

УДК 594.133-111.11:[551.464.6:546.221.1]

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭРИТРОИДНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ГЕМОЛИМФЫ *ANADARA KAGOSHIMENSIS* (ТОКУНАГА, 1906) В УСЛОВИЯХ СЕРОВОДОРОДНОГО ЗАРАЖЕНИЯ

© 2024 г. А. А. Солдатов^{1,2}, В. Н. Рычкова¹, Т. А. Кухарева¹

¹ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Российская Федерация

²Севастопольский государственный университет, Севастополь, Российская Федерация
E-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.12.2021; после доработки 21.04.2022;
принята к публикации 09.10.2023; опубликована онлайн 22.03.2024.

В условиях эксперимента исследовали влияние сероводородной нагрузки на морфометрические характеристики эритроидных элементов гемолимфы *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). Работа выполнена на взрослых особях моллюска с высотой раковины 26–38 мм. Контрольную группу моллюсков содержали в аквариуме с концентрацией кислорода 7,0–7,1 мг O₂·л⁻¹ (нормоксия). Экспериментальную группу подвергали действию сероводородной нагрузки, создававшейся при растворении в воде донора Na₂S до финальной концентрации 6 мг S²⁻·л⁻¹. Спустя сутки уровень кислорода в воде составил 1,8 мг O₂·л⁻¹, а сероводород не был обнаружен. Часть моллюсков подвергали повторной сероводородной нагрузке путём внесения Na₂S до финальной концентрации 9 мг S²⁻·л⁻¹. К концу вторых суток в воде регистрировали 1,9 мг S²⁻·л⁻¹ и следовую концентрацию кислорода — 0,03 мг O₂·л⁻¹. В условиях краткосрочной сероводородной нагрузки (первые сутки) популяция эритроидных элементов анадары становилась более гетерогенной. В гемолимфе повышалось содержание микро- и макроцитов, увеличивалось число клеток с изменённой формой и низким содержанием зернистых включений в цитоплазме. Число свободных гранул гематина в гемолимфе существенно росло. Среднеклеточный объём (V_c) увеличивался более чем на 20 %. Пребывание в условиях повышенной концентрации сульфидов в течение двух суток приводило к значительному понижению V_c, что определяется существенным сокращением популяции макроцитов в гемолимфе моллюсков.

Ключевые слова: моллюски, *Anadara kagoshimensis*, сероводород, гемолимфа, эритроидные элементы

Наличие в толще Чёрного моря обширной редокс-зоны (зона хемоклина) принципиально отличает его от других акваторий Мирового океана. Для неё характерно сочетание условий острой гипоксии с сероводородным заражением [Подымов, 2005]. Зона хемоклина обычно располагается на глубинах 100–150 м. Сходный комплекс условий может возникать и на шельфе [Заика и др., 2011]. Чаще всего это является следствием отсутствия сквозной вертикальной конвекции и образования локальных зон гниения мёртвого органического вещества [Орехова, Коновалов, 2018]. Не следует исключать из внимания и процессы апвеллинга, способствующие случайному выносу глубинных, заражённых сероводородом вод в прибрежную зону [Орехова, Коновалов, 2018].

Особый интерес представляют организмы, способные существовать в условиях сероводородного заражения и экстремально низких концентраций кислорода. В этом отношении выделяется двустворчатый моллюск — вселенец *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) (далее — анадара). Впервые найденный в акватории Чёрного моря в 1968 г. [Киселёва, 1992], к настоящему времени он стал одной из руководящих форм бентоса [Ревков, 2016]. В условиях эксперимента анадара показала высокую устойчивость не только к острым формам гипоксии [Cortesi et al., 1992; Isani et al., 1989], но и к сероводородной нагрузке [Miyamoto, Iwanaga, 2017; Nakano et al., 2017]. Этим в значительной степени объясняется её широкое распространение в проблемных акваториях Чёрного и Азовского морей [Ревков, 2016].

Толерантность моллюсков к острым формам гипоксии и аноксии достаточно хорошо изучена. Показано, что в её основе лежит способность их организма сопрягать процессы белкового и углеводного обмена. Свидетельством тому являются повышение продукции NH_4^+ [Chew et al., 2005], рост активности аланин- и аспартатаминотрансферазы [Soldatov et al., 2009], усиление процессов переаминирования глутамата и аланина [Hochachka, Somero, 2002], образование в качестве конечных продуктов аланина и сукцината [Buck, 2000].

Способность моллюсков компенсировать присутствие в воде сероводорода до конца не изучена. Показано присутствие в их гемолимфе особого белка, наличие нечувствительных к сероводороду гемоглобинов [Arp, Childress, 1981, 1983], а также участие в нейтрализации повышенной концентрации сульфидов особых зернистых включений эритроцитов, содержащих гематин [Holden et al., 1994; Vismann, 1993]. Роль данных включений в нейтрализации H_2S была продемонстрирована нами и для анадары [Soldatov et al., 2018]. В настоящей публикации представлены материалы в развитие этих закономерностей.

Цель работы — в условиях эксперимента исследовать влияние повышенных концентраций сероводорода на морфологические и морфометрические характеристики эритроидных элементов гемолимфы анадары.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на взрослых особях *A. kagoshimensis*, собранных в июне 2021 г. в акватории бухты Ласпи (Крым). Высота раковины моллюсков (от замка до края створки) составляла от 26 до 38 мм.

Схема эксперимента. Контрольную группу моллюсков содержали в воде с концентрацией кислорода 7,0–7,1 мг $\text{O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$ (нормоксия). Экспериментальную группу подвергали действию сероводорода. В воде, где находились моллюски, растворяли Na_2S до финальной концентрации 6 мг $\text{S}^{2-} \cdot \text{л}^{-1}$. Экспозиция составляла 24 ч (первые сутки эксперимента). Присутствие в воде сульфид-иона приводило к её защелачиванию. Это компенсировали внесением 0,1 н HCl . Значения pH удерживали на уровне 8,20–8,27. Сульфид-ион взаимодействовал с кислородом, что сопровождалось с течением времени понижением содержания обоих газов в воде аквариума. Спустя 24 ч уровень кислорода в воде составил 1,8 мг $\text{O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$, а сероводород не был обнаружен. У части моллюсков (7 особей) отбирали образцы гемолимфы из экстрапаллиального пространства, остальных (7 особей) подвергали повторной сероводородной нагрузке. В воду аквариума вносили Na_2S до финальной концентрации 9 мг $\text{S}^{2-} \cdot \text{л}^{-1}$. Спустя 24 ч (вторые сутки эксперимента) в воде аквариума были обнаружены следы кислорода, 0,03 мг $\text{O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$; уровень сероводорода составлял 1,9 мг $\text{S}^{2-} \cdot \text{л}^{-1}$. Также у моллюсков отбирали образцы гемолимфы.

Контроль за содержанием кислорода в воде осуществляли при помощи оксиметра ST300D (Ohaus, США). Значения pH определяли на pH-метре InoLab pH 720 (Германия). Величину сульфид-иона в воде измеряли потенциометрически с применением сульфидселективного сенсора MSBS (Нидерланды).

Морфометрические характеристики эритроцитов. Окраску мазков проводили по комбинированному методу Паппенгейма. Мазки анализировали при помощи светового микроскопа «Биомед ПР2 ЛЮМ», оборудованного камерой Levenhuk C NG Series. Диаметр клетки (C_1 и C_2) и ядра (N_1 и N_2) измеряли по фотографиям в программе ImageJ 1.44p (рис. 1). На каждом мазке указанные величины определяли у 100 клеток. На основании полученных значений по известным алгоритмам рассчитывали среднеклеточный объём (V_c) [Houchin et al., 1958], объём ядра (V_n), толщину клетки (h) [Чижевский, 1959], площадь поверхности клетки (S_c) [Houchin et al., 1958], удельную поверхность клетки (SS_c) и ядерно-цитоплазматическое отношение (nuclear-cytoplasmic ratio, NCR):

$$V_c = 0,7012 \cdot \left(\frac{C_1 + C_2}{2} \right)^2 \cdot h + V_n,$$

$$V_n = \frac{\pi \cdot N_1 \cdot N_2^2}{6},$$

$$h = 1,8 + 0,0915 \cdot (C_1 - 7,5),$$

$$S_c = 2\pi a^2 b + \frac{2\pi a b \sin(h^{-1}e)}{e},$$

где

$$e = \frac{\sqrt{a^2 - b^2}}{a}, \quad a = \frac{C_1 + C_2}{4}, \quad b = 0,67h, \quad SS_c = \frac{S_c}{V_c}, \quad NCR = \frac{V_n}{V_c}.$$

Одновременно на мазках гемолимфы из расчёта на 1000 клеток определяли число эритроцитарных аномалий.

Статистические сравнения выполнены на основе непараметрического U -критерия Манна — Уитни. Результаты представлены как $M \pm m$. В работе использован стандартный пакет Grapher (версия 11).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфометрические характеристики. Эритроциты гемолимфы анадары представляют собой крупные округлые клетки (рис. 1А). Продольный (C_1) и поперечный (C_2) диаметры имеют близкие значения — $(18,86 \pm 0,61)$ и $(16,13 \pm 0,52)$ мкм соответственно. Средний объём клетки (V_c) составляет $(678,5 \pm 52,0)$ мкм³, а площадь поверхности (S_c) — $(1037,5 \pm 78,4)$ мкм². Ядро компактное, с высокой долей гетерохроматина, что отражает низкую функциональную активность данной структуры. Форма эллипсоидная [N_1 $(5,46 \pm 0,09)$ мкм; N_2 $(4,11 \pm 0,10)$ мкм]. Расположено оно обычно в центре клетки. Объём (V_n) составляет $(50,1 \pm 3,1)$ мкм³. Ядерно-цитоплазматический индекс (NCR) невысок — 0,08, что также свидетельствует о подавленной функции ядра клетки. Цитоплазма ацидофильная, с высоким содержанием гемоглобина и большим числом мелких зернистых включений.

Сероводородная нагрузка в первые сутки сопровождалась значительным ростом объёма клетки и её ядра (рис. 2). Увеличение составило 24,3 и 30,1 % соответственно и являлось статистически значимым ($p \leq 0,05$). Как видно, рост был близким. Об этом свидетельствовало сохранение значений NCR на уровне контрольных величин. Площадь поверхности клетки увеличивалась почти на 23 % ($p \leq 0,05$) и достигала $(1275,5 \pm 99,6)$ мкм². При этом удельная поверхность клетки (SS_c) не изменялась, составляя в среднем $1,53$ мкм⁻¹. В гемолимфе росло число свободных гранул гематина.

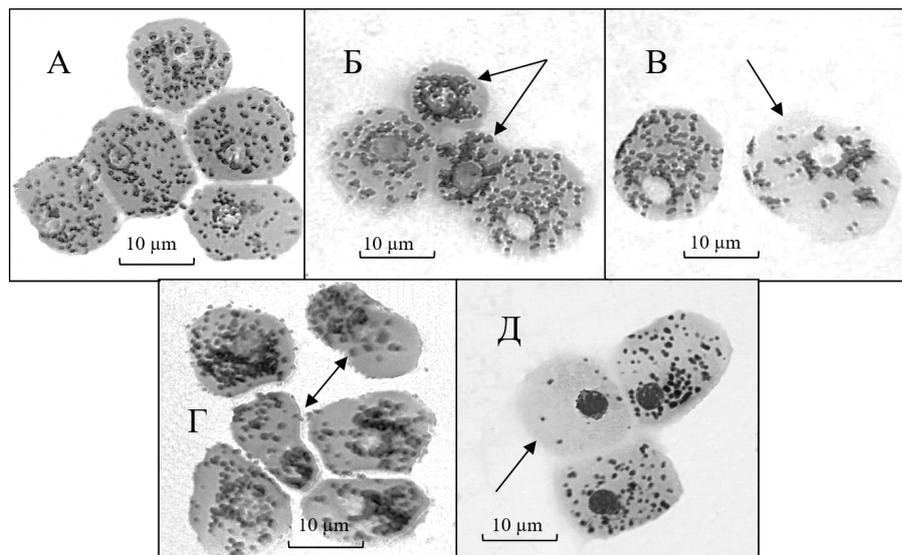


Рис. 1. Морфологические типы клеток в гемолимфе *Anadara kagoshimensis* (А — нормоциты; Б — микроциты; В — макроциты; Г — клетки с изменённой формой; Д — клетки с низким числом гранулярных включений)

Fig. 1. Morphological types of cells in *Anadara kagoshimensis* hemolymph (A, normocytes; Б, microcytes; В, macrocytes; Г, cells with an altered shape; Д, cells with a low number of granular inclusions)

На вторые сутки эксперимента ситуация была противоположной. Объём клетки существенно уменьшался (см. рис. 2): относительно контрольных значений снижение составило 36,4 % ($p \leq 0,05$), а относительно первых суток — 48,9 % ($p \leq 0,01$). Аналогичным образом менялись объём ядра и площадь поверхности эритроцита. Изменения были пропорциональными, что отражает сохранение значений индексов NCR и SS_c .

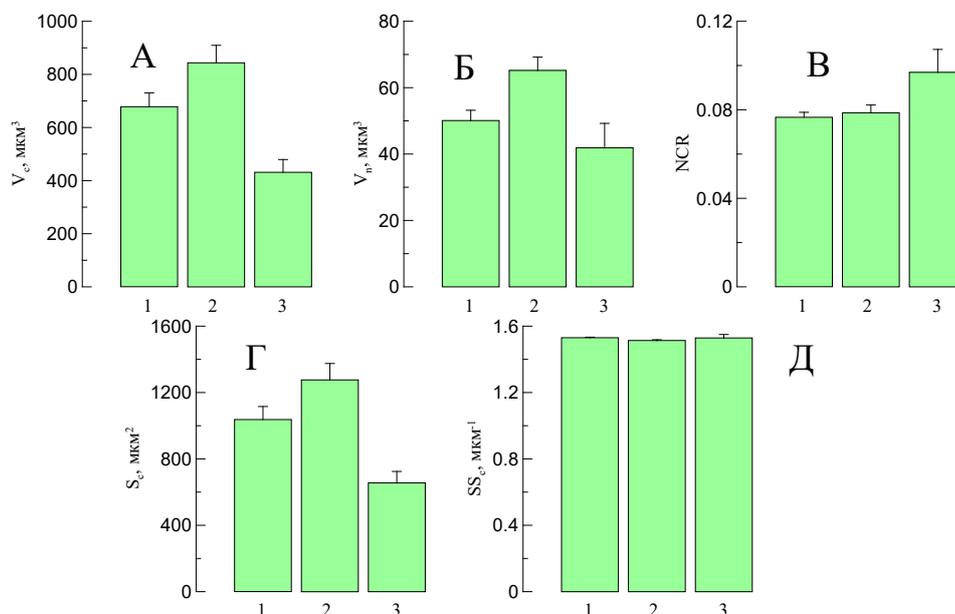


Рис. 2. Морфометрические характеристики эритроидных элементов гемолимфы *Anadara kagoshimensis* в условиях сероводородного заражения (А — V_c ; Б — V_n ; В — NCR; Г — S_c ; Д — SS_c ; 1 — контрольная группа; 2 — первые сутки эксперимента; 3 — вторые сутки эксперимента)

Fig. 2. Morphometric characteristics of erythroid elements of *Anadara kagoshimensis* hemolymph under conditions of hydrogen sulfide loading (A, V_c ; Б, V_n ; В, NCR; Г, S_c ; Д, SS_c ; 1, the control group; 2, the first day of the experiment; 3, the second day of the experiment)

Особенности морфологии. Анализ морфологических особенностей эритроидных клеток показал значительный рост числа микроцитов в гемолимфе моллюска в условиях сероводородной нагрузки (первые и вторые сутки эксперимента) (рис. 1Б, 3А). На них приходилось 6,6–7,0 % клеток, что было почти в три раза выше контрольных величин ($p < 0,05$). Микроциты отличались более низкими значениями поперечного диаметра клетки (менее 15 мкм). Следует обратить внимание и на увеличение числа макроцитов в гемолимфе моллюска на первые сутки эксперимента на 30–32 % ($p \leq 0,05$) (рис. 3Б). Поперечное сечение клетки у них превышало 22 мкм (рис. 1В).

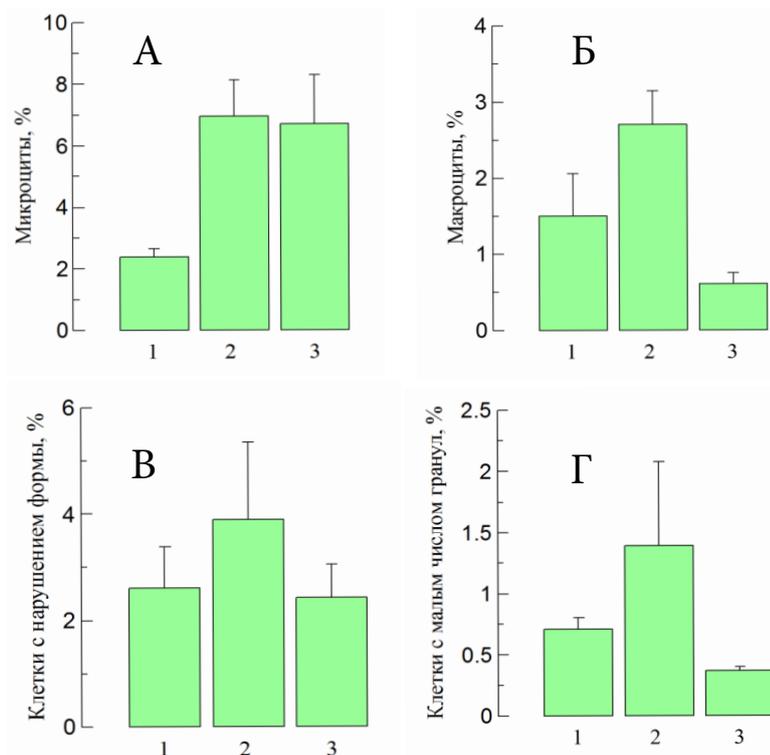


Рис. 3. Содержание клеток различных морфологических типов в гемолимфе *Anadara kagoshimensis* в условиях сероводородного заражения (А — микроциты; Б — макроциты; В — клетки с нарушенной формой; Г — клетки с малым числом зёрен; 1 — контрольная группа; 2 — первые сутки эксперимента; 3 — вторые сутки эксперимента)

Fig. 3. Content of cells of various morphological types in *Anadara kagoshimensis* hemolymph under conditions of hydrogen sulfide loading (A, microcytes; Б, macrocytes; В, cells with an altered shape; Г, cells with a small number of grains; 1, the control group; 2, the first day of the experiment; 3, the second day of the experiment)

В условиях сероводородной нагрузки (первые сутки эксперимента) в гемолимфе моллюска возрастало число эритроцитарных аномалий. Появлялись клетки с изменённой формой и крайне низким содержанием зернистых включений (рис. 1Г, Д). Их число увеличивалось на 30–50 % относительно контрольного уровня (рис. 3В, Г), однако различия, ввиду существенной индивидуальной вариабельности полученных величин, не были статистически значимы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Двукратное внесение Na_2S в воду аквариума, где находились моллюски, приводило к развитию неоднозначной ситуации:

- после первых суток в воде аквариумов развивалась умеренная гипоксия ($1,8 \text{ мг } \text{O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$), а сероводород не определялся, что, по-видимому, является следствием взаимодействия последнего с кислородом;

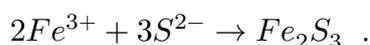
- повторное внесение Na_2S (вторые сутки) приводило к развитию аноксии с сохранением сероводородного заражения на уровне $1,9 \text{ мг S}^{2-} \cdot \text{л}^{-1}$.

Состояние эритроидной популяции клеток моллюска в каждом конкретном случае имело свою специфику.

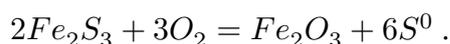
Первые сутки эксперимента. В сравнении с контролем эритроидная популяция клеток становилась более гетерогенной. Об этом свидетельствовали значительное увеличение содержания в гемолимфе макро- и микроцитов, а также повышение числа клеток с изменённой формой и сниженным числом зернистых включений в цитоплазме. Среднеклеточный объём рос более чем на 20 %. В основе увеличения клеточного объёма (V_c) могут лежать несколько процессов.

Учитывая то, что моллюски находились в условиях умеренной гипоксии, можно допустить развитие у клеток красной крови реакции набухания (swelling), которую отмечают у многих водных организмов, в том числе моллюсков [Новицкая, Солдатов, 2011; Holk, 1996; Jensen et al., 1998; Nikinmaa et al., 1987]. Считается, что эта реакция направлена на коррекцию величины внутриклеточного pH и определяется работой Na^+/H^+ -антипорта [Tufts, 1992]. Реакция контролируется катехоламинами (адреналином, норадреналином) и реализуется через β -адренорецепторы клеток и cAMP [Ferguson, Boutilier, 1988; Salama, Nikinmaa, 1990; Val et al., 1997]. В нашем случае можно ожидать рост содержания катехоламинов в гемолимфе моллюсков, так как переход к условиям умеренной гипоксии осуществлялся в относительно короткий промежуток времени. Однако данный процесс может определять рост объёма клеток не более чем на 5–6 % [Nikinmaa et al., 1987], что не вполне согласуется с представленными в настоящей работе величинами изменения клеточного объёма ($> 20 \%$). Даже если принять во внимание более высокую эластичность клеточных мембран моллюсков, косвенным отражением которой является более широкий диапазон осмотической резистентности их эритроидных элементов [Новицкая, Солдатов, 2011], этот рост можно рассматривать как чрезмерный.

Следует обратить внимание на увеличение содержания в гемолимфе анадары числа макроцитов, диаметр которых превышал 22 мкм. Рост уровня этих клеточных форм вполне может объяснить столь значительное увеличение среднеклеточного объёма (V_c). Появление их в гемолимфе моллюска обычно предшествует процессу апоптоза, когда клетка распадается на отдельные фрагменты (апоптотические тельца) [Манских, 2007]. В случае с анадарой эта реакция имеет адаптивное значение [Soldatov et al., 2018], поскольку при разрушении клетки в гемолимфу высвобождаются в значительном количестве зернистые включения, содержащие гематин [Holden et al., 1994; Vismann, 1993]. Гематины обладают высокой окислительной способностью и могут вступать во взаимодействие с сероводородом [Vismann, 1993]. Наиболее вероятный продукт этого взаимодействия — сульфид трёхвалентного железа:



Это нестойкое соединение, которое при наличии кислорода окисляется до оксида трёхвалентного железа с высвобождением атомарной серы:



Известна способность некоторых видов морских беспозвоночных в условиях сероводородного загрязнения накапливать серу [Powell et al., 1980], что позволяет допустить рассмотренный выше порядок событий. Увеличение содержания в гемолимфе анадары в условиях сероводородной нагрузки эритроцитов с пониженным числом зернистых включений позволяет также сделать допущение о способности этих клеток выводить за свои пределы гранулы гематина без нарушения собственной целостности.

Вторые сутки эксперимента. Отличительными чертами состояния популяции эритроидных элементов гемолимфы анадары на вторые сутки эксперимента являлись высокое содержание в ней микроцитов и значительное уменьшение средноклеточного объёма (V_c). Последнее, по видимому, определялось понижением числа макроцитов в гемолимфе моллюска, так как содержание микроцитов на первые и вторые сутки эксперимента было близким. Рост числа микроцитов в гемолимфе может быть обусловлен несколькими процессами.

Первый процесс — фрагментация участков цитоплазмы клеток красной крови, которая приводит к образованию шистоцитов. При этом происходит уменьшение размеров самой клетки (образование микроцитов). Это явление отмечено для организмов различного уровня организации, включая человека [Bessman, 1988]. Оно обычно наблюдается при развитии анемичных состояний. Показано оно и для анадары в условиях внешней аноксии [Soldatov et al., 2021]. Вероятно, это основной процесс, который за относительно короткий период времени приводит к образованию большого числа микроцитов в гемолимфе моллюска.

Близким к фрагментации является процесс прямого деления узкоспециализированных клеток (амитоз), к которым относятся и эритроциты. При нём происходит случайное распределение ядерного материала [Fuller, Shields, 1998]. Частным проявлением этого процесса является образование безъядерных клеток и микроцитов; оно происходит в случае, если ядро перед процессом цитокинеза (образования перетяжки) смещается в сторону одного из полюсов клетки. Такое явление описано и для анадары [Novitskaya, Soldatov, 2013]. Его можно наблюдать и у клеток неправильной формы в настоящей работе (рис. 1Г).

Образование микроцитов возможно также при интенсивном гемопоэзе (эритропоэзе), который чаще всего отмечают в условиях дефицита кислорода, что совпадает с условиями, в которых находится анадара. Однако сведения по этому вопросу в отношении моллюсков крайне ограничены [Furuta, Yamaguchi, 2001], что не позволяет принять такую трактовку за основу.

Заключение. В условиях краткосрочной сероводородной нагрузки (первые сутки) популяция эритроидных элементов анадары становится более гетерогенной. В гемолимфе повышается содержание микро- и макроцитов, увеличивается число клеток с изменённой формой и низким содержанием зернистых включений в цитоплазме. Число свободных гранул гематина в гемолимфе существенно повышается. Средноклеточный объём (V_c) увеличивается более чем на 20 %. Пребывание в условиях повышенной концентрации сульфидов в течение вторых суток приводит к значительному понижению V_c , что определяется существенным сокращением популяции макроцитов в гемолимфе моллюсков.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Функциональные, метаболические и молекулярно-генетические механизмы адаптации морских организмов к условиям экстремальных экотопов Чёрного и Азовского морей и других акваторий Мирового океана» (№ 124030100137-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Заика В. Е., Коновалов С. К., Сергеева Н. Г. Локальные и сезонные явления гипоксии на дне севастопольских бухт и их влияние на макробентос // *Морской экологический журнал*. 2011. Т. 10, № 3. С. 15–25. [Zaika V. E., Konovalev S. K., Sergeeva N. G. The events of local and seasonal hypoxia at the bottom of the Sevastopol bays and their influence on macrobenthos. *Morskoy ekologicheskij zhurnal*, 2011, vol. 10, no. 3, pp. 15–25. (in Russ.)]. <https://repository.marine-research.ru/handle/299011/1167>
2. Киселёва М. И. Сравнительная характеристика донных сообществ у берегов Кавказа // *Многолетние изменения зообентоса Чёрного моря*. Киев : Наукова думка, 1992. С. 84–99. [Kiseleva M. I. Sravnitel'naya kharakteristika donnykh soobshchestv u beregov Kavkaza. *Mnogoletnie izmeneniya zoobentosa*

- Chernogo morya*. Kyiv : Naukova dumka, 1992, pp. 84–99. (in Russ.). <https://repository.marine-research.ru/handle/299011/5644>
3. Манских В. Н. Пути гибели клетки и их биологическое значение // *Цитология*. 2007. Т. 49, № 11. С. 909–915. [Manskikh V. N. Pathways of cell death and their biological importance. *Tsitologiya*, 2007, vol. 49, no. 11, pp. 909–915. (in Russ.)]
 4. Новицкая В. Н., Солдатов А. А. Эритроидные элементы гемолимфы *Anadara inaequalis* (Mollusca: Arcidae) в условиях экспериментальной аноксии: функциональные и морфометрические характеристики // *Морской экологический журнал*. 2011. Т. 10, № 1. С. 56–64. [Novitskaja V. N., Soldatov A. A. Erythroid elements of hemolymph in *Anadara inaequalis* (Mollusca: Arcidae) under conditions of experimental anoxia: Functional and morphometric characteristics. *Morskoy ekologicheskij zhurnal*, 2011, vol. 10, no. 1, pp. 56–64. (in Russ.)]. <https://repository.marine-research.ru/handle/299011/1138>
 5. Орехова Н. А., Коновалов С. К. Кислород и сульфиды в донных отложениях прибрежных районов севастопольского региона Крыма // *Океанология*. 2018. Т. 58, № 5. С. 739–750. [Orehova N. A., Kononov S. K. Oxygen and sulfides in bottom sediments of the coastal Sevastopol region of Crimea. *Okeanologiya*, 2018, vol. 58, no. 5, pp. 739–750. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S0030157418050106>
 6. Подымов О. И. Количественные оценки гидрхимических характеристик редокс-слоя Чёрного моря с помощью проблемно ориентированной базы данных : автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук : 25.00.28. Москва, 2005. 21 с. [Podymov O. I. *Kolichestvennye otsenki gidrokhimicheskikh kharakteristik redoks-sloya Chernogo morya s pomoshch'yu problemno orientirovannoi bazy dannykh* : avtoref. dis. ... kand. fiz.-mat. nauk : 25.00.28. Moscow, 2005, 21 p. (in Russ.)]
 7. Ревков Н. К. Особенности колонизации Чёрного моря недавним вселенцем – двустворчатым моллюском *Anadara kagoshimensis* (Bivalvia: Arcidae) // *Морской биологический журнал*. 2016. Т. 1, № 2. С. 3–17. [Revkov N. K. Colonization's features of the Black Sea basin by recent invader *Anadara kagoshimensis* (Bivalvia: Arcidae). *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2016, vol. 1, no. 2, pp. 3–17. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2016.01.2.01>
 8. Чижевский А. Л. Структурный анализ движущейся крови. Москва : Изд-во АН СССР, 1959. 474 с. [Chizhevsky A. L. *Strukturnyi analiz dvizhushcheysya krovi*. Moscow : Izd-vo AN SSSR, 1959, 474 p. (in Russ.)]
 9. Arp A. J., Childress J. J. Blood function in the hydrothermal vent vestimentiferan tube worm. *Science*, 1981, vol. 213, no. 4505, pp. 342–344. <https://doi.org/10.1126/science.213.4505.342>
 10. Arp A. J., Childress J. J. Sulfide binding by the blood of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*. *Science*, 1983, vol. 219, no. 4582, pp. 295–297. <https://doi.org/10.1126/science.219.4582.295>
 11. Bessman J. D. Red blood cell fragmentation: Improved detection and identification of causes. *American Journal of Clinical Pathology*, 1988, vol. 90, iss. 3, pp. 268–273. <https://doi.org/10.1093/ajcp/90.3.268>
 12. Buck L. T. Succinate and alanine as anaerobic end-products in the diving turtle (*Chrysemys picta bellii*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, vol. 126, iss. 3, pp. 409–413. [https://doi.org/10.1016/s0305-0491\(00\)00215-7](https://doi.org/10.1016/s0305-0491(00)00215-7)
 13. Chew S. F., Gan J., Ip Y. K. Nitrogen metabolism and excretion in the swamp eel, *Monopterus albus*, during 6 or 40 days of estivation in mud. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2005, vol. 78, no. 4, pp. 620–629. <https://doi.org/10.1086/430233>
 14. Cortesi P., Cattani O., Vitali G. Physiological and biochemical responses of the bivalve *Scapharca inaequalis* to hypoxia and cadmium exposure: Erythrocytes versus other tissues. In: *Marine Coastal Eutrophication* : proceedings of an International Conference, Bologna, Italy, 21–24 March, 1990. Amsterdam, the Netherlands : Elsevier, 1992, pp. 1041–1054. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-89990-3.50090-0>
 15. Ferguson R. A., Boutilier R. G. Metabolic energy production during adrenergic pH regulation in red cells of the Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Respiration Physiology*, 1988, vol. 74, iss. 1, pp. 65–76. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(88\)90141-7](https://doi.org/10.1016/0034-5687(88)90141-7)
 16. Fuller G. M., Shields D. *Molecular Basis of Medical Cell Biology*. Stamford, Connecticut : Appleton & Lange, 1998, 231 p.

17. Furuta E., Yamaguchi K. Haemolymph: Blood cell morphology and function. In: *The Biology of Terrestrial Molluscs* / G. M. Barker (Ed.). Wallingford, UK ; New York, USA : CABI Publishing, 2001, pp. 289–306. <http://doi.org/10.1079/9780851993188.0289>
18. Hochachka P. W., Somero G. N. *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford : Oxford University Press, 2002, 356 p.
19. Holden J. A., Pipe R. K., Quaglia A., Ciani G. Blood cells of the arcid clam, *Scapharca inaequivalvis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1994, vol. 74, iss. 2, pp. 287–299. <https://doi.org/10.1017/S0025315400039333>
20. Holk K. Effects of isotonic swelling on the intracellular Bohr factor and the oxygen affinity of trout and carp blood. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1996, vol. 15, pp. 371–375. <https://doi.org/10.1007/BF01875579>
21. Houchin D. N., Munn J. I., Parnell B. L. A method for the measurement of red cell dimensions and calculation of mean corpuscular volume and surface area. *Blood*, 1958, vol. 13, no. 12, pp. 1185–1191. <https://doi.org/10.1182/blood.V13.12.1185.1185>
22. Isani G., Cattani O., Tacconi S. Energy metabolism during anaerobiosis and recovery in the posterior adductor muscle of the bivalve *Scapharca inaequivalvis* (Bruguière). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1989, vol. 93, iss. 1, pp. 193–200. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(89\)90235-6](https://doi.org/10.1016/0305-0491(89)90235-6)
23. Jensen F. B., Fago A., Weber R. E. Hemoglobin structure and function. In: *Fish Respiration* / S. F. Perry, B. L. Tufts (Eds). San Diego, CA : Academic Press, 1998, pp. 1–40. (Fish Physiology ; vol. 17). [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60257-5](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60257-5)
24. Miyamoto Y., Iwanaga C. Effects of sulphide on anoxia-driven mortality and anaerobic metabolism in the ark shell *Anadara kagoshimensis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2017, vol. 97, iss. 2, pp. 329–336. <https://doi.org/10.1017/S0025315416000412>
25. Nakano T., Yamada K., Okamura K. Duration rather than frequency of hypoxia causes mass mortality in ark shells (*Anadara kagoshimensis*). *Marine Pollution Bulletin*, 2017, vol. 125, iss. 1–2, pp. 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.073>
26. Nikinmaa M., Cech J. J., Ryhänen L., Salama A. Red cell function of carp (*Cyprinus carpio*) in acute hypoxia. *Experimental Biology*, 1987, vol. 47, iss. 1, pp. 53–58.
27. Novitskaya V. N., Soldatov A. A. Peculiarities of functional morphology of erythroid elements of hemolymph of the bivalve mollusk *Anadara inaequivalvis*, the Black Sea. *Hydrobiological Journal*, 2013, vol. 49, iss. 6, pp. 64–71. <https://doi.org/10.1615/hydrobj.v49.i6.60>
28. Powell E. N., Crenshaw M. A., Rieger R. W. Adaptations to sulfide in sulfide-system meiofauna. End-products of sulfide detoxification in three turbellarians and a gastrotrich. *Marine Ecology Progress Series*, 1980, vol. 2, pp. 169–177.
29. Salama A., Nikinmaa M. Effect of oxygen tension on catecholamine-induced formation of cAMP and on swelling of carp red blood cells. *American Journal of Physiology—Cell Physiology*, 1990, vol. 259, iss. 5, pt 1, pp. C723–C726. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1990.259.5.c723>
30. Soldatov A. A., Andreenko T. I., Sysoeva I. V., Sysoev A. A. Tissue specificity of metabolism in the bivalve mollusc *Anadara inaequivalvis* Br. under conditions of experimental anoxia. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 2009, vol. 45, iss. 3, pp. 349–355. <https://doi.org/10.1134/S002209300903003X>
31. Soldatov A. A., Kukhareva T. A., Andreeva A. Y., Efremova E. S. Erythroid elements of hemolymph in *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) under conditions of the combined action of hypoxia and hydrogen sulfide contamination. *Russian Journal of Marine Biology*, 2018, vol. 44, iss. 6, pp. 452–457. <https://doi.org/10.1134/S1063074018060111>
32. Soldatov A., Kukhareva T., Morozova V., Richkova V., Andreyeva A., Bashmakova A. Morphometric parameters of erythroid hemocytes of alien mollusc *Anadara kagoshimensis* under normoxia and anoxia. *Ruthenica, Russian Malacological Journal*, 2021, vol. 31, no. 2, pp. 77–86. [https://doi.org/10.35885/ruthenica.2021.31\(2\).3](https://doi.org/10.35885/ruthenica.2021.31(2).3)
33. Tufts B. *In vitro* evidence for sodium-dependent pH regulation in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) red blood cell. *Canadian Journal of Zoology*, 1992, vol. 70, no. 3, pp. 411–416. <http://doi.org/10.1139/z92-062>

34. Val A. L., De Menezes G. C., Wood C. M. Red blood cell adrenergic responses in Amazonian teleosts. *Journal of Fish Biology*, 1997, vol. 52, iss. 1, pp. 83–93. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb01554.x>
35. Vismann B. Hematin and sulfide removal in hemolymph of the hemoglobin-containing bivalve *Scapharca inaequivalvis*. *Marine Ecology Progress Series*, 1993, vol. 98, pp. 115–122. <http://doi.org/10.3354/meps098115>

MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF ERYTHROID ELEMENTS OF ANADARA KAGOSHIMENSIS (TOKUNAGA, 1906) HEMOLYMPH UNDER CONDITIONS OF HYDROGEN SULFIDE LOADING

A. Soldatov^{1,2}, V. Rychkova¹, and T. Kukhareva¹

¹A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation

²Sevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: alekssoldatov@yandex.ru

The effect of hydrogen sulfide loading on the morphometric characteristics of erythroid elements of *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) hemolymph was studied experimentally. The work was carried out on adult molluscs with a shell height of 26–38 mm. Molluscs of the control group were kept in an aquarium with oxygen concentration of 7.0–7.1 mg O₂·L⁻¹ (normoxia). Molluscs of the experimental group were exposed to hydrogen sulfide loading created by Na₂S donor dissolving in water to a final concentration of 6 mg S²⁻·L⁻¹. A day later, the oxygen level in water amounted to 1.8 mg O₂·L⁻¹, and hydrogen sulfide was not detected. Some of molluscs were subjected to repeated hydrogen sulfide loading by Na₂S adding up to a final concentration of 9 mg S²⁻·L⁻¹. By the end of the second day, 1.9 mg S²⁻·L⁻¹ and 0.03 mg O₂·L⁻¹ (trace oxygen concentration) were recorded in water. Under conditions of short-term hydrogen sulfide loading (the first day), the population of *A. kagoshimensis* erythroid elements became more heterogeneous. In the hemolymph, the content of micro- and macrocytes increased; the number of cells with an altered shape and low content of granular inclusions in the cytoplasm rose. The number of free hematin granules in the hemolymph significantly increased. The mean cell volume (V_c) rose by more than 20%. Exposure to increased concentration of sulfides for two days led to a noticeable decrease in V_c, which is determined by a significant reduction in the population of macrocytes in the hemolymph of molluscs.

Keywords: molluscs, *Anadara kagoshimensis*, hydrogen sulfide, hemolymph, erythroid elements