

УДК 594.121–111:577.27]:593.4

**РЕАКЦИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ
ТИХООКЕАНСКОЙ УСТРИЦЫ *MAGALLANA GIGAS*
(THUNBERG, 1793) ПРИ ПОРАЖЕНИИ СВЕРЛЯЩЕЙ ГУБККОЙ
PIONE VASTIFICA (HANSOCK, 1849)**

© 2025 г. Д. С. Лавриченко (ORCID: 0009-0009-1148-3427),
Э. С. Челебиева (ORCID: 0000-0002-7662-2573),
М. С. Подольская (ORCID: 0000-0001-8185-3985),
А. Ю. Андреева (ORCID: 0000-0001-7845-0165),
Е. С. Кладченко* (ORCID: 0000-0001-9476-6573)

Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского (ИнБИОМ) РАН,
Севастополь, 299011 Россия

*e-mail: kladchenko_ekaterina@bk.ru

Поступила в редакцию 07.06.2024 г.

После доработки 26.10.2024 г.

Принята к публикации 27.11.2024 г.

Тихоокеанская устрица *Magallana gigas* (Thunberg, 1793) является одним из наиболее распространенных объектов культивирования в мире. Несмотря на устойчивость этого вида к большинству патогенов, устричные фермы все чаще сталкиваются с проблемами, связанными с заражением различными организмами. Одним из наиболее опасных эпибионтов-вредителей является сверлящая губка *Pione vastifica* (Hancock, 1849). Целью данного исследования было определить влияние заражения губкой *P. vastifica* на иммунные параметры устрицы *M. gigas*. Ключевые параметры неспецифического иммунного ответа — клеточный состав гемолимфы, продукция активных форм кислорода и фагоцитарная активность, были исследованы в образцах гемолимфы методами проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии. У устриц с признаками перфорации раковины была обнаружена активация иммунной системы, выражавшаяся в повышении уровня продукции активных форм кислорода основными иммунными клетками гранулоцитами, а также в повышении фагоцитарной активности гранулоцитов и гиалиноцитов. При этом относительное количество гранулоцитов у устриц, пораженных сверлящей губкой, было значительно ниже, чем у здоровых особей. Поскольку гемоциты двустворчатых моллюсков участвуют в процессах биоминерализации, последний результат может свидетельствовать об инфильтрации гемоцитов в мантию, которая является основной тканью, ответственной за репарацию раковины. Это первое исследование, посвященное изучению иммунной системы тихоокеанских устриц, пораженных сверлящими губками. Полученные результаты помогают понять, как организм устриц реагирует на присутствие таких опасных эпибионтов-вредителей, как сверлящие губки.

Ключевые слова: тихоокеанская устрица, гемоциты, сверлящая губка, фагоцитоз, активные формы кислорода, иммунитет

DOI: 10.31857/S0134347525020039, EDN: GBTCJO

Тихоокеанская устрица *Magallana gigas* (Thunberg, 1793) является одним из важнейших промысловых видов моллюсков (Petton et al., 2021). *M. gigas* была завезена из Японии на побережье Тихоокеанского и Атлантического бассейнов (в США, Канаду, Великобританию, Францию, Корею, Китай, Новую Зеландию, Австралию, Южную Африку и Южную Америку) (Mann et al., 1991; Orensanz et al., 2002; Miossec et al., 2009; Martínez-García et al., 2022), поскольку

местные виды, *Magallana angulata* (Lamarck, 1819) и *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758, находились на грани вымирания из-за заражения различными патогенами (Comps et al., 1976). Аналогичное явление наблюдалось вдоль береговой линии Атлантического океана и Мексиканского залива, где популяция *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) была уничтожена инфекцией *Perkinsus marinus* Levine, 1978 (Faisal et al., 1998; Proestou, Sullivan, 2020).

В ходе недавних исследований было установлено, что *M. gigas* подвержен поражению различными эпибионтами-вредителями. Эти организмы нарушают целостность раковины, ослабляют моллюска, снижают скорость роста, что делает организм более уязвимым к различным инфекциям (Longshaw et al., 2012; Demann, Wegner, 2019; Hanley et al., 2019). Наиболее распространенными эпибионтами являются многощетинковые черви рода *Polydora*, которые проникают в известковый субстрат или раковину моллюска, создавая там норы (Martinelli et al., 2020; Davinack et al., 2024), а также сверлящие губки (Carroll et al., 2015; Dieudonne, Carroll, 2022) и гороховые крабы (Watts et al., 2018). Одним из самых опасных и малоизученных эпибионтов, представляющих угрозу для двустворчатых моллюсков, являются сверлящие губки (Мальцев, 2021). Первые случаи заражения тихоокеанских устриц сверлящими губками были зафиксированы еще в XIX веке (Rützler, Stone, 1986; Ferrario et al., 2010; Kumar, 2016; Pyecroft, 2022). Губки рода *Pione*, как и другие представители семейства Clionidae, широко распространены в различных частях Мирового океана. Среди них *Pione vastifica* (Hancock, 1849) выделяется наиболее обширным ареалом (Zundelevich et al., 2007; Burgsdorf et al., 2022).

Сверлящие губки считаются серьезной экологической проблемой для аквакультуры двустворчатых моллюсков (Mao Che et al., 1996; Daume et al., 2010; Moore, 2023). При проникновении в раковину губка образует сеть туннелей (Kingma, 2022), которые могут быть заселены другими организмами, например, многощетинковыми червями (Warne, Marshall, 1969). Кроме того, заражение сверлящими губками приводит к задержке роста на 20–28%, снижению массы мягких тканей на 10% и повышенной смертности пораженных устриц, а перфорация

раковины снижает ее прочность (Мальцев, 2021). Уменьшение веса и увеличение хрупкости раковины неизбежно влияют на рыночную стоимость устриц, что, в свою очередь, приводит к финансовым потерям на фермах марикультуры (Pyecroft, 2022). Кроме того, сверлящие губки могут полностью разрушить раковину, тем самым нарушая первый уровень барьерной защиты (Rosell et al., 1999). Это, в свою очередь, приводит к более интенсивному взаимодействию с микробной средой (Fallet et al., 2022). Потенциальное воздействие сверлящих губок на иммунную систему *M. gigas* еще не изучено.

Таким образом, цель настоящего исследования — оценить маркерные параметры клеточного иммунитета, включая клеточный состав гемолимфы, пролиферативную активность гемоцитов, их фагоцитарную активность и уровень продукции активных форм кислорода (АФК) у тихоокеанской устрицы *M. gigas*, зараженной сверлящей губкой *P. vastifica*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В настоящей работе было исследовано 110 особей *Magallana gigas* возрастом 5 лет (согласно данным ООО “Марикультура”), массой 77.7 ± 8.2 г, длиной раковины 11.4 ± 2.6 см. Моллюски были собраны в 2023 г. в прибрежной акватории г. Севастополь (температура воды 15–18°C, соленость — 16–18‰, pH 8, содержание кислорода — 7–8 мг/л). Устриц доставляли в лабораторию в контейнерах без воды, после чего помещали в аквариумы. Условия в аквариумах были приближены к таковым в месте отбора особей. В дальнейшем устрицы были разделены на 2 группы: 30 здоровых и 80 зараженных *P. vastifica* (рис. 1). У зараженных устриц наблюдалось характерное повреждение сверлящей губкой, которое составляло 30–40% от общей площади раковины.

После периода акклимации 1–1.5 мл гемолимфы устрицы отбирали из сердечного синуса стерильным шприцем объемом 2 мл. Гемолимфу от 3–4 особей объединяли в один образец для увеличения концентрации клеток и снижения индивидуальных различий. Гемоциты трижды отмывали центрифугированием (5 мин, 10°C, 350 g) в эквивалентном объеме стерильной морской воды. Все манипуляции с гемоцитами

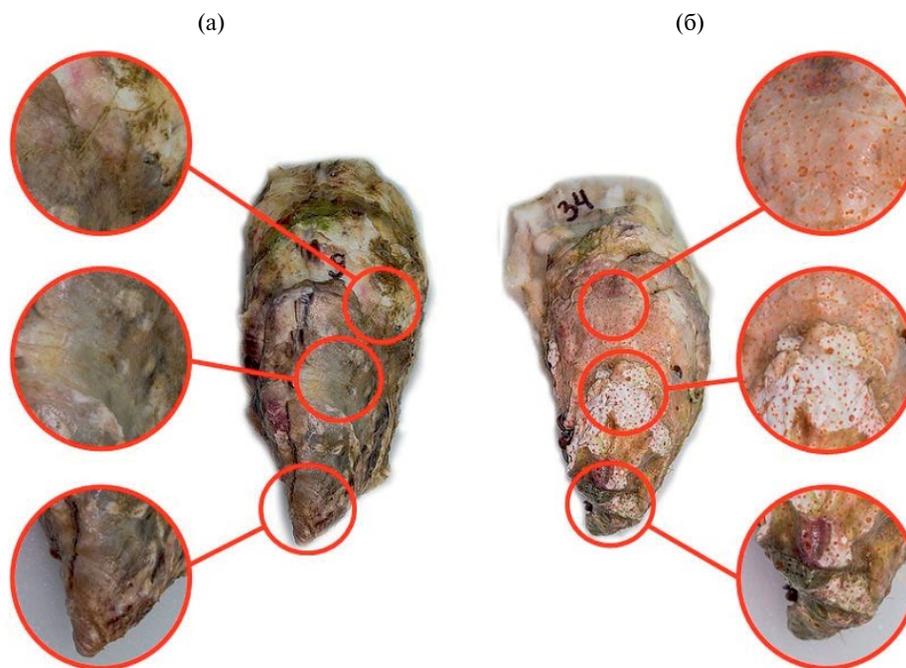


Рис. 1. Раковина тихоокеанской устрицы *Magallana gigas* в здоровом состоянии (а) и зараженная сверлящей губкой (б).

проводили при 5°C, чтобы избежать агрегации клеток. Функциональные параметры гемоцитов оценивали на проточном цитометре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия), оборудованном однофазным аргоновым лазером (длина волны 488 нм). Для анализа готовили суспензию с финальной концентрацией гемоцитов $1-2 \times 10^6$ кл/мл. Для каждого образца подсчитывали 10000 событий, все измерения проводили в трех повторах.

Для анализа клеточного цикла и клеточного состава гемолимфы использовали ДНК-специфический краситель SYBR Green I (SGI, Sigma, США). Суспензии гемоцитов окрашивали в темноте в течение 30 мин (финальная конечная концентрация 10 мкМ). Содержание ДНК в гемоцитах измеряли по однопараметрическим гистограммам флуоресценции SGI (FL1-канал). Количество пролиферирующих клеток оценивали с помощью стандартного анализа клеточного цикла, подсчитывая число клеток на стадиях покоя (G0/G1), синтеза ДНК (S), роста клеток и подготовки к митозу (G2), а также митоза (M).

Идентификацию клеточных типов проводили среди событий положительных по SYBR Green I, по двухпараметрическим

гистограммам прямого (FSC — forward scatter) и бокового (SSC — side scatter) рассеяния, согласно ранее описанной методике (Andreyeva et al., 2021). Внутриклеточный уровень продукции АФК гемоцитов оценивали с помощью 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетата (DCF-DA, Sigma-Aldrich, США). Образцы окрашивали в темноте в течение 30 мин, финальная концентрация красителя составляла 10 мкМ.

Для оценки фагоцитарной активности гемоцитов использовали флуоресцентный зимозан (Green Zymosan, Phagocytosis Assay Kit, Sigma-Aldrich, США). Образец готовили в соответствии с количественными характеристиками, указанными производителем. Анализ проводили согласно описанной ранее методике (Andreyeva et al., 2024). Клетки инкубировали с зимозаном в течение 1 ч при 25°C, затем трижды промывали стерильной морской водой (5 мин, 10°C, 350 g). Оценку фагоцитарной активности проводили при помощи флуоресцентного микроскопа Olympus CX43 (Olympus, Япония). Фагоцитарную активность гемоцитов определяли по количеству клеток, содержащих частички зимозана, относительно общего числа гемоцитов в пробе, анализировали не менее 1000 клеток.

Данные анализировали с помощью программы MACS Quantify Software 2.13. Статистическую обработку выполняли с помощью интегрированной среды разработки RStudio. Нормальность распределения проверяли при помощи критерия Колмогорова–Смирнова. Поскольку распределение данных было отличным от нормального, достоверность рассчитывали по U-критерию Манна–Уитни. Данные считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клеточный состав гемолимфы и пролиферативная активность гемоцитов

В гемолимфе *Magallana gigas* было выделено три типа клеток, которые различались по относительному размеру и степени гранулярности (рис. 2б). Агранулоциты — это небольшие клетки с низкой степенью гранулярности и небольшим

относительным размером, по сравнению с другими типами клеток. Гранулоциты, напротив, обладали высокой относительной гранулярностью и большим размером. Гиалиноциты представляли собой промежуточный тип клеток, их относительная гранулярность и размер были выше, чем у агранулоцитов, но ниже, чем у гранулоцитов.

Наши данные показали, что клеточный состав гемолимфы здоровых и зараженных моллюсков существенно различался (рис. 2в), однако эти различия не сопровождалось пролиферацией циркулирующих гемоцитов. В гемолимфе здоровых устриц преобладающим типом были гиалиноциты ($40.81 \pm 2.65\%$ от всего числа гемоцитов). Относительное количество агранулоцитов составляло $38.24 \pm 1.25\%$, гранулоцитов — $20.95 \pm 1.71\%$. Клеточный состав гемоцитов зараженных устриц отличался от такового здоровых моллюсков. Доля гиалиноцитов

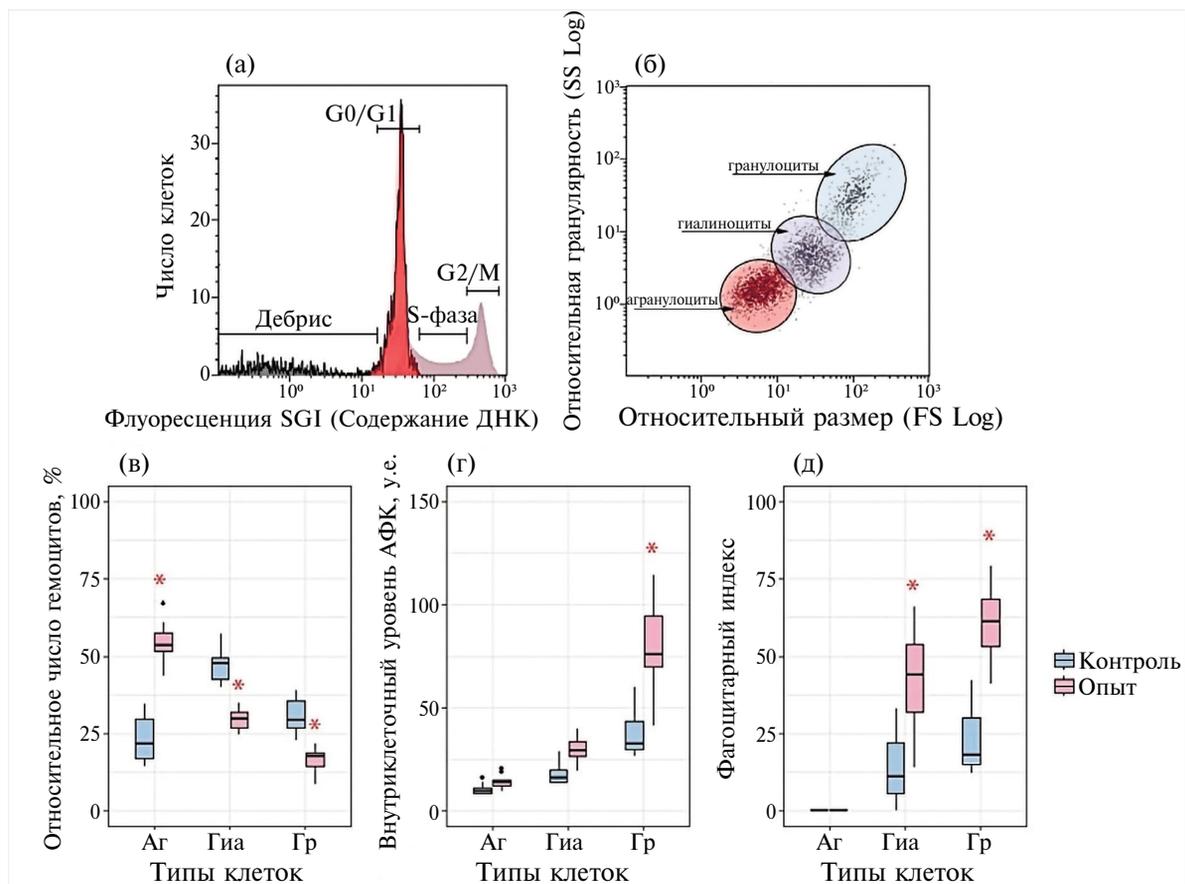


Рис. 2. Изменение функциональных показателей гемоцитов устрицы *Magallana gigas* при поражении сверлящей губкой: (а) — график распределения содержания ДНК: красный пик — диплоидный пик ДНК, розовый пик — теоретическое изображение пика делящихся клеток; (б) — пример идентификации клеточных типов гемоцитов на двухпараметрическом графике FS/SS; (в) — клеточный состав гемолимфы; (г) — уровень продукции АФК в нестимулированных гемоцитах; (д) — фагоцитарная активность гемоцитов.

Примечание. АГ — агранулоциты, Гиa — гиалиноциты, Гр — гранулоциты.

была значительно ниже контрольного значения ($p < 0.05$). Наиболее многочисленными в гемолимфе зараженных особей были агранулоциты — $54.7 \pm 4.3\%$ от общего числа клеток ($p < 0.05$). Доля гранулоцитов у зараженных устриц была на 5.15% меньше, чем у здоровых, и составляла $15.8 \pm 2.8\%$ от общего числа клеток.

Продукция активных форм кислорода

Внутриклеточный уровень АФК во всех типах гемоцитов был значительно выше у зараженных устриц по сравнению с контролем (рис. 2г). Наибольшие различия зафиксированы для гранулоцитов, где уровень продукции АФК у зараженных устриц был более чем в 2 раза выше, чем в контрольной группе ($p < 0.05$).

Фагоцитарная активность гемоцитов

Как у здоровых, так и у зараженных устриц агранулоциты не проявляли фагоцитарную активность, а гранулоциты, в свою очередь, были наиболее активно фагоцитирующим типом клеток (рис. 2д). Заражение сверлящей губкой сопровождалось повышением фагоцитарной активности гиалиноцитов в 2.8 раза, а гранулоцитов в 2.5 раза ($p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе нами было исследовано влияние сверлящей губки *Pione vastifica* на клеточный иммунитет тихоокеанской устрицы *Magallana gigas*. Выявлены различия в клеточном составе гемолимфы, уровне продукции АФК гемоцитами и их способности к фагоцитозу гемоцитов у здоровых и зараженных моллюсков.

Количество гемоцитов в гемолимфе и ее клеточный состав являются важными маркерами клеточного иммунитета двустворчатых моллюсков, поскольку гемоциты — это основные клетки, ответственные за неспецифический иммунный ответ (Evariste et al., 2016; De la Ballina et al., 2022; Weng et al., 2022; Freire et al., 2023). Поселение сверлящих губок на раковинах приводит к хрупкости и эрозии раковины, что в свою очередь снижает ее барьерную защиту и делает уязвимой для различных патогенов (Riout et al., 2013; Baden et al., 2021; Okon et al., 2023). Значительное изменение соотношения клеточных типов гемоцитов — типичная

реакция двустворчатых моллюсков в ответ на инвазию различных патогенов (Carballal et al., 1998; Li et al., 2008; Parisi et al., 2008; Yang et al., 2021; De la Ballina et al., 2022). Например, клеточный состав гемолимфы значительно изменялся у мидии *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 при заражении различными видами вибрионов и микрококков (Li et al., 2008; Parisi et al., 2008). У устрицы *O. edulis*, зараженной паразитом *Bonamia ostreae* (Pichot, Comps, Tigé, Grizel & Rabouin, 1980), значительно повышался уровень гиалиноцитов в гемолимфе по сравнению со здоровой группой моллюсков (Carballal et al., 1998). С другой стороны, инвазия бактериями рода *Vibrio* приводила к снижению количества гранулярных клеток у *M. galloprovincialis* (Ciacci et al., 2010). В нашем исследовании поражение сверлящей губкой *P. vastifica* привело к увеличению процента агранулоцитов и снижению количества гиалиноцитов ($p < 0.05$). Изменения в клеточном составе гемолимфы могут быть связаны с усиленной пролиферацией гемоцитов, поскольку агранулоциты считаются предшественниками гиалиноцитов и гранулоцитов (Montes et al., 1995, 1997). Однако мы не наблюдали пролиферирующих гемоцитов в образцах гемолимфы. С другой стороны, гемоциты способны мигрировать к местам вторжения патогенов, а также участвовать в процессах репарации и биоминерализации раковины (Allam, Espinosa, 2016). Положительный хемотаксис гемоцитов к месту воспаления был продемонстрирован при воздействии на *M. gigas* и *M. galloprovincialis* патогенов рода *Vibrio* (Lau et al., 2018; Rey-Campos, 2019; Lv et al., 2022; Panebianco et al., 2023).. В пользу теории о том, что у *M. gigas* изменение соотношения клеточных типов было связано с миграцией гемоцитов к тканям с очагами воспаления или к мантии для репарации поврежденных участков раковины, свидетельствуют недавние исследования *M. galloprovincialis* (Panebianco et al., 2023). Повреждение раковины этого моллюска в результате воздействия патогенных факторов или других стрессовых условий (например, снижения pH) приводило к миграции гемоцитов к участкам повреждения.

Фагоцитоз — одна из основных защитных реакций организма, которая играет важную роль в уничтожении и удалении патогенов (Lambert et al., 2003; Jiang et al., 2016; Takahashi et al., 2017).

В нашей работе фагоцитарная активность гемоцитов существенно различалась у здоровых и зараженных устриц. В группе инфицированных моллюсков гиалиноциты и гранулоциты проявляли более высокую способность к фагоцитозу, что отражалось в большем фагоцитарном индексе, по сравнению со здоровыми моллюсками. В исследовании, объектом которого была устрица *Crassostrea tulipa* (Lamarck, 1819), гранулоциты также были клетками, проявляющими наибольшую фагоцитарную активность (Freire et al., 2023). Кроме того, наши данные об отсутствии поглощения фагоцитарных частиц агранулоцитами подтверждаются на примере других двустворчатых моллюсков (Donaghy et al., 2009; Kim et al., 2020). Более высокий фагоцитарный индекс у наиболее активных иммунных клеток гемолимфы явно указывает на активацию иммунной системы у инфицированных устриц. Очевидно, что это связано с разрушением первого уровня барьерной защиты (раковины) в результате перфорации сверлящей губкой, что подтверждается и результатами транскриптомных исследований различных видов моллюсков после механической перфорации раковины (Yagga et al., 2021; Peng et al., 2024).

На активацию иммунного ответа указывают и результаты исследования уровня продукции АФК в различных типах гемоцитов тихоокеанской устрицы после поражения сверлящей губкой. Способность гемоцитов продуцировать АФК обычно используется в качестве второго маркера состояния иммунной системы у большинства организмов, в том числе двустворчатых моллюсков (Terahara, Takahashi, 2008; De la Ballina et al., 2022), поскольку АФК генерируются гемоцитами при фагоцитозе для уничтожения патогенов (Lushchak, 2011; Gajbhiye, Khandeparker, 2017; Brokordt et al., 2019). Однако если уровень продукции АФК превышает способность антиоксидантного комплекса к их нейтрализации, это может привести к окислительному повреждению и гибели клеток (Cheng et al., 2004; Gu et al., 2020). Наши результаты показали, что клетки, продемонстрировавшие наибольшую фагоцитарную активность — гиалиноциты и гранулоциты, вырабатывали значительно больше АФК у моллюсков, зараженных губкой, по сравнению с контрольной группой. Аналогичный

эффект наблюдался у тихоокеанской устрицы, зараженной *Vibrio aestuarianus* Tison & Seidler, 1983 (см.: Labreuche et al., 2006a, 2006b; Park et al., 2012). В другой работе нами было продемонстрировано общее увеличение продукции АФК у устрицы, зараженной губкой *P. vastifica* (см.: Chelebieva et al., 2024), при отсутствии изменений антиоксидантного комплекса моллюсков, что может сопровождаться развитием окислительного стресса (Kladchenko et al., 2024).

В заключение следует отметить, что нами впервые была проведена оценка иммунных реакций *M. gigas* при поражении *P. vastifica*. Результаты исследований показали, что поражение раковины сверлящей губкой *P. vastifica* сопровождается активацией иммунной системы устрицы *M. gigas*. Мы предполагаем, что губка снижает защитный барьер раковины в результате ее полной перфорации. Это делает моллюсков более уязвимыми к другим заболеваниям и патогенам. Для более глубокого понимания механизмов взаимодействия между сверлящей губкой и устрицей необходимо провести дополнительные микробиологические и гистопатологические исследования. Также важно проанализировать зависимость наблюдаемых эффектов от степени покрытия раковины губкой.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 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”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных. Протоколы с использованием животных были одобрены Комитетом по этике Института биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН (Севастополь), протокол № 1(6)/24 от 12 марта 2024 года.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Мальцев В.И., Петрова В.Н. Прибрежный ихтио-комплекс акватории ландшафтного рекреационного парка “Тихая бухта” (Юго-восточный Крым, Чёрное море) по результатам визуальных учётов // Вестн. Керченского гос. мор. технол. ун-та. 2021. № 3. С. 66–83.
https://doi.org/10.47404/2619-0605_2021_2_66
- Allam B., Espinosa E.P. Bivalve immunity and response to infections: are we looking at the right place? // Fish Shellfish Immunol. 2016. V. 53. P. 4–12.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.037>
- Andreyeva A.Y., Kladchenko E.S., Vyalova O.Y., Kukhareva T.A. Functional characterization of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Bivalvia: Ostreidae), hemocytes under normoxia and short-term hypoxia // Turk. J. Fish. Aquat. Sci. 2021. V. 21. № 3. P. 125–133.
https://doi.org/10.4194/1303-2712-v21_3_03
- Andreyeva A.Y., Kukhareva T.A., Gostyukhina O.L. et al. Impacts of ocean acidification and hypoxia on cellular immunity, oxygen consumption and antioxidant status in Mediterranean mussel // Fish Shellfish Immunol. 2024. V. 154. Art. ID109932.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109932>
- Baden S., Hernroth B., Lindahl O. Declining populations of *Mytilus* spp. in North Atlantic coastal waters — a Swedish perspective // J. Shellfish Res. 2021. V. 40. № 2. P. 269–296.
<https://doi.org/10.2983/035.040.0207>
- Brokordt K., Defranchi Y., Espósito I. et al. Reproduction immunity trade-off in a mollusk: hemocyte energy metabolism underlies cellular and molecular immune responses // Front. Physiol. 2019. V. 10. Art. ID77.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00077>
- Burgsdorf I., Sizikov S., Squatrito V. et al. Lineage-specific energy and carbon metabolism of sponge symbionts and contributions to the host carbon pool // ISME J. 2022. V. 16. № 4. P. 1163–1175.
<https://doi.org/10.1038/s41396-021-01165-9>
- Carballal M.J., Villalba A., López C. Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development, and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis* // J. Invertebr. Pathol. 1998. V. 72. № 3. P. 304–312.
<https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4779>
- Carroll J.M., O’Shaughnessy K.A., Diedrich G.A., Finelli C.M. Are oysters being bored to death? Influence of *Cliona celata* on *Crassostrea virginica* condition, growth and survival // Dis. Aquat. Org. 2015. V. 117. № 1. P. 31–44.
<https://doi.org/10.3354/dao02928>
- Chelebieva E.S., Lavrichenko D.S., Gostyukhina O.L. et al. The boring sponge (*Pionea vastifica*, Hancock, 1849) induces oxidative stress in the Pacific oyster (*Magallana gigas*, Thunberg, 1793) // Comp. Biochem. Physiol. Pt. B: Biochem. Mol. Biol. 2024. V. 273. Art. ID110980.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2024.110980>
- Cheng G., Lambeth J.D. NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the Phox homology (PX) domain // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 6. P. 4737–4742.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M305968200>
- Ciacci C., Betti M., Canonico B. et al. Specificity of anti-*Vibrio* immune response through p38 MAPK and PKC activation in the hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* // J. Invertebr. Pathol. 2010. V. 105. № 1. P. 49–55.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.05.010>
- Comps M., Bonami J.R., Vago C. A virus disease of the Portuguese oyster (*Crassostrea angulata* Lmk) // C.R. Acad. Sci. Paris. Sér. D. 1976. V. 282. № 22. P. 139–143.
- Daume S., Fromont J., Parker F. et al. Quantifying sponge erosions in Western Australian pearl oyster shells // Aquacult. Res. 2010. V. 41. № 9. P. e260–e267.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02518.x>
- Davinack A.A., Strong M., Brennessel B. Worms on the Cape: an integrative survey of polydorid infestation in wild and cultivated oysters (*Crassostrea virginica*) from Massachusetts, USA // Aquaculture. 2024. V. 581. Art. ID740366.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740366>
- De la Ballina N.R., Maresca F., Cao A., Villalba A. Bivalve haemocyte subpopulations: a review // Front. Immunol. 2022. V. 13. Art. ID826255.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.826255>
- Demann F., Wegner K.M. Infection by invasive parasites increases susceptibility of native hosts to secondary infection via modulation of cellular immunity // J. Anim. Ecol. 2019. V. 88. № 3. P. 427–438.
<https://doi.org/10.1111/1365-2656.12939>
- Dieudonne J., Carroll J.M. The impacts of boring sponges on oyster health across multiple sites and tidal heights // Estuaries Coasts. 2022. V. 45. № 1. P. 213–224.
<https://doi.org/10.1007/s12237-021-00942-1>
- Donaghy L., Kim B.K., Hong H.K. et al. Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis* // Fish Shellfish Immunol. 2009. V. 27. № 2. P. 296–301.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.05.010>
- Evariste L., Auffret M., Audonnet S. et al. Functional features of hemocyte subpopulations of the invasive

- mollusk species *Dreissena polymorpha* // Fish Shellfish Immunol. 2016. V. 56. P. 144–154.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.054>
- Faisal M., MacIntyre E.A., Adham K.G. et al. Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters // Comp. Biochem. Physiol. Pt. B: Biochem. Mol. Biol. 1998. V. 121. № 2. P. 161–168.
[https://doi.org/10.1016/s0305-0491\(98\)10084-6](https://doi.org/10.1016/s0305-0491(98)10084-6)
- Fallet M., Montagnani C., Petton B. et al. Early life microbial exposures shape the *Crassostrea gigas* immune system for lifelong and intergenerational disease protection // Microbiome. 2022. V. 10. № 1. Art. ID85.
<https://doi.org/10.1186/s40168-022-01280-5>
- Ferrario F., Calcinaï B., Erpenbeck D. et al. Two *Pione* species (Hadromerida, Clionaidae) from the Red Sea: a taxonomical challenge // Org. Diversity Evol. 2010. V. 10. P. 275–285.
<https://doi.org/10.1007/s13127-010-0027-x>
- Freire J.M.S., Farias N.D., Hégaret H., Da Silva P.M. Morphological and functional characterization of the oyster *Crassostrea gasar* circulating hemocytes: cell types and phagocytosis activity // Fish Shellfish Immunol. Rep. 2023. V. 4. Art. ID100089.
<https://doi.org/10.1016/j.fsirep.2023.100089>
- Gajbhiye D.S., Khandeparker L. Immune response of the short neck clam *Paphia malabarica* to salinity stress using flow cytometry // Mar. Environ. Res. 2017. V. 129. P. 14–23.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.04.009>
- Gu J., Zhang H., Wen C. et al. Purification, characterization, antioxidant and immunological activity of polysaccharide from *Sagittaria sagittifolia* L. // Food Res. Int. 2020. V. 136. Art. ID109345.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109345>
- 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 // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2019. V. 612. P. 111–125.
<https://doi.org/10.3354/meps12849>
- Jiang S., Jia Z., Zhang T. et al. Functional characterisation of phagocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* // Peer J. 2016. V. 4. Art. ID e2590.
<https://doi.org/10.7717/peerj.2590>
- Kim J.H., Lee H.M., Cho Y.G. et al. Flow cytometric characterization of the hemocytes of blood cockles *Anadara broughtonii* (Schrenck, 1867), *Anadara kagoshimensis* (Lischke, 1869), and *Tegillarca granosa* (Linnaeus, 1758) as a biomarker for coastal environmental monitoring // Mar. Pollut. Bull. 2020. V. 160. Art. ID111654.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111654>
- Kingma E. The role of the excavating sponge *Cliona celata* in oyster shells / Master's thesis. 2022.
- Kladchenko E.S., Chelebieva E.S., Podolskaya M.S. et al. Effects of boring sponge *Pione vastifica* (Hancock, 1849) infestation on redox status and histological structure in Pacific oyster *Magallana gigas* (Thunberg, 1793) gills // Ecol. Montenegr. 2024. V. 77. P. 211–223.
<https://doi.org/10.37828/em.2024.77.21>
- Kumar P.S. Bioeroding sponges in aquaculture systems // Marine sponges: Chemicobiological and biomedical applications. 2016. P. 53–56.
https://doi.org/10.1007/978-81-322-2794-6_4
- Labreuche Y., Soudant P., Gonçalves M. et al. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas* // Dev. Comp. Immunol. 2006a. V. 30. № 4. P. 367–379.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.05.003>
- Labreuche Y., Lambert C., Soudant P. et al. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 // Microbes Infect. 2006b. V. 8. № 12–13. P. 2715–2724.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.07.020>
- Lambert C., Soudant P., Choquet G., Paillard C. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios // Fish Shellfish Immunol. 2003. V. 15. № 3. P. 225–240.
[https://doi.org/10.1016/s1050-4648\(02\)00160-2](https://doi.org/10.1016/s1050-4648(02)00160-2)
- Lau Y.T., Gambino L., Santos B. et al. Transepithelial migration of mucosal hemocytes in *Crassostrea virginica* and potential role in *Perkinsus marinus* pathogenesis // J. Invertebr. Pathol. 2018. V. 153. P. 122–129.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.03.004>
- Li H., Parisi M.G., Toubiana M. et al. Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses // Fish Shellfish Immunol. 2008. V. 25. № 1–2. P. 143–152.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.04.001>
- Longshaw M., Feist S.W., Bateman K.S. Parasites and pathogens of the endosymbiotic pea crab (*Pinnotheres pisum*) from blue mussels (*Mytilus edulis*) in England // J. Invertebr. Pathol. 2012. V. 109. № 2. P. 235–242.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.11.011>
- Lushchak V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals // Aquat. Toxicol. 2011. V. 101. № 1. P. 13–30.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Lv Z., Qiu L., Wang W. et al. RGD-labeled hemocytes with high migration activity display a potential

- immunomodulatory role in the pacific oyster *Crassostrea gigas* // Front. Immunol. 2022. V. 13. Art. ID914899.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.914899>
- Mann R.L., Burreson E.M., Baker P.K. The decline of the Virginia oyster fishery in Chesapeake Bay: considerations for introduction of a non-endemic species, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) // J. Shellfish Res. 1991. V. 10. № 2. Art. ID379.
- Mao Che L., Le Champion-Alsumard T., Boury-Esnault N. et al. Biodegradation of shells of the black pearl oyster, *Pinctada margaritifera* var. *cumingii*, by microborers and sponges of French Polynesia // Mar. Biol. 1996. V. 126. P. 509–519.
- Martinelli J.C., Lopes H.M., Hauser L. et al. Confirmation of the shell-boring oyster parasite *Polydora websteri* (Polychaeta: Spionidae) in Washington State, USA // Sci. Rep. 2020. V. 10. № 1. Art. No. 3961.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-60805-w>
- Martínez-García M.F., Ruesink J.L., Grijalva-Chon J.M. et al. Socioecological factors related to aquaculture introductions and production of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) worldwide // Rev. Aquacult. 2022. V. 14. № 2. P. 613–629.
<https://doi.org/10.1111/raq.12615>
- Miossec L., Le Deuff R.M., Gouletquer P. Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster) // ICES Coop. Res. Rep. 2009. № 299.
<https://doi.org/10.17895/ices.pub.5417>
- Montes J.F., Del Rió J.A., Durfort M., García-Valero J. The protozoan parasite *Perkinsus atlanticus* elicits a unique defensive response in the clam *Tapes semidecussatus* // Parasitology. 1997. V. 114. № 4. P. 339–349.
<https://doi.org/10.1017/S003118209600861X>
- Montes J.F., Durfort M., García-Valero J. Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. // Cell Tissue Res. 1995. V. 279. P. 529–538.
<https://doi.org/10.1007/bf00318165>
- Moore J.D. Disease and potential disease agents in wild and cultured abalone // Abalone: Biology, ecology, aquaculture and fisheries. Elsevier. 2023. P. 189–250. (Dev. Aquacult. Fish. Sci.; V. 42).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814938-6.00007-5>
- Okon E.M., Birikorang H.N., Munir M.B. et al. A global analysis of climate change and the impacts on oyster diseases // Sustainability. 2023. V. 15. № 17. Art. ID12775.
<https://doi.org/10.3390/su151712775>
- Orensanz J.M., Schwindt E., Pastorino G. et al. No longer the pristine confines of the world ocean: a survey of exotic marine species in the southwestern Atlantic // Biol. Invasions. 2002. V. 4. P. 115–143.
<https://doi.org/10.1023/A:1020596916153>
- Panebianco A., Rey-Campos M., Romero A. et al. *Mytilus galloprovincialis* releases immunologically functional haemocytes to the intervalvar space in response to tissue injury and infection // Fish Shellfish Immunol. 2023. V. 138. Art. ID108806.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108806>
- Parisi M.G., Li H., Jouvét L.B. et al. Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria // Fish Shellfish Immunol. 2008. V. 25. № 6. P. 834–840.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.09.005>
- Park K.I., Lee M., Liu Y. et al. Flexible nanocomposite generator made of BaTiO₃ nanoparticles and graphitic carbons // Adv. Mater. 2012. V. 24. № 22. P. 2999–3004.
<https://doi.org/10.1002/adma.201200105>
- Peng M., Cardoso J.C., Pearson G. et al. Core genes of biomineralization and *cis*-regulatory long non-coding RNA regulate shell growth in bivalves // J. Adv. Res. 2024. V. 64. P. 117–129.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2023.11.024>
- Petton B., Destoumieux-Garzón D., Pernet F. et al. The Pacific oyster mortality syndrome, a polymicrobial and multifactorial disease: state of knowledge and future directions // Front. Immunol. 2021. V. 12. Art. ID630343.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.630343>
- Proestou D.A., Sullivan M.E. Variation in global transcriptomic response to *Perkinsus marinus* infection among eastern oyster families highlights potential mechanisms of disease resistance // Fish Shellfish Immunol. 2020. V. 96. P. 141–151.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.001>
- Pyecroft S.B. Shell-boring polychaetes (mudworms) and sponges affecting oysters, scallops, and abalone // Aquaculture pathophysiology. V. 2: Crustacean and mollusks diseases. Acad. Press, 2022. P. 583–591.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95434-1.00077-2>
- Rey-Campos M., Moreira R., Valenzuela-Muñoz V. et al. High individual variability in the transcriptomic response of Mediterranean mussels to *Vibrio* reveals the involvement of myticins in tissue injury // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. Art. No. 3569.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39870-3>
- Riout D., Lebel J.M., Le Foll F. Cell tracking and velocimetric parameters analysis as an approach to assess activity of mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes in vitro // Cytotechnology. 2013. V. 65. P. 749–758.
<https://doi.org/10.1007/s10616-013-9558-2>

- Rosell D., Uriz M.J., Martin D. Infestation by excavating sponges on the oyster (*Ostrea edulis*) populations of the Blanes littoral zone (north-western Mediterranean Sea) // J. Mar. Biol. Assoc. U. K., 1999. V. 79. № 3. P. 409–413.
- Rützler K., Stone S.M. Discovery and significance of Albany Hancock's microscope preparations of excavating sponges (Porifera: Hadromerida: Clionidae) // Proc. Biol. Soc. Wash. 1986. V. 99. P. 658–675.
- Takahashi K.G., Izumi-Nakajima N., Mori K. Unique phagocytic properties of hemocytes of Pacific oyster *Crassostrea gigas* against yeast and yeast cell-wall derivatives // Fish Shellfish Immunol. 2017. V. 70. P. 575–582.
- Terahara K., Takahashi K.G. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs // Curr. Pharm. Des. 2008. V. 14. № 2. P. 131–137.
<https://doi.org/10.2174/138161208783378725>
- Warne J.E., Marshall N.F. Marine borers in calcareous terrigenous rocks of the Pacific coast // Am. Zool. 1969. V. 9. № 3. P. 765–774.
<https://doi.org/10.1093/icb/9.3.765>
- 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 // Dis. Aquat. Org. 2018. V. 130. № 1. P. 25–36.
- Weng N., Meng J., Huo S. et al. Hemocytes of bivalve mollusks as cellular models in toxicological studies of metals and metal-based nanomaterials // Environ. Pollut. 2022. V. 312. Art. ID120082.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120082>
- Yang Q., Yu X., Du C. et al. Bacterial challenge undermines the innate immune response in *Hyriopsis cumingii* // Aquaculture. 2021. V. 530. Art. ID735783.
- Yarra T., Ramesh K., Blaxter M. et al. Transcriptomic analysis of shell repair and biomineralization in the blue mussel, *Mytilus edulis* // BMC Genomics. 2021. V. 22. № 1. Art. ID437.
- Zundeleovich A., Lazar B., Ilan M. Chemical versus mechanical bioerosion of coral reefs by boring sponges—lessons from *Pione* cf. *vastifica* // J. Exp. Biol. 2007. V. 210. № 1. P. 91–96.
<https://doi.org/10.1242/jeb.02627>

Immune Responses of the Pacific Oyster *Magallana gigas* (Thunberg, 1793) to Infestation by the Boring Sponge *Pione vastifica* (Hancock, 1849)

© 2025 D. S. Lavrichenko, E. S. Chelebieva, M. S. Podolskaya, A. Yu. Andreyeva, E. S. Kladchenko*

Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas,
Russian Academy of Sciences, Sevastopol, 299011 Russia
*e-mail: kladchenko_ekaterina@bk.ru

The Pacific oyster, *Magallana gigas* (Thunberg, 1793), is one of the most widely cultured species in the world. Despite the resistance of this species to most pathogens, oyster farms increasingly face problems associated with infestations by various organisms. One of the most dangerous epibiont pests is the boring sponge, *Pione vastifica* (Hancock, 1849). The aim of this study was to determine the effect of infestation by the sponge *P. vastifica* on the immune system of the oyster *M. gigas*. The key parameters of the nonspecific immune response, including the cellular composition of the hemolymph, the production of reactive oxygen species, and phagocytic activity, were studied in hemolymph samples using flow cytometry and fluorescence microscopy. Oysters with signs of shell perforation showed activation of the immune system, expressed as an increase in the production of reactive oxygen species by granulocytes, the main immune cells, and an increase in the phagocytic activity of granulocytes and hyalinocytes. The relative number of granulocytes in oysters infested by the boring sponge was significantly lower than that in healthy individuals. Since hemocytes of bivalves are involved in biomineralization processes, this result may indicate hemocyte infiltration into the mantle, the main tissue responsible for shell repair. This is the first study to focus on the immune system of Pacific oysters infested by the boring sponge. The results obtained provide insights into how the oyster organism responds to the presence of such dangerous epibiont pests as the boring sponge.

Keywords: Pacific oyster, hemocytes, boring sponge, phagocytosis, reactive oxygen species, immune system