

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ *MAGALLANA GIGAS* ПРИ ЗАРАЖЕНИИ *PIONE VASTIFICA*

Подольская М.С., Челебиева Э.С., Гостюхина О.Л., Лавриченко Д.С., Кладченко Е.С.

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: podolskaya m99@bk.ru

Поступила в редакцию 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbc.2023.0633

Аннотация. Тихоокеанская устрица, *Magallana gigas* (Thunberg, 1793), является важным промысловым видом Черноморского побережья России. Несмотря на благоприятные условия для развития марикультуры в регионе, существует ряд биотических факторов, способных нанести ущерб устричным фермам. В частности, сверлящая губка *Pione vastifica* (Hancock, 1849). Сверлящие губки представляют собой серьезную проблему для марикультурных хозяйств, поскольку пораженные моллюски изымаются из товарооборота, что влечет за собой экономические убытки. В работе исследовали влияние сверлящей губки на функциональное состояние гемоцитов (способность к продукции активных форм кислорода - АФК и мембранный потенциал митохондрий) и антиоксидантный статус мантии тихоокеанских устриц. У гемоцитов моллюсков, пораженных *P. vastifica*, был значительной ингибирован мембранный потенциал митохондрий. Кроме этого, гемоциты “зараженных” устриц характеризовались более высоким уровнем продукции АФК, по сравнению с группой “здоровых” устриц. Увеличение содержания АФК не сопровождалось ростом активности каталазы. Отсутствие роста активности каталазы на фоне избыточной продукции АФК может приводить к различным физиологическим и метаболическим нарушениям и снижению скорости роста моллюсков. Настоящее исследование способствует расширению понимания о влиянии сверлящей губки (*P. vastifica*) на функциональное состояние распространенного объекта региональной марикультуры - тихоокеанскую устрицу (*M. gigas*).

Ключевые слова: гемоциты, антиоксиданты, активные формы кислорода, мембранный потенциал митохондрий, каталаза, сверлящая губка.

Двустворчатые моллюски являются объектом активного марикультурного промысла во всем мире. Патогенные бактерии и простейшие паразиты наиболее часто упоминаются в литературе как факторы, ограничивающие культивирование двустворок в связи с высоким уровнем смертности зараженных организмов [1]. Однако не меньший ущерб марикультурным хозяйствам могут нанести представители типа губок (Porifera) [2,3]. Устриц *Magallana gigas* (Thunberg, 1793), культивируемых в Черноморском регионе, поражают сверлящие губки семейства Clionidae, в частности *Pione vastifica* (Hancock, 1849) [4,5]. Губка поселяется на раковине моллюска, проделывая в ней отверстия путем химического и механического травления, в результате чего наблюдается увеличение толщины раковины и снижение темпов роста устриц [6]. Не смотря на очевидную актуальность исследования взаимодействия между моллюсками и сверлящими губками, до настоящего момента слабо изучено функциональное состояние двустворок при инвазии. Имеющиеся в литературе исследования сосредоточены на размерно-весовых характеристиках моллюсков [7-9], в нескольких работах показано, что пораженные сверлящей губкой моллюски в большей степени подвержены микробному заражению [10-12]. Можно предположить, что инвазия сверлящей губкой приводит к ослаблению “здоровья” моллюсков за счет угнетения иммунной и антиоксидантной систем, однако, последнее утверждение не подкрепляется имеющимися в литературе данными. В настоящий момент отсутствуют фундаментальные знания о взаимодействии губки с организмом устриц, неизвестна степень ее негативного влияния на организм моллюска, не раскрыты механизмы, приводящие к ухудшению ростовых показателей и гибели зараженных устриц. Вместе с тем, понимание процессов, лежащих в основе патологических изменений в организме двустворок, зараженных сверлящей губкой, необходимо для разработки эффективных систем лечения, не приводящих к необратимым функциональным изменениям организма “хозяина”.

Защита от возможных вредителей обеспечивается гемоцитами, клетками гемолимфы, которые в ответ на действие патогена реагируют рядом цитотоксических реакций [13]. Гемоциты отвечают за переваривание, транспортировку и распределение питательных веществ, восстановление раковины и тканей моллюсков, а также неспецифический иммунный ответ [14]. Восстановление раковины является энергозатратным процессом [15]. Большую часть клеточного запаса энергии генерируют митохондрии во время клеточного дыхания [16]. Кроме того, митохондрии являются основным источником клеточных активных форм кислорода (АФК) [17]. С другой стороны, избыточное производство АФК может привести к повреждению внутриклеточных структур организма [18]. В ответ на гиперпродукцию АФК в организме активизируется антиоксидантная система защиты, которая инактивирует свободные радикалы [19,20]. Одним из основных ферментов, участвующих в каскаде антиоксидантных реакций, является каталаза (КАТ) [21]. КАТ участвует в разложении перекиси водорода, предотвращая образование гидроксильных радикалов [22]. Комплексные исследования физиологических и иммунологических изменений в организме моллюсков, индуцированных инвазией паразитов, патогенов и различных аменсалов, дают представление о значении этих стрессоров как в биологии популяции, так и в производстве коммерчески важных двустворчатых моллюсков.

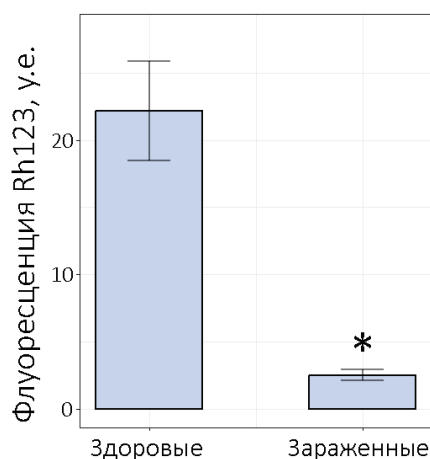


Рисунок 1. Мембранный потенциал митохондрий гемоцитов *Magallana gigas* (* $p \leq 0,05$)

В связи с вышесказанным, целью настоящей работы была оценка влияния сверлящей губки *P. vastifica* на функциональный статус тихоокеанской устрицы *M. gigas*, а именно на мембранный потенциал митохондрий клеток, продукцию АФК и активность КАТ в мантии моллюска.

Устриц собирали в прибрежной акватории Севастопольской бухты ($n=60$, масса $77,7 \pm 8,2$ г, длина раковины $11,4 \pm 2,6$ см) при температуре воды 20 °С, солености $17-18$ ‰, содержании кислорода $7,2-8,5$ мг/л. Для оценки воздействия сверлящей губки на организм устриц делили на 2 группы: контрольную (без видимого повреждения раковины, “здоровые”) и опытную (моллюски, имеющие красные вкрапления на раковине или видимые внешние повреждения, “зараженные”). Группы моллюсков акклиматизировали к лабораторным условиям в отдельных аквариумах в течение 7 дней. По окончании периода акклиматизации у каждой группы моллюсков отбирали гемолимфу и ткани мантии. Способность гемоцитов к спонтанной продукции АФК оценивалась с помощью метода проточной цитометрии по флуоресценции красителя 2-7-дихлорфлуоресцеин-диацетата (DCF-DA, Sigma) Мембранный потенциал митохондрий клеток гемолимфы оценивали по изменению интенсивности флуоресценции гемоцитов, окрашенных красителем родамин 123 (Rh123, Sigma Aldrich). Активность каталазы измеряли по реакции взаимодействия остаточного количества перекиси водорода с молибдатом аммония (Goth, 1991). Нормальность распределения проверялась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Оценка достоверности полученных данных проводилась с помощью U-критерия Манна-Уитни.

Энергетический баланс является фундаментальной основой для устойчивости организма к стрессовым факторам среды [22]. По степени нарушения энергетического баланса можно определить уровень стресса и адаптивную стратегию [23]. В настоящем исследовании интенсивность флуоресценции Rh123, характеризующих мембранный потенциал митохондрий, у пораженных губкой устриц была существенно ниже (в 8,8 раз), чем в контрольной группе ($p < 0,01$). Значительное снижение мембранного потенциала митохондрий свидетельствует о том, что у устриц после заражения сверлящей губкой происходит угнетение аэробного метаболизма (метаболическая депрессия) [24].

Снижение мембранного потенциала митохондрий гемоцитов обычно сопровождается подавлением способности к генерации окислительного взрыва [25]. Такая корреляция связана с тем, что митохондрии считаются основным источником АФК в гемоцитах [26]. Результаты настоящего исследования показали, что

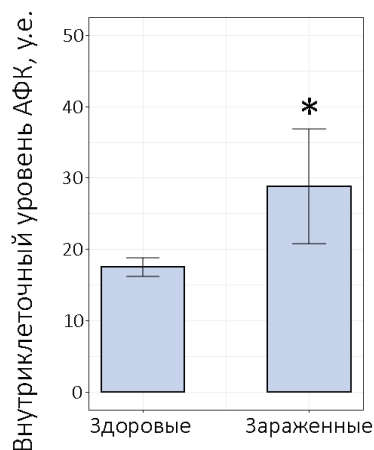


Рисунок 2. Спонтанная продукция АФК гемоцитами *Magallana gigas*

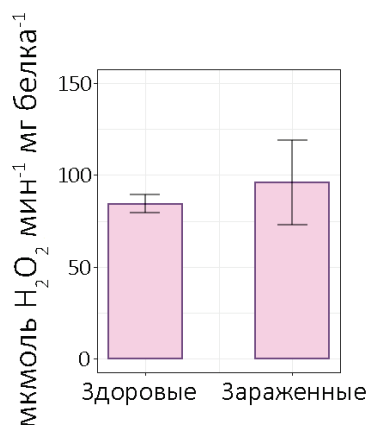


Рисунок 3. Активность каталазы в мантии *Magallana gigas*

инвазия сверлящей губки, напротив, значительно стимулировала продукцию АФК в гемоцитах тихоокеанской устрицы *M. gigas* ($P < 0,05$). Вероятно, рост уровня АФК после заражения сверлящей губкой происходит за счет других источников АФК, например, за счет эндоплазматического ретикулума [27]. Уровень внутриклеточных АФК был примерно в 1,6 раза выше в опытной группе в сравнении с контролем. Способность гемоцитов к продукции активных форм кислорода является индикаторным показателем функционального состояния двустворчатых моллюсков [28]. Генерация окислительного взрыва системой хозяина является одной из наиболее важных стратегий защиты от паразитов. [29,30]. Чрезмерное накопление АФК и окислительно-восстановительный дисбаланс [31], что приводит к перекисному окислению липидов мембран, деформации клеточной структуры, повреждению ДНК, нарушению белкового обмена, деградации, физиологическим и метаболическим нарушениям [32] и, в конечном итоге, торможению роста моллюсков.

Уровень активности КАТ оценивали в мантии, как барьерной ткани в организме моллюсков. Содержание фермента в контрольной и опытной группах статистически значимо не отличалось. Несмотря на то, что в гемоцитах зафиксирован высокий уровень АФК, в ткани, наиболее близко расположенной к сверлящей губке, не изменялась активность антиоксидантных. Вероятно, антиоксидантная система мантии устрицы справляется с развитием окислительного стресса.

Таким образом, результаты работы демонстрируют, что инвазия *P. vastifica* не оказывает значимого влияния на активность КАТ, являющейся одним из основных ферментов антиоксидантного комплекса. Однако клетки гемолимфы гораздо более чувствительны к поражению сверлящей губки, на что указывает увеличение продукции АФК и снижение мембранного потенциала митохондрий.

Работа выполнена в рамках госзадания № 121102500161-4 «Закономерности организации иммунной системы промысловых гидробионтов и исследование влияния факторов внешней среды на функционирование их защитных систем» и гранта РНФ № 23-26-00019 «Сверлящая губка Черного моря: влияние на иммунную систему устриц и оценка эффективности метода гипосмотического шока для борьбы с ее распространением на марикультурной ферме».

Список литературы / References:

1. Sindermann C.J., Rosenfield A. Principal diseases of commercially important marine bivalve Mollusca and Crustacea. *Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service of the USA*, 1967, vol. 66, pp. 335-385.
2. Carver C.E., Theriault I., Mallet A.L. Infection of cultured eastern oysters *Crassostrea virginica* by the boring sponge *Cliona celata*, with emphasis on sponge life history and mitigation strategies. *Journal of Shellfish Research*, 2010, vol. 29, no. 4, pp. 905-915.
3. Watts J.C. et al. Examination of the potential relationship between boring sponges and pea crabs and their effects on eastern oyster condition. *Diseases of aquatic organisms*, 2018, vol. 130, no. 1, pp. 25-36.
4. Lebedovskaya M.V. Shell affection of pacific oyster *Crassostrea gigas*, cultivates in the Black Sea by the boring sponge *Pione vastifica*. *Ekologiya Morya*, 2009, no. 77, p. 67.
5. Копытина N.I. Fungi of the Black Sea basin: directions and perspectives of research. *Marine Biological Journal*, 2019, vol. 4, no. 4, pp. 15-33.
6. Coleman S.E. *The effects of boring sponge on oyster soft tissue, shell integrity, and predator-related mortality*: The University of North Carolina at Chapel Hill, 2014.
7. Кракатица Т.Ф. Сокращение ареала и уменьшение численности устриц в Егорлыцком заливе. *Моллюски. Основные результаты их изучения*, Л.: Наука, 1979, с. 112-114 [Kratitsa T.F. Reduction of the range and decrease in the number of oysters in the Yegorlytsky Bay. *Shellfish. The main results of their study*, L.: Nauka, 1979, pp. 112-114 (In Russ.)].
8. Dieudonne J., Carroll J.M. The impacts of boring sponges on oyster health across multiple sites and tidal heights. *Estuaries and Coasts*, 2022, vol. 45, no. 1, pp. 213-224.

9. Лебедевская М.В. Зараженность устриц *Crassostrea gigas* сверлящей полихетой *Polydora websteri* в марихозяйствах в озере Донузлав (Крым). Школа по теоретической и морской паразитологии, 2019, с. 94. [Lebedovskaya M.V. Infestation of *Crassostrea gigas* oysters by drilling polychaete *Polydora websteri* in marine farms in Lake Donuzlav (Crimea). *School of Theoretical and Marine Parasitology*, 2019, pp. 94-94 (In Russ.)].
10. Лебедевская М.В. Морфометрические и микробиологические показатели гигантской устрицы *Crassostrea gigas* при поражении сверлящей губкой *Pione vastifica*, 2013 [Lebedovskaya M.V. Morphometric and microbiological parameters of the giant oyster *Crassostrea gigas* when affected by the drilling sponge *Pione vastifica*, 2013 (In Russ.)].
11. Watts J.C., Carroll J.M., Munroe D.M., Finelli C.M. Examination of the potential relationship between boring sponges and pea crabs and their effects on eastern oyster condition. *Diseases of aquatic organisms*, 2018, vol. 130, no. 1, pp. 25-36.
12. Hanley T.C., White J.W., Stallings C.D., Kimbro D.L. Environmental gradients shape the combined effects of multiple parasites on oyster hosts in the northern Gulf of Mexico. *Marine Ecology Progress Series*, 2019, vol. 612, pp. 111-125.
13. Eleftherianos I., Heryanto C., Bassal T., Zhang W., Tettamanti G., Mohamed A. Haemocyte-mediated immunity in insects: Cells, processes and associated components in the fight against pathogens and parasites. *Immunology*, 2021, vol. 164, no. 3, pp. 401-432.
14. Donaghy L., Kraffe E., Goic N., Lambert C., Volety A.K., Soudant P. Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement, 2012.
15. Palmer A.R. Calcification in marine molluscs: how costly is it? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, vol. 89, no. 4, pp. 1379-1382.
16. Solaini G. et al. Evaluating mitochondrial membrane potential in cells. *Bioscience reports*, 2007, vol. 27, no. 1-3, pp. 11-21.
17. Samain J.F. Review and perspectives of physiological mechanisms underlying genetically-based resistance of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to summer mortality. *Aquatic Living Resources*, 2011, vol. 24, no. 3, pp. 227-236.
18. Кладченко Е.С., Андреева А.Ю., Кухарева Т.А. Влияние краткосрочной ранжированной гипоксии на функциональные и морфологические показатели гемоцитов тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*, 2022, т. 58, № 1, с. 43-50 [Kladchenko E.S., Andreeva A.Yu., Kukhareva T.A. Influence of short-term ranked hypoxia on functional and morphological parameters of hemocytes of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 2022, vol. 58, no. 1, pp. 43-50 (In Russ.)].
19. Victor V.M., Rocha M., Esplugues J.V. Role of free radicals in sepsis: antioxidant therapy. *Current pharmaceutical design*, 2005, vol. 11, no. 24, pp. 3141-3158.
20. Sukoyan G.V., Gongadze N.V., Demina N.B., Golovach V.V., Tsvitsivadze E.T., Bakuridze A.D. Ageing Induced Hyperproduction of Reactive Oxygen Species and Dysbalance in Enzymatic Link of Antioxidant Defense System of Skin and Therapeutic Efficacy of Artichoke Extract. *European Journal of Medicinal Plants*, 2019, vol. 27, no. 4, pp. 1-10.
21. Ighodaro O.M., Akinloye O.A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 2018, vol. 54, no. 4, pp. 287-293.
22. Ho Y.S. et al. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, vol. 279, no. 31, pp. 32804-32812.
23. Sokolova I.M. et al. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine environmental research*, 2012, vol. 79, pp. 1-15.
24. Sokolova I.M., Lannig G. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate research*, 2008, vol. 37, no. 2-3, pp. 181-201.
25. Russo J., Madec L. Haemocyte apoptosis as a general cellular immune response of the snail, *Lymnaea stagnalis*, to a toxicant. *Cell and Tissue Research*, 2007, vol. 328, pp. 431-441.
26. Donaghy L. et al. Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement, 2012.
27. Pomponi S.A. Excavation of calcium carbonate substrates by boring sponges: ultrastructure and cytochemistry. University of Miami, 1977.
28. Anderson R.S. Hemocyte-derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve molluscs. *Developmental & Comparative Immunology*, 1994, vol. 18, no. 2, pp. 89-96.
29. Motavallihaghi S. et al. The role of *Acanthamoeba castellanii* (T4 genotype) antioxidant enzymes in parasite survival under H₂O₂-induced oxidative stress. *Parasitology International*, 2022, vol. 87, p. 102523.
30. Donaghy L. et al. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): current knowledge and future prospects. *Aquaculture*, 2009, vol. 297, no. 1-4, pp. 10-24.
31. Sharma S.S., Dietz K.J. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in plant science*, 2009, vol. 14, no. 1, pp. 43-50.
32. De R., Mazumder S., Bandyopadhyay U. Mediators of mitophagy that regulate mitochondrial quality control play crucial role in diverse pathophysiology. *Cell biology and toxicology*, 2021, vol. 37, no. 3, pp. 333-366.

FUNCTIONAL STATUS OF MAGALLANA GIGAS INFECTED BY PIONE VASTIFICA

Podolskaya M.S., Chelebieva E.S., Gostyukhina O.L., Lavrichenko D.S., Kladchenko E.S.

FRC "A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, RAS"

Nakhimov Ave. 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: podolskaya_m99@bk.ru

Received 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0633

Abstract. Pacific oyster *Magallana gigas* (Thunberg, 1793) is an important commercial species of the Black Sea coast of Russia. Black Sea is favorable for the development of regional mariculture, but the existing biotic factors may lead to damage to an oyster farm. In particular, boring sponge *Pione vastifica* (Hancock, 1849). Boring sponges are a serious problem for mariculture farms, because the affected mussels are withdrawn from trade, which entails economic losses. In this work, the effect of boring sponges on the functional state of hemocytes (the ability to produce reactive oxygen species - ROS and the membrane potential of mitochondria) and the antioxidant status of the mantle of the Pacific oyster were studied. The membrane potential of mitochondria was significantly inhibited in the hemocytes of mollusks affected by *P. vastifica*. In addition, the hemocytes of "infected" oysters were characterized by a higher level of ROS production compared to the group of "healthy" oysters. The increase in ROS was not accompanied by an increase in catalase activity. The absence of an increase in catalase activity against the background of excessive ROS production can lead to various physiological and metabolic disorders and a decrease in the growth rate of mollusks. The present study contributes to the expansion of understanding about the influence of the drilling sponge (*P. vastifica*) on the functional state of a common object of regional mariculture – the Pacific oyster (*M. gigas*).

Key words: hemocytes, antioxidantes, reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential, catalase, boring sponge.