

На правах рукописи

КЛАДЧЕНКО
Екатерина Сергеевна

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

1.5.16– гидробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Севастополь – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН» (ФИЦ ИнБЮМ), лаборатория экологической иммунологии

Научный руководитель:

Солдатов Александр Александрович - доктор биологических наук, главный научный сотрудник отдела физиологии животных и биохимии ФИЦ ИнБЮМ, г. Севастополь

Официальные оппоненты:

Тимофеев Максим Анатольевич - доктор биологических наук, профессор кафедры гидробиологии и зоологии беспозвоночных биолого-почвенного факультета Иркутского государственного университета, г. Иркутск

Сокольникова Юлия Николаевна - кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН», п. Борок, Ярославская обл.

Защита диссертации состоится «7» декабря 2022 года в 10:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.221.01 (Д900.009.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федерального исследовательского центра "Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН" наук по адресу: 299011, Россия, Севастополь, пр. Нахимова, 2; телефон: +7 (8692) 54-06-49; e-mail: dissovet@ibss-ras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН» по адресу: 299011, РФ г. Севастополь, проспект Нахимова, 2, и на сайте по адресу: <https://ibss-ras.ru/science/dissertation-council-24-1-221-01/announcement/1874/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Поспелова Наталья Валериевна

Общая характеристика работы

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Соленость считается одним из основных экологических факторов, влияющих на функциональное состояние двустворчатых моллюсков. Согласно прогнозам Межправительственной группы экспертов по изменению климата, в ближайшие годы ожидается увеличение частоты экстремальных осадков, стоки которых в прибрежные морские участки могут привести к резким колебаниям солености. С другой стороны, интенсивное испарение может привести увеличению солености (Hoegh-Guldberg et al., 2018). Среди возможных последствий, колебания солености выделяют – сокращение видового разнообразия и исчезновение крупных видов гидробионтов, являющихся объектами добычи или культивирования в мировой пищевой промышленности (Ambily Nath et al., 2011).

Двустворчатые моллюски являются основными объектами массового выращивания в аквакультуре (Яхонтова и др., 2008; Andreyeva et al., 2021). При этом границы адаптивного потенциала к изменению солености коммерчески значимых или перспективных объектов марикультуры остаются неисследованными. К таким видам относится двустворчатый моллюск *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). В связи с чем, ощущается острая необходимость проведения фундаментальных исследований в области изучения влияния факторов климатических изменений на иммунную систему моллюсков. Известно, что основу клеточного иммунного ответа двустворчатых моллюсков составляют гемоциты, циркулирующие в гемолимфе (Vamber et al., 2018). Оценка функционального статуса клеток гемолимфы в условиях колебания солености позволит дать интегральную характеристику состояния организма моллюсков. Кроме этого, не раскрыты механизмы, обеспечивающие видам двустворчатых моллюсков продолжительную и успешную адаптацию к колебаниям солености (Ballantyne et al., 2020). Учитывая, что осмолярность внутренней среды моллюсков, как организмов осмоконформеров, напрямую определяется внешними условиями, очевидно, что основу адаптации видов к соленостному стрессу составляют клеточные реакции. Вместе с тем, способность гемоцитов восстанавливать первоначальный клеточный объем после гипосмотического набухания или гиперосмотического сжатия все еще остается предметом обсуждения (Pourmozaffar et al., 2019).

Цель работы. 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.

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 и практическая 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.

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.

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 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.

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.

Степень достоверности и апробация 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 полученных результатов 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 представлены на всероссийских и международных конференциях, а также опубликованы в высокорейтинговых рецензируемых научных изданиях и реферируемых базами РИНЦ, Web of Science и Scopus. По материалам диссертационной работы опубликовано 12 печатных работ, из них 5 статей в

изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 6 – в изданиях, индексируемых в базах WoS и Scopus, и 6 тезисов докладов.

Благодарности. Автор выражает благодарность своему научному руководителю д.б.н. А. А. Солдатову за многолетнее руководство и помощь в подготовке диссертационной работы. Искреннюю благодарность автор приносит д.б.н. И. В. Миндукшеву (ИЭФБ РАН) и д.б.н. С. П. Гамбарян (ИЭФБ РАН) за ценные рекомендации, консультацию и всестороннюю помощь. Отдельную благодарность автор выражает к.б.н. А. Ю. Андреевой за творческое вдохновение, а также неоценимую помощь в проведении экспериментальных работ и интерпретации полученных данных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 Литературный обзор

В настоящей главе 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.

Глава 2 Материал и методы исследований

Объектом исследования являлись двустворчатые моллюски (*A. kagoshimensis*). В работе исследовано 80 особей массой $17,6 \pm 1,9$ г и диаметром створки $30,5 \pm 1,0$ 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). 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 500 g в центрифуге Eppendorf 5810R (Германия) и температуре 10 °C. Надосадочную жидкость отбирали для оценки осмолярности на осмометре OsmoSpecial 1 (Astori, Италия). Перед дальнейшим анализом для удаления агрегатов суспензию гемоцитов фильтровали через фильтр с диаметром ячейки 20 мкм.

Клетки гемолимфы *A. kagoshimensis* идентифицировали на основании морфометрических (окраска, наличие гранул в цитоплазме, линейные характеристики) и функциональных особенностей (способность к продукции активных форм кислорода – АФК, мембранный потенциал митохондрий) при помощи метода проточной цитометрии и оптической микроскопии.

Для оценки диапазонов соленостной адаптации моллюсков разделили на 5 групп по 10 особей в каждой (рисунок 1). Контрольная группа содержалась при солености 18 ‰,

экспериментальные – при 8, 14, 35 и 45 ‰. Экспериментальное снижение солености (точки 14 ‰ и 8 ‰) достигалось путем разбавления морской воды, дистиллированной со скоростью $1,3 \pm 0,6$ ‰ в сутки. 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. Моллюсков выдерживали в заданных экспериментальных условиях 2 дня, затем у моллюсков отбирали гемолимфу для анализа методом проточной цитометрии, световой микроскопии и лазерной дифракции.

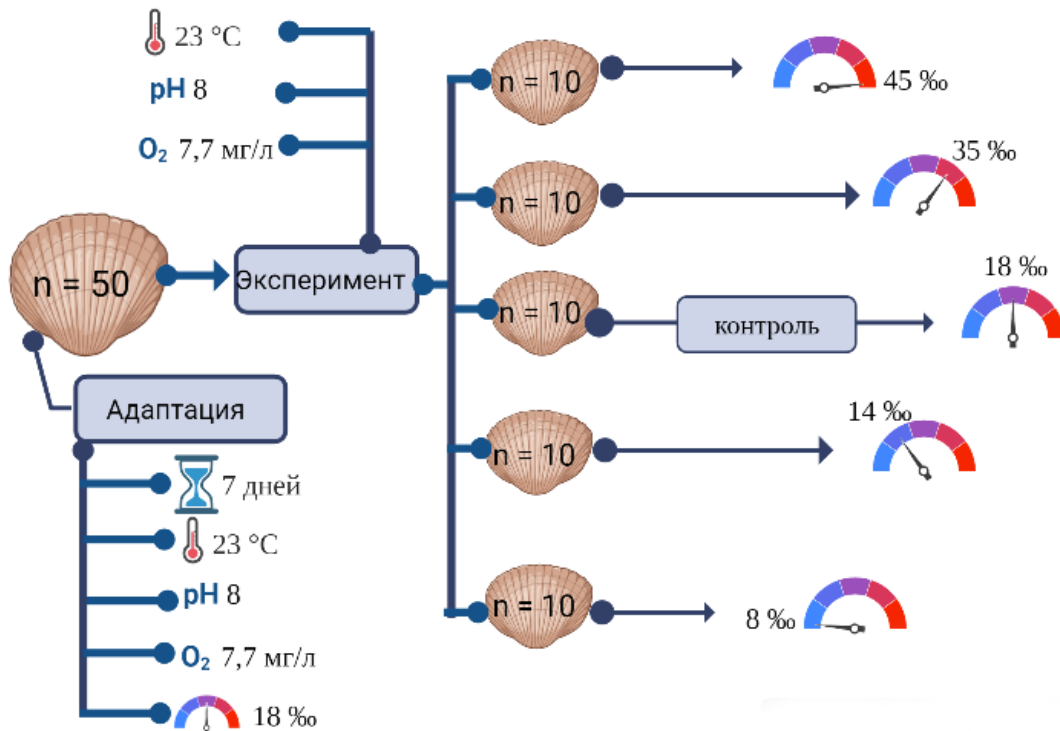


Рисунок 1 — Схема эксперимента по оценки адаптивного потенциала двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis* к изменению солености

Морфометрический анализ гемоцитов осуществлялся при помощи метода оптической микроскопии 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 (Kladchenko et al., 2021):

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

где ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение,

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

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

Цитометрический анализ проводили на проточном цитометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США), оборудованном однофазным аргоновым лазером (длина волны 488 нм). Для идентификации типов гемоцитов клетки окрашивали ДНК-красителем SYBR Green I. Суспензию окрашивали в течение 40 мин в темноте при 4 °С. Идентификацию клеточных типов проводили среди событий положительных по SGI по показателям относительного размера (FS) и уровня гранулярности цитоплазмы (SS). Долю поврежденных гемоцитов анализировали, используя краситель пропидиум йодид (PI). Окрашивание суспензии гемоцитов проводили в темноте в течение 40 мин при 4 °С. Изменения потенциала митохондрий в гемоцитах контролировали путем измерения интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных красителем родамин 123 (Rh123). Гемоциты окрашивали Rh123 в течение 40 мин при 4 °С в темноте. Для оценки способности гемоцитов к спонтанной продукции активных форм кислорода применяли 2-7-дихлорфлуоресцеин-диацетат (DCF-DA). 1 мл суспензий гемоцитов инкубировали с 10 мкл раствора DCF-DA в течение 40 мин в темноте при 4 °С.

Реакцию RVD и RVI моделировали по методикам, описанным ранее (Andreyeva et al., 2018; Hoffmann et al., 2011), модифицированным для двустворчатых моллюсков. В течение 5 минут суспензию инкубировали в кювете при температуре 10 °С, осмолярности 461 мОсм/кг и постоянном перемешивании (1500 об./мин). Затем для моделирования RVD осмолярность морской воды в кювете была снижена 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). Схема эксперимента представлена на рисунке 2.

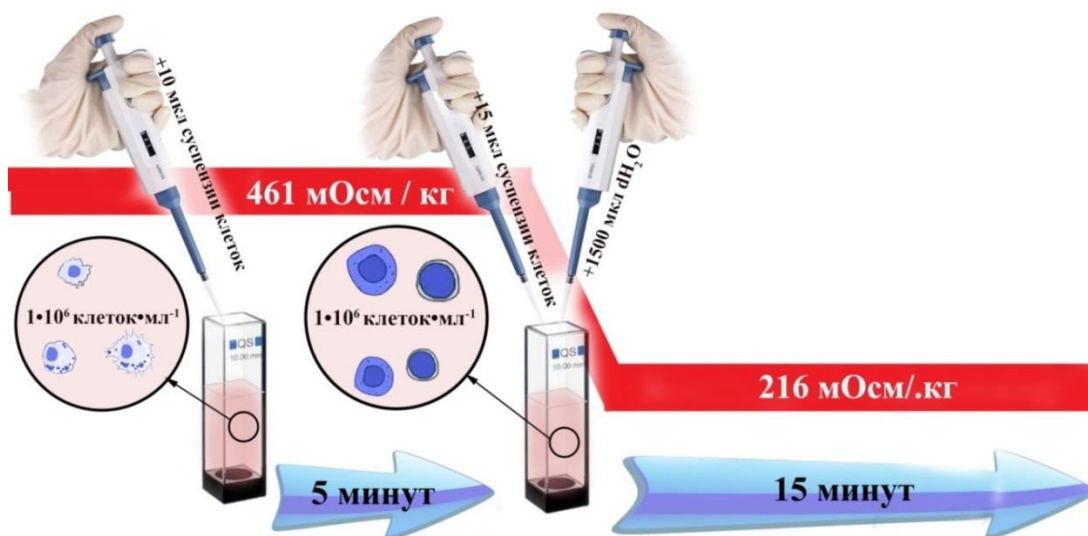


Рисунок 2 — Схема моделирования реакции RVD гемоцитов *Anadara kagoshimensis* в условиях гипосмотической нагрузки

Для моделирования RVI осмоляльность в кювете повышали до 760 мОсм/кг путем добавления концентрированного раствора NaCl. Изменения объема фиксировали в течение 15 минут по интенсивности лазерного рассеяния на малых углах (0–4°). Схема эксперимента представлена на рисунке 3.

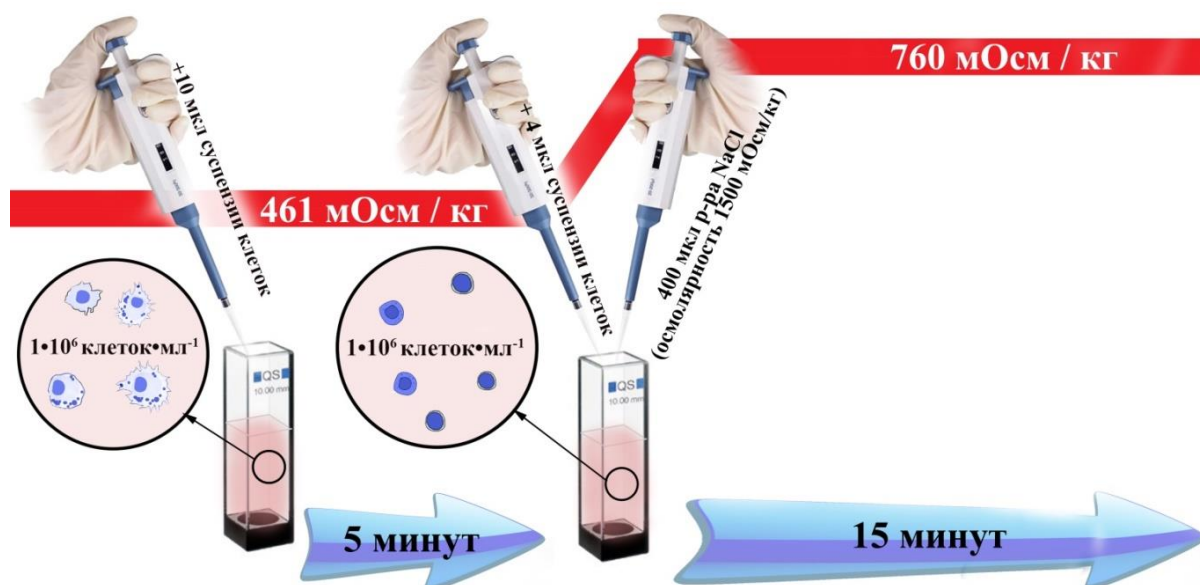


Рисунок 3 — Схема эксперимента по моделированию реакции RVI гемоцитов *Anadara kagoshimensis* в условиях гиперосмотической нагрузки

Нормальность распределения проверяли при помощи теста Колмогорова-Смирнова. Различия между группами анализировали с помощью программного обеспечения RStudio версия 4.1.0. 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 дана классификация гемоцитов анадары при помощи методов проточной цитометрии, световой микроскопии и градиентного центрифугирования. Охарактеризованы морфологические и размерные характеристики выделенных морфотипов клеток. Описаны особенности выделенных популяций клеток к продукции активных форм кислорода и мембранного потенциала митохондрий. В гемолимфе анадары, в зависимости от

метода идентификации, выделено 2-3 типа клеток, что в целом, согласуется с аналогичными данными, полученными на других видах двустворчатых (Andreyeva et al., 2021; Bayne et al., 1979; Rodrick and Ulrich, 1984). Согласно данным калибровки протокола цитометра при помощи микрочастиц, субпопуляция 1 (рисунок 5) соответствует морфологическому типу 1 (M1) гемоцитов с наименьшим диаметром (рисунок 4).

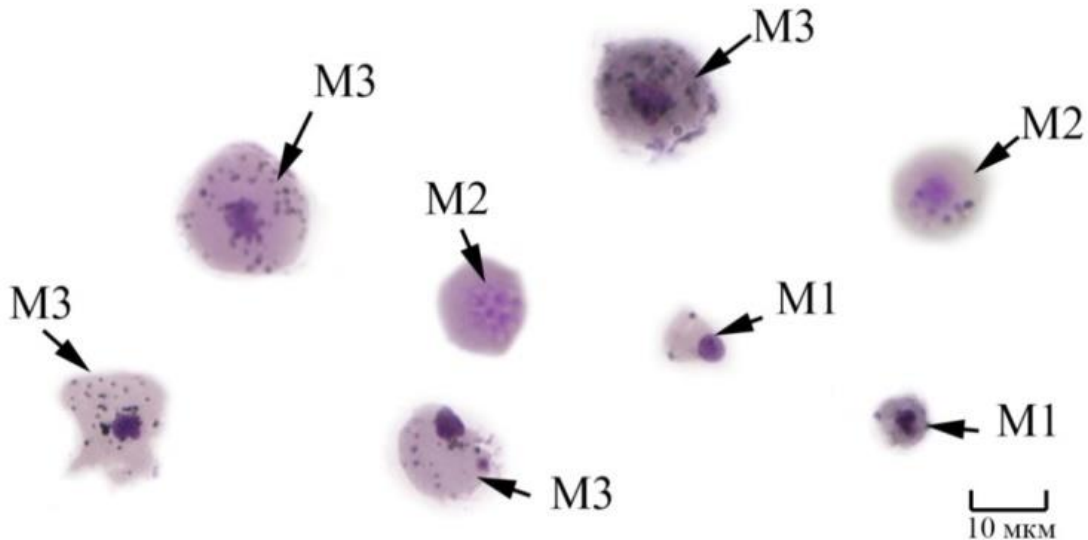


Рисунок 4 — Микрофотографии клеток гемолимфы *Anadara kagoshimensis*: M1, M2, M3 – морфотипы клеток

Морфологические характеристики описанных клеток соответствуют амебоцитам анадары, описанным ранее в литературе (Kolyuchkina and Ismailov, 2011; Dang et al., 2013; Andreyeva et al., 2021; Bayne et al., 1979; Rodrick and Ulrich, 1984). Неоднородность распределения амебоцитов по FS и SS амебоцитов свидетельствует о наличии в популяции нескольких подтипов, которые, однако, невозможно идентифицировать на основании использованных методов.

Субпопуляция 2 на гистограмме FS/SS (рисунок 5) включает в себя клетки второго (M2) и третьего (M3) морфологических типов (рисунок 4). Вероятно, вытянутость облака распределения клеток типа по оси SS обусловлено различиями в размере ядра между M2 и M3 гемоцитов, а также содержанием большого количества включений в клетках M3. По своим морфологическим характеристикам M3 соответствует гранулярным гемоцитам мидий и устриц или эритроцитам анадары, описанным в литературе, а M2 схож с гиалиноцитами устриц (Kolyuchkina and Ismailov, 2011; Holden et al., 1994; Dang et al., 2013). Однако, поскольку данные типы клеток нельзя разделить методами, отличными от световой микроскопии, в настоящей работе они рассматриваются исключительно как подтипы субпопуляции 2 (агранулярный подтип эритроцитов).

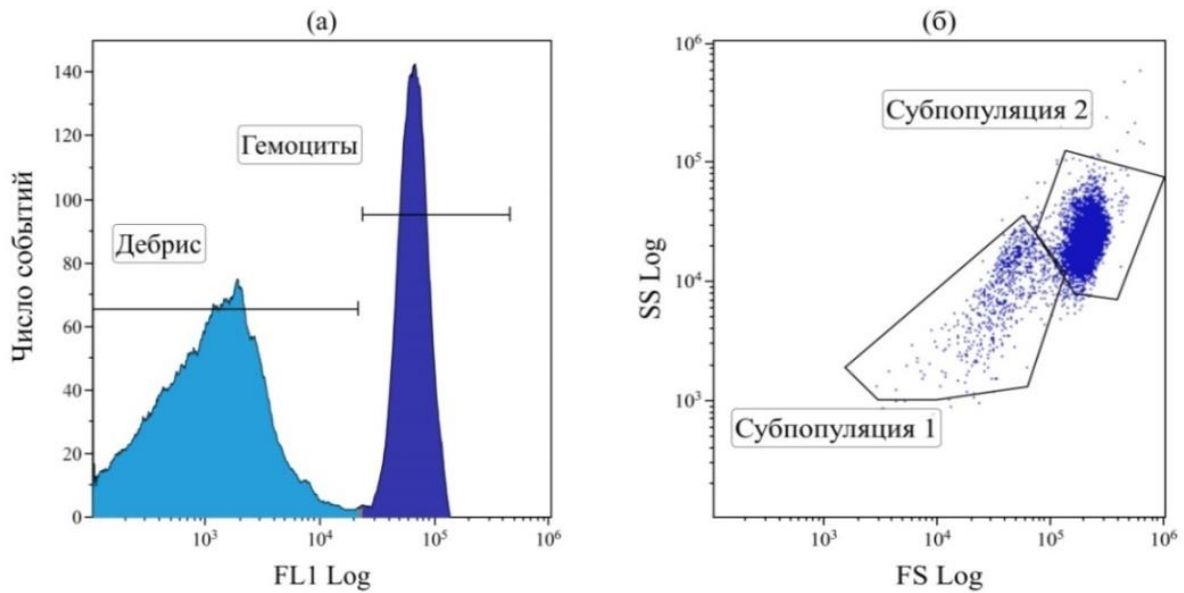


Рисунок 5 — Идентификация типов гемоцитов *Anadara kagoshimensis* методом проточной цитометрии (а) и гистограмма содержания ДНК в гемоцитах (б). Распределение клеток гемолимфы на основании величин FS и SS, показывающее две субпопуляции гемоцитов

Методом проточной цитометрии и световой микроскопии выделено два основных типа клеток гемолимфы *A. kagoshimensis* — небольшие агранулярные и крупные гранулярные. Гемолимфа 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*

Осмолярность гемолимфы анадары соответствовала осмолярности морской воды на протяжении всего эксперимента. В контрольной группе моллюсков (инкубация при солености 18 ‰) она равна $493,4 \pm 1,5$ мОсм/кг, при осмолярности морской воды — 470,0 мОсм/кг. Гипоосмотические условия приводили к постепенному снижению осмолярности гемолимфы, при 8 ‰ достигали $395,0 \pm 298,0$ мОсм/кг. Данная группа моллюсков содержалась при осмолярности 298 мОсм/кг. В гиперосмотических условиях данный показатель возрастал и при максимальной солености (45‰) составил $1446,1 \pm 46,2$ мОсм/кг. Осмолярность морской воды была равна 1500 мОсм/кг.

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 6), при солености 8 ‰ данный

показатель равен $1,9 \pm 0,6$ % ($p < 0,05$). Доля гранулярных клеток составила $98,2 \pm 0,6$ % ($p < 0,05$). Снижение солености до 14 ‰ не приводило к изменению клеточного состава гемолимфы. В условиях гиперосмотического стресса у моллюсков также снизилась доля агранулярных клеток до $3,0 \pm 0,6$ % после воздействия солености 45 ‰ ($p < 0,05$). Процентное содержание гранулярных клеток составило $97,0 \pm 0,6$ % ($p < 0,05$). Повышение солености до 35 ‰ не сопровождалось изменением клеточного состава гемолимфы анадары.

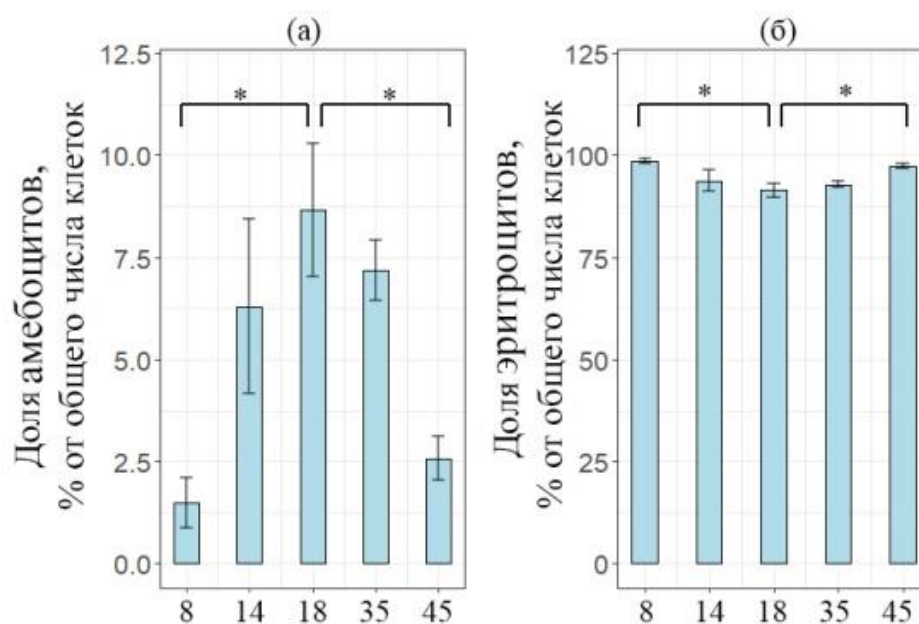


Рисунок 6 — Изменение соотношения агранулярных (а) и гранулярных гемоцитов *Anadara kagoshimensis* в гипо- и гиперосмотических условиях. * – достоверно относительно контроля ($p \leq 0,05$, $n=10$)

Гипоосмотический стресс не повлиял на морфологические особенности агранулярных клеток. 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 солености 8 ‰ их число было более чем в 3,5 раза выше контрольных значений и составило $18,2 \pm 0,5$ % общего числа гемоцитов. Инкубация в гиперосмотических условиях не сопровождалась увеличением доли эритроцитарных теней.

В контрольной группе диаметр агранулоцитов составил $7,1 \pm 0,2$ мкм. Снижение солености не приводило к значительному изменению размерных характеристик агранулярных клеток, при солености 14 ‰ диаметр равен $7,8 \pm 0,2$ мкм, а при 8 ‰ – $7,2 \pm 0,4$ мкм (рисунок 7а). Гиперосмотические условия приводили к уменьшению диаметра amoebocytes до $6,4 \pm 0,2$ мкм

при солёности 35 ‰ ($p < 0,05$), а при повышении солёности – до 45 ‰ диаметр клеток вернулся на уровень контрольных значений и составил $7,0 \pm 0,4$ мкм.

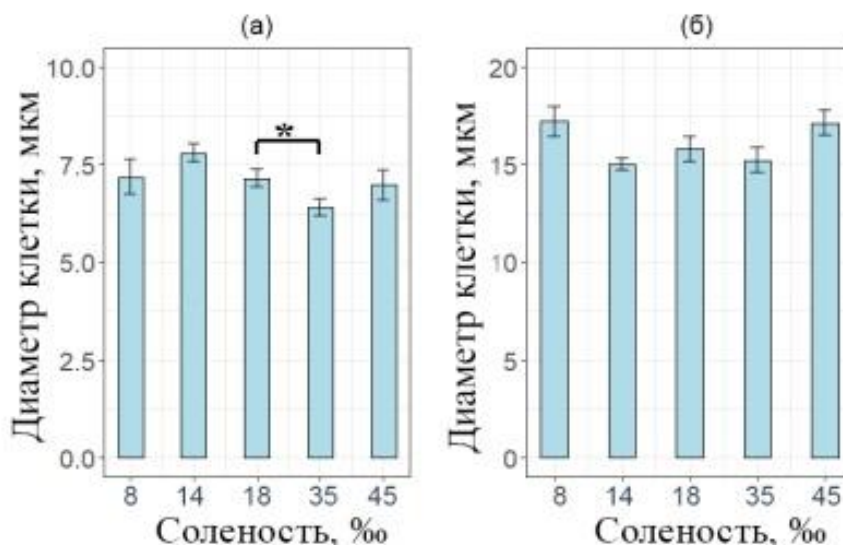


Рисунок 7 — Изменение диаметра клетки агранулярных (а) и гранулярных (б) гемоцитов *Anadara kagoshimensis* после акклимации в условиях гипер- и гипоосмотической нагрузки. *– достоверно относительно контроля ($p \leq 0,05$)

Гранулярные клетки контрольной группы моллюсков крупнее, по сравнению с агранулярными ($15,8 \pm 0,6$ мкм). Изменение солёности не оказало влияния на диаметр гранулярных клеток (рисунок 7б). Диаметр ядра агранулярных клеток контрольной группы составил $4,3 \pm 0,1$ мкм. Гипоосмотическая нагрузка не оказала влияния на размер ядер амебоцитов (рисунок 5а). При солёности 8 ‰ данный показатель соответствовал уровню контроля и составлял $4,4 \pm 0,1$ мкм. Снижение солёности индуцировало увеличение диаметра ядер гранулярных клеток с $4,3 \pm 0,1$ мкм (контроль) до $4,8 \pm 0,1$ мкм при 14 ‰ ($p < 0,05$). Повышение солёности привело к снижению размерных характеристик ядра агранулярных клеток (рисунок 8а). У группы моллюсков, инкубированных при солёности 35 ‰, диаметр ядра равен $3,7 \pm 0,1$ мкм ($p < 0,05$), а у группы 45 ‰ диаметр статистически не отличался от контроля ($3,9 \pm 0,2$ мкм). Повышение солёности до 35 ‰ не привело к статистически значимым различиям в диаметре ядра гранулярных клеток. Дальнейшее повышение солёности сопровождалось увеличением линейных характеристик данного показателя (рисунок 8б), при 45 ‰ диаметр ядер гранулярных клеток равен $4,9 \pm 0,1$ мкм ($p < 0,05$).

Все изменения диаметра агранулярных клеток и их ядер в основном имели прямо пропорциональную зависимость, что определило отсутствие статистически значимых изменений ЯЦО. Вместе с тем, при снижении солёности до 14 ‰ ЯЦО гранулярных клеток на 17 % выше в сравнении с уровнем контроля ($p < 0,05$). Дальнейшее снижение солёности до 8 ‰ сопровождалось восстановлением данного показателя до уровня контрольных значений.

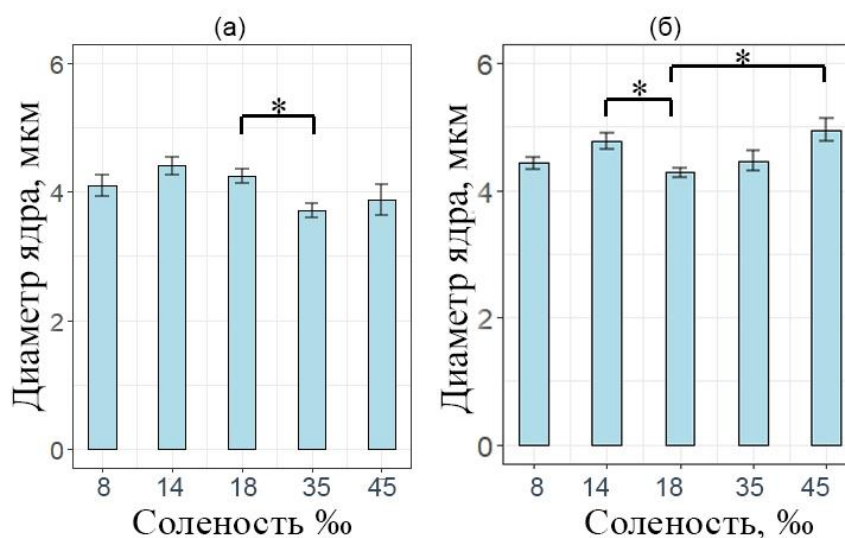


Рисунок 8 — Изменение диаметра ядер агранулярных (а) и гранулярных (б) гемоцитов *Anadara kagoshimensis* после воздействия гипо- и гиперосмотической нагрузки. * – достоверно относительно контроля ($p \leq 0,05$)

Снижение солености привело к увеличению общего АФК в гемоцитах анадары (рисунок 9). При 8 ‰ данный показатель выше контрольных значений более чем в 3 раза. Повышение солености 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 солености до 45 ‰ флуоресценция общая флуоресценция DCF-DA соответствовала уровню контроля – $825,2 \pm 40,2$ у.е.

Описанные закономерности характерны как для гранулярных, так и для агранулярных гемоцитов. Вместе с тем, повышение солености оказывало более выраженное действие на способность к продукции АФК агранулярных гемоцитов. Повышение солености до 35 ‰ привело к снижению уровня флуоресценции DCF-DA агранулярных клеток более чем в 6,5 раза ($p < 0,05$). Несмотря на значительное увеличение уровня АФК при дальнейшем повышении солености (в 2,8 раза по сравнению с соленостью 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, после воздействия солености 45‰ данный показатель соответствовал уровню контроля.

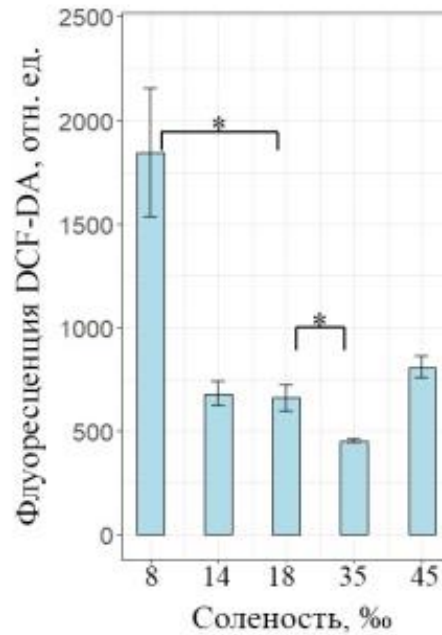


Рисунок 9 — Влияние засоления и снижения солености на общий уровень внутриклеточных АФК в гемоцитах *Anadara kagoshimensis*. * – достоверно относительно контроля ($p \leq 0,05$, $n=10$)

У контрольной группы моллюсков флуоресценция Rh123 равна $124,3 \pm 15,5$ у.е. Гипоосмотическая нагрузка сопровождалась увеличением мембранного потенциала митохондрий гемоцитов анадары (рисунок 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 10), 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.

Соленосный стресс, исследованный в настоящем эксперименте, не оказал существенного влияния на уровень смертности гемоцитов, изменения носили характер тенденции. Относительное число клеток, положительных по PI, не превышало 3 % от общего числа клеток.

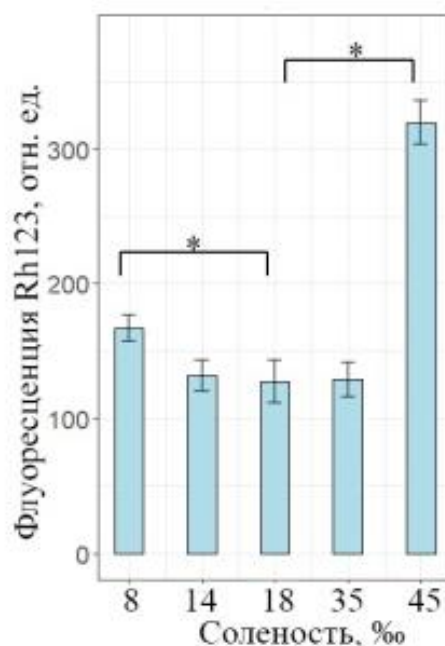


Рисунок 10 — Влияние осмотического стресса на мембранный потенциал митохондрий гемоцитов *Anadara kagoshimensis*, оцениваемый по флуоресценции красителя Rh123. * – достоверно относительно контроля ($p \leq 0,05$, $n=10$)

Адаптивная реакция *A. kagoshimensis* на соленостный 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 основы устойчивости моллюска *A. kagoshimensis* к изменению солености

В этой главе приведены результаты исследования влияния краткосрочного гипер- и гипоосмотического стресса на клетки гемолимфы моллюска, распространенного в водах с соленостью от 12 до 35 ‰. В условиях акклимации к лабораторным условиям не было зафиксировано гибели моллюсков. Воздействие и гипер- и гипоосмотического стресса также не привело к гибели анадары. Постепенное снижение осмолярности среды приводило к набуханию гемоцитов (рисунок 11). В контрольной группе максимальное набухание

гемоцитов перед лизисом равно $115,0 \pm 3,5$ % при солёности $272,2 \pm 23,1$ мОсм/кг. Дальнейшее снижение солёности приводило к постепенному лизису гемоцитов.

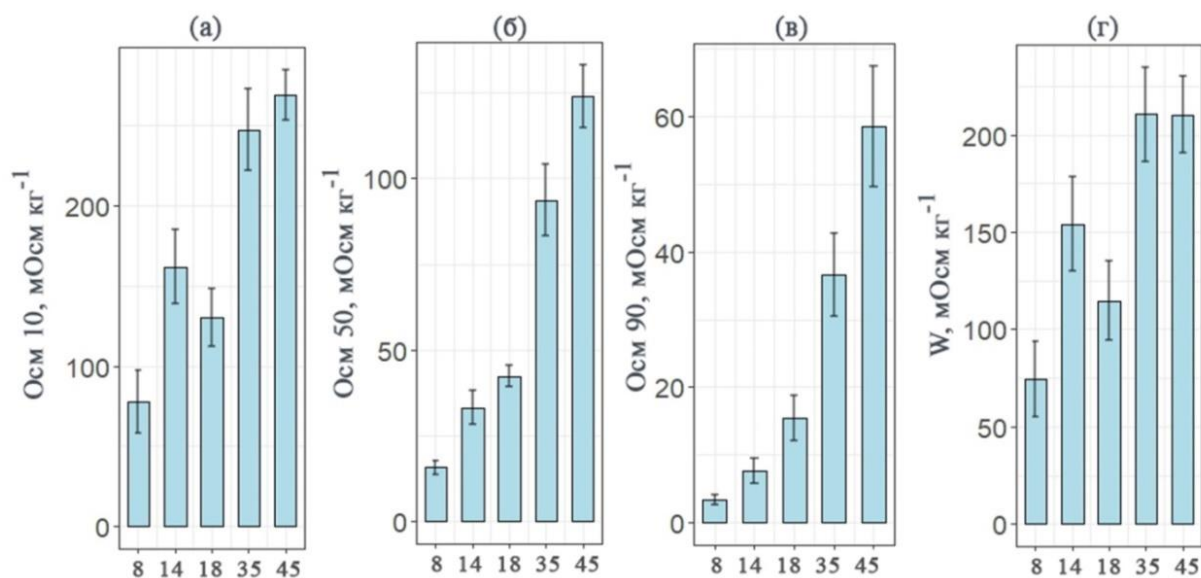


Рисунок 11 — Влияние инкубации моллюсков в условиях гипо- и гиперсолёности на осмотическую хрупкость гемоцитов *Anadara kagoshimensis*: (а) – оценка эффектов снижения и увеличения солёности в точке Н10, (б) – в точке Н50 и (в) – в точке Н90, (г) – оценка ширины распределения графика осмотической хрупкости

В контрольной группе Н50 ($42,3 \pm 3,1$ мОсм/кг) в 11,7 раза ниже осмолярности плазмы моллюсков ($493,4 \pm 1,5$ мОсм/кг). Полный лизис гемоцитов анадары происходил при осмолярности 20 мОсм/кг. Инкубация моллюсков в гипоосмотических условиях значительно снижала осмотическую хрупкость клеток, другими словами, повышала жесткость гемоцитов. Н50 для моллюсков, инкубированных при 14‰, составил $33,2 \pm 5,0$ мОсм/кг ($p > 0,05$), а при 8‰ – $15,7 \pm 2,0$ мОсм/кг ($p < 0,05$). После воздействия гиперосмотических условий (солёности 35 и 45 ‰), гемоциты были более осмотически хрупкими, в сравнении с контролем ($p < 0,05$). В группе, инкубированной при 35 ‰, Н50 равен $93,6 \pm 10,4$ мОсм/кг, а после воздействия солёности 45 ‰ – $124,0 \pm 9,1$ мОсм/кг. В зависимости от солёности, в которой инкубировались моллюски отличались начало и конец лизиса клеток. Снижение солёности до 14 ‰ не оказало влияния на данный показатель, Н10 для данной группы моллюсков составил $161,8 \pm 23,3$ мОсм/кг ($p > 0,05$). У моллюсков, инкубированных при 8 ‰, лизис клеток начинался при меньшей осмолярности – Н10 равен $77,7 \pm 19,4$ мОсм/кг.

В контрольной группе моллюсков Н90 равно $15,4 \pm 3,3$ мОсм/кг. Гипоосмотический стресс приводил к снижению данного показателя, при солёности 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 солёности 35 и 45 ‰ Н90

равно $36,6 \pm 6,2$ мОсм/кг и $58,5 \pm 8,9$ мОсм/кг. Вместе с тем, снижение солености в условиях *in vivo* эксперимента не оказывала статистически значимого воздействия на ширину распределения графика осмотической хрупкости (W) осмотической кривой.

На снижение осмолярности среды в экспериментальной кювете с 461 мОсм/кг (физиологическая осмолярность) до 216 мОсм/кг (гипоосмотический шок) гемоциты *A. kagoshimensis* ответили быстрым набуханием и последующим снижением объема (рисунок 12). Увеличение объема гемоцитов статистически значимо ($p < 0,05$). Максимальный размер гемоцитов на $71,5 \pm 15,2\%$ от контроля выше исходного уровня. Затем объем клеток снизился, в конце экспериментального периода (15 мин) объем гемоцитов составил $37,3 \pm 10,5\%$ от контроля. В конце экспериментального периода гемоциты восстановили объем более чем на 30 %, изменения статистически достоверны ($p < 0,05$).

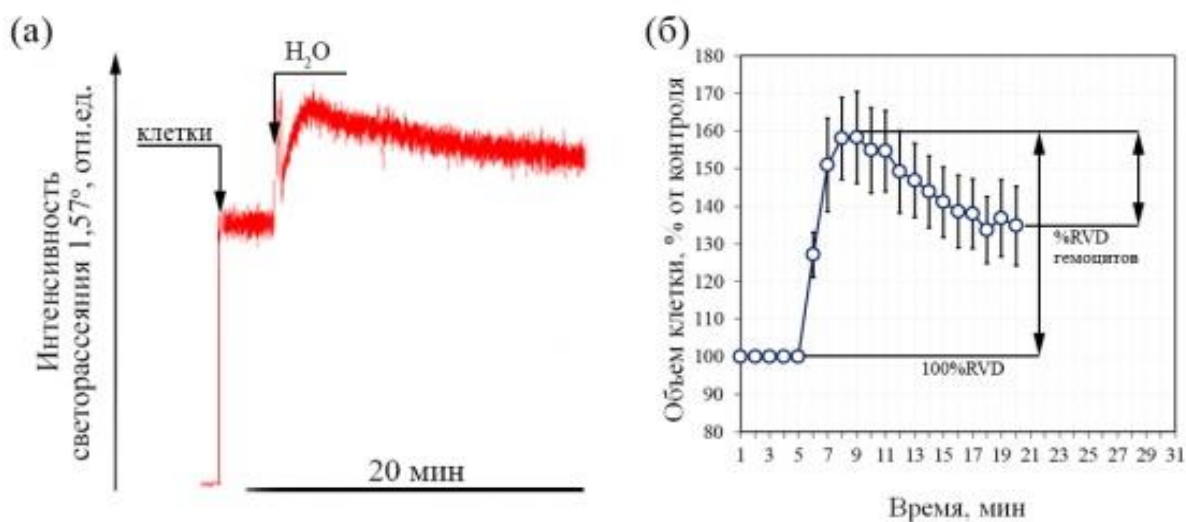


Рисунок 12 — Способность гемоцитов *Anadara kagoshimensis* к регуляторному снижению объема в условиях осмотического стресса: (а) – оригинальная запись кинетики изменения объема гемоцитов, (б) – график реакции RVD гемоцитов анадары в условиях гипоосмотического стресса

Увеличение осмолярности морской воды с 461 мОсм/кг (физиологическая осмолярность) до 760 мОсм/кг (гиперосмотический шок) гемоциты моллюсков ответили быстрым сжатием (рисунок 13). При максимальном сжатии размер гемоцитов составил $67,5 \pm 2,4\%$ уровня контроля. В течение 15 мин инкубации при осмолярности 760 мОсм/кг клетки постепенно восстанавливали объем, в конце экспериментального периода размер клеток составил $79,8 \pm 4,2\%$ контроля. В течение экспериментальной экспозиции после гиперосмотической стимуляции гемоциты анадары восстановили средноклеточный объем на 15 % от контроля, изменения статистически достоверны ($p < 0,05$).

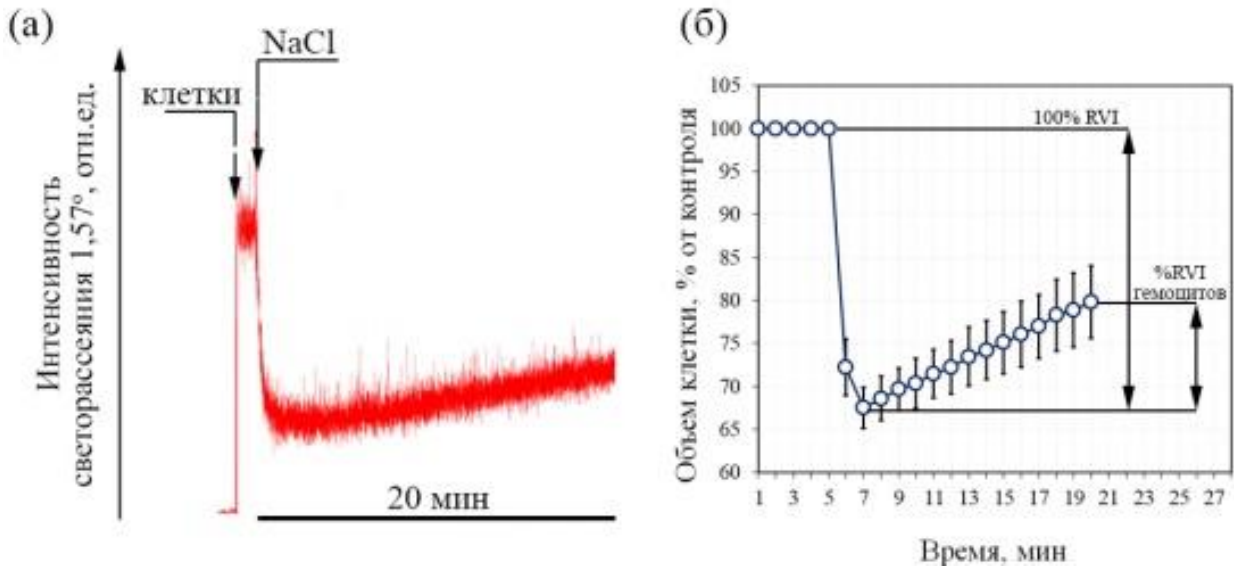


Рисунок 13 — Способность гемоцитов *Anadara kagoshimensis* к регуляторному увеличению объема в условиях осмотического стресса: (а) – запись кинетики изменения объема гемоцитов, (б) – график реакции RVI гемоцитов в условиях гиперосмотического стресса

Инкубация моллюсков в условиях соленосного стресса привела к сдвигу кривой осмотической стойкости гемоцитов. Данный результат свидетельствует о способности гемоцитов *A. kagoshimensis* изменять стратегию адаптации к изменению солености. В ходе эксперимента *in vitro* 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 *Anadara 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 обладают 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, 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 анадары:

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 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). Наиболее выраженное влияние на исследованные показатели оказала соленость 8 ‰: выявлено повышение митохондриального потенциала и существенный рост уровня АФК в гемоцитах. Наблюдаемый 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. Показано, что при стрессе моллюски могут увеличивать свои энергетические затраты в качестве механизма клеточной защиты, позволяя организму успешно адаптироваться к таким условиям (Sokolova et al., 2008). Рост уровня АФК на фоне увеличения мембранного потенциала митохондрий является закономерным процессом, поскольку митохондрии считаются основным источником АФК в гемоцитах (Suski et al., 2012).

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 гипосолённых 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, и выражается, как правило, в образовании таких АФК, как супероксидный анион и перекись водорода (Somero et al., 1983). В частности, изменение солёности 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 солёность, являются адаптивной реакцией на осмотический стресс.

Широкий диапазон солёностной толерантности двустворчатых моллюсков обеспечивается преимущественно клеточными механизмами адаптации (Kladchenko et al., 2022). Так, гемоциты анадары более осмотически стойкие клетки в сравнении с эритроцитами низших позвоночных. 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 солёности приводят к дисбалансу в производстве АФК и их атаке на липидные мембраны, и, следовательно, вызывают окислительное повреждение клеток (Velez et al., 2016). Известно, что кислородные радикалы способны повреждать фосфолипиды и белки, и, следовательно, влиять на структуру мембран (Lin et al., 2012; Li et al., 2013). Именно в гипоосмотической среде нами выявлен значительный рост уровня АФК в гемоцитах. Так, АФК способны повреждать фосфолипиды клеточной мембраны и белки, и, следовательно, влиять на их свойства (Li et al., 2013; Igbokwe et al., 2018). Показано, что окислительный стресс влияет на гомеостаз катионов эритроцитов и, как следствие, снижает деформируемость мембран (Mohanty et al., 2014). Согласно данной теории, выявленный нами окислительный стресс при солёности 8 ‰ должен приводить к снижению осмотической стойкости гемоцитов. При этом увеличение уровня внутриклеточных АФК не сопровождалось увеличением хрупкости эритроцитов. H50 был в 10-12 раз ниже осмолярности гемолимфы в каждой из исследуемых групп. 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 солености воды, в которой инкубировались моллюски. Вероятно, гемоциты анадрары способны адаптироваться к осмотическому стрессу на клеточном уровне, изменяя свойства мембраны в зависимости от солености. Механизмы переключения процессов соленостной адаптации известны и хорошо исследованы для эвригалинных рыб. Рыбы имеют молекулярные сенсоры, чувствительные к изменению солености, которые запускают механизмы корректировки осморегуляторной стратегии (Kultz, 2015; Gui, 2016). Вместе с тем, в отличие от двустворчатых моллюсков, рыбы адаптируются за счет переноса ионов в жабрах и других важных осморегуляторных органах (Seale and Breves, 2022). При этом, инкубация рыб в условиях низкой солености приводит к снижению осмотической стойкости эритроцитов (Andreeva et al., 2013; Arihan et al., 2017). Способность двустворчатых моллюсков переключать механизмы соленостной адаптации слабо изучена. Вместе с тем, исследования транскриптома жабр *Cyclina sinensis* и мантии двух видов мидий (*Mytilus galloprovincialis* и *Xenostrobus securis*) после воздействия низкой солености также подтверждает наличие осмотических сенсоров у моллюсков (Ni et al., 2021; Yuan et al., 2019). 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 состоит из крупных гранулярных клеток, второй тип клеток составляет 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.

Список работ, опубликованных по теме диссертационной работы

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК РФ

1. Soldatov A.A. Erythroid Elements of Hemolymph in *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) under Conditions of the Combined Action of Hypoxia and Hydrogen Sulfide Contamination / A. A. Soldatov, T. A. Kukhareva, A.Yu. Andreeva, **E.S. Efremova** // Russian Journal of Marine Biology. 2018. Vol. 44, iss. 6. P. 452-457. <https://doi.org/10.1134/S1063074018060111>

2. **Kladchenko E.S.** Morphologic, cytometric and functional characterisation of *Anadara kagoshimensis* hemocytes / **E.S. Kladchenko**, A.Yu. Andreyeva, T.A. Kukhareva, A.A. Soldatov // Fish and Shellfish Immunology. 2020. Vol. 98. P. 1030-1032. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.061>

3. **Кладченко Е. С.** Влияние суточной гипоксии на функциональные показатели гемоцитов *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) / **Е.С. Кладченко**, А.Ю. Андреева, Т.А. Кухарева, В.Н. Рычкова, А.А. Солдатов // Морской биологический журнал. 2020. Т. 5, № 4. С. 28-36. <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.4.03>

4. **Kladchenko E.S.** Impact of Low Salinity on Hemocytes Morphology and Functional Aspects in Alien Clam *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) / **E.S. Kladchenko**, A.Yu. 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>

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

Материалы и тезисы конференций

6. **Кладченко Е. С.** Анализ клеточного цикла и морфофункциональных параметров гемоцитов *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* и *Anadara kagoshimensis* / **Е.С. Кладченко**, А.Ю. Андреева, Т.А. Кухарева // Понт Эвксинский – 2019 : материалы XI Всерос. науч.-практ. конф. молодых учёных по проблемам водных экосистем, посвящ. памяти д.б.н., проф. С. Б. Гулина, г. Севастополь, 23–27 сентября 2019 г. Севастополь. 2019. С. 30-32. <https://repository.marine-research.org/handle/299011/7410>

7. **Кладченко Е.С.** Влияние соленосного стресса на функциональные параметры гемоцитов *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) / **Е.С. Кладченко**, И.В. Головина, А.Ю. Андреева // Биология – наука XXI века: 24-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых 2020, Пущино. Сборник тезисов: Издательство Синхробук, 2020. С. 271.

8. **Кладченко Е. С.** Осмотическая стойкость гемоцитов двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis* (Bruguiere, 1789) / **Е.С. Кладченко**, А.Ю. Андреева // Современная гидробиология: глобальные проблемы Мирового океана : материалы XI Всерос. онлайн-школы-семинара для молодых ученых, студентов и аспирантов, г. Севастополь, 28 сентября – 2 октября 2020 г. Севастополь : ФИЦ ИнБЮМ, 2020. С. 14-15. <https://repository.marine-research.org/handle/299011/8669>

9. **Кладченко Е. С.** Влияние гипоксической нагрузки на функциональные характеристики гемоцитов *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) / **Е.С. Кладченко**, Т.А. Кухарева, В.Н. Рычкова // Комплексные исследования Мирового океана [КИМО-2020] : материалы V Всерос. науч. конф. молодых ученых, г. Калининград, 18-22 мая 2020 г. Калининград : АО ИО РАН, 2020. С. 257-258.

10. **Кладченко Е. С.** Влияние осмотического стресса на морфофункциональные параметры гемоцитов двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis* / **Е.С. Кладченко**, А.Ю. Андреева, В.Н. Рычкова // Изучение водных и наземных экосистем: история и современность : тез. докл. Междунар. науч. конф., посвящ. 150-летию Севастопольской биологической станции — Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского и 45-летию НИС «Профессор Водяницкий», 13–18 сентября 2021 г., Севастополь, Российская Федерация. Севастополь : ФИЦ ИнБЮМ, 2021. С. 390-391. <https://elibrary.ru/item.asp?id=46714968>

11. **Kladchenko E.** Ecological aspects of bivalve adaptation to salinity fluctuations on the example of *Anadara kagoshimensis* / **E. Kladchenko**, A. Andreyeva, V. Rychkova // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 2021. Vol. 937, iss. 2. Article no. 022070. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/937/2/022070>

12. **Kladchenko E. S.** Tolerance to hypersalinity stress in ark clams *Anadara kagoshimensis* / **E.S. Kladchenko**, A.Y. Andreyeva, T.A. Kukhareva, V.N Rychkova // Marine Biology in the 21st Century: Achievements and Development Outlook (in Commemoration of the 100th Anniversary of the Birth of Academician Alexey V. Zhirmunsky) : Book of Abstracts of the Intern. Conf., Oct. 6–8, 2021, Vladivostok, Russia. Vladivostok : NSCMB FEB RAS, 2021. P. 95-97.