

НАУЧНЫЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 594-111.11:[551.464.6:546.221.1]

**ЭРИТРОИДНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ГЕМОЛИМФЫ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА
ANADARA KAGOSHIMENSIS (ТОКУНАГА, 1906)
В УСЛОВИЯХ СЕРОВОДОРОДНОЙ НАГРУЗКИ:
ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ И СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ**

© 2025 г. Ю. В. Богданович¹, А. А. Солдатов^{1,2}, Н. Е. Шалагина¹, В. Н. Рычкова¹

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 25.02.2025; после доработки 25.02.2025;
принята к публикации 12.08.2025.

Нарушение баланса между окислением органического вещества и поступлением кислорода приводит к формированию в водной толще устойчивых во времени редокс-зон. На шельфе это обычно происходит вследствие отсутствия сквозной вертикальной конвекции и образования локальных зон гниения мёртвого органического вещества. Функциональные аспекты устойчивости ряда бентосных организмов к подобным условиям представляют определённый интерес. В настоящей работе исследован двустворчатый моллюск *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906), способный переносить условия сероводородного заражения. При помощи методов проточной цитометрии и световой микроскопии экспериментально изучено влияние сероводородной нагрузки на морфофункциональные характеристики эритроидных элементов моллюска. Работа выполнена на взрослых особях с высотой раковины 23–34 мм. Контрольную группу *A. kagoshimensis* содержали в аквариуме с концентрацией кислорода 7,0–8,2 мг $O_2 \cdot л^{-1}$ (нормоксия). У опытной группы сначала в течение 2 ч понижали уровень кислорода до 0,1 мг $O_2 \cdot л^{-1}$ (барботаж воды азотом). Затем в воду вносили Na_2S до финальной концентрации 6 мг $S^{2-} \cdot л^{-1}$. При наличии сероводорода выявлен значительный рост объёма эритроидных элементов гемолимфы анадары (более 40 %, $p < 0,01$), происходящий на фоне существенного повышения величины флуоресценции родамина 123 (R123) и 2'-7'-дихлорфлуоресцеин-диацетата (DCF-DA) (2–3 раза, $p < 0,01$), что отражает усиление окислительных процессов в клетках и их возможный лизис. Последний позволяет освобождать гранулы, содержащие гематин, который способен нейтрализовать сульфиды. Отмеченная реакция, по-видимому, имеет адаптивное значение. Рост величин бокового светорассеяния и флуоресценции SYBR Green I отражает увеличение числа гранулярных включений в клетках красной крови при наличии сероводорода и повышение функциональной активности их ядер.

Ключевые слова: *Anadara kagoshimensis*, сероводород, гемолимфа, эритроидные элементы, морфология, проточная цитометрия

Тихоокеанский двустворчатый моллюск *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) впервые был обнаружен у побережья Кавказа в 1968 г. [Киселёва, 1992]. В настоящее время его массовые поселения регистрируют в основном вдоль кавказского и румынского побережий Чёрного моря [Ревков, 2016]. Этот моллюск активно осваивает шельфовую зону

Азовского моря [Живоглядова и др., 2021] и уже фактически превратился в одну из руководящих форм бентоса [Ревков, 2016]. Столь быстрое освоение Азово-Черноморского региона связывают с адаптационной пластичностью анадары, в частности со способностью к существованию в условиях низкого содержания кислорода и сероводородного заражения.

Специальные исследования показали, что организм *A. kagoshimensis* может поддерживать высокий энергетический статус тканей в условиях острой гипоксии [Cortesi et al., 1992]. При этом интенсивность аэробного обмена в тканях анадары существенно ниже, чем в тканях других видов двустворок [Андреенко и др., 2009]. Моллюск устойчив к наличию сероводорода в воде [Miyamoto, Iwanaga, 2017], что отчасти связывают с тем, что в клетках его гемолимфы есть особые зернистые включения, содержащие гематин [Holden et al., 1994; Vismann, 1993]. Показано, что плотность этих образований существенно возрастает в условиях экспериментальной сероводородной нагрузки [Soldatov et al., 2018].

Определённые эффекты выявлены также в реакции клеточных систем анадары на гипоксию и наличие сероводорода [Soldatov et al., 2018, 2021]. Они касаются в основном функциональной морфологии клеток — объёма, удельной поверхности и ядерно-цитоплазматических отношений. Настоящая работа является продолжением ранее начатых исследований.

Цель работы — на основе методов проточной цитометрии и световой микроскопии в условиях эксперимента *in vivo* оценить влияние сероводорода на функциональные характеристики эритроидных элементов гемолимфы *Anadara kagoshimensis*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования послужили взрослые особи анадары. Моллюсков собирали в акватории бухты Ласпи (Крым). Размеры раковины — 23–34 мм (от замка до края створки).

Экспериментальная схема. Моллюсков разделили на две группы — контрольную и опытную. Контрольную содержали при концентрации кислорода 7,0–8,2 мг $O_2 \cdot л^{-1}$. У опытной группы сначала в течение 2 ч понижали уровень кислорода до 0,1 мг $O_2 \cdot л^{-1}$ (барботажа воды азотом). Затем в воду вносили Na_2S до финальной концентрации 6 мг $S^{2-} \cdot л^{-1}$. Наличие в воде сульфид-иона приводило к её защелачиванию, которое компенсировали внесением 0,1 н HCl. Значения pH удерживали на уровне 8,2–8,3. Экспозиция для контрольной и опытной группы составляла 48 ч. Моллюсков содержали при температуре воды +17...+20 °С.

Уровень кислорода в воде контролировали при помощи оксиметра DO Meter ST300D (Ohaus, США). Величину pH определяли на pH-метре inoLab pH 720 (Германия). Содержание сульфид-иона в воде устанавливали потенциометрически посредством сульфидселективного сенсора MSBS (Нидерланды).

Отбор образцов гемолимфы. Гемолимфу получали при помощи шприца пункцией экстрапаллиального пространства. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (Richter, Венгрия). Полученный образец делили на две части. Одну использовали для изготовления мазков. Вторую часть трижды отмывали от плазмы центрифугированием при 500 g в течение 5 мин при +4 °С. В работе применяли рефрижераторную центрифугу Eppendorf 5424 R (Германия). Клетки ресуспензировали в стерилизованной морской воде. Полученные образцы использовали для проведения цитометрических исследований.

Проточная цитометрия. Часть суспензии эритроцитов окрашивали SYBR Green I (Sigma Aldrich, США). Финальная концентрация в пробе составляла 10 мкМ, время инкубации в темноте — 40 мин. Флуоресценцию этого ДНК-красителя анализировали на канале FL1 (экстинкция — 497 нм, эмиссия — 521 нм). Характер распределения клеток во взвеси классифицировали на основании их относительного размера — по величине прямого рассеяния (forward scatter, FS) и бокового (side scatter, SS).

Способность эритроцитов к спонтанной продукции активных форм кислорода оценивали по флуоресценции красителя 2'-7'-дихлорфлуоресцеин-диацетата (DCF-DA, Sigma Aldrich). Для этого 1 мл суспензии эритроцитов инкубировали с 10 мкл раствора DCF-DA в течение 40 мин в темноте. Финальная концентрация красителя в пробе составляла 10 мкМ. Его флуоресценцию анализировали на канале FL1 (экстинкция — 485 нм, эмиссия — 525 нм).

Изменения мембранного потенциала митохондрий в эритроцитах контролировали по интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных родамином 123 (R123) (Molecular Probes, США). Эритроциты окрашивали R123 в течение 40 мин. Его концентрация в пробе составляла 2,5 мкМ. Интенсивность флуоресценции определяли на канале FL1 (экстинкция — 508 нм, эмиссия — 528 нм).

Все измерения выполняли на проточном цитометре Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США), оборудованном однофазным аргоновым лазером (длина волны — 488 нм).

Световая микроскопия. Часть образцов гемолимфы использовали при изготовлении мазков, которые окрашивали по комбинированному методу Паппенгейма (Май — Грюнвальд + Романовский — Гимза) [Золотницкая, 1987], и применяли для оценки морфометрических характеристик клеток красной крови. При помощи светового микроскопа Biomed PR-2 Lum (увеличение 100х, производство Китай — Россия), оборудованного камерой Levenhuk C NG Series, по фотографиям (программа ImageJ 1.44p) определяли большой и малый диаметры клеток (C_1 и C_2 соответственно) и их ядер (N_1 и N_2). Объём выборки — 100 клеток на мазок. На основании полученных значений по известным алгоритмам рассчитывали средноклеточный объём (V_c) [Houchin et al., 1958], объём ядра (V_n) [Tască, 1976] и ядерно-цитоплазматическое отношение (nuclear-cytoplasmic ratio, NCR):

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

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

$$NCR = \frac{V_n}{V_c}.$$

Статистическая обработка. Результаты представлены как $M \pm m$. Статистические сравнения проведены на основе непараметрического U -критерия Манна — Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Статистическая обработка и графическое оформление полученной информации выполнены при помощи стандартного программного обеспечения MS Office Excel 2010. Объём выборочных совокупностей показан на графиках.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проточная цитометрия. Анализ прямого (FS) и бокового (SS) светорассеяния эритроцитарной взвеси в условиях сероводородной нагрузки показал рост значений обоих показателей (рис. 1). В случае с SS различия были достоверными ($p < 0,001$).

Значительный рост флуоресценции при наличии H_2S отмечен также в отношении SYBR Green I, R123 и DCF-DA (рис. 2) — в 1,7 раза ($p < 0,05$), 1,9 раза ($p < 0,01$) и 3,2 раза ($p < 0,001$) соответственно.

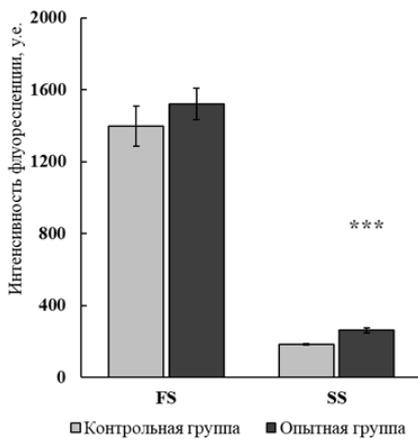


Рис. 1. Показатели прямого (FS) и бокового (SS) светорассеяния взвесей эритроидных клеток гемолимфы *Anadara kagoshimensis* в условиях сероводородной нагрузки (***) — $p < 0,001$)

Fig. 1. Parameters of forward scatter (FS) and side scatter (SS) of suspensions of erythroid cells in *Anadara kagoshimensis* hemolymph under hydrogen sulfide loading (***, $p < 0.001$)

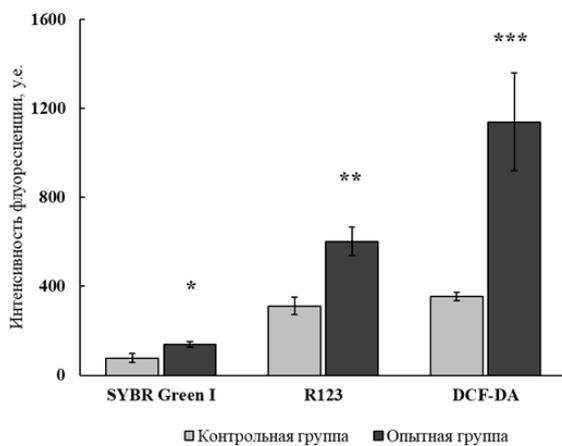


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции SYBR Green I, R123 и DCF-DA взвесей эритроидных клеток гемолимфы *Anadara kagoshimensis* в условиях сероводородной нагрузки (* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$)

Fig. 2. Fluorescence intensity of SYBR Green I, R123, and DCF-DA suspensions of erythroid cells in *Anadara kagoshimensis* hemolymph under hydrogen sulfide loading (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)

Морфометрия эритроидных клеток. При наличии сероводорода зарегистрирован рост объёма клеток и количества зернистых включений в них (рис. 3). Об этом же свидетельствуют данные морфометрии. Продольные и поперечные оси эритроидных клеток (C_1 и C_2) увеличивались на 20–21 % ($p < 0,05$ для C_2) (рис. 4). Объём клеток при этом повышался более чем на 40 % ($p < 0,01$). В ядрах клеток происходили аналогичные изменения, однако выражены они были слабо ($p > 0,05$) (рис. 5). Расчёт NCR также не показал наличия статистически значимых изменений: контроль — $(0,120 \pm 0,020)$; опыт — $(0,090 \pm 0,004)$.

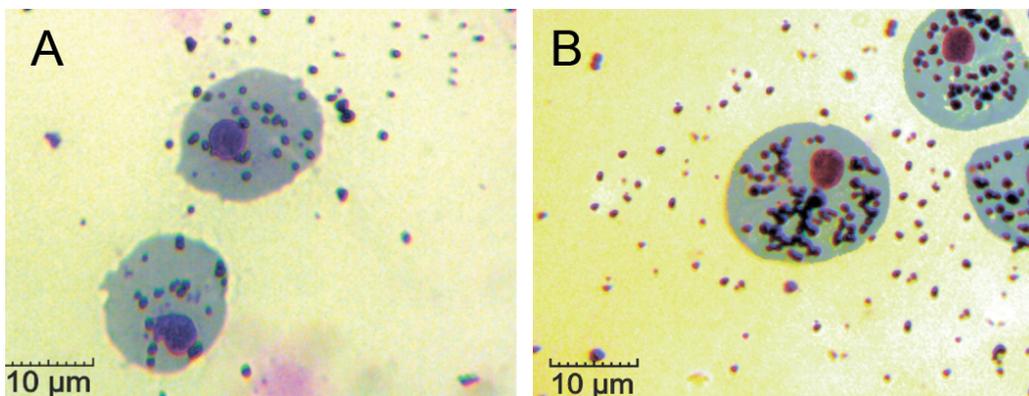


Рис. 3. Эритроидные элементы гемолимфы *Anadara kagoshimensis* (A — нормоксия; B — сероводородное заражение)

Fig. 3. Erythroid cells in *Anadara kagoshimensis* hemolymph (A, normoxia; B, hydrogen sulfide contamination)

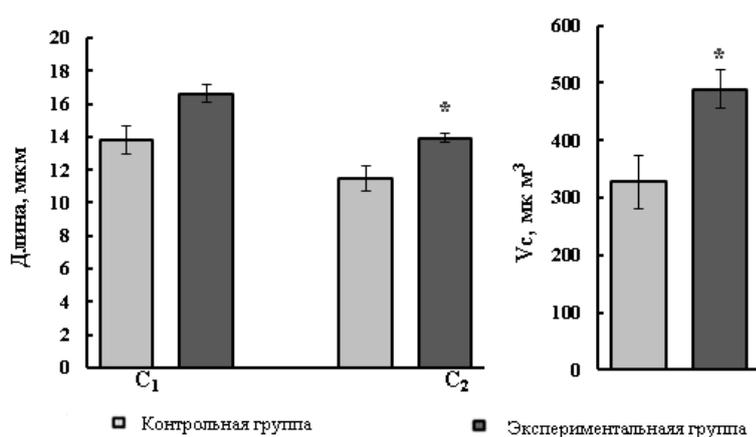


Рис. 4. Морфометрические характеристики эритроидных элементов гемолимфы *Anadara kagoshimensis* в условиях нормоксии и сероводородной нагрузки (C₁ — большой диаметр клетки; C₂ — малый диаметр клетки; V_c — клеточный объём; * — $p < 0,01$)

Fig. 4. Morphometric characteristics of erythroid cells in *Anadara kagoshimensis* hemolymph under normoxia and hydrogen sulfide loading (C₁, large cell diameter; C₂, small cell diameter; V_c, cell volume; *, $p < 0.01$)

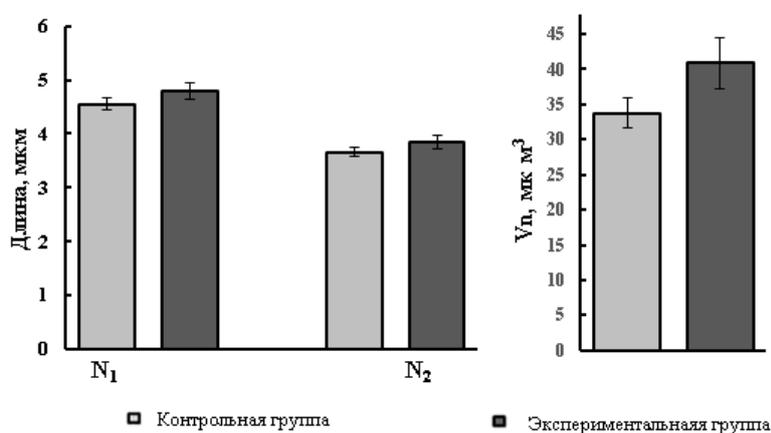


Рис. 5. Морфометрические характеристики ядер эритроидных элементов гемолимфы *Anadara kagoshimensis* в условиях нормоксии и сероводородной нагрузки (N₁ — большой диаметр ядра; N₂ — малый диаметр ядра; V_n — объём ядра)

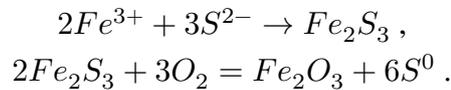
Fig. 5. Morphometric characteristics of nuclei of erythroid cells in *Anadara kagoshimensis* hemolymph under normoxia and hydrogen sulfide loading (N₁, large nucleus diameter; N₂, small nucleus diameter; V_n, nucleus volume)

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты эксперимента показали, что сероводородная нагрузка вызывала ряд однозначных изменений в состоянии эритроидных элементов гемолимфы анадары — рост объёма клеток, а также увеличение SS клеточных взвесей и интенсивности флуоресценции SYBR Green I, R123 и DCF-DA.

Наличие сероводорода в морской среде обычно регистрируют на фоне острых форм гипоксии, для которых характерно набухание (swelling) клеток красной крови [Holk, 1996; Nikinmaa et al., 1987]. Ранее подобная реакция была отмечена нами у *A. kagoshimensis* в условиях как внешнего дефицита кислорода, так и комбинированного действия двух факторов [Soldatov et al., 2018]. Известно, что гипоксия активизирует работу Na⁺/H⁺-антипорта в клетках красной крови рыб [Salama, Nikinmaa, 1990; Val et al., 1997]. Реакция ещё более выражена при наличии катехоламинов (адреналина, норадреналина), продукция которых может усиливаться в условиях экспериментальных нагрузок. Показано, что ядерные эритроциты содержат β-адренорецепторы, через которые гормоны индуцируют выработку cAMP в клетках [Salama, Nikinmaa, 1990; Val et al., 1997]. При этом клеточный объём увеличивается обычно не более чем на 5–6 % [Nikinmaa et al., 1987]. В нашем случае рост превысил 40 %. Подобное состояние чаще всего предшествует апоптозу — процессу, при котором клетка распадается на отдельные фрагменты (апоптотические тельца) [Манских, 2007]. Лизис эритроидных элементов у анадары в условиях сероводородной нагрузки был отмечен нами ранее [Soldatov et al., 2018]. Реакция имела адаптивное значение, так как сопровождалась сбросом гранулярных включений, способных нейтрализовать сульфиды [Holden et al., 1994; Vismann, 1993].

Рост SS, зарегистрированный в настоящей работе, хорошо согласуется с увеличением зернистости эритроидных клеток, которое ранее было показано визуально для *A. kagoshimensis* при наличии сероводорода [Soldatov et al., 2018]. В составе зернистых включений выявлены гематины [Vismann, 1993], способные вступать в реакцию с сульфидами с образованием серы:



Можно допустить, что данные реакции протекают и в гемолимфе анадары, если принять во внимание, что некоторые виды морских беспозвоночных способны накапливать серу при наличии сульфидов в морской воде [Powell et al., 1980].

Увеличение интенсивности флуоресценции SYBR Green I в эритроцитах *A. kagoshimensis* при наличии сероводорода, показанное в настоящей работе, пока сложно интерпретировать, так как механизм взаимодействия этого флуорохрома с молекулой ДНК до конца не известен. Однако некоторые авторы считают, что почти во всех случаях это отражает рост функциональной активности ядра клеток [Cerca et al., 2011]. Учитывая то, что объём ядер эритроидных элементов анадары при наличии H_2S увеличивался на фоне роста зернистости цитоплазмы клетки, мы также можем принять за основу эту точку зрения.

Значительный рост флуоресценции R123 и DCF-DA в эритроидных элементах гемолимфы *A. kagoshimensis* в условиях сероводородной нагрузки, зарегистрированный в настоящей работе, отражает увеличение мембранного потенциала митохондрий и повышение уровня активных форм кислорода. В целом это свидетельствует о существенном усилении окислительных процессов в клетке, что должно сопровождаться их лизисом. Отмеченное выше чрезмерное увеличение клеточного объёма, скорее всего, отражает этот процесс. Разрушение клеток сопровождается выбросом зернистых включений, содержащих гематин, который способен нейтрализовать сульфиды в гемолимфе моллюска. Эта реакция, по-видимому, имеет адаптивное значение и затрагивает именно клетки красной крови. В других соматических тканях (жабры, гепатопанкреас, нога) она фактически не выражена [Soldatov et al., 2022].

Заключение. Экспериментально выявлено, что в условиях сероводородной нагрузки значительно возрастал объём эритроидных элементов гемолимфы моллюска *Anadara kagoshimensis* на фоне существенного повышения величины флуоресценции R123 и DCF-DA, что отражает усиление окислительных процессов в клетках и их возможный лизис. Последний позволяет освобождать гранулы, содержащие гематин, который способен нейтрализовать сульфиды. Отмеченная реакция, по-видимому, имеет адаптивное значение. Рост величин бокового светорассеяния и флуоресценции SYBR Green I отражает увеличение числа гранулярных включений в клетках красной крови при наличии сероводорода и повышение функциональной активности их ядер.

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» (№ гос. регистрации 124030100137-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Андреев Т. И., Солдатов А. А., Головина И. В. Адаптивная реорганизация метаболизма у двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis* Bruguiere в условиях экспериментальной аноксии // *Доповіди Національної академії наук України*. 2009. № 7. С. 155–160. [Andreenko T. I., Soldatov A. A., Golovina I. V. Adaptive reorganization of metabolism in bivalve mollusk (*Anadara inaequalis* Bruguiere) under experimental anoxia. *Dopovidi Natsional'noi*

- akademii nauk Ukrainy*, 2009, no. 7, pp. 155–160. (in Russ.)). <https://repository.marine-research.ru/handle/299011/14288>
2. Живоглядова Л. А., Ревков Н. К., Фроленко Л. Н., Афанасьев Д. Ф. Экспансия двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) в Азовском море // *Российский журнал биологических инвазий*. 2021. Т. 14, № 1. С. 83–94. [Zhivoglyadova L. A., Revkov N. K., Frolenko L. N., Afanasyev D. F. The expansion of the bivalve mollusk *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) in the Sea of Azov. *Rossiiskii zhurnal biologicheskikh invazii*, 2021, vol. 14, no. 1, pp. 83–94. (in Russ.)). <https://doi.org/10.35885/1996-1499-2021-14-1-83-94>
 3. Золотницкая Р. П. Методы гематологических исследований // *Лабораторные методы исследования в клинике : справочник* / ред. В. В. Меньшиков. Москва : Медицина, 1987. С. 106–148. [Zolotnitskaya R. P. Metody gematologicheskikh issledovaniy. In: *Laboratornye metody issledovaniya v klinike : spravochnik* / V. V. Menshikov (Ed.). Moscow : Meditsina, 1987, pp. 106–148. (in Russ.)]
 4. Киселёва М. И. Сравнительная характеристика донных сообществ у побережья Кавказа // *Многолетние изменения зообентоса Чёрного моря* / отв. ред. В. Е. Заика. Киев : Наукова думка, 1992. С. 84–99. [Kiseleva M. I. Sravnitel'naya kharakteristika donnykh soobshchestv u poberezh'ya Kavkaza. In: *Mnogoletnie izmeneniya zoobentosa Chernogo morya* / V. E. Zaika (Ed.). Kyiv : Naukova dumka, 1992, pp. 84–99. (in Russ.)]. <https://repository.marine-research.ru/handle/299011/5644>
 5. 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.)]. <https://elibrary.ru/mpvsggr>
 6. 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). *Marine Biological Journal*, 2016, vol. 1, no. 2, pp. 3–17. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2016.01.2.01>
 7. Cerca F., Trigo G., Correia A., Cerca N., Azeredo J., Vilanova M. SYBR Green as a fluorescent probe to evaluate the biofilm physiological state of *Staphylococcus epidermidis*, using flow cytometry. *Canadian Journal of Microbiology*, 2011, vol. 57, no. 10, pp. 850–856. <https://doi.org/10.1139/w11-078>
 8. Cortesi P., Cattani O., Vitali G., Carpené E., de Zwaan A., van den Thillart G., Roos J., van Lieshout G., Weber R. E. Physiological and biochemical responses of the bivalve *Scapharca inaequivalvis* 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>
 9. 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>
 10. 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>
 11. 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>
 12. 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>
 13. 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.
 14. 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, no. 2, pp. 169–177.
15. 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>
 16. Soldatov A. A., Golovina I. V., Kolesnikova E. E., Sysoeva I. V., Sysoev A. A. Effect of hydrogen sulfide loading on the activity of energy metabolism enzymes and the adenylate system in tissues of the *Anadara kagoshimensis* clam. *Inland Water Biology*, 2022, vol. 15, no. 5, pp. 632–640. <https://doi.org/10.1134/S1995082922050194>
 17. 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)
 18. 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>
 19. Tască C. *Introducere în morfologia cantitativă cito-histologică*. Bucuresti : Editură Academiei Republicii Socialiste România, 1976, 182 p.
 20. 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>
 21. 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>

**ERYTHROID CELLS IN THE HEMOLYMPH OF A BIVALVE
ANADARA KAGOSHIMENSIS (TOKUNAGA, 1906)
UNDER HYDROGEN SULFIDE LOADING:
FLOW CYTOMETRY AND LIGHT MICROSCOPY**

Yu. Bogdanovich¹, A. Soldatov^{1,2}, N. Shalagina¹, and V. Rychkova¹

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 imbalance between organic matter oxidation and oxygen supply mediates the formation of time-stable redox zones in the water column. On the shelf, this typically occurs due to the absence of thorough vertical convection and the formation of localized decomposition zones. The functional mechanisms of the resistance of certain benthic organisms to such conditions are of particular interest. In this work, we study a bivalve *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) known for its tolerance to hydrogen sulfide contamination. Using flow cytometry and light microscopy, we examined the effect of hydrogen sulfide loading on morphofunctional characteristics of its erythroid cells under experimental conditions. The analysis was carried out on adult specimens with a shell height of 23–34 mm. The control group of molluscs was kept in an aquarium with an oxygen concentration of 7.0–8.2 mg O₂·L⁻¹ (normoxia). For the experimental group, oxygen content was first lowered to 0.1 mg O₂·L⁻¹ for 2 h (via nitrogen bubbling); then, Na₂S was added to water to a final concentration of 6 mg S²⁻·L⁻¹. Exposure to hydrogen sulfide revealed a significant increase in the volume of erythroid cells in *A. kagoshimensis* hemolymph (more than 40%, $p < 0.01$) accompanied by a substantial rise in fluorescence intensity of rhodamine 123 (R123) and 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCF-DA) (2–3-fold, $p < 0.01$). This evidences for enhanced oxidative processes within cells and their possible lysis. The latter one may facilitate the release of hematin-containing granules, and hematin is capable of neutralizing sulfides. The observed response seems to be an adaptive one. A rise in values of side scatter and SYBR Green I fluorescence reflects an increase in abundance of granular inclusions within red blood cells under hydrogen sulfide loading and a gain in the functional activity of their nuclei.

Keywords: *Anadara kagoshimensis*, hydrogen sulfide, hemolymph, erythroid cells, morphology, flow cytometry