

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«Дальневосточный федеральный университет»

На правах рукописи

СОКОЛЬНИКОВА ЮЛИЯ НИКОЛАЕВНА

**АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЙ В ДИАГНОСТИКЕ
ЗДОРОВЬЯ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ *MODIOLUS KURILENSIS***

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Кумейко Вадим Владимирович

Владивосток – 2021

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Защитно-адаптационные реакции двустворчатых моллюсков	13
1.2 Биомаркеры здоровья.....	18
1.3 Морфофункциональная спецификация гемоцитов двустворчатых моллюсков.....	23
1.4 Реакции клеточного иммунитета	28
1.5 Факторы, влияющие на морфофункциональные свойства гемоцитов	34
1.5.1 Абиотические факторы	34
1.5.2 Биотические факторы.....	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	49
2.1 Материалы.....	49
2.1.1 Объект исследования.....	49
2.1.2 Сбор материала	49
2.1.3 Районы сбора материала	51
2.2 Методы	53
2.2.1 Взятие и подготовка препаратов гемолимфы	53
2.2.2 Морфофункциональный анализ клеточных факторов гемолимфы	53
2.2.2.1 Общий и дифференциальный подсчёт числа гемоцитов	53
2.2.2.2 Фракционирование клеток гемолимфы	54
2.2.2.3 Ультраструктурный анализ.....	54
2.2.2.4 Цитохимический анализ.....	55
2.2.2.5 Флуоресцентное окрашивание микрофиламентов	56
2.2.2.6 Оценка содержания лизосом и их ферментативной активности.....	57
2.2.2.7 Оценка активности кислородзависимой противоинойфекционной системы	57
2.2.2.8 Оценка фагоцитарной активности.....	58
2.2.2.9 Оценка пролиферативной активности	59
2.2.3 Гистопатологический анализ.....	60
2.2.3.1 Количественная оценка гистологических параметров.....	60
2.2.3.2 Анализ гистопатологического статуса.....	63
2.2.4 Моделирование инфицирования	64
2.2.5 Моделирование острой кровопотери.....	65
2.2.6 Исследование моллюсков, зараженных зелеными микроводорослями	65
2.2.6.1 Выделение из тканей моллюсков микроводорослей и получение их культуры.....	65
2.2.6.2 Молекулярно-генетический анализ микроводорослей	66
2.2.6.3 Определение степени инвазии моллюсков.....	67
2.2.6.4 Заражение моллюсков <i>C. parasitica</i> в лабораторных условиях.....	68
2.2.6.5 Анализ криосрезов тканей зараженных моллюсков.....	69
2.2.6.6 Оценка иммунного и апоптического статуса зараженных моллюсков	69

2.3 Анализ данных.....	70
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	71
3.1 Клеточный состав гемолимфы <i>M. kurilensis</i>	71
3.2 Показатели клеточного иммунитета <i>M. kurilensis</i> в условиях нормы	80
3.2.1 Возрастные и половые особенности показателей гемоцитов.....	80
3.2.2 Фагоцитарная активность гемоцитов в отношении различных видов бактерий.....	81
3.3.3 Иммунный статус моллюсков из условно-фоновых акваторий.....	81
3.3.4 Межгодовая динамика клеточных параметров иммунитета моллюсков залива Восток	82
3.3.5 Сезонная динамика клеточных параметров иммунитета моллюсков залива Восток	82
3.3 Динамика показателей клеточного иммунитета при импульсном воздействии	84
3.3.1 Моделируемое инфицирование	84
3.3.2 Моделируемая острая кровопотеря.....	88
3.3 Клеточные реакции в ответ на хроническое загрязнение.....	90
3.3.1 Иммунный статус.....	90
3.3.2 Гистопатологический статус	92
3.3.2.1 Пищеварительная железа	92
3.3.2.2 Почки.....	96
3.3.3 Индекс гистопатологического состояния.....	98
3.3.4 Корреляционный анализ иммунных и гистопатологических параметров	100
3.4 Физиологическое состояние моллюсков, зараженных <i>Coccomyxa parasitica</i>	101
3.4.1 Выделение и характеристика микроводорослей в постоянной культуре.....	101
3.4.2 Анализ тканей моллюсков, инвазированных паразитической микроводорослью	106
3.4.3 Изменение показателей иммунитета моллюсков при заражении <i>Coccomyxa</i>	113
3.5 Интегральный индекс здоровья.....	119
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	121
4.1 Морфофункциональные особенности гемоцитов <i>M. kurilensis</i>	121
4.2 Вариативность показателей иммунитета <i>M. kurilensis</i> в условиях относительной нормы .	125
4.3 Клеточные защитные реакции <i>M. kurilensis</i> при стрессовых условиях	130
4.3.1 Инфицирование.....	130
4.3.2 Острая кровопотеря	134
4.3.3 Загрязнение.....	136
4.3.4 Гистопатологии.....	137
4.3.5 Инвазия зеленой микроводоросли <i>Coccomyxa</i>	141
4.4 Разработка интегрального индекса здоровья для оценки физиологического статуса	151
ВЫВОДЫ	154
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	156

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФА – активные формы азота
АФК – активные формы кислорода
БАВ – биологически активные вещества
БДУ – 5-бromo-2-дезоксиуридин
БСА – бычий сывороточный альбумин
ГИ – индекс гистопатологического состояния
ГЛР – гемолитическая реакция
ГП – глутатионпероксидаза
ГР – глутатионредуктаза
ГТ – глутатионтрансфераза
ГЭР – гладкий эндоплазматический ретикулум
ДАБ – 3,3-диаминобензидина тетрагидрохлорид
ИЛ – интерлейкин
ИСС – искусственная солевая среда
КАТ – каталаза
КОЕ – колониеобразующая единица
Контр – контрольная группа
КФ – кислая фосфатаза
МПО – миелопероксидаза
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НСТ – нитросиний тетразолий-п (хлорид)
НЧ – наночастицы
ОЕФ – относительные единицы флуоресценции
ОЧГ – общее число гемоцитов
ПАУ – полициклические ароматические углеводороды
ПВЖ – пищеварительная железа
ПДК – предельно допустимые концентрации
ПОЛ – липопероксидирование
ПФА – параформальдегид
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РГА – реакция прямой гемагглютинации
рДНК – рибосомная дезоксирибонуклеиновая кислота
СМВ – стерильная морская вода

СОД – супероксиддисмутаза
Трис – трис(гидрохиметил)аминометан
ТБС – трис-буферный солевой раствор
ФА – фагоцитарная активность
ФБС – фосфатно-буферная смесь
ФБСС – физиологическая бескальциевая солевая среда
ФИ – фагоцитарный индекс
ФО – фенолоксидаза
ШЭР – шероховатый эндоплазматический ретикулум
ЩФ – щелочная фосфатаза
Эксп – экспериментальная группа
BAI – bioeffect assessment index (индекс оценки биоэффекта)
BI – biomarker index (биомаркеров индекс)
DAPI – 4,6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride
FSC – forward scattering channel (канал прямого светорассеивания)
H – histon (гистон)
HAI – health assessment index (индекс оценки здоровья)
HEPES – N-(2-гидроксиэтил)-пиперазин-N'-2-этансульфоукислота
IBR – integrated biomarker response index (интегрированный ответ биомаркеров)
IHI – integral health index (интегральный индекс здоровья, ИИЗ)
MAb – monoclonal antibody (моноклональное антитело)
OsHV-1 – Остридовирок герпеса
PDGF – platelet-derived growth factor (фактор роста тромбоцитов)
PI – propidium iodide (йодид пропидия)
QPX – quahog parasite unknown (неизвестный паразит венерок)
SSC – side scattering channel (канал бокового светорассеивания)
TGF – transforming growth factor (трансформирующий ростовой фактор)
TNF – tumor necrosis factor (фактор некроза опухоли)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Двустворчатые моллюски – одни из наиболее массовых представителей бентосных сообществ морской фауны, многие из которых являются ценными объектами промысла и аквакультуры. Под влиянием неблагоприятных факторов среды происходит напряжение их адаптационных и защитных систем, и как следствие снижаются темпы роста и развития, повышаются заболеваемость и смертность. Для оперативной оценки экологической безопасности и сохранения биоразнообразия, а также развития морских хозяйств, требуются простые и надежные технологии диагностики состояния здоровья морских гидробионтов и среды их обитания. В настоящее время методы контроля физиологического состояния морских организмов недостаточно хорошо развиты, что связано с отсутствием четких критериев проведения подобных работ и недостатком сведений о границах нормы и патологии.

Изменения параметров тканей внутренней среды являются наиболее достоверным отражением механизмов адаптации организмов к условиям обитания. У позвоночных животных и человека оценка гематологических показателей давно входит в число первоочередных задач диагностики физиологического статуса организма. В таком случае, гемолимфа моллюсков, отвечающая за формирование физиологических адаптаций, поддержание гомеостаза и обеспечение иммунной защиты, выступает одним из наиболее перспективных и доступных инструментов диагностики здоровья этих организмов. Анализ параметров иммунитета, сопряженный с определением гистопатологического, инфекционного и инвазионного статусов моллюсков, позволит определить референсные диапазоны этих показателей в условиях нормы и при патогенетических процессах.

Степень разработанности темы. В течение последних двух десятилетий разнообразные гистологические параметры органов рыб и двустворчатых моллюсков были исследованы и использованы в качестве биомаркеров состояния окружающей среды (Cajaraville et al., 1992; Au, 2004; Marigomez et al., 2006; Schettino et al., 2012), некоторые из которых успешно применяются в крупных национальных и международных программах мониторинга (Kumeiko et al., 2018). Несмотря на высокую достоверность результатов, получаемых с помощью данного подхода, он позволяет регистрировать в основном изменения на поздних стадиях их развития. Таким образом, для создания корректного показателя состояния здоровья в протоколе диагностики одновременно с морфологическими должны быть введены и функциональные тесты, определяющие клеточную активность. Основой защитно-адаптационной системы двустворчатых моллюсков являются гемоциты, играющие ключевую роль в уничтожении патогенов, заживлении ран, поглощении и транспортировке питательных веществ, размножении, экскреции, образовании раковины, а

также производстве и секреции гуморальных факторов (Allam, Raftos, 2015; Evariste et al., 2016; Ladhar-Chaabouni, 2016). Кроме того, в ряде работ показано, что при каких-либо нарушениях в организме, даже не выраженных на тканевом уровне, в первую очередь происходит изменение характеристик гемоцитов, их мобилизация и миграция к органу, испытывающему наибольшую нагрузку со стороны повреждающего фактора (Allam et al., 2000; Sheir et al., 2010). Проявляемая в данном случае лабильность гематологических параметров двустворчатых моллюсков отражает высокую степень их чувствительности и реактивности, что является первоочередным требованием, предъявляемым к подобным инструментам диагностики состояния здоровья. К тому же большинство иммунологических методов являются количественными и поддаются статистической обработке, что особенно важно для установления зависимости между дозой, эффектом и временем воздействия на организм. Таким образом, определив вариативность клеточных показателей иммунитета в условиях относительной нормы и при различных патогенетических процессах, возможно провести количественный анализ взаимосвязи параметров иммунитета и степени развития патогенетического процесса. Вместе с тем комплексный учет иммунологических и гистоморфологических показателей, наиболее достоверно отражающих физиологическое состояние этих животных, может обеспечить релевантную и интегральную характеристику физиологического состояния морских организмов (Au, 2004; Montaudouin et al., 2010; Bignell et al., 2011; Matozzo et al., 2018).

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлся анализ клеточных защитных реакций в диагностике здоровья двустворчатых моллюсков *Modiolus kurilensis*.

Для достижения цели были поставлены задачи:

1. Провести морфофункциональную спецификацию клеточных популяций гемоцитов *M. kurilensis*;
2. Установить пределы вариативности параметров клеточного иммунитета в условиях нормы;
3. Провести анализ изменения параметров клеточного иммунитета при хроническом загрязнении, инфицировании, потере гемолимфы, паразитарной инвазии, гистопатологии;
4. Разработать метод количественной оценки состояния здоровья двустворчатых моллюсков, основываясь на иммунных и гистологических параметрах.

Научная новизна. Впервые выполнена идентификация гемоцитов *M. kurilensis*, основанная не только на морфологических критериях, но и учитывающая комплекс морфофункциональных признаков, в результате которой были описаны четыре типа клеток

гемолимфы, характеризующиеся исключительными признаками: гемолбласты, агранулоциты, базофильные и эозинофильные гранулоциты.

Впервые описана динамика морфофункциональных параметров клеточных факторов гемолимфы двустворчатых моллюсков в ответ на инфицирование термически инактивированными *Staphylococcus* и потерю гемолимфы.

Для гистологического анализа почек и пищеварительной железы двустворчатых моллюсков были предложены оригинальные формулы оценки ряда гистоморфологических параметров. Впервые выполненная количественная оценка гистопатологических изменений показала достоверно большую интенсивность и частоту встречаемости в почках у животных из импактной акватории кариопикноза, изменений площади и структуры конкреций, толщины базальной мембраны и формы нефроцитов, а в пищеварительной железе – кариопикноза, гипервакуолизации, некроза, инфильтрации интерстициального пространства гемоцитами, оккупации фиброзной тканью и паразитами.

В результате данной работы разработан простой и универсальный способ оценки здоровья двустворчатых моллюсков, выраженный в виде интегрального индекса здоровья и основанный на нормализации и интеграции достоверно различающих между исследуемыми выборками параметров физиологического состояния моллюсков. Данный способ позволяет интегрировать одни из ключевых показателей физиологического состояния организмов – гистопатологические и иммунологические, имеющих, как правило, разную шкалу измерений.

Из тканей морфологически атипичных *M. kurilensis* была впервые изолирована в чистом виде культура микроводоросли *Coccomyxa parasitica*. Благодаря впервые проведенному комбинированному анализу апоптоза, гистопатологических и иммунных характеристик у естественно и экспериментально зараженных зелеными микроводорослями *Coccomyxa parasitica* моллюсков был подтвержден паразитический статус данной микроводоросли.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные результаты содержат важные фундаментальные сведения, которые пополняют знания о системе врожденного иммунитета беспозвоночных. Важнейшим значением работы является практический результат, описывающий референсные значения морфофункциональных параметров гемоцитов моллюсков в норме и их изменение при различных патогенетических процессах (инфицировании, потере гемолимфы, хроническом загрязнении, гистопатологии, паразитарной инвазии). Описанная динамика иммунного ответа при моделируемом инфицировании может быть полезной в разработке мер, направленных на повышение резистентности двустворчатых моллюсков к различным патогенам. Полученные данные об иммунном статусе моллюсков во время моделируемой потери гемолимфы могут быть

полезны в прогнозе вероятных осложнений, связанных с развитием инфекций на фоне травмы еще до их клинического проявления, и своевременном применении методов профилактической и лечебной иммунокоррекции.

Разработанный интегральный индекс здоровья, основанный на количественной оценке и интеграции релевантных параметров организма, является эффективным инструментом оценки состояния здоровья, как отдельных особей, так и целых популяций двустворчатых моллюсков, и его также можно применять для динамического наблюдения за состоянием моллюсков и среды их обитания при различных условиях.

Кроме того, результаты работы пополняют фундаментальные сведения о структуре и функционировании довольно редкой, но интересной форме симбиотических отношений среди двустворчатых моллюсков и микроводорослей. Практическая значимость данной части работы, заключается в разработке комплексного методического подхода выделения и поддержания постоянной культуры паразитических микроводорослей *C. parasitica*. Детальное понимание механизмов, лежащих в основе инициации процесса симбиоза, сложных отношений «паразит-хозяин» и возможность управлять биотическими связями для устойчивого развития экосистем является важнейшей фундаментальной биологической задачей, открывающей широкие перспективы для управления биосистемами и конструирования новых высокоэффективных форм симбиосистем. Определение механизмов резистентности микроводорослей к защитным факторам хозяина или компетентности последнего к данным микроорганизмам может способствовать разработке систем биологической защиты ценных культивируемых видов гидробионтов.

Результаты научно-исследовательской работы внедрены в содержание специальных курсов, читаемых для студентов профилей «Клеточная биология и генетика» и «Молекулярная биотехнология». Используемые в работе методы и технологические процедуры преподаются в рамках таких дисциплин как «Большой практикум по клеточной биологии и генетике», «Общая биология и микробиология» и «Морская биотехнология».

Методология и методы диссертационного исследования. В данном диссертационном исследовании применены классические и современные методы клеточной биологии. Для оценки морфофункциональных параметров гемоцитов моллюсков применяли комплекс методик, основанных на цитохимических окрасках и ультраструктурном анализе клеточных фракций гемолимфы, полученных в ходе центрифугирования в градиенте плотности среды. Дальнейшая работа основывалась на выявлении и количественной оценке комплекса релевантных показателей иммунного, гистопатологического и инфекционного статусов двустворчатых моллюсков при различных факторах внешней среды, и их дальнейшем корреляционном анализе с целью определения вариативности данных

показателей в условиях относительной нормы и при патогенетических процессах. Для оценки гистопатологического и паразитарного статуса животных применяли стандартные гистологические и молекулярные методики обработки и анализа материала с некоторыми модификациями, подходящими для данного объекта исследования. Состояние иммунной системы моллюсков оценивали, применяя классические методы анализа иммунного статуса, применяемые, в том числе в ветеринарной практике, и основывающиеся на постановке ряда реакций с участием клеточных и гуморальных факторов гемолимфы. Поскольку исследование направлено на выявление иммунных параметров, адекватно отражающих физиологическое состояние моллюсков при различных условиях, то следующим этапом работы являлась проверка результатов на предмет их аналитической ценности, статистической достоверности, корреляционных взаимосвязей и, в конечном итоге, выявление референсных границ показателей и их вероятные патологические значения. Далее, используя математико-статистические методы анализа, был разработан интегральный индекс здоровья. Этот инструмент, основан на нормализации значений всех параметров, которые имеют достоверные различия между исследуемыми выборками, и он применим к любым молекулярным, клеточным или тканевым характеристикам, но более эффективен в комбинированной форме. Такой подход приводит к унифицированной количественной оценке, не зависящей от мнения оператора, и может служить эффективным диагностическим инструментом оценки различных патогенетических процессов у моллюсков из естественных популяций и марикультурных хозяйств.

Положения, выносимые на защиту:

1. В гемолимфе *M. kurilensis* присутствуют четыре типа гемоцитов, характеризующихся исключительными морфофункциональными признаками: гемобласты, агранулоциты, эозинофильные и базофильные гранулоциты.

2. Морфофункциональные параметры гемоцитов *M. kurilensis*, такие как число гемоцитов, фагоцитарная активность, доля клеток с активными формами кислорода являются надежными и высокочувствительными показателями физиологического состояния моллюсков.

3. Разработанный интегральный индекс здоровья применим как для оценки иммунного статуса, так и при количественном гистопатологическом анализе, но более эффективен в комбинированной форме. Индекс обеспечивает унифицированную количественную характеристику, не зависящую от оператора, и служит валидным диагностическим инструментом идентификации различных патогенетических процессов.

Степень достоверности результатов. Достоверность полученных результатов обеспечивается их релевантностью поставленным задачам, репрезентативностью выборок

экспериментальных животных, применением адекватных методов исследования, корректной обработкой данных с помощью современных методов математико-статистического анализа, валидизацией и воспроизводимостью разработанных технологий, фактологическим материалом в виде рисунков и таблиц, а также согласованностью полученных данных ранее опубликованным научным работам. Кроме того, большинство полученных в ходе выполнения диссертационной работы результатов опубликованы в рецензируемых международных научных изданиях, реферируемых базами данных Scopus, Web of Science и РИНЦ, и представлены на конференциях различного уровня.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на международных конференциях: «Научно-технологические разработки в области изучения и мониторинга морских биологических ресурсов» (Россия, 2017), «Unique Marine Ecosystems: Modern Technologies of Exploration and Conservation for Future Generations» (Россия, 2016), «Asian-Pacific Aquaculture» (Вьетнам, 2013) «AQUA 2012» (Чехия, 2012), «Physiomar12» (Испания, 2012), «Международный научный форум студентов, аспирантов и молодых ученых стран Азиатско-Тихоокеанского региона 2012» (Россия, 2012); на всероссийских конференциях: Научно-практическая конференция «Наука о море в интересах России» (Владивосток, 2018), Всероссийская конференция «Научное обеспечение развития товарной аквакультуры до 2030 г.» (Москва, 2017), Вторая Всероссийская научная молодежная конференция-школа «Проблемы экологии морского шельфа» (Владивосток, 2010), Всероссийская научная школа для молодежи «Перспективы развития инноваций в биологии» (Владивосток, 2009), Научная конференция, посвященная 70-летию С.М. Коновалова «Современное состояние водных биоресурсов» (Владивосток, 2008); на региональных конференциях: «Региональная научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых учёных по естественным наукам» (Владивосток, 2016), «Региональная конференция студентов, аспирантов и научных организаций Дальнего Востока России «Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии»» (Владивосток, 2008-2012).

Результаты диссертации и основные методические подходы внедрены и используются в учебном процессе при проведении лабораторно-практических занятий Кафедры клеточной биологии и генетики, а также Департамента медицинской биологии и биотехнологии Дальневосточного федерального университета.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 22 печатных работы, в том числе 4 статьи в рецензируемых международных журналах, индексируемых Scopus и Web of Science, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК, получен 1 патент на изобретение.

Личный вклад автора. Автор лично выполнял всю экспериментальную работу, осуществлял обработку, анализ и интерпретацию полученных результатов, а также

написание диссертации. Подготовка и написание основных публикаций проводилась с соавторами.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 194 страницах, содержащих 29 рисунков и 15 таблиц; состоит из введения, 4 основных глав, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 458 источников.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность своему наставнику и научному руководителю к.б.н. Кумейко Вадиму Владимировичу за многолетнее руководство и неоценимую помощь на протяжении всех этапов работы. Глубокая признательность коллективу кафедры клеточной биологии и генетики Школы естественных наук ДВФУ за внимание и заботу. Особую благодарность хочется выразить А.В. Гринченко за его всестороннюю помощь и дружескую поддержку, к.б.н. Т.Ю. Магарламову за полезные дискуссии и неоценимую помощь в области электронной микроскопии, к.б.н. А.М. Стенковой за помощь в проведении молекулярного анализа, а также к.б.н. Ю.О. Кипрюшиной и к.б.н. И.В. Манжуло за их отзывчивость и дружеское участие. Отдельную признательность – Ю.А. Муруг за его терпение и моральную поддержку.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Защитно-адаптационные реакции двустворчатых моллюсков

Моллюски имеют самое широкое распространение и разнообразие местообитаний, и составляют второй по величине тип животных, уступая лишь членистоногим (Rupert et al., 2004; Gerdol et al., 2018). Процветанию данной группы животных способствовал высокий уровень развития уникальных адаптационно-защитных механизмов, отсутствующих, в том числе у представителей более высших таксонов. Так, двустворчатые моллюски, входящие в состав типа Mollusca, и населяющие все бентосные сообщества от литорали до ультраабиссали, (за исключением лишь тех, которые слишком анаэробны) в зависимости от условий населяемой ими среды имеют защищенное твердой кальцинированной раковиной мягкое тело и особые модификации в питании и прикреплении. Кроме того, некоторые представители данного семейства имеют специфические приспособления, позволяющие им жить на растительности (мангровых листьях, водорослях, древесине), но эти эпибентосные формы составляют лишь самую малую часть от всех видов двустворчатых моллюсков, равно как и виды, являющиеся комменсалами иглокожих, ракообразных, губок или паразитами голотурий.

Большинство двустворчатых моллюсков не способны к активному плаванию, как, например, гребешки или лимарии, и ведут сидячий (прикрепленный) или малоподвижный образ жизни, прикрепляясь биссусом к субстрату, свободно лежа на нем, либо зарываясь в него мощной ногой. При каждом из вариантов образа жизни происходит соответствующая модификация тела моллюсков. Например, морские гребешки, активно перемещающиеся в пространстве, имеют по краю мантии светочувствительные глазки и щупальца, реагирующие на внешние раздражители, а также хорошо развитую приводящую мышцу, энергичное сокращение которой приводит к выталкиванию воды из мантийной полости и передвижению моллюска, позволяя избежать опасности или просто мигрировать в более комфортные условия. Моллюски, ведущие оседлый образ жизни, несмотря на их «примитивное» существование также имеют некоторые приспособления. Так, у моллюсков, зарывающихся в грунт, как правило, хорошо развитая мускулистая нога и плотная раковина обеспечивают им надежную защиту от хищников, ударов волн, перепадов солёности, обезвоживания и перегрева во время отливов и дождя. У некоторых из этих моллюсков в системах жизнеобеспечения также появляются дополнительные модификации, связанные с гипоксией среды: гемоблобин в гемолимфе, удлинённые сифоны или симбиотические микроорганизмы, участвующие в фиксации газов. Многие двустворчатые моллюски благодаря форме раковины просто лежат на поверхности грунта или, используя биссусные нити, состоящие из

специфических адгезионных белков, более прочно крепятся к нему. В результате такого лишнего движения образа жизни у этих моллюсков может редуцироваться нога, а жабры кроме дыхательной функции берут на себя еще функцию сортировки пищевых частиц.

Кроме того, внутри каждой из этих экологических групп также наблюдаются разнообразные адаптации, зависящие от факторов среды и потребностей организма. Например, показано, что распределение в толще воды моллюсков рода *Tridacna*, имеющих в мантии симбиотические микроводоросли *Symbiodinium*, зависит от типа их питания (Ikeda et al., 2017). *T. maxima*, представляющая собой строгую фотоавтотрофную систему, ограниченную глубиной проникновения света в воду, живет на сравнительно небольших глубинах, тогда как миксотроф *T. squamosa*, фотоавтотрофный диапазон которого расширен гетеротрофностью, населяет более глубокие акватории (Jantzen et al., 2008).

Защитная система двустворчатых моллюсков включает несколько уровней физических и биологических барьеров, которые предотвращают повреждение подлежащих тканей, потерю жидкости и заражение патогенами. Главный физический барьер среди них – это раковина, которая защищает находящиеся в ней мягкие части тела и действует как жесткий каркас для прикрепления мышц и мантии. Незащищенные же раковиной части тела имеют, как правило, довольно плотные покровы (в этом случае барьерная функция переходит к наружному эпителию). Структурные свойства раковины (размер, форма, выпуклость, толщина, состав, кристаллическая структура, а также наличие или отсутствие дополнительных структурных опор, таких как ребра, складки, гребни и др.) весьма разнообразны и зависят от образа жизни моллюсков (Kauffman, 1979). Раковина состоит в основном из трех слоев: тонкого внешнего некальцинированного периостракума, состоящего из конхиолина; остракума, состоящего из двух слоев, и включающего кальцит и / или арагонит, переплетенных с тонкими, в основном арагонитовыми слоями миостракума – особой структуры, лежащей в основании крепления мышц (Taylor et al., 1972; Kauffman, 1979; Stanley, 1988). Кальцинированные слои раковины у разных групп моллюсков обладают разнообразной структурой (Taylor et al., 1972; Kauffman, 1979), придают ей различную прочность и плотность, адаптируя, таким образом, моллюсков к определенному образу жизни. Форма раковины также сильно коррелирует с эффективностью и скоростью рытья (Kauffman, 1979; Stanley, 1988): например, менее орнаментированная и более удлиненная раковина быстрее втягивается в грунт. У большинства инфунальных двустворчатых моллюсков раковины очень прочные и состоят из поперечно-пластинчатого и однородного арагонита, тогда как у многих биссусных моллюсков раковины более тонкие и гибкие (Kauffman, 1979). В зависимости от силы течений также изменяется степень обтекаемости

раковины и развитость складок и ребер, которые в данном случае участвуют в разделении водных потоков, тем самым уменьшая сопротивление трения (Stanley, 1988).

Второй физический барьер у двустворчатых моллюсков обеспечивается мантией и слоем слизи, который вырабатывается ее клетками и клетками жабр, обеспечивая в совокупности с работой цилиарных клеток и щупалец сортировку, задержание и устранение частиц (Gerdol et al., 2018). Кроме того, мантия разделена на отдельные морфогенетические области, состоящие из высокоспециализированных типов эпителиальных клеток, некоторые из которых отвечают за секрецию макромолекул матрикса раковины. Поскольку у двустворчатых моллюсков отсутствует голова, то основные сенсорные органы располагаются на мантии и прикрываются, как правило, ее краевыми складками. При этом эпифаунальные и полуинфаунальные моллюски имеют более развитые органы, чем инфаунальные. Также мантия является одним из основных мест хранения питательных веществ (особенно гликогена) и играет определенную роль в биоаккумуляции металлов и органических загрязнителей (Suryawanshi et al., 2011; Yurimoto, 2015). Накопленные ею поллютанты метаболизируются и удаляются через почки, в то время как тяжелые металлы секвестрируются лизосомами пищеварительной железы (ПВЖ) или металлотионеинами жабр, мантии и ПВЖ (Livingstone, Pipe, 1992; Widdows, Donkin, 1992). Также показано, что практически весь эпителий мантии моллюсков способен к эндоцитозу биотических и абиотических частиц (Allam, Pales Espinosa, 2015). У некоторых представителей Tridacnidae в процессе эволюции в мантии появились третичные пищеварительные каналы, которые обильно заселены микроводорослями рода *Symbiodinium*. Эти микроорганизмы принимают облигатное участие в метаболизме хозяина, в том числе образовании раковины, росте и питании моллюсков (Hernawan, 2008).

Слизь играет существенную роль в защите моллюсков от физических, химических и биологических повреждений, а также в их передвижении и навигации (Allam, Pales Espinosa, 2015). Протекторные свойства слизи зависят от концентрации в ней полимеров и сшивков между ними, а также присутствующих в ней типов клеток и биоактивных молекул (Cone, 2009; Robledo et al., 2011). Слизь, вырабатываемая жабрами и мантией, содержит широкий спектр таких противомикробных факторов, как агглютинины, гидролитические ферменты (лизоцим, протеазы), антимикробные пептиды, дефензины, антиоксиданты, белок, повышающий проницаемость, белки теплового шока и металлотионеины (Robledo et al., 2011; Pales Espinosa et al., 2014; Allam, Pales Espinosa, 2015). Показано, что вся совокупность компонентов слизи определяет микрофлору моллюсков (Allam, Pales Espinosa, 2015). Например, в результате проведенного эксперимента с *Crassostrea virginica* было установлено, что слизь мантии усиливает рост *Perkinsus*, тогда как слизь, собранная из

пищеварительной системы, наоборот – тормозит. Более того, слизь мантии *C. gigas* также сильно тормозила рост *P. marinus*, в результате чего авторы предположили, что специфичность паразита к хозяину определяется еще на этапе его контакта с секретом мантии (Pales Espinosa et al., 2013). Дальнейшее секвенирование РНК показало, что повышенная *in vivo* вирулентность *P. marinus* была связана со значительной активацией соответствующих факторов после его контакта со слизью (Pales Espinosa et al., 2014). Кроме того, авторы этой работы (Allam, Pales Espinosa, 2015) отмечают, что микробы могут оказывать схожий эффект на слизь, вырабатывая факторы, изменяющие ее структуру и состав, и тем самым способствуя своему проникновению в моллюсков.

Несмотря на всю внушительность описанных барьеров, они зачастую оказываются недостаточно эффективными для предотвращения заражения моллюсков (Shinn et al., 2015), поэтому в случае проникновения антигенов включаются механизмы внутренней защиты. Хотя внутренняя защита моллюсков обеспечивается главным образом факторами гемолимфы, показано, что компоненты паллиальной и экстрапаллиальной жидкостей, циркулирующих между мантией и раковиной, также играют существенную роль в резистентности организма (Allam, Pales Espinosa, 2015). Эти жидкости содержат большое количество гемоцитов (Takatsuki, 1934; Allam, Paillard, 1998; Allam et al., 2000; Fisher, 1986, 2004a; Mount et al., 2004; Lau et al., 2017), участвующих помимо иммунной реакции в биоминерализации и образовании раковины, а также синтезе компонентов слизи. В работах с *Ruditapes philippinarum* (Allam, 1998; Allam, Paillard, 1998) и *C. virginica* (Allam, 1998; Lau et al., 2017) было установлено, что гемоциты могут двигаться через мантию в гемолимфу посредством трансэпителиальной миграции, подобно дендритным клеткам позвоночных, и выполняя по аналогии с ними сигнальную функцию. В сравнительном исследовании Лау и коллег (2017) было установлено, что паллиальные амебоциты устриц обладали более высокой фагоцитарной активностью, чем циркулирующие в гемолимфе клетки. Также они выявили отличные от сигнатур циркулирующих гемоцитов (поверхностные углеводы и кластеры дифференцировки) сигнатуры эпитопа паллиальных клеток (Lau et al., 2017). В частности, мечение кластером дифференцировки 14 (рецептор липополисахаридов и других молекулярных паттернов, связанных с микробами) было значительно выше в паллиальных клетках по сравнению с гемальными клетками, что указывает на его более высокую экспрессию и подчеркивает «сторожевую» роль этих клеток. В дополнении к таким иммунным функциям, как фагоцитоз, агрегация и инкапсуляция, эти гемоциты могут участвовать в меланизации, ограничивая распространение инфекционных микроорганизмов, и некрозе (Allam, Pales Espinosa, 2015). Так, при заражении устриц *Roseovarius* и манильского моллюска *Vibrio tapetis* было обнаружено, что ткани и секрет мантии имеют

повышенную концентрацию меланина, который в дальнейшем откладывался вокруг паразитов в виде узелков (Ford, Borrego, 2001; Paillard, 2004). Меланизация инородных тел у моллюсков иногда сопровождается также биоминерализацией и внедрением меланизированных интервентов в новообразованные слои раковины (Allam, Raftos, 2014).

Как было упомянуто выше, внутренняя защита моллюсков обеспечивается главным образом гемолимфой, которая включает в себя бесклеточную фракцию – плазму и циркулирующие иммунные клетки, в различных источниках называемых по-разному: гемоциты, амебоциты, гемальные клетки, иммуноциты – подразделяющиеся, как правило, на гранулярные и агранулярные (Ottaviani, 2006). Помимо непосредственного участия клеток гемолимфы *Vivalvia* в таких иммунных реакциях, как фагоцитоз, агрегация, инкапсуляция, формирование узелков, цитотоксические реакции, образование жемчуга, синтез гуморальных факторов, они могут вовлекаться и в другие физиологические процессы, напрямую не связанные с иммунитетом: нейроэндокринная регуляция, перенос, накопление и переваривание питательных веществ, участие в нормальных и репаративных морфогенетических процессах (Cajaraville, Pal, 1995; Cheng, 1996, 2000; Chu, 2000; Mount et al., 2004; Ottaviani, 2006; Donaghy et al., 2009). В реализации всех этих функций большую роль играют такие специфические свойства амебоцитов, как способность к хемотаксису и фагоцитозу.

Помимо внутренних механизмов иммунной защиты, обеспечиваемых гемолимфой, она также реализуется благодаря работе клеточных и гуморальных факторов внутренних органов. Патогены, попадая в пищеварительную систему, сначала подвергаются механическому воздействию в глоточном отделе, а затем действию гидролитических ферментов и бактерицидных веществ кишечника (Gosling, 2003). Кроме того, показано (Yonge, 1926, 1928), что эпителиальные клетки, выстилающие различные отделы пищеварительной системы, фагоцитируя микроорганизмы, поддерживают, таким образом, микробный гомеостаз и ограничивают развитие инфекций. Также в пищеварительной железе многих двустворчатых моллюсков (Moore, 1991; Lowe, Pipe, 1994; Cajaraville et al., 1995; Livingstone et al., 2000) были обнаружены металлотионеины, антиоксидантные ферменты и глутатион, участвующие в биотрансформации органических поллютантов (Livingstone, Pipe, 1992). Значительный вклад в защиту организма вносит субэпителиальная ткань пищеварительного тракта и соединительная ткань жабр, которые являются одними из самых богатых гемоцитами тканей у моллюсков, при этом эти клетки проявляют ту же способность к двустворчатой миграции (через базальную мембрану и эпителий), что и гемоциты мантии. Жабры также участвуют в биоаккумуляции пестицидов, растворимых тяжелых металлов и различных углеводов (Livingstone, Pipe, 1992). Хотя почки и перикардиальные железы

являются в основном выделительными органами, они также играют очень важную роль в хранении и устранение углеводов и тяжелых металлов, таких как цинк и кадмий (Livingstone, Pipe, 1992). Кроме того, почки являются очагом обсервации *Haplosporidium*, *Proctoeces*, *Rickettsia*, личинок трематод и простейших подкласса кокцидии (Gosling, 2003).

1.2 Биомаркеры здоровья

Двустворчатые моллюски, являясь естественными фильтраторами и биоаккумуляторами, играют важную роль в структуре и функционировании морских бентосных сообществ. Поэтому помимо промыслового значения они имеют и экологическую значимость в качестве биоиндикаторов состояния морских экосистем (Gosling, 2003; Vidal-Linan, Bellas, 2013; Сокольникова и др., 2015; Moschino et al., 2016; Beyer et al., 2017; Faggio et al., 2018). Как для обеспечения оперативной оценки экологической безопасности, так и создания условий для устойчивого развития морских хозяйств требуются непрерывные и надежные технологии диагностики состояния здоровья морских гидробионтов и среды их обитания. Несмотря на то, что в течение последних двух десятилетий разнообразные параметры физиологического состояния отдельных видов рыб и мидий, как наиболее распространенных объектов аквакультуры среди моллюсков, были исследованы на предмет их диагностической ценности (Goldberg, Bertine, 2000), лишь малая часть из них была использована на практике в программах мониторинга в качестве тест-систем (NOAA, ICES, UNEP, MED POL II, North Sea, WGBEC, NMMP, WHO-FAO, WFD, BEST, BEEP of EU) (Melwani et al., 2014; Farrington et al., 2016). Это связано с тем, что большинство перспективных показателей не выходят за пределы исследовательской среды, поскольку все еще находятся на стадии экспериментальной доработки и апробации, и должны отвечать большому своду требований. В 2003 г. Ван дер Оост с коллегами (Van der Oost et al., 2003) предложили шесть критериев биомаркеров для оценки состояния рыб. Так, согласно данным требованиям проводимый анализ должен быть надежным, относительно недорогим и простым в использовании; реакция биомаркера должна быть высокочувствительной к воздействию; исходные данные биомаркера должны быть четко определены, чтобы отличить его реакцию от естественной вариации; между ответом биомаркера и долгосрочным воздействием фактора на организм должна быть четко установлена взаимосвязь; должен быть выявлен механизм этой взаимосвязи; и должен быть точно определен эффект влияния на биомаркер любых вмешивающихся факторов, основными среди которых являются репродуктивный статус, пол, возраст и происхождение организма.

В 2006 г. Ньютон и Коуп (Newton, Core, 2006) провели анализ работ, посвященных различным биомаркерам мидий в контексте токсикологии, используя систему

классификации биомаркеров, разработанной для рыб (Van der Oost et al., 2003). В этой классификации биомаркеры были сгруппированы по десяти категориям: ферменты биотрансформации, окислительный стресс, продукты биотрансформации, аминокислоты и белки, гематологические, иммунологические, репродуктивные и эндокринные, нервно-мышечные, генотоксические, физиологические и морфологические. Несмотря на то, что многие классы биомаркеров были успешно апробированы на мидиях, авторы (Newton, Core, 2006) все же указывают, что большая часть проанализированных работ имеет недостатки и нуждается в дополнительных исследованиях, которые бы фокусировались на здоровье организма в естественных условиях в отсутствие поллютантов и характеризовали бы его исходное состояние. Регулярная оценка здоровья диких популяций могла бы помочь в оценке влияния не только антропогенных, но и естественно текущих изменений природных факторов на морские организмы, регистрируя кумулятивный эффект их действия в реальных полевых условиях.

В настоящее время наиболее популярными поведенческо-адаптационными показателями состояния здоровья моллюсков являются скорость зарывания и двигательная активность створок раковины (Boldina-Cosqueric et al., 2010; Moschino et al., 2016; Ogunola, 2017). Эти характеристики, несомненно, полезны, но возвращаясь к критериям биомаркеров, можно заключить, что они все же мало информативны, поскольку не дают реальной картины конкретных механизмов нарушения здоровья организма, требуют специального оборудования, их трудно определить количественно и они могут проявляться только после длительного или острого стресса. Следующим способом оценки состояния моллюсков являются долговременные наблюдения за какой-либо интегральной функцией организма-биоиндикатора (скорость фильтрации, сердечная активность, накопление поллютантов в ПВЖ и др.) (Мелехова, 2007; Бахмет и др., 2013; Boldina-Cosqueric et al., 2010; Nobles, Zhang 2015; Ogunola, 2017; Ciparis et al., 2019). Например, при помощи имплантированных в организм животного датчиков, а также исследования биохимических показателей физиологических процессов, химического состава тканей можно оценить их физиологический статус. Однако такой косвенный подход не отражает причины и механизмы влияния факторов на живые организмы. Традиционным методом диагностики заболеваний моллюсков является гистологический анализ тканей и органов (Howard et al., 2004), как правило, наиболее подверженных воздействию внешних факторов (Seiler, Morse, 1988; Costa et al., 2013). Гистология предоставляет большой объем информации не только об общем состоянии здоровья моллюсков, но также обнаруживает широкий спектр патогенов. Данный метод является весьма трудоёмким, длительным в обработке, требующим специальных лабораторных условий, а получаемые с помощью него

результаты требуют тщательного сравнительного анализа и интерпретации, и потому сильно отставлены во времени. Показано, что наиболее чувствительными органами у моллюсков являются жабры, ПВЖ и гонады (Au, 2004; Marigomez et al., 2006; Irinco-Salinas, 2012; Schettino et al., 2012). Почки и другие органы реже используются для проведения подобных исследований, поскольку хуже изучены в норме и при патологиях, имеют высокую избирательность к разным типам загрязнителей и не демонстрируют чёткой зависимости между дозой и реакцией (Au, 2004). Однако, из немногочисленных литературных источников, известно, что тяжелые металлы концентрируются как раз в основном в тканях почек (George, 1983). В современной литературе методы оценки гистопатологических изменений органов довольно сильно разнятся. В некоторых публикациях гистоморфологические изменения описывают лишь качественно, отмечая повышение частоты встречаемости аномалий, обнаруживаемых при усилении загрязнения. Другие исследования сосредотачиваются на определенных патологиях органов и оценки степени их проявления с помощью некой шкалы (например, слабые, умеренные и сильные патологии), что позволяет судить об интенсивности поражений. Общим недостатком всех этих исследований является отсутствие четкой количественной оценки, которая необходима для контроля течения патогенетических процессов, вызванных теми или иными факторами (Cajaraville et al., 1992; Irinco-Salinas, 2012; Bignell et al., 2011; Costa et al., 2013; De los Ríos et al., 2018). Одна из попыток решить эту проблему была предпринята в 1999 году Бернетом с коллегами. Команда исследователей разработала метод, который основывался на качественной оценке состояния органов рыб и присвоения каждому из выявленных отклонений значимости и степени выраженности с дальнейшим вычислением общего гистопатологического индекса. Этот способ оценки был успешно применен на моллюсках для диагностики состояния ПВЖ, жабр и гонады у *R. decussatus* (Costa et al., 2013), *Mytilus edulis* (Giltrap et al., 2016) и *M. galloprovincialis* (Barmo et al., 2013; Cuevas et al., 2015; Pagano et al., 2016; Rocha et al., 2016), и выявил достоверные различия гистоморфологического состояния органов у животных из акваторий с различной степенью антропогенной нагрузки. Однако, несмотря на развитие описанного диагностического подхода, его достоверность не всегда удовлетворительна, поскольку сильно зависит от субъективного мнения исследователя о степени тяжести патологии. Таким образом, проблема количественной и статистически обеспеченной оценки параметров гистопатологических отклонений в настоящее время остается актуальной.

Фундаментальным показателем физиологического состояния организмов является эффективность поддержания его гомеостаза. Одной из центральных систем двустворчатых моллюсков, отвечающей за поддержание гомеостаза, обеспечение иммунной защиты и

формирование физиологических адаптаций к изменениям, происходящим в окружающей среде, является гемолимфа. В таком случае, гемолимфа моллюсков, обладающая многообразием функций и свойств клеточных и гуморальных факторов, может являться наиболее высокочувствительным индикатором здоровья животных. Многочисленные исследования показали, что иммунные параметры двустворчатых моллюсков являются с одной стороны достаточно стабильными показателями при нормальных условиях среды, а с другой стороны достаточно лабильными при стрессе (Oliver, Fisher, 1999; Chu, 2000; Donaghy et al., 2009; Renault, 2015). Проявляемая в данном случае лабильность гематологических параметров отражает их высокую чувствительность и реактивность, что является обязательным критерием, предъявляемым к подобного рода методам диагностики здоровья. Как показывают результаты исследований в условно идеальной среде обитания (с оптимальным запасом пищевых ресурсов, в отсутствии загрязнений и ярко выраженных инфекций), основными факторами, оказывающими влияние на параметры гемолимфы, являются температура воды, соленость и репродуктивный статус животных (Gerdol et al., 2018). Используя последующее сравнение параметров гемолимфы в условиях стресса с нормой, можно проводить наблюдения за состоянием, как отдельной особи, так и популяции в целом, и достоверно обнаруживать изменение условий среды.

Все вышеупомянутые биомаркеры указывают либо на наличие стрессоров в среде, либо на последствия их воздействия. Тогда как для биомониторинговых исследований были бы более ценны прогностические биомаркеры, способные предсказывать будущие эффекты от действия стрессоров на более высоких уровнях организации. Такими методами могут стать метаболомика и транскриптомика, которые в режиме реального времени предоставляют данные о реакции моллюсков на текущие условия среды (Gomez-Chiarri et al., 2015; Waller et al., 2019). Например, изменения метаболитов, связанные с использованием и производством энергии, были обнаружены у *Amblema plicata* всего через 1-2 недели ограничения в пище (Roznere et al., 2014), тогда как влияние ограничения в пище на рост или выживание могло бы обнаружиться только через несколько месяцев или даже дольше. Однако у подобных работ также есть и некоторые недостатки: например, как показано в обзоре Бурресона (Burreson, 2008), обнаружение ДНК патогена с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) указывает на присутствие инфекционного агента, но не подтверждает, что патоген находится в жизнеспособной форме и не дает информации об его тканевой локализации. В связи с чем, на данном этапе развития молекулярных методов диагностики пока не видится возможным полный отказ от клеточных, физиологических, поведенческих и других методов оценки здоровья организмов, поскольку эта область науки нуждается в сравнительных исследованиях, выявляющих связи молекулярных маркеров с реакциями на

клеточном и организменном уровне. Такой комплексный подход в анализе позволит выявить варианты отклонения исследуемых параметров от нормы в условиях патогенетических процессов, а также наиболее точно определить минимально необходимые, но достаточные показатели для разработки эффективной тест-системы ветеринарного контроля физиологического состояния моллюсков. Кроме того, мониторинг здоровья моллюсков в сочетании с геномным анализом может выявить особей, устойчивых к болезням или устойчивых к стрессовым факторам окружающей среды (Houston, 2017).

Для повышения эффективности процесса мониторинга физиологического состояния животных и среды их обитания ряд авторов разработали специальные индексы (показатели или индикаторы), как правило, интегрирующие в себе наиболее информативные характеристики физиологического статуса животного. Решение о том, какие параметры и в каком количестве использовать для определения индекса имеет важное значение, и зависит от области применения разрабатываемого индекса и требует биологического и математико-статистического обоснования. Как и к биомаркерам, к индексам предъявляется ряд требований: он должен облегчать интерпретацию широкого диапазона измерений; быть максимально точным и подробным для того, чтобы избежать субъективности в оценивании параметров; к тому же, компоненты, на основе которых рассчитывается индекс, должны иметь строгую (прямую или обратную) корреляцию с взаимосвязью «доза-эффект». Индекс также может быть улучшен за счет включения данных о серьезности патологии в дополнение к её распространенности (Bernet et al., 1999).

На данный момент разработано всего несколько адекватных критериев оценки состояния морских организмов, наиболее популярным из которых является интегральный индекс реакции биомаркеров (IBR) (Beliaeff, Burgeot, 2002), но по последним литературным данным (Devin et al., 2013) имеющий ряд методических недоработок, что в свою очередь может привести к недостоверным результатам. Другие критерии, такие как индекс оценки биоэффекта (BAI) (Broeg et al., 2005; Broeg, Lehtonen, 2006) и индекс биомаркеров (Narbonne et al., 1999) предназначены для узкого набора параметров, затрагивающих только показатели одного уровня организации – биохимические, что является недостаточным, поскольку неполноценно характеризует состояние здоровья организмов (Moschino et al., 2016). Кроме того, BAI может быть применим только для динамического наблюдения изменения того или иного параметра при условии стойкого загрязнения. Несмотря на это, BAI был успешно использован при оценке состояния рыб *Platichthys flesus* (Broeg et al., 2005), *Zoarcetes viviparus* и моллюска *M. edulis* (Broeg, Lehtonen, 2006). Индекс биомаркеров (Narbonne et al., 1999) также был протестирован на моллюсках *M. edulis* и *M. galloprovincialis*. Вторая группа критериев включает индекс биомаркеров (BI), примененный для *Mya arenaria* (Chevre et al.,

2003), индекс оценки здоровья (HAI) (Adams et al., 1993), использованный для рыб, и гистопатологический индекс (Ih) (Bernet et al., 1999), изначально разработанный для рыб и в настоящее время модифицированный и экстраполированный на двустворчатых моллюсков (Costa et al., 2013; Cuevas et al., 2015). Существенным недостатком этой группы индексов является субъективность и полуколичественность проводимой оценки, поскольку она основывается на субъективном присвоении числовых значений степени тяжести (рангов) значениям оцениваемых параметров. Среди прочего стоит отметить трудность математических операций в случае с BI, поскольку в основе анализа лежит группирование данных на основе энтропии, которое вряд ли будет одинаковым при расширении этого набора данных. Наиболее часто используемым среди вышеуказанных индексов является Ih, который основывается на присвоении степени значимости и распространенности тем или иным патологиям, что также несет ранговый характер, и в некоторых случаях уменьшает различия между переменными.

Таким образом, несмотря на все большее совершенствование инструментов оценки состояния здоровья, все еще недостаточно информации о связях между факторами окружающей среды, стрессорами, конкретными болезнями и реакциями биомаркеров для выявления референсного диапазона «хорошего здоровья» животного (нормального или исходного состояния).

1.3 Морфофункциональная спецификация гемоцитов двустворчатых моллюсков

Среди представителей класса *Bivalvia* дифференцировка клеток гемолимфы выражена в разной степени и, несмотря на активное развитие исследований, посвященных гемоцитам, к настоящему времени до сих пор не сложилось какой-либо однородной и удовлетворительной системы их классификации. Следуя схеме, предложенной Ченгом еще в 1981 г., большинство авторов подразделяют гемоциты двустворчатых моллюсков на две субпопуляции: гранулярные и агранулярные амебоциты, которые имеют большое сходство в строении и выполняемых функциях даже между различными семействами. Так, эти две группы клеток были обнаружены у *M. arenaria* (Huffman, Tripp, 1982), *M. edulis* (Pipe et al., 1997), *M. galloprovincialis* (Cajaraville et al., 1997), *Bathymodiolus japonicus* (Sekine et al., 2016), *T. derasa*, *Hippopus hippopus*, *Corculum cardissa* (Nakayama et al., 1998), *R. decussatus* (Lopez et al., 1997b), *Mercenaria mercenaria* (Tripp, 1992), *Anodonta cygnaea* (Soares-da-Silva, 2002), *Meretrix lusoria* и *C. gigas* (Su-Jung Chang, 2005), *Panopea globosa* (Hernández-Méndez et al., 2020), *Pinna nobilis* (Matozzo et al., 2016) и др.. Однако некоторыми авторами (Ottaviani et al., 1998; Canesi et al., 2002b; Goedken, De Guise, 2004) описаны также промежуточные между гранулоцитами и агранулоцитами клеточные типы. Так, например,

исследователи до сих пор не могут прийти к единому мнению о существовании гранулоцитов у морских гребешков, поскольку найденные в их гемолимфе клетки не имеют характерных для гранулоцитов особенностей, обнаруживаемых у других двустворчатых моллюсков. Авторы предполагают, что, вероятно, в гемолимфе присутствует лишь малое число полугранулярных клеток, а основная масса гемоцитов все же представлена агранулоцитами и бластоподобными клетками (Gonzalez et al., 2019).

Соотношение гранулоцитов и агранулоцитов в гемолимфе двустворчатых моллюсков значительно варьирует у разных представителей этой систематической группы (даже внутри одного рода). Например, гранулоциты преобладают среди гемоцитов у *M. galloprovincialis* (Cajaraville, 1997; Carballal et al., 1998) и *M. edulis* (Pipe et al., 1997), а также у *M. mercenaria* (Tripp, 1992), *M. arenaria* (Huffman, Tripp, 1982), *A. cygnea* (Soares-da-Silva et al., 2002), *R. decussatus* и *R. philippinarum* (Allam et al., 2002). Примерно в одинаковом соотношении представлены данные морфотипы в гемолимфе *T. philippinarum* (Cima et al., 2000), *T. crocea*, *T. derasa* и *C. cardissa* (Nakayama et al., 1998). Концентрация агранулоцитов значительно превышает таковую по сравнению с гранулоцитами, например, у устриц *Ostrea edulis* и *C. gigas* (Carballal et al., 1998), а также у *P. globosa* (Hernández-Méndez et al., 2020). Вероятно, только агранулоцитами представлена гемолимфа *Anadara trapezia* (Dang et al., 2013) и некоторых видов гребешков (Estrada et al., 2013).

Гранулярные амебоциты двустворчатых моллюсков содержат эксцентрично расположенное гиперхромное, обычно бобовидное или палочковидное ядро, гранулы и включения различной величины и электронной плотности. Природа содержимого гранул до конца не изучена: очевидно, часть этих гранул представляет собой лизосомы, так как внутри них были обнаружены в большей концентрации, чем в других клеточных типах, специфические гидролазы – кислая фосфатаза (КФ), арилсульфатаза, лейцинаминопептидаза, неспецифическая эстераза (НЭ) и щелочная фосфатаза (ЩФ) (Cima et al., 2000; Blaise et al., 2017), Р-глюкуронидаза, пероксидаза, НАДФН-оксидаза (Wootton et al., 2003), а также лизоцим (Sminia, W.P.W. van der Кнаар., 1987; Pipe, 1990). Другие гранулы могут являться секреторными, поскольку содержат биологически активные вещества (БАВ), различные регуляторные и сигнальные белки, антибактериальные пептиды и агглютинины (Hine, 1999; Canesi et al., 2002a; Cantet et al., 2012; Allam, Raftos, 2015). Данный тип клеток принимает различную форму при распластывании на субстрате, и обладают большей скоростью передвижения (Rioullet et al., 2013) по сравнению с агранулоцитами за счет более развитого актинового цитоскелета (Gomez-Mendikute, Cajaraville, 2002; Foll et al., 2010). Нередко гранулоциты подразделяют на субпопуляции в соответствии с морфологией гранул или характером их окрашивания различными красителями. При этом гранулы ацидофильных

амебоцитов, как правило, имеют больший размер по сравнению с гранулами базофильных клеток (Pipe, 1990; Noël et al., 1994; Cajaraville, 1997; Carballal et al., 1998; Hine, 1999; Wootton et al., 2003; Tame et al., 2015; Bregante et al., 2016), и могут быть разной электронной плотности и формы (круглой, овальной или яйцевидной). При исследовании гранулоцитов *M. galloprovincialis* (Cajaraville, 1997), *A. inaequalis* (Holden et al., 1994) и *T. philippinarum* (Cima et al., 2000) наряду с клетками, содержащими только мелкие или только крупные гранулы, были обнаружены и клетки, имеющие гранулы обоих типов, а у *M. arenaria* также были выявлены гранулы, которые вообще не окрашивались по Гимзе (Huffman, Tripp, 1982). Также отмечено, что у клеток, содержащих маленькие гранулы, митохондрии и эндоплазматический ретикулум более развиты, чем у гранулоцитов с большими гранулами (Hine, 1999). Обнаружено, что число гранул внутри крупных гранулоцитов намного больше, и содержимое их гомогенно, тогда как в гранулах малых гранулоцитов присутствует периферическое светлое гало (Pipe, 1990; Cajaraville, 1997; Tame et al., 2015). Предполагают, что гранулоциты являются эволюционным аналогом макрофагов и нейтрофилов млекопитающих, поскольку из всех типов гемоцитов именно гранулоциты, как правило, характеризуются большей эффективностью фагоцитарной реакции и генерации активных форм кислорода (АФК). Кроме того, в одной из работ показано (Wang et al., 2017), что транскрипты мРНК некоторых генов *C. gigas*, связанных с иммунитетом, включая толл-подобные рецепторы, клатрин, лизоцим, дефензин и ИЛ-17, в основном экспрессируются в гранулоцитах, и меньше – в полугранулоцитах и агранулоцитах, что еще раз подтверждает ключевую роль гранулоцитов в качестве иммунокомпетентных клеток.

Популяция агранулоцитов, также как и гранулоцитов, неоднородна и объединяет две морфофункционально различающиеся группы гемоцитов: незрелые гемоциты (или бластные, ювенильные клетки, гемобласты, прогемоциты), выступающие в качестве предшественников всех типов гемоцитов; и крупные агранулоциты, или гиалиноциты, функция которых до конца не выяснена, но, вероятно, заключается в синтезе, накоплении некоторых БАВ и участии в фагоцитозе (Pipe, 1990; Hine, 1999; Wootton et al., 2003; Tame et al., 2015). Гемобласты имеют наиболее маленькие размеры по сравнению с другими типами гемоцитов и характеризуются высоким ядерно-цитоплазматическим отношением: вокруг крупного ядра, содержащего ядрышко, располагается узкий ободок слабо базофильной цитоплазмы. Ультраструктурные исследования клеток этой группы показали, что, за исключением митохондрий и слабо выраженного шероховатого эндоплазматического ретикулума (ШЭР), большинство клеточных органоидов отсутствует (Анисимова, 2012; Pipe, 1990; Hine, 1999; Wootton et al., 2003; Tame et al., 2015). У большинства двустворчатых моллюсков (Cima et al., 2000; Donaghy et al., 2009) прогемоциты составляют всего 3-10 % от общего

числа циркулирующих клеток. Агранулоциты, напротив, имеют бóльшие размеры и образуют псевдоподии различной формы. При ультраструктурном анализе в цитоплазме этих клеток были обнаружены митохондрии, аппарат Гольджи, развитая эндоплазматическая сеть, гранулы гликогена, а также фагосомы и фаголизосомы с разной степенью электронной плотности (Pipe et al., 1997; Hine, 1999; Wootton et al., 2003; Tame et al., 2015).

Агранулоциты (гиалиноциты) и гранулоциты большинства видов двустворчатых моллюсков проявляют схожие функции, в том числе и такие первостепенные, как способность к распластыванию и фагоцитозу (Tripp, 1992; Cima et al., 2000; Delaporte et al., 2003; Goedken, De Guise, 2004; Lambert et al., 2007; Donaghy et al., 2009). Вероятно, это связано с тем, что, несмотря на различную хромаффинную способность, гранулы гемоцитов содержат практически одинаковый набор ферментов (Huffman, Tripp, 1982; Cima et al., 2000; Xue, Matozzo et al., 2007; Xing et al., 2008). Таким образом, чтобы достоверно охарактеризовать отдельный клеточный тип необходимо применять комплексный подход с одновременной оценкой широкого круга как морфологических, так и функциональных параметров гемоцитов, и подкреплять его определением специфических популяционных молекулярных маркеров. Например, полученные против гемоцитов *M. edulis* (Noël et al., 1994) моноклональные антитела (MAb) позволили подтвердить ранее идентифицированные гистохимическими окрасками три группы гемоцитов: базофильные гранулоциты, эозинофильные гранулоциты и агранулоциты (Dugynda et al., 1997). Кроме того, Карбаллал с коллегами (Carballal et al., 1997), используя данные антитела, выявили перекрестную реактивность среди гемоцитов разных видов мидий: MAb *M. edulis* реагировали с гемоцитами *M. galloprovincialis*, а один из типов MAb проявлял специфичность лишь к базофильным гранулоцитам этих моллюсков. Также в 1997 г. Лопез с коллегами (Lopez et al., 1997b) попытались идентифицировать разные популяции гемоцитов с помощью MAb, индуцированных против гемоцитов *C. gigas* (Morvan, 1991) и *M. edulis* (Noël et al., 1994), у моллюсков *R. decussatus*. В итоге реакция наблюдалась только с некоторыми из гемоцитов устриц. Полученные против гемоцитов гребешка *Chlamys farreri* 4 типа MAb связывались с более чем одним типом гемоцитов и также перекрестно реагировали, по крайней мере, с гемоцитами шестью видами двустворчатых моллюсков (Xing, Zhan, 2006; Donaghy et al., 2009). Наиболее примечательной в данной области работой является исследование Секина и коллег (2016), в результате которой было получено 16 MAb *B. japonicus*. Среди всех MAb наиболее полезными оказались: MAb Bjh4-3G2, которое реагировало только с гранулами гранулоцитов, и в дальнейшем может быть хорошим маркером лизосом в гемоцитах *B. japonicus*; MAb Bja4-2D11, которое связывалось только с агранулоцитами, что впоследствии может позволить более подробно изучить роль этих «загадочных» клеток; и

MAb Vjh4-1F4, которое специфически связывалось с одним из подтипов гранулоцитов (какими именно, базофильным или ацидофильным, авторам не удалось установить), что в дальнейшем может помочь в изучении функциональных различий этих субпопуляций. Таким образом, молекулярные методы подтвердили гетерогенность гранулоцитов и агранулоцитов, и вопрос о том, являются ли гиалиноциты незрелыми клетками, дифференцирующимися впоследствии в гранулоциты (Ottaviani et al., 1998; Hine, 1999), или же они являются независимой клеточной линией гемоцитов (Cheng, 1981; Auffret, 1988), был практически разрешен в пользу последней версии. Полученные в настоящее время библиотеки МАВ также могут быть полезны не только для классификации гемоцитов, но и для исследования их функций, дифференциации и локализации в организме моллюсков. Например, при использовании МАВ GP₂E₁₁ было обнаружено, что меченые гранулоциты находятся во всех органах у *O. edulis*, но наибольшее их скопление обнаруживается под эпителием мантии, между эпителиальными клетками пищеварительных канальцев и соединительной ткани ПВЖ и кишечника, а также в жабрах (Хуе, Reunalt, 2001).

Нетипичными клетками гемолимфы являются эритроциты различных видов моллюсков, живущих в условиях гипоксии, например, таких как *Astarte borealis*, *A. elliptica*, *Capsa fragilis*, *Cardita aculeata*, *Pectunculus glycymeris*, *Solen legumen*, *Tellina planate*, *Arca* и *Anadara* (Алякринская, 1979; Holden et al., 1994), а также моруло-подобные клетки симбиотических моллюсков семейства Tridacnidae: *T. derasa*, *Hippopus hippopus* и *C. cardissa* (Nakayama et al., 1998). Эритроциты представляют собой сильно уплощенные клетки эллиптической формы, содержащие ядро, периферические пучки микротрубочек, гранулы гемоглобина и различные органоиды. Как было показано, Колючкиной (2009), а также Солдатовым с коллегами (2008) число эритроцитов и содержание в них гемоглобина может изменяться в зависимости условий среды. Например, импульсное загрязнение морской среды нефтепродуктами приводило к увеличению концентрации эритроцитов в гемолимфе *Anadara*, а присутствие сероводорода в комбинации с гипоксией приводило лишь к увеличению содержания гемоглобина. Однако, как было показано (Алякринская, 1979), основным лимитирующим фактором концентрации гемоглобина является все же содержание кислорода в среде. В гемолимфе некоторых моллюсков был идентифицирован еще один тип клеток помимо гранулоцитов и агранулоцитов – коричневые клетки (серозные клетки, поровые клетки, подоциты), которые представляют собой клетки сферической формы, цитоплазма которых заполнена желто-коричневыми гранулами. Но, эти клетки, по-видимому, являются резидентами соединительной ткани моллюсков и при некоторых условиях могут выходить в циркуляцию. Воттон и коллеги в 2003 г. показали, что эти клетки находятся в ренокардиальных протоках и участвует в функционирование выделительной

системы этих животных. Таким образом, по происхождению эти клетки неродственны гемоцитам, но, вероятно, выполняют некоторые схожие функции (Wootton et al., 2003).

Кроме того в литературе можно встретить различные названия амебоцитов гемолимфы моллюсков, которые зачастую носят противоречивые и ничем неоправданные названия. Так, например, Жоу с коллегами (2017), применяя методы электронной микроскопии в сочетании с цитохимическими окрасками, разделили гемоциты *A. broughtoni* на лейкоциты, лимфоциты и эритроциты. Возможно, из-за того что Arcidae содержат эритроциты, их гемолимфа и может отличаться значительным разнообразием амебоцитарных форм гемоцитов, которые, предположительно, могут иметь различную функциональную нагрузку и формировать отдельные морфофункциональные типы, но ни в коем случае не включать, например, клетки «приобретенной иммунной системы», как это предлагают в своих исследованиях данные авторы. Давно показано (Заварзин, 1953), что лимфоциты являются клетками приобретенной иммунной системы позвоночных и имеют конкретные свойственные только им функции, такие как киллинг, синтез иммуноглобулинов и формирование иммунной памяти, идентичных которым в иммунной системе моллюсков на данный момент не обнаружено (Allam, Raftos, 2015).

1.4 Реакции клеточного иммунитета

Двустворчатые моллюски обладают широким набором врожденных механизмов защиты, осуществляемых главным образом клеточными и гуморальными факторами гемолимфы (Allam, Raftos, 2015; Zanella et al., 2017), и обеспечивающими высокий уровень эффективного контроля бактериальных, вирусных и паразитарных инфекций, столкновение с которыми является неизбежным условием их образа жизни и типа питания, а также агрессивного воздействия окружающей среды.

Среди основных реакций клеточного иммунитета двустворчатых моллюсков выделяют фагоцитоз, продукцию АФК, инкапсуляцию, а также формирование узелков, образование жемчуга, атрофию и некроз ткани (Сокольников и др., 2015; Canesi et al., 2002b; Donaghy et al., 2009; Koutsogiannaki, Kaloyianni, 2010; Schultz, Adema 2017; Zannella et al., 2017).

Наиболее древним и общим клеточным механизмом иммунной защиты является фагоцитоз, который совместно с гуморальными факторами обеспечивает мощную линию защиты от патогенных микроорганизмов. Несмотря на то, что к фагоцитозу в той или иной степени способны все типы дифференцированных амебоцитов (Lopez et al., 1997a; Ottaviani et al., 1998; Cima et al., 2000; Canesi et al., 2002b; Matozzo et al., 2007), наиболее активными фагоцитами являются гранулоциты (Cheng, 1984; Cajaraville, Pal, 1995; Ottaviani et al., 1998;

Tame et al., 2015). В настоящее время известно (Canesi et al., 2002б; Tiscar, Mosca, 2004; Donaghy et al., 2009), что также, как и у позвоночных животных, фагоцитоз двустворчатых моллюсков включает хемотаксис, который зависит от типа патоген-ассоциированного паттерна; адгезию чужеродных частиц к мембране фагоцитов (либо за счет прямого взаимодействия антигена с рецепторами мембраны клеток, либо с участием молекул-посредников – опсонинов); захват частиц и образование фагосом; внутриклеточное разрушение поглощенного материала (Schmitt et al., 2012; Soudant et al., 2013; Allam, Raftos, 2015; Schultz, Adema, 2017; Zannella et al., 2017; Gerdol et al., 2018). За последнее десятилетие за счет совершенствования методов молекулярного анализа значительно обогатились данные о рецепторах иммунных клеток, передачи сигналов и регуляции транскрипции иммуно-релевантных генов (Buckley, Rast, 2015; Guo et al., 2015; Pila et al., 2017; Schultz, Adema, 2017). Вопрос о степени участия большинства новообнаруженных рецепторов в событиях распознавания, остается пока открытым, поскольку их названия основаны только на предполагаемом структурном сходстве с другими известными рецепторами, и поэтому требуют доказательства их функции (Gerdol et al., 2018).

Что касается сигнальных путей, то здесь более и менее все ратифицировано. Так, показано, что изменение формы клеток, хемотаксис и фагоцитоз у мидий и устриц опосредованы действием биоактивных пептидов (адренокортикотропного гормона и кортикорелина) и цитокинов (PDGF, TGF- β , ИЛ-1 α , ИЛ-2 и ИЛ-8) (Zhang et al., 2012; Gerdol et al., 2018). Функционально продемонстрировано, что несколько паттерн-распознающих рецепторов опосредуют индукцию фагоцитоза иммунными стимулами через несколько сигнальных путей: например, внеклеточная супероксиддисмутаза (СОД), очень распространенная в плазме устриц, индуцирует фагоцитоз, опосредованный β -интегрином (Duperthuy et al., 2011). Лектины из манильских моллюсков (MCL и MCL4) стимулируют *in vitro* опсонизацию паразита *P. olsenii* и бактериальных клеток *V. tubiashii* и их последующий фагоцитоз (Soudant et al., 2013; Zannella et al., 2017). Конкурентное ингибирование лектина, связывающего сиаловую кислоту (CgSiglec-1), подавляет фагоцитоз и апоптоз в гемоцитах устриц, что согласуется с ролью сиглеков как регуляторов иммунных ответов (Liu et al., 2016). Известно также, что сигнальный каскад, запускающий изменение формы клеток, сопровождается активацией классического пути через протеинкиназы А, В и С (Ottaviani, 2006; Gerdol et al., 2018).

Цитотоксические реакции гемоцитов включают продукцию активных форм азота (АФА) и кислорода, синтез и выделение антимикробных пептидов и лизосомальных ферментов (Cheng, 1984; Cajaraville, Pal, 1995; Ottaviani et al., 1998; Allam, Raftos, 2015; Tame et al., 2015). Продукция АФК в той или иной степени характерна для всех

дифференцированных амебоцитов (Cima et al., 2000). Например, у *M. galloprovincialis* с помощью проточной цитометрии максимальный уровень фагоцитарной активности (ФА) и продукции АФК наблюдался у гранулоцитов и постепенно убывал в ряду: большие полугранулоциты – малые полугранулоциты – агранулоциты (Garcia-Garcia et al., 2008). Несмотря на то, что механизмы производства радикалов в целом гомологичны тем, которые наблюдаются у позвоночных, скорость и степень их синтеза в гемоцитах двустворчатых моллюсков намного ниже таковых у позвоночных животных (Soudant et al., 2013; Schultz, Adema 2017). Поэтому термин «респираторный взрыв» в отношении фагоцитов двустворчатых моллюсков можно использовать с большой долей условности (Donaghy et al., 2009). Кроме того, двустворчатые моллюски и другие морские беспозвоночные также демонстрируют некоторые отличия от позвоночных с точки зрения базовой (не стимулируемой патогенами) генерации АФК как части энергетического метаболизма в органеллах, таких как митохондрии, эндоплазматический ретикулум и пероксисомы (Donaghy et al., 2015). Выявленное Донахи с коллегами (2015) в период нереста снижение продукции АФК гемоцитами и их митохондриальной активности согласуется с основным митохондриальным происхождением АФК в гемоцитах. Исследования по секвенированию показывают, что, помимо НАДФН-оксидазы, двустворчатые моллюски содержат гены, схожие с генами двойной оксидазы, которые активируются в ответ на патогенные вибрионы (Donaghy et al., 2015). Также показано, что гемоциты двустворчатых моллюсков проявляют миелопероксидазную (МПО) активность (Schmitt et al., 2012; Donaghy et al., 2015) и синтезируют АФА (оксид азота и пероксинитрит) (Villamil et al., 2007). Установлено, что оксид азота действует как иммунный регулятор, усиливая фагоцитоз, антибактериальную активность и апоптоз гемоцитов (Song et al., 2010). При этом уровень АФА устриц, стимулированных зимозаном, выше в агранулоцитах, тогда как активность НАДФН-оксидазы – в гранулоцитах (Lambert et al., 2007). Известно, что фагоцитоз приводит к многократному увеличению содержания АФК в фагоцитирующих клетках с одновременным повышением потребления кислорода в 20 и более раз, однако, такая взаимосвязь наблюдается далеко не всегда (Donaghy et al., 2009), и указывает на различные варианты уничтожения антигена в реакции фагоцитоза: только лизосомальными ферментами, только АФК либо комбинированно. Показано участие радикалов в цитотоксических реакциях при гранулообразовании и инкапсуляции чужеродного агента, а также в индукции апоптоза гемоцитов (Terahara, Takahashi, 2008). Часто регистрируемый окислительный стресс у моллюсков в основном вызван избыточной продукцией АФК (Wang et al., 2017; Zhang et al., 2019), который в свою очередь является токсичным и для самого организма. Геномный и транскриптомный анализ идентифицировали пять генов СОД в геноме тихоокеанской

устрицы (He et al., 2015), два функциональных гена каталазы (КАТ) у *C. hongkongensis* и несколько генов, кодирующих глутатионпероксидазу (ГП) и глутатионтрансферазу (ГТ) (Wang et al., 2017). Из шести известных групп СОД у двустворчатых моллюсков были обнаружены только марганец-содержащие и медь/цинк-содержащие ферменты. Несмотря на такой набор компонентов антиоксидатной системы он оказался достаточным и вполне эффективным механизмом защиты. Так, было показано (Sureda et al., 2013), что у *P. nobilis*, выловленных из загрязненной акватории в гемоцитах было выявлено повышенное содержание окислительных радикалов и антиоксидантных ферментов (КАТ, СОД, ГП и глутатионредуктазы (ГР), МПО), а содержание глутатиона снижено. Тогда как различий в маркерах окислительного повреждения (малондиальдегидный и карбонильный индекс) выявлено не было.

Еще одной формой реакции врожденного иммунитета при массовом проникновении микроорганизмов, выявленной у двустворчатых моллюсков, является образование узелков, представляющих собой скопление фагоцитирующих и нефагоцитирующих клеток вокруг паразитов, в результате чего патогены оказываются как бы пойманными в «ловушку». Образование узелков (клеточных агрегатов, клеточных пробок, коричневых тел, гранулем, гранулоцитом) – не изолированный процесс и происходит одновременно с фагоцитозом, продукцией меланина и иными реакциями, совместное действие которых обеспечивает эффективную изоляцию патогена (Allam, Raftos, 2015). Реакция образования узелков включает две стадии: на первой стадии происходит контакт между гемоцитами и антигеном, дегрануляция клеток, в результате чего в местах разрушения клеток образуется клейкая масса, фиксирующая и лишаящая подвижности значительное число патогенов, оказавшихся в зоне клеточной деструкции. Накапливающийся здесь меланин обладает ингибирующими и токсикогенными по отношению к бактериям свойствами (Ford, Borrero, 2001; Paillard, 2004). В этой фазе реакции фагоцитирующих клеток мало, но по прошествии некоторого времени они начинают мигрировать и атаковать меланизированный сгусток, включающий разрушенные гемоциты, захваченные ими антигены и коагулированную гемолимфу. После чего в этой зоне гемоциты, наслаиваясь друг на друга, образуя характерную многослойную структуру – капсулу. Определенная задержка при формировании клеточного «футляра» из гемоцитов вокруг меланизированного сгустка связана с тем, что источником хемотаксических факторов для фагоцитов служат те разрушающиеся клетки, которые первыми вступили в контакт с антигеном. Другой механизм включения гемоцитов в процесс образования узелков связан с селективной задержкой свободно мигрирующих клеток гемолимфы: амебоциты, циркулируя с током гемолимфы, случайно соприкасаются с ранними узелками (Ford, Borrero, 2001; Paillard, 2004). При этом задерживаются только те

клетки, чьи рецепторы способны взаимодействовать с поверхностными структурами клеток первичного узелка – агглютинидами (лектинами). Процесс меланизации и образования узелков хорошо изучен у *M. mercenaria* (Wang et al., 2016), зараженных неизвестным паразитом венерок (Quahog Parasite Unknown – QPX), а также у *Ruditapes*, пораженных *Roseovarius* и *V. tapetis* (Ford, Borrero, 2001; Paillard, 2004; Allam, Pales Espinosa, 2016). Однако способ уничтожения бактерий в узелках пока до конца не описан: предполагается, что в этот процесс включается меланин и его токсические предшественники, лизоцим и другие гидролитические ферменты (Allam, Raftos, 2015; Wang et al., 2016).

Помимо фагоцитоза и образования узелков у двустворчатых моллюсков описана еще одна форма неспецифической защиты – инкапсуляция (Cheng, 1984; Donaghy et al., 2009). В тех случаях, когда беспозвоночные встречаются с такими многоклеточными паразитами, как цестоды, трематоды, нематоды, грибки или крупные простейшие, которые являются настолько большими, что не могут быть поглощены одним гемоцитом, вокруг инородного материала формируется многослойный клеточный футляр из клеток (Donaghy, 2009; Soudant et al., 2013; Allam, Raftos, 2015). Сформировавшаяся клеточная капсула в морфологическом и функциональном отношении аналогична узелку, но отличается лишь размером вследствие величины изолируемого объекта (Donaghy et al., 2009). Часто такие капсулы дополнительно усиливаются волокнами соединительной ткани и содержат большое количество ферментов для внеклеточного разрушения паразита (Cheng, 1984; Allam, Raftos, 2015). В гемоцитах *R. decussatus* и *R. philippinarum*, участвующих в образовании гранулемы, был обнаружен специфический гликозилированный полипептид p225. Интересно, что этот полипептид отсутствовал у здоровых моллюсков, что указывает, как предполагают авторы (Montes et al., 1996), на специфическую и исключительную ассоциацию p225 с инфекцией *Perkinsus*. Как и любой другой иммунологический ответ, процесс инкапсуляции (число клеточных слоев, плотность упаковки клеток в капсуле, интенсивность меланизации) варьирует в зависимости от видовых особенностей, как паразита, так и хозяина, а также от внешних факторов. Этот процесс может происходить в тканях, приводя к образованию, подобному гранулеме, или во внепаллиальном пространстве между мантией и внутренней стороной раковины двустворчатых моллюсков, приводя к образованию конхиолина или жемчуга (Carella et al., 2015).

Апоптоз играет важную роль в развитии и дифференцировке иммунных клеток, а также в регуляции иммунного ответа. Функциональная значимость модуляции апоптоза патогенами и стрессовыми факторами среды у двустворчатых моллюсков все еще неясна (Soudant et al., 2013). Апоптоз является эволюционно достаточно консервативным процессом клеточной гибели, однако показано, что двустворчатые моллюски могут обладать

независимым от каспаз путем апоптоза, предположительно, индуцированным простейшим паразитом *P. marinus* (Wang et al., 2017). Например, доказано, что *Perkinsus* spp. модулирует апоптоз в гемоцитах и тканях моллюсков, но характер модуляции зависит от вида двустворчатых моллюсков и стадии инфекции. Так, более поздние стадии инфицирования *P. marinus* у *C. virginica* обычно характеризовались подавлением апоптоза по сравнению с более ранними (Sunila, LaBanca, 2003; Goedken et al., 2005; Hughes et al., 2010; Wang et al., 2017). Кроме того показано, что *P. marinus* экспрессируют многие антиапоптотические гены в ответ на воздействие паллиальной жидкости устриц, модулируя таким образом процесс апоптоза в организме хозяина (Pales Espinosa et al., 2014).

У двустворчатых моллюсков, как и у позвоночных, гистоны, выполняющие ключевую роль в структуре хроматина и регуляции транскрипции, также обладают антибактериальной активностью, участвуя во многих иммунных реакциях. Так, показано, что в отличие от интактных *C. gigas* у инфицированных и травмированных моллюсков в тканях вместе с внеклеточной ДНК накапливаются антимикробные H5-подобные и H1-подобные гистоны (Nikapitiya et al., 2013). У *C. virginica* были выявлены другие антимикробные гистоны – H2B и H4. Наибольшая концентрация гистонов H4 и H2B при этом наблюдалась в лизате гемоцитов и плазме устриц *C. virginica*, инфицированных *P. marinus*, но ни один из этих гистонов ни при каких концентрациях не ингибировал рост этого возбудителя *in vitro* (Poirier et al., 2014). В ряде работ показана специфичность антибактериальной активности разных гистонов и даже их изомеров (Seo et al., 2010). Так, cvH2B-2 и cvH2B-1 проявляли активность против *Lactococcus lactis*, *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus*, но не против *Staphylococcus*. Тогда как cvH2B-3 и cvH2B-4 обладали аналогичной активностью только против *V. vulnificus*.

Геномы морских двустворчатых моллюсков обладают множеством генов, участвующих, как в стрессовых, так и в иммунных реакциях. Например, у устриц 5844 гена, участвующих в реакциях при действии абиотического стресса, и 1405 гена, ассоциированных с иммунными реакциями (Guo et al., 2015), из которых 16 % мультиэксонов способны на альтернативный сплайсинг, что еще больше расширяет их адаптационную способность. Гавери и Робертс (2014) выдвинули идею о том, что обнаруженное гипометилирование ДНК у моллюсков может быть связано с «транскрипционным шумом» (альтернативные стартовые сайты транскрипции, пропуск экзона или другие неизвестные механизмы), и обеспечивает этим организмам большую фенотипическую пластичность в непредсказуемой и изменчивой морской среде.

Таким образом, врожденную реакцию иммунитета моллюсков можно суммировать в три основных этапа: распознавание молекулярных паттернов, связанных с

микроорганизмами, или эндогенных молекул, секретируемых поврежденными тканями, растворимыми соединениями и клеточными рецепторами; активация различных сигнальных путей; выработка молекулярных эффекторов, участвующих в защите хозяина и клеточных ответах. Однако традиционное представление о системе иммунитета беспозвоночных и существовании у них только врожденных реакций защиты недавно было пересмотрено, благодаря работам, в которых показано наличие специфического «иммунного прайминга», являющегося функциональным эквивалентом приобретенного (адаптивного) иммунитета позвоночных (Tetreau et al., 2019). Этот феномен был экспериментально подтвержден у беспозвоночных лишь 20 лет назад, хотя предположение о его существовании выдвигалось еще в начале XX века (Tetreau et al., 2019). В широком смысле «иммунный прайминг» определяется как повышенная защита организма против патогена после предшествующего контакта с этим же патогеном или иммунным элиситором. Хотя точные механизмы этого явления у беспозвоночных еще полностью не изучены, считается, что они связаны с факторами распознавания, такими как белки, содержащие тиоэфирные группы (Rodrigues et al., 2010), лектины С-типа (Wang et al., 2013) или молекулы клеточной адгезии, появляющиеся при синдроме Дауна (Ng et al., 2014). Иммунное праймирование уже выявлено у нескольких видов насекомых, ракообразных, круглых червей и моллюсков, в том числе *Bivalvia* (Tetreau et al., 2019). Так, была показана бóльшая выживаемость морских гребешков после их повторного заражения *Listonella anguillarum* (Cong et al., 2008) и устриц после *V. splendidus*, вследствие повышения экспрессии генов, участвующих в фагоцитозе и кроветворении, а также повышения числа циркулирующих гемоцитов и их функциональной активности (Milutinović, 2016). Более того, явление иммунного прайминга было продемонстрировано между поколениями двустворчатых моллюсков (Gerdol et al., 2018). Изучение феномена иммунного прайминга особенно важно для аквакультуры в качестве способа вакцинирования моллюсков с целью их защиты от эпидемий.

1.5 Факторы, влияющие на морфофункциональные свойства гемоцитов

1.5.1 Абиотические факторы

Физиологическое состояние двустворчатых моллюсков зависит как от индивидуальных особенностей животного (Delaporte et al., 2007; Lambert et al., 2007), так и от факторов среды (Fisher et al., 1996; Carballal et al., 1998; Soudant et al., 2004; Flye-Sainte-Marie et al., 2009). Среди абиотических факторов температура является одним из наиболее изученных, поскольку именно этот фактор играет ключевую роль в скорости роста и передачи патогенов (Zannella et al., 2017), а также иммуносупрессии моллюсков (Hegaret et al., 2004; Gagnaire et al., 2006; Hooper et al., 2007; Wendling, Wegner, 2013).

Данные о влиянии температуры на общее число гемоцитов (ОЧГ) у двустворчатых моллюсков противоречивы. Например, у *M. galloprovincialis* (Carballal et al., 1998) и *R. philippinarum* (Paillard et al., 2004) число гемоцитов положительно коррелировало с температурой воды: самые низкие значения были обнаружены зимой, а самые высокие – летом. Зависимость размеров гемоцитов от температуры носила обратный характер – максимальные размеры клеток отмечались осенью и зимой, минимальные – весной и летом. Снижение температуры воды в лабораторных условиях давало также подобные результаты. Тогда как в работе Малаголи и коллег (2007) у этого же вида мидий повышенная температура (воздействие 25 °С в течение 24 ч) не оказывала значительного влияния на количество циркулирующих гемоцитов. У устрицы *C. virginica* уровень ОЧГ был самым низким в июле и августе, когда были зарегистрированы самые высокие значения температуры воды (Fisher, Oliver, 1996). При исследовании влияния на гребешка *C. farreri* острого температурного воздействия (от 17 °С до 11, 23 и 28 °С в течение 72 ч) ОЧГ увеличивалось уже через час и почти в 2 раза (Chen et al., 2007). При содержании *M. mercenaria* при температуре 13, 21 и 27 °С, только при 21 °С через 2 мес. было выявлено значительное увеличение ОЧГ, которое через 4 мес. возвращалось к исходным значениям (Perrigault et al., 2011). У моллюсков *C. gigas*, *M. galloprovincialis* и *Katelysia rhytiphora*, содержащихся в течение 14 сут при 15, 20 и 25 °С, только при температуре 25 °С увеличивалось ОЧГ и их ФА. В гемоцитах *M. galloprovincialis* и *K. rhytiphora* с повышением температуры быстро увеличивалось содержание АФК, а также активность СОД и КАТ. Тогда как у *C. gigas* увеличение АФК и СОД произошло только при повышении температуры с 20 до 25 °С (Rahman et al., 2019). В работе Монари и коллег (2007), напротив, у моллюсков *C. gallina*, содержащихся при 30 °С наблюдали значительное ингибирование ФА гемоцитов по сравнению с 20 °С. Также как и у *C. farreri* при 28 °С (Chen et al., 2007) и у *C. virginica* при 28 °С (Hegaret et al., 2003) и 25 °С (Chu, La Peyre, 1993). Но у этого вида устриц увеличение ФА было зарегистрировано при их содержании в 20 °С воде в течение 68 сут (Chu, La Peyre, 1993). У *M. galloprovincialis* же способность гемоцитов поглощать *in vitro* инородные частицы была выше при 20 °С и 30 °С, чем при 10 °С (Carballal et al., 1997). Хотя Малаголи и коллеги (Malagoli et al., 2007) в своей работе с *M. galloprovincialis* сообщили, что воздействие температурой 25 °С в течение 24 ч не оказывает значительного влияния на ФА гемоцитов. В исследовании Ганьера и коллег (Gagnaire et al., 2006) с *C. gigas* при действии высокой температуры (60 °С) в течение 4 ч обнаружено значительное снижение как ФА гемоцитов, так и доли эстераз-положительных клеток, что как предполагают авторы связано с повышением клеточной гибели. У *C. gallina* содержание лизоцима значительно повышалось в гемоцитах при 25 °С, а в плазме при 20 и 30 °С, что вероятно, было связано с высокой ФА

гемоцитов моллюсков, содержащихся при 20 °С (Monari et al., 2007). У моллюсков *Macra veneriformis* при 10 °С активность лизоцима и содержание гемоцитов уменьшалось, а ФА повышалась. Тогда как действие 30 °С в этом же исследовании приводило к значительному увеличению ОЧГ, но снижению ФА и активности лизоцима (Yu et al., 2010). У *M. mercenaria* увеличение содержания лизоцима в гемоцитах и их ФА наблюдалось при 13 °С, а АФК при 21 °С (Perrigault et al., 2011). В гемоцитах гребешка *S. farreri*, содержащегося при различных температурах (11, 17, 23 и 28 °С) после введения высокой концентрации *Vibrio* (10^7 КОЕ/мл) экспрессия шести генов (липополисахарид и β -1, белок, связывающий 3-глюкан, лектин С-типа, толл-подобный рецептор, лизоцим, СОД и феноксидаза (ФО)) была значительно выше, чем у контрольных животных и животных, которым вводили меньшую концентрацию *Vibrio* (10^4 КОЕ/мл) (Chen et al., 2019).

Таким образом, проведенные исследования показали, что при воздействии высоких температур, число клеток в гемолимфе, как правило, повышается, как и содержание в них лизоцима и АФК, тогда как ФА снижается, делая моллюсков более уязвимыми для патогенов, чей рост и развитие, напротив, усиливаются при повышении температуры. Многие авторы (Soudant et al., 2004; Flye-Sainte-Marie et al., 2009) связывают повышение ОЧГ при более высоких температурах с сезонными изменениями скорости клеточных делений, что в свою очередь обусловлено повышением бактериальной нагрузки со стороны среды обитания, вызванной подъемом температуры воды, а также с подготовкой к нересту. Снижение общего числа гемоцитов в течение зимнего периода может объясняться тем, что репродукция клеток требует больших пластических и энергетических ресурсов, в то время как доступность пищи в холодное время года ограничена, а скорость метаболизма невысока (Donaghy et al., 2009). Кроме того, большое значение в отклике организма на изменение температуры имеет занимаемая им экологическая ниша и набор факторов в ней: например, литоральные виды, подверженные периодическому воздействию воздуха и горячих солнечных лучей во время отлива, будут более приспособлены к перепадам температур.

Лабораторные и полевые исследования продемонстрировали взаимосвязь между уровнем солености и степенью заражения двустворчатых моллюсков (Chu, La Pyere, 1993; Reid et al., 2003). У устриц *O. edulis*, содержащихся в течение 7 сут при разных уровнях солености (32, 25 и 16 ‰), лишь самая высокая концентрация способствовала росту числа условно-патогенных бактерий *Listonella anguillarum*, и приводила к увеличению числа гранулоцитов, но снижению в них АФК (Hauton et al., 2000). Кроме того, у этого вида моллюсков было обнаружено, что при 16 и 19 ‰ стабильность лизосом ниже, чем при 32, 28 и 25 ‰ (Hauton et al., 2000). У другого вида устриц (*S. gigas*) при низких уровнях солености (6,5, 3 и 0 ‰) наблюдалась высокая смертность гемоцитов, а содержание моллюсков в

течение суток в условиях гипосолености (15 ‰) значительно снижало ФА гемоцитов (Gagnaire et al., 2006). Значительное повышение ОЧГ с увеличением солености с 20 до 40 ‰ наблюдалось у *R. philippinarum* (Reid et al., 2003) и *M. galloprovincialis* (Malagoli et al., 2007). Тогда как у *C. gallina*, содержащихся при 28, 34 и 40 ‰, изменение ОЧГ имело обратную динамику, и наиболее высокая ФА была зарегистрирована только в гемоцитах моллюсков, содержащихся при 34 ‰ (Matozzo et al., 2007). Басселл с коллегами (Bussell et al., 2008) установили, что у мидий *M. edulis*, содержащихся в течение 2 сут при пониженной солености (16 ‰), происходит значительное снижение числа гемоцитов, доли эозинофилов и ФА по сравнению с моллюсками, содержащимися при 32 ‰. У *Pinctada imbricata* (Kuchel et al., 2010) ФА и активность ФО значительно снизились, а ОЧГ возросло при воздействии низкой солености (25 ‰). Фишер и Ньюэлл (1986) обнаружили, что подвижность гемоцитов снижается после острого увеличения солености, и выдвинули гипотезу о том, что гемоциты не могут двигаться, пока они не «отрегулируют» свой объем, то есть накопят в клетках достаточное количество осмотических эффекторов, чтобы предотвратить сокращение объема клетки, вызванного осмотическим стрессом (Fisher, Newell, 1986). Таким образом, у моллюсков при повышении солености наблюдается увеличение числа гемоцитов, тогда как при пониженном уровне солености происходит снижение ОЧГ и подавление их ФА.

Обнаружено, что закисление морской воды отрицательно влияет на такие физиологические процессы у моллюсков, как кальцификация, дыхание, фильтрация, окислительно-восстановительный гомеостаз и иммунная реактивность (Zhao et al., 2020), что может сделать их более восприимчивыми и к другим агрессивным факторам среды, в том числе к патогенным инфекциям (Hooper et al., 2007; Ellis et al., 2015). Малаголи и Оттавиани (2005), исследуя влияние низкого рН (7,3) на *M. galloprovincialis*, обнаружили значительное снижение цитотоксичности гемолимфы по сравнению с контрольной группой (рН 8,0). В работе с другим видом мидий (*M. edulis*) Бибби с коллегами (2008) установили, что ФА гемоцитов значительно увеличивается при всех протестированных значениях рН (6,7; 7,5; 7,7) в сравнении с контролем при рН 7,8, тогда как другие измеренные иммунные параметры (производство супероксид-анионов, общее и дифференциальное число гемоцитов) значительно не изменяются. Авторы связывают это с растворением раковины мидий и как следствие повышением уровня Ca^{2+} в гемолимфе, влияющего в свою очередь на клеточный метаболизм, функции и сигнальные пути гемоцитов.

Концентрация кислорода в морской среде также значительно влияет на состояние моллюсков (Gerdol et al., 2018). Так, содержание *M. galloprovincialis* в условиях гипоксии в течение 24 ч привело к значительному увеличению числа гранулоцитов, но уменьшению числа агранулоцитов и АФК в гранулоцитах (Andreyeva et al., 2019). У устриц

жизнеспособность гемоцитов и их ФА были нечувствительны к повышению содержания кислорода до 9 мм рт. ст., что вероятно связано с тем, что данный вид моллюсков обычно обитает в устьях рек, и периодически подвергаются гипоксии (особенно летом) (Alvarez et al., 1992).

Исследования, проведенные в условиях комплексного воздействия факторов (повышенные температуры, нерест, инфекция *Vibrio*) показали, что все факторы вносили аддитивный вклад в смертность *C. gigas* (Wendling, Wegner 2013). Последствия сложных взаимодействий между несколькими одновременными факторами стресса на иммунную функцию также обнаруживаются в серии исследований заболевания моллюсков – мартелиоза, вызванного *Marteilia sydneyi* у *S. glomerata* и *P. imbricata* (Raftos et al., 2014). У этих двустворчатых моллюсков пониженная соленость (например, после сильных дождей), экстремальные температуры вызывали выброс норадреналина, который в свою очередь приводил к апоптотическим реакциям в гемоцитах, снижению количества гемоцитов, ингибированию их адгезии и ФА, а также уменьшению числа фенолоксидаз-положительных гемоцитов. Последнее является критически важным, поскольку данный патоген меланизируется внутри фаголизосом (Raftos et al., 2014). В других исследованиях сочетание таких стрессоров, как пониженная соленость, гипоксия и низкий pH приводили к увеличению частоты диссеминированных неоплазий (Sunila, 2003; Wolowicz et al., 2005; Carballal et al., 2015).

Различные виды поллютантов оказывают негативное воздействие на организм, которое проявляется как в прямом повреждающем действии на определенные ткани и органы, так и в опосредованном изменении общего физиологического статуса организма, затрагивая системы, ответственные за поддержание гомеостаза, в том числе, иммунную систему. При этом иммуномодулирующий эффект зависит от типа поллютанта, его дозы и исходного состояния моллюсков. Как правило, низкие концентрации загрязнителя оказывают стимулирующее действие, а высокие – ингибирующее (Cheng, Sullivan, 1984; Coles et al., 1995; Pipe, Coles, 1995; Pipe et al., 1999; Dyrzynda et al., 1998, 2000; Matozzo et al., 2001; Gagnaire et al., 2007), что в свою очередь приводит к иммунодефицитному состоянию и высокой восприимчивости моллюсков к патогенам (Auffret et al., 2002). Содержание мидий *M. edulis* при низких концентрациях меди стимулировало выработку гемоцитами АФК, а в больших – ингибировало, повышая восприимчивость животных к бактериальным инфекциям (Pipe, Coles, 1995; Pipe et al., 1999). У *R. philippinarum* медь также оказывала ингибирующий эффект на ФА гемоцитов и содержание в них СОД, тогда как кадмий в таких же концентрациях не вызывал каких-либо изменений параметров клеток, но оба металла повышали активность цитохромоксидазы и вызывали дестабилизацию лизосомальных

мембран (Matozzo et al., 2001). Отсутствие эффекта действия кадмия на ФА и АФК гемоцитов также было выявлено и у *M. edulis* (Coles et al., 1995), однако он проявлялся в отношении ОЧГ: при низкой концентрации поллютанта число клеток снижалось, а при увеличении – повышалось, что интерпретируется авторами как результат миграции клеток из тканей в гемолимфу. У *C. virginica* при воздействии высокой концентрации кадмия также наблюдалось повышение концентрации циркулирующих клеток и их ФА, увеличение содержания металлотионеина в гемоцитах и ингибирование генерации АФК (Butler et al., 2000). Более длительная экспозиция (в течение 21 сут) вызывала увеличение числа мертвых гемоцитов и повышение смертности среди моллюсков. При этом эффект имел обратную зависимость от дозы поллютанта и максимально проявлялся при низких концентрациях кадмия, тогда как более высокие концентрации наоборот – повышали жизнеспособность и функциональную активность гемоцитов (Bouilly et al., 2006). У *M. galloprovincialis* наблюдался подобный эффект при их содержании в присутствии повышенных доз кадмия и меди. Тогда как производство АФК гемоцитами изменялось лишь в присутствии меди, и проявлялось в подавлении их синтеза (Gomez-Mendikute, Cajaraville, 2003). У *M. arenaria* в подобных условиях (28 сут) наблюдалось снижение жизнеспособности гемоцитов и их ФА (Fournier et al., 2001). Тяжелые металлы могут и не оказывать токсического действия на двустворчатых моллюсков. Так, гемоциты *C. virginica* накапливают такие металлы, как медь и цинк для осуществления антимикробной защиты (Fisher, 2004a) и формирования раковины (Fisher, 2004b). Иванина с коллегами (2016) обнаружили, что медь является иммуностимулятором не только для устриц, но и для других видов моллюсков, и предположили, что «лечение» медью может использоваться для укрепления иммунитета и защиты от патогенов двустворчатых моллюсков. Иммуномодулирующий эффект металла также может измениться под действием сторонних факторов, таких как присутствие патогенов и параметры среды обитания. Так, показано, что при заражении *M. edulis* бактериями *V. tubiashii* при совместном действии меди и температуры происходит более значительное снижение ОЧГ по сравнению с действием одного лишь из факторов. Кроме того, содержание АФК в присутствии различных концентраций меди значительно снизилось при температуре 10 °С, тогда как при 15 °С – увеличилось. В то время как на ФА эффект оказывала именно концентрация меди: при низких концентрациях металла ФА увеличилась (Parry, Pipe, 2004). Согласно нескольким исследованиям, химический стресс является также значительным фактором в развитии неоплазий (St-Jean et al., 2005; Muttray et al., 2012). Например, Арриагада с коллегами (2014) доказали, что наиболее высокая частота возникновения неоплазии, связанная с запуском ретротранспозона Steamer, что встречается в районах, подверженных действию поллютантов.

Муниципальные сточные воды являются основным источником загрязнения и могут содержать различные ксенобиотики, в том числе эстрогенные вещества и фармацевтические продукты. Канеси с коллегами (2007) выявили, что в гемоцитах *Mytilus*, инкубированных в течение 30 мин с эстрогенами или ксенобиотиками иммитирующими их действие (17 α -этинилэстрадиол и карбоксилат моноэтоксилат нонилфенола), увеличивается высвобождение лизосомального фермента на 45 % и 65 %, соответственно, по сравнению с контрольными гемоцитами. При более низких концентрациях соединений обнаруживалась значительная стимуляция ФА гемоцитов, а при повышении – ингибирующий эффект. Подобный ингибирующий эффект высокой дозы 17 β -эстрадиола обнаружили и у *C. fluminea* (Champreau et al., 2006). Исследование *in vitro* воздействия на гемоциты *Elliptio complanata* ряда фармацевтических препаратов, костанола, каинола (копростанола) и городских отходов в концентрации 2,5, 25, 50 и 100 мкМ, показали, что бензафибрат, гемфиброзил и триметоприм, увеличивают ФА, тогда как новобиоцин и морфин снижают его активность (Gagne et al., 2006). Активность внутриклеточной эстеразы снижалась при применении сульфаметазола, новобиоцина, гемфиброзила, бензафибрата и карбамазепина. Клеточная адгезия снижалась окситетрациклином, новобиоцином и напроксеном и увеличивалась в присутствии гемфиброзила, безафибрата и сульфапиридина. Воздействие этих продуктов также модулировало перекисное окисление липидов (ПОЛ) в гемоцитах. Тогда как копростанол и напроксен снижали ПОЛ, а новобиоцин и сульфапиридин индуцировали ПОЛ.

При исследовании влияния полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), входящих в состав сырой нефти, на *M. arenaria* (Fournier et al., 2007) и *C. gigas* (Bado-Nilles et al., 2008) было обнаружено подавление ФА гемоцитов. Исследования, проведенные с гребешком *P. maximus*, показали, что воздействие в течение 7 сут фенантрена в концентрации 100 и 200 мкг/л приводит к возрастанию количества гемоцитов, но снижению стабильности их клеточной мембраны и ФА (Hannam et al., 2010). После воздействия в течение 7 и 14 сут фенантрена разной концентрации на *M. edulis*, *Cerastoderma edule* и *Ensis siliqua* происходила 100 % гибель *C. edule* (после 14 сут) и *E. siliqua* (через 7сут) при 400 мкг/л. При этом ФА и образование АФК были значительно снижены у *C. edule* после 14 сут воздействия 100 и 200 мкг/л, а у *M. edulis* после 7 сут воздействия фенантрена концентрацией 50, 100 и 200 мкг/л активность КФ увеличивалась, но через 14 сут уменьшалась. Тогда как иммунные параметры *E. siliqua*, как сообщают авторы, были наименее чувствительными при тех же концентрациях фенантрена и практически не изменялись (Wootton et al., 2003). В результате экспозиции с фенолом у мидии *M. edulis* наблюдалось увеличение ОЧГ (Renwranz, 1990), а у *M. mercenaria* – угнетение ФА

гемоцитов (Fries, Tripp, 1980). Экспозиция *C. gallina* с бензпиреном концентрацией 0,5 мг/л в течение 7 и 12 сут значительно снижала активность лизоцима, способность к адгезии и фагоцитозу гемоцитов (Matozzo et al., 2016). Тогда как на *M. galloprovincialis* бензпирен практически не оказывал какого-либо влияния, за исключением повышения продукции супероксид-анионов (Gomez-Mendikute et al., 2003). Исследования, проведенные на тихоокеанской устрице *C. gigas*, подвергнутой *in vitro* воздействию бензпирена и френантрена, показали, что эти соединения значительно увеличивают долю гранулоцитов, концентрацию эстеразы и лизосом, но подавляют клеточную гибель (Gagnaire et al., 2006). Воздействие мазута № 6 в течение 7 сут на *P. imbricata* не приводило к значительным изменениям таких иммунологических параметров, как ОЧГ, ФА и концентрация лизоцима, за исключением жизнеспособности клеток (Nuseti et al., 2004). Таким образом, авторы проведенных исследований, предполагают, что воздействие ПАУ может повысить восприимчивость к инфекциям в связи со снижением иммунокомпетентности гемоцитов, вызванной повышением АФК.

Исследования влияния пестицидов на устриц *Crassostea*, показали, что 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота усиливает гибель клеток после их инкубации с этим ксенобиотиком в течение 4 ч. В то время как воздействие пароксона вызывает снижение доли эстераз- и лизосом-положительных клеток через 4 и 24 ч инкубации, но повышение доли АФК-положительных клеток после 4 ч. Фунгицид хлороталонил в концентрации 2 мкмоль/л приводил к значительной гибели клеток, а при 200 мкмоль/л способствовал повышению концентрации гранулоцитов. Такие пестициды, как алахлор, метолахлор, тербутилазин, глифосат, диурон, атразин, карбарил и фосфид алюминия не оказывали никакого эффекта на иммунные параметры гемоцитов, а вот их смесь приводила к снижению ФА (Gagnaire et al., 2006). Другие исследования, проведенные с пестицидами, показали, что паракват вызывает значительное увеличение содержания супероксид аниона в гемоцитах *M. galloprovincialis* и снижение их жизнеспособности (Gomez-Mendikute, Cajaraville, 2003). Для оценки влияния пестицидов на заражение моллюсков патогенами, устрицы *C. gigas* подвергали в течение 7 сут воздействию вышеупомянутой смеси пестицидов в концентрации, соответствующей экологической значимости (Gagnaire et al., 2007). Результаты показали, что ФА была значительно снижена, в то время как смертность клеток, выработка эстеразы и АФК не изменились. Однако анализ ПЦР в реальном времени показал, что в гемоцитах происходило подавление экспрессии 19 генов, участвующих в передаче сигналов, работе цитоскелета, фагоцитарной реакции и других защитных механизмах. Кроме того, у подопытных животных наблюдалась повышенная восприимчивость к заражению бактериями. На втором этапе этой работы при совместном воздействии пестицидов и *V.*

splendidus наблюдали активацию 10 из 19 генов, продукты которых, как считают авторы, вызывают повреждение тканей моллюска (Gagnaire et al., 2007).

Лабораторные исследования, несомненно, имеют свои положительные моменты, главное из которых – это контролируемые условия. Однако интерпретация результатов данных исследований применительно к естественным системам с несколькими флуктуирующими переменными проблематична. Полевые исследования имеют больше преимуществ в подобных исследованиях, поскольку позволяют анализировать параметры в соответствии с условиями, присутствующими в конкретный момент, в совокупности со всеми факторами, влияющими на экосистему. Так, в работе (Toledo-Ibarra, 2016), при оценке содержания ПАУ (пирен, нафталин и бензо(а)пирен), металлов (Cu, Pb, Zn, Mn, As, Fe) и фосфорорганических пестицидов (ингибирование ацетилхолина) в Тихоокеанских водах Мексики, и их влиянии на иммунные параметры *C. corteziensis*, было выявлено снижение ОЧГ и повышение активности супероксид-аниона, пероксида водорода, КАТ и ПОЛ в жабрах. В других исследованиях (Fisher et al., 2000; Oliver et al., 1999) сообщалось о положительной корреляции между концентрацией ксенобиотиков в экосистеме и усилением защитных механизмов моллюсков. При переселении *C. virginica* на загрязненные участки (с высоким содержанием металлов, ПАУ и полихлорированных бифенилов) и нахождении гидробионтов в данных условиях в течение 12 нед., у особей наблюдалось значительное повышение числа гемоцитов и их бактерицидной активности. Однако, когда эксперимент был воспроизведен в обратном порядке, результаты были неоднозначными: концентрация лизоцима была снижена, но ОЧГ и число, поглощаемых ими бактерий – фагоцитарный индекс не изменялись. Авторы предполагают, что эти результаты могут указывать на адаптацию устриц к хроническому загрязнению (Fisher et al., 2004a).

Двустворчатые моллюски представляют собой наиболее подходящую модель для исследования эффектов и механизмов действия наночастиц (НЧ) на морских беспозвоночных, поскольку они ведут малоподвижный образ жизни с фильтрующим способом питания, аккумулируя ксенобиотики в тканях на порядок выше, чем их концентрация в водной среде. Степень токсичности НЧ зависит от их размера и времени воздействия. В целом авторы отмечают, что НЧ ингибируют иммунную систему моллюсков, делая их более восприимчивыми к различным патогенам. У нескольких видов двустворчатых моллюсков (*M. galloprovincialis*, *M. edulis* и *C. gigas*) при действии НЧ было обнаружено повреждение ДНК и изменение экспрессии белков (Fabbri et al., 2008; Li et al., 2018). Также на нескольких моделях моллюсков показана прооксидантная природа НЧ, приводящая к окислительному стрессу, который в свою очередь активирует различные клеточные сигнальные пути, приводящие к разнообразным биологическим реакциям с целью

восстановления окислительного равновесия (Shi et al., 2017; Li et al., 2018). У *M. galloprovincialis*, *M. edulis*, *C. virginica* и *Perna viridis* также было отмечено подавление ФА гемоцитов, подвергшихся воздействию различных видов НЧ (Shi et al., 2017). Кроме того, у *M. galloprovincialis* при действии НЧ отмечено повышение уровня лизоцима (Canesi et al., 2010), а у *M. coruscus* – снижение числа циркулирующих гемоцитов (Huang et al., 2016).

1.5.2 Биотические факторы

Патогены, вызывающие заболевания двустворчатых моллюсков, могут иметь самое разнообразное происхождение: это могут быть вирусы, бактерии, простейшие или грибы. Но, несмотря на внушительный список видов патогенов, которые поражают моллюсков, описание их влияния на хозяина все еще удивительно скудно (Lohan et al., 2016). Так среди вирусов, наиболее распространенным является Остридовirus герпеса 1, или вирус герпеса устриц (OsHV-1), который может инфицировать кроме устриц еще несколько видов двустворчатых моллюсков (Ren et al., 2013; Guo, Ford, 2016). Другие известные вирусы двустворчатых моллюсков включают вирус некроза жабр, вирус инфекции гемоцитов и велярной вирус устриц (Renault, Novoa, 2004). Антивирусные реакции иммунной системы двустворчатых моллюсков во многом остаются загадкой. Анализ экспрессии генов у *C. gigas*, пораженных OsHV1 и вибрионами, показал вовлеченность 10 генов иммунного ответа (Fleury, Huvet 2012), список которых был в последующем значительно расширен (Allam, Raftos, 2015). Также Ксинг с коллегами (Xing et al., 2008) показали, что инфицирование гребешка *C. farreri* острым некробиотическим вирусом сопровождается изменением в гемоцитах активности КФ, СОД, МПО и ФО. Но наиболее значимое влияние вирусов на организм моллюсков, и в частности иммунную систему, выражается в индукции у них диссеминированной неоплазии (Carballal et al., 2015).

Исследования микробиомов двустворчатых моллюсков показали, что среди патогенных бактерий наиболее распространенными возбудителями являются *Chlamidia*, *Vibrio*, *Alteromonas*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Cytophaga*, *Nocardia*, *Mycoplasma* и *Rickettsia* (Travers et al., 2015; Zannella et al., 2017). Несмотря, на первый взгляд, большое разнообразие возбудителей, около 50 % встречающихся у моллюсков заболеваний вызваны представителями рода *Vibrio*. Чаще всего моллюсков поражает болезнь коричневого кольца, нокардиоз, болезнь ювенильных устриц и летняя смертность тихоокеанских устриц, которые были зарегистрированы практически у всех промысловых видов (Guo, Ford, 2016; Zannella et al., 2017), и с каждым годом наблюдается рост числа заболеваний. Во многом причиной этому является изменение климата, приводящее к расширению ареала некоторых патогенов, а также деятельность человека, ведущая к занесению патогенов в новые регионы либо

эпизоотиям имеющихся. Чаще всего у животных, инфицированных в естественных условиях, обнаруживается повышение ОЧГ и ФА (Carballal et al., 1998; Flye-Sainte-Marie et al., 2009), однако при тяжелом течении заболевания наблюдается обратная динамика (Ordas et al., 2000). Кроме того, было выявлено, что некоторые бактерии (например, из рода *Vibrio*) способны ингибировать продукцию АФК за счет собственной антиоксидантной системы (Bramble, Anderson, 1998; Lambert et al., 2003), снижать способность клеток к адгезии (Choquet et al., 2003; Labreuche et al., 2006), а также подавлять их ФА либо путем формирования капсулы, создающей физические препятствия для фагоцитоза (Harris-Young et al., 1995; Genthner et al., 1999; Canesi et al., 2002b), либо за счет прямой цитотоксической деятельности, направленной против гемоцитов хозяина (Nottage, Birkbeck, 1990; Labreuche et al., 2006). Подобная тенденция иммунной реакции была обнаружена и при моделируемом в лабораторных условиях экспериментальном заражении. Так, при инфицировании *R. philippinarum* бактериями *V. tapetis* в лабораторных условиях, было обнаружено, что в течение первых двух недель после заражения число гемоцитов повышается, но затем падает, как предполагают авторы из-за их миграции из гемолимфы в тканевые очаги инфекции (Oubella et al., 1993, 1994; Paillard, 2004; Allam et al., 2000). Однако в других экспериментах при искусственном инфицировании мидий несколькими видами бактерий рода *Vibrio* было обнаружено резкое уменьшение концентрации клеток гемолимфы в течение нескольких часов после заражения с постепенным восстановлением (Parisi et al., 2008; Ciacci et al., 2009a). При этом у инфицированных животных наблюдалось снижение доли гранулоцитов; и уменьшение степени их зернистости, что авторы объясняют дегрануляцией в результате дестабилизации лизосомальных мембран в ответ на вторжение патогенов (Ciacci et al., 2009a, 2010; Mateo et al., 2009). Действительно, после заражения отмечается возрастание антимикробной активности гемоцитов, в том числе лизоцима (Paillard et al., 2004; Ciacci et al., 2009a, 2010), а также усиление продукции внеклеточных свободных радикалов (Ciacci et al., 2009a, 2010). Характер иммунной реакции на инфекционный агент зависит от восприимчивости моллюска, обусловленной его физиологическим статусом, от вирулентности и патогенности самого агента, а также от действия сторонних факторов (Canesi et al., 2002b; Ciacci et al., 2010).

Среди простейших наиболее серьезную угрозу для естественных и выращиваемых популяций двустворчатых моллюсков несут представители родов *Perkinsus*, *Haplosporidium*, *Marteilia* и *Bonamia* (Gestal et al., 2008). При паразитической инвазии, как правило, происходит уменьшение числа циркулирующих гемоцитов из-за их миграции в очаг инфекции, а также повышение ФА и продукции АФК (Anderson et al., 1992, 1995; Chu, La Pyere, 1993; La Pyere et al., 1995). Однако, показано, что некоторые паразиты, такие как

P. marinus (Tall et al., 1999) и *B. ostreae* (Morga et al., 2009) обладают особыми механизмами вирулентности, потенциально способствующими их выживанию в гемоцитах хозяина (Alavi et al., 2009). Эти механизмы могут быть связаны с подавлением ФА гемоцитов, экспрессией генов, кодирующих антиапоптотические белки, белки теплового шока и ингибиторы протеиназ (Soudant et al., 2013; Pales Espinosa et al., 2014), а также с производством антиоксидантных ферментов, таких как СОД (Schott et al., 2006; Asojo et al., 2006), аскорбат-зависимые пероксидазы (Schott et al., 2006) и естественный ассоциированный с резистентностью белок макрофагов (Gerdol et al., 2018). Интересным фактом является то, что при заражении устриц *H. nelsoni* основными эффекторными клетками выступают агранулярные гемоциты (McCormick-Ray, Howard, 1991).

В наименьшей степени заболевания моллюсков вызывают грибы (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis* и *Fusarium*), *Porifera* (*Cliona* spp.) и гельминты (трематоды, цестоды и нематоды), поэтому информации о реагировании иммунной системы на вторжение этих патогенов крайне мало (Zannella et al., 2017).

Среди биотических факторов токсины микроводорослей представляют особую проблему. Они вызывают не только патологии и гибель двустворчатых моллюсков (Landsberg, 2002), но и, накапливаясь в их тканях (Landsberg, 2002; Medhioub et al., 2013; Lassudrie et al., 2014), создают угрозу здоровью человека, употребляющего этих гидробионтов в пищу. При содержании *R. philippinarum* с токсичными видами динофлагеллят (*Karenia selliformis* и *K. mikimotoi*) у моллюсков наблюдалось увеличение ОЧГ, уменьшение их размеров и степени зернистости, а также снижение числа апоптических клеток, что авторы связывают с активацией пролиферативных процессов и появлением большого количества молодых клеток среди циркулирующих гемоцитов (Hegaret et al., 2011; da Silva et al., 2008). У *M. edulis* при действии *Alexandrium fundyense* кроме вышеперечисленных эффектов, также наблюдалось уменьшение доли эозинофильных гранулоцитов, и повышение уровня фагоцитоза и продукции АФК, что интерпретируется авторами миграцией эозинофилов из циркуляторного русла для клиренса поврежденных тканей (Galimany et al., 2008a). Действие *P. lima* на функции гемоцитов *Perna* выражалось в нарушении фагоцитоза, индуцировании продукции АФК и снижении ОЧГ (Neves et al., 2019). Тогда как у *R. philippinarum* при инкубации с *A. tamarense* происходило снижение адгезивной способности гемоцитов и их ФА (Ford et al., 2008). Цветение *Dinophysis acuminata* оказывало различный эффект на *C. gigas*, *Anomalocardia brasiliiana* и *P. perna* (Mello et al., 2010). Так, у *A. brasiliiana* и *P. perna* наблюдалось снижение числа апоптических клеток, увеличение ОЧГ, хотя у мидий при этом доля гранулоцитов снижалась. У всех моллюсков наблюдалось снижение содержания ФО, но достоверно лишь у

P. perna. В исследовании Хаберкон и коллег (2010) при воздействии *A. minutum* на *C. gigas* наблюдалось повышение ОЧГ, доли среди них гранулоцитов и фагоцитарной способности. Что касается *P. minimum*, то в одном из экспериментов моделируемое цветение приводило к увеличению у *C. virginica* ОЧГ, ФА, тогда как число и жизнеспособность гранулоцитов и их агрегация подавлялись, а в другом – какой-либо модуляции иммунных параметров не наблюдалось, что авторы связывают с различиями популяций устриц и способов воздействия на них токсинами (в лабораторных или естественных условиях) (Hegaret et al., 2011). Различия в результатах *in vivo* и *in vitro* могут быть связаны с тем, что в естественных условиях гемоциты не являются основной мишенью биологических токсинов, и их поведение является не прямым, а опосредованным ответом на действие данного повреждающего фактора (Donaghy et al., 2009). Кроме того, большое значение может иметь появление устойчивых генотипов моллюсков в результате их адаптации к повторяющемуся токсическому цветению (Navaro et al., 2014). Апоптотическое действие токсинов на гемоциты *M. edulis*, *Nodipecten subnodosus* и *C. gigas* было выявлено для водорослей *A. catenella* и *A. tamarense* (Medhioub et al., 2013; Estrada et al., 2013; Bianchi et al., 2019), а также у мидий *Perna* и устриц *Crassostrea* при действии *P. lima* (Prado-Alvarez et al., 2013; Neves, Rodrigues, 2020). Также было обнаружено, что биотоксины динофлагеллят, депонированные в тканях двустворчатых моллюсков, коррелируют с наличием у них диссеминированной неоплазии (Landsberg, 2002). А биотоксины динофлагеллат из группы, называемой азаспирацидами, коррелируют с экспрессией генов и активностью белков, участвующих в защите организма, клеточной регуляции, апоптоза и развитии рака, таких как катепсин D и белки семейства p53, что еще раз указывает на то, что токсины могут действовать как канцерогенные соединения (Nzoughet et al., 2009). Было показано, что токсины могут по-разному модулировать взаимодействия двустворчатых моллюсков с патогенами: либо усиливая восприимчивость моллюсков к заболеванию, либо, наоборот, подавляя распространение или передачу инфекции (Hegaret et al., 2011; da Silva et al., 2008; Lassudrie et al., 2014).

У некоторых моллюсков встречаются мутуалистические симбиозы с сульфидо- и метанооксиляющими бактериями (Tame et al., 2015), а также микроводорослями *Symbiodinium*. Биотический статус другой эндобиотической микроводоросли рода *Coccolithus* пока до сих пор не определен. После первого сообщения (Goetsch, Scheuring, 1927) о фотосимбионтах *Chlorella*, найденных в 1927 г. Гётш и Шоуринг в двустворчатых моллюсках *A. cygnea* и *Unio pictorum*, эндобиотические микроводоросли были обнаружены у более чем 30 ныне живущих видов класса *Bivalvia*. Большинство представителей (около 27 видов) сосредоточены в одном семействе *Cardiidae* и заселены динофлагеллятом *Symbiodinium*, и

лишь 5 видов принадлежат Mytilidae и содержат зеленую микроводоросль *Coccomyxa*. Однако как в отношении *Symbiodinium* так и *Coccomyxa*, исследований, касающихся иммунного статуса моллюсков, заселенными этими фотосимбионтами нет. Известно лишь, что помимо традиционных клеточных типов гемоцитов у симбиотических видов Cardiidae также в гемолимфе присутствуют моруло-подобные клетки, обладающие уникальным белковым профилем, функция которых до конца не ясна (Nakayama, 1997a). Что касается моллюсков, инвазированных *Coccomyxa*, то каких-либо исследований клеточных и гуморальных факторов их гемолимфы вообще не проводилось, несмотря на то что именно иммунитет хозяина играет ключевую роль в установлении и регуляции симбиоза.

В настоящий момент отсутствуют какие-либо исследования, в которых был бы выполнен анализ взаимосвязи параметров иммунитета и степени развития гистопатологий. В ряде работ указано лишь, что при каких-либо нарушениях в организме, даже не выраженных на тканевом уровне, происходит изменение характеристик гемоцитов, их мобилизация и миграция к органу, испытывающему наибольшую нагрузку со стороны повреждающего фактора (Allam et al., 2000; Sheir et al., 2010). Данное явление рассматривается в качестве важного компонента воспалительного процесса у организма в ответ на загрязнение (Costa et al., 2013; Cuevas et al., 2015). Например, при воздействии НЧ оксида титана на ПВЖ у *M. galloprovincialis* (Varmo et al., 2013) было выявлено уменьшение транскрипции антиоксидантной системы, а в гемолимфе – уменьшение стабильности лизосомальной мембраны, ФА, при этом наблюдалось увеличение концентрации радикалов кислорода и антибактериальной активности.

Гаметогенез – ресурсозатратный процесс, приводящий к снижению активности других жизненно важных процессов, что подтверждается данными о массовой гибели двустворчатых моллюсков именно после их размножения (Tremblay et al., 1998; Samain et al., 2007). Кроме того показано, что репродуктивный цикл оказывает значительное влияние на аккумуляцию химических агентов тканями моллюсков, и которые во время нереста могут выделяться в среду (Hummel et al., 1989; 1990). Среди Bivalvia исследования взаимосвязи репродуктивного цикла и иммунитета были проведены в основном на устрицах, и исключительно путем оценки параметров клеточного иммунитета (Cho, Jeong, 2005; Li et al., 2007; Samain et al., 2007; Wendling, Wegne, 2013). Так, у устриц Чесапикского залива в отсутствии нереста (период с января по май) Маккормик-Рей и Ховард наблюдали сдвиг гемограммы от гранулярных к агранулярным клеткам (McCormick-Ray, Howard, 1991). Тогда как степень гранулированности гемоцитов *M. edulis*, выловленных из Венецианской лагуны Италии (Pipe et al., 1995), была ниже летом в период нереста. Снижение концентрации гранулоцитов, являющихся активными фагоцитами, может способствовать повышению

смертности моллюсков из-за снижения их резистивности и усиления инфицирования (Cho, Jeong, 2005). Начало весеннего нереста у устриц из залива Апалачикола Флориды, сопровождалось снижением степени гранулированности циркулирующих гемоцитов, их способности продуцировать цитотоксический супероксид-анион, но увеличением концентрации лизоцима в гемолимфе; все перечисленные параметры возвращались к исходному уровню после окончания нереста (осенью) (Fisher et al., 1996). В другом исследовании у устриц из Нью-Джерси (Feng et al., 1970) и устриц Чесапикского залива (Chu, La Peyre, 1993) уровень лизоцима в плазме гемолимфы был ниже летом, но выше у устриц из Флориды (Fisher et al., 2000). Также показано, что у *Mizuhopecten yessoensis* во время нереста и после него увеличивается ОЧГ, в связи с их участием в резорбции и реструктуризации гонад (Дзюба, Романова, 1992). В работе Брокорда и коллег (2019), проведенной с *Argopecten purpuratus* было выявлено уменьшение числа циркулирующих гемоцитов после нереста, которое при этом не сопровождалось увеличением числа инфильтрирующих гемоцитов в гонаде, что может быть связано, как указывают авторы, с повышением смертности гемоцитов или снижением кроветворной способности после нереста. Также Ли с коллегами (Li et al., 2007) зарегистрировали заметное снижение антимикробной активности гемолимфы после нереста у *C. gigas*.

Оценка влияния рациона питания на рост и развитие моллюсков, проведенная на *Pecten maximus* (Soudant et al., 1998), *C. gigas* (Soudant et al., 2000), *O. edulis* (Berntsson et al., 1997), *R. decussatus* (Albentosa et al., 1996) и *R. philippinarum* (Caers et al., 1999), показала, что недоедание является наиболее значимым фактором риска развития болезней и смерти этих организмов. Хотя иммунная система является весьма ресурсозатратной системой организма в настоящее время связь между питанием и иммунитетом остается малоизученной (Brokordt et al., 2019). Тем не менее из этих немногочисленных работ известно, что экспериментальное голодание вызывает эффект, аналогичный действию температурного стресса, т.е. приводит к снижению ФА и агрегации гемоцитов, а также повышению числа мертвых клеток и АФК (Hegaret et al., 2004). Показано, что у устриц *C. virginica* различные диеты по-разному модифицируют такие иммунологические показатели как концентрация клеток в гемолимфе, доля гранулоцитов, ФА и продукция АФК (Delaporte et al., 2003, 2007; Hegaret et al., 2004). Кроме того, было установлено, что у некоторых видов моллюсков ограничения в питании благоприятствуют развитию опухолей (Carballal et al., 2015).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

2.1.1 Объект исследования

M. kurilensis (Bernard, 1983) – модиолус курильский или длиннощетинистый, до недавнего времени (Liu et al., 2014) считавшийся *M. modiolus* (Linnaeus, 1758). Двустворчатый моллюск принадлежит отряду Mytilida, семейству Mytilidae, роду *Modiolus*, является тихоокеанским приазиатским субтропическо-бореальным и сублиторальным видом, наиболее широко распространенным от южной части Охотского моря до Японского моря. В бухтах Японского моря встречается в основном на илистых и песчано-алевритовых отложениях, среди которых рассеяны валуны и крупная галька. Глубина обитания обычно не превышает 12-15 м. Модиолусы встречаются друзами или отдельными особями, прикрепляясь к субстрату с помощью многочисленных нитей биссуса.

Раковина обычно бобовидная темно-коричневая с тремя макушками, сдвинутыми к переднему более узкому краю. Нижний край раковины более или менее ровный, передний немного выступает вперед макушки, а верхний образует заметное расширение. Килевой перегиб округлый и выражен очень слабо. Наружная поверхность покрыта коричневым периостракумом, который в центральной и задней части несет длинные щетинистые выросты (у старых моллюсков эта щетина может отсутствовать). Изнутри раковина равномерно перламутрово-лиловатая или с фиолетовыми пятнами. Мягкие ткани в среднем составляют 21 % от общей массы, а раковина 63 %. Длина раковины особей возрастом более 40 лет может достигать 140-150 мм. Половозрелость наступает на четвертом году жизни, нерест наступает в середине лета-начале осени при температуре воды 16-19 °С.

2.1.2 Сбор материала

В качестве подопытных животных в работе использовали половозрелых особей *M. kurilensis* 4-5 лет, длина раковины которых варьировала от 75 до 95 мм (за исключением исследования иммунитета моллюсков разных возрастных групп). Моллюсков вылавливали в конце мая и начале июня, в конце сентября и начале октября (Радовец, Христофорова, 2008; Yurchenko, Vaschenko, 2010; Vaschenko et al., 2013). Манипуляции с животными проводили в день их вылова, за исключением моделируемых экспериментов (в данном случае животных оставляли для адаптации на одну неделю в аэрируемых аквариумах с непрерывным проточным водоснабжением при естественном температурном режиме).

Для установления нормальных границ вариативности показателей клеточного иммунитета животных вылавливали из условно фоновых акваторий бухты Троицы, залива Восток и бухты Киевка Японского моря.

Исследования годовой вариативности иммунных параметров гемолимфы проводили на животных, собранных в заливе Восток. Поскольку достоверные различия исследуемых параметров в межгодовой динамике отсутствовали и варьировали в пределах средних значений показателей из других условно фоновых акваторий (бухта Троицы и бухта Киевка), то в качестве референсной группы была использована выборка именно из залива Восток, особи, которой характеризовались метастабильными значениями параметров клеточного иммунитета, являющимися репрезентативными для гемоцитов модиолусов из условно фоновых акваторий.

Анализ сезонной вариативности морфофункциональных параметров гемолимфы в естественно изменяющихся физико-химических условиях среды проводили на животных, собранных в течение года (примерно каждые 45-50 сут) из залива Восток. Колебания гидрологических параметров данной акватории в течение года, любезно предоставленных Л.Д. Куличковой (ст. инженер Лаборатории динамики морских экосистем ННЦМБ им. А.В. Жирмунского ДВО РАН), представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Гидрологические данные залива Восток

Время сбора материала	температура, °С	соленость, ‰	кислород, мл/л
3-8 мая	5,0	32,6	7,5
17-22 июня	11,3	34,2	6,5
10-15 сентября	19,3	32,4	5,1
20-25 ноября	3,6	31,9	7,2
6-11 января	-1,5	31,9	7,5
20-25 марта	-0,9	28,5	7,9
28 апреля-3 мая	4,2	32,9	7,5

Оценку физиологического состояния животных, подверженных хроническому стрессу, проводили на модиолусах, выловленных из импактной акваторий – Спортивной гавани.

Для исследования динамики клеточной реакции в ответ на проникновение бактериальных агентов или травму осуществляли в моделируемых лабораторных условиях на животных из залива Восток.

Изучение физиологического состояния моллюсков, зараженных паразитической зеленой микроводорослью, проводили у животных, выловленных на малой глубине (1,5-2 м) в бухточке Подсобной бухты Средняя залива Восток.

2.1.3 Районы сбора материала

Животных собирали легководолазным методом с глубины 2-5 м в бухте Средняя и в районе м. Пашинникова залива Восток, в районе о-ва Второй бухты Киевка, бухте Рисовая бухты Троицы и Спортивной гавани Амурского залива Японского моря. Районы сбора материала обусловлены различиями в геохимических, гидрологических и санитарно-эпидемиологических условиях воды и грунта (Зеунко, Рачков, 2003; Наумов, 2007).

Залив Восток располагается в юго-восточной части залива Петра Великого и вдается в берег между мысами Пещурова и Подосенова. Максимальная глубина составляет 31 м, а средняя – 13 м. Долгое время залив считался эталоном природы залива Петра Великого и рассматривался как модельная акватория благодаря своей чистоте и огромному биологическому разнообразию. В целях охраны природного комплекса, сохранения его естественного многообразия животных, растений и рационального использования природных ресурсов был образован морской заказник «Залив Восток» (Долганов, 2016). Однако в настоящее время залив Восток имеет участки локального загрязнения с превышением предельно допустимых концентраций (ПДК) и считается условно фоновым районом, т.к. на его побережье отсутствуют крупные населенные пункты и промышленные предприятия. В воды залива поступает около 0,1 % общего объема сточных вод, сбрасываемых в залив Петра Великого (Галышева, 2003; Журавель и др., 2012). Загрязнение энтеробактериями и гетеротрофными микроорганизмами имеет сезонный характер, связанный с рекреационным периодом с июля по август. Однако в течение года наблюдается загрязнение вод залива фенолами и нефтяными углеводородами, превышающими ПДК, что связано с притоком вод из более загрязнённых соседних заливов или эмиссией нефтяных и органических поллютантов (пестициды, фенолы растительного происхождения, фекальные стиролы) в самой акватории. Количество фосфатов в верхнем слое в среднем составляет 21 мг/л (максимум равный 136 мкг/л был зарегистрирован в июле 2003 г.), тогда как в придонных водах – превышает 100 мкг/л (Галышева, 2007). Остальные показатели, такие как концентрация кислорода, фосфора и тяжелых металлов находится в пределах нормы (Журавель и др., 2012; Тищинко и др., 2019; Khristoforova et al., 2002; Kozhenkova, 2009).

Бухта Киевка находится в южной части побережья Приморья за пределами залива Петра Великого, имеет широтную протяженность и открыта с южной стороны. Западной границей бухты является мыс Суцкого, а восточной – мыс Островной. Бухта является мелководной: глубина открытой части около 20 м, по направлению к вершине до изобаты – 10 м. Грунт в основном мягкий и варьирует от псаммитов до пелитовых алевролитов. Степень заиленности повышена на участках, прилегающих к устью р. Киевка, которая впадает в бухту двумя рукавами. Данная акватория относится к типу бухт со свободным водообменом

и существенным материковым стоком, что значительно влияет на характеристики поверхностного слоя и препятствует конвективному перемешиванию (за исключением зимнего периода, во время которого сток минимален). Несмотря на то, что для данного района характерно высокое содержание растворенного кислорода (особенно в мае – 12-14 мг/л) и низкие концентрации соединений фосфора, они не выходят за пределы ПДК (Зуенко, Рачков, 2015). Бухта находится на значительном удалении от крупных населенных пунктов и располагается вблизи Лазовского заповедника, поэтому она почти не подвержена антропогенному прессу (Галышева и др., 2008). Периодически выявляемые в водах органические вещества приходятся на рекреационный период и носят исключительно сезонный характер. В этот же период наблюдается повышенное содержание гетеротрофов, кишечной палочки и нефтеокисляющих микроорганизмов (Boychenko, 2017).

Бухта Троицы относится к заливу Посъет (южная часть залива Петра Великого) и находится между мысом Слычкова и мысом Стенина. Устойчивые северные ветры зимой и южные и юго-восточные летом обуславливают возникновение сгонно-нагонных течений с подъемом уровня воды до 20-30 см и дрейфовых течений. Значительное выпадение осадков, особенно летом, приводит к существенному разливу рек, увеличению стоковых течений и опреснению приустьевых районов бухты. В связи с тем, что бухта полузакрытая, то она сильно изолирована от открытых вод и уязвима к загрязнению. На побережье бухты Троицы находятся посёлки Зарубино и Андреевка, морской и нефтеналивной порт Зарубино, обширная рекреационная зона, Морская экспериментальная станция Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (МЭС ДВО РАН) (Супранович, Якунин, 1976; Белоус, Дроздов, 2015). Наибольший рекреационный пресс бухта испытывает с июля по октябрь, и содержание поллютантов, геохимические и гидрологические условия в воде и грунтах в этот период в зависимости от удаленности акваторий в составе бухты Троицы от открытых вод, сильно варьируют и часто не соответствуют ПДК.

Спортивная гавань Амурского залива располагается в северо-западной части залива Петра Великого в селитебной части г. Владивостока (Наумов, 2007; Нигматулина и др., 2007; Yurchenko, Vaschenko, 2010; Ващенко и др., 2010). По экологическим оценкам данная акватория не отвечает санитарно-эпидемиологическим нормам и естественным показателям среды по фенолам, нефтепродуктам, численности патогенных бактерий (в частности энтерококков) и нефтеокисляющих микроорганизмов (Бойченко и др., 2009), концентрациям кислорода, фосфора, тяжелых металлов, а также ряду других параметров, которые существенно варьируют из года в год (Nemirovskaya, 2007; Yurchenko, Vaschenko, 2010; Vaschenko et al., 2012; Tishchenko et al., 2014; Aksentov, 2015; Kobzar, Khristoforova, 2015;

Tsoy et al., 2015; Vekhova et al., 2015). Степень загрязнения донных отложений Амурского залива тяжелыми металлами относят к очень высокой (Журавель, Подгурская, 2014). Наибольший объем загрязняющих веществ и стоков вносят предприятия Владивостокского ТЭЦ-2, водоканализационного хозяйства города, а также рыбоперерабатывающие компании и порты.

2.2 Методы

2.2.1 Взятие и подготовка препаратов гемолимфы

Для изучения морфофункциональных особенностей гемоцитов у моллюсков шприцом из синуса заднего мускула-аддуктора брали порцию гемолимфы. Аликвоту взятой гемолимфы сразу фиксировали 8 % раствором параформальдегида (ПФА), приготовленном на искусственной солевой среде (ИСС) с осмотичностью 1090 мОсм, содержащей 460 мМ NaCl, 9,4 мМ KCl, 48,3 мМ MgCl₂·6 H₂O, 6 мМ NaHCO₃, 10,8 мМ CaCl₂·2H₂O и 10 мМ N-(2-гидроксиэтил)-пиперазин-N'-2-этансульфонокислота (HEPES), для общего и дифференциального подсчета числа гемоцитов на проточном цитофлуориметре или гемоцитометре Горяева. Оставшуюся часть гемолимфы центрифугировали в течение 12 мин при 800 g в рефрижераторной центрифуге Eppendorf 5810R (Германия) при 17 °С. После отбора надосадочной жидкости к гемоцитам добавляли физиологическую бескальциевую солевую среду (ФБСС), содержащую 436 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 22 мМ Na₂HPO₄·7H₂O, 16 мМ глюкозу, 12 мМ HEPES, и 0,45 М этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), ресуспендировали и центрифугировали при тех же условиях. После отмывки в пробирки с гемоцитами вносили ИСС и ресуспендировали. Для получения временной клеточной культуры 15 мкл суспензии клеток в ИСС наносили на предметные стекла (для реакции *in vitro* фагоцитоза гемоциты дополнительно вносили в лунки 96-луночных плоскодонных черных планшетов), и инкубировали во влажной камере в течение 20 мин для адгезии клеток к субстрату.

2.2.2 Морфофункциональный анализ клеточных факторов гемолимфы

2.2.2.1 Общий и дифференциальный подсчёт числа гемоцитов

Для дифференциального подсчета числа циркулирующих гемоцитов 500 мкл суспензии клеток отмывали ИСС от ПФА центрифугированием в течение 12 мин при 800 g и 17 °С. Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре BD Accuri C6 (Becton Dickinson, США) с помощью программного обеспечения CellQuest. От каждого образца было проанализировано не менее 10 000 событий (отдельных сигналов от клеток). Для построения двухпараметрических гистограмм распределения клеток по размерам и степени зернистости

анализировали сигналы прямого – FSC (Forward Scattering Channel) и бокового светорассеяния – SSC (Side Scattering Channel). Дополнительно общий подсчет числа гемоцитов производили в гемоцитометре Горяева.

2.2.2.2 Фракционирование клеток гемолимфы

Для анализа клеточного состава гемолимфы у моллюсков из синуса заднего мускула-замыкателя шприцом с иглой 22G брали 4 мл гемолимфы и фракционировали методом изопикнического центрифугирования в ступенчатом градиенте плотности разделяющей среды Percoll (Sigma-Aldrich, США). Для этого Percoll разводили ФБСС и ЭДТА до 10, 20, 30 и 40 %, после чего в пробирке из этих растворов формировали градиент, путем их последовательного наслоения, начиная от наибольшей концентрации. В каждую пробирку с охлажденным градиентом поверх разделяющей среды наслаивали цельную гемолимфу и центрифугировали в течение 12 мин при 800 g и 17 °С. Клеточные фракции гемоцитов снимали с интерфаз градиентов в отдельные пробирки шприцом с иглой (0-10, 10-20, 20-30 и 30-40 %) и трижды отмывали охлажденным раствором ФБСС, путем ресуспендирования с последующим центрифугированием при тех же условиях. Аликвоту от полученных суспензий использовали для оценки жизнеспособности клеток, окрашивая их 0,01 % раствором трипанового синего, приготовленного на ИСС, а также для общего и дифференциального подсчета числа гемоцитов. Оставшуюся часть суспензии использовали для морфофункционального анализа.

2.2.2.3 Ультраструктурный анализ

Для исследования ультраструктуры клеток, суспензии гемоцитов, полученные в результате фракционирования гемолимфы в Percoll, фиксировали в течение часа 2,5 % раствором глутарового альдегида, приготовленным на ИСС. После этого образцы трижды отмывали ИСС, заключали в 1 % агарозу, приготовленной на ИСС, постфиксировали в течение часа 1 % раствором тетраоксида осмия в темноте при 4 °С, отмывали трижды ИСС, контрастировали водным раствором 1 % уранил ацетата (УА) в течение часа, трижды отмывали ИСС и дегидратировали по 10 мин в спиртах возрастающей концентрации (с 10 до 96 %). Затем препараты помещали в серию растворов, содержащих 96 % спирт и ацетон в соотношении 2:1, 1:1, 1:2 соответственно, и дважды отмывали ацетоном. В это время готовили смесь смол Epon 812 и Araldite M (EMS, США) с добавлением затвердителя DDSA в соотношении 1,67:1:3,67 соответственно. Образцы пропитывали в течение 1 ч 30 мин в смеси смол с добавлением ацетона в соотношении 2:1, 1:1, 1:2 (и с добавлением акселератора DMP-30 в расчете 15 мкл/мл); в последнем растворе препараты оставляли на ночь при

комнатной температуре. На следующий день после новой пропитки в смеси смол без акселератора в течение 2 ч, образцы заключали в смесь смол с добавлением акселератора и оставляли для полимеризации на трое суток в термостате при 60 °С.

Полутонкие срезы (0,75 мкм) изготавливали на ротационном микротоме HM-360 (Thermo Fisher Scientific MICROM International GmbH, Германия) и окрашивали метиленовым синим или метиленовым синим – аzur II с добавлением основного фуксина (Humphrey, Pittman, 1974). Полученные препараты анализировали в проходящем свете на микроскопе Axio A1 (Carl Zeiss, Германия). Ультратонкие срезы (0,6-0,7 мкм), изготовленные на микротоме Reichert Ultracut S (Leica, Германия), монтировали на медные бленды с подложкой из бутвара и дополнительно контрастировали 1 % УА. Полученные препараты анализировали на трансмиссионном электронном микроскопе Zeiss LIBRA 120 (Carl Zeiss, Германия).

2.2.2.4 Цитохимический анализ

Морфологический и цитохимический анализ клеточного состава гемолимфы проводили на препаратах, фиксированных 4 % раствором ПФА, и окрашенных различными красителями.

Для общего цитоморфологического анализа гемоциты окрашивали эозин-метиленовым синим по Май-Грюнвальду в течение 2 мин. Ацидофильные образования в клетках окрашивались в различные оттенки красного цвета, базофильные – от пурпурного до синего цвета.

Для изучения химического состава клеточных структур гемоциты окрашивали специфическими гистохимическими окрасками. Для выявления белков (кислых и основных) препараты окрашивали прочным зелёным при pH 2,2, а для выявления только основных белков – прочным зелёным при pH 8,5 по стандартной методике (Роскин, Левинсон, 1957). Цитоплазма клеток, содержащая соответствующие белковые группы, приобретала разной интенсивности зелёный цвет.

Для выявления всех классов липидов препараты окрашивали суданом чёрным В по стандартной методике (Роскин, Левинсон, 1957), в результате чего они приобретали черный цвет различной степени насыщенности.

Для идентификации полисахаридов гемоциты окрашивали кармином по Бесту (гликоген окрашивался в красный цвет), а также комбинированным методом выявления полисахаридов по Моури, согласно стандартной методике (Роскин, Левинсон, 1957). При этом мукополисахариды окрашивались в голубой, синий или сине-зеленый цвет, гликоген и

нейтральные полисахариды – в розово-красные цвета, смесь кислых и нейтральных полисахаридов – в пурпурно-фиолетовый цвет.

Препараты заключали в среду Biomount (Bio-Optica, Италия) и анализировали в проходящем свете с помощью микроскопа Axio A1 при увеличении объектива 100х. Дифференциальный подсчет клеток проводили в нескольких полях зрения таким образом, чтобы общее количество подсчитанных клеток было не менее 100. Опираясь на морфометрические характеристики (диаметр, форма клетки, наличие или отсутствие исследуемых компонентов в цитоплазме), интенсивность и цвет окраски клеток и ядер выделяли различные морфотипы гемоцитов и определяли их процентное соотношение в гемолимфе.

Для оценки интенсивности окраски применяли полуколичественный метод, используя принцип Астальди (Astaldi, Verga, 1957). В зависимости от степени окраски клетки делили на 4 группы: с отрицательной реакцией (-), слабopоложительной (+), положительной (++) и сильно положительной (+++). Далее подсчитанные 100 клеток дифференцировали по указанным группам и вычисляли средний цитохимический коэффициент (СЦК):

$$\text{СЦК} = (A \times 0 + B \times 1 + C \times 2 + D \times 3), \quad (1)$$

где А – количество клеток с (-) реакцией;

В – количество клеток с (+) реакцией;

С – количество клеток с (++) реакцией;

Д – количество клеток с (+++) реакцией.

Степень окраски выражали в виде шкалы: 0 – нет окраски, 0-100 – слабая, 101-200 – умеренная, 201-300 – сильная.

2.2.2.5 Флуоресцентное окрашивание микрофиламентов

Для изучения актиновых микрофиламентов гемоцитов их окрашивали флуоресцентным красителем родамин-фаллоидин (Thermo Fisher Scientific, США), специфически связывающимся с полимеризованной формой актина. Для повышения проницаемости мембраны фиксированные в 4 % растворе ПФА клетки обрабатывали 0,1 % Triton X-100 в течение 3-5 мин при комнатной температуре. Затем клетки трижды отмывали ИСС и окрашивали рабочим раствором красителя (согласно протоколу производителя) в течение 30 мин при 37 °С в темноте. Далее препараты окрашивали флуоресцентным красителем DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride; Invitrogen, США) в течение 5 мин для визуализации ядер, отмывали трижды ИСС, заключали в Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich, США) и фотографировали с помощью конфокального лазерного микроскопа Zeiss LSM 700 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении объектива 60 х.

2.2.2.6 Оценка содержания лизосом и их ферментативной активности

Для выявления лизосом гемоциты инкубировали с 0,0005 % раствором акридинового оранжевого (АО) (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин при комнатной температуре, трижды отмывали ИСС, заключали в Mowiol 4-88 и фотографировали с помощью конфокального лазерного микроскопа Zeiss LSM 700 при увеличении объектива 60 х. При возбуждении светом с длиной волны возбуждающего светофильтра 488 нм интактные лизосомы с высоким содержанием АО наблюдали в красной области, а при снижении его – в зеленой.

Для определения ферментативной активности использовали три типа образцов: нативную гемолимфу, плазму и фракции гемоцитов, отмывтые ФБСС. Для этого суспензии гемоцитов или гемолимфы доводили до конечной концентрации 10^7 кл/мл, клетки разрушали замораживанием-оттаиванием и центрифугировали при 5500 г в течение 10 мин при 4 °С (Xing et al., 2008). Полученные супернатанты лизатов использовали для определения активности и содержания КФ, ЩФ и МПО с помощью специфических реакций.

Для оценки МПО активности 10 мкл образца (плазма, лизат гемолимфы или лизаты фракций гемоцитов) добавляли к 2,5 мл раствора, содержащего 0,88 мМ 3,3',5,5'-тетраметил бензидин, 5 мМ раствор H_2O_2 , 50 мМ ацетатный буфер (рН 4,5). Далее полученную смесь инкубировали при 26 °С в течение 5 мин. Реакцию останавливали добавлением к образцам по 50 мкл 2М H_2SO_4 . Светопоглощение измеряли в кварцевой микрокювете кат. № 046-25302-11 (Shimadzu, Япония) с длиной оптического пути 10 мм при 655 нм относительно рабочего буфера с помощью спектрофотометра Shimadzu BioSpec-mini (Shimadzu, Япония). Активность фермента выражали в усл. ед. как количество фермента, разлагающего при 37 °С 1 мкмоль H_2O_2 /мг белка за 1 мин (Xing et al., 2008).

Для выявления активности КФ 100 мкл образца инкубировали в течение 30 мин при 37 °С с 2 мл раствором р-нитрофенилфосфат (рНФФ), приготовленном на цитратном буфере (рН 5). Для оценки активности ЩФ 100 мкл образца инкубировали при тех же условиях в рНФФ, приготовленном на глицин-NaOH буфере (рН 9). Реакцию останавливали добавлением к образцам по 2,9 мл 0,1 М NaOH. Светопоглощение измеряли спектрофотометрически при 405 нм относительно рабочего буфера. Активность ферментов выражали в усл.ед. как количество фермента, разлагающего при 37 °С 1 мг рНФФ/мг белка за 30 мин (Xing et al., 2008).

2.2.2.7 Оценка активности кислородзависимой противоинойфекционной системы

Для исследования активности кислородзависимой противоинойфекционной системы гемоцитов использовали три метода: восстановление нитросинего тетразолия-п (хлорида) до

диформаза (НСТ-тест), окраска 3,3-диаминобензидинтетрахлоридом (ДАБ) и флуоресцентное окрашивание с помощью CellROX.

Для выявления супероксид-анионов препараты с фракциями клеток, адгезированных на стекле, инкубировали в присутствии 5 мкМ раствора CellROX Orange Reagent (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 30 мин. Для рутинного анализа препараты инкубировали с 0,004 % раствором НСТ (Sigma-Aldrich, США), приготовленном на ИСС, в течение 30 мин при 17 °С. Пероксидазную активность выявляли методом окраски ДАБ (Sigma-Aldrich, США), инкубируя препараты с временной клеточной культурой в течение 12 мин с 0,05 % раствором ДАБ, приготовленном на ИСС с добавлением 3 % пероксида водорода (из расчета 1 мкл на 250 мкл раствора ДАБ). По завершении инкубации все препараты трижды отмывали ИСС, фиксировали в течение 1 ч 4 % раствором ПФА (ядра клеток, окрашенных CellROX, дополнительно маркировали DAPI), заключали в Mowiol и фотографировали с помощью конфокального лазерного микроскопа Zeiss LSM 700 при увеличении объектива 60x и 100x. В цитоплазме клеток при окислении АФК CellROX давал ярко-оранжевую флуоресценцию с максимумами возбуждения / поглощения 545/565 нм, НСТ выявлялся в виде темно-синих гранул диформаза, пероксидазосомы с ДАБ приобретали коричневый цвет. Оценку пероксидазной активности и содержания АФК проводили, подсчитывая долю окрашенных клеток от общего числа гемоцитов (200 клеток).

2.2.2.8 Оценка фагоцитарной активности

В качестве биотических частиц для проведения *in vitro* реакции фагоцитоза использовали штамм *Staphylococcus* sp. (№ 636), ранее выделенный из морских гидробионтов и хранящийся в коллекции бактериальных культур ННЦМБ ДВО РАН при -85 °С, и любезно предоставленный старшим научным сотрудником лаборатории морской биоты И.А. Беленовой. Бактерий, термически инактивированных в течение 1 ч при 72 °С и маркированных 0,1 % раствором флуоресцеина-5-изотиоцианата (изомер I ФИТЦ (FITC), MP Biomedicals, США), приготовленном на 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере (рН 9,3) добавляли к гемоцитам (из расчета 15-20 клеток на один гемоцит). Реакцию фагоцитоза останавливали через 1 ч 20 мин с момента добавления бактерий к клеткам фиксацией в течение 1 ч 4 % раствором ПФА. Препараты заключали в Mowiol и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении объектива 100 х. Для лучшей визуализации границ клеток получали также фотографии, сделанные с помощью техники фазового контраста.

Для оценки фагоцитарного статуса гемоцитов подсчитывали количество бактерий в 200 клетках гемолимфы одного животного. Для вычисления фагоцитарного индекса (ФИ)

рассчитывали среднее число бактерий, поглощенных одним фагоцитом. Фагоцитарную активность определяли как долю фагоцитирующих гемоцитов среди общего числа проанализированных гемоцитов (200 клеток).

Для ускорения процесса анализа фагоцитарную активность оценивали также в черных планшетах с помощью планшетного флуориметра DTX 880 (Bekman Coulter, США) с возбуждающим светофильтром 485 нм и поглощающим 535 нм (результаты выражали в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ)). Для этого перед фиксацией образцов ПФА проводили тушение флуоресценции неинтернализованных бактерий, инкубируя препараты с 0,1 % раствором трипанового синего, приготовленном на ИСС, в течение 12 мин. Корреляционный анализ визуальной и флуориметрической оценки ФА гемоцитов показал, что интенсивность фагоцитоза, измеренная двумя способами, сопоставима и воспроизводит одинаковый результат (коэффициент корреляции между двумя видами измерений составил 0,93).

2.2.2.9 Оценка пролиферативной активности

Для выявления пролиферативной активности гемоцитов использовали метод включения 5-бромо-2-дезоксидуридина (БДУ) в ДНК. Для этой цели за 3 ч до взятия образцов гемолимфы молиолусам в задний мускул-аддуктор с помощью шприца однократно вводили 200 мкл 10 мкМ раствора БДУ (MP Biomedicals, США), приготовленном на ИСС. Взятие гемолимфы и подготовку препаратов осуществляли по протоколу, описанному выше в п. 2.2.1. Для денатурации ДНК и пермеабиллизации клеточных мембран фиксированные гемоциты обрабатывали 2 Н раствором HCl, содержащим 0,5 % Тритон X-100 в течение 1 ч при 37 °С. После гидролиза препараты обрабатывали 0,1 М боратным буфером (pH 8,5), а затем дважды по 15 мин отмывали 0,05 М раствором трис-буфера (pH 7,4), содержащим детергент Tween-20 (ТБСТ). Для блокирования неспецифического связывания антител препараты инкубировали 30 мин при 37 °С в 3 % растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА), приготовленном на ТБСТ. Инкубацию с первичными моноклональными мышинными антителами к БДУ (Invitrogen, США), приготовленными на 1 % БСА в концентрации 1:100, проводили при 4 °С в течение 12 ч. Препараты трижды отмывали буфером от несвязанных антител, окрашивали вторичными антителами в разведении 1:400, конъюгированными с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США), окрашивали иодидистым пропидием (PI) (50 мкг/мл), заключали и анализировали с помощью конфокального микроскопа.

2.2.3 Гистопатологический анализ

Для оценки гистопатологического статуса моллюсков у 80 половозрелых особей из залива Восток и Спортивной гавани брали образцы пищеварительной железы и почек, фиксировали в течение 24 ч при 4 °С в смеси Буэна (смесь насыщенного водного раствора пикриновой кислоты, формалина и ледяной уксусной кислоты в соотношении 15:5:1) и заливали в парафин по стандартной методике (Роскин, Левинсон, 1957). Далее с помощью ротационного микротомы НМ-360 (MICROM International GmbH, Германия) изготавливали серийные парафиновые срезы толщиной 3-4 мкм, депарафинировали их по стандартной методике (Роскин, Левинсон, 1957) и окрашивали гематоксилин-эозином Каррарчи по стандартной методике с некоторыми модификациями. Для оценки степени фиброза срезы также окрашивали 0,1 % раствором сириуса красного ((Direct Red 80) Sigma-Aldrich, США) в насыщенной пикриновой кислоте в течение 1 ч с последующей отмывкой в двух порциях 0,5 % раствора уксусной кислоты. Окрашенные срезы осветляли в двух порциях ксилола по 5 мин в каждой и заключали в среду Biomount. Препараты анализировали и фотографировали во флуоресцентном микроскопе Axio Imager A1 при увеличении объектива 20-100 х.

2.2.3.1 Количественная оценка гистологических параметров

Помимо качественного анализа наличия патологических отклонений в органах для определения степени их выраженности проводили количественный учет 13 параметров почек и 9 параметров ПВЖ, по нашим наблюдениям и литературным данным оказывающих наибольшее влияние на физиологическое состояние моллюсков, и наиболее выраженно реагирующих на различные факторы среды (Fowler, Gould, 1988; Regoli et al., 1992; Bernet et al., 1999; Varmo et al., 2013; Moëzzi et al., 2013). Среди таких параметров был кариопикноз, гипервакуолизация, некроз, инфильтрация интерстициального пространства гемоцитами, фиброз и паразитарные инвазии пищеварительной железы и почек, толщина базальной мембраны почечных трубочек, гиперплазия и форма нефроцитов, количество, размер и плотность конкреций в канальцах почек, соотношение типов пищеварительных трубочек, наличие и размер гранулоцитом и фибром пищеварительной железы.

Для некоторых из параметров сотрудником кафедры клеточной биологии и генетики Школы естественных наук ДВФУ А.В. Гринченко были выведены формулы (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8).

Коэффициент отклонения толщины базальной мембраны вычисляли по формуле:

$$BM = \frac{\sqrt{\left(\frac{th_{min}}{m_{min}} - 1\right)^2} + \sqrt{\left(\frac{th_{max}}{m_{max}} - 1\right)^2} + \sqrt{\left(\frac{th_{min} - th_{max}}{m} - 1\right)^2}}{3}, \quad (2)$$

где BM – коэффициент отклонения толщины базальной мембраны;

th_{min} – минимальная толщина базальной мембраны;

th_{max} – максимальная толщина базальной мембраны;

m_{min} – средняя арифметическая минимальных размеров базальной мембраны;

m_{max} – средняя арифметическая максимальных размеров базальной мембраны;

m – средняя арифметическая $th_{max} - th_{min}$.

Коэффициент отклонения конкреций по их числу и размерам рассчитывали по формулам:

$$C_n = \sqrt{\left(\frac{n}{m_n} - 1\right)^2}, \quad (3)$$

$$C_{min} = \sqrt{C_n^2 + \left(\frac{s}{m_s} - 1\right)^2 + \left(\frac{a}{m_a} - 1\right)^2}, \quad (4)$$

$$C_{max} = \sqrt{C_n^2 + \left(\frac{s}{m_s} - 1\right)^2 + \left(\frac{a}{m_a} - 1\right)^2}, \quad (5)$$

$$C_m = \sqrt{C_n^2 + \left(\frac{s}{m_s} - 1\right)^2 + \left(\frac{a}{m_a} - 1\right)^2}, \quad (6)$$

$$CD = \frac{\Sigma(C_{min}, C_{max}, C_m)}{3}, \quad (7)$$

где C_n – коэффициент отклонения для числа конкреций в трубочке (диаметр 200 мкм);

n – число конкреций в трубочке;

m_n – среднее арифметическое числа конкреций в трубочке;

C_{min} – коэффициент отклонения для конкреций минимальных размеров;

C_{max} – коэффициент отклонения для конкреций максимальных размеров;

C_m – коэффициент отклонения для конкреций среднего размера;

s – размер конкреций число конкреций в трубочке;

m_s – среднее арифметическое размера конкреций;

a – площадь, занимаемая конкрециями;

m_a – среднее арифметическое площади конкреций;

CD – коэффициент общего отклонения всех типов размеров конкреций.

Для определения преобладающего типа пищеварительных трубочек у каждой особи подсчитывали 100 случайно выбранных трубочек. Коэффициент соотношения типов трубочек ПВЖ (R) рассчитывали по формуле:

$$R = \left(\frac{T_1}{m_1} - 1\right)^2 + \left(\frac{T_2}{m_2} - 1\right)^2 + \left(\frac{T_{3a}}{m_{3a}} - 1\right)^2 + \left(\frac{T_{3б}}{m_{3б}} - 1\right)^2 + \left(\frac{T_{3в}}{m_{3в}} - 1\right)^2 + \left(\frac{T_4}{m_4} - 1\right)^2, \quad (8)$$

где T_1 – число трубочек I типа;

T_2 – число трубочек II типа;

T_{3a} – число трубочек IIIa типа;

$T_{3б}$ – число трубочек IIIб типа;

$T_{3в}$ – число трубочек IIIв типа;

T_4 – число трубочек IV типа;

m_1 – число трубочек I типа

m_2 – число трубочек II типа;

m_{3a} – число трубочек IIIa типа;

$m_{3б}$ – число трубочек IIIб типа;

$m_{3в}$ – число трубочек IIIв типа;

m_4 – число трубочек IV типа.

Форму нефроцитов оценивали по формуле:

$$A = 4\pi * \left(\frac{S}{P^2}\right), \quad (9)$$

где A – округлость нефроцита;

S – площадь нефроцита;

P – периметр нефроцита.

Оценку степени выраженности кариопикноза и гипервакуолизации рассчитывали путем подсчета числа аномальных клеток среди 200 клеток.

Величину гиперплазии оценивали по количеству аномальных клеток на 30 канальцев.

Структуру (плотность) конкреций измеряли с помощью функции анализа изображения в Adobe Photoshop CC 2015.

Степень развития инвазии подсчитывали, анализируя количество паразитов на площади среза.

Выраженность некроза, гранулоцитомы и фибромы рассчитывали, измеряя площадь обнаруженной патологии на площадь среза.

Интенсивность гемоцитарной инфильтрации рассчитывали путем подсчета числа гемоцитов на площадь интерстициального пространства всего среза.

Степень фиброза анализировали в поляризованном свете на препаратах, окрашенных сириусом красным. Нормальные ткани, как правило, содержали тонкие пучки коллагена с желто-зеленым двойным лучепреломлением, в то время как фиброз приводил к образованию более толстых параллельных пучков коллагена с оранжево-красным двойным лучепреломлением. Далее степень выраженности фиброза рассчитывали, измеряя площадь выявленной аномалии на площадь интерстициального пространства.

2.2.3.2 Анализ гистопатологического статуса

На основе индекса, предложенного Бернетом и коллегами (1999) для рыб, и модифицированного впоследствии Коста и коллегами (2013), оценивали индивидуальный индекс гистопатологического состояния моллюсков. Этот индекс был оценен в соответствии с концепцией о биологическом значении каждого обнаруженного изменения (т.е., его значимости) согласно работе Коста и коллег (2013) и степени его распространения (т.е., его выраженности) (Таблица 2). Значение параметра значимости (w) варьировало от 1 (минимальная тяжесть) до 3 (максимальная тяжесть), а значение выраженности (a) – от 0 (отсутствие патологии или характерная черта данного органа) до 6 (обширное изменение). Выраженность аномалий рассчитывали согласно формулам в п. 2.2.3.2, а полученным значениям в зависимости от степени их отклонения от средних присваивали ранги от 0 до 6.

Частота встречаемости каждого гистопатологического изменения была рассчитана как доля особей, имеющих данное отклонение, среди всех животных в выборке.

Индекс гистопатологического состояния (ГИ) оценивали в соответствии с формулой, предложенной Коста и коллегами (2013):

$$I_h = \frac{\sum_1^j (w_j * a_{jh})}{m_1^j M_j}, \quad (10)$$

где I_h – гистопатологический индекс состояния для h -ой особи;

w_j – значимость j -го гистопатологического изменения;

a_{jh} – выраженность (тяжесть) для j -го гистопатологического изменения у h -ой особи;

M_j – максимальное значение j -го гистопатологического изменения ($a * w_{\max}$).

Гистопатологический индекс рассчитывали для трех типов реакции: трубочка, интерстициальное пространство и паразитарная инвазия. После этого оценивали гистопатологический индекс для отдельных особей, а затем глобальный гистопатологический индекс (Таблица 2).

Таблица 2 – Гистопатологическая оценка пищеварительной железы и почек *M. kurilensis*; w – значимость каждого обнаруженного изменения

w	Тип реакции	Почки	Пищеварительная железа
1	Трубочка	толщина базальной мембраны форма эпителия гипервакуолизация эпителия	гипервакуолизация эпителия
2		кариопикноз плотность конкреций в трубчатке (d=200 мкм) число конкреций в трубчатке (d=200 мкм) структура конкреций	кариопикноз
3		некроз	некроз
3		гиперплазия	соотношение типов трубочек
2	Интерстициальное пространство	инфильтрация гемоцитами	инфильтрация гемоцитами
2		фиброз	фиброз
3		–	гранулоцитома/фиброма
3	Паразитарная инвазия		

Итоговый коэффициент гистопатологического состояния варьировал от 0 до 1, что позволило сравнивать различные состояния в разных органах каждой особи и сравнивать их между акваториями.

2.2.4 Моделирование инфицирования

Для исключения особей с возможными физиологическими отклонениями до основного эксперимента у выловленных моллюсков проводили первичный скрининг ФА гемоцитов и агглютинирующей активности плазмы и далее в качестве подопытных животных использовали особей, у которых значения этих показателей находились в диапазоне медиана \pm 30 %. Предварительный скрининг привел к гомогенности всех исходных групп, на которые были разделены особи для анализа их иммунного статуса в различных временных точках, увеличил достоверность результатов и позволил с большей уверенностью говорить о типичности выявленных динамик. Отобранных моллюсков делили на экспериментальную (Эксп) и контрольную (Контр) группы, в которых на каждую временную точку приходилось по 16 особей.

В случае моделируемого инфекционного процесса экспериментальным животным шприцом в задний мускул-замыкатель в качестве антигена вводили 500 мкл суспензии термически инактивированных бактерий рода *Staphylococcus*, окрашенных флуоресцентным

красителем Родамин В изотиоцианатом (РИТЦ (RITC), ICN Biomedicals, Inc., США), с конечной концентрацией $30 \cdot 10^6$ КОЕ/мл (из расчета 30-35 бактерий на 1 гемоцит) в ИСС. Контрольным животным вводили стерильную морскую воду (СМВ) того же объема. Непосредственно перед инъекцией производили отбор 500 мкл гемолимфы от каждого животного всех исследуемых групп, который являлся показателем исходного состояния каждой отдельной особи до введения антигена (Эксп 1) или СМВ (Контр 1). После этого животных «Эксп» и «Контр» групп маркировали и помещали в отдельные аквариумы. Через 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 120, 168 или 336 часов после инъекции у экспериментальных (Эксп 2) и контрольных (Контр 2) животных повторно брали по 500 мкл гемолимфы для оценки состояния иммунной системы моллюсков после воздействия. Полученные образцы подготавливали согласно вышеописанным методикам для дальнейшей оценки числа гемоцитов, их фагоцитарной и кислородзависимой бактерицидной активности.

2.2.5 Моделирование острой кровопотери

Отбор животных для эксперимента и их распределение на «Эксп» и «Контр» группы осуществляли по схеме описанной выше (п. 2.2.4). Травмирование, моделируемое массивной потерей гемолимфы (кровопотерей), осуществляли взятием 5 мл гемолимфы из заднего мускула-аддуктора, что составляет в среднем около 25-30 % от всего объема гемолимфы моллюсков. У животных «Контр» группы брали 300 мкл гемолимфы. Таким образом, контролем состояния каждой отдельной особи исследуемых групп до произведенных манипуляций являлись отобранные образцы гемолимфы (у Контр 1 – 300 мкл и у Эксп 1 – 5 мл). После этого животных «Эксп» и «Контр» групп маркировали и помещали в отдельные аквариумы. Через 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72, 120 или 168 ч после травмирования у экспериментальных (Эксп 2) и контрольных (Контр 2) животных повторно брали по 500 мкл гемолимфы для оценки состояния иммунной системы моллюсков после воздействия. Полученные образцы подготавливали согласно вышеописанным методикам для дальнейшей оценки общего и дифференциального числа гемоцитов и их фагоцитарной активности.

2.2.6 Исследование моллюсков, зараженных зелеными микроводорослями

2.2.6.1 Выделение из тканей моллюсков микроводорослей и получение их культуры

Для исследования инвазии эндобиотическими зелеными микроводорослями двустворчатых моллюсков вылавливали из эвтрофицированной бухточки Подсобной бухты Средняя залива Восток и брали у них образцы тканей и органов (жабры, ПВЖ, почки, мантия, задний мускул-замыкатель, гонада, гемолимфа), которые затем заливали в смолу для приготовления полутонких срезов по методике указанной в п. 2.2.2.3.

Микроводоросли выделяли из гемолимфы и фрагментов мантии инфицированных животных. Для этой цели фрагменты тканей механически гомогенизировали с помощью пестика и ступки и дополнительно лизировали в течение 15 мин 0,5 % раствором трипсина (tissue culture grade, 1:250, Difco, Invitrogen, США), приготовленном на ИСС. Полученную суспензию центрифугировали при 800 g 12 мин при 17 °C в градиенте плотности Percoll, приготовленном по методике описанной в п. 2.2.2.2. Клеточные фракции водорослей снимали с интерфаз градиентов, трижды отмывали СМВ путем ресуспендирования с последующим центрифугированием при тех же условиях. Накопительная культура была получена путем инокуляции суспензии выделенных микроводорослей в обогащенную стерильную жидкую культуральную среду f/2 (из расчета 150-200 *10⁶ клеток на 100 мл среды), приготовленной согласно методике Гилларда и Ритера (1962). Культуральные флаконы с водорослями оставляли в месте, не подверженном воздействию прямых лучей света, под лампой 80 мкмоль фотонов м/с и слегка помешивали каждые 2 сут. Интенсивность освещения измеряли, используя Li-Cor квантум дозиметр LI-189 (LI-COR Inc., США) (в пределах 400-700 нм). Рост культуры поддерживался при 20-22 °C при 16/8 часовом фотопериоде. Для построения кривой роста исследования культуры микроводорослей проводили на флуоресцентном микроскопе ежедневно в течение 1 мес путем подсчета клеток в камере Горяева и анализа изменений размера и формы клеток. Оценку состояния культуры также проводили, основываясь на анализе окраски и интенсивности флуоресценции клеток водорослей. Обработку микроводорослей для ультраструктурного анализа проводили по схеме описанной выше в п. 2.2.2.3.

2.2.6.2 Молекулярно-генетический анализ микроводорослей

Для экстракции тотальной ДНК 50 мг осадка водорослей гомогенизировали в пробирке с жидким азотом до получения светло-зеленой пудры и обрабатывали цетилтриметиламониум буфером, согласно методике, описанной Виннепенниксом и коллегами (1993). Полученные образцы ДНК хранили при -20 °C. Качество ДНК определяли с помощью электрофореза в агарозном геле в присутствии красителя бромистого этидия (0,5 мкг/мл) с маркером известной молекулярной массы ДНК бактериофага лямбда и документировали при помощи системы Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, США). Для этого в кармашки геля вносили образцы ДНК, предварительно добавив буфер для электрофореза с 0,1 % бромфеноловым синим, 0,1 % ксиленцианолом, 60 % глицерином и 60 мМ ЭДТА.

Ген 18S рДНК амплифицировали с использованием олигонуклеотидных праймеров 5'-CTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCAT-3' и 5'-TAGGTGGGAGGGTTTAACG AACTT-3' (Sokolnikova et al., 2016). Условия ПЦР включали стадию начальной денатурации при 95 °C в

течение 5 мин, затем 30 циклов, включающих денатурацию при 94 °С в течение 20 с, отжиг – при 55 °С в течение 20 с, синтез – при 72 °С в течение 1 мин и финальный цикл при 72 °С в течение 5 мин. Продукты ПЦР реакции анализировали с помощью 0,8 % агарозного геле-электрофореза, используя ДНК маркер длиной 1 kb DNA Ladder (Sigma-Aldrich, США). Невключенные праймеры и dNTP удаляли из продуктов ПЦР с использованием набора Silica Bead DNA GelExtraction Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Очищенную ДНК секвенировали с помощью Genetic analyser 3500 (Thermo Fisher Scientific, США), использования дополнительные праймеры 2EX-R 5'-TATTGGAGCTGGA ATTACCGCG-3' и 2EX-F2 5'-GGGAGTATGGTCGCAAGGCTGA-3'. Декодированная почти полная последовательность (1728 н.п.) гена 18S рРНК зеленых микроводорослей, заражающих *M. kurilensis*, депонирована в European Nucleotide Archive под номером LN879479.

2.2.6.3 Определение степени инвазии моллюсков

Для определения степени зараженности моллюсков зелеными водорослями производили визуальный осмотр их органов и подсчет клеток микроводорослей в организме животного. Для этого готовили гомогенат из мягких тканей моллюска и обрабатывали его 0,5 % раствором трипсина в течение 10 мин. Далее с помощью флуоресцентного микроскопа производили подсчет числа клеток водорослей в камере Горяева, с применением методики фазового контраста.

Исходя из полученных значений, было выделено 5 степеней инвазии, которые использовали для дальнейшего анализа (Таблица 3).

Таблица 3 – Степень инвазии *M. kurilensis* зелеными микроводорослями *C. parasitica*

Окраска органов и гемолимфы	Степень	Изменения в организме
	0	«здоровые» животные, не имеют видимых и микроскопических признаков поражения органов и тканей паразитической микроводорослью
	1	животные имеют зеленую окраску гемолимфы и содержат до $28 \cdot 10^9$ клеток водорослей во всем теле
	2	животные, у которых помимо гемолимфы зеленую окраску приобретает прямая кишка, и содержание клеток водорослей достигает $29-41 \cdot 10^9$
	3	животные, имеющие помимо зеленой гемолимфы и прямой кишки, также окрашенную в зеленый цвет мантию; при этом число клеток водорослей увеличивается от 41 до $60 \cdot 10^9$
	4	животные, у которых интенсивную зеленую окраску имеют гемолимфа, ткани прямой кишки, мантии, жабр, гонад и заднего мускула-аддуктора; число клеток водорослей в моллюске превышает $60 \cdot 10^9$

2.2.6.4 Заражение моллюсков *C. parasitica* в лабораторных условиях

Для заражения двустворчатых моллюсков получали культуру микроводорослей по методике, описанной выше, исключая этап трипсинизации, поскольку показано, что данная процедура приводит к изменению профиля клеточной стенки микроводорослей (Wood-Charison, 2006), что в свою очередь может повлиять на ее контагиозность. Полученную суспензию микроводорослей в расчете $100-200 \cdot 10^9$ клеток/особь добавляли в 100-литровый

аквариум с 25 особями *M. kurilensis* на 2 недели с аэрируемой, но не проточной морской водой при постоянной температуре, солености и без прямого освещения. Через 3, 24, 72, 168 и 336 ч (на каждую временную точку по 5 особей) у животных брали образцы тканей и органов (гемолимфу, задний мускул-замыкатель, жабра, почки, ПВЖ, гонада, кишечник, мантия, сифон, перикард) и фиксировали в 4 % растворе ПФА в течение 1 ч.

2.2.6.5 Анализ криосрезов тканей зараженных моллюсков

Для определения возможных путей проникновения микроводорослей в моллюсков анализировали криосрезы образцов тканей и органов, зараженных в естественных и лабораторных условиях. Для этого фиксированные в ПФА кусочки помещали на 1 ч в 20 % раствор сахарозы, а затем в среду для замораживания Cryomatrix Gel (Thermo Fisher Scientific, США) и изготавливали из них срезы толщиной 10-15 мкм на криостате HM 560 Cryo-Star (Thermo Fisher Scientific, США). Препараты заключали в Mowiol и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

2.2.6.6 Оценка иммунного и апоптического статуса зараженных моллюсков

Для оценки клеточного иммунитета зараженных моллюсков оценивали общее и дифференциальное число гемоцитов, их жизнеспособность, фагоцитарный статус и содержание и АФК, согласно методикам, описанным в п. 2.2.2. При оценке АФК в гемоцитах, клетки в зависимости от интенсивности окраски подразделяли на три категории, используя принцип Астальди, указанный в п. 2.2.2.4.

Для выявления апоптотических и некротических клеток использовали метод, основанный на двойном флуоресцентном окрашивании клеток Аннексином V-FITC и PI согласно протоколу производителя (Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC и PI, Thermo Fisher Scientific, США). Полученные препараты фотографировали с помощью конфокального микроскопа при увеличении объектива 60 х. В результате окрашивания можно было выявить 4 субпопуляции клеток: живые (AnnexinV-/PI-), первично некротические (AnnexinV-/PI+), апоптотические (AnnexinV+/PI-) и вторично некротические (Annexin V+/PI+). Далее оценивали долю апоптотических клеток (апоптотический индекс, АИ): среди интактных гемоцитов (контроль), среди гемоцитов инкубированных *in vitro* в течение 4 ч с бактериями, среди гемоцитов инкубированных *in vitro* в течение 4 ч с микроводорослями у «здоровых» животных, и среди гемоцитов экспериментально зараженных моллюсков и зараженных в естественных условиях.

2.3 Анализ данных

Статистический анализ был выполнен при помощи пакета программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 6.0. Тест Колмогорова-Смирнова показал, что распределения значений показателей иммунитета и гистопатологических индексов не подчиняются закону нормального распределения ($p < 0,05$) для всех выборок, поэтому анализ был проведен при помощи непараметрической статистики. Для проверки значимости гипотезы об отсутствии или наличии различий всех параметров между исследуемыми выборками был использован критерий Манна-Уитни (непараметрический аналог t-критерия). Все данные в работе представлены как среднее значение \pm доверительный интервал (95 %). Анализ корреляций проводили с использованием коэффициента корреляции Спирмена R ($p < 0,05$).

Для оценки распространенности изменений иммунных параметров было рассчитано среднее линейное отклонение, а значения вне среднего со стандартным отклонением принимались как минимальные и максимальные значения.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе работы были изучены морфофункциональные особенности клеток гемолимфы широко распространенных в Японском море двустворчатых моллюсков *M. kurilensis*. Основываясь на полученных данных, на втором этапе исследования были определены границы вариативности показателей клеточного иммунитета моллюсков в условиях нормы для их дальнейшего использования в качестве инструмента диагностики физиологического состояния данного вида моллюсков. Третий и последующие этапы работы включали комплексную оценку изменения показателей иммунитета в условиях стресса (естественное изменение физико-химических параметров среды, хроническое загрязнение среды поллютантами антропогенного происхождения, наличие внутренних патологий, импульсное воздействие инактивированных бактерий, травмирование и заражение паразитами). Завершающим этапом работ являлась разработка инструмента диагностики здоровья двустворчатых, основанного на интеграции исследуемых параметров и количественной оценке физиологического статуса моллюсков.

3.1 Клеточный состав гемолимфы *M. kurilensis*

Анализ гемолимфы *M. kurilensis* показал, что содержание гемоцитов у животных варьирует в пределах $1,77 \pm 0,16 \cdot 10^6$ кл/мл, и они представлены несколькими клеточными формами, отличающимися морфологией и размерами. Как видно на рисунке 1а, клетки, имеющие ризоподialesные отростки, также обладают высоко приподнятым над поверхностью субстрата телом, тогда как ламеллоподialesные наоборот – хорошо распластываются и занимают значительно большую площадь субстрата, чем ризоподialesные. Также среди гемоцитов встречались и клетки, которые практически не образовывали отростков, а имели вокруг высокоприподнятого тела узкий ободок гиалиновой цитоплазмы.

Проточный цитометрический анализ подтвердил присутствие в гемолимфе моллюсков трех популяций клеток (Рисунок 1б), различающихся по размеру (FSC) и степени гранулированности (SSC): бластоподобные клетки – маленькие клетки с минимальной внутренней зернистостью ($2,65 \pm 0,36$ %), агранулоциты – клетки разных размеров с умеренной зернистостью ($9,36 \pm 0,74$ %) и гранулоциты – высокозернистые клетки различных размеров ($85,79 \pm 0,97$ %). Наиболее вариативной по числу клеток оказалась популяция агранулоцитов: в некоторых случаях концентрация этих клеток в гемолимфе животных не превышала 4 % либо достигала 17 %. Подобную картину наблюдали и относительно гемобластов: у некоторых моллюсков данная форма клеток вообще не была обнаружена, а у некоторых – концентрация этих клеток составляла 8 %. Минимальная

концентрация гранулоцитов не превышала 76 %, а максимальная – 93 %. При этом в гемолимфе с уменьшением доли гранулоцитов возрастало число как агранулоцитов (коэффициент корреляции составил $R = -0,89$), так и гемобластов ($R = -0,77$).

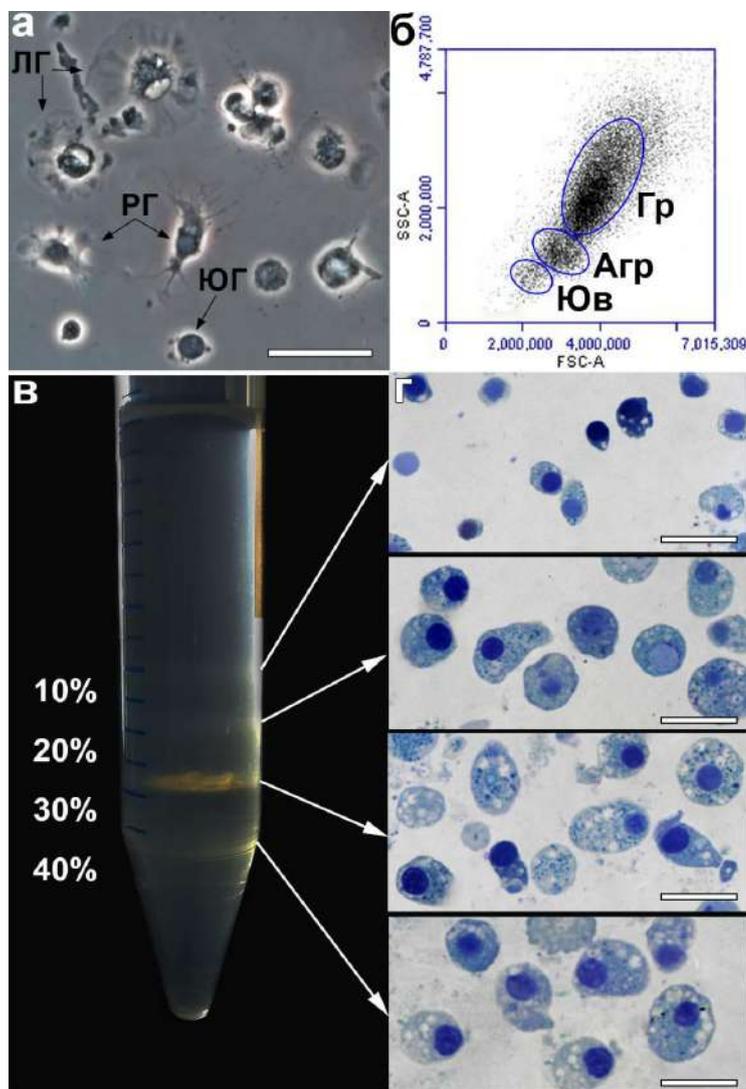


Рисунок 1. Фракционирование гемолимфы *M. kurilensis* и их кратковременное культивирование:

а – временная клеточная культура гемоцитов (метод фазового контраста):

лг – ламеллоподиальный гемоцит, рг – ризоподиальный гемоцит, юг – ювенильный гемоцит;

б – цитофлуоретрический анализ состава гемолимфы: Гр – гранулоциты,

Агр – агранулоциты, Юв – ювенилы; в – фракционирование гемолимфы в градиенте плотности Percoll; г – полутонкие срезы гемоцитов клеточных фракций, показывающие их морфологические особенности. Масштабные отрезки – 20 мкм

Для более детального исследования особенностей морфологии выявленных типов клеток проводили фракционирование нативной гемолимфы (Рисунок 1в) в градиенте

плотности разделяющей среды Percoll (число жизнеспособных клеток при этом не изменялось и соответствовало таковому в нативной гемолифе: $92,53 \pm 0,71$ %). В результате центрифугирования в Percoll были выделены 4 фракции клеток (Рисунок 1г), различающиеся по строению, размеру, плотности, адгезионным свойствам, цитохимическому составу, способности к окраске и фагоцитозу (Таблицы 4-6). При этом размер клеток и плотность их цитоплазмы увеличивались по мере возрастания концентрации Percoll (Таблица 4).

Таблица 4 – Клеточный состав фракций Percoll (средняя \pm 95 % доверительный интервал, полужирным шрифтом выделены преобладающие морфотипы и их параметры)

Фракция	гемобласты, %	базофильные гранулоциты, %	эозинофильные гранулоциты, %	агранулоциты, %	диаметр клеток, мкм	диаметр ядра, мкм
0-10 %	2,20 \pm 0,85	1,35 \pm 0,22	0	1,79 \pm 0,34	5,81 \pm 1,54	5,01 \pm 1,36
10-20 %	1,00 \pm 0,10	14,21 \pm 0,34	4,00 \pm 1,21	1,33 \pm 0,28	18,40 \pm 4,51	4,62 \pm 1,10
20-30 %	0	3,72 \pm 1,01	62,64 \pm 1,32	7,24 \pm 0,22	17,13 \pm 7,23	4,34 \pm 1,41
30-40 %	0	1,44 \pm 0,13	4,47 \pm 2,13	24,11 \pm 2,40	23,74 \pm 3,64	4,82 \pm 1,33

Таблица 5 – Цитохимический (по методу Астальди) и ферментативный анализ клеточного состава фракций (полужирным шрифтом выделены преобладающие компоненты)

Фракция	Кислые белки	Основные белки	Липиды	Кислые/нейтральные/основные полисахариды	Миелопероксидаза, усл.ед.	Щелочная фосфатаза, усл.ед.	Кислая фосфатаза, усл.ед.
0-10 %	91	10	70	0/15/0	0,005	0,038	0,018
10-20 %	50	82	140	0/86/0	0,005	0,059	0,025
20-30 %	140	5	207	146/255/0	0,012	0,070	0,044
30-40 %	265	7	255	23/270/234	0,040	0,068	0,029

Таблица 6 – Функциональная активность клеток из фракций (средняя \pm 95 % доверительный интервал, полужирным шрифтом выделены преобладающие свойства)

Фракция	ФА, %	ФИ	Интенсивность окраски на АФК, усл.ед.	Интенсивность окраски на F-актин, усл.ед.	Акридин, %
0-10 %	3,32 \pm 1,17	3,00 \pm 0,57	2,91 \pm 1,94	7,44 \pm 2,91	-
10-20 %	17,67 \pm 2,31	4,04 \pm 0,94	22,54 \pm 3,20	28,80 \pm 6,10	44,11 \pm 3,82
20-30 %	81,73 \pm 5,41	6,21 \pm 1,03	42,04 \pm 12,46	58,81 \pm 31,24	87,13 \pm 9,25
30-40 %	58,98 \pm 4,76	11,05 \pm 2,07	41,05 \pm 11,20	40,44 \pm 15,53	15,00 \pm 2,03

Верхняя фракция (0-10 %) содержала малое количество клеток ($2,20 \pm 0,85$ % от общего числа гемоцитов), которые имели маленький размер (5-8 мкм) и плохо адгезировали на стекле, поскольку были практически лишены отростков, и имели высокоприподнятое над поверхностью субстрата тело с узким ободком гиалиновой цитоплазмы, окружающей крупное ядро ($5,01 \pm 1,36$ мкм) (Таблица 4). Как видно на фотографиях рисунка 2а гемоциты данной фракции имеют тонкий ободок цитоплазмы, в которой из органоидов обнаруживаются только рибосомы и небольшое количество митохондрий, ядерно-

цитоплазматическое отношение сдвинуто в сторону ядра, содержащего крупные глыбки гетерохроматина вдоль кариолеммы и хорошо выраженное ядрышко. Эти клетки практически не окрашивались гистохимическими красителями либо давали слабую базофильную реакцию при окраске по Май-Грюнвальду (Таблица 4, Рисунок 2б). Также эти клетки не давали реакции на лизосомы, АФК, ферменты (Таблица 5, 6), содержали минимальное из всех групп клеток количество F-актина (Рисунок 2д) и проявляли самую низкую ФА (Таблица 6, Рисунок 2г). Учитывая выше полученные результаты, и основываясь на данных иммунофлуоресцентного анализа, который показал наибольшее включение БДУ этими клетками (Рисунок 2в), мы идентифицировали их как ювенильные или бластные клетки.

Фракция клеток 10-20 % (Рисунок 3) состояла в основном из различной формы базофильных клеток размером $18,40 \pm 4,51$ мкм (Таблица 4, Рисунок 3б) с гетерохроматиновым ядром и цитоплазмой, содержащей в околоядерной области равномерно распределенный по всей площади гладкий эндоплазматический ретикулум (ГЭР), мелкие электронно-светлые везикулы, большое число стопок диктиосом аппарата Гольджи и группы пластинчатых митохондрий, не превышающих чаще всего размера везикул, а в периферической части – цитоскелетные структуры (Рисунок 3а). Помимо интенсивной реакции на кислые белки, клетки этой популяции являлись единственными, которые окрашивались прочным зеленым рН 8,5 и содержали в небольшом количестве основные белки (Таблица 5, Рисунок 3г). Окраска акридиновым оранжевым на лизосомы и суданом черным В (Рисунок 3б) умеренно проявлялась в этой группе клеток (Рисунок 3в) (Таблица 5, 6). Тогда как содержание актина (Рисунок 3е) и АФК (Рисунок 3ж), а также ФА ($17,67 \pm 2,31$ %) (Рисунок 3з) были незначительными по сравнению с нижерасположенными фракциями клеток (Таблица 6).

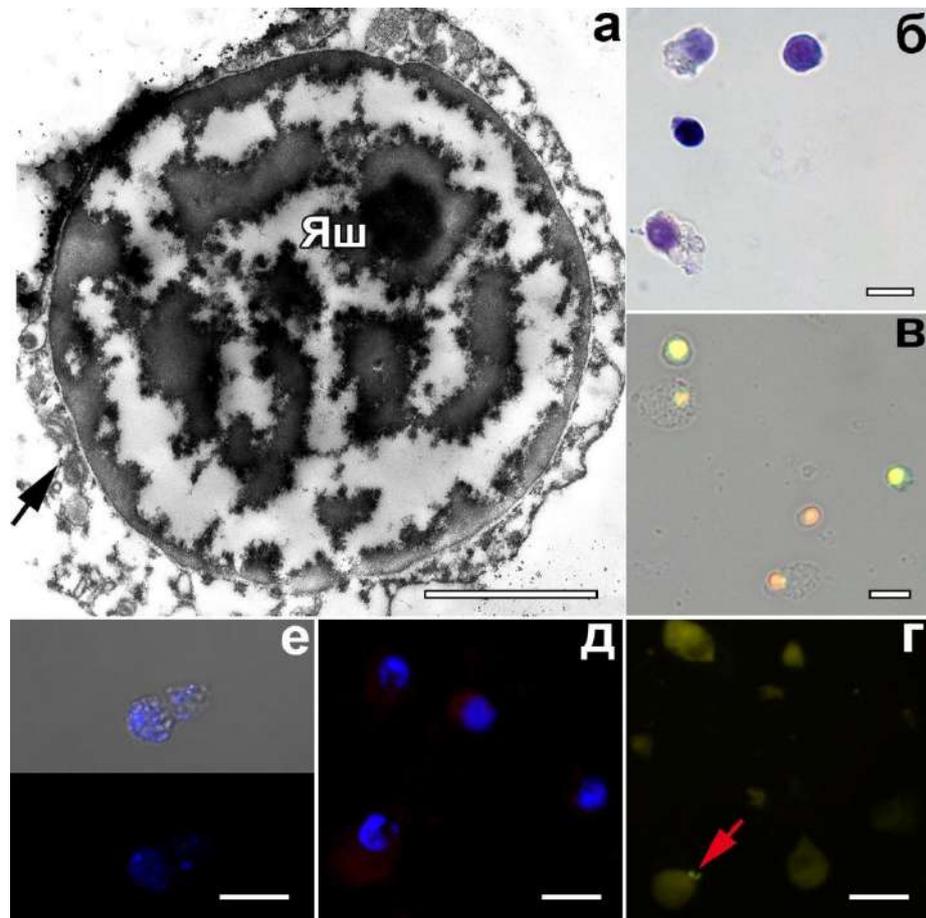


Рисунок 2. Гемоциты 0-10 % фракции градиента Percoll: а – трансмиссионная электронная микроскопия (стрелка – митохондрии, Яш – ядрышко), б – окраска по Май-Грюнвальду, в – конфокальная микроскопия (клетки мечены первичными антителами к БДУ, их вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом Alexa 488 и контрастированы пропидий иодидом), г – реакция *in vitro* фагоцитоза (стрелка указывает на бактерии), д – окраска родамин-фаллоидином на актиновые микрофиламенты (синим – ядра, меченные DAPI), е – окраска CellRox Orange Reagent для выявления АФК.

Масштабные отрезки: а – 2 мкм, б-е – 10 мкм

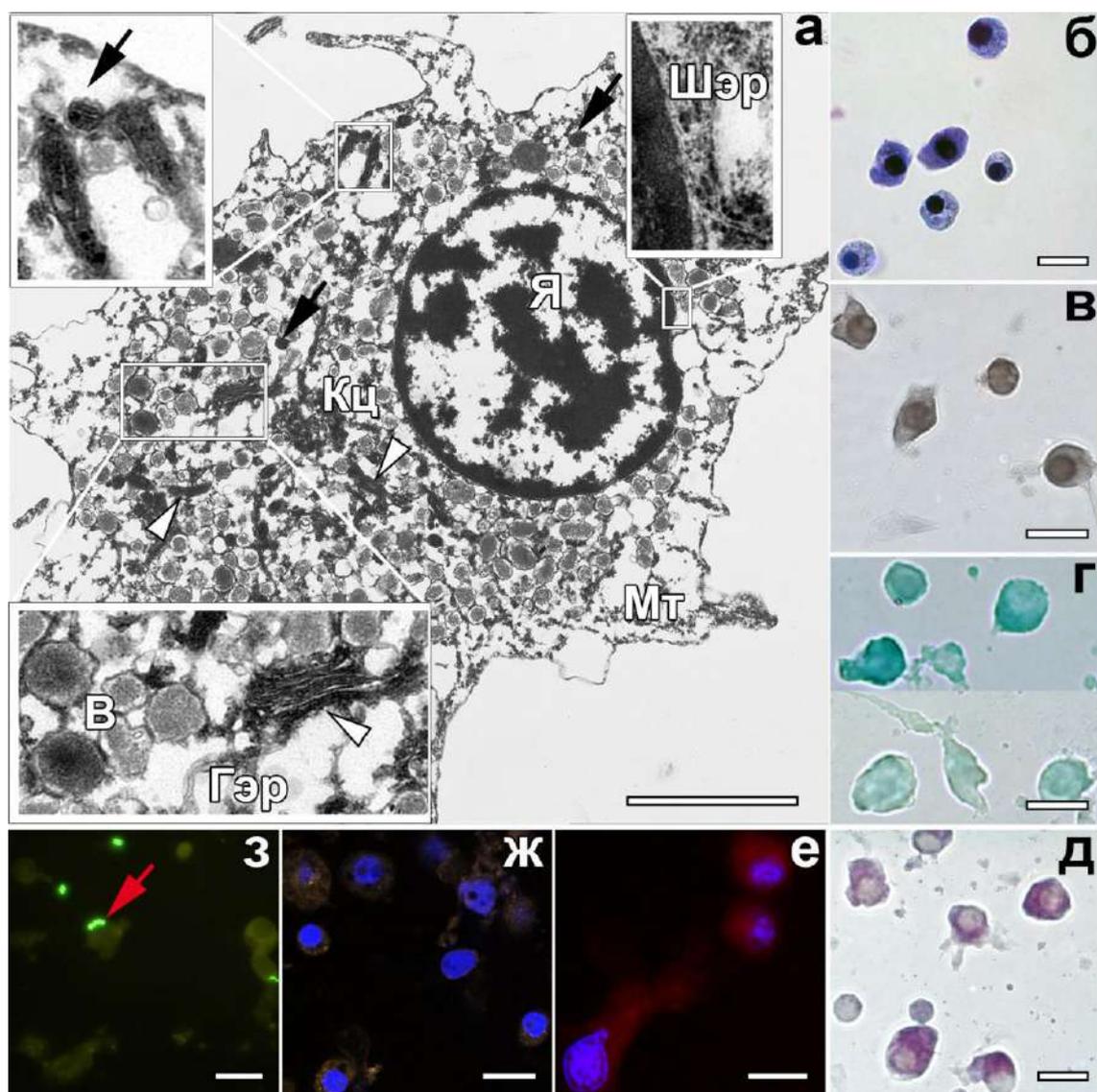


Рисунок 3. Гемоциты 10-20 % фракции градиента Percoll: а – трансмиссионная электронная микроскопия (белая стрелка – аппарат Гольджи, черная стрелка – митохондрии, В – везикулы, Гэр – гладкий эндоплазматический ретикулум, Кц – клеточный центр, Мт – микротрубочки, Шэр – шероховатый эндоплазматический ретикулум, Я – ядро), б – окраска по Май-Грюнвальду, в – окраска суданом черным В на липиды, г – окраска прочным зеленым на белки (верхний ряд – pH 2,2, нижний ряд – pH 8,5), д – окраска по Моури на полисахариды, е – окраска родамин-фаллоидином, ж – окраска CellRox Orange Reagent, з – реакция *in vitro* фагоцитоза (стрелка указывает на бактерии).

Масштабные отрезки: а – 3 мкм, б-е – 20 мкм

Гемоциты фракции 20-30 % ($62,64 \pm 9,32$ %) имели разной плотности зернистую эозинофильную цитоплазму (Рисунок 4б), образовывали ламеллоподии и варьировали в зависимости от распластанности от 9 до 25 мкм (Таблица 4). Ядра этих клеток содержали в основном эухроматин с небольшими глыбками гетерохроматина; околоядерная цитоплазма

по сравнению с предыдущим клеточным типом была более плотной и содержала многочисленные везикулы различной плотности и размера, крупные пероксисомы, умеренно развитый белок-синтезирующий аппарат; а периферическая часть цитоплазмы была свободна от органоидов и содержала только микротрубочки (Рисунок 4а). При цитохимическом окрашивании было обнаружено, что околядерная часть цитоплазмы содержит в основном нейтральные и кислые полисахариды (Рисунок 4д) и большое число лизосом, поскольку при окраске суданом (Рисунок 4в) и акридиновым оранжевым в этом районе в клетках выявлялась обильная зернистость (Рисунок 4ж). Кроме того встречались гемоциты, цитоплазма которых равномерно окрашивалась только на кислые полисахариды (они, как правило, имели небольшой размер). Несмотря на то, что клетки давали умеренную реакцию на кислые белки (Таблица 5, Рисунок 4г), они содержали наибольшее количество актина (Таблица 6, Рисунок 4е) и АФК (Таблица 6, Рисунок 4з), и проявляли максимальную ФА (примерно 80 % от всех клеток) среди остальных фракций (Таблица 6, Рисунок 4и). Кроме того, эти клетки проявляли наибольшую среди других фракций фосфатазную активность (Таблица 5).

Нижнюю фракцию (30-40 %) составляли самые крупные (15-25 мкм) различной формы слабоокрашенные клетки (Таблица 4, Рисунок 5б). Эти клетки содержали эухроматиновое ядро с глыбками гетерохроматина, а цитоплазма имела принципиально иную ультраструктурную организацию, чем предыдущие типы: в ней не обнаруживалось каких-либо везикул, но она вся была равномерно заполнена хорошо развитым белоксинтезирующим аппаратом, полисомами, ГЕР, митохондриями (большого, чем в предыдущей фракции, числа и размера), и гранулярным компонентом (Рисунок 5а). При дальнейшем анализе (Таблица 5), было установлено, что из всех клеточных популяций данные гемоциты дают наиболее выраженную реакцию на МПО (Таблица 5), кислые белки (Таблица 5, Рисунок 5г), гликоген и нейтральные полисахариды (Таблица 5, Рисунок 5д) несмотря на слабую окраску по Май-Грюнвальду, при которой в цитоплазме удавалось выявить только редко встречающиеся крупные эозинофильные гранулы на фоне слабо базофильной цитоплазмы (Рисунок 5б). Клетки проявляли различную степень окраски на полисахариды: в некоторых клетках какие-либо включения углеводной природы отсутствовали (однако клетки имели больший размер по сравнению с другими в этой фракции), а в других – нейтральные полисахариды с гранулами гликогена занимали всю площадь цитоплазмы. Кроме того, эти клетки давали умеренную реакцию на актин (Таблица 6, Рисунок 5е) и АФК (Таблица 6, Рисунок 5ж) и активно участвовали в реакции фагоцитоза (Таблица 6, Рисунок 5и).

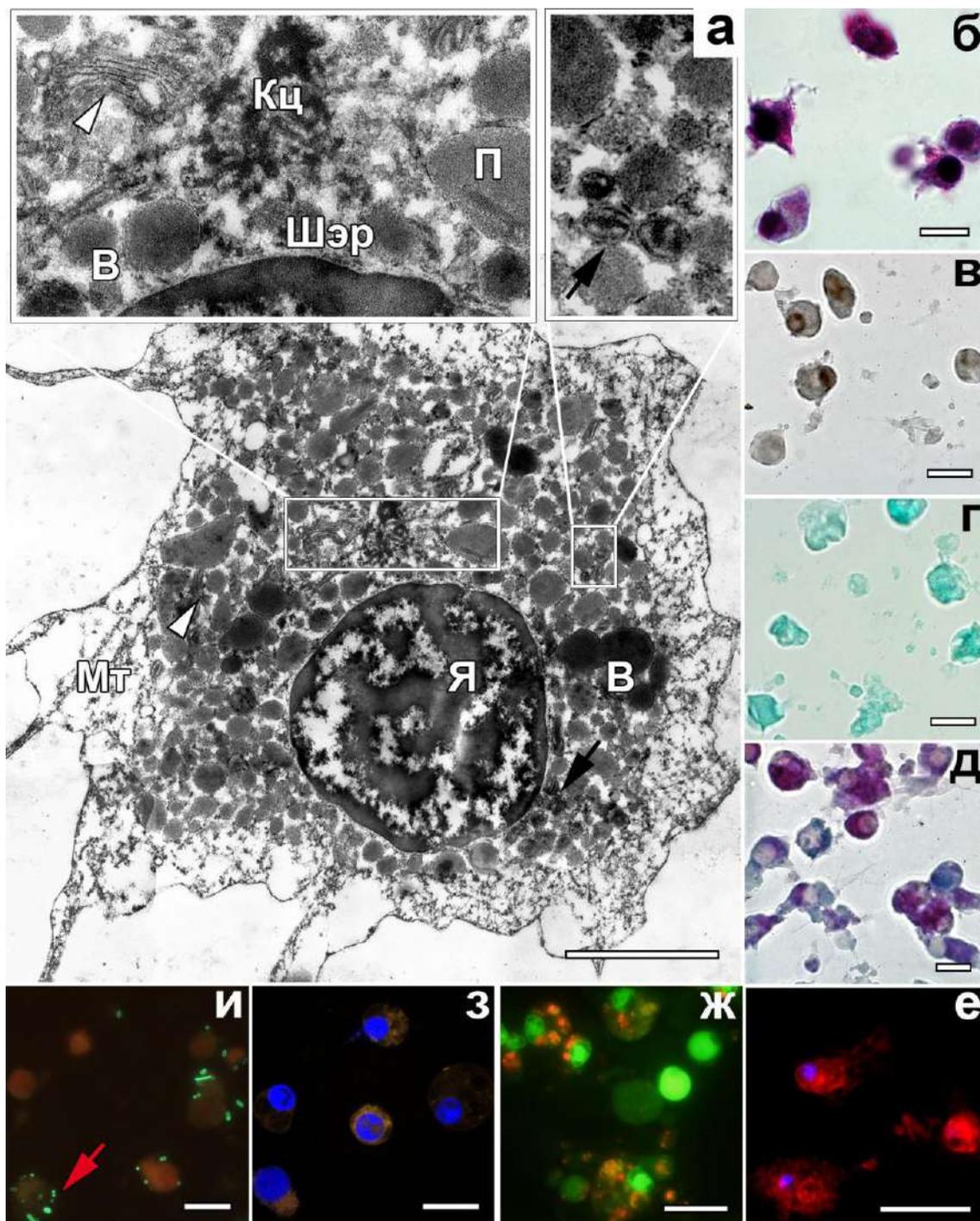


Рисунок 4. Гемоциты 20-30 % фракции градиента Percoll: а – трансмиссионная электронная микроскопия (белая стрелка – аппарат Гольджи, черная стрелка – митохондрии, В – везикулы, Кц – клеточный центр, Мт – микротрубочки, Шэр – шероховатый эндоплазматический ретикулум, Я – ядро), б – окраска по Май-Грюнвальду, в – окраска суданом черным В, г – окраска прочным зеленым рН 2,2, д – окраска по Моури, е – окраска родамин-фаллоидином, ж – окраска акридиновым оранжевым, з – окраска CellRox Orange Reagent, з – реакция *in vitro* фагоцитоза (стрелка указывает на бактерии). Масштабные отрезки: а – 3 мкм, б-и – 20 мкм

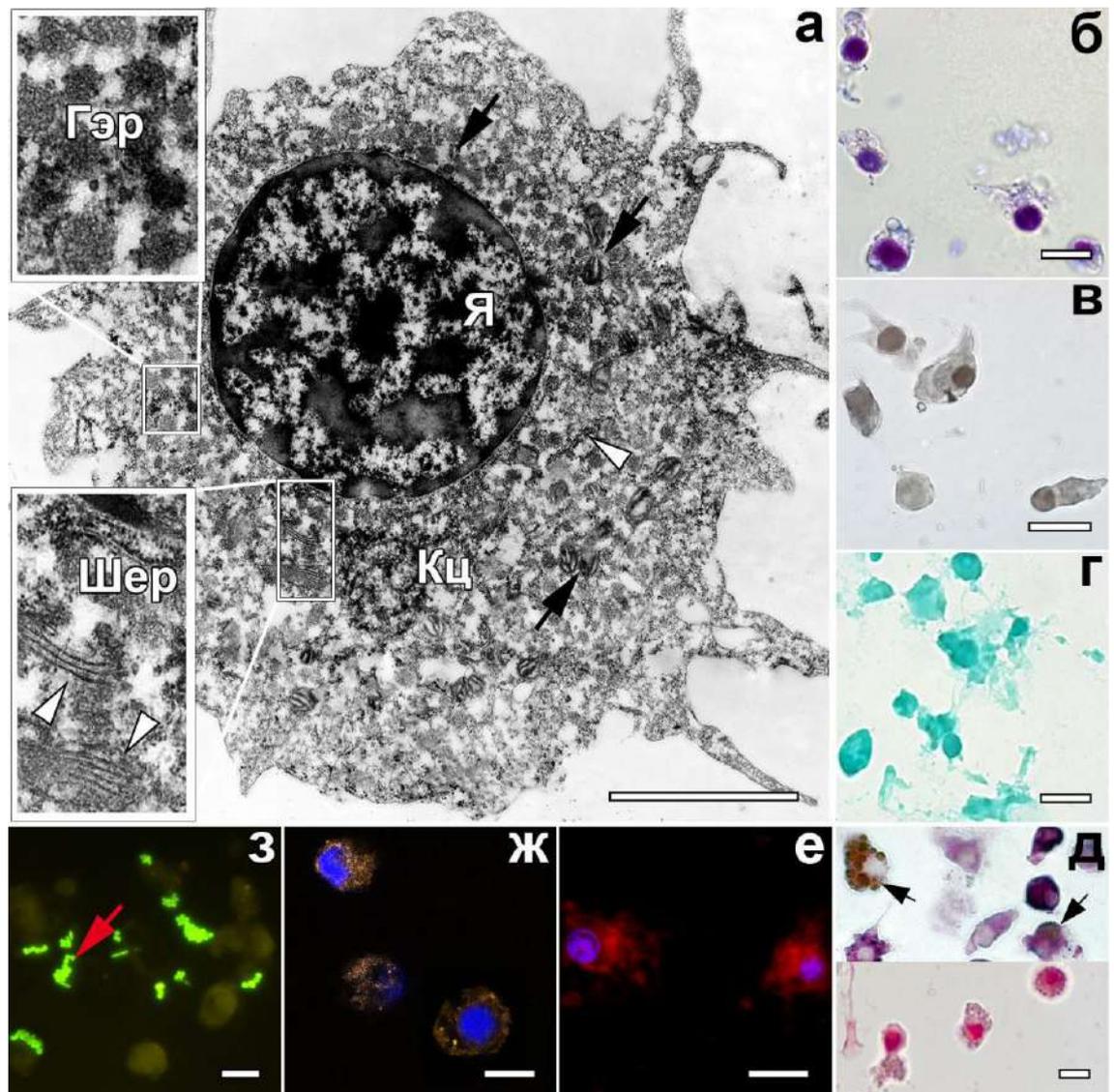


Рисунок 5. Гемоциты 30-40 % фракции градиента Percoll: а – трансмиссионная электронная микроскопия (белая стрелка – аппарат Гольджи, черная стрелка – митохондрии, Гэр – гладкий эндоплазматический ретикулум, Кц – клеточный центр, Шэр – шероховатый эндоплазматический ретикулум, Я – ядро), б – окраска по Май-Грюнвальду, в – окраска суданом черным Б, г – окраска прочным зеленым рН 2,2, д – окраска на полисахариды (верхний ряд – по Моури, нижний ряд – по Бесту, стрелки указывают на гранулы гликогена), е – окраска родамин-фаллоидином, ж – окраска акридиновым оранжевым, з – окраска CellRox Orange Reagent, з – реакция *in vitro* фагоцитоза (стрелка указывает на бактерии).

Масштабные отрезки: а – 4 мкм, б-з – 20 мкм

3.2 Показатели клеточного иммунитета *M. kurilensis* в условиях нормы

3.2.1 Возрастные и половые особенности показателей гемоцитов

Учитывая возрастную динамику размера раковины *M. kurilensis*, представленную в работе Веховой (2013), моллюсков распределяли на три возрастные группы. В группу «А» включали животных, длина раковины которых варьировала от 60 до 70 мм, что соответствовало возрасту 3-4 года. Группа «Б» содержала животных возрастом 5-7 лет с длиной раковины 75-95 мм. В группу «В» были помещены животные старше 9 лет, чья раковина достигала 100-120 мм в длину.

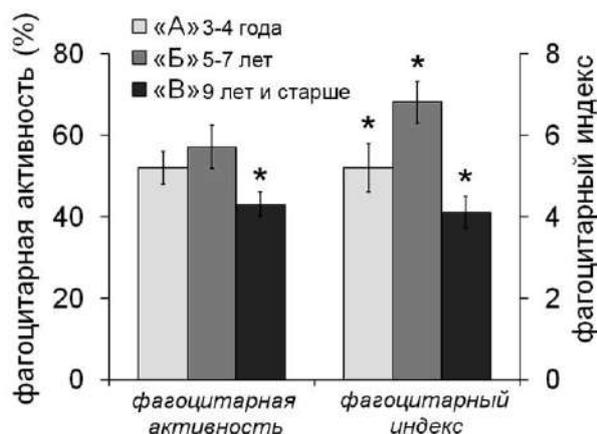


Рисунок 6. Фагоцитарный статус гемоцитов двустворчатых моллюсков *M. kurilensis* разного возраста. Гистограмма показывает средние значения \pm 95 % доверительные интервалы;

* – достоверность различий при $p < 0,05$

Сравнительный анализ фагоцитарного статуса животных разных возрастных групп (Рисунок 6), показал, что у животных средней возрастной категории (группа «Б») ФА в среднем варьирует в пределах $58,3 \pm 4,0$ %, ФИ – $7 \pm 0,5$; тогда как у моллюсков младшего возраста ФА достигает лишь $52,0 \pm 6,3$ %, ФИ – $5 \pm 0,5$. Несмотря на то, что ФА гемоцитов моллюсков 3-4 лет и 5-7 лет достоверно не различались ($p > 0,05$), у более молодых особей границы вариативности ФА были шире (44,1-83,2 %), по сравнению с моллюсками чуть старше (48,3-70,2 %). Также у более молодых модиолусов ФИ был достоверно ниже по сравнению с моллюсками среднего возраста, поскольку границы вариативности ФИ у молодых особей были значительно сдвинуты в меньшую сторону (3-8) и сниженные значения показателя наблюдались у 57,5 % животных. Однако, из трех групп животных, у моллюсков старше 9 лет границы вариативности показателей фагоцитоза были наиболее узкими (40,1-58,2 %; 3-7), и число фагоцитов ($43,4 \pm 3,1$ %) с поглощенными ими бактериями ($4 \pm 0,3$) было достоверно ниже ($p < 0,05$) по сравнению с другими. Достоверных различий в числе циркулирующих гемоцитов и содержания среди них клеток с АФК не было выявлено.

Сравнительный анализ параметров гемоцитов женских и мужских особей *M. kurilensis* не показал достоверных различий ($p > 0,05$), в том числе внутри возрастных групп.

3.2.2 Фагоцитарная активность гемоцитов в отношении различных видов бактерий

Исследование фагоцитарной способности гемоцитов в отношении трех видов бактерий: *P. fluorescens* (ФА $49,5 \pm 5,0$ %, ФИ $7 \pm 0,6$), *Listeria monocytogenes* (ФА $51,1 \pm 5,3$ %, ФИ $6 \pm 0,5$) и *S. aureus* (ФА $56 \pm 3,6$ %, ФИ $6 \pm 0,6$) не показало достоверных различий ($p < 0,05$). Учитывая эти результаты, для проведения дальнейших работ, в качестве антигена использовали клетки бактериальных культур *Staphylococcus*. Представители данного рода бактерий широко распространены в природе, а также удобны для визуализации, типирования и количественного анализа в клетках за счет своей сферической формы.

3.3.3 Иммунный статус моллюсков из условно-фоновых акваторий

На следующем этапе исследования были установлены пределы вариативности фагоцитарного статуса гемоцитов половозрелых моллюсков *M. kurilensis* из условно фоновых акваторий (Рисунок 7) доля использования в качестве референсных значений при дальнейших исследованиях: залива Восток, бухты Киевка и бухты Троицы Японского моря.

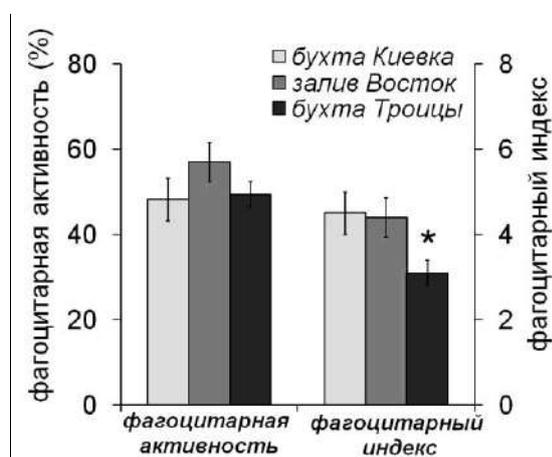


Рисунок 7. Фагоцитарный статус гемоцитов *Modiolus kurilensis* в выборках из условно фоновых акваторий. Гистограмма показывает средние значения ± 95 % доверительные интервалы; * – достоверность различий при $p < 0,05$

Как видно на гистограмме рисунка 7 у животных, выловленных из бухты Киевка ФА проявляли в среднем $48,2 \pm 5,0$ % гемоцитов с ФИ равным $4,5 \pm 0,3$ (при этом показатели варьировали от 36,2 до 68,4% и от 2,6 до 5,8 соответственно). ФА гемоцитов модиолусов,

выловленных из акватории залива Восток, составляла в среднем $56,5 \pm 4,6$ %, а ФИ – $4,4 \pm 0,4$, при этом значения ФА варьировали от 32,3 до 75,1 %, а ФИ изменялся в пределах от 2,7 до 5,9. Животные, выловленные из залива Восток и бухты Киевка, в подавляющем большинстве (более 50 % выборки) имели средние значения показателей фагоцитоза, тогда как доля моллюсков из бухты Троицы с ФИ ниже 4 и ФА менее 50 % была преобладающей (примерно 75 % особей от всей выборки), что было связано с расширением границ вариации показателей фагоцитоза: ФА изменялась от 27,4 до 82,2 %, а ФИ – от 1,8 до 5,1. В среднем у животных из бухты Троицы ФА достигала $49,3 \pm 6,7$ %, а ФИ – $3,1 \pm 0,5$ и был достоверно ниже ($p < 0,05$) такового у моллюсков из бухты Киевка и залив Восток. ФА по трем выборкам достоверно не различалась ($p > 0,05$) и составила для всей совокупности животных из условно фоновых акваторий $52,0 \pm 2,8$ %, тогда как ФИ – $4,0 \pm 0,4$.

3.3.4 Межгодовая динамика клеточных параметров иммунитета моллюсков залива Восток

Средние значения ФА у животных, выловленных из залива Восток в 2006 г. составили $56,5 \pm 4,6$ %, в 2009 – $51,0 \pm 3,7$ %, в 2010 – $49,0 \pm 3,5$ % и в 2011 – $51,0 \pm 4,3$ % (рис. 3). В 2006 и 2009 годах ФА имела более и менее нормальное распределение, тогда как в 2010 году значения ФА были сильно сдвинуты в сторону более низких величин: примерно 50 % особей из выборки имели показатели со сниженными значениями, и менее 10 % – повышенные. Подобная картина наблюдалась и в 2011 году: в выборке помимо большого числа животных с нижним квартилем (63 %), также наблюдалось увеличение максимального значения ФА (до 88 %), и увеличение числа животных с ФА со значениями верхнего квартиля, тогда как число особей, имеющих средние показатели было минимально и составляло всего 12 % от всей выборки. Несмотря на то, что критерий Краскелла-Уоллеса показал достоверные различия между выборками ($p < 0,05$), межгодовые изменения ФА были незначительны и находились в пределах вариативности ФА, характерной для моллюсков из всех условно фоновых акваторий. Поэтому в качестве референсной группы для дальнейших исследований на последующих этапах работы были использованы выборки именно из данной акватории.

3.3.5 Сезонная динамика клеточных параметров иммунитета моллюсков залива Восток

Анализ годовой динамики гидрологических показателей залива Восток (Рисунок 8а) показал, что наиболее теплая морская среда с наиболее низким содержанием кислорода приходится на начало сентября, тогда как январь является наиболее холодным, хотя температуры ниже нуля также наблюдаются еще и в марте, когда концентрация кислорода в воде максимальна, а соленость минимальна.

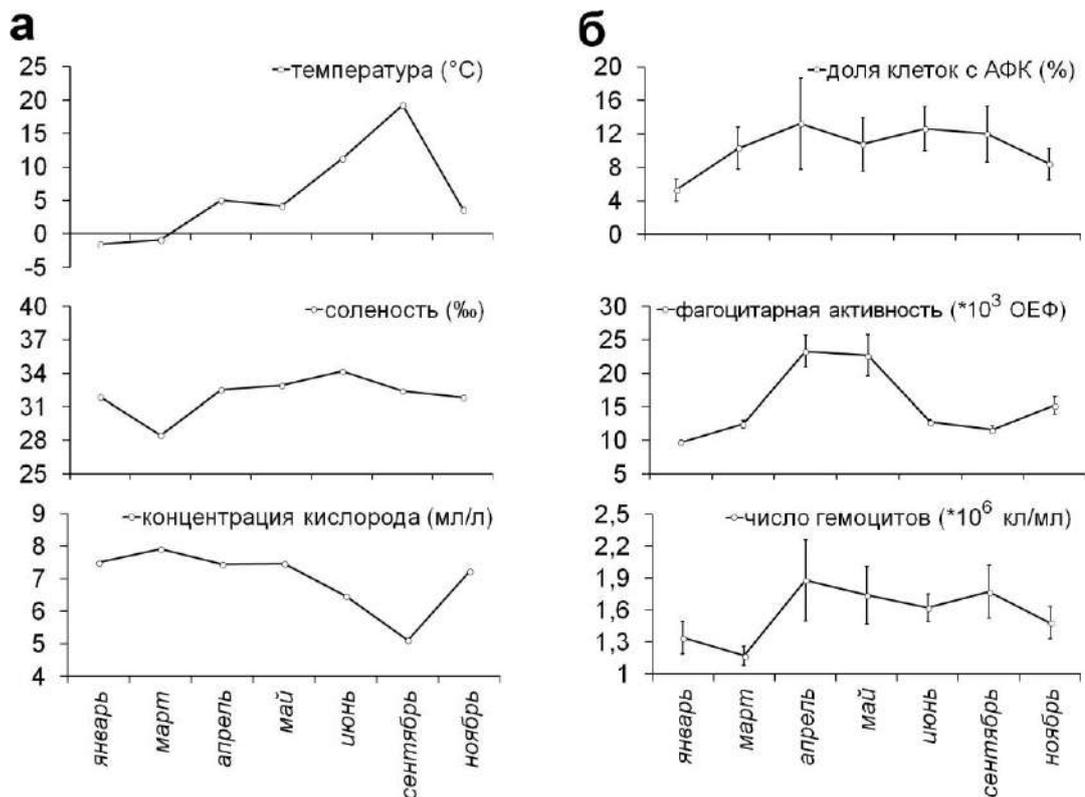


Рисунок 8. Динамика гидрологических параметров залива Восток (а) и показателей клеточного иммунитета *M. kurilensis* (б) в течение года. Гистограмма показывает средние значения \pm 95 % доверительные интервалы

Как видно из гистограмм на рисунке 8б в течение года происходит достоверное изменение параметров клеточного иммунитета *M. kurilensis*. Так, критерий Краскелла-Уоллеса показал достоверное изменение концентрации гемоцитов в течение года ($p < 0,001$): максимальное число клеток в гемолимфе наблюдалось в апреле, далее происходило постепенное снижение их концентрации, и в период низких температур (с ноября по март) оно достигало минимальных значений. Экстремально высокие ($5,6 \cdot 10^6$ кл/мл) и низкие ($0,5 \cdot 10^6$ кл/мл) значения показателя также встречались в апреле и марте соответственно. Однако следует заметить, что это единичные случаи, и наиболее характерными были значения, варьирующие от 1,1 до $1,9 \cdot 10^6$ кл/мл, которые соответствуют границам квартильного размаха. Критерий Манна-Уитни U показал, что концентрация гемоцитов в марте достоверно отличается от всех остальных месяцев ($p < 0,05$). В течение года значения ФА изменялись от $8,3 \cdot 10^3$ усл. ед. (январь) до $42,4 \cdot 10^3$ усл. ед. (май) с высокой степенью достоверности ($p < 0,001$). Динамика ФА в течение года имела выраженные пики с максимальными значениями в период поздней весны (апрель, май), и минимальными – в январе. В ноябре также наблюдалось некоторое повышение ФА гемоцитов при температуре близкой к таковой в апреле и мае. Парный U критерий подтвердил достоверность различий в

апреле, мае и ноябре относительно других месяцев ($p < 0,001$). Критерий Н показал достоверность изменений ($p < 0,05$) и следующего показателя клеточного иммунитета – концентрации клеток с АФК, оцененных с помощью НСТ-теста. Как показал анализ, этот параметр весьма нестабильный и вариабельный с широким разбросом минимальных и максимальных значений как в целом для всего года, так и для каждого месяца в отдельности. Минимальное среднее значение числа АФК-положительных клеток (5 %) было выявлено в январе, что подтверждалось U-критерием ($p < 0,05$). Тогда как, максимальная концентрация АФК-положительных клеток (54 %) была отмечена в апреле. Однако характерные значения для всего года в целом лежали в диапазоне квартильного размаха: от 3 % до 15 %.

Корреляционный анализ показателей среды показал прямую связь между температурой и соленостью ($R = 0,64$), обратную – между температурой и концентрацией кислорода ($R = -0,86$), а также между соленостью и концентрацией кислорода ($R = -0,46$). Также была выявлена положительная связь между ФА и долей клеток с АФК с наиболее сильными значениями в апреле (0,72), мае (0,54) и июне (0,50). Кроме того сильная прямая корреляция была обнаружена между числом гемоцитов и ФА в марте (0,91), апреле (0,43) и между числом гемоцитов и клеток с АФК среди них в сентябре (0,53). Дальнейший корреляционный анализ изменения показателей иммунитета в течение года с гидрологическими параметрами среды также выявил некоторые зависимости. Так, была обнаружена сильная положительную связь между числом клеток и температурой воды ($R = 0,79$), умеренная – между числом клеток и соленостью (0,64) и обратная – с концентрацией кислорода в воде ($R = -0,61$). ФА показала слабую зависимость от факторов среды: коэффициент Спирмена варьировал от 0 до 0,39. Тогда как, доля АФК-положительных клеток достоверно повышалась при увеличении температуры (0,82) и солености (0,69), а при повышении концентрации кислорода (-0,50) наоборот – уменьшалась.

3.3 Динамика показателей клеточного иммунитета при импульсном воздействии

3.3.1 Моделируемое инфицирование

Для постановки эксперимента инфицирования с целью выяснения динамики клеточной реакции иммунитета моллюсков в ответ на антиген, предварительно из выборки исключали особей с возможными физиологическими отклонениями. Для этого проводили первичный скрининг иммунного статуса моллюсков, и в дальнейшем использовали особей, у которых значения этих показателей находились в диапазоне медиана $\pm 30\%$, что, таким образом, привело к гомогенности всех групп, на которые были разделены в дальнейшем моллюски. Результаты сравнений всех показателей иммунитета методами ANOVA Краскела-

Уоллеса выборок Контр 1 и Эксп 1 показали отсутствие заведомо выбивающихся групп животных.

Критерий Колмогорова-Смирнова показал достоверное ($p < 0,05$) отклонение от нормального распределения всех исследованных показателей иммунитета, полученных как при предварительном отборе животных, так и в экспериментальных выборках.

Парные сравнения показателей иммунитета зависимых выборок Контр 1 и Контр 2 критерием Уилкоксона и t-тестом показали отсутствие достоверных различий ($p > 0,05$) до и после введения морской стерильной воды. Тогда как введение термически убитых бактерий в задний мускул-аддуктор *M. kurilensis* вызвало незамедлительную активацию каскада защитных реакций (Эксп 2). Введенные бактерии, окрашенные РИТЦ, обнаруживали в гемолимфе первые 2 суток. Через 3 ч после введения бактерий часть из них была обнаружена адгезированной на поверхности клеток, а другая – поглощена фагоцитами (отдельные гемоциты содержали до 20 бактерий). Через 6 ч антиген практически не обнаруживался на поверхности клеток, а находился в основном только в гемоцитах. В последующие сутки число фагоцитов, содержащих бактерии, значительно снизилось. На последующих стадиях эксперимента (от 3 до 14 сут) гемолимфа моллюсков уже не содержала бактерий.

Несмотря на то, что бактерии, окрашенные РИТЦ, детектировались в гемолимфе лишь первые 2 сут, иммунная реакция имела более пролонгированный характер, что видно на гистограммах рисунка 9. После введения антигена в гемолимфе моллюсков (Эксп 2) постепенно увеличивалось число циркулирующих гемоцитов ($1,38 \pm 0,29 \cdot 10^6$ кл/мл) относительно изначальных (Эксп 1) показателей ($1,35 \pm 0,28 \cdot 10^6$ кл/мл) с достоверным ($p < 0,05$) максимальным повышением на 12 ч ($3,41 \pm 0,54 \cdot 10^6$ кл/мл). Через 36 ч количество циркулирующих гемоцитов у животных группы Эксп 2 возвращалось к исходным значениям ($1,36 \pm 0,22 \cdot 10^6$ кл/мл) (Рисунок 9а).

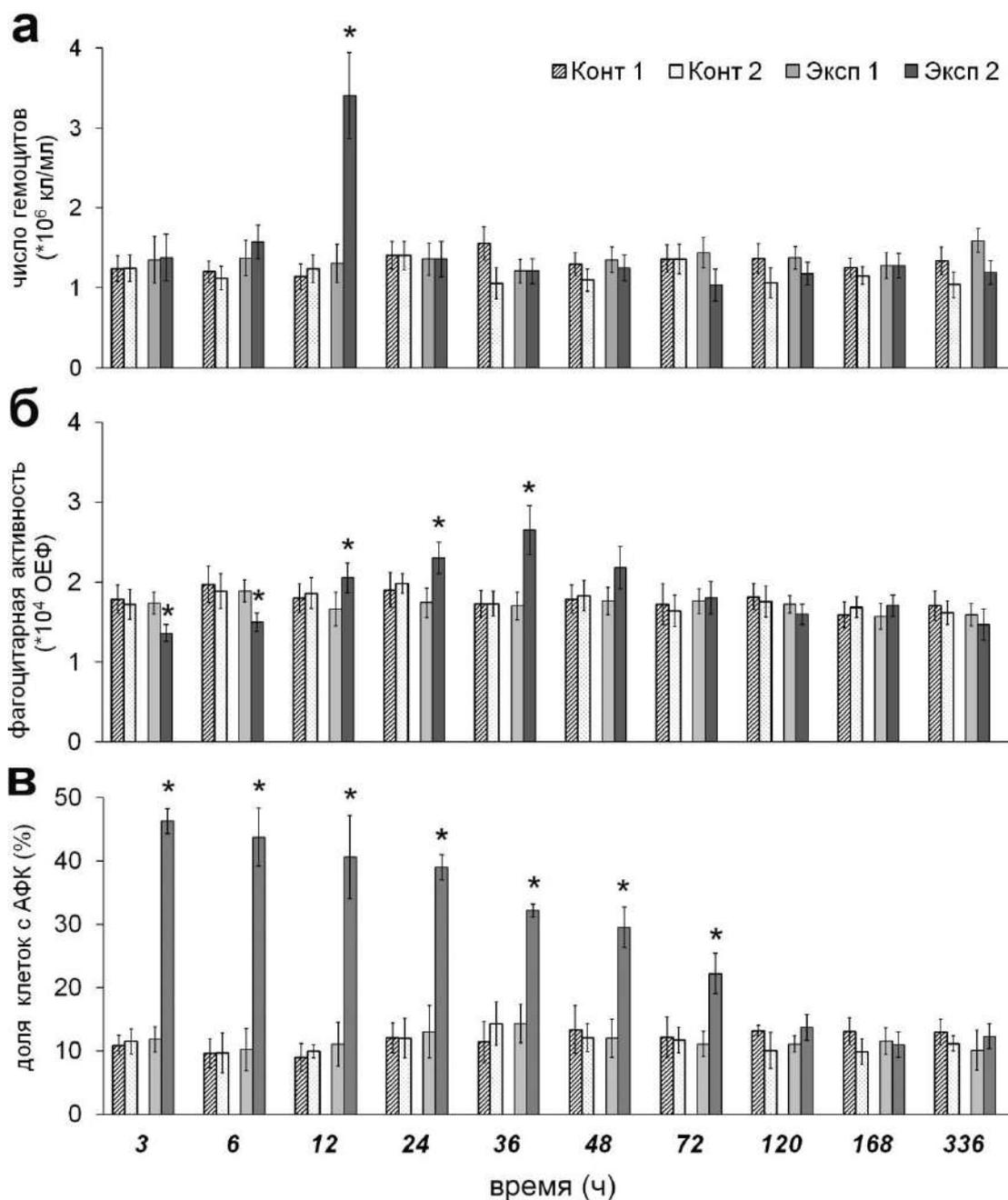


Рисунок 9. Динамика реакции клеточного иммунитета *M. kurilensis* в ответ на введение термически инактивированных бактерий или стерильной морской воды (СМВ) в задний мускул-аддуктор: изменение концентрации гемоцитов (а), их фагоцитарной активности (б) и доли клеток с АФК (в). Контр 1 и Контр 2 – параметры гемолимфы контрольной группы до и после введения СМВ ($n = 16$); Эксп 1 и Эксп 2 – параметры гемолимфы экспериментальной группы до и после введения *Staphylococcus* ($n = 16$). Временные точки на горизонтальной оси показывают время взятия гемолимфы после введения СМВ или *S. aureus*.

Гистограммы показывают средние значения ± 95 % доверительные интервалы;

* – достоверность различий при $p < 0,05$

Анализ реакции *in vitro* фагоцитоза (Рисунок 9б) показал, что уже через 3 ч после введения антигена происходит достоверный ($p < 0,05$) спад ФА, который сохранялся до 6 ч. Достоверно значимый ($p < 0,05$) подъем уровня ФА наблюдался с 12 ч, достигая максимального значения к 1,5 сут. Затем ФА постепенно снижалась, достигая к 3 сут исходных значений и не показывая достоверных различий ($p > 0,05$) между Эксп 1 и Эксп 2 с 3 по 14 сут. Уровень содержания активных форм кислорода в гемоцитах также незамедлительно увеличивался после введения бактерий и сохранялся достоверно высоким ($p < 0,05$) вплоть до 3 сут (Рисунок 9в).

Корреляционный анализ (коэффициент Спирмена при $p < 0,05$) исходных на начало эксперимента показателей иммунитета показал, что общее число клеток и доля среди них гемоцитов с АФК имели обратную зависимость ($R = -0,61$), однако динамика ответа после введения антигена кардинально меняла картину, приводя к положительной связи данных параметров ($R = 0,70$). Поиск зависимостей между показателями в каждой временной точке показал большее число корреляционных связей. Так, через 3 ч после введения антигена с повышением числа циркулирующих гемоцитов достоверно увеличивалось среди них и число клеток с АФК, вплоть до 36 ч, и коэффициент корреляции при этом показывал прямые умеренные связи (от 0,38 до 0,53). Подобная корреляционная динамика наблюдалась между числом клеток и ФА, только начиная с 12 ч и до 36 ч (R варьировал от 0,37 до 0,60). Тогда как с АФК-положительными клетками ФА имела в течение этого времени, начиная с 3 ч, сильную обратную корреляционную связь ($R < -0,70$ во всех временных точках).

Таким образом, установлено, что индукция иммунного ответа, во время которой начиналось поглощение бактерий происходит в первые 3 ч после воздействия. Эффекторная стадия, сопряженная с активным *in vivo* поглощением введенного антигена гемоцитами, наступает в первые 12 ч (поскольку ФА *in vitro* с 3 до 6 ч снижается, а доля клеток с АФК повышается). Достоверное повышение *in vitro* ФА происходит до 48 ч, что, вероятно, связано с постепенным увеличением концентрации циркулирующих гемоцитов, и как следствие повышение *in vivo* клиренса *Staphylococcus* sp. По мере освобождения организма от антигена наступала следующая стадия – снижение или прекращение активности клеточных факторов иммунитета (с 72 ч), после которой (36-72 ч) наблюдалось возвращение иммунной системы к исходному состоянию.

3.3.2 Моделируемая острая кровопотеря

Как видно на рисунке 10 в первые часы после потери моллюском значительного объема гемолимфы (5 мл), соответствующего острой массивной кровопотере, относительно исходного объема циркулирующей гемолимфы, наблюдается закономерное уменьшение числа гемоцитов с достоверным снижением среди них в первую очередь базофилов как у контрольной, так и экспериментальной групп животных (Рисунок 10 а-б). Через 6 ч у животных Эксп 2 наблюдается также снижение числа эозинофилов, тогда как доля агранулоцитов и гемобластов, также как и общее число гемоцитов достоверно возрастают (Рисунок 10б). Далее (через 9 ч) число циркулирующих гемоцитов вновь снижается с пропорциональным снижением всех типов клеток. По истечении 12 ч в гемолимфе опять наблюдается повышение числа агранулоцитов, за счет чего общее число гемоцитов также повышается. В последующие часы достоверных изменений клеточного состава гемолимфы у животных Эксп 1 и Эксп 2 не наблюдается, и лишь через 72 и 120 ч в гемолимфе возрастает доля эозинофильных гранулоцитов, которая приводит и к возрастанию общего числа клеток у Эксп 2.

После нанесения травмы ФА клеток достоверно снижается лишь через 6 ч, но уже через 9 ч достоверно повышается и сохраняется таковой практически до конца эксперимента (Рисунок 10в). Восстановление показателей фагоцитоза до нативного состояния начинается лишь к 7-м суткам посттравматического периода.

Корреляционный анализ (коэффициент Спирмена при $p < 0,05$) исходных значений параметров гемолимфы всех животных показал, что повышенное число циркулирующих гемоцитов сопряжено с большим числом базофилов ($R = 0,80$) и эозинофилов ($R = 0,90$), однако после острой кровопотери фонд циркулирующих гемоцитов помимо базофилов ($R = 0,75$) и эозинофилов ($R = 0,80$) восполнялся гемобластами ($R = 0,58$). ФА показала обратную зависимость от числа базофилов ($R = -0,60$) и эозинофилов ($R = -0,53$) для всей совокупности контрольных животных. Тогда как у экспериментальных ФА коррелировала только с числом базофилов и достоверно повышалась при увеличении доли этих клеток среди гемоцитов ($R = 0,53$).

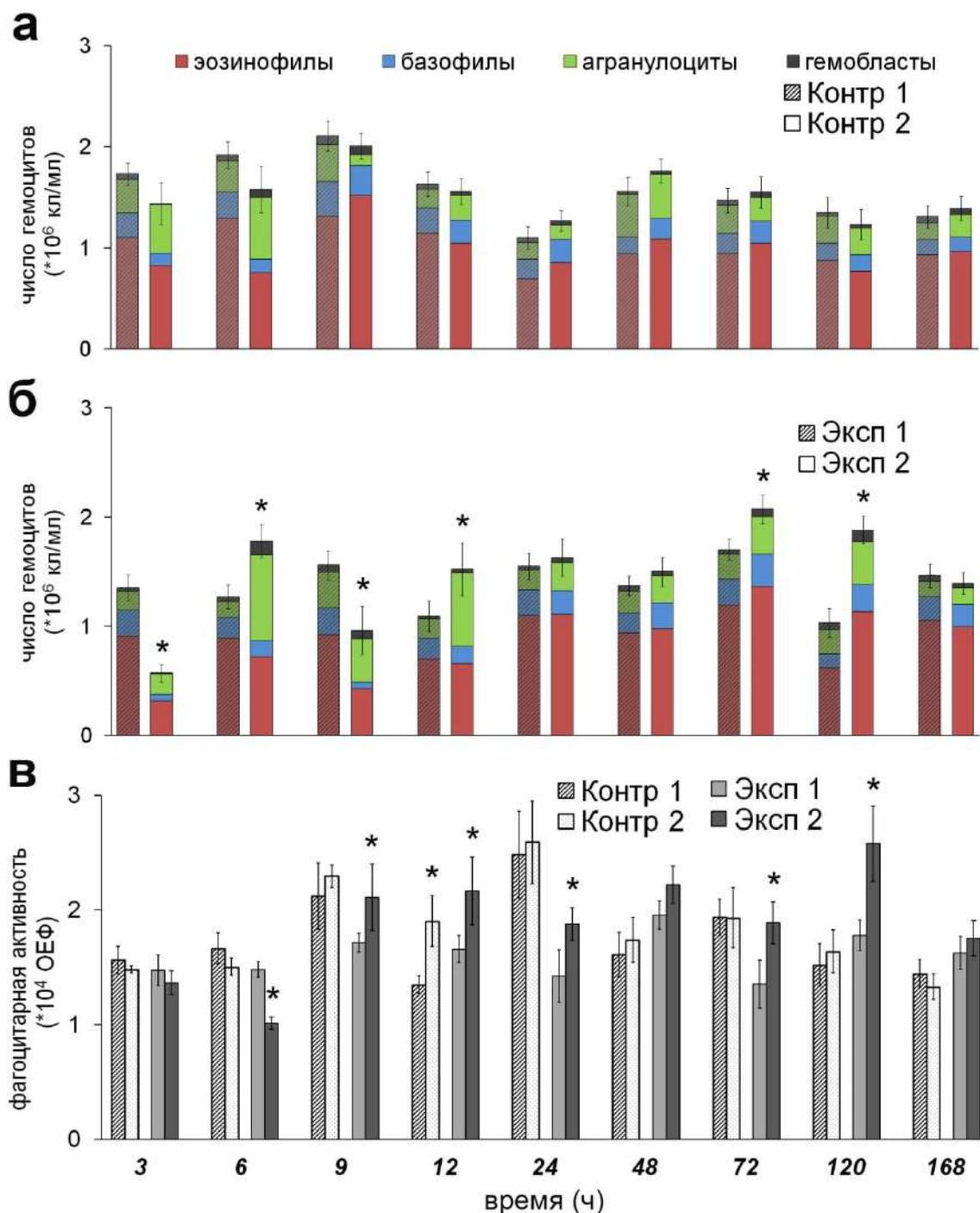


Рисунок 10. Динамика клеточных реакций *M. kurilensis* при острой кровопотере: изменение концентрации гемоцитов и различных типов клеток у контрольной (а) и экспериментальной (б) групп животных, и их фагоцитарной активности (в). Контр 1 и Контр 2 – параметры гемолимфы контрольной группы до и после взятия 300 мкл гемолимфы (n = 16); Эксп 1 и Эксп 2 – параметры гемолимфы экспериментальной группы до и после взятия 5 мл гемолимфы (n = 16). Временные точки на горизонтальной оси показывают время взятия гемолимфы после нанесения травмы. Гистограммы показывают средние значения ± 95 % доверительные интервалы; * – достоверность различий при p < 0,05

Таким образом, состояние гемолимфы на фоне массивной и острой кровопотери, характеризуется двухфазной динамикой клеточных реакций: первичное снижение показателей иммунитета и последующее восстановление. По мере увеличения среди циркулирующих гемоцитов незрелых форм клеток наблюдается снижение уровня фагоцитоза (3-6 ч). Однако во втором периоде (9-120 ч) происходит достаточно быстрая и мощная активация гемоцитов (в особенности гранулоцитов через 72 ч), что приводит к повышению ФА гемоцитов, которая сохраняется достоверно высокой до 5 суток.

3.3 Клеточные реакции в ответ на хроническое загрязнение

3.3.1 Иммунный статус

Проточный цитометрический анализ гемолимфы *M. kurilensis*, представленный на рисунке 11, показал преобладание гранулоцитов у большинства исследованных особей как из залива Восток, так и Спортивной гавани, однако степень зернистости и размер всех типов клеток были достоверно ниже ($p < 0,05$) у моллюсков из импактной акватории.

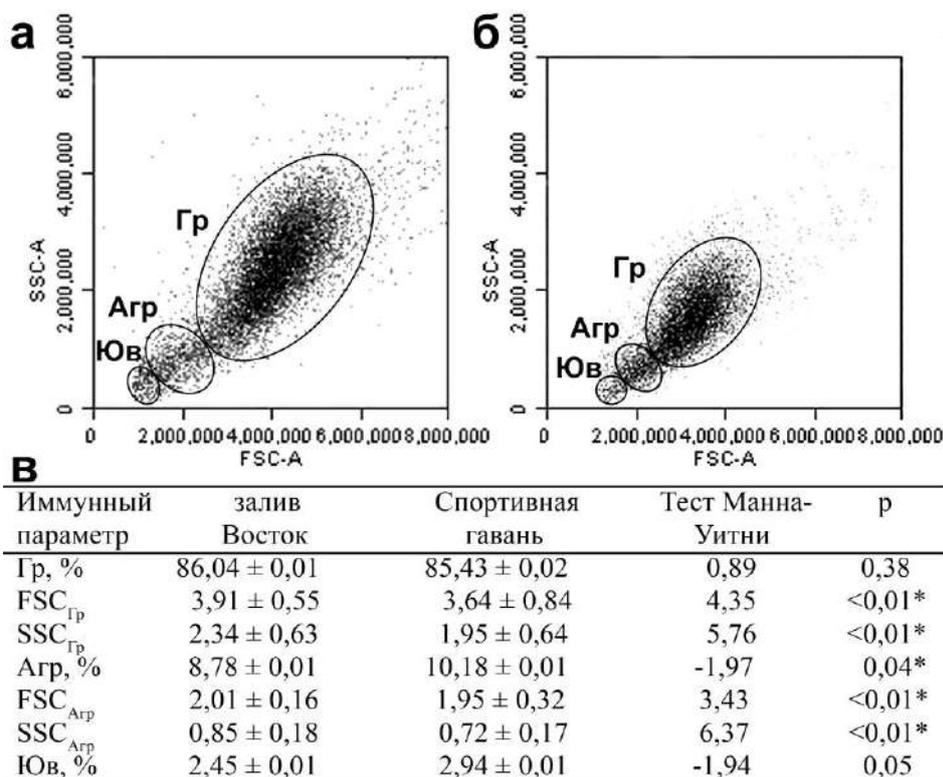


Рисунок 11. Бипараметрические гистограммы распределения гемоцитов *M. kurilensis* из залива Восток (а) и Спортивной гавани (б) по сигналу прямого светорассеяния (FSC) и бокового светорассеяния (SSC) на три типичные клеточные популяции: гранулоциты (Gr), агранулоциты (Agr) и ювенильные клетки (Юв). Таблица (в) показывает средние значения ± 95 % доверительные интервалы параметров гемоцитов; * – достоверность различий при $p < 0,05$

Для оценки показателей клеточного иммунитета определяли общее число клеток в гемолимфе моллюсков, их способность к фагоцитозу, а также производству пероксидазы и АФК (Рисунок 12).

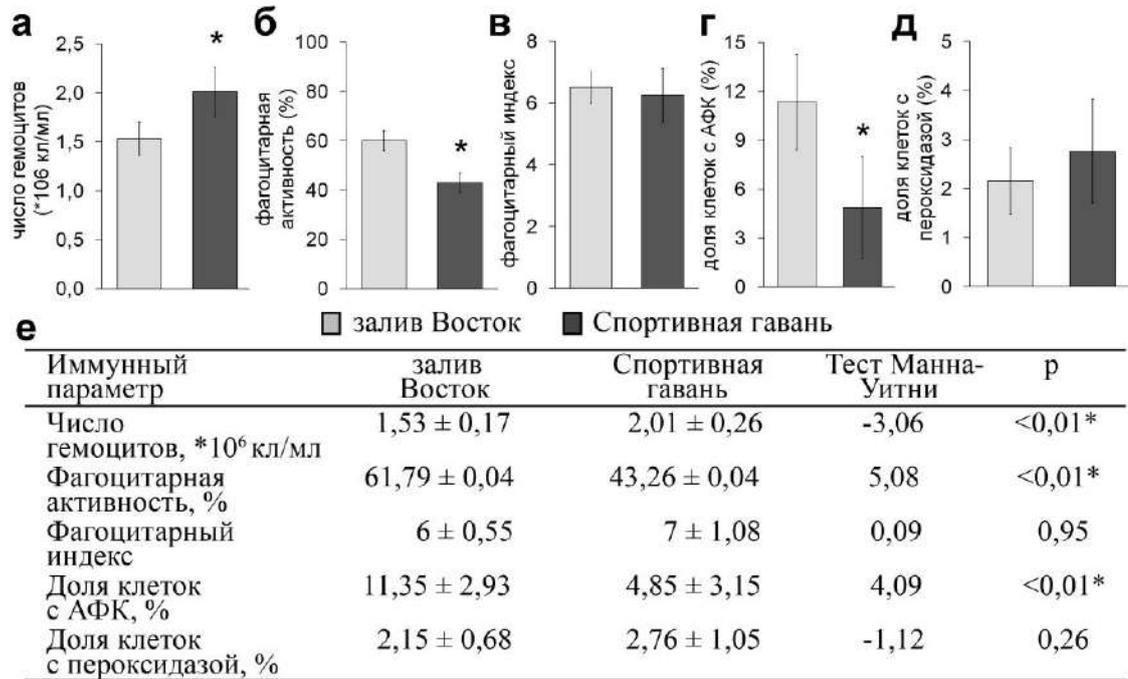


Рисунок 12. Параметры клеточного иммунитета *M. kurilensis* из залива Восток и Спортивной гавани. Гистограммы и таблица показывают средние значения ± 95 % доверительные интервалы; * – достоверность различий при $p < 0,05$

У животных из залива Восток число гемоцитов (Рисунок 12а) варьировало от 0,72 до $3,00 \cdot 10^6$ кл/мл, при этом сниженные значения наблюдались всего у 16,7 % животных от всей выборки, а высокие – у 22,9 %. Тогда как у животных из Спортивной гавани отмечались значительные отклонения по этому показателю: среднее значение наблюдалось лишь у 37,62 % особей и было достоверно выше ($2,01 \pm 0,26 \cdot 10^6$ кл/мл), варьируя от 1,26 до $3,60 \cdot 10^6$ кл/мл. У животных залива Восток ФА (Рисунок 12б) варьировала в пределах от 41,12 % до 89,23 %, при этом сниженные значения наблюдались у 14,63 % животных, высокие – у 8,31 %. В Спортивной гавани границы вариативности ФА были значительно сдвинуты в меньшую сторону (26,01-71,44 %) и низкие значения наблюдались у 46,82 % животных, высокие всего у 6,24 %. Достоверные различия ФИ (Рисунок 12в) у животных из импактной и условно фоновой акваторий не выявлены, однако пределы вариативности этого показателя у моллюсков из Спортивной гавани были значительно шире (1-15) по сравнению с таковыми из залива Восток (4-12). Сниженные значения НСТ-теста (< 1 %) наблюдались в выборке из референсной акватории у 27 % животных (Рисунок 12г), высокие ($> 40,05$ %) – у

12,50 %, а низкие значения ДАБ-окраски (0,50 %) наблюдались у 18 %, повышенные (8,50 %) – у 2 % (Рисунок 12д). У животных из импактной акватории достоверно изменялось лишь содержание клеток с АФК (НСТ-тест), и средняя величина этого параметра составляла $4,85 \pm 3,15$ %, варьируя от 0,50 до 40,00 %, поскольку низкие значения этого параметра наблюдались у 40,60 % животных, а высокие лишь у 3,13 %.

Корреляционный анализ показателей иммунитета у *M. kurilensis* в совокупности из двух выборок представлен в таблице 7.

Таблица 7 – Корреляционные связи между иммунными параметрами *M. kurilensis* из исследуемых акваторий (коэффициент Спирмена, $p < 0,05$).

Сравниваемые иммунные параметры	Коэффициент корреляции
SSC гранулоцитов – Доля клеток с АФК	0,36
Фагоцитарная активность – Фагоцитарный индекс	0,31
Доля клеток с АФК – Фагоцитарная активность	0,31
Число агранулоцитов – Фагоцитарная активность	-0,28
FSC гранулоцитов – Фагоцитарная активность	0,40
SSC агранулоцитов – Доля клеток с АФК	0,42
SSC гранулоцитов – Фагоцитарная активность	0,46

При выборочном анализе показателей иммунитета моллюсков только из условно-фоновой акватории была выявлена также достоверная прямая связь доли гранулоцитов с ФА ($R = 0,33$) и ФИ ($R = 0,36$).

Таким образом, наиболее репрезентативными показателями состояния клеточного иммунитета двустворчатых моллюсков, обитающих в условиях хронического загрязнения, являются: число гемоцитов, доля среди них агранулоцитов, размер и зернистость агранулоцитов и гранулоцитов, ФА, доля клеток с АФК.

3.3.2 Гистопатологический статус

3.3.2.1 Пищеварительная железа

В норме пищеварительная железа *M. kurilensis* парная, от коричнево-зеленого до чёрного цвета, окружает снаружи желудок и часть кишечника, располагаясь в верхней части тела под гонадой (Таблица 3).

Как видно на рисунке 13а железа состоит из слепо заканчивающихся канальцев (трубочек) и многочисленных протоков, которые соединяются с желудком. В норме в интерстициальном пространстве между канальцами встречается несколько фиброцитов и гемоцитов. Эпителий трубочек состоит из секреторных базофильных клеток и светлых пищеварительных клеток с множеством микроворсинок на апикальном конце, захватывающих и переваривающих пищевые частички в вакуолях (Рисунок 13б).

Секреторные клетки подразделяются на призматические, пирамидальные и цилиндрические. Призматические клетки заполнены прозрачными везикулами, что делает их похожими на пищеварительные, пирамидальные клетки содержат крупные вакуоли и выделяют секрет в виде небольших базофильных гранул, а цилиндрические клетки малодифференцированные, несут жгутик и слабо окрашиваются основными красителями. Конечные продукты пищеварения выводятся непосредственно в просвет трубочки в виде остаточных тел. Разорвавшиеся клетки в ходе естественного пищеварительного цикла разрушаются и замещаются новыми. У контрольных особей *M. kurilensis* из залива Восток в конце июня в первой половине дня трубочки пищеварительной железы имели сравнительно большой просвет и эпителий средней высоты, в составе которого присутствовали описанные выше типы клеток. Среди всех трубочек ПВЖ были идентифицированы четыре типа (Рисунок 13а), соответствующих разным стадиям пищеварения. I тип (фаза исходная/покоя) – $8,31 \pm 2,02$ %: округлый большой просвет, эпителий представлен всеми типами клеток (5-10 мкм), размер трубочек варьировал от 15 до 55 мкм; II тип (фаза адсорбции и пищеварения) – $58,22 \pm 4,48$ %: звездчатый, овальный или круглый просвет, клетки более высокие по сравнению с предыдущим типом трубочек (10-15 мкм) и заполнены в апикальной зоне вакуолями, формируя выпячивания, размеры трубочек варьировали от 20 до 90 мкм; III тип (фаза разрушения) – $31,3 \pm 2,20$ %: среди этого типа трубочек были выделены морфологически еще три подтипа а, б, в, которые отличались размерами (20-60 мкм) и разной степенью пищеварения/разрушения: а – апикальная часть клеток эпителия (10-20 мкм) отшнуровывалась и отделялась отдельными фрагментами в просвет трубочки ($11 \pm 2,4$ %), б – фрагменты и отделившиеся от мембраны целые клетки заполняли весь просвет трубочек, при этом ее оголение не происходило ($11,9 \pm 1,9$ %), в – некротические трубочки, в которых наблюдалась дезинтеграция эпителия, некроз и фагоцитоз клеток гемоцитами, постепенный распад базальной мембраны ($8,4 \pm 1,8$ %); IV тип (фаза восстановления) – $3,2 \pm 1,2$ %: просвет округлый достаточно широкий, клетки эпителия низкие (до 7 мкм), размер трубочек варьировал от 10 до 40 мкм. Таким образом, преобладающим типом трубочек являлся II тип, доля которого у разных животных варьировала от 27 до 100 %, другие трубочки могли быть представлены от 2 до 40 %, среди которых наиболее часто мог отсутствовать IV тип трубочек (в более чем 50 % случаев).

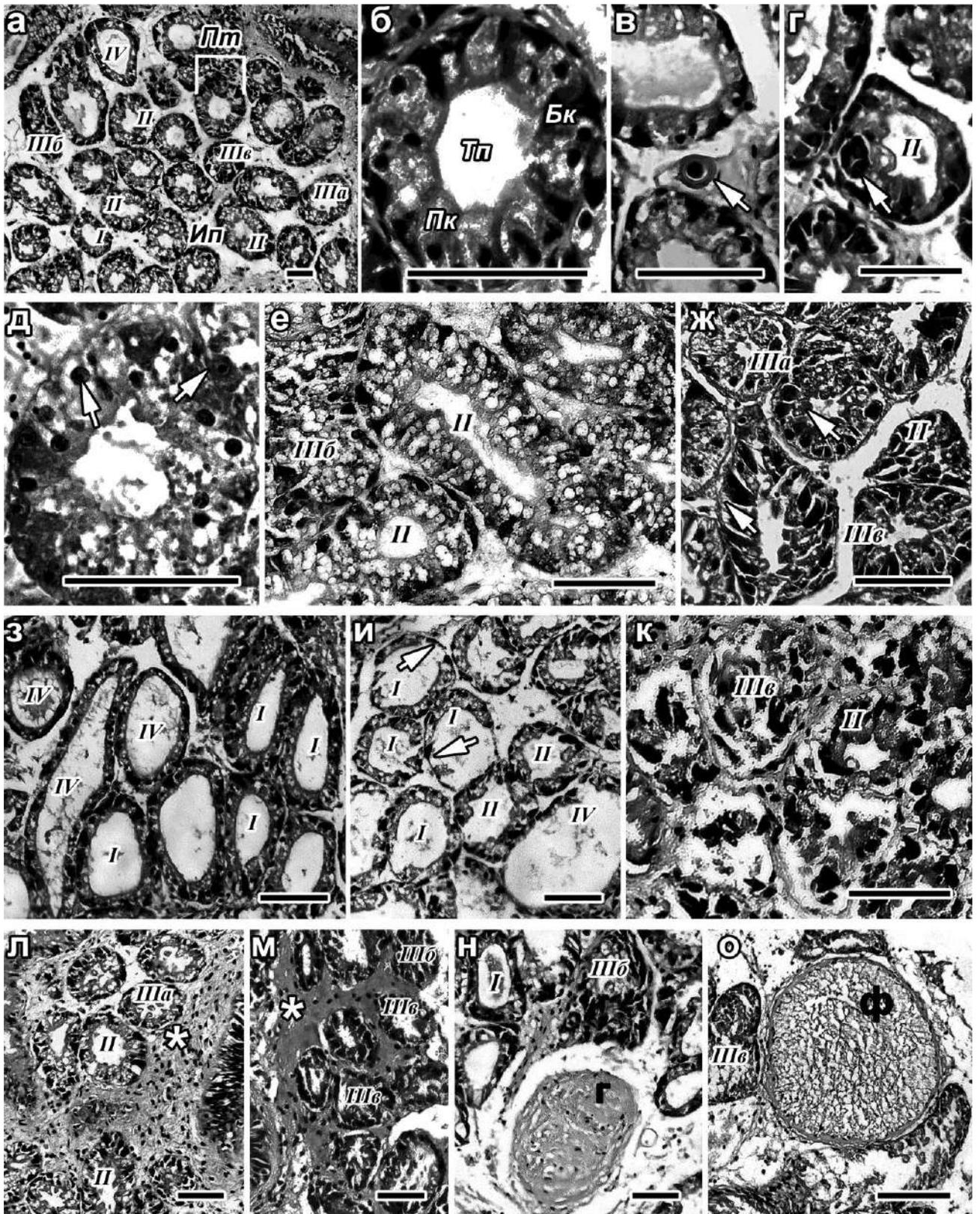


Рисунок 13. Нормальное строение (а, б) и гистопатологические изменения ПВЖ *M. kurilensis* (в-о): I, II, IIIа, IIIб, IIIв, IV – типы пищеварительных трубочек (Пт), Ип – интерстициальное пространство, Тп – трубочки просвет, Пк – пищеварительная клетка, Бк – базофильная клетка; в – спороциста *Nematopsis* sp. (стрелка); г – спороциста *Marteilia* sp. (стрелка);

д – кариопикноз (стрелки); е – гипервакуолизация эпителия трубочек; ж – сужение и атрофия клеток эпителия трубочек (стрелки); з – изменение соотношения типов пищеварительных трубочек с преобладанием покоящихся (I тип) и восстанавливающихся (IV тип); и – оголение базальной мембраны (стрелки) в результате сдувания эпителиальных клеток; к – обширный некроз трубочек; л – инфильтрация гемоцитами интерстициального пространства (звезда); м – гиперплазия фиброзной ткани в интерстициальном пространстве (звезда); н – гранулоцитома (Г); о – фиброма (Ф). Масштабные отрезки – 50 мкм

При анализе гистологических препаратов были обнаружены изменения ПВЖ, которые относились к разным категориям патологий (Рисунок 13 в-о). Первой такой категорией являлись дегенеративные изменения клеток (Рисунок 13 д-ж): кариопикноз, гипервакуолизация и атрофия.

Второй категорией являлись деструктивные изменения пищеварительных трубочек (Рисунок 13 з-к), выражающиеся в изменении соотношения типов пищеварительных трубочек, обнажении базальной мембраны трубочек в результате сдувания эпителиальных клеток и некрозе.

Третьей категорией являлись воспалительные процессы интерстициального пространства железы (Рисунок 13 л-о), среди которых наблюдались инфильтрация гемоцитами, гиперплазия соединительной ткани – фиброз, образование гранулоцитом и фибром.

Кроме того, в тканях ПВЖ морфологически были идентифицированы спороцисты паразитических простейших *Nematopsis* sp. (Рисунок 13в) и *Marteilia* sp. (Рисунок 13г).

Среди гистопатологических отклонений ПВЖ у животных из залива Восток наибольшую встречаемость имели: инфильтрация (41 %), фиброз (44 %) и паразитарная инвазия (38 %), при этом чаще всего (13-15 %) особи имели среднюю степень тяжести, равную 2 согласно принятой в работе шкале (см. Таблицу 2 в п. 2.2.3.2). У моллюсков из Спортивной гавани частота встречаемости этих отклонений значительно увеличивалась (инфильтрация – 69 %, фиброз – 62 %, инвазия – 77 %), при этом особи имели в 15-20 % случаев 3-4 степени тяжести. Также по сравнению с заливом Восток в импактной акватории возросла почти в два раза доля моллюсков (42 %), имеющих отклонения в строении эпителия канальцев.

3.3.2.2 Почки

В норме у *M. kurilensis* U-образные темно-коричневые почки, лежащие вентрально в перикардиальной области. Каждая почка представляет собой паренхиматозный орган, состоящий из трубочек и протоков, концы которых открываются в перикард и мантийную полость. Эпителий трубочек состоит из крупных нефроцитов (30-100 мкм) различной формы (от округлой до столбчатой) в зависимости от отдела почки (Рисунок 14а). Как видно на рисунке 14б нефроциты имеют пристеночное маленькое (5-8 мкм) плотное ядро, не четкое цитоплазматическое содержимое с вакуолями и конкрециями (нефролитами). Нефроциты примыкают к гемальным синусам, и их апикальная часть, способная к апокриновой секреции, обращена в выводящий проток трубочки.

При анализе гистологических препаратов были обнаружены изменения тканей почек (Рисунок 14 в-р), которые включали дегенеративные патологии клеток (Рисунок 14 д-м), проявляющиеся как гипервакуолизация и изменение формы клеток (ошаривание) отдела почки, для которого характерны более столбчатые нефроциты, накопление конкреций и изменение их характеристик (числа, формы, структуры, размеров).

Второй категорией являлись деструктивные изменения почечных трубочек (Рисунок 14 н-о), выражающиеся в изменении толщины базальной мембраны трубочек и количестве нефроцитов (гиперплазии).

Третьей категорией патологического состояния являлись воспалительные процессы соединительной ткани почек (Рисунок 14 п-р), среди которых наблюдались фиброз, инфильтрация ткани гемоцитами и инвазии паразитов (Рисунок 14 в-г). Как и в случае с ПВЖ, в интерстициальном пространстве почек были обнаружены спорозисты *Nematopsis* sp. (Рисунок 14г), а в базальной мембране иной не идентифицированный паразит (Рисунок 14в).

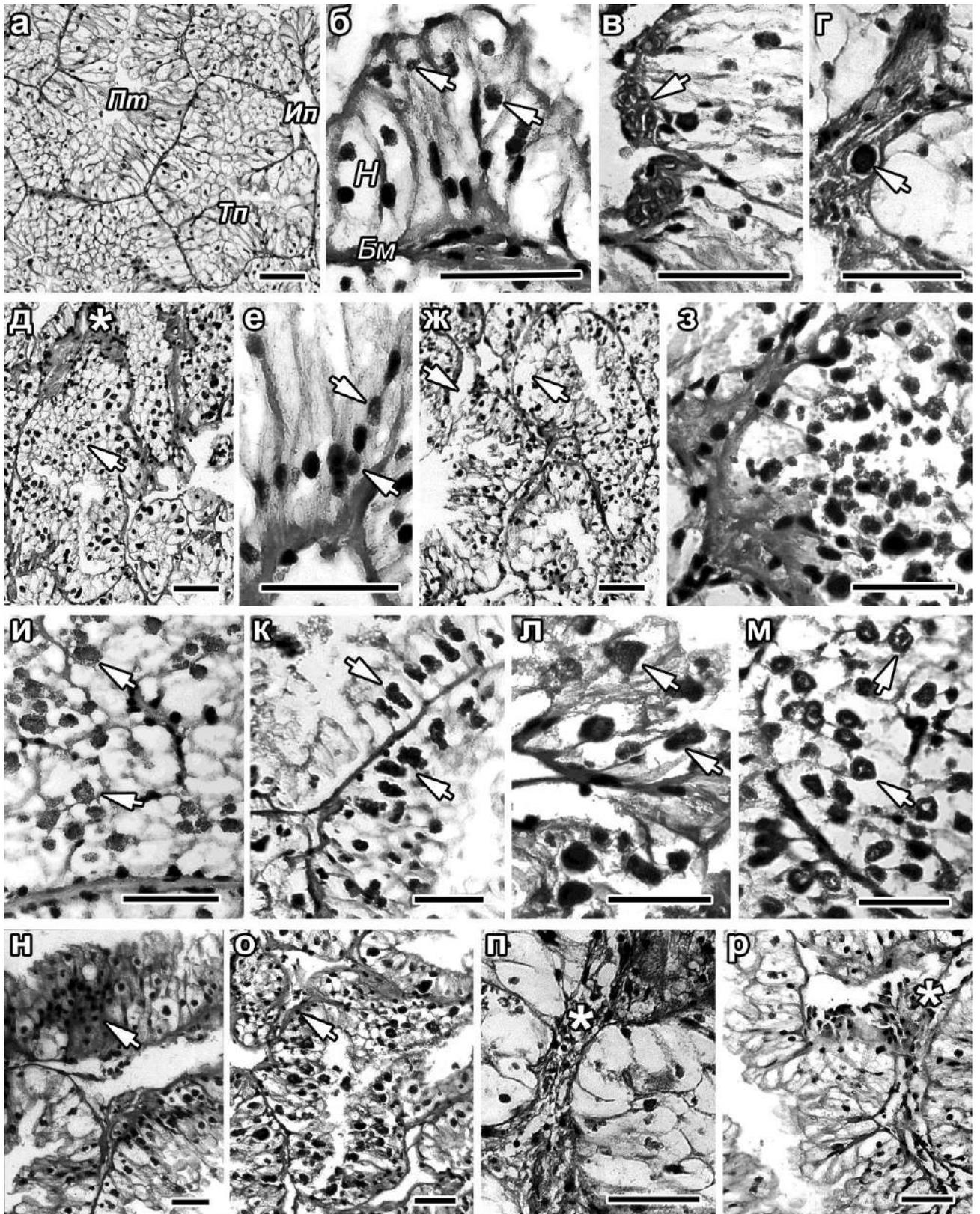


Рисунок 14. Нормальное строение (а, б) и гистопатологические изменения почек *M. kurilensis* (в-р): Тп – трубочка почки, Пт – просвет трубочки, Ип – интерстициальное пространство, Н – нефроцит, Бм – базальная мембрана, стрелки указывают на конкреции; в – не идентифицированный паразит в базальной мембране трубочек (стрелка);

г – спороциста *Nematopsis* sp. (стрелка); д – изменение формы почечного эпителия (стрелка) и разрастание соединительной ткани (фиброз) в просветах между трубочек; е – кариопикноз; ж – гипервакуолизация, атрофия и разрушение нефроцитов, разрыв и оголение базальной мембраны трубочек (стрелки); з – избыточная секреция и накопление конкреций; и – изменение плотности конкреций на более рыхлую (стрелки); к – увеличение размеров конкреций (стрелки); л – изменение формы конкреций на неправильную (многогранная, цилиндрическая, треугольная); м – появление просвета в конкрециях (стрелки); н – гиперплазия нефроцитов (стрелка); о – утолщение базальной мембраны трубочек; п – расслоение базальной мембраны (звезда); р – инфильтрация интерстициального пространства гемоцитами (звезда). Масштабные отрезки – 50 мкм

Анализ встречаемости гистопатологических отклонений в почках моллюсков из импактной акватории показал, что наиболее часто (у 92 % особей) изменяется площадь конкреций в трубочках (с преобладанием 4 степени гистопатологических изменений). У животных из залива Восток этот показатель изменялся слабо (преобладали изменения 1 и 2 степеней) и лишь у 51 % животных. С почти одинаковой частотой на обеих станциях встречались особи с конкрециями аномальной структуры (Спортивная гавань – 73 %, залив Восток – 69 %), однако у животных из импактной акватории преобладала степень выраженности изменений структуры конкреций со значением 6, а на референсной – 5. Несмотря на то, что животные со станции Восток имели значения выраженности числа конкреций только 1 и 2, а со Спортивной – все значения выраженности (от 1 до 6), частота встречаемости данного отклонения на обеих станциях была почти одинаковой (Спортивная гавань – 46 %, залив Восток – 49 %). Более чем в два раза возросло число особей из Спортивной гавани, у которых встречался кариопикноз (35 %), в три раза – число особей, имеющих изменения в толщине базальной мембраны (62 %).

3.3.3 Индекс гистопатологического состояния

Анализ индекса гистопатологического состояния, показал, что наиболее сильные патологические изменения в обоих органах происходили у животных из Спортивной гавани. В таблице 8 представлены суммарные данные классификации гистопатологических изменений и проанализированных показателей почек и ПВЖ *M. kurilensis*. Как видно из данной таблицы, гистопатологические изменения всех исследуемых параметров ПВЖ *M. kurilensis* из импактной акватории были значительно выше, чем у моллюсков, собранных из условно-фоновой (особенно велико это различие в отношении паразитов и

инфильтрации). Также значительные различия между исследуемыми акваториями были обнаружены для патологий, связанных с канальцами почек.

Таблица 8 – Гистопатологический индекс (ГИ) состояния почек и ПВЖ у животных из залива Восток и Спортивной гавани (средняя \pm 95 % доверительный интервал);

* – достоверность различий при $p < 0,05$.

Индекс гистопатологического состояния	Залив Восток	Спортивная гавань	Тест Манна–Уитни	Р
ГИ пищеварительной железы	0,16 \pm 0,05	0,27 \pm 0,05	-3,26	< 0,01*
ГИ трубочки	0,12 \pm 0,05	0,18 \pm 0,05	-2,01	0,04*
ГИ интерстициального пространства	0,19 \pm 0,07	0,34 \pm 0,10	-2,32	0,02*
ГИ паразитарной инвазии	0,19 \pm 0,09	0,40 \pm 0,11	-2,79	< 0,01*
ГИ почек	0,13 \pm 0,02	0,25 \pm 0,05	-2,87	< 0,01*
ГИ трубочки	0,14 \pm 0,02	0,27 \pm 0,04	-3,53	< 0,01*
ГИ интерстициального пространства	0,15 \pm 0,07	0,27 \pm 0,13	-0,82	0,41
ГИ паразитарной инвазии	0,04 \pm 0,05	0,14 \pm 0,12	-1,44	0,15
Общий ГИ (два органа)	0,15 \pm 0,02	0,26 \pm 0,04	-4,26	< 0,01*
ГИ трубочки	0,13 \pm 0,03	0,22 \pm 0,04	-3,19	< 0,01*
ГИ интерстициального пространства	0,17 \pm 0,04	0,31 \pm 0,09	-2,03	0,04*
ГИ паразитарной инвазии	0,22 \pm 0,16	0,62 \pm 0,35	-3,33	< 0,01*

Корреляционный анализ гистопатологических параметров у *M. kurilensis* в совокупности из двух выборок представлен в таблице 9.

Таблица 9 – Корреляционные связи между гистопатологическими параметрами *M. kurilensis* в совокупности из двух исследованных акваторий (коэффициент Спирмена, $p < 0,05$).

Орган	Сравниваемые параметры	Коэффициент корреляции
Пищеварительная железа	Фиброз – Гранулоцитома/фиброма	0,26
	Инфильтрация – Паразитарная инвазия	0,26
	Гипервакуолизация – Инфильтрация	0,32
	Фиброз – Паразитарная инвазия	0,32
	Гранулоцитома/фиброма – Паразитарная инвазия	0,34
	Фиброз – Инфильтрация	0,60
Почки	Гиперплазия – Число конкреций	0,26
	Фиброз – Инфильтрация	0,30
	Кариопикноз – Фиброз	0,30
	Некроз – Число конкреций	-0,33
	Некроз – Форма эпителия	0,34
	Гипервакуолизация – Форма эпителия	0,75

Таким образом, наиболее репрезентативными показателями гистопатологического статуса двусторчатых моллюсков, обитающих в условиях хронического загрязнения, являются: кариопикноз, площадь конкреций, толщина базальной мембраны, форма нефроцитов почек, а также кариопикноз, некроз, гипервакуолизация, инфильтрация, гранулема/фиброма и инвазия ПВЖ.

3.3.4 Корреляционный анализ иммунных и гистопатологических параметров

Корреляционный анализ гистопатологических изменений и показателей иммунитета у *M. kurilensis* в совокупности из всех выборок представлен в таблице 10.

Таблица 10 – Корреляционные связи гистопатологических параметров ПВЖ и почек с иммунными параметрами гемолимфы *M. kurilensis* в совокупности для двух исследованных акваторий (коэффициент Спирмена, $p < 0,05$).

Орган	Сравниваемые параметры	Коэффициент корреляции
Пищеварительная железа	Кариопикноз – SSC гранулоцитов	-0,29
	Кариопикноз – Число агранулоцитов	0,25
	Гипервакуолизация – Доля клеток с АФК	-0,25
	Инфильтрация гемоцитами – Число гранулоцитов	-0,21
	Инфильтрация гемоцитами – SSC агранулоцитов	-0,29
	Инфильтрация гемоцитами – Фагоцитарная активность	-0,3
	Инфильтрация гемоцитами – SSC гранулоцитов	-0,31
	Инфильтрация гемоцитами – Доля клеток с АФК	-0,32
	Фиброз – Число гранулоцитов	-0,25
	Фиброз – Число агранулоцитов	0,25
	Гранулоцитоз/фиброма – Число гранулоцитов	-0,28
	Гранулоцитоз/фиброма – Число агранулоцитов	0,31
	Паразитарная инвазия – Фагоцитарная активность	-0,42
	Паразитарная инвазия – SSC гранулоцитов	-0,32
	ГИ Пищеварительной железы – Фагоцитарная активность	-0,36
	ГИ Пищеварительной железы – SSC гранулоцитов	-0,35
	ГИ Пищеварительной железы – Число гранулоцитов	-0,26
	ГИ Пищеварительной железы – Число агранулоцитов	0,31
	ГИ Интерстициального пространства – Фагоцитарная активность	-0,30
	ГИ Интерстициального пространства – Число гранулоцитов	-0,29
ГИ Интерстициального пространства – Число агранулоцитов	0,29	
ГИ паразитарной инвазии – Фагоцитарная активность	-0,42	
Почки	Форма эпителия – SSC агранулоцитов	-0,25
	Форма эпителия – Фагоцитарная активность	-0,25
	Инфильтрация гемоцитами – Число гранулоцитов	0,21
	ГИ Почки – SSC гранулоцитов	-0,26
	ГИ Почки – Фагоцитарная активность	-0,21
	ГИ Трубочки – SSC гранулоцитов	-0,36
	ГИ Трубочки – Число гранулоцитов	-0,35
	ГИ Трубочки – Фагоцитарная активность	-0,33
Пищеварительная железа и почки	Общий ГИ – SSC гранулоцитов	-0,50
	Общий ГИ – SSC агранулоцитов	-0,43
	Общий ГИ – Фагоцитарная активность	-0,39
	Общий ГИ – Число агранулоцитов	0,25

Среди всех гистопатологических отклонений ПВЖ наибольшее число достоверных связей с различными показателями иммунитета имели кариопикноз, гипервакуолизация эпителия, а также все изменения интерстициального пространства и паразитарные инвазии. Структурные изменения почек меньше коррелировали с иммунными параметрами, и касались в основном изменения формы эпителия и инфильтрации гемоцитами интерстициального пространства.

Общий индекс гистопатологического состояния по двум исследуемым органам имел достоверные корреляционные связи с числом агранулоцитов, гранулированностью (SSC) как агранулоцитов, так и гранулоцитов, а также с ФА. При этом показатель SSC гранулоцитов имел достоверные умеренные связи со всеми проявлениями отклонений (от -0,30 до -0,34), тогда как ФА (-0,42) и SSC агранулоцитов только с паразитарной инвазией (-0,32).

Как видно из таблицы 11, выборочный анализ корреляционных связей, возникающих у животных из отдельно взятых бухт, выявил дополнительные зависимости исследуемых параметров у моллюсков из Спортивной гавани, которые при вычислении корреляций в совокупности по двум акваториям либо ослаблялись, либо нивелировались.

Таблица 11 – Корреляционные связи между гистопатологическими параметрами ПВЖ и почек с иммунными параметрами гемолимфы *M. kurilensis* для каждой акватории (коэффициент Спирмена, $p < 0,05$).

Орган	Сравниваемые параметры	Залив Восток	Спортивная гавань
		Коэффициент корреляции	
Пищеварительная железа	Гипервакуолизация – Число гемоцитов	0,37	-0,22
Почки	Форма эпителия – Число гемоцитов	-0,14	-0,54
	Кариопикноз – Доля клеток с АФК	-0,06	-0,33
	Число конкреций – SSC гранулоцитов	0,41	-0,2
	Инфильтрация – Число гранулоцитов	-0,10	0,34
	Фиброз – Число гранулоцитов	-0,11	0,25
	Фиброз – Доля клеток с АФК	0,29	-0,18
	Паразитарная инвазия – Число гемоцитов	-0,40	0,27

3.4 Физиологическое состояние моллюсков, зараженных *Coscomyxa parasitica*

3.4.1 Выделение и характеристика микроводорослей в постоянной культуре

Выловленные из эвтрофицированных вод Японского моря смешанные друзы представителей семейства Mutilidae содержали моллюсков двух видов: *Crenomytilus grayanus* и *M. kurilensis*. Однако только среди модиолусов были обнаружены животные с деформированной сердцевидной формы с тупым задним краем и широкой щелью между створками раковины, длина которой в среднем составляла 86-126 мм (Рисунок 15а). Иногда на раковине встречались также сильно выступающие концентрические линии скульптуры, свидетельствующие о неравномерном росте моллюсков.

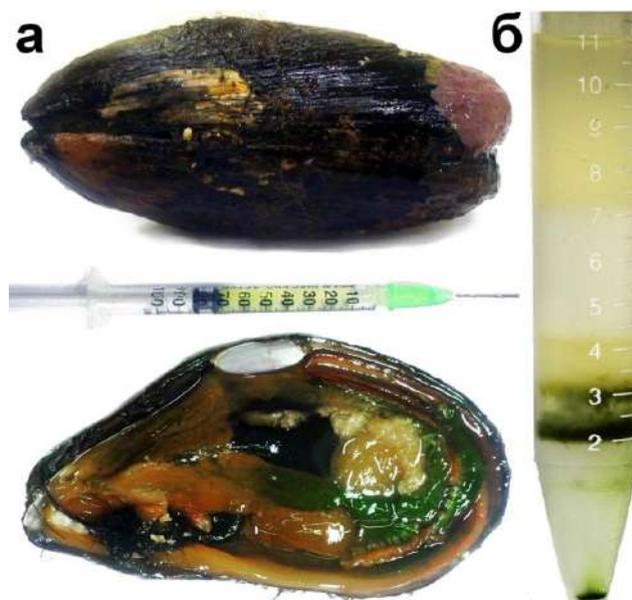


Рисунок 15. Зараженный зелеными микроводорослями *M. kurilensis* с деформированной раковиной (а) и выделение микроводорослей из инфицированных тканей моллюска с фракционированием в градиенте плотности Percoll (б)

В результате препарирования моллюсков с деформированной раковиной, а также некоторых из них без выраженных нарушений внешней морфологии, было обнаружено, что часть органов обильно ослизнены и имеют зеленую окраску как представлено на фотографии рисунка 15а. При детальном макроскопическом осмотре тканей с разной степенью поражения интервентом, было выявлено, что в первую очередь инфицируется водорослями гемолимфа (животные при этом не имели видимых невооруженным глазом очагов инфильтрации водорослями в других органах и тканях), затем задняя кишка (ближе к анусу) и уже позже заражению подвергаются сифоны, мантия, мускул, ткани гонады, жабр и т.д. При значительном заражении мантия становилась основным местом инфицирования – колонии водорослей имели большой размер и более плотную упаковку.

Для получения культуры этих микроводорослей был разработан эффективный метод выделения клеток водорослей из моллюсков с применением механической и ферментативной дезагрегации тканей с последующим фракционированием в градиенте плотности Percoll (Рисунке 15б). Анализ препаратов тканей, обработанных таким способом, показал, что примененные условия получения суспензий клеток являются достаточными для высвобождения большей части клеток водорослей из тканевых депо с сохранением их целостности и жизнеспособности. На рисунке 15б представлен результат центрифугирования полученных суспензий в градиенте плотности Percoll с 4 фракциями, в которых концентрация свободных клеток водорослей увеличивалась с концентрацией разделяющей среды. Фракция 20-25 % содержала главным образом гемоциты с фагоцитированными

водорослями; фракция 25-30 % включала гемоциты с фагоцитированными водорослями, и свободные водоросли, но представленные в малом количестве, чем в последующих фракциях; фракция 30-35 % состояла из больших (6-10 мкм) клеток водорослей и не содержала гемоцитов; осадок на дне пробирки и взвесь во фракции 40 % содержали только маленькие (2-5 мкм) клетки водорослей.

Максимумы поглощения пигментов выделенных водорослей находились в красной и сине-фиолетовой области спектра, а наибольшую флуоресценцию наблюдали в красной области при возбуждении светом длиной волны 556 нм, показывающее преобладание хлорофилла в составе пигментов, что вместе с особенностями морфологии свидетельствует о принадлежности выделенных водорослей отделу Chlorophyta (Рисунок 16 а-б).

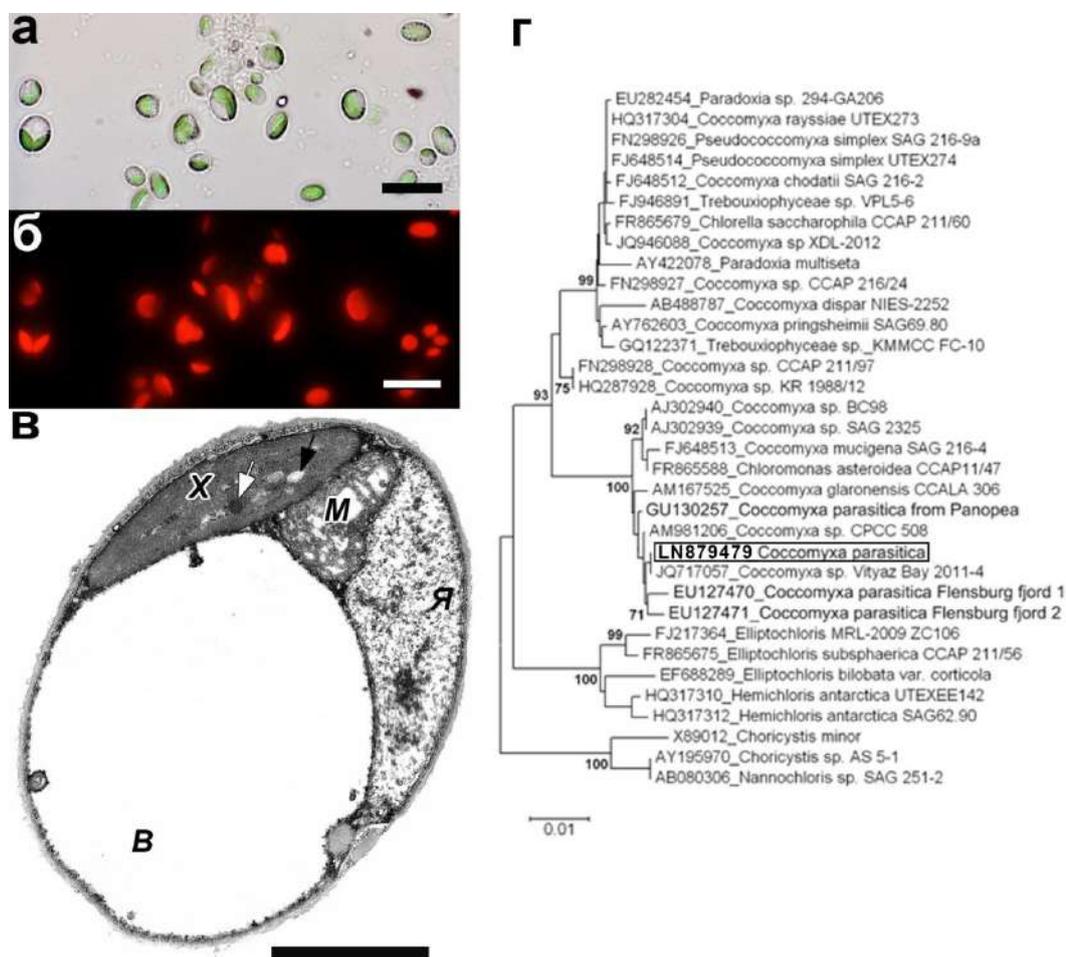


Рисунок 16. Идентификация микроводорослей *C. parasitica*: а – фазовый контраст; б – флуоресценция; в – трансмиссионная электронная микроскопия: ядро (Я), митохондрион (М), вакуоль (В), хлоропласт (X) с крахмальными зёрнами (черная стрелка) и пластоглобулой (белая стрелка); г – филогенетический анализ, проведенный с помощью метода объединения ближайших соседей Соссомухасеае на основе 18S рДНК генов.

Масштабные отрезки: а, б – 12 мкм; в – 2 мкм

Водорослевая природа микроорганизмов была впоследствии подтверждена также трансмиссионной электронной микроскопией (Рисунок 16в), которая показала, что клетки представляют собой сферической или овальной формы одноклеточные эукариотические водоросли 2-10 мкм в диаметре с морфологическими признаками, соответствующими роду зеленых водорослей *Coccomyxa*. Для них характерно наличие одиночного дисковидного ядра, парietального чашеобразного хлоропласта, везикулярных тел, митохондрий, плотной гранулярной цитоплазмы с липидными включениями и запасными тельцами, а также отсутствие флагелл и пиреноидов.

Для определения филогенетического положения исследуемой микроводоросли были сконструированы два новых праймера и построено филогенетическое древо всех 18S rDNA Trebouxiophyceae представленных в GenBank, где несколько семейств образуют отдельные кластеры: Coccomyxaceae, Stenocladaceae, Oocystaceae и Prasiolaceae. Конечная длина выровненных последовательностей доходила в итоге до 1578 н.п. Детальный филогенетический анализ семейства Coccomyxaceae представлен на рисунке 16г и показывает, что все зеленые водоросли семейства разделены на три группы, одна из которых включает недавно описанных членов *C. parasitica* (Rodriguez et al., 2008; Vazquez et al., 2010). Наша последовательность также находится в этой группе, что подтверждает ее идентичность зеленым водорослям *C. parasitica*, полученных от *C. grayanus* (Rodriguez et al., 2008). Зеленые водоросли из *M. kurilensis* идентичны *Coccomyxa* sp. из залива Витязь 2011-4 JQ717057 (100% идентичности), и почти идентичны *C. parasitica* мидий, выловленных в Балтийском море из Фленборг-фьорд 2 (EU127471) и Фленборг-фьорд 1 (EU127470) (99% идентичности).

Последующий анализ выделенных клеток на эпифлуоресцентном микроскопе позволил исследовать развитие и рост культуры *Coccomyxa* в лабораторных условиях. Так, инокуляция 20-50 млн клеток водорослей в 100 мл питательной среды f/2 была неудовлетворительной концентрацией для получения жидкой субкультуры – после нескольких месяцев культивирования видимого роста не наблюдалось. При инокуляции бóльшего количества клеток (100-200 млн клеток на 100 мл среды) выявили стимуляцию активного роста субкультуры уже через несколько дней. Рост культуры поддерживали при 20-22 °C с 16/8 часовым фотопериодом. При таких условиях в лаборатории водоросли в жидкой культуре формировали колонии и давали начало активно растущим субкультурам, постоянно сохраняющимся в коллекции.

Кривая роста культуры с исходной плотностью 10^6 кл/мл на рисунке 17а показывает, что в течение 5 дней культура находилась в латентной фазе – лаг фазе (периоде адаптации), при которой происходило незначительное увеличение числа клеток (Рисунок 18б).

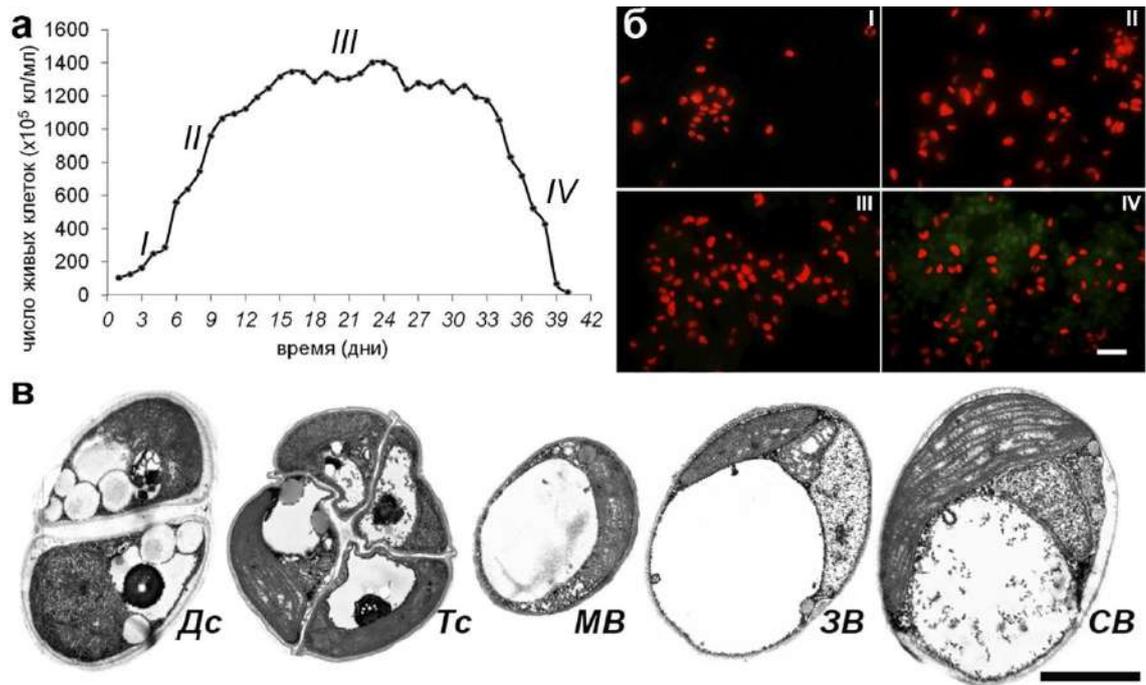


Рисунок 17. Фазы жизненного цикла культуры *C. parasitica*: I – лаг-фаза, II – фаза экспоненциального роста, III – стационарная фаза роста, IV – фаза отмирания (зеленая автофлуоресценция водорослей), Дс – диспора, Тс – тетраспора, МВ – молодая микроводоросль, ЗВ – зрелая микроводоросль, СВ – старая микроводоросль. а – кривая роста культуры; б – флуоресцентная микроскопия, в – трансмиссионная электронная микроскопия фаз жизненного цикла. Масштабные отрезки: б – 12 мкм, в – 2 мкм

Резкий подъем кривой (фаза экспоненциального роста, log-фаза) наблюдался в основном в последующие дни, когда происходил активный рост культуры за счет пролиферации клеток водорослей (Рисунок 17 а-б). Водоросли размножались споруляцией путем образования ди- и тетра-апланоспор (Рисунок 17в). Молодые клетки маленьких размеров ($3,7 \pm 1,1$ мкм) имели четко выраженный одиночный чашеобразный хлоропласт по сравнению со старыми большими ($8,5 \pm 1,4$ мкм) клетками с диффузным хлоропластом. Апланоспорангий варьировал в размере от 2 до 9 мкм. Дескриптивный анализ культуры водорослей показал, что диспоры доминируют по сравнению с тетраспорами: частота встречаемости диспор составила $80,4 \pm 6,3\%$ среди всех делящихся клеток и $24,8 \pm 10,1\%$ от общей биомассы клеток. Тетраспоры имели частоту встречаемости $7,5 \pm 5,4\%$ от общей массы клеток. Как видно на графике рисунка 17а стадия log-фазы завершалась на 16 день. Стационарная фаза роста наступала на 17 сут, во время которой клетки почти прекращали делиться. При достижении концентрации $140 \cdot 10^6$ кл/мл и накоплении продуктов

метаболизма происходило снижение общей биомассы водорослей, которое после 33 суток культивирования приобретало катастрофический характер (фаза отмирания).

Анализ чистоты полученной культуры методом проточной цитометрии с помощью показателей двух видов светорассеяния – прямого (FSC) и бокового (SSC), представленный на рисунке 18, позволил выделить отдельные клетки водорослей (R4) от клеточных фрагментов и других микроорганизмов (R3). Исследование флуоресценции полученных кластеров с использованием дополнительного канала FL4-A показало, что кластеры с наибольшей интенсивностью флуоресценции и высокими показателями FSC содержат живые клетки водорослей, в то время как кластеры с малой интенсивностью флуоресценции и низкими показателями FSC содержат фрагменты клеток водорослей.

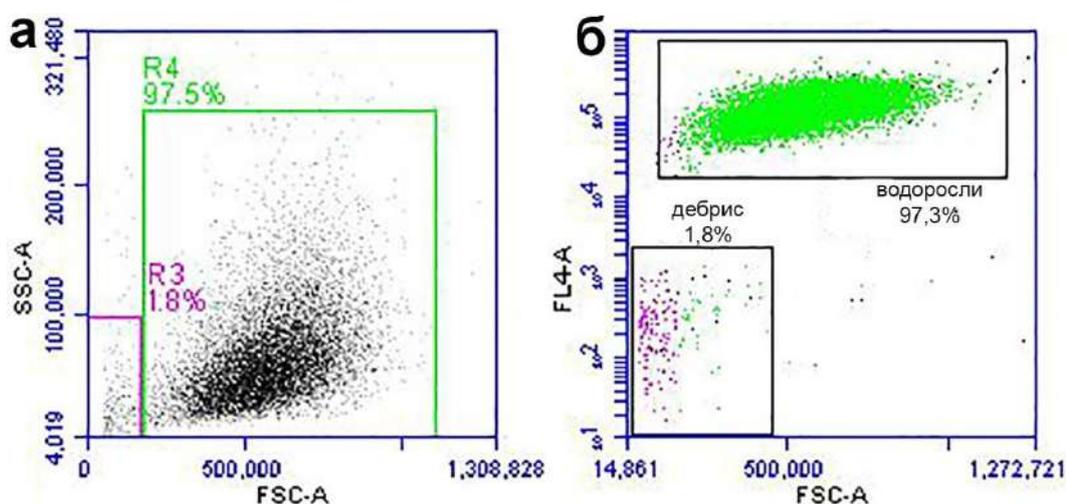


Рисунок 18. Бипараметрические гистограммы прямого светорассеяния (FSC) и бокового светорассеяния (SSC) клеток культуры *C. parasitica* (а) и автофлуоресценции хлорофилла в канале FL4 и FSC (б). R4 – популяция микроводорослей, R3 – дебрис

Таким образом, благодаря разработанной методике выделения клеток водорослей в градиенте плотности Percoll из зараженных моллюсков, была успешно получена чистая культура микроводорослей, подлежащая длительному субкультивированию.

3.4.2 Анализ тканей моллюсков, инвазированных паразитической микроводорослью

Сравнительный гистологический анализ тканей зараженных и не зараженных микроводорослями моллюсков, представленный в таблице 12 и на рисунках 19-26, показал значительные гистоморфологические перестройки и выраженную воспалительную реакцию, за исключением мускула-аддуктора (фотография не представлена), в котором никаких отклонений не было выявлено.

Таблица 12 – Гистопатологические изменения органов *M. kurilensis*, зараженных *S. parasitica*

Орган	Гистопатологические изменения
Жабры	Инфильтрация гемоцитами интерстициального пространства; не регулярное уменьшение числа слизистых клеток; дегенерация промежуточного эпителия (область контакта).
Мантия	Деформация края мантии; увеличение количества слизистых клеток; сужение клеток эпителия; истончение базальной мембраны и наружного циркуляторного мышечного слоя; очаги инкапсуляции водорослей гемоцитами; деформация циркуляторных и продольных мышечных слоев.
Почки	Инфильтрация гемоцитами и водорослями интерстициального пространства; гиперплазия, вакуолизация экскреторного эпителия; увеличение количества конкреций; изменения формы (округление) и размера (уменьшение) клеток; не регулярная дегенерация почечного эпителия трубочек; утолщение базальной мембраны.
ПВЖ	Денудация и утолщение базальной мембраны пищеварительных канальцев; инфильтрация гемоцитами и водорослями интерстициального пространства между пищеварительными и кишечными канальцами; деформация кишечного эпителия.
Гонада	Инфильтрация гемоцитами и водорослями интерстициального пространства.

Мантия здоровых особей (Рисунок 19 а-в) была образована эпителиальными клетками и мышечными волокнами, уложенными в несколько слоев. Между мышцами и эпителием, содержащим слизистые и цилиндрические ресничные клетки (40-42 мкм высотой) находилась базальная мембрана с прилежащими клетками базального слоя, которая при участии наружного циркуляторного мышечного слоя (10-13 мкм толщиной) образовывала микроворсинки мантии. В отличие от здоровых животных у зараженных модиолусов (Рисунок 19 г-е) слои мышечных волокон не имели такого типичного строя и были сильно инфильтрированы водорослями и гемоцитами, с некротическими зонами (Рисунок 19е), что указывает на острую воспалительную реакцию. Цилиарный наружный мышечный слой (5-7 мкм толщиной) и базальная мембрана были значительно деформированы и утончены, микроворсинки практически отсутствовали (Рисунок 19 г-д). Также деформировался слой эпителиальных клеток, которые становились более вакуолизированными у основания, узкими и вытянутыми (45-52 мкм высотой) с преобладаем среди них слизистых клеток, секрет которых покрывал весь эпителий (Рисунок 19г), что хорошо согласуется с данными макроскопического обследования.

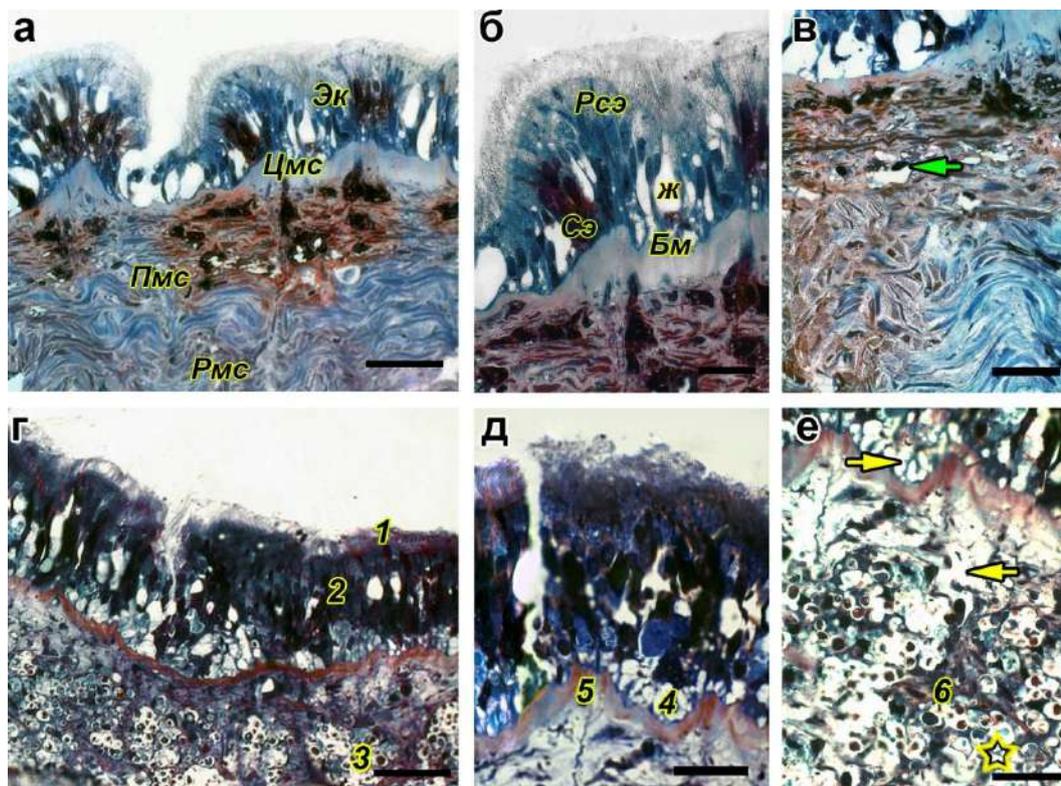


Рисунок 19. Мантия здоровых (а-в) и зараженных *Coccomyxa* (г-е) *M. kurilensis*. Мантия моллюсков образована эпителиальными клетками (Эк) двух типов: ресничный столбчатый эпителий (Рсэ) и слизистый эпителий (Сэ), лежащими на базальной мембране (Бм). Клетки объединяются в группы между которыми располагается желобок (Ж). Под базальной мембраной располагается циркуляторный мышечный слой (Цмс); продольный мышечный слой (Пмс) и радиальный мышечный слой (Рмс), в толще которых можно встретить гемоциты (зеленая стрелка): 1 – увеличение активности слизистых клеток; 2, 4 – сужение и вакуолизация эпителиальных клеток; 3 – деформация продольного и радиального мышечных слоев; 5 – утоньшение базальной мембраны и циркуляторного мышечного слоя; 6 – очаг инкапсуляции водорослей гемоцитами (звезда) и очаги некроза (стрелки).

Масштабные отрезки – 20 мкм

Анализ полутонких срезов почек (Рисунок 20) также показал значительные отклонения в строении этих органов у зараженных особей по сравнению со здоровыми. Так, у моллюсков происходило утолщение (в некоторых участках в десятки раз) базальной мембраны и значительное увеличение числа (гиперплазия) нефроцитов, которые, как правило, имели более округлую и сплюснутую форму и меньшие (20-30 мкм) по сравнению со здоровыми (30-50 мкм) размеры, а также содержали большее число конкреций (Рисунок 20в). Просвет почечных канальцев зараженных моллюсков был зачастую сильно расширен, поскольку был заполнен массой, состоящей из водорослей и фагоцитирующих гемоцитов (Рисунок 20г). Иногда также наблюдалась дегенерация нефроцитов.

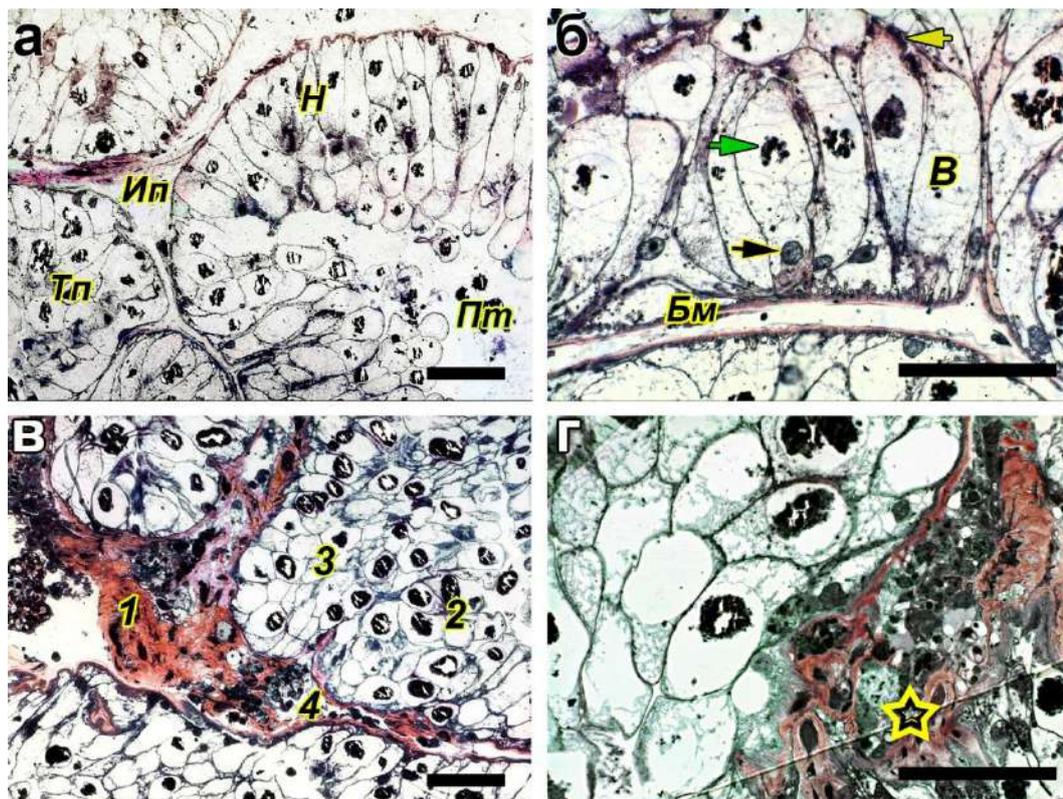


Рисунок 20. Почка здоровых (а-б) и зараженных *Socсотуха* (в-г) *M. kurilensis*. Почка состоит из почечных трубочек (Тп) с просветом (Пт), окруженных интерстициальным пространством (Ип) и состоящих из ресничных (желтая стрелка) столбчатых эпителиальных клеток – нефроцитов (Н), лежащих на базальной мембране (Бм) и содержащих большие вакуоли (В), маленькое ядро (черная стрелка) и конкреции (зеленая стрелка): 1 – утолщение базальной мембраны и фиброз интерстициального пространства; 2 – увеличение числа конкреций; 3 – гиперплазия и вакуолизация эпителия с изменением размера и формы клеток (ошаривание и уменьшение); 4 – инфильтрация интерстициального пространства гемоцитами и фагоцитоз клеток микроводорослей (звезда). Масштабные отрезки – 40 мкм

При анализе ПВЖ моллюсков обеих групп (Рисунок 21) были обнаружены трубочки на разных стадиях пищеварительного цикла, содержащие пищеварительные и базофильные клетки. Однако у зараженных животных (Рисунок 21б) интерстициальное пространство было значительно расширено и заполнено массой из микроводорослей и гемоцитов, а сами трубочки имели более утолщенную базальную мембрану (3-10 мкм) по сравнению с таковой у здоровых животных (2-4 мкм) (Рисунок 21а).

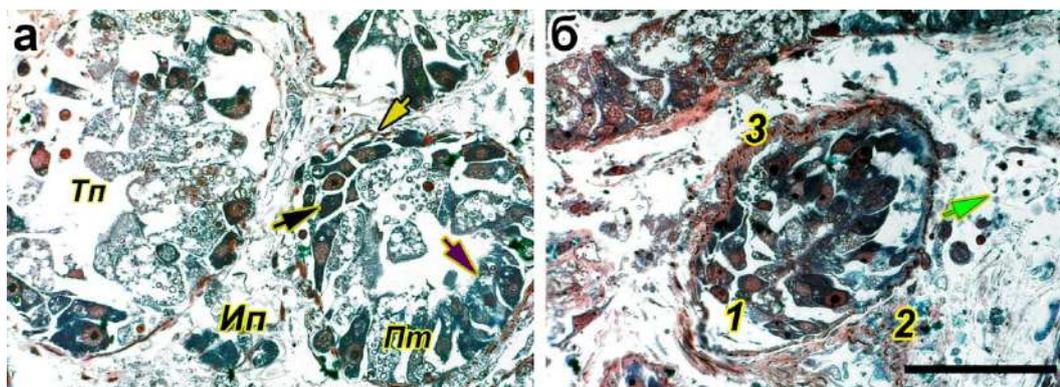


Рисунок 21. Пищеварительная железа здоровых (а) и зараженных *Coccomyxa* (б) *M. kurilensis*. Пищеварительная железа состоит из пищеварительных трубочек (Пт) с просветом (Тп), окруженных интерстициальным пространством (Ип), и состоящих из базофильных (черная стрелка) и пищеварительных (фиолетовая стрелка) клеток, лежащих на базальной мембране (желтая стрелка): 1, 3 – утолщение и оголение базальной мембраны; 2 – инфильтрация гемоцитами интерстициального пространства с инкапсуляцией клеток водорослей (зеленая стрелка). Масштабный отрезок – 50 мкм

Как видно на фотографиях рисунка 22 гонады зараженных и здоровых моллюсков практически не имели морфофункциональных различий и содержали созревающие ооциты, за исключением того, что просветы между ацинусами у зараженных животных были значительно инфильтрованы клетками водорослей и гемолимфы (Рисунок 22б).

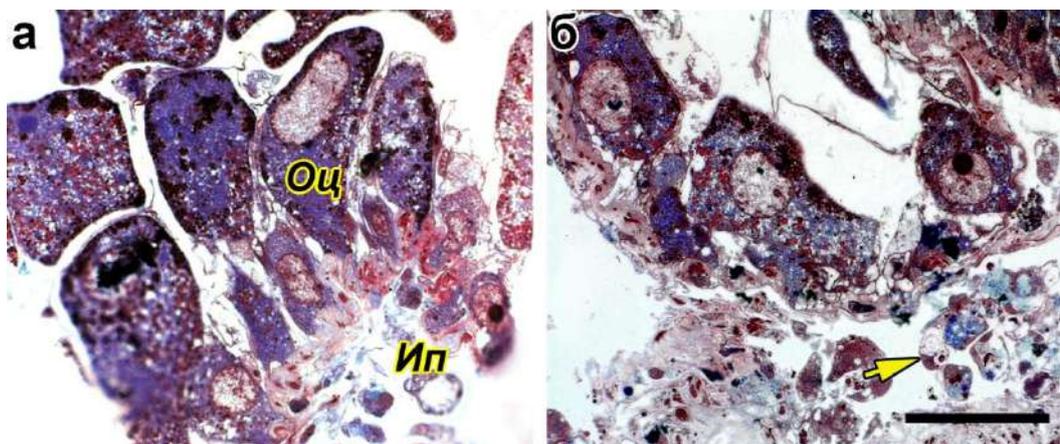


Рисунок 22. Женская гонада здоровых (А) и зараженных *Coccomyxa* (б) *M. kurilensis*. У зараженных животных сфагоцитированные гемоцитами клетки микроводорослей (стрелка) обнаруживаются в интерстициальном пространстве (Ип), при этом микроводоросли не наблюдаются внутри ооцитов (Оц). Масштабный отрезок – 40 мкм

Несмотря на то что, что в жабрах зараженных модиолусов клетки водорослей отсутствовали (Рисунок 23 в-г), они были значительно инфильтрованы гемоцитами

(Рисунок 23г), а в некоторых ктенидиях наблюдалось уменьшение числа слизистых клеток среди цилиарных клеток абфронтальной зоны и дегенерация столбчатых эпителиальных клеток с микроворсинками промежуточной зоны (Рисунок 23в).

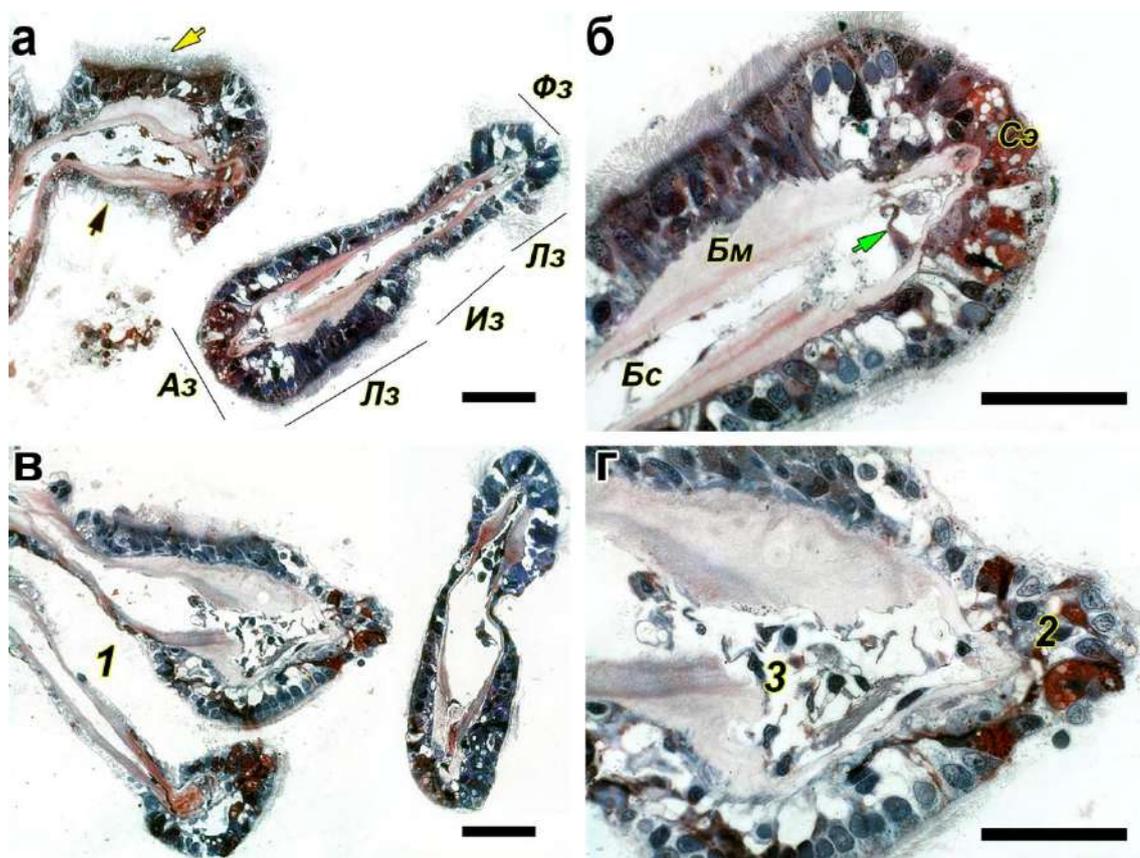


Рисунок 23. Жабры здоровых (а-б) и зараженных *Coccomyxa* (в-г) *M. kurilensis*. Отдельный ктенидий жабр имеет бранхиальный синус (Бс), содержащий гемоциты и мышечные клетки (зеленая стрелка) и состоит из четырех зон (абфронтальной (Аз), фронтальной (Фз), латеральной (Лз) и интермедиальной (Из)), которые различаются типом эпителия и его морфологией. Среди эпителиальных клеток, лежащих на базальной мембране (Бм), различаются слизистый (Сэ), ресничный столбчатый (желтая стрелка) и кубический с микроворсинками (черная стрелка) типы эпителия: 1 – дегенерация эпителия, выражающаяся в исчезновении микроворсинок, ресничек и изменении формы и размера клеток; 2 – уменьшение активности слизистых клеток; 3 – инфильтрация гемоцитами бранхиального синуса. Масштабные отрезки: а, в – 40 мкм, б, г – 20 мкм

Как видно на рисунке 24 в гемолимфе зараженных моллюсков гемоциты окружают конгломераты водорослей и фагоцитируют их.

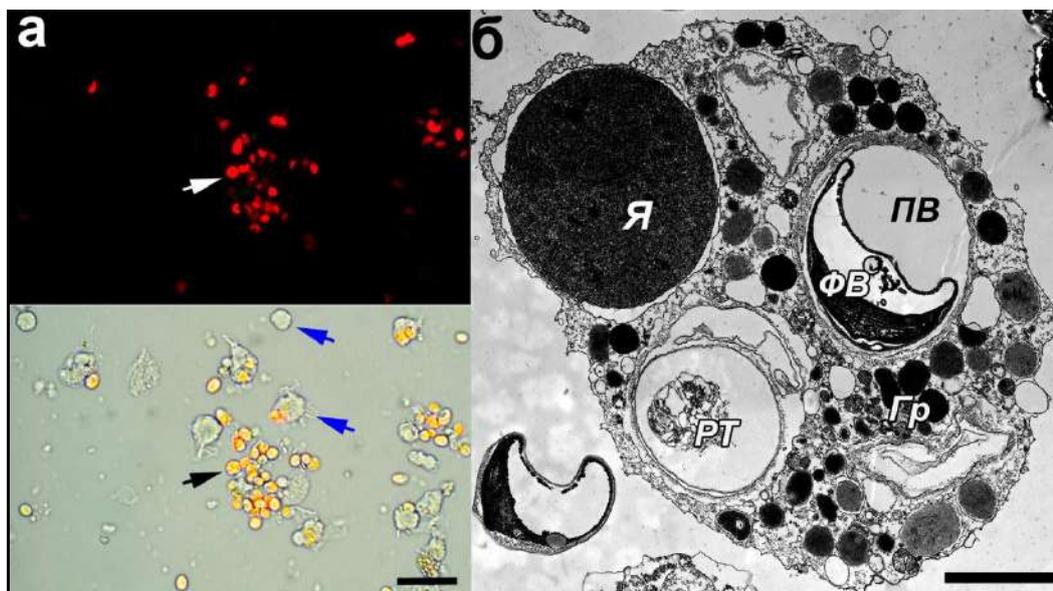


Рисунок 24. Гемоциты *M. kurilensis*, зараженного *Coccomyxa* (а – фазовый контраст и флуоресценция; б – трансмиссионная электронная микроскопия) с активной реакцией *in vivo* фагоцитоза (синие стрелки) клеток микроводорослей (белая и черная стрелки): ядро (Я), гранулы (Гр), пищеварительная вакуоль (ПВ), фагоцитированная микроводоросль (ФВ), ризидуальное/остаточное тельце (РТ). Масштабные отрезки: а, б – 40 мкм, в – 3 мкм

Как было отмечено выше, водорослевые агрегаты и инфильтрация гемоцитами с поглощенными клетками микроводорослей были отмечены во всех исследованных органах моллюсков, за исключением жабр и мускула-аддуктора. Фагоциты, наблюдаемые в инфицируемых тканях, имели, как правило, округлую форму и содержали различное число клеток водорослей (в одном гемоците можно было наблюдать до 8 клеток). Электронная микроскопия подтвердила присутствие многочисленных клеток водорослей в гемоцитах модиолусов (Рисунок 24б).

Анализируя криосрезы органов моллюсков с разной степенью инвазии, а также моллюсков зараженных в ходе эксперимента, нам не удалось выявить «входные ворота» микроводорослей. У моллюсков, зараженных в природных условиях (при начальной степени инвазии) и у моллюсков, зараженных в ходе эксперимента, микроводоросли присутствовали только в гемолимфе. При этом клеток водорослей, мигрирующих через эпителий мантии, кишки, сифона и перикарда не было замечено, хотя кишка практически на всем своем протяжении содержала микроводоросли, при помещении которых в культуральную среду начинался их рост и размножение. У моллюсков со средней степенью инвазии, имеющих окрашенную в зеленый цвет заднюю кишку, уже наблюдалась инфильтрация всех типов тканей этого органа микроводорослями и их свободное перемещение через мышечные и эпителиальные слои (Рисунок 25а). Подобное перемещение также наблюдалось и в мантии

моллюсков с крайними формами инфильтрации микроводорослями (зеленую окраску приобретали кишка, мантия, жабры, мускул, сифон) (Рисунок 25б). Иногда клетки *Coccostuxa* встречались и в гемоцитах на поверхности мантии (Рисунок 25в).

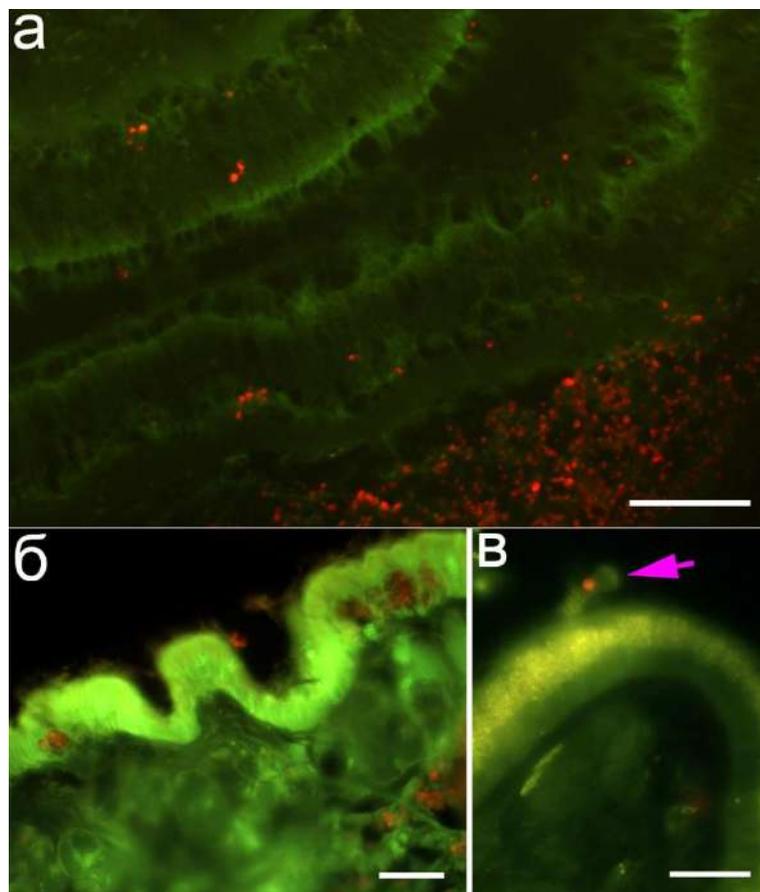


Рисунок 25. Криосрезы кишки (а) и мантии (б, в) *M. kurilensis* 3-4 степени заражения *Coccostuxa* в природных условиях. Стрелка указывает на гемоцит, содержащий микроводоросль. Масштабные отрезки – 50 мкм

Таким образом, сравнительный анализ здоровых и инфицированных особей подтвердил паразитический статус *C. parasitica*, поскольку влияние данной микроводоросли приводило к существенным гистоморфологическим перестройкам органов, свидетельствующим о выраженной воспалительной реакции, сопровождающейся дегенерацией тканей.

3.4.3 Изменение показателей иммунитета моллюсков при заражении *Coccostuxa*

Разработанная методика оценки инвазированности модиолусов, основанная на макроскопическом описании признаков заражения и подсчете числа клеток микроводорослей в гомогенате мягких тканей моллюсков, выявила 4 степени заражения этих

гидробионтов, подробное описание которых представлено в главе Материал и методы (п. 2.2.6.3). Распределение животных по степени инвазии показано на рисунке 26.

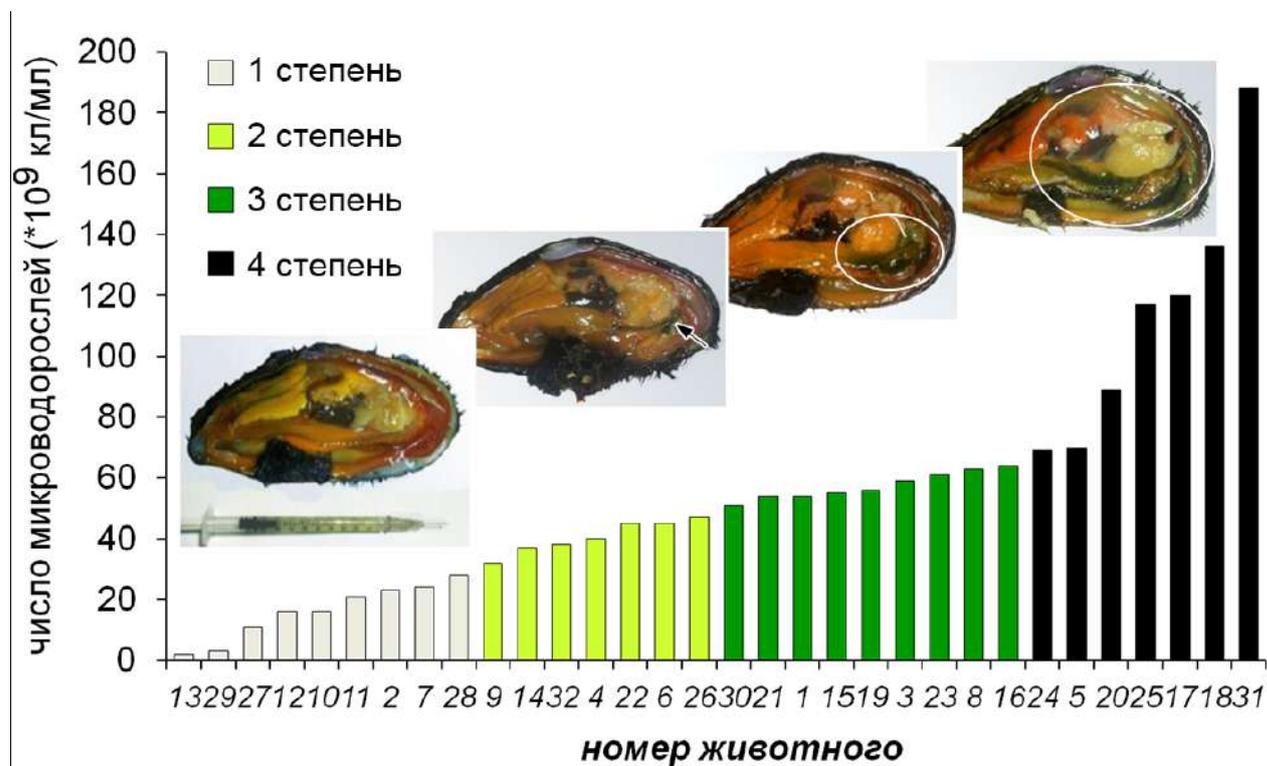


Рисунок 26. Распределение особей *M. kurilensis* по степени инвазии от 1 до 4 (стрелка и овалы указывают на инфильтрацию органов и тканей микроводорослями)

Как видно на гистограмме рисунка 26, в группу животных с первой стадией инвазии вошло 9 особей, у которых количество микроводорослей в теле не превышало $28,2 \cdot 10^9$ кл/мл (среднее значение $15,8 \pm 5,9 \cdot 10^9$). Группу животных со второй степенью инвазии (7 особей) составили представители, число водорослей у которых находилось в пределах от $28,2$ до $41 \cdot 10^9$ кл/мл (среднее значение $40,3 \pm 4 \cdot 10^9$ кл/мл). Животные (9 особей) с количеством микроводорослей от 41 до $60 \cdot 10^9$ кл/мл (среднее значение $57,3 \pm 2,9 \cdot 10^9$ кл/мл) вошли в третью группу. Остальные 7 представителей *M. kurilensis* составили группу четвертой степени инвазии, количество микроводорослей у которых было выше $60,0 \cdot 10^9$ кл/мл (среднее значение $112,5 \pm 31,2 \cdot 10^9$ кл/мл). Максимальное количество микроводорослей, которое было обнаружено у одного из животных из всей выборки, составило $182,0 \cdot 10^9$ кл/мл.

Как видно на рисунке 27, у зараженных моллюсков достоверно повышалось число циркулирующих гемоцитов, их ФА, а также доля среди гемоцитов клеток с АФК и пероксидазой, тогда как емкость гемоцитов (ФИ) понижалась.

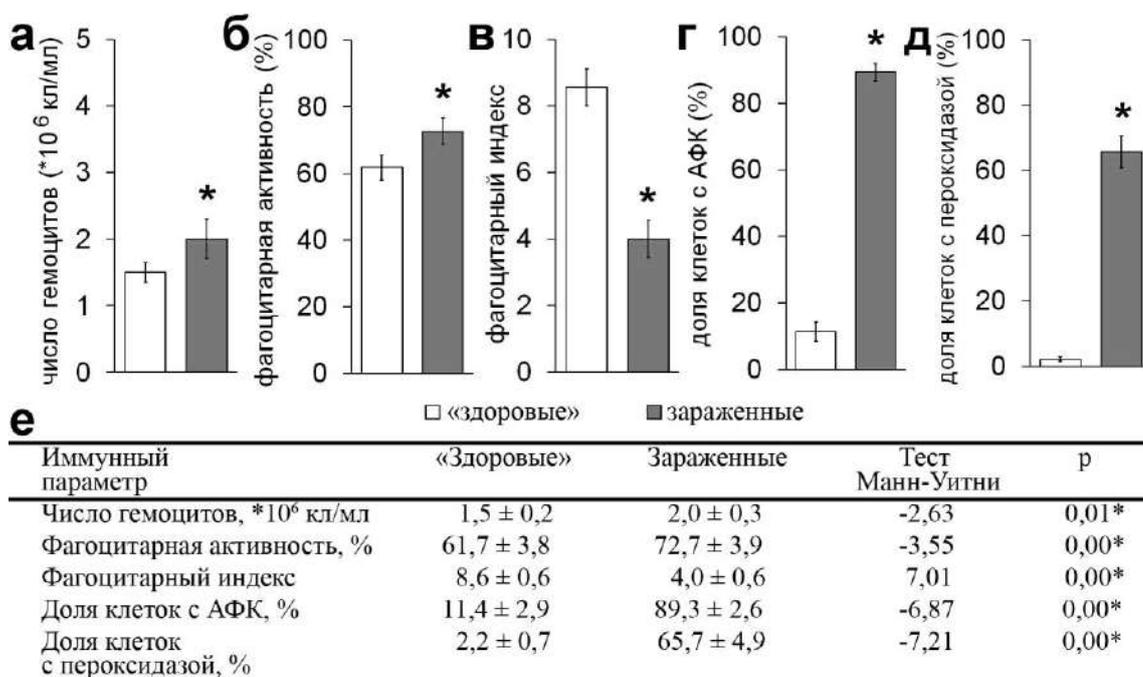


Рисунок 27. Показатели клеточного иммунитета «здоровых» *M. kurilensis* и зараженных *C. parasitica*. Гистограммы и таблица показывают средние значения ± 95 % доверительные интервалы; * – достоверность различий при $p < 0,05$

Для определения достоверности различий измеряемых параметров в зависимости от степени заражения были попарно проанализированы значения этих параметров у животных с разной степенью инвазии. Данные анализа представлены в таблице 13 и на рисунке 28. Так, наиболее сильные различия показателей заметны при сравнении животных 0 степени заражения («здоровых») с животными любой другой степени инвазии (Рисунок 28). У этих особей достоверно различались ($p < 0,05$): ФА и ФИ, а также доля клеток, содержащих АФК и пероксидазу. На начальном этапе инфицирования (0-1) только изменение числа гемоцитов достоверно повышалось с увеличением количества микроводорослей в тканях моллюсков; остальные изменения не имели корреляционных связей с дальнейшим увеличением биомассы водорослей в организме хозяина.

Таблица 13 – Сравнительный анализ выборок животных различных степеней инвазии по показателям иммунитета; * – достоверность различий при $p < 0,05$.

Параметр	Уровень значимости, p									
	0-1	0-2	0-3	0-4	1-2	1-3	1-4	2-3	2-4	3-4
Фагоцитарный индекс	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,87	0,24	0,74	0,00*	0,68	0,19
Фагоцитарная активность	0,05*	0,01*	0,05*	0,03*	0,71	0,54	0,16	0,02*	0,37	0,13
Общее число гемоцитов	0,01*	0,24	0,13	0,24	0,34	0,15	0,64	0,86	0,68	0,65
Число мертвых гемоцитов	0,28	0,20	0,28	0,93	0,83	0,12	0,42	0,14	0,52	0,57
Доля клеток с пероксидазой	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,92	0,30	0,32	0,53	0,81	0,65
Доля клеток с АФК	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	0,15	0,56	0,87	0,24	0,14	0,50

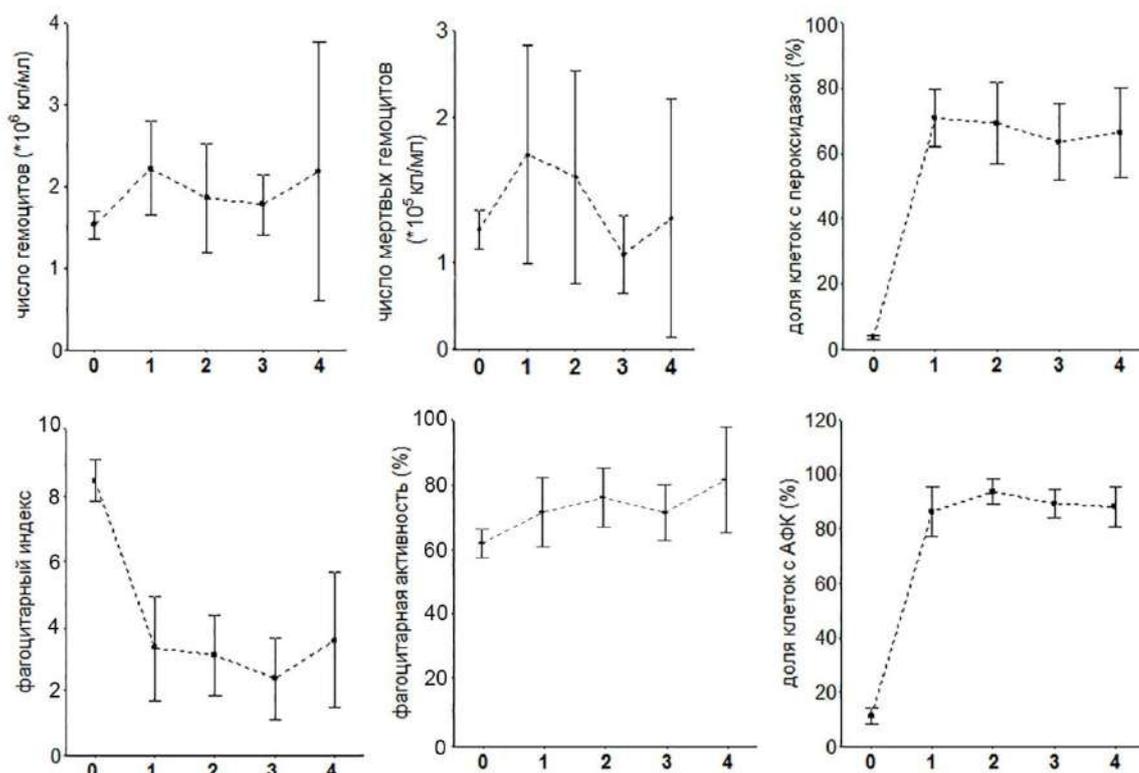


Рисунок 28. Показатели иммунитета *M. kurilensis* с различной степенью инвазии. 0-4 по оси X – степень инвазии. Гистограммы показывают средние значения \pm 95 % доверительные интервалы; - - - тренд.

Корреляционный анализ показателей иммунитета двух выборок животных («здоровых» и зараженных) представлен в таблице 14.

Таблица 14 – Корреляционные связи между показателями иммунитета у животных с различной степенью инвазии (коэффициент Спирмена, $p < 0,05$)

Выборки	Сравниваемые параметры	Коэффициент корреляции
«Здоровые» моллюски	Фагоцитарная активность – Фагоцитарный индекс	0,24
	Фагоцитарный индекс – Количество гемоцитов	-0,20
	Фагоцитарный индекс – Доля клеток с пероксидазой	-0,22
Зараженные моллюски	Количество водорослей – Доля клеток с АФК 3 степени	-0,56
	Количество водорослей – Число мертвых клеток	-0,39
	Количество водорослей – Фагоцитарный индекс	-0,20
	Фагоцитарная активность – Фагоцитарный индекс	0,70
	Фагоцитарная активность – Доля клеток с АФК 1 степени	0,40
	Фагоцитарная активность – Общее число клеток	-0,30
	Фагоцитарный индекс – Доля клеток с пероксидазой	-0,22
	Количество мертвых клеток – Доля клеток с АФК	0,25

У «здоровых» моллюсков показатели слабо коррелировали друг с другом. Однако, слабая корреляционная связь между ФА и ФИ ($R = 0,24$) значительно усиливалась у зараженных моллюсков ($R = 0,70$).

Среди интактных гемоцитов (контроль) апоптотические клетки встречались редко ($7,5 \pm 1,3$ %), доля которых также достоверно не изменялась при инкубировании клеток с бактериями в течение 4 ч ($6,9 \pm 1,7$ %) (Рисунок 29). При инкубировании *in vitro* гемоцитов с клетками *Socсотуха* происходило достоверное и значительное усиление апоптоза ($80,1 \pm 9,3$ %). Достоверное повышение доли апоптотических клеток также наблюдалось у экспериментально зараженных паразитической водорослью животных ($73,6 \pm 17,2$ %). У животных с хронической инвазией уровень апоптотических клеток не отличался от показателей контрольных интактных гемоцитов ($8,2 \pm 1,2$ %). Некротических клеток ни в одном из вариантов препаратов не было обнаружено.

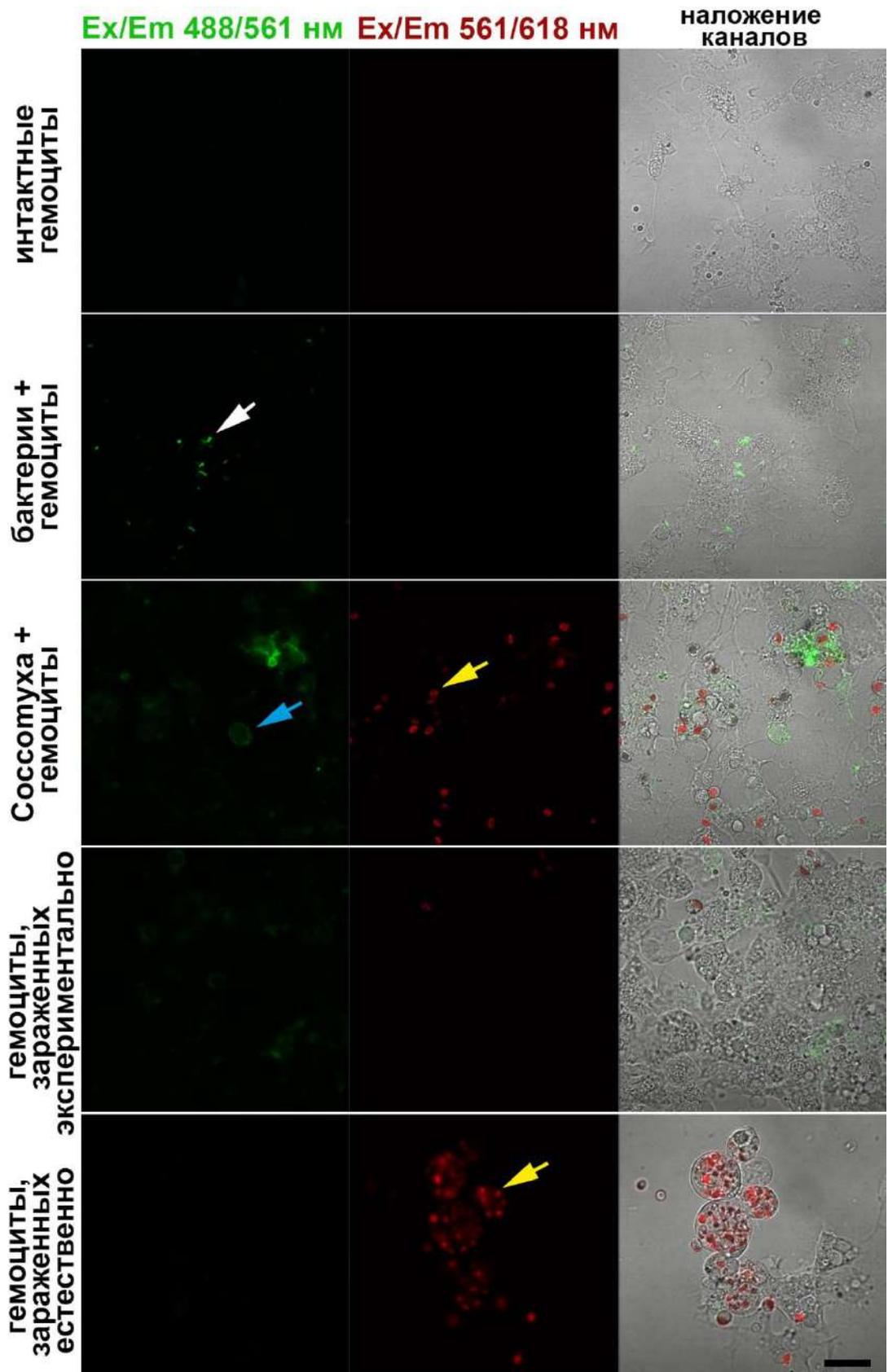


Рисунок 29. Микрофотографии апоптоза гемоцитов, окрашенные Аннексином V-FITC и пропидий йодидом: белая стрелка – бактерии, окрашенные FITC, синяя стрелка – апоптотические клетки, желтая стрелка – хлоропласты микроводорослей.

Масштабный отрезок – 30 мкм

3.5 Интегральный индекс здоровья

Для расчёта интегрального индекса здоровья численные значения всех параметров были нормализованы согласно формуле:

$$P = \frac{P - P_m}{sd}, \quad (11)$$

где P – нормализованное значение параметра;

p – численное значение параметра для каждого моллюска;

p_m – среднее значение исследуемого параметра, рассчитанное для всех выборок;

sd – стандартное отклонение, рассчитанное для всех выборок. В противном случае, для сравнительного анализа было использовано объединенное значение от каждого образца для каждой выборки.

Интегральный индекс здоровья (ИИЗ) или Integral Health Index (ИИ), был рассчитан с помощью разработанной формулы:

$$IHI = \frac{\sum P}{n}, \quad (12)$$

где P – нормализованное значение параметра, который демонстрирует достоверные различия между выборками;

n – число этих параметров.

Для расчёта ИИЗ для каждого моллюска, были использованы числовые значения параметров, демонстрирующих достоверные различия между исследуемыми акваториями.

Для определения минимально необходимого, но достаточного числа параметров, достоверно дифференцирующих выборки из условно-фоновой и импактной акваторий, было использовано несколько вариантов их сочетания (как показывающих достоверные различия между выборками, так и нет) (Таблица 15).

Таблица 15 – Сравнительный анализ ИИЗ; * – достоверность различий при $p < 0,05$.

Вариант сочетания параметров	Тест Манна–Уитни	p
ИИЗ всех параметров почки	-2,72	0,0066*
ИИЗ всех параметров ПВЖ	-2,87	0,0041*
ИИЗ всех параметров ПВЖ и почки	-3,87	0,0001*
ИИЗ различающих параметров почки	-1,66	0,0968
ИИЗ различающих параметров ПВЖ	-2,87	0,0041*
ИИЗ различающих параметров почки и ПВЖ	-3,25	0,0011*
ИИЗ, включающий число гемоцитов, ФА, ФИ, долю клеток с АФК и пероксидазой	-1,37	0,1720
ИИЗ, включающий концентрацию, FSC, SSC гемоцитов	-2,72	0,0066*
ИИЗ всех параметров иммунитета и концентрации, FSC, SSC гемоцитов	-2,26	0,0236*
ИИЗ, включающий число гемоцитов, ФА, долю клеток с АФК	-1,14	0,2550
ИИЗ концентрация гемоцитов, FSC, SSC гемоцитов, ФА, доля клеток с АФК	-2,64	0,0083*
ИИЗ по всем гистопатологическим и иммунным параметрам	-3,99	0,0001*
ИИЗ по всем различающимся гистопатологическим и иммунным параметрам	-4,07	0,0000*

Как видно из Таблицы 15, ИИЗ показал достоверные различия между выборками практически во всех вариантах его сравнения. Наиболее сильные различия были выявлены при использовании минимального набора параметров, которые достоверно различались между выборками животных, и включали как иммунологические (ФА, число гемоцитов, доля клеток с АФК, число агранулоцитов, их и гранулоцитов размер и степень гранулированности), так и гистопатологические параметры (площадь конкреций, толщина базальной мембраны трубочки, форма и кариопикноз нефроцитов почек, гипервакуолизация, кариопикноз, некроз, инфильтрация и паразитарная инвазия ПВЖ).

Для расчёта ИИЗ моллюсков, зараженных зелеными микроводорослями, также использовали числовые значения иммунных параметров, достоверно различающиеся у моллюсков с разной степенью инвазии (число гемоцитов, ФА, ФИ, доля клеток с АФК и пероксидазой, концентрация общего белка в плазме). Расчеты проводили подобным же образом для нескольких моделей: в первой модели сравнительный анализ ИИЗ проводился только между выборками животных 0 и 1 степенью инвазии, который показал значительные ($p = 0,01$) различия между животными. Во второй модели ИИЗ рассчитывали для животных 0 и 2 степени инвазии, в результате чего также была выявлена достоверная ($p = 0,002$) разница между выборками, которая усиливалась в третьей модели ($p = 0,001$) при сравнении животных 0 и 3, а также 0 и 4 ($p = 0,0003$).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Морфофункциональные особенности гемоцитов *M. kurilensis*

На сегодняшний день уже не осталось сомнений, что гемоциты играют центральную роль в иммунной защите двустворчатых моллюсков. Однако точные механизмы, лежащие в основе их функциональных различий, изучены лишь частично, что в свою очередь и не позволяет выработать единую систему их классификации. Такая ситуация могла возникнуть из-за отсутствия единого методологического подхода к выделению клеточных популяций гемолимфы. Среди всех известных в настоящее время методов, достаточно архаичным, но простым и общепризнанным методом является разделение гемоцитов на агранулоциты и гранулоциты по способности окрашиваться морфологическими красителями, например, по Романовскому-Гимза, Май-Грюнвальд-Гимза или Паппенгейму. Однако этот метод слабо отражает функциональные особенности клеточных популяций и поэтому в настоящее время несёт только вспомогательную функцию. Другим, более современным способом, является фракционирование гемолимфы с помощью цитометров или путем центрифугирования в градиенте разделяющих сред. Несмотря на то, что последний метод уже давно входит в ранг классических, он до сих пор используется для препаративного выделения отдельных клеточных популяций. В настоящем исследовании гемоциты *M. kurilensis* сначала были отсортированы с помощью проточной цитометрии и центрифугирования в градиенте плотности Percoll на три клеточных типа: малые и большие агранулоциты, и гранулоциты, которые в последствии были комплексно охарактеризованы с помощью морфологических и функциональных методов, в результате чего гранулоциты дополнительно были разделены на эозинофильные и базофильные. Подобные группы клеток были идентифицированы с использованием данных методов и у других представителей семейства Mytilidae (Feng et al., 1977; Moore, Lowe, 1977; Cheng 1981; Pipe, 1990; Carballal et al., 1997; Hine, 1999; Anisimova, 2012; Wootton et al., 2003; Ottaviani, 2006; Tame et al., 2015).

Как и у всех митилид гемолимфа *M. kurilensis* состояла преимущественно из гранулоцитов – высокозернистых клеток различного размера ($85,79 \pm 0,97$ %), что согласовывается с ранее опубликованными работами Анисимовой (2012) и Гринченко с коллегами (2014), где применяя проточную цитометрию, как основной метод анализа, авторы в гемолимфе этого же вида моллюсков также выявили доминирование гранулоцитов (53-63 %). Однако этот метод не является достаточным для полноценной характеристики гемоцитов.

В результате дальнейшего комплексного обследования гемоцитов *M. kurilensis* нам удалось выделить 4 субпопуляции клеток, самой малочисленной ($2,20 \pm 0,85$ %) среди которых были слабобазофильные, малодифференцированные мелкие ($5,81 \pm 1,54$ мкм) с

БДУ-положительным ядром агранулоциты, которые в своей цитоплазме кроме митохондрий и рибосом практически ничего не содержали и не проявляли никакой иммунной реактивности. У *T. philippinarum* подобные клетки имели веретено деления и были положительны в отношении антител против CD34 человека, которые характерны для гематопозитических клеток млекопитающих (Matozzo et al., 2008). Таким образом, основываясь на полученных данных, обнаруженные нами в верхней фракции Percoll клетки были отнесены по аналогии с другими авторами (Hine, 1999) к гемобластам, основная функция, которых, вероятно, заключается в процессе своей дифференцировки давать начало другим клеточным типам циркулирующих гемоцитов.

Другой тип агранулоцитов, располагающийся в самой нижней фракции Percoll, был представлен более крупными клетками ($24,11 \pm 2,40$ мкм), в цитоплазме которых не обнаруживалось каких-либо везикул, но она вся была равномерно заполнена хорошо развитым белоксинтезирующим аппаратом, полисомами, ГЕР и митохондриями. Несмотря на то, что цитоплазма этих клеток практически не окрашивалась по Май-Грюнвальду, среди всех клеточных популяций данные гемоциты давали наиболее выраженную реакцию на МПО, кислые белки, гликоген и нейтральные полисахариды. Хотя агранулоциты и проявляли хорошую фагоцитарную активность, поглощая за отведенный промежуток времени большее по сравнению с гранулоцитами число бактерий ($11,05 \pm 2,07$), содержание акридин-меченых лизосом, КФ и актина в этих клетках все же значительно уступало таковому в эозинофильных гранулоцитах. Подобная картина иммунной реакции агранулоцитов была также выявлена у *M. galloprovincialis* (Carballal et al., 1997; Gomez-Mendikute et al., 2002) и *M. edulis* (Foll et al., 2010). А у трех видов *Bathymodiolus* (Tame et al., 2015) и *T. crocea* (Nakayama et al., 19976), а также *C. edule* (Russell-Pinto et al., 1994) агранулоциты вообще не проявляли ФА, что может быть связано с антигенной специфичностью клеток. Так, Такаши и Мори (2000), исследуя фагоцитарную способность гемоцитов *C. gigas* против трех различных видов бактерий, формализированных эритроцитов, дрожжевых клеток, убитых нагреванием, и латексных шариков, выявили, что гранулоциты проявляют высокую ФА против всех протестированных видов бактерий и дрожжевых клеток, тогда как агранулоциты – слабую, за исключением формализованных эритроцитов и латексных шариков. При оценке влияния присутствия тех или иных паразитов в организме *M. galloprovincialis* было выявлено, что *M. refringens* вызывает увеличение числа циркулирующих агранулоцитов, *U. cyprinae* индуцирует прирост гранулоцитов (Carballal et al., 1998), а *B. ostreae* вызывает прирост агранулоцитов в гемолимфе *O. edulis* (Chagot, 1989). Тогда как Оубелла с коллегами (1994) сообщили о значительном уменьшении числа агранулоцитов и увеличении доли гранулоциты у *R philippinarum* при атаке *V. tapetis*, а

Сантарем с коллегами (1994) выявили возрастание концентрации агранулярных гемоцитов у *M. galloprovincialis* при заражении *Mytilicola intestinalis*, что еще раз указывает на различную реактивность агранулоцитов и гранулоцитов против различных патогенов. Несмотря на то, что большинство авторов (Hine, 1999; Donaghy et al., 2015; Prado-Alvarez et al., 2013) указывают, что агранулоциты содержат меньше АФК по сравнению с гранулярными гемоцитами, и даже после антигенной стимуляции (Lambert et al., 2007), а у *R. decussatus*, *S. edule* и *S. japonica* АФК вообще не обнаруживаются в гемоцитах (Bugge et al., 2007), нами было установлено, что уровень АФК как в эозинофильных гранулоцитах, так и в агранулоцитах *M. kurilensis* примерно одинаков (41 % клеток в каждой из групп гемоцитов содержали АФК). Вероятно, это связано с большим по сравнению с другими типами гемоцитов содержанием в агранулоцитах МПО и митохондрий, выступающими в качестве источников АФК, что согласуется с работой Донагхи (2015). В 2015 г. Донагхи, предложил экспериментально обоснованную схему производства АФК в гемоцитах, согласно которой в стимулированных клетках производство радикалов происходит цитоплазматической НАДФН-оксидазой, синтазой оксида азота или МПО, а в нестимулированных – митохондриями, пероксисомами и эндоплазматическим ретикулум. И поскольку, известно, что киллинг антигенов может осуществляться кислород-зависимым и независимым путями, то вероятно, агранулоциты осуществляют уничтожение чужеродных агентов как раз в основном только благодаря АФК. Как было показано в работе Тэрахара и коллег (2006) их участие в фагоцитарной реакции в отличие от гранулоцитов регулируется интегрин-зависимым механизмом. Возрастание в гемолимфе числа агранулоцитов у *M. galloprovincialis* (Carballal et al., 1998), *Dreissena polymorpha* (Evariste et al., 2016) и *R. philippinarum* (Hong et al., 2014), и уменьшение их у *S. gigas* (Terahara et al., 2006) при снижении гликогенных и липидных резервов во время нереста, детектируемое нами изменение числа агранулоцитов в гемолимфе в первые часы после травмирования моллюсков и зафиксированное Радделлом (1971) участие агранулоцитов, богатых гликогеном и осмиофильными структурами, в заживлении раны, а также обеспечение агранулоцитами инкапсуляции паразита *H. nelsoni* (Bower, McGladdery, 1994) и цестод *Tylocephalum* (Rifkin et al., 1969), указывает на их исключительную роль именно в физиологических процессах, таких как транспорт питательных веществ и метаболитов, регенерация тканей и органов (Cheng, 1984; Suzuki et al., 1991; Delaporte et al., 2007; Samain et al., 2007). Таким образом, мы предполагаем, что миссия агранулоцитов реализуется в основном на ранних стадиях воспаления и заключается в миграции в сторону хемоаттрактанта (вероятнее всего в качестве которого выступают поврежденные ткани в

результате инвазии или травмы), осуществлении клиринса тканей и участии в образовании соединительнотканной «пробки» в случае с травмой или капсулы при паразитарной инвазии.

Несмотря на функциональную «уникальность» агранулоцитов показано, что, они имеют практически одинаковый с гранулоцитами состав антимикробных пептидов, представленных четырьмя классами: митицины, митимицины, митилины и дефензины (Cantet et al., 2012; Venier et al., 2013; Allam, Raftos, 2015). Помимо этого, оба класса клеток продуцируют одинаковый набор ферментов, но чаще всего ЩФ, ФО и пероксидаза более активны в гранулоцитах (Cheng, 1981; Xing et al., 2008). Ультраструктурное исследование локализации ряда гидролитических ферментов в гранулярных гемоцитах *M. edulis* показало присутствие арилсульфатазы, глюкуронидазы и эластазы в больших гранулах, а лизоцима и катепсин В – во всех гранулах (однако при высоких разведениях первичное антитело против лизоцима также ограничивалось крупными гранулами). Антитела к катепсину G показали четкую дискретную маркировку небольших гранул (Pipe, 1990). Позже, Коулс и Пайп (Coles, Pipe, 1994) показали преобладание в маленьких периферийных гранулах эозинофилов *M. edulis* пероксидазной активности (однако не все эозинофилы были позитивны на пероксидазу). В нашем исследовании у *M. kurilensis* также было выявлено преобладание лизосом, фосфатаз и АФК у эозинофильных гранулоцитов. Помимо большего содержания везикул, эти клетки имели крупные пероксисомы и хорошо развитый актиновый цитоскелет, что в комплексе обеспечивало им наиболее высокую ФА по сравнению с другими клеточными типами (примерно 80 % клеток данной фракции поглощали флуоресцентно меченых бактерий). Подобные результаты о ключевой роли эозинофильных гранулоцитов в осуществлении фагоцитарной реакции организма были получены также для *M. edulis* (Pipe et al., 1997), *C. edule* (Russell-Pinto et al., 1994), *C. gigas* (Wang et al., 2017), *Bathymodiolus* (Tame et al., 2015) и других моллюсков (Allam, Raftos, 2015).

Помимо выше описанных характерных для митилид типов гемоцитов, как и Анисимова (2012), мы выявили присутствие в гемолимфе еще одного типа клеток – базофильных гранулоцитов, характеризующихся наименьшими по сравнению с эозинофильными гранулоцитами размером и числом ($14,21 \pm 0,34$ %). На основе цитометрического анализа Анисимова охарактеризовала данный тип клеток как полугранулоциты – гранулярные клетки, находящиеся на ранней стадии дифференцировки. Результаты нашего исследования показали, что эти клетки содержат мелкие электронно-светлые гранулы, большое число стопок диктиосом аппарата Гольджи, проявляют наиболее интенсивную окраску на кислые белки среди всех других клеточных типов, являются единственными клетками, которые дают хоть какую-то реакцию на основные белки, имеют низкое содержание актина, АФК и КФ, обладают низкой ФА, но дают умеренную реакцию

на лизосомы. Таким образом, эти клетки действительно могут представлять собой, например, переходную форму клеток между базофильными гемобластами и эозинофильными гранулоцитами, или же все-таки быть самостоятельным клеточным типом, функция которого нам до конца не ясна. Однако о присутствии в гемолимфе мителид переходных форм, как гранулоцитов, так и агранулоцитов достаточно редко сообщается в литературе (Garcia-Garcia et al., 2008; Parisi et al., 2008). Анализ ФА у *Bathymodiolus* показал (Tame et al., 2015), что наиболее активными фагоцитами у этих моллюсков являются эозинофилы (68-74 %), тогда как базофилы вступают в реакцию фагоцитоза значительно реже (12-16 %). Более того по прошествии 2 ч с момента поглощения базофильными гемоцитами антигена, он все еще остается интактным в их цитоплазме (а в некоторых случаях даже и после 24 ч). В пользу теории происхождения базофилов и эозинофилов из одной линии клеток выступает работа Секина с коллегами (2016), в которой показано перекрестное связывание МАб группы В как с небольшим количеством эозинофильных гранулярных клеток, так и с базофильными гемоцитами *B. japonicus*. Общие эпитопы между базофильными и эозинофильными гранулярными типами клеток также были описаны Ноэлем и коллегами (1994) у *M. edulis*.

Дальнейшее исследование субпопуляций гемоцитов *M. kurilensis* в сочетании с транскриптомным анализом позволит более полно охарактеризовать функциональную дифференциацию гемоцитов необходимую для их типирования.

4.2 Вариативность показателей иммунитета *M. kurilensis* в условиях относительной нормы

Прибрежные морские экосистемы испытывают все нарастающее давление со стороны природных, климатических и антропогенных факторов. За последние два десятилетия было приложено много усилий для разработки инструментов мониторинга состояния этих экосистем. Двустворчатые моллюски, такие как мидии и устрицы, являясь одними из доминирующих групп животных среди бентосных сообществ, ввиду их малоподвижного образа жизни и биоаккумулирующей особенности наиболее часто используются в качестве видов-индикаторов состояния среды обитания (Beyer et al., 2017; Azizi et al., 2018). В работах по исследованию адаптации наиболее массовых видов Японского моря *M. kurilensis* и *S. grayanus* к различным условиям среды, показана большая выживаемость на заиленных грунтах модиолусов, способных более эффективно осуществлять фильтрацию в условиях повышенной концентрации взвеси (Селин, 2018). Кроме того обнаружено, что модиолусы по сравнению с мидиями являются более сильными аккумуляторами тяжелых металлов, очевидно, вследствие их адаптации к обитанию на обогащенных микроэлементами мягких грунтах (Христофорова и др., 1993; Shulkin et al., 2002) и более эффективной системы

детоксикации и выведения тяжелых металлов (Подгурская, Кавун, 2005). Как отмечает Шулькин и его коллеги (Shulkin et al., 2002) у мидий накопление в тканях кадмия и цинка происходит достаточно долго и регулируется самим организмом, что ограничивает возможность использования данного вида моллюсков для отслеживания антропогенного поступления биодоступных форм этих металлов. Таким образом, несмотря на отсутствие промысловой значимости, *M. kurilensis* за счет своих адаптационных способностей, позволяющих ему выживать в более неблагоприятных условиях, чем сопоставимый с ним по численности вид *S. grayanus*, может быть использован в качестве вида-индикатора.

Ключевое требование, предъявляемое к диагностическим технологиям в программах мониторинга – это определение в первую очередь нормальных или «эталонных» диапазонов значений тех или иных параметров биомаркеров для дифференциации естественной вариации данного показателя от изменений, связанных с влиянием какого-либо фактора. Такие референсные диапазоны могут быть определены с помощью контролируемых лабораторных экспериментов, где организмы подвержены действию единичных стрессоров. Однако интерпретация этих диапазонов применительно к естественным системам с несколькими флуктуирующими переменными может быть проблематична. Поэтому в качестве более практичной альтернативы контрольные диапазоны лучше определять в естественных природных системах.

Нами установлено, что средние значения показателей фагоцитоза, как основного механизма клеточно-опосредованной иммунной защиты беспозвоночных, в выборках животных из условно-фоновых акваторий (бухта Киевка, залив Восток, бухта Троицы) достоверно не различались, за исключением ФИ у особей из бухты Троицы, которые характеризовались незначительным, но достоверным снижением данного параметра. В результате ФА для всей совокупности животных из всех исследованных акваторий составила $52,0 \pm 1,8\%$, а ФИ – $4,1 \pm 0,1$. Поскольку межгодовая оценка ФА гемоцитов популяций животных из залива Восток показала метастабильные значения, не выбивающиеся за пределы диапазона вариативности ФА, характерной для моллюсков из всех условно-фоновых акваторий, то в качестве референсной акватории был выбран именно залив Восток, имеющий промежуточное географическое положение, а также полевые и экспериментальные лабораторные работы в котором были технически более доступными из-за наличия хорошо оснащенной Морской биологической станции «Восток» ННЦМБ ДВО РАН.

Следующим этапом разработки диагностического критерия является выбор подходящего биомаркера и определение эффекта влияния на него вмешивающихся факторов, основными среди которых являются репродуктивный статус, пол и возраст. Вариабельность параметров гемоцитов в зависимости от размера / возраста мало изучена

(Carballal et al., 1997; Lopez et al., 1997b; Carballal et al., 1998; Barracco et al., 1999; Flye-Sainte-Marie et al., 2010), а явное влияние возраста на параметры гемоцитов обнаруживалось редко. Как и в нашем исследовании у *R. philippinarum* старшего возраста (Flye-Sainte-Marie et al., 2010) наблюдалось снижение ФА гемоцитов, что было обусловлено сужением границ вариативности данного показателя. Кроме того Флай-Санте-Мари с коллегами (2010) и Карбаллал с коллегами (1998) обнаружили, что с возрастом у *R. philippinarum* и *M. galloprovincialis* происходит значительное увеличение числа циркулирующих гемоцитов, в том числе доли гранулоцитов.

Как и в ранее проведенных исследованиях (Barracco et al., 1999; Gagne et al., 2006; Flye-Sainte-Marie et al., 2010), посвященных исследованию влияния пола на защитные механизмы моллюсков, так и в нашей работе, половых различий у двустворчатых моллюсков в параметрах гемоцитов (в том числе защитных) не обнаружено. Однако Матоццо и Марин (Matozzo, Marin, 2010), проводя исследования с *R. philippinarum*, а также Дюшемен с коллегами (2007) с *C. gigas*, выявили различия в фагоцитарной способности гемоцитов у особей разного пола: гемоциты самок более эффективно уничтожали антигены по сравнению с самцами. Несмотря на то, что содержание клеток в гемолимфе не зависело от пола ни у тихоокеанских устриц *C. gigas* (Duchemin et al., 2007), ни у мидий *Perna perna* (Barracco et al., 1999), у самок *C. gigas* было выявлено преобладание гранулоцитов и лизоцима в плазме, а у самцов – агранулоцитов (Duchemin et al., 2007). Можно предположить, что выявленные более эффективные по сравнению с самцами механизмы иммунной защиты самок связаны с их более высокими энергетическими затратами на гаметогенез и как следствие возможно большей угрозы здоровью со стороны патогенов во время и / или после нереста. Многие авторы обнаруживают особенно катастрофичное снижение иммунных параметров моллюсков, зачастую ведущее к его заболеванию и гибели, именно в ранний посленерестовый период (Oliver, Fisher, 1999). Вероятнее всего сезонные колебания параметров клеточного иммунитета, главным образом, также связаны с репродуктивным циклом моллюсков. Так, при исследовании *M. galloprovincialis*, выловленного на берегах Италии в Адриатическом море с относительно постоянной температурой воды (15-20 °C) и количеством пищи, было выявлено, что сезонные колебания большинства иммунных параметров не коррелируют с изменениями температуры воды, а приурочены к нересту моллюсков, происходящему несколько раз в год (Ciacci et al., 2009b). При анализе зависимости иммунного статуса *M. galloprovincialis* от репродуктивного цикла в акваториях западной части Франции было выявлено, что период нереста более продолжителен у моллюсков, собранных вне залива (февраль-апрель), а у моллюсков, собранных в бухте период нереста продолжается с февраля по март. При этом у исследованных особей

наблюдалось достоверное повышение средних значений ОЧГ в апреле. ФА варьировала в зависимости от места сбора: в апреле показатели ФА были выше у моллюсков, собранных вне залива (Lacroix et al., 2017). В работе Дюшемена с коллегами (2007) у *C. gigas* ФИ был также значительно понижен в период нереста с последующим максимумом в осенний период. Но поскольку показано, что одни и те же иммунные показатели у одних и тех же животных (*R. philippinarum*) также сильно варьируют в зависимости от места обитания: даже в пределах одного моря (Кельтское), но с разными экологическими условиями (острова Иль Шосе с океаническим режимом; бухта Бреста и Марен д'Ируаз с эстуарным режимом; бухта Марен – запруда) (Soudant, 2011), а моделируемые экологические режимы в лабораторных условиях оказывают влияние на иммунные параметры (Negaret et al., 2003; Chen et al., 2007; Bibby et al., 2008; Yu et al., 2010; Munari et al., 2019), то это еще раз доказывает, что определенную модуляцию состояния иммунной системы все-таки вызывают и сами абиотические факторы среды, флуктуирующие в течение года.

Среди всех исследованных нами параметров клеточного иммунитета у *M. kurilensis* ОЧГ коррелировало как с температурой воды, так и с содержанием в ней кислорода и соленостью. Однако особенно сильная прямая связь между температурой и ОЧГ прослеживалась в январе и марте. Прямая корреляция ОЧГ и температуры также была выявлена у *M. galloprovincialis* и *Paphia malabarica* (Carballal et al., 1998; Gajbhiye, Khandeparker, 2019), *C. gigas* из Средиземного и Японского морей (Ishikawa et al., 1999; Duchemin et al., 2007), а также *M. galloprovincialis* из Северной части Атлантического океана (Carballal et al., 1998), *R. philippinarum* (Flye-sainte-marie et al., 2009), обитающем в заливе Морбиан (юго-запад Франции, Атлантический океан). Однако, для этого же вида, обитающего в северных и южных акваториях Венеции (Адриатическое море) была получена обратная корреляция: значения ОЧГ снижались при повышении температуры в летний период (Matozzo et al., 2003). Такие различия в наличии и отсутствии корреляций внутри видов связаны с особенностями температурного режима мест обитаний исследуемых особей и как следствие шириной их нормы реакции. Температурный режим акваторий Атлантического океана имеет более широкий диапазон (от 6 до 23 °С), сравнимый с нашими значениями (от -1,5 до 19,3 °С), в то время как для Адриатического моря температура колеблется в более узком диапазоне (от 13 до 23 °С). Снижение числа гемоцитов при понижении температуры также может быть вызвано нехваткой питательных веществ, и как следствие снижением общего уровня физиологической активности моллюсков, что было подтверждено в эксперименте с *M. galloprovincialis*: максимальное число гемоцитов наблюдалось в летний период с максимальным обилием пищи (Carballal et al., 1998). Нами была обнаружена прямая корреляционная связь между соленостью и ОЧГ, тогда как с

количеством растворенного кислорода наблюдалась обратная зависимость, что согласуется с ранее опубликованными работами, проведенными на *P. malabarica*, *M. edulis* и *O. edulis*. (Hauton et al., 2000; Bussell et al., 2008; Gajbhiye, Khandeparker, 2019). Значительное увеличение числа гемоцитов у *M. kurilensis* в мае и апреле, но снижение их концентрации в осенний период, вероятно, было связано не только с изменением условий окружающей среды, но и с половым циклом моллюска. Показано, что у данного вида нерест начинается при температуре воды выше 16 °С и приурочен в заливе Восток к июлю-августу, в то время как гаметогенез приурочен к апрелю-июню (Радовец, Христофорова, 2008; Селин, 2018). И выявленное снижение концентрации клеток в гемолимфе в постнерестовый период, вероятно, связано с тем, что большая часть гемоцитов мигрирует в гонады для репарации тканей органа. Фагоцитарная активность гемоцитов *M. kurilensis* была максимальна в апреле и мае, а минимальна в январе (в период максимально низких температур). Также повышение данного показателя было отмечено в ноябре, когда температура была сходна с таковой в весенние месяцы. Подобная динамика ФА была выявлена и у *P. malabarica* (Gajbhiye, Khandeparker, 2019). Вероятно, изменение ФА у *M. kurilensis* и *P. malabarica* не связано с гормональным фоном моллюсков, как предполагают некоторые авторы (Lacroix et al., 2017), а обусловлено главным образом увеличением бактериальной нагрузки при повышении температуры воды и одновременным повышением физиологической нагрузки животных, вызванной подготовкой к нересту (Ishikawa et al., 1999). Минимальные значения ФА в период максимально низких температур, вероятно, связаны со снижением общего уровня метаболизма моллюсков и сниженной бактериальной нагрузкой. В нашей работе корреляции между температурой и ФА были незначительными, что также было отмечено у *C. gigas* из Японского моря (Ishikawa et al., 1999). Корреляционный анализ показателей иммунитета показал прямую зависимость ФА гемоцитов и доли клеток с АФК в течение всего года, но с наиболее высокими коэффициентами в апреле, мае и июне. Подобная картина была выявлена и в работе с *P. malabarica* (Gajbhiye, Khandeparker, 2019). Помимо возрастающей бактериальной нагрузки с повышением температуры среды, некоторые авторы (Chen et al., 2007; Mosca et al., 2013) объясняют усиление корреляционных связей ФА и АФК также снижением активности антиоксидантных ферментов при высоких температурах. Так, при исследовании состояния антиоксидантной системы *C. gigas*, *M. galloprovincialis* и *K. rhytiphora* при температурном стрессе было выявлено повышение уровня АФК и активности антиоксидантных ферментов при увеличении температуры (Rahman et al., 2019). Однако у *M. edulis* корреляции между АФК и параметрами среды не было обнаружено (Bibby et al., 2008; Bussell et al., 2008). В нашем исследовании минимальная концентрация АФК в гемоцитах *M. kurilensis*, как и в работе с *R. philippinarum* у Матоццо и коллег (2003),

была выявлена в зимний период, что вероятно связано со значительным сокращением доступной пищи в период низких температур (Matozzo et al., 2003; Soudant et al., 2004). А высокое содержание клеток с АФК у *M. kurilensis* в весенне-летний период может быть связано с подготовкой к гаметогенезу и размножению. В работе с *R. philippinarum* авторы также предположили, что активный половой период сопряжен как с увеличением потребления кислорода, так и с продукцией АФК, что, соответственно, выражается в усилении и антиоксидантной активности (Matozzo et al., 2003).

4.3 Клеточные защитные реакции *M. kurilensis* при стрессовых условиях

4.3.1 Инфицирование

Несмотря на интенсивное изучение вопросов, связанных с устойчивостью моллюсков к заражению различными патогенами, например, такими как *Perkinsus* (La Peyre et al., 1995; Ordas et al., 2000; Goedken et al., 2005; da Silva et al., 2008), *Vibrio* (Oubella et al., 1993; Oubella et al., 1994; Lopez-Cortesa et al., 1999; Allam et al., 2000; Allam et al., 2002; Allam et al., 2006; Labreuche et al., 2006; De Decker, Saulnier, 2011), *Shigella flexneri* и *Salmonella typhimurium* (Hartland, Timoney, 1979), среди основных проблем аквакультуры, таких как эвтрофикация и загрязнение среды, первое место все еще по масштабности экономического урона занимают периодически возникающие эпизоотии (Shinn et al., 2015), поскольку информация о механизмах защитных реакций моллюсков остается во многом противоречивой и мало изученной. Главным образом это связано с тем, что легкие инфекции и сопутствующие им патологии, как правило, значительно не изменяют параметры клеточных факторов иммунитета; однако, при интенсификации этих процессов ФА гемоцитов снижается, что свидетельствует о не способности организма противостоять воздействиям из вне, и подавлении его защитных функций (Fisher et al., 1986; Bower, McGladdery, 1994; Morga et al., 2009; Blaise et al., 2017). Одним из возможных вариантов решения проблем при исследовании клеточных механизмов иммунитета является использование инактивированного антигена, который позволяет проследить последовательность каскада тех или иных иммунных реакций, а также скорость элиминации антигена, исключая не предсказуемость протекания ответа, зависящую в первую очередь от вирулентности самого патогена. Например, в работе Лопез-Кортесы и коллег (1999) были выявлены различия миграционной и поглотительной *in vitro* способности гемоцитов в зависимости от вида и состояния антигена: моллюски *R. philippinarum* и *R. decussatus* проявляли большую активность по отношению к живым видам бактерий рода *Vibrio* и *E. coli*, чем инактивированных 0,7 % формальдегидом, что вероятно связано с менее «привлекательной» для гемоцитов модификацией фиксатором рецепторов клеточной стенки бактерий. В другом

исследовании (Oubella et al., 1996) лишь у *R. philippinarum*, которым были введены живые бактерии *Vibrio* P1 (при концентрации $5 \cdot 10^6$ КОЕ в 0,5 мл), на 3 сут происходило достоверное увеличение концентрации гемоцитов, тогда как при введении других видов или термически инактивированных *Vibrio* изменений в концентрации клеток у животных не наблюдалось. Несколько иная картина наблюдалась у *R. philippinarum* в работе с использованием как термически убитых, так и живых *V. tapetis* (при концентрации $5 \cdot 10^7$ КОЕ в 0,1 мл): уже через 2 ч после введения антигена наблюдалось увеличение числа циркулирующих гемоцитов с максимумом через 6 ч (у всех экспериментальных групп животных) (Allam et al., 2006). При этом инъекция живых бактерий вызывала постепенное увеличение концентрации гемоцитов в течение 3 сут (с возвращением к исходным значениям к 7 сут), а термически инактивированных – только в течение 6 ч (через сутки их число возвращалась к исходному значению). Подобные результаты были получены и нами. Так, повышение числа циркулирующих гемоцитов наблюдается уже через 6 ч после введения термически убитых *Staphylococcus* ($1,57 \pm 0,21 \cdot 10^6$ кл/мл) по сравнению с контрольной группой и исходным состоянием ($1,38 \pm 0,29 \cdot 10^6$ кл/мл); однако достоверное увеличение концентрации клеток происходило через 12 ч и достигало при этом максимума ($3,41 \pm 0,54 \cdot 10^6$ кл/мл), после чего показатель постепенно падал и через 36 ч возвращался к исходным значениям. Подобную динамику, показывающую увеличение концентрации клеток в начальный период после введения антигена, можно наблюдать и в других работах (Oubella et al., 1993; Oubella et al., 1994; Allam et al., 2000; Labreuche et al., 2006). При этом изменение концентрации клеток может быть результатом клеточной мобилизации и миграции гемоцитов из тканей в циркуляторную систему, а выявляемые различия в динамике ответа зависят от дозы (Oubella et al., 1996) и иммуногенности вводимого антигена (Allam et al., 2006), а также индивидуальных особенностей моллюска (Oubella et al., 1993; Goedken et al., 2005; Schmitt et al., 2012). Так, Аллам с коллегами (2006) установили, что при введении непатогенного штамма живых бактерий возросшая с 6 ч концентрация клеток возвращается к нормальным значениям уже к 3 сут, тогда как при введении патогенных лишь к 7 сут. В этой же работе *R. philippinarum* показал более пролонгированный иммунный ответ по сравнению с *R. decussatus*. В работе Оубеллы с коллегами (1993) для тех же видов моллюсков подобных различий не наблюдалось, и достоверное отличие от контрольных животных сохранялось даже после эксперимента (более 7 сут). Подобные различия, но уже в фагоцитарной реакции гемоцитов, были выявлены для двух видов устриц в работе Гоедкена и коллег (2005): через 3 сут после введения *P. marinus* у *C. virginica* наблюдалось достоверное повышение *in vitro* ФА гемоцитов по сравнению с *C. gigas*, для которой никаких изменений в динамике реакции *in vitro* фагоцитоза выявлено не было (однако эти различия

были не достоверны относительно контрольных животных). Совершенно иные результаты были получены для тех же видов моллюсков после введения зимозана (La Peyre et al., 1995): гемоциты *C. gigas* проявляли достоверно большую *in vitro* ФА, чем гемоциты *C. virginica*. В другой работе (Labreuche et al., 2006) гемоциты *C. gigas* также проявляли более активную фагоцитарную способность *in vitro*, которая на 8 сут достоверно падала относительно контрольных животных. Увеличение ФА гемоцитов *in vitro* наблюдалось и у *S. subcrenata* (Zhi-Hong et al., 2002) с 4 до 72 ч после стимуляции *Vibrio*. У *C. farreri* при введении *L. anguillarum* (Cong et al., 2008) ФА также возрастала в первые часы эксперимента и достигала максимума через 3-8 ч, возвращаясь к исходным значениям к 6 сут; ФИ имел достоверно большие значения лишь через 3 ч после введения антигена, а затем сразу же возвращался к исходным значениям.

При этом клиренс антигена также имеет видоспецифичный характер, зависящий как от происхождения патогена, так и моллюска. У *M. mercenaria* и *C. virginica* при введении интракардиальным способом различных видов живых бактерий (концентрация 10^3 КОЕ в 0,02 мл) при 20 °С наиболее быстро происходила элиминация *E. coli* (через 12-16 ч после инъекции), а дольше всего клиренсу подвергались бактерии *S. flexneri* (через 36-48 ч) (Hartland, Timoney, 1979). При понижении температуры до 6 °С полной элиминации какого-либо из антигенов не наступало даже через 72 ч. В работе Аллама с коллегами (2002) после инъекции в мускул-аддуктор *R. philippinarum* живых бактерий *V. tapetis*, окрашенных цианодитолилом тетразолиум хлоридом ($5 \cdot 10^7$ КОЕ в 100 мкл), наблюдали повышение фагоцитарной реакции *in vivo* на 30 % по сравнению с контролем уже через 30 мин, которая постепенно возвращалась к контрольным значениям через сутки (при этом максимальное количество свободных бактерий наблюдалось в гемолимфе до 24 ч, а на 3 сут они уже отсутствовали). В нашем случае инъекция бактерий вызвала активную *in vivo* фагоцитарную реакцию гемоцитов в первые часы эксперимента, интенсивность которой постепенно угасала по мере элиминации антигена (полный клиренс наступал через 2 сут). При этом реакция *in vitro* фагоцитоза имела противоположную динамику: в первые 6 ч ФА гемоцитов имела достоверно более низкие значения по сравнению с исходными, что, вероятно, связано с уменьшением их фагоцитарной емкости ввиду активного поглощения введенного антигена. После 6 ч клеточный ответ усиливался с ярко выраженной реакцией через 36 ч и был связан, вероятно, с увеличением числа циркулирующих гемоцитов и содержанием среди них АФК-положительных, что согласуется с вышеприведенными работами (Allam et al., 2002; Hartland, Timoney, 1979).

Таким образом, учитывая корреляционные связи, обнаруженные между клеточными параметрами, было установлено, что индукция иммунного ответа, во время которой

начиналось поглощение бактерий, происходит в первые 3 ч после инъекции антигена. Эффекторная стадия, сопряженная с активным *in vivo* поглощением введенного антигена гемоцитами, наступает в первые 12 ч (поскольку ФА *in vitro* с 3 до 6 ч снижается, а доля клеток с АФК повышается). Достоверное повышение *in vitro* ФА происходит до 48 ч, что, вероятно, связано с постепенным увеличением концентрации циркулирующих гемоцитов в результате клеточной мобилизации и миграции гемоцитов из тканей-депо в циркуляторную систему, и как следствие повышение *in vivo* клиренса *Staphylococcus*. По мере освобождения организма от антигена наступала следующая стадия – снижение активности клеточных факторов иммунитета (36-72 ч), после которой наблюдалось постепенное возвращение иммунной системы к исходному состоянию. Выявленная динамика иммунного ответа может быть полезной в разработке мер псевдовакцинации для повышения резистентности двусторчатых моллюсков (особенно в условиях аквакультуры). В последние десятилетия у беспозвоночных, в том числе моллюсков, был обнаружен эффект «иммунной памяти» при введении одного и того же антигена. Поскольку этот феномен не может быть связан с обычным адаптивным иммунитетом, присущим позвоночным, его связывают с терминами «прайминг врожденного иммунитета» или «тренированный иммунитет» или «врожденная иммунная память» (Sun, 2014; Coustau et al., 2016). При этом иммунное праймирование обнаруживается у моллюсков как внутри, так и между поколениями (Milutinović, 2016). Так, особи *C. farreri*, которые были вторично подвергнуты воздействию *V. anguillarum* (ранее называвшейся *Listonella anguillarum*) обладали большей выживаемостью и показали более высокий уровень ФА и активности КФ, в том числе на стадии трохофоры и D-образной личиночной стадии. Подобный эффект наблюдался и у тихоокеанской устрицы *C. gigas* при воздействии убитыми нагреванием *V. splendidus*: у животных после вакцинации происходило усиление фагоцитоза и увеличение числа циркулирующих гемоцитов (Milutinović, 2016). Кроме того, недавно было показано (Lafont et al., 2020), что неинфекционный элиситор – синтетическая двухцепочечная РНК, имитирующая вирус, называемая поли I:C, несмотря на свою недолговечность в гемолимфе, вызывает долгосрочную (до 5 месяцев) выживаемость устриц как при экспериментальных инфекциях, так и в естественных условиях во время вспышек заболеваний. Было установлено, что транскрипционная динамика иммунного прайминга характеризуется устойчивым транскриптомным ремоделированием и индукцией мощного иммунного ответа, обеспечивающего долгосрочную защиту против вирусной инфекции, подавляя репликацию антигена. Примечательно, что после вирусной инфекции у праймированных устриц произошли лишь незначительные изменения транскрипции. Среди 1587 генов, подвергнувшихся ремоделированию, 43 % относились к противовирусному

ответу («V»), 5 % – к антибактериальному («B»), 20 % – потенциально к обоим («V / B»), а 32 % не были напрямую связаны с известными иммунными путями («другие»).

Таким образом, первичный и вторичный иммунные ответы, развивающиеся против одного и того же патогена, включают разные эффекторный элементы иммунной системы: во втором случае происходит превалирование гуморального ответа над клеточным, и как следствие его ускорение, что в свою очередь своевременно повышает выживаемость хозяина (Sun, 2014; Coustau et al., 2016). Обнаруженные нами в ходе данного эксперимента обратные корреляционные связи между клеточными и гуморальными факторами в период активного иммунного ответа (3-48 ч), и представленные в опубликованной ранее работе (Grinchenko et al., 2015) также подтверждают, что эти компоненты защитной системы работают по эксклюзивному (компенсаторному) механизму: повышение или понижение активности фагоцитов компенсируется гуморальными факторами и наоборот. А быстрота клеточной реакции на септическое воздействие дает возможность предположить, что фагоцитоз опосредуется не гуморальными механизмами, а индуцируется непосредственно бактериями.

4.3.2 Острая кровопотеря

Продолжительность восстановления организма при травмах зависит от силы и длительности воздействия повреждающего фактора, а также от масштаба повреждения, но не малую роль в этом процессе играют иммунологические аспекты патогенеза. Благодаря нескольким работам (DesVoigne, Sparks 1968; Pauley, Heaton 1969; Armstrong, 1971; Ruddell, 1971; Suzuki et al., 1991; Mamangkey, 2009; Rey-Campos, 2019), посвященным исследованию процессов заживления тканей и органов у таких коммерчески ценных видов двустворчатых моллюсков, как *S. plana*, *P. fucata*, *C. gigas* и *H. cracherodii*, было дано детальное морфологическое описание событий, происходящих во время этого процесса, и которые как выяснилось имеют значительное сходство у разных видов и при различных типах травм (начиная от удаления целых фрагментов мантии до незначительных порезов кишечника). Так, известно, что на первых этапах (в течение первых 8 ч) происходит ретракция раны за счет мышечного сокращения, активная миграция гемоцитов в место повреждения и их наслаивание по краям раны. В последующие сутки инфильтрация места травмы усиливается и сопровождается клиренсом дебриса поврежденных тканей и фагоцитозом проникших патогенов гранулоцитами. После чего происходит закупоривание раны гемоцитами с образованием гранулоцитомы (48-72 ч) и формирование внеклеточного матрикса агранулоцитами для регенерации эпителиальных клеток мантии. В итоге на гистологическом срезе через 72 ч после травмы поврежденный участок практически не детектируется, поскольку заполнен гранулоцитарной тканью, а его основание слоеном фиброзной ткани.

Окончательное заживление раны по литературным данным чаще всего завершается к 14 сут, но срок может значительно удлиняться в зависимости от тяжести травмы.

Несмотря на то, что интенсивность и скорость процесса заживления может отягощаться сопутствующими хроническими заболеваниями и инфекциями из-за иммунодефицитного состояния на фоне травмы, а также неблагоприятным воздействием факторов внешней среды, каких-либо исследований иммунного статуса организмов при травматических процессах проведено не было. Лишь в работе Хусманна с коллегами (2013), исследовавших влияние голодания на процессы регенерации и иммунореактивности *Laternula elliptica*, было отмечено, что у моллюсков, испытывающих недостаток в питании, происходит увеличение числа циркулирующих гемоцитов после нанесения травмы.

В проведенной нами работе было выявлено, что травма *M. kurilensis*, вызванная массивной острой кровопотерей, приводит к мгновенному запуску иммунного ответа, характеризующегося двухфазной динамикой: первичное пикирование показателей гемоцитов и последующее повышение их функциональной активности. Основываясь на вышеописанных литературных данных, мы предполагаем, что по мере миграции депонированного резерва клеток-предшественников гемопоэза (или бласттрансформации циркулирующих) для восполнения фонда циркулирующих клеток, а также для устранения повреждений происходит увеличение среди циркулирующих гемоцитов числа незрелых форм со сниженной фагоцитарной способностью (3-6 ч). Во втором периоде (9-120 ч), вероятно, за счет активных процессов клиренса фрагментов поврежденных тканей, захвату проникающих через рану патогенов (для купирования возможного инфекционного процесса) и образования гранулоцитарной «пробки» происходит достаточно быстрая и мощная активация гемоцитов (в особенности гранулоцитов через 72 ч), что приводит в свою очередь к мобилизации ФА клеток, которая сохраняется достоверно высокой практически до 5 сут. Периодическое повышение концентрации агранулоцитов на протяжении всего эксперимента может свидетельствовать об участии данного типа клеток как в синтезе сигнальных молекул для регуляции процессов заживления (например, для привлечения гемоцитов и стимуляции созревания бластных форм), так и в синтезе межклеточного вещества, необходимого для восстановления поврежденных тканей, что согласуется с литературными данными (Suzuki et al., 1991).

Эксперименты, проведенные по модуляции иммунореактивности травмированных моллюсков *Limax maximus*, показали, что экзогенное введение фактора роста тромбоцитов АВ (PDGF-AB) и трансформирующего ростового фактора β -1 ускоряет процесс заживления тканей за счет общей мобилизации выполняемых гемоцитами функций: происходит более массивная инфильтрация травмированной ткани и, как следствие, большее отложение

компонентов внеклеточного матрикса, чем в контрольном разрезе. Более того, почти на всех этапах эксперимента гемоциты были иммунореактивны к антителам против интерлейкинов ИЛ-1а, ИЛ-8 и фактора некроза опухоли α (Franchini, Ottaviani, 2000). Авторы также отмечают, что сами гемоциты являются источником цитокиноподобных молекул, выделяя которые они стимулируют миграцию клеток, фагоцитарную реакцию, производство синтазы оксида азота, а также образование новых гематических лакун и реэпителизацию раны.

Таким образом, знания об иммунном статусе пострадавших моллюсков могут быть использованы в прогнозе вероятных осложнений, что позволит снизить удельный вес инвалидизации и смертности гидробионтов, а также спрогнозировать риск развития и генерализации инфекционных осложнений еще до их клинического проявления и разработать методы направленной профилактической и лечебной иммунокоррекции для улучшения выживаемости моллюсков.

4.3.3 Загрязнение

Влияние загрязнения внешней среды в естественных условиях на иммунитет моллюсков изучено довольно слабо, особенно мало данных о состоянии иммунитета двустворчатых моллюсков из акваторий с разной степенью антропогенной нагрузки. Однако эти немногочисленные данные показывают, что разные виды загрязнений могут изменять состояние иммунитета моллюсков, при этом оказываемый эффект зависит от типа поллютанта и его концентрации. Как правило, низкий уровень загрязнения оказывает иммуностимулирующий эффект (Coles, Pipe, 1994; Pipe et al., 1995), а высокие концентрации производят подавляющее действие (Coles, Pipe, 1994; Pipe et al., 1999; Gomez-Mendikute, Cajaville, 2003). Так, у представителей рода *Mytilus* в присутствии низких концентраций меди (Coles, Pipe, 1994; Pipe et al., 1999), кадмия (Coles et al., 1995), эстрогенов (Canesi et al., 2007) и сточных вод (Dyugynda et al., 2000; Akaishi et al., 2007) ФА гемоцитов в начальные сроки эксперимента либо не менялась, либо незначительно увеличивалась. При дальнейшей экспозиции или увеличении дозы агента происходило подавление фагоцитоза, ингибирование высвобождения свободных радикалов и снижение устойчивости животных к бактериальным инфекциям (Coles, Pipe, 1994; Coles et al., 1995; Pipe et al., 1999; Gomez-Mendikute, Cajaville, 2003). Снижение ФА регистрировали и у *C. virginica* при импульсном воздействии кадмия, а при двухнедельном воздействии этого металла при той же концентрации ФА и концентрация гемоцитов повышались (Cheng, 1990). В нашем исследовании у *M. kurilensis* из импактной акватории достоверно увеличивалась концентрация гемоцитов, тогда как доля агранулоцитов, ФА, концентрация в клетках АФК, зернистость и размеры гранулоцитов и агранулоцитов достоверно снижались. Сходные

результаты ответа клеточного иммунитета у моллюсков после длительного воздействия поллютантов можно обнаружить и в работах с *M. edulis*, *C. virginica* и *O. edulis* (Sami et al., 1992; Dyrynda et al., 1997; Dyrynda et al., 2000; Auffret et al., 2002; Gagnaire et al., 2007; Girón-Pérez, 2010; Gillis, 2012). Однако в другой работе, проведенной с *M. edulis* (Akaishi et al., 2007), при воздействии на моллюсков сточными водами отмечается снижение количества циркулирующих гемоцитов. Тогда как в исследовании другой научной группы выявлено повышение производства АФК у животных, которые были подвержены крайне высокой концентрации кадмия (Coles, Pipe, 1994). Анализ корреляций между показателями иммунитета у *M. kurilensis* в совокупности из всех выборок (см. Результаты, глава 3.3.1) выявил прямые достаточно высокие достоверные связи между SSC гранулоцитов, ФА, АФК, что обусловлено защитной ролью гранулоцитов в качестве фагоцитов (Beckman et al., 1992; Genthner et al., 1999). Выборочный анализ корреляционных связей, возникающих у животных из отдельно взятых бухт, выявил дополнительные зависимости исследуемых параметров у моллюсков из Спортивной гавани, которые при вычислении корреляций в совокупности по двум акваториям либо ослаблялись, либо нивелировались. Например, у моллюсков, выловленных из чистой акватории, была выявлена достоверная умеренная связь доли гранулоцитов с ФА (0,33) и ФИ (0,36). Более сильные коррелятивные связи между компонентами иммунной системы, обнаруживаемые у моллюсков из Спортивной гавани Амурского залива, связаны с большей антропогенной нагрузкой данной акватории по сравнению с условно-фоновой. В данном случае работа всех компонентов становится более сопряженной, поскольку направлена на устранение стрессора или адаптации к нему, в результате чего формируется более эффективный иммунный ответ.

4.3.4 Гистопатологии

В течение последних двух десятилетий разнообразные физиологические изменения органов рыб и двустворчатых моллюсков были исследованы и использованы в качестве биомаркеров для мониторинга состояния окружающей среды и ее обитателей (Au, 2004), некоторые из которых успешно используются в крупных национальных программах мониторинга, в то время как другие хотя и перспективные все еще находятся на стадии экспериментальной разработки. Наиболее чувствительными к загрязнению органами моллюсков являются жабры, ПВЖ, гонады и почки (Au, 2004; Irinco-Salinas, 2012), поскольку являются первыми барьерами на пути загрязняющих агентов и основными органами детоксикации.

Патологические изменения органов двустворчатых моллюсков привлекают все большее внимание в качестве индикаторов загрязнения окружающей среды. Тем не менее,

они не используются так широко, как например, маркеры гистопатологических изменений органов рыб, поскольку изменения, возникающие под воздействием загрязняющих факторов среды, в тканях и органах моллюсков остаются малоизученными (Au, 2004). Основным органом биотрансформации органических ксенобиотиков и выведения тяжелых металлов у двустворчатых моллюсков является ПВЖ, обладающая высокой неспецифической чувствительностью (Au, 2004; Marigómez et al., 2013). В пищеварительном цикле ПВЖ различают от 3 до 5 стадий и несколько типов пищеварительных трубочек, соответствующих этим циклам: I – покоящиеся/ исходные, II – всасывающие/переваривающие, III – разрушающиеся и IV – восстанавливающиеся (Ушева и др., 2006; Owen, 1974; Cajaraville et al., 1992; Syasina et al., 1997). Морфология ПВЖ представителей *Modiolus* до этого не была изучена, а между тем такая информация необходима для понимания не связанных с пищеварительным циклом патологических модификаций железы. Проведенный в данном исследовании анализ показал, что пищеварительный цикл *M. kurilensis* сходен с таковыми у других представителей двустворчатых моллюсков, и преобладающим типом трубочек является II, доля которого у животных из исследуемых акваторий варьировала от 27 до 100 % (другие трубочки могли быть представлены от 2 до 40 %, среди которых наиболее часто в норме отсутствовал IV тип трубочек). Для моллюсков *C. graynus* (Ушева и др., 2006), населяющих залив Петра Великого, также показано преобладание летом II типа трубочек, тогда как для гребешка приморского – только в зимне-весенний период, что вероятно связано с особенностями запасания питательных веществ, обеспечивающих гаметогенез (Syasina et al., 1997). Известно, что стресс вызывает образование атрофического эпителия, высота которого схожа с таковой IV типа трубочек (Couch, 1984; Rocha et al., 2016). Согласно данным ранее опубликованных работ, под влиянием антропогенного пресса происходит достоверный сдвиг соотношения типов трубочек: у мидий из импактных акваторий выявлено увеличение разрушающихся и восстанавливающихся типов трубочек по сравнению с нормой (Cajaraville et al., 1992; Ушева, Фролова, 2006). В нашем случае, у *M. kurilensis* при хроническом загрязнении обнаружено помимо преобладания трубочек IV типа, еще и I типа, что, вероятно, указывает на активные регенеративные процессы в этом органе.

Ряд исследований (Moore, Lowe, 1977; Lowe et al., 1981; Sunila, 1986; Auffret, 1988; Lowe, 1988; Cajaraville et al., 1990; Moore, 1991; Livingstone, Pipe, 1992; Rocha et al., 2016; Faggio et al., 2018) показали, что эпителиальные клетки, выстилающие трубочки пищеварительной железы, являются чувствительной мишенью для многих веществ, загрязняющих морскую среду. Как показали результаты настоящего исследования, у моллюсков из импактной акватории (Спортивной гавани) все ткани ПВЖ повреждены. Наиболее существенной патологией при этом являлось нарушение эпителия трубочек,

вызванное увеличением числа и размеров вакуолей и лизосом в клетках, что в дальнейшем приводило к изменению клеток и их последующему разрушению. Данная патология достаточно частое явление при экспериментальном и хроническом загрязнении *in situ*, и говорит о гиперактивности ПВЖ в условиях загрязнения (Rocha et al., 2016; Yavasoglu et al., 2016). Подобные аномалии наблюдались у *Anadara* и *Chlamella* из Черного моря (Kolyuchkina, Ismailov, 2011) при воздействии сульфата меди, а также после воздействия различными дозами гербицидов у *D. poly* (Mantecca et al., 2006), при долговременном действии различных органических масел на мидий (Lowe et al., 1981) и у всех особей *C. grayanus*, выловленных из импактной акватории залива Петра Великого (бухта Сивучья), у которых помимо этого также наблюдалось и скопление соединительной ткани, содержащей липофусцин с образованием гранулоцитом (Ушева и др., 2006). Только у *Mytilus* sp. (Bignell et al., 2011; Rocha et al., 2016), выловленных из акваторий с различным уровнем загрязнений, наблюдалось уменьшение высоты эпителиальных клеток, что, однако, со временем приводило к изменению соотношения типов пищеварительных трубочек, их некрозу, изменению окраски ткани на более базофильную и обнажению базальной мембраны в результате слущивания эпителиальных клеток. Помимо вышеуказанных отклонений, у моллюсков *Batissa violacea* (Irinco-Salinas, 2012) из загрязненной акватории и у *Gafrarium divaricatum* (Agwuocha et al., 2011) после 30 сут воздействия ксилолом, бензолом и нефтью наблюдали увеличение просвета трубочек и пространства между ними, а также массовую инфильтрацию ПВЖ гемоцитами.

Среди всех патологий у исследованных моллюсков из Спортивной гавани, по сравнению с таковыми из залива Восток, достоверно возросла частота встречаемости различных отклонений, касающихся интерстициального пространства, например, инфильтрация и фиброз, что вероятно связано с элиминацией некроза (Lowe, Moore, 1979) или утилизацией возросшей паразитарной инвазии *Nematosis* sp. и *Marteilia* spp. (77 % случаев). Известно, что в зависимости от типа паразита, инвазирующего ткани ПВЖ, может формироваться различная ответная реакция (Villalba et al., 1993; Carella et al., 2015).

Во многих случаях, такие поллютанты, как тяжелые металлы концентрируются в тканях моллюсков, особенно почках (George, 1983). Эта функция обеспечивается посредством запасаания почечных конкреций – электронноплотных третичных лизосом, важными диагностическими параметрами которых являются размер, форма, плотность и сродство к определенному типу красителя (базо- или ацидофильность) (George, 1983). Исследования показали, что стресс наиболее часто стимулирует образование конкреций, как попытка экскретировать металлы, захваченные лизомально-вакуолярной системой (Darriba, Sanchez-Marin, 2013). Другие гистоморфологические изменения у двустворчатых моллюсков

относительно почек практически не исследованы, и лишь у *A. keana* (Maeno et al., 2012) при вирусном заражении в лабораторных условиях выявлен некроз нефроцитов. Несмотря на то, что почки играют важную роль в обеспечении постоянства основных физико-химических констант организма, состава внутренней среды (гомеостаза), регуляции обмена органических и неорганических веществ, а также накоплении и выведении продуктов метаболизма (George, 1983; Meyhofer et al., 1985), они являются более избирательно чувствительными к определенному типу загрязнений и у них отсутствует четкая взаимосвязь дозы-реакции, что вероятно является причиной более редкого использования почек в качестве биоиндикатора (Au, 2004). Поскольку Спортивная гавань испытывает интенсивную антропогенную нагрузку и содержит разнообразные типы поллютантов (см. главу Материал и методы), то нам удалось обнаружить достоверные гистопатологические изменения почек модиолусов. Согласно оценке состояния почек рыб, выполненного в работе Бернета (Bernet et al., 1999), вышеуказанным литературным данным, и результатам проведенного анализа почек модиолуса, мы выделили ряд признаков, которые могут быть в дальнейшем полезны для диагностики состояния этих органов у двустворчатых моллюсков. Среди таких признаков были выделены 3 основные категории: дегенеративные изменения нефроцитов (гипервакуолизация и изменение формы (ошаривание) нефроцитов отдела почки, для которого характерны более столбчатые клетки, накопление конкреций и изменения их характеристик (числа, формы, структуры, размеров)), деструктивные изменения почечных трубочек, выражающихся в изменении толщины базальной мембраны и количестве нефроцитов (гиперплазии), а также воспалительные процессы интерстициальной ткани почек (включая паразитарные инвазии). При этом наиболее частыми патологиями у модиолусов являлись изменение площади, числа и структуры конкреций, с увеличением степени тяжести этих отклонений у животных из импактной акватории. Вместе с возросшей на 12 % инвазированностью, возросла встречаемость фиброза и инфильтрации (на 10-15 %) у моллюсков из загрязненной акватории.

В ряде работ показано, что при каких-либо нарушениях в организме, даже не выраженных на тканевом уровне, происходит изменение характеристик гемоцитов, их мобилизация и миграция к органу, испытывающему наибольшую нагрузку со стороны повреждающего фактора (Allam et al., 2000; Sheir et al., 2010). Данное явление рассматривается в качестве важного компонента воспалительного процесса в ответ на загрязнение (Costa et al., 2013; Cuevas et al., 2015). Например, при воздействии наночастиц TiO_2 на ПВЖ у *M. galloprovincialis* (Varmo et al., 2013) было выявлено уменьшение транскрипции антиоксидантной системы, а в гемолимфе – уменьшение ФА, стабильности лизосомальных мембран, повышение антибактериальной активности и содержания АФК.

После воздействия вредоносных водорослей *P. minimum* (Galimany et al., 2008б) у *M. edulis* наблюдался диapedез гемоцитов и изоляция патогена в просвете кишечника, далее начинались общие воспалительные процессы, ведущие к увеличению количества бактерий в желудке и кишечнике, с последующей миграцией гемоцитов в эти органы. При этом гематологические параметры гемолимфы и функциональная активность гемоцитов на протяжении 9-ти дневного эксперимента не изменялись, за исключением достоверного изменения внутренней плотности гемоцитов. При воздействии гербицида паракваут на *D. polymorpha* (Mantecca et al., 2006) в дозе от 0,125 до 0,500 мг/л в течение 14 сут, помимо гистоморфологических изменений тканей ПВЖ и гонады, также происходила инфильтрация этих органов гранулоцитами.

Однако никаких количественных оценок и тем более корреляций в вышеуказанных работах сделано не было. Выполненный впервые корреляционный анализ гистопатологических отклонений (в том числе индексов) органов и иммунных показателей у *M. kurilensis* в совокупности из всех выборок выявил достоверную умеренную корреляционную связь между ГИ (в совокупности для двух исследованных органов) и ФА, и параметрами гранулоцитов. Среди всех гистопатологических отклонений ПВЖ наибольшее число достоверных связей с различными показателями иммунитета имели кариопикноз, гипервакуолизация эпителия, а также все изменения интерстициального пространства и паразитарные инвазии. Структурные изменения почек меньше коррелировали с иммунными параметрами, и касались в основном изменения формы эпителия и инфильтрации гемоцитами интерстициального пространства. Выявленные многочисленные обратные связи инфильтрации интерстициального пространства с иммунными параметрами гемолимфы, вероятно, обусловлены миграцией гемоцитов из гемолимфы для элиминации очагов поражения. В условиях хронического воспалительного процесса у животных из Спортивной гавани для пополнения пула циркулирующих и мигрирующих клеток наблюдается увеличение клеток в гемолимфе. Это, вероятно, происходит за счет возрастания числа агранулоцитов, как в результате дегрануляции гранулоцитов, так и выхода из депо недифференцированных клеток, практически не участвующих в реакциях клеточного иммунитета. Интересной оказалась обнаруженная прямая корреляционная связь между фиброзом, фибромами / гранулоцитами и агранулоцитами. Из литературных данных известно, что агранулоциты активно участвуют в транспорте питательных веществ и метаболитов, внутриклеточном пищеварении, производстве матрикса, в том числе, для восстановления тканей после повреждений (Cheng, 1984; Suzuki et al., 1991).

4.3.5 Инвазия зеленой микроводоросли *Coccostuxa*

Симбиотические отношения с участием микроводорослей зафиксированы для 150 родов из восьми типов беспозвоночных, в том числе и для двустворчатых моллюсков (Vermeij, 2013). Эндобиотические (т.е. живущие в тканях хозяина) микроводоросли обнаружены у морских и пресноводных представителей двустворчатых моллюсков, но форма, при которой осуществляется симбиоз, разнообразна и варьирует от типичного мутуализма до, вероятно, паразитизма (Hinde, 1987; Vermeij, 2013; Zuykov et al., 2014; Gontier, Pombo, 2015; Sokolnikova et al., 2016). Среди более чем 30 видов двустворчатых моллюсков, где были обнаружены подобные ассоциации, самый узнаваемый и достаточно хорошо изученный симбиоз – между яркими гигантскими моллюсками *Tridacna* (из семейства Tridacnidae) и микроводорослями *Symbiodinium* (зооксантеллы) (Hernawan, 2008). Этот консорциум позволяет выжить моллюскам в олиготрофных водах, регулируя их питание, рост и продолжительность жизни (Belda et al., 1993; Ambariyanto, 1996). В данном случае сожительство с микроводорослями является обязательным (облигатным) условием для выживания моллюсков, в отличие, от представителей Mutilidae (*M. kurilensis*, *M. edulis*, *M. modiolus*, *M. galloprovincialis*) и недавно обнаруженными у них микроводорослями *C. parasitica* (Rodríguez et al., 2008; Crespo et al., 2009; Sokolnikova et al., 2016; Zuykov et al., 2018). Морфологический и филогенетический анализ выделенной нами водоросли из *M. kurilensis* из залива Восток, позволил наиболее точно установить, что модиолусов залива Петра Великого Японского моря (Syasina et al., 2012) тоже инвазирует *C. parasitica*, достаточно сильно схожая с таковой из Фленсбург Ферт 1 (EU127470) и Фленсбург Ферт 2 (EU127471) (99 % идентичности). Важным условием получения и изучения эндозоических водорослей является эффективная методика их выделения из тканей организмов-хозяев и поддержание в постоянной культуре. Стивенсон и Сауф (1974), Хартман и Претт (1976), а также Родригес с коллегами (2008) предпринимали попытки выделения микроводорослей из тканей моллюсков, но, несмотря на сложные процедуры методик выделения, описанные в их работах, культуры были недостаточной степени чистоты и нередко содержали бактерий (Stevenson, South 1974; Hartman, Pratt, 1976), что в итоге приводило к заражению культуры и ее гибели. В 2015 г. Бельзиль и Госслин также получили не аксеничную культуру *Soccostyxa* sp. (методика выделения не указана в работе авторов), однако это не помешало команде исследователей изучить ее физико-химические особенности, и установить высокую степень оксифильности данного фитобионта. Нам удалось получить постоянную аксеничную культуру *C. parasitica* и проанализировать стадии ее жизненного цикла в ходе лабораторного культивирования (Sokolnikova et al., 2016). Применяя метод, сочетающий механическую и ферментативную дезагрегацию тканей хозяина, с последующим фракционированием в градиенте плотности Percoll, мы смогли добиться высокой чистоты микроводорослей с

сохранением их жизнеспособности, подходящей для быстрой инициации культуры и ее роста в лабораторных условиях. Разработанный нами метод позволяет эффективно получать постоянную культуру паразитических микроводорослей, которая лучше развивается при более высоких температурах (20-22 °С), чем указывают в своих работах Стивенсон, Хартман и Претт (15-16 °С), что очевидно связано с другим систематическим положением, обнаруженных ими водорослей. Однако, нами, также как и Стивенсоном, было отмечено, что при недостаточном количестве клеток водорослей в культуре она не растет. Попытки Родригеса с коллегами выделить *C. parasitica* из мидий, используя среду f/2 и К среду, не увенчались успехом, вследствие чего авторы заключили, что эти среды не являются подходящими для *C. parasitica*, поскольку не содержат нужного количества нутриентов. Однако в литературе также есть примеры успешного культивирования на среде f/2 свободноживущей *Coccomyxa* sp. CPCC 508 (Verma et al., 2009) и *Coccomyxa* sp., изолированной из *M. edulis* (Belzile, Gosselin, 2015). В нашем случае оптимальной средой для культуры *C. parasitica* стала среда f/2, рецептура которой прописана на сайте ССАР. В работах Стивенсона и Сауфа (1974), а также Хартмана и Претта (1976) представлен широкий перечень сред, апробированных и подходящих для выращивания эндозоических водорослей, которые сходны по составу с упомянутыми выше.

Оптимальным циклом чередования световой и темновой фаз для выращивания выделенной нами *C. parasitica* в культуре стал фотопериод 18/6 ч (без прямого воздействия света), что также было характерно для культур, описанных в работах Стивенсона и Сауфа (1974), Хартмана и Претта (1976), Бельзиль и Госселин (2015). В таких оптимальных условиях культура проходила все стадии жизненного цикла с видимыми метаморфозами клеток, характерными для большинства культур микроводорослей. Таким образом, несмотря на различия культур водорослей, выделенных нами, Стивенсоном и Сауфом (1974), Хартманом и Преттом (1976), а также Родригесом и коллегами (2008) для выращивания паразитических водорослей из морских двустворчатых моллюсков необходимы в целом сходные условия с фотопериодом 18/6 ч, оптимизированные по температурному режиму. Несмотря на то, что Стивенсон (1974), а также Хартман и Претт (1976) сообщают в своих работах об образовании 8- и 16-споровых структур в культуре, нами были обнаружены лишь ди- и тетраспоры размером 2-8 мкм. Полученная и описанная Стивенсоном культура отличалась и формой клеток (от круглой до каплевидной с различными выростами цитоплазмы), что еще раз подтверждает отличие микроводорослей, заселяющих ткани гребешка от *C. parasitica*. *C. parasitica*, выделенная нами из *M. kurilensis* залива Восток, является эукариотическим одноклеточным организмом без флагеллы с одним или двумя хлоропластами, овальной или

круглой формы, размером от 2 до 10 мкм, что согласуется с литературными данными (Gray et al., 1999; Crespo et al., 2009; Vázquez et al., 2010; Syasina et al., 2012).

В 1995 г. Бала, изучая распространение *Coccomyxa* у четырёх видов митилид *Aulacomya atraatra*, *Brachidontes rodriguezii*, *M. edulis platensis*, *Perumytilus purpuratus* из залива Сан-Хосе, установил, что этот паразит встречается здесь только у аргентинской мидии (*M. edulis platensis*), а Васкес с коллегами (2010) обнаружил подобную особенность для *P. abbreviate*, которые оказались единственно зараженными *C. parasitica* среди других массово выловленных видов моллюсков (*O. puelchana*, *Pododesmus rudis*, *Aequipecten tehuelchus*). Вышеописанные факты и не обнаруженное нами заражение водорослями других видов моллюсков из смешанной друзы, кроме как *M. kurilensis* позволяет предположить, что *C. parasitica* обладает высокой степенью специфичности по отношению к своему хозяину. Таким образом, описанная Хартманом и Преттом (1976) и Джонесом (1992), но не определенная генетическим анализом, инвазирующая *C. nuttalli* водоросль, вероятно, не является *C. parasitica*, поскольку образовывала в культуре кроме ди- и тетраспор, апланоспорангии, содержащие 8 и 16 спор, упоминающиеся только Стивенсоном и Сауфом (1974). Вероятнее всего гребешка и сердцевидку поражает один и тот же вид зоохлореллы, отличный от *C. parasitica*. Таким образом, заражению *C. parasitica* подвергаются в основном представители семейства Mytilidae (*M. galloprovincialis*, *M. trossulus*, *M. edulis*, *M. edulis chilensis*, гибрид *M. edulis*-*M. trossulus*, *M. kurilensis*), за исключением единичного случая заражения *Panopea* (Vázquez et al., 2010). При этом моллюсков, инфицированных микроводорослями, как правило, обнаруживают на глубине 30-70 см (Jones 1992; Gray et al., 1999; Mortensen et al., 2005), 2-5 м (Syasina et al., 2012; и исследованные нами моллюски) или 15 м (Vázquez et al., 2010) в бентосных экосистемах с илистым и реже песчаным дном. Кроме того, Найду (1970), Грей и коллегами (1999), а также Васкес и коллегами (2010) показано, что с увеличением глубины степень заражения уменьшается, в связи с тем, что для развития водорослевой инвазии необходим свет. Кроме того большинство авторов отмечают, что поражаются животные старше двух лет (Stevenson, 1972; Jones, 1992; Mortensen et al., 2005; Rodríguez et al., 2008; Crespo et al., 2009; Zuykov et al., 2014). В данной работе в смешанных друзах семейства Mytilidae, содержащих, в том числе, моллюсков разного возраста, были обнаружены инфицированные особи только старше 6 лет размером раковины 86-126 мм. В ряде работ (Mortensen et al., 2005; Zuykov et al., 2014) также показано, что с увеличением возраста увеличивается частота и степень заражения моллюсков, но до определенных пределов: не встречаются очень старые особи, что вероятно связано с ранней смертностью зараженных моллюсков.

Пораженные органы зараженных особей моллюсков, среди которых чаще всего авторами отмечается мантия, приобретают зеленую окраску. Нами, как и другими авторами, также была выявлена зеленая окраска мантии, жабр, гонады (Naidu 1970; Stevenson, South, 1974), задней кишки ближе к анусу и выводного сифона (Hartman, Pratt, 1976; Mortensen et al., 2005). В работе Сясиной с коллегами (2012) и Зуйкова с коллегами (2014) также описана зеленая окраска ПВЖ. При этом для мидий чаще описывают диффузную окраску пораженных органов в виде пустул (Rodríguez et al., 2008; Crespo et al., 2009), что вероятно связано с видовыми особенностями поражаемого хозяина. У *P. abbreviate* сифон был описан, как единственный орган, зараженный *C. parasitica* (Vázquez et al., 2010). Нами было установлено, что сначала у зараженных животных без видимых поражений органов, водоросли наблюдаются лишь в гемолимфе, при дальнейшем развитии инвазии поражается задняя кишка (ближе к анусу), затем выводной сифон, мантия, жабры и гонада, а впоследствии деформируется и раковина моллюсков. При исследовании эндозоической инвазии у *M. edulis* Мортенсен с коллегами (2005) также отметили, что первичным депо интервента являются ткани мантии и гемолимфа, а затем микроводоросли заселяют гемальный синус заднего мускула-аддуктора и гонаду, что в целом согласуется с установленным нами порядком инфильтрации тканей *C. parasitica* у *M. kurilensis*. Однако не во всех работах сообщается о деформации раковины моллюсков (Jones 1992; Syasina et al., 2012). Деформация и истончение раковины моллюсков, как показано Зуйковым и коллегами (2014, 2019) вызваны изменением процесса кальцификации микроводорослями за счет снижения содержания в раковине углерода, что в свою очередь способствует лучшему проникновению света и развитию интервента.

Первая гипотеза о пути и причине проникновения паразитической водоросли в организм моллюсков была выдвинута Найдю в 1970 г., согласно которой водоросли проникают в организм в результате повреждения внешних эпителиальных покровов и раковины моллюсков. Однако в 1972 г. Стивенсон в своей работе опровергает Найдю, поскольку не все особи с обнаруженной им инвазией имели видимые повреждения в столь раннем возрасте (2 года). В этой же работе Стивенсон представил результаты проведенных опытов экспериментального заражения моллюсков, и, несмотря на то, что наиболее удачным оказался опыт с инъекцией клеток водорослей в краевую складку мантии, автор склоняется к гипотезе о проникновении водорослей все же через ПВЖ. Это было связано с тем, что в желудке моллюсков наблюдались гемоциты с фагоцитированными водорослями, которые, как предполагают большинство авторов, поглощая водоросли, не всегда способны переварить их клеточную стенку, что и обеспечивает их распространение по всему организму. В работе Стивенсона и Сауфа (1974) показано, что клеточная стенка обладает

высокой резистентностью к химическому воздействию (например, 10 мин воздействие 75 % H_2SO_4). Все указанные данные подтверждают возможную высокую устойчивость клеток эндозоических водорослей к воздействию лизосомальных ферментов гемоцитов.

Активная реакция гемоцитов на присутствие *Soccomyxa*, выражающаяся в обширном воспалительном процессе, является показателем патогенности водоросли по отношению к моллюскам. Проведенное нами микроскопическое исследование показало повсеместное распространение микроводорослей по организму *M. kurilensis*, за исключением жабр и заднего мускула-аддуктора. Однако значительная инфильтрация гемоцитами наблюдалась как в тканях мантии, гонады, почек и ПВЖ, пораженных микроводорослями, так в жабрах, в которых отсутствовал интервент. При этом неоднократно встречалась инкапсуляция водорослей с образованием крупных очагов фиброза и очагов с аморфным преимущественно некротическим материалом, что было также отмечено при микроводорослевых инвазиях в работах Грея с коллегами (1999), Родригеса с коллегами (2008), Креспо с коллегами (2009), Мортенсена с коллегами (2005) и Васкеса с коллегами (2010), а также в исследованиях, посвященных изучению влияния паразитов различных систематических групп на физиологическое состояние моллюсков (Neff, 1986; Auffret, 1988; Villalba et al., 1997; da Silva et al., 2008). Описанные Васкесом и коллегами (2010) аномалии в тканях сифона *P. abbreviate*, выражающиеся в искажении ориентации мышечных и соединительнотканых волокон, клеточный дебрис и инфильтрация гемоцитами с поглощенными ими водорослями, были выявлены и нами в мантии модиолусов. Также в мантии и почках *M. kurilensis* были обнаружены значительные клеточные аномалии эпителиальных, соединительных и мышечных тканей, ведущих к дисфункции пораженных органов.

В ряде работ было указано, что инвазия микроводорослей приводит к деформации тканей, ослаблению и атрофии мускула-аддуктора (Gray et al., 1999), эрозии раковины (Zuikov et al., 2014), нарушению репродуктивного цикла, связанного с недоразвитием половых желез, росту соединительной ткани (Gray et al., 1999; Vaschenko et al., 2013). Выявленные гистопатологии, как правило, приводят в дальнейшем к нарушению нормальной фильтрационной способности моллюсков, а также к отставанию в развитии и дегенерации поражённых органов (Gray et al., 1999; Humphrey, 2005), что также может способствовать проникновению и развитию других паразитов.

Учитывая, что один из самых распространенных механизмов проникновения интервентов, в том числе и паразитов, во внутреннюю среду хозяина происходит путем их проглатывания во время кормления, и, исходя из ранее полученных данных о развитии инвазии у модиолусов (зеленую окраску в первую очередь приобретает гемолимфа, далее задняя кишка и почти одновременно с ней мантия (Sokolnikova et al., 2016)), мы

предположили, что «входными воротами» может являться задняя кишка моллюсков (по некоторым данным эпителий данного отдела имеет значительные отличия в клеточном составе и является менее «защищенным» (Tantiwisawarujj et al., 2011; Gabri et al., 2018)). Более того Янг (1926) и Такатсу (1934) сообщили в своих работах о том, что гемоциты могут свободно перемещаться через эпителий кишки для захвата пищевых частиц и их дальнейшего переваривания. Трипп (1960) и Стаубер (1950), проводя эксперименты с введением различных антигенов (тушь, *Bacillus*, дрожжи и др.) в кардиальную полость, через 48 ч наблюдали гемоциты, содержащие эти антигены на всем протяжении эпителия кишки, а через 3-5 сут гемоциты также появлялись в эпителии пищеварительных трубочек, мантии и пальп (в меньшей степени они обнаруживались в почках, перикарде и гонадах). К сожалению, на данном этапе работы у моллюсков, зараженных в природных условиях (при начальной степени инвазии) и у моллюсков, зараженных в ходе эксперимента, нами было выявлено, присутствие микроводорослей только в гемолимфе. Никаких клеток микроводорослей, мигрирующих через эпителий мантии, кишки, сифона или перикарда нам не удалось зафиксировать, хотя кишка практически на всем своем протяжении содержала живые микроводоросли, при помещении которых в культуральную среду начинался их рост и размножение. У моллюсков со средней степенью инвазии, имеющих окрашенную в зеленый цвет заднюю кишку, уже наблюдалась инфильтрация всех типов тканей этого органа микроводорослями и их свободное перемещение через мышечные и эпителиальные слои. Подобное перемещение также наблюдалось и в мантии моллюсков с крайними формами инфильтрации микроводорослями (зеленую окраску приобретали кишка, мантия, жабры, мускул, сифон). Стоит отметить, что иногда клетки *Soccostuxa* встречались в гемоцитах на поверхности мантии. Установлено, что проникновение широко распространенного *Perkinsus* в тело хозяина происходит после попадания паразита в секрет слизистой мантии, которая в ответ начинает вырабатывать комплекс факторов, маскирующих его, и, индуцируя в то же время захват паллиальными гемоцитами патогена (Pales Espinosa et al., 2014). Далее эти гемоциты, обладая способностью к двунаправленной трансэпителиальной миграции, перемещаются через мантию в гемальные синусы (Allam et al., 2013; Lau et al., 2018). Несмотря на комплекс защитных факторов, содержащихся в слизи двустворчатых моллюсков (гемолизины, лизоцимы, лектины и протеазы) (Robledo et al., 2011), она также может и способствовать развитию некоторых патогенов. Например, *V. shiloi*, бактериальный патоген кораллов, адгезирует к b-D-галактозид-содержащим рецепторам слизи коралла для того, чтобы войти в эпидермальные слои полипов (Robledo et al., 2011). И в работе Эспинозы с коллегами (2014) показано усиление пролиферации *P. marinus* после контакта со слизью мантии. Тогда как экстракты ПВЖ, наоборот,

значительно тормозят рост патогенна в этом эксперименте (что подчеркивает эффективность пищеварительного барьера в нейтрализации антигенов). Вероятно, *C. parasitica* у модиолусов приобретается во время процесса фильтрации, но не через проглатывание, а по мере скопления псевдофекалий у постериорного отдела слизистой мантии (Beninger et al., 1999), в которых он и был обнаружен нами. Исследования *Perkinsus* в различных частях тела моллюсков показали, что наибольшая концентрация жизнеспособных и вирулентных клеток присутствовала именно в псевдофекалиях (Bushek et al., 2002; Robledo et al., 2011). Далее, по аналогии с *Perkinsus*, слизь мантии, усиление синтеза которой нами было установлено гистоморфологически у зараженных модиолусов, вероятно способствует миграции как отдельных клеток *Coccomyxa*, так и в фагосомах паллиальных гемоцитов (которые как указано выше мы наблюдали при анализе криосрезов) в гемальные синусы, откуда микроводоросли распространяются по всему организму. В данном случае, гемоциты слизистой мантии выступают в качестве дендритных клеток позвоночных (Allam et al., 2013), а в сочетании с данными о высокой резистентности и оксифильности *Coccomyxa* (Belzile, Gosselin, 2015), можно предположить, что именно паллиальные гемоциты являются «брешью» в системе защиты моллюсков, и именно они, парадоксальным образом, способствуют проникновению водорослей. Подтверждением этой теории являются работы на других паразитах. Так, показано, что инфекции *H. nelson* (Burreson, Ford, 2004), неизвестный паразит QPX (Dahl, Allam, 2007) и *M. sydneyi* (Kleeman et al., 2002) у устриц и мерценарий инициируются именно в паллиальных органах (мантии и жабрах).

Для выяснения дальнейшей судьбы *Coccomyxa* и факторов, допускающих развитие инвазии у моллюсков, на следующем этапе работы мы проанализировали состояние ключевой линии защиты – клеточных факторов гемолимфы. Полученные нами данные показали, что на начальных этапах инвазии организм активно пытается элиминировать антиген путем клеточно-опосредованных механизмов иммунитета, в частности с помощью фагоцитоза. Причем чем выше ФА у моллюсков, тем, более активно развивается инфекция, поскольку система защиты моллюсков против этих микроводоросей оказывается не эффективной, и лишь способствует ее развитию (что вероятно связано с оксифильностью *Coccomyxa* (Belzile, Gosselin, 2015)). Для борьбы с интервентом организм «привлекает» всё большее число гемоцитов, о чем свидетельствует достоверное повышение циркулирующих гемоцитов, и возрастание доли активных фагоцитов. Подобный сценарий развития событий наблюдался и у восточной устрицы (*C. virginica*) при инфицировании ее *P. marinus*: зараженные особи имели достоверно повышенное число гемоцитов, но сниженную концентрацию белка плазмы (La Peyre et al., 1995). Что также было выявлено при краткосрочном экспериментальном заражении *R. philippinarum* и *R. decussatus* бактерией

Vibrio P1. Тогда как при долгосрочном воздействии бактерий достоверных изменений не происходило (Oubella et al., 1993; Chintala et al., 2002).

Далее после поглощения и не эффективного киллинга микроводорослей набором ферментов лизосом фагоцитов, в клетках хозяина запускается масштабный окислительный стресс, о чем свидетельствует резкое повышение показателей НСТ- и ДАБ-теста. Но, поскольку, согласно литературным данным микроводоросли имеют эффективную антиоксидантную систему в виде лютеина (Vaquero et al., 2014), таких каротиноидов, например, как аллоксантин, диадиноксантин и диатоксантин (в том числе и у *C. parasitica* (Rodríguez et al., 2008; Crespo et al., 2009)), а также жирных кислот (линоленовая кислота в *Coccomyxa* sp. (штамм *onubensis*) и *C. gloeobotrydiformis* (Sun et al., 2013)), ферментов – ГР, аскорбатпероксидазы и КАТ (Ruiz-Dominguez et al., 2015), то АФК практически не оказывают никакого пагубного влияния на интервента. Выявленная Лау и коллегами регуляция антиоксидантов (пероксиредоксина и СОД) у *P. marinus* свидетельствует, что регуляция апоптоза у инфицированных устриц может быть опосредована антиоксидантными процессами. Химическое ингибирование СОД *P. marinus* привело к заметному увеличению продукции АФК и апоптозу в инфицированных гемоцитах (Lau et al., 2018).

Антиоксидантная система микроводорослей, защищая их от действия АФК, приводит к гиперреактивности клеток хозяина и накоплению радикалов, что в свою очередь запускает в этой безвыходной ситуации апоптоз клеток хозяина, о чем свидетельствуют данные резкого повышения числа апоптотических клеток на начальных стадиях инвазии и при *in vitro* инкубации гемоцитов с водорослями. Но, несмотря, на очевидную взаимосвязь окислительного стресса с апоптозом, роль конкретных форм АФК в саморазрушении клеток и механизмы реализации цитотоксичности неясны. Более того, нет однозначного ответа на вопрос, чем является окислительный стресс – следствием или индуктором функциональных изменений, сопровождающих развитие запрограммированной гибели клеток. Другой вариант сценария может предполагать прямую индукцию апоптоза со стороны микроводорослей благодаря каким-либо вырабатываемым ими токсинам. В любом из вариантов массовая гибель клеток приводит к иммунодефицитному состоянию у моллюсков.

На втором этапе инфицирования продолжает наблюдаться повышенная смертность клеток и все большее снижение емкости фагоцитов (ФИ продолжает снижаться), что вероятно связано с привлечением юных (не способных к эффективному уничтожению антигенов) клеток из депо (число гемоцитов держится на исходном после внедрения антигенов уровне). Тогда как доля активных фагоцитов растет, и наблюдается обратная зависимость между числом водорослей и ФА (если бы мы выявили и дальнейшее падение числа микроводорослей при повышении ФА, то, в конце концов, инвазия бы нивелировалась;

но вероятнее всего сценарий таков, что при увеличении числа микроводорослей ФА гемоцитов подавляется, поскольку они уже не играют существенной роли в распространении интервента по организму). Доля клеток, содержащих цитотоксические факторы, остается на неизменно высоком уровне вплоть до крайней степени инвазии, но теперь уже наблюдается прямая зависимость между числом микроводорослей и АФК, которая еще больше усиливается на следующем этапе развития инфекции.

Состояние, в котором моллюски прибывают на второй фазе заражения, сохраняется и при третьей. За исключением массовой гибели клеток, которая практически останавливается и соотносится с уровнем нормальных «здоровых» моллюсков. Причина этого пока не ясна: либо микроводоросли посредством сигнальных молекул моделируют апоптотический путь (поскольку АФК все еще на высоком уровне), ингибируя его, чтобы организм-хозяин в конце концов не погиб; либо клетки хозяина «смиряются» с интервентом и адаптируются.

На последней стадии инвазии и фатальной инфильтрации тканей хозяина микроводорослями наблюдается обратная картина в иммунном состоянии моллюсков. В присутствии большого числа водорослей ФА еще больше подавляется, ФИ также падает, число гемоцитов уменьшается, выработка цитотоксических факторов также снижается. Иммунная система моллюсков подавлена, что может привести к развитию других инфекций. Было обнаружено, что высоковирулентный штамм *P. marinus* модулирует апоптоз иммунных клеток устриц, способствуя развитию инфекции: на начальных стадиях инфекции происходило увеличение *in vitro* и *in vivo* апоптоза, через 8-24 ч после заражения следовало подавление и возвращение апоптоза к исходному уровню, что четко указывает на индуцируемое паразитом ингибирование иммунного ответа. Тогда как во время инфекций с промежуточными или низковирулентными штаммами *P. marinus* временное подавление апоптоза через 4-8 ч после заражения сопровождалось устойчивым повышением апоптоза гемоцитов на более поздних стадиях, что указывает на способность гемоцитов противостоять паразитарному влиянию и успешно бороться с инфекцией (Hughes et al., 2010). Исследования механизмов апоптоза, вызванного *P. marinus*, показали, что ранняя пост-инфекционная стимуляция апоптоза не зависит от каспазы и происходит с участием митохондриального пути (Bcl-2, анаморсин) (Lau et al., 2018). Показано, что ремодуляция апоптоза у моллюсков, например, при инфицировании *B. ostreae* происходит с участием таких генов, как ингибитор апоптоза и фактор апоптоза (Gervais et al., 2018). Высокая смертность двустворчатых моллюсков при различных инвазиях является одной из основных проблем аквакультуры, такая гибель приводит к значительным экономическим потерям в данной отрасли. Тем не менее, знания об иммунном ответе у этих видов все еще ограничены, и борьба с патогенами основана на профилактических стратегиях и удалении больных особей. Таким образом,

можно заключить, что *C. parasitica* с довольно эффективной системой защиты от атаки организмом-хозяином, инвазирующая двустворчатых моллюсков, и способная независимо от хозяина размножаться в культуре, является факультативным паразитом, вызывающим значительные патологические изменения, выражающиеся в аномальном гистоморфологическом паттерне и дисфункции пораженных тканей. И в свете того, что заражаются *Cossmutha* в основном промысловые моллюски и их ближайшие родственники, нередко формирующие смешанные друзы, то в долгосрочной перспективе существует некоторая угроза последующего распространения этого паразита.

4.4 Разработка интегрального индекса здоровья для оценки физиологического статуса

За последние два десятилетия были достигнуты примечательные успехи в разработке инструментов оценки биологических эффектов, оказываемых различными факторами, на состояние здоровья животных и оценки состояния экосистем (Marigómez et al., 2013; Hook et al., 2014). Каждый из этих видов инструментов имеет ряд преимуществ и ограничений в зависимости от целей конкретного исследования. Большинство из известных в настоящее время таких инструментов, или как их чаще называют индексов, включают оценку лишь биохимического статуса организма: индекс биомаркеров (Narbonne et al., 1999), IBR (Beliaeff, Burgeot, 2002), BAI (Broeg et al., 2003; Broeg et al., 2005). Однако данные, полученные в результате исследований только на одном уровне (молекулярном), не позволяют автоматически прогнозировать стрессовые реакции и на других уровнях, в том числе и на более высоких. Что касается IBR, как наиболее популярного среди исследователей, то при его применении возникает ряд сложностей. Например, вклад каждого измерения в IBR зависит от значений двух измерений, которые являются его соседями в звёздчатом графике. Это означает, что в общем случае переупорядочение маркеров в звездчатой диаграмме изменяет значение IBR. К сожалению, аргументы не приводятся, почему влияние измерения на IBR не должно, как правило, зависеть от значений его соседей и того, в каком порядке должны быть размещены маркеры. Поскольку нет естественного порядка среди биомаркеров, остается большая свобода выбора для пользователей IBR. Как сообщает Девин с коллегами (2013) в 75 публикациях со ссылкой на IBR (Beliaeff, Burgeot, 2002) (согласно ISI – Thomson Reuters) только 31 статья цитирует IBR без его применения, а 44 – применившие в своей работе несколько биомаркеров и использовавшие более упрощенную формулу IBR, 23 публикации из которых изданы с ошибками этой формулы, 15 с правильным использованием и 6 – где метод расчета не приводится. В последующем Девин с коллегами (2013), а также Санчес с коллегами (2013) исправили систематические ошибки в данном индексе. Однако, как показал анализ литературных данных, некоторые из авторов все

еще используют оригинальную версию IBR (Kumeiko et al., 2018). Концепция ВАI (Broeg et al., 2005; Broeg, Lehtonen, 2006) основана на наблюдении прогрессивных изменений какого-то параметра с присвоением им определенной степени. В других работах (НАI (Adams et al., 1993), ВI (Chèvre et al., 2003)) полученным данным присваиваются числовые значения в зависимости от степени тяжести или ущерба, понесенного органом, т. е. ранг, что в свою очередь уменьшает различия между переменными. Для подсчета ВI суммируют значения шести биомаркеров (металлотионеины, разломы нитей ДНК, ПОЛ, белки, подобные вителлину, фагоцитоз и неспецифическую активность эстеразы в гемоцитах) путем добавления их рангов в группы, которые формируются неким алгоритмом на основе энтропии, а уже результирующим группам присваиваются ранги (Chèvre et al., 2003). Однако группировка данных по принципу энтропии уже не будет одинаковой для более расширенного набора данных.

В современной литературе, методы оценки гистопатологических изменений органов довольно сильно разнятся. В некоторых публикациях, гистоморфологические изменения описывают лишь морфологически и отмечают наличие зависимости обильности повреждений, обнаруженных в органах, со степенью загрязненности. Другие исследования сосредоточиваются на определенных патологиях органов и оценки степени их проявления с помощью некой шкалы (например, слабые, умеренные и сильные патологии), что позволяет судить об интенсивности поражений. Одна из попыток разработки подобного метода была предпринята Бернет и коллегами в 1999 г., который основывался на качественной оценке состояния органов рыб, присвоения каждому из выявленных отклонений значимости и степени выраженности, и дальнейшем вычислении общего гистопатологического индекса. Этот способ оценки был успешно применен на моллюсках для диагностики состояния пищеварительной железы, жабр и гонады у *R. decussatus* (Costa et al., 2013), *M. edulis* (Giltrap et al., 2016) и *M. galloprovincialis* (Barmo et al., 2013; Cuevas et al., 2015; Pagano et al., 2016; Rocha et al., 2016) и выявил достоверные различия гистоморфологического состояния органов у животных из акваторий с различной степенью антропогенной нагрузки. Несмотря на развитие описанного диагностического подхода, его достоверность не всегда удовлетворительна, поскольку она зависит от субъективного мнения исследователя о степени тяжести патологии. Для решения этой проблемы мы провели количественную оценку гистоморфологических параметров с обнаружением их диапазонов изменчивости в нормальных и патологических условиях. Мы также получили результаты схожие с предыдущими работами. Гистопатологический индекс был достоверно ниже относительно обоих органов (и ПВЖ, и почек) у *M. kurilensis* из импактной акватории. Гистопатологический индекс, вычисленный в совокупности для двух органов, имел

достоверные корреляционные связи с числом агранулоцитов и их гранулированностью, а также с гранулированностью гранулоцитов, и фагоцитарной активностью. При этом показатель гранулированности гранулоцитов имел достоверные умеренные связи со всеми реакционными паттернами (от -0,30 до -0,34), тогда как фагоцитарная активность (-0,42) и гранулированность агранулоцитов только с паразитической инвазией (-0,32). Выборочный анализ корреляционных связей, возникающих у животных из отдельно взятых бухт, выявил дополнительные зависимости исследуемых параметров у моллюсков из Спортивной гавани, которые при вычислении корреляций в совокупности по двум бухтам либо занижались, либо совсем нивелировались. Несмотря на высокую эффективность методов гистологического контроля состояния здоровья организма, они отражают лишь морфологическую картину изменений, которая может быть отчетливо зарегистрирована лишь на поздних этапах развития патологии и не всегда однозначно свидетельствует о нарушении физиологических функций. В этом отношении высокочувствительным биомаркером является оценка иммунного статуса моллюсков. Однако использование различных методов и шкал оценки, а также диагностика биомаркеров, характеризующихся различными профилями стрессового ответа затрудняет сравнение результатов разных исследований. Таким образом, необходим метод стандартизированной оценки для его экстраполяции на многообразие физиологических параметров. В данной работе предлагается простая и универсальная система оценки физиологического статуса двустворчатых моллюсков, выраженная в виде ИИЗ и основанная на нормализации числовых значений всех параметров, имеющих достоверные различия между выборками исследуемых акваторий: ОЧГ, доля агранулоцитов, их и гранулоцитов размер и зернистость, ФА, доля клеток с АФК, площадь конкреций, толщина базальной мембраны, кариопикноз и форма нефроцитов почек, кариопикноз, некроз, гипервакуолизация, инфильтрация и инвазия ПВЖ. Данный способ отвечает всем требованиям, предъявляемым к разрабатываемым индексам (см. Обзор литературы), позволяет сравнивать одни из ключевых показателей физиологического состояния животных – гистопатологические и иммунологические, имеющих, как правило, разную шкалу измерений, включает исключительно проверенные биомаркеры, отражающие индуцированные изменения на разных уровнях биологической организации. В нашем исследовании ИИЗ, вычисленный во всех сочетаниях, показал достоверные различия в каждом из случаев. Оценка ИИЗ животных разной степени инвазии показала, что валидность его применения не только в случае терминальных последствий стрессового воздействия, но и при осуществлении динамического контроля за ходом реакции организма в ответ на действие как-либо фактора.

ВЫВОДЫ

1. В гемолимфе *M. kurilensis* идентифицировано четыре типа гемоцитов: мелкие недифференцированные базофильные гемобласты ($2,20 \pm 0,85$ %) с пролиферативной активностью; агранулоциты ($24,11 \pm 2,40$ %) с выраженной синтетической активностью; эозинофильные гранулоциты ($62,64 \pm 9,32$ %) с наибольшей фагоцитарной активностью; базофильные гранулоциты ($14,21 \pm 0,34$ %), обладающие сходными, но менее выраженными по сравнению с эозинофилами признаками.
2. Установлено, что у *M. kurilensis* число циркулирующих гемоцитов и доля среди них клеток с АФК не зависят от пола и возраста моллюсков, но имеют прямую корреляцию с температурой и соленостью среды, а обратную – с концентрацией кислорода, тогда как фагоцитарная активность зависит от возраста особей и имеет прямые корреляции с температурой и соленостью.
3. Выявлено, что при инфицировании *M. kurilensis* термически инактивированными бактериями *Staphylococcus*, эффекторная стадия иммунного ответа наступает в первые 12 ч и характеризуется достоверным снижением *in vitro* ФА, но повышением доли клеток с АФК, что связано с клиренсом введенного антигена в первые 48 ч, после которого происходит снижение клеточной активности факторов гемолимфы, с постепенным возвращением к 72 ч иммунной системы к исходному состоянию.
4. Впервые описано состояние иммунитета двустворчатых моллюсков при массивной острой кровопотере, которое характеризуется у *M. kurilensis* в первые 6 ч достоверным снижением фагоцитарной активности гемоцитов, и связано с увеличением среди циркулирующих клеток числа незрелых форм, а в последующие 9-120 ч активацией гранулоцитов и восстановлением их фагоцитарной способности, что приводит клеточный иммунитет на 7 сут к исходному состоянию.
5. У животных из импактной акватории выявлено достоверное снижение степени зернистости и размера гемоцитов, их фагоцитарной активности и доли клеток с АФК, но повышение общего числа циркулирующих гемоцитов и доли среди них агранулоцитов.
6. Впервые проведенная количественная оценка гистопатологического состояния двустворчатых моллюсков показала достоверное повышение частоты встречаемости и степени выраженности у животных из импактной акватории таких изменений в почках как: кариопикноз, площадь конкреций, толщина базальной мембраны и форма нефроцитов, а в пищеварительной железе – кариопикноз, некроз, гипервакуолизация, инфильтрация, гранулема/фиброма и инвазия.

7. У *M. kurilensis*, имеющих гистопатологии, такие параметры иммунитета как гранулированность гемоцитов, их число, доля клеток с АФК, и фагоцитарная активность показали наибольшее число достоверных связей с кариопикнозом, гипервакуолизацией, изменениями интерстициального пространства и паразитарными инвазиями пищеварительной железы, а со структурными изменениями почек они коррелировали меньше и касались в основном изменения формы эпителия и инфильтрации.
8. Впервые проведенный иммунологический и гистологический анализ тканей *M. kurilensis*, зараженных микроводорослями *C. parasitica*, и показавший значительные гистоморфологические аномалии и выраженную воспалительную реакцию практически во всех органах моллюсков, достоверно подтвердил паразитический статус эндобионта.
9. У *M. kurilensis*, с повышением степени заражения *C. parasitica*, выявлено постепенное и достоверное повышение числа гемоцитов, доли среди них мертвых гемоцитов, доли клеток с АФК и пероксидазой, а также фагоцитарной активности, но снижение фагоцитарного и апоптотического индекса.
10. Разработан валидный способ оценки состояния здоровья двустворчатых моллюсков на основе количественной оценки нормализованных параметров гистопатологического и иммунного статуса, и выражаемый в виде интегрального индекса здоровья.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алякринская И.О. Гемоглобины и гемоцианины беспозвоночных // М.: Наука. 1979. 155 с.
2. Анисимова А.А. Идентификация клеточных субпопуляций гемоцитов *Modiolus kurilensis* (Bernard, 1983) (Bivalvia: Mytilidae) методами проточной цитометрии и световой микроскопии // Биология моря. 2012. Т. 38, № 5. С. 400–408.
3. Бахмет И.Н., Бергер В.Я., Комендантов А.Ю., Смуров А.О., Халаман В.В. Исследование сердечной ритмики трех видов двустворчатых моллюсков – *Mytilus edulis* L., *Modiolus modiolus* L и *Hiatella arctica* L // Труды Зоологического института РАН, Приложение № 3, Пятьдесят лет концепции критической солености. 2013. С. 63–68.
4. Белоус О.С., Дроздов А.Л. Бухта Троицы (залив Петра Великого, Японское море): физико-географическая характеристика, макробентос // Биота и среда заповедников Дальнего Востока. 2015. Т. 1. С. 3–12.
5. Бойченко Т.В., Христофорова Н.К., Бузолева Л.С. Микробная индикация прибрежных вод северной части Амурского залива // известия ТИНРО. 2009. Т. 158. С. 324–332.
6. Ващенко М.А., Жадан П.М., Альмяшова Т.Н., Ковалёва А.Л., Слинко Е.Н. Оценка уровня загрязнения донных осадков Амурского залива (Японское море) и их потенциальной токсичности // Биология моря. 2010. Т. 36, № 5. С. 354–361.
7. Вехова Е.Е. Особенности роста и формы раковины трех представителей семейства Mytilidse (Bivalvia) // Зоологический журнал. 2013. Т. 92, № 4. С. 399–408.
8. Галышева Ю.А. Изменение компонентов среды и биоты залива Восток Японского моря в условиях антропогенного воздействия // Автореф. дис. канд. биол. наук. Владивосток. 2003.
9. Галышева Ю.А., Христофорова Н.К. Среда и макробентос залива Восток Японского моря в условиях рекреационного воздействия // известия ТИНРО. 2007. Т. 149. С. 270–309.
10. Галышева Ю.А., Христофорова Н.К., Чернова Е.Н., Гришан Р.П., Семянниев А.Р. Некоторые экологические параметры водной среды и донных отложений бухты Киевка Японского моря // известия ТИНРО. 2008. Т. 154. С. 114–124.
11. Гиляров М.С. Экологические принципы эволюции наземных животных // М.: Товарищество научных изданий КМК. 2012. С. 585–588.
12. Гринченко А.В., Кудрявцев И.В., Кумейко В.В., Шилов А.С., Полевщиков А.В. Опыт применения проточной цитометрии в оценке защитных реакций двустворчатого моллюска *Modiolus modiolus* (Linnaeus, 1758) // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8, № 4. С. 993–1001.
13. Дзюба С.М., Романова Л.Г. Морфология амебоцитов гемолимфы приморского гребешка // Цитология. 1992. Т. 34, № 10. С. 45–52.

14. Долганов С.М. Морской заказник «Залив Восток» (1989-2016) // Владивосток: биота и среда заповедников Дальнего Востока. 2016. Т. 2, № 9. С. 125–145.
15. Журавель Е.В., Подгурская О.В. Раннее развитие плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis* в воде из различных районов залива Петра Великого (Японское море) // Известия ТИНРО. 2014. Т. 178. С. 206–216.
16. Журавель Е.В., Христофорова Н. К., Дроздовская О. А. Оценка состояния вод залива Восток (залив Петра Великого, Японское море) по гидрохимическим и микробиологическим показателям // Известия Самарского научного Центра РАН. 2012. Т. 14, № 1. С. 2325–2329.
17. Заварзин А.А. Избранные труды. Очерки эволюционной гистологии крови и соединительной ткани: учеб. пособие // М.–Л.: изд. АН СССР. 1953. Т. 4. 717с
18. Зуенко Ю.И., Рачков В.И. Климатические изменения температуры, солености и концентрации биогенных элементов в Амурском заливе Японского моря // известия ТИНРО. 2015. Т. 183. С. 186–199.
19. Колючкина Г.А. Биомаркеры воздействия загрязнений на двустворчатых моллюсков Северо Кавказского побережья Чёрного моря // Автореф. дис. канд. биол. наук. Москва. 2009.
20. Кумейко В.В., Гринченко А.В., Сокольникова Ю.Н. Способ оценки здоровья морских двустворчатых моллюсков и состояния среды их обитания: Патент №RU2571817C1. 2015.
21. Мелехова О.П., Сарапульцева Е.И., Евсеева Т.И. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование // М.: Издательский центр Академия. 2008. 288 с.
22. Наумов Ю.А. Антропогенез и экологическое состояние геосистемы прибрежно-шельфовой зоны залива Петра Великого Японского моря // Владивосток: Дальнаука. 2007. 300 с.
23. Нигматулина Л.В. Оценка антропогенной нагрузки береговых источников на Амурский залив (Японское море) // Вестн. ДВО РАН. 2007. Т. 1. С. 73–76.
24. Подгурская О.В., Кавун В.Я. Сравнительный анализ субклеточного распределения тяжелых металлов в органах двустворчатых моллюсков *Crenomytilus grayanus* и *Modiolus kurilensis* в условиях хронического загрязнения // Биология моря. 2005. Т. 31, № 6. С. 435–442.
25. Радовец А.В., Христофорова Н.К. Динамика численности личинок промысловых видов двустворчатых моллюсков в планктоне бухты Миносок (зал. Посьет) и зал. Восток (Японское море) // Известия ТИНРО. 2008. Т. 153. С. 201–214.
26. Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника // М.: Советская наука. 1957. 469 с.

27. Селин Н.И. Состав и структура смешанных поселений *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) и *Modiolus kurilensis* (Bernard, 1983) (Bivalvia: Mytilidae) в заливе Петра Великого Японского моря // Биология моря. 2018. Т. 44, № 5. С. 307–316.
28. Сокольникова Ю.Н., Трубецкая Е.В., Беленева И.А., Гринченко А.В., Кумейко В.В. Флуоресцентный анализ реакций *in vitro* фагоцитоза как эффективный метод оценки активности гемоцитов двустворчатого моллюска *Modiolus kurilensis* (Bernard, 1983) из фоновых и импактной акваторий // Биология моря. 2015. Т. 41, № 2. С. 122–129.
29. Супранович Т.И., Якунин Л.П. Гидрология залива Петра Великого // Тр. ДВНИИГМИ. 1976. Вып. 22. 200 с.
30. Тищенко П.П., Тищенко П.Я., Еловская О.А., Звалинский В.И., Федорец Ю.В. Условия формирования первичной продукции фитопланктона в заливе Восток (Японское море) весной 2016 г. // Известия ТИНРО. 2019. Т. 198. С. 164–185.
31. Ушева Л.Н., Ващенко М.А., Дуркина В.Б. Гистопатология пищеварительной железы двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) из юго-западной части залива Петра Великого Японского моря // Биология моря. 2006. Т. 32, № 3. С. 197–203.
32. Ушева Л.Н., Фролова Л.Т. Морфофункциональные изменения пищеварительной железы у двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) в норме и при паразитарной инвазии трематодами // Биология моря. 2006. Т. 32. С. 115–124.
33. Христофорова Н. К. Тяжелые металлы в промысловых и культивируемых моллюсках залива Петра Великого // Владивосток: Дальнаука. 1993. 296 с.
34. Adams S.M., Brown A.M., Goede R.W. A Quantitative health assessment index for rapid evaluation of fish condition in the field // Transactions of the American Fisheries Society. 1993. Vol. 122, № 1. P. 63–73.
35. Agwuocha S., Kulkarni, B.G., Pandey, A.K. Histopathological alterations in hepatopancreas of *Gafrarium divaricatum* exposed to xylene, benzene and gear oil-WSF // Journal of Environmental Biology. 2011. Vol. 32. P. 35–38.
36. Akaishi F.M., St-Jean S.D., Bishay F., Clarke J., Rabitto I. da S., Ribeiro C.A. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater // Aquatic Toxicology. 2007. Vol. 82, № 1. P. 1–14.
37. Aksentov K.I. Mercury in the sea water of the Amur Bay (the Sea of Japan): recent content and geochemical processes // Russian Meteorology and Hydrology. 2015. Vol. 40. P. 606–611.
38. Alavi M.R., Fernandez-Robledo J.A., Vasta G.R. Development of an *in vitro* assay to examine intracellular survival of *Perkinsus marinus* trophozoites upon phagocytosis by oyster

- (*Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis*) hemocytes // Journal of Parasitology. 2009. Vol. 95. P. 900–907.
39. Albentosa M., Camacho A.P., Beiras R. The effect of food concentration on the scope for growth and growth performance of *Ruditapes decussatus* (L.) seed reared in an open-flow system // Aquaculture Nutrition. 1996. Vol. 2. P. 213–220.
 40. Allam B. Role of extrapallial fluids in bivalve immunity: the case of brown ring disease in the clam *Ruditapes philippinarum* // PhD dissertation. University of Western Brittany. Brest, France. 1998.
 41. Allam B., Carden W. E., Ward J. E., Ralph G., Winnicki S., Espinosa E. P. Early host-pathogen interactions in marine bivalves: evidence that the alveolate parasite *Perkinsus marinus* infects through the oyster mantle during rejection of pseudofeces // Journal of Invertebrate Pathology. 2013. Vol. 113. P. 26–34.
 42. Allam B., Paillard C. Defense factors in clam extrapallial fluids // Diseases of Aquatic Organisms. 1998. Vol. 33. P. 123–128.
 43. Allam B., Paillard C., Auffret M., Ford S.E. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: II. Cellular and biochemical changes following *in vivo* challenge // Fish and Shellfish Immunology. 2006. Vol. 20. P. 384–397.
 44. Allam B., Paillard C., Ford S.E. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams // Diseases of Aquatic Organisms. 2002. Vol. 48. P. 221–231.
 45. Allam B., Paillard P., Auffret M. Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis* // Journal of Invertebrate Pathology. 2000. Vol. 76, № 1. P. 63–69.
 46. Allam B., Pales Espinosa E. Mucosal immunity in mollusks // Mucosal Health in Aquaculture. Beck B., Peatman E. (Eds). London: Elsevier. 2015. P. 325–370.
 47. Allam B., Pales Espinosa E., Tanguy A., Jeffroy F., Le Bris C., Paillard C. Transcriptional changes in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in response to brown ring disease // Fish and Shellfish Immunology. 2014. Vol. 41, № 1. P. 2–11.
 48. Allam B., Raftos D. Immune responses to infectious diseases in bivalves // Journal of Invertebrate Pathology. 2015. Vol. 131. P. 121–136.
 49. Ambariyanto O.H. Nutrient enrichment and the ultrastructure of zooxanthellae from the giant clam *Tridacna maxima* // Marine Biology. 1996. Vol. 125, № 2. P. 359–363.
 50. Anderson R.S., Bureson E.M., Paynter K.T. Defense responses of hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus* // Journal of Invertebrate Pathology. 1995. Vol. 66. P. 82–89.

51. Anderson R.S., Paynter K.T., Bureson E.M. Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus* // Biological Bulletin. 1992. Vol. 183. P. 476–481.
52. Andreyeva A.Y., Kladchenko E.S., Kukhareva T.A., Sakhon E.G. Analysis of cell cycle and morphological and functional abnormalities of *Mytilus galloprovincialis* Lam., 1819 (Bivalvia) hemocytes from coastal ecosystems near Sevastopol, Crimea // Inland Water Biology. 2019. Vol. 12. P. 96–103.
53. Armstrong D.A., Armstrong J.L., Krassner S.M., Pauley G.B. Experimental wound repair in the black abalone, *Haliotis cracherodii* // Journal of Invertebrate Pathology. 1971. Vol. 17, № 2. P. 216–27.
54. Asojo O.A., Schott E.J., Vasta G.R., Silva A.M. Structures of PmSOD1 and PmSOD2, two superoxide dismutases from the protozoan parasite *Perkinsus marinus* // Acta Crystallographica Section F. 2006. Vol. 62. P. 1072–1075.
55. Astaldi G., Verga Z. The glycogen content of the cells of lymphatic leukaemia // Acta Haematologica. 1957. Vol. 17. P. 129–131.
56. Au D.W. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review // Marine Pollution Bulletin. 2004. Vol. 48, № 9–10. P. 817–834.
57. Auffret M. Bivalve hemocyte morphology // Disease processes in marine bivalve molluscs. American Fisheries Society Special Publication. 1988. Vol. 18. P. 169–177.
58. Auffret M. Histopathological changes related to chemical contamination in *Mytilus edulis* from field and experimental conditions // Marine Ecology Progress Series. 1988. Vol. 46. P. 101–107.
59. Auffret M., Mujdzic N., Corporeau P., Moraga D. Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis* // Marine Environmental Research. 2002. Vol. 54, № 3–5. P. 585–589.
60. Azizi G., Akodad M., Baghour M., Layachi M., Moumen A. The use of *Mytilus* spp. mussels as bioindicators of heavy metal pollution in the coastal environment // Journal of Materials and Environmental Science. 2018. Vol. 9. P. 1170–1181.
61. Bado-Nilles A., Gagnaire B., Thomas-Guyon H., Le Floch S., Renault T. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) // Toxicology in Vitro. 2008. Vol. 22. P. 1610–1617.
62. Bala L.O. Specificity and prevalence of the endobiosis of *Coccomyxa parasitica* (Chlorophyta: Chlorococcales) in *Mytilus edulis platensis* (Mollusca: Bivalvia) // National Patagonia. 1995. Vol. 3. P. 1–9.

63. Barmo P., Ciacci P., Canonico B., Fabbri R., Cortese K., Balbi T., Marcomini A., Pojana G., Gallo G., Canesi L. *In vivo* effects of n-TiO₂ on digestive gland and immune function of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* // *Aquatic Toxicology*. 2013. Vol. 132–133. P. 9–18.
64. Barracco M.A., Medeiros I.D., Moreira F.M. Some haematoimmunological parameters in the mussel *Perna perna* // *Fish and Shellfish Immunology*. 1999. Vol. 9. P. 387–404
65. Beckman N., Morse M.P., Moore C.M. Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalvia mollusks *Mya arenaria* // *Journal of Invertebrate Pathology*. 1992. Vol. 59. P. 124–132.
66. Belda C.A., Lucas J.S., Yellowlees D. Nutrient limitation in the giant clam-zooxanthellae symbiosis effects of nutrient supplements on growth of the symbiotic partners // *Marine Biology*. 1993. Vol. 117. P. 655–664.
67. Beliaeff B., Burgeot T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment // *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2002. Vol. 21, № 6. P. 1316–1322.
68. Belzile C., Gosselin M. Free-living stage of the unicellular algae *Coccomyxa* sp. parasite of the blue mussel (*Mytilus edulis*): low-light adaptation, capacity for growth at a very wide salinity range and tolerance to low pH // *Journal of Invertebrate Pathology*. 2015. Vol. 132. P. 201–207.
69. Beninger P.G., Veniot A., Poussart Y. Principles of pseudofeces rejection on the bivalve mantle: integration in particle processing // *Marine Ecology Progress Series*. 1999. Vol. 178. P. 259–269.
70. Bernet D., Schmidt H., Meier W., Burkhardt-Holm P., Wahli T. Histopathology in fish proposal for a protocol to assess aquatic pollution // *Journal of Fish Diseases*. 1999. Vol. 22. P. 25–34.
71. Beyer J., Green N.W., Brooks S., Allan I.J., Ruus A., Gomes T., Brate I.L.N., Schoyen M. Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: a review // *Marine Environmental Research*. 2017. Vol. 130. P. 338–365.
72. Bianchi V.A., Langeloh H., Tillmann U., Krock B., Muller A., Bickmeyer U., Abele D. Separate and combined effects of neurotoxic and lytic compounds of *Alexandrium* strains on *Mytilus edulis* feeding activity and hemocyte function // *Fish and Shellfish Immunology*. 2019. Vol. 84. P. 414–422
73. Bibby R., Widdicombe S., Parry H., Spicer J., Pipe R. Effects of ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis* // *Aquatic Biology*. 2008. Vol. 2, № 1. P. 67–74.
74. Bignell J.P., Stentiford G.D., Taylor N.G., Lyons B.P. Histopathology of mussels (*Mytilus* sp.) from the Tamar estuary, UK // *Marine Environmental Research*. 2011. Vol. 72, № 1–2. P. 25–32.
75. Blaise C., Gagne F., Burgeot T. Three simple biomarkers useful in conducting water quality assessments with bivalve mollusks // *Environmental Science and Pollution Research*. 2017. Vol. 24. P. 27662–27669.

76. Blaise C., Gagne F., Pellerin J., Hansen P-D, Trottier S. Molluscan shellfish biomarker study of the Saguenay Fjord (Quebec, Canada) with the soft-shell clam, *Mya arenaria* // Environmental Toxicology. 2002. Vol. 17. P. 170–186.
77. Boldina-Cosqueric I., Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Dedourge-Geffard O., Metais I., Mouneyrac C., Berthet B. Biochemical, physiological and behavioural markers in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* as tools for the assessment of estuarine sediment quality // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2010. Vol. 73. P. 1733–1741.
78. Bouilly K., Gagnaire B., Bonnard M., Thomas-Guyon H., Renault T., Miramand P., Lapegue S. Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the 567 Pacific oyster, *Crassostrea gigas* // Aquatic Toxicology. 2006. Vol. 78. P. 149–156.
79. Bower S. M., McGladdery S.E. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish // Annual Review of Fish Diseases. 2003. Vol. 4. 1994. P. 1–199.
80. Boychenko T.V. Eco-trophic groups microorganisms in the surface water of the Kievka Bay // Social Science and Humanity. 2017. Vol. 1. P. 48–58.
81. Bramble L.H., Anderson R.S. A comparison of the chemiluminescent response of *Crassostrea virginica* and *Morone saxatilis* phagocytes to zymosan and viable *Listonella anguillarum* // Developmental and Comparative Immunology. 1998. Vol. 22. P. 55–61.
82. Bregante M., Piazza V., Sbrana F., Vassalli M., Faimali M., Gambale F. Osmoregulated chloride currents in hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* // PLoS One. 2016. Vol. 11, № 12. P. 1–18.
83. Broeg K., Lehtonen K.K. Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: integrated assessment of a multi-biomarker approach // Marine Pollution Bulletin. 2006. Vol. 53, № 8–9. P. 508–522.
84. Broeg K., Westernhagen H.V., Zander S., Körting W., Koehler A. The «bioeffect assessment index» (BAI): a concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach // Marine Pollution Bulletin. 2005. Vol. 50, № 5. P. 495–503.
85. Brokordt K., Defranchi Y., Esposito I., Carcamo C., Schmitt P., Mercado L., de la Fuente-Ortega E., Rivera-Ingraham G.A. Reproduction Immunity trade-off in a mollusk: hemocyte energy metabolism underlies cellular and molecular immune responses // Frontiers in Physiology. 2019. Vol. 10. P. 77.
86. Buckley K.M., Rast J.P. Diversity of animal immune receptors and the origins of recognition complexity in the deuterostomes // Developmental and Comparative Immunology. 2015. Vol. 49, № 1. P. 179–189.
87. Bugge M.D., Hegaret H., Wikfors G.H., Allam B. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes // Fish and Shellfish Immunology. 2007. Vol. 23. P. 188–196.

88. Burreson E.M. Misuse of PCR assay for diagnosis of mollusc protistan infections // *Diseases of Aquatic Organisms*. 2008. Vol. 80, № 1. P. 81–83.
89. Bushek D., Ford S.E., Chintala M.M. Comparison of *in vitro*-cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. III. Fecal elimination and its role in transmission // *Diseases of Aquatic Organisms*. 2002. Vol. 51, № 3. P. 217–225.
90. Bussell J.A., Gidman E.A., Causton D.R., Gwynn-Jones D., Malham S.K., Jones M.L.M., Reynolds B., Seed R. Changes in the immune response and metabolic fingerprint of the mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus) in response to lowered salinity and physical stress // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2008. Vol. 358, № 1. P. 78–85.
91. Butler R.A., Roesijadi G. Metallothionein (MT) gene expression and cadmium-induced immunotoxicity in hemocytes of the eastern oyster *Crassostrea virginica* // *Marine Environmental Research*. 2000. Vol. 50, № 1–5. P. 470.
92. Caers M., Coutteau P., Sorgellos P. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat // *Aquaculture*. 1999. Vol. 170. P. 307–322.
93. Cajaraville M.P., Abascal I., Etxeberria M., Marigomez I. Lysosomes as cellular markers of environmental pollution: time- and dose-dependent responses of the digestive lysosomal system of mussels after petroleum hydrocarbon exposure // *Environmental Toxicology and Water Quality*. 1995. Vol. 10. P. 1–8.
94. Cajaraville M.P., Diez G., Marigomez I.I., Angulo E. Responses of basophilic cells of the digestive gland of mussels to petroleum hydrocarbon exposure // *Diseases of Aquatic Organisms*. 1990. Vol. 9. P. 221–228.
95. Cajaraville M.P., Lopez M.C., Azevedo C., Villalba A. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis* // *Diseases of Aquatic Organisms*. 1997. Vol. 29. P. 127–135.
96. Cajaraville M.P., Marigomez J.A., Diez G., Angulo E. Comparative effects of the water accommodated fraction of three oils on mussels-2. Quantitative alterations in the structure of the digestive tubules // *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 1992. Vol. 102C, № 1. P. 113–123.
97. Cajaraville M.P., Pal S.G. Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment // *Cell Structure and Function*. 1995. Vol. 20, № 5. P. 355–367.
98. Canesi L., Betti M., Ciacci C., Scarpato A., Citterio B., Pruzzo C., Gallo G. Signaling pathways involved in the physiological response of mussel hemocytes to bacterial challenge: the role of stress-activated p38 MAPK // *Developmental and Comparative Immunology*. 2002. Vol. 26. P. 325–334.

99. Canesi L., Gallo G., Gavioli M., Pruzzo P. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves // *Microscopy Research and Technique*. 2002a. Vol. 57, № 6. P. 469–476.
100. Canesi L., Lorusso L.C., Ciacci C., Betti M., Rocchi M., Pojana G., Marcomini A. Immunomodulation of *Mytilus* hemocytes by individual estrogenic chemicals and environmentally relevant mixtures of estrogens: *in vitro* and *in vivo* studies // *Aquatic Toxicology*. 2007. Vol. 81. P. 36–44.
101. Canesi L., Fabbri R., Gallo G., Vallotto D., Marcomini A., Pojana G. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂) // *Aquatic Toxicology*. 2010. Vol. 100. P. 168–177.
102. Cantet F., Toubiana M., Parisi M.G. Individual variability of mytimycin gene expression in mussel // *Fish and Shellfish Immunology*. 2012. Vol. 33, № 3. P. 641–644.
103. Carballal M.J., Barber B.J., Iglesias D., Villalba A. Neoplastic diseases of marine bivalves // *Journal of Invertebrate Pathology*. 2015. Vol. 131. P. 83–106.
104. Carballal M.J., Villalba A., Lopez P. Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development, and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis* // *Journal of Invertebrate Pathology*. 1998. Vol. 72, № 3. P. 304–12.
105. Carella F., Feist S.W., Bignell J.P., De Vico G. Comparative pathology in bivalves: aetiological agents and disease processes // *Journal of Invertebrate Pathology*. 2015. Vol. 131. P. 107–120.
106. Chagot D. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémodocytes d'*Ostrea edulis* et de *Crassostrea gigas*, mollusques bivalves. Etude *in vitro* de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (Ascetospora) // Thèse de l'École Pratique des Hautes Etudes, Montpellier. 1989.
107. Champeau O., Narbonne J.F. Effects of tributyltin and 17β-estradiol on immune and lysosomal systems of the Asian clam *Corbicula fluminea* (M.) // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2006. Vol. 21, № 3. P. 323–30.
108. Chang S-J., Su-Min T., Chou H. Morphological characterization via light and electron microscopy of the hemocytes of two cultured bivalves: a comparison study between the hard clam (*Meretrix lusoria*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) // *Zoological Studies*. 2005. Vol. 44. P. 144–152.
109. Chen M., Yang H., Delaporte M., Zhao S. Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge // *Aquaculture*. 2007. Vol. 271, № 1–4. P. 479–487.
110. Chen Z., Zhang D., Xing J., Zhan W. Effects of temperature on haemocyte and granulocyte counts and expressions of immunity-related genes in haemocytes of scallop *Chlamys farreri* after *Vibrio anguillarum* infection // *Journal of Ocean University of China*. 2019. Vol. 18. P. 1163–1173.

111. Cheng T.C. A classification of molluscan hemocytes based on functional evidences // *Invertebrate Blood. Comparative Pathobiology*. 1984. Vol. 6. P. 112–124.
112. Cheng T.C. Effects of *in vivo* exposure of *Crassostrea virginica* to heavy metals on hemocyte viability and activity levels of lysosomal enzymes // *Pathology in Marine Science*. 1990. Vol. 47. P. 513–524.
113. Cheng T.C. Hemocytes: forms and functions // In: Kennedy V.S., Newell R.I.E., Eble A.F. (Eds.). *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Book. College Park: MD. 1996. P. 299–333.
114. Cheng T.C. Cellular defense mechanisms in oysters // In: Fingerman N., Nagabhushanam R. (Eds.). *Recent advances in marine biotechnology. Immunobiology and pathology*. Enfield: Science Publishers. 2000. P. 43–83.
115. Cheng T.C., Ratcliffe N.A., Rowley A.F. *Invertebrate blood cells // Bivalves*. New York: Academic Press. 1981. P. 233–300.
116. Chevre N., Gagne F., Blaise C. Development of a biomarker-based index for assessing the ecotoxic potential of aquatic sites // *Biomarkers*. 2003. Vol. 8, № 3. P. 287–298.
117. Chintala M.M., Bushek D., Ford S.E. Comparison of *in vitro*-cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. II. Dosing methods and host response // *Diseases of Aquatic Organisms*. 2002. Vol. 51. P. 203–216.
118. Cho S.-M., Jeong W.-G. Spawning impact on lysosomal stability of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* // *Aquaculture*. 2005. Vol. 244, № 1–4. P. 383–387.
119. Choquet G., Soudant P., Lambert C., Nicolas J.L., Paillard C. Reduction of adhesion properties on *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis* // *Diseases of Aquatic Organisms*. 2003. Vol. 57. P. 109–116.
120. Chu F.L.E. Defense mechanisms of marine bivalves // In: Fingerman N., Nagabhushanam R. (Eds.). *Recent advances in marine biotechnology. Immunobiology and pathology*. Enfield: Science Publishers. 2000. P. 1–42.
121. Chu F.L.E., La Peyre J.F. Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oysters (*Crassostrea virginica*) // *Journal of Invertebrate Pathology*. 1989. Vol. 54. P. 224–232.
122. Ciacci C., Betti M., Canonico B., Citterio B., Roch P., Canesi L. Specificity of anti-*Vibrio* immune response through p38 MAPK and PKC activation in the hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* // *Journal of Invertebrate Pathology*. 2010. Vol. 105, № 1. P. 49–55.
123. Ciacci C., Fabbri R., Betti M., Roch P., Canesi L. Seasonal changes in functional parameters of the hemolymph of *Mytilus galloprovincialis* // *Invertebrate Survival Journal*. 2009. Vol. 6, № 1. P. 44–48.

124. Cima F., Matozzo V., Marin M.G., Ballarin L. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850): morphofunctional characterization // Fish and Shellfish Immunology. 2000. Vol. 10. P. 677–693.
125. Ciparis S., Rhyne G., Stephenson T. Exposure to elevated concentrations of major ions decreases condition index of freshwater mussels: comparison of metrics // Freshwater Mollusk Biology and Conservation. 2019. Vol. 22, № 2. P. 98–108.
126. Coles J.A., Farley S.R., Pipe R.K. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium // Diseases of Aquatic Organisms. 1995. Vol. 22. P. 59–65.
127. Coles J.A., Pipe R.K. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis* // Fish and Shellfish Immunology. 1994. Vol. 4. P. 337–352.
128. Cone R.A. Barrier properties of mucus // Advanced Drug Delivery Reviews. 2009. Vol. 61. P. 75–85.
129. Cong M., Song L.S., Wang L.L., Zhao J.M., Qiu L.M., Li L., Zhang H. The enhanced immune protection of Zhikong scallop *Chlamys farreri* on the secondary encounter with *Listonella anguillarum* // Comparative Biochemistry and Physiology B. 2008. Vol. 151. P. 191–196.
130. Costa P.M., Carreira S., Costa M.H., Caeiro S. Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality // Aquatic Toxicology. 2013. Vol. 126. P. 442–454.
131. Couch J.A. Atrophy of diverticular epithelium as an indicator of environmental irritants in the Oyster, *Crassostrea virginica* // Marine Environmental Research. 1984. Vol. 14. P. 525–526.
132. Coustau C., Kurtz J., Moret Y. A novel mechanism of immune memory unveiled at the invertebrate-parasite interface // Trends in Parasitology. 2016. Vol. 32, № 5. P. 353–355.
133. Crespo C., Rodriguez H., Segade P., Iglesias R., Garcia-Estevéz J.M. *Coccomyxa* sp. (Chlorophyta: Chlorococcales), a new pathogen in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) of Vigo estuary (Galicia, NW Spain) // Journal of Invertebrate Pathology. 2009. Vol. 102, № 3. P. 214–219.
134. Cuevas N., Zorita I., Costa P.M., Franco J., Larreta J. Development of histopathological indices in the digestive gland and gonad of mussels: integration with contamination levels and effects of confounding factors // Aquatic Toxicology. 2015. Vol. 162. P. 152–164.
135. da Silva P.M., Hegaret H., Lambert C., Wikfors G.H., Le Goic N., Shumway S.E., Soudant P. Immunological responses of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) with varying parasite (*Perkinsus olseni*) burden, during a long-term exposure to the harmful alga, *Karenia selliformis*, and possible interactions // Toxicon. 2008. Vol. 51. P. 563–573.

136. Dahl S.F., Allam B. Laboratory transmission studies of QPX disease in the northern quahog (=hard clam): development of an infection procedure // *Journal of Shellfish Research*. 2007. Vol. 26. P. 383–389.
137. Dang C., Cribb T.H., Osborne G., Kawasaki M., Bedin A.S., Barnes A.C. Effect of a hemiuroid trematode on the hemocyte immune parameters of the cockle *Anadara trapezia* // *Fish and Shellfish Immunology*. 2013. Vol. 35, № 3. P. 951–956.
138. Darriba S., Sanchez–Marin P. Lead accumulation in extracellular granules detected in the kidney of the bivalve *Dosinia exoleta* // *Aquatic Living Resources*. 2013. Vol. 26. P. 11–17.
139. De los Rios A., Echavarri-Erasun B., Devier, M.H., Le Menach K., Budzinski H., Ortiz-Zarragoitia M., Orbea A., Juanes J.A., Cajaraville M.P. Assessment of the effects of discontinuous sources of contamination through biomarker analyses on caged mussels // *Science of the Total Environment*. 2018. Vol. 634. P. 116–126.
140. Delaporte M., Chu F.E., Langdon C., Moal J., Lambert C., Samain J.F., Soudant P. Changes in biochemical and hemocyte parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed T-Iso supplemented with lipid emulsions rich in eicosapentaenoic acid // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2007. Vol. 342. P. 261–275.
141. Delaporte M., Soudant P., Moal J., Lambert C., Quere C., Miner P., Choquet G., Paillard C., Samain J.F. Effect of a monospecific algal diet on immune functions in two bivalve species – *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* // *Journal of Experimental Biology*. 2003. Vol. 206. P. 3053–3064.
142. Des Voigne D. M., Sparks A. K. The process of wound healing in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* // *Journal of Invertebrate Pathology*. 1968. Vol. 12. P. 53–65.
143. Devin S., Burgeot T., Giamberini L., Minguez L., Pain-Devin P. The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse // *Environmental Science and Pollution Research*. 2013. Vol. 21, № 4. P. 2448–2454.
144. Diamant A., Lipshitz A., Ucko M. Phylogeny of *Coccomyxa* (Myxosporea: Myxidiidae) spp. with the description of a new species from *Bathygobius cyclopterus* (Gobiidae) in the northern Red Sea // *Folia parasitologica*. 2007. Vol. 54. P. 109–116.
145. Diane L., Waller W., Cope G. The status of mussel health assessment and a path forward // *Freshwater Mollusk Biology and Conservation*. 2019. Vol. 22, № 2. P. 26–42.
146. Dimitriadis V.K., Gougoula C., Anestis A., Portner H.O., Michaelidis B. Monitoring the biochemical and cellular responses of marine bivalves during thermal stress by using biomarkers // *Marine Environmental Research*. 2012. Vol. 73. P. 70–77.

147. Donaghy L, Hong H-K, Jauzein C, Choi K-S. The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve mollusks // *Fish and Shellfish Immunology*. 2015. Vol. 42. P. 91–97.
148. Donaghy L., Lambert C., Choi K.-S., Soudant P. Hemocytes of the carpet shellclam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): current knowledge and future prospects // *Aquaculture*. 2009. Vol. 297. P. 10–24.
149. Duchemin M.B., Fournier M., Auffret M. Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) // *Aquaculture*. 2007. Vol. 264, № 1–4. P. 73–81.
150. Duperthuy M., Schmitt P., Garzyn E., Caro A., Rosa R.D., Le Roux F., Lautredou-Audouy N., Got P., Romestand B., de Lorgeril J., Kieffer-Jaquinod S., Bachere E., Destoumieux-Garzona D. Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus* // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2011. Vol. 108. P. 2993–2998.
151. Dyrynda E.A., Law R.J., Dyrynda P.E.J., Kelly C.A., Pipe R.K., Ratcliffe N.A. Changes in immune parameters of natural mussel *Mytilus edulis* populations following a major oil spill (Sea Empress, Wales, UK) // *Marine Ecology Progress Series*. 2000. Vol. 206. P. 155–170.
152. Dyrynda E.A., Pipe R.K., Burt G.R., Ratcliffe N.A. Modulations in the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK // *Aquatic Toxicology*. 1997. Vol. 42. P. 169–185.
153. Dyrynda E.A., Pipe R.K., Burt G.R., Ratcliffe N.A. Modulations in the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK // *Aquatic Toxicology*. 1998. Vol. 42. P. 169–185.
154. Ellis R.P., Parry H., Spicer J.I., Hutchinson T.H., Pipe R.K., Widdicombe S. Immunological function in marine invertebrates: responses to environmental perturbation // *Fish and Shellfish Immunology*. 2011. Vol. 30. P. 1209–1222.
155. Espinosa E.P., Winnicki S., Allam B. Early host-pathogen interactions in a marine bivalve: *Crassostrea virginica* pallial mucus modulates *Perkinsus marinus* growth and virulence // *Diseases of Aquatic Organisms*. 2014. Vol. 104. P. 237–247.
156. Estrada N., Velazquez E., Rodríguez-Jaramillo C., Ascencio F. Morphofunctional study of hemocytes from lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus* // *Immunobiology*. 2013. Vol. 218. P. 1093–1103.
157. Evariste L., Auffret M., Audonnet S., Geffard A., David E., Brousseau P., Fournier M., Betoulle S. Functional features of hemocyte subpopulations of the invasive mollusk species *Dreissena polymorpha* // *Fish and Shellfish Immunology*. 2016. Vol. 56. P. 144–154.

158. Fabbri E., Valbonesi P., Franzellitti S. HSP expression in bivalves // *Invertebrate Survival Journal*. 2008. Vol. 5. P.135–161.
159. Faggio C., Tsarpali V., Dailianis S. Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: an overview // *Science of the Total Environment*. 2018. Vol. 636. P. 220–229.
160. Farrington J.W., Tripp B.W., Tanabe S., Subramanian A., Sericano J.L., Wade T.L., Knap A.H. Edward D. Goldberg's proposal of «the Mussel Watch»: reflections after 40years // *Marine Pollution Bulletin*. 2016. Vol. 110, № 1. P. 501–510.
161. Feng S.Y., Canzonier W.J. Humoral responses in the American oyster (*Crassostrea virginica*) infected with *Bucephalus* sp. and *Minchinia nelson* // *American Fisheries Society*. 1970. Vol. 5. P.497–510.
162. Feng S.Y., Feng J.S., Yamasu T. Roles of *Mytilus coruscus* and *Crassostrea gigas* blood cells in defense and nutrition // *Comparative Pathobiology*. 1977. Vol. 3. P. 32–63.
163. Fisher W.S. Structure and functions Oyster hemocytes // In: Brehelin M. (eds) *Immunity in Invertebrates. Proceedings in Life Sciences*. Springer, Berlin, Heidelberg. 1986. P. 25–35.
164. Fisher W.S. Antimicrobial activity of copper and zinc accumulated in eastern oyster amoebocytes // *Journal of Shellfish Research*. 2004a. Vol. 23. P. 321–351.
165. Fisher W.S. Relationship of amebocytes and terrestrial elements to adult shell deposition in eastern oysters // *Journal of Shellfish Research*. 2004b. Vol. 23. P. 353–367.
166. Fisher W.S., Leah M.O., Edwards P. Hematologic and serologic variability of eastern oysters from Apalachicola Bay, Florida // *Journal of Shellfish Research*. 1996. Vol. 15. P. 555–564.
167. Fisher W.S., Newell R.I.E. Salinity effects on the activity of granular hemocytes of American oysters, *Crassostrea virginica* // *Biological Bulletin*. 1986. Vol. 170. 122–134.
168. Fisher W.S., Oliver L.M., Winstead J.T., Long E.R. A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminant burdens // *Aquatic Toxicology*. 2000. Vol. 51. P. 115–138.
169. Fleury E., Huvet A. Microarray analysis highlights immune response of Pacific Oysters as a determinant of resistance to summer mortality // *Marine Biotechnology*. 2012. Vol. 14. P. 203–217.
170. Flye-sainte-marie J., Soudant P., Lambert C., Le Goïc N., Goncalvez M., Travers M., Paillard C., Jean F. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes philippinarum* in the field during an annual cycle // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2009. Vol. 377, № 1. P. 1–11.
171. Flye-Sainte-Marie J., Soudant P., Lambert C., Le Goïc N., Goncalvez M., Travers M.-A., Paillard C., Jean F. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes philippinarum* in the

- field during an annual cycle // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2009. Vol. 377. P. 1–11.
172. Ford S.E., Borrero F.J. Epizootiology and pathology of juvenile oyster disease in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* // *Journal of Invertebrate Pathology*. 2001. Vol. 78. P. 141–154.
173. Ford S.E., Bricelj V.M., Lambert C., Paillard C. Deleterious effects of a non PST bioactive compounds from *Alexandrium tamarense* on bivalve hemocytes // *Marine Biology*. 2008. Vol. 154. P. 241–253.
174. Ford S.E., Kraeuter J.N., Barber R.D., Mathis G. Aquaculture-associated factors in QPX disease of hard clams: density and seed source // *Aquaculture*. 2002. Vol. 208. P. 23–38.
175. Fournier M., Pellerin J., Clermont Y., Morin Y., Brousseau P. Effects of *in vivo* exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes // *Toxicology*. 2001. Vol. 61. P. 201–211.
176. Fournier M., Pellerin J., Lebeuf M., Brousseau P., Morin Y., Cyr D. Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes // *Aquatic Toxicology*. 2002. Vol. 59, № 1–2. P. 83–92.
177. Fowler B.A., Gould E. Ultrastructural and biochemical studies of intracellular metalbinding patterns in kidney tubule cells of the scallop *Placopecten magellanicus* following prolonged exposure to cadmium or copper // *Marine Biology*. 1988. Vol. 97. P. 207–216.
178. Franchini A., Ottaviani E. Repair of molluscan tissue injury: role of PDGF and TGF-beta1 // *Tissue and Cell*. 2000. Vol. 32, № 4. P. 312–321.
179. Friedl F.E., Alvarez M.R. Hide details Oxidant production by hemocytes of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin) // *Aquaculture*. 1992. Vol. 107, № 2–3. P. 125–129.
180. Fries C.R., Tripp M.R. Depression of phagocytosis in *Mercenaria* following chemical stress // *Developmental and Comparative Immunology*. 1980. Vol. 4. P. 233–244.
181. Gabri M., Fawaz A., Saad A.E.-H., Aly R. Biological aspects of the digestive system of *Caelatura teretiuscula* (Bivalvia: Unionidae) // *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*. 2018. Vol. 9, № 1. P. 15–40.
182. Gagnaire B., Frouin H., Moreau K., Thomas-Guyon H., Renault T. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) // *Fish and Shellfish Immunology*. 2006. Vol. 20, № 4. P. 536–547.
183. Gagnaire B., Soletchnik P., Faury N., Kerdudou N., Le Moine O., Renault T. Analysis of hemocyte parameters in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in the field - comparison of hatchery diploids and diploids from natural beds // *Aquaculture*. 2007. Vol. 264. P. 449–456.

184. Gagne F., Blaise C., Fournier M., Hansen P.D. Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels // Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology. 2006. Vol. 143, № 2. P. 179–86.
185. Gajbhiye D.S., Khandeparker L. Immunoecology of the short neck clam *Paphia malabarica* (Chemnitz, 1782) in a tropical monsoon-influenced estuary // Marine Environmental Research. 2019. Vol. 143. P. 60–70.
186. Galimany E., Sunila I., Hegaret H., Ramon M., Wikfors G.H. Pathology and immune response of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) after an exposure to the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum* // Harmful Algae. 2008a. Vol. 7. P. 630–638.
187. Galimany E., Sunila I., Hegaret H., Ramon M., Wikfors G.H. Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: histopathology, immune responses, and recovery // Harmful Algae. 2008b. Vol. 7. P. 702–711.
188. Garcia-Garcia E., Prado-Alvarez M., Novoa B., Figueras A., Rosales C. Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI3-K, PKC, and ERK kinase families // Developmental and Comparative Immunology. 2008. Vol. 32. P. 637–653.
189. Genthner F.J., Volety A.K., Oliver L.M., Fisher W.S. Factors influencing *in vitro* killing of bacteria by hemocytes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) // Applied and Environmental Microbiology. 1999. Vol. 65, № 7. P. 3015–3020.
190. George S.G. Heavy metal detoxication in *Mytilus* kidney. An *in vitro* study of Cd and Zn-binding to isolate tertiary lysosomes // Comparative Biochemistry and Physiology. 1983. Vol. 76. P. 59–65.
191. Gerdol M., Gomez-Chiarri M., Castillo M.G., Figueras A., Fiorito G., Moreira R., Novoa B., Pallavicini A., Ponte G., Roumbedakis K., Venier P., Vasta G.R. Immunity in molluscs: recognition and effector mechanisms, with a focus on Bivalvia // In: Cooper E. (Eds.). Advances in Comparative Immunology. Cham: Springer. 2018. P. 225–341.
192. Gervais O., Renault T., Arzul I. Molecular and cellular characterization of apoptosis in flat oyster a key mechanisms at the heart of host-parasite interactions // Scientific Reports. 2018. Vol. 8, № 1. P. 1–12.
193. Gestal C., Pallavicini A., Venier P., Novoa B., Figueras A. MgC1q, a novel C1q-domain-containing protein involved in the immune response of *Mytilus galloprovincialis* // Developmental and Comparative Immunology. 2010. Vol. 34. P. 926–934.
194. Gestal C., Roch P., Renault T., Pallavicini A., Paillard C., Novoa B., Oubella R., Venier P., Figueras A. Study of diseases and the immune system of bivalves using molecular biology and genomics // Reviews in Fisheries Science. 2008. Vol. 16, № 1. P. 131–154.

195. Gillis P.L. Cumulative impacts of urban runoff and municipal wastewater effluents on wild freshwater mussels (*Lasmigona costata*) // Science of the Total Environment. 2012. Vol. 431. P. 348–356.
196. Giltrap M., Ronan J., Tanner C., O’Beirn F.X., Lyons B.P., Mag Aoidh R., Rochford H., McHugh B., McGovern E., Wilson J. Application of a weight of evidence approach utilising biological effects, histopathology and contaminant levels to assess the health and pollution status of *Irish blue mussels* (*Mytilus edulis*) // Marine Environmental Research. 2016. Vol. 122. P. 33–45.
197. Giron-Perez M.I. Relationships between innate immunity in bivalve molluscs and environmental pollution // Invertebrate Survival Journal. 2010. Vol. 7. P. 149–156.
198. Goedken M., De Guise S. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms // Fish and Shellfish Immunology. 2004. Vol. 16. P. 539–552.
199. Goedken M., Morsey B., Sunila I., De Guise S. Immunomodulation of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica* cellular defense mechanisms by *Perkinsus marinus* // Journal of Shellfish Research. 2005. Vol. 24. P. 487–496.
200. Goetsch W., Scheuring L. Parasitismus und symbiose der algengattung chlorella // Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere. 1926. Vol. 7, № 1–2. P. 220–253.
201. Goldberg E.D., Bertine K.K. Beyond mussel match – new directions for monitoring marine pollution // The Science of the Total Environment. 2000. Vol. 247. P. 165–174.
202. Gomez-Chiarri M., Warren W.C., Guo X., Proestou D. Developing tools for the study of molluscan immunity: the sequencing of the genome of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* // Fish and Shellfish Immunology. 2015. Vol. 46, № 1. P. 2–4.
203. Gomez-Mendikute A., Cajaraville M.P. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes // Toxicology in Vitro. 2003. Vol. 17. P. 539–546.
204. Gontier N., Pombo O. Reticulate evolution: symbiogenesis, lateral gene transfer, hybridization and infectious heredity (interdisciplinary evolution research) // Reticulate Evolution. 2015. Vol. 3. P. 1–40.
205. Gonzalez-Soto N., Hatfield J., Katsumiti A., Duroudier N., Lacave J.M., Bilbao E., Orbea A., Navarro E., Cajaraville M.P. Impacts of dietary exposure to different sized polystyrene microplastics alone and with sorbed benzo[a]pyrene on biomarkers and whole organism responses in mussels *Mytilus galloprovincialis* // Science of the Total Environment. 2019. Vol. 684. P. 548–566.
206. Gosling E. Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture // Oxford: Blackwell Science. 2004. 443 p.

207. Gray A.P., Lucas I.A.N., Seed R., Richardson C.A. *Mytilus edulis chilensis* infested with *Coccomyxa parasitica* (Chlorococcales, Coccomyxaceae) // Journal of Molluscan Studies. 1999. Vol. 65, № 3. P. 289–294.
208. Grinchenko A., Sokolnikova Y., Korneiko D., Kumeiko V. Dynamics of the immune response of the horse mussel *Modiolus kurilensis* (Bernard, 1983) following challenge with heat-inactivated bacteria // Journal of Shellfish Research. 2015. Vol. 34, № 3. P. 909–917.
209. Guillard R.R.L., Ryther J.H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran // Canadian Journal of Microbiology. 1962. Vol. 8. P. 229–239.
210. Guo X., Ford S.E. Infectious diseases of marine molluscs and host responses as revealed by genomic tools // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2016. Vol. 371, № 1689. P. 1–16.
211. Guo X., He Y., Zhang L., Lelong C., Jouaux A. Immune and stress responses in oysters with insights on adaptation // Fish and Shellfish Immunology. 2015. Vol. 46, № 1. P. 107–119.
212. Haberkorn H., Lambert C., Le Goic N., Gueguen M., Moal J., Palacios E., Lassus P., Soudant P. Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas* // Aquatic Toxicology. 2010. Vol. 97, № 2. P. 96–108.
213. Hannam M.L., Bamber S.D., Galloway T.S., John Moody A., Jones M.B. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus* // Chemosphere. 2010. Vol. 78, № 7. P. 779–84.
214. Harris-Young L., Tamplin M.L., Mason W.J., Aldrich H.C., Jackson K. Viability of *Vibrio vulnificus* in association with hemocytes of the American oyster (*Crassostrea virginica*) // Applied and Environmental Microbiology. 1995. Vol. 61. P. 52–57.
215. Hartland B.J., Timoney J.F. Vivo clearance of enteric bacteria from the hemolymph of the hard clam and the American oyster // Applied and Environmental Microbiology. 1979. Vol. 37. P. 517–520.
216. Hartman M.C., Pratt I. Infection of the heart cockle, *Clinocardium nuttallii*, from Yaquina Bay, Oregon, with an endosymbiotic alga // Journal of Invertebrate Pathology. 1976. Vol. 28. P. 291–299.
217. Hauton C., Hawkins L.E., Hutchinson S. The effects of salinity on the interaction between a pathogen (*Listonella anguillarum*) and components of a host (*Ostrea edulis*) immune system // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2000. Vol. 172, № 2. P. 203–212.

218. He Y., Jouaux A., Ford S.E., Lelong C., Sourdain P., Mathieu M., Guo X. Transcriptome analysis reveals strong and complex antiviral response in a mollusk // *Fish and Shellfish Immunology*. 2015. Vol. 46. P. 131–144.
219. Hegaret H., da Silva P.M., Wikfors G.H., Haberkorn H., Shumway S.E., Soudant P. In vitro interactions between several species of harmful algae and haemocytes of bivalve molluscs // *Cell Biology and Toxicology*. 2011. Vol. 27, № 4. P. 249–66.
220. Hegaret H., Wikfors G.H., Soudant P. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2003. Vol. 293, № 2. P. 249–265.
221. Hegaret H., Wikfors H.G., Soudant P., Delaporte M., Alix J.H., Smith B.C., Dixon M.S., Quere C., Le Coz J.R., Paillard C., Moal J., Samain J.F. Immunological competence of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, fed different microalgal diets and challenged with a temperature elevation // *Aquaculture*. 2004. Vol. 234. P. 541–560.
222. Hernandez-Mendez L.S., Castro-Longoria E., Araujo-Palomares C.L., Garcia-Esquivel Z., Castellanos-Martinez S. Hemocyte cell types of the Cortes Geoduck, *Panopea globosa* (Dall 1898), from the Gulf of California, Mexico // *Fish and Shellfish Immunology*. 2020. Vol. 100. P. 230–237.
223. Hernawan U.E. Symbiosis between the giant clams (Bivalvia: Cardiidae) and zooxanthellae (Dinophyceae) // *Indonesia: Biodiversitas*. 2008. Vol. 9, № 1. P. 53–58.
224. Hinde R. Symbioses between aquatic invertebrates and algae // *International Journal for Parasitology*. 1987. Vol. 17, № 2. P. 383–390.
225. Hine P.M. The inter-relationships of bivalve haemocytes // *Fish and Shellfish Immunology*. 1999. Vol. 9. P. 367–385.
226. Holden J., Pipe R., Quaglia A., Ciani G. Blood cells of the arcid clam, *Scapharca inaequalvis* // *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 1994. Vol. 74, № 2. P. 287–299.
227. Hong H.K., Donaghy L., Park H.S., Choi K.S. Influence of reproductive condition of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* on hemocyte parameters during early post-spawning period // *Aquaculture*. 2014. Vol. 434. P. 241–248.
228. Hook S.E., Gallagher E. P., Batley G.E. The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health // *Integrated Environmental Assessment and Management*. 2014. Vol. 10. P. 327–341.

229. Hooper C., Hardy-Smith P., Handler J. Ganglioneuritis causing high mortalities in farmed Australian abalone (*Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*) // Australian Veterinary. 2007. Vol. 85. P. 188–193.
230. Houston R.D. Future directions in breeding for disease resistance in aquaculture species // Revista Brasileira de Zootecnia. 2017. Vol. 46, № 6. P. 545–551.
231. Howard D.W., Lewis E.J., Keller B.J., Smith C.S. Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans // NOAA Technical Memorandum NCCOS. 2004. Vol. 5, № 1. P. 1–218.
232. Huang X., Lin D., Ning K., Sui Y., Hu M., Lu W., Wang Y. Hemocyte responses of the thick shell mussel *Mytilus coruscus* exposed to nano-TiO₂ and seawater acidification // Aquatic Toxicology. 2016. Vol. 180. P. 1–10.
233. Huffman J.E., Tripp M.R. Cell types and hydrolytic enzymes of soft shell clam (*Mya arenaria*) haemocytes // Journal of Invertebrate Pathology. 1982. Vol. 40. P. 68–74.
234. Hughes F.M., Foster B., Grewal S., Sokolova I.M. Apoptosis as a host defense mechanism in *Crassostrea virginica* and its modulation by *Perkinsus marinus* // Fish and Shellfish Immunology. 2010. Vol. 29, № 2. P. 247–257.
235. Hummel H., Bogaards R.H., Nieuwenhuize J., De Wolf L., Van Liere J.M. Spatial and seasonal changes differences in the PCB content of the mussels *Mytilus edulis* // The Science of the Total Environment. 1990. Vol. 92. P. 155–163.
236. Humphrey C.D., Pittman F.E. A simple methylene blue-azure II-basic fuchsin stain for epoxy-embedded tissue sections // Stain Technology. 1974. Vol. 49. P. 9–14.
237. Husmann G., Abele D., Rosenstiel P., Clark M.S., Kraemer L., Philipp E.E. Age-dependent expression of stress and antimicrobial genes in the hemocytes and siphon tissue of the Antarctic bivalve, *Laternula elliptica*, exposed to injury and starvation // Cell Stress and Chaperones. 2014. Vol. 19, № 1. P. 15–32.
238. Ikeda S., Yamashita H., Kondo S.N., Inoue K., Morishima S.Y., Koike K. Zooxanthellal genetic varieties in giant clams are partially determined by species-intrinsic and growth-related characteristics // PLoS ONE. 2017. Vol. 12, № 2. P. 127–132.
239. Irinco-Salinas R. Histopathology in the digestive gland of *Batissa violaceae*, Lamark as a biomarker of pollution in the Catubig River, Northern Samar, Philippines // International Conference on Environment, Chemistry and Biology IPCBEE. Singapore: IACSIT Press. 2012. Vol. 49 P. 20–24.
240. Ishikawa H., Takahashi G., Katsuyoshi M. Annual changes in maturation of the gonad and phagocytic activity in hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Onogawa Bay, Miyagi Prefecture // Suisanzoshoku. 1999. Vol. 47, № 4. P. 519–525.

241. Ivanina A.V., Hawkins C., Sokolova I.M. Interactive effects of copper exposure and environmental hypercapnia on immune functions of marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria* // Fish and Shellfish Immunology. 2016. Vol. 49. P. 54–65.
242. Jantzen C., Wild C., El-Zibdah M., Roa-Quiaoit H.A., Haacke C., Richter C. Photosynthetic performance of giant clams, *Tridacna maxima* and *T. squamosa*, Red Sea // Marine Biology. 2008. Vol. 155, № 2. P. 211–221.
243. Jones D.S., Jacobs D.K. Photosymbiosis in *Clinocardium nuttalli*: implications for tests of photosymbiosis in fossil mollusks // PALAIOS. 1992. Vol. 7, № 1. P. 86–95.
244. Kauffman E.G. Bivalvia // In: Paleontology. Encyclopedia of Earth Science. Berlin: Springer. 1979.
245. Khristoforova N.K., Zhuravel E.V., Mironova Y.A. Recreational effects in Vostok Bay, Sea of Japan // Russian Journal of Marine Biology. 2002. Vol. 28. P. 274–277.
246. Kleeman S.N., Adlard R.D., Lester R.J. Detection of the initial infective stages of the protozoan parasite *Marteilia sydneyi* in *Saccostrea glomerata* and their development through to sporogenesis // International Journal for Parasitology. 2002. Vol. 32, № 6. P. 767–84.
247. Kobzar A.D., Khristoforova N.K. Monitoring heavy-metal pollution of the coastal waters of Amursky Bay (Sea of Japan) using the brown alga *Sargassum miyabei* Yendo, 1907 // Russian Journal of Marine Biology. 2015. Vol. 41. P. 384–388.
248. Kolyuchkina G.A., Ismailov A.D. Morpho-functional characteristics of bivalve mollusks under the experimental environmental pollution by heavy metals // Oceanology. 2011. Vol. 51, № 5. P. 804–813.
249. Koutsogiannaki S., Kaloyianni M. Signaling molecules involved in immune responses in mussels // ISJ-Invertebrate Survival Journal. 2009. Vol. 7. P. 11–21.
250. Kozhenkova S.I. Retrospective analysis of the marine flora of Vostok Bay, Sea of Japan // Russian Journal of Marine Biology. 2009. Vol. 35. P. 263–278.
251. Kuchel R.P., Raftos D.A., Birch D., Vella N. Haemocyte morphology and function in the Akoya pearl oyster, *Pinctada imbricate* // Journal of Invertebrate Pathology. 2010. Vol. 105, № 1. P. 36–48.
252. Kumar S., Pandey R.K., Das S., Das V.K. Pathological changes in hepatopancreas of freshwater mussel (*Lamellidens marginalis*, Lamarck) exposed to sub-lethal concentration of dimethoate // GERF Bulletin of Biosciences. 2011. Vol. 2, № 2. P. 18–23.
253. Kumeiko V.V., Sokolnikova Y.N., Grinchenko A.V., Mokrina M.S., Kniazkina M.I. Immune state correlates with histopathological level and reveals molluscan health in populations of *Modiolus kurilensis* by integral health index (IHI) // Journal of Invertebrate Pathology. 2018. Vol. 154. P. 42–57.

254. La Peyre J.F., Chu F.-L.E., Meyers J.M. Haemocytic and humoral activities of eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus* // Fish and Shellfish Immunology. 1995. Vol. 5. P. 179–190.
255. Ladhar-Chaabouni R., Hamza-Chaffai A. The cell cultures and the use of haemocytes from marine molluscs for ecotoxicology assessment // Cytotechnology. 2015. Vol. 68. P. 1669–1685.
256. Lafont M., Vergnes A., Vidal-Dupiol J., de Lorgeril J., Gueguen Y., Haffner P., Petton B., Chaparro C., Barrachina C., Destoumieux-Garzon D., Mitta G., Gourbal B., Montagnani C. A sustained immune response supports long-term antiviral immune priming in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* // mBio. 2020. Vol. 11, № 2. P. e02777-19.
257. Lambert C., Soudant P., Choquet G., Paillard C. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocytes oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios // Fish and Shellfish Immunology. 2003. Vol. 15. P. 225–240.
258. Lambert C., Soudant P., Degremont L., Delaporte M., Moal J., Boudry P., Jean F., Huvet A., Samain J-F., Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites // Aquaculture. 2007. Vol. 270, № 1–4. P. 276–288.
259. Landsberg J.H. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms // Reviews in Fisheries Science. 2002. Vol. 10. P. 113–390.
260. Lassudrie M., Soudant P., Richard G., Henry N., Medhioub W., da Silva P.M., Donval A., Bunel M., Le Goic N., Lambert C., de Montaudouin X., Fabioux C., Hegaret H. Physiological responses of Manila clams *Venerupis (=Ruditapes) philippinarum* with varying parasite *Perkinsus olseni* burden to toxic algal *Alexandrium ostenfeldii* exposure // Aquatic Toxicology. 2014. Vol. 154. P. 27–38.
261. Lau Y.T., Gambino L., Santos B., Pales Espinosa E., Allam B. Transepithelial migration of mucosal hemocytes in *Crassostrea virginica* and potential role in *Perkinsus marinus* pathogenesis // Journal of Invertebrate Pathology. 2018. Vol. 153. P. 122–129.
262. Lau Y.T., Sussman L., Pales Espinosa E., Katalay S., Allam B. Characterization of hemocytes from different body fluids of the eastern oyster *Crassostrea virginica* // Fish and Shellfish Immunology. 2017. Vol. 71. P. 372–379.
263. Le Foll F., Rioult D., Boussa S., Pasquier J., Dagher Z., Leboulenger F. Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging // Fish and Shellfish Immunology. 2010. Vol. 28. P. 372–386.
264. Li J., Green C., Reynolds A., Shi H., Rotchell J.M. Microplastics in mussels sampled from coastal waters and supermarkets in the United Kingdom // Environmental Pollution. 2018. Vol. 41. P. 35–44.

265. Li Y., Qin J.G., Abbot C.A., Li X., Benkendorff K. Synergistic impacts of heat shock and spawning on the physiology and immune health of *Crassostrea gigas*: an explanation for summer mortality in Pacific oysters // American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2007. Vol. 293. P. 2353–2362.
266. Liu C., Jiang S., Wang M., Wang L., Chen H., Xu J., Lv Z., Song L. A novel siglec (CgSiglec-1) from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) with broad recognition spectrum and inhibitory activity to apoptosis, phagocytosis and cytokine release // Developmental and Comparative Immunology. 2016. Vol. 61. P. 136–144.
267. Liu W., He J., Bao X. Mitochondrial DNA supports validity of *Modiolus kurilensis* F.R. Bernard, 1983 // Shell Discoveries. 2014. Vol. 1, № 3. P. 18–19.
268. Livingstone D.R., Chipman J.K., Lowe D.M., Minier C., Mitchelmore C.L., Moore M.N., Peters L.D., Pipe R.K. Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids // International Journal of Environment and Pollution. 2000. Vol. 13. P. 56–91.
269. Livingstone D.R., Pipe R.K. Mussels and environmental contaminants: molecular and cellular aspects // In: Gosling E. (Eds.). The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. Amsterdam: Elsevier. Vol. 25. P. 425–456.
270. Lopez C., Carballal M.J., Azevedo C., Villalba A. Enzyme characterisation of the circulating haemocytes of the carpet shell clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia) // Fish and Shellfish Immunology. 1997a. Vol. 7. P. 595–608.
271. Lopez C., Carballal M.J., Azevedo C., Villalba A. Morphological characterization of the haemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia) // Journal of Invertebrate Pathology. 1997b. Vol. 69. P. 51–57.
272. Lopez-Cortesa L., Castroa D., Navasb J.I., Borrego J.J. Phagocytic and chemotactic responses of manila and carpet shell clam haemocytes against *Vibrio tapetis*, the causative agent of brown ring disease // Fish and Shellfish Immunology. 1999. Vol. 9. P. 543–555.
273. Lowe D.M. Alterations in cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions // Marine Ecology Progress Series. 1988. Vol. 46. P. 91–100.
274. Lowe D.M., Moore M.N. The cytology and occurrence of granulocytomas in mussels // Marine Pollution Bulletin. 1979. Vol. 10. P. 137–141.
275. Lowe D.M., Moore M.N., Clarke K.R. Effects of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure // Aquatic Toxicology. 1981. Vol. 1. P. 213–226.

276. Lowe D.M., Pipe R.K. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an *in vitro* study // Aquatic Toxicology. 1994. Vol. 30. P. 357–365.
277. Maeno Y., Suzuki K., Yurimoto T., Kiyomoto S., Fuseya R., Fujisaki H., Yoshida M., Nasu H. Laboratory and field studies on gill and kidney associated virus in the pen shell *Atrina lischkeana* (Mollusca: Bivalvia) // Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 2012. Vol. 32. P. 78–86.
278. Malagoli D., Casarini L., Ottaviani E. Monitoring of the immune efficiency of *Mytilus galloprovincialis* in Adriatic sea mussel farms in 2006: regular changes of cytotoxicity during the year // Invertebrate Survival Journal. 2007. Vol. 4, № 1. P. 10–12.
279. Mamangkey N.G., Southgate P.C. Regeneration of excised mantle tissue by the silver-lip pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jameson) // Fish and Shellfish Immunology. 2009. Vol. 27, № 2. P. 164–74.
280. Mantecca P., Vailati G., Bacchetta R. Histological changes and micronucleus induction in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* after paraquat exposure // Histology and Histopathology. 2006. Vol. 21, № 8. P. 829–840.
281. Marigomez I. Garmendia L., Soto M., Orbea A., Izagirre U., Cajaraville M.P. Marine ecosystem health status assessment through integrative biomarker indices: a comparative study after the Prestige oil spill «mussel Watch» // Ecotoxicology. 2013. Vol. 22. P. 486–505.
282. Marigomez I., Soto M., Cancio I., Orbea A., Garmendia L., Cajaraville M.P. Cell and tissue biomarkers in mussel, and histopathology in hake and anchovy from Bay of Biscay after the Prestige oil spill (Monitoring Campaign 2003) // Marine Pollution Bulletin. 2006. Vol. 53. P. 287–304.
283. Mateo D.R., Siah A., Araya M.T., Berthe F.C.J., Johnson G.R., Greenwood S.J. Differential *in vivo* response of soft-shell clam hemocytes against two strains of *Vibrio splendidus*: changes in cell structure, numbers and adherence // Journal of Invertebrate Pathology. 2009. Vol. 102. P. 50–56.
284. Matozzo V., Da Ros L., Ballarin L., Meneghetti F., Marin M.G. Functional responses of haemocytes in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice: fishing impact and seasonal variations // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2003. Vol. 60, № 8. P. 949–958.
285. Matozzo V., Ercolini C., Serracca L., Battistini R., Rossini I., Granato G., Quagliari E., Perolo A., Finos L., Arcangeli G., Bertotto D., Radaelli G., Chollet B., Arzul I., Quaglio F. Assessing the health status of farmed mussels (*Mytilus galloprovincialis*) through histological, microbiological and biomarker analyses // Journal of Invertebrate Pathology. 2018. Vol. 153. P. 165–179.

286. Matozzo V., Marin M.G., Cima F., Ballarin L. First evidence of cell division in circulating haemocytes from the Manila clam *Tapes philippinarum* // Cell Biology International. 2008. Vol. 32, № 7. P. 865–868.
287. Matozzo V., Monari M., Foschi J., Serrazanetti G.P., Cattani O., Gabriella M. Marin effects of salinity on the clam *Chamelea gallina*. Part I: alterations in immune responses // Marine Biology. 2007. Vol. 151. P. 1051–1058.
288. Matozzo V., Pagano M., Spinelli A., Caicci F., Faggio C. *Pinna nobilis*: A big bivalve with big haemocytes? // Fish and Shellfish Immunology. 2016. Vol. 55. P. 529–534.
289. McCormick-Ray M.G., Howard T. Morphology and mobility of oyster hemocytes: evidence for seasonal variations // Journal of Invertebrate Pathology. 1991. Vol. 58. P. 219–230.
290. Medhioub W., Ramondenc S., Vanhove A.S., Vergnes A., Masseret E., Savar V., Amzil Z., Laabir M., Rolland J.L. Exposure to the neurotoxic dinoflagellate, *Alexandrium catenella*, induces apoptosis of the hemocytes of the oyster, *Crassostrea gigas* // Marine Drugs. 2013. Vol. 11. P. 4799–4814.
291. Mello D.F., Proenca L.A., Barracco M.A. Comparative study of various immune parameters in three bivalve species during a natural bloom of *Dinophysis acuminata* in Santa Catarina Island, Brazil // Toxins (Basel). 2010. Vol. 2, № 5. P. 1166–1178.
292. Melwani A. R., Gregorio D., Jin Y., Stephenson M., Ichikawa G., Siegel E., Crane D., Lauenstein G., Davis J.A. Mussel watch update: long-term trends in selected contaminants from coastal California, 1977–2010 // Marine Pollution Bulletin. 2014. Vol. 81. P. 291–302.
293. Meyhofer E., Morse M.P., Robinson W.E. Podocytes in bivalve molluscs: morphological evidence for ultrafiltration // Journal of Comparative Physiology B. 1985. Vol. 156, № 2. P. 151–161.
294. Milutinovic B., Kurtz J. Immune memory in invertebrates // Seminars in Immunology. 2016. Vol. 28. P. 328–342.
295. Moëzzi F., Javanshir A., Eagderi S., Poorbagher H., Sallaki M. Evaluation of bivalve clearance rate (CR) as a physiological indicator of heavy metal toxicity in freshwater mussel, *Anodonta cygnea* (Linea, 1876) // Journal of Animal Science. 2013. Vol. 2, № 4. P. 89–94.
296. Monari M., Matozzo V., Foschi J., Cattani O., Serrazanetti G.P., Marin M.G. Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina* // Fish and Shellfish Immunology. 2007. Vol. 22. P. 98–114.
297. Montaudouin X., Lambert C., Gonzalez P., Raymond N., Jude F., Legeay A., Baudrimont M., Dang C., Le Grand F., Le Goic N., Bourasseau L., Paillard C. Bivalve population health: multistress to identify hot spots // Marine Pollution Bulletin. 2010. Vol. 60, № 8. P. 1307–1318.

298. Montes J.F., Dufort M., García-Valero J. When the venerid clam *Tapes decussatus* is parasitized by the protozoan *Perkinsus* sp. it synthesizes a defensive polypeptide that is closely related to p225 // *Diseases of Aquatic Organisms*. 1996. Vol. 26. P. 149–157.
299. Moore M.N. Lysosomal changes in the response of molluscan hepatopancreatic cells to extracellular signals // *Histochemical Journal*. 1991. Vol. 23, № 10. P. 495–500.
300. Moore M.N., Lowe D.M. The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles // *Journal of Invertebrate Pathology*. 1977. Vol. 29, № 1. P. 18–30.
301. Morga B., Arzul I., Chollet B., Renault T. Infection with the protozoan parasite *Bonamia ostreae* modifies *in vitro* haemocyte activities of flat oyster *Ostrea edulis* // *Fish and Shellfish Immunology*. 2009. Vol. 26. P. 836–842.
302. Mortensen S., Harketstad L.S., Stene R., Renault T. Picoeucaryot alga infecting blue mussel *Mytilus edulis* in southern Norway // *Diseases of Aquatic Organisms*. 2005. Vol. 63. P. 25–32.
303. Morvan A., Boulo V., Despres B., Hervio D., Bachkre E. Mialhe E. Monoclonal antibodies against hemocytes of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia) // *Developmental and Comparative Immunology*. 1991. Vol. 15, № 1. P. 73.
304. Mosca F., Narcisi V., Calzetta A., Gioia L., Finoia M.G., Latini M., Tiscar P.G. Effects of high temperature and exposure to air on mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lmk 1819) hemocyte phagocytosis: modulation of spreading and oxidative response // *Tissue and Cell*. 2013. Vol. 45, № 3. P. 198–203.
305. Moschino V., Del Negro P., De Vittor C., Da Ros L. Biomonitoring of a polluted coastal area (Bay of Muggia, Northern Adriatic Sea): a five-year study using transplanted mussels // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2016. Vol. 128. P. 1–10.
306. Mount A.S., Wheeler A.P., Paradkar R.P., Snider D. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster // *Science*. 2004. Vol. 304. P. 297–300.
307. Munari M., Matozzo V., Chemello G., Riedl V., Pastore P., Badocco D., Marin M.G. Seawater acidification and emerging contaminants: a dangerous marriage for haemocytes of marine bivalves // *Environmental Research*. 2019. Vol. 175. P. 11–21.
308. Muttray A., Reinisch C., Miller J., Ernst W., Gillis P., Losier M., Sherry J. Haemocytic leukemia in Prince Edward Island (PEI) soft shell clam (*Mya arenaria*): spatial distribution in agriculturally impacted estuaries // *Science of the Total Environment*. 2012. Vol. 424. P. 130–142.
309. Naidu K.S. Infection of the giant scallop *Placopecten magellanicus* from Newfoundland with an endozoic alga // *Journal of Invertebrate Pathology*. 1971. Vol. 17. P. 145–157.
310. Naidu K.S., South G.R. Occurrence of an endozoic alga in the giant scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin) // *Canadian Journal of Zoology*. 1970. Vol. 48. P. 183–185.

311. Nakayama K., Nishijima M., Maruyama T. Morula-like cells in photo-symbiotic clams harboring zooxanthellae // *Zoological Science*. 1998. Vol. 15, № 3. P. 339–344.
312. Narbonne J.F., Daubeze M., Cler C. Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts // *Biomarkers*. 1999. Vol. 4, № 6. P. 415–424.
313. Navarro J.M., Gonzalez K., Cisternas B., Lopez J.A., Chaparro O.R., Segura C.J., Cordova M., Suarez-Isla B., Fernandez-Reiriz M.J., Labarta U. Contrasting physiological responses of two populations of the razor clam *Tagelus dombeii* with different histories of exposure to paralytic shellfish poisoning (PSP) // *PLoS One*. 2014. Vol. 9, № 8. P. e105794.
314. Neff J.M., Hillman R.E., Carr R.S., Buhl R.L., Lahey J.I. Histopathologic and biochemical responses in arctic marine bivalve molluscs exposed to experimentally spilled oil // *Arctic*. 1987. Vol. 40. P. 220–229.
315. Nemirovskaya I.A. Hydrocarbons in the water and bottom sediments of a region with continuous petroleum contamination // *Geochemistry International*. 2007. Vol. 45. P. 638–651.
316. Neves R.A.F., Rodrigues E.T. Harmful Algal Blooms: Effect on Coastal Marine Ecosystems // In: Leal Filho W., Azul A.M., Brandli L., Lange Salvia A., Wall T. (Eds.). *Life below water. Encyclopedia of the UN Sustainable Development Goals*. Cham: Springer. 2020.
317. Neves R.A.F., Santiago T.C., Carvalho W.F., Silva E.S., da Silva P.M., Nascimento S.M. Impacts of the toxic benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima* on the brown mussel *Perna perna*: shell-valve closure response, immunology, and histopathology // *Marine Environmental Research*. 2019. Vol. 146. P. 35–45.
318. Newton T.J., Cope W.G. Biomarker responses of unionid mussels to environmental contaminants // Farris J.L., Van Hassel J. H. (Eds.). *Freshwater Bivalve Ecotoxicology*. Boca Raton: CRC Press. 2007. P. 257–284.
319. Ng T.H., Chiang Y.-A., Yeh Y.-C., Wang H.-C. Review of Dscam-mediated immunity in shrimp and other arthropods // *Developmental and Comparative Immunology*. 2014. Vol. 46. P. 129–138.
320. Nikapitiya C., Dorrington T., Gymez-Chiarri M. The role of histones in the immune responses of aquatic invertebrates // *ISJ*. 2013. Vol. 10. P. 94–101.
321. Nobles T., Zhang Y. Survival, growth and condition of freshwater mussels: effects of municipal wastewater effluent // *PLoS ONE*. 2015. Vol. 10, № 6. P. 1–19.
322. Noël D., Pipe R., Elston R., Bachere E., Mialhe E. Antigenic characterization of hemocyte subpopulations in the mussel *Mytilus edulis* by means of monoclonal antibodies // *Marine Biology*. 1994. Vol. 119. P. 549–556.

323. Nottage A.S., Birkbeck H.T. Interactions between different strains of *Vibrio alginolitycus* and hemolymph fractions from adult *Mytilus edulis* // *Journal of Invertebrate Pathology*. 1990. Vol. 56. P. 15–19.
324. Nusetti O.A., Marcano L., Zapata E., Nusetti S., Esclapes M., Lodeiros C. Immunologic answers and of anti-rust enzymes in the oyster pearl *Pinctada imbricata* (mollusca pteridae) exposed at levels subletales of fuel oil № 6 // *Interciencia*. 2004. Vol. 29, № 6. P. 324–328.
325. Nzoughet J.K., Hamilton J.T., Botting C.H., Douglas A., Devine L., Nelson J., Elliott C.T. Proteomics identification of azaspiracid toxin biomarkers in blue mussels, *Mytilus edulis* // *Molecular and Cellular Proteomics*. 2009. Vol. 8, № 8. P. 1811–1822.
326. Ogunola O.S. Physiological, immunological, genotoxic and histopathological biomarker responses of molluscs to heavy metal and water quality parameter exposures: a critical review // *Journal of Oceanography and Marine Research*. 2017. Vol. 5, № 158. P. 1–6.
327. Oliver L.M., Fisher W.S. Appraisal of prospective bivalve immunomarkers // *Biomarkers*. 1999. Vol. 4, № 6. P. 510–530.
328. Ordas M.C., Ordas A., Beloso C., Figueras A. Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus* // *Fish and Shellfish Immunology*. 2000. Vol. 10. P. 597–609.
329. Ottaviani E., Franceschi P. A new theory on the common evolutionary origin of natural immunity, inflammation and stress response: the invertebrate phagocytic immunocyte as an eye-witness // *Domestic Animal Endocrinology*. 1998. Vol. 15, № 5. P. 291–296.
330. Oubella R., Maes P., Allam R., Paillard C., Auffret M. Selective induction of hemocytic response in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria) // *Aquatic Living Resources*. 1996. Vol. 9. P. 137–143.
331. Oubella R., Maes P., Paillard C., Auffret M. Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia) // *Diseases of Aquatic Organisms*. 1993. Vol. 15. P. 193–197.
332. Oubella R., Paillard C., Maes P., Auffret M. Changes in hemolymph parameters in the manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) following bacterial challenge // *Journal of Invertebrate Pathology*. 1994. Vol. 64. P. 33–38.
333. Owen G. Feeding and digestion in the Bivalvia // *Advances in Comparative Physiology and Biochemistry*. 1974. Vol. 5. P. 1–35.
334. Pagano M., Capillo G., Sanfilippo M., Palato S., Trischitta F., Manganaro A., Faggio C. Evaluation of functionality and biological responses of *Mytilus galloprovincialis* after exposure to Quaternium-15 (Methenamine 3-Chloroallylochloride) // *Molecules*. 2016. Vol. 21. P. 1–12.

335. Paillard C., Le Roux F., Borrego J.J. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution // *Aquatic Living Resources*. 2004. Vol. 17. P. 477–498.
336. Pales Espinosa E., Corre E., Allam B. Pallial mucus of the oyster *Crassostrea virginica* regulates the expression of putative virulence genes of its pathogen *Perkinsus marinus* // *International Journal for Parasitology*. 2014. Vol. 44, № 5. P. 305–17.
337. Pales Espinosa E., Winnicki S.M., Allam B. Early host-pathogen interactions in marine bivalves: pallial mucus of *Crassostrea virginica* modulates the growth and virulence of its pathogen *Perkinsus marinus* // *Diseases of Aquatic Organisms*. 2013. Vol. 104. P. 237–247.
338. Parisi M.G., Li H., Jouvét L.B., Dyrinda E.A., Parrinello N., Cammarata M., Roch P. Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria // *Fish and Shellfish Immunology*. 2008. Vol. 25. P. 834–840.
339. Parry H.E., Pipe R.K. Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*) // *Aquatic Toxicology*. 2004. Vol. 69, № 4. P. 311–25.
340. Pauley G.B., Heaton L.H. Experimental wound repair in the freshwater mussel *Anodonta oregonensis* // *Journal of Invertebrate Pathology*. 1969. Vol. 13. P. 241–249.
341. Perrigault M., Dahl S.F., Espinosa E.P., Gambino L., Allam B. Effects of temperature on hard clam (*Mercenaria mercenaria*) immunity and QPX (Quahog Parasite Unknown) disease development: II. Defense parameters // *Journal of Invertebrate Pathology*. 2011. Vol. 106, № 2. P. 322–32.
342. Pila E.A., Li H., Hambrook J.R., Wu X., Hanington P.C. Schistosomiasis from a snail's perspective: advances in snail immunity // *Trends in Parasitology*. 2017. Vol. 33, № 11. P. 845–857.
343. Pipe R. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis* // *Histochemical Journal*. 1990. Vol. 22, № 11. P. 595–603.
344. Pipe R.K., Coles J.A. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve mollusks // *Fish and Shellfish Immunology*. 1995. Vol. 5. P. 581–595.
345. Pipe R.K., Coles J.A., Carissan F.M.M., Ramanathan K. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis* // *Aquatic Toxicology*. 1999. Vol. 46. P. 43–54.
346. Pipe R.K., Coles J.A., Thomas M.E., Fossatob V.U, Pulsforda A.L Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon // *Aquatic Toxicology*. 1995. Vol. 32, № 1. P. 59–73.
347. Pipe R.K., Farley S.R., Coles J.A. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis* // *Cell and Tissue Research*. 1997. Vol. 289. P. 537–545.
348. Poirier A.C., Schmitt P., Rosa R.D., Vanhove A.S., Kieffer-Jaquinod S., Rubio T.P., Charriere G.M., Destoumieux-Garzon D. Antimicrobial histones and DNA traps in

- invertebrate immunity: evidences in *Crassostrea gigas* // Journal of Biological Chemistry. 2014. Vol. 289, № 36. P. 24821–24831.
349. Prado-Alvarez M., Florez-Barros F, Mendez J., Fernandez-Tajes J. Effect of okadaic acid on carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) haemocytes by *in vitro* exposure and harmful algal bloom simulation assays // Cell Biology and Toxicology. 2013. Vol. 29, № 3. P.189–97.
350. Raftos D.A., Kuchel R., Aladaileh S., Butt D. Infectious microbial diseases and host defense responses in Sydney rock oysters // Frontiers in Microbiology. 2014. Vol. 5. P. 135.
351. Rahman M.A., Henderson S., Miller-Ezzy P., Li X.X., Qin J.G. Immune response to temperature stress in three bivalve species: pacific oyster *Crassostrea gigas*, mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and mud cockle *Katylsia rhytiphora* // Fish and Shellfish Immunology. 2019. Vol. 86. P. 868–874.
352. Regoli F., Nigro M., Orlando E. Effects of copper and cadmium on the presence of renal concretions in the bivalve *Donacilla cornea* // Comparative Biochemistry and Physiology. 1992. Vol. 102C. P. 189–192.
353. Reid H.I., Soudant P., Lambert C., Paillard C., Birkbeck T.H. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* // Diseases of Aquatic Organisms. 2003. Vol. 56. P. 249–258.
354. Ren W.C., Chen H.X., Renault T., Cai Y.Y., Bai C.M., Wang C.M., Huang J. Complete genome sequence of acute viral necrosis virus associated with massive mortality outbreaks in the Chinese scallop *Chlamys farreri* // Virology Journal. 2013. Vol. 10. P. 110.
355. Renault T. Immunotoxicological effects of environmental contaminants on marine bivalves // Fish and Shellfish Immunology. 2015. Vol. 46, № 1. P. 88–93.
356. Renault T., Novoa B. Viruses infecting bivalve molluscs // Aquatic Living Resources. 2004. Vol. 17. P. 397–409.
357. Renwranz L. Internal defence system of *Mytilus edulis* // In: Stefano G.B. (Eds.). Neurobiology of *Mytilus edulis*. Manchester: Manchester University Press. 1990. P. 256–275.
358. Rey-Campos M., Moreira R., Gerdol M., Pallavicini A., Novoa B., Figueras A. Immune tolerance in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes after repeated contact with *Vibrio splendidus* // Frontiers in Immunology. 2019. Vol. 10. P. 1984.
359. Rifkin E., Cheng T.C., Hohl H.R. An electron microscope study of the constituents of encapsulating cysts in the American oyster, *Crassostrea virginica* formed in response to Tylocephalum (Metacestodes) // Journal of Invertebrate Pathology. 1969. Vol. 14. P. 211–226.
360. Rioult D., Lebel J., Le Foll F. Cell tracking and velocimetric parameters analysis as an approach to assess activity of mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes *in vitro* // Cytotechnology. 2013. Vol. 65. P. 749–758.

361. Robledo F.J.A., Caler E., Matsuzaki M., Keeling P.J., Shanmugam D., Roos D.S., Vasta G.R. The search for the missing link: a relic plastid in *Perkinsus*? // International Journal for Parasitology. 2011. Vol. 41, № 12. P. 1217–1229.
362. Rocha T.L., Saboia-Morais S.M.T., Bebianno M.J. Histopathological assessment and inflammatory response in the digestive gland of marine mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium-based quantum dots // Aquatic Toxicology. 2016. Vol. 177. P. 306–315.
363. Rodrigues C.F., Webster G., Cunha M.R., Duperron S., Weightman A.J. Chemosynthetic bacteria found in bivalve species from mud volcanoes of the Gulf of Cadiz // FEMS Microbiology Ecology. 2010. Vol. 73, № 3. P. 486–99.
364. Rodriguez F., Feist S.W., Guillou L., Harketstad L.S., Bateman K., Renault T., Mortensen S. Phylogenetic and morphological characterisation of the green algae infesting blue mussel *Mytilus edulis* in the North and South Atlantic oceans // Diseases of Aquatic Organisms. 2008. Vol. 81. P. 231–240.
365. Roznere I., Watters G.T., Wolfe B.A., Daly M. Nontargeted metabolomics reveals biochemical pathways altered in response to captivity and food limitation in the freshwater mussel *Amblema plicata* // Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics. 2014. Vol. 12. P. 53–60.
366. Ruddell C.L. The fine structure of oyster agranular amebocytes from regenerating mantle wounds in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* // Journal of Invertebrate Pathology. 1971. Vol. 18. P. 260–268.
367. Ruiz-Domínguez M.C., Vaquero I., Obregon V., Morena B., Vilchez C., Vega J.M. Lipid accumulation and antioxidant activity in the eukaryotic acidophilic microalga *Coccomyxa* sp. (strain onubensis) under nutrient starvation // Journal of Applied Phycology. 2015. Vol. 27, № 3. P. 1099–1108.
368. Russell-Pinto F., Reima R. de Sousa M. Haemocytes in *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia): distinct cell types engage in different responses to sheep erythrocytes // Fish and Shellfish Immunology. 1994. Vol. 4. P. 383–397.
369. Samain J. F., Degremont L., Soletchnik P., Haure J., Bedier E., Ropert M., Moal J., Huvet A. et al. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes // Aquaculture. 2007. Vol. 268. P. 227–243.
370. Sami S., Fischer-Scherl T., Hoffmann R.W., Pfeil-Putzien P. Immune complex-mediated glomerulonephritis associated with bacterial kidney disease in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Veterinary Pathology. 1992. Vol. 29, № 2. P. 169–174.

371. Santarem M.M., Robledo J. A. F., Figueras A. Seasonal changes in hemocytes and serum defense factors in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* // Diseases of Aquatic Organisms. 1994. Vol. 18, № 3. P. 217–222.
372. Schettino T., Caricato R., Calisi A., Giordano M.E., Lionetto, M.G. Biomarker approach in marine monitoring and assessment: new insights and perspectives // Open Environmental Sciences. 2012. Vol. 6. P. 20–27.
373. Schmitt P., Rosa R.D., Dupertuy M., de Lorgeril J., Bachere E., Destoumieux-Garzon D. The antimicrobial defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. How diversity may compensate for scarcity in the regulation of resident/pathogenic microflora // Frontiers in Microbiology 2012. Vol. 3, № 160. P. 1–17.
374. Schott E., Pecher W., AF R., Vasta G. Investigating the role of antioxidant activities in virulence of the oyster parasite, *Perkinsus marinus* // Journal of Eukaryotic Microbiology. 2006. Vol. 53. P. 14.
375. Schultz J.H., Adema C.M. Comparative immunogenomics of mollusks // Developmental and Comparative Immunology. 2017. Vol. 75. P. 3–15.
376. Seiler G.R., Morse P.M. Kidney and hemocytes of *Mya arenaria* (Bivalvia): normal and pollution-related ultrastructural morphologies // Journal of Invertebrate Pathology. 1988. Vol. 52. P. 201–363.
377. Sekine D., Ohishi K., Nakamura Y., Kusaka C., Tame A., Inoue K., Nakazawa M., Miyake H., Yoshida T., Maruyama T. Monoclonal antibodies to hemocytes of the deep-sea symbiotic mussel, *Bathymodiolus japonicas* // JAMSTEC Report of Research and Development. 2016. Vol. 23. P. 27–33.
378. Seo J.K., Stephenson J., Crawford J.M., Stone K.L., Noga E.J. American oyster, *Crassostrea virginica*, expresses a potent antibacterial histone H2B protein // Marine Biotechnology. 2010. Vol. 12. P. 543–551.
379. Sheir S.K., Handy R.D., Galloway T.S. Tissue injury and cellular immune responses to cadmium chloride exposure in the common mussel *Mytilus edulis*: modulation by lipopolysaccharide // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2010. Vol. 73. P. 602–613.
380. Shi W., Han Y., Guo C., Zhao X., Liu S., Su W., Zha S., Wang Y., Liu G. Immunotoxicity of nanoparticle nTiO₂ to a commercial marine bivalve species, *Tegillarca granosa* // Fish and Shellfish Immunology. 2017. Vol. 66. P. 300–306.
381. Shinn A.P., Pratoomyot J., Bron J.E., Paladini G., Brooker E.E., Brooker A.J. Economic costs of protistan and metazoan parasites to global mariculture // Parasitology. 2014. Vol. 142. P. 196–270.

382. Shul'kin V.M., Kavun V.Ya., Tkalin A.V., Presley B.J. The influence of metal concentration in bottom sediments on metal accumulation by Mytilids *Crenomytilus grayanus* and *Modiolus kurilensis* // Russian Journal of Marine Biology. 2002. Vol. 28, № 1. P. 53–60.
383. Sminia T., Van der Knaap W.P.W. Cells and molecules in molluscan immunology // Developmental and Comparative Immunology. 1987. Vol. 11. P. 17–28.
384. Soares-da-Silva I.M., Ribeiro J., Valongo C., Pinto R., Vilanova M., Bleher R., Machado J. Cytometric, morphologic and enzymatic characterisation of haemocytes in *Anodonta cygnea* // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology. 2002. Vol. 132. P. 541–553.
385. Sokolnikova Y., Magarlamov T., Stenkova A., Kumeiko V. Permanent culture and parasitic impact of the microalgae *Coccomyxa parasitica*, isolated from horse mussel *Modiolus kurilensis* // Journal of Invertebrate Pathology. 2016. Vol. 140. P. 25–34.
386. Soldatov A., Kukhareva T.A., Andreevaa 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, № 6. P. 452–457.
387. Song L., Wang, L., Qiu, L., Zhang, H. Bivalve Immunity. Invertebrate Immunity // Advances in Experimental Medicine and Biology. 2010. Vol. 708. P. 44–65.
388. Soudant P., Chu F.-L.E., Samain J.F. Lipid requirements in some economically important marine bivalves // Journal of Shellfish Research. 2000. Vol. 19. P. 605.
389. Soudant P., E Chu F.-L.E., Volety A. Host-parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus species* // Journal Invertebrate Pathology. 2013. Vol. 114. P. 196–216.
390. Soudant P., Marty Y., Moal J., Masski H., Samain J. F. Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.) // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology. 1998. Vol. 121, № 3. P. 279–288.
391. Soudant P., Paillard C., Choquet G., Lambert C., Reid H.I., Marhic A., Donaghy L., Birkbeck T.H. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis* (= *Tapes*, = *Ruditapes*) *philippinarum* // Aquaculture. 2004. Vol. 229, № 1–4. P. 401–418.
392. Stanley S.M. Adaptive morphology of the shell of bivalves and gastropods // In Trueman E.R., Clarke M.R. (Eds.). The Mollusca. Form and function. New York: Academic Press. 1988. Vol. 11. P. 105–14

393. Stauber L.A. The problem of physiological species with special reference to oysters and oyster drills // *Ecology*. 1950. Vol. 31. P. 109–118.
394. Stevenson R.N., South R.G. *Coccomyxa parasitica* sp. nov. (Coccomyxaceae, Chlorococcales), a parasite of giant scallops in Newfoundland // *British Phycological Journal*. 1974. Vol. 9. P. 319–329.
395. St-Jean S.D., Stephens R.E., Courtenay S.C., Reinisch C.L. Detecting p53 family proteins in leukemia cells of *Mytilus edulis* from Pictou Harbour, Nova Scotia // *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2005. Vol. 62. P. 2055–2066.
396. Sun L., Jin Y., Dong L., Sumi R., Jahan R., Li Z. The neuroprotective effects of *Coccomyxa gloeobotrydiformis* on the ischemic stroke in a rat model // *International Journal of Biological Sciences*. 2013. Vol. 9, № 8. P. 811–817.
397. Sunila I. Histopathological changes in the mussel *Mytilus edulis* L. at the outlet from a titanium dioxide plant in Northern Baltic // *Annales Zoologici Fennici*. 1986. Vol. 23. P. 61–70.
398. Sunila I., LaBanca J. Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica* // *Diseases of Aquatic Organisms*. 2003. Vol. 56. P. 163–170.
399. Sureda A., Natalotto A., Alvarez E., Deudero S. Increased antioxidant response and capability to produce ROS in hemocytes of *Pinna nobilis* L. exposed to anthropogenic activity // *Environmental Pollution*. 2013. Vol. 181. P. 321–324.
400. Suryawanshi G.D., Shaikh A.M., Mane U.H. Heavy metals concentration in rock oyster *Crassostrea cattuckensis* from Ratnagiri coast // *Journal of Ecophysiology and Occupational Health*. 2011. Vol. 11, № 3–4. P. 175–180.
401. Suzuki T., Yoshinaka R., Mizuta S., Funakoshi S., Wada K. Extracellular matrix formation by amoebocytes during epithelial regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata* // *Cell and Tissue Research*. 1991. Vol. 266. P. 75–82.
402. Syasina I.G., Kukhlevsky A.D., Kovaleva A.L., Vaschenko M.A. Phylogenetic and morphological characterization of the green alga infesting the horse mussel *Modiolus modiolus* from Vityaz Bay (Peter the Great Bay, Sea of Japan) // *Journal of Invertebrate Pathology*. 2012. Vol. 111, № 2. P. 175–181.
403. Syasina I.G., Vaschenko M.A., Zhadan P.M. Morphological alterations in the digestive diverticula of *Mizuhopecten yessoensis* (Bivalvia: Pectinidae) from polluted areas of Peter the Great Bay, Sea of Japan // *Marine Environmental Research*. 1997. Vol. 44. P. 85–98.
404. Takatsuki S.I. On the nature and functions of the amoebocytes of *Ostrea edulis* // *Quarterly Journal of Microscopical Science*. 1934. Vol. 76. P. 379–431.
405. Tall B.D., La Peyre J.F., Bier J.W., Miliotis M.D., Hanes D.E., Kothary M.H., Shah D.B., Faisal M. *Perkinsus marinus* extracellular protease modulates survival of *Vibrio vulnificus* in

- Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes // Applied and Environmental Microbiology. 1999. Vol. 65, № 9. P. 4261–4263.
406. Tame A., Yoshida T., Ohishi K., Maruyama T. Phagocytic activities of hemocytes from the deep-sea symbiotic mussels *Bathymodiolus japonicus*, *B. platifrons*, and *B. septemdierum* // Fish and Shellfish Immunology. 2015. Vol. 45, № 1. P. 146–156.
407. Tantiwisawaruji S., Chatchavalvanich K., Kovitvadh U., Thongpan A., Kovitvadh S. Histological structure of the digestive tract of the freshwater pearl mussel *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* (Bivalvia: Unionidae) // Thai Journal of Agricultural Science. 2011. Vol. 44, № 1. P. 1–10.
408. Taylor D.L. Algal symbionts of invertebrates // Annual Review of Microbiology. 1973. Vol. 27. P. 171–188.
409. Taylor J.D., Layman M. The mechanical properties of bivalve (Mollusca) shell structure // Palaeontology. 1972. Vol. 15. P. 73–87.
410. Terahara K., Takahashi K.G. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs // Current Pharmaceutical Design. 2008. Vol. 14. P. 131.
411. Terahara K., Takahashi K.G., Nakamura A., Osada M., Yoda M., Hiroi T., Hirasawa M., Mori K. Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* // Developmental and Comparative Immunology. 2006. Vol. 30. P. 667–683.
412. Tetreau G., Dhinaut J., Gourbal B., Moret Y. Trans-generational immune priming in invertebrates: current knowledge and future prospects // Frontiers in Immunology. 2019. Vol. 10. P. 1938.
413. Tiscar P.G., Mosca F. Defense mechanisms in farmed marine mollusks // Veterinary Research Communications. 2004. Vol. 28, № 1. P. 57–62.
414. Tishchenko P.P., Tishchenko P.Y., Zvalinskii V.I., Semkin P.Y. Rate of biochemical oxygen demand during formation of hypoxia in Amur Bay, Sea of Japan // Doklady Earth Sciences. 2014. Vol. 459. P. 1627–1630.
415. Toledo-Ibarra G.A., Diaz Resendiz K.J.G., Ventura-Ramon G.H., Romero-Banuelos C.A., Medina-Diaz I.M., Rojas-Garcia A.E., Vega-Lopez A., Giron-Perez M.I. Assessment of pollution of the Boca de Camichin Estuary in Nayarit (Mexico) and its influence on oxidative stress in *Crassostrea corteziensis* oysters // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology. 2016. Vol. 200. P. 47–55.
416. Travers M.A., Boettcher Miller K., Roque A., Friedman C.S. Bacterial diseases in marine bivalves // Journal of Invertebrate Pathology. 2015. Vol. 131. P. 11–31.

417. Tremblay R., Myrand B., Guderley H. Temporal variation of lysosomal capacities in relation to susceptibility of mussels, *Mytilus edulis*, to summer mortality // *Marine Biology*. 1998. Vol. 132, № 4. P. 641–649.
418. Tripp M.R. Mechanisms of removal of injected microorganisms from the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin) // *Biological Bulletin*. 1960. Vol. 119. P. 273–282.
419. Tripp M.R. Phagocytosis by hemocytes of the hard clam, *Mercenaria mercenaria* // *Journal of Invertebrate Pathology*. 1992. Vol. 59. P. 222–227.
420. Tsoy I., Prushkovskaya I., Aksentov, K., Astakhov A. Environmental changes in the Amur Bay (Japan/East Sea) during the last 150 years revealed by examination of diatoms and silicoflagellates // *Ocean Science Journal*. 2015. Vol. 50. P. 433–444.
421. Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2003. Vol. 13, № 2. P. 57–149.
422. Vaquero I., Vazquez M., Ruiz-Domínguez M.C., Vilchez C. Enhanced production of a lutein-rich acidic environment microalga // *Journal of Applied Microbiology*. 2014. Vol. 116, № 4. P. 839–850.
423. Vaschenko M.A., Kovaleva A.L., Syasina I.G., Kukhlevsky A.D. Reproduction-related effects of green alga *Coccomyxa* sp. infestation in the horse mussel *Modiolus modiolus* // *Journal of Invertebrate Pathology*. 2013. Vol. 113, № 1. P. 86–95.
424. Vaschenko M.A., Zhadan P.M., Aminin D.L., Almyashova T.N. Lipofuscin-like pigment in gonads of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* as a potential biomarker of marine pollution: a field study // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2012. Vol. 62. P. 599–613.
425. Vazquez N., Ituarte C., Rodriguez F., Klaich J., Cremonte F. Host-parasite relationship of the geoduck *Panopea abbreviata* and the green alga *Coccomyxa parasitica* in the Argentinean Patagonian coast // *Journal of Invertebrate Pathology*. 2010. Vol. 105, № 3. P. 254–260.
426. Vekhova E.E., Kusaykin M.I., Kiselev K.V. Activity of 1,3- β -D-glucanases and expression of CG-GLU1 in the mussel *Crenomytilus grayanus* (Bivalvia) in three Bays of the Sea of Japan // *Achievements in the Life Sciences*. 2015. Vol. 9. P. 69–77.
427. Venier P., Varotto L., Rosani U., Millino C., Celegato B., Bernante F., Lanfranchi G., Novoa B., Roch P., Figueras A., Pallavicini A. Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* // *BMC Genomics*. 2011. Vol. 12, № 1. P. 69.
428. Verma V., Bhatti S., Huss V.A.R., Colman B. Photosynthetic inorganic carbon acquisition in an acid-tolerant, free-living species of *Coccomyxa* (Chlorophyta) // *Journal of Phycology*. 2009. Vol. 45, № 4. P. 847–854.

429. Vermeij G.J. The evolution of molluscan photosymbioses: a critical appraisal // *Biological Journal of the Linnean Society*. 2013. Vol. 109, № 3. P. 497–511.
430. Vidal-Linan L., Bellas J. Practical procedures for selected biomarkers in mussels, *Mytilus galloprovincialis* – implications for marine pollution monitoring // *Science of the Total Environment*. 2013. Vol. 461–462. P. 56–64.
431. Villamil L., Gymez-Leyn J., Gymez-Chiarri M. Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus* // *Developmental and Comparative Immunology*. 2007. Vol. 31. P. 968–977.
432. Wang K., Pales Espinosa E., Tanguy A., Allam B. Alterations of the immune transcriptome in resistant and susceptible hard clams (*Mercenaria mercenaria*) in response to quahog parasite unknown (QPX) and temperature // *Fish and Shellfish Immunology*. 2016. Vol. 49. P. 163–176.
433. Wang Q., Wang C., Mu C., Wu H., Zhang L., Zhao J. A novel C-type lysozyme from *Mytilus galloprovincialis*: insight into innate immunity and molecular evolution of invertebrate C-type lysozymes // *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8, № 6. P. e67469.
434. Wang W., Li M., Wang L., Chen H., Liu Z., Jia Z., Qiu L., Song L. The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas* // *Developmental and Comparative Immunology*. 2017. Vol. 67. P. 221–228.
435. Wendling C.C.K., Wegner M. Relative contribution of reproductive investment, thermal stress and *Vibrio infection* to summer mortality phenomena in Pacific oysters // *Aquaculture*. 2013. Vol. 412–413. P. 88–96.
436. Widdows J., Donlun P. Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects // In: Gosling E. (Ed.). *The mussel Mytilus*. Chap 8. Amsterdam: Elsevier Press. 1992. P. 383–424
437. Winnepeninckx B., Backeljau T., De Wachter R. Extraction of high molecular weight DNA from mollusks // *Trends in Genetics*. 1993. Vol. 9. P. 407.
438. Wolowicz M., Smolarz K., Sokolowski A. Neoplasia in estuarine bivalves: effect of feeding behaviour and increase environmental pollution // In: Dame R.F., Olenin S. (Eds.). *The comparative roles of suspension-feeders in ecosystems*. 2005. Vol. 47. P. 165–182.
439. Wood-Charlson E.M., Hollingsworth L.L., Krupp D.A., Weis V.M. Lectin/glycan interactions play a role in recognition in a coral/dinoflagellate symbiosis // *Cellular Microbiology*. 2006. Vol. 8, № 12. P. 1985–1993.
440. Wootton E.P., Dyrzynda E.A., Ratcliffe N.A. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*) // *Fish and Shellfish Immunology*. 2003. Vol. 15, № 3. P. 195–210.

441. Xing J., Lin T.T., Zhan W.B. Variations of enzyme activities in the hemocytes of scallop *Chlamys farreri* after infection with the acute virus necrobiotic virus (AVNV) // Fish and Shellfish Immunology. 2008. Vol. 25. P. 847–852.
442. Xing J., Zhan W. Comparison of antigenicity among haemocytes of seven bivalve species by monoclonal antibodies against haemocytes of scallop (*Chlamys farreri*) // Fish and Shellfish Immunology. 2006. Vol. 20, № 4. P. 528–535.
443. Xue Q., Renault T. Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph // Journal of Invertebrate Pathology. 2000. Vol. 76, № 3. P. 155–163.
444. Xue Q., Renault T. Monoclonal antibodies to European flat oyster *Ostrea edulis* hemocytes: characterization and tissue distribution of granulocytes in adult and developing animals // Developmental and Comparative Immunology. 2001. Vol. 25, № 3. P. 187–194.
445. Yavasoglu A., Ozkan D., Guner A., Katalay S., Oltulu F., Yavasoglu N.U.K. Histopathological and apoptotic changes on marine mussels *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) following exposure to environmental pollutants // Marine Pollution Bulletin. 2016. Vol. 109. P. 184–191.
446. Yonge C.M. Feeding mechanisms in the invertebrates // Biological Reviews. 1928. Vol. 3. P. 21–76.
447. Yonge C.M. Structure and physiology of the organs of feeding and digestion in *Ostrea edulis* // Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 1926. Vol. 14, № 2. P. 295.
448. Yu J., Choi M., Park K., Park S. Effects of anoxia on immune functions in the surf clam *Macra veneriformis* // Zoological Studies. 2010. Vol. 49, № 1. P. 94–101.
449. Yurchenko O.V., Vaschenko M.A. Morphology of spermatogenic and accessory cells in the mussel *Modiolus kurilensis* under environmental pollution // Marine Environmental Research. 2010. Vol. 70. P. 171–180.
450. Yurimoto T. Seasonal changes in glycogen contents in various tissues of the edible bivalves, pen shell *Atrina lischkeana*, ark shell *Scapharca kagoshimensis*, and manila clam *Ruditapes philippinarum* in West Japan // Journal of Marine Biology. 2015. P.5
451. Zannella C., Mosca F., Mariani F., Franci, G., Folliero V., Galdiero M., Tiscar P.G., Galdiero M. Microbial diseases of bivalve mollusks: infections, immunology and antimicrobial defense // Marine drugs. 2017. Vol. 15, № 6. P. 182.
452. Zhang G., Fang X., Guo X., Li L., Luo R., Xu F., Yang P., Zhang L., Wang X., Qi H., Xiong Z., Que H. et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation // Nature. 2012. Vol. 490. P. 49–54.
453. Zhang H., Cheng D., Tan K., Liu H., Ye T., Li S., Ma H., Zheng H. Identification of two ferritin genes and their expression profiles in response to bacterial challenge in noble scallop

- Chlamys nobilis* with different carotenoids content // Fish and Shellfish Immunology. 2019. Vol. 88. P. 9–16.
454. Zhao L., Lu Y., Yang F., Liang J., Deng Y. Transgenerational biochemical effects of seawater acidification on the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) // Science of the Total Environment. 2020. Vol. 710. P. 136420.
455. Zhi-Hong L., Shicui Z., Aiguo Y., Qingyin W. Immunological study of phagocytosis and serum lectin of *Scapharca subcrenata* // Diseases in Asian Aquaculture V, Queensland, Australia. 2012. P. 495–502.
456. Zhou L., Yang A., Liu Z., Wu B., Sun X., Lv Z., Tian J. teng, Du M. Changes in hemolymph characteristics of ark shell *Scapharaca broughtonii* dealt with *Vibrio anguillarum* challenge in vivo and various of anticoagulants in vitro // Fish and Shellfish Immunology. 2017. Vol. 61. P. 9–15.
457. Zuykov M., Anderson J., Pelletier E. Does photosynthesis provoke formation of shell deformity in wild mytilid mussels infested with green microalgae *Coccomyxa*? – A conceptual model and research agenda // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2018. Vol. 505. P. 9–11.
458. Zuykov M., Belzile C., Lemaire N., Gosselin M., Dufresne F., Pelletier E. First record of the green microalgae *Coccomyxa* sp. in blue mussel *Mytilus edulis* (L.) from the Lower St. Lawrence Estuary // Journal of Invertebrate Pathology. 2014. Vol. 120. P. 23–32.