

НАУЧНЫЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 594.1:612.22.017.1

**ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА КИСЛОРОДА
НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ**

© 2022 г. А. Ю. Андреева, Е. С. Кладченко, О. Л. Гостюхина

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,

Севастополь, Российская Федерация

E-mail: kladchenko_ekaterina@bk.ru

Поступила в редакцию 09.03.2021; после доработки 01.07.2021;
принята к публикации 19.08.2022; опубликована онлайн 13.09.2022.

В течение последних десятилетий исследования иммунной системы двустворчатых моллюсков сфокусированы на изучении влияния факторов внешней среды на базальный статус защитных систем организма. Иммунная система моллюсков чувствительна к действию абиотических факторов, среди которых наиболее существенны температура, солёность воды и уровень растворённого кислорода. Гипоксия широко распространена в прибрежных водах Мирового океана с 1950-х гг.; гипоксические зоны (с концентрацией кислорода менее $0,5 \text{ мл O}_2 \cdot \text{л}^{-1}$) сохраняются на шельфе в течение длительного времени, соответствующего продолжительности жизненного цикла многих гидробионтов. Двустворчатые моллюски, являясь бентосными организмами, часто попадают под воздействие пониженной концентрации растворённого кислорода. Данная группа водных беспозвоночных играет важную роль в функционировании водных экосистем, при этом двустворки активно используют для аквакультурного выращивания. Эффективность культивирования этих организмов напрямую зависит от их иммунного статуса, определяющего устойчивость к заболеваниям. Основу иммунной системы двустворчатых моллюсков составляет комплекс неспецифических реакций клеточного и гуморального компонентов. Гемоциты, циркулирующие в гемолимфе, являются ключевыми эффекторами клеточного иммунного ответа, которые, наряду с барьерными тканями моллюсков, осуществляют синтез гуморальных факторов с широким спектром антимикробной активности. Гемолимфа моллюсков различных видов содержит разные типы клеток, которые отличаются по размерам, морфологии и наличию включений в цитоплазме. Большинство видов двустворок имеет два типа гемоцитов — гранулярные и агранулярные гемоциты; они могут подразделяться на морфотипы в зависимости от числа и окраски гранул, размеров ядра и наличия органелл в цитоплазме. Считается, что гранулоциты являются основными иммунными клетками, осуществляющими фагоцитоз и (или) инкапсуляцию инфекционных агентов, а также их последующую нейтрализацию путём выделения активных форм кислорода, лизирующих ферментов и гуморальных антимикробных белков. Также в комплекс защитных систем организма входит антиоксидантная, тесно связанная с иммунитетом моллюсков, поскольку эта система осуществляет нейтрализацию активных форм кислорода, выделяющихся в процессе активации клеточных иммунных механизмов. Избыток этих веществ оказывает повреждающее действие на клетки моллюсков путём окисления белков, липидов цитоплазматической мембраны и ДНК. В настоящем обзоре приведены данные о влиянии недостатка кислорода на клеточный и гуморальный компоненты иммунной системы и на тканевый антиоксидантный комплекс двустворчатых моллюсков.

Ключевые слова: двустворчатые моллюски, иммунитет, гемоциты, гипоксия, антимикробные белки, антиоксидантный комплекс

Глубокие гипоксические условия, как правило, характерны для водных экосистем, где формируются зоны кислородного минимума (Diaz & Breitburg, 2009). Формирование гипоксии во многих водных экосистемах обусловлено причинами естественного характера, однако усиление антропогенной нагрузки на прибрежные участки водоёмов привело к существенному распространению гипоксии и аноксии в Мировом океане (Gallo & Levin, 2016). При этом достаточное количество растворённого кислорода — фактор, определяющий выживание организмов в водной среде. Гипоксия вызывает существенные трансформации структуры сообществ, приводя к смене их видового состава и к изменениям численности и биомассы популяций (Diaz & Breitburg, 2009). Недостаток кислорода особенно влияет на физиологию бентосных макроорганизмов (Wang Y. et al., 2012).

Двустворчатые моллюски — массовые представители прибрежных морских водоёмов. Многие виды являются объектами культивирования и обладают высокой коммерческой ценностью (Wijsman et al., 2019). Кроме того, моллюски играют ключевую роль в функционировании морских экосистем (Hartmann et al., 2016). Высокая биологическая и экономическая значимость этих организмов обуславливает интерес исследователей к изучению особенностей функционирования их иммунной системы и к определению степени влияния негативных факторов среды на способность иммунитета противостоять инфекционным агентам различной природы (Anderson, 2001).

Иммунная защита двустворчатых моллюсков основана в первую очередь на биологических барьерах (раковина и мантия), а также на неспецифических реакциях врождённого иммунитета (Donaghy et al., 2012). Иммунитет двустворок состоит из клеточного и гуморального компонентов (Anderson, 2001). Моллюски имеют открытую систему циркуляции. Основными агентами, осуществляющими клеточный иммунный ответ, являются гемоциты (Donaghy et al., 2012). Механизмы клеточного компонента иммунной системы моллюсков включают фагоцитоз и (или) инкапсуляцию патогенных микроорганизмов с последующей их деструкцией путём ферментативного расщепления или выброса активных форм кислорода (далее — АФК) (Pauletto et al., 2014). Гуморальный ответ реализуется посредством воздействия на патогены комплекса молекул, в числе которых — антимикробные белки (Rodrigues et al., 2010), лектины С-типа (Wang S. et al., 2010), пептидогликанраспознающие белки (Ikuta et al., 2019) и ряд других соединений (Wootton et al., 2003).

Некоторые авторы рассматривают антиоксидантный (далее — АО) тканевый комплекс как ещё один механизм иммунной защиты моллюсков, поскольку в процессе реализации ответа на воздействие патогенов и неблагоприятных условий среды происходит генерация гемоцитами АФК (Donaghy et al., 2012). При этом восстановление кислорода до супероксидного аниона приводит к появлению множества высокоактивных форм кислорода, среди которых гидроперекиси, синглетный кислород или гидроксил-радикалы (Lambert & Brand, 2004). Избыток этих веществ способен повредить клеточные структуры (Valko et al., 2006). Между тем баланс в производстве и нейтрализации АФК достигается за счёт поддержания высокой активности тканевых АО-ферментов (каталазы, супероксиддисмутаза и др.), которые расщепляют гидроперекиси на менее активный газообразный кислород и воду (Monari et al., 2007). Таким образом реализуется внутренний механизм защиты организма от повреждающего действия АФК в процессе функционирования иммунной системы.

Являясь преимущественно донными организмами, моллюски часто сталкиваются с условиями периодической или постоянной гипоксии, что обусловило наличие у них широкого спектра адаптационных механизмов для выживания в среде с минимальным содержанием кислорода (Sokolov et al., 2019). В настоящей работе приведён обзор современных понятий о реакции клеточного и гуморального иммунного ответа, а также о реакции АО-комплекса двустворчатых моллюсков на недостаток кислорода.

1. Клеточный иммунный ответ

1.1. Соотношение типов гемоцитов и общее число гемоцитов в гемолимфе. Известно, что клеточный состав гемолимфы и функциональные особенности гемоцитов различны у представителей двустворчатых моллюсков. Различия в классификации гемоцитов у разных видов (а иногда и у одного вида) зависят от метода анализа и от принципа, положенного в основу классификации клеток (Hine, 1999). Обобщая существующие классификации, можно выделить два основных типа клеток — агранулярные (бластоподобные клетки, агранулоциты и гиалиноциты) и гранулярные (Andrejeva et al., 2019; Hine, 1999). Именно гранулярные клетки в большей степени отвечают за реализацию иммунного ответа (Wang W. et al., 2017), в связи с чем соотношение типов клеток в гемолимфе — это важный диагностический показатель функционального состояния организма моллюска. Снижение общего количества гемоцитов или изменение их соотношения в гемолимфе может повлиять на эффективность иммунного ответа.

Показано снижение общего числа гемоцитов в условиях недостатка кислорода у разных видов моллюсков. Так, инкубация мидий *Mytilus coruscus* Gould, 1861 на протяжении 3 суток в условиях гипоксии приводила к снижению относительного числа гранулярных клеток в гемолимфе (Sui et al., 2016). У мидии *Perna perna* (Linnaeus, 1758) инкубация на воздухе в течение 48 ч вела к уменьшению количества циркулирующих гемоцитов на 73 % (Nogueira et al., 2017). Снижение общего числа гемоцитов после инкубации в гипоксических условиях отмечено у *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) (Wang Y. et al., 2011) и *Chamelea gallina* (Linnaeus, 1758) (Matozzo et al., 2005). Уменьшение общего количества гемоцитов связывают с нарушением их пролиферации, миграцией гемоцитов в другие ткани, увеличением скорости апоптоза и уровня смертности (Mydlarz et al., 2006). Показано, что инкубация в условиях дефицита кислорода обуславливает увеличение уровня смертности гемоцитов *P. viridis* (Wang Y. et al., 2011) и *M. coruscus* (Sui et al., 2016). По результатам других исследований, гипоксия может приводить к снижению общего числа гемоцитов без увеличения уровня их смертности (Nogueira et al., 2017). Интересно, что у *Ch. gallina*, подвергшихся суточной гипоксии после 96 ч инкубации в условиях нормоксии, число гемоцитов восстановилось до уровня контроля (Matozzo et al., 2005). В то же время воздействие дефицита кислорода более 24 ч приводило к необратимым изменениям в отношении числа гемоцитов (Pampanin et al., 2002).

1.2. Фагоцитоз. Гемоциты способны фагоцитировать чужеродные частицы и патогенных микроорганизмов, проникающих в организм моллюска. Процесс фагоцитоза включает распознавание, связывание и инактивацию патогена (Canesi et al., 2002). Как правило, гипоксия приводит к подавлению фагоцитарной активности (Ellis et al., 2011); её снижение отмечено у *P. viridis* после суточной инкубации в условиях гипоксии (Wang Y. et al., 2011), у *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 после 12 и 24 ч инкубации на воздухе (Mosca et al., 2013), а также у *M. coruscus* (Sui et al., 2016), *Chlamys farreri* (K. H. Jones & Preston, 1904) (Chen J. et al., 2007) и *Ch. gallina* (Matozzo et al., 2005). Изменения зависели от времени инкубации: при более длительной гипоксии зафиксирована меньшая интенсивность фагоцитоза (Sui et al., 2016). Снижение фагоцитарной активности при гипоксии связывают с уменьшением числа гемоцитов (Pampanin et al., 2002). Недостаточная продукция аденозинтрифосфорной кислоты при дефиците кислорода приводит к снижению способности мигрировать и фагоцитировать инородные частицы. Вместе с тем инкубация на воздухе *P. perna* способствовала увеличению фагоцитарной активности их гемоцитов (Nogueira et al., 2017).

1.3. Спонтанная продукция активных форм кислорода. Гемоциты продуцируют АФК для противомикробной защиты (Anderson, 2001). Обычно гранулярные клетки двустворчатых моллюсков в большей степени способны к генерации окислительного взрыва, чем агранулярные клетки (Pauletto et al., 2014). Считается, что основным источником АФК в гемоцитах —

митохондрии (Donaghy et al., 2013), а снижение продукции АФК может быть вызвано ингибированием ферментов, участвующих в генерации окислительного взрыва (Andreyeva et al., 2019). Ингибирование продукции АФК отмечено у гемоцитов *P. viridis* (Wang Y. et al., 2011). Снижение продукции АФК связывают с механизмами метаболической корректировки при участии фактора, индуцируемого гипоксией (hypoxia-inducible factor, HIF) (Michiels et al., 2002). С другой стороны, у *M. galloprovincialis* краткосрочная гипоксия индуцирует увеличение способности к продукции АФК в агранулоцитах и снижение — в гранулоцитах (Andreyeva et al., 2019). Аналогичные результаты получены другими авторами (Chen J. et al., 2007 ; Sui et al., 2016). Вероятно, у некоторых видов гипоксия индуцирует реорганизацию дыхательной цепи митохондрий, что приводит к увеличению образования АФК (Chandel et al., 2000).

2. Гуморальный иммунитет и реакция на гипоксию

Двустворчатые моллюски обладают комплексом гуморальных иммунных факторов, активируемых в ответ на инвазию патогенных микроорганизмов и (или) на негативное воздействие окружающей среды. Основными классами соединений, принимающих участие в гуморальном иммунном ответе моллюсков, являются антимикробные белки, цитокины, факторы системы комплемента, АО-ферменты и белки острой фазы (Rodrigues et al., 2010). Эффекторы гуморального неспецифического иммунитета обладают широким спектром активности против грамположительных и грамотрицательных бактерий, простейших, дрожжей, грибов и вирусов. Одними из первых выявлены и описаны антимикробные белки у *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758 и *M. galloprovincialis* (Charlet et al., 1996 ; Mitta et al., 2000). Наиболее распространённой у двустворок группой антимикробных белков являются дефензины, однако описаны и другие классы соединений, обладающих антимикробными свойствами, — гистоны (Dorrington et al., 2011), лизозимы и др. (Wang Q. et al., 2013). Показано, что семейство лизозимов у моллюсков представлено большим числом белков, которые в основной своей массе экспрессируются в мукозальных тканях (мантии, жабрах и гепатопанкреасе) (Wang Q. et al., 2013). Очевидно, что спектр соединений, принимающих участие в гуморальном иммунном ответе моллюсков, значительно шире известного в настоящее время. В основе принципа исследований лежит поиск аналогий с уже описанными факторами неспецифического иммунитета позвоночных, и при таком подходе специфические для моллюсков соединения остаются неописанными. Конкретная роль большинства идентифицированных факторов гуморального иммунитета всё ещё не изучена ввиду сложностей в постановке экспериментов и выборе методик. Тем не менее большинство авторов сходятся во мнении о первичной роли этих соединений в иммунном ответе моллюсков. Данное предположение основано на быстрых изменениях уровней экспрессии гуморальных факторов в ответ на экспериментальную иммунизацию гемоцитов (Suárez-Ulloa et al., 2013).

Поскольку база фундаментальных знаний об особенностях функционирования гуморального иммунитета двустворчатых моллюсков отсутствует, чрезвычайно сложно охарактеризовать степень негативного влияния недостатка кислорода на эту часть иммунной системы. Транскриптомные исследования свидетельствуют об активации целого комплекса генов, которые задействованы в ряде иммунных сигнальных путей, реализующих ответ на бактериальную инвазию у моллюсков, которых содержат в условиях гипоксии (Zhang et al., 2019). Показано, что она оказывает угнетающее действие на гуморальный иммунитет моллюсков. Уровень экспрессии дефензина в жабрах *Brachidontes pharaonis* (P. Fischer, 1870) снижался в 5–20 раз после 6-дневного воздействия низких концентраций кислорода (Parisi et al., 2015). У других представителей типа Mollusca также отмечены существенные изменения экспрессии иммунных генов. Так, у тихоокеанского абалона зарегистрировано угнетение экспрессии 6 генов, ассоциированных с иммунным ответом, в условиях дефицита кислорода (Shen et al., 2019). С другой стороны, инкубация морских ушек (*Haliotis discus discus* Reeve, 1846) в гипоксических условиях в течение 8 ч вызывала

существенное усиление транскрипции белков, задействованных в регуляции активности цитокинов, что говорит об активации последних, а также некоторых других белков, участвующих в иммунном ответе позвоночных (De Zoysa et al., 2009).

Непосредственные реакции гуморального иммунитета, возникающие вследствие изменений экспрессии генов, остаются предметом дискуссии, и результаты лишь фиксируют факт изменений экспрессии факторов гуморального иммунитета. Реальная физиологическая роль наблюдаемых изменений пока не исследована. Вероятно, подобные реакции иммунной системы имеют негативный характер, поскольку у некоторых видов отмечено снижение экспрессии факторов гуморального иммунитета в ответ на стимуляцию патогенными организмами при инкубации в гипоксических условиях (Sun et al., 2016).

3. Влияние гипоксии на антиоксидантный комплекс двустворчатых моллюсков

АО-комплекс моллюсков является важнейшей системой неспецифической защиты организма от окислительного стресса (далее — ОС) и в значительной мере определяет их устойчивость к действию неблагоприятных факторов среды (Гостюхина и Андреев, 2018 ; Soldatov et al., 2014). Одним из наиболее существенных повреждающих факторов, защиту от которых обеспечивает АО-система, является дефицит кислорода. Повышенное высвобождение АФК у моллюсков при гипоксии увеличивает риск ОС (Tomanek, 2015). АО-защиту моллюсков обеспечивают АО-ферменты, такие как каталаза, супероксиддисмутаза и глутатионпероксидаза (далее — КАТ, СОД и ГП соответственно), а также ряд низкомолекулярных антиоксидантов (Livingstone, 2001). Некоторые компоненты АО-комплекса не только обеспечивают защиту от гипоксии, но и служат важными гуморальными факторами иммунной защиты; например, активность КАТ, СОД и ГП хорошо коррелирует с иммунной компетентностью клеток моллюсков (Liu et al., 2004 ; Sui et al., 2017). Высокая активность разных звеньев АО-системы у моллюсков-эврибионтов позволяет им выдерживать длительный дефицит кислорода в воде (Irato et al., 2007 ; Soldatov et al., 2014), адаптироваться к нему и занимать свою собственную эконишу (Довженко, 2006).

3.1. Видовая специфика в реакциях антиоксидантного комплекса на гипоксию. Несмотря на универсальный, неспецифический характер действия АО-комплекса, он может иметь специфику в зависимости от видовых, тканевых, эволюционных и экологических особенностей моллюсков (Гостюхина и Андреев, 2018 ; Довженко, 2006 ; Истомина, 2012 ; Gostyukhina & Andreenko, 2019 ; Livingstone, 2001 ; Soldatov et al., 2014). Так, в условиях экспериментальной гипоксии и аноксии выявили три типа реакций: увеличение активности АО-ферментов (у толерантных к гипоксии видов), снижение их активности и постоянство состояния АО-комплекса (Истомина и др., 2011). Повышение активности СОД и глутатионредуктазы обнаружили у *Spisula sachalinensis* (Schrenck, 1862) и *Littorina mandshurica* (Schrenck, 1862) — моллюсков, испытывающих дефицит кислорода в силу условий среды обитания. *S. sachalinensis* периодически закапывается в грунт и находится в гипоксических условиях, а *L. mandshurica* — обитатель литорали — ежедневно подвержена колебаниям уровня кислорода при приливах и отливах. Эти реакции связывают со способностью АО-ферментов данных моллюсков к быстрой реакции на рост уровня АФК. В гепатопанкреасе *S. sachalinensis* также отмечено снижение содержания восстановленного глутатиона (далее — GSH) (Истомина, 2012), что отражает активную АО-роль GSH и быстрое истощение его ресурса при гипоксии. У устойчивых к ОС видов моллюсков при гипоксии повышается активность АО-ферментов, в первую очередь СОД и КАТ. В частности, реакция на кратковременную и продолжительную критическую гипоксию у моллюска *Astarte borealis* (Schumacher, 1817) выражалась в активации СОД и КАТ, а также ГП (Abele-Oeschger & Oeschger, 1995). В гепатопанкреасе и жабрах устойчивой к гипоксии анадары *Scapharca inaequivalvis* (Bruguère, 1789) тоже выявлена высокая активность КАТ, СОД и ГП (Irato et al., 2007).

У стенооксильного вида *Patinopecten yessoensis* (Jay, 1857) активность АО-ферментов падала, что обусловлено меньшей устойчивостью данного моллюска к гипоксии. Это связывают с его обитанием в относительно стабильных условиях и способностью избегать гипоксии (Истомина и др., 2011). У чувствительного к ОС моллюска *Tapes philippinarum* (A. Adams & Reeve, 1850) при гипоксии показано снижение активности СОД и КАТ, что может свидетельствовать о наличии ОС в тканях (Irato et al., 2007). Также у гребешка *Mizuhopecten yessoensis* при гипоксии зарегистрирован существенный рост уровня GSH — в 6 раз (Истомина, 2012). Это отражает ведущую роль GSH в защите чувствительных к ОС моллюсков.

Третий способ реагирования — постоянная АО-активность — также связан, вероятно, с устойчивостью к недостатку кислорода. Отсутствие достоверных изменений АО-комплекса при гипоксии показано у *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) и *Tegula rustica* (Gmelin, 1791), обитающих в сублиторали, ведущих прикрепленный или малоподвижный образ жизни и не подверженных частому дефициту кислорода, в отличие от литоральных или роющих моллюсков (Истомина и др., 2011). Кроме того, мидия Грея, *C. grayanus*, способна длительное время поддерживать постоянную активность СОД и КАТ при дефиците кислорода на фоне постоянного уровня продуктов перекисного окисления липидов (Истомина, 2012). Такая стратегия АО-защиты обусловлена, возможно, эволюционной приспособленностью митилид к длительной гипоксии/аноксии (Hicks & McMahon, 2005). Однако при этом отмечено снижение активности глутатионредуктазы и уровня GSH (Истомина, 2012). Это указывает на то, что основной вклад в АО-защиту *C. grayanus* при гипоксии вносят ключевые ферменты — СОД и КАТ. В тканях *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906), ещё более устойчивой к ОС, чем *M. galloprovincialis*, показаны более высокая активность АО-ферментов и существенно повышенный ресурс GSH (Гостюхина и Андреев, 2018). Это даёт анадаре преимущество для обитания и выживания в гипоксических условиях среды.

3.2. Чувствительность отдельных компонентов антиоксидантного комплекса к недостатку кислорода. В ответе на недостаток кислорода отмечают и специфику реакций отдельных компонентов АО-комплекса. В первую очередь при гипоксии выявляют рост активности СОД и КАТ (Chen J. et al., 2007 ; Chen X. et al., 2014 ; Sui et al., 2017). Среди АО-систем первую и наиболее важную линию защиты обеспечивает СОД (Sui et al., 2017). В условиях дефицита кислорода нередко обнаруживают быстрое повышение активности СОД — в гемоцитах гребешков *Ch. farreri* (Chen J. et al., 2007), в гепатопанкреасе и жабрах анадары *S. inaequalis*, у устриц *Pteria penguin* (Röding, 1798) (Gu et al., 2020), у *S. sachalinensis* и *L. mandshurica* (Истомина и др., 2011), в жабрах и гемолимфе *M. coruscus* (Sui et al., 2017). Как правило, СОД реагирует одной из первых, но преимущественно на начальных этапах гипоксии. При дальнейшем дефиците кислорода наблюдают снижение активности фермента; так, у *Ch. farreri* уменьшение активности СОД произошло через 7, 14 и 21 день, что свидетельствует о том, что продолжительная гипоксия может привести к инаktivации основных защитных ферментов (Chen J. et al., 2007). Примечательно, что у высокоустойчивого к гипоксии двусторчатого моллюска *A. borealis* реакция на кратковременную и продолжительную критическую гипоксию выражалась в активации не только СОД, но и КАТ, а также ГП (Abele-Oeschger & Oeschger, 1995). Это указывает на совместное действие разных звеньев АО-комплекса, в том числе при длительной гипоксии. Возможно, такая АО-стратегия и определяет высокую устойчивость *A. borealis* к гипоксии.

Повышенная активность СОД приводит к высокой скорости дисмутации супероксидного анион-радикала в H_2O_2 , что стимулирует активность КАТ, катализирующей расщепление H_2O_2 и гидропероксидов, а также защищает организм от высоких количеств гидроксильных радикалов (Hermes-Lima, 2004). Показано, что активность КАТ часто повышается в результате увеличения H_2O_2 при ОС (Hermes-Lima, 2004). Это согласуется с результатами (Sui et al., 2017): активность КАТ у *M. coruscus* увеличивается в ответ на низкий уровень кислорода и pH.

В ряде случаев активность КАТ уменьшается при дефиците кислорода в воде, например у мидии *M. galloprovincialis*. При этом в защите мидии от гипоксии более значительную роль, чем каталаза, могут играть другие АО-ферменты, в частности глутатионтрансфераза (далее — ГТ) (Woo et al., 2013). Такое разнообразие ответов отражает видоспецифичность реакций АО-комплекса при гипоксии, указывает на их сложность и изменчивость, а также на пластичность АО-системы в защите моллюсков от гипоксии/аноксии.

Показано и доминирование в АО-защите моллюсков низкомолекулярных антиоксидантов, в первую очередь GSH. Это наблюдают, как правило, у более чувствительных к ОС видов. Так, у стенооксильного вида — гребешка *P. yessoensis* — при гипоксии продемонстрировано снижение активности АО-ферментов (Истомина и др., 2011), что определяется, вероятно, меньшей их устойчивостью к недостатку кислорода. Однако на этом фоне у гребешка отмечают значительный рост ресурса GSH, что обеспечивает защиту моллюска от АФК в условиях пониженной активности ферментов. Подтверждением этому может служить способность GSH инактивировать супероксидный анион-радикал, отчасти дублируя таким образом функцию СОД (Hermes-Lima, 2004). В условиях гипоксии такая взаимная замена может способствовать эффективной защите и выживанию моллюска: она позволяет при нарастании уровня АФК обеспечить быстрый и эффективный АО-ответ с помощью низкомолекулярного глутатиона без активации СОД, что не требует затрат времени и энергии (Гостюхина и Андрееenko, 2018).

Важную защитную роль GSH демонстрирует и сравнение АО-реакций моллюсков с разной устойчивостью к дефициту кислорода. В ряде тканей чувствительного к гипоксии японского гребешка *M. yessoensis* показана не только повышенная активность АО-ферментов, но и более высокий ресурс GSH, в то время как у мидии Грея, *S. grayanus*, обнаружен только рост активности СОД в жабрах. Это является видоспецифической реакцией и определяет устойчивость данных видов к гипоксии (Belcheva et al., 2016).

3.3. Тканеспецифические особенности антиоксидантного комплекса в условиях гипоксии. Реакции АО-системы моллюсков на гипоксию носят и тканеспецифический характер. Как правило, наибольшую активность АО-ферментов выявляют в гепатопанкреасе и жабрах (Гостюхина и Андрееenko, 2018 ; Довженко, 2006), однако есть ряд исключений. Так, для *M. coruscus* показана более высокая активность КАТ, СОД и ГП при гипоксии в гемоцитах, чем в жабрах (Sui et al., 2017). Это связывают с более важной ролью гемолимфы в иммунной защите. У других видов при гипоксии также обнаруживают подобные особенности — более высокие, чем в жабрах, значения активности КАТ в гемоцитах *M. galloprovincialis* (Katsumiti et al., 2015) и значения активности СОД и ГТ в гемоцитах *Venerupis philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) (Chen X. et al., 2014). У *A. kagoshimensis* максимальные значения уровня GSH и активности ГП зарегистрированы в ноге. Это указывает на активное участие GSH в работе данного фермента как кофактора и одновременно — на его собственную активную АО-роль. Содержание других низкомолекулярных антиоксидантов (глюкозы, аминокислот и мочевины) было самым высоким в гепатопанкреасе и жабрах (таргетных органах), а наименьшим — в ноге (Gostyukhina & Andreenko, 2019). Вероятно, эти низкомолекулярные антиоксиданты вносят значительный вклад в АО-защиту моллюска в условиях гипоксии. К такому же заключению приходят другие авторы. Сделан вывод о ключевой роли низкомолекулярного звена АО-системы в детоксикации АФК у анадары при аноксии и реоксигенации, поскольку низкомолекулярные антиоксиданты в меньшей степени зависят от интенсивности метаболизма и источников энергии (Истомина и др., 2011).

3.4. Особенности функционирования антиоксидантной системы при нахождении в атмосфере. Ряд исследований посвящён влиянию на моллюсков аноксии при воздействии воздуха. Так, аноксия в сочетании с разной температурой у гребешка *Ch. farreri* приводила к комплексу реакций — увеличению продукции АФК, снижению активности кислой фосфатазы

и числа фагоцитарных гемоцитов, росту смертности гемоцитов. При этом активность СОД достоверно не зависела от температуры воздуха, но зависела от длительности аноксии (Chen J. et al., 2007).

В условиях аноксии на воздухе при +25 °С в течение 2 ч в лизате гемоцитов гребешков активность СОД значительно повышалась на фоне одновременного существенного увеличения продукции АФК (Chen J. et al., 2007). Это указывает на защитное действие СОД при росте окислительной нагрузки в таких условиях. У гребешков при температуре +5 °С продукция АФК была существенно выше исходных значений при этом режиме аноксии, однако активность СОД в лизате гемоцитов сохранялась на уровне контроля (Chen J. et al., 2007). Подобные реакции свидетельствуют о важной защитной роли СОД при разных режимах дефицита кислорода и при разной температуре. В то же время авторы считают, что при высокой температуре гребешки показали относительно низкую переносимость аноксии. Это согласуется с мнением ряда специалистов о том, что влияние аноксических и гипоксических нагрузок может изменять иммунные реакции моллюска и приводить к повышенной восприимчивости к заболеваниям (Matozzo et al., 2005 ; Monari et al., 2005 ; Pampanin et al., 2002). Возможно, такой тип АО-защиты больше свойственен стеноокисильным моллюскам.

Лидирующую роль СОД в защите моллюсков от гипоксии отмечают и у *P. penguin* при выдерживании на воздухе (Gu et al., 2020). Активность СОД увеличивалась после воздействия воздуха и затем стабилизировалась в гепатопанкреасе и гемолимфе устрицы, что выразилось в неизменном уровне МДА в течение 6 и 9 ч гипоксии. В отличие от активности СОД, активность КАТ и ГП, а также общая АО-способность быстро увеличивались, а затем постепенно снижались после 6 ч пребывания моллюска на воздухе. Возможно, причиной послужил рост уровня МДА в гемолимфе после 9 и 12 ч воздействия гипоксии.

3.5. Обратимость воздействия гипоксии на антиоксидантный комплекс при реоксигенации. Ряд исследований посвящён ответу АО-системы моллюсков на гипоксию и последующую реоксигенацию. В жабрах *M. galloprovincialis* в условиях 48-часового воздействия воздуха с последующей 48-часовой реоксигенацией наблюдали рост экспрессии генов и активности КАТ, СОД и ГТ. Возврат к нормоксическому уровню отмечали во время реоксигенации (Giannetto et al., 2017). Подобные реакции отражают превентивный рост АО-потенциала моллюска для борьбы с окислительным взрывом во время будущей реоксигенации.

При действии разных режимов гипоксии у *M. galloprovincialis* установили снижение активности КАТ, но неизменную активность СОД, а также рост активности ГТ и последующее её снижение на фоне роста уровня перекисного окисления липидов. Это отражает транскрипционную стабильность и избирательные изменения генов отдельных АО-ферментов, обеспечивающих защиту мидии при разных режимах дефицита кислорода (Woo et al., 2013). Кроме того, выявлены разные реакции у отдельных изоформ ферментов. Так, при влиянии аноксии на иммунный ответ гемоцитов *Ch. gallina* активность Cu/Zn-СОД снизилась, в то время как активность Mn-СОД значительно возросла. Особенно высока активность Mn-СОД во время реоксигенации, что обусловлено, вероятно, высокой индуцибельностью этой изоформы и её важной ролью в защите от АФК при возврате к нормоксии (Monari et al., 2005).

Закключение. Результаты исследований последних лет позволили существенно углубить и расширить знания о последствиях воздействия гипоксии на иммунную систему моллюсков на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях. Дальнейший анализ адаптационных механизмов гемоцитов моллюсков позволит оценить и предсказать возможные негативные последствия воздействия гипоксии на клеточный компонент иммунной системы, а молекулярно-генетические исследования дадут возможность оценить степень воздействия дефицита кислорода на гуморальный компонент. В свою очередь, степень влияния гипоксии на иммунитет двустворчатых

моллюсков будет зависеть от комбинации климатических изменений в среде (глобальное потепление, изменения ветровых характеристик, течений и т. д.), а также от перспектив использования прибрежных участков суши в хозяйственной деятельности. Реакции антиоксидантного комплекса двустворчатых моллюсков на гипоксию, как и иммунный ответ, видоспецифичны. В АО-ответ вовлекаются компоненты как ферментного, так и низкомолекулярного звена АО-системы в разных комбинациях. Изменения в АО-активности при гипоксии нередко вызваны подготовкой к последующей реоксигенации и часто носят обратимый характер. Это отражает функциональную пластичность АО-системы и её важную роль в защитных механизмах, а также в формировании неспецифических иммунных реакций организма двустворчатых моллюсков при дефиците кислорода в среде.

Влияние гипоксии на антиоксидантный комплекс двустворчатых моллюсков изучали в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Закономерности организации иммунной системы промысловых гидробионтов и исследование влияния факторов внешней среды на функционирование их защитных систем» (№ 121102500161-4). Исследование влияния дефицита кислорода на иммунную систему двустворчатых моллюсков проводили при финансовой поддержке гранта президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских учёных — кандидатов наук (проект МК609.2020.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Гостюхина О. Л., Андреев Т. И. Ферментное и низкомолекулярное звенья антиоксидантного комплекса двух видов черноморских моллюсков с разной устойчивостью к окислительному стрессу: *Mytilus galloprovincialis* Lam. и *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) // *Журнал общей биологии*. 2018. Т. 79, № 6. С. 482–492. [Gostyukhina O. L., Andreenko T. I. Enzymatic and low-molecular weight units of antioxidant complex in two species of the Black Sea mollusks with different resistance to oxidative stress: *Mytilus galloprovincialis* Lam. and *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). *Zhurnal obshchei biologii*, 2018, vol. 79, no. 6, pp. 482–492. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S0044459618060040>
2. Довженко Н. В. Реакция антиоксидантной системы двустворчатых моллюсков на воздействие повреждающих факторов среды : автореф. ... дис. канд. биол. наук : 03.00.16. Владивосток, 2006. 22 с. [Dovzhenko N. V. *Reaktsiya antioksidantnoi sistemy dvustvorchatykh mollyuskov na vozdeystvie povrezhdayushchikh faktorov sredy* : avtoref. ... dis. kand. biol. nauk : 03.00.16. Vladivostok, 2006, 22 p. (in Russ.)]
3. Истомина А. А. Реакция антиоксидантной системы у массовых видов моллюсков залива Петра Великого в условиях дефицита кислорода и действия ионов Cu^{2+} : автореф. ... дис. канд. биол. наук : 03.08.02. Владивосток, 2012. 18 с. [Istomina A. A. *Reaktsiya antioksidantnoi sistemy u massovykh vidov mollyuskov zaliva Petra Velikogo v usloviyakh defitsita kisloroda i deistviya ionov Cu^{2+}* : avtoref. ... dis. kand. biol. nauk : 03.08.02. Vladivostok, 2012, 18 p. (in Russ.)]
4. Истомина А. А., Довженко Н. В., Бельчева Н. Н., Челомин В. П. Активность антиоксидантных ферментов у разных видов моллюсков в условиях гипоксии/аноксии // *Известия Самарского НЦ РАН*. 2011. Т. 13, № 1 (5). С. 1106–1108. [Istomina A. A., Dovzhenko N. V., Belcheva N. N., Chelomin V. P. Activity of antioxidant enzymes at different kinds of molluscs in the hypoxia/anoxia condition. *Izvestiya Samarskogo NTs RAN*, 2011, vol. 131, no. 2, pp. 1106–1108. (in Russ.)]
5. Abele-Oeschger D., Oeschger R. Hypoxia-induced autoxidation of haemoglobin in the benthic invertebrates *Arenicola marina* (Polychaeta) and *Astarte borealis* (Bivalvia) and the possible effects of sulphide. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1995, vol. 187, iss. 1, pp. 63–80. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(94\)00172-A](https://doi.org/10.1016/0022-0981(94)00172-A)
6. Anderson R. S. Reactive oxygen species and antimicrobial defenses of invertebrates: A bivalve model. In: *Phylogenetic Perspectives on the Vertebrate Immune System* / G. Beck, M. Sugumaran, E. L. Cooper (Eds). Boston, MA : Springer, 2001, pp. 131–139. (Advances

- in Experimental Medicine and Biology ; vol. 484). https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1291-2_12
7. Andreyeva A. Y., Efremova E. S., Kukhareva T. A. Morphological and functional characterization of hemocytes in cultivated mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and effect of hypoxia on hemocyte parameters. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, vol. 89, pp. 361–367. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.017>
 8. Belcheva N. N., Dovzhenko N. V., Istomina A. A., Zhukovskaya A. F., Kukla S. P. The antioxidant system of the Gray's mussel *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) and the Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857) (Mollusca: Bivalvia). *Russian Journal of Marine Biology*, 2016, vol. 42, iss. 6, pp. 489–494. <http://dx.doi.org/10.1134/S106307401606002X>
 9. Canesi L., Gallo G., Gavioli M., Pruzzo C. Bacteria–hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique*, 2002, vol. 57, iss. 6, pp. 469–476. <https://doi.org/10.1002/jemt.10100>
 10. Chandel N. S., McClintock D. S., Feliciano C. E., Wood T. M., Melendez J. A., Rodriguez A. M., Schumacker P. T. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: A mechanism of O₂ sensing. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, vol. 275, iss. 33, pp. 25130–25138. <https://doi.org/10.1074/jbc.m001914200>
 11. Charlet M., Chernysh S., Philippe H., Hetru C., Hoffmann J. A., Bulet P. Innate immunity: Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, vol. 271, iss. 36, pp. 21808–21813. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.36.21808>
 12. Chen J., Mai K., Ma H., Wang X., Deng D., Liu X., Xu W., Liufu Z., Zhang W., Tan B., Ai Q. Effects of dissolved oxygen on survival and immune responses of scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston). *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, vol. 22, iss. 3, pp. 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.06.003>
 13. Chen X., Zhang R., Li C., Bao Y. Mercury exposure modulates antioxidant enzymes in gill tissue and hemocytes of *Venerupis philippinarum*. *Invertebrate Survival Journal*, 2014, vol. 11, no. 1, pp. 298–308.
 14. De Zoysa M., Whang I., Lee Y., Lee S., Lee J. S., Lee J. Transcriptional analysis of antioxidant and immune defense genes in disk abalone (*Haliotis discus discus*) during thermal, low-salinity and hypoxic stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, vol. 154, iss. 4, pp. 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.08.002>
 15. Diaz R. J., Breitburg D. L. The hypoxic environment. In: *Hypoxia* / J. G. Richards, A. P. Farrell, C. J. Brauner (Eds). New York ; London ; Oxford ; Boston ; San Diego : Academic Press, 2009, chap. 1, pp. 1–23. (Fish Physiology ; vol. 27). [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)00001-0](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)00001-0)
 16. Donaghy L., Kraffe E., Le Goïc N., Lambert C., Volety A. K., Soudant P. Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: A mitochondrial involvement. *PLoS One*, 2012, vol. 7, iss. 10, art. no. e46594 (10 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046594>
 17. Donaghy L., Artigaud S., Sussarellu R., Lambert C., Le Goïc N., Hégaret H., Soudant P. Tolerance of bivalve mollusc hemocytes to variable oxygen availability: A mitochondrial origin? *Aquatic Living Resources*, 2013, vol. 26, no. 3, pp. 257–261. <https://doi.org/10.1051/alr/2013054>
 18. Dorrington T., Villamil L., Gómez-Chiarri M. Up-regulation in response to infection and antibacterial activity of oyster histone H4. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, vol. 30, iss. 1, pp. 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.006>
 19. 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 & Shellfish Immunology*, 2011, vol. 30, iss. 6, pp. 1209–1222. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.03.017>
 20. Gallo N. D., Levin L. A. Fish ecology and evolution in the world's oxygen minimum zones and implications of ocean deoxygenation. *Advances in Marine Biology*, 2016, vol. 74, pp. 117–198. <https://doi.org/10.1016/bs.amb.2016.04.001>
 21. Giannetto A., Maisano M., Cappello T., Oliva S., Parrino V., Natalotto A., De Marco G., Fasulo S. Effects of oxygen availability on oxidative stress biomarkers in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Biotechnology*, 2017, vol. 19, no. 6, pp. 614–626. <https://doi.org/10.1007/s10126-017-9780-6>

22. Gostyukhina O. L., Andreenko T. I. Tissue metabolism and the state of the antioxidant complex in the Black Sea mollusks *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) and *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 with different tolerances to oxidative stress. *Russian Journal of Marine Biology*, 2019, vol. 45, no. 3, pp. 211–220. <https://doi.org/10.1134/S1063074019030039>
23. Gu Z., Wei H., Cheng F., Wang A., Liu C. Effects of air exposure time and temperature on physiological energetics and oxidative stress of winged pearl oyster (*Pteria penguin*). *Aquaculture Reports*, 2020, vol. 17, art. no. 100384 (9 p.). <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100384>
24. Hartmann J. T., Beggel S., Auerswald K., Stoeckle B. C., Geist J. Establishing mussel behavior as a biomarker in ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, 2016, vol. 170, pp. 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.06.014>
25. Hermes-Lima M. Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation* / K. B. Storey (Ed.). Holoken, NJ : Wiley-Liss, 2004, chap. 12, pp. 319–368. <https://doi.org/10.1002/047167558X.ch12>
26. Hicks D. W., McMahon R. F. Effects of temperature on chronic hypoxia tolerance in the non-indigenous brown mussel, *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae) from the Texas Gulf of Mexico. *Journal of Molluscan Studies*, 2005, vol. 71, iss. 4, pp. 401–408. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyi042>
27. Hine P. M. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, vol. 9, iss. 5, pp. 367–385. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0205>
28. Ikuta T., Tame A., Saito M., Aoki Y., Nagai Y., Sugimura M., Inoue K., Fujikura K., Ohishi K., Maruyama T., Yoshida T. Identification of cells expressing two peptidoglycan recognition proteins in the gill of the vent mussel, *Bathymodiolus septemdierum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, vol. 93, pp. 815–822. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.022>
29. Irato P., Piccinni E., Cassini A., Santovito G. Antioxidant responses to variations in dissolved oxygen of *Scapharca inaequivalvis* and *Tapes philippinarum*, two bivalve species from the lagoon of Venice. *Marine Pollution Bulletin*, 2007, vol. 54, iss. 7, pp. 1020–1030. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.01.020>
30. Katsumiti A., Gilliland D., Arostegui I., Cajaraville M. P. Mechanisms of toxicity of Ag nanoparticles in comparison to bulk and ionic Ag on mussel hemocytes and gill cells. *PLoS One*, 2015, vol. 10, iss. 6, art. no. e0129039 (30 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129039>
31. Lambert A. J., Brand M. D. Superoxide production by NADH: Ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochemical Journal*, 2004, vol. 382, iss. 2, pp. 511–517. <https://doi.org/10.1042/BJ20040485>
32. Liu S., Jiang X., Hu X., Gong J., Hwang H., Mai K. Effects of temperature on non-specific immune parameters in two scallop species: *Argopecten irradians* (Lamarck 1819) and *Chlamys farreri* (Jones & Preston 1904). *Aquaculture Research*, 2004, vol. 35, iss. 7, pp. 678–682. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01065.x>
33. Livingstone D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 2001, vol. 42, iss. 8, pp. 656–666. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00060-1)
34. Matozzo V., Monari M., Foschi J., Papi T., Cattani O., Marin M. G. Exposure to anoxia of the clam *Chamelea gallina*: I. Effects on immune responses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, vol. 325, iss. 2, pp. 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.04.030>
35. Michiels C., Minet E., Mottet D., Raes M. Regulation of gene expression by oxygen: NF-κB and HIF-1, two extremes. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, vol. 33, iss. 9, pp. 1231–1242. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01045-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01045-6)
36. Mitta G., Hubert F., Dzyrnda E. A., Boudry P., Roch P. Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: Gene structure and expression analysis. *Developmental & Comparative Immunology*, 2000, vol. 24, iss. 4, pp. 381–393. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00084-1](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00084-1)
37. Monari M., Matozzo V., Foschi J. M., Marin M. G., Cattani O. Exposure to anoxia of the clam, *Chamelea gallina*: II: Modulation of superoxide dismutase activity and expression in haemocytes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005,

- vol. 325, iss. 2, pp. 175–188. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.05.001>
38. Monari M., Matozzo V., Foschi J., Cattani O., Ser-
razanetti G. P., Marin M. G. Effects of high tem-
peratures on functional responses of haemocytes
in the clam *Chamelea gallina*. *Fish & Shellfish
Immunology*, 2007, vol. 22, iss. 1–2, pp. 98–114.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.03.016>
 39. Mosca F., Narcisi V., Calzetta A., Gioia L.,
Finoia M. G., Latini M., Tiscar P. G. Ef-
fects 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, iss. 3, pp. 198–203.
<https://doi.org/10.1016/j.tice.2012.12.002>
 40. Mydlarz L. D., Jones L. E., Harvell C. D.
Innate immunity, environmental drivers,
and disease ecology of marine and fresh-
water invertebrates. *Annual Review of Ecol-
ogy, Evolution, and Systematics*, 2006,
vol. 37, pp. 251–288. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110103>
 41. Nogueira L., Mello D. F., Trevisan R., Garcia D.,
da Silva Acosta D., Dafre A. L., de Almeida E. A.
Hypoxia effects on oxidative stress and im-
munocompetence biomarkers in the mussel
Perna perna (Mytilidae, Bivalvia). *Marine Envi-
ronmental Research*, 2017, vol. 126, pp. 109–115.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.02.009>
 42. Pampanin D. M., Ballarin L., Carotenuto L.,
Marin M. G. Air exposure and functional-
ity of *Chamelea gallina* haemocytes: Effects
on haematocrit, adhesion, phagocytosis and en-
zyme contents. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative
Physiology*, 2002, vol. 131, iss. 3, pp. 605–614.
[https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00512-8](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00512-8)
 43. Parisi M. G., Vizzini A., Toubiana M., Sarà G.,
Cammarata M. Identification, cloning and envi-
ronmental factors modulation of a $\alpha\beta$ defensin
from the Lessepsian invasive mussel *Brachidontes
pharaonis* (Bivalvia: Mytilidae). *Invertebrate Sur-
vival Journal*, 2015, vol. 12, no. 1, pp. 264–273.
 44. Pauletto M., Milan M., Moreira R., Novoa B.,
Figuera A., Babbucci M., Patarnello T., Bargel-
loni L. Deep transcriptome sequencing of *Pecten
maximus* hemocytes: A genomic resource
for bivalve immunology. *Fish & Shellfish Im-
munology*, 2014, vol. 37, iss. 1, pp. 154–165.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.01.017>
 45. Rodrigues J., Brayner F. A., Alves L. C.,
Dixit R., Barillas-Mury C. Hemocyte differ-
entiation mediates innate immune memory
in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science*,
2010, vol. 329, iss. 5997, pp. 1353–1355.
<https://doi.org/10.1126/science.1190689>
 46. Shen Y., Huang Z., Liu G., Ke C., You W.
Hemolymph and transcriptome analysis to un-
derstand innate immune responses to hy-
poxia in *Pacific abalone*. *Comparative Bio-
chemistry and Physiology Part D: Genomics
and Proteomics*, 2019, vol. 30, pp. 102–112.
<https://doi.org/10.1016/j.cbd.2019.02.001>
 47. Sokolov E. P., Markert S., Hinzke T.,
Hirschfeld C., Becher D., Ponsuksili S.,
Sokolova I. M. Effects of hypoxia-reoxygenation
stress on mitochondrial proteome and bioener-
getics of the hypoxia-tolerant marine bivalve
Crassostrea gigas. *Journal of Proteomics*, 2019,
vol. 194, pp. 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.jprote.2018.12.009>
 48. Soldatov A. A., Gostyukhina O. L., Golo-
vina I. V. Functional states of antioxidant
enzymatic complex of tissues of *Mytilus gallo-
provincialis* Lam. under conditions of oxidative
stress. *Journal of Evolutionary Biochemistry
and Physiology*, 2014, vol. 50, iss. 3, pp. 206–214.
<https://doi.org/10.1134/S0022093014030028>
 49. Suárez-Ulloa V., Fernández-Tajes J., Man-
frin C., Gerdol M., Venier P., Eirín-López J. M.
Bivalve omics: State of the art and po-
tential applications for the biomonitoring
of harmful marine compounds. *Marine
Drugs*, 2013, vol. 11, no. 11, pp. 4370–4389.
<https://doi.org/10.3390/md11114370>
 50. Sui Y., Hu M., Shang Y., Wu F., Huang X.,
Dupont S., Storch D., Pörtner H.-O., Li J., Lu W.,
Wang Y. Antioxidant response of the hard shelled
mussel *Mytilus coruscus* exposed to reduced pH
and oxygen concentration. *Ecotoxicology and En-
vironmental Safety*, 2017, vol. 137, pp. 94–102.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.023>
 51. Sui Y., Kong H., Shang Y., Huang X., Wu F.,
Hu M., Lin D., Lu W., Wang Y. Effects
of short-term hypoxia and seawater acidifi-
cation on hemocyte responses of the mus-
sel *Mytilus coruscus*. *Marine Pollution Bul-
letin*, 2016, vol. 108, iss. 1–2, pp. 46–52.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.001>

52. Sun Y., Zhang X., Wang G., Lin S., Zeng X., Wang Y., Zhang Z. PI3K-AKT signaling pathway is involved in hypoxia/thermal-induced immunosuppression of small abalone *Haliotis diversicolor*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, vol. 59, pp. 492–508. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.011>
53. Tomanek L. Proteomic responses to environmentally induced oxidative stress. *Journal of Experimental Biology*, 2015, vol. 218, pt. 12, pp. 1867–1879. <https://doi.org/10.1242/jeb.116475>
54. Valko M., Rhodes C., Moncol J., Izakovic M. M., Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 2006, vol. 160, iss. 1, pp. 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
55. Wang S., Peatman E., Liu H., Bushek D., Ford S. E., Kucuktas H., Quilang J., Li P., Wallace R., Wang Y., Guo X., Liu Z. Microarray analysis of gene expression in eastern oyster (*Crassostrea virginica*) reveals a novel combination of antimicrobial and oxidative stress host responses after dermo (*Perkinsus marinus*) challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, vol. 29, iss. 6, pp. 921–929. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.07.035>
56. 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, iss. 6, art. no. e67469 (12 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067469>
57. 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 & Comparative Immunology*, 2017, vol. 67, pp. 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.09.017>
58. Wang Y., Hu M., Cheung S. G., Shin P. K. S., Lu W., Li J. Immune parameter changes of hemocytes in green-lipped mussel *Perna viridis* exposure to hypoxia and hyposalinity. *Aquaculture*, 2012, vols 356–357, pp. 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.001>
59. Wang Y., Hu M., Shin P. K., Cheung S. G. Immune responses to combined effect of hypoxia and high temperature in the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, vol. 63, iss. 5–12, pp. 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.035>
60. Wijsman J. W. M., Troost K., Fang J., Roncarati A. Global production of marine bivalves. Trends and challenges. In: *Goods and Services of Marine Bivalves* / A. Smaal, J. Ferreira, J. Grant, J. Petersen, Ø. Strand (Eds). Cham : Springer, 2019, pp. 7–26. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96776-9_2
61. Woo S., Denis V., Won H., Shin K., Lee G., Lee T.-K., Yum S. Expressions of oxidative stress-related genes and antioxidant enzyme activities in *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, Mollusca) exposed to hypoxia. *Zoological Studies*, 2013, vol. 52, no. 1, art. no. 15 (8 p.). <https://doi.org/10.1186/1810-522X-52-15>
62. Wootton E. C., Dyrinda 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 & Shellfish Immunology*, 2003, vol. 15, iss. 3, pp. 195–210. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(02\)00161-4](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(02)00161-4)
63. Zhang X., Shi J., Sun Y., Habib Y. J., Yang H., Zhang Z., Wang Y. Integrative transcriptome analysis and discovery of genes involving in immune response of hypoxia/thermal challenges in the small abalone *Haliotis diversicolor*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, vol. 84, pp. 609–626. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.044>

EFFECT OF HYPOXIA ON IMMUNE SYSTEM OF BIVALVE MOLLUSCS

A. Y. Andreyeva, E. S. Kladchenko, and O. L. Gostyukhina

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation
E-mail: kladchenko_ekaterina@bk.ru

Over the past decades, research on bivalve immune system is focused on studying the effect of environmental factors on the basal status of defense systems. The immune system of bivalves is greatly affected by abiotic factors, and the most significant ones are water temperature, salinity, and level

of dissolved oxygen. Hypoxia is widespread in the coastal waters of the World Ocean since the 1950s. Hypoxic zones (with dissolved oxygen concentration $< 0.5 \text{ mL O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) occur in shelf areas for a long time corresponding to the life cycle of many hydrobionts. Being benthic organisms, bivalve molluscs often experience reduced dissolved oxygen concentrations. This group of aquatic invertebrates both plays an important role in aquatic ecosystem functioning and is actively used in aquaculture. The efficiency of bivalve cultivation directly depends on its immune status determining resistance to diseases. The immune system of bivalve molluscs is based on a complex of nonspecific reactions of cellular and humoral components. Hemocytes circulating in the hemolymph are the key effectors of the cellular immune response which, along with the barrier tissues of molluscs, synthesize humoral factors with a wide spectrum of antimicrobial activity. The hemolymph of various bivalve species contains different cell types differing by size, morphology, and granulation of cytoplasm. Most bivalve species have 2 types of hemocytes – granular and agranular ones; those can be subdivided into morphotypes depending on number and color of granules, size of the nucleus, and presence of organelles in the cytoplasm. Granulocytes are considered the main immune cells that perform phagocytosis and (or) encapsulation of infectious agents, as well as their subsequent neutralization by releasing reactive oxygen species, lysing enzymes, and humoral antimicrobial proteins. Moreover, the complex of defense systems includes an antioxidant system which is closely related to mollusc immunity since it neutralizes reactive oxygen species releasing during cellular immune mechanism activation. An excess of these compounds damages mollusc cells by oxidizing proteins, cytoplasmic membrane lipids, and DNA. This article provides data on an oxygen deficiency effect on the cellular and humoral components of the immune system, as well as the tissue antioxidant complex of bivalve molluscs.

Keywords: bivalve molluscs, immunity, hemocytes, hypoxia, antimicrobial proteins, antioxidant enzymes