 128-139. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2017.04.009>

55. Deaton L.E. Osmotic and ionic regulation in molluscs / Ed. D. H. Evans — *Osmotic and Ionic Regulation: Cells and Animals*, CRC Press, Boca Raton, —2008. — P. 107–133. <https://doi.org/10.1201/9780849380525>

56. Des M. Modeling salinity drop in estuarine areas under extreme precipitation events within a context of climate change: Effect on bivalve mortality in Galician Rías Baixas / M.Des, D. Fernández-Nóvoa, M. deCastro, J. L. Gómez-Gesteira, M. C. Sousa, M. Gómez-Gesteira // *Science of the Total Environment*, — 2021 — Vol. 790 — Article no. 148147. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148147>

57. Dhabhar F.S. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection versus immunopathology / F.S. Dhabhar // *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*— 2008. — Vol. 4. — iss. 1 — P. 2–11. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-4-1-2>

58. Dinh H. Q. Fotedar, R. Early development of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) cultured in potassium-fortified inland saline water / H. Q. Dinh, R.

Fotedar, // Aquaculture —2016 — Vol. 452 — P. 373–379
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.025>

59. Donaghy L. Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis* / L. Donaghy, B. K. Kim, H. K. Hong, H. S. Park, K. S. Choi // Fish and shellfish immunology — 2009 — Vol. 27. — iss. 2 — P. 296-301 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.05.010>

60. Donaghy L. Functional and metabolic characterization of hemocytes of the green mussel, *Perna viridis*: in vitro impacts of temperature / L. Donaghy, A. K. Volety // Fish and shellfish immunology — 2011 — Vol. 31. — iss. 6 — P. 808-814 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.07.018>

61. Donaghy L. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*R. philippinarum*): current knowledge and future prospects / L. Donaghy, C. Lambert, K. S. Choi P. Soudant // Aquaculture — 2009. — Vol. 297. — iss. 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.09.003>

62. Donaghy L. The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs / L. Donaghy, H. K. Hong, C. Jauzein, K. S. Choi // Fish and shellfish immunology — 2015. — Vol. 42. — iss. 1 — P. 91-97 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.030>

63. Donaghy L., Artigaud, S., Sussarellu, R., Lambert, C., Le Goïc, N., Hégaret, H., Soudant, P. Tolerance of bivalve mollusc hemocytes to variable oxygen availability: a mitochondrial origin? / L. Donaghy, S. Artigaud, R. Sussarellu, C. Lambert, N. Le Goïc, H. Hégaret, P. Soudant // Aquatic Living Resources — 2013 — Vol. 26. — iss. 3 — P. 257-261. <https://doi.org/10.1051/alr/2013054>

64. Doupé R. G. Rethinking the land: the development of inland saline aquaculture in Western Australia / R. G. Doupé, A. J. Lymbery, M. R. Starcevich // International Journal of Agricultural Sustainability — 2003 — Vol. 1. — iss. 1 — P. 30-37. <https://doi.org/10.3763/ijas.2003.0104>

65. Durack P. J. Fifty-year trends in global ocean salinities and their relationship to broad-scale warming / P. J. Durack, S. E. Wijffels // *Journal of Climate* — 2010 — Vol. 23. — iss. 16 — P. 4342-4362 <https://doi.org/10.1175/2010JCLI3377.1>
66. El Nahas A.F. Impaired antioxidant gene expression by pesticide residues and its relation with other cellular biomarkers in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Lake Burullus / El A.F. Nahas, M.A.S. Abdel-Razek, N.M. Helmy, S. Mahmoud, H.A. Ghazy // *Ecotoxicology and environmental safety* — 2017 — Vol. 137 —P. 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.12.006>
67. Elsaid K. Environmental impact of desalination technologies: A review/ K. Elsaid, M. Kamil, E. T. Sayed, M. A. Abdelkareem, T. Wilberforce, A. Olabi // *Science of The Total Environment* — 2020 — Vol. P. 748 — Article no. 141528 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141528>
68. Evans D. H. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys / D. H. Evans // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* — 2008 — Vol. 295. — iss. 2 — P. 704-713. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90337.2008>
69. Evans D. H. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste / D. H. Evans, P. M. Piermarini, K. P. Choe // *Physiological reviews* — 2005 — Vol. 85 – iss 1 — P. 97-177. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2003>
70. Fonseca V. B. Morphological characterization of hemocytes of the brown mussel *Perna perna*: An update / V. B. Fonseca, B. P. Cruz, S. S. da Silva, M. P. Soares, A. D. Cañedo, M. A. Vargas, J. Z. Sandrini // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2022. – Vol. 120. – P. 139-141 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.11.030>
71. Foster C. Do osmoregulators have lower capacity of muscle water regulation than osmoconformers? A study on decapod crustaceans / C. Foster, E. M. Amado, M. M. Souza, C. A. Freire, // *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* — 2010. — Vol. 313. —iss. 2 — P. 80-94 <https://doi.org/10.1002/jez.575>

72. Freire C. A. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity / C. A. Freire, E. M. Amado, L. R. Souza, M. P. Veiga, J. R. Vitule, M. M. Souza, V. Prodocimo // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* — 2008 — Vol. 149 iss. 4 — P. 435-446 <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.02.003>

73. Freitas R. Effects of seawater acidification and salinity alterations on metabolic, osmoregulation and oxidative stress markers in *Mytilus galloprovincialis* / R. Freitas, L. De Marchi, M. Bastos, A. Moreira, C. Velez, S. Chiesa, A. M. Soares // *Ecological Indicators* — 2017. — Vol. 79 — P. 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.04.003>

74. Fugelli K., Riersen, L. O. Volume regulation in flounder erythrocytes. The effect of osmolality on taurine influx / Ed. C. B. Jorgensen, E. Skadhauge — *Osmotic and Volume Regulation*. Copenhagen. 1978 — P. 418– 432.

75. Fuhrmann M. Salinity influences disease-induced mortality of the oyster *Crassostrea gigas* and infectivity of the ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) / M. Fuhrmann, B. Petton, V. Quillien, N. Faury, B. Morga, F. Pernet, // *Aquaculture Environment Interactions*. – 2016. – Vol. 8. – P. 543-552. <https://doi.org/10.3354/aei00197>

76. Gagnaire B. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) / B. Gagnaire, H. Frouin, K. Moreau, H. Thomas-Guyon, T. Renault // *Fish and shellfish immunology* — 2006 — Vol. 20 iss. 4 — P. 536-547 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.07.003>

77. Gagnaire B. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry / B. Gagnaire, H. Thomas-Guyon, T. Burgeot, T. Renault // *Cell biology and toxicology* — 2006b — Vol. 22 — P. 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10565-006-0011-6>

78. Gain A. K. Impact of river salinity on fish diversity in the south-west coastal region of Bangladesh / A. K. Gain, M. N. Uddin, P. Sana. *International Journal of Ecology and Environmental Sciences* — 2008 — Vol. 34 iss. 1. - P. 49-54.

79. Gajbhiye D. S. Immune response of the short neck clam *Paphia malabarica* to salinity stress using flow cytometry / D. S. Gajbhiye, L. Khandeparker // Marine environmental research — 2017 — Vol. 129 — 14-23. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.04.009>

80. Gao R. Effects of salinity on the growth and survival of larvae and spats of *Coelomactra antiquata* (Spengler) / R. Gao, Q. Qi, // Journal of Fujian Teachers University (Natural science) — 1995 — Vol. 11 — P. 82–88

81. Gauthier J. D. A parasitological survey of oysters along salinity gradients in coastal Louisiana / J. D. Gauthier, T. M. Soniat, J. S. Rogers // Journal of the World Aquaculture Society — 1990. — Vol. 21. — iss. 2 — P. 105-115 <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1990.tb00530.x>

82. Ghazy H. A. Assessment of complex water pollution with heavy metals and Pyrethroid pesticides on transcript levels of metallothionein and immune related genes / H. A. Ghazy, M. A. Abdel-Razek, A. F. El Nahas, S. Mahmoud // Fish and Shellfish Immunology — 2017. — Vol. 68 — P. 318-326 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.034>

83. Gibson J. S., Cossins A. R., Ellory J. C. Oxygen-sensitive membrane transporters in vertebrate red cells / J. S. Gibson, A. R. Cossins, J. C. Ellory // Journal of Experimental Biology — 2000. — Vol. 203. — iss. 9 — P. 1395-1407 <https://doi.org/10.1242/jeb.203.9.1395>

84. Goedken M. The effects of temperature and salinity on apoptosis of *Crassostrea virginica* hemocytes and *Perkinsus marinus* / M. Goedken, B. Morsey, I. Sunila, C. Dungan, S. De Guise // Journal of Shellfish Research. — 2005. — Vol. 24. — iss. 1. — P. 177-183 [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[177:TEOTAS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[177:TEOTAS]2.0.CO;2)

85. Gonçalves A. M. M. Salinity effects on survival and life history of two freshwater cladocerans (*Daphnia magna* and *Daphnia longispina*) / A.M.M. Gonçalves, B. B. Castro, M. A. Pardal, F. Gonçalves // Annales De Limnologie-International Journal of Limnology. — EDP Sciences, 2007. — Vol. 43. — iss. 1. — P. 13-20. <https://doi.org/10.1051/limn/2007022>

86. Gonçalves A. M. M. The biochemical response of two commercial bivalve species to exposure to strong salinity changes illustrated by selected biomarkers / A.M. M.Gonçalves, D. V. Barroso, T. L. Serafim, T. Verdelhos, J. C. Marques, F. Gonçalves // *Ecological Indicators*. — 2017. — Vol. 77 — P. 59-66 <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.01.020>

87. Gonçalves A.M.M. Salinity effects on survival and life history of two freshwater cladocerans (*Daphnia magna* and *Daphnia longispina*) / A.M.M. Gonçalves, B.B. Castro, M.A. Pardal, F. Gonçalves // *Annales De Limnologie-International Journal of Limnology*. — EDP Sciences — 2007 — Vol. 43. — iss. 1 — P. 13-20. <https://doi.org/10.1051/limn:2007022>

88. Gonzalez R. J. The physiology of hyper-salinity tolerance in teleost fish: a review / R. J. Gonzalez // *Journal of Comparative Physiology B*. — 2012. — Vol. 182. — iss. 3 — P. 321-329 <https://doi.org/10.1007/s00360-011-0624-9>

89. Gu H. Microplastics aggravate the adverse effects of BDE-47 on physiological and defense performance in mussels / H. Gu, , S. Wei, , M. Hu, , H. Wei, X. Wang, Y. Shang, Y. Wang // *Journal of Hazardous Materials*. — 2020 — Vol. 398 — Article no. 122909. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122909>

90. Gui L. Adaptive responses to osmotic stress in kidney-derived cell lines from *Scatophagus argus*, a euryhaline fish / L. Gui, P. Zhang, X. Liang, M. Su, D. Wu, J. Zhang // *Gene*. — 2016. — Vol. 583. — iss. 2. — P. 134-140. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.02.026>

91. Guzmán-Agüero J. E. Feeding physiology and scope for growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) acclimated to different conditions of temperature and salinity / J. E. Guzmán-Agüero, M. Nieves-Soto, M. Á. Hurtado, P. Piña-Valdez, M. D. C. Garza-Aguirre // *Aquaculture International*. — 2013. — Vol. 21. — iss. 2. — P. 283-297. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9550-4>

92. Haider F. Interactive effects of osmotic stress and burrowing activity on protein metabolism and muscle capacity in the soft shell clam *Mya arenaria* / F. Haider, E. P. Sokolov, S. Timmd, M. Hagemann, E. Blanco Rayon, I. Marigomez, U. Izagirre, I. M.

Sokolova // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology — 2019 — Vol. 228 — P. 81-93. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.10.022>

93. Hale R. E. Evidence that context-dependent mate choice for parental care mirrors benefits to offspring / R. E. Hale // *Animal behaviour* — 2008. — Vol. 75. — iss. 4 — P. 1283-1290. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2007.09.034>

94. Hallett C. S. Observed and predicted impacts of climate change on the estuaries of south-western Australia, a Mediterranean climate region / C.S. Hallett, A.J. Hobday, J. R. Tweedley, P. A. Thompson, K. McMahon, F. J. Valesini // *Regional Environmental Change*. — 2018. — Vol. 18. — iss. 5. — P. 1357-1373. <https://doi.org/10.1007/s10113-017-1264-8>

95. Hameed A., Morphological and structural characterization of blood cells of *Anadara antiquate* / A. Hameed, F. Muhammad, A. A. Muhammad, M. Shafi, R. Sultana // *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. — 2018. — Vol. 17. — iss. 3. — P. 613-619. <https://dx.doi.org/10.22092/ijfs.2018.119523>.

96. Hassan AM Thermal stress of ambient temperature modulate expression of stress and immune-related genes and DNA fragmentation in *Nile tilapia* (*Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)) / A.M. Hassan, A.F. El Nahas, S. Mahmoud, M.E. Barakat, A.Y. Ammar // *Applied Ecology and Environmental Research* — 2017. — Vol. 15. iss. 3. — P. 1343-1354 https://doi.org/10.15666/aeer/1503_13431354

97. Hauton C. The effects of salinity on the interaction between a pathogen (*Listonella anguillarum*) and components of a host (*Ostrea edulis*) immune system / C. Hauton, L.E. Hawkins, S. Hutchinson // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* — 2000. — Vol. 127. — iss. 2 — P. 203-212. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(00\)00251-0](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(00)00251-0)

98. Hégaret H. 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 / H. Hégaret, G. H. Wikfors, P. Soudant // *Journal of experimental marine biology and ecology*. — 2003. — Vol. 293. — iss. 2. — C. 249-265. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00235-1)

99. Heise K. Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress / K. Heise, S. Puntarulo, H. O. Pörtner, D. Abele // *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)

100. Hermes-Lima M. Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: revisiting the proposal two decades later / M. Hermes-Lima, D. C. Moreira, G. A. Rivera-Ingraham, M. Giraud-Billoud, T. C. Genaro-Mattos, É. G. Campos, // *Free Radical Biology and Medicine*. — 2015. — Vol. 89. — P. 1122-1143.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.156>

101. Hernández-Méndez L. S. Hemocyte cell types of the Cortes Geoduck, *Panopea globosa* (Dall 1898), from the Gulf of California / L. S. Hernández-Méndez, E. Castro-Longoria, C. L. Araujo-Palomares, Z. García-Esquivel, S. Castellanos-Martínez // *Fish and Shellfish Immunology*. — 2020. — Vol. 100. — P. 230-237.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.013>

102. Hine P. M. The inter-relationships of bivalve haemocytes / P. M. Hine // *Fish and Shellfish Immunology*. — 1999. — Vol. 9. — iss. 5. — P. 367-385.
<https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0205>

103. Hinzmann M. Identification of distinct haemocyte populations from the freshwater bivalves swan mussel (*Anodonta cygnea*) and duck mussel (*Anodonta anatina*) using wheat-germ agglutinin / M. Hinzmann, M. Lopes-Lima, F. Cerca, A. Correia, J. Machado, M. Vilanova // *Canadian Journal of Zoology*. — 2017. — Vol. 95. — iss. 12. — P. 937-947.

104. Hoegh-Guldberg O. Securing a long-term future for coral reefs / O. Hoegh-Guldberg, E. V. Kennedy, H. L. Beyer, C. McClennen, H. P. Possingham // *Trends in Ecology and Evolution*. — 2018. — Vol. 33. — iss. 12. — P. 936-944.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2018.09.006>

105. Hoffmann E. K. Cell volume homeostatic mechanisms: effectors and signalling pathways / E. K. Hoffmann, S. F. Pedersen // *Acta physiologica*. – 2011. – Vol. 202. – iss. 3. – P. 465-485 <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02190.x>

106. Höher N. Effects of Environmental Contamination on the Immune System of the Blue Mussel *Mytilus Spp* in Brackish Water Systems of the Baltic Sea. Doctoral dissertation — 2013 — Jacobs University Bremen Alfred Wegener Institute Jacobs University Bremen, Bremen, Germany.

107. Holden J. A. Blood cells of the arcid clam, *Scapharca inaequalvis* / J. A. Holden, R. K. Pipe, A. Quaglia, G. Ciani // *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. – 1994. – Vol. 74. – iss. 2. – P. 287-299. <https://doi.org/10.1017/S0025315400039333>

108. Hong H. K. Comparative study on the hemocytes of subtropical oysters *Saccostrea kegaki* (Torigoe & Inaba, 1981), *Ostrea circumpecta* (Pilsbry, 1904), and *Hyotissa hyotis* (Linnaeus, 1758) in Jeju Island, Korea: morphology and functional aspects/ H. K. Hong, H. S. Kang, T. C. Le, K. S. Choi // *Fish and shellfish immunology*. – 2013. – Vol. 35. – iss. 6. – P. 2020-2025. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.022>

109. Hosoda S. Global surface layer salinity change detected by Argo and its implication for hydrological cycle intensification / S. Hosoda, T. Sugo, N. Shikama, K. Mizuno, // *Journal of Oceanography*. – 2009. – Vol. 65. – iss. 4. – P. 579-586. <https://doi.org/10.1007/s10872-009-0049-1>

110. Hosoi M. Effect of salinity change on free amino acid content in Pacific oyster / M. Hosoi, S. Kubota, M. Toyohara, H. Toyohara // *Fisheries science*. – 2003. – Vol. 69. – iss. 2. – P. 395-400. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2003.00634.x>

111. Hosoi M. Expression and functional analysis of mussel taurine transporter, as a key molecule in cellular osmoconforming / M. Hosoi, K. Takeuchi, H. Sawada, H. Toyohara // *Journal of experimental biology*. – 2005. – Vol. 208. – iss. 22. – P. 4203-4211. <https://doi.org/10.1242/jeb.01868>

112. Huang Y. Characterization and expression of arginine kinase 2 from *Macrobrachium nipponense* in response to salinity stress / Y. Huang, D. Wu, Y. Li, Q.

Chen, Y. Zhao // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2020. – Vol. 113. — Article no. 103804. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103804>

113. Huiping Y. Immunological assays of hemocytes in molluscan bivalves as biomarkers to evaluate stresses for aquaculture / Y. Huiping // *Bulletin of Japan Fisheries Research and Education Agency*. – 2021. – Vol. 50. – P. 31-45.

114. Igbokwe N. A. A review of the factors that influence erythrocyte osmotic fragility / N. Igbokwe // *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*. – 2018. – Vol. 16. – iss. 4. – P. 1-23. <https://doi.org/10.4314/sokjvs.v16i4.1>

115. Ingram B. A. Growth and survival of selected aquatic animals in two saline groundwater evaporation basins: an Australian case study / B. A. Ingram, L. J. McKinnon, G. J. Gooley // *Aquaculture research*. – 2002. – Vol. 33. – iss. 6. – P. 425-436. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00691.x>

116. IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). *Climate change 2014: Impacts, adaptation, and vulnerability*. In V. R. Barros, C. B. Field, D. J. Dokken, M. D. Mastrandrea, K. J. Mach, T. E. Bilir, M. Chatterjee, K. L. Ebi, Y. O. Estrada, R. C. Genova, B. Girma, E. S. Kissel, A. N. Levy, S. MacCracken, P. R. Mastrandrea, L.L. White (Eds.), Part B: Regional aspects. Contribution of working group II to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/cbo9781107415386.001>

117. Jackson P. S. The volume-sensitive organic osmolyte-anion channel VSOAC is regulated by nonhydrolytic ATP binding. / P. S. Jackson, R. Morrison, K. Strange // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 1994. – Vol. 267. – iss. 5. – P. C1203-C1209. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.267.5.C1203>

118. Jiang S. The cytochemical and ultrastructural characteristics of phagocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* / S. Jiang, Z. Jia, L. Xin, Y. Sun, R. Zhang, W. Wang, L. Song // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2016. – Vol. 55. – P. 490-498. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.024>

119. Kiss T. Apoptosis and its functional significance in molluscs / T. Kiss // *Apoptosis*. – 2010. – Vol. 15. – iss. 3. – P. 313-321.

120. Kladchenko E. S. Cellular osmoregulation of the ark clam (*Anadara kagoshimensis*) hemocytes to hyposmotic media / E. S. Kladchenko, A. Y. Andreyeva, I. V. Mindukshev, S. Gambaryan // Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology. – 2022 - 1–6. <https://doi.org/10.1002/jez.2578>

121. Kladchenko E. S. Impact of Low Salinity on Hemocytes Morphology and Functional Aspects in Alien Clam *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) / E. S. Kladchenko, A. Y. Andreyeva, T. A. Kukhareva, V. N. Rychkova, A. A. Soldatov, I. V. Mindukshev // Russian Journal of Biological Invasions. – 2021. – Vol. 12. – iss. 2. – P. 203-212. <https://doi.org/10.1134/S2075111721020089>

122. Kolyuchkina G. A. Morpho-functional characteristics of bivalve mollusks under the experimental environmental pollution by heavy metals / G. A. Kolyuchkina, A. D. Ismailov // Oceanology. – 2011. – Vol. 51. – iss. 5. – P. 804-813. <https://doi.org/10.1134/S0001437011050092>

123. Krapal A. M. Molecular confirmation on the presence of *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) (Mollusca: Bivalvia: Arcidae) in the Black Sea / A. M. Krapal, O. P. Popa, A. F. Levarda, E. I. Iorgu, M. Costache, F. Crocetta, L. O. Popa // Travaux du Museum National d'Histoire Naturelle Grigore Antipa. – 2014. – Vol. 57. – iss. 1. – P. 9-12.

124. Kube S. Seasonal variability of free amino acids in two marine bivalves, *Macoma balthica* and *Mytilus spp.*, in relation to environmental and physiological factors / S. Kube, A. Sokolowski, J. M. Jansen, D. Schiedek // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology. – 2007. – Vol. 147. – iss. 4. – P. 1015-1027. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.03.012>

125. Kultz D. Physiological mechanisms used by fish to cope with salinity stress / D. Kultz // The Journal of Experimental Biology. – 2015. – Vol. 218. – iss. 12. – P. 1907-1914 <https://doi.org/10.1242/jeb.118695>

126. Kwon H. Characterization of the hemocytes in Larvae of *Protoetia brevitarsis seulensis*: involvement of granulocyte-mediated phagocytosis / H. Kwon, K. Bang, S. Cho

// PLoS One. – 2014. – Vol. 9. – iss. 8. — Article no. e103620.[https://10.1371/journal.pone.0103620](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103620)

127. Lacoste A. Stress-induced catecholamine changes in the hemolymph of the oyster *Crassostrea gigas* / A. Lacoste, S. K. Malham, A. Cueff, S. A. Poulet // General and comparative endocrinology. – 2001. – Vol. 122. – iss. 2. – P. 181-188. <https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7629>

128. Lambert C. Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites / C. Lambert, P. Soudant, L. Dégremont, M. Delaporte, J. Moal, P. Boudry, J. F. Samain // Aquaculture. – 2007. – Vol. 270. – iss. 1-4. – P. 276-288. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.03.016>

129. Landes A. Growth and respiration in blue mussels (*Mytilus spp.*) from different salinity regimes / A. Landes, P. Dolmer, L. K. Poulsen, J. K. Petersen, B. Vismann // Journal of Shellfish Research. – 2015. – Vol. 34. – iss. 2. – P. 373-382. <https://doi.org/10.2983/035.034.0220>

130. Larsen E.H. Osmoregulation and excretion / E.H. Larsen, L.E. Deaton, H. Onken, M. O'Donnell, M. Grosell, W.H. Dantzler, D. Weihrauch // Comprehensive physiology. – 2011. – Vol. 4. – iss. 2. – P. 405-573. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130004>

131. Lau Y. T. Characterization of hemocytes from different body fluids of the eastern oyster *Crassostrea virginica* / Y. T. Lau, L. Sussman, E. P. Espinosa, S. Katalay, B. Allam // Fish and shellfish immunology. – 2017. – Vol. 71. – P. 372-379 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.10.025>

132. Lauritano C. Gene expression patterns and stress response in marine copepods / C. Lauritano, G. Procaccini, A. Ianora // Marine Environmental Research. – 2012. – Vol. 76. – P. 22-31 <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.09.015>

133. Le Foll F. Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging / F. Le Foll, D. Rioult, S. Boussa, J. Pasquier, Z. Dagher, F. Leboulenger // Fish and shellfish immunology. – 2010. – Vol. 28. – iss. 2. – P. 372-386 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.011>

134. Le Guernic A. Comparison of viability and phagocytic responses of hemocytes withdrawn from the bivalves *Mytilus edulis* and *Dreissena polymorpha*, and exposed to human parasitic protozoa / A. Le Guernic, A. Geffard, F. Le Foll, M. P. Ladeiro // International journal for parasitology. – 2020. – Vol. 50. – iss. 1. – P. 75-83 <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.10.005>

135. Lee C. L. Design and operation of a land-based closed recirculating hatchery system for the topshell, *Trochus niloticus*, using treated bore water / Ed. B. Smith, C. Barlow, // Trochus: Status, Hatchery Practice and Nutrition Workshop. – 1997. – C. 27-32

136. Lefebvre O. Halophilic biological treatment of tannery soak liquor in a sequencing batch reactor / O. Lefebvre, N. Vasudevan, M. Torrijos, K. Thanasekaran, R. Moletta // Water research. – 2005. – Vol. 39. – iss. 8. – P. 1471-1480 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.12.038>

137. Lefebvre O. Impact of increasing NaCl concentrations on the performance and community composition of two anaerobic reactors / O. Lefebvre, S. Quentin, M. Torrijos, J.J. Godon, J.P. Delgenès, R. Moletta // Applied microbiology and biotechnology. – 2007. – Vol. 75. – iss. 1. – P. 61-69. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0799-2>

138. Levinton J. Climate change, precipitation and impacts on an estuarine refuge from disease / J. Levinton, M. Doall, D. Ralston, A. Starke, B. Allam // PLoS One. – 2011. – Vol. 6. – iss. 4. – P. e18849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018849>

139. Li H. T. Oxidative stress parameters and anti-apoptotic response to hydroxyl radicals in fish erythrocytes: protective effects of glutamine, alanine, citrulline and proline / H. T. Li, L. Feng, W.D. Jiang, Y. Liu, J. Jiang, S. H. Li, X. Q. Zhou // Aquatic toxicology. – 2013. – Vol. 126. – P. 169-179. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.005>

140. Li J. The first morphologic and functional characterization of hemocytes in Hong Kong oyster, *Crassostrea hongkongensis* / J. Li, Y. Zhang, F. Mao, Y. Lin, S. Xiao, Z. Xiang, Z. Yu // Fish and shellfish immunology. – 2018. – Vol. 81. – P. 423-429 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.062>

141. Li S. Morphology and classification of hemocytes in *Pinctada fucata* and their responses to ocean acidification and warming / S. Li, Y. Liu, C. Liu, J. Huang, G. Zheng, L. Xie, R. Zhang // *Fish and shellfish immunology*. – 2015. – Vol. 45. – iss. 1. – P. 194-202 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.04.006>
142. Li Y. Mitochondrial dysfunctions trigger the calcium signaling-dependent fungal multidrug resistance / Y. Li, Y. Zhang, C. Zhang, H. Wang, X. Wei, P. Chen, L. Lu // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – Vol. 117. – iss. 3. – P. 1711-1721. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911560116>
143. Lin C. H. Ionic and amino acid regulation in hard clam (*Meretrix lusoria*) in response to salinity challenges / C. H. Lin, P. L. Yeh, T. H. Lee // *Frontiers in Physiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 368. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00368>
144. Lin T. T. Toxic effects of several saline-alkali factors on *Cyclina sinensis* / T. T. Lin, Q. F. Lai, J. X. Lu, Z. L. Yao, Z. N. Li, H. Wang, K. Zhou // *Mar. Fish.* – 2012. – Vol. 34. – P. 183-188.
145. Liu Y. Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes / Y. Liu, W. N. Wang, A. L. Wang, J. M. Wang, R. Y. Sun // *Aquaculture*. – 2007. – Vol. 265. – iss. 1-4. – P. 351-358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.010>
146. Lundgreen K. Physiological response in the European flounder (*Platichthys flesus*) to variable salinity and oxygen conditions / K. Lundgreen, P. Kiilerich, C. K. Tipsmark, S. S. Madsen, F. B. Jensen // *Journal of Comparative Physiology B*. – 2008. – Vol. 178. – iss. 7. – P. 909-915. <https://doi.org/10.1007/s00360-008-0281-9>
147. Luo Y. Immune responses of oyster hemocyte subpopulations to in vitro and in vivo zinc exposure / Y. Luo, W. X. Wang // *Aquatic Toxicology*. – 2022. – Vol. 242. – P. 106022. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.106022>
148. Lushchak, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals / V. I. Lushchak // *Aquatic toxicology*. – 2011. – Vol. 101. – iss. 1. – P. 13-30 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>

149. Maar M. Growth potential of blue mussels (*M. edulis*) exposed to different salinities evaluated by a Dynamic Energy Budget model / M. Maar, C. Saurel, A. Landes, P. Dolmer, J. K. Petersen // *Journal of Marine Systems*. – 2015. – Vol. 148. – P. 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2015.02.003>

150. Maboloc E. A. Stress responses of zooxanthellae in juvenile *Tridacna gigas* (Bivalvia, Cardiidae) exposed to reduced salinity / E. A. Maboloc, J. J. M. Puzon, R. D Villanueva // *Hydrobiologia*. – 2015. – Vol. 762. – iss. 1. – P. 103-112 <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2341-y>

151. Makhro A. Red cell properties after different modes of blood transportation / A. Makhro, R. Huisjes, L. P. Verhagen, M. D. M. Manu-Pereira, E. Llaudet-Planas, P. Petkova-Kirova, L. Kaestner // *Frontiers in physiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 288. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00288>

152. Malagoli D Stress and immune response in the mussel *Mytilus galloprovincialis* / D. Malagoli, L. Casarini, S. Sacchi, E. Ottaviani // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2007. – Vol. 23. – iss. 1. – P. 171-177. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.10.004>

153. Maoxiao P. Survival, growth and physiology of marine bivalve (*Sinonovacula constricta*) in long-term low-salt culture. *Scientific Reports*, 9(1), 1-9. / P. Maoxiao, L. Xiaojun, N. Donghong, Y. Bo, L. Tianyi, D. Zhiguo, L. Jiale // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – iss. 1. – P. 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39205-2>

154. Marino A. Calcium and cytoskeleton signaling during cell volume regulation in isolated nematocytes of *Aiptasia mutabilis* (Cnidaria: Anthozoa) / A. Marino, G. La Spada // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. – 2007. – Vol. 147. – iss. 1. – P. 196-204 <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.12.030>

155. Martello L. B. Combined effects of pentachlorophenol and salinity stress on phagocytic and chemotactic function in two species of abalone / L.B. Martello, C.S. Friedman, R.S. Tjeerdema // *Aquatic toxicology*. – 2000. – Vol. 49. – iss. 3. – P. 213-225. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00075-2)

156. Martínez-Álvarez R. M. Adaptive branchial mechanisms in the sturgeon *Acipenser naccarii* during acclimation to saltwater / R. M. Martínez-Álvarez, A. Sanz, M. García-Gallego, A. Domezain, J. Domezain, R. Carmona, A. E. Morales // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. – 2005. – Vol. 141. – iss. 2. – P. 183-190. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.05.003>

157. Martínez-Álvarez R. M. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors / R.M. Martínez-Álvarez, A.E. Morales, A. Sanz // *Reviews in Fish Biology and fisheries*. – 2005. – Vol. 15. – iss. 1. – P. 75-88. <https://doi.org/10.1007/s11160-005-7846-4>

158. Matozzo V. Effects of salinity on the clam *Chamelea gallina*. Part I: alterations in immune responses / V. Matozzo, M. Monari, J. Foschi, G. P. Serrazanetti, O. Cattani, M. G. Marin // *Marine Biology*. – 2007. – Vol. 151. – iss. 3. – P. 1051-1058. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0543-6>

159. Matozzo V. *Pinna nobilis*: a big bivalve with big haemocytes? / V. Matozzo, M. Pagano, A. Spinelli, F. Caicci, C. Faggio // *Fish and shellfish immunology*. – 2016. – Vol. 55. – P. 529-534. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.039>

160. McFarland K. Effect of acute salinity changes on hemolymph osmolality and clearance rate of the non-native mussel, *Perna viridis*, and the native oyster, *Crassostrea virginica*, in Southwest Florida / K. McFarland, L. Donaghy, A. K. Volety // *Aquatic Invasions*. – 2013. – Vol. 8. – iss. 3. – P. 299-310. <https://doi.org/10.3391/ai.2013.8.3.06>

161. Medeiros I. P. M. Osmoionic homeostasis in bivalve mollusks from different osmotic niches: Physiological patterns and evolutionary perspectives / I. P. M. Medeiros, S. C. Faria, M. M. Souza, // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. – 2020. – Vol. 240. — Article no. 110582. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.110582>

162. Mindukshev I. V. Erythrocytes' reactions to osmotic, ammonium, and oxidative stress are inhibited under hypoxia / I.V. Mindukshev, J.S. Sudnitsyna, E.A. Skverchinskaya, A.Y. Andreyeva, I.A. Dobrylko, E.Y. Senchenkova, S.P. Gambaryan,

//Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. – 2019. – Vol. 13. – iss. 4. – P. 352-364 <https://doi.org/10.1134/S1990747819040081>

163. Mindukshev I. V. Erythrocytes' reactions to osmotic, ammonium, and oxidative stress are inhibited under hypoxia / I.V. Mindukshev, J. S. Sudnitsyna, E. A. Skverchinskaya, A. Y. Andreyeva, I. A. Dobrylko, E. Y. Senchenkova, S. P. Gambaryan // Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. – 2019. – Vol. 13. – iss. 4. – P. 352-364 <https://doi.org/10.1134/S1990747819040081>

164. Mindukshev I. V. Necrotic and apoptotic volume changes of red blood cells investigated by low-angle light scattering technique / I. V. Mindukshev, V. V. Krivoshlyk, E. E. Ermolaeva, I. A. Dobrylko, E. V. Senchenkov, N.V. Goncharov, A. I. Krivchenko // Spectroscopy. – 2007. – Vol. 21. – iss. 2. – P. 105-120 <https://doi.org/10.1155/2007/629870>

165. Mirabdullayev I. M. Succession of the ecosystems of the Aral Sea during its transition from oligohaline to polyhaline water body / I.M. Mirabdullayev, I.M. Joldasova, Z.A. Mustafaeva, S. Kazakhbaev, S.A. Lyubimova, B.A.Tashmukhamedov //Journal of Marine Systems. – 2004. – Vol. 47. – iss. 1-4. – P. 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2003.12.012>

166. Mohanty J. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging / J. Mohanty, E. Nagababu, J. M. Rifkind //Frontiers in physiology. – 2014. – Vol. 5. – P. 84. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00084>

167. Monari M. Effects of salinity on the clam *Chamelea gallina* haemocytes. Part II: superoxide dismutase response. / M. Monari, G. P. Serrazanetti, J. Foschi, V. Matozzo, M. G. Marin, O. Cattani // Marine biology. – 2007. – T. 151. – №. 3. – P. 1059-1068 <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0544-5>

168. Murphy M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species / M.P. Murphy // Biochemical journal. – 2009. – Vol. 417. – iss. 1. – P. 1-13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>

169. Mydlarz L. D. Innate immunity, environmental drivers, and disease ecology of marine and freshwater invertebrates / L. D. Mydlarz, L. E. Jones, C. D. Harvell //

Annual Review of Ecology Evolution and Systematics. – 2006. – Vol. 37. – P. 251-288.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110103>

170. Naceur C. B. Oyster's cells regulatory volume decrease: A new tool for evaluating the toxicity of low concentration hydrocarbons in marine waters / C.B. Naceur, V. Maxime, H. B. Mansour, V. Le Tilly, O. Sire // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2016. – Vol. 133. – P. 327-333 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.07.030>

171. Nakahara R. Fluorophotometric determination of hydrogen peroxide with fluorescein in the presence of cobalt (II) and reaction against other reactive oxygen species / R. Nakahara, S. Kashitani, K. Hayakawa, Y. Kitani, T. Yamaguchi, Y. Fujita // *Journal of fluorescence*. – 2009. – Vol. 19. – iss. 5. – P. 769-775. <https://doi.org/10.1007/s10895-009-0473-z>

172. Neufeld D. S. Salinity change and cell volume: the response of tissues from the estuarine mussel *Geukensia demissa* / D. S. Neufeld, S. H. Wright // *The Journal of experimental biology*. – 1996. – Vol. 199. – iss. 7. – P. 1619-1630. <https://doi.org/10.1242/jeb.199.7.1619>

173. Nguyen D. H. Classification and morphology of circulating haemocytes in the razor clam *Sinonovacula constricta* / D. H. Nguyen, D. Niu, Z. Chen, M. Peng, N. T. Tran, J. Li // *Aquaculture and Fisheries*. – 2020. – Vol. 7. – iss. 1. – P. 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2020.06.007>

174. Ni Q. Gill transcriptome analysis reveals the molecular response to the acute low-salinity stress in *Cyclina sinensis* / Q. Ni, W. Li, X. Liang, J. Liu, H. Ge, Z. Dong // *Aquaculture Reports*. – 2021. – Vol. 19. — Article no. 100564. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100564>

175. Nikinmaa M. Haemoglobin function in vertebrates: evolutionary changes in cellular regulation in hypoxia / M. Nikinmaa // *Respiration physiology*. – 2001. – Vol. 128. – iss. 3. – P. 317-329 [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(01\)00309-7](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(01)00309-7)

176. Nordlie F.G. Osmotic regulation in the sheepshead minnow *Cyprinodon variegatus* Lacepede // *Journal of Fish Biology*. – 1985. – Vol. 26. – iss. 2. – P. 161-170 <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1985.tb04253.x>

177. Novitskaya V. N. Peculiarities of functional morphology of erythroid elements of hemolymph of the bivalve mollusk *Anadara inaequalis*, the Black Sea / V.N. Novitskaya, A.A. Soldatov // Hydrobiological Journal. – 2013. – Vol. 49. – iss. 6. – P. 64-71. <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v49.i6.60>

178. Ottaviani E. Comparative and morphofunctional studies on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes: Presence of two aging-related hemocyte stages / E. Ottaviani, A. Franchini, D. Barbieri, D. Kletsas // Italian Journal of Zoology. – 1998. – Vol. 65. – iss. 4. – P. 349-354. <https://doi.org/10.1080/11250009809386772>

179. Panfili J. Influence of salinity on the life-history traits of the West African black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron*): Comparison between Gambia and Saloum estuaries / J. Panfili, A.Mbow, J.D. Durand, K. Diop, K. Diouf, D.Thior, P. Ndiaye, R. Lae // Aquatic Living Resources. – 2004. – Vol. 17. – iss. 1. – P. 65-74. <https://doi.org/10.1051/alr:2004002>

180. Panfili J. Influence of salinity on the size at maturity for fish species reproducing in contrasting West African estuaries / J. Panfili, D.Thior, J.M. Ecoutin, P. Ndiaye, J.J. Albaret // Journal of Fish Biology. – 2006. – Vol. 69. – iss. 1. – P. 95-113.

181. Parada J. M. Multispecies mortality patterns of commercial bivalves in relation to estuarine salinity fluctuation / J. M. Parada, J. Molares, X. Otero // Estuaries and Coasts. – 2012. – Vol. 35. – iss. 1. – P. 132-142. <https://doi.org/10.1007/s12237-011-9426-2>

182. Parada J.M. Natural mortality of the cockle *Cerastoderma edule* (L.) from the Ria of Arousa (NW Spain) intertidal zone / J.M. Parada, J. Molares. // Revista de biología marina y oceanografía. – 2008. – Vol. 43. – iss. 3. – P. 501-511.

183. Parida A. K. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review / A. K. Parida, A. B. Das // Ecotoxicology and environmental safety. – 2005. – Vol. 60. – iss. 3. – P. 324-349 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.010>

184. Parrino V. Flow cytometry and micro-Raman spectroscopy: Identification of hemocyte populations in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae) from Faro Lake and Tyrrhenian Sea (Sicily, Italy) / V. Parrino, G. Costa, C. Cannavà, E. Fazio,

M. Bonsignore, S. Concetta, F. Fazio // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2019. – Vol. 87. – P. 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.067>

185. Perrigault M. Effects of salinity on hard clam (*Mercenaria mercenaria*) defense parameters and QPX disease dynamics / M. Perrigault, S. F. Dahl, E. P. Espinosa, B. Allam // *Journal of invertebrate pathology*. – 2012. – Vol. 110. – iss. 1. – P. 73-82 <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.02.004>

186. Phuvasate S. Impact of water salinity and types of oysters on depuration for reducing *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) / S. Phuvasate, Y. C. Su // *Food Control*. – 2013. – Vol. 32. – iss. 2. – P. 569-573. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.025>

187. Pourmozaffar S. The role of salinity in physiological responses of bivalves / S. Pourmozaffar, S. Tamadoni Jahromi, H. Rameshi, A. Sadeghi, T. Bagheri, S. Behzadi, S. Abrari Lazarjani // *Reviews in Aquaculture*. – 2020. – Vol. 12. – iss. 3. – P. 1548-1566. <https://doi.org/10.1111/raq.12397>

188. Power S. B. Humans have already increased the risk of major disruptions to Pacific rainfall / S. B. Power, F. P. D. Delage, C. T. Y. Chung, H. Ye, B. F. Murphy // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – iss. 1. – P. 1-7. <https://doi.org/10.1038/ncomms14368>

189. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Core Team; 2015. Available AT: <https://www.r-project.org>

190. Reid H. I. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* / H. I. Reid, P. Soudant, C. Lambert, C. Paillard, T.H. Birkbeck // *Diseases of aquatic organisms*. – 2003. – Vol. 56. – iss. 3. – P. 249-258. <https://doi.org/10.3354/dao056249>

191. Riisgård H. U. Effect of salinity on filtration rates of mussels *Mytilus edulis* with special emphasis on dwarfed mussels from the low-saline Central Baltic Sea / H. U. Riisgård, F. Lüskow, D. Pleissner, K. Lundgreen, M. Á. P. López // *Helgoland Marine Research*. – 2013. – Vol. 67. – iss. 3. – P. 591-598 <https://doi.org/10.1007/s10152-013-0347-2>

192. Rivera-Ingraham G. A. Oxygen radical formation in anoxic transgression and anoxia-reoxygenation: foe or phantom? Experiments with a hypoxia tolerant bivalve / G. A. Rivera-Ingraham, I. Rocchetta, S. Meyer, D. Abele // *Marine environmental research*. – 2013. – Vol. 92. – P. 110-119. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.09.007>

193. Rodrick G. E. Microscopical studies on the hemocytes of bivalves and their phagocytic interaction with selected bacteria / G. E. Rodrick, S. A. Ulrich // *Helgoländer Meeresuntersuchungen*. – 1984. – Vol. 37. – iss. 1. – P. 167-176 <https://doi.org/10.1007/BF01989301>

194. Rolton A. Flow cytometric characterization of hemocytes of the flat oyster, *Ostrea chilensis* / A. Rolton, L. Delisle, J. Berry, L. Venter, S. C. Webb, S. Adams, Z. Hilton // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2020. – Vol. 97. – P. 411-420. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.071>

195. Ruiz J. L. Osmotic stress and muscle tissue volume response of a freshwater bivalve / J. L. Ruiz, M. M. D. Souza // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. – 2008. – Vol. 151. – iss. 3. – P. 399-406. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.03.028>

196. Saccò M. Salt to conserve: A review on the ecology and preservation of hypersaline ecosystems / M. Saccò, N. E. White, C. Harrod, G. Salazar, P. Aguilar, C. F. Cubillos, M. E. Allentoft // *Biological Reviews*. – 2021. – Vol. 96. – iss. 6. – P. 2828-2850 <https://doi.org/10.1111/brv.12780>

197. Sanders T. High calcification costs limit mussel growth at low salinity / T. Sanders, L. Schmittmann, J. C. Nascimento-Schulze, F. Melzner // *Frontiers in Marine Science*. – 2018. – Vol. 5. – P. 352. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00352>

198. Santos I.A. Direct relationship between osmotic and ionic conforming behavior and tissue water regulatory capacity in echinoids / I.A. Santos, G.C. Castellano, C.A. Freire // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. – 2013. – Vol. 164. – iss. 3. – P. 466-476. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.12.010>

199. Sarà G. Effect of salinity and temperature on feeding physiology and scope for growth of an invasive species (*Brachidontes pharaonis*-Mollusca: Bivalvia) within the Mediterranean Sea / G. Sarà, C. Romano, J. Widdows, F. J. Staff // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. – 2008. – Vol. 363. – iss. 1-2. – P. 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.06.030>

200. Sardella B. A. The effects of variable water salinity and ionic composition on the plasma status of the Pacific hagfish (*Eptatretus stoutii*) / B. A. Sardella, D. W. Baker, C. J. Brauner // Journal of Comparative Physiology B. – 2009. – Vol. 179. – iss. 6. – P. 721-728. <https://doi.org/10.1007/s00360-009-0355-3>

201. Schmitz M Chronic hyperosmotic stress inhibits renal Toll-like receptors expression in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*, Sauvage) exposed or not to bacterial infection / M. Schmitz, S. Baekelandt, S. Bequet, P. Kestemont // Developmental and Comparative Immunology. – 2017. – Vol. 73. – P. 139-143. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.03.020>

202. Schmitz M Salinity stress, enhancing basal and induced immune responses in striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage) / M. Schmitz, T. Ziv, A. Admon, S. Baekelandt, S.N.M. Mandiki, M. L'Hoir, P. Kestemont // Journal of proteomics. – 2017. – Vol. 167. – P. 12-24. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.08.005>

203. Seale A. P. Endocrine and osmoregulatory responses to tidally-changing salinities in fishes / A. P. Seale, J. P. Breves // General and Comparative Endocrinology. – 2022. . — Article no.114071.

204. Shakhmatova E. I. Cations in molluscan tissues at sharply different hemolymph osmolality / E. I. Shakhmatova, V.Y. Berger, Y.V. Natochin // Biology Bulletin. – 2006. – Vol. 33. – iss. 3. – P. 269-275 <https://doi.org/10.1134/S1062359006030095>

205. Singh S. Osmotic tolerance of avian erythrocytes to complete hemolysis in solute free water / S. Singh, N. Ponnappan, A., Verma, A. Mittal // Scientific reports. – 2019. – Vol. 9. – iss. 1. – P. 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44487-7>

206. Smith M. D. An ecological perspective on extreme climatic events: A synthetic definition and framework to guide future research / M. D. Smith // *Journal of Ecology*. – 2011. – Vol. 99. – iss. 3. – P. 656-663. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2011.01798.x>

207. Sokolov E. P. Effects of hypoxia-reoxygenation stress on mitochondrial proteome and bioenergetics of the hypoxia-tolerant marine bivalve *Crassostrea gigas* / E. P. Sokolov, S. Markert, T. Hinzke, C. Hirschfeld, D. Becher, S. Ponsuksili, I.M. Sokolova, // *Journal of proteomics*. – 2019. – Vol. 194. – P. 99-111. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.009>

208. Sokolova I. M. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates / I. M. Sokolova, M. Frederich, R. Bagwe, G. Lannig, A. A. Sukhotin, // *Marine environmental research*. – 2012. – Vol. 79. – P. 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>

209. Sokolowski A. Free amino acids in the clam *Macoma balthica* L (Bivalvia Mollusca) from brackish waters of the southern Baltic Sea / A. Sokolowski, M. Wolowicz, H. Hummel // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. – 2003. – Vol. 134. – iss. 3. – P. 579-592 [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(02\)00360-4](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(02)00360-4)

210. Solan M. Stressors in the Marine Environment: Physiological and Ecological Responses; Societal Implications, 1st edn / M. Solan, N.M. Whiteley // Oxford University Press, Oxford, UK, 2016

211. Soldatov A. A. Peculiarities of organization of tissue metabolism in molluscs with different tolerance to external hypoxia / A. A. Soldatov, T. I. Andreenko, I. V. Golovina, A. Y. Stolbov // *Journal of evolutionary biochemistry and physiology*. – 2010. – Vol. 46. – iss. 4. – P. 341-349 <https://doi.org/10.1134/S0022093010040022>

212. Somero G. N. Osmolytes and metabolic end products of molluscs: the design of compatible solute systems / G. N. Somero, R. D. Bowlus // *The mollusca*. – Academic Press, 1983. – C. 77-100 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751402-4.50010-8>

213. Song J. A. Exposure to benzo [α] pyrene causes oxidative stress and cell damage in bay scallop *Argopecten irradians* / J.A. Song, C.Y. Choi // Aquaculture Reports. – 2021. – Vol. 21. — Article no. 100860
<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100860>

214. Song L. Bivalve immunity / L. Song, L. Wang, L. Qiu, H. Zhang, // Advances in experimental medicine and biology. – 2010. – Vol. 708. – P. 44-65
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8059-5_3

215. St Mary C.M. Effects of the environment on male reproductive success and parental care in the Florida flagfish, *Jordanella floridae* / C.M. St Mary, C.G. Nouredine, K. Lindström // Ethology. – 2001. – Vol. 107. – iss. 11. – P. 1035-1052.
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2001.00747.x>

216. St Mary C.M. Environmental effects on egg development and hatching success in *Jordanella floridae*, a species with parental care / C.M. St Mary, E. Gordon, R.E. Hale // Journal of Fish Biology. – 2004. – Vol. 65. – iss. 3. – P. 760-768.
<https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2004.00481.x>

217. Sudnitsyna J. Microvesicle formation induced by oxidative stress in human erythrocytes / J. Sudnitsyna, E. Skverchinskaya, I. Dobrylko, E. Nikitina, S. Gambaryan, I. Mindukshev // Antioxidants. – 2020. – Vol. 9. – iss. 10. – P. 929
<https://doi.org/10.3390/antiox9100929>

218. Suganthi K. In vitro Assessment of Haemocyte and Thrombocyte Count from the Blood Clam of *Anadara inequivalvis*. / K. Suganthi, S. Bragadeeswaran, K. Prabhu, S. S. Rani, S. Vijayalakshmi, T. Balasubramanian // Middle-East Journal of Scientific Research. – 2009. – Vol. 4. – iss. 3. – P. 163-167

219. Sun X. Experimental study on shortcut nitrification of sewage from flushing toilet with seawater / X. Sun, Y. Sun, H. Wang, D. Yu // 2009 International Conference on Environmental Science and Information Application Technology. – IEEE, 2009. – Vol. 2. – P. 273-276.

220. Suski J. Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation / J. Suski, M. Lebiezinska, M. Bonora, P. Pinton, J. Duszynski, M. R. Wieckowski // *Mitochondrial bioenergetics*. – Humana Press, 2012. – P. 183-205

221. Takahashi K. G. Unique phagocytic properties of hemocytes of Pacific oyster *Crassostrea gigas* against yeast and yeast cell-wall derivatives / K. G. Takahashi, N. Izumi-Nakajima, K. Mori // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2017. – Vol. 70. – P. 575-582. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.027>

222. Takeuchi K. A hyperosmotic stress induced mRNA of carp cell encodes Na⁺ - and Cl⁻ -dependent high affinity taurine transporter / K. Takeuchi, H. Toyohara, M. Sakaguchi // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2000. – Vol. 1464. – iss. 2. – P. 219-230 [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00158-9)

223. Takeuchi K. Ubiquitous increase in taurine transporter mRNA in tissues of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during high-salinity adaptation / K. Takeuchi, H. Toyohara, M. Kinoshita, M. Sakaguchi // *Fish Physiology and Biochemistry*. – 2000. – Vol. 23. – iss. 2. – P. 173-182. <https://doi.org/10.1023/A:1007889725718>

224. Tame A. Morphological and functional characterization of hemocytes from two deep-sea vesicomid clams *Phreagena okutanii* and *Abyssogena phaseoliformis* / A. Tame, G. Ozawa, T. Maruyama, T. Yoshida // *Fish and shellfish immunology*. – 2018. – Vol. 74. – P. 281-294 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.12.058>

225. Telesh I. Life in the salinity gradient: discovering mechanisms, behind a new biodiversity pattern / I. Telesh, H. Schubert S. Skarlato // *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. – 2013. – Vol. 135. – P. 317-327 <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2013.10.013>

226. Terahara K. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs / K. Terahara, K. G. Takahashi // *Current pharmaceutical design*. – 2008. – Vol. 14. – iss. 2. – P. 131-137 <https://doi.org/10.2174/138161208783378725>

227. Tine M. Transcriptional responses of the blackchinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* to salinity extremes / M. Tine, J. de Lorgeril, H. D’Cotta, E. Pepey, F. Bonhomme, J.F. Baroiller, J.D. Durand // *Marine Genomics*. – 2008. – Vol. 1. – iss. 2. – P. 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2008.06.001>

228. Torre, A. Digestive cells from *Mytilus galloprovincialis* show a partial regulatory volume decrease following acute hypotonic stress through mechanisms involving inorganic ions / A. Torre, F. Trischitta, C. Corsaro, D. Mallamace, C. Faggio // Cell biochemistry and function. – 2013. – Vol. 31. – iss. 6. – P. 489-495 <https://doi.org/10.1002/cbf.2925>

229. Torreilles J. Reactive oxygen species and defense mechanisms in marine bivalves / J. Torreilles, M. C. Guérin, P. Roch // Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie. – 1996. – Vol. 319. – iss. 3. – P. 209-218

230. Toyohara H. The role of taurine in the osmotic adaptation in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* / H. Toyohara, M. Hosoi, // *Marine Biotechnology* . – 2004. – Vol. 6. – P. S511-S516.

231. Trenberth K. E. Changes in precipitation with climate change / K. E. Trenberth, // Climate research. – 2011. – Vol. 47. – iss. 1-2. – P. 123-138 <https://doi.org/10.3354/cr00953>

232. Trenberth K. E. Climate extremes and climate change: The Russian heat wave and other climate extremes of 2010 / K. E. Trenberth, J. T. Fasullo, // Journal of Geophysical Research: Atmospheres. – 2012. – Vol. 117. – iss. D17 . — Article no. D17103 <https://doi.org/10.1029/2012JD018020>

233. Tu C. Y. Simultaneous flow cytometric assessment for cellular types and phagocytic abilities of the haemocytes of the hard clam, *Meretrix lusoria* / C.Y. Tu, S.W. Hung, L.T.Tsou, Y.C. Chang, W.S. Wang // Fish and Shellfish Immunology. – 2007. – Vol. 23. – iss. 1. – P. 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.08.021>

234. Velasco J. Response of biotic communities to salinity changes in a Mediterranean hypersaline stream / J. Velasco, A. Milla'n, J. Herna'ndez, C. Gutie'rrez, P. Abella'n, D. Sa'nchez, M. Ruiz // Saline systems. – 2006. – Vol. 2. – iss. 1. – P. 1-15. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-2-12>

235. Velez C. Combined effects of seawater acidification and salinity changes in *Ruditapes philippinarum* / C. Velez, E. Figueira, A. M. Soares, R. Freitas, // Aquatic

Toxicology. – 2016. – Vol. 176. – P. 141-150.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.016>

236. Velez C. Native and introduced clams biochemical responses to salinity and pH changes / C. Velez, E. Figueira, A. M. Soares, R. Freitas // *Science of the Total Environment*. – 2016. – Vol. 566. – P. 260-268.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.019>

237. Verdelhos T. The impact of estuarine salinity changes on the bivalves *Scrobicularia plana* and *Cerastoderma edule*, illustrated by behavioral and mortality responses on a laboratory assay / T. Verdelhos, J. C. Marques, P. Anastácio // *Ecological Indicators*. – 2015. – Vol. 52. – P. 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.11.022>

238. Wan Y. The combined effects of oxygen availability and salinity on physiological responses and scope for growth in the green-lipped mussel *Perna viridis* / Y. Wang, M. Hu, W. H. Wong, P. K. S. Shin, S. G. Cheung // *Marine pollution bulletin*. – 2011. – Vol. 63. – iss. 5-12. – P. 255-261 <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.02.004>

239. Wang H. Salinity is a key factor driving the nitrogen cycling in the mangrove sediment / H. Wang, J. A. Gilbert, Y. Zhu, X. Yang // *Science of the Total Environment*. – 2018. – Vol. 631. – P. 1342-1349. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.102>

240. Wang W. The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas* / W. Wang, M. Li, L. Wang, H. Chen, Z. Liu, Z. Jia, L. Song // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2017. – Vol. 67. – P. 221-228. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.09.017>

241. Wang Y. Chronic hypoxia and low salinity impair anti-predatory responses of the green-lipped mussel *Perna viridis* / Y. Wang, M. Hu, S. G. Cheung, P. K. Shin, W. Lu, J. Li // *Marine environmental research*. – 2012. – Vol. 77. – P. 84-89 <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.02.006>

242. Westerbom M. Blue mussels, *Mytilus edulis*, at the edge of the range: population structure, growth and biomass along a salinity gradient in the north-eastern Baltic Sea / M. Westerbom, M. Kilpi, O. Mustonen // *Marine Biology*. – 2002. – Vol. 140. – iss. 5. – P. 991-999. <https://doi.org/10.1007/s00227-001-0765-6>

243. Woodin S. A. Behavioral responses of three venerid bivalves to fluctuating salinity stress / S. A. Woodin, D. S. Wethey, C. Olabarria, E. Vázquez, R. Domínguez, G. Macho, L. Peteiro // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. – 2020. – Vol. 522. – P. 151256 <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2019.151256>

244. Wright S. H. Epidermal taurine transporter in marine mussels / S. H. Wright, T. W. Secomb // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 1984. – Vol. 247. – iss. 2. – P. R346-R355. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1984.247.2.R346>

245. Wu F. Combined effects of ZnO NPs and seawater acidification on the haemocyte parameters of thick shell mussel *Mytilus coruscus* / F. Wu, S. Cui, M. Sun, Z. Xie, W. Huang, X. Huang, Y. Wang // *Science of the total environment*. – 2018. – Vol. 624. – P. 820-830. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.168>

246. Wu F. Short-term exposure of *Mytilus coruscus* to decreased pH and salinity change impacts immune parameters of their haemocytes / F. Wu, Z. Xie, Y. Lan, S. Dupont, M. Sun, S. Cui, Y. Wang // *Frontiers in physiology*. – 2018. – Vol. 9. — Article no. 166. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00166>

247. Xie Y. Morphology and phagocytic ability of hemocytes from *Cristaria plicata* / Y. Xie, B. Hu, C. Wen, S. Mu // *Aquaculture*. – 2011. – Vol. 310. – iss. 3-4. – P. 245-251. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.034>

248. Xue Q. G. Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph / Q.G. Xue, T. Renault, S. Chilmonczyk // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2001. – Vol. 11. – iss. 7. – P. 557-567. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0335>

249. Yan L. Transcriptomic analysis of *Crassostrea sikamea* × *Crassostrea angulata* hybrids in response to low salinity stress / L. Yan, J. Su, Z. Wang, X. Yan, R. Yu, P. Ma, J. Du // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12. – iss. 2. — Article no. e0171483. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171483>

250. Yancey P. H. Compatible and counteracting solutes,” in Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation, ed K. Strange (Boca Raton, FL: CRC Press) –1994. –P. 81–109

251. Yancey P. H. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems / P. H. Yancey, M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlus, G.N. Somero //Science. – 1982. – Vol. 217. – iss. 4566. – P. 1214-1222. <https://doi.org/10.1126/science.7112124>

252. Yancey P. H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counter-acting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses / P. H. Yancey // Journal of Experimental Biology. – 2005. – Vol. 208. – iss. 15. – P. 2819-2830. <https://doi.org/10.1242/jeb.01730>

253. Yang S. J. Sub-optimal or reduction in temperature and salinity decrease antioxidant activity and cellularity in the hemolymph of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) / S. J. Yang, B. H. Min, // Fish and Shellfish Immunology. – 2019. – Vol. 84. – P. 485-490. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.041>

254. Yuan W. S. Synergistic effects of salinity and temperature on the survival of two nonnative bivalve molluscs, *Perna viridis* (Linnaeus 1758) and *Mytella charruana* (d’Orbigny 1846) / W. S. Yuan, L. J. Walters, S. A. Brodsky, K. R. Schneider, E. A. Hoffman // Journal of Marine Biology. – 2016. – Vol. 2016. – P. 111-124. <https://doi.org/10.1155/2016/9261309>

255. Zajc J., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N. Yeasts in hypersaline habitats. / Ed. P. Buzzini, M. Lachance, A. Yurkov // Yeasts in natural ecosystems: Diversity. – Springer, Cham, 2017. – P. 293-329 https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3_10

256. Zarejabad A. M. Haematology of great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juvenile exposed to brakish water environment / A. M. Zarejabad, M. A. Jalali, M., Sudagar, S. Puralimotlagh // Fish physiology and biochemistry. – 2010. – Vol. 36. – iss. 3. – P. 655-659. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9339-1>

257. Zhou L. Ark shell *Scapharca broughtonii* hemocyte response against *Vibrio anguillarum* challenge / L. Zhou, D. Zhao, B. Wu, X. Sun, Z. Liu, F. Zhao, C. Ma // Fish

and Shellfish Immunology. – 2019. – Vol. 84. – P. 304-311.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.039>