

ВЛИЯНИЕ АДРЕНАЛИНА НА МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МИТОХОНДРИЙ И ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ГЕМОЦИТОВ СРЕДИЗЕМНОМОРСКОЙ МИДИИ (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*)

© 2024 г. А. А. Ткачук^{1,*}, Т. А. Кухарева¹, Е. С. Кладченко¹, А. Ю. Андреева^{1,2}

¹Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН,
г. Севастополь, Российская Федерация

²Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН,
г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

* e-mail: tkachuk@ibss-ras.ru

Поступила в редакцию 20.09.2024 г.

После доработки 05.11.2024 г.

Принята к публикации 07.11.2024 г.

Двустворчатые моллюски как обитатели литоральной зоны Мирового океана подвержены колебаниями абиотических факторов окружающей среды. Резкие колебания параметров среды обитания сопровождаются развитием физиологической стресс-реакции в организме моллюсков, при этом изменения функционального состояния животных происходят за счет выброса нейромедиаторов в циркуляторное русло гемолимфы. Катехоламины являются ключевыми сигнальными молекулами в системе нейроэндокринной регуляции организма двустворчатых моллюсков и также участвуют в модуляции иммунного ответа в период физиологического стресса. Гемоциты, как центральное звено клеточного иммунитета двустворчатых моллюсков имеют на поверхности клеточной мембраны адренорецепторы, что предполагает наличие функциональной взаимосвязи между внешним стрессом и клеточным иммунным ответом организма. В настоящей работе в условиях *in vitro* исследовано влияние адреналина в концентрациях 1 и 10 мкМ на фагоцитоз, способность к адгезии и агрегации гемоцитов средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Также изучено влияние адреналина на уровень спонтанной продукции активных форм кислорода и на изменения мембранного потенциала митохондрий клеток гемолимфы. Показано, что стимуляция гемоцитов мидий адреналином в концентрации 10 мкМ способствовала достоверному увеличению способности к фагоцитозу. Адреналин в концентрации 1 мкМ существенно увеличивал способность гемоцитов к адгезии на твердый субстрат. Также стимуляция клеток адреналином 10 мкМ в течение 30 минут приводила к росту мембранного потенциала митохондрий гемоцитов. Достоверных изменений в уровне спонтанной продукции активных форм кислорода в гемоцитах при воздействии адреналина не выявлено. Результаты настоящей работы свидетельствуют, что адреналин оказывает иммуномодулирующий эффект на гемоциты мидий и стимулирует их аэробный обмен.

Ключевые слова: средиземноморская мидия, гемоциты, адреналин, фагоцитоз, адгезия, активные формы кислорода, мембранный потенциал митохондрий

DOI: 10.31857/S0044452924070042, **EDN:** KKCDTR

ВВЕДЕНИЕ

Двустворчатые моллюски являются массовыми представителями прибрежной (в том числе, приливо-отливной) зоны Мирового океана, которая характеризуется наиболее нестабильными условиями существования [1]. Показано, что система нейроэндокринной регуляции функций организма составляет основу быстрой способности моллюсков адаптироваться к меняющимся условиям среды [2–3]. При этом нервная система двустворчатых моллюсков имеет примитивное строение в сравнении с позвоночными, так как функционально

дифференцированные органы отсутствуют [2]. Известно, что механизмы физиологического стресса у беспозвоночных животных высоко консервативны и, в целом, в значительной степени сходны с таковыми у млекопитающих [4]. Среди типичных реакций при стрессе, вызванном колебаниями условий среды обитания, а также воздействием токсикантов и биологических факторов, у двустворчатых моллюсков отмечается изменение состояния их иммунитета [5–9]. Иммунная система двустворчатых моллюсков, хотя и не имеет сложности адаптивного иммунитета позвоночных, обладает разнообраз-

ными механизмами врожденной неспецифической защиты, которые позволяют эффективно распознать и уничтожить патогены различной природы [2]. Свободно циркулирующие клетки гемолимфы (гемоциты) играют ключевую роль в механизмах иммунного ответа моллюсков. Эффективность клеточного иммунного ответа гемоцитов оценивают по таким показателям как фагоцитоз, адгезия к твердому субстрату, продукция активных форм кислорода (АФК) и других цитотоксических молекул, инкапсуляция, индукция апоптоза в клетках инфекционных агентов [9].

Модуляция функций иммунитета двустворчатых моллюсков при стрессе осуществляется нейроэндокринной системой, в которой центральную роль играют катехоламины (Catecholamines, CA): норадреналин, адреналин и дофамин. СА высвобождаются в гемолимфу в ответ на острый стресс [2, 10–11]. Показано, что гемоциты двустворчатых моллюсков имеют на поверхности клеточной мембраны многочисленные рецепторы к СА, при этом воздействие норадреналина и адреналина реализуется путем связывания молекул нейромедиаторов с адренорецепторами, которые функционально близки к β -адренорецепторам позвоночных животных [10–12]. Установлено также, что помимо эффекторной функции в реализации реакций иммунитета, гемоциты двустворчатых моллюсков способны самостоятельно синтезировать СА [2, 10–11]. Ингибирующее воздействие норадреналина на различные иммунные реакции гемоцитов, включая внутриклеточную продукцию АФК, фагоцитоз, активность фенолоксидазы, бактериолизитическую активность показано у гигантских устриц *Magallana (Crassostrea) gigas* (Thunberg, 1793), сиднейских устриц *Saccostrea glomerata* (A. Gould, 1850), гребешках Фарпера *Chlamys farreri* (K. H. Jones & Preston, 1904) и других видов двустворчатых моллюсков [10–11, 13–15]. Некоторые исследователи выдвинули гипотезу, что норадреналин может модулировать активность антиоксидантной защиты и продукцию АФК в гемоцитах в ответ на окислительный стресс, хотя точный механизм этого процесса до конца не изучен [16–17]. Также установлено, что норадреналин и дофамин снижают адгезию гемоцитов к субстрату, угнетают процесс фагоцитоза и активность фенолоксидазы у других видов водных беспозвоночных, среди которых белые креветки *Penaeus vannamei* (Boone, 1931), пресноводные гигантские креветки *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) и тигровые креветки *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) [18–21]. При этом, основная масса исследованной сосредоточена на изучении регуляторной роли норадреналина и дофамина, тогда как исследования функций адреналина фрагментарны. В связи с этим, цель настоящей работы заключается в исследовании

действия влияния различных концентраций адреналина на маркерные показатели клеточного иммунитета (фагоцитоз, адгезия, агрегация, продукция АФК) и на мембранный потенциал митохондрий средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) в условиях *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Средиземноморские мидии *M. galloprovincialis* (размер: 84.7 ± 1.5 мм, масса: 31.2 ± 2.8 г, $n = 150$) были получены на марикультурной ферме в районе г. Севастополя (ООО “Марикультура”) в феврале 2024 г. Для адаптации к лабораторным условиям (концентрация кислорода $7\text{--}8$ мг·л⁻¹, pH = 8.2, температура $18\text{--}20$ °С) моллюсков размещали в пластиковых аквариумах емкостью $50\text{--}70$ л, оборудованных системой аэрации и фильтрации воды в течение 1 недели. Мидии находились в состоянии функционального покоя. Далее из синуса заднего мускула-замыкателя раковины стерильным шприцем отбирали пробу гемолимфы ($0.5\text{--}2.0$ мл). Гемоциты трижды отмывали в стерильной морской воде на рефрижераторной центрифуге Eppendorf 5430R (500 g, 5 мин, при $+ 10$ °С). По окончании отмывки клетки ресуспендировали в стерильной морской воде (концентрация клеток $2\text{--}4 \cdot 10^6$ кл·мл⁻¹). Для получения оптимальной концентрации клеток в суспензиях пробу гемолимфы объединяли из двух особей.

Стимуляция гемоцитов адреналином проводилась в условиях *in vitro*. Готовую суспензию клеток инкубировали с адреналином в финальной концентрации 1 и 10 мкМ в течение 30 минут при $+ 4$ °С в темноте. Далее пробы подготавливались к исследованию адгезии и фагоцитоза.

Анализ адгезии и агрегации гемоцитов проводили по адаптированной методике Aladaileh et al., 2008. На предметные стекла наносили по 30 мкл стимулированной адреналином суспензии гемоцитов и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре и дневной освещенности. Далее пробы фиксировали и окрашивали эозином в течение 2 минут и анализировали на флуоресцентном микроскопе Olympus CX43 (Япония) в световом режиме. На каждом предметном стекле подсчитывали количество прикрепившихся клеток и агрегатов в десяти случайно выбранных полях зрения. Изображения анализировали с помощью программы ImageJ. Данные представлены как средняя частота прикрепившихся и агрегированных гемоцитов на поле зрения \pm стандартная ошибка [22].

Для определения фагоцитарной активности гемоцитов мидий к стимулированным адреналином суспензиям клеток гемолимфы добавляли зеленый флуоресцентный зимозан (Zymosan Green,

Molecular Probes Inc.) в соотношении 1:20 (число гемоцитов : число частиц зимозана) и инкубировали при 20 °С в темноте в течение 60 минут. Затем клетки отмывали 3 раза в стерильной морской воде на центрифуге при 500 g 5 мин для удаления свободного зимозана. Суспензии клеток наносили на предметное стекло и фотографировали на микроскопе Olympus CX 43 (Япония) во флуоресцентном режиме. Фагоцитарную активность (ФА) гемоцитов рассчитывали, как процент клеток, содержащих частицы зимозана. Фагоцитарный индекс (ФИ) определяли как среднее число частиц зимозана на один гемоцит. Объем выборки составил 10 проб на каждую экспериментальную группу, анализировали по 100 гемоцитов на пробу.

Изменения мембранного потенциала митохондрий гемоцитов и продукции АФК проводили методом проточной цитометрии. Анализ проводился спустя 5 и 30 минут инкубации клеток с адреналином в концентрациях 1 и 10 мкМ. Далее измеряли интенсивность флуоресценции клеток на канале FL1 (488 нм) проточного цитометра MACSQuant (Германия). Для анализа изменений мембранного потенциала митохондрий гемоцитов применялся краситель Rhodamine 123 (Rh123, Sigma) (время инкубации 30 минут при +4 °С в темноте), а способность клеток к спонтанной продукции АФК оценивали при помощи флуоресцентного зонда 2,7-диацетат дихлорофлуоресцеина (DCF-DA, Sigma) (время инкубации 30 минут при +4 °С в темноте).

Нормальность распределения данных проверяли при помощи теста Шапиро-Уилка. Распределение данных, полученных методами световой и

флуоресцентной микроскопии, было отличным от нормального, поэтому различия между группами проверяли при помощи непараметрического теста Крускала–Уоллиса, с последующим применением апостериорного анализа – теста Данна для множественных сравнений. Данные по проточной цитометрии анализировались двухфакторным дисперсионным анализом (two-way ANOVA) с последующим применением критерия Даннета для анализа различий опытных групп от контроля (нестимулированные клетки). Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. Результаты считались статистически значимыми, если вероятность ошибки первого рода (p) была меньше 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Стимуляция гемоцитов мидий адреналином в концентрации 10 мкМ достоверно увеличивала их ФИ и ФА. ФИ увеличился на 30 % относительно контроля (рис. 1 b), а ФА на 20 % ($p \leq 0.05$, $n = 10$) (рис. 1 c). При этом адреналин в концентрации 1 мкМ не влиял на способность гемоцитов к фагоцитозу.

Адреналин в концентрации 1 мкМ достоверно стимулировал адгезию гемоцитов к предметным стеклам: число адгезированных гемоцитов в полях обзора увеличилось на 79 % по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0.05$, $n = 10$) (рис. 2b). При этом у гемоцитов, инкубированных с 10 мкМ адреналина способность к адгезии не отличалась от контроля. Также адреналин в обеих концентрациях

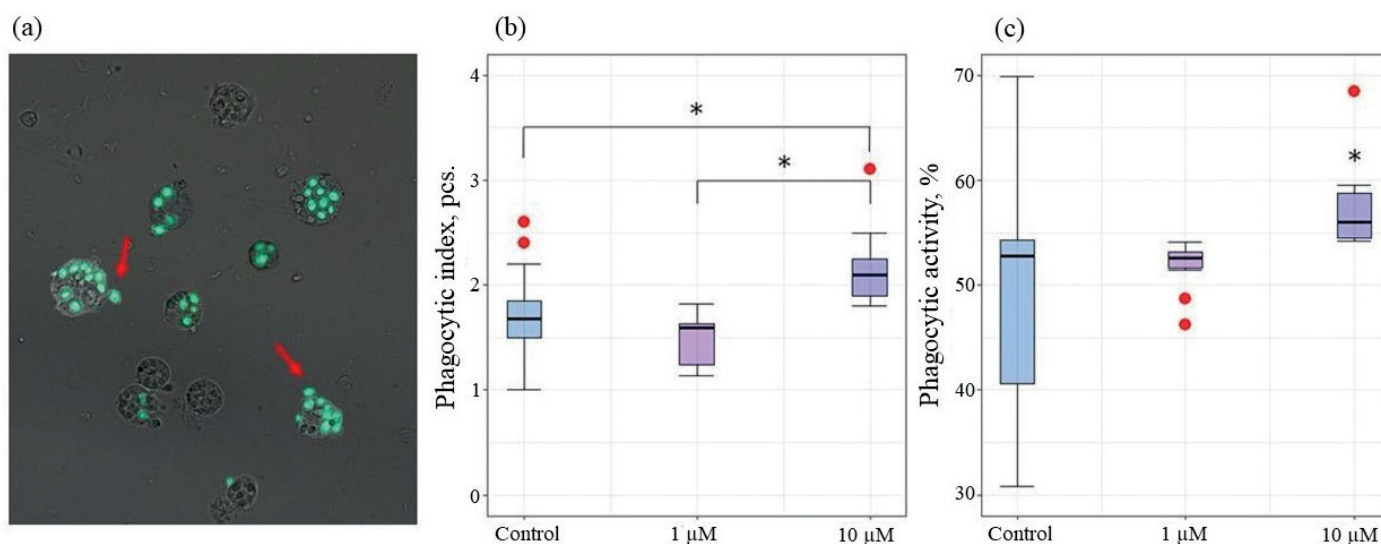


Рис. 1. Влияние адреналина (1 мкМ и 10 мкМ) на интенсивность фагоцитоза гемоцитов средиземноморской мидии *M. galloprovincialis*. (a) – микрофотографии гемоцитов, содержащих частицы зеленого флуоресцентного зимозана (↓), фагоцитарный индекс (b) и фагоцитарная активность (c) клеток гемолимфы. * – достоверно относительно контроля при $p \leq 0.05$ ($n = 10$).

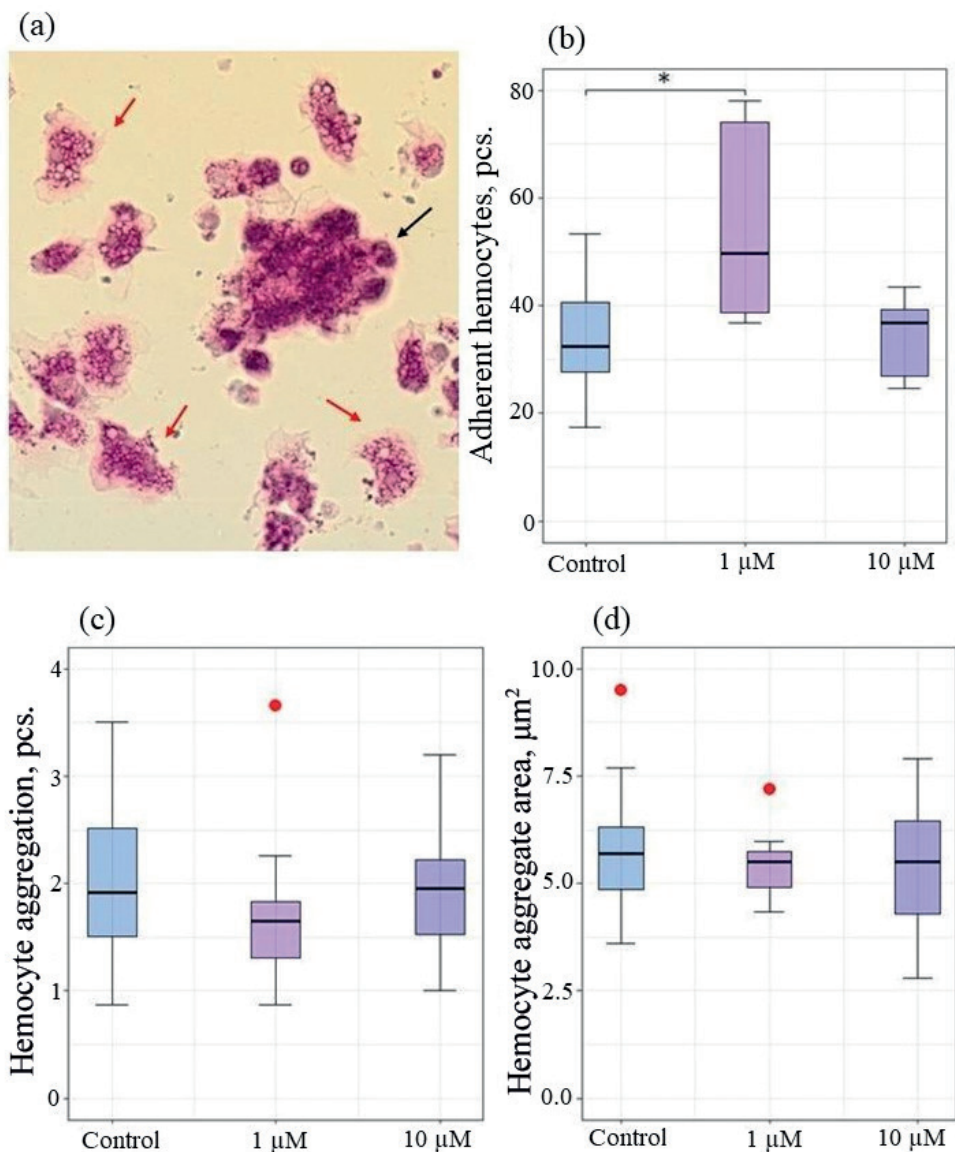


Рис. 2. Влияние адреналина (1 мкМ и 10 мкМ) на адгезию и агрегацию клеток гемолимфы средиземноморских мидий *M. galloprovincialis*: (a) – микрофотография суспензии гемоцитов, активированных добавлением адреналина (b) – число адгезированных гемоцитов, (c) – число агрегатов гемоцитов; (d) – площадь агрегатов гемоцитов. ↓ – адгезированные гемоциты; ↓ – агрегаты. * – достоверно относительно контроля при $p \leq 0.05$ ($n = 10$).

не влиял на агрегацию гемоцитов: число и площадь агрегатов клеток в полях обзора не менялась.

Адреналин в различных концентрациях достоверно не влиял на внутриклеточную концентрацию АФК в гемоцитах в течение периода эксперимента (5 мин, 30 мин) (рис. 3).

Мембранный потенциал митохондрий гемоцитов возрастал при инкубации с адреналином (рис. 4), достоверные различия с контролем отмечались спустя 30 минут воздействия адреналина в концентрации 10 мкМ. Показатели флуоресценции Rh123 выросли на 25 % относительно контроля ($p \leq 0.05$, $n = 10$) (рис. 4 б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что СА играют важную роль в регуляции иммунных функций гемоцитов [2, 10, 23]. Исследования по количественному определению содержания СА в органах и тканях различных видов двусторчатых моллюсков (в частности, *Patinopecten yessoensis* (Jay, 1857), *M. gigas*, *C. farreri* и *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758), как правило, свидетельствуют о более высоком содержании дофамина и норадреналина в ганглиях, гонадах, жабрах и гемолимфе, тогда как концентрации адреналина, существенно, в ряде случаев на порядок, ниже [24–26]. Так-

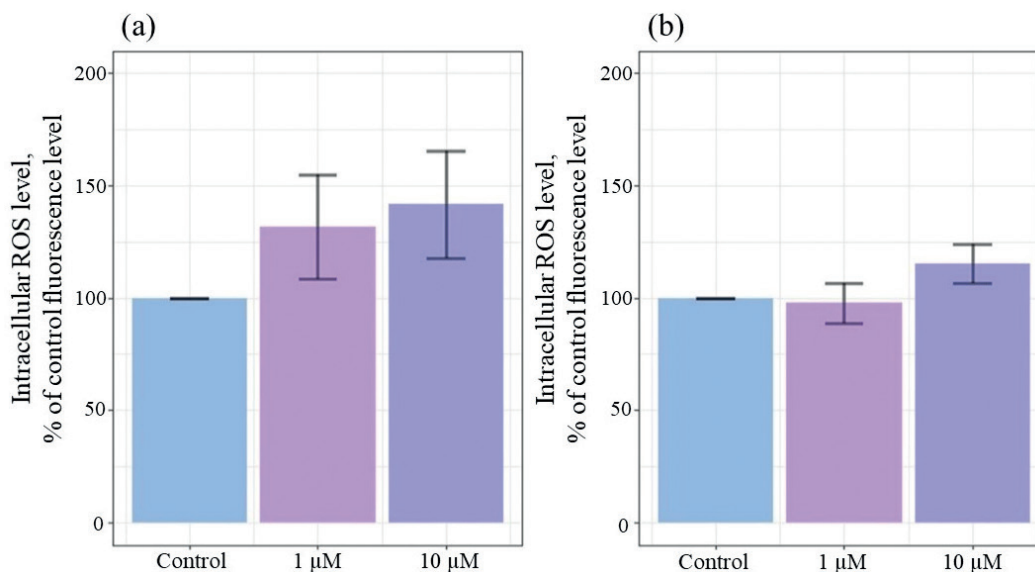


Рис. 3. Содержание активных форм кислорода в гемоцитах мидии при влиянии адреналина (1 мкМ и 10 мкМ) в течение 5 мин (а) и 30 мин (б).

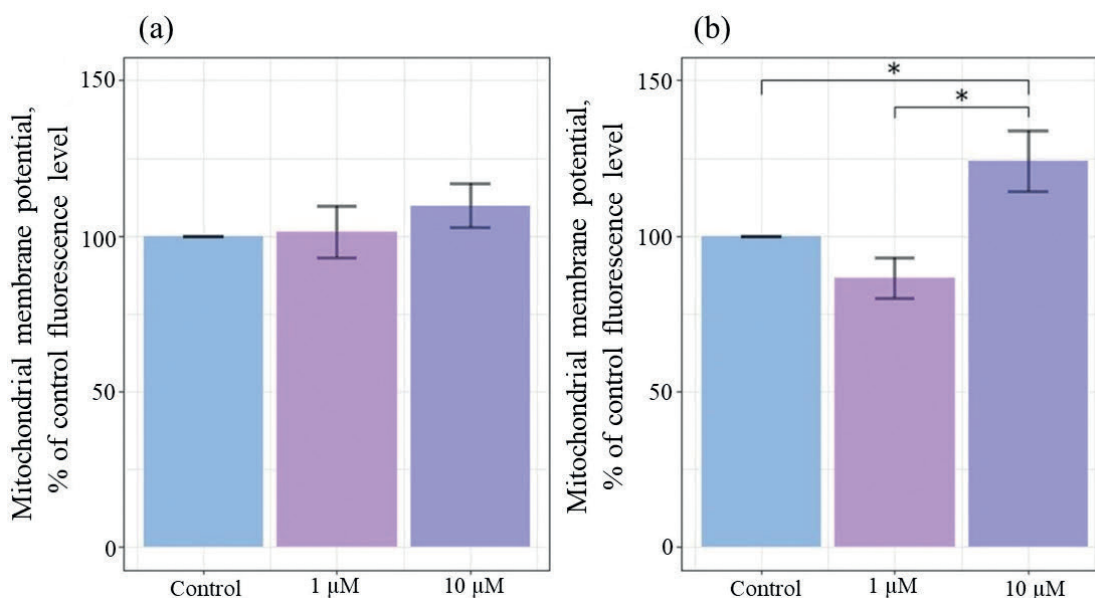


Рис. 4. Изменение мембранного потенциала митохондрий гемоцитов мидий при влиянии адреналина (1 мкМ и 10 мкМ) в течение 5 мин (а) и 30 мин (б). * – достоверно относительно контроля при $p \leq 0.05$ ($n = 10$)

же показано, что адреналин, норадреналин и дофамин синтезируются и выделяются гемоцитами при стимуляции липополисахаридами бактерий, факторами роста тромбоцитов, трансформирующим фактором роста (TGF- β 1) и др. веществами [3, 27]. При этом определение концентраций СА в органах, тканях и жидкостях организма двустворчатых моллюсков не позволяет в полной мере определить их функциональную роль. В особенности это касается адреналина, который быстро метаболизируется в организме (в течение 25–30 мин) вследствие чего

его детектируемая концентрация зачастую ниже предела измерения [3, 27–28]. Таким образом, для определения физиологических эффектов воздействия СА на клетки двустворчатых моллюсков наиболее целесообразно применение экспериментальной стимуляции *in vitro*.

Результаты настоящей работы свидетельствуют, что адреналин оказывал существенное воздействие на маркерные показатели клеточного иммунитета мидий. Наибольшая концентрация адреналина (10 мкМ) способствовала росту ФА и ФИ гемоци-

тов. Также установлено, что адреналин в минимальной концентрации (1 мкМ) достоверно стимулировал адгезию гемоцитов к субстрату. Таким образом, инкубация с адреналином оказывает иммуномодулирующий эффект на гемоциты мидий. Вместе с тем, не все исследованные показатели клеточного иммунного ответа реагировали на стимуляцию адреналином. Так, уровень спонтанной продукции АФК достоверно не отличался от контроля. При этом, влияние норадреналина на показатели клеточного иммунитета двустворчатых моллюсков зачастую отличается. Воздействие норадреналина *in vitro* ингибировало ФА, способность гемоцитов к адгезии к твердому субстрату и продукцию АФК у таких видов как гигантская устрица *M. gigas*, сиднейская каменная устрица *S. glomerata*, жемчужная устрица Аюка *Pinctada imbricata* (Röding, 1798) [10–11, 22, 29–30]. Очевидно, что система нейроэндокринной регуляции функций иммунной системы обладает существенной сложностью организации, поскольку различные типы нейромедиаторов способны специфически влиять на иммунные функции двустворчатых моллюсков. Кроме того, экзогенное или эндогенное (в отношении гемоцитов) происхождение СА, вероятно, также может влиять на характер наблюдаемых изменений показателей иммунного ответа [2]. Интерес вызывает и сам внутриклеточный путь регуляции ФА и способности гемоцитов к адгезии, поскольку оба процесса тесно связаны со свойствами клеточной мембраны и цитоскелета [31]. Известно, что адреналин способен влиять на различные механические свойства эритроцитов позвоночных, такие как деформируемость, жесткость и устойчивость к осмотическому шоку (кривая осмотической стойкости) [32–34]. У двустворчатых моллюсков осмотическая стойкость гемоцитов, напротив, не менялась при воздействии адреналина, хотя реакция регуляторного снижения объема в ответ на гипоосмотический стресс полностью останавливалась [35]. Эти результаты, а также достоверное увеличение числа адгезированных гемоцитов позволяют предположить, что в основе наблюдаемых изменений интенсивности фагоцитоза может быть регуляция свойств клеточной мембраны гемоцитов, однако, данное предположение требует дальнейших исследований.

Помимо влияния на маркерные показатели клеточного иммунитета, стимуляция гемоцитов мидий адреналином приводила к росту в них величины мембранного потенциала митохондрий. При этом достоверный рост отмечался спустя 30 мин воздействия при наибольшей концентрации адреналина (10 мкМ) тогда как кратковременный период воздействия и низкая концентрация вещества не приводили к достоверным изменениям интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных Rh123. Как правило, рост величины мембранного потенциала

митохондрий связан с усилением аэробного обмена в клетках и является общепринятым индикатором интенсивности клеточного дыхания [36–37]. Следовательно, можно предположить, что адреналин стимулирует аэробный метаболизм в гемоцитах мидий. Стимулирующее действие адреналина на клеточный метаболизм, в частности, углеводный обмен, широко исследовано на клеточных моделях позвоночных животных, включая клетки иммунной системы. Так воздействие адреналина на макрофаги крыс в течение 40 мин усиливало потребление глюкозы, а также продукцию в них перекиси водорода. Причем образование последней, по предположению авторов, было опосредовано митохондриями [38]. Также, в изолированных гепатоцитах речной миноги (*Lampetra fluviatilis* (Linnaeus, 1758)) и кардиомиоцитах крыс отмечено увеличение мембранного потенциала митохондрий и модуляция активности ферментов дыхательной цепи при стимуляции адреналином [39–40]. Таким образом, стимулирующее воздействие адреналина на интенсивность клеточного аэробного обмена показано на различных типах клеток у представителей как высших, так и низших позвоночных, что предполагает высокий консерватизм наблюдаемой функциональной связи. Результаты настоящей работы, в свою очередь, свидетельствуют о том, что механизмы воздействия адреналина на активность митохондрий присутствуют и у двустворчатых моллюсков.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе установлено, что клеточные иммунные реакции гемоцитов мидий чувствительны к воздействию адреналина. Показано усиление ФИ, ФА и увеличение адгезии гемоцитов к твердой поверхности, а также выявлено, что нарастание интенсивности клеточных иммунных реакций сопровождается ростом величины мембранного потенциала митохондрий. Последнее предполагает возможность нейроэндокринной регуляции интенсивности аэробного метаболизма у гемоцитов двустворчатых моллюсков, аналогично иммунцитам позвоночных (макрофаги).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям локального этического комитета ФИЦ ИнБЮМ, протокол № 1(6)/24 от 12.03.2024 г.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Государственного задания 124030100090-4 (FNNZ-2024-0035) “Механизмы функционирования иммунной системы двустворчатых

моллюсков и физиологические основы ее адаптации к абиотическим, биотическим и антропогенным факторам окружающей среды” (определение адгезии и агрегации гемоцитов к субстрату, анализ фагоцитоза и спонтанной продукции клетками АФК), а также Государственного задания № 075-00264-24-00 “Механизмы адаптации человека и животных к экстремальным воздействиям природного и антропогенного характера” (анализ изменений величины мембранного потенциала митохондрий гемоцитов).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.Ю.А), сбор данных (А.А.Т., Т.А.К.), обработка данных (А.А.Т., Т.А.К., А.Ю.А., Е.С.К.), написание и редактирование рукописи (А.Ю.А., А.А.Т., Т.А.К., Е.С.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lange X, Klingbeil K, Burchard H (2020) Inversions of estuarine circulation are frequent in a weakly tidal estuary with variable wind forcing and seaward salinity fluctuations. *J Geophysical Res: Oceans* 125: e2019JC015789. <https://doi.org/10.1029/2019JC015789>
2. Liu Z, Li M, Yi Q, Wang L, Song L (2018) The neuroendocrine-immune regulation in response to environmental stress in marine bivalves. *Front Physiol* 9: 1456. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01456>
3. Fabbri E, Balbi T, Canesi L (2024) Neuroendocrine functions of monoamines in invertebrates: Focus on bivalve molluscs. *Mol Cell Endocrinol* 112215. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2024.112215>
4. Adamo SA (2012) The effects of the stress response on immune function in invertebrates: an evolutionary perspective on an ancient connection. *Horm Behav* 62: 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.012>
5. Amorim VE, Gonçalves O, Capela R, Fernández-Boo S, Oliveira M, Dolbeth M, Arenas F, Cardoso PG (2020) Immunological and oxidative stress responses of the bivalve *Scrobicularia plana* to distinct patterns of heatwaves. *Fish Shellfish Immunol* 106: 1067–1077. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.09.024>
6. Sendra M, Sparaventi E, Novoa B, Figueras A (2021) An overview of the internalization and effects of microplastics and nanoplastics as pollutants of emerging concern in bivalves. *Sci Total Environment* 753: 142024. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142024>
7. Andreyeva AY, Kladchenko ES, Gostyukhina OL (2022) Effect of hypoxia on immune system of bivalve molluscs. *Marine Biol* 7: 3–16. <https://doi.org/10.21072/mbj.2022.07.3.01>
8. Tan K, Sun Y, Zhang H, Zheng H (2023) Effects of harmful algal blooms on the physiological, immunity and resistance to environmental stress of bivalves: Special focus on paralytic shellfish poisoning and diarrhetic shellfish poisoning. *Aquaculture* 563: 739000. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739000>
9. De la Ballina NR, Maresca F, Cao A, Villalba A (2022) Bivalve haemocyte subpopulations: a review. *Front Immunol* 13: 826255. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.826255>
10. Lacoste A, Malham SK, Cueff A, Poulet SA (2001) Noradrenaline modulates hemocyte reactive oxygen species production via β -adrenergic receptors in the oyster *Crassostrea gigas*. *Develop Compar Immunol* 25: 285–289. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(00\)00067-7](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(00)00067-7)
11. Lacoste A, Malham SK, Cueff A, Poulet SA (2001) Noradrenaline modulates oyster hemocyte phagocytosis via a β -adrenergic receptor–cAMP signaling pathway. *Gen Comparat Endocrinol* 122: 252–259. <https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7643>
12. Massarsky A, Trudeau VL, Moon TW (2011) β -blockers as endocrine disruptors: the potential effects of human β -blockers on aquatic organisms. *J Exp Zool Part A: Ecol Gen Physiol* 315: 251–265. <https://doi.org/10.1002/jez.672>
13. Lacoste A, Malham SK, Gélébart F, Cueff A, Poulet SA (2002) Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* 26: 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00067-2](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00067-2)
14. Jiang Q, Zhou Z, Wang L, Yang C, Wang J, Wu T, Song L (2014) Mutual modulation between norepinephrine and nitric oxide in haemocytes during the mollusc immune response. *Scie Rep* 4: 6963. <https://doi.org/10.1038/srep06963>
15. Liao Q, Lei F, Zhang N, Miao J, Tong R, Li Y, Pan L (2024) The immunotoxicity mechanism of hemocytes in *Chlamys farreri* incubated with noradrenaline and benzo [a] pyrene-7, 8-dihydrodiol-9, 10-epoxide alone or in combination. *Fish Shellfish Immunol* 144: 109278. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.109278>
16. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K (2014) Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Res International* 2014: 761264. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
17. Álvarez-Diduk R, Galano A (2015) Adrenaline and noradrenaline: protectors against oxidative stress or molecular targets? *J Physic Chem B* 119: 3479–3491. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b00052>
18. Cheng W, Chieu HT, Ho MC, Chen JC (2006) Noradrenaline modulates the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 21: 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.09.003>
19. Chang CC, Wu ZR, Kuo CM, Cheng W (2007) Dopamine depresses immunity in the tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol* 23: 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.09.001>

20. Chang CC, Hung MD, Cheng W (2011) Norepinephrine depresses the immunity and disease-resistance ability via $\alpha 1$ - and $\beta 1$ -adrenergic receptors of *Macrobrachium rosenbergii*. *Develop Compar Immunol* 35: 685–691. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.01.020>
21. Li JT, Lee PP, Chen OC, Cheng W, Kuo CM (2005) Dopamine depresses the immune ability and increases susceptibility to *Lactococcus garvieae* in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol* 19: 269–280. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.003>
22. Aladaileh S, Mohammad MG, Ferrari B, Nair SV, Raftos DA (2008) In vitro effects of noradrenaline on Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Mol Integr Physiol* 151: 691–697. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.08.028>
23. Barcia R, Ramos-Martínez JI (2011) Stress-based modulation of the immune response in molluscan hemocytes: a two-receptor model. *Invertebrat Survival J* 8: 56–58.
24. Osada M, Matsutani T, Nomura T (1987) Implication of catecholamines during spawning in marine bivalve molluscs. *International journal of invertebrate reproduction and development* 12: 241–251. <https://doi.org/10.1080/01688170.1987.10510324>
25. Osada M, Nomura T (1989) Seasonal variations of catecholamine levels in the tissues of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol Part C: Comp Pharmacol* 93: 171–173. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(89\)90029-7](https://doi.org/10.1016/0742-8413(89)90029-7)
26. Chen M, Yang H, Xu B, Wang F, Liu B (2008) Catecholaminergic responses to environmental stress in the hemolymph of Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *J Exp Zool Part A: Ecol Gen Physiol* 309: 289–296. <https://doi.org/10.1002/jez.458>
27. Cao A, Ramos-Martínez JI, Barcia R (2007) In hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* Lmk., treatment with corticotropin or growth factors conditions catecholamine release. *Internat Immunopharmacol* 7: 1395–1402. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.07.008>
28. Canesi L, Miglioli A, Balbi T, Fabbri E (2022) Physiological roles of serotonin in bivalves: possible interference by environmental chemicals resulting in neuroendocrine disruption. *Front Endocrinol* 13: 792589. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.792589>
29. Chen H, Wang L, Zhou Z, Hou Z, Liu Z, Wang W, Gao D, Gao Q, Wang M, Song, L (2015) The comprehensive immunomodulation of NeurimmiRs in haemocytes of oyster *Crassostrea gigas* after acetylcholine and norepinephrine stimulation. *BMC Genomics* 16: 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2150-8>
30. Kuchel RP, Raftos DA (2011) In vitro effects of noradrenaline on Akoya pearl oyster (*Pinctada imbricata*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 31: 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.05.025>
31. Freeman SA, Grinstead S (2014) Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol Rev* 262: 193–215. <https://doi.org/10.1111/imr.12212>
32. Volodchenko AI, Tsirkin VI, Kostyaev AA (2014) The mechanism of change in the rate of agglutination of human erythrocytes under the influence of adrenaline. *Hum Physiol* 40: 171–178. <https://doi.org/10.1134/S0362119714010198>
33. Andreyeva AY, Kladchenko ES, Sudnitsyna JS, Krivchenko AI, Mindukshev IV, Gambaryan S (2021) Protein kinase A activity and NO are involved in the regulation of crucian carp (*Carassius carassius*) red blood cell osmotic fragility. *Fish Physiol Biochem* 47: 1105–1117. <https://doi.org/10.1007/s10695-021-00971-4>
34. Chelebueva ES, Kladchenko ES, Mindukshev IV, Gambaryan S, Andreyeva AY (2024) ROS formation, mitochondrial potential and osmotic stability of the lamprey red blood cells: effect of adrenergic stimulation and hypoosmotic stress. *Fish Physiol Biochem* 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10695-024-01342-5>
35. Ткачук АА, Кладченко ЕС, Андреева АЮ (2023) Роль бета-адренорецепторов и аденилатциклазы в процессе адаптации гемоцитов средиземноморской мидии (*Mytilus galloprovincialis*) к гипоосмотическому стрессу. *Биоразнообраз устойчив разв* 8: 52–61. [Ткачук АА, Кладченко ЕС, Андреева АЮ (2023) The role of beta-adrenergic receptors and adenylate cyclase in the process of adaptation of hemocytes of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) to hypoosmotic stress. *Biodivers Sustainable Devel* 8: 52–61. (In Russ)]. <https://doi.org/10.21072/eco.2023.28.04>
36. Venditti P, Di Stefano L, Di Meo S. (2013) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion* 13: 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.01.008>
37. Koch RE, Buchanan KL, Casagrande S, Crino O, Dowling DK, Hill GE, Hood WR, McKenzie M, Mariette MM, Noble DWA, Pavlova A, Seebacher F, Sunnucks P, Udino E, White CR, Salin K, Stier A (2021) Integrating mitochondrial aerobic metabolism into ecology and evolution. *Trends Ecol Evol* 36: 321–332. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2020.12.006>
38. Fernando L, Rosa BC, Safi DA, Cury Y, Curi R (1992) Effect of epinephrine on glucose metabolism and hydrogen peroxide content in incubated rat macrophages. *Biochem Pharmacol* 44: 2235–2241. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(92\)90352-J](https://doi.org/10.1016/0006-2952(92)90352-J)
39. Konovalova SA, Zubatkina IS, Savina MV (2010) The influence of estradiol, epinephrine and cAMP on mitochondria energization and intracellular free Ca²⁺ concentration in lamprey hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1797: 126–127. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.04.375>
40. Tapbergenov SO, Sovetov BS, Smailova ZK (2022) Adrenergic receptors in the mechanism of regulation of mitochondrial and cytoplasmic enzymes of cardiomyocytes by catecholamines. *Bull Exp Biol Med* 173: 330–334. <https://doi.org/10.1007/s10517-022-05544-w>

EFFECT OF ADRENALINE ON MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL AND INDICATORS OF THE CELLULAR IMMUNITY OF HEMOCYTES OF THE MEDITERRANEAN MUSSEL (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*)

A. A. Tkachuk^{a, #}, T. A. Kukhareva^a, E. S. Kladchenko^a, and A. Yu. Andreyeva^{a, b}

^aA. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation

^bSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

[#]e-mail: tkachuk@ibss-ras.ru

Bivalves as inhabitants of the littoral zone of the World Ocean are subjected to fluctuations in abiotic environmental factors. Sharp fluctuations in environmental parameters are accompanied by the development of a physiological stress reaction in the organism of mollusks, while changes in their functional state occur due to the release of neurotransmitters into the hemolymph. Catecholamines are key signaling molecules in the system of neuroendocrine regulation of bivalve mollusks and also are involved in the modulation of the immune response during physiological stress. Hemocytes, as the central effector of the cellular immunity of bivalve mollusks, have adrenoreceptors on the surface of the cell membrane, which suggests the presence of a functional relationship between external stress and the cellular immune response. In the present work, the effect of adrenaline at concentrations of 1 and 10 μM on phagocytosis, adhesion and aggregation capacity of hemocytes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) was investigated *in vitro*. The effect of adrenaline on the level of spontaneous production of reactive oxygen species and on changes in the mitochondrial membrane potential of hemocytes was also studied. It was shown that stimulation of mussel hemocytes with adrenaline at a concentration of 10 μM contributed to a reliable increase in the ability to phagocytosis. Adrenaline at a concentration of 1 μM significantly increased the ability of hemocytes to adhere to a solid substrate. Also, stimulation of cells with adrenaline at 10 μM for 30 minutes led to an increase in the membrane potential of hemocyte mitochondria. No reliable changes in the level of spontaneous production of active forms of oxygen in hemocytes under the influence of adrenaline were detected. The results of this work indicate that adrenaline has an immunomodulatory effect on mussel hemocytes and stimulates their aerobic metabolism.

Keywords: Mediterranean mussel, hemocytes, adrenaline, phagocytosis, adhesion, reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential