

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ» (ДФУ)

На правах рукописи

ГРИНЧЕНКО АНДРЕЙ ВИКТОРОВИЧ

**АГГЛЮТИНИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ И НОВЫЙ БЕЛОК-АГГЛЮТИНИН M κ C1qDC
ГЕМОЛИМФЫ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *MODIOLUS KURILENSIS*:
ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ТКАНЕВАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ И СВОЙСТВА**

1.5.22. Клеточная биология

1.5.4. Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Кумейко Вадим Владимирович

Владивосток – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Роль гемолимфы в защитных реакциях двустворчатых моллюсков	12
1.1.1. Общая характеристика иммунитета <i>Bivalvia</i>	12
1.1.2. Гемоциты и защитные клеточные реакции	15
1.1.3. Защитные гуморальные факторы <i>Bivalvia</i>	17
1.1.4. Чувствительность гуморальных показателей гемолимфы двустворчатых моллюсков к средовым факторам.....	24
1.2. Литические факторы гемолимфы двустворчатых моллюсков	28
1.3. Агглютинины и опсоины гемолимфы <i>Bivalvia</i>	30
1.3.1 Лектины.....	31
1.3.2. Белки, содержащие фибриноген-ассоциированные домены	35
1.3.3. Белки, содержащие C1q-домен	36
1.4. Углевод-распознающие белки как молекулярные инструменты в медицине и биотехнологии	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ	41
2.1. Объект исследования и сбор материала.....	41
2.2. Физиологические эксперименты в моделируемых условиях	42
2.3. Определение агглютинирующей активности плазмы гемолимфы <i>M. kurilensis</i> реакцией гемагглютинации (РГА).....	43
2.4. Исследование углеводной специфичности агглютининов методом ингибирования реакции гемагглютинации (ИРГА).....	44
2.5. Оценка литической активности плазмы гемолимфы <i>M. kurilensis</i>	44
2.6. Определение концентрации белков плазмы гемолимфы <i>M. kurilensis</i>	46
2.7. Электрофорез белков плазмы гемолимфы <i>M. kurilensis</i> в полиакриламидном геле	46
2.8. Оценка содержания фракций белков в плазме гемолимфы <i>M. kurilensis</i>	47
2.9. Выделение нового C1q-домен-содержащего белка MkC1qDC из плазмы гемолимфы <i>M. kurilensis</i>	47
2.10. Выявление физико-химических свойств и углеводной специфичности белка MkC1qDC	48
2.11. Определение первичной структуры белка MkC1qDC	49
2.12. Оценка антибактериальной активности MkC1qDC	50
2.13. Получение поликлональных антител к MkC1qDC и оценка их качества	51
2.14. Выявление локализации MkC1qDC в тканях <i>M. kurilensis</i> методом иммуногистохимии	53

2.15. Оценка взаимодействия MkC1qDC с клеточными линиями млекопитающих	55
2.16. Статистические методы.....	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	58
3.1. Стандартизация методик оценки агглютинирующей и литической активности плазмы гемолимфы <i>M. kurilensis</i>	58
3.2. Внутрипопуляционная вариативность и сезонная динамика показателей плазмы гемолимфы <i>M. kurilensis</i>	59
3.3. Динамика активности плазмы гемолимфы <i>M. kurilensis</i> в ответ на импульсную стимуляцию бактериями.....	66
3.4. Влияние на показатели плазмы гемолимфы <i>M. kurilensis</i> антропогенной нагрузки как хронического стресса.....	68
3.5. Спектр углеводной специфичности агглютининов плазмы гемолимфы <i>M. kurilensis</i>	70
3.6. Разработка метода выделения и очистки углевод-распознающего белка MkC1qDC из плазмы гемолимфы <i>M. kurilensis</i>	71
3.7. Физико-химические свойства нового белка MkC1qDC	74
3.8. Углеводная специфичность белка MkC1qDC	75
3.9. Первичная структура белка MkC1qDC	77
3.10. Антибактериальная активность белка MkC1qDC.....	80
3.11. Выявление тканевой локализации и мест синтеза MkC1qDC	82
3.12. Взаимодействие MkC1qDC с клетками млекопитающих	102
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	111
4.1. Метастабильный статус динамики агглютинирующей и литической активности плазмы гемолимфы <i>M. kurilensis</i> в течение года	111
4.2. Стимуляция гуморальных факторов гемолимфы <i>M. kurilensis</i> в ответ на введение инактивированных бактерий.....	116
4.3. Чувствительность гуморальных показателей гемолимфы <i>M. kurilensis</i> к антропогенному стрессу	119
4.4. Новый белок-агглютинин гемолимфы <i>M. kurilensis</i> (MkC1qDC) с высоким аффинитетом к гликанам на основе кислых галактанов и маннанов.....	122
4.5. Белок MkC1qDC как антибактериальный защитный фактор гемолимфы <i>M. kurilensis</i>	126
4.6. Гемоциты как источник белка MkC1qDC в гемальной системе и интерстициальном компартменте <i>M. kurilensis</i>	129
4.7. Биомедицинский потенциал углевод-связывающего белка MkC1qDC.....	131
ВЫВОДЫ.....	135
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	136

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АМП – антимикробные пептиды
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ГЛР – гемолитическая реакция
- ДСН – додецилсульфат натрия
- ИРГА – ингибирование реакции гемагглютинации
- КОЕ – колониеобразующая единица
- ПАМП – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
- ПВДФ – поливинилиденфторид
- ПРР – паттерн-распознающие рецепторы
- ПФА – параформальдегид
- РГА – реакция гемагглютинации
- СА – сульфат аммония
- СМВ – стерильная морская вода
- ФО – фенолоксидазы
- ЭГТА – этиленгликоль-бис-аминоэтиловый эфир N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- Эр – эритроциты
- AIF-1 – allograft inflammatory factor 1 (воспалительный фактор-1 аллотрансплантата)
- BPI – bactericidal/permeability-increasing (бактерицидные повышающие проницаемость клеточной мембраны)
- BLAST – Basic Local Alignment Search Tool (средство поиска основного локального выравнивания)
- C1qDC – C1q domain-containing (C1q-домен-содержащий)
- СВВ G-250 – Coomassie Brilliant Blue G-250 (Кумасси бриллиантовый синий G-250)
- СМФСС – calcium magnesium free salt solution (искусственная солевая среда без Ca^{2+} и Mg^{2+})
- CRD – carbohydrate recognition domain (углевод-распознающий домен)
- C_p – концентрация белков в плазме
- FReD – fibrinogen-related domain (фибриноген-ассоциированный домен)
- LPS – lipopolysaccharide (липополисахарид)
- MIF – macrophage migration inhibitory factor (фактор ингибирования миграции макрофагов)
- MkC1qDC – C1q-домен-содержащий белок *Modiolus kurilensis*
- Mr – молекулярная масса
- PBM – poor broth medium (обедненная бульонная питательная среда)

PBS – phosphate buffered saline (фосфатная буферная солевая среда)

PDG – peptidoglycan (пептидогликан)

PGRP – peptidoglycan recognition proteins (пептидогликан-распознающие белки)

TBS – Tris-buffered saline (Tris-буферная солевая среда)

TNF- α – tumor necrosis factor α (фактор некроза опухоли α)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В последние десятилетия происходит интенсификация изучения молекул и клеток морских беспозвоночных, обеспечивающих эффективную адаптацию к факторам среды. Это обусловлено теоретической разработкой вопроса об эволюционном становлении защитных механизмов и связанных с ним тканей, клеток и молекул, что, в свою очередь, находит отражение в клеточной биологии, биохимии, сравнительной иммунологии и гистологии, а впоследствии и в соответствующих медико-биологических исследованиях. Кроме того, морские беспозвоночные являются источником уникальных соединений, которые находят широкое применение в медицине и биотехнологии. Особый интерес в связи с активным развитием биомедицинских разработок представляют углевод-распознающие белки-агглютинины, которые ранее относили только к лектинам, однако с прогрессом геномных исследований список групп лектин-подобных белков значительно расширился. Одной из таких групп являются C1q-домен-содержащие (C1qDC) белки, обладающие выраженными антимикробными свойствами и вероятным, но пока еще плохо изученным, противоопухолевым потенциалом. Однако несмотря на обнаруженную недавно широкую представленность в геномах *Bivalvia* соответствующих генов, выделенных в чистом виде и охарактеризованных C1qDC-белков на данный момент крайне мало.

Modiolus kurilensis Bernard, 1983 – один из широко распространенных на Дальнем Востоке видов морских двустворчатых моллюсков, образующий многочисленные плотные поселения в прибрежной зоне залива Петра Великого Японского моря. Обширная представленность, высокая численность на небольшой глубине (2–4 м) при отсутствии активного промысла делают данный вид привлекательным в качестве объекта исследований и биотехнологического ресурса. Ранее в некоторых работах *M. kurilensis* использовали как объект экологического мониторинга (Kavun, Podgurskaya, 2009; Yurchenko, Vaschenko, 2010; Подгурская, Кавун, 2012), однако исследований его защитных молекул и тканевых источников их синтеза не проводилось.

Степень разработанности темы. Гемолимфа, как одна из основных интегративных и реактивных тканей двустворчатых моллюсков, часто используется для оценки их физиологического состояния в биомониторинге (Song et al., 2010; Анисимова, 2013; Gerdol et al., 2018; Loker, Bayne, 2018). При этом чаще акцент сконцентрирован на клеточных показателях, а исследований системных гуморальных реакций представителей *Bivalvia*, которые давали бы более широкое представление о состоянии их здоровья, не так много (Loker, Bayne, 2018). Гуморальные защитные компоненты, в свою очередь, являются объектом повышенного интереса последних лет в основном в связи с развитием методов молекулярной биологии, биохимии и поиском новых ценных молекул для биотехнологии.

Среди углеводов-распознающих белков лектины, как наиболее известные и изученные, находят широкое применение и рассматриваются как потенциальные инструменты в различных областях, таких как гематология, гистохимия, клеточная биология, биохимия, вирусология, микробиология и медицина, как в аспекте исследований и диагностики, так и терапевтического потенциала (Mitchell et al., 2017; Devi, Basil-Rose, 2018; Catanzaro et al., 2019; Mishra et al., 2019; Wu, Liu, 2019; Hassan et al., 2020). C1qDC-белки являются другим относительно недавно открытым обширным мультигенным семейством углеводов-распознающих полипептидов, представленность кодирующих последовательностей которых в геномах ряда двустворчатых моллюсков исчисляется сотнями (Takeuchi et al., 2016; Sun et al., 2017; Mun et al., 2017; Powell et al., 2018; Gerdol et al., 2019), однако выделенных и описанных из них – единицы. Еще меньше работ касается их биомедицинского потенциала.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлся анализ агглютинирующей активности гемолимфы двустворчатого моллюска *Modiolus kurilensis* с идентификацией и изучением свойств нового углеводов-распознающего белка MkC1qDC.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать активность защитных гуморальных факторов гемолимфы *M. kurilensis* с оценкой функциональной динамики в природных и экспериментально моделируемых условиях.
2. Охарактеризовать углеводную специфичность агглютининов гемолимфы *M. kurilensis* и провести поиск не идентифицированных ранее углеводов-связывающих белков.
3. Разработать схему эффективного выделения и описать физико-химические свойства нового углеводов-связывающего белка-агглютинина MkC1qDC из гемолимфы *M. kurilensis*.
4. Методами иммуногистохимии выявить клеточный источник синтеза и тканевую локализацию белка MkC1qDC;
5. Охарактеризовать антимикробные свойства белка MkC1qDC в отношении грам(+) и грам(-) бактерий.
6. Оценить цитотоксическую активность белка MkC1qDC и его способность распознавать опухолевые клетки человека.

Научная новизна. Впервые обнаружен и выделен C1qDC-белок из гемолимфы *M. kurilensis* MkC1qDC, обладающий уникальной для данной группы высокой специфичностью в отношении гликанов на основе кислых галактанов и маннанов. Определены первичная структура и физико-химические свойства MkC1qDC, исследована его агглютинирующая и антибактериальная активность, установлена внутриклеточная локализация MkC1qDC в гранулярных гемоцитах и внеклеточная локализация в гемальной системе и интерстициальном компартменте. Показана способность нового белка связывать опухолевые клетки и влиять на их активность.

Кроме того, комплексно описаны и проанализированы особенности защитных реакций *M. kurilensis*, апробированы и стандартизированы методики оценки активности агглютинирующих и литических факторов гемолимфы моллюсков. Впервые установлены границы их естественной вариативности у *M. kurilensis* в зависимости от места обитания и времени года. Показана сезонная динамика белкового профиля и активности защитных факторов плазмы моллюска. Описана динамика гуморального ответа *M. kurilensis* на введение инактивированных нагреванием бактерий *Staphylococcus aureus*, а также выявлены чувствительность исследованных показателей к хроническому стрессу в виде повышенной антропогенной нагрузки, а также их связь с гистопатологиями и клеточными показателями гемолимфы.

Теоретическая и практическая значимость. Впервые выделенный и охарактеризованный углевод-распознающий белок MkC1qDC является представителем C1qDC-белков двустворчатых моллюсков с характерной специфичностью к сиаловой кислоте и патоген-ассоциированным молекулярным паттернам (ПАМП), что обеспечивает выраженные антимикробные свойства. Разработан метод выделения белка MkC1qDC, имеющего наибольший аффинитет к гликанам на основе кислых галактанов и маннанов, который демонстрирует значительный биомедицинский потенциал в качестве молекулы, распознающей углеводные компоненты опухолевых клеток.

Предложенный в данной работе методологический подход к системной оценке агглютинирующей и литической активности гемолимфы моллюсков и приведенные доказательства их чувствительности к внешним и внутренним стрессорам позволяют применять выявленные параметры для создания быстрых и эффективных тест-систем оценки физиологического состояния двустворчатых моллюсков. Полученные в ходе представленной работы результаты существенно дополняют имеющиеся знания о защитных гуморальных реакциях *Vivalvia* и могут быть использованы в построении моделей и теорий иммунного ответа двустворчатых моллюсков.

Методология и методы диссертационного исследования. В работе использован широкий набор методов клеточной биологии и гистологии (культивирование клеток, морфологический анализ клеток и тканей, гистохимический и иммуногистохимический анализ, различные варианты световой микроскопии, включая конфокальную лазерную и автоматизированную количественную микроскопию), биохимии (выделение и очистка биополимеров, спектрофотометрия, различные варианты электрофореза белков, иммуноблоттинг, гель-фильтрационная и аффинная хроматография), иммунологии (реакция гемагглютинации, получение поликлональных антител и иммунохимический анализ), молекулярного анализа (секвенирование методом Эдмана, масс-спектрометрия) и биоинформатики (*de novo* сборка

пептидных фрагментов, поиск и выравнивание белковых последовательностей с использованием доступных баз данных, статистический анализ).

В оценке активности гуморальных факторов иммунитета *M. kurilensis* были использованы: классическая методика реакции прямой гемагглютинации (Кэтти и др., 1991) с подбором оптимальных условий и оригинальная методика гемолитической реакции, разработанная на основе литературных данных (Rowe, Welch, 1994; Armstrong et al., 1996; Hu et al., 2011). Для описания белкового профиля гемолимфы проводили измерение концентрации белков по светопоглощению нативной плазмы при длине волны 280 нм и электрофорез белков по Лэммли (Laemmli, 1970) с последующей оценкой соотношения фракций по оптической плотности выявляемых Кумасси бриллиантовым синим G-250 полос. Статистический анализ проводили с предварительной оценкой нормальности распределения показателей в выборках и подбором соответствующих критериев сравнения.

С использованием биохимических методов фракционирования белков, включая ступенчатое высаливание в растворе сульфата аммония и последующую аффинную хроматографию, была разработана схема эффективного выделения MkC1qDC. Определение спектра и степени его углеводной специфичности проводили методом ингибирования реакции гемагглютинации растворами углеводов с различной концентрацией. Термолабильность и pH-зависимость оценивали с помощью реакции гемагглютинации с модификациями. Методом 2D-электрофореза (изофокусирование в первом направлении и электрофорез по Лэммли с градиентным разделяющим гелем во втором) определяли изоэлектрическую точку MkC1qDC и его состав. Особенности первичной структуры нового белка определяли N-концевым секвенированием по Эдману и масс-спектрометрией его пептидных фрагментов с последующей *de novo* сборкой и биоинформатическим анализом. Иммунную роль и антимикробную активность MkC1qDC определяли по его способности агглютинировать бактерии и подавлять рост их культур с оценкой результатов с помощью флуоресцентной микроскопии в первом случае и спектрофотометрическим методом – во втором. Тканевую локализацию MkC1qDC выявляли методами иммуногистохимии с использованием конфокальной микроскопии, предварительно получив собственные антисыворотки кролика с оценкой их качества иммуноферментным анализом и иммуноблотингом.

Личный вклад автора. Все экспериментальные данные, представленные в работе, получены лично автором или студентами под его руководством и при его непосредственном участии, за исключением инструментальной части N-концевого секвенирования MkC1qDC по Эдману и масс-спектрометрии его пептидных фрагментов, проведенных на базах Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и Института генетики и молекулярной медицины Университета Эдинбурга

(Великобритания), соответственно. Автор проводил первичный сбор материала, его обработку, планирование исследований и постановку экспериментов, документирование результатов и их анализ, непосредственно участвовал в написании научных публикаций, а также лично представлял результаты по теме исследования на конференциях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Впервые выделенный агглютинирующий фактор гемолимфы *M. kurilensis* MkC1qDC является новым C1q-домен-содержащим белком с уникальной специфичностью к гликанам на основе кислых галактанов и маннанов, выраженными антимикробными свойствами и сродством к углеводным паттернам опухолевых клеток. Для MkC1qDC характерна внутриклеточная локализация в гранулярных гемоцитах и внеклеточная локализация, ассоциированная с гемальной системой и интерстициальным компартментом.

2. Агглютинирующая активность, а также общая концентрация белков, литическая активность и содержание фракций полипептидов P124, P55, P78 плазмы гемолимфы *M. kurilensis* характеризуются в норме метастабильной динамикой в течение года и проявляют чувствительность к импульсному и хроническому стрессу.

Степень достоверности результатов. Повторяемость качества и количества выделения белка MkC1qDC, а также процедур по оценке его свойств и структуры при использовании современных высокоточных методов обеспечивают достоверность полученных результатов. Оценка исследованных показателей в сезонной динамике, в ответ на импульсное воздействие бактериями и хронический антропогенный стресс проводилась с постановкой предварительных экспериментов, тщательной проработкой методических аспектов, многократным повторением процедур и значительным объемом проанализированных выборок. Все первичные данные задокументированы и представлены в результатах в виде рисунков, графиков и таблиц.

Апробация работы и публикации. Результаты исследований по теме диссертационной работы были представлены на всероссийских школах-конференциях "Перспективы развития инноваций в биологии" (Владивосток, 2010), "Проблемы экологии морского шельфа" (Владивосток, 2011), "Экология и управление природопользованием" (Томск, 2016); на международных конференциях "16th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish" (Tampere, 2013), "Unique Marine Ecosystems: Modern Technologies of Exploration and Conservation for Future Generations" (Vladivostok, 2016) и "Future of Biomedicine 2017" (Vladivostok, 2017).

По теме диссертации опубликовано 11 работ: 4 статьи в отечественных и международных журналах, индексируемых РИНЦ, Scopus, Web of Science и рекомендованных ВАК, один патент на изобретение, 6 тезисов в материалах всероссийских и международных конференций.

Структура работы. Диссертация изложена на 167 страницах, включает список сокращений, введение, обзор литературы, материал и методы, результаты, обсуждение, выводы

и список литературы. Работа содержит 34 рисунка и 4 таблицы. Список литературы включает 376 наименований, 355 из которых на иностранном языке.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность за ценные советы, создание благоприятной научной среды и комфортных условий работы своему научному руководителю В.В. Кумейко, а также учителям, коллегам и наставникам А.П. Анисимову, И.Ю. Лисицыной, И.А. Кирсановой, А.А. Анисимовой, Н.П. Токмаковой и Н.Е. Зюмченко. Значительный вклад в понимание и проведение статистического анализа результатов внесли Е.Э. Борисовец и И.И. Пушин. Особую благодарность автор выражает Н.А. Шведу, а также своим ученикам и младшим товарищам, чей труд обогатил работу: Д.К. Корнейко, А.Е. Егоровой, Т.Д. Карп и Д.В. Ильяскиной. По-настоящему неоценимая помощь была оказана коллегой и верным товарищем Ю.Н. Сокольниковой.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Роль гемолимфы в защитных реакциях двустворчатых моллюсков

1.1.1. Общая характеристика иммунитета *Bivalvia*

В настоящее время иммунитет рассматривают как систему, работа которой направлена на поддержание целостности и генетической индивидуальности организма, являясь, таким образом, одной из систем, обеспечивающих его гомеостаз. Структура иммунитета животных сильно варьирует и зависит от множества факторов, таких как, например, эволюционная продвинутость и филогенетическое положение, экологическая ниша и стратегия выживаемости вида, а также ряда других (Ratcliffe et al., 1985; Галактионов, 2005; Song et al., 2010a).

В связи с очевидной практической необходимостью, наиболее изученными являются иммунные системы высших позвоночных, в частности человека, а также модельных в этом отношении млекопитающих – мышей и крыс. При этом классически иммунитет для них делят на врожденный (неспецифический) и приобретенный (специфический), который основан на работе иммунокомпетентных клеток, клеток памяти и продуцируемых их клонами антител. Ткани внутренней среды беспозвоночных не достигают той же степени дифференцировки и не формируют специализированных лимфоидных тканей и органов, как и высокоспецифичных к антигенам антител, поэтому, как считается, им присущ только врожденный иммунитет (Ratcliffe et al., 1985; Полевщиков, 1996; Галактионов, 2005).

Моллюски являются второй по численности видов группой животных после членистоногих и занимают множество разнообразных экологических ниш, что говорит об их высокой адаптивной способности, в которой иммунитет играет важнейшую роль. В целом защита от патогенов у большинства беспозвоночных складывается из внешних барьеров на основе эпителиев и их производных, а также из компонентов циркуляторных систем, как клеточных, так и гуморальных (Ratcliffe et al., 1985; Галактионов, 2005; Gerdol et al., 2018; Loker, Bayne, 2018).

Двустворчатые моллюски являются донными фильтраторами и, таким образом, постоянно взаимодействуют поверхностью мантии, жабр и кишечником с водой, насыщенной, в том числе, микроорганизмами, которые потенциально могут представлять для них опасность. В экстремальных ситуациях они могут плотно захлопываться, прекращать питание и держать клапаны плотно закрытыми, например, при низком содержании кислорода или цветении опасных видов фитопланктона. В случае кормления показано, что двустворчатые моллюски способны распознавать и сортировать поступаемые в пищеварительный тракт частицы, что является одной из первых защитных линий (Criscitiello, de Figueiredo, 2013). Причем в данном аспекте выявлены некоторые видовые особенности. Например, считается, что устрицы *Crassostrea virginica*

накапливают меньше чем мидии *Mytilus edulis* токсичной домоевой кислоты из водорослей *Pseudonitzschia* spp., поскольку меньше их поглощают (Mafra et al., 2010). Кроме того, показано, что при добавлении в среду паразита *Perkinsus marinus* селективно выращиваемые *C. virginica* поглощают его меньше, чем животные, не подвергавшиеся отбору (Ben-Horin et al., 2015).

Следующей и, вероятно, одной из наиболее значимых, но малоизученных линий защиты у представителей *Bivalvia* является иммунитет, ассоциированный со слизистыми оболочками, которые постепенно перестают рассматриваться лишь как физический барьер на пути патогенов (Allam, Pales Espinosa, 2016). Важность и эффективность иммунитета за счет слизистых барьеров подтверждается экспериментами, в которых животные имеют большую устойчивость к инфицированию при помещении их в среду с высоким содержанием патогенов в сравнении с малыми дозами, вводимыми инъекциями внутрь тканей (Gerdol et al., 2018; Loker, Bayne, 2018). В целом иммунные ответы слизистых оболочек включают следующий ряд механизмов: 1) продукцию гуморальных защитных факторов, секретируемых в слизь; 2) хемотаксис и трансэпителиальную миграцию фагоцитов в паллиальное и экстрапаллиальное пространства; 3) фагоцитоз и внутриклеточное переваривание клетками пищеварительного эпителия; 4) инкапсулирующий ответ в экстрапаллиальной полости, характеризующийся секрецией конхиолина и антимикробных продуктов с активацией каскада профенолоксидазы (Allam, Raftos, 2015; Allam, Pales Espinosa, 2016; Zannella et al., 2017).

В основе системного иммунного ответа лежит работа интегративной циркуляторной системы животных, которой у двустворчатых моллюсков является гемолимфа, состоящая из амебоидных клеток гемоцитов и плазмы с растворенными в ней веществами различной природы, структуры и назначения (Заварзин, 2000; Song et al., 2010a; Gerdol et al., 2018; Loker, Bayne, 2018). В целом стратегия иммунного ответа двустворчатых моллюсков, как и множества других животных, включает следующий ряд ключевых этапов. Исходно происходит первичное распознавание генетически чужеродного материала по патоген-ассоциированным молекулярным паттернам (ПАМП) через паттерн-распознающие рецепторы (ПРР), растворимые формы которых являются агглютинирующими и опсонизирующими гуморальными факторами. Далее привлеченные гемоциты запускают каскады сигнальной трансдукции и высвобождение цитокинов, что приводит к формированию клеточного иммунного ответа и выработке гуморальных защитных веществ-эффекторов, которые различаются в зависимости от природы и расположения иммунных стимулов. Тонкая регуляция иммунного ответа достигается за счет регулирующей сети нейроэндокринной иммуномодуляции, перекрестного взаимодействия нервной, эндокринной и иммунной систем, которое поддерживает гомеостаз и настраивает врожденный иммунный ответ у всех животных (Gerdol et al., 2018; Loker, Bayne, 2018).

Еще один важный, но крайне малоизученный аспект защитных механизмов *Bivalvia* – явление "иммунологической памяти", которую в литературе часто берут в кавычки из-за наличия у беспозвоночных лишь врожденного иммунитета, а также нередко называют иммунным праймингом. Например, некоторые представители моллюсков, такие как *Biomphalaria glabrata* и *Crassostrea gigas* продемонстрировали усиленный патоген-специфический фагоцитоз и повышение экспрессии генов, участвующих в фагоцитозе и гематопоезе, при вторичных заражениях (Zhang et al., 2014b; Wang et al., 2015b; Green et al., 2015; Pinaud et al., 2016; Wang et al., 2017). Кроме того, показано, что экспериментально инфицированные молодые *C. gigas* могут поддерживать длительную противовирусную иммунную память, сохраняющуюся не менее 5 месяцев, что защищает их от последующих вирусных инфекций (Lafont et al., 2017). Также у двустворчатых моллюсков продемонстрировано иммунное праймирование между поколениями (Green et al., 2016). Конкретные механизмы, лежащие в основе этих явлений, все еще неясны, но считается, что переключение с клеточного на гуморальный ответ и эпигенетическая регуляция играют решающую роль.

Внимание к физиологическому состоянию двустворчатых моллюсков в зависимости от факторов среды с одной стороны обусловлено пищевой и экономической ценностью множества их представителей, а с другой использованием их в качестве биоиндикаторных видов состояния среды, что связано с их прикрепленным или малоподвижным образом жизни донных фильтраторов. Исследования, как естественных изменений среды, так и моделируемых, позволяют наблюдать нормальную вариативность физиологических показателей и как быстро организмы способны восстанавливаться после стресса. Это, в свою очередь, дает возможность устанавливать диапазоны толерантности видов к спектру условий внешней среды, а также проводить в дальнейшем биоиндикацию. Существует множество исследований, посвященных влиянию различных факторов на физиологию *Bivalvia*, в том числе на параметры гемолимфы (Song et al., 2010a; Анисимова, 2013; Gerdol et al., 2018; Loker, Wayne, 2018). Однако в последнем случае существует явный перекоп в сторону оценки клеточных показателей, таких как число, морфология и популяционная структура гемоцитов, содержание в них активных форм кислорода и различных ферментов, стабильность их лизосомальных мембран, фагоцитарная активность и ряд других. Данные же по гуморальным факторам имеют более отрывочный и разрозненный характер и чаще всего в работах ограничиваются оценкой 1–3 показателей, таких как общая концентрации белков в плазме, ее агглютинирующая, литическая или антимикробная активность (Chu, La Peyre, 1989; Olafsen et al., 1992; Santarem et al., 1994; Fisher et al., 1996; Soudant et al., 2004; Matozzo et al., 2003; Soudant et al., 2004; Malagoli et al., 2007).

Факторы, влияющие на состояние организма, могут быть как эндогенными, так и экзогенными, при этом последние классически подразделяются на абиотические, биотические и

антропогенные. Однако следует помнить, что зачастую на организм оказывает влияние комплекс факторов. Так, например, одним из наиболее значимых эндогенных факторов, влияющих на иммунитет двустворчатых моллюсков, считается половой цикл, который, очевидно, напрямую зависит от температуры, обилия пищи и ряда других экзогенных параметров. Также бактериальная и паразитарная нагрузка, как и особенности питания, зачастую имеют циклические изменения, связанные с естественными колебаниями температуры и иных абиотических факторов. Наконец антропогенное влияние может проявляться в виде изменений температуры, рН и солености воды, появления в среде различных поллютантов, а также в изменении состава и плотности микрофлоры, которые при этом накладываются на естественные изменения эндогенных и экзогенных факторов (Matozzo et al., 2010; Höher et al., 2012; Dos Santos et al., 2013; Matozzo et al., 2013; Loker, Bayne, 2018).

1.1.2. Гемоциты и защитные клеточные реакции

У представителей *Bivalvia* в зависимости от вида и классификации выделяют от 3 до 5 типов гемоцитов. Наиболее распространенным вариантом является деление на малые гиалиноциты (малые агранулоциты), гиалиноциты (агранулоциты) и гранулоциты (Oubella et al., 1993; Santarem et al., 1994; Carballal et al., 1998; Allam et al., 2002). Иногда гранулированные клетки дополнительно подразделяют на базофильные и эозинофильные в зависимости от состава гранул и их сродству к соответствующим красителям. Кроме того, некоторые авторы также выделяют промежуточный тип полугранулярных гемоцитов (Анисимова, 2013). Дополнительно у ряда двустворчатых моллюсков могут встречаться иные клеточные популяции. Так, например, в гемолимфе представителей семейства *Arcidae* присутствуют эритроциты (Dam et al., 1992; Romanenko et al., 2008; Chen et al. 2017), или группы, выделенные на основе дополнительных специфических вариантов маркирования (Гринченко и др., 2014).

Функции гемоцитов довольно разнообразны: клеточные иммунные реакции, синтез и секреция различных, в том числе защитных, гуморальных факторов, перенос веществ, регуляция тканевых процессов (Житенева и др., 2001; Wang et al., 2017; Gerdol et al., 2018; Loker, Bayne, 2018). К основным клеточным защитным реакциям у двустворчатых моллюсков относятся фагоцитоз, тромбирование, формирование узелков и инкапсуляция. Первый из них является наиболее древним и универсальным способом элиминации генетически чужеродных агентов, который встречается у всех животных, начиная с кишечнополостных (Ratcliffe et al., 1985; Заварзин, 2000). Процесс фагоцитоза включает в себя несколько стадий: 1) хемотаксис – направленное движение клеток к области накопления веществ, привлекающих фагоциты; 2) адгезия – встреча и прикрепление чужеродного агента к клеточной поверхности с помощью рецепторов или гуморальных факторов; 3) процесс поглощения гемоцитами чужеродного

материала; 4) киллинг и переваривание поглощенных частиц, который зависит от активности гидролитических ферментов лизосом (Заварзин, 2000; Житенева и др., 2001).

Тромбирование раны без коагуляции плазмы – комплексный процесс, который начинается мышечным сокращением в области поражения тканей, препятствующей обильной кровопотере, с немедленной миграцией гемцитов к месту ранения и их последующей агрегацией для закупорки раны. При этом нередко происходит их параллельная пролиферация для компенсации потерянных клеток. Образовавшаяся пробка укрепляется коллагеном, который секретируют клетки окружающих тканей, а на границе раны происходит фагоцитоз поврежденных клеток и микроорганизмов. Так же *in vitro* показано, что процесс агрегации гемцитов зависит от ионов Ca^{2+} (Ratcliffe et al., 1985; Галактионов, 2005; Gerdol et al., 2018).

Образование узелков – механизм, который особенно важен при массовом проникновении микроорганизмов. Запуск происходит в результате дегрануляции гемцитов, что вызывает цепную реакцию привлечения в очаг других клеток. В результате комплексного процесса, включающего фагоцитоз и накопление гуморальных факторов, происходит формирование изолированной области, которая уплотняется за счет меланина и работы прилегающих тканей (Ratcliffe et al., 1985; Галактионов, 2005; Gerdol et al., 2018).

Инкапсуляция необходима, если в организм попадают цестоды, трематоды и другие многоклеточные патогены, с которыми уже не может справиться небольшое число гемцитов. Капсула морфологически аналогична узелку, но она намного больше вследствие размера патогена. Основные клетки капсулы – гемциты и клетки соединительной ткани. Начальным этапом является встреча фагоцитов и патогена с участием, в том числе, и гуморальных факторов. При этом гранулоциты разрушаются, образуя тромбоподобную реакцию. Далее происходит приток фагоцитирующих клеток и их закрепление в местах разрушения первых гранулоцитов. В результате образуется характерная многослойная капсула, и идет активный фагоцитоз патогена. Одновременно с образованием капсулы начинают работать гуморальные факторы разрушенных гемцитов, убивающие микроорганизмов: кислая фосфатаза, лизоцим, алкалин, β -глюкуронидаза, липаза, амилаза и другие (Ratcliffe et al., 1985; Галактионов, 2005; Gerdol et al., 2018).

Кроме ключевой роли в защитных клеточных реакциях, описанных выше, гемциты считаются основным местом синтеза растворимых защитных факторов гемолимфы (Song et al., 2010a; Wang et al., 2017; Gerdol et al., 2018; Loker, Wayne, 2018), которые более подробно рассмотрены в следующем разделе.

1.1.3. Защитные гуморальные факторы Bivalvia

Классификация гуморальных факторов иммунитета моллюсков претерпевала изменения и дополнения вместе с углублением знаний в этой области. Одной из классических и наиболее обобщенных является дифференцировка гуморальных факторов по принципу функциональной активности веществ, которая включает: опсонины, агглютинины, лизины, цитотоксические антимикробные факторы, цитокин-подобные и иные сигнальные молекулы (Ratcliffe et al., 1985; Полевщиков, 1996; Галактионов, 2005). Со временем список растворимых веществ, вовлеченных в защиту моллюсков от патогенов, расширился, и в данный момент все чаще встречаются классификации на основе их биохимической структуры и гомологии.

Многообразие открытых в последние годы компонентов гуморального звена иммунитета двустворчатых моллюсков в значительной степени усложняет их систематизацию и представление в единой стройной логике. Одними из наиболее изученных факторов, ответственных на первичное распознавание ПАМП и инициацию иммунного ответа, являются белки группы лектинов, которые считаются основными агглютинидами и опсонинами, а также зачастую играют роль ПРР на клеточной поверхности. Среди других инициализирующих иммунный ответ молекул важно отметить интенсивно исследуемые в последнее десятилетие белки, содержащие фибриноген-ассоциированные домены (fibrinogen-related domain, FReD), а также C1q домен-содержащие (C1q domain-containing, C1qDC) белки. Основными межклеточными сигнальными молекулами, вовлеченными в иммунный ответ, являются цитокины, для которых у двустворчатых моллюсков во многих случаях показана гомология с цитокинами позвоночных. Однако в последнее время стала появляться информация о том, что другие, например, эффекторные молекулы могут проявлять цитокин-подобную активность (Balseiro et al., 2011; Zhang et al., 2015). Эффекторами гуморального иммунитета называют молекулы, обеспечивающие непосредственную гибель и разрушение патогенов. К ним относятся антимикробные пептиды, лизоцимы, бактерицидные повышающие проницаемость клеточной мембраны белки (bactericidal/permeability-increasing proteins, BPIs), комплемент-подобные белки и/или белки предполагаемой системы комплемента, различные протеазы, а также компоненты фенолоксидазного каскада (Gerdol et al., 2018).

Далее более подробно рассмотрены некоторые из гуморальных факторов иммунитета *Bivalvia*. При этом наиболее значимым агглютинирующим и литическим факторам посвящены отдельные главы 1.2 и 1.3, а среди прочих отмечены антимикробные пептиды, цитокины, белки фенолоксидазной системы и некоторые другие.

Антимикробные пептиды (АМП) представляют собой группу мелких катионных цистеин-насыщенных белков с выраженной антибактериальной активностью. Первые АМП двустворчатых моллюсков, схожие с дефензинами членистоногих, были выделены из гемолимфы

M. edulis и *Mytilus galloprovincialis* и названы митилинами (Hubert et al., 1996; Charlet et al., 1996). Несмотря на то, что их первичное высвобождение из гранул гемоцитов происходит при фагоцитозе бактерий внутриклеточно (Mitta et al., 2000a, 2000b), показано также и участие их в системном иммунном ответе при вторичном высвобождении в гемолимфу (Mitta et al., 2000c).

Несколько позже в плазме и гемоцитах *M. galloprovincialis* были обнаружены АМП нового класса, названного митицинами, которые проявляли более ограниченную антимикробную активность по сравнению с дефензинами и митилинами, но имели с ними восемь общих консервативных остатков цистеина (Mitta et al., 1999). Кроме относительно более слабой антибактериальной активности, которая проявляется лишь при низких рН (Martinez-Lopez et al., 2013; Domeneghetti et al., 2015), для митицинов показаны противовирусные, а также хемокиновые или цитокин-подобные свойства (Balseiro et al., 2011; Novoa et al., 2016).

Для рассмотренных выше АМП мидий было выявлено, что исходно они формируются в виде предшественника, который имеет кислый С-концевой фрагмент, уравнивающий высококатионный заряд основной части зрелого пептида и удаляемый после высвобождения из гранул. Также было обнаружено, что эти АМП относятся к мультигенным семействам, которые имеют сходную архитектуру, включающую четыре экзона и три интрона с фиксированными границами (Mitta et al., 2000a). Некоторая непредсказуемость в колебаниях экспрессии генов данных АМП в ответ на бактериальную стимуляцию (Mitta et al., 2000a), а также значительная внутривидовая вариативность предположительно указывают на значимость влияния факторов окружающей среды на их генную активность (Li et al., 2010).

Несколько позже были обнаружены две изоформы дефензиноподобных АМП с восемью цистеинами у *C. gigas*, одна из которых была характерна для гемоцитов, а вторая в основном экспрессировалась по краю мантии (Gueguen et al., 2006; Gonzalez et al., 2007a). Схожие с дефензинами АМП, имеющие в структуре характерные три или четыре дисульфидные связи, были обнаружены и у ряда других двустворчатых моллюсков, проявляя при этом, кроме некоторых особенностей в организации, еще и различия в спектрах активности и локализации экспрессии, а также дополнительные функции. Например, для дефензин-подобного пептида *Dreissena polymorpha* показана локализация в ноге и участие в процессе образования бисуса (Xu, Faisal, 2010), тогда как у *C. virginica* был обнаружен АМП с выраженной активностью против грам(+) бактерий и характерный главным образом для жабр (Seo et al., 2005), а выявленные дефензины *Ruditapes philippinarum* и пресноводного *Hyriopsis schlegelii* имеют схожий спектр активности и локализацию с АМП у *Mytilus*, но активируются только после бактериального заражения (Peng et al., 2012; Wang et al., 2015c).

Другой группой цистеин-насыщенных АМП являются макины, которые среди двустворчатых моллюсков впервые были обнаружены у *M. galloprovincialis* как мультигенное

семейство (Gerdol et al., 2012), а позже и у других представителей *Bivalvia*. Несмотря на недостаточную изученность их структурных особенностей, макины представляют большой интерес, поскольку помимо антимикробных свойств показано их участие в заживлении ран и выявлен широкий профиль экспрессии во всех основах тканей (Gerdol et al., 2018).

В отличие от канонических дефензинов, большие дефензины помимо характерной структуры с шестью цистеинами на С-конце имеют дополнительный α -спиральный домен на N-конце, присутствие которого также необходимо для антимикробной активности. При этом для двустворчатых моллюсков показан их индуцибельный характер синтеза, однако относительно мест их основной экспрессии имеются противоречивые данные (Zhao et al., 2010a; Rosa et al. 2011; Gerdol et al., 2012; Li et al., 2012; Wang et al., 2014; Yang et al., 2016). Точная локализация была продемонстрирована методами иммуоцитохимии лишь для *Argopecten irradians*, у которого значительное присутствие в эпителии жабр и мантии указывает на роль больших дефензинов в иммунитете слизистых оболочек (González et al., 2017).

Одновременно с митилином из гемолимфы *M. edulis* был выделен и противогрибковый пептид, названный митимицином (Charlet et al., 1996). Как и другие АМП двустворчатых моллюсков, он продуцируется в гранулах гемоцитов в виде неактивного предшественника с дополнительным С-концевым фрагментом. При этом область зрелого пептида может различаться как по количеству, так и по расположению остатков цистеина (Sonthi et al., 2011).

Кроме описанных выше цистеин-насыщенных АМП в гемоцитах *C. gigas* был выявлен богатый пролином пептид CgPrp, который секретируется совместно с дефензинами и проявляет с ними синергетический эффект (Gueguen et al., 2009). Другим примером неродственного дефензина АМП является моллюскидин, широкий спектр антимикробной активности и контитутивная экспрессия которого показана во многих тканях того же моллюска (Seo et al., 2013). Еще один известный в данный момент вариант линейных катионных АМП включает митикалины и модиокалины, характерные для представителей родов *Mytilus* и *Modiolus* соответственно. Исходно обнаруженные благодаря *in silico* подходу, они проявляют широкий спектр активности против грам(+) и грам(-) бактерий. При этом митикалины продуцируются в основном в жабрах и, вероятно, имеют возможную функцию модуляторов связанных с ними микробных сообществ (Leoni et al., 2017).

Последняя основная категория АМП включает пептиды, образующиеся в результате фрагментации более крупных предшественников с различными не связанными с антимикробной активностью функциями. Первым примером является моллюскин, являющийся N-концевым высококатионным фрагментом гистона H2В, который, по-видимому, модулирует бактериальное сообщество в жабрах *C. virginica* и, возможно, других двустворчатых моллюсков (Seo et al., 2011). Другой АМП этой группы выделен из *Anadara kagoshimensis* (ранее *Arca subcrenata*) и

представляет собой фрагмент присутствующего в эритроцитах данного моллюска гемоглобина I (Chen et al., 2017).

Пептидогликан-распознающие белки (peptidoglycan recognition proteins, PGRP) являются одной из групп ППП, недавно описанной у двустворчатых моллюсков. Данный класс соединений подробно описан у плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, у которой PGRP существуют в мембран-связанной форме, непосредственно распознающей ПАМП грам(-) бактерий и запускающей каскад сигнального пути иммунодефицита (IMD), а также растворимой, взаимодействующей с грам(-)-распознающими белками (GNBP) во внеклеточной среде и в комплексе запускающей через Toll-рецепторы профенолоксидазный каскад (Royet, Dziarski, 2007). Также PGRP представлены у позвоночных, но лишь как гуморальные факторы с антибактериальной активностью (Montaño et al., 2011). В случае двустворчатых моллюсков в данный момент выделены и описаны только растворимые PGRP, хотя в их геномах потенциально обнаружены оба варианта, которые, однако, показывают сильное расхождение с PGRP других организмов, а также для них не было обнаружено ключевых участников передачи сигнала активации фенолоксидазной системы (Gerdol, Venier, 2015). Для *Azumapesten farreri* (ранее *Chlamys farreri*), *M. galloprovincialis* и *B. azoricus* показана индуцибельность PGRP в ответ на бактериальную стимуляцию (Su et al., 2007; Martins et al., 2014). Аналогичный результат был выявлен при работе с *Hyriopsis cumingii*, где также была продемонстрирована антибактериальная активность широкого спектра и литическая активность в отношении некоторых пептидогликанов (Yang et al., 2013). Также у *Solen grandis* показана стимуляция экспрессии двух секретируемых коротких PGRP в ответ только на введение пептидогликанов, но не липополисахаридов (Wei et al., 2012b). Кроме того, обнаружен уникальный химерный белок *C. gigas*, включающий в структуру домены PGRP и G-лизоцима (Itoh, Takahashi, 2009), который более подробно будет рассмотрен в разделе, посвященном литическим факторам (раздел 1.2). В целом все данные указывают, что PGRP двустворчатых моллюсков функционально более схожи с таковыми у позвоночных животных, чем у членистоногих, выступая главным образом как гуморальные защитные факторы.

Одной из важнейших для двустворчатых моллюсков защитной системой, непосредственно участвующей в механизмах инкапсуляции и образования узелков, является каскад фенолоксидаз (ФО), обеспечивающий процесс меланизации патогенов. Запуск системы происходит при воздействии внеклеточного протеолитического каскада на профенолоксидазы (проФО), которые таким образом переходят в активную форму ФО. Исходным стимулом являются, как правило, реакции, вызванные взаимодействием ППП с ПАМП, или некоторые средовые стрессоры. Среди всех животных ФО система характерна для членистоногих, у которых ее участники относительно хорошо изучены (Christensen et al., 2005; Tang, 2009), и

моллюсков, по которым данные имеют довольно ограниченный характер (Luna-Acosta et al., 2017). Так, например, ранее уже было отмечено, что за активацию ФО у *D. melanogaster* ответственны выше рассмотренные растворимые PGRP, в то время как для представителей *Bivalvia* они имеют иные функции, и конкретный молекулярный механизм инициации каскада для них пока остается неясным. При этом меланизация как нормальный физиологический процесс, связанный с формированием раковины, у двустворчатых моллюсков известен довольно давно (Waite, Wilbur, 1976). Несколько позже повышенная меланизация, обычно сопровождаемая значительной перестройкой внеклеточного матрикса и изменениями в минерализации раковины, были показаны как яркие отличительные признаки некоторых распространенных патологий мантийной ткани *Bivalvia* (Ford, Borrero, 2001; Paillard, 2004). При этом меланизация, вероятно, не просто внеклеточное событие, так как она также может быть вовлечена во внутриклеточное уничтожение инкапсулированных микроорганизмов (Butt, Raftos, 2008).

Существование внеклеточного каскада проФО, связанного с компонентами гемолимфы, было продемонстрировано на *C. gigas* и *Perna viridis*, где он мог быть индуцирован липополисахаридами, зимозаном и ламинарином (Asokan et al., 1997; Hellio et al., 2007). Кроме того, участие каскада проФО в ответе на паразитарные, бактериальные и вирусные инфекции показано у *Marteilia sydneyi* (Raftos et al., 2014; Luna-Acosta et al., 2017). Однако подробной функциональной характеристики, как и расшифрованных генов, для ФО двустворчатых моллюсков все еще крайне мало. Среди немногочисленных примеров можно отметить выделенный из гемоцитов *A. farreri* белок с ФО активностью и массой 576 кДа, избирательно ингибирующий рост *Vibrio* spp. и *Aeromonas salmonicida* (Xing et al., 2012). Белок со схожей молекулярной массой 555 кДа и *p*-дифенолоксидазной активностью был также выделен из гемоцитов другого гребешка *A. irradians* (Jiang et al., 2011).

Одной из самых больших и при этом наименее изученных групп гуморальных факторов, вовлеченных в иммунный ответ *Bivalvia*, можно назвать протеазы и их ингибиторы. Фактически они регулируют активность множества иммунных реакций и эндогенных молекул, таких как, например, антимикробные пептиды, система комплемента, фенолоксидазный каскад, апоптоз и другие, а также участвуют в разрушении чужеродных агентов, расщепляя белки экзогенной природы (Gerdol et al., 2018). Во многом такой значительный пробел можно объяснить тем фактом, что протеазы относятся к большим и многофункциональным семействам ферментов, одновременно выполняющих роли в самых разнообразных клеточных и тканевых процессах. К относительно изученным у двустворчатых моллюсков протеазам, вовлеченным в иммунные реакции, можно назвать лишь внутриклеточные лизосомальные катепсины, которые были охарактеризованы у *Sinonovacula constricta* (Niu et al., 2013a, Niu et al., 2013b, Niu et al., 2014), *Cristaria plicata* (Hu et al., 2014) и *Saccostrea glomerata* (Ertl et al., 2016). Что касается ингибиторов

протеаз, то особый интерес к ним связан с их активностью, направленной против протеаз патогенов, которые те могут вырабатывать для инактивации защитных компонентов хозяина. Наиболее изученным в этом плане является *P. marinus*. Так повышенное содержание ингибитора сериновой протеазы *C. virginica* (CvSI) из семейства протеаз I84 было показано для особей, которых специально отбирали в связи с их большей устойчивостью к данному патогену, предварительно показав ингибирующую активность CvSI на протеазы *P. marinus* (Xue et al., 2006; La Peyre et al., 2010). Кроме того, повышенную устойчивость к перекиси устриц *Crassostrea corteziensis* по сравнению с *C. virginica* также связывают с различным уровнем экспрессии CvSI у этих видов (Gutiérrez-Rivera et al., 2015). Еще одним изученным семейством являются сериновые протеазы Kazal-типа, которые активируются при повреждениях или бактериальном воздействии в гемоцитах *A. irradians* (Zhu et al., 2006), *A. farreri* (Wang et al., 2008), пищеварительной железе *R. philippinarum* и большинстве органов *Mesodesma donacium* (Maldonado-Aguayo et al., 2013; Yu et al., 2017). Третий большой класс ингибиторов протеаз, связанных с иммунитетом Bivalvia, включает тканевые ингибиторы металлопротеиназ (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP), которые были выявлены и охарактеризованы у некоторых моллюсков, например, *C. gigas* (Montagnani et al., 2001).

Среди гуморальных факторов, обеспечивающих межклеточный сигналинг в иммунном ответе, важнейшую роль играют цитокины, представляющие собой небольшие белки и имеющие мощный иммуномодулирующий эффект даже при незначительных концентрациях. Несмотря на давнюю известность и подробное описание у позвоночных, наличие цитокинов у беспозвоночных долгое время носило дискуссионный характер. В данный момент у двустворчатых моллюсков описан ряд цитокинов, большинство из которых было выявлено благодаря наличию гомологии с таковыми у позвоночных и, таким образом, могут быть относительно легко идентифицированы по высоко консервативным участкам (Gerdol et al., 2018).

Первым идентифицированным цитокином Bivalvia был интерлейкин-17 (IL-17), продуцируемый в значительных количествах в гемоцитах *C. gigas* в ответ на бактериальное воздействие (Roberts et al., 2008). Впоследствии IL-17 были выделены у многих видов двустворчатых моллюсков или обнаружены как высокочувствительные к бактериальным воздействиям и абиотическим стимулам транскрипты (Wu et al., 2013; Moreira et al., 2014; Xin et al., 2015; Xin et al., 2016). Геномные исследования также показали, что IL-17 являются продуктами мультигенного семейства, которое состоит как минимум из пяти членов (Li et al., 2014).

Другими провоспалительными цитокинами, выявленными благодаря гомологичности с известными последовательностями, являются фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF) и воспалительный фактор-1 аллотрансплантата (AIF-1). MIF позвоночных представляет

собой лиганд рецептора CD74, который стимулирует острофазовый ответ и, несмотря на филогенетическую удаленность, у *M. galloprovincialis* он имеет схожую структурную организацию (Parisi et al., 2012). Помимо бактериальной стимуляции экспрессии MIF у *A. farreri* его рекомбинантная форма вызывала миграцию фибробластов позвоночных, что говорит о его высокой консервативности (Li et al., 2011b). Характерной функциональной особенностью AIF-1 является способность активировать макрофаги при повреждении тканей. В случае двустворчатых моллюсков AIF-1 проявлял активность в гемоцитах и мантии *Ostrea edulis* с тяжелой формой бонамиоза (Martín-Gómez et al., 2014), а также его экспрессия могла быть индуцирована у *C. gigas* различными иммунными стимулами (Zhang et al., 2013). Кроме того, AIF-1 устриц были способны повышать фагоцитарную активность гранулоцитов, а также вовлечены в процессы, связанные с повреждениями тканей (Li et al., 2013a), что говорит о явном функциональном сходстве с AIF-1 позвоночных.

Еще одним примером цитокина *Bivalvia*, проявляющего высокую степень структурной и функциональной гомологии с белками позвоночных, является фактор некроза опухоли α (tumor necrosis factor α , TNF- α), для которого показана многофункциональная иммуномодулирующая роль. Факторы данного типа были описаны у *C. gigas*, *Crassostrea hongkongensis* и *O. edulis*. При этом транскрипционная активность TNF- α *C. gigas* активировалась в ответ на иммунную стимуляцию и бонамиоз, модулируя фагоцитоз и апоптоз гемоцитов. Кроме того, рекомбинантные белки TNF- α могут индуцировать экспрессию репортерных генов NF- κ B в линиях клеток человека (Martín-Gómez et al., 2014; Sun et al., 2014; Qu et al., 2017).

В целом интенсивные в последние годы исследования геномов и транскриптомов двустворчатых моллюсков дают основания предполагать наличие у них множества пока функционально не описанных факторов гуморального иммунитета, предсказанных на основании гомологии с известными на данный момент белками. Примерами таких молекул являются предсказанные новые семейства АМП представителей рода *Mytilus* – митикусины (Liao et al., 2013), митихитины, (Qin et al., 2014) и богатые цистеином пептиды I (cysteine-rich peptides, CRP-I) (Gerdol et al., 2015a). Кроме того, значительные эволюционные дистанции, характерные для беспозвоночных в целом и двустворчатых моллюсков в частности, а также их экофизиологические особенности, связанные с насыщенной патогенами средой, широкой представленностью и высокой продолжительностью жизни, позволяют предполагать, что ряд уникальных защитных гуморальных факторов еще только предстоит выявить. Например, потенциально такие молекулы могут обнаружиться среди неизвестных пока посредников в активации С2- и С3-гомологичных компонентов собственной системы комплемента *Bivalvia*, собственных цитокинов и других (Gerdol et al., 2018).

1.1.4. Чувствительность гуморальных показателей гемолимфы двустворчатых моллюсков к средовым факторам

Одним из наиболее значимых параметров, влияющих на физиологию животных, является сезонность, которая в случае морских организмов, таких как двустворчатые моллюски, включает изменения температуры, солености, концентрации различных веществ и содержания пищи в воде, а также гонадный цикл, паразитарную нагрузку и ряд других. В данном аспекте работы по оценке гуморальных факторов иммунитета проводились, как правило, на коммерчески значимых и/или биоиндикаторных видах, среди которых можно отметить *M. galloprovincialis* (Santarem et al., 1994; Soudant et al., 2004; Malagoli et al., 2007), *R. philippinarum* (Matozzo et al., 2003; Soudant et al., 2004), *C. virginica* (Chu, La Peyre, 1989; Fisher et al., 1996) и *C. gigas* (Olafsen et al., 1992).

Одним из наиболее часто оцениваемых гуморальных параметров является концентрация белков в плазме. Так, для *C. virginica* было показано их более высокое содержание в периоды низких температур, а также изменение в случае переноса животных из одного района в другой и значимые различия для выборок из различных локаций (Chu, La Peyre, 1989; Fisher et al., 1996). Также различия при переносе моллюсков из одного района в другой были показаны для *M. galloprovincialis*, однако в целом повышение параметра происходило, напротив, в летние месяцы (Santarem et al., 1994). Аналогичная ситуация была выявлена для *R. philippinarum*, у которого снижение концентрации белков было характерно в зимний период, но при этом у животных из более холодных северных районов этот параметр был в целом выше (Soudant et al., 2004).

Другим часто анализируемым показателем является литическая активность, которая в случае *C. virginica* прямо коррелирует с концентрацией белка и имеет схожую с ней годовую динамику, однако противоположное ей изменение при переносе животных из одного района в другой (Chu, La Peyre, 1989; Fisher et al., 1996). Также схожие с ранее описанным показателем снижения литической активности плазмы зимой отмечены у *M. galloprovincialis* и *R. philippinarum* (Santarem et al., 1994; Soudant et al., 2004; Malagoli et al., 2007).

Агглютинирующая активность плазмы является более стабильным параметром и не изменяется значимым образом в течение года у *C. virginica* (Fisher et al., 1996) и *C. gigas* (Olafsen et al., 1992). И лишь у *M. galloprovincialis* данный показатель повышался в летний период (Santarem et al., 1994).

Кроме явной зависимости иммунных показателей от абиотических факторов, главным образом температуры, многие авторы предполагают влияние на их сезонную динамику у *Bivalvia* режима питания, периода размножения и паразитарные инвазии. Однако, например, зараженность устрицы *C. virginica* одноклеточным паразитом *P. marinus* (Chu, La Peyre, 1989) и мидии *M. galloprovincialis* паразитической копеподой *Mytilicola intestinalis* (Santarem et al., 1994)

не влияли на сезонную динамику оцененных у них гуморальных факторов, а вот половой цикл, напротив, являлся значимым параметром у *R. philippinarum* и *M. galloprovincialis* (Santarem et al., 1994; Matozzo et al., 2003).

В разделах 1.1.3, 1.2 и 1.3 приведено множество примеров влияния различных вирусных, бактериальных и одноклеточных организмов на экспрессию отдельных гуморальных факторов *Bivalvia*, что можно рассматривать как конкретные примеры оценки влияния в моделируемых условиях одного из важнейших биотических факторов – патогенов. Что касается абиотических факторов, то при оценке их влияния на изменения иммунных параметров, как правило, моделируют наиболее значимые из них: рН, концентрация кислорода, соленость, температура воды и присутствие химических веществ, наиболее часто выступающих в роли поллютантов.

В исследованиях иммунного статуса *M. galloprovincialis* и *R. philippinarum* по три группы каждого из видов животных содержали в течение недели при рН 8,1 (контроль), 7,7 и 7,4, и далее еще в течение 2 недель в отсутствии диклофенака (нестероидное противовоспалительное вещество) и с добавлением его в двух разных концентрациях (Munari et al., 2019). На активность лизоцима *M. galloprovincialis* оказывали существенное влияние и рН (активность лизоцима снижалась), и диклофенак (активность фермента увеличивалась независимо от значений рН). У *R. philippinarum* на 14 день происходило снижение активности лизоцима как при измененном рН, так и в присутствии диклофенака, что для последнего показывает противоположные результаты в сравнении с *M. galloprovincialis*. В целом авторы выявили, что более выраженное влияние на иммунитет моллюсков оказывает понижение значений рН как при длительном воздействии, так и при краткосрочном (Munari et al., 2019).

В другом исследовании влияния снижения рН среды на *M. edulis* было показано, что антимикробные пептиды в жабрах меньше подвержены снижению рН, чем в экстрактах гемоцитов (Hernroth et al., 2016). Однако после 4 месяцев экспозиции животных при рН 7,7 (контроль – рН 8,1) снижение бактериостатической активности происходило и в жабрах, что, по мнению авторов, может способствовать проникновению инфекции в организм (Hernroth et al., 2016).

На изменение концентрации кислорода в воде во время отливов и штормов многие морские организмы реагируют проявлением стрессовых реакций иммунитета. Так, для моллюска *Macra veneriformis*, были проведены серии экспериментов, позволяющие пронаблюдать за устойчивостью данного вида к бескислородному стрессу (при помещении моллюсков во влажную камеру) в течение 24, 48 и 72 ч, а также способность в течение 24 ч к восстановлению (Yu et al., 2010). Значения клеточных показателей и активности лизоцима в группе, подвергшейся воздействию воздуха в течение 24 ч, снизились, однако, после помещения моллюсков в естественные условия для восстановления значения нормализовались. В случае воздействия в

течение 48 ч и 72 ч происходило более выраженное изменение параметров. При этом к исходным значениям через 24 ч возвращалось лишь число гемоцитов, а остальные клеточные показатели и активность лизоцима нет (Yu et al., 2010).

При анализе иммунологического состояния *A. farreri* животных помещали в различные температурные режимы (из 17 °С в 11, 23 и 28 °С) в течение 72 часов. Параметры иммунитета измеряли через 1, 24 и 72 ч. Активность кислой фосфатазы была подвержена изменениям при различной температуре: значения уменьшались через 24 часа при 28 °С и через 72 часа при 23 °С. Такая динамика фермента согласуется с данными по фагоцитарной активности, поскольку высвобождение фосфатазы зависит от дегрануляции гемоцитов в процессе фагоцитоза. В целом было выявлено, что температуры выше 20 °С негативно влияют на способность *A. farreri* защищаться от патогенов вследствие снижения активности иммунных параметров, и напротив, гребешки более устойчивы к снижению температур (Chen et al., 2007).

При оценке влияния различных температур на агглютинирующую активность плазмы *Modiolus modiolus* было показано отсутствие значимых различий как в случае содержания животных при 4 °С или 11 °С в течение 65 дней, так и при проведении самой реакции гемагглютинации при 4 °С или 24 °С (Tunkijjanukij et al., 1997).

В работе с *Mercenaria mercenaria* и *C. virginica* было проведено исследование совместного влияния на иммунные параметры двух абиотических факторов – парциального давления CO₂ и содержания кадмия (Ivanina et al., 2014). Было выявлено, что умеренно повышенный уровень CO₂ усиливает негативное влияние кадмия на адгезию гемоцитов и фагоцитарную активность, а также снижает уровни экспрессии мРНК лектинов, белков теплового шока и лизоцима, что это может повысить уязвимость моллюсков перед патогенами в подкисленных и загрязненных местах (Ivanina et al., 2014).

Интересными являются работы по исследованию влияния факторов среды на физиологические показатели мидий рода *Bathymodiolus*, что связано с особенностями глубоководных условий их жизни и возможностью биоиндикации с их помощью соответствующих уникальных экосистем. Так ряд исследований выявил активацию ферментов и изменение экспрессии белков антиоксидантной системы в различных органах при воздействиях кадмием и/или медью (Company et al., 2004, 2010, 2019; Martins et al., 2017; Zhou et al., 2021). Кроме того, для *B. azoricus* показана активация экспрессии защитных белков, включая ранее упомянутый митилин, при воздействии различными видами *Vibrio* (Bettencourt et al., 2009; Martins et al., 2015), причем при сравнении профилей экспрессии *B. azoricus* и *M. galloprovincialis* были обнаружены значительные отличия (Martins et al., 2014), что подчеркивает уникальность глубоководных видов, их физиологии и особенностей иммунного ответа. Также интересным является тот факт, что ранее упомянутые защитные PGRP белки участвуют не только в иммунных

реакциях, но и ответственны за взаимодействие с симбионтной микрофлорой (Détrée et al., 2017; Ikuta et al., 2019), имеющей особое значение в глубоководных условиях с отсутствием доступа солнечного света.

В целом можно отметить, что реакции двустворчатых моллюсков на изменения факторов среды довольно видоспецифичны и общим является только угнетение иммунных реакций при сублетальных воздействиях различной продолжительности.

Описанные выше реакции двустворчатых моллюсков на моделируемые воздействия во многом направлены на раскрытие возможных негативных последствий влияния человеческой деятельности на физиологию данных животных и, как следствие, их выживаемость. Существуют даже некоторые обзоры, связанные с воздействием на физиологию и иммунитет *Bivalvia* отдельных типов поллютантов, таких как, например, ксенобиотики или наночастицы (Girón-Pérez, 2010; Canesi et al., 2012). Однако в них главным образом рассмотрены экспериментальные *in vitro* и *in vivo* модели, поскольку работ по оценке иммунных показателей животных из акваторий с различной антропогенной нагрузкой относительно мало и еще меньше тех, в которых бы рассматривались реакции гуморального иммунитета.

Одной из немногочисленных подобных работ является исследование *R. philippinarum* из нескольких частей Венецианской лагуны, для которых показаны различия в степени антропогенной нагрузки и некоторые другие особенности. При этом для каждой из них были показаны изменения в иммунном статусе животных, в том числе значимые различия отмечены для лизоцима, активность которого была повышенной в акваториях с высокой степенью загрязнения (Matozzo et al., 2010). Примечательно, что в своих дальнейших исследованиях авторы получили аналогичные результаты, а также выявили различия в реакциях на экспозицию с медью у моллюсков из разных по степени загрязнения акваторий и в целом отметили большую устойчивость животных из более импактной акватории (Matozzo et al., 2013).

В другой работе, проведенной на *Crassostrea rhizophorae* с побережья Бразилии, была обнаружена повышенная активность карбоангидразы в гемолимфе, жабрах и мантии устриц, собранных из места с высоким антропогенным воздействием по сравнению с чистой акваторией. При этом гемолимфа и жабры оказались более чувствительными по данному показателю. Также было обнаружено, что выраженность отличий возрастала в период дождей, что, по-видимому, связано с увеличением загрязнения в импактной зоне из-за усиления стока воды и вместе с ней поллютантов в море, или же опреснение усиливало восприимчивость моллюсков к имеющемуся загрязнению (Dos Santos et al., 2013).

Отсутствие чувствительности исследованных гуморальных факторов иммунитета к загрязнению было показано для *M. edulis* из акваторий Дании. В отличие от клеточных показателей, гемолитическая активность не показала корреляций с количеством измеренных

поллютантов в тканях, а также различий между акваториями с различной антропогенной нагрузкой, но была чувствительна к солености воды (Höher et al., 2012).

В целом можно отметить, что тема как комплексного анализа параметров иммунитета *Bivalvia* в связи с загрязнением, так и отдельно гуморальных, является довольно слабо освещенной и требует большего числа работ для формирования ясной картины реакции такого воздействия на организм моллюсков.

1.2. Литические факторы гемолимфы двустворчатых моллюсков

У позвоночных животных одним из главных литических факторов, обеспечивающих лизис (разрушение) проникших внутрь организма патогенов, является система комплемента. Кроме того, в составе различных эпителиальных секретов, например, на поверхности слизистых оболочек, имеются другие эффективные литические агенты – лизоцимы. У двустворчатых моллюсков также обнаружены комплемент-подобные белки, лизоцимы и так называемые бактерицидные повышающие проницаемость клеточной мембраны (BPI) белки (Gerdol et al., 2018).

Литические факторы беспозвоночных ранее также подразделяли на гемолизины и бактериолизины в зависимости от типа клеток, которые они в большей степени разрушали или просто были использованы в тест-системе для конкретного случая. При этом первыми были обнаружены гемолизины, которые также называли комплемент-подобными факторами, поскольку являлись термолabile (инактивировались при температуре около 56 °C), чувствительными к протеолитическим энзимам и Ca^{2+} -зависимыми. К бактериолизинам же относили так называемые лизоцим-подобные вещества, ряд из которых впоследствии были классифицированы как отдельная группа лизоцимов (Ratcliffe et al., 1985; Галактионов, 2005).

В данный момент к лизоцимам относят белки, участвующие в реакциях неспецифического иммунитета и имеющие выраженную литическую активность в отношении бактерий. Несмотря на схожую пространственную организацию лизоцимов, их первичные последовательности могут в значительной степени различаться, что лежит в основе их классификации на три основных типа: С-лизоцимы – от "chicken-type", G-лизоцимы – от "goose-type" и I-лизоцимы – от "invertebrate-type" (Callewaert, Michiels, 2010). При этом в данный момент известно, что у одного и того же вида могут присутствовать лизоцимы всех трех типов, причем по несколько вариантов одновременно (Gerdol, Venier, 2015).

Несмотря на отличия первичных последовательностей, все лизоцимы обладают одинаковой ферментативной активностью гликозидгидролазы, которая катализирует гидролиз пептидогликанов и, в меньшей степени, хитина. Таким образом лизоцимы проявляют свою

активность в основном против грам(+) бактерий, поскольку в структуре клеточной стенки грам(-) практически отсутствуют пептидогликаны.

На данный момент наиболее представленными у двустворчатых моллюсков считаются лизоцимы I-типа, которые были обнаружены и охарактеризованы у *Chlamys islandica* (Nilsen et al., 1999), *C. gigas* (Matsumoto et al., 2006), *C. virginica* (La Peyre et al., 2010), *M. meretrix* (Yue et al., 2011), *H. cumingii* (Ren et al., 2012) и ряда других. Углубленный филогенетический анализ кодирующих последовательностей показал некоторую степень гомологии лизоцимов I-типа и С-типа позвоночных, что, вероятно, указывает на их эволюционное происхождение от общего предка (Bachali et al., 2002). Интересным открытием последних лет является обнаруженная у гидротермальных мидий *B. azoricus* роль лизоцимов I-типа с паралоговым происхождением генов не только в противомикробной защите, но и в управлении их симбиотическими сообществами (Detree et al., 2016).

Лизоцимы С-типа встречаются у *Bivalvia* в значительно меньшей степени. Представителем данного типа является обнаруженный у *M. galloprovincialis* белок, который позже был охарактеризован как индуцибельный гуморальный фактор иммунитета, способный воздействовать на широкий круг бактерий (Venier et al., 2009; Wang et al., 2013b).

Лизоцимы G-типа долгое время считались специфичными для позвоночных, однако впоследствии были обнаружены, в том числе, и у двустворчатых моллюсков, в частности у гребешков *A. farreri* (Zhao et al., 2007; Li et al., 2013b) и *Mizuhopecten yessoensis* (He et al., 2012), причем их функции были показаны как в иммунитете, так и в пищеварении. Уникальным в плане структурной организации является индуцибельный химерный белок *C. gigas*, который сочетает С-концевой домен лизоцима G-типа с N-концевым доменом пептидогликан-распознающего белка (PGRP), проявляя функции обоих – литическую и связывания бактерий (Itoh, Takahashi, 2009).

Совсем недавно у *R. philippinarum* был обнаружен еще один тип лизоцима, который показал значительное сходство с лизинами бактериофагов, которые те используют для разрыва цепей пептидогликанов стенок инфицированных бактериальных клеток и высвобождения зрелых фагов (Ding et al., 2014). Дальнейшие исследования на основе геномных и транскриптомных данных указали на вероятное происхождение этого гена, выявив его ко-вариант в вирусах, который путем горизонтального переноса мог закрепиться у двух основных групп двустворчатых моллюсков – *Heterodonta* и *Palaeoheterodonta*. Впоследствии эти приобретенные последовательности претерпели сложные геномные перестройки, которые в целом способствовали увеличению антибактериального потенциала (Ren et al., 2017).

Аналогичное лизоцимам действие на грам(+) бактерии в отношении грам(-) бактерий проявляют ранее упомянутые и обнаруженные у многих животных ВРІ-белки, работа которых

основана на образовании пор в клеточных стенках при распознавании в их составе специфических липополисахаридов. У *S. gigas* обнаружены две формы таких белков, кодируемых отдельными генами и отличающихся по локализации и паттернам экспрессии. Одна форма характерна для слизистых эпителиев, вторая встречается в большинстве органов с максимальным содержанием в жабрах, и при этом введение моллюскам липополисахаридов вызывает у них различную степень стимуляции экспрессии в тканях (Gonzalez et al., 2007b; Zhang et al., 2011b).

Растворимые факторы, схожие с белками системы комплемента позвоночных, обнаружены у многих беспозвоночных (Ratcliffe et al., 1985; Галактионов, 2005; Gerdol et al., 2018). При этом в случае двустворчатых моллюсков в данный момент идет обсуждение не отдельных комплемент-подобных молекул, а собственной полноценной системы комплемента, многие аспекты организации и функционирования которой пока не ясны, но ее существование выглядит вполне логично и обоснованно (Gerdol et al., 2018). В пользу данного предположения говорит наличие в геномах *Bivalvia* гомологов C2 и C3 компонентов комплемента (Moreira et al., 2012; Zhang et al., 2014a; Gerdol, Venier, 2015), вовлеченность в иммунный ответ и индуцибельность для которых показана экспериментально (Prado-Alvarez et al., 2009; Peng et al., 2016). Кроме того, удивительное многообразие лектинов C-типа, FReD-содержащих и C1qDC белков, выступающих в роли опсопинов, по всей видимости, может быть эффективной заменой антител, маннан-связывающих лектинов и фиколинов, инициирующих запуск каскада комплемента у позвоночных (Gerdol et al., 2018).

1.3. Агглютинины и опсопины гемолимфы *Bivalvia*

Агглютинины – это вещества, обеспечивающие склеивание (агрегацию) клеток и молекул. Формирование конгломератов затрудняет нормальную подвижность и размножение патогенов, усиливает в их направлении хемотаксис фагоцитов и, таким образом, ускоряет процессы элиминации чужеродных агентов. Опсопины – вещества, которые служат для фагоцитов и других защитных клеток знаком "чужое", поскольку они имеют рецепторы к этим веществам и атакуют любой опсонизированный объект. Фактически две эти функции, как правило, выполняют одни и те же молекулы, как, например, в случае позвоночных различные антитела, а в случае беспозвоночных, например, лектины, которые ранее нередко называли функциональными аналогами антител (Ratcliffe et al., 1985; Полевщиков, 1996; Галактионов, 2005).

Ранее, до определения биохимической природы и принадлежности к конкретным группам веществ, агглютинины подразделяли только на гемагглютинины и бактериоагглютинины, агрегирующие, соответственно, эритроциты или бактерий (Ratcliffe et al., 1985; Полевщиков, 1996). В настоящее время данные термины используются, как правило, лишь в контексте

определения функциональной активности агглютининов при использовании конкретной тест-системы на основе эритроцитов или бактерий.

Как и многие гуморальные факторы, агглютинины могут быть как конститутивными, содержание которых поддерживается на постоянном уровне, так и индуцибельными, выработка которых усиливается в случае иммунного ответа. Кроме того, показано, что многие агглютинины плазмы моллюсков являются зависимыми от бивалентных катионов, главным образом Ca^{2+} (Ratcliffe et al., 1985; Полевщиков, 1996; Галактионов, 2005).

1.3.1 Лектины

Лектины – это белки и гликопротеины, способные к обратимому связыванию с углеводами и/или углеводной частью гликоконъюгатов без нарушения ковалентной структуры любых из узнаваемых гликозидных лигандов (Полевщиков, 1996; Игнатов, 1997). Они встречаются во всех организмах от вирусов, бактерий и одноклеточных до цветковых растений и высших позвоночных. Роль этих белков в жизнедеятельности организмов трудно переоценить, поскольку они являются одними из основных участников белок-углеводных взаимодействий и их работа во многом обеспечивает взаимодействия типа "клетка-клетка" и "клетка-внеклеточный матрикс". Среди процессов и функций, в которые вовлечены лектины, можно назвать взаимодействия паразит-хозяин, симбиогенез, оплодотворение, эмбриогенез, гистогенез, гуморальную и рецепторную регуляцию от внутриклеточных компартментов до многоклеточного организма, иммунные реакции (Полевщиков, 1996; Игнатов, 1997; Sharon, Lis, 2007).

В данный момент лектины разделяют по нескольким признакам. Самая первая классификация, которая до сих пор во многом не потеряла своей актуальности, была основана на источниках выделения: лектины растений, животных, грибов, бактерий, вирусов и/или более узких групп организмов. Во-вторых, как и многие белки, их подразделяют на мембранные и растворимые. При этом, также, как и в случае других протеинов, две эти формы лектинов могут кодироваться одними и теми же генами, то есть фактически являться изоформами, в структуре которых присутствуют или отсутствуют фрагменты, ответственные за заякоривание в мембране. Однако основной сейчас классификацией является разделение лектинов по структуре углевод-распознающих доменов (carbohydrate recognition domain, CRD). В данный момент выделяют лектины С-типа, R-типа, F-типа, H-типа, I-типа, P-типа, L-типа, M-типа, галектины (ранее S-типа), пентраксины, фиолины и ряд других более мелких групп, каждая из которых характеризуется своими особенностями работы, структуры CRD, углеводной специфичности, представленности в организмах и другими (Vasta et al., 2007; Gerdol et al., 2018).

В плане иммунного ответа лектины представляют собой как ПРР, так и эффекторные молекулы. Обеспечивая первичное распознавание ПАМП и как рецепторы, и как опсонины, они инициируют последующие механизмы уничтожения и элиминации чужеродных агентов, например, через предполагаемую систему комплемента моллюсков (Fujita et al., 2004; Vasta et al., 2007). С другой стороны, индуцибельные лектины, агглютинируя патогены, препятствуют их размножению и распространению, способствуя при этом их фагоцитозу и изоляции путем инкапсуляции или формирования узелков, а также напрямую вызывая их гибель и разрушение (Полевщиков, 1996; Gerdol et al., 2018). В отличие от антител, с которыми часто проводят функциональную аналогию, лиганды лектинов генетически жестко определены. Однако сложность их репертуаров у организмов, лишенных специфического иммунитета, говорит о широком разнообразии углеводных фрагментов ПАМП, которые они способны распознавать, обеспечивая, таким образом, эффективность их врожденного иммунитета (Vasta et al., 2007, Vasta et al., 2012a; Vasta, Ahmed, 2008).

Первыми лектинами, у которых в структуре CRD были определены уникальные для их семейств мотивы, были представители S-типа (ныне галектины) и C-типа (Drickamer 1988). В случае последних, помимо характерной организации CRD, ключевой особенностью является функциональная Ca^{2+} -зависимость, которая легла в основу их названия. При этом особенности организации CRD C-типа довольно разнообразны, и структурно они могут быть связаны с множеством лектиновых и нелектиновых доменов, составляющих в совокупности химерные белки, наделенные множеством функциональных свойств (Zelensky, Gready, 2005; Pees et al., 2016). Широкая представленность данного семейства у всех животных во многом связана с многообразием путей и процессов, в которые они вовлечены. Как у позвоночных, так и у беспозвоночных лектины C-типа являются ключевыми факторами распознавания инфекционного заражения через углеводные паттерны. При этом они играют и эффекторные роли, обеспечивая и регулируя иммобилизацию, фагоцитоз, клиренс, инкапсуляцию, образование узелков, активацию каскадов проФО и системы комплемента, прямую антимикробную активность и регуляцию экспрессии АМП (Vasta et al. 2007; Vasta and Ahmed 2008; Wang et al. 2014b; Pees et al. 2016; Zhao et al. 2016b). На различных видах моллюсков, таких как *A. farreri*, *A. irradians*, *C. virginica*, *R. philippinarum*, *M. galloprovincialis*, *B. azoricus* и ряде других, были проведены многочисленные исследования лектинов C-типа в иммунной защите, в которых однозначно была показана их роль в распознавании, агглютинации и опсонизации бактериальных патогенов (Zheng et al., 2008; Zhu et al., 2008; Jing et al., 2011; Huang et al., 2013; Mu et al., 2014; Martins et al., 2014; Huang et al., 2015b; Yang et al., 2015). В целом репертуар лектинов C-типа у любого отдельного вида, по-видимому, очень разнообразен и сложен, а места их локализации и экспрессии включают гемоциты, плазму и паллиальную слизь, а также органы

и ткани, имеющие отношение к иммунным ответам, такие как мантия, жабры и кишечник. Также эксперименты с инфекционным заражением показали, что в большинстве случаев их экспрессия модулируется воздействием потенциальных патогенов (Zhu et al., 2008; Mu et al., 2014; Martins et al., 2014). Кроме того, показана их потенциальная роль в активации предполагаемой системы комплемента моллюсков (Li et al., 2015; Wang et al., 2017).

Другое упомянутое выше семейство галектинов представляет собой β -галактозил-связывающие белки, которым для проявления активности требуется восстанавливающая среда, но не Ca^{2+} , как у ранее описанной группы (Vasta, Ahmed, 2008; Vasta et al., 2012b). При широкой представленности среди организмов, галектины в плане структуры CRD довольно консервативны, хотя у млекопитающих выделяют как минимум три их типа по сложности доменной организации. Это, вероятно, позволяет им проявлять функциональное разнообразие, участвуя в процессах развития, клеточной адгезии и подвижности, регуляции иммунного гомеостаза и распознавании углеводов на поверхности вирусов, бактерий и простейших-паразитов (Vasta, 2009). Галектины моллюсков менее разнообразны, но также демонстрируют различные доменные организации, углеводную специфичность к олигосахаридам групп крови и активацию экспрессии инфекционным заражением, что подтверждает их иммунную роль (Tasumi, Vasta, 2007; Feng et al., 2013; Feng et al., 2015; Kurz et al., 2013; Vasta et al., 2015). Большинство исследований при этом направлено на идентификацию их транскриптов в различных тканях и типах клеток, включая гемоциты, а также оценку экспрессии при экологическом или инфекционном воздействии (Yamaura et al., 2008; Yoshino et al., 2008; Song et al., 2010b, Song et al., 2011; Zhang et al., 2011a; Bao et al., 2013; Dheilly et al., 2015; Bai et al., 2016). Среди структурно и функционально охарактеризованных галектинов *Bivalvia* можно отметить CvGal1 и CvGal2 из *C. virginica* (Tasumi, Vasta, 2007; Feng et al., 2013, Feng et al., 2015; Kurz et al., 2013), доменная организация которых не соответствует ни одному из типов, описанных у позвоночных (Vasta, Ahmed, 2008; Vasta et al., 2012b), но включает по четыре канонических CRD галектинов (Tasumi, Vasta, 2007; Feng et al., 2013; Feng et al., 2015). Дальнейшие исследования показали, что галектины моллюсков являются довольно консервативными и в большинстве случаев их можно разделить на содержащие 2 или 4 CRD (Vasta et al., 2015). С функциональной точки зрения CvGal1 распознает бактериальных и одноклеточных патогенов и способствует их фагоцитозу, а также может избирательно связываться с компонентами фитопланктона, что указывает на его участие в поглощении микроводорослей (Tasumi, Vasta, 2007). Кроме того, недавние исследования показывают, что *P. marinus* адаптировались к нарушению механизмов врожденного иммунитета и/или распознавания пищи у устриц, чтобы проникнуть в клетки-хозяева, будучи преимущественно распознаваемыми CvGal1 и CvGal2 (Tasumi, Vasta 2007; Feng et al., 2013, Feng et al., 2015; Kurz et al., 2013; Vasta et al., 2015).

Следующая группа лектинов R-типа характеризуется CRD с уникальной структурой "β-трилистника", каждый сегмент которого содержит сайт связывания углеводов и была описана для лектинов R-типа высших растений, гидролаз прокариот, гликозилтрансфераз млекопитающих и рецепторов маннозы макрофагов (Cummins, Schnaar, 2017). Среди двустворчатых моллюсков лектины данного типа со специфичностью к α-D-галактозе и N-ацетил-D-галактозамину и схожей первичной структурой были описаны для мидий *Crenomytilus grayanus* – CGL (Jakób et al., 2015; Chernikov et al., 2017a; Chernikov et al., 2017b), *M. galloprovincialis* – MytiLec-1 (Hasan et al., 2016; Terada et al., 2016), *Mytilus trossulus* – MTL (Chikalovets et al., 2016) и *Mytilus californianus* (García-Maldonado et al., 2017). CGL демонстрирует типичную структуру β-трилистника (Jakób et al., 2015), так же, как и MytiLec-1 (Terada et al., 2016), тогда как две другие изоформы (MytiLec-2 и -3) из того же вида содержат дополнительный порообразующий домен (Hasan et al., 2016; Terada et al., 2016). С точки зрения функциональной активности лектины R-типа мидий могут распознавать и агглютинировать как грам(+), так и грам(–) бактерии через углеводные детерминанты, проявлять бактериостатическую и противогрибковую активность (Jakób et al., 2015; Hasan et al., 2016; Terada et al., 2016; Chernikov et al., 2017a; Chernikov et al., 2017b). Примечательно, что MytiLec и CGL также проявляют иммуномодулирующую активность в отношении макрофагов млекопитающих, а также проапоптотическую или противоопухолевую активность за счет связывания с глоботриозой на гликолипидах клеточной поверхности (Chernikov et al., 2017a; Chernikov et al., 2017b).

Группой, исходно обнаруженной в моллюсках, являются лектины H-типа, выделенные из секрета альбуминовых желез, покрывающего оплодотворенные ооциты у брюхоногого моллюска *Helix pomatia*. Такая уникальная локализация, присутствие в гемолимфе и их связывание с потенциально патогенными бактериями привели к предположению об их функциях защиты яиц и иммунитета взрослых улиток. При этом их специфичность к N-ацетилгалактозамину и эритроцитам человека группы крови A привела к их использованию в качестве реагентов для их типирования (Uhlenbruck, Prokop, 1966). Структурные исследования показали, что лектины H-типа имеют гексамерную структуру с β-складчатой организацией субъединиц. Несмотря на обнаружение секреции данных белков у других представителей рода *Helix* и садовой улитки *Cepaea hortensis*, пока нет никаких функциональных данных для этого типа лектинов в двустворчатых моллюсках, кроме той, что они не являются широко распространенным семейством генов (Gerdol, 2017).

Последними из идентифицированных лектинов являются представители семейства F-типа (Odom, Vasta, 2006), для CRD которых характерна особая цилиндрическая "jelly-roll" упаковка β-складчатостей, а также специфичность к фукозе и Ca²⁺-зависимость (Bianchet et al., 2002). При этом в их структуре количество CRD может быть одинарным, двойным или множественным, а

также могут встречаться функционально иные домены, что формирует лектиновые субъединицы плейотропных свойств даже в пределах одного вида (Bianchet et al., 2002; Odom, Vasta, 2006; Bianchet et al., 2010; Vasta et al., 2012a). Кроме того, несмотря на характерность упаковки в CRD F-типа, она не является уникальной для представителей данного семейства и встречается у других белков с разнообразными функциями (Bianchet et al., 2002). Интересно, что при своей широкой представленности филогенетический анализ последовательностей CRD F-типа с одной стороны согласуется с таксономией, но с другой показывает неравномерное распределение внутри групп, что говорит о вероятной подверженности их генов дупликациям, вторичной потере и латеральному переносу (Bianchet et al., 2002; Bishnoi et al., 2015). Лектины F-типа уникальны также количеством и вариабельностью изоформ, которые могут быть экспрессированы у одной особи, что было показано на так называемых биндинах – белках, участвующих в распознавании гамет у *C. gigas* (Springer et al., 2008; Moy et al., 2008; Moy, Vacquier, 2008). Другие представители семейства участвуют в иммунном ответе, демонстрируя одиночные или тандемно выстроенные CRD с различной специфичностью в одной субъединице, и потенциально могут связывать распознанные патогены с эндогенными гликанами на поверхности фагоцитарных клеток (Odom, Vasta, 2006; Bianchet et al., 2010). Например, PmF-лектин устрицы *Pinctada fucata martensii* высоко экспрессирован в гемоцитах и жабрах и еще больше повышает ее при заражении *Vibrio* sp. (Wang et al., 2011a). Интересной также является идентификация F-лектина в матриксе раковины и тканях мантии *Mya truncata*, которая предполагает исходную его секрецию мантией в растворенном виде с иммунными свойствами с последующим встраиванием в матрикс раковины при ее росте (Arivalagan et al., 2016).

1.3.2. Белки, содержащие фибриноген-ассоциированные домены

Помимо лектинов к растворимым PPP, способным к агглютинации и опсонизации, относят ранее упомянутые содержащие фибриноген-ассоциированные домены (FReD-содержащие) белки. Одним из первых таких веществ с лектин-подобными свойствами был охарактеризован AiFREP из гребешков *A. irradians*, рекомбинантная форма которого агглютинировала как грам(+), так и грам(-) бактерии (Zhang et al., 2009). Дальнейшая работа со схожим белком AiFREP-2 из того же вида подтвердила их функциональность как растворимых PPP (Yang et al. 2014). Схожие результаты были получены и в случае рекомбинантного FReD-содержащего белка ChFCN из *C. hongkongensis* (Xiang et al., 2014).

Биоинформатический анализ нуклеотидных баз данных показал, что FReD-содержащие белки у представителей рода *Mytilus* являются частью большого мультигенного семейства (Gorbushin, Iakovleva, 2011). В данный момент в геномах двустворчатых моллюсков известно более 100 генов FReD-содержащих белков, которые в

основном экспрессируются в гемоцитах, жабрах и пищеварительной железе (Zhang et al., 2015; Huang et al., 2015a; Gerdol, Venier, 2015). Важно отметить, что зачастую из-за характерной углевод-связывающей активности FReD-содержащие белки относят к группе лектинов (Vasta, Ahmed, 2008; Catanzaro et al., 2020).

1.3.3. Белки, содержащие C1q-домен

Следующей группой PPP, имеющих широкую представленность среди двустворчатых моллюсков, являются белки, содержащие C1q-домен (C1qDC белки). У позвоночных животных C1q-белок является ключевым компонентом системы комплемента, запускающим классический путь ее активации. У беспозвоночных C1q-домены и соответствующие белки показывают обширный спектр лигандов, включая разнообразные ПАМПИ. При этом наибольшее количество генов, кодирующих C1qDC белки, выявлено именно у представителей Bivalvia: более 150 в виде транскриптов в гемоцитах *M. galloprovincialis* (Gestal et al., 2010; Gerdol et al., 2011), 296 в геноме у *P. fucata* (Takeuchi et al., 2016), 337 у *C. gigas* (Gerdol et al., 2015b), 445 у *Modiolus philippinarum* (Sun et al., 2017), 554 у *S. glomerata* (Powell et al., 2018), 476 у *C. virginica* (Gerdol et al., 2019) и 1182 у *R. philippinarum* (Mun et al., 2017). Такое огромное число генов, вероятно, возникло вследствие множественных дубликаций геномных фрагментов, причем результаты анализа говорят о том, что данный процесс происходил у различных видов независимо (Mun et al., 2017). Предположительно, обилие C1qDC-белков позволяет покрыть защитные потребности двустворчатых моллюсков в отношении различных патогенов за счет потенциального структурного многообразия ПАМПИ, которые эти белки могут связывать, что дает ощутимое преимущество для адаптации к условиям непосредственного контакта со средой, насыщенной микроорганизмами (Gerdol et al., 2015b; Gerdol et al., 2018).

Однако геномные исследования не показывают функциональной характеристики, что является необходимым для подтверждения связи между увеличением числа C1qDC-белков и улучшением иммунных функций двустворчатых моллюсков. Усиление транскрипционной активности генов C1qDC-белков выявлено у *Crassostrea ariakensis* в ответ на подобные рикетсиям организмы, а также показана их вовлеченность в процессы воздействия возбудителей болезни коричневого кольца (brown ring disease, BRD) на *R. philippinarum*, QPX (quahog parasite unknown) инфекции у *M. mercenaria* и *Perkinsus olseni* у *Ruditapes decussatus* (Xu et al., 2012b; Leite et al., 2013; Allam et al., 2014; Wang et al., 2016). Кроме того, повышение экспрессии у различных видов вызывают как целые грибы и бактерии (Kong et al., 2010; Gestal et al., 2010; Li et al., 2011a; Gerdol et al., 2011; Jiang et al., 2015), так и их компоненты, такие как липополисахариды, пептидогликаны, β -глюкан и кополимер полиинозиновой и полицитидиловой кислот (poly I:C), в целом усиливая их роль как PPP (Wang et al., 2012a, 2012c;

Yang et al., 2012; Wang et al., 2015a). Данные по экспрессии генов были дополнены функциональными исследованиями соответствующих рекомбинантных белков C1qDC, которые показали способность связывать липополисахариды, протеогликаны, poly I:C, маннан, β -1,3-глюкан и дрожжевой глюкан (Wang et al., 2012a; Jiang et al., 2015; Wang et al., 2015a), а также живые бактерии (Wang et al., 2015a; Zhao et al., 2016; Huang et al., 2016). Кроме того, рекомбинантный белок C1qDC устрицы *C. hongkongensis* был способен ингибировать рост бактериальных культур (He et al., 2011), а два других белка морского гребешка *A. irradians* агглютинировали различные виды бактерий и грибов с дифференцированной степенью селективности (Kong et al., 2010; Wang et al., 2012a). Опсонизирующая роль C1qDC-белков, связывающих различные ПАМП, также была показана у *M. galloprovincialis* (Pezzati et al., 2015), гребешка *A. farreri* (Wang et al., 2012c) и устрицы *C. gigas* (Jiang et al., 2015). Интересным фактом является то, что рекомбинантные белки C1qDC способны взаимодействовать с агрегированными при нагревании человеческими иммуноглобулинами G и M (Wang et al., 2015a), что, в свою очередь, наталкивает на мысли о связи рассматриваемой группы белков с системой комплемента Bivalvia, существование которой предполагается некоторыми авторами, как было упомянуто в разделе 1.2.

Что касается мест синтеза C1qDC-белков у двустворчатых моллюсков, то в данный момент известно, что они экспрессируются во всех основных тканях, особенно в жабрах и пищеварительной железе, а не только в гемоцитах, как считалось ранее. При этом предполагаются и их иные, отличные от иммунного ответа, роли (Gerdol et al., 2015b).

Важно отметить, что многие C1qDC белки Bivalvia, в большинстве являясь секреторными ПРР, еще и способны нековалентно связывать углеводы, что фактически является функциональным признаком лектинов. Ввиду такого выраженного сходства, C1qDC белки двустворчатых моллюсков нередко относят либо к лектинам (Zhang et al., 2008; He et al., 2011; Li et al., 2011; Yang et al., 2012), либо к лектин-подобным белкам, подчеркивая при этом их вероятное происхождение именно как лектинов с последующей диверсификацией и приобретением у новых форм более узких специфичностей и функций (Gerdol et al., 2011, 2015b, 2019).

1.4. Углевод-распознающие белки как молекулярные инструменты в медицине и биотехнологии

Как упоминалось ранее, белок-углеводные взаимодействия лежат в основе множества важнейших биологических процессов. Также было отмечено, что наиболее обширной и изученной группой углевод-распознающих белков являются лектины, и только в последние годы интенсивные исследования в области биохимии и геномики беспозвоночных привели к

открытию новых групп лектин-подобных молекул с аналогичными свойствами, таких как FReD-содержащие и C1qDC белки. Широчайшая представленность и характерная функциональность лектинов привела к их активному использованию в биотехнологии, которое началось еще с рицина и арбина, открытых и выделенных более 100 лет назад. Лектины сыграли немаловажную роль на ранних этапах становления иммунологии и гематологии, в первом случае как модельные антигены, а во втором как вещества способные распознавать группы крови. В данный момент существует множество обзоров, посвященных отдельным аспектам использования лектинов как инструментов в биомедицине и биотехнологии (Bojarová, Křen, 2016; Gorakshakar, Ghosh, 2016; Manning et al., 2017; Mitchell et al., 2017; Breitenbach Barroso Coelho et al., 2018; Carvalho et al., 2018; Devi, Basil-Rose, 2018; Hendrickson, Zherdev, 2018; Mazalovska, Kouokam, 2018; Singh, Walia, 2018; Catanzaro et al., 2019; Laaf et al., 2019; Mishra et al., 2019; Višnjiar et al., 2019; Wu, Liu, 2019; Hassan et al., 2020; Mazalovska, Kouokam, 2020), при этом с каждым годом внимание к ним только усиливается.

Лектины все так же остаются важным инструментом иммуногематологии, продолжая классически использоваться для обнаружения специфических антигенов эритроцитов и активации различных типов лимфоцитов, а кроме того стала обсуждаться перспектива их использования как инструментов выявления стволовых клеток через углеводные маркеры (Gorakshakar, Ghosh, 2016; Carvalho et al., 2018). Также не теряет актуальности их использование в картировании гликанов в гистохимии и клеточной биологии (Manning et al., 2017). Внедрение лектинов в ставшую классической технологию иммуноферментного анализа привело к появлению его нового аналога – ELLSA (enzyme-linked lectin sorbent assay), отличающегося направленностью на выявление углеводных компонент (Wu, Liu, 2019). Кроме того, современные аналитические методы с применением лектинов включают лектиноаффинную хроматографию, лектиновый блоттинг, анализ на микропланшетах, микрочипах и биосенсорные технологии (Hendrickson, Zherdev, 2018). Огромный потенциал данной группы белков и современная тенденция к миниатюризации технологий анализа, как в науке, так и в клиницистике, привела к активному обсуждению использования лектинов в системах типа "лаборатория на чипе" (lab-on-a-chip), идеология которых заключается в проведении сложных комплексных процедур с использованием минимального количества аналитов на микрочипах в один шаг (Hassan et al., 2020).

Другим интенсивно развивающимся направлением является применение лектинов в составе биокomпозитных материалов и структур самого различного назначения и типа, от гликозилированных органических макроструктур до гликонаночастиц на основе неорганических матриц (Bojarová, Křen, 2016). При этом особенность использования в составе наночастиц заключается в их нацеливании по углеводным детерминантам, что может быть использовано в

адресной доставке лекарств, таргетной терапии и пероральной иммунизации (Devi, Basil-Rose, 2018).

Многие из лектинов показывают противовирусную активность, в результате чего некоторые из них были выдвинуты в качестве кандидатов на разработку методов профилактики или лечения вирусных инфекций (Mitchell et al., 2017). Среди потенциальных мишеней при этом отмечают ВИЧ, гепатит, грипп, энцефалит, коронавирус, вирус простого герпеса и другие (Singh, Walia, 2018). Особое внимание при этом уделяют исследованиям возможности применения лектинов в борьбе со СПИДом и сопутствующими инфекциями у ВИЧ-инфицированных (Mazalovska, Kouokam, 2018).

Проблемы развития у инфекционных бактерий резистентности к антибиотикам и сложностей в поисках их новых эффективных представителей толкает на поиски новых антимикробных агентов. Лектины считаются одной из перспективных в этом направлении групп, поскольку множество из них имеют иммуномодулирующую активность, в том числе путем запуска цитокиновых каскадов и ускорения фагоцитоза, а также способны напрямую уничтожать данные патогены (Breitenbach Barros Coelho et al., 2018; Mishra et al., 2019). Кроме того, рассматривается возможность применения вакцин на основе комплексов инактивированных нагреванием бактерий с лектинами, которые должны вызывать активную выработку антител с более разнообразным репертуаром распознаваемых антигенных детерминант (Mishra et al., 2019), а также применение лектинов и как противогрибковых агентов (Breitenbach Barros Coelho et al., 2018). Также значительный потенциал в качестве противомикробных агентов имеется у C1qDC белков, широко представленных в геномах двустворчатых моллюсков и проявляющих выраженную способность связывать как различные микроорганизмы, так и компоненты их клеточных стенок (Wang et al., 2012a; Wang et al., 2015a; Zhao et al., 2016).

Поскольку злокачественная трансформация тесно связана с изменением углеводного репертуара клеточной поверхности и внеклеточного матрикса, то углевод-распознающие белки могут представлять собой ценный инструмент для диагностики опухолей и потенциально быть использованными в составе терапевтических средств. Для ряда лектинов уже показаны цитотоксические эффекты, проявляющиеся главным образом за счет индукции апоптотических и аутофагических путей в злокачественных клетках (Mazalovska, Kouokam, 2020; Catanzaro et al., 2020). При этом рассматриваются варианты, включающие их использование в нанотераностике, представляющей собой объединение диагностических и терапевтических функций в единой системе на основе нанотехнологий (Višnjač et al., 2019). Кроме того, известно изменение структуры и функционирования галектинов на поверхности ряда трансформированных клеток, что привело к разработке возможных стратегий лечения на основе влияния гликомиметиков и неогликоконъюгатов на опухолевые галектины (Laaf et al., 2019). Группы FReD-содержащих и

C1qDC белков также могут быть рассмотрены с точки зрения онкодиагностики и онкотерапии. Так, например, давно известно такое явление как сиалирование клеточных поверхностей при онкогенезе и метастазировании. При этом недавний анализ показал принадлежность некоторых ранее описанных сиало-специфичных лектинов моллюсков к FReD-содержащим или C1qDC белкам (Ghosh et al., 2017). Кроме того, специфичность к сиаловой кислоте показана для большинства C1qDC белков *Bivalvia* (He et al., 2011; Li et al., 2011; Yang et al., 2012), а для сиало-специфичного лектина моллюска *Haliotis discus discus*, который также оказался представителем белков C1qDC (Ghosh et al., 2017), уже показана выраженная противоопухолевая активность (Yang et al., 2014; Wu et al., 2017; Li et al., 2018).

Среди лектинов двустворчатых моллюсков можно отметить ранее упомянутые MytiLec и CGL, которые проявляют иммуномодулирующую активность в отношении макрофагов млекопитающих, а также проапоптотическую и противоопухолевую активность за счет связывания с глоботриозой на гликолипидах клеточных поверхностей (Chernikov et al., 2017a, 2017b). При этом такая комбинация свойств показала свою перспективность в качестве эффективных диагностических и терапевтических средств и уже привела к созданию искусственного лектина под названием Мицуба-1 (Mitsuba-1), смоделированным по образцу MytiLec и CGL дизайном (Terada et al., 2017). Кроме того, выраженная антимикробная активность была показана для различных растворимых лектинов, выделенных из *M. modiolus* (Tunkijjanukij et al., 1997; Tunkijjanukij, Olafsen, 1998), *A. farreri* (Wang et al., 2007; Zheng et al., 2008), *A. irradians* (Zheng et al., 2009; Huang et al., 2015b), *C. hongkongensis* (He et al., 2011), *M. californianus* (García-Maldonado et al., 2017) и во многих других описанных ранее случаях.

В целом, исходя из имеющихся данных о разнообразии репертуаров углевод-распознающих белков у двустворчатых моллюсков, можно заключить, что *Bivalvia* заслуженно занимают одно из первых мест по исследованию данного типа белков, которые в свою очередь благодаря функциональным особенностям находят широчайшее применение в биотехнологии и биомедицине, не теряя актуальности и перспективности для новых направлений.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования и сбор материала

Объектом исследования являлись агглютинирующие и литические факторы гемолимфы двустворчатых моллюсков *Modiolus kurilensis* (Bivalvia, Mytilidae; Bernard, 1983). Половозрелых особей с длиной раковины 75–95 мм собирали водолазным способом с глубины 2–4 м из акваторий залива Петра Великого Японского моря.

M. kurilensis широко распространенный вид донных фильтраторов северо-западной Пацифики, обитающий в Желтом, Японском, Охотском и Беринговом морях на илистых и песчано-алевритовых отложениях с рассеянными валунами и галькой. Встречается на глубине до 15–20 м. В заливе Петра Великого наибольшая плотность поселения данного вида наблюдается на глубине 2–6 м, нередко в виде плотных совместных друз с *C. grayanus*. Нерест начинается при температуре среды более 16 °С и для исследуемых вод приурочен к июлю-августу (Радовец, Христофорова, 2008). Яркой морфологической особенностью от *M. modiolus*, с которым до недавнего времени отождествляли исследуемый вид, является наличие длинных щетинок периостакума. Кроме того, самостоятельность вида подтверждена генетическим анализом на основе секвенирования митохондриальной ДНК (Liu et al., 2014b; Lee et al., 2019).

Для определения внутривидовых вариаций и сезонных особенностей активности гуморальных факторов иммунитета *M. kurilensis* животных собирали в сезоны с различным температурным режимом водной среды в 2011–2012 гг. из акватории залива Восток (N42.892078°, E132.737502°) 28 апреля (n = 37), 17 июня (n = 85), 10 сентября (n = 31), 20 ноября (n = 32), 6 января (n = 31), 20 марта (n = 30) и 3 мая (n = 30). Суммарно количество экземпляров в выборках составило 276 животных. Данные по температуре, солености и концентрации кислорода водной среды в дни сбора указаны в таблице 1 и предоставлены старшим инженером Лаборатории динамики морских экосистем Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (ННЦМБ ДВО РАН) Куличковой Л.Д.

Для выявления динамики активности факторов гуморального иммунитета *M. kurilensis* в ответ на импульсную стимуляцию бактериальными частицами исследуемых моллюсков отлавливали из акватории залива Восток и содержали в аэрируемых аквариумах с проточной морской водой с 24 сентября по 25 октября 2012 г. в аквариальном зале морской биологической станции "Восток" ННЦМБ ДВО РАН. Для постановки эксперимента исходно было собрано 1016 животных.

Таблица 1. Параметры водной среды обитания *M. kurilensis* в момент сбора животных из залива Восток в различное время года

Месяц	Температура, °С	Соленость, ‰	Концентрация кислорода, мг/л
Апрель	5,0	32,6	7,45
Июнь	11,3	34,2	6,46
Сентябрь	19,3	32,4	5,11
Ноябрь	3,6	31,9	7,23
Январь	-1,5	31,9	7,49
Март	-0,9	28,5	7,90
Май	4,2	32,9	7,46

Для оценки влияния хронического стресса, возникающего в результате повышенной антропогенной нагрузки, на активность гуморальных факторов иммунитета моллюсков 26 особей были собраны из импактной акватории – Спортивной гавани Амурского залива (N42.892078°, E132.737502°) и 39 особей из залива Восток (N42.892078°, E132.737502°) как референсной (условно фоновой) акватории 19 и 25 июня 2014 г. соответственно. Кроме гемолимфы у данных животных брали фрагменты почек и пищеварительной железы для фиксации с целью последующего гистологического анализа (результаты предоставлены младшим научным сотрудником Лаборатории физиологии ННЦМБ ДВО РАН Сокольниковой Ю.Н.).

Для определения спектра углеводной специфичности углеводов-распознающих белков плазмы исследуемых моллюсков, а также для выделения впервые обнаруженного C1q-домен-содержащего белка из плазмы *M. kurilensis* (MkC1qDC) животных собирали в период 2014–2018 гг. из акваторий залива Восток и Амурского залива в районе о. Скребцова (N43.200788°, E131.914084°).

Сбор гемолимфы производили из синуса заднего мускула-замыкателя одноразовыми стерильными шприцами с последующим переносом образцов в пробирки на ледяной бане (0 °С), которые затем центрифугировали в течение 12 мин при 800 g, 4 °С. Супернатант (плазму) отбирали в криопробирки, которые сразу же помещали для заморозки в жидкий азот (-196 °С) с последующим переносом в низкотемпературную морозильную камеру (-80 °С) для длительного хранения.

2.2. Физиологические эксперименты в моделируемых условиях

Для исследования особенностей динамики гуморального иммунного ответа *M. kurilensis* на введение термически инактивированных бактерий моллюсков после вылова акклимировали в течение 7 суток в аквариумах с проточной аэрируемой морской водой при температуре 13–15 °С и содержали в этих же условиях в течение всего периода проведения эксперимента. После

акклимации у животных брали по 100 мкл гемолимфы для предварительной оценки их иммунного статуса и исключения особей с возможными физиологическими отклонениями. Непосредственно в эксперимент были взяты особи с условно нормальными показателями (медиана \pm 30 %) клеточного и гуморального иммунитета, которые оценивали соответственно по фагоцитарной активности гемоцитов (результат предоставлен младшим научным сотрудником лаборатории физиологии ННЦМБ ДВО РАН Сокольниковой Ю.Н.) и агглютинирующей активности плазмы. Суммарно в указанный диапазон по обоим показателям попали 320 из 1016 экземпляров (31,5 %), которые были распределены на контрольную ("К") и экспериментальную ("Э") группы по 16 особей для каждой из 10 исследованных временных точек.

В начале эксперимента у животных обеих групп шприцем из синуса заднего мускула-замыкателя брали по 500 мкл гемолимфы для оценки исходного состояния моллюсков ("Э1" и "К1"), после чего, не вынимая иглы, вводили тот же объем соответствующего раствора: экспериментальным особям суспензию термически инактивированных бактерий *Staphylococcus aureus* (штамм 636 из коллекции ННЦМБ ДВО РАН) с конечной концентрацией 3×10^7 КОЕ/мл в искусственной морской воде (460 мМ NaCl, 9,4 мМ KCl, 48,3 мМ MgCl₂, 6 мМ NaHCO₃, 10,8 мМ CaCl₂, 10 мМ HEPES), контрольным – стерильную морскую воду (СМВ). После этого животных маркировали и помещали в отдельные аквариумы по группам. Через 3 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч (1 сутки), 36 ч (1,5 суток), 48 ч (2 суток), 72 ч (3 суток), 120 ч (5 суток), 168 ч (7 суток) или 336 ч (14 суток) после инъекции у экспериментальных ("Э2") и контрольных ("К2") животных повторно брали по 500 мкл гемолимфы.

2.3. Определение агглютинирующей активности плазмы гемолимфы *M. kurilensis* реакцией гемагглютинации (РГА)

Для определения агглютинирующей активности плазмы гемолимфы *M. kurilensis* была проведена реакция прямой гемагглютинации (РГА) – осаждение эритроцитов агглютинами плазмы без добавления дополнительных агентов. РГА проводили в круглодонных 96-луночных иммунологических планшетах с эритроцитами (Эр) барана, кролика и человека разных групп крови (0, А, В, АВ). Предварительно Эр отмывали раствором PBS (Phosphate buffered saline: 20 мМ Na₂HPO₄-KH₂PO₄, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, pH 7,4) центрифугированием в течение 15 мин при 4 °С, 300 g до полного осветления супернатанта. Далее проводили фиксацию 0,25 % раствором глутарового альдегида на PBS в течение 30 мин, перемешивая аккуратным покачиванием, с последующей трехкратной отмывкой раствором PBS, нейтрализацией оставшихся альдегидных групп 1 % раствором глицина на PBS в течение 4 ч и повторными трехкратными отмывками раствором PBS. Непосредственно в реакции использовали суспензии Эр с концентрацией 1,5 % (объемная доля) или 6×10^7 клеток/мл (подсчет проводили в камере

Горяева) на растворе TBS (Tris-buffered saline: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) с 15 mM CaCl₂.

В каждую лунку планшета помещали по 100 мкл TBS, в первый ряд дополнительно вносили по 100 мкл плазмы и получали в последующих рядах серию двукратных разведений (от 1/2 до 1/2048) по стандартной методике (Кэтти и др., 1991), оставляя последний ряд без образца для отрицательного контроля, и далее добавляли 50 мкл суспензии Эр. Результаты РГА визуально фиксировали и фотографировали через 2 ч инкубации при 23 °С. Показатель РГА выражали в виде отрицательного логарифма титра $-\log_2(\text{титр})$, что преобразует разведения плазмы: 1/2 – "1", 1/4 – "2" и так до 1/2048, соответствующего показателю "11".

2.4. Исследование углеводной специфичности агглютининов методом ингибирования реакции гемагглютинации (ИРГА)

Для определения углеводной специфичности агглютининов плазмы *M. kurilensis* было проведено ингибирование реакции гемагглютинации (ИРГА) углеводами различной структуры. При этом предварительно определяли титр агглютинации с помощью РГА по указанной выше схеме и далее проводили повторную реакцию с присутствием в растворе углевода или сложного гликополимера.

Для проведения ИРГА с плазмой моллюсков использовали 30 mM растворы 23 типов углеводов и гликополимеров различной структуры: мио-инозитола, лактозы, D-глюкуроно-3,6-лактозы, DL-арабинозы, D-(-)-рибозы, D-(+)-фукозы, D-(+)-галактуронозой кислоты, D-(+)-раффинозы, D-(+)-ксилозы, D-(+)-мелибиозы, D-(+)-маннозы, D-(+)-мальтозы, L-(-)-сорбозы, L-рамнозы, α-метил-D-глюкопиранозы, муцина II типа, муцина III типа, N-ацетил-D-глюкозамина, D-глюкуронозой кислоты, D-глюкозы, N-ацетил-D-галактозамина, сиаловой (N-ацетилнейраминовой) кислоты из *Escherichia coli*. Результат визуально фиксировали и фотографировали через 2 ч после добавления суспензий Эр. Поскольку все углеводы и гликополимеры были использованы в одной концентрации, то специфичность определяли полуколичественно по степени отмены реакции – насколько сильно в присутствии потенциального лиганда происходит скатывание Эр на дно лунки (эффект обратный гемагглютинации).

2.5. Оценка литической активности плазмы гемолимфы *M. kurilensis*

Литическую активность плазмы гемолимфы *M. kurilensis* оценивали с помощью оригинальной методики гемолитической реакции (ГЛР), разработанной на основе существующих методик (Rowe, Welch, 1994; Armstrong et al., 1996; Hu et al., 2011), по степени выхода гемоглобина в раствор после инкубации суспензии Эр с плазмой. Предварительно был

произведен подбор оптимальной для проведения ГЛР концентрации хлорида кальция (CaCl_2) в TBS, поскольку многие лизины являются кальций-зависимыми и, в то же время, избыток ионов кальция может приводить к дестабилизации мембран и, таким образом, усиливать спонтанный гемолиз, искажая результаты реакции. Сначала Эр пять раз отмывали раствором PBS, после чего готовили суспензии с концентрацией $1,25 \times 10^8$ клеток/мл на растворах TBS с различной концентрацией CaCl_2 : 1 мМ, 2 мМ, 5 мМ и 10 мМ. После этого каждую суспензию разделяли на четыре аликвоты и инкубировали 4 ч при 23 °С. Далее пробирки с суспензиями центрифугировали 15 мин при 300 g, 4 °С. Сразу после центрифугирования аккуратно отбирали супернатант, у которого измеряли оптическую плотность при длине волны 415 нм на спектрофотометре Shimadzu BioSpec-mini (Shimadzu, Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Для подтверждения наличия у лизинов плазмы *M. kurilensis* Ca^{2+} -зависимости оценивали степень гемолиза в суспензиях Эр с образцами плазмы модиолусов в присутствии ионов Ca^{2+} и хелатирующих агентов: динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты ($\text{Na}_2\text{ЭДТА}$) и этиленгликоль-бис-аминоэтилового эфира N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (ЭГТА). Для этого в микропробирки на 1,5 мл добавляли: 50 мкл плазмы; 50 мкл одного из трех типов TBS (2 мМ CaCl_2 , или 30 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, или 30 мМ ЭГТА); 400 мкл суспензии Эр на соответствующем типе TBS. Смесь инкубировали 1 ч при 23 °С, периодически встряхивая каждые 15 мин, после чего к ней добавляли по 1 мл холодного (4 °С) TBS с 30 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, снова встряхивали и центрифугировали 15 мин при 300 g, 4 °С. В отдельные чистые пробирки отбирали по 500 мкл супернатанта, который потом разводили до 3 мл раствором TBS без добавок. У полученного раствора измеряли оптическую плотность при длине волны 415 нм на спектрофотометре Shimadzu BioSpec-mini (Shimadzu, Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм. Оценку литической активности (X) образцов плазмы *M. kurilensis* проводили по указанной схеме, используя для инкубации только TBS с 2 мМ CaCl_2 . В негативном контроле (спонтанный гемолиз, X_0) при инкубации вместо плазмы добавляли 50 мкл TBS с 2 мМ CaCl_2 , в положительном контроле (полный гемолиз, X_1) – 50 мкл 1 % раствора Triton X-100 на TBS с 2 мМ CaCl_2 . Показатель ГЛР выражали в процентах по формуле:

$$\text{Показатель ГЛР} = \left(\frac{X - X_0}{X_1 - X_0} \right) \times 100\%, \text{ где} \quad (1)$$

X – оптическая плотность раствора после инкубации с плазмой,

X_0 – оптическая плотность раствора в негативном контроле,

X_1 – оптическая плотность раствора в позитивном контроле.

2.6. Определение концентрации белков плазмы гемолимфы *M. kurilensis*

Определение концентрации белков в плазме (C_p) проводили с помощью метода, основанного на способности ароматических радикалов, присутствующих, главным образом, в аминокислотах белков, поглощать свет длиной волны 280 нм. Для этого в кварцевый микрокувет (кат. № 046-25302-11, Shimadzu) с длиной оптического пути 10 мм вносили 100 мкл плазмы и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Shimadzu BioSpec-mini (Shimadzu, Япония), используя заводские настройки прибора в режиме "UV-method" (длина световой волны 280 нм, коэффициент поглощения 0,667).

2.7. Электрофорез белков плазмы гемолимфы *M. kurilensis* в полиакриламидном геле

В работе был использован вариант метода электрофореза белков по Лэммли (Laemmli, 1970) с концентрацией акриламида в разделяющем геле 12 %, в концентрирующем – 4,5 %. Соотношение метилен-бис-акриламида к акриlamиду в обоих случаях составляло 1:36,5 соответственно.

Для проведения электрофореза белков плазмы их предварительно осаждали ацетоном для концентрирования и избавления от небелковых компонентов. Для этого к 500 мкл образца добавляли 4500 мкл ацетона; полученную смесь центрифугировали 15 мин при 3200 g, 4 °С, после чего удаляли супернатант, а белковый осадок подсушивали на воздухе при 23 °С, растворяли в 50 мкл раствора для солиubilизации (62,5 мМ Tris-HCl pH 6,7, 10 % глицерин, 1,25 мМ Na₂ЭДТА, 1 % додецилсульфат натрия (ДСН), 2,5 % 2-меркаптоэтанол, бромфеноловый синий до яркой окраски) и далее кипятили на водяной бане в течение 5 мин. После остывания смесь снова центрифугировали 15 мин при 3200 g, и далее от каждого образца вносили по 20 мкл супернатанта в отдельные кармашки концентрирующего геля, подслаивая под электродный буфер (192 Мм Tris-глицин, 0,1 % ДСН, pH 8,4). В качестве стандартов молекулярных масс в один из карманов вносили 7 мкл смеси PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США). В случае различных фракций выделения белка MkC1qDC и его очищенного препарата осаждение ацетоном не проводили, а лишь добавляли к образцам равный объем двукратного солиubilизирующего раствора, кипятили и далее проводили манипуляции по описанной выше схеме.

Электрофорез осуществляли при силе тока 20 мА на гель 100×100×1 мм до момента достижения фронта бромфенолового синего нижнего края геля. После этого его извлекали из блока, инкубировали 1 ч в фиксирующем растворе (30 % этанол, 10 % уксусная кислота). Окрашивали 0,125 % раствором Кумасси бриллиантового синего (Coomassie Brilliant Blue G-250 – СВВ G-250) в течение 1 ч при постоянном помешивании. Краситель отмывали многократными сменами 7 % раствора уксусной кислоты до появления четких белковых полос. Изображения

гелей получали в просвечивающем режиме сканирования слайдов с разрешением 300 пикселей на дюйм на сканере HP scanjet 7400c (Hewlett-Packard, США).

2.8. Оценка содержания фракций белков в плазме гемолимфы *M. kurilensis*

Анализ электрофореграмм для определения молекулярных масс основных белковых компонентов и их относительного содержания проводили методом денситометрии с использованием программы RflpScan. Содержание различных фракций белков выражали в процентах, используя программные опции, по формуле:

$$PN = \frac{Q_N}{\sum_{j=1}^n Q_j} \times 100\%, \text{ где} \quad (2)$$

PN – доля фракции белков N в образце плазмы,

Q_N – оптическая плотность фракции белков N , окрашенной СВВ G-250,

n – общее число детектированных в образце фракций белков.

2.9. Выделение нового C1q-домен-содержащего белка MkC1qDC

из плазмы гемолимфы *M. kurilensis*

Выделение целевого белка проводили в несколько этапов. Плазму от 20–80 особей в объеме 200–400 мл, полученную описанным выше способом, объединяли и осветляли центрифугированием в течение 30 мин при 10000 g, 4 °C, после чего замораживали для хранения при –80 °C.

На первом этапе белки осветленной плазмы фракционировали высаливанием сульфатом аммония (СА). Сначала к плазме медленно приливали раствор насыщенного СА, забуференного Трис (рН 7,5), с перемешиванием на ледяной бане (0 °C) до 15 % насыщения СА. Далее смесь оставляли без перемешивания при 0 °C на 30 мин для формирования белковых коагулятов, после чего ее центрифугировали 30 мин при 3200 g, 0 °C. Осадок удаляли и к полученному супернатанту снова приливали СА до 30 % насыщения раствора и вновь центрифугировали при тех же условиях. Далее процесс повторяли со ступенчатым повышением насыщения СА до 45 %, 60 %, 75 % и 85%. Полученные после центрифугирования осадки растворяли в TBS и диализировали против пятидесятикратного объема TBS в три смены в холодильнике при 4 °C для удаления остатков СА.

На следующем этапе очистки MkC1qDC проводили аффинную хроматографию. В качестве носителя использовали сефарозу CL-4B с ковалентно иммобилизованными дивинилсульфоном молекулами пектина цитрусовых со степенью этерификации 60 % (Copenhagen Pectin A/S, Дания). Раствор белков с выявленной с помощью РГА и ИРГА целевой активностью осветляли центрифугированием (30 мин, 10000 g, 4 °C). Колонку уравнивали раствором TBS с 15 мМ CaCl₂, образец наносили в том же растворе, и им же промывали тремя

полными объемами колонки носитель от не связавшихся компонентов. Элюцию проводили раствором TBS большой буферной емкости, содержащим хелатирующий агент: 200 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 30 мМ Na₂ЭДТА, pH 7,5. Все этапы проводили при скорости элюции 0,5 мл/мин.

Элюат, содержащий вышедшие в растворе с ЭДТА белки, собирали и диализировали против пятидесятикратного объема TBS без добавок в три смены при 4 °С. Полученный раствор разделяли на аликвоты, содержащие по 100 мкг белка в криопробирки, которые замораживали и хранили в жидком азоте при -196 °С.

Оценку концентрации MkC1qDC проводили методом Бредфорда (Bradford, 1976), используя в качестве стандарта для построения калибровочной кривой растворы бычьего сывороточного альбумина (БСА). Измерения проводили в кварцевой кювете на 1 мл с длиной оптического пути 10 мм и при длине световой волны 595 нм.

2.10. Выявление физико-химических свойств и углеводной специфичности белка MkC1qDC

Определение молекулярной массы (Mr) полипептидов MkC1qDC проводили по описанной выше методике электрофореза белков (раздел 2.7) в полиакриламидном геле по Лэммли, включающей восстановление дисульфидных связей и денатурацию в присутствии ДСН, с нанесением на гель по 5–10 мкг выделенного и аффинно очищенного белка на образец.

Определение изоэлектрической точки (pI) проводили методом 2D-электрофореза: изофокусирование в первом направлении с использованием коммерческих полимерных полосок (стрипов) с градиентом pH 5–8 "ReadyStrip™ IPG Strips" (Bio-Rad, США) и электрофорезом в градиентном 4–20 % полиакриламидном геле во втором направлении.

Для определения pH-зависимости MkC1qDC активности проводили РГА по описанной ранее методике (раздел 2.3) с суспензиями эритроцитов человека группы крови 0 в концентрации 6×10^7 клеток/мл на TBS с повышенной буферной емкостью (50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 15 мМ CaCl₂, pH 7,5). В качестве образцов использовали аликвоты очищенного, диализированного против деионизированной воды и лиофильно высушенного белка, которые предварительно растворяли в концентрации 0,1 мг/мл и инкубировали 1 ч в следующих 10 мМ буферных растворах, содержащих 150 мМ NaCl: pH 3 – глицин-HCl, pH 4 и pH 5 – CH₃COOH-CH₃COONa, pH 6 и pH 7 – (CH₃)₂AsO₂Na-HCl, pH 8 – трис-HCl, pH 9 – глицин-NaOH, pH 10 – NaHCO₃-Na₂CO₃.

Для определения термолабильности MkC1qDC образцы в TBS (10 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 15 мМ CaCl₂, pH 7,5) инкубировали по 1 ч при температурах 0 °С, 10 °С, 20 °С, 30 °С, 40 °С, 50 °С, 60 °С, 70 °С с последующим доведением до 23 °С. Далее для определения активности белка проводили РГА по описанной выше методике.

Для определения специфичности белка MkC1qDC в ИРГА, описанной в разделе 2.4, использовали растворы с различными концентрациями следующих углеводов: альгината, к-каррагинана, фукоидана, растительного пектина со степенью этерификации 60 %, маннана из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, липополисахарида (LPS) из клеточной стенки *E. coli*, пептидогликана (PDG) из клеточной стенки *S. aureus*, муцина II типа, гиалуроновой кислоты, хитозана, агарозы, декстрана с молекулярной массой 35–50 кДа, D-лактозы, 2 α -маннобиозы, N-ацетил-D-лактозамина, D-мелибиозы, D-мальтозы, D-раффинозы, сиаловой (N-ацетилнейраминовой) кислоты, D-галактурановой кислоты, D-глюкуроновой кислоты, L-гулозы, 2-деокси-D-галактозы, D-галактозы, D-маннозы, D-глюкозы, D-фукозы, L-фукозы, N-ацетил-D-галактозамина, N-ацетил-D-глюкозамина, N-ацетил-D-маннозамина, D-глюкозамина, α -метил-D-глюкопиранозы, L-рамнозы, D-рибозы, мио-инозитола, DL-арабинозы, D-ксилозы, L-сорбозы, метил- β -ксилопиранозы, D-глюкуроно-6,3-лактона. Используя серию двукратных разведений, указанных выше препаратов, для каждого углевода определяли минимальную концентрацию, при которой происходил эффект ингибирования – снижение титра гемагглютинации на один шаг разбавления, что, таким образом, соответствует концентрации полумаксимального ингибирования (half maximal inhibitory concentration, IC50).

2.11. Определение первичной структуры белка MkC1qDC

Для последующего анализа полипептидов методом N-концевого секвенирования по Эдману образцы переносили методом электроблоттинга на поливинилиденфторидную (ПВДФ) мембрану (Novex, США) с диаметром пор 0,2 мкм в 192 мМ глицин-трисовом буфере (pH 7,4), с 20 % содержанием метанола и 0,01 % ДСН при силе тока 160 мА в течение 1 ч. Образцы детектировали окрашиванием 0,1 % Понсо S в 5 % растворе уксусной кислоты. Необходимые полосы вырезали стерильным скальпелем, помещали в микропробирки и удаляли краситель 5 циклами отмывки в деионизированной воде. N-концевое секвенирование по методике Эдмана проводили на автоматическом секвенаторе белков Precise модели 492 (Applied Biosystems, США) с использованием протокола производителя. Работу проводили на базе Лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, г. Москва.

Для анализа пептидного состава MkC1qDC образцы очищенного белка переносили в раствор, содержащий 6 М гуанидинхлорид, 100 мМ Трис, 10 мМ хлорацетамид, 5 мМ Трис(2-карбоксиэтил)фосфин, pH 8, и нагревали при 95 °С в течение 5 мин. Далее смесь разбавляли деионизированной водой в 10 раз, вносили в нее трипсин (Thermo Fisher Scientific, США) в массовом отношении 1:100 трипсин-субстрат, инкубировали при 37 °С в течение 4 ч, после чего добавляли трифторуксусную кислоту до конечной концентрации 1 % и обессоливали

полученный раствор с помощью центрифужных микроколонок C18 (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя. Пептиды анализировали на масс-спектрометре Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific, США), соединенном с насосом RSLnano uHPLC (Thermo Fisher Scientific, США). Пептиды разделяли на 15 см колонке C18 Aurora (IonOptiks, США), используя 40-минутный градиент от 5 % до 35 % ацетонитрила в 0,05 % уксусной кислоте. Для анализа использовали режим работы спектрометра "high/high" с разрешением 120k / 35k (MS и MS / MS). Секвенирование *de novo* проводили с использованием пакета программного обеспечения PEAKS (Bioinformatics Solutions, Канада) с точностью массы 5 ppm / 0,01 Да (MS и MS / MS). В последующий анализ были взяты только пептиды со значениями ALC > 80 % (Average Local Confidence, средняя локальная достоверность), которые были собраны в более длинные последовательности с использованием ALPS ассемблера де Брёйна при k-value = 7 согласно ранее опубликованным данным (Tran et al., 2016). Таким образом были получены 11 не перекрывающихся аминокислотных последовательностей, ряд из которых показал высокую гомологию с C1q-домен-содержащим белком MgC1q4 из *M. galloprovincialis* (CBX41653.1). Поэтому CBX41653.1 был выбран в качестве референса для сборки полной последовательности белка MkC1qDC с использованием программы Clustal Omega (Sievers et al., 2018). Теоретические Mr и pI собранного MkC1qDC были определены с помощью программы ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/). Работу проводили на базе Института генетики и молекулярной медицины Эдинбургского университета, г. Эдинбург.

2.12. Оценка антибактериальной активности MkC1qDC

Антимикробные свойства MkC1qDC проверяли в отношении условно патогенных грам(-) бактерий (*Vibrio* sp., *Ruegeria* sp., *Escherichia coli*, *Pseudoalteromonas* sp.) и грам(+) бактерий (*S. aureus*, *Bacillus subtilis*), выделенных из морских организмов и хранящихся в коллекции живых микроорганизмов Морского биобанка ННЦМБ ДВО РАН (материал предоставлен старшим научным сотрудником Лаборатории морской микробиоты ННЦМБ ДВО РАН Беленовой И.А).

Для оценки влияния MkC1qDC на бактериальный рост культуры выращивали до log-фазы (фазы роста) в жидкой среде на основе морской воды (Youshimizu, Kimura, 1976), после чего разводили в жидкой среде РВМ (Poor broth medium: 1,5 % пептон, 1,5 % NaCl, pH 7,2) до $A_{600} = 0,05$ (оптическая плотность при длине волны 600 нм) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм и вносили по 50 мкл на лунку 96-луночного плоскодонного планшета. В экспериментальные лунки дополнительно вносили по 50 мкл раствора белка с концентрацией 0,4 мг/мл (20 мкМ) на РВМ, в положительный контроль по 50 мкл РВМ без добавок, в отрицательный – 50 мкл РВМ с пенициллином (2000 ед./мл) и стрептомицином (2 мг/мл). Для

каждого типа контрольных и экспериментальных образцов использовали по 6 лунок для каждого вида бактерий. Результаты ингибирования бактериального роста измеряли при помощи планшетного ридера Cytation 5 imaging reader (BioTek Instruments, США) с использованием программы анализа данных Gen 5. Оптическую плотность растворов в лунках измеряли каждый час в течение 48 ч при длине волны 600 нм в режиме "Endpoint" (измерение по конечной точке) при температуре инкубации 37 °С с перемешиванием аппаратным встряхиванием перед каждым измерением.

Для оценки агглютинирующей активности MkC1qDC бактерий термически инактивировали нагреванием до 72 °С в течении 1 ч. Далее суспензии отмывали тремя циклами центрифугирования (3000 g, 20 мин, 4 °С) и ресуспендирования в растворе HBS (HEPES buffered saline: 10 mM HEPES-NaOH, 150 mM NaCl, pH 7,4). Осадки бактерий тщательно ресуспендировали, чтобы разбить крупные конгломераты на отдельные клетки, и фиксировали 4 % раствором параформальдегида (ПФА) на HBS при постоянном покачивании, после чего снова трижды отмывали раствором HBS. Далее проводили окраску в течение 2 ч флуоресцентным красителем флуоресцеин-5-изотиоцианатом (0,5 мг/мл fluorescein isothiocyanate (FITC), 0,1 M NaHCO₃-Na₂CO₃, pH 9,3) при постоянном помешивании, после чего трижды отмывали раствором HBS от не связавшегося красителя. Реакцию агглютинации осуществляли в микропробирках на 1,5 мл в объеме реакционной смеси 200 мкл при постоянном перемешивании и конечной концентрации компонентов: суспензии бактерий с оптической плотностью $A_{600} = 1,5$, 65 мкг/мл (3,4 мкМ) MkC1qDC, 10 mM HEPES-NaOH, 150 mM NaCl, 50 mM CaCl₂, pH 7,5. В качестве негативного контроля использовали смесь того же состава, но без MkC1qDC. После инкубирования суспензии наносили на предметные стекла и после высушивания заключали в среду Sub-X (Leica Biosystems, Германия) под покровные стекла. Визуализацию проводили, используя объективы с увеличением 100 х, на системе лазерного имиджинга на базе микроскопа FluoView FV1200MPE (Olympus, Япония), получая серию изображений по оси Z с последующим объединением для создания Z-проекции.

2.13. Получение поликлональных антител к MkC1qDC и оценка их качества

Поликлональные антитела кролика к MkC1qDC получали по следующей схеме, составленной на основании существующих рекомендаций (Кэтти и др., 1991): первая внутримышечная инъекция с полным адьювантом Фрейнда; вторая внутримышечная спустя 20 дней с неполным адьювантом Фрейнда; третья подкожная через 60 дней с неполным адьювантом Фрейнда; четвертая внутримышечная через 14 дней на стерильном физиологическом растворе без адьювантов. Каждая инъекция содержала 250–500 мкг очищенного MkC1qDC. После каждого введения у кролика брали кровь из ушной вены и

выделяли сыворотку по стандартной методике (Кэтти и др., 1991) с последующим хранением ее при -80°C .

Эффективность выработки антител определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих вторичных антител лошади, конъюгированных с пероксидазой хрена (Thermo Fisher Scientific, США), и ортофенилендиамином (ОФДА) в качестве субстрата. В планшеты с высокой сорбционной емкостью для ИФА поочередно вносили и инкубировали компоненты системы: 1) 50 мкл раствора очищенного MкC1qDC на TBS с концентрацией 20 мкг/мл или для отрицательного контроля 50 мкл 3 % раствора БСА на TBS (2 ч при 23°C); 2) 300 мкл 3 % раствора БСА на TBS для избегания неспецифического связывания других компонентов системы с адгезивной поверхностью планшета (1 ч при 23°C); 3) 50 мкл заранее раститрованных в TBS антисывороток с двукратными разведениями от 1/50 до 1/102400 (1 ч при 37°C); 4) вторичные антитела с рекомендуемым производителем разведением (1 ч при 37°C); 5) 40 мкл раствора 0,1 % ОФДА и 0,03 % H_2O_2 с переносом планшета в темное место до появления заметной окраски и остановкой реакции добавлением серной кислоты до конечной концентрации 2,5 %. Между каждой сменой компонентов системы проводили отмычки лунок планшета раствором TBS с Tween-20 (TBST: 10 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 0,1 % Tween-20, pH 7,5) по 10 раз.

Далее проводили очистку фракции антител IgG. Сначала белки антисыворотки осаждали раствором сульфата аммония со степенью насыщения 33 % на льду (0°C) с центрифугированием при 3000 g, 0°C , 15 мин. Полученный осадок растворяли в PBS и пропускали через колонку 1×10 см с DEAE-сефарозой CL-6B при скорости элюции 0,5 мл/мин. Фракцию не связавшихся с носителем IgG собирали в отдельные микропробирки, концентрацию определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм и коэффициенте молярной экстинкции $2,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Полученный раствор разбавляли глицерином до 50 % (конечная концентрация IgG 2,5 мг/мл) и хранили при -20°C .

Специфичность и активный титр полученных антител проверяли иммуноблотингом на ПВДФ мембране. Для этого сначала проводили в двух повторах электрофорез белков по Лэммли с концентрацией акриламида в разделяющем геле 12 %, в концентрирующем – 4,5 %. На гели в отдельные карманы наносили солиобилизованные образцы осажденных ацетоном (по указанной ранее методике в разделе 2.7) белков плазмы и аффинно очищенный белок MкC1qDC. В качестве стандартов молекулярных масс использовали смесь PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США). Электрофорез проводили при силе тока 15 мА на гель размером $86 \times 68 \times 1$ мм в камере Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, США). Один из гелей фиксировали, окрашивали раствором CBV G-250 и отмывали по описанной ранее схеме (раздел 2.7). Белки из второго геля переносили на ПВДФ мембрану, используя погружной блок для

Вестерн-блоттинга камеры Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, США), электродный буфер с 20 % метанола при силе тока 180 мА в течение 90 мин. После переноса белков мембрану нарезали на полоски, содержащие по 1 образцу осажденных белков плазмы и MkC1qDC, и помещали на 2 ч в 3 % раствор БСА на TBS. Далее проводили трехкратную отмывку мембраны раствором TBST по 10 мин, после чего на полоски наносили первичные антитела, полученные после иммунизации кролика, в трех концентрациях, выбранных на основании результатов ИФА: 1/2500, 1/5000 и 1/10000 в 0,5 % растворе БСА на TBS для выявления рабочего титра антисывороток, с последующей инкубацией образцов при 23 °С в течение 2 ч. Полоски отмывали 3 раза раствором TBST по 10 мин, далее на них наносили вторичные мышиные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Thermo Fisher Scientific, США) в концентрации 1/20000, разведенных на TBS, и инкубировали в течение 1 ч при 23 °С. Полоски 3 раза отмывали раствором TBST по 10 мин, после чего на них наносили субстрат для хемилюминесцентной окраски Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, США), в соответствии с промышленным протоколом. Результат снимали на системе мультиплексной детекции ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad, США).

2.14. Выявление локализации MkC1qDC в тканях *M. kurilensis* методом иммуногистохимии

Для иммуногистохимического анализа образцы тканей и органов моллюсков (кишечника, мантии, мускула-замыкателя, перикарда, жабр, гонад, пищеварительной железы (ПВЖ), почек) брали в день их вылова, фиксировали в течение 2 ч в 4 % растворе ПФА на PBS, отмывали в 10 порциях PBS по 20 мин в каждой и далее проводили обезвоживание и заливку в парафин по стандартной методике (Роскин, Левинсон, 1957). Срезы толщиной 10 мкм изготавливали с помощью ротационного микротомы HM-360 (MICROM International GmbH, Германия). Готовые парафиновые срезы депарафинировали по стандартной схеме (Роскин, Левинсон, 1957) и, не допуская высыхания препаратов, производили их отмывку раствором PBS с 0,02% Tween-20 (PBST) 3 раза по 5 мин, после чего немедленно приступали к окраске.

Клетки гемолимфы, взятой шприцем из синуса заднего мускула-замыкателя, осаждали центрифугированием (800 g, 4 °С, 15 мин), дважды отмывали искусственной солевой средой без Ca^{2+} и Mg^{2+} (CMFSS: 435 mM NaCl, 10,7 mM KCl, 27 mM Na_2SO_4 , 16,6 mM $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 12 mM HEPES, 5 mM $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, pH 7,4) при тех же условиях центрифугирования, и доводили до исходного объема культуральной средой RPMI-1640 (ПанЭко, Россия). Затем аликвоты суспензии клеток объемом 30 мкл вносили в лунки 8-луночной камеры Ibidi (Ibidi GmbH, Германия) и оставляли на 30 мин при 10 °С для их адгезии к поверхности камеры. Далее клетки фиксировали в течение 10 мин при 23 °С добавлением 16 % раствора ПФА непосредственно в культуральную среду до

конечной концентрации 1,5 %. Далее жидкость из лунок отбирали, добавляли в них по 300 мкл охлажденного метанола и оставляли при 4 °С на 10 мин, после чего камеру оставляли на более длительное хранение при –20 °С. Непосредственно перед окрашиванием препараты гемоцитов отмывали 3 раза раствором PBST.

Дополнительно проводили фракционирование гемоцитов методом изопикнического центрифугирования в ступенчатом градиенте плотности разделяющей среды Percoll (Sigma-Aldrich, США). Для этого Percoll разводили CMFSS до 10, 20, 30 и 40 %, после чего в пробирке из этих растворов формировали градиент, путем их последовательного наслаения, начиная от наибольшей концентрации. В каждую пробирку с охлажденным градиентом поверх разделяющей среды наслаивали цельную гемолимфу и центрифугировали в течение 12 мин при 800 g и 17 °С. Фракции гемоцитов снимали с интерфаз градиентов (0–10, 10–20, 20–30 и 30–40 %) в отдельные пробирки далее проводили ранее описанные процедуры, что и для осадка нативных гемоцитов.

Далее на срезы и гемоциты наносили PBS с 0,5 % содержанием Triton X-100 на 10 мин при 23 °С для пермеабилзации мембран. Препараты отмывали 3 раза по 10 мин раствором PBST, после чего наносили первичные антитела, приготовленные на PBS с 0,5 % БСА в разведении 1/500 и инкубировали 2 ч при 23 °С. Далее препараты отмывали 3 раза по 10 мин раствором PBS, наносили конъюгированные с Alexa Fluor-488 вторичные антитела козы (Thermo Fisher Scientific, США), приготовленные на PBS также в разведении 1/500, и инкубировали 1 ч при 23 °С. Образцы вновь отмывали 3 раза по 10 мин раствором PBST, проводили окрашивание ядер красителем DAPI (Invitrogen, США) с концентрацией 1 мкг/мл на PBS в течение 5 мин при 23 °С и трижды отмывали раствором PBS. В качестве контроля использовали препараты, которые вместо первичных антител обрабатывали контрольной сывороткой кролика, полученной до иммунизации, в разведении 1/500. Гемоциты, фракционированные в среде Percoll, дополнительно окрашивали на актин родамин-фаллоидином (Thermo Fisher Scientific, США), а также по отдельной аликвоте каждой фракции окрашивали эозин-метиленовым синим по Май-Грюнвальду в течение 2 мин для общего цитоморфологического анализа. Препараты анализировали и фотографировали на конфокальном микроскопе Olympus Fluoview FV10i (Olympus, Япония) и микроскопе Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия).

Для выявления коллагенов как одного из основных компонентов внеклеточного матрикса парафиновые срезы анализируемых тканей и органов также окрашивали 0,1 % раствором сириуса красного (Direct Red 80, Sigma-Aldrich, США) в насыщенной пикриновой кислоте в течение 1 ч с последующей отмывкой в двух порциях 0,5 % раствора CH_3COOH . Окрашенные срезы осветляли двумя сменами ксилола по 5 мин и заключали в среду Biomount (Bio-Optica, Италия). Препараты

анализировали и фотографировали на микроскопе Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении объектива 40 х в простом проходящем и поляризованном свете.

2.15. Оценка взаимодействия MkC1qDC с клеточными линиями млекопитающих

Анализ влияния белка MkC1qDC на пролиферативную активность проводили с использованием системы непрерывного высокоэффективного *in vivo* имиджинга Cell-iQ MLF (CM Technologies, Финляндия) на клетках аденокарциномы шейки матки человека линии HeLa CCL-2 (ATCC). Клетки культивировали при 37 °C и 5 % CO₂ в модифицированной среде Игла Дульбекко DMEM (Gibco, США) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки FBS (Gibco, США) и высевали в 24-луночные культуральные планшеты с плотностью посадки $1,5 \times 10^4$ клеток/см². После 18 ч предварительного культивирования для адгезии и стабилизации роста культур в среду добавляли растворы MkC1qDC на HBS с CaCl₂ (10 mM HEPES-NaOH, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7,4) до конечных концентраций 1 мкМ (19 мкг/мл), 2 мкМ (38 мкг/мл), 4 мкМ (76 мкг/мл) и 0 мкМ в качестве контроля (по 6 лунок для каждой концентрации). Съемку проводили каждый 1 ч в течение 90 ч с использованием фазового контраста и последующим автоматическим распознаванием образов на основе машинного обучения для построения кривых роста.

Также проводили оценку механизма клеточной гибели при воздействии MkC1qDC в концентрации 5 мкМ (95 мкг/мл) с использованием витальной окраски комбинацией йодистого пропидия и аннексина V, конъюгированного с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США). Для этого в 96-луночные планшеты проводили рассев клеточных линий аденокарциномы шейки матки человека HeLa CCL-2 (ATCC, $1,5 \times 10^4$ клеток/см²), аденокарциномы груди человека MDA-MB-231 (ATCC, $0,5 \times 10^4$ клеток/см²), глиобластомы человека U87 MG (ATCC, $1,0 \times 10^4$ клеток/см²) и иммортализованных клеток пигментного эпителия сетчатки человека hTERT RPE-1 (ATCC, $1,0 \times 10^4$ клеток/см²). Культивирование проводили при указанных выше условиях. После 18 ч предварительного культивирования для адгезии и стабилизации роста культур среду заменяли на 50 мкл раствора HBS с CaCl₂ и 475 мкг/мл MkC1qDC, или без него в качестве контроля, инкубировали 20 мин и далее добавляли 200 мкл культуральной среды. Через 48 ч планшеты центрифугировали при 100 g, 23 °C, 10 мин, удаляли надосадочную и проводили окраску клеток в лунках по протоколу производителя с небольшими модификациями: добавляли в каждую лунку по 20 мкл йодистого пропидия и аннексина V в рабочем буфере, инкубировали 15 мин при 23 °C в темноте, добавляли еще 80 мкл рабочего буфера без красителей, центрифугировали при 100 g, 23 °C, 10 мин и проводили съемку на планшетном ридере Cytation 5 imaging reader (BioTek Instruments, США) с использованием объектива 10x (12 полей зрения на лунку, в повторах по 3 лунки). Анализ проводили визуально

подсчетом окрашенных аннексином V (апоптоз), йодистым пропидием (некроз), одновременно аннексином V и йодистым пропидием (некроз и поздний апоптоз) и неокрашенных живых клеток на каждое поле зрения.

Оценку IC₅₀ MкC1qDC на тех же клеточных линиях HeLa CCL-2, MDA-MB-231, U87 MG и hTERT RPE-1 (ATCC) проводили с помощью МТТ-теста (Mosmann, 1983) также в 96-луночных планшетах при тех же условиях, времени культивирования и плотности посадки, используя конечные концентрации MкC1qDC 1 мкМ, 2 мкМ, 3 мкМ, 4 мкМ, 5 мкМ и 0 мкМ в качестве контроля (по 8 лунок). Предварительно готовили раствор МТТ: 5 мг/мл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия бромид (Thermo Fisher Scientific, США) в однократном стерильном растворе PBS (Gibco, Великобритания), который хранили при 4 °С в темноте. Лизис-буфер включал 1 % NP-40 (Amresco, США) и 4 мМ HCl на изопропанол и также хранился при 4 °С. После 48 ч инкубирования клеток с MкC1qDC в каждую лунку вносили раствор МТТ в соотношении со средой 1:10 и инкубировали в течение 4 ч при 37 °С и 5 % CO₂. Далее планшеты центрифугировали (1000 g, 10 мин, 23 °С), среду с раствором МТТ удаляли и вносили по 150 мкл лизис-буфера и инкубировали планшеты 1 ч в темноте на шейкере: 150 об./мин, 23 °С. Оптическую плотность (OD) измеряли с помощью планшетного спектрофотометра iMark (BioRad, США) по двум длинам волн 595 нм (A₅₉₅) и 655 нм (A₆₅₅, референс), принимая за итоговые значения их разность: OD = A₅₉₅ – A₆₅₅. Далее значения OD переводили в проценты от среднего по контрольным лункам и IC₅₀ рассчитывали на основании регрессионной прямой, построенной по полученным средним значениям OD для каждой использованной концентрации MкC1qDC.

Для оценки сродства белка MкC1qDC к углеводным детерминантам клеточных структур опухолевых линий белок предварительно конъюгировали с флуоресцентным красителем FITC. Для этого смешивали очищенный MкC1qDC и FITC в молярном соотношении 1:5 в 0,1 М растворе NaHCO₃-Na₂CO₃ pH 9 и инкубировали 1 ч при 23 °С и постоянном помешивании, после чего проводили очистку конъюгата от не связавшегося красителя гель-фильтрацией на колонке 1×10 см с сефадексом G25 (GE Healthcare, США) в растворе HBS со скоростью элюции 1 мл/мин и мониторингом оптической плотности раствора при длинах световых волн 280 нм и 495 нм. В работе были использованы живые клетки человека линий HeLa CCL-2, MDA-MB-231, U87 MG и hTERT RPE-1 (ATCC), культивированные по описанной выше схеме. Клетки высевали в 8-луночные камеры Ibbi (Ibbi, США) с плотностью посадки 1,5×10⁴ клеток/см² и после 36 ч культивирования окрашивали 2 мкМ (38 мкг/мл) раствором MкC1qDC-FITC (концентрация по белку) на HBS с 5 мМ CaCl₂ 30 мин при 23 °С. После отмывки от потенциально не связавшегося белкового препарата клетки окрашивали DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride; Invitrogen, США) для визуализации ядер и снова трижды отмывали раствором HBS. Кроме того,

для дополнительной визуализации морфологии клеток проводили окраску по описанной выше методике и родамин-фаллоидином, выявляющим актин, на фиксированных (4 % ПФА на HBS, 2 ч, 23 °С) клетках первичной глиальной опухоли пациента (ДВФУ), аденокарциномы шейки матки линии HeLa CCL-2 (ATCC), карциномы толстой кишки линии RKO CRL-2577 (ATCC), карциномы толстой кишки линии HCT 116 (ATCC), нейробластомы мыши линии Neuro-2a CCL-131 (ATCC) и мышинных перитонеальных макрофагах в качестве контроля (неопухолевых клеток). Визуализацию проводили, используя объективы с увеличением 20x и 100x, на системе лазерного имиджинга на базе микроскопа FluoView FV1200MPE (Olympus, Япония), получая серию изображений по оси Z с последующим объединением для создания Z-проекции.

2.16. Статистические методы

Оценка исследованных в работе выборок тестом Колмогорова-Смирнова показала значимое отклонение распределений всех рассмотренных параметров от нормального, поэтому были использованы непараметрические критерии. Сравнение показателей РГА с Эр различных групп крови человека на одних и тех же образцах плазмы (внутри одной выборки), как и всех исследованных показателей до и после введения СМВ или *S. aureus* у одних и тех же особей, проводили парным критерием Вилкоксона для зависимых переменных и дисперсионным ранговым критерием Фридмана. В остальных случаях сравнение параметров между выборками проводили критерием Краскела-Уоллиса (ранговый аналог однофакторного дисперсионного анализа – ANOVA) и парным критерием Манна-Уитни (ранговый аналог t-теста для независимых выборок). При этом, несмотря на использование непараметрических критериев, значения измеренных показателей в работе выражены в виде средних с 95 % доверительными интервалами для удобства восприятия результатов. Для выявления возможных связей между показателями использовали ранговый коэффициент корреляция Спирмена. Все представленные коэффициенты корреляции получены при уровне значимости $p < 0,05$. Данные проанализированы с помощью пакетов программ Microsoft Office Excel 2010 и STATISTICA 7.0.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Стандартизация методик оценки агглютинирующей и литической активности плазмы гемолимфы *M. kurilensis*

Использование в РГА суспензий Эр, приготовленных объемным и гемоцитометрическим методом ($1,5\%$ и 6×10^7 клеток/мл соответственно), показало в первом случае появление значимых различий (критерий Вилкоксона, $p > 0,05$) для одних и тех же образцов плазмы, что, по всей видимости, связано с недостаточной точностью получаемых объемным методом концентраций Эр. Наибольшую активность агглютинины плазмы *M. kurilensis* проявили в отношении Эр человека. При этом использование разных групп крови (0, А, В, АВ) не показало значимых различий (критерий Фридмана, $p > 0,05$), то есть у исследуемых агглютининов не выявляется преобладающего аффинитета к какой-либо группе крови человека. Поэтому все представленные далее результаты приведены для РГА с суспензиями Эр человека только одной 0 группы, приготовленными гемоцитометрическим методом. При данных условиях минимальные и максимальные показатели РГА равные 1 и 11 (титр плазмы 1/2 и 1/2048 соответственно) встречались крайне редко – в совокупности менее чем в 5 % всех исследованных образцов.

Особое значение для оценки литической активности факторов плазмы имела стандартизация концентрации ионов Ca^{2+} при проведении ГЛР. Инкубирование Эр в TBS с различной концентрацией CaCl_2 в среде приводило к различной степени спонтанного гемолиза. Были получены следующие средние значения с ошибкой оптической плотности растворов супернатанта после центрифугирования суспензий Эр на TBS с различной концентрацией CaCl_2 : $0,085 \pm 0,015$ с концентрацией раствора 1 мМ; $0,104 \pm 0,022$ – с 2 мМ; $0,557 \pm 0,001$ – с 5 мМ; $0,550 \pm 0,001$ – с 10 мМ. Таким образом, уже 5 мМ ионов Ca^{2+} в растворе повышают нестабильность мембран Эр, что является критичным при оценке активности литических факторов с помощью ГЛР.

Для подтверждения зависимости активности литических факторов плазмы *M. kurilensis* от ионов Ca^{2+} было проведено сравнение результатов ГЛР с образцами плазмы разных особей при содержании в TBS 2мМ CaCl_2 или хелатирующих факторов: $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ (30 мМ), ЭГТА (30 мМ). Было показано, что при содержании в реакционной смеси 2мМ CaCl_2 происходит активный гемолиз, а в присутствии 30 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ или 30 мМ ЭГТА – полная остановка реакции.

3.2. Внутрипопуляционная вариативность и сезонная динамика показателей плазмы гемолимфы *M. kurilensis*

Агглютинирующая активность плазмы гемолимфы *M. kurilensis* в различные месяцы представлена на рисунке 1А. Наибольшая вариативность показателя отмечена в июне, что, по-видимому, связано с большим, чем в остальных случаях, объемом выборки – 85 особей, в противовес 30–37 в каждой из остальных. Следует также отметить, что показатель $-\log_2(\text{титр}) = 1$ выявлен лишь у одной особи из всей совокупности исследованного материала, что говорит о его явной аномальности. Также всего у 4 особей из выборок июня, ноября и января показатель РГА был равен 2. Максимальная зафиксированная активность агглютининов плазмы *M. kurilensis*, соответствующая показателю 11, была отмечена у 5 особей из выборок апреля, июня и мая. Кроме того, в июне наблюдались наибольшие границы квартильного размаха данного показателя: 4 – нижний квартиль (25 %), 8 – верхний (75 %). Квартильные размахи остальных выборок укладывались в указанные границы. В совокупности из 276 значений в диапазон показателей РГА 4–8 попадали 211 особей, что соответствовало 76 % от всей совокупности выборок за год.

Как видно из рисунка 1А, значимых скачков активности в какой-то из сезонов не происходит, за исключением некоторого снижения в январе. ANOVA Краскела–Уоллеса не выявила статистически значимых изменений ($p > 0,05$), однако парный критерий Манна–Уитни поддержал достоверность снижения агглютинирующей активности в январе по сравнению с апрелем, мартом и маем ($p < 0,05$).

В сравнении с агглютинирующей активностью, литическая активность плазмы гемолимфы, динамика которой представлена на рисунке 1Б, имела более выраженное снижение зимой. Значимость различий с январской точкой показали все остальные месяцы, что подтверждает как ANOVA Краскела–Уоллеса ($p < 0,05$), так и парные сравнения Манна–Уитни ($p < 0,05$). В целом данный показатель, как и титр агглютининов, проявлял высокую внутрипопуляционную вариативность, которую характеризует величина доверительных интервалов. При этом наибольший размах был выявлен в январе.

Хотя экстремально высокие (100 %) и низкие (0 %) значения ГЛР и встречались в большинстве точек, но в целом их доля была невелика: для всех выборок в совокупности по 4,6 % (10 особей из 276 для ГЛР 100 % и столько же для ГЛР 0 %). Наибольшая частота встречаемости максимально низких показателей была зафиксирована в январе – 12,9 % (4 из 31), максимально высоких – в ноябре – 12,5 % (4 из 32).

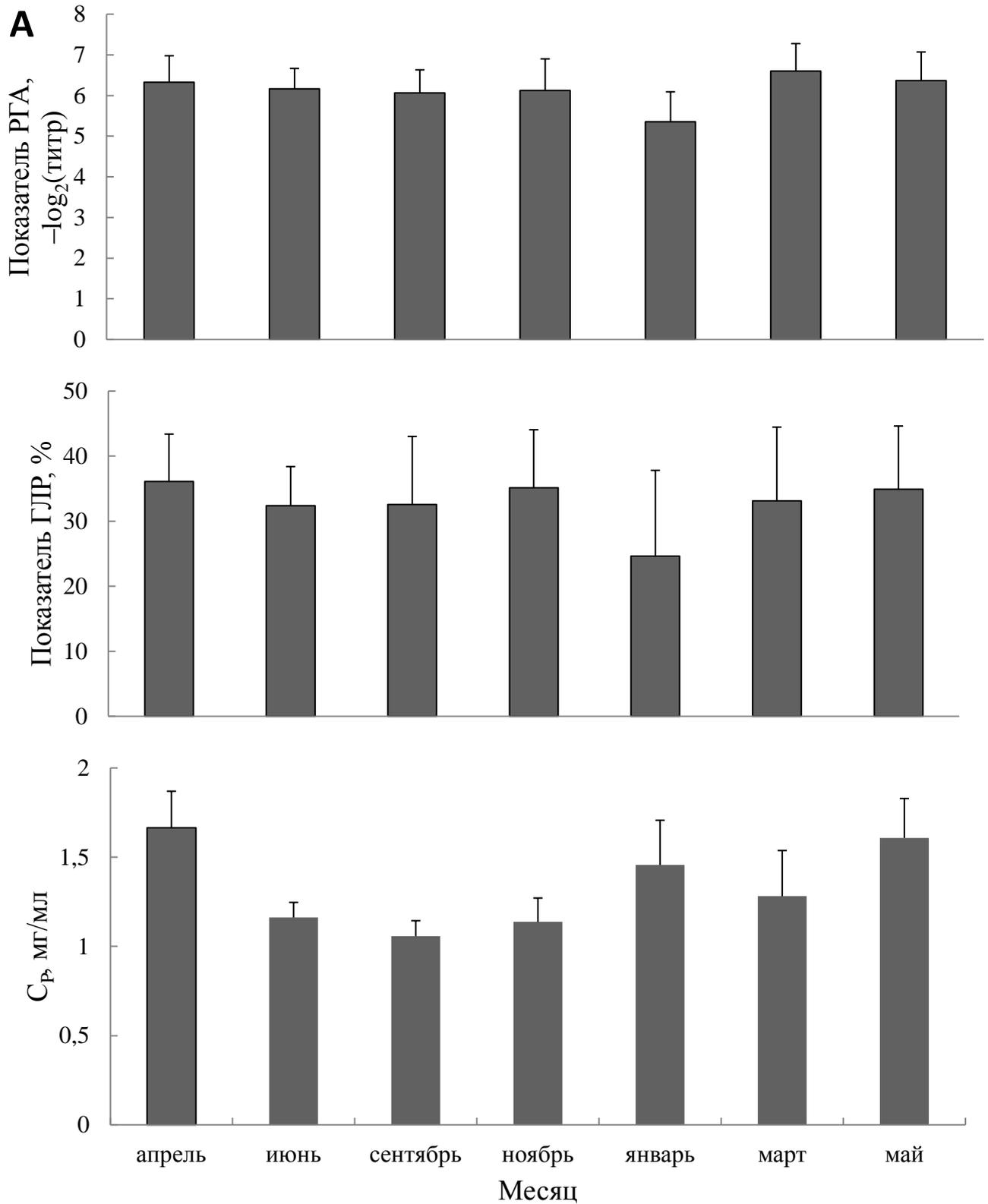


Рисунок 1. Сезонная динамика гуморальных показателей в плазме *M. kurilensis* из залива Восток: А – реакции гемагглютинации (РГА), Б – гемолитической реакции (ГЛР), В – общей концентрации белка (C_p), представленных в виде средних значений с 95 % доверительными интервалами.

Содержание общего белка в плазме C_p , как и в случае ранее рассмотренных параметров, также варьировало в широких пределах от 0,35 до 3,00 мг/мл, отличаясь внутри одной выборки почти на порядок. Однако экстремальные значения меньше 0,5 мг/мл и больше 2,7 мг/мл являлись крайне редкими, а в промежутке между обозначенными границами попадали более 95 % (267 из 276) всех исследованных особей. Диапазон квартильного размаха, характеризующий наиболее типичные значения, составлял: 0,92 мг/мл – нижний квартиль (25 %) и 1,58 мг/мл – верхний квартиль (75 %). Наиболее стабильными месяцами являлись летне-осенние точки, поскольку внутри данных выборок вариативность была значительно ниже по сравнению с зимне-весенними выборками.

Как видно из рисунка 1В, сезонная динамика C_p значительно отличалась от динамики активности ранее описанных гуморальных факторов иммунитета. Так, в летне-осенних точках, в сравнении с зимне-весенними, происходило снижение содержания белка в плазме, которое подтверждают как парные сравнения выборок, так и ANOVA с высокой степенью значимости ($p < 0,001$).

Анализ данных, полученных методом электрофореза по Лэммли, для всей совокупности образцов ($n = 276$) выявил 15 белковых фракций, окрашиваемых СВВ G-250 в достаточной для детектирования степени. Значения процентного содержания каждой из фракций для различных сезонных точек представлены в таблице 2, а также на рисунках 2 и 3.

Содержание в плазме P196 имело колебательную динамику, но без резких скачков (рис. 2А), при этом белки данной фракции хорошо детектировались в большинстве образцов (72 %) и относительно равномерно выявлялись по всем точкам, что в итоге привело к отсутствию значимых различий между сезонами (табл. 2).

Белки фракций P145, P124 и P107 были одними из наименее детектируемых (табл. 2), с наибольшим содержанием в период с сентября по март. Белки фракции P145 вовсе не были выявлены в апреле (рис. 2Б), в то время как в остальные месяцы их содержание было относительно равномерным. Бóльшая частота встречаемости P124 в сентябре (81 %) приводила к резкому повышению среднего значения этой фракции в данной точке (рис. 2В). В разы меньшее содержание фракции P107 в апреле, июне и мае в сравнении с остальными точками приводило к значимым различиям ($p < 0,001$) по данному показателю, что хорошо заметно на графике рисунка 2Г.

Несмотря на несколько большее содержание в плазме белков фракции P78 (54 %), их концентрация также имела значительную вариативность, особенно выраженную в сентябре и марте (что хорошо заметно на графике рисунка 2Д) и влияющую на результаты ANOVA (табл. 2).

Таблица 2. Основные статистические параметры содержания фракций белков в плазме *M. kurilensis* для образцов из залива Восток (n = 276) и результаты сравнения выборок, взятых в различные сезоны

Фракции белков	Частота встречаемости в образцах, %	Медиана	Минимум	Максимум	Среднее	Стандартное отклонение	Уровень значимости ANOVA Краскелла-Уоллеса, p
P196	71	2,5	0,0	11,6	2,6	2,4	0,09
P145	30	0,0	0,0	6,7	0,6	1,3	0,26
P124	40	0,0	0,0	6,8	0,6	1,1	< 0,001*
P107	35	0,0	0,0	9,5	0,7	1,4	< 0,001*
P78	54	1,0	0,0	19,2	1,5	2,2	0,01
P55	100	67,7	16,4	95,5	66,0	14,1	0,12
P48	70	1,6	0,0	42,1	2,6	4,2	< 0,001*
P41	89	2,5	0,0	12,8	3,0	2,5	< 0,001*
P36	91	3,5	0,0	33,5	4,9	5,3	< 0,001*
P33	50	0,0	0,0	14,7	1,3	2,4	0,008
P29	42	0,0	0,0	21,9	0,9	1,9	0,02
P26	65	1,2	0,0	17,0	1,8	2,4	0,03
P22	67	1,8	0,0	31,6	3,3	4,8	0,88
P19	63	1,3	0,0	27,6	3,1	4,8	0,22
P16	82	2,9	0,0	32,2	4,1	4,3	0,004

* – уровни значимости, подтверждающие достоверность различий с учетом поправки на множественные сравнения Бонферрони: для 15 сравнений $p < 0,003$

P55 является единственной мажорной фракцией со 100 % представленностью (обнаружена во всех исследованных образцах) и средним значением процентного содержания 66 % (табл. 2), т.е. данная фракция в среднем занимает 2/3 от всех детектируемых белков в образце. Несмотря на постепенное снижение P55 с января по март (рис. 2Е), значимых различий между сезонными точками в данном случае не выявлено.

Следующая по массе фракция белков плазмы P48 (табл. 2) имела среднюю и относительно равномерно распределенную по месяцам представленность: из 193 детектированных случаев (70 % от 276) минимальная доля была характерна для мая (16 из 30), а максимальная – для сентября (29 из 31). В целом, для P48 выявлен один из наиболее выраженных разбросов значений, при этом встретились всего два аномальных значения, превышающих $P48 = 17,5\%$ (42,1 % в сентябре и 34,5% в марте), которые вносят значительный вклад в повышения средних для соответствующих точек (рис. 2Ж).

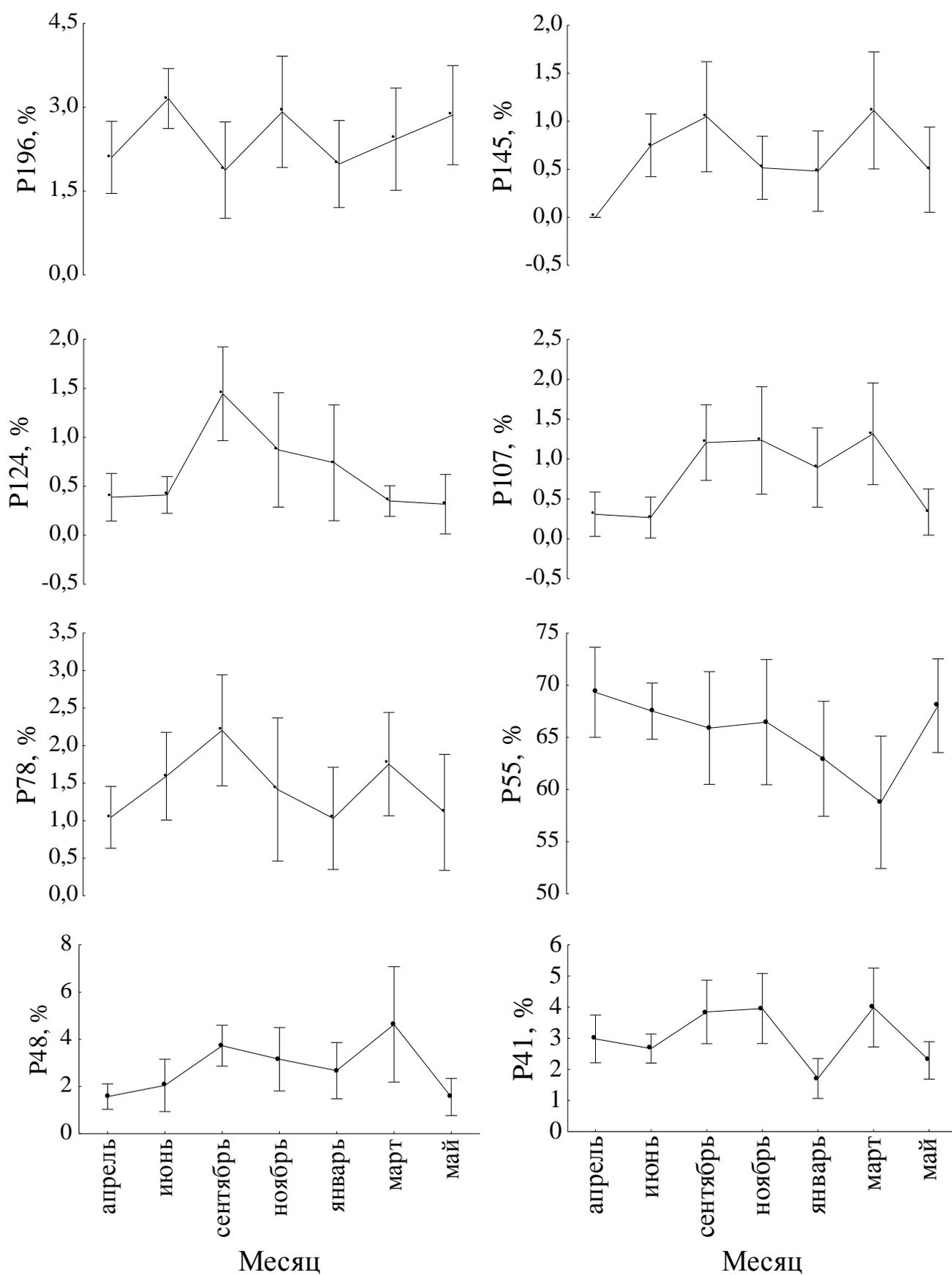


Рисунок 2. Сезонная динамика содержания в плазме фракций белков P196 (А), P145 (Б), P124 (В), P107 (Г), P78 (Д), P55 (Е), P48 (Ж) и P41 (З). Данные представлены в виде средних значений с 95 % доверительными интервалами.

Фракции P36 и P41 являются второй и третьей, соответственно, по частоте встречаемости в образцах (табл. 2), однако их динамики противоположны: для P41 характерно резкое снижение в январе (рис. 23), в то время как P36 в этой точке имеет максимально высокие значения и стабильные минимальные значения в самые теплые месяцы – июнь и сентябрь (рис. 3А).

Относительно слабо представленными фракциями белков плазмы были P33 и P29 (табл. 2), имеющие схожее распределение по точкам: максимум встречаемости был характерен для марта (73 % и 63 % соответственно), минимум – для января (25 % и 28 % соответственно). Что касается января, то P33 в этой точке имела минимальные и при этом наиболее стабильные значения (рис. 3Б), в то время как P29 показала максимальный размах, связанный с экстремальным значением равным 21,9 % (остальные во всех образцах не превышали 10,5 %), которое повысило среднее для данной выборки до уровня других месяцев (рис. 3В).

P26, P22 и P19 можно отнести к средне представленным фракциям белков в плазме (табл. 2) с относительно равномерным распределением по сезонам. Для P26 характерно постепенное снижение с апреля по ноябрь с последующим ростом и нестабильными значениями в январе и марте (рис. 3Г), тогда как динамика P22 – одна из наиболее ровных, без каких-либо заметных скачков между точками (рис. 3Д). Для P19 заметны спады в апреле, январе и мае (рис. 3Е), однако они в данном случае при анализе ANOVA Краскела-Уоллеса не привели к значимым различиям ($p > 0,05$).

Фракция P16 имела значительную представленность с равномерным распределением по месяцам (табл. 2). В данном случае в годовой динамике отчетливо был заметен осенний спад содержания P16 в сентябре и ноябре (рис. 3Ж).

Корреляционный анализ показал незначительную положительную связь РГА и ГЛР для всей совокупности образцов ($R = 0,22$, $n = 276$), которая максимально усиливается в январе ($R = 0,55$, $n = 31$). Одна из наиболее выраженных среди всех зависимостей между иммунными показателями и фракциями белков была отмечена для РГА с P19: $R = 0,38$ для всех образцов ($n = 276$) с более высокими значениями в июне ($R = 0,55$, $n = 85$) и сентябре ($R = 0,52$, $n = 31$).

Помимо ранее указанной связи с агглютинирующей активностью, ГЛР показала также корреляцию с концентрацией белка в плазме: $R = 0,27$ для всех образцов ($n = 276$) с сохранением достоверных положительных корреляций для большинства точек, кроме апреля, января и мая, с максимальными значениями $R = 0,54$ в марте ($n = 30$). Среди всех фракций белков плазмы наибольшую связь ГЛР имеет с P16, которая, однако, при этом характеризуется низким коэффициентом корреляции $R = 0,16$ для всей совокупной выборки ($n = 276$) и несколько более высокими значениями для отдельных точек: $R = 0,27$ для июня ($n = 85$), $R = 0,48$ для сентября ($n = 31$) и $R = 0,47$ для ноября ($n = 32$).

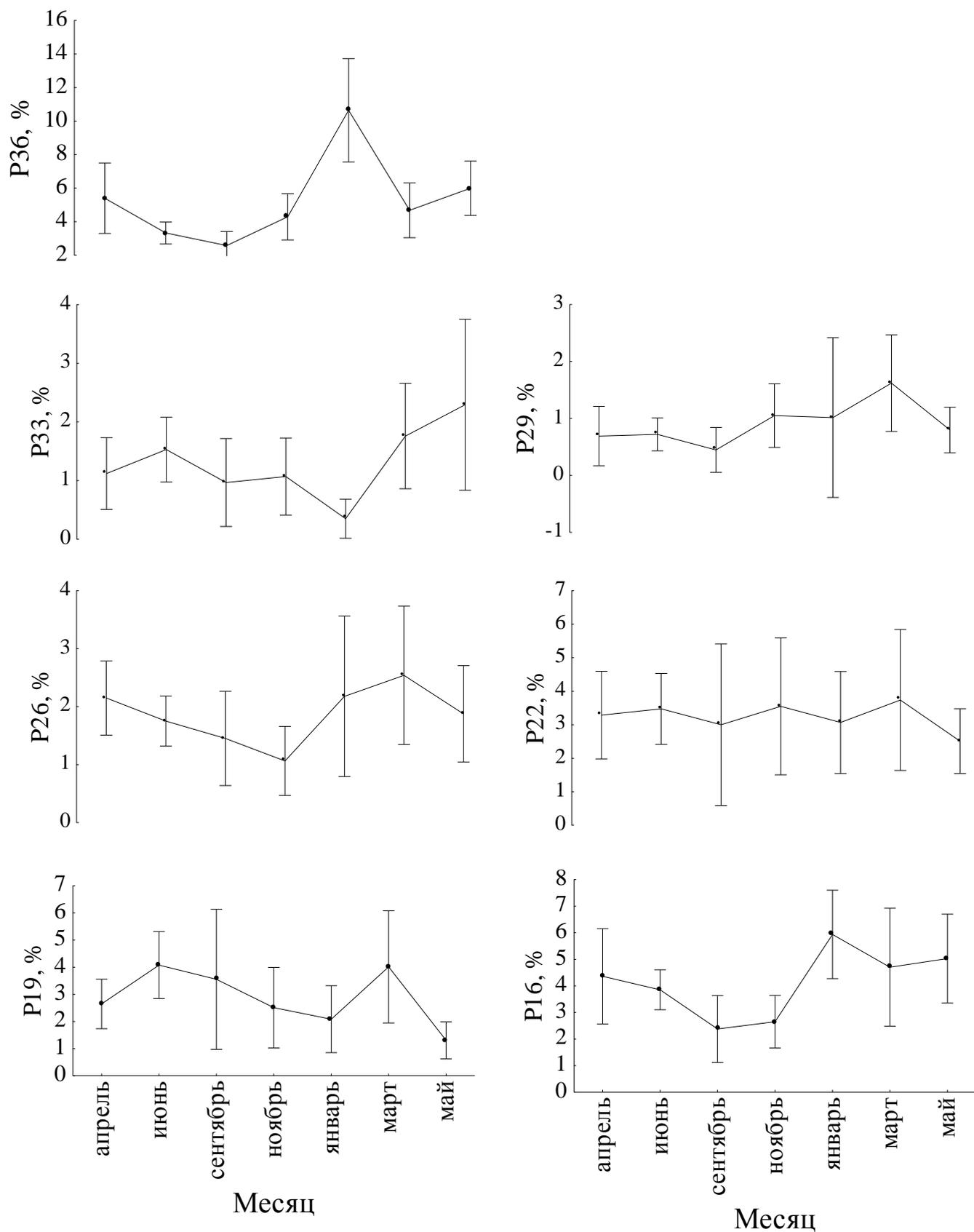


Рисунок 3. Сезонная динамика содержания фракций белков плазмы P36 (А), P33 (Б), P29 (В), P26 (Г), P22 (Д), P19 (Е) и P16 (Ж). Данные представлены в виде средних значений с 95 % доверительными интервалами.

В отличие от РГА и ГЛР, C_p имела достоверную связь с факторами среды, такими как температура воды ($R = -0,17$) и концентрация кислорода в ней ($R = 0,22$). Также ранее была отмечена связь C_p с ГЛР. Что касается корреляций C_p с содержанием различных белковых фракций плазмы, то они выявлены в большинстве случаев (за исключением P124, P48, P41 и P26), как правило, с положительной направленностью (кроме P196 и P55). Наиболее сильную связь C_p показала с P55 ($R = -0,4$, $n = 276$), которая сохраняется практически во всех точках (R от $-0,34$ до $-0,52$), кроме ноября, а также с P16 ($R = 0,4$, $n = 276$). В остальных случаях связи имели слабую выраженность ($R < 0,3$).

Среди всех выявленных полипептидных фракций плазмы связь с показателями среды были отмечены лишь для P107, которая имела обратную корреляцию с соленостью воды ($R = -0,38$), а также для P36: $R = -0,33$ в случае температуры и $R = 0,34$ в случае солености.

3.3. Динамика активности плазмы гемолимфы *M. kurilensis* в ответ на импульсную стимуляцию бактериями

Проведенный исходно отбор из всей совокупности выловленных особей ($n = 1016$) животных с показателями агглютинирующей и фагоцитарной активности гемолимфы в диапазоне медиана $\pm 30\%$ обеспечил относительную гомогенность оцениваемых показателей для *M. kurilensis*, взятых для эксперимента ($n = 320$): сравнение критерием Фридмана исходного состояния всех контрольных (“К1”) и экспериментальных (“Э1”) групп, как в совокупности ($n = 160$), так и для каждой отдельной точки ($n = 16$), не выявило значимых различий ($p > 0,05$) ни по одному из оцениваемых показателей (РГА, ГЛР, C_p).

Значения показателей РГА до отбора варьировали в широких пределах от 1 до 11, но, как и в ранее проведенных работах по сезонной динамике, максимальные и минимальные значения встречались крайне редко: в совокупности всего 7 % от выборки ($n = 1016$) для показателей 1, 2, 10 и 11. Литическая активность и концентрация белков в плазме даже после отбора ($n = 320$) варьировали в широких пределах, близких к ранее выявленным в сентябре-ноябре границам: показатели ГЛР от 0 до 98,3 %, C_p – от 0,59 до 2,67 мг/мл.

Изменений состояния моллюсков после введения СМВ во всех контрольных выборках (“К1” и “К2”) от 3 ч до 336 ч парный критерий Вилкоксона не выявил ($p > 0,05$) ни по одному из параметров, в отличие от экспериментальных групп, которым вводили термически инактивированных бактерий *S. aureus*. Повышение всех показателей в этом случае происходило с первых часов наблюдения (рис. 4), причем для ГЛР и C_p высокие значения сохранялись до 24 ч, в то время как для РГА – вплоть до 168 ч. Значимость всех отмеченных изменений подтверждалась парным критерием Вилкоксона ($p < 0,05$).

У отобранных в эксперимент животных ($n = 320$) по исходным данным ("К1" и "Э1") корреляционный анализ показал крайне слабую связь между ГЛР и C_p ($R = 0,16$) и несколько более выраженную – для РГА и ГЛР ($R = 0,28$).

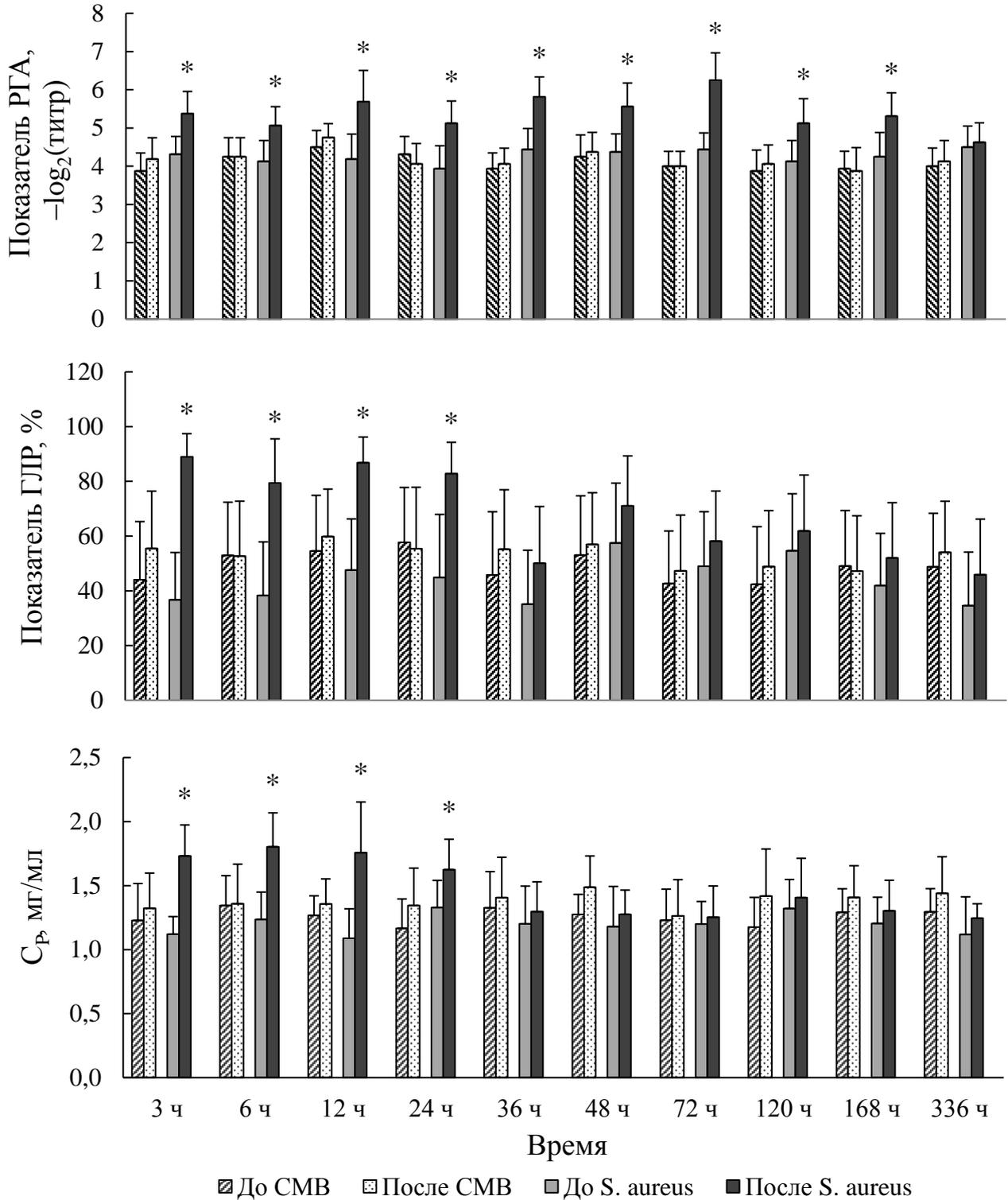


Рисунок 4. Показатели реакции гемагглютинации (РГА), гемолитической реакции (ГЛР) и концентрации общего белка в плазме (C_p) до и после введения стерильной морской воды (СМВ) или суспензии *S. aureus*, представленные в виде средних значений с 95 % доверительными интервалами; * – различия до и после введения значимы при $p < 0,05$.

При оценке связи между изменениями показателей у экспериментальных животных (значения "Э2" минус "Э1") были выявлены слабая прямая зависимость между изменениями РГА и ГЛР ($R = 0,11$), ГЛР и C_p ($R = 0,24$), а также обратная связь ГЛР с фагоцитарной активностью гемоцитов для всей совокупности точек ($n = 160$). Кроме того, в период активного иммунного ответа – от 3 ч до 24 ч ($n = 64$) была обнаружена обратная зависимость между изменениями показателей РГА и C_p ($R = -0,43$), а также наблюдали усиление связи ГЛР с фагоцитарной активностью ($R = -0,54$) в период от 3 ч до 48 ч ($n = 96$). Существенная связь между изменениями РГА и ГЛР выявлена лишь в отдельных точках – 48 ч и 168 ч ($n = 16$).

3.4. Влияние на показатели плазмы гемолимфы *M. kurilensis* антропогенной нагрузки как хронического стресса

На рисунке 5 представлены значения гуморальных показателей плазмы *M. kurilensis* из условно фоновой акватории залива Восток и импактной Спортивной гавани Амурского залива. Как видно из графиков на рисунке, все показатели у животных из импактной акватории снижены. Так, общий размах РГА у животных из Спортивной гавани составлял 1–10 и квартильный размах (25–75 %) – 3–5, в то время как из залива Восток – 3–10 и 4–6 соответственно. Однако в случае агглютинирующей активности сдвиг был недостаточным для статистической поддержки различий ($p > 0,05$). В случае же литической активности и концентрации белков в плазме различия были достоверными ($p < 0,05$). Как и для РГА, общая вариативность и квартильный размах показателей ГЛР в заливе Восток были выше: 0,09–94,35 % и 0,99–85,42 % соответственно, против 0,04–81,76 % и 0,22–26,95 % в Спортивной гавани. В случае C_p минимальные и максимальные значения были на сходном уровне, однако распределение значений в импактной акватории было сдвинуто в сторону меньших величин.

Показатели содержания фракций белков плазмы имели стабильный характер, и различия были выявлены лишь в отношении трех из них: сниженной в импактной акватории оказалась мажорная фракция P55, а P124 и P78 наоборот были повышены.

Корреляционный анализ между гуморальными показателями, как и ранее в сезонной динамике, выявил некоторую зависимость между ГЛР и C_p ($R = 0,31$, $n = 65$), а также связь РГА и P19 ($R = 0,30$, $n = 65$).

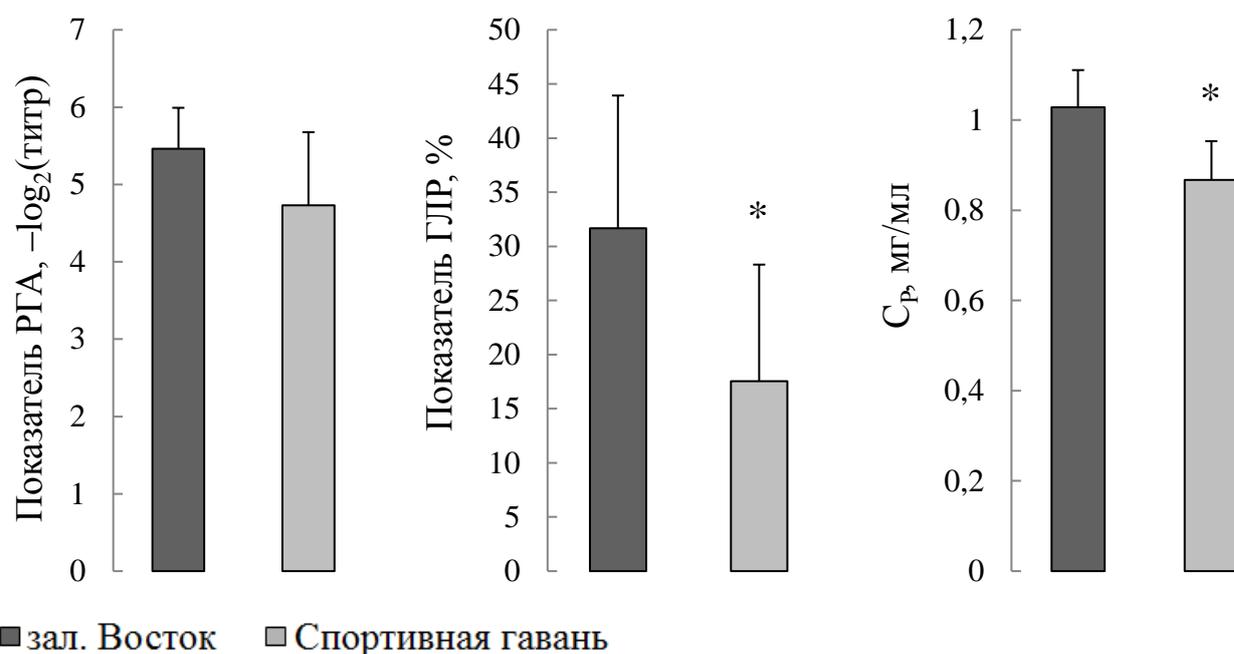


Рисунок 5. Показатели реакции гемагглютинации (РГА), гемолитической реакции (ГЛР) и концентрации белка в плазме (S_p) *M. kurilensis* из условно фоновой (залив Восток) и импактной (Спортивная гавань Амурского залива) акваторий, представленные в виде средних с 95 % доверительными интервалами ($p = 0,05$); * – различия значимы при $p < 0,05$.

У взятых в данную работу животных проводили комплексное исследование показателей гемолимфы и гистологического состояния пищеварительной железы (ПВЖ) и почки как органов, в первую очередь отвечающих за очистку и выведение поллютантов из организма моллюсков. Были исследованы корреляционные зависимости между рядом гистопатологических показателей и показателями гуморального иммунитета. Достоверными и наиболее выраженными по совокупной выборке ($n = 65$) были следующие корреляции: для ПВЖ – гипервакуолизация клеток канальцев с ГЛР ($R = -0,36$) и P78 ($R = 0,33$), некроз тканей органа с ГЛР ($R = -0,25$); для почки – число конкреций в нефроцитах с P78 ($R = -0,27$) и инфильтрация гемоцитами интерстициального пространства с РГА ($R = -0,25$). Также ГЛР показала обратную связь с комплексными гистопатологическими индексами, рассчитанными на основе всех зафиксированных гистопатологий: состояния ПВЖ ($R = -0,27$, $n = 65$) и общим индексом для двух органов ($R = -0,30$, $n = 65$). Кроме того, у животных из залива Восток показана положительная связь S_p с общим гистопатологическим индексом ($R = 0,33$, $n = 39$), которая для Спортивной гавани становилась обратной ($R = -0,55$, $n = 26$), что в совокупности по двум станциям приводило к ослаблению ее значения ($R = -0,19$, $n = 65$). Анализ отдельных выборок (табл. 3) показал ряд корреляций, которые могли иметь кардинально противоположное значение или вовсе исчезать в зависимости от акватории.

Таблица 3. Статистически значимые ($p < 0,05$) корреляции между гистопатологическими и гуморальными показателями для выборок *M. kurilensis* из условно фоновой акватории залива Восток и импактной акватории Спортивной гавани Амурского залива (данные по гистопатологиям предоставлены Сокольниковой Ю.Н. (Сокольникова, 2021) и представлены в нашей статье Kumeiko et al., 2018).

Орган	Показатели гистопатологии	Гуморальные показатели	Коэффициент корреляции Спирмена, R	
			залив Восток, n = 39	Спортивная гавань, n = 26
ПВЖ	Гипервакуолизация	ГЛР	-0,03	-0,60
	Гипервакуолизация	С _p	0	-0,40
	Гранулоцитома / фиброма	РГА	0,06	0,22
	Гранулоцитома / фиброма	ГЛР	0,05	0,22
	Гранулоцитома / фиброма	С _p	0,50	0,35
	Паразитарные инвазии	ГЛР	0,11	0,40
	Паразитарные инвазии	P55	-0,35	0,39
Почка	Осферивание эпителиальных клеток	ГЛР	0	-0,33
	Гипервакуолизация	ГЛР	-0,03	-0,35
	Кариопикноз	ГЛР	0,17	-0,27
	Кариопикноз	РГА	0,14	-0,26
	Кариопикноз	С _p	0	-0,33
	Воспаление	ГЛР	-0,11	-0,33

ПВЖ – пищеварительная железа; ГЛР – гемолитическая реакция; С_p – концентрация белков в плазме; РГА – реакция гемагглютинации; P55 – содержание фракции белков массой 55 кДа в плазме.

3.5. Спектр углеводной специфичности агглютининов плазмы гемолимфы *M. kurilensis*

Агглютинины плазмы подавляющего большинства исследованных особей проявили высокую специфичность к D-(+)-галактуроновой и D-глюкуроновой кислотам. Лишь в случаях нескольких моллюсков, собранных в мае и ноябре, не выявлено высокой специфичности к использованным уроновым кислотам. В отношении сиаловой кислоты неактивными оказались лишь два животных, и еще одно показало слабую активность. Полное ингибирование реакции для абсолютно всех животных показали муцины типов II и III, часто используемые в качестве позитивного контроля отмены реакции гемагглютинации.

Достаточно сильные, во многих случаях, ингибирующие свойства для разных животных с разных станций показали N-ацетил-D-галактозамин, N-ацетил-D-глюкозамин, D(-)-рибоза и D-глюкоза. Менее специфичными оказались D-глюкуроно-3,6-лактоза, D-(+)-манноза и D-(+)-галактоза. Среднюю и слабую степень специфичности показали DL-арабиноза, D-(+)-раффиноза, D-(+)-мелибиоза, D-(+)-ксилоза и D-(+)-фукоза. Очень слабую специфичность, и лишь в отношении некоторых животных, показали мио-инозитол, лактоза и

L(-)-сорбоза. Практически нулевую ингибирующую способность, за единичными исключениями, показали D-(+)-мальтоза, α -метил-D-глюкопираноза и L-рамноза.

3.6. Разработка метода выделения и очистки углеводов-распознающего белка MkC1qDC из плазмы гемолимфы *M. kurilensis*

Полученные фракции высаливания белков плазмы растворами СА с насыщениями от 15 % до 85 % показали содержание полипептидов различной массы и различную агглютинирующую активность (рис. 6). Максимальный титр РГА был характерен для фракции 45 % (рис. 6Б), однако анализ методом ИРГА показал наибольшее содержание агглютининов с целевой углеводной специфичностью к уроновым кислотам и Ca^{2+} -зависимостью во фракциях 75 % и 85 %, которые и были использованы в последующей очистке аффинной хроматографией.

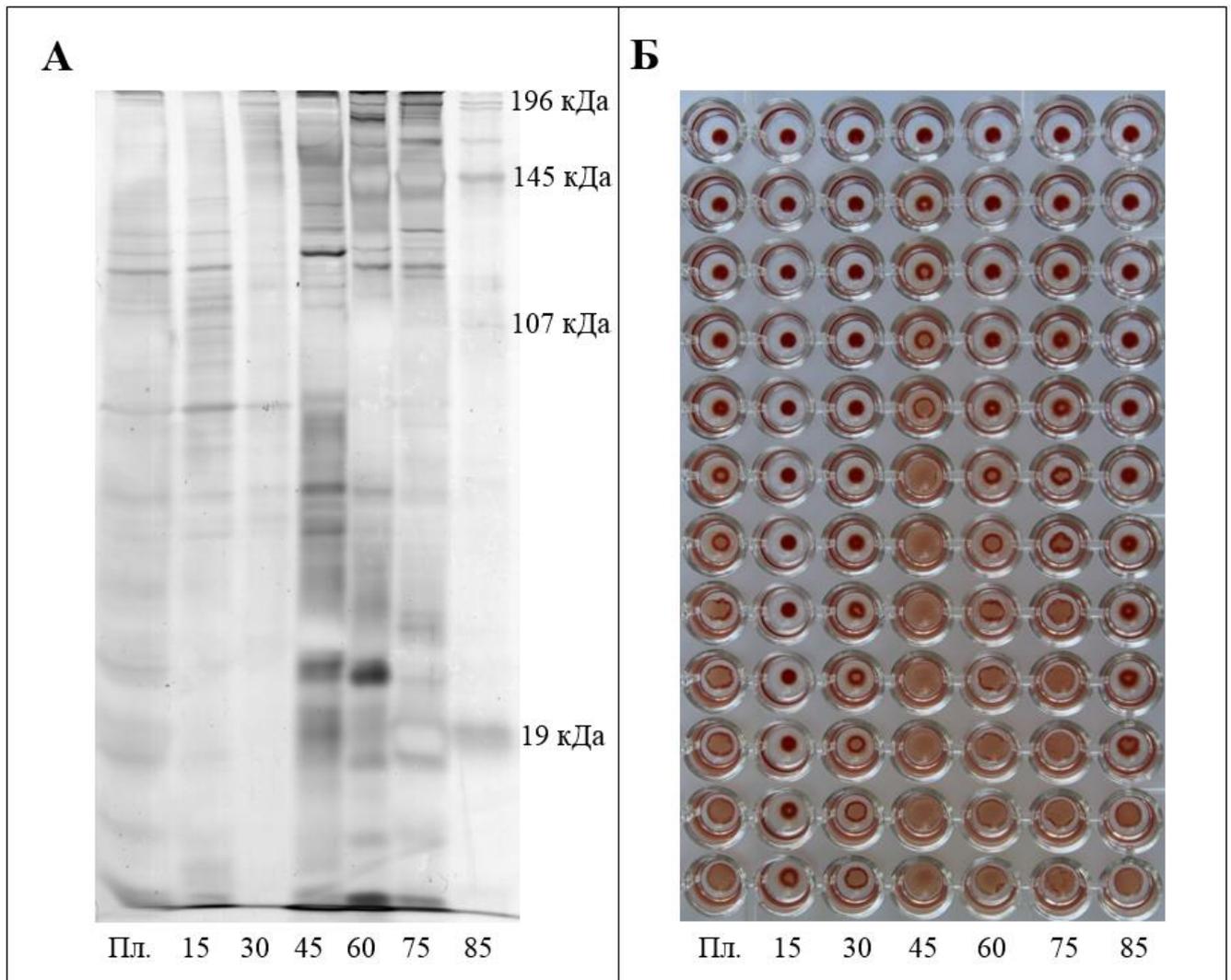


Рисунок 6. Этапы высаливания плазмы *M. kurilensis* ступенчатым градиентом сульфата аммония. А – электрофореграмма белков не разделенной плазмы (Пл.) и белковых осадков, полученных после центрифугирования растворов с различными степенями насыщения сульфата аммония (15–85 %); Б – реакция прямой гемагглютинации с соответствующими образцами.

На рисунке 7А представлена итоговая схема выделения целевого белка. При этом для анализа качества разделения белков образцов каждого этапа очистки МкС1qDC был проведен электрофорез по методике Лэммли с окрашиванием 12 % полиакриламидного геля раствором СВВ G-250. На полосах "1"–"5" (рис. 7Б) представлены разные фракции выделения белка МкС1qDC, включающие нативную плазму, продукты высаливания растворами СА со степенями насыщения 60 % и 85 %, а также растворы, полученные в ходе аффинной хроматографии, профиль элюции которой представлен на рисунке 7В.

На полосе "1" рисунка 7Б представлена гемолимфа, очищенная от клеток (плазма), которая имеет множество белков различной массы от ≈ 10 до ≈ 200 кДа и один мажорный белок массой порядка 55 кДа. После высаливания раствором СА со степенью насыщения 60 % (рис. 7Б, полоса "2") происходило уменьшение числа и снижение содержания сохранившихся белков, что хорошо просматривается на примере мажора с массой 55 кДа. Полоса "3" – фракция высаливания со степенью насыщения СА 85 %, где также видно еще более выраженное снижение количества белков, однако отчетливо проявляется полипептид с массой 19 кДа, соответствующей МкС1qDC.

После метода грубой очистки белков путем высаливания производили тонкую очистку аффинной хроматографией. Образец не связавшихся с аффинным носителем компонентов на полосе "4" сохраняет все белки образца "3", кроме полипептида с массой 19 кДа, соответствующему МкС1qDC, который являлся единственным мажорным белком в образце "5" (рис. 7Б) после элюции раствором с $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$. На рисунке 7В представлен профиль элюции аффинной хроматографии, проведенной с фракцией высаливания плазмы *M. kurilensis* раствором СА со степенью насыщения 85 % и сефарозой, несущей на поверхности молекулы полиуроната (растительный пектин со степенью этерификации 60 %). Как видно на рисунке 7В, в профиле элюции белков хорошо выделяются два пика оптической плотности. Первый пик, протяженностью от ≈ 10 до ≈ 54 мл, соответствует не связавшимся с носителем компонентам (полоса "4", рис. 7Б). Второй пик (полоса "5", рис. 7Б) отставлен на объем промывочного раствора и совпадает со сменой состава элюента, что отображает график электропроводности: повышение содержания ионов связано с большей концентрацией Tris-HCl : 200 мМ в растворе с хелатирующим агентом $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ вместо 10 мМ в предшествующем рабочем растворе с CaCl_2 . Таким образом, полученный в ходе очистки МкС1qDC представляет собой Ca^{2+} -зависимый углевод-связывающий белок с высокой степенью аффинитета к растительным пектинам и/или их компонентам.

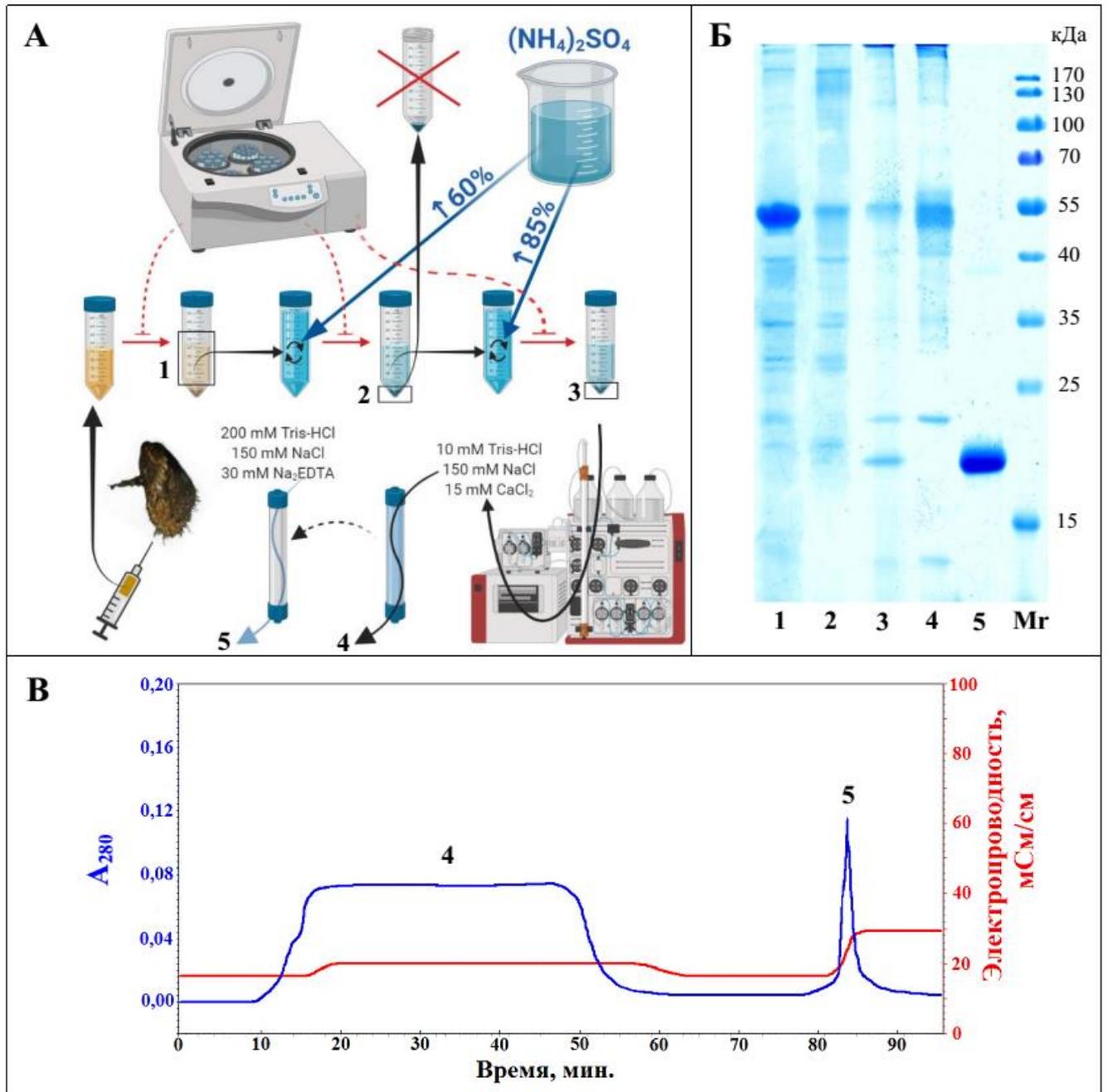


Рисунок 7. Этапы выделения белка MkC1qDC. А – общая схема выделения; Б – электрофореграмма с образцами различных этапов выделения белка; В – профиль элюции белков при выделении MkC1qDC аффинной хроматографией. 1 – бесклеточная гемолимфа (плазма) *M. kurilensis*; 2 – образец после высаливания плазмы раствором сульфата аммония со степенью насыщения 60 %; 3 – образец после второй ступени высаливания с доведением насыщения раствора сульфата аммония до 85 %; 4 – образец белков, не связавшихся с носителем в аффинной хроматографии; 5 – образец после аффинной хроматографии, снятый с носителя раствором, содержащим ЭДТА; Mr – стандарты молекулярных масс PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

3.7. Физико-химические свойства нового белка MkC1qDC

Проверка 2D электрофорезом подвижности очищенного MkC1qDC в градиенте pH и акриламида 4–20% показала, что pI соответствует 5,2, и подтвердила наличие лишь одного полипептида массой 19 кДа (рис 8А).

При проверке pH-зависимости MkC1qDC было выявлено, что максимальную агглютинирующую активность белок сохраняет после 1 ч инкубации в диапазоне pH 7–8 (рис. 8Б). При повышении pH до 9 происходит некоторое снижение активности, которая вовсе пропадает при pH 10. Слабокислая и кислая среда pH 3–6 незначительно влияли на активность белка. Агглютинирующая активность MkC1qDC не менялась при инкубировании его по 1 ч при температурах 0–40 °С, но незначительно снижалась при 50 °С и совершенно исчезала при 60 °С и выше (рис. 8В).

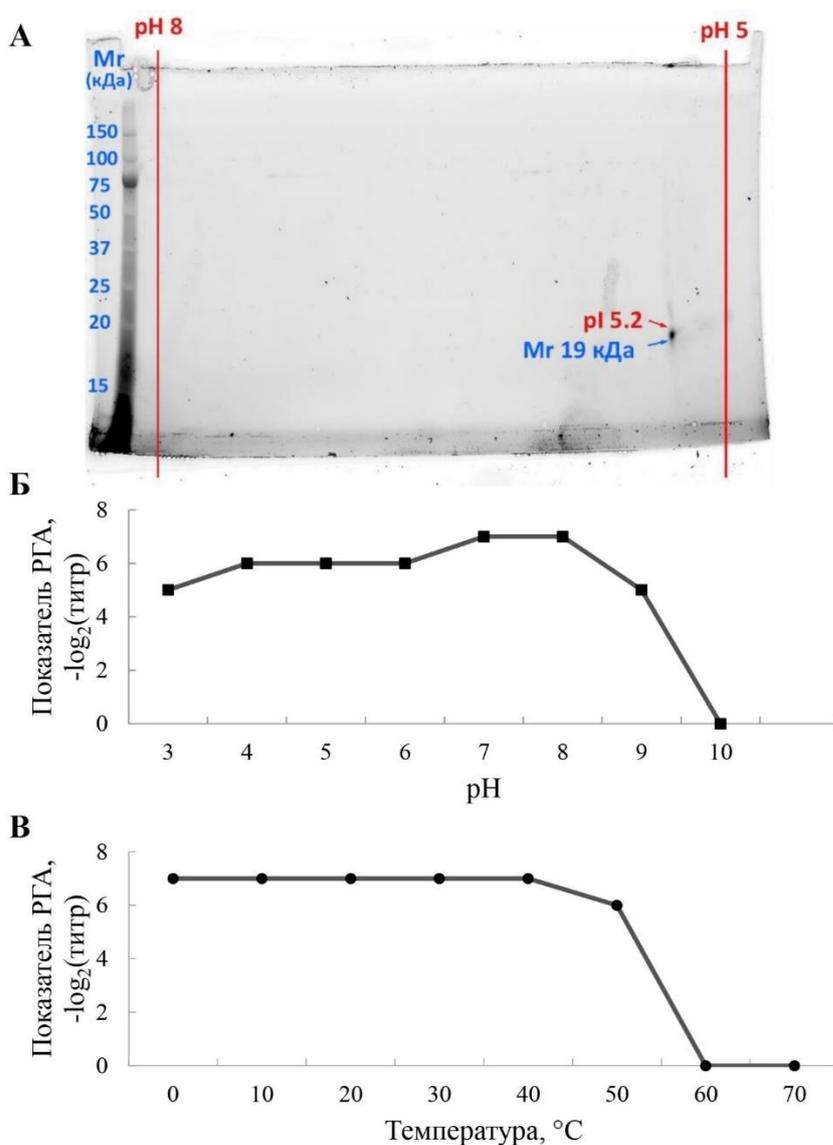


Рисунок 8. Физико-химические свойства белка MkC1qDC. А – 2D электрофорез выделенного и очищенного MkC1qDC. Б, В – активность MkC1qDC, выраженная в виде показателей реакции гемагглютинации (РГА), после 1 ч инкубации при различных значениях pH (А) и температуры (В).

3.8. Углеводная специфичность белка MкC1qDC

Исходя из полученных результатов, представленных в таблице 4, среди 23 проверенных методом ИРГА моносахаридов ингибирующую активность показали лишь 6 из них. Это сиаловая кислота (3,75 мМ, 1,16 мг/мл), D-глюкуроновая кислота и (7,5 мМ, 1,46 мг/мл), D-галактурановая кислота (7,5 мМ, 1,46 мг/мл), являющиеся основой центральной цепи пектинов, галактоза при максимальной использованной концентрации (30 мМ, 5,4 мг/мл), ее эпимер гулоза (15 мМ, 2,7 мг/мл) и дезоксигалактоза (7,5 мМ, 1,23 мг/мл). Другой изомер галактозы – манноза не проявила ингибирующей активности при концентрации 30 мМ, в отличие от ее димера маннобиозы (15 мМ, 5,13 мг/мл) и лактозы (7,5 мМ, 2,7 мг/мл), в состав которой входит галактоза. Полисахариды, являющиеся компонентами клеточных стенок микроорганизмов, такие как маннан из *S. cerevisiae*, LPS из *E. coli* и PDG из *S. aureus*, а также муцин типа II, имеющий в составе терминально расположенную сиаловую кислоту, имели гораздо более высокую ингибирующую способность с IC50 в диапазоне 0,10–0,49 мг/мл. Однако наибольший аффинитет MкC1qDC проявил в отношении полисахаридов с кислыми производными маннозы и галактозы в основе, таким как альгинат, κ-каррагинан, фукоидан и пектин, для которых IC50 был менее 0,002 мг/мл, что на три порядка меньше ранее упомянутых полисахаридов.

Таблица 4. Концентрации полумаксимального ингибирования (half maximal inhibitory concentration, IC50) углеводов, использованных в реакции ингибирования гемагглютинации с белком MкC1qDC

	Углеводы	IC50
<i>Полисахариды</i>	альгинат	< 0,30 мкг/мл
	κ-каррагинан	< 0,66 мкг/мл
	фукоидан	< 0,62 мкг/мл
	пектин	1,6 мкг/мл
	маннан	101 мкг/мл
	липополисахарид (LPS)	125 мкг/мл
	пептидогликан (PDG)	250 мкг/мл
	муцин II типа	493 мкг/мл
	гиалуроновая кислота	—
	хитозан	—
	агароза	—
	декстран	—
<i>Олигосахариды</i>	D-лактоза	15 мМ, 5,13 мг/мл
	2α-маннобиоза	30 мМ, 10,26 мг/мл
	N-ацетил-D-лактозамин	—
	D-мелибиоза	—
	D-мальтоза	—
	D-раффиноза	—
<i>Моносахариды</i>	сиаловая кислота	3,75 мМ, 1,16 мг/мл
	D-галактуриновая кислота	7,5 мМ, 1,46 мг/мл
	D-глюкуроновая кислота	7,5 мМ, 1,46 мг/мл
	L-гулоза	7,5 мМ, 1,35 мг/мл
	2-деокси-D-галактоза	15 мМ, 2,46 мг/мл
	D-галактоза	30 мМ, 5,40 мг/мл
	D-манноза	—
	D-глюкоза	—
	D-фукоза	—
	L-фукоза	—
	N-ацетил-D-галактозамин	—
	N-ацетил-D-глюкозамин	—
	N-ацетил-D-маннозамин	—
	D-глюкозамин	—
	α-метил-D-глюкопираноза	—
	L-рамноза	—
	D-рибоза	—
	мио-инозитол	—
	DL-арабиноза	—
	D-ксилоза	—
L-сорбоза	—	
метил-β-ксилопираноза	—	
D-глюкуроно-6,3-лактон	—	

3.9. Первичная структура белка MkC1qDC

В результате пяти секвенирований по методу Эдмана N-концевого фрагмента MkC1qDC с использованием независимо выделенных образцов были получены пептидные последовательности длиной от 13 до 41 аминокислотных остатков (рис. 9А). Однако их анализ с помощью программы BLAST не дал достоверных совпадений ни по одной из интегрированных баз (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, по состоянию на 26 мая 2021 г.).

De novo сборка пептидных фрагментов на основе проведенной масс-спектрометрии позволила получить N-концевой фрагмент, аналогичный предыдущему результату секвенирования методом Эдмана (рис. 9А–В, рис 10А,Б), а также путем выравнивания трех перекрывающихся пептидов была получена последовательность из 70 аминокислот (рис. 9Г, рис. 10В–Д). Анализ этого фрагмента с помощью программы BLAST обнаружил совпадение с C1qDC или C1q-подобными белками двустворчатых моллюсков с высокой статистической значимостью и идентичностью до 67% для CBX41653.1 (рис. 9Д). Далее, используя CBX41653.1 (C1q-домен-содержащий белок *M. galloprovincialis*, MgC1q4) в качестве референса и ALPS ассемблер де Брэйна (Tran et al., 2016), была получена полная аминокислотная последовательность исследуемого белка MkC1qDC, представленная на рисунке 11. Анализ собранной последовательности MkC1qDC с помощью BLAST выявил предполагаемый консервативный домен суперсемейства C1q и высокую гомологию с другими белками C1qDC двустворчатых моллюсков: CBX41653.1; SAC5364865.1; КАГ2251157.1; XP_022294274.1; XP_034307311.1 (рис. 9Е). Гомологичные белки имели по одному домену C1q на С-конце, относительно короткие уникальные N-концевые фрагменты и находились в диапазоне 177–206 аминокислотных остатков. Первичная структура белка MkC1qDC включает 176 аминокислот, что соответствует расчетной молекулярной массе Mr 19181 Да и изоэлектрической точке pI 5,2 (http://web.expasy.org/compute_pi/, по состоянию на 26 мая 2021 г.) и полностью совпадает с экспериментальными данными электрофорезов, описанными выше.

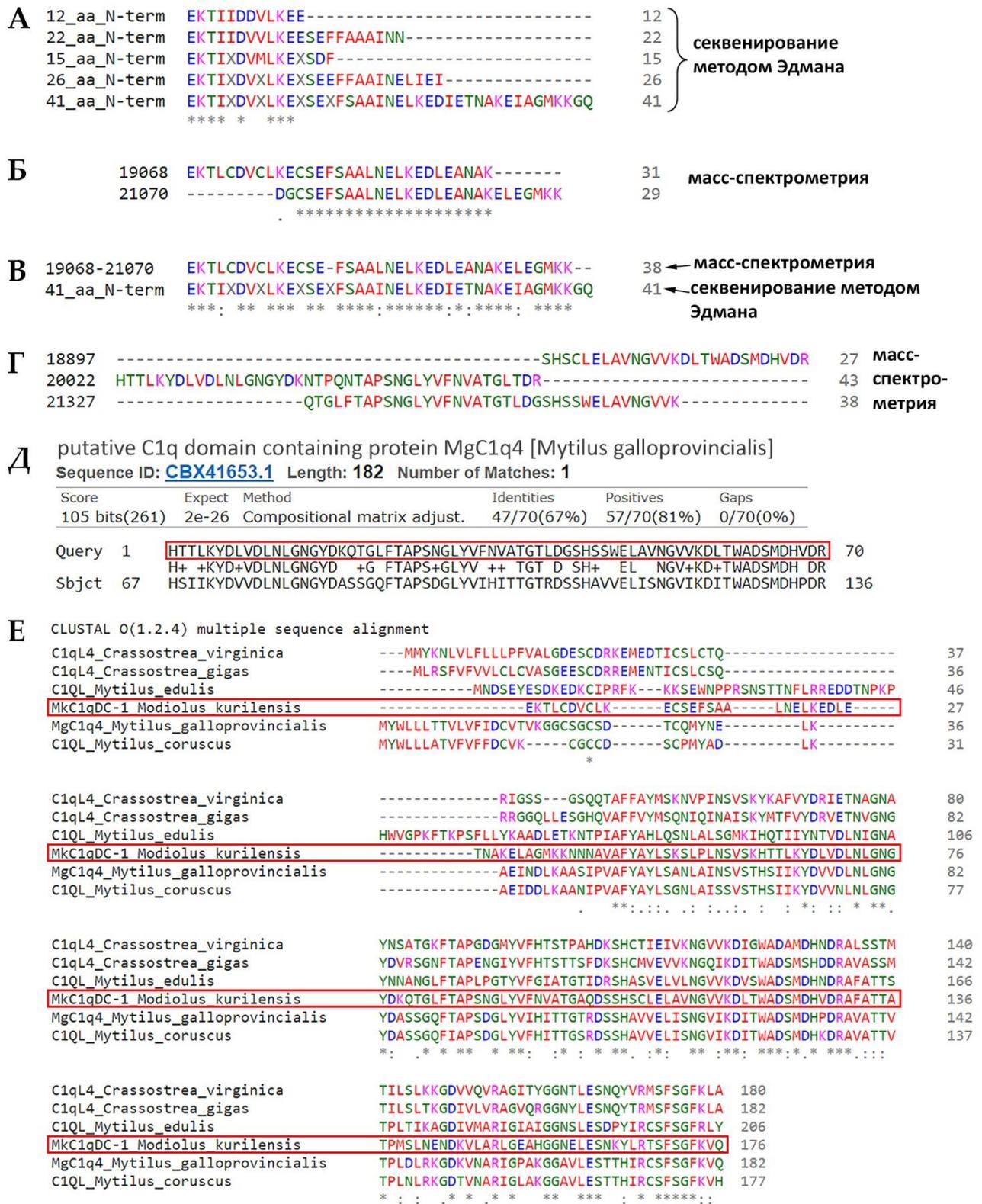


Рисунок 9. Анализ первичной структуры белка MkC1qDC. А – результаты пяти независимых секвенирований N-концевого фрагмента MkC1qDC методом Эдмана. Б – выравнивание двух фрагментов, полученных в результате масс-спектрометрии, которые соответствуют N-концу MkC1qDC. В – выравнивание N-концевых фрагментов, полученных секвенированием по Эдману и масс-спектрометрией. Г – выравнивание трех перекрывающихся пептидов из центральной части белка MkC1qDC. Д – пример анализа полученного пептида длиной 70 аминокислотных остатка с помощью программы BLAST. Е – выравнивание полной аминокислотной последовательности MkC1qDC с ближайшими гомологами.

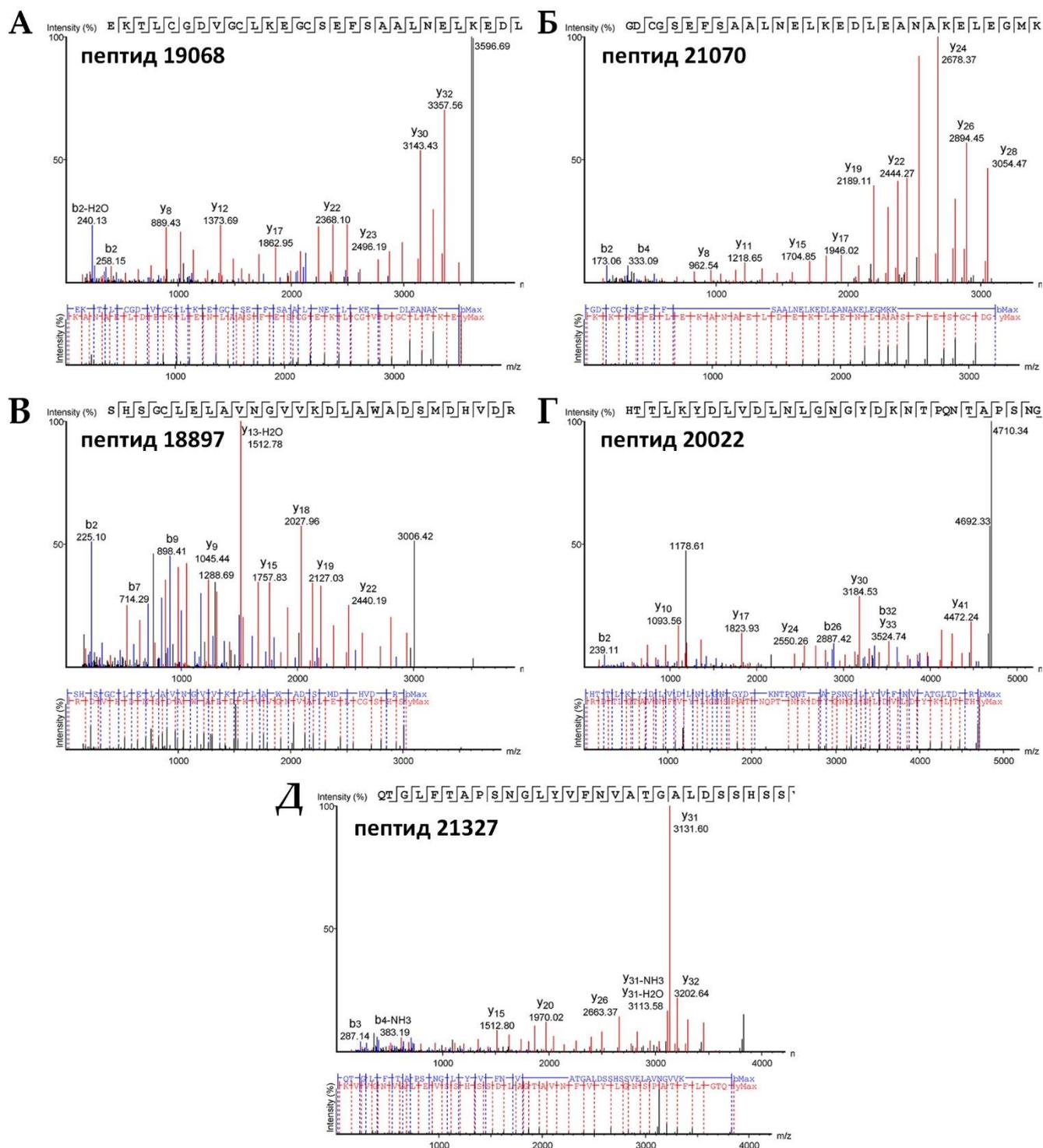


Рисунок 10. Данные масс-спектрометрии пептидных фрагментов белка Mkc1qDC. А, Б – пептиды, использованные для выравнивания с N-концевым фрагментом, полученным методом Эдмана (рис. 9Б,В). В, Г, Д – пептиды, использованные для построения последовательности из 70 аминокислотных остатка, гомологичной C1qDC белкам двусторчатых моллюсков (рис. 9Г,Д).

```

>MkC1qDC_Modiolus_kurilensis
EKTLCADVCLKECSEFSAALNELKEDLETNAKELAGMKNNNAVAFYAYLSKSLPLNSVSKHTTLKYDLVD
LNLGNGYDKQTGLFTAPSNGLYVFNVAATGAQDSSHSCELEAVNGVVKDLTWADSMDHVDRAFATTATPMS
LNENDKVLARLGEAHGGNELESNKYLRTSFSGFKVQ

```

Рисунок 11. Полная аминокислотная последовательность белка MkC1qDC в формате fasta.

3.10. Антибактериальная активность белка MkC1qDC

Анализ антибактериальной активности MkC1qDC с использованием нескольких видов бактерий (*Vibrio* sp., *Ruegeria* sp., *E. coli*, *Pseudoalteromonas* sp., *S. aureus* и *B. subtilis*) выявил агглютинирующую активность белка в отношении обоих грам(+) бактерий *B. subtilis* и *S. aureus* (рис. 12А). При этом в случае агглютинации белком *B. subtilis* результат был замечен невооруженным взглядом в виде гетерогенного осадка в микропробирке. При проведении дальнейшего микроскопического анализа были выявлены крупные уплотненные конгломераты бактерий, тогда как на контроле клетки были расположены равномерно и преимущественно поодиночке. В результате реакции MkC1qDC с *S. aureus* образовалось большое количество плотных конгломератов значительно меньших размеров по сравнению с *B. subtilis*, тогда как в контроле без добавления белка бактериальные клетки *S. aureus* формировали в основном тетрады либо скопления из нескольких тетрад.

В опытах с грам(-) бактериями наиболее выраженные конгломераты клеток были обнаружены при реакции агглютинации MkC1qDC с *Pseudoalteromonas* sp. В контроле клетки располагались одиночно, либо в небольших цепочках по 3–5 штук. После инкубации с белком практически все клетки образовали единое плотное скопление, которое было размером больше, чем поле зрения объектива микроскопа 60х. Крупные и плотные конгломераты были выявлены и при реакции MkC1qDC с клетками *Ruegeria* sp., в то время как в контроле бактериальные клетки располагались равномерно и далеко друг от друга. При проведении реакции с *E. coli* формировались более рыхлые конгломераты меньших размеров и большое количество цепочек из клеток, которые потом, по-видимому, уже собирались в более крупные скопления (рис. 12А).

Наименее эффективная реакция была характерна в случае взаимодействия MkC1qDC с *Vibrio* sp.: крупных конгломератов не образовывалось, клетки были соединены в небольшие разреженные группы по 4–15 клеток или формировали небольшие цепочки (рис. 12А). В этом случае было сложно оценить точно, произошло распознавание белком MkC1qDC паттернов на клеточной поверхности *Vibrio* sp. или же нет.

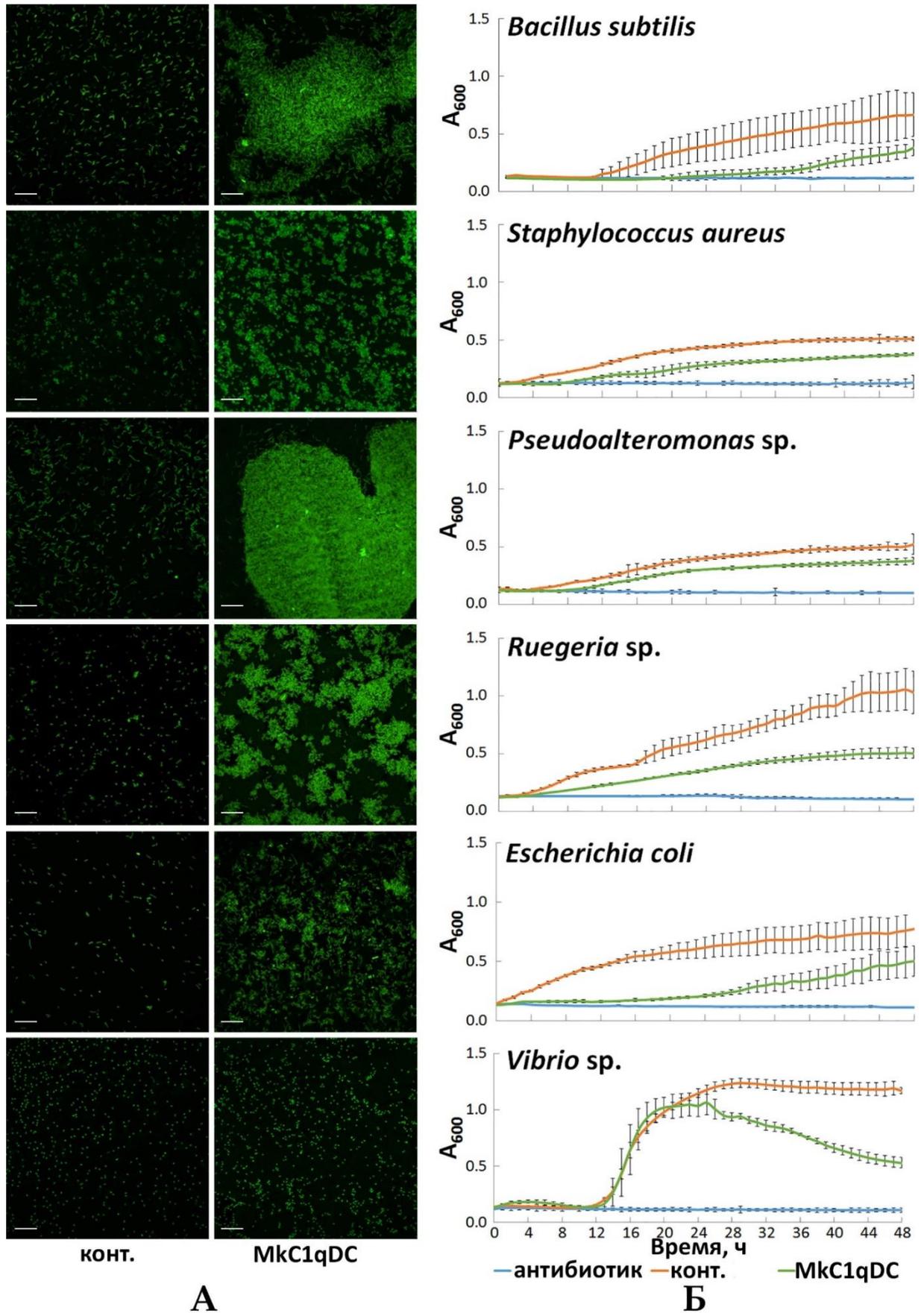


Рисунок 12. Антибактериальные свойства белка Mkc1qDC (0,1 мг/мл). А – агглютинация фиксированных параформальдегидом FITC-меченых бактерий (масштабный отрезок – 10 мкм); Б – оптическая плотность живых бактериальных культур (среднее \pm 95 % доверительный интервал). A_{600} – оптическая плотность суспензий живых культур при длине волны 600 нм.

Белок MkC1qDC также проявил различные бактериостатические свойства в отношении использованных видов бактерий (рис. 12Б). Рост культуры *B. subtilis* в среде без добавок (контроль) начался через 12 ч после начала эксперимента, в то время как при наличии в среде MkC1qDC только через 22 ч, но с более низким темпом по сравнению с контролем вплоть до 35 ч. Лишь начиная с 36 ч в среде с белком скорость роста становилась сопоставимой с таковой в контроле. В случае *S. aureus* начало роста культуры в среде без добавок наступало уже через 4 ч, а в присутствии MkC1qDC – через 10 ч, но в данном случае кривые роста были схожи и шли практически параллельно (рис. 12Б).

Для грам(–) бактерий *Ruegeria* sp., *E. coli* и *Pseudoalteromonas* sp. графики имели схожий с двумя ранее описанными случаями характер, но с некоторыми отличиями (рис. 12Б). Для *Pseudoalteromonas* sp. задержка роста в присутствии MkC1qDC составила 5 часов: с 11 ч после начала эксперимента по сравнению с 6 ч в контроле. Далее кривые роста, как и в случае с *S. aureus*, шли практически параллельно. У *Ruegeria* sp. задержка начала роста культуры исследуемым белком в сравнении с контролем составила всего 2 ч, однако интенсивность роста после этого явно отличалась: менее крутой подъем кривой в случае с MkC1qDC в среде к концу эксперимента выходил практически на плато, в то время как кривая контроля имела более стабильный характер подъема. При той же незначительной задержке в 2 ч самые выраженные отличия в скорости роста культуры были зафиксированы для *E. coli* – вплоть до 24 ч эксперимента. После этого темпы увеличения оптической плотности в присутствии MkC1qDC несколько ускорились, в то время как в контроле – замедлились, что формировало на графике “линзу” между кривыми роста.

Динамика роста культур *Vibrio* sp. кардинально отличалась от рассмотренных выше (рис. 12Б). Как в случае контроля, так и в присутствии MkC1qDC, как видно на графике, начиная с 13 ч происходил резкий синхронный подъем оптической плотности суспензии вплоть до 21 ч. В контроле рост продолжался до 31 ч, после чего кривая выходила на плато. В присутствии в среде MkC1qDC рост культуры в период 21–26 ч останавливался, и после этого происходил его постепенный спад.

3.11. Выявление тканевой локализации и мест синтеза MkC1qDC

Анализ с помощью ИФА полученных антисывороток показал их высокую активность во всех случаях, кроме контрольной сыворотки, взятой до начала иммунизации, что говорит о высокой иммуногенности исследуемого белка. На рисунке 13 представлен результат электрофореза плазмы *M. kurilensis* и очищенного белка MkC1qDC, а также результат иммуноблоттинга этих же образцов с разведением очищенной фракции антител IgG 1:5000. На мембране четко заметна окрашенная полоса, соответствующая по массе целевому белку с массой

19 кДа, причем как в очищенном препарате MkC1qDC, так и плазме моллюска. Кроме того, менее выражено выявляется и другая полоса, соответствующая, по-видимому, не полностью распавшемуся димеру, в пользу чего говорит его молекулярная масса порядка 40 кДа, увеличение его при хранении и исчезновение компонента при обработке белка дитиотреитолом. На основе полученного результата для иммуногистохимической окраски тканей *M. kurilensis* использовали разведение антител 1:500. Поскольку ткани моллюсков обладают автофлуоресценцией, то для более четкой дифференциации мест специфичной окраски на всех рисунках представлены фотографии препаратов органов, окрашенных по схемам с использованием антител к MkC1qDC и контрольной сыворотки кролика, взятой до иммунизации.

Наиболее четко внутриклеточную локализацию удалось выявить на препаратах гемоцитов. На рисунке 14 видно, что в некоторых клетках окрашенные гранулы занимают практически все пространство цитоплазмы, в других лишь небольшую ее часть, а в-третьих окраска на MkC1qDC практически не выявляется. В случае проанализированных парафиновых срезов целевой белок встречается главным образом также в гемоцитах, стенках гемальных синусов и каналов, а также в интерстициальном пространстве, включающем внеклеточные волокнистые структуры.

Стенка кишки *M. kurilensis* состояла из слизистых и абсорбирующих ресничных эпителиальных клеток, лежащих на базальной мембране, под которой располагались крупные гемальные синусы, окруженные мышечными волокнами (рис. 15). Тонкий не плотный слой ретикулярных волокон, а также эпителиальная базальная пластинка, отделяли мышечный слой от наружного слоя уплощенных эпителиальных клеток. При этом клетки среднего отдела кишки содержали кубовидный эпителий с хорошо развитым секреторным аппаратом, тогда как эпителиальные клетки прямой кишки имели столбчатую форму. Несмотря на это, картина распределения MkC1qDC на всем протяжении кишечника была практически идентичной: наиболее интенсивно окрашивались стенки гемальных синусов и расположенные внутри гемоциты. Немного более яркое свечение по сравнению с контролем имела мышечная ткань. Кроме того, в толще внутреннего эпителия встречались мигрирующие гемоциты с ярко окрашенной цитоплазмой (рис. 16).

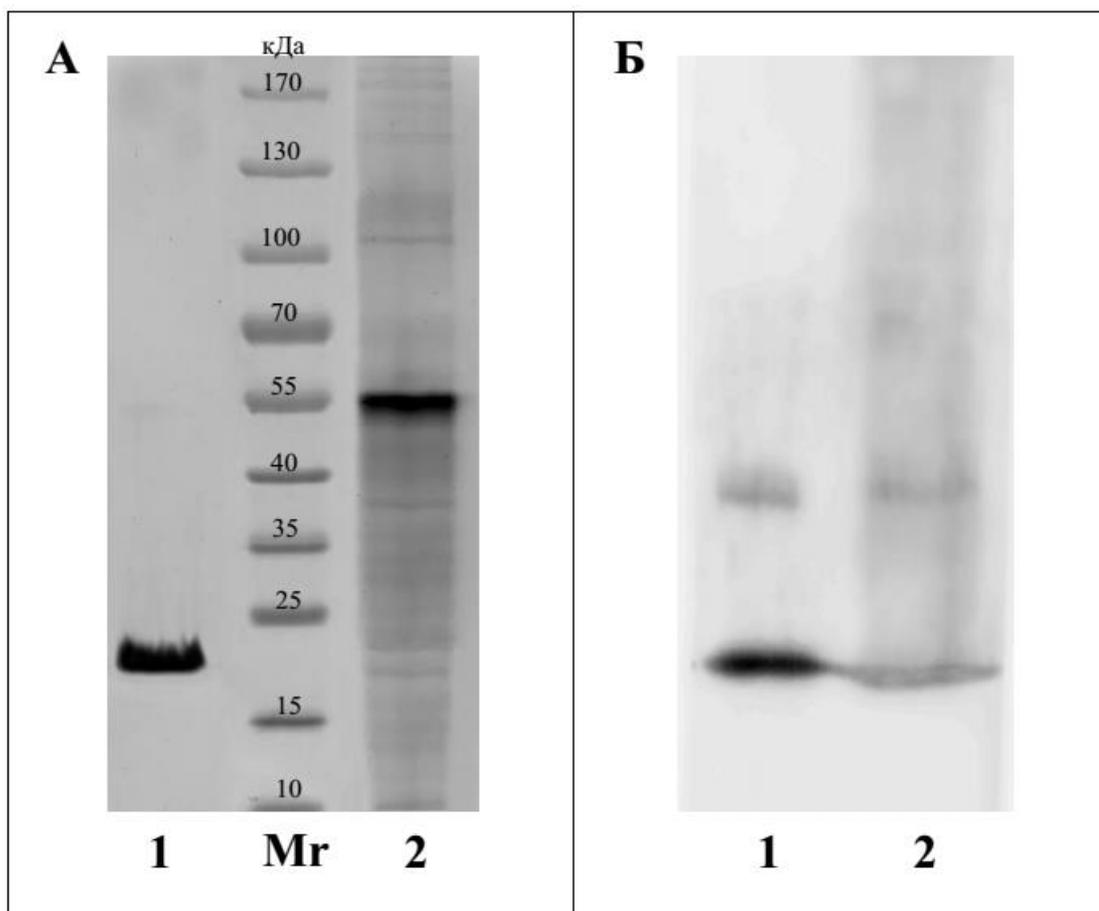


Рисунок 13. Анализ специфичности полученных антител к белку MkC1qDC. А – электрофореграмма, полученная при окрашивании 12 % полиакриламидного геля красителем Кумасси бриллиантовым синим G-250; Б – результат окрашивания поливинилиденфторидной мембраны после вестерн-блоттинга (разведение первичных антител – 1:5000, вторичных антител – 1:20000). 1 – очищенный MkC1qDC после аффинной хроматографии; 2 – плазма гемолимфы *M. kurilensis*; Mr – стандарты молекулярных масс PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

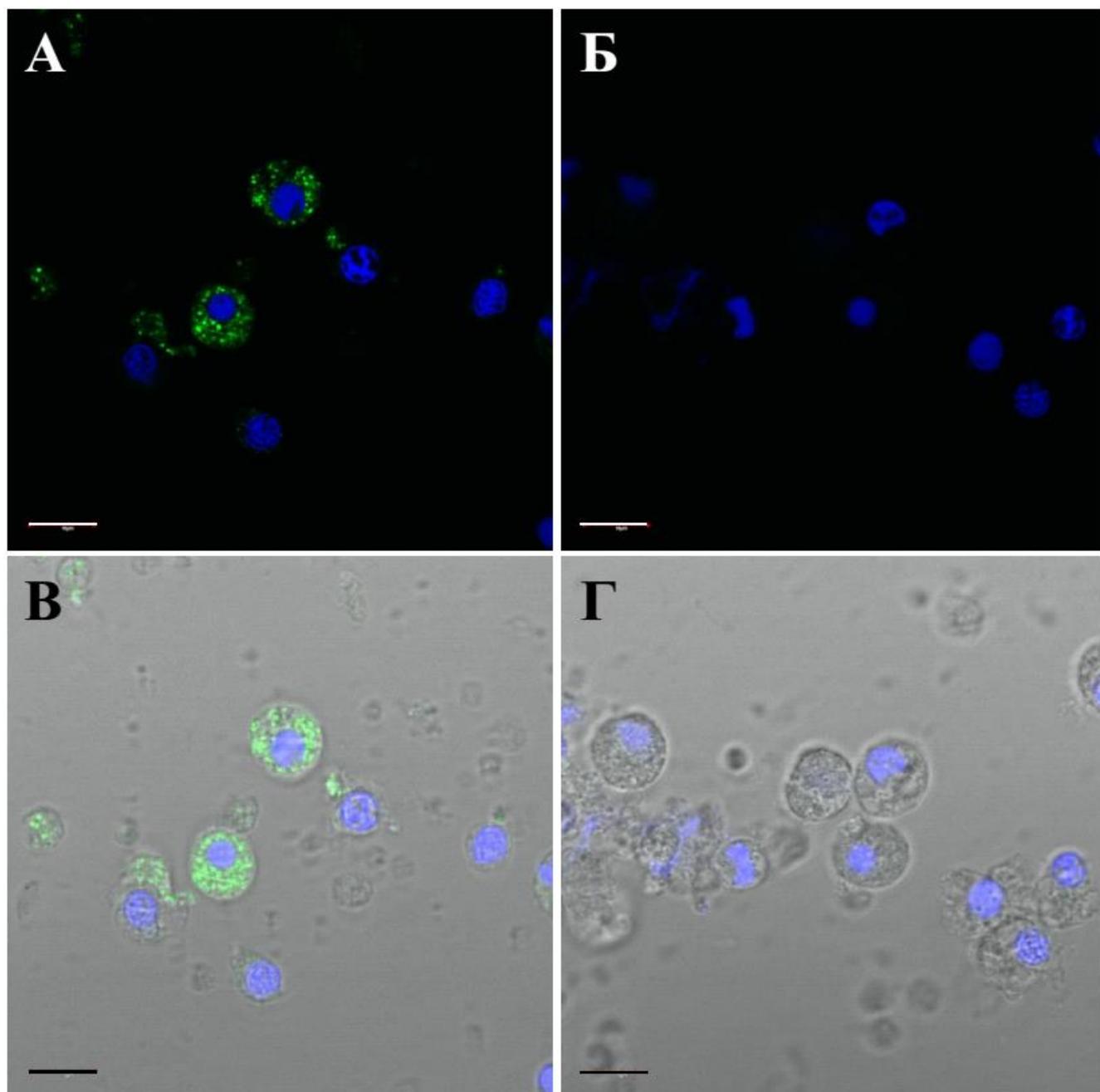


Рисунок 14. Локализация исследуемого белка MkC1qDC (зеленый) в гемоцитах *M. kurilensis*. Ядра окрашены DAPI (синий). А, В – окраска со специфичными к MkC1qDC антителами; Б, Г – окраска с контрольной сывороткой; А, Б – флуоресценция; В, Г – наложение фазового контраста и флуоресценции. Масштабный отрезок – 10 мкм.

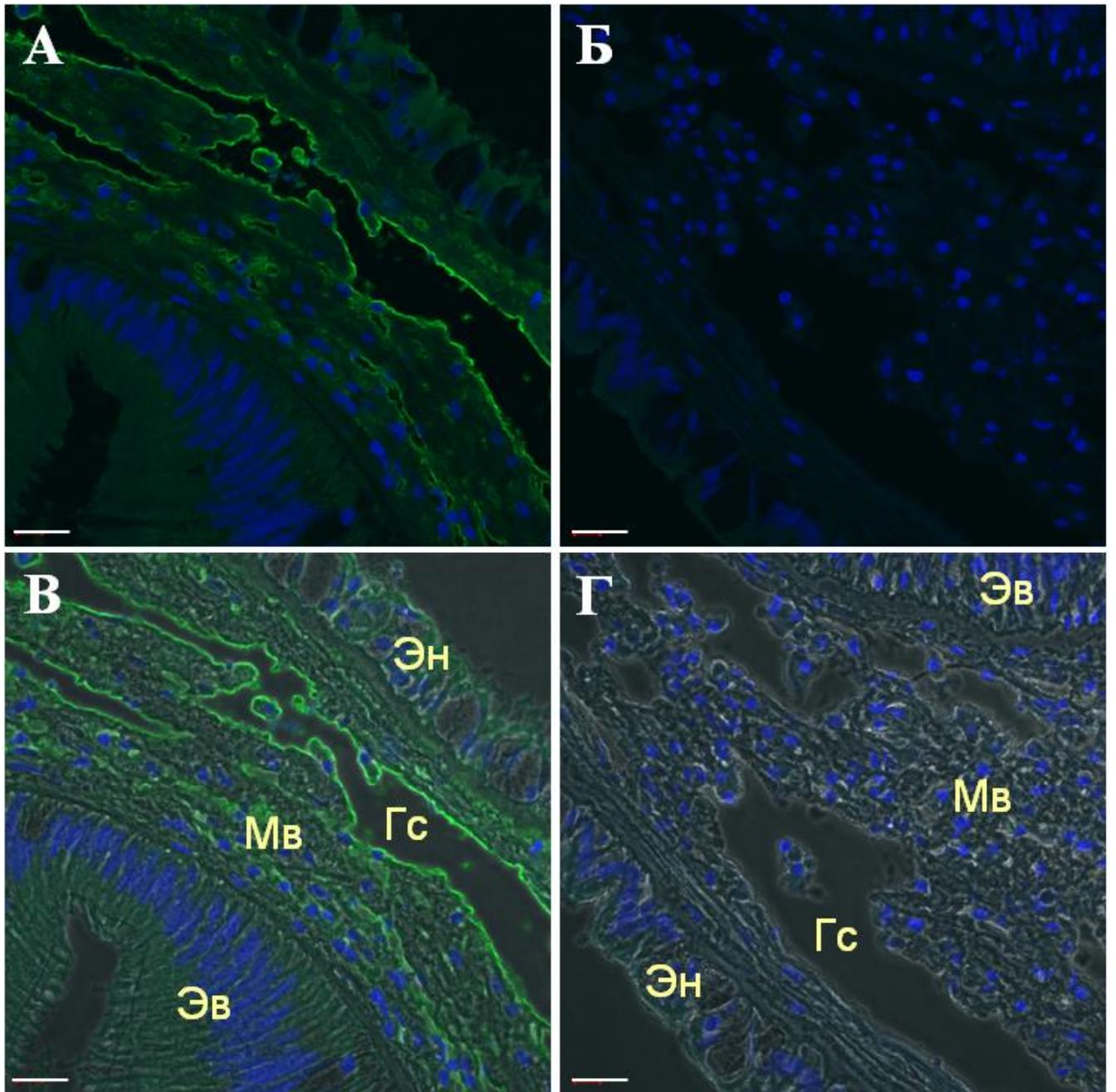


Рисунок 15. Локализация исследуемого белка MkC1qDC (зеленый) в кишке *M. kurilensis*. Ядра окрашены DAPI (синий). А, В – окраска со специфичными к MkC1qDC антителами; Б, Г – окраска с контрольной сывороткой; А, Б – флуоресценция; В, Г – наложение фазового контраста и флуоресценции. Эв – эпителий внутренний; Эн – эпителий наружный; Гс – гемальный синус; Мв – мышечное волокно. Масштабный отрезок – 20 мкм.

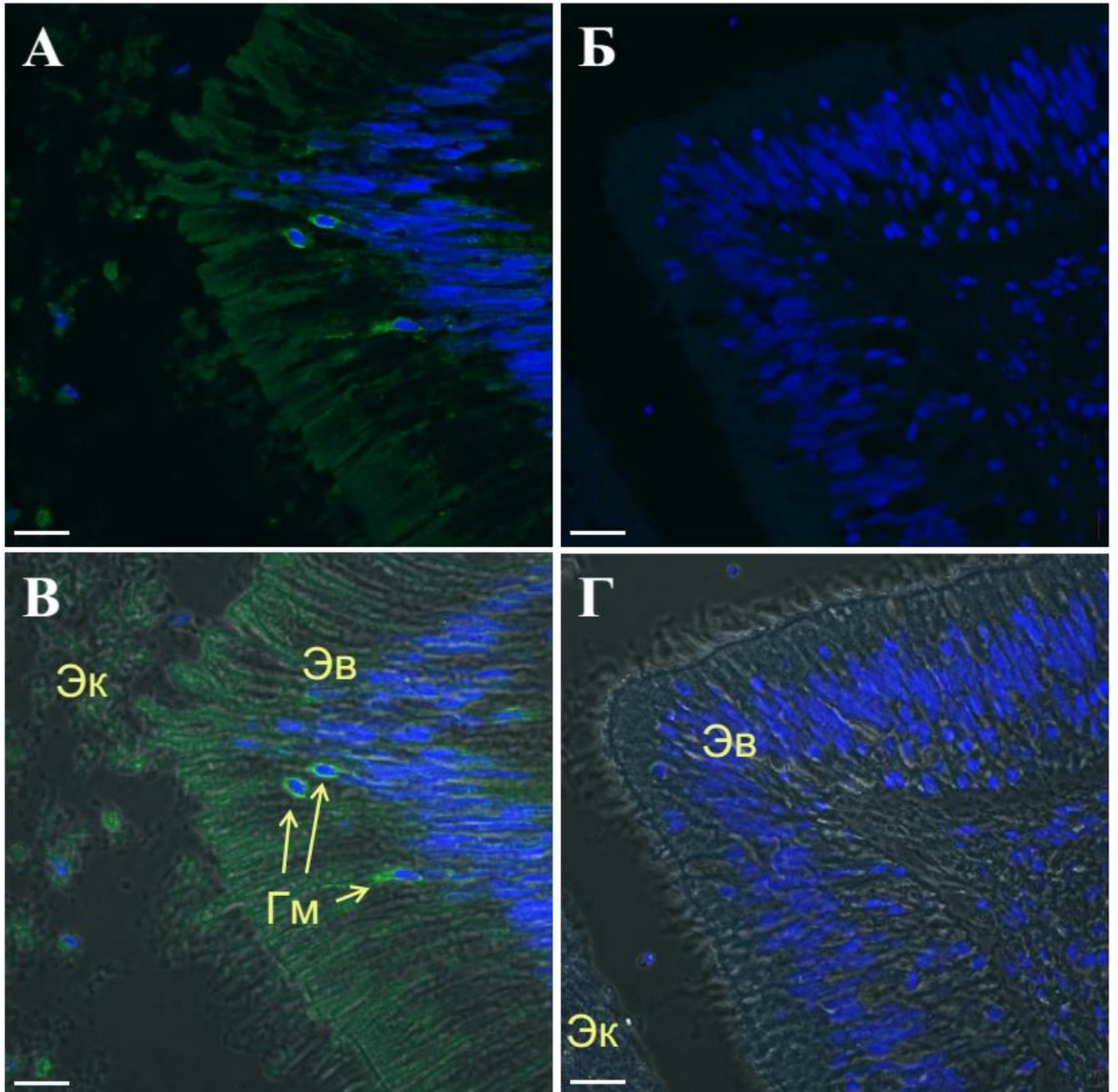


Рисунок 16. Локализация исследуемого белка Mkc1qDC (зеленый) в толще эпителия средней кишки *M. kurilensis*. Ядра окрашены DAPI (синий). А, В – окраска со специфичными к Mkc1qDC антителами; Б, Г – окраска с контрольной сывороткой; А, Б – флуоресценция; В, Г – наложение фазового контраста и флуоресценции. Эв – эпителий внутренний; Эк – экскременты; Гм – гемоциты. Масштабный отрезок – 20 мкм.

Мантия моллюсков представлена базальной мембраной с расположенными на ней сосочками из слизистых и цилиндрических ресничных эпителиальных клеток, а также мышечными волокнами, уложенными в несколько слоев различного направления: циркуляторный, продольный и радиальный. Как и в предыдущем случае, локализация MкC1qDC была выявлена по стенкам гемальных синусов и в расположенных внутри них гемоцитах, а также незначительно в мышечной ткани (рис. 17). Кроме того, в толще эпителия на поверхности сосочков обнаруживались интенсивно окрашенные гемоциты, однако наиболее ярко в краевой зоне мантии окрашивались волокнистые, по всей видимости, соединительнотканые компоненты (рис. 18).

Гистологический анализ заднего мускула-замыкателя, включающего многоядерные продольно и поперечно расположенные мышечные волокна, также показал присутствие MкC1qDC по краю гемальных синусов и в расположенных внутри них гемоцитах с незначительной окраской толщи ткани (рис. 19).

Сердце *M. kurilensis* расположено внутри перикардиальной полости тонкого перикардиального мешка, образованного плоскоклеточным эпителием, и состоит из слоя уплощенных эпикардиальных клеток и миокарда, представленного наружным и внутренним слоями, отличающихся плотностью и направлением расположения волокон, между которыми располагается множество гемальных каналов. Особенностью строения сердца у двустворчатых моллюсков является прохождение сквозь него кишечника. В целом, окраска миокарда была более интенсивной, чем в ранее описанных случаях, что связано с обилием гемальных каналов с интенсивно окрашиваемыми стенками и расположенными внутри гемоцитами. Также несколько более интенсивной флуоресценцией характеризовался перикардиальный эпителий (рис. 20).

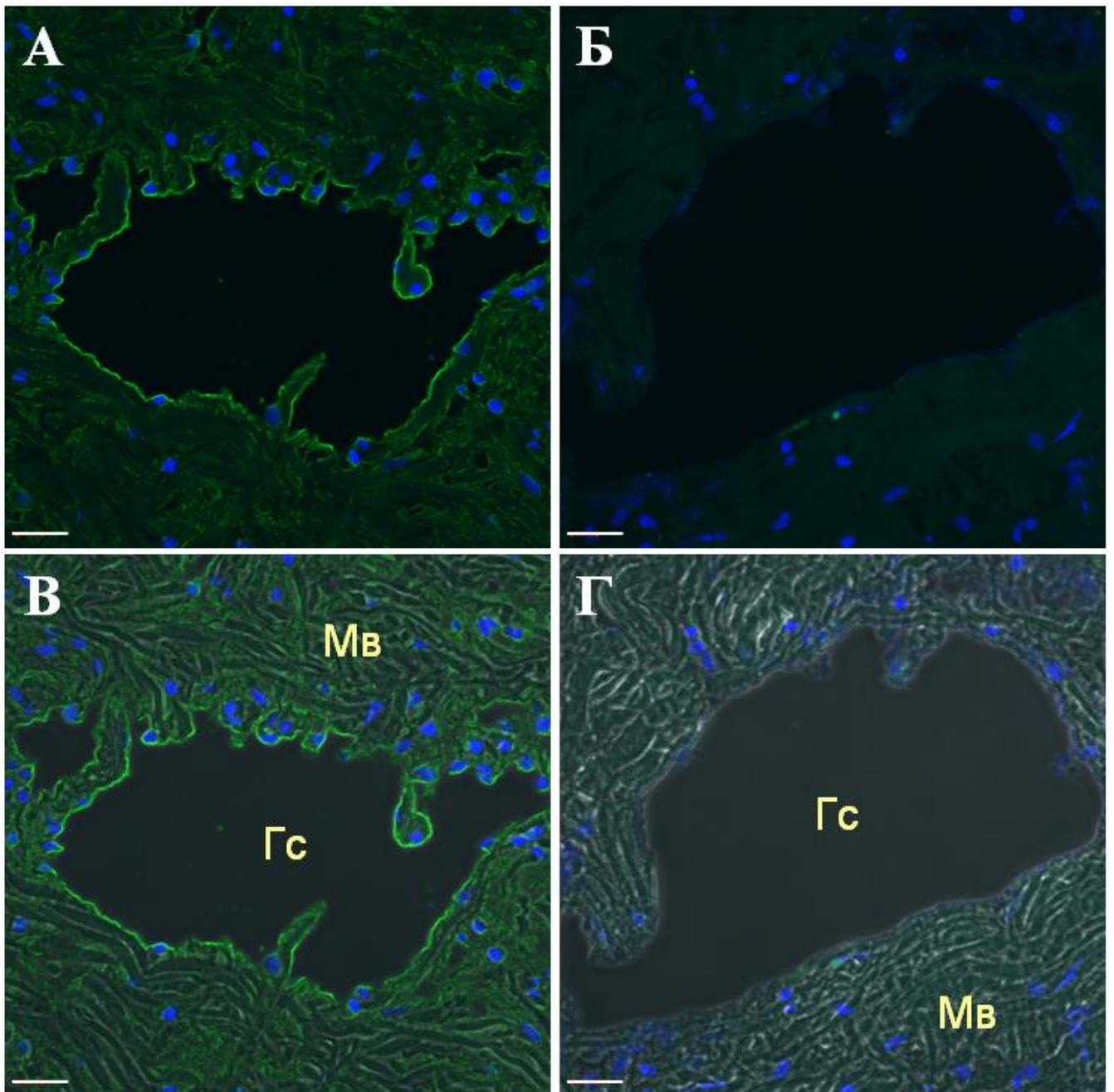


Рисунок 17. Локализация исследуемого белка MkC1qDC (зеленый) в мышечном слое мантии *M. kurilensis*. Ядра окрашены DAPI (синий). А, В – окраска со специфичными к MkC1qDC антителами; Б, Г – окраска с контрольной сывороткой; А, Б – флуоресценция; В, Г – наложение фазового контраста и флуоресценции. Гс – гемальный синус; Мв – мышечное волокно. Масштабный отрезок – 20 мкм.

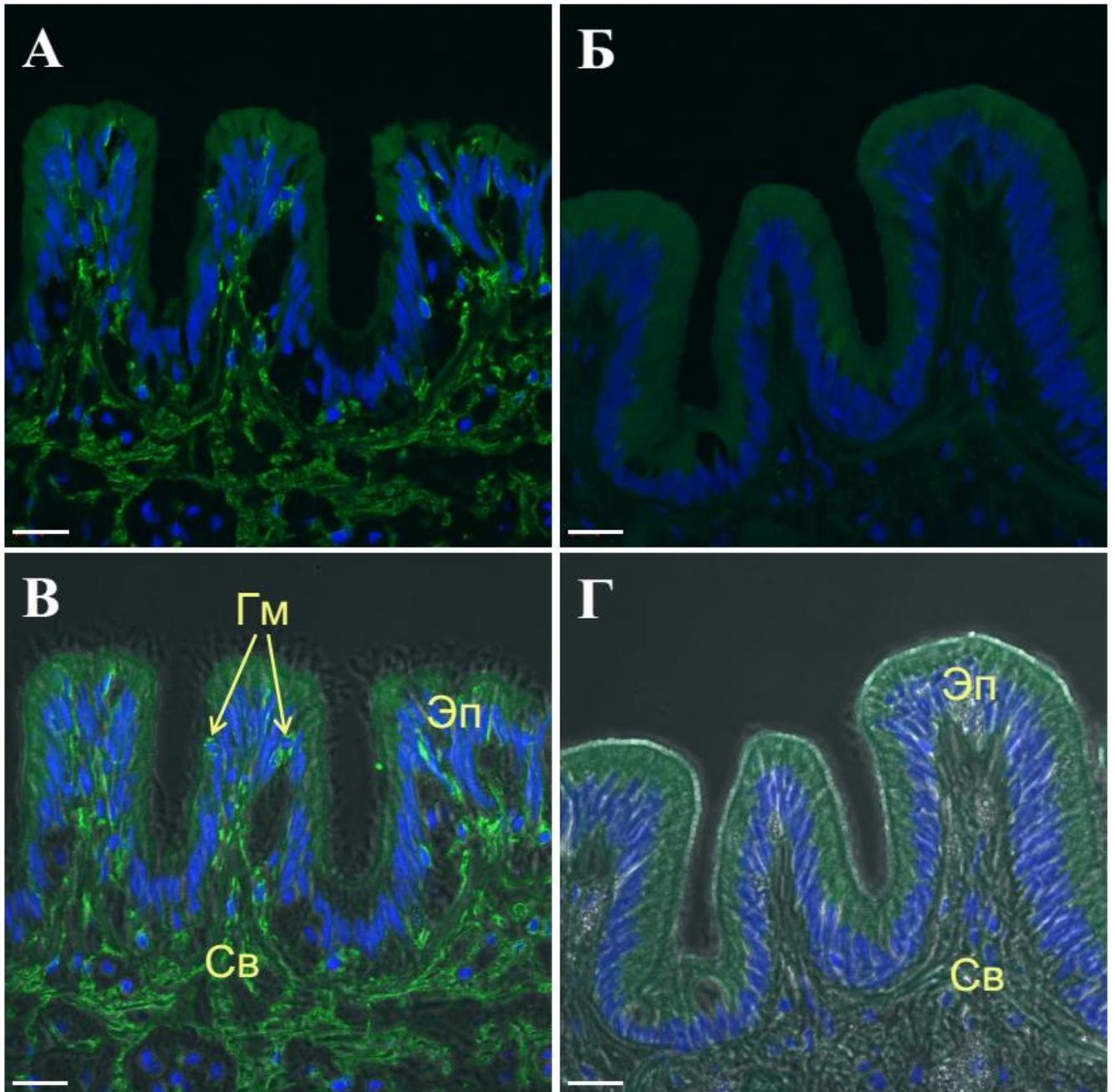


Рисунок 18. Локализация исследуемого белка MkC1qDC (зеленый) в краевой зоне мантии *M. kurilensis*. Ядра окрашены DAPI (синий). А, В – окраска со специфичными к MkC1qDC антителами; Б, Г – окраска с контрольной сывороткой; А, Б – флуоресценция; В, Г – наложение фазового контраста и флуоресценции. Эп – эпителий; Св – соединительнотканнные волокна; Гм – гемоциты. Масштабный отрезок – 20 мкм.

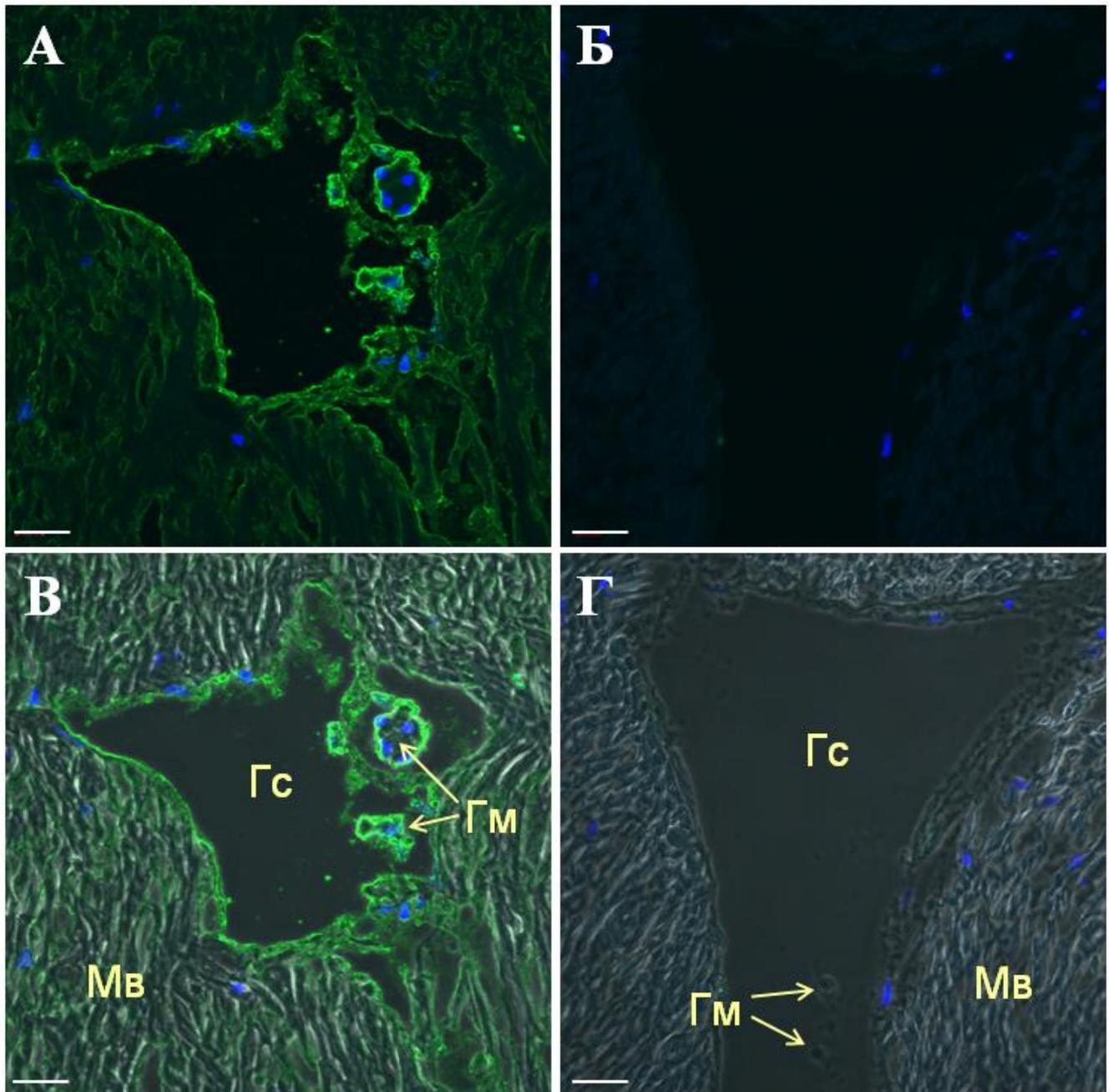


Рисунок 19. Локализация исследуемого белка MkC1qDC (зеленый) в мускуле-замыкателе *M. kurilensis*. Ядра окрашены DAPI (синий). А, В – окраска со специфичными к MkC1qDC антителами; Б, Г – окраска с контрольной сывороткой; А, Б – флуоресценция; В, Г – наложение фазового контраста и флуоресценции. Гс – гемальный синус; Гм – гемоциты; Мв – мышечное волокно. Масштабный отрезок – 20 мкм.

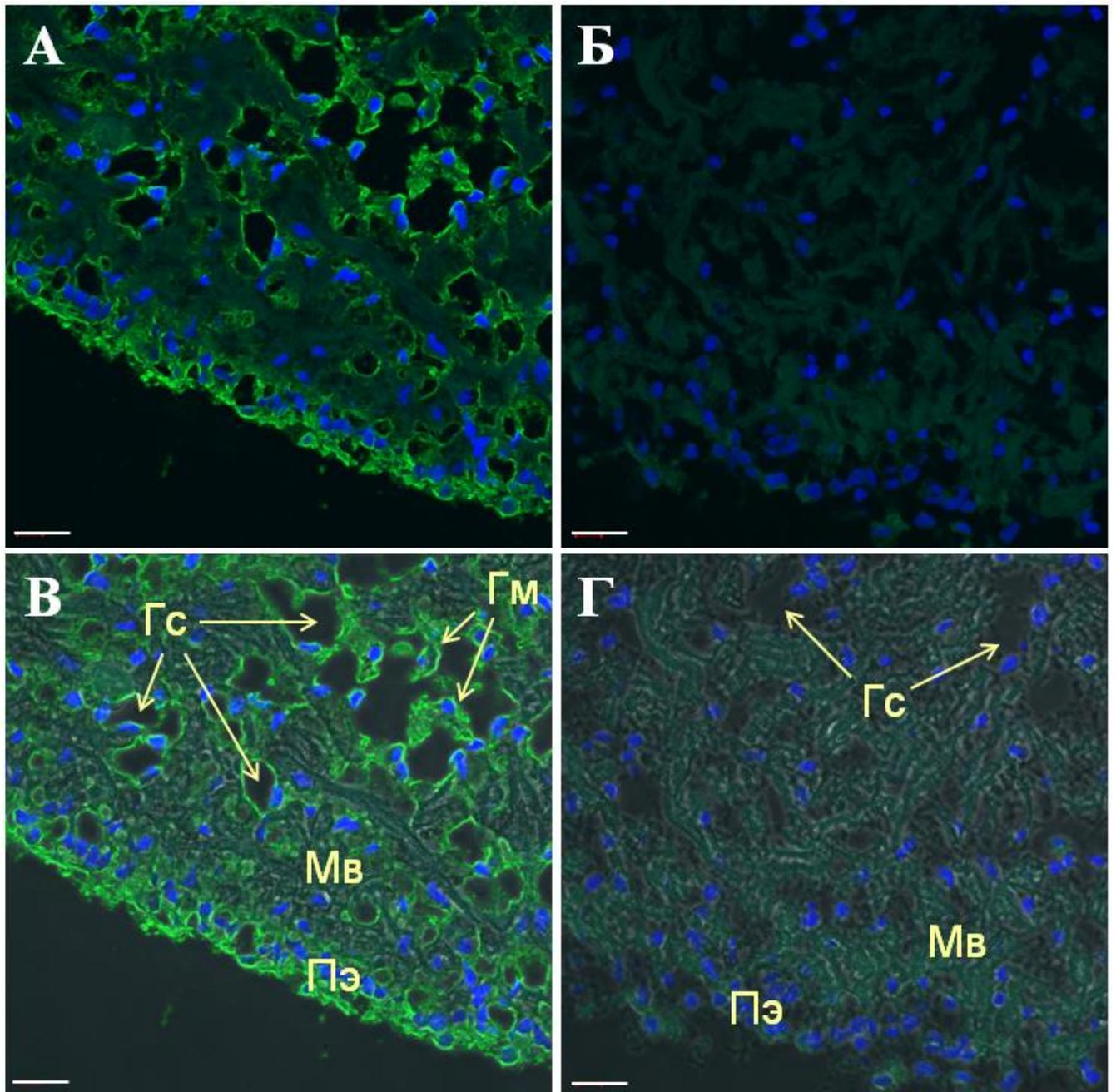


Рисунок 20. Локализация исследуемого белка MkC1qDC (зеленый) в перикарде *M. kurilensis*. Ядра окрашены DAPI (синий). А, В – окраска со специфичными к MkC1qDC антителами; Б, Г – окраска с контрольной сывороткой; А, Б – флуоресценция; В, Г – наложение фазового контраста и флуоресценции. Гс – гемальные синусы (каналы); Гм – гемоциты; Мв – мышечное волокно; Пэ – перикардиальный эпителий. Масштабный отрезок – 20 мкм.

Жабры *M. kurilensis* представлены базальной мембраной с расположенным на ней эпителием, в котором количество слизистых клеток увеличивается от фронтальной к абфронтальной зоне. Внутри ктенидиев находится бронхиальный синус, стенки которого имеют одну из наиболее интенсивных окрасок среди структур всех исследованных органов. Как и в предыдущих случаях, ярко окрашиваются гемоциты, которые в большом количестве присутствуют внутри синуса (рис. 21).

В гонадах, основной массой которых являлись ацинусы с половыми клетками различной зрелости, интенсивная окраска была приурочена к интерстициальному пространству, образованному соединительной тканью, а также стенкам аценусов и, как и в других случаях, гемоцитам (рис. 22).

В ПВЖ моллюсков, образованной пищеварительными канальцами, состоящими из пищеварительных и базофильных клеток и окруженными интерстициальным пространством, также окрашивались стенки канальцев, гемоциты и волокна относительно крупных фиброзных образований и интерстициального пространства (рис. 23).

В канальцах почек, образованных лежащими на базальной мембране нефроцитами с крупными вакуолями и конкрециями, окраска на MkC1qDC была слабой, тогда как относительно узкое интерстициальное пространство между канальцами, заполненное фиброзной тканью с гемоцитами, давало более интенсивную гомогенную окраску. Кроме того, несколько более интенсивное свечение по сравнению с контролем имели конкреции (рис. 24).

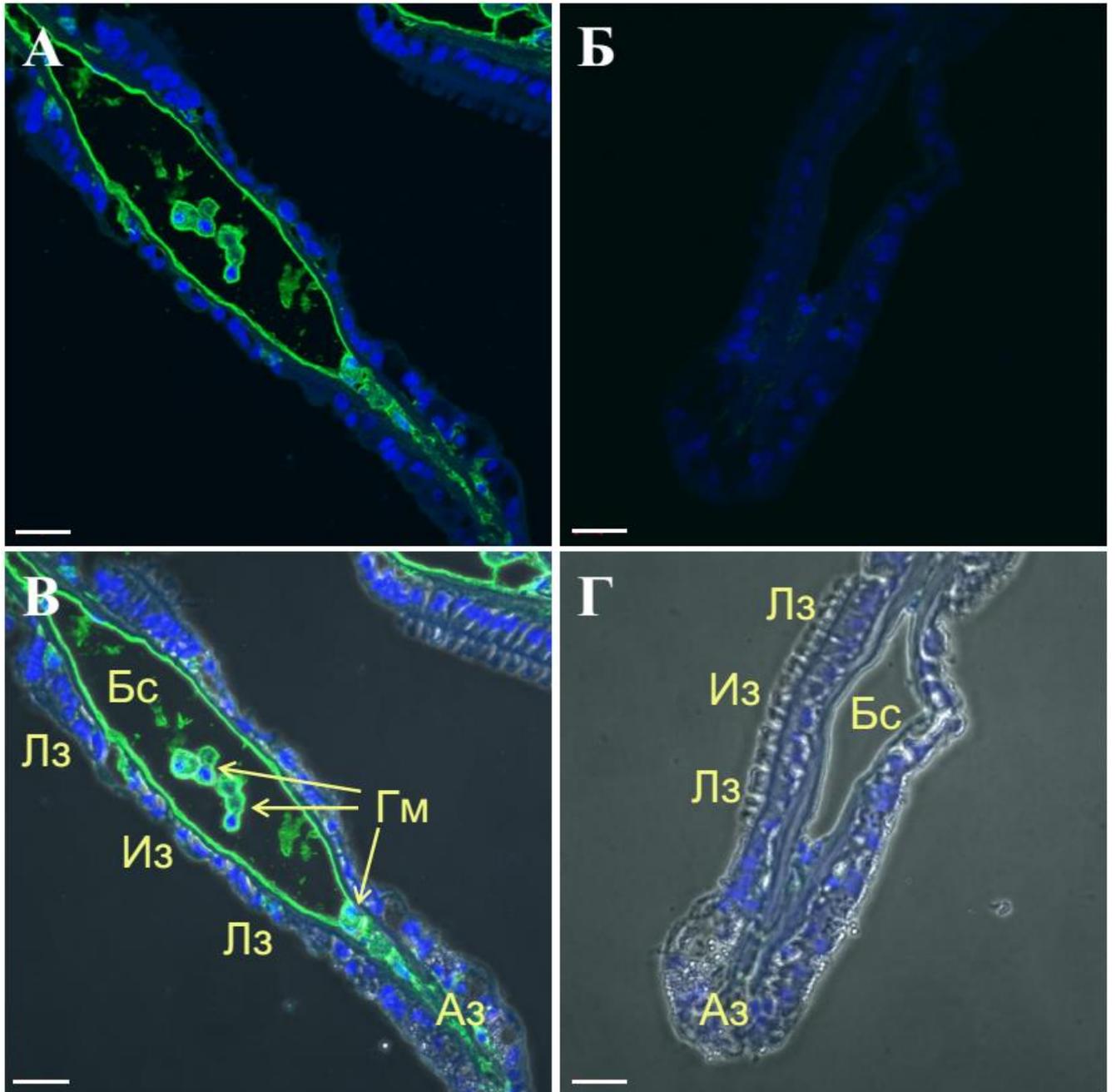


Рисунок 21. Локализация исследуемого белка Mkc1qDC (зеленый) в жабрах *M. kurilensis*. Ядра окрашены DAPI (синий). А, В – окраска со специфичными к Mkc1qDC антителами; Б, Г – окраска с контрольной сывороткой; А, Б – флуоресценция; В, Г – наложение фазового контраста и флуоресценции. Аз – абфронтальная зона; Лз – латеральная зона; Из – интермедиальная зона; Бс – бронхиальный синус; Гм – гемоциты. Масштабный отрезок – 20 мкм.

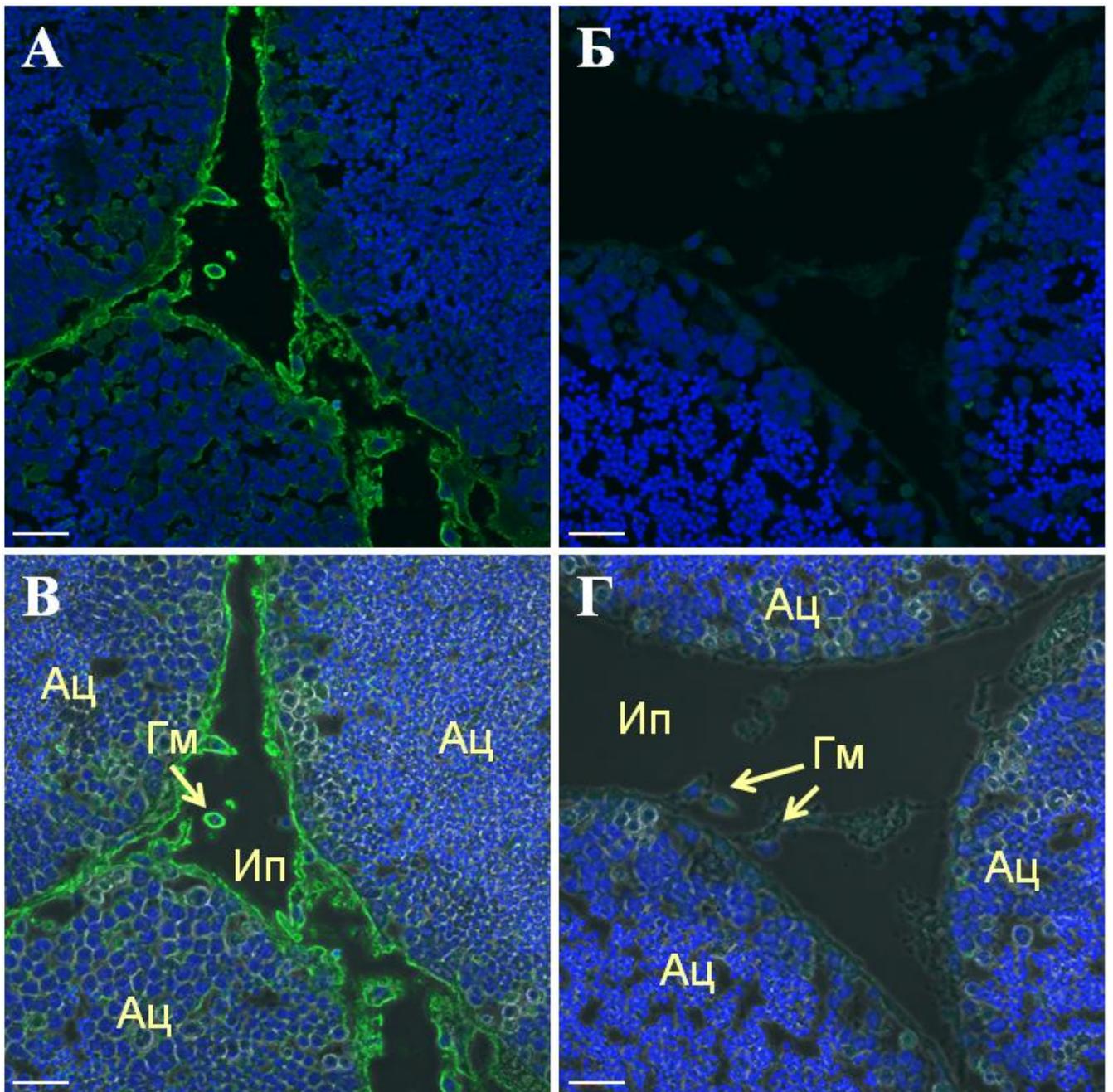


Рисунок 22. Локализация исследуемого белка MkC1qDC (зеленый) в гонадах *M. kurilensis*. Ядра окрашены DAPI (синий). А, В – окраска со специфичными к MkC1qDC антителами; Б, Г – окраска с контрольной сывороткой; В, Г – наложение фазового контраста и флуоресценции. Ац – ацинус; Ип – интерстициальное пространство; Гм – гемоциты. Масштабный отрезок – 20 мкм.

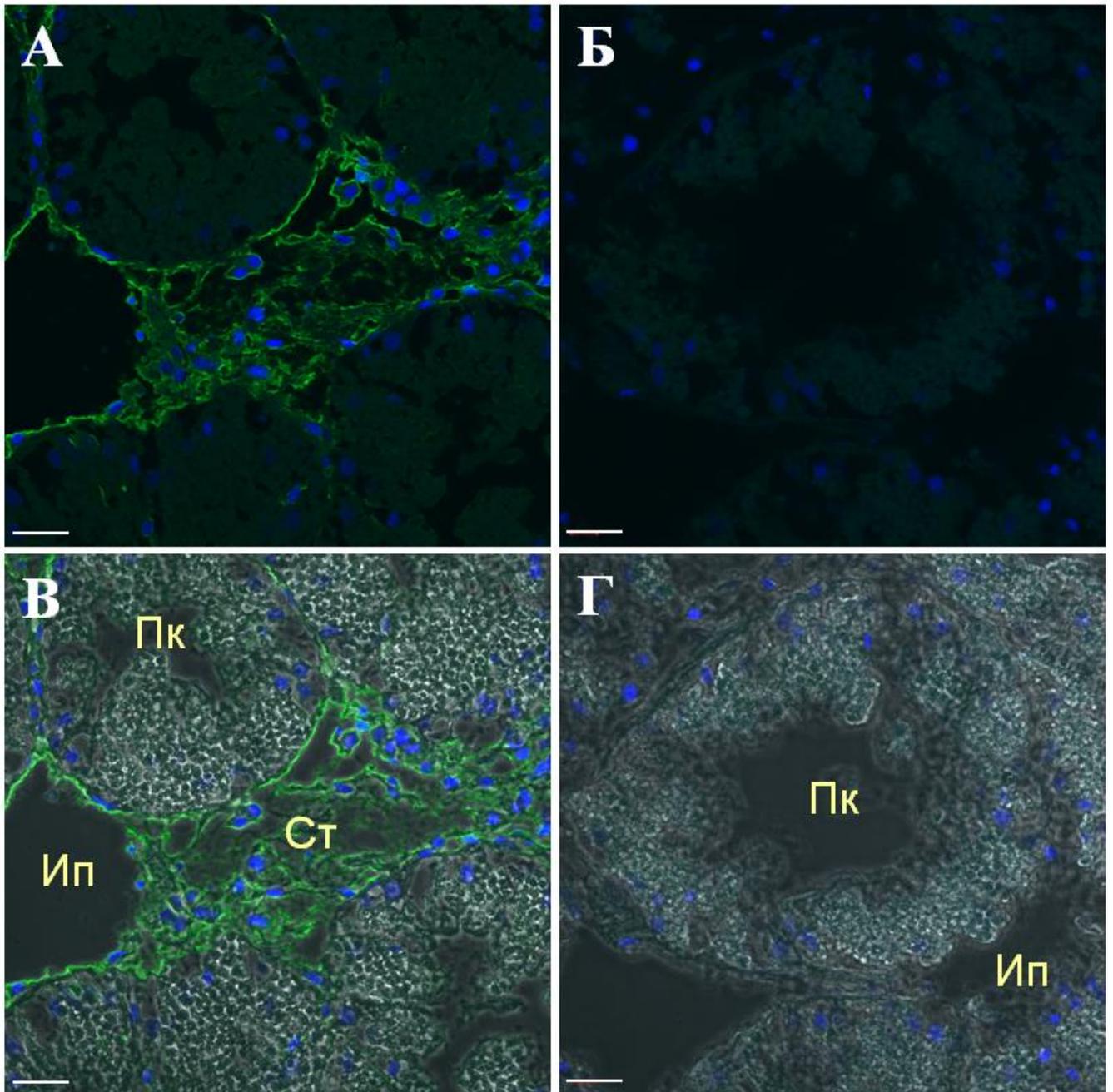


Рисунок 23. Локализация исследуемого белка MkC1qDC (зеленый) в ПВЖ *M. kurilensis*. Ядра окрашены DAPI (синий). А, В – окраска со специфичными к MkC1qDC антителами; Б, Г – окраска с контрольной сывороткой; А, Б – флуоресценция; В, Г – наложение фазового контраста и флуоресценции. Пк – пищеварительный каналец; Ип – интерстициальное пространство; Ст – соединительная ткань. Масштабный отрезок – 20 мкм.

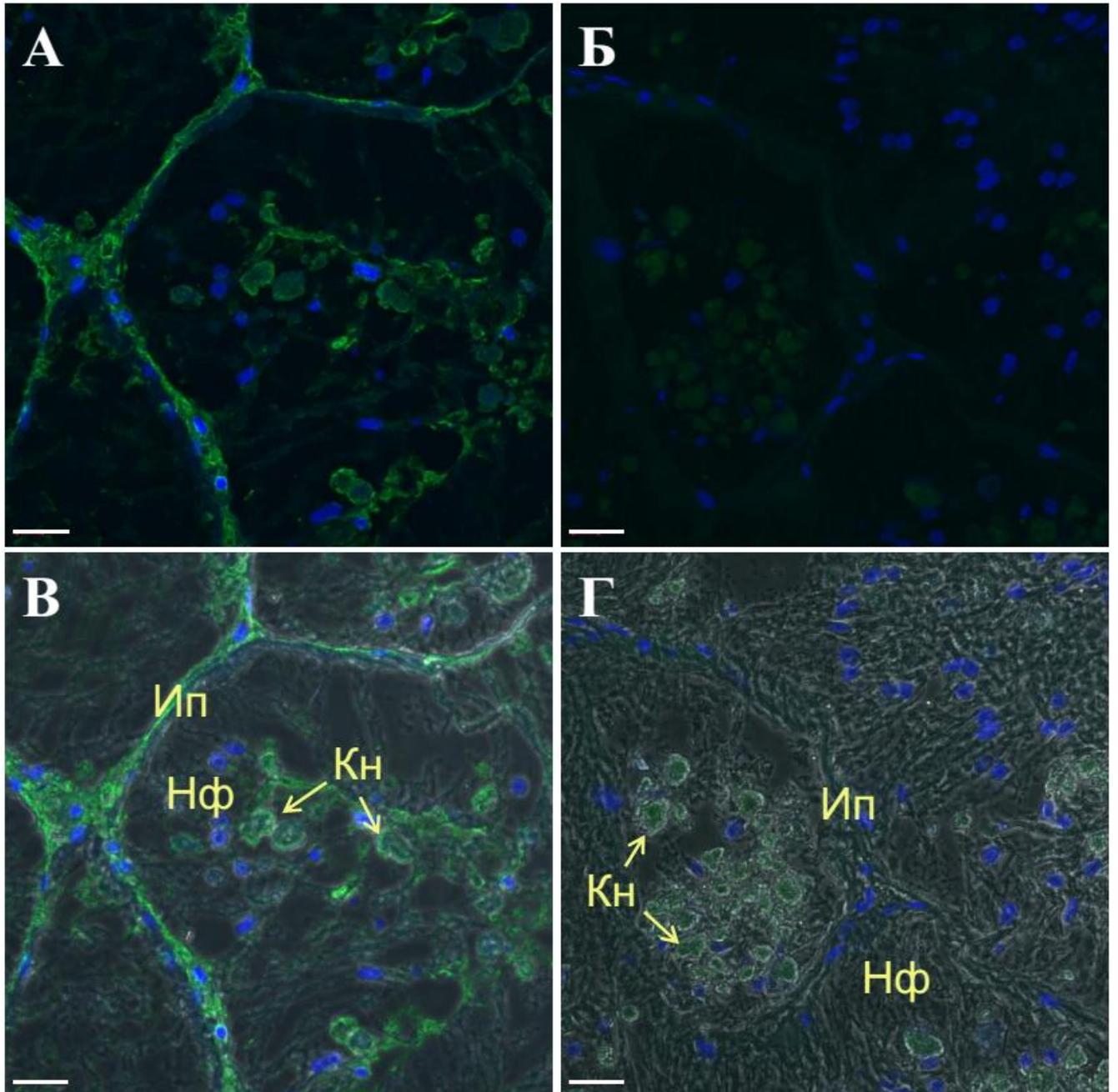


Рисунок 24. Локализация исследуемого белка МсС1qDC (зеленый) в почке *M. kurilensis*. Ядра окрашены DAPI (синий). А, В – окраска со специфичными к МсС1qDC антителами; Б, Г – окраска с контрольной сывороткой; А, Б – флуоресценция; В, Г – наложение фазового контраста и флуоресценции. Ип – интерстициальное пространство; Нф – нефроциты; Кн – конкреции. Масштабный отрезок – 20 мкм.

Для уточнения локализации внеклеточных соединительнотканых волокон, с которыми, по-видимому, ассоциирован MkC1qDC в тканях моллюска, использовали пикросириус красный, результат окраски которым представлен на рисунках 25–27. Данный краситель выявляет коллагеновые волокна, придавая в поляризованном свете коллагену I типа ярко красный цвет, а коллагену III типа зеленоватые оттенки.

На основе полученного результата исследованные ткани были условно разделены на три группы: мышечные структуры (рис. 25), ткани с выраженной фиброзной компонентой (рис. 26) и без нее (рис. 27).

В случае мышечных органов и их компонентов, таких как толща мантии, мускул-замыкатель и перикард, окраска мышечных волокон была наименее выраженной и относительно равномерной (рис. 25), что было также характерно при выявлении в них MkC1qDC. Во второй группе органов коллаген был ассоциирован с выраженными соединительноткаными структурами: ретикулярными волокнами в стенке кишки, центральными частями сосочков края мантии и фиброзными образованиями в толще ПВЖ (рис. 26), которые за исключением кишки показали аналогичное распределение MkC1qDC. Кроме того, окраска пикросириусом хорошо проявлялась в базальных мембранах жабр, гонад, почек (рис. 27) и ПВЖ (рис. 26E), а также в интерстициальном пространстве трех последних из перечисленных органов. Интересной особенностью являлась окраска пикросириусом конкреций в почках (рис. 27E), по всей видимости, содержащих в структуре коллагены.

В целом, в локализации MkC1qDC кроме явного присутствия в гемоцитах была заметна тенденция к распределению его в компонентах интерстициального компартмента, многие структуры которого включают коллагеновые волокна.

Для уточнения основных синтезирующих белок MkC1qDC типов гемоцитов *M. kurilensis* было проведено их фракционирование в градиенте разделяющей среды Percoll с последующей окраской антителами. В диссертационной работе Сокольниковой Ю.Н. (Сокольникова, 2021) показано подавляющее содержание в каждой из фракций следующих клеточных типов: фракция 0–10 % – гемобласты, фракция 10–20 % – базофильные гранулоциты, фракция 20–30 % – эозинофильные гранулоциты, фракция 30–40 % – агранулоциты. Для упрощения описания далее будут указаны только клеточные типы. Результат окраски представлен на рисунке 28. Как видно, гемобласты имели наименьшую фоновую окраску, тогда как наиболее интенсивно светились базофильные гранулоциты, цитоплазма которых практически полностью относительно равномерно метилась на целевой белок. В эозинофильных гранулоцитах можно было различить отдельные гранулы, а агранулярные клетки показали содержание MkC1qDC главным образом по периферии клеток без выраженной окраски в цитоплазме.

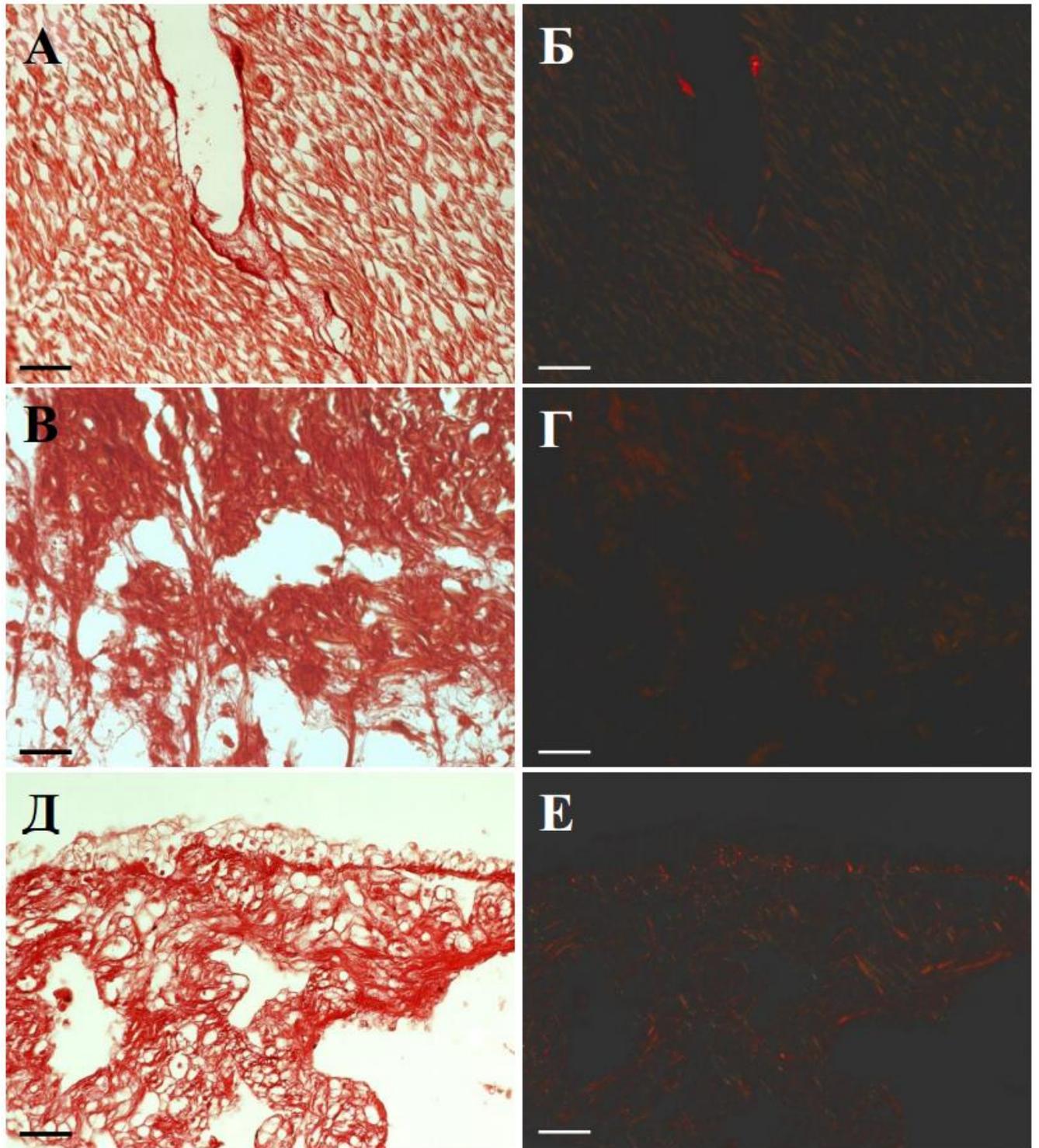


Рисунок 25. Выявление коллагеновых волокон пикосириусом красным в мышечных тканях *M. kurilensis*. А, Б – мускул-замыкатель; В, Г – толща мантии; Д, Е – перикард; А, В, Д – проходящий свет; Б, Г, Е – линейно-поляризованный свет. Масштабный отрезок – 20 мкм.

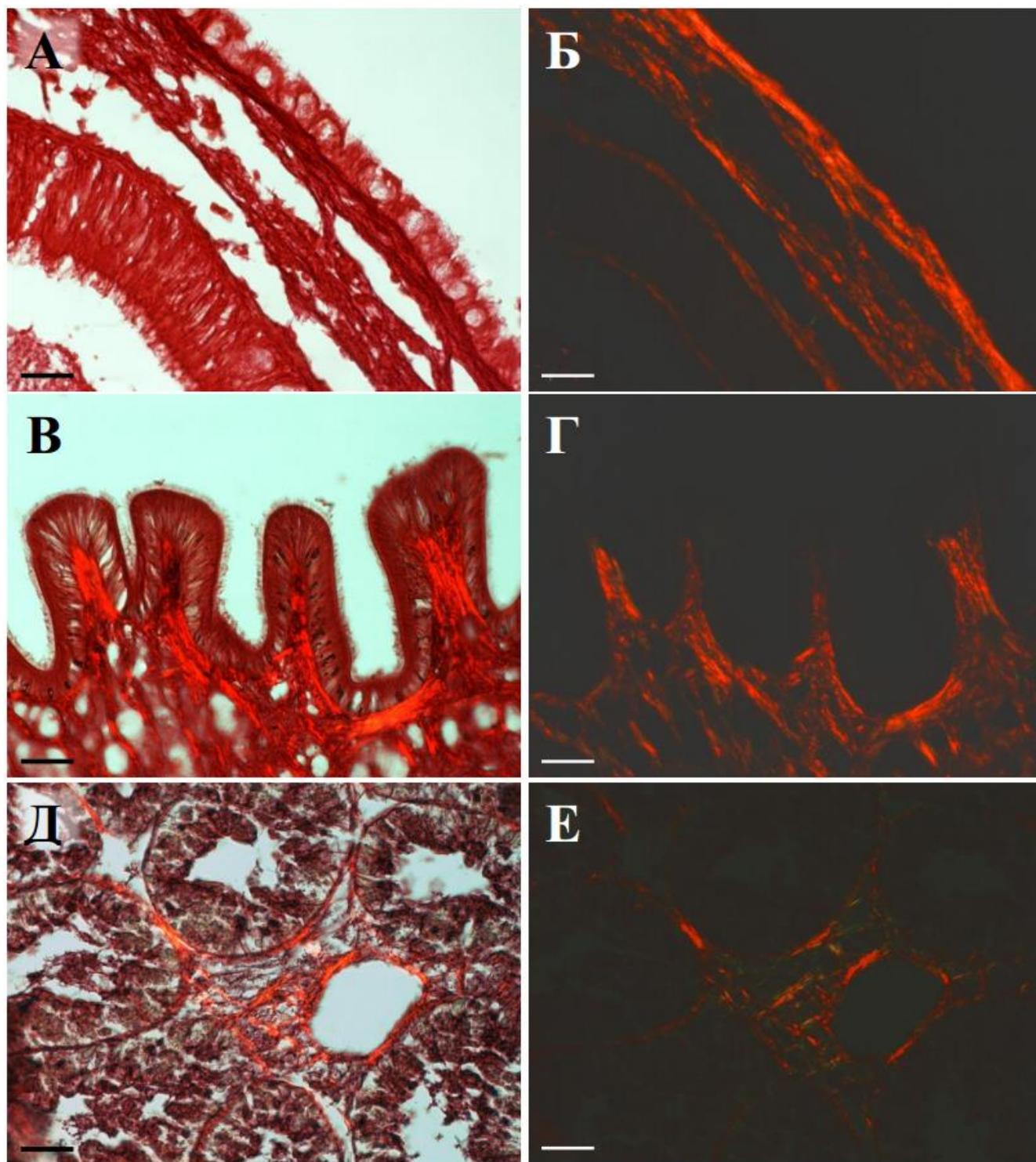


Рисунок 26. Выявление коллагеновых волокон пикосириусом красным в тканях *M. kurilensis* с выраженной фиброзной компонентой. А, Б – кишка; В, Г – край мантии; Д, Е – ПВЖ; А, В, Д – проходящий свет; Б, Г, Е – линейно-поляризованный свет. Масштабный отрезок – 20 мкм.

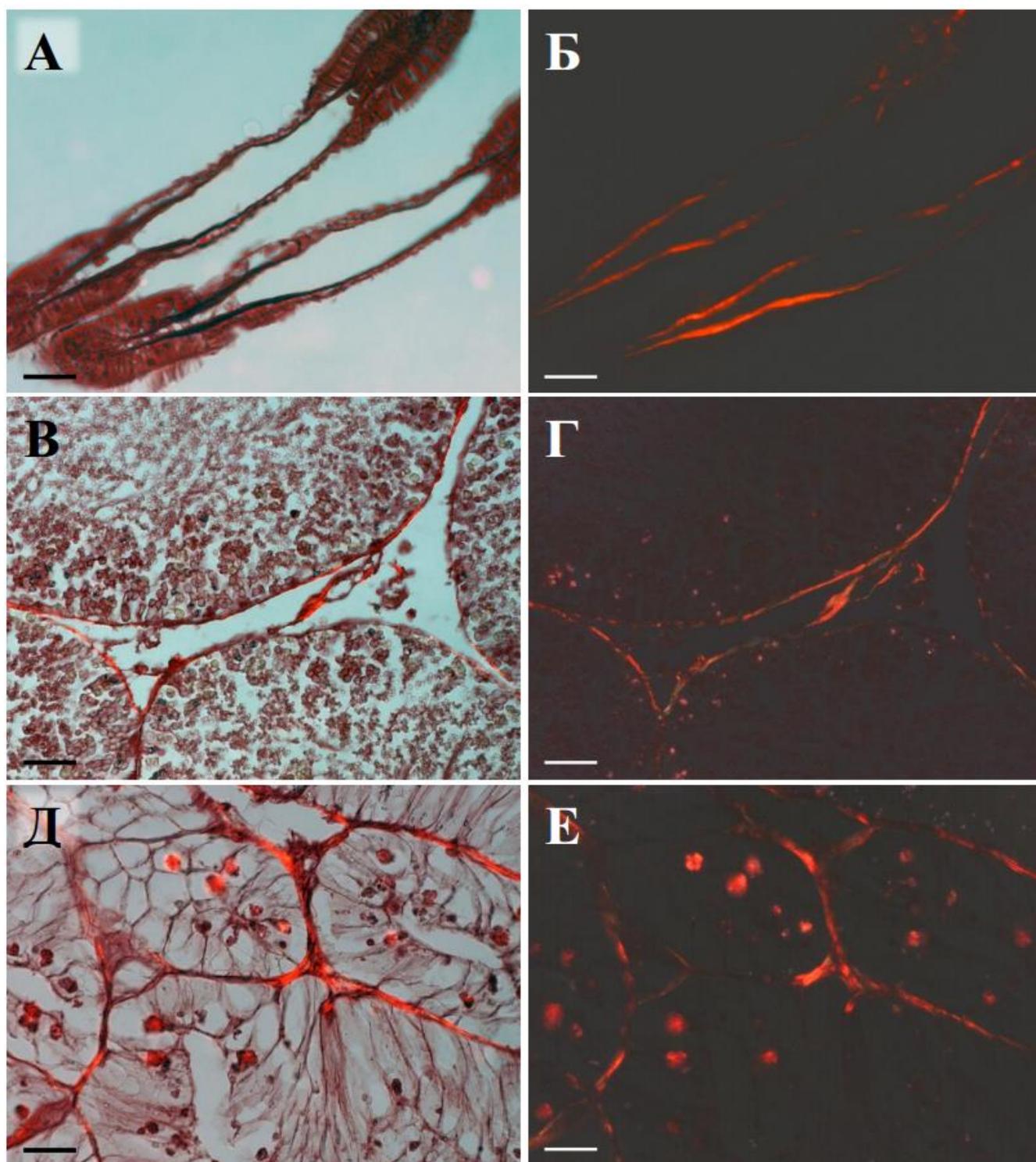


Рисунок 27. Выявление коллагеновых волокон пикросириусом красным в тканях *M. kurilensis* без выраженной фиброзной компоненты. А, Б – жабры; В, Г – гонада; Д, Е – почка; А, В, Д – проходящий свет; Б, Г, Е – линейно-поляризованный свет. Масштабный отрезок – 20 мкм.

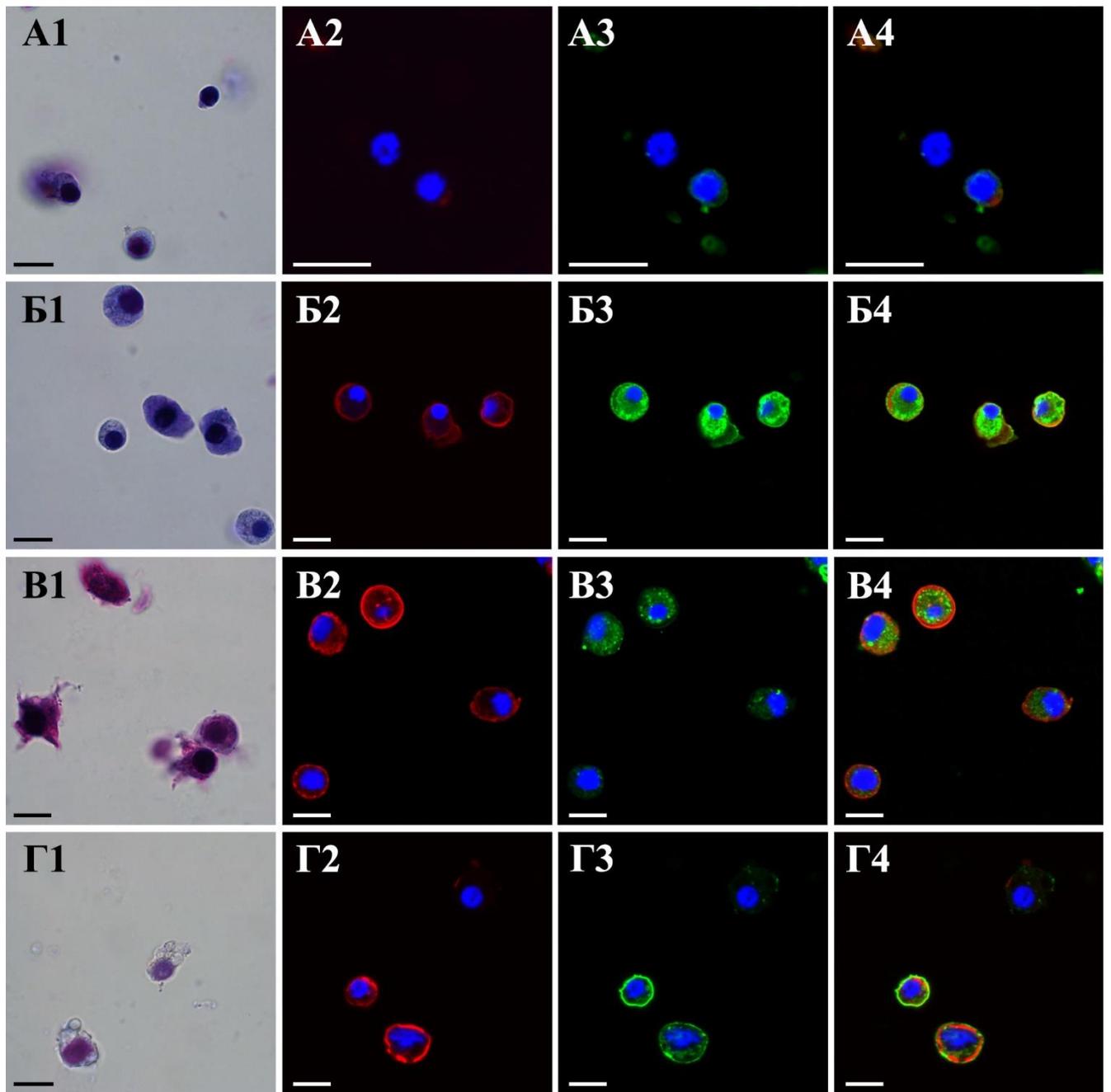


Рисунок 28. Локализация белка Mkc1qDC в различных фракциях гемоцитов *M. kurilensis*. А – фракция 0–10 % (гемобласты). Б – фракция 10–20 % (базофильные гранулоциты). В – фракция 20–30 % (эозинофильные гранулоциты). Г – фракция 30–40 % (агранулоциты). 1 – световая микроскопия: окраска эозин-метиленовым синим по Май-Грюнвальду. 2–4 – конфокальная микроскопия: белок Mkc1qDC окрашен антителами с Alexa Fluor-488 (зеленый), ядра окрашены DAPI (синий), актин окрашен родамин-фаллоидином (красный). Масштабный отрезок – 20 мкм.

3.12. Взаимодействие Mkc1qDC с клетками млекопитающих

Оценка антипролиферативной активности белка Mkc1qDC на клетках аденокарциномы шейки матки линии HeLa CCL-2 показала значимое ($p < 0,05$) снижение количества клеток в случае содержания в среде 4 мкМ белка уже через 4 ч и через 16 ч для концентраций 1 мкМ и

2 мкМ МкС1qDC (рис. 29А). При этом, как видно из гистограммы, влияние МкС1qDC имеет дозозависимый эффект. Также следует отметить, что при максимальной в данном случае использованной концентрации МкС1qDC 4 мкМ большая часть клеток не проявляла активности и в первые часы приобретала морфологию, характерную для мертвых клеток, и лишь небольшая часть выживших клеток пролиферировала со значительной задержкой (рис. 29Д).

Результаты МТТ-теста показали чувствительность всех трех использованных опухолевых линий (рис. 30), особенно аденокарцином. В частности, наименьший показатель $IC_{50_{\text{MkC1qDC}}}$ (1,77 мкМ) имела линия HeLa CCL-2, а клетки аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 проявили в два раза меньшую чувствительность к МкС1qDC (3,48 мкМ). Самое высокое значение $IC_{50_{\text{MkC1qDC}}}$ (7,89 мкМ) показала линия глиобластомы U87 MG. В случае не опухолевых иммортализованных клеток пигментного эпителия сетчатки человека hTERT RPE-1 построение регрессионной прямой с удовлетворительным значением R^2 было невозможно, поскольку средние показатели МТТ для 1, 2 и 3 мкМ МкС1qDC были не значимо выше контрольных, а для 4 и 5 мкМ хоть и были несколько ниже, но не показали статистически значимых различий ($p > 0,05$). Таким образом, исследуемый белок не оказывал воздействия на линию нормальных клеток hTERT RPE-1.

Схожие результаты показала витальная окраска клеток комбинацией йодистого пропидия и аннексина V (рис. 31). Для hTERT RPE-1 достоверных изменений выявлено не было ($p > 0,05$), тогда как для опухолевых клеток основным выявленным механизмом клеточной гибели был некроз: доля окрашенных йодистым пропидием (некроз), или одновременно окрашенных йодистым пропидием и аннексином V (поздний апоптоз) при воздействии 5 мкМ МкС1qDC в течение 48 ч возрастала для разных линий до 74,4–92,6 % в сравнении с контролем 6,8–25,6 % ($p < 0,05$ во всех случаях). Значимое повышение содержания еще и апоптотических клеток, окрашенных только аннексином V, отмечено лишь для клеток глиобластомы U87 MG: с $4,6 \pm 2,1$ % до $11,1 \pm 3,5$ % ($p < 0,05$).

Окрашивание живых клеток конъюгатом МкС1qDC-FITC также подтверждает описанные выше результаты. Наиболее интенсивная окраска крупными конгломератами белка была отмечена для клеток HeLa CCL-2 (рис. 32А), причем не только на поверхности клеток, но и в непосредственной близости к ним. Клетки другой аденокарциномы MDA-MB-231 окрашивались меньшими по размеру конгломератами, но несколько более таргетно по отношению к границам клеток (рис. 32Б). Наиболее выражено МкС1qDC-FITC выявлял границы клеток в случае глиобластомы U87 MG (рис. 33А). Препараты клеток hTERT RPE-1 также окрасились МкС1qDC-FITC, однако белок в данном случае был равномерно распределен в виде мелких зерен по всей поверхности лунки независимо от наличия или отсутствия клеток (рис. 33Б), что наиболее вероятно, как и в случае линии HeLa CCL-2, говорит о связывании МкС1qDC с секретлируемыми

клетками углеводными структурами. В случае фиксированных клеток (рис. 34) конъюгат MkC1qDC-FITC также окрашивал все опухолевые клетки, однако более таргетно по отношению к их непосредственной поверхности, что особенно заметно для повторной окраски линии HeLa CCL-2: в данном случае отмечены аналогичные витальной окраске крупные конгломераты белка MkC1qDC, однако практически не выходящие за контуры клеток. Характер окраски других опухолевых клеток человека имеет некоторые особенности: более яркое и гомогенное свечение в случае карциномы HCT 116, мелкие диффузно расположенные зерна в случае карциномы RKO CRL-2577 и первичной глиальной опухоли, для которой, однако, отмечены более крупные и плотно расположенные гранулы MkC1qDC-FITC на поверхности мелких, предположительно делящихся клеток. Относительно слабую, но более равномерную окраску имели тела клеток мышинной нейробластомы Neuro-2a CCL-131. При этом препараты неопухолевых мышинных перитонеальных макрофагов не окрашивались вовсе.

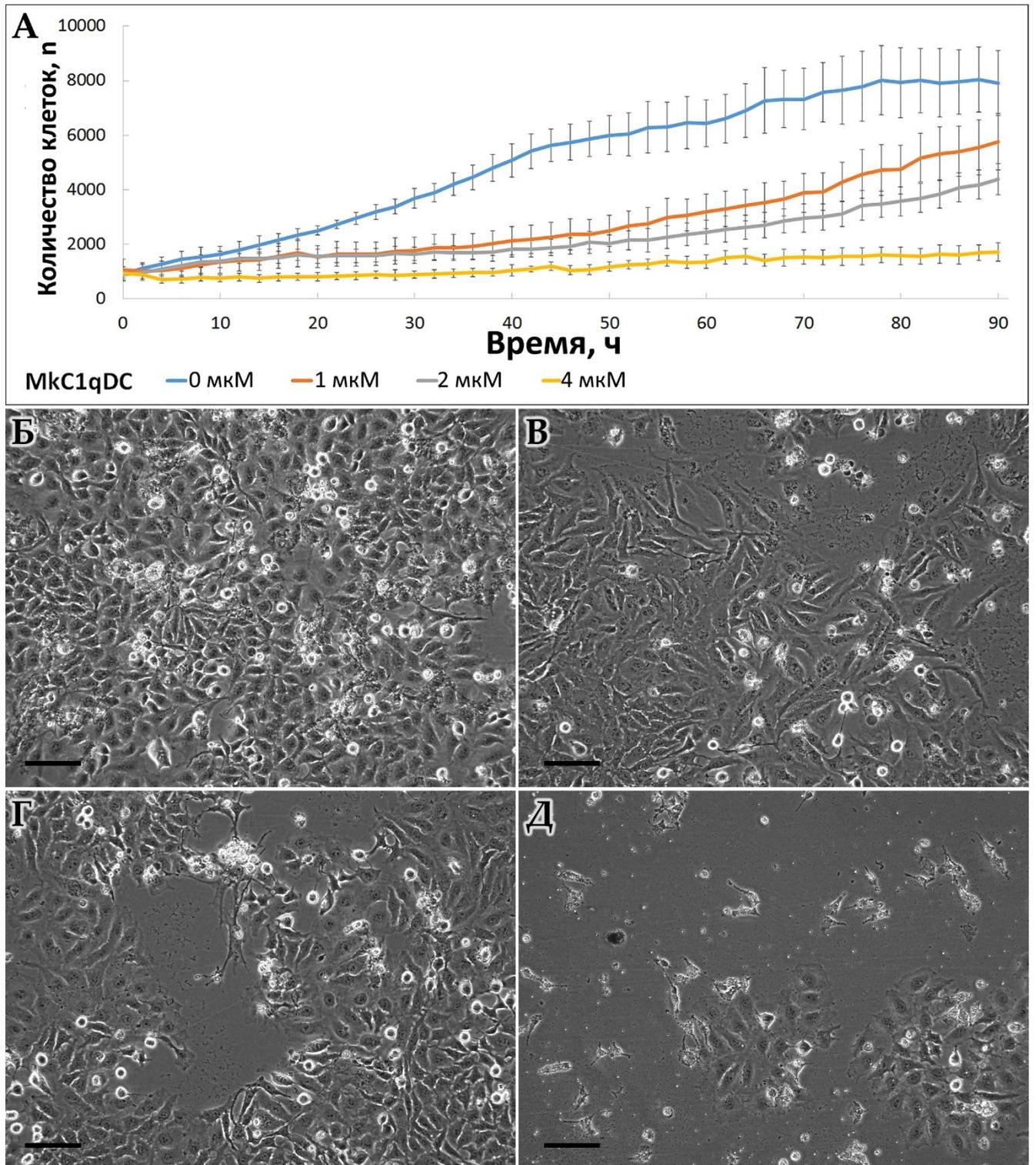


Рисунок 29. Влияние белка Mkc1qDC на пролиферацию клеточной линии HeLa SCL-2. А – кривые роста клеточных культур HeLa SCL-2 в присутствии различных концентраций Mkc1qDC. Б–Д – внешний вид культур клеток HeLa SCL-2 после 90 ч культивирования в присутствии различных концентраций Mkc1qDC: 0 мкМ (контроль, Б), 1 мкМ (В), 2 мкМ (Г) и 4 мкМ (Д). Масштабный отрезок – 50 мкм.

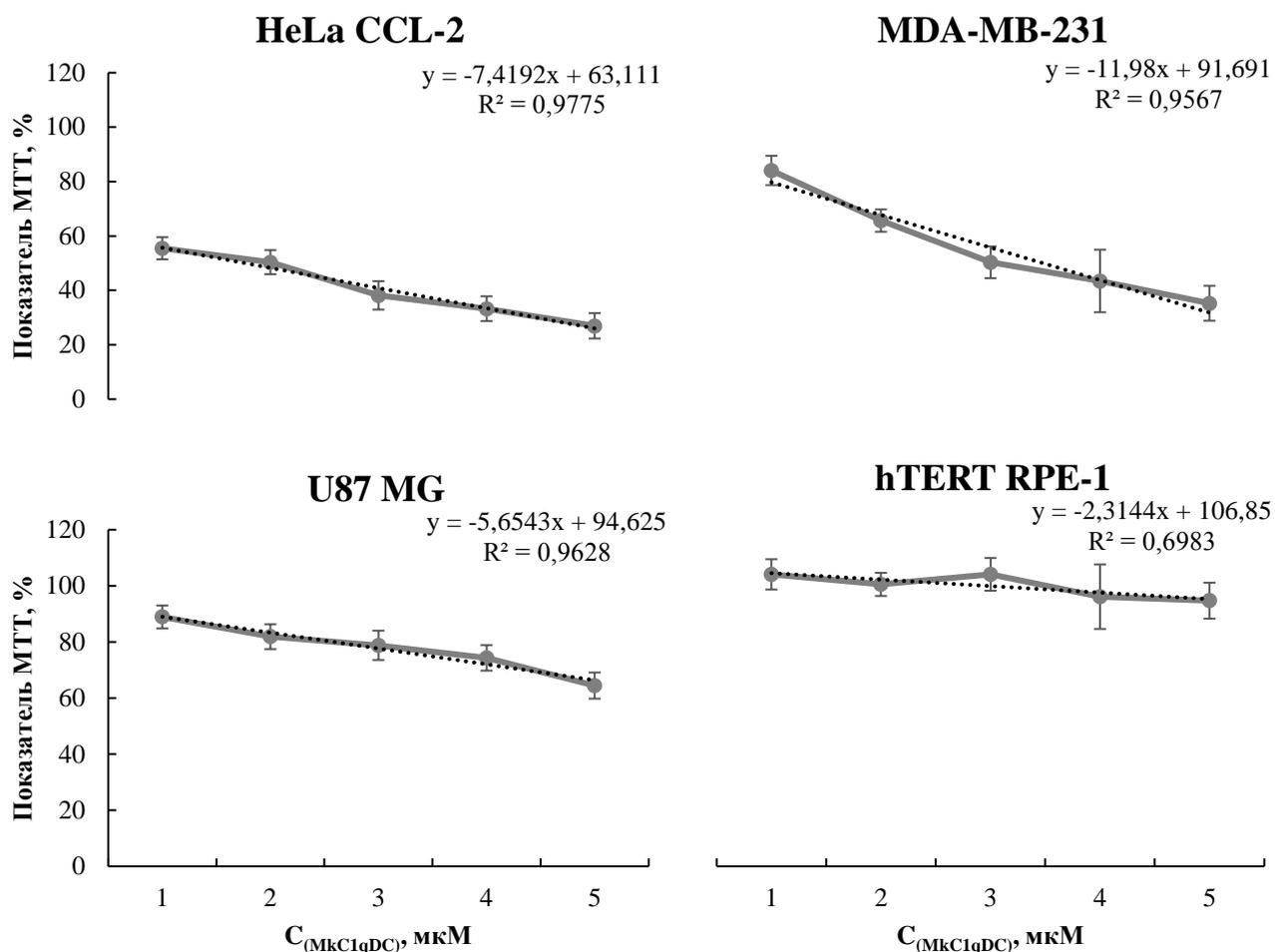


Рисунок 30. Результаты МТТ-теста с клеточными линиями человека после их культивирования в присутствии различных концентраций MkC1qDC в течение 48 ч. На графиках пунктиром обозначены регрессионные прямые и соответствующие уравнения, на основе которых были рассчитаны значения $IC_{50_{MkC1qDC}}$ для каждой линии.

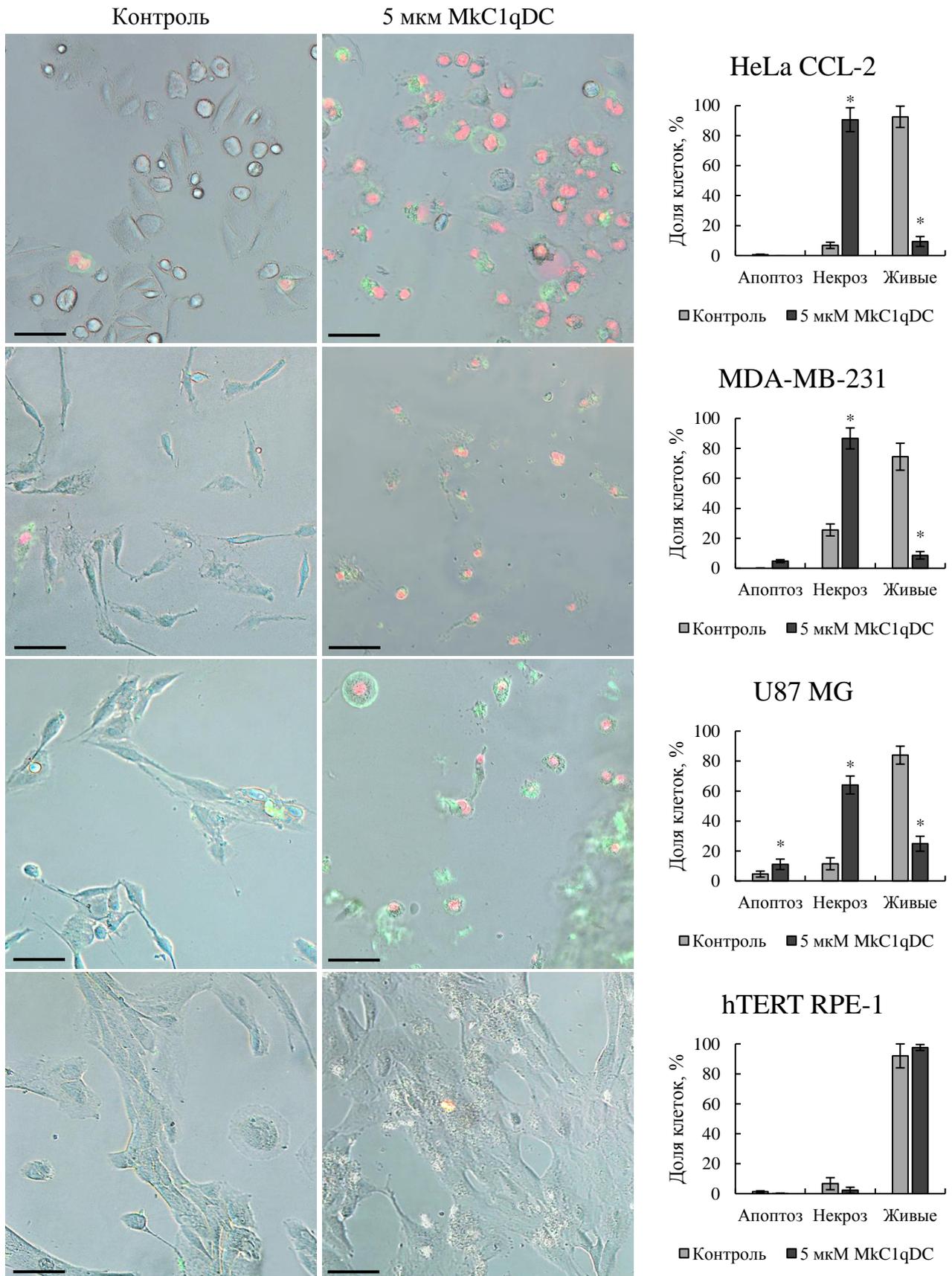


Рисунок 31. Оценка механизма клеточной гибели витальной окраской йодистым пропидием (красный) и аннексином V (зеленый) исследуемых линий после их культивирования в присутствии 5 мкМ МкС1qDC и без него (контроль) в течение 48 ч. На фотографиях представлено наложение фазового контраста и флуоресценции; масштабный отрезок – 50 мкм. * – различия с контролем значимы при $p < 0,05$.

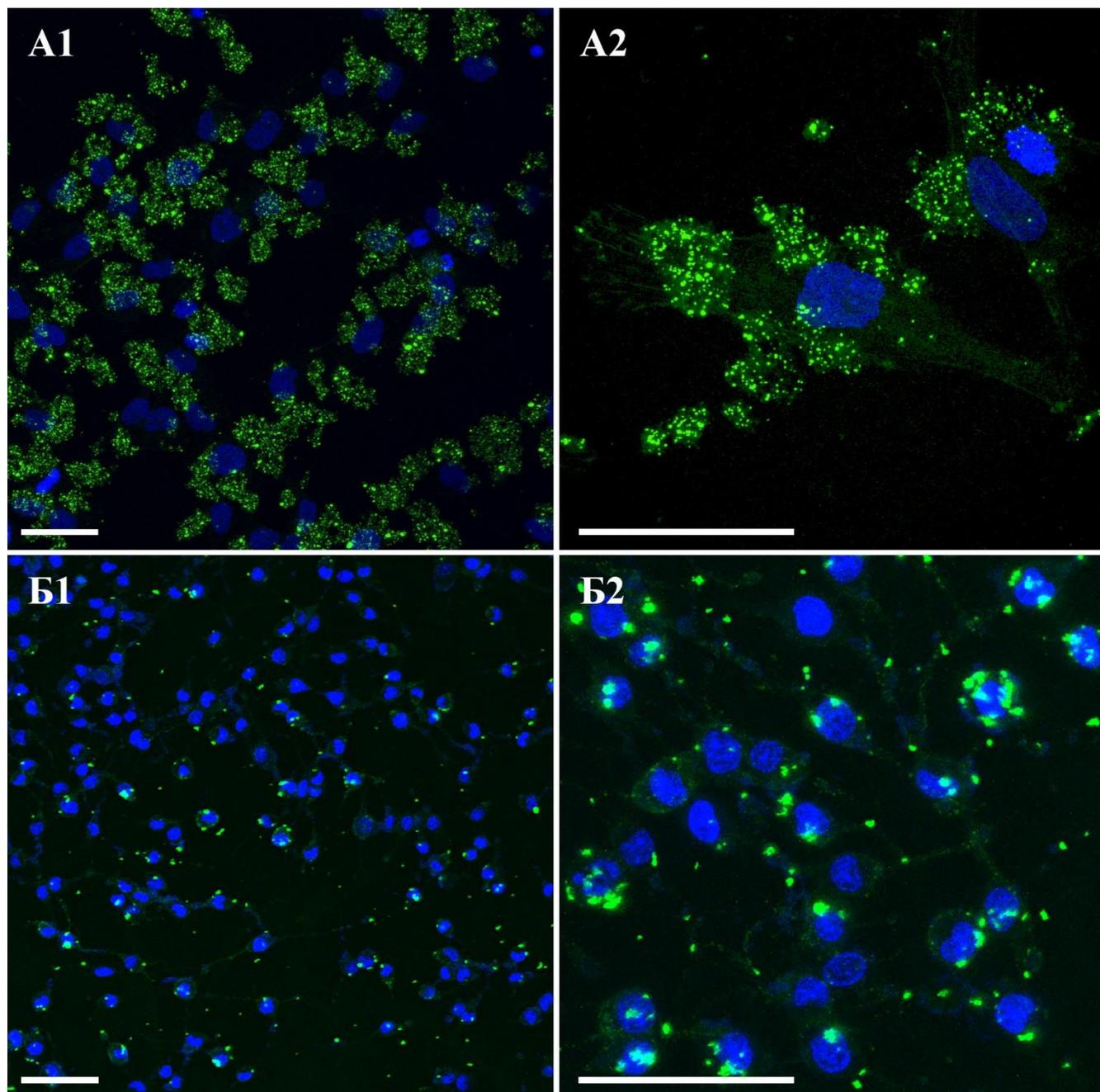


Рисунок 32. Окраска клеточных линий человека FITC-меченным белком Mkc1qDC (зеленый), ядра окрашены DAPI (синий). А – клетки аденокарциномы шейки матки линии HeLa CCL-2 (ATCC). Б – клетки аденокарциномы молочной железы линии MDA-MB-231 (ATCC). Масштабный отрезок – 50 мкм.

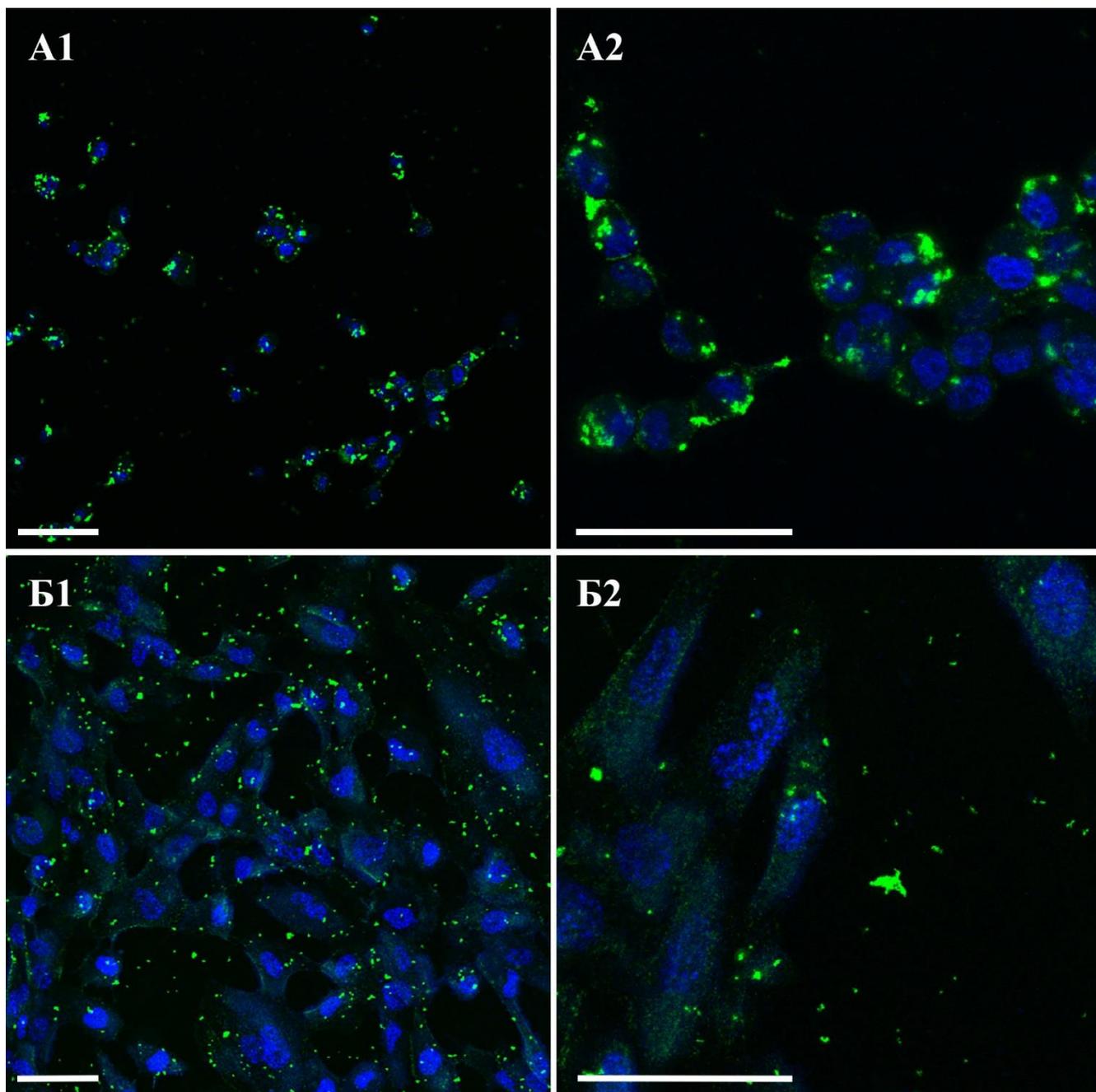


Рисунок 33. Окраска клеточных линий человека FITC-меченным белком Mkc1qDC (зеленый), ядра окрашены DAPI (синий). А – клетки глиобластомы линии U87 MG (ATCC). Б – иммортализованные клетки пигментного эпителия сетчатки линии hTERT RPE-1 (ATCC). Масштабный отрезок – 50 мкм.

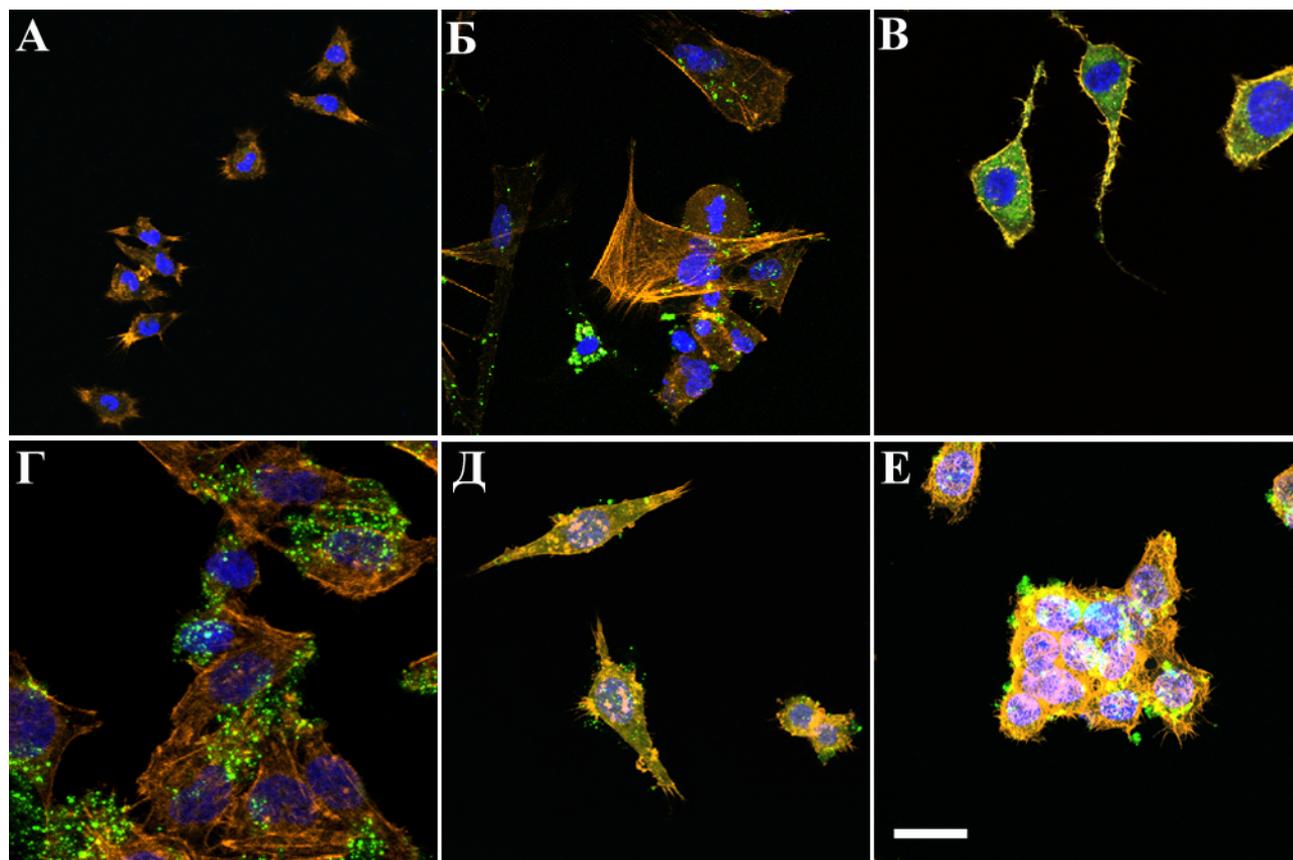


Рисунок 34. Окраска фиксированных клеток эукариот конъюгатом M κ C1qDC-FITC (зеленый), ядра окрашены DAPI (синий), актин окрашен родамин-фаллоидином (оранжевый). А – мышинные перитонеальные макрофаги, Б – клетки первичной глиальной опухоли пациента (ДВФУ), В – мышинные клетки нейробластомы линии Neuro-2a CCL-131 (ATCC), Г – клетки аденокарциномы шейки матки линии HeLa CCL-2 (ATCC), Д – клетки карциномы толстой кишки линии RKO CRL-2577 (ATCC), Е – клетки карциномы толстой кишки линии HCT 116 (ATCC). Масштабный отрезок – 20 мкм.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Метастабильный статус динамики агглютинирующей и литической активности плазмы гемолимфы *M. kurilensis* в течение года

Широкие температурные колебания вод умеренных поясов, к которым относится российское побережье Японского моря, напрямую влияют на адаптационные изменения организмов в течение года. Одной из наиболее реактивных систем животных, чувствительной к изменениям внешней среды, является иммунитет (Ratcliffe et al., 1985; Заварзин, 2000; Галактионов, 2005).

В ходе работы была проведена оценка динамики гуморальных показателей гемолимфы *M. kurilensis* в течение года, таких как ГЛР, РГА, С_р и белковый профиль плазмы, с выявлением возможных корреляций иммунных параметров между собой и с показателями водной среды, такими как температура, концентрация растворенного кислорода и соленость. Результаты вместе с оценкой еще и клеточных показателей представлены в нашей статье, а также клеточных показателей, которые подробно рассмотрены в нашей статье (Grinchenko et al., 2021a).

Многими авторами показано, что гемагглютинины беспозвоночных – растворимые лектины гемолимфы или целомической жидкости, которые в зависимости от своей углеводной специфичности могут избирательно связывать различные типы Эр, в том числе дифференцировать группы крови человека (Brown et al., 1968; Tatsumi et al., 1982; Bulgakov et al., 2007). И среди этой группы организмов двустворчатые моллюски не являются исключением (Johnson, 1964; Tatsumi et al., 1982; Schleder et al., 2008). Нами было обнаружено, что гемагглютинины *M. kurilensis* проявили наибольший аффинитет к Эр человека, причем для всех групп крови в равной степени. При этом редкая встречаемость крайних значений показателей РГА, равных 1 или 11 (титр 1/2 или 1/2048 соответственно), свидетельствует о правильно подобранных условиях оценки вариативности агглютинирующей активности плазмы гемолимфы *M. kurilensis* и валидности как использованной системы, так и полученных результатов.

Также в ходе работы было установлено, что стандартизация концентрации Эр существенным образом влияет на результаты РГА: использование суспензий, приготовленных классическим волюметрическим методом (1,5 % объемная доля Эр), нередко приводило к возникновению артефактных различий, которых нет в случае стандартизации по числу Эр с подсчетом в гемоцитометре Горяева. Поэтому в данной работе представлены результаты, полученные только последним способом.

Кроме того, было обнаружено, что литические факторы плазмы гемолимфы *M. kurilensis* проявляют явную Ca²⁺-зависимость, поскольку добавление в среду как неспецифического хелатирующего агента Na₂ЭДТА, так и высокоселективного к Ca²⁺ ЭГТА полностью

останавливают лизис Эр в ГЛР. Таким образом, оцениваемая активность является типичной для большинства гемолизинов беспозвоночных, характеризующихся как термолабильные Ca^{2+} -зависимые белки (Ratcliffe et al., 1985; Полевщиков, 1996; Song et al., 2010a). Кроме того, подобная зависимость от присутствия ионов Ca^{2+} согласуется с активностью предполагаемой у моллюсков системы комплемента, одними из ключевых активаторов которой считаются Ca^{2+} -зависимые лектины С-типа (Gerdol et al., 2018). Полученные в результате ГЛР широкие диапазоны показателей (от 0 % до 100 %) с редкой встречаемостью крайних значений свидетельствуют о том, что подобранные условия оптимальны для проведения ГЛР с плазмой *M. kurilensis*.

Сезонная динамика активности исследованных гуморальных факторов иммунитета *M. kurilensis* из залива Восток проявляется в небольших вариациях в пределах устойчивых диапазонов показателей РГА (агглютинирующие факторы) и ГЛР (литические факторы) в течение всего года, со значимым снижением лишь в выборке января, характеризующегося наименьшей температурой среды.

Отсутствие влияния температуры водной среды на агглютинирующую активность плазмы двустворчатых моллюсков было показано в работе с *M. modiolus* из Норвежского моря. Две группы экспериментальных животных содержали при различной температуре (4 °С и 11 °С) в течение 65 дней, и, хотя титр агглютининов у животных из среды с более высокой температурой был несколько выше, все же значимых различий выявлено не было. Кроме того, результаты РГА, проведенной при 4°С или 24°С, также не выявляли различий (Tunkijjanukij et al., 1997). Аналогичные результаты и отсутствие явной сезонной динамики активности агглютининов плазмы были получены и в работе с устрицей *C. gigas* из акватории Ирландского моря (Olafsen et al., 1992).

В работе с *M. galloprovincialis* из марикультурных хозяйств Испании была показана явная сезонная динамика иммунологических параметров, которая, однако, была в большей степени связана с репродуктивным циклом, чем с температурой водной среды. Так, максимальные значения агглютинирующей и литической активности, содержания общего белка и минимальная концентрация циркулирующих клеток в гемолимфе были выявлены в июле – в периоде после нереста. В других временных точках значимых изменений концентрации гемоцитов и белка в гемолимфе показано не было, а вот титр агглютининов и содержание лизоцима заметно падали при понижении температуры. Более того, показатель РГА положительно коррелировал с концентрацией лизоцима, а также общей концентрацией белка (Santarem et al., 1994), что прослеживалось в отдельные месяцы и для *M. kurilensis*.

В работе с *R. philippinarum* (Soudant et al., 2004) и *M. galloprovincialis* (Santarem et al., 1994; Malagoli et al., 2007) динамика активности лизоцима была схожа с полученными нами

результатами для ГЛР. Максимальные значения были выявлены в мае, июле и сентябре у *M. galloprovincialis*, а минимальные – в зимний период у *R. philippinarum* и *M. galloprovincialis* (Santarem et al., 1994; Soudant et al., 2004; Malagoli et al., 2007). При этом снижение иммунной активности у *R. philippinarum* в зимний период авторы связывают с общим снижением бактериальной нагрузки, уровня метаболизма животного и доступности пищи (Soudant et al., 2004).

Таким образом, вероятно, что агглютинирующая и литическая активности факторов гуморального иммунитета двустворчатых моллюсков не напрямую зависит от температуры водной среды, а опосредованно – через общую физиологическую активность, которая у исследуемого нами *M. kurilensis*, по-видимому, падает лишь при стабильных отрицательных значениях.

Динамика содержания белка в плазме у *M. kurilensis* из залива Восток в летне-осенний период (июнь-ноябрь) имела четкую тенденцию к снижению, тогда как в январе, марте, апреле и мае – к повышению. Для *M. galloprovincialis* показана противоположная тенденция с максимальными значениями в июле, что совпадало с периодом восстановления после размножения и малого количества еды, которые, по мнению авторов, являются определяющими факторами повышения концентрации белков в гемолимфе (Santarem et al., 1994). Поскольку нерест *M. kurilensis* в заливе Восток приурочен к июлю-августу (Колотухина, Семенихина, 1998; Радовец, Христофорова, 2008), а снижение концентрации белка отмечено с конца июня до конца ноября, то вероятно, изменения концентрации белка в плазме связаны не с нерестом, а иными факторами.

Для *A. irradians* и *A. farreri* было выявлено, что концентрация белков гемолимфы повышается с подъемом температуры, однако лишь до 28 °С. При дальнейшем повышении температуры концентрация белков значительно падает, и, таким образом, у данных видов она оказывается сниженной при максимально высоких температурах (Liu et al., 2004). В исследовании, проведенном на моллюске *R. philippinarum*, содержание белка гемолимфы было высоким весной-летом и низким – осенью-зимой. Несмотря на то, что тенденция к снижению концентрации белков в зимний период прослеживалась достаточно четко, особи, обитающие в северных районах, где диапазон температур более широкий, в среднем имели более высокие значения концентрации белков (Soudant et al., 2004). Такие противоречивые результаты по динамике C_p у разных видов, по-видимому, связаны с различными диапазонами температур, в которых они обитают.

Повышение концентрации белков плазмы *M. kurilensis* в январе и марте, когда температура морской воды ниже нуля, может быть связано с увеличением концентрации белков, отвечающих за устойчивость моллюсков к низким температурам. В этой связи особый интерес

вызывает белковая фракция P36, резкий скачок содержания которой был выявлен в наиболее холодный период. Корреляционный анализ, в свою очередь, показал прямую связь P36 с общей концентрацией белков в плазме ($R = 0,31$, $n = 276$), с максимальными значениями в январе ($R = 0,62$, $n = 31$), а также обратную связь с температурой ($R = -0,33$, $n = 276$). Криопротекторные белки известны для некоторых позвоночных и беспозвоночных животных, бактерий и водорослей, обитающих в морях и океанах, где температура воды опускается ниже нуля (Kim et al., 2017). Для рыб антифризные белки содержат мотив из нескольких аминокислотных остатков, который может повторяться до 50 раз, в результате чего диапазон молекулярных масс для данных белков варьирует от 2,6 до 33,7 кДа (Kim et al., 2017), тогда как, антифризные белки арктической ногохвостки *Megaphorura arctica* имеют диапазон молекулярных масс от 6,5 до 16,9 кДа (Graham et al., 2020). Таким образом, криопротекторные белки имеют весьма широкий диапазон молекулярных масс и строго специфичны для каждого вида. Установление вовлеченности фракции P36 в криопротекцию у *M. kurilensis* требует дальнейших исследований и носит дискуссионный характер.

Результаты корреляционного анализа показали связь ГЛР с P16 в течение всего года с усилением в отдельные сезоны, и, таким образом, можно предположить, что в данной фракции содержатся некоторые литические факторы *M. kurilensis*. В пользу этого говорят данные исследований литических факторов (в первую очередь лизоцимов) других представителей *Bivalvia*, масса которых варьировала от 12 до 22 кДа. Так, у *M. galloprovincialis* обнаруженный лизоцим С-типа имел массу 14,4 кДа, лизоцим I-типа *R. philippinarum* – 20,87 кДа, лизоцим I-типа *C. plicata* – 18,2 кДа, лизоцим I-типа *M. meretrix* – 14,6 кДа, а два лизоцима I-типа, обнаруженные в *C. virginica* – 12,98 и 17,86 кДа (Itoh et al., 2007; Xue et al., 2007; Zhao et al., 2010b; Yue et al., 2011; Wang et al., 2013b; Dai et al., 2015).

Кроме того, в ходе работы была выявлена прямая связь между РГА и содержанием P19 в плазме для всей совокупности образцов ($R = 0,38$, $n = 276$) с усилением корреляции в отдельные месяцы. Данная фракция по массе соответствует выделенному и описанному в данной работе белку MkC1qDC, проявляющего агглютинирующую активность как в отношении эритроцитов, так и бактерий (более подробно рассмотрено в последующих разделах), поэтому такая связь P19 и РГА вполне объяснима. Однако значения полученных коэффициентов корреляции ($R < 0,6$), говорит о том, что в плазме *M. kurilensis* присутствуют и иные углеводов-распознающие белки, главным образом лектины, которые в различные сезоны могут играть большую или меньшую роль в качестве агглютинирующих факторов. В пользу данного предположения говорят ранее полученные другими авторами данные о наличии нескольких лектинов в гемолимфе двустворчатых моллюсков, например, у близкого вида *M. modiolus* (Tunkijjanukij et al., 1997) или у *R. philippinarum* (Kang et al., 2006).

В плазме гемолимфы *M. kurilensis* был охарактеризован белковый профиль из 15 белковых фракций, среди которых единственной мажорной была P55, а значимые вариации в течение года (тест Краскела-Уоллиса, $p < 0,001$) выявлены для пяти других: P124, P107, P48, P41 и P36. При этом их динамики имели индивидуальный характер и не были приурочены к значимым физиологическим событиям, связанным, например, с нерестом, и в большинстве случаев не коррелировали со средовыми параметрами, за исключением ранее описанной фракции P36. Кроме того, у ряда фракций (P124, P78, P55) нами была установлена их диагностическая значимость при оценке состояния моллюсков с помощью "integral health index" (Kumeiko et al., 2018) – интегрального индекса здоровья, что будет более детально описано в последующих разделах.

В целом, оценка сезонной динамики параметров гемолимфы *M. kurilensis* показала их незначительное, но достоверное изменение в течение года. Это, в совокупности с диагностической ценностью исследованных параметров, свидетельствует о необходимости исследований естественных годовых вариаций показателей физиологического состояния животных с целью определения валидных границ нормы и отклонения от них для каждого сезона. При этом, с одной стороны, наличие чувствительности и направления изменений у различных иммунных показателей по отношению к параметрам среды могут быть специфичными, связанными с биологией самого вида и, соответственно, особенностями активности метаболизма, образа жизни, питания, полового цикла и другими. С другой стороны, прослеживается тенденция, что чем сильнее размах вариативности конкретного средового фактора, тем более выражено его влияние на динамику чувствительных иммунологических параметров. Данное явление особенно хорошо заметно в работах с одними и теми же видами моллюсков из акваторий с резко различающимися температурными режимами (Carballal et al., 1998; Matozzo et al., 2003; Ciacci et al., 2009; Flye-sainte-marie et al., 2009; Lacroix et al., 2017). Залив Восток Японского моря на глубине вылова исследуемых моллюсков имеет характерное для большей части залива Петра Великого годовое распределение температуры, солености и концентрации кислорода (Лучин и др., 2005). Это позволяет с высокой долей уверенности предполагать, что выявленные особенности динамики исследованных показателей характерны для *M. kurilensis* не только из залива Восток, но и из значительной части акваторий Южного Приморья.

Таким образом, наши данные говорят, что наиболее устойчивые значения исследованных показателей (РГА, ГЛР, C_p и подавляющего большинства белковых фракций плазмы) были характерны для летне-осеннего периода, в который были проведены все последующие работы.

4.2. Стимуляция гуморальных факторов гемолимфы *M. kurilensis* в ответ на введение инактивированных бактерий

В результате введения *M. kurilensis* термически инактивированных *S. aureus* нами было зафиксировано увеличение C_p , ГЛР и РГА уже через 3 ч после инъекции, при этом ГЛР и C_p быстро восстанавливались до исходных значений к 36 ч, что согласуется с данными о быстром кратковременном увеличении транскрипционной активности множества различных защитных факторов. Повышенную экспрессию гуморальных факторов в первые часы после введения различных патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП) наблюдали в гемоцитах *S. grandis* (Wei et al. 2012a), *A. farreri* (Zhang et al., 2008; Yang et al., 2011), *P. fucata* (Anju et al., 2013), *C. ariakensis* (Xu et al., 2012a), *M. galloprovincialis* (Romero et al., 2011) и *T. granosa* (Bao et al., 2013), в том числе и в отношении пептидогликанов из использованного в нашей работе вида бактерий *S. aureus* (Chellaram et al., 2004; Romanenko et al., 2008). Подобные процессы также происходили после инъекции *Vibrio*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* и *Saccharomyces* в мышцу-замыкатель моллюсков *M. galloprovincialis*, *T. granosa*, *R. philippinarum*, *A. irradians*, *C. plicata*, *C. hongkongensis*, *Mytilus coruscus* и *P. fucata martensii* (Zhang et al., 2009; Zhu et al., 2009; Gestal et al., 2010; Song et al., 2010b; Zhao et al., 2010b; Chen et al., 2011; Estevez-Calvar et al., 2011; He et al., 2011; Romero et al., 2011; Wang et al., 2011b; Bao et al., 2013; Liu et al., 2014a; Qu et al., 2014; Xiang et al., 2014; Burgos-Aceves et al., 2017). Кроме того, в работах о влиянии *Vibrio* на *R. philippinarum* ранее было показано, что литическая активность и C_p уже через 72 ч после воздействия соответствуют исходным значениям (Oubella et al. 1994, Paillard et al. 2004, Allam et al. 2006).

Повышенный уровень РГА на протяжении 7 суток может быть связан либо с более длительной активностью соответствующих генов, либо с большей устойчивостью гемагглютининов *M. kurilensis* к истощению или деградации. Следует заметить, что работ по оценке динамики агглютинирующей активности в ответ на бактериальную стимуляцию крайне мало. Так, в одной из них у *C. gigas* показано повышение активности агглютининов гемолимфы после содержания животных в среде с *Vibrio anguillarum*, которое наблюдали как через 2 суток, так и через 7 суток инкубирования животных с бактериями (Olafsen et al., 1992). В последующих работах на том же объекте, но с более длительным наблюдением, повышения активности агглютининов через 14 суток уже не наблюдали (Olafsen et al., 1993). Также у *C. gigas* при воздействии одноклеточным паразитом *P. marinus* происходило возрастание числа циркулирующих гемоцитов, доли среди них гранулоцитов и агглютинирующей активности плазмы, в отличие от *C. virginica*, у которой подобных изменений не происходило. Однако при тяжелом инфицировании у *C. virginica* содержание гранулоцитов и фагоцитирующих гемоцитов, а также титр агглютининов были выше, чем у *C. gigas* (La Peyre et al., 1995).

Как было отмечено ранее, основными агглютинидами плазмы моллюсков являются лектины. В работе с гемоцитами *R. philippinarum* в их геноме были выявлены гены сразу 7 различных лектинов (Kangetal., 2006). Интересной особенностью является тот факт, что у неинфицированных моллюсков в гемоцитах не происходил синтез ни одного из этих лектинов, в то время как у инфицированных одноклеточным паразитом *P. olsenii* экспрессировались сразу 6 генов, а при инфицировании бактерией *Vibrio tapetis* – только 2 (Kang et al., 2006).

У тяжело инфицированных *Perkinsus atlanticus* двустворчатых моллюсков *R. decussatus*, в сравнении со здоровыми, титр агглютининов был значительно выше, а антимикробная активность плазмы – ниже (Ordás et al., 2000). Было также показано, что у здоровых особей концентрация гемоцитов, фагоцитарная и антибактериальная активность выше, в то время как концентрация лизоцима и общего белка, а также титр агглютининов ниже в сравнении с тяжело инфицированными. Однако, вероятно, из-за малого объема выборок (5 и 10 особей) и высокой внутрипопуляционной вариативности большинства из показателей выявленные различия были статистически не значимы (Ordás et al., 2000). Таким образом, исключение нами из выборок явно аномальных особей вполне обосновано.

В целом, исследования, посвященные изучению непосредственного проявления защитной физиологической активности иммунных факторов при действии патогенов, становятся все более редкими, что, вероятно, связано с их значительной вариабельностью и, следовательно, сложностью их анализа и интерпретации. Широкие пределы естественной вариативности иммунных параметров, включая РГА, С_p и литических факторов, показаны для различных моллюсков, среди которых *M. galloprovincialis* (Santarem et al., 1994), *C. virginica* и *C. gigas* (La Peyre et al., 1995), *R. decussatus* (Ordas et al., 2000), *R. philippinarum* (Paillard et al., 2004) и *M. veneriformis* (Yu et al., 2010). Вероятно, это связано с тем, что иммунные факторы выполняют интегративные и гомеостатические функции, тонко реагируя на многие экзогенные и эндогенные стимулы. Поэтому предварительный скрининг животных по исследуемым параметрам является необходимым условием для нахождения удовлетворительных экспериментальных особей, для которых не характерны заведомо повышенные или пониженные значения.

В нашем исследовании предварительный отбор выловленных животных по агглютинирующей и фагоцитарной активности в итоге обеспечил однородность исходных образцов ("К1" и "Э1" – до введения инъекций) по всем исследованным параметрам, что повысило валидность результатов, полученных для сравнительно небольших выборок (n = 16) каждой временной точки; это также дало уверенность в том, что выявленная динамика была типичной, и результаты не были искажены показателями особей с заведомо аномальными (крайними для показателей) значениями. Кроме того, ранее описанная для *M. kurilensis* годовая динамика РГА, ГЛР и С_p показала их стабильность в течение периода проведения данного

эксперимента (сентябрь-октябрь). Это особенно важно для правильной оценки ответа животных на введение бактерий спустя длительный период (7 и 14 суток), поскольку естественные изменения среды, при условии содержания моллюсков в проточной морской воде из открытой акватории, могли бы потенциально исказить результаты.

Проведенный нами корреляционный анализ исходных значений до введения бактерий или СМВ ($n = 320$) выявил некоторую корреляцию между РГА и ГЛР ($R = 0,28$), которой не было обнаружено при оценке сезонной динамики этих параметров. Подобная связь была ранее выявлена у *M. galloprovincialis* (Santarem et al. 1994), что, вероятно, говорит о совместной работе этих двух наиболее важных факторов гуморального иммунитета. Причиной появления коррелятивной связи между РГА и ГЛР у *M. kurilensis*, не выявленной при изучении естественной годовой вариативности показателей гемолимфы, может являться предварительный отбор особей для основного эксперимента по показателям РГА и фагоцитарной активности, что делает выборку заведомо скорректированной. Также это могло повлиять и на ослабление ранее выявленной в течение года связи между ГЛР и C_p ($R = 0,16$).

Корреляция между изменениями показателей (их разность до и после введения бактерий, т.е. "Э2" минус "Э1") представляет особый интерес, поскольку отражает взаимосвязь параметров в динамике иммунного ответа *M. kurilensis*. Ранее отмеченная корреляция между РГА и ГЛР, а также между ГЛР и C_p несколько усиливалась в отдельных точках ($n = 16$) в случае разности по показателям, однако в совокупности для всех точек ($n = 160$) оставалась также слабой. Кроме того, между изменениями ГЛР и фагоцитарной активностью всех образцов ($n = 160$) была выявлена обратная связь, которая в период активного клеточного ответа (3–48 ч, $n = 96$) становилась более выраженной ($R = -0,54$). Это может означать, что ФА и ГЛР работают по компенсаторному принципу, то есть увеличение или уменьшение фагоцитарной активности гемоцитов может быть скомпенсировано литическими факторами плазмы и/или наоборот.

Таким образом, было выявлено несколько стадий в динамике иммунного ответа *M. kurilensis* на заражение термически инактивированными бактериями *S. aureus*: индукторная – в первые три часа, эффекторная – в период 3–24 ч и фаза восстановления – 36–72 ч, каждая из которых подробно рассмотрена со стороны клеточных и гуморальных показателей в опубликованной нами статье (Grinchenko et al., 2015).

В целом, можно заключить, что все изученные в данном случае показатели (РГА, ГЛР и C_p) оказались чувствительными к импульсному воздействию путем стимуляции иммунного ответа бактериями, что подтверждает их перспективность в качестве инструмента оценки физиологического состояния моллюсков.

4.3. Чувствительность гуморальных показателей гемолимфы *M. kurilensis* к антропогенному стрессу

Двустворчатые моллюски в силу малоподвижного или прикрепленного придонного образа жизни с фильтрующим типом питания являются удобным объектом биомониторинга, и на некоторых видах проведен ряд работ по оценке влияния загрязнения на их распространение и физиологию (Girón-Pérez, 2010; Canesi et al., 2012; Loker, Wayne, 2018). Однако системного рассмотрения с количественной оценкой иммунологических и гистологических параметров в связи друг с другом и влияния на них антропогенной нагрузки ранее не проводилось. В результате проведенной нами работы были выявлены чувствительные к хроническому загрязнению гуморальные показатели гемолимфы, такие как ГЛР, Ср, P55, P78 и P124, а также их взаимосвязь с гистопатологическими изменениями почек и ПВЖ (Kumeiko et al., 2018).

В Спортивной гавани Амурского залива были неоднократно зафиксированы значительная степень антропогенной нагрузки и превышение ПДК Pb, Cu, Cd, Zn, Ni и других металлов, пестицида дихлордифенилтрихлорметилметана (ДДТ), нефтеуглеводородов в донных осадках (Олейник и др., 2004, Ващенко и др., 2010) и различных микроорганизмов (Бойченко и др., 2009). Все это в совокупности неблагоприятно сказывалось на состоянии некоторых гидробионтов (Жадан и др., 2003; Ващенко и др., 2005; Маркина, 2008), и, в том числе, повлияло на сперматогенез *M. kurilensis* (Yurchenko, Vaschenko, 2010). Кроме того, в других работах была показана способность модиолусов аккумулировать в мягких тканях As, Cd, Cu, Hg, Pb, Ni, Se, Zn, Fe и некоторые органические поллютанты. Однако явно негативного влияния накопления этих веществ на исследованные в опубликованных работах (Chou et al., 2003; Kavun, Podgurskaya, 2009; Veldhoen et al., 2011) морфометрические показатели моллюсков, работу их внутренних органов, репродуктивный статус или возрастную структуру популяций выявлено не было. Было обнаружено лишь коррелирующее с концентрацией некоторых поллютантов в тканях *M. modiolus* изменение активности транскрипции мРНК четырех белков, которое, однако, не показывало однозначного влияния на общее физиологическое состояние моллюсков (Veldhoen et al., 2011).

Полученные нами результаты показали, что среди проанализированных показателей гемолимфы *M. kurilensis* лишь агглютинирующая активность не имеет значимых различий ($p > 0,05$) у моллюсков из исследованных акваторий. Аналогичный результат был получен в работе с *C. gigas* из Норвежского моря, где у моллюсков из пяти акваторий не было выявлено различий в агглютинирующей активности (Olafsen et al., 1993). Вероятно, данный параметр для *M. kurilensis* является наиболее стабильным по отношению к изменениям среды, не носящим катастрофический характер. В пользу этого, с одной стороны, говорят результаты исследований по накоплению и выведению тяжелых металлов из мягких тканей *M. kurilensis* и *C. grayanus*,

обитающих в заливе Петра Великого, где была показана более высокая устойчивость модиолуса к данным поллютантам (Жадан и др., 2003; Подгурская, Кавун, 2012). С другой стороны, в работе с пресноводными двустворчатыми моллюсками семейства Unionida (*Anodonta cygnea*, *Unio timidus* и *Unio pictorum*) была выявлена положительная корреляция степени антропогенной нагрузки с титром гемагглютининов и отрицательная – с численностью особей в популяциях (Алехина и др., 2010). Однако информации о резком снижении численности *M. kurilensis* в Спортивной гавани на данный момент не опубликовано, а наше исследование на особях из этой акватории не показывает увеличения агглютинирующей активности плазмы.

В ряде работ также показано, что разные виды загрязнений могут изменять иммунное состояние моллюсков, при этом оказываемый эффект зависит как от вида организма, так и от типа поллютанта и его концентрации. При этом в большинстве случаев низкий уровень загрязнения производит иммуностимулирующий эффект (Coles et al., 1995; Pipe, Coles, 1995; Pipe et al., 1999), а высокие концентрации оказывают подавляющее действие (Coles et al., 1995; Pipe, Coles, 1995; Pipe et al., 1999; Sokolnikova et al., 2015). У *M. kurilensis* из импактной акватории выявлено значимое снижение литической активности плазмы и общего содержания белка в ней. Сходные результаты были получены для гуморальных факторов гемолимфы *C. virginica* (Chu, Peuge, 1989) и *R. philippinarum* (Allam et al., 2000). В работе по исследованию влияния высокой плотности гетеротрофной микрофлоры в среде на физиологическое состояние пресноводных двустворчатых моллюсков *Elliptio complanata* показана значительная отрицательная корреляция фагоцитарной активности гемоцитов с концентрацией микроорганизмов и значимое снижение концентрации лизоцима в случае максимальной зафиксированной бактериальной нагрузки (Bouchard et al., 2009).

Работ, посвященных исследованию изменения белкового профиля плазмы двустворчатых моллюсков в литературе крайне мало, и они посвящены оценке влияния загрязняющих или иных неблагоприятных факторов на отдельные растворимые компоненты внутренней среды белковой природы, или наоборот, отдельных факторов на профиль экспрессии белков. Например, установлено, что полихлордифенил "Aroclor 1254" вызывает повышение экспрессии белков плазмы у *Chamaelea gallina*, а у *M. edulis* – их снижение. Умеренное загрязнение медью Cu (II) у тех же видов также повышало экспрессию, однако высокие дозы ее подавляли (Manuel et al., 2003; McKinnon et al., 2003). Изменение экспрессии различных белков при влиянии кадмия и других тяжелых металлов было показано у четырех видов морских двустворчатых моллюсков: *Chlamys nobilis*, *R. philippinarum*, *P. viridis*, *Saccostrea cucullata* (Liu et al., 2012). Также изменение в профиле экспрессии белков обнаружено у *D. polymorpha* при воздействии бензопирена (Riva et al., 2011) и триклозана (Riva et al., 2012). Кроме того, было установлено, что паразиты также вызывают изменение белкового профиля плазмы. Например, такие изменения были показаны при

заражении простейшими *P. olseni* моллюска *R. philippinarum* (Fernández-Boo et al., 2016) и QPX (quahog parasite unknown) моллюска *M. mercenaria* (Rubin et al., 2016). У *M. meretrix* и *A. farreri* при влиянии различных неблагоприятных факторов выявлено изменение активности экспрессии ряда отдельных белковых молекул, например, ферритина, каталаз и QM белков (Wang et al., 2013a; Chen et al., 2015; Chen et al., 2016). В нашей работе среди 15 выявленных белковых фракций плазмы три из них показали значимые различия между исследованными акваториями: процентное содержание мажорной фракции P55 у животных из импактной Спортивной гавани было снижено, а содержание P78 и P124 – повышено. Таким образом, указанные фракции, наряду с литической активностью и концентрацией общего белка плазмы *M. kurilensis*, также показали чувствительность к высокой антропогенной нагрузке и, таким образом, могут быть использованы в дальнейшем в качестве инструмента биоиндикации.

Впервые проведенный нами корреляционный анализ между показателями гемолимфы и гистопатологий выявил для некоторых из них взаимосвязи, которые в зависимости от акватории могли менять степень выраженности, что влияло на значения коэффициентов корреляции в совокупной выборке (Kumeiko et al., 2018). При этом частота и степень связи были более выражены в случае Спортивной гавани, что, по всей видимости, объясняется бóльшим числом и тяжестью гистопатологических изменений, выявленных у животных из этой акватории (Kumeiko et al., 2018). Так, например, гипервакуолизация клеток пищеварительных трубочек ПВЖ у животных из Спортивной гавани имела умеренную обратную связь с ГЛР ($R = -0,60$, $n = 26$) и с S_p ($R = -0,40$, $n = 26$), которая отсутствовала у животных из залива Восток, что приводило к ослаблению данной корреляции для всех образцов ($n = 65$) до $R = -0,36$ в первом случае и $R < -0,20$ – во втором. В общем, ГЛР показала наибольшее число корреляций с различными типами гистопатологий, хотя для РГА и S_p такие связи также были выявлены, но в меньшем количестве, а для P55 и P78 – в единичных случаях. Кроме того, ГЛР и S_p показали связь с комплексными гистопатологическими индексами, более полно отражающими общее физиологическое состояние моллюсков.

Таким образом, чувствительные к антропогенному воздействию и коррелирующие с гистопатологическими изменениями параметры ГЛР, S_p , P55 и P78, а также достоверно различающийся между акваториями уровень P124, наряду с клеточными иммунными показателями и гистопатологическими индексами были взяты за основу разработанного нами комплексного показателя – интегрального индекса здоровья, наиболее полно отражающего физиологическое состояние моллюсков, концепция которого подробно изложена в опубликованной нами статье (Kumeiko et al., 2018).

4.4. Новый белок-агглютинин гемолимфы *M. kurilensis* (MkC1qDC) с высоким аффинитетом к гликанам на основе кислых галактанов и маннанов

Как отмечалось ранее, роль агглютининов в гемолимфе и целомической жидкости беспозвоночных выполняют главным образом белки и гликопротеины группы лектинов, которые нередко называют функциональными аналогами антител для данной группы животных. Важно отметить, что представленность этих белков не ограничивается плазмой беспозвоночных: они обнаружены практически во всех крупных систематических группах, существуют в растворимой и мембранной формах, приурочены к различным тканям, органам и этапам онтогенеза, а также участвуют в широчайшем наборе биологических процессов, связанных с взаимодействиями клетка–клетка и клетка–межклеточное вещество. Связывание лектинов с лигандами, которыми являются поверхностные углеводы в составе различных структур, происходит нековалентно. При этом для каждого лектина в зависимости от его структуры, функций и локализации степень и спектр специфичности индивидуальны (Полевщиков, 1996; Игнатов, 1997; Sharon, Lis, 2007). Другие углевод-распознающие белки беспозвоночных FReD и C1qDC, участвующие в иммунном ответе, впервые описаны относительно недавно, поэтому в литературе не так много данных о них, особенно касательно спектра их углеводной специфичности. При этом явное функциональное сходство, вероятно, является причиной, по которой некоторые из этих белков относят к лектинам (Zhang et al., 2008; He et al., 2011; Li et al., 2011; Yang et al., 2012; Zhao et al., 2016) или называют лектин-подобными (Gerdol et al., 2011, 2015b, 2019).

Скрининг спектра углеводных специфичностей лектинов плазмы *M. kurilensis* с помощью ИРГА показал наибольшую ингибирующую способность муцинов, которые из-за своего сложного углеводного состава классически используются в качестве позитивного контроля в ИРГА (Tunkijjanukij, Olafsen, 1998; Suzuki et al., 2012), а также D-галактуроновой, D-глюкуроновой и сиаловой кислот. В работах с близким атлантическим видом *M. modiolus* также показана высокая специфичность плазменных лектинов к сиаловой кислоте и углеводным структурам на ее основе или с ее присутствием в составе (Tunkijjanukij et al., 1997; Tunkijjanukij et al., 1998). При этом они обладали высокой агглютинирующей активностью в отношении эритроцитов человека или лошади и были названы модиолинами H и E соответственно. Причем только модиолин E, специфичный к эритроцитам лошади, проявлял Ca^{2+} -зависимость (Tunkijjanukij et al., 1997). Среди других углеводов, для которых у нашего и атлантического видов были выявлены перекрытия в специфичности лектинов, можно отметить N-ацетил-D-галактозамин, D-(-)-рибозу, DL-арабинозу, D-(+)-раффинозу, D-(+)-ксилозу и лактозу (Tunkijjanukij et al., 1997). Однако ряд использованных нами углеводов показал специфичность, отсутствующую у *M. modiolus*, с возрастанием ингибирующей активности у *M. kurilensis* в ряду: L-(-)-сорбоза, D-(+)-фукоза, D-(+)-галактоза, D-(+)-манноза, D-глюкоза, N-ацетил-D-

глюкозамин, D-глюкуроновая кислота. Таким образом, для лектинов атлантического вида не было обнаружено специфичности к D-глюкуроновой кислоте (D-галактурановая кислота для *M. modiolus* не использовалась) и N-ацетил-D-глюкозамину, которые в нашем случае показали высокую ингибирующую активность в ИРГА, что свидетельствует о возможном наличии новых участников в лектиновом профиле плазмы *M. kurilensis*.

Дальнейшая работа подтвердила наличие нового углевод-распознающего белка плазмы *M. kurilensis* (MkC1qDC), для которого была разработана и оптимизирована схема выделения, включающая первичное грубое фракционирование плазмы растворами сульфата аммония со степенями насыщения 60 % и 85 % и тонкую очистку аффинной хроматографией с использованием сефарозы с ковалентно сшитым природным полигалактуронидом – растительным пектином. При этом было обнаружено, что активность MkC1qDC зависит от присутствия бивалентных катионов (Ca^{2+}), а его молекулярная масса при обработке восстанавливающими агентами (меркаптоэтанолом, дитиотреитолом) составляет 19 кДа. Масса полипептидов, входящих в состав выделенного с помощью муцин-сефарозы из плазмы *M. modiolus* сиало-специфичного лектина, составляла 14, 17,5 и 20 кДа в восстанавливающих условиях, при этом было показано их нативное существование в виде крупных конгломератов с молекулярной массой в широком диапазоне 100–1300 кДа (Tunkijjanukij et al., 1997; Tunkijjanukij, Olafsen, 1998). Мы не проводили исследования нативной структуры MkC1qDC, но данные электрофореза с вестерн-блоттинга говорят о существовании его димера (рис. 13). Более глубокий анализ степени гомологии и структурного сходства MkC1qDC и модиолинов не представлялся возможным, так как для модиолинов не были определены ни нуклеотидная, ни аминокислотная последовательности, а также не проводилось секвенирование генома или транскриптома *M. modiolus*. Тем не менее, все полученные данные в совокупности свидетельствуют о том, что нами выделен новый белок с уникальными свойствами распознавания углеводов и разработан относительно простой и эффективный протокол его очистки (Grinchenko et al., 2021b).

Повторяемость результатов N-концевого секвенирования методом Эдмана образцов MkC1qDC, полученных независимо в разное время, подтверждает надежность разработанной схемы выделения и очистки белка (рис. 7А). Однако, несмотря на получение последовательностей длиной до 41 аминокислотных остатка, нам не удалось выявить каких-либо значимых совпадений с другими белками ни в одной из доступных баз данных, что указывает на уникальность N-концевого фрагмента и самого белка. Масс-спектрометрическое секвенирование *de novo* также дало множество пептидов, анализ которых позволил собрать полную аминокислотную последовательность MkC1qDC с использованием MgC1q4, имеющем наибольшую идентичность, в качестве референса (рис. 9Г,Д). При этом и молекулярная масса

(19181 Да) и pI (5,2), предсказанные на основании полученной полной последовательности, совпадали с данными электрофореза (рис. 7Б, 8А). Следует отметить, что наиболее близкие C1qDC белки других 5 видов *Bivalvia* были предполагаемыми или предсказанными (рис. 9Е). Однако полученные Mr и pI исследуемого белка схожи с соответствующими значениями C1qDC белков с одной глобулярной головкой других двустворчатых моллюсков, например, выделенных из гребешков *A. farreri* (CfC1qDC) и *A. irradians* (AiC1qDC-1), которые, как и 5 упомянутых выше предполагаемых C1qDC белков, состоят только из одного C1q-домена, расположенного на С-конце, и уникального в каждом случае короткого N-концевого пептида (Zhang et al., 2008; Kong et al., 2010). Кроме того, многие выделенные и описанные сиало-специфичные лектины *Bivalvia*, впоследствии были определены как C1qDC белки с аналогичной структурой (Ghosh et al., 2017).

Функции лектинов и лектин-подобных белков определяются разнообразием их углеводных лигандов. Как отмечалось ранее в обзоре литературы (раздел 1.3.3), C1qDC белки широко представлены в геномах двустворчатых моллюсков (Gestal et al., 2010; Gerdol et al., 2011; Gerdol et al., 2015b; Takeuchi et al., 2016; Mun et al., 2017; Sun et al., 2017; Powell et al., 2018; Gerdol et al., 2019), что предположительно позволяет покрывать их защитные потребности от различных патогенов за счет потенциального структурного разнообразия связываемых лигандов, ассоциированных с ПАМП. При этом для ряда C1qDC белков *Bivalvia* показана способность связывать PNG, LPS, поли I:C, маннан, β -1,3-глюкан и глюкан дрожжей (Wang et al., 2012a; Jiang et al., 2015; Wang et al., 2015a; Xiong et al., 2021). Наши результаты также показали высокую чувствительность MkC1qDC к маннану, LPS и PGN (табл. 4). Следует заметить, что в целом данные об углеводной специфичности C1qDC белков довольно ограничены, что может быть объяснено небольшим числом выделенных на данный момент белков данной группы и смещением акцента в сторону их защитных функций и взаимодействия с ПАМП. Что касается специфичности в отношении моносахаридов, в нескольких исследованиях было показано сродство C1qDC белков *Bivalvia* только к сиаловой кислоте (Zhang et al., 2008; He et al., 2011; Li et al., 2011; Yang et al., 2012), в то время как для MkC1qDC помимо высокой специфичности к сиаловой кислоте и другим ацетилированным моносахаридам (D-глюкуроновой и D-галактурановой кислотам), также была показана ингибирующая способность D-галактозы, 2-дезоксид-галактозы, L-гулозы и дисахаридов D-лактозы и 2 α -маннобиозы. Многие лектины также могут проявлять широкий спектр углеводной специфичности, например, к различным изомерам и наиболее часто к диастереомерам (Nitta et al., 1994; Sharon, Lis, 2007), а также олигосахаридам различной структуры (Chatterjee et al., 2013; Mayer et al., 2017). Также известно, что точечные аминокислотные замены в областях ответственных на связывание с углеводами могут приводить к значительному изменению специфичности, как, например, в случае CRD манноз-специфичного лектина С-типа из сыворотки крысы, у которого замены одной аминокислоты приводили к смене аффинитета с маннозы на метил-L-фукозиды (Iobst et al.,

1994b) или галактозу (Iobst et al., 1994a), а также в случае получения “ricin-B chain-like” галактоз-связывающего белка из сиало-специфичного лектина (Yabe et al., 2007).

Максимальная же специфичность MkC1qDC, характеризующаяся IC50 на три порядка ниже, чем к ранее упомянутым компонентам ПАМП, была обнаружена в отношении полисахаридов, содержащих карбоксильные и сульфатные группы, таких как альгинат, к-каррагинан, фукоидан и пектин. С учетом их мономерного состава возможно заключить, что MkC1qDC характеризуется наиболее выраженной специфичностью к гликанам, обогащенным кислыми галактанами и маннанами. Эти полисахариды в основном являются компонентами клеточных стенок водорослей, что объясняет некоторое их структурное сходство. Помимо своей очевидной кормовой роли, микроводоросли могут быть инвазивными у двустворчатых моллюсков и инициировать некоторые процессы патогенности. В частности, ранее это было показано для *M. kurilensis* и *Coccomyxa parasitica* (Sokolnikova et al., 2016), причем для Chlorophyta, к которым относится *C. parasitica*, показано содержание альгината и пектина в клеточных стенках (Baudelet et al., 2017).

При проверке pH-зависимости MkC1qDC было выяснено, что данный лектин-подобный белок активен в достаточно широком спектре pH: от 3 до 9. Максимальную активность белок проявлял при близкой к нейтральной pH (7–8), в то время как повышение pH подавляло активность, и при значении 10 она исчезала вовсе, а слабокислая и кислая среда влияли на активность белка незначительно. Некоторые представители беспозвоночных животных имеют стабильные молекулы лектинов, которые также проявляют широкий диапазон pH-активности. Так, лектины плазмы *A. granosa* и голотурии *Holothuria scabra* имели диапазон активности pH от 5 до 10. Причем 50 % активности сохранялись у обоих белков при pH 4 и 11 (Baldo et al., 1978; Adhya et al., 2016). Лектин, выделенный из *Aplysia kurodai*, проявлял стабильность при широком диапазоне pH: от 7 до 12, причем при pH менее 5–6 лектин мгновенно терял свою активность (Kawsar et al., 2009). Лектин из гемолимфы *M. californianus* сохранял активность в диапазоне pH от 3 до 10, но максимальная активность была отмечена только при pH 7 (García-Maldonado et al., 2017). Щелочной спектр активности имел лектин из гемолимфы *M. trossulus* (pH 9–10), при этом активность лектина снижалась на 25 % при pH 6 и на 50 % при pH 4 (Chikalovets et al., 2016).

При оценке термостабильности MkC1qDC не показал изменений активности при температурах от 0 °C до 40 °C, но она незначительно снижалась при 50 °C и совершенно исчезала при 60 °C и выше. Сходный диапазон активности имел лектин *M. trossulus*, который полностью терял активность при инкубации при 60 °C в течение 30 мин (Chikalovets et al., 2016). В то же время, показано, что некоторые лектины беспозвоночных имеют более широкие спектры термостабильности: лектины из голотурии *H. scabra*, моллюсков *A. kurodai*, *M. californianus* и *A. granosa* сохраняли свою активность при различных температурах от 0 °C до 80 °C (Dam et al., 1992; Gowda et al., 2008; Kawsar et al., 2009; García-Maldonado et al., 2017).

Таким образом, в ходе изучения активности агглютининов плазмы *M. kurilensis* была выявлена ранее не отмеченная для близкого вида *M. modiolus* специфичность к уроновым кислотам, дальнейшее исследование которой в итоге привело к обнаружению нового углевод-распознающего белка, имеющего структурную гомологию с C1qDC-белками других моллюсков, уникальный набор углеводной специфичности с наибольшим аффинитетом к кислым галактанам и маннанам, а также относительно широкий диапазон устойчивости к pH и температурам до 50 °C.

4.5. Белок MkC1qDC как антибактериальный защитный фактор гемолимфы *M. kurilensis*

C1qDC белки во многих случаях являются иммунными факторами, транскрипционная активность которых увеличивается при воздействии различными микроорганизмами (Kong et al., 2010; Gestal et al., 2010; Li et al., 2011a; Gerdol et al., 2011; Xu et al., 2012b; Leite et al., 2013; Allam et al., 2014; Jiang et al., 2015; Wang et al., 2016), или их компонентами, связанными с ПАМП (Wang et al., 2012a, 2012c; Yang et al., 2012; Wang et al., 2015a). Кроме того, ранее была рассмотрена способность C1qDC белков *Bivalvia* распознавать и взаимодействовать с ПАМП (Wang et al., 2012a; Jiang et al., 2015; Wang et al., 2015a; Xiong et al., 2021), которая также характерна для MkC1qDC. Однако работ, касающихся непосредственно оценки антибактериальной активности C1qDC белков не так много.

Выделенный и очищенный белок MkC1qDC проявлял агглютинирующую активность в отношении всех используемых видов без явного преимущества в отношении грам(+) или грам(-) бактерий, но с несколько более выраженной селективностью в отношении некоторых штаммов, в частности *Pseudoalteromonas* sp. и *B. subtilis* (рис. 12). В то же время агглютинирующая активность не показала четкой корреляции с подавлением роста бактерий. Например, наибольшие различия в росте культур в присутствии MkC1qDC по сравнению с контролем были заметны для *E. coli*, тогда как агглютинирующая активность для нее была не самой выраженной. Противоположный результат был в случае *Pseudoalteromonas* sp., где конгломераты в присутствии MkC1qDC образовывали в микропробирках видимые невооружённым глазом частицы, но ингибирование роста было одним из самых слабых. В случае *Vibrio* sp. подавления роста в начале эксперимента не происходило, а различия становились достоверными только после фазы активного роста, когда культура в контрольных образцах прекращала рост и переходила в стационарную фазу, а в присутствии MkC1qDC начинала падать. Более того, агглютинация *Vibrio* sp. происходила в наименьшей степени, что указывает на возможный иной механизм действия MkC1qDC для данного штамма по сравнению с другими с вероятным отсроченным антибактериальным эффектом. Также относительно слабое влияние на *Vibrio* sp. является существенным отличием от ранее упомянутых модиолинов, проявивших выраженные

антибактериальные свойства в отношении различных штаммов *Vibrio* (Tunkijjanukij et al., 1997; Tunkijjanukij, Olafsen, 1998). Агглютинирующая активность, схожая с исследуемым MkC1qDC белком, была показана для рекомбинантных белков гребешков *A. farreri* и *A. irradians*. В частности, CfC1qDC агглютинировал *E. coli*, *Listonella anguillarum* и *Micrococcus luteus* (Kong et al., 2010), а AiC1qDC-1 агглютинировал только грибы *Pichia pastoris*, но не бактерии *M. luteus* и *L. anguillarum* (Zhang et al., 2008), тогда как AiC1qDC-2 агглютинировал все используемые виды: *P. pastoris*, *B. subtilis*, *E. coli* и *Vibrio anguillarum* (Wang et al., 2012a).

Исследований влияния белков C1qDC на рост бактерий крайне мало. В одном из исследований с C1qDC белком OXYL морской лилии *Anneissia japonica* была показана способность как агглютинировать *P. aeruginosa*, так и нарушать формирование ее биопленок (Hasan et al., 2019). В другой работе рекомбинантный C1qDC белок устрицы *C. hongkongensis* rCh-салектин был способен почти в равной степени агглютинировать и ингибировать рост бактериальных культур *Vibrio alginolyticus*, *E. coli*, *S. aureus* и *Bacillus thuringiensis* (He et al., 2011), что, однако проявляется не в уменьшении угла роста кривой оптической плотности, как у *B. subtilis*, *Ruegeria* sp. и *E. coli* в нашем случае, но в некотором её снижении в первые часы, которое сохранялось и в дальнейшем, делая кривые роста в контрольной и опытной группах практически параллельными, как и у *S. aureus* и *Pseudoalteromonas* sp. в присутствии MkC1qDC (рис. 12).

Агглютинирующая, цитотоксическая и бактериостатическая способности лектинов обнаружены и исследованы у многих двустворчатых моллюсков. Так, в работах с лектином *A. irradians*, который получил название AiCTL-9, была показана агглютинирующая активность в присутствии ионов Ca^{2+} в отношении грам(+) бактерий *B. subtilis*, *Micrococcus luteus* и грам(-) бактерий *V. anguillarum*, *E. coli*. При этом AiCTL-9 мог связывать различные ПАМП (липополисахариды, маннаны, глюканы, пептидоглюканы) и обладал цитотоксическими свойствами и способностью инициировать инкапсуляцию *in vitro* (Wang et al., 2012b).

Интересные результаты были получены при исследовании галактоз-специфичного лектина *C. grayanus* (CGL), который проявлял различные антибактериальные свойства, такие как агглютинация, опсонизация, ингибирование роста. Причем у этого гликопротеида эффективность агглютинирующей активности не коррелировала с бактериостатическими свойствами. В результате тестирования активности CGL в отношении грам(+) *B. subtilis*, *Salinibacterium amurskyense*, *S. aureus* и грам(-) *Arenibacter troitsensis*, *Chryseobacterium scophthalmum*, *E. coli* было показано, что лектин связывается со всеми тестируемыми видами бактерий через D-галактозу, расположенную на их клеточной стенке. При этом подавление роста культуры было обнаружено у всех грам(+) бактерий и *E. coli*, но агглютинирующая активность была выявлена только в отношении *B. subtilis*, *S. aureus* и *E. coli*. Результаты, полученные нами при изучении MkC1qDC, аналогичны и указывают на то, что эффективность агглютинации не

всегда означает такую же степень выраженности бактериостатических свойств, и в принципе их может и не быть (Kovalchuk et al., 2013).

В работе на *R. philippinarum* был также обнаружен лектин, как и MkC1qDC требующий для активации ионы Ca^{2+} и способный к агглютинации эритроцитов человека, но не способный к агглютинации бактерий. Однако этот лектин проявлял опсонизирующие и цитотоксические свойства по отношению к *Vibrio tubiashii* (-), *Alteromonas haloplanktis* (+) и *Marinococcus halophilus* (+) и участвовал в хемотаксисе гемоцитов и усилении их фагоцитарной активности. Этот эксперимент подтверждает, что не все лектины выражено обладают всеми тремя механизмами иммунной защиты и используют их против бактерий (Takahashi et al., 2008).

У многих представителей ракообразных также найдено большое разнообразие лектинов, имеющих агглютинирующую активность, сходную с нашим исследуемым белком. Например, лектин из гемолимфы голубого краба *Portunus pelagicus* (Pp-Lec) обладал способностью к агглютинации *S. cerevisiae* и человеческих эритроцитов. У этого белка также был обнаружен широкий спектр антибактериальной активности в отношении грам(+) (*Bacillus pumulis*, *B. thuringiensis*, *Enterococcus faecalis*) и грам(-) (*Citrobacter amalonaticus*, *V. parahemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter murlinae*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morgani*) бактерий. Очищенный лектин подавлял рост всех протестированных в работе бактерий, а также обладал цитотоксическими свойствами (Jayanthi et al., 2017).

Для рекомбинантного лектина креветки *Litopenaeus vannamei* показано сродство к липосахаридам, пептидогликану и липотейхоевым кислотам, которые по-разному представлены на клеточной стенке бактерий в зависимости от дифференцировки по Граму. При этом белок обладал агглютинирующими и бактериостатическими свойствами в отношении как грам(+) (*B. subtilis* и *S. Aureus*), так и грам(-) (*E. coli*, *V. alginolyticus* и *Aeromonas veronii*) бактерий. Также он проявил высокую цитотоксическую активность, направленную против всех представителей грам(-) бактерий, использованных в работе (Cha et al., 2015).

Интересным лектином является гликопротеид из ракообразного *Eriocheir sinensis* (EsLecD), который функционирует не только как свободная агглютинирующая и опсонизирующая молекула, но и как PPP на поверхности клеток. Присутствие ионов кальция также значительно увеличивало эффективность данного лектина (Guo et al., 2013). В экспериментах EsLecD проявлял разную степень агглютинирующей активности к грам(-) (*Aeromonas hydrophila*, *V. parahemolyticus*, *E. Coli*) и грам(+) (*Microbacterium lactium*, *B. subtilis*, *S. Aureus*) бактериям. Данный лектин также имел наименьшую степень сродства к вибрионам *V. parahemolyticus*, а наиболее крупные конгломераты бактерий были обнаружены при взаимодействии лектина с *E. coli*, *S. aureus* и *B. subtilis*. Полученные нами результаты указывают,

что вероятно MkC1qDC способен распознавать схожие углеводные детерминанты, что и EsLecD (Guo et al., 2013).

Все выше перечисленные исследования указывают на тот факт, что лектины и лектин-подобные белки обладают различным аффинитетом к разным видам бактерий в зависимости от паттернов, которые они могут распознавать на поверхности клеточных стенок. Некоторые лектины обладают антибактериальными свойствами, которые могут зависеть от дифференцировки бактерий по Граму, или, как в случае исследуемого нами белка MkC1qDC, не проявляют такой зависимости. Также во многих экспериментах показана различная степень активности и/или проявления той или иной функции лектина в отношении различных видов бактерий. Корреляция между эффективностью агглютинирующих свойств исследуемого нами белка *M. kurilensis* и его бактериостатической активностью была выражена слабо.

4.6. Гемоциты как источник белка MkC1qDC в гемальной системе и интерстициальном компартменте *M. kurilensis*

Исследуемый белок MkC1qDC был обнаружен во всех органах моллюска, однако единственными структурами с внутриклеточной локализацией были гемоциты (рис. 14), которые повсеместно распространены в элементах гемальной системы или иногда мигрируют в эпителии мантии и кишечника. Причем дополнительный анализ с их фракционированием показал присутствие главным образом в гранулоцитах (рис. 28), что говорит об основном месте синтеза плазменного MkC1qDC именно там, с последующей дегрануляцией в гемолимфу и вероятным распространением с ней по всему организму.

Лектины и лектин-подобные белки могут встречаться в организме в двух состояниях – на клеточной мембране в роли рецепторов и в плазме в виде растворенных факторов. Определение места локализации и синтеза белков – это, как правило, достаточно трудоемкий процесс. У многих групп беспозвоночных, в том числе упомянутых ранее, места синтеза углеводов-распознающих белков так и не были обнаружены. Однако, из имеющихся данных известно, что некоторые типы лектинов секретируются циркулирующими гемоцитами. Так, была показана локализация лектинов из гемолимфы моллюсков *M. modiolus*, *R. philippinarum*, *A. farreri* в гемоцитах и в растворенном виде в плазме (Tunkijjanukij, Olafsen, 1998; Kim et al., 2006; Wang et al., 2007). Также у этих моллюсков при заражении бактериями было выявлено закономерное увеличение концентрации лектинов в жабрах, гонадах и мантии. Лектин из гемолимфы мидии *M. trossulus*, детектированный методом ИФА, присутствовал в мантии, гонадах, гемоцитах, жабрах, мышцах и ПВЖ (García-Maldonado et al., 2017).

В настоящее время известно, что C1qDC белки у двустворчатых моллюсков могут экспрессироваться во всех органах. Более того, в ряде случаев можно выявить участки, в которых

экспрессия значительно выше по сравнению с другими клетками и органами, например, в гепатопанкреасе (Kong et al., 2010; Wang et al., 2012a; Yang et al., 2012; Wang et al., 2015a), гемоцитах (Gestal et al., 2010; Liu et al., 2014; Jiang et al., 2015), мантии (Li et al., 2011; Jiang et al., 2015) и жабрах (Yang et al., 2015). Для ряда других C1qDC белков различия в экспрессии между органами также существуют, но не столь значительны (Zhang et al., 2008; Gerdol et al., 2011; Zhang et al., 2011; Xu et al., 2012; Xiong et al., 2021). Важно отметить, что во всех приведенных выше случаях транскрипция в гемоцитах отмечалась с разной степенью активности, но неизменно возрастала в них при иммунной стимуляции. Этот факт указывает на явно индуцируемый характер синтеза C1qDC белков в гемолимфе и их участие в иммунном ответе.

Однако используемые во всех вышеперечисленных случаях методы не определяли ни тип синтезирующих клеток, ни их точное местонахождение. Подходами, которые позволяют это сделать, являются *in situ* гибридизация и иммуногистохимия, которые, однако, крайне редко использовались в отношении C1qDC белков. Например, они были обнаружены в эпителиальных структурах, участвующих в формировании раковин, в частности, PmC1qDC-1 *Pinctada fucata martensii* в мантийном эпителии (Xiong et al., 2021), а KEYSTONE из *M. californianus* во внешних слоях мантии и ноги, а также в периостракуме и раковине живых особей (Zimmer et al., 2017). В случае CfC1qDC, участвующего в иммунном ответе у *A. farreri*, белок обнаружен в гепатопанкреасе, почках, гонадах и жабрах, что авторы связывают с особой ролью этих органов в синтезе защитных белков или высокой площадью их контакта с окружающей средой, богатой патогенами (Wang et al., 2012c). Другой ранее упомянутый белок OXYL из *A. japonica* был ассоциирован с компонентами целома (Hasan et al., 2019).

В органах *M. kurilensis* белок MkC1qDC был ассоциирован главным образом с внеклеточными структурами, преимущественно со стенками гемальной системы и интерстициального пространства, а также с волокнами ВКМ, локализацию которых дополнительно выявляли при окрашивании на коллаген (рис. 25–27). Органы с наибольшей экспрессией (жабры, край мантии, перикард) имеют наибольшую подверженность воздействию патогенов. В целом, можно предположить, что основными клетками, синтезирующими MkC1qDC, являются гемоциты, и благодаря хорошей растворимости он циркулирует по организму и в дальнейшем может фиксироваться на компонентах внеклеточного матрикса, выполняя иммунные или другие возможные дополнительные функции.

Таким образом, выявленный MkC1qDC как гуморальный фактор иммунитета, способный агглютинировать и подавлять рост грам(+) и грам(–) бактерий, наиболее вероятно исходно синтезируется в гранулярных гемоцитах, а в тканях различных органов представлен главным образом в структурах, связанных с гемальной системой (гемоциты, стенки синусов и каналов) и интерстициальным компартментом.

4.7. Биомедицинский потенциал углеводов-связывающего белка M₆C1qDC

Ключевым параметром углеводов-распознающих белков, определяющим возможности их применения в конкретной области биомедицины, являются особенности углеводной специфичности данных белков. Важным результатом настоящей работы является оценка влияния полученного белка M₆C1qDC на клетки эукариот, в частности, опухолевые линии клеток человека. Одним из признаков злокачественности является аномальное гликозилирование клеточных поверхностей, причем как с образованием новых гликформ, так и с неполным синтезом гликанов. При этом измененные паттерны гликозилирования можно рассматривать в качестве специфических биомаркеров злокачественных новообразований (Pinho, Reis, 2015). Также растущее количество данных показывает, что изменения в гликозилировании влияют на потенциал злокачественности, иммунный надзор за опухолью и прогноз, что может быть использовано для разработки новых инструментов для диагностики и терапии опухолей (Zheng et al., 2019).

Изменения N-связанных гликопротеинов в основном включают образование разветвленных олигосахаридов. Например, характерное для ряда опухолей повышенное количество N-ацетилглюкозаминилтрансферазы V (MGAT5) индуцирует разветвление β 1-6GlcNAc гликопротеинов, что способствует злокачественности (Dennis et al., 1986; Dennis, Laferte, 1987). Кроме того, повышенное разветвление β 1-6GlcNAc N-связанных олигосахаридов способствует сиалированию (присоединению сиаловых кислот в терминальном положении), которое участвует в метастазировании (Pousset et al., 1997). Такие O-связанные антигены, как T, Tn и sTn (соединенные через остатки серина или треонина -GalNAc-Gal, -Gal и -Gal-Sia соответственно), экспрессируются в случаях раковых опухолей молочной железы, легких, толстой кишки, шейки матки и мочевого пузыря, но отсутствуют в нормальных тканях (Fu et al., 2016). Кроме того, появление модифицированных O-гликанов может быть индикатором неблагоприятного прогноза для ряда опухолей (Накомори, 2002; Kobata, Amano, 2005). Также частым при малигнизации является изменение терминальных сахаров, что связано со сверхэкспрессией катализирующих их присоединение ферментов (Kobata, Amano, 2005). К подобным примерам относятся антигены сиалил-Tn, сиалил-Льюиса X (sialyl-Lewis X, sLeX), Льюиса Y (Lewis Y, LeY), Томас-Фридриха (Thomas-Friedrich, TF), полисиаловая кислота (polysialic acid, PSA) и Globo H (Накомори, 2002). Также для многих типов рака характерна гиперэкспрессия антигенов сиалил-Льюиса A или X, которая связана с потерей антигенов крови АВН и плохим прогнозом (Le Pendu et al., 2001). Другими примерами гликоконъюгатов, для которых характерно повышенное содержание при злокачественных изменениях, являются ганглиозиды и муцины. Так повышенное количество ганглиозидов выявлено при опухолях

головы и шеи, нейробластоме, меланоме, медуллобластоме, раке легкого и раке молочной железы (Zheng et al., 2019).

Исследуемый нами белок MкC1qDC показал высокую специфичность к сиаловой кислоте (наибольшую среди всех использованных нами в ИРГА моносахаридов), а также значительную специфичность к муцину – сложному гетерополимеру с сиаловой кислотой в составе. Как отмечалось ранее, важность сиалирования клеточной поверхности при онкогенезе и метастазировании известна уже давно (Dennis et al., 1986; Dennis, Laferte, 1987). Более того, ряд сиало-специфичных белков уже был исследован на предмет противоопухолевых свойств и перспективности использования в данном направлении. Одним из наиболее известных и изученных подобных белков является сиало-специфичный лектин из яиц лягушки *Rana catesbeiana*, обладающий одновременно углевод-связывающими и эндонуклеазными свойствами (Nitta et al., 1987; Nitta et al., 1994; Tatsuta et al., 2014). Другим структурно и филогенетически более близким примером является сиало-специфичный лектин HddSBL моллюска *H. discus discus*, который позже был определен как представитель семейства C1qDC белков (Ghosh et al., 2017) и для которого также были показаны выраженные противоопухолевые свойства (Yang et al., 2014; Wu et al., 2017; Li et al., 2018). Наиболее чувствительными к воздействию HddSBL оказались, как и в случае MкC1qDC, опухоли эпителиального происхождения, которыми в порядке убывания чувствительности были линии: гепатоцеллюлярной карциномы Hep3B, рака легкого A549, немелкоклеточного рака легких H1299 и колоректальной аденокарциномы SW480 (Yang et al., 2014).

Другим крайне интересным лектином с высокой специфичностью к муцину является халилектин-3 (halilectin-3, H3) из морской губки *Haliclona caerulea*, который проявлял токсичность в отношении клеток аденокарциномы груди MCF-7 с $IC_{50} = 100$ мкг/мл, что довольно схоже с нашими значениями для MкC1qDC. При этом H3 запускает клеточную гибель тремя различными вариантами: внешними и внутренними путями апоптоза, аутофагией и аноиксисом. Механизм последнего, объясняется тем, что H3 снижает экспрессию интегрина $\alpha\beta 1$ и взаимодействует с интегрином $\alpha 5\beta 1$, рецептором фибронектина, тем самым нарушая адгезию MCF-7 и способствуя гибели клеток (Nascimento-Neto et al., 2018). Другой лектин из губки того же рода *Haliclona cratera* HCL проявил крайне высокую токсичность в отношении клеток аденокарциномы HeLa ($IC_{50} = 9$ мкг/мл) и меланомы FemX ($IC_{50} = 11$ мкг/мл). При этом HCL, как и MкC1qDC, проявлял специфичность к галактозе и лактозе (Pajic et al., 2002). Лактоз-специфичный лектин из губки *Cinachyrella apion* Cal проявлял высокую цитотоксичность в отношении линий аденокарцином шейки матки HeLa и предстательной железы PC-3. При этом на клетках HeLa он способствует типичным изменениям фенотипа раннего апоптоза и модулирует некоторые проапоптотические белки внутреннего сигнального пути. Однако

ингибирование активации каспаз не приводило к значительному снижению цитотоксичности Cal, что говорит о другом отличном от апоптоза возможном механизме клеточной гибели, который он вызывает (Rabelo et al., 2012). В нашем случае спустя 48 ч инкубирования с MkC1qDC большинство клеток опухолевых линий HeLa CCL-2, MDA-MB-231 и U87 MG были окрашены йодистым пропидием (рис. 31), что говорит о явно преобладающем некротическом характере гибели. Лишь в случае клеток глиобластомы U87 MG, имеющей наибольшее значение $IC_{50} = 150$ мкг/мл, было выявлено небольшое, но статистически значимое ($p < 0,05$) повышение уровня апоптотических клеток. Вероятно, что механизмы воздействия на использованные линии аденокарцином и глиобластомы могут несколько отличаться. При этом иммортализованные клетки пигментного эпителия сетчатки человека hTERT RPE-1, взятые нами в качестве контроля, влияния на не опухолевые клетки, не показали значимых изменений после воздействия MkC1qDC, что говорит о потенциальной безопасности исследуемого белка в отношении нормальных клеток человека эпителиального происхождения, повышая его биомедицинский потенциал.

В большинстве работ, в которых использовали углевод-распознающие белки, главным образом лектины, в качестве агентов, маркирующих клетки опухолевых линий, показана относительно равномерная окраска ими цитоплазмы в различных участках или клеточной поверхности. Среди примеров использованных таким образом белков можно назвать агглютинин I из *Maackia amurensis* (MAL-I), агглютинин из *Sambucus nigra* (SNA), агглютинин из *Triticum vulgare* (WGA), лектин из *Ulex europaeus* (E-lectin), лектин I из *Griffonia simplicifolia* (GS-I), агглютинин из *Vicia villosa* (VVA) и фруталин (frutalin) из плодов *Artocarpus altilis* (Korourian et al., 2008; Oliveira et al., 2011; Badr et al., 2013; Elster et al., 2013; Chowdhury et al., 2017). В нашем случае MkC1qDC формировал гранулярные структуры различного размера главным образом на поверхности клеток (рис. 32–34). Такая характерная окраска гранулами, которые иногда формирующие конгломераты, была отмечена в случае живых клеток MDA-MB-231 и U87 MG, а также фиксированных клеток Neuro-2a CCL-131, RKO CRL-2577 и HCT 116. Самые крупные конгломераты MkC1qDC-FITC формировались в случае наиболее чувствительной к воздействию исследуемого белка линии HeLa CCL-2. Причем при окраске живых клеток HeLa CCL-2 как на их поверхности, так и на участках в непосредственной близости к ним, а на фиксированных – только на поверхности клеток. На препаратах неопухолевой линии hTERT RPE-1 также выявлялись гранулы, которые, однако, не были таргетно сопряжены с клетками и их поверхностью, а были равномерно распределены по всей поверхности дна лунок. Прилежащие к клеткам HeLa CCL-2 окрашенные участки, а также окрашенные гранулы на препаратах hTERT RPE-1, предположительно, могут являться сформированными ими компонентами гликокаликса и/или внеклеточного матрикса, обогащенного целевыми для

MkC1qDC углеводами. В пользу этого говорит высокая специфичность окраски только к клеточной поверхности в случае фиксированных препаратов, которые перед обработкой фиксатором подвергались предварительной отмывкой от компонентов культуральной среды буферным раствором.

Таким образом, исследуемый углевод-распознающий белок MkC1qDC связывается с клеточными поверхностями эпителиальных опухолей и опухолей мозга. При этом он проявляет цитотоксические свойства в отношении линий аденокарцином и глиобластомы с преобладающим некротическим механизмом их гибели, не влияя при этом на неопухолевую линию. Данные свойства характеризуют MkC1qDC как перспективный инструмент онкодиагностики для маркирования неопластических образований и возможный инструмент таргетной доставки противоопухолевых препаратов, что в совокупности с описанными ранее противомикробными свойствами и уникальным спектром углеводной специфичности, говорит о его высоком биомедицинском потенциале.

ВЫВОДЫ

1. Агглютинирующая активность, а также общая концентрация белков, литическая активность и содержание фракций полипептидов P124, P55, P78 плазмы гемолимфы двустворчатого моллюска *M. kurilensis* имеют метастабильный характер динамики в течение года и зависят от физиологического состояния моллюсков при хроническом антропогенном стрессе и остром иммунном ответе.

2. Анализ агглютинирующей активности плазмы гемолимфы *M. kurilensis* показал наличие нового углевод-распознающего белка MkC1qDC с максимальной специфичностью в отношении кислых галактанов и маннанов, менее выраженной специфичностью к углеводам патоген-ассоциированных молекулярных паттернов и муцину, а также моно- и дисахаридам с убыванием в следующем ряду: сиаловая кислота → (L-гулоза, D-галактуроновая и D-глюкуроновая кислоты) → (D-лактоза, 2-деокси-D-галактоза) → (D-галактоза, 2α-маннобиоза).

3. Установлена первичная структура белка MkC1qDC и его гомология с C1q-домен-содержащими белками других *Bivalvia*.

4. Защитная роль MkC1qDC проявляется в агглютинации и подавлении роста грам(+) и грам(-) бактерий с убыванием степени воздействия в ряду: *Pseudoalteromonas* sp. → *Bacillus subtilis* → *Reugeteria* sp. → *Staphylococcus aureus* → *Escherichia coli* → *Vibrio* sp.

5. Показано, что синтез и накопление MkC1qDC происходит в гранулярных гемоцитах *M. kurilensis*, в то время как во внутренних органах он ассоциирован с внеклеточными структурами гемальной системы и интерстициального компартмента.

6. Белок MkC1qDC способен распознавать клетки аденокарцином (HeLa CCL-2, MDA-MB-231) и глиобластомы (U87 MG), проявляет в отношении них цитотоксические свойства с преобладающим некротическим механизмом гибели, не влияя при этом на неопухолевые эпителиальные клетки линии hTERT RPE-1. Полученные данные свидетельствуют о биомедицинском потенциале применения MkC1qDC для разработки систем онкодиагностики и таргетной доставки противоопухолевых препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алехина Г.П., Логинова Е.Г., Мисетов И.А. Иммунологическая реакция пресноводных двустворчатых моллюсков на неблагоприятное воздействие среды // Вестник ОГУ. 2010. Т. 112, № 6. С. 52–54.
2. Анисимова А.А. Морфофункциональные параметры гемоцитов в оценке физиологического состояния двустворчатых моллюсков // Биология моря. 2013. Т. 39, № 6. С. 389–399.
3. Бойченко Т.В., Христофорова Н.К., Бузолёва Л.С. Микробная индикация прибрежных вод северной части Амурского залива // Известия ТИНРО. 2009. Т. 158. С. 324–332.
4. Ващенко М.А., Альмяшова Т.Н., Михайлович Ж.П. Многолетняя и сезонная динамика состояния гонад морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, обитающего в условиях антропогенного загрязнения (Амурский залив Японского моря) // Вестник ДВО РАН. 2005. № 1. С. 32–42.
5. Ващенко М.А., Жадан П.М., Альмяшова Т.Н., Ковалёва А.Л., Слинко Е.Н. Оценка уровня загрязнения донных осадков Амурского залива (Японское море) и их потенциальной токсичности // Биология моря. 2010. Т. 36, № 5. С. 354–361.
6. Галактионов В.Г. Эволюционная иммунология. М.: Академкнига, 2005. 408 с.
7. Гринченко А.В., Кудрявцев И.В., Кумейко В.В., Шилов А.С., Полевщиков А.В. Опыт применения проточной цитометрии в оценке защитных реакций двустворчатого моллюска *Modiolus modiolus* (Linnaeus, 1758) // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8, № 4. С. 993–1001.
8. Жадан П.М., Ващенко М.А., Альмяшева Т.Н., Слинко Е.Н. Оценка экологической ситуации в прибрежной зоне залива Петра Великого в 1999–2001 гг. по биологическим и биогеохимическим показателям // Вестник ДВО РАН. 2003. № 2. С. 56–65.
9. Житенева Л.Д., Макаров Э.В., Рудницкая О.А. Эволюция крови. АЗНИИРХ. Ростов-на-Дону, 2001. 104 с.
10. Заварзин А.А. Сравнительная гистология. Санкт-Петербург: Издательство Санкт-Петербургского государственного университета, 2000. 517 с.
11. Игнатов В.В. Углеводузнающие белки – лектины // Соросовский образовательный журнал. 1997. Т. 2. С. 14–20.
12. Колотухина Н.К., Семенихина О.Я. Динамика численности личинок мидии *Mytilus trossulus* и модиолуса *Modiolus kurilensis* в планктоне бухты Троицы (залив Посъета) и залива Восток Японского моря // Биология моря. 1998. Т. 24, № 2. С. 129–131.
13. Кэтти Д., Райкундалия Ч., Браун Д. Антитела. Методы. М.: Мир, 1991. Т. 1. 250 с.

14. Лучин В.А., Тихомирова Е.А., Круц А.А. Океанографический режим вод залива Петра Великого (Японское море) // Известия ТИНРО. 2005. Т. 140. С. 130–169.
15. Маркина Ж.В. Использование микроводоросли *Plagioselmis prolunga* для оценки качества воды Амурского залива и залива Находка (Японское море) // Биология моря. 2008. Т. 34, № 1. С. 35–41.
16. Олейник Е.В., Мощенко А.В., Лишавская Т.С. Влияние загрязнения донных отложений на видовой состав и обилие двустворчатых моллюсков в заливе Петра Великого Японского моря // Биология моря. 2004. Т. 30, № 1. С. 39–45.
17. Подгурская О.В., Кавун В.Я. Оценка адаптационно-защитного потенциала двустворчатых моллюсков *Modiolus modiolus* (Linnaeus, 1758) и *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) в условиях повышенного содержания тяжелых металлов в среде // Биология моря. 2012. Т. 38, № 2. С. 174–182.
18. Полевщиков А.В. Лектины в защитных реакциях беспозвоночных // Журнал общей биологии. 1996. Т. 57, № 6. С. 718–739.
19. Радовец А.В., Христофорова Н.К. Динамика численности личинок промысловых видов двустворчатых моллюсков в планктоне бухты Миносок (зал. Посьета) и зал. Восток (Японское море) // Известия ТИНРО. 2008. Т. 153. С. 201–214.
20. Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника. М.: Сов. наука, 1957. 467 с.
21. Сокольникова Ю.Н. Анализ клеточных защитных реакций в диагностике здоровья двустворчатых моллюсков *Modiolus kurilensis*: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология. Владивосток, 2020. 194 с.
22. Adhya M., Singha B. Gal/GalNAc specific multiple lectins in marine bivalve *Anadara granosa* // Fish Shellfish Immunol. 2016. Vol. 50. P. 242–246.
23. Allam B., Paillard C., Auffret M. Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis* // J. Invertebr. Pathol. 2000. Vol. 76, № 1. P. 63–69.
24. Allam B., Paillard C., Ford S.E. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams // Dis. Aquat. Org. 2002. Vol. 48, № 3. P. 221–231.
25. Allam B., Pales Espinosa E. Bivalve immunity and response to infections: Are we looking at the right place? // Fish Shellfish Immunol. 2016. Vol. 53. P. 4–12.
26. Allam B., Pales Espinosa E., Tanguy A., Jeffroy F., Le Bris C., Paillard C. Transcriptional changes in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in response to Brown Ring Disease // Fish Shellfish Immunol. 2014. Vol. 41, № 1. P. 2–11.

27. Allam B., Raftos D. Immune responses to infectious diseases in bivalves // *J. Invertebr. Pathol.* 2015. Vol. 131. P. 121–136.
28. Anju A., Jeswin J., Thomas P.C., Vijayan K.K. Molecular cloning, characterization and expression analysis of F-type lectin from pearl oyster *Pinctada fucata* // *Fish Shellfish Immunol.* 2013. Vol. 35, № 1. P. 170–174.
29. Arivalagan J., Marie B., Sleight V.A., Clark M.S., Berland S., Marie A. Shell matrix proteins of the clam, *Mya truncata*: Roles beyond shell formation through proteomic study // *Mar Genomics.* 2016. Vol. 27. P. 69–74.
30. Armstrong P.B., Swarnakar S., Srimal S., Misquith S., Hahn E.A., Aimes R.T. et al. A cytolytic function for a sialic acid-binding lectin that is a member of the pentraxin family of proteins // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271, № 25. P. 14717–14721.
31. Asokan R., Arumugam M., Mullainadhan P. Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus // *Dev. Comp. Immunol.* 1997. Vol. 21, № 1. P. 1–12.
32. Bachali S., Jager M., Hassanin A., Schoentgen F., Jollès P., Fiala-Medioni A. et al. Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function // *J. Mol. Evol.* 2002. Vol. 54, № 5. P. 652–664.
33. Badr H.A., El Sayed A.I., Ahmed H., Dwek M.V., Li C., Djansugurova L.B. Preferential Lectin Binding of Cancer Cells upon Sialic Acid Treatment Under Nutrient Deprivation // *Appl Biochem Biotechnol.* 2013. Vol. 171, № 4. P. 963–974.
34. Bai Z., Zhao L., Chen X., Li Q., Li J. A galectin from *Hyriopsis cumingii* involved in the innate immune response against to pathogenic microorganism and its expression profiling during pearl sac formation // *Fish Shellfish Immunol.* 2016. Vol. 56. P. 127–135.
35. Baldo B.A., Sawyer W.H., Stick R.V., Uhlenbruck G. Purification and characterization of a galactan-reactive agglutinin from the clam *Tridacna maxima* (Röding) and a study of its combining site // *Biochem. J.* 1978. Vol. 175, № 2. P. 467–477.
36. Balseiro P., Falcó A., Romero A., Dios S., Martínez-López A., Figueras A. et al. *Mytilus galloprovincialis* myticin C: a chemotactic molecule with antiviral activity and immunoregulatory properties // *PLoS ONE.* 2011. Vol. 6, № 8. P. e23140.
37. Bao Y., Shen H., Zhou H., Dong Y., Lin Z. A tandem-repeat galectin from blood clam *Tegillarca granosa* and its induced mRNA expression response against bacterial challenge // *Genes & Genomics.* Springer, 2013. Vol. 35, № 6. P. 733–740.
38. Baudalet P.-H., Ricochon G., Linder M., Muniglia L. A new insight into cell walls of Chlorophyta // *Algal Research.* 2017. Vol. 25. P. 333–371.

39. Ben-Horin T., Allen Jr S.K., Small J.M., Proestou D.A. Genetic variation in anti-parasite behavior in oysters // *Marine Ecology Progress Series*. 2018. Vol. 594. P. 107–117.
40. Bettencourt R., Dando P., Collins P., Costa V., Allam B., Serrão Santos R. Innate immunity in the deep sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* // *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2009. Vol. 152, № 2. P. 278–289.
41. Bianchet M.A., Odom E.W., Vasta G.R., Amzel L.M. A novel fucose recognition fold involved in innate immunity // *Nat. Struct. Biol.* 2002. Vol. 9, № 8. P. 628–634.
42. Bianchet M.A., Odom E.W., Vasta G.R., Amzel L.M. Structure and specificity of a binary tandem domain F-lectin from striped bass (*Morone saxatilis*) // *J. Mol. Biol.* 2010. Vol. 401, № 2. P. 239–252.
43. Bishnoi R., Khatri I., Subramanian S., Ramya T.N.C. Prevalence of the F-type lectin domain // *Glycobiology*. 2015. Vol. 25, № 8. P. 888–901.
44. Bojarová P., Křen V. Sugared biomaterial binding lectins: achievements and perspectives // *Biomater Sci*. 2016. Vol. 4, № 8. P. 1142–1160.
45. Bouchard B., Gagné F., Fortier M., Fournier M. An in-situ study of the impacts of urban wastewater on the immune and reproductive systems of the freshwater mussel *Elliptio complanata* // *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2009. Vol. 150, № 2. P. 132–140.
46. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. 1976. Vol. 72, № 1. P. 248–254.
47. Breitenbach Barroso Coelho L.C., Marcelino Dos Santos Silva P., Felix de Oliveira W., de Moura M.C., Viana Pontual E., Soares Gomes F. et al. Lectins as antimicrobial agents // *J. Appl. Microbiol.* 2018. Vol. 125, № 5. P. 1238–1252.
48. Brown R., Almodovar L.R., Bhatia H.M., Boyd W.C. Blood group specific agglutinins in invertebrates // *J. Immunol.* 1968. Vol. 100, № 1. P. 214–216.
49. Bulgakov A.A., Eliseikina M.G., Petrova I.Y., Nazarenko E.L., Kovalchuk S.N., Kozhemyako V.B. et al. Molecular and biological characterization of a mannan-binding lectin from the holothurian *Apostichopus japonicus* // *Glycobiology*. 2007. Vol. 17, № 12. P. 1284–1298.
50. Burgos-Aceves M.A., Faggio C. An approach to the study of the immunity functions of bivalve haemocytes: Physiology and molecular aspects // *Fish Shellfish Immunol.* 2017. Vol. 67. P. 513–517.
51. Butt D., Raftos D. Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections // *Dev. Comp. Immunol.* 2008. Vol. 32, № 3. P. 299–306.

52. Callewaert L., Michiels C.W. Lysozymes in the animal kingdom // *J. Biosci.* 2010. Vol. 35, № 1. P. 127–160.
53. Canesi L., Ciacci C., Fabbri R., Marcomini A., Pojana G., Gallo G. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity // *Mar. Environ. Res.* 2012. Vol. 76. P. 16–21.
54. Carballal M.J., Villalba A., Lopez C. Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development, and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis* // *J. Invertebr. Pathol.* 1998. Vol. 72, № 3. P. 304–312.
55. Carvalho E.V.M.M., Oliveira W.F., Coelho L.C.B.B., Correia M.T.S. Lectins as mitosis stimulating factors: Briefly reviewed // *Life Sci.* 2018. Vol. 207. P. 152–157.
56. Catanzaro E., Calcabrini C., Bishayee A., Fimognari C. Antitumor Potential of Marine and Freshwater Lectins // *Mar Drugs.* 2019. Vol. 18, № 1.
57. Cha G.-H., Liu Y., Peng T., Huang M.-Z., Xie C.-Y., Xiao Y.-C. et al. Molecular cloning, expression of a galectin gene in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and the antibacterial activity of its recombinant protein // *Mol. Immunol.* 2015. Vol. 67, № 2 Pt B. P. 325–340.
58. 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* // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271, № 36. P. 21808–21813.
59. Chatterjee B.P., Adhya M. Lectins with Varying Specificity and Biological Activity from Marine Bivalves // *Marine Proteins and Peptides.* John Wiley & Sons, Ltd, 2013. P. 41–68.
60. Chellaram C., Gnanambal K., Edward J.K. Antibacterial activity of the winged oyster *Pteria chinensis* (Pterioidea: Pteridae). CSIR, 2004.
61. Chen G., Zhang C., Wang Y., Guo C., Sang F., Wang C. Identification and characterization of a ferritin gene involved in the immune defense response of scallop *Chlamys farreri* // *Fish Shellfish Immunol.* 2016. Vol. 55. P. 1–9.
62. Chen G., Zhang C., Wang Y., Wang Y., Guo C., Wang C. Molecular characterization and immune response expression of the QM gene from the scallop *Chlamys farreri* // *Fish Shellfish Immunol.* 2015. Vol. 45, № 2. P. 543–550.
63. Chen J., Xiao S., Yu Z. F-type lectin involved in defense against bacterial infection in the pearl oyster (*Pinctada martensii*) // *Fish Shellfish Immunol.* 2011. Vol. 30, № 2. P. 750–754.
64. Chen M., Yang H., Delaporte M., Zhao S. Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge // *Aquaculture.* 2007. Vol. 271, № 1. P. 479–487.
65. Chen Y., Li C., Zhu J., Xie W., Hu X., Song L. Purification and characterization of an antibacterial and anti-inflammatory polypeptide from *Arca subcrenata* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2017. Vol. 96. P. 177–184.

66. Chernikov O., Kuzmich A., Chikalovets I., Molchanova V., Hua K.-F. Lectin CGL from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* induces Burkitt's lymphoma cells death via interaction with surface glycan // Int. J. Biol. Macromol. 2017a. Vol. 104, № Pt A. P. 508–514.
67. Chernikov O.V., Wong W.-T., Li L.-H., Chikalovets I.V., Molchanova V.I., Wu S.-H. et al. A GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* modulates immune response in macrophages and in mice // Sci Rep. 2017b. Vol. 7, № 1. P. 6315.
68. Chikalovets I.V., Kovalchuk S.N., Litovchenko A.P., Molchanova V.I., Pivkin M.V., Chernikov O.V. A new Gal/GalNAc-specific lectin from the mussel *Mytilus trossulus*: Structure, tissue specificity, antimicrobial and antifungal activity // Fish Shellfish Immunol. 2016. Vol. 50. P. 27–33.
69. Chou C.-L., Paon L.A., Moffatt J.D., Zwicker B. Bioaccumulation and interrelationship of manganese and zinc in horse mussel *Modiolus modiolus* from Eastern Canada // Fisheries science. The Japanese Society of Fisheries Science, 2003. Vol. 69, № 2. P. 369–378.
70. Chowdhury S.R., Ray U., Chatterjee B.P., Roy S.S. Targeted apoptosis in ovarian cancer cells through mitochondrial dysfunction in response to *Sambucus nigra* agglutinin: 5 // Cell Death Dis. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 8, № 5. P. e2762–e2762.
71. Christensen B.M., Li J., Chen C.-C., Nappi A.J. Melanization immune responses in mosquito vectors // Trends Parasitol. 2005. Vol. 21, № 4. P. 192–199.
72. Chu F.-L.E., La Peyre J.F. Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oysters (*Crassostrea virginica*) // Journal of Invertebrate Pathology. 1989. Vol. 54, № 2. P. 224–232.
73. Ciacci C., Fabbri R., Betti M., Roch P., Canesi L. Seasonal changes in functional parameters of the hemolymph of *Mytilus galloprovincialis* // Invertebrate Survival Journal. 2009. Vol. 6, № 1. P. 44–48.
74. Coles J.A., Farley S.R., Pipe R.K. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium // Diseases of Aquatic Organisms. 1995. Vol. 22, № 1. P. 59–65.
75. Company R., Antúnez O., Cosson R.P., Serafim A., Shillito B., Cajaraville M. et al. Protein expression profiles in *Bathymodiolus azoricus* exposed to cadmium // Ecotoxicol Environ Saf. 2019. Vol. 171. P. 621–630.
76. Company R., Serafim A., Bebianno M.J., Cosson R., Shillito B., Fiala-Médioni A. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* // Mar Environ Res. 2004. Vol. 58, № 2–5. P. 377–381.
77. Company R., Serafim A., Bebianno M.J., Cosson R., Shillito B., Fiala-Médioni A. Sub-lethal

- effects of cadmium on the antioxidant defence system of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* // *Ecotoxicol Environ Saf.* 2010. Vol. 73, № 5. P. 788–795.
78. Criscitiello M.F., de Figueiredo P. Fifty shades of immune defense // *PLoS Pathog.* 2013. Vol. 9, № 2. P. e1003110.
79. Dai W., Wu D., Zhang M., Wen C., Xie Y., Hu B. et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel i-type lysozyme in the freshwater mussel *Cristaria plicata* // *Microbiol. Immunol.* 2015. Vol. 59, № 12. P. 744–755.
80. Dam T.K., Sarkar M., Ghosal J., Choudhury A. A novel galactosyl-binding lectin from the plasma of the blood clam, *Anadara granosa* (L) and a study of its combining site // *Mol. Cell. Biochem.* 1992. Vol. 117, № 1. P. 1–9.
81. Dennis J.W., Laferte S. Tumor cell surface carbohydrate and the metastatic phenotype // *Cancer Metast Rev.* 1987. Vol. 5, № 3. P. 185–204.
82. Dennis J.W., Laferté S., Waghorne C., Breitman M.L., Kerbel R.S. β 1-6 Branching of Asn-Linked Oligosaccharides Is Directly Associated with Metastasis // *Science. American Association for the Advancement of Science*, 1986. Vol. 236, № 4801. P. 582–585.
83. Detree C., Chabenat A., Lallier F.H., Satoh N., Shoguchi E., Tanguy A. et al. Multiple I-Type Lysozymes in the Hydrothermal Vent Mussel *Bathymodiolus azoricus* and Their Role in Symbiotic Plasticity // *PLoS ONE.* 2016. Vol. 11, № 2. P. e0148988.
84. Détrée C., Lallier F.H., Tanguy A., Mary J. Identification and gene expression of multiple peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) in the deep-sea mussel *Bathymodiolus azoricus*, involvement in symbiosis? // *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2017. Vol. 207. P. 1–8.
85. Devi R.V., Basil-Rose M.R. Lectins as Ligands for Directing Nanostructured Systems // *Curr Drug Deliv.* 2018. Vol. 15, № 4. P. 448–452.
86. Dheilly N.M., Duval D., Mouahid G., Emans R., Allienne J.-F., Galinier R. et al. A family of variable immunoglobulin and lectin domain containing molecules in the snail *Biomphalaria glabrata* // *Dev. Comp. Immunol.* 2015. Vol. 48, № 1. P. 234–243.
87. Ding J., Wang R., Yang F., Zhao L., Qin Y., Zhang G. et al. Identification and characterization of a novel phage-type like lysozyme from Manila clam, *Ruditapes philippinarum* // *Dev. Comp. Immunol.* 2014. Vol. 47, № 1. P. 81–89.
88. Domeneghetti S., Franzoi M., Damiano N., Norante R., El Halfawy N.M., Mammi S. et al. Structural and Antimicrobial Features of Peptides Related to Myticin C, a Special Defense Molecule from the Mediterranean Mussel *Mytilus galloprovincialis* // *J. Agric. Food Chem.* 2015. Vol. 63, № 42. P. 9251–9259.

89. Dos Santos M.B., Monteiro Neto I.E., de Souza Melo S.R.C., Amado E.M. Hemolymph and gill carbonic anhydrase are more sensitive to aquatic contamination than mantle carbonic anhydrase in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* // *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2017. Vol. 201. P. 19–25.
90. Elster J.D., McGuire T.F., Lu J., Prochownik E.V. Rapid in Vitro Derivation of Endothelium Directly From Human Cancer Cells // *PLOS ONE. Public Library of Science*, 2013. Vol. 8, № 10. P. e77675.
91. Ertl N.G., O'Connor W.A., Papanicolaou A., Wiegand A.N., Elizur A. Transcriptome Analysis of the Sydney Rock Oyster, *Saccostrea glomerata*: Insights into Molluscan Immunity // *PLoS ONE*. 2016. Vol. 11, № 6. P. e0156649.
92. Estévez-Calvar N., Romero A., Figueras A., Novoa B. Involvement of pore-forming molecules in immune defense and development of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) // *Dev. Comp. Immunol.* 2011. Vol. 35, № 10. P. 1017–1031.
93. Feng C., Ghosh A., Amin M.N., Bachvaroff T.R., Tasumi S., Pasek M. et al. Galectin CvGal2 from the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) Displays Unique Specificity for ABH Blood Group Oligosaccharides and Differentially Recognizes Sympatric Perkinsus Species // *Biochemistry*. 2015. Vol. 54, № 30. P. 4711–4730.
94. Feng C., Ghosh A., Amin M.N., Giomarelli B., Shridhar S., Banerjee A. et al. The galectin CvGal1 from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) binds to blood group A oligosaccharides on the hemocyte surface // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288, № 34. P. 24394–24409.
95. Fernández-Boo S., Villalba A., Cao A. Protein expression profiling in haemocytes and plasma of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in response to infection with *Perkinsus olseni* // *J. Fish Dis.* 2016. Vol. 39, № 11. P. 1369–1385.
96. Fisher W.S., Oliver L.M., Edwards P. Hematologic and serologic variability of eastern oysters from Apalachicola Bay, Florida // *Journal of Shellfish Research*. 1996. Vol. 15, № 3. P. 555–564.
97. Flye-Sainte-Marie J., Soudant P., Lambert C., Le Goïc N., Goncalvez M., Travers M.-A. et al. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes philippinarum* in the field during an annual cycle // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2009. Vol. 377, № 1. P. 1–11.
98. Ford S.E., Borrero F.J. Epizootiology and pathology of juvenile oyster disease in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* // *J. Invertebr. Pathol.* 2001. Vol. 78, № 3. P. 141–154.
99. Fu C., Zhao H., Wang Y., Cai H., Xiao Y., Zeng Y. et al. Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen // *HLA*. 2016. Vol. 88, № 6. P. 275–286.
100. Fujita T., Matsushita M., Endo Y. The lectin-complement pathway--its role in innate immunity and evolution // *Immunol. Rev.* 2004. Vol. 198. P. 185–202.

101. García-Maldonado E., Cano-Sánchez P., Hernández-Santoyo A. Molecular and functional characterization of a glycosylated Galactose-Binding lectin from *Mytilus californianus* // Fish Shellfish Immunol. 2017. Vol. 66. P. 564–574.
102. Gerdol M., De Moro G., Manfrin C., Venier P., Pallavicini A. Big defensins and mytimacins, new AMP families of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* // Dev. Comp. Immunol. 2012. Vol. 36, № 2. P. 390–399.
103. Gerdol M., Gomez-Chiarri M., Castillo M.G., Figueras A., Fiorito G., Moreira R. et al. Immunity in molluscs: recognition and effector mechanisms, with a focus on bivalvia // Advances in comparative immunology. Springer, 2018. P. 225–341.
104. Gerdol M., Greco S., Pallavicini A. Extensive Tandem Duplication Events Drive the Expansion of the C1q-Domain-Containing Gene Family in Bivalves // Mar Drugs. 2019. Vol. 17, № 10.
105. Gerdol M., Manfrin C., De Moro G., Figueras A., Novoa B., Venier P. et al. The C1q domain containing proteins of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: a widespread and diverse family of immune-related molecules // Dev. Comp. Immunol. 2011. Vol. 35, № 6. P. 635–643.
106. Gerdol M., Puillandre N., De Moro G., Guarnaccia C., Lucafò M., Benincasa M. et al. Identification and Characterization of a Novel Family of Cysteine-Rich Peptides (MgCRP-I) from *Mytilus galloprovincialis* // Genome Biol Evol. 2015a. Vol. 7, № 8. P. 2203–2219.
107. Gerdol M., Venier P. An updated molecular basis for mussel immunity // Fish Shellfish Immunol. 2015. Vol. 46, № 1. P. 17–38.
108. Gerdol M., Venier P., Pallavicini A. The genome of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* brings new insights on the massive expansion of the C1q gene family in Bivalvia // Dev. Comp. Immunol. 2015b. Vol. 49, № 1. P. 59–71.
109. Gestal C., Pallavicini A., Venier P., Novoa B., Figueras A. MgC1q, a novel C1q-domain-containing protein involved in the immune response of *Mytilus galloprovincialis* // Dev. Comp. Immunol. 2010. Vol. 34, № 9. P. 926–934.
110. Ghosh S. Sialic acid binding lectins (SABL) from molluscs, a review and in silico study of SABL from *Solen grandis* and *Limax flavus* // J. Entomol. Zool. Stud. AkiNik Publications, 2017. Vol. 5, № 6. P. 1563–1572.
111. Girón-Pérez M.I. Relationships between innate immunity in bivalve molluscs and environmental pollution // Invertebrate Survival Journal. Invertebrate Survival Journal, 2010. Vol. 7, № 2. P. 149–156.
112. Gonzalez M., Gueguen Y., Desserre G., de Lorgeril J., Romestand B., Bachère E. Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas* // Dev. Comp. Immunol. 2007a. Vol. 31, № 4. P. 332–339.

113. Gonzalez M., Gueguen Y., Destoumieux-Garzón D., Romestand B., Fievet J., Pugnère M. et al. Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007b. Vol. 104, № 45. P. 17759–17764.
114. González R., Brokordt K., Cárcamo C.B., Coba de la Peña T., Oyanedel D., Mercado L. et al. Molecular characterization and protein localization of the antimicrobial peptide big defensin from the scallop *Argopecten purpuratus* after *Vibrio splendidus* challenge // Fish Shellfish Immunol. 2017. Vol. 68. P. 173–179.
115. Gorakshakar A.C., Ghosh K. Use of lectins in immunohematology // Asian J Transfus Sci. 2016. Vol. 10, № 1. P. 12–21.
116. Gorbushin A.M., Iakovleva N.V. A new gene family of single fibrinogen domain lectins in *Mytilus* // Fish Shellfish Immunol. 2011. Vol. 30, № 1. P. 434–438.
117. Gowda N.M., Goswami U., Khan M.I. Purification and characterization of a T-antigen specific lectin from the coelomic fluid of a marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*) // Fish Shellfish Immunol. 2008. Vol. 24, № 4. P. 450–458.
118. Graham L.A., Boddington M.E., Holmstrup M., Davies P.L. Antifreeze protein complements cryoprotective dehydration in the freeze-avoiding springtail *Megaphorura arctica* // Sci Rep. 2020. Vol. 10, № 1. P. 3047.
119. Green T.J., Raftos D., Speck P., Montagnani C. Antiviral immunity in marine molluscs // J. Gen. Virol. 2015. Vol. 96, № 9. P. 2471–2482.
120. Grinchenko A., Sokolnikova Y., Korneiko D., Kumeiko V. Dynamics of the immune response of the horse mussel *Modiolus kurilensis* (Bernard, 1983) following challenge with heat-inactivated bacteria // Journal of Shellfish Research. BioOne, 2015. Vol. 34, № 3. P. 909–917.
121. Grinchenko A.V., Von Kriegsheim A., Shved N.A., Egorova A.E., Ilyaskina D.V., Karp T.D., Goncharov N.V., Petrova I.Y., Kumeiko, V.V. A novel C1q domain-containing protein isolated from the mollusk *Modiolus kurilensis* recognizing glycans enriched with acidic galactans and mannans // Marine Drugs. 2021b. Vol. 19, № 12. P. 668.
122. Grinchenko A.V., Sokolnikova Y.N., Ilyaskina D.V., Kumeiko V.V. Seasonal Changes in Hemolymph Parameters of the Bivalve *Modiolus kurilensis* Bernard, 1983 from Vostok Bay, Sea of Japan // Russian Journal of Marine Biology. 2021a. Vol. 47, № 4. P. 300–311.
123. Gueguen Y., Bernard R., Julie F., Paulina S., Delphine D.-G., Franck V. et al. Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin // Mol. Immunol. 2009. Vol. 46, № 4. P. 516–522.
124. Gueguen Y., Herpin A., Aumelas A., Garnier J., Fievet J., Escoubas J.-M. et al. Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution

- structure, antimicrobial activities, and gene expression // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 1. P. 313–323.
125. Guo X.-N., Jin X.-K., Li S., Yu A.-Q., Wu M.-H., Tan S.-J. et al. A novel C-type lectin from *Eriocheir sinensis* functions as a pattern recognition receptor with antibacterial activity // *Fish Shellfish Immunol.* 2013. Vol. 35, № 5. P. 1554–1565.
126. Gutiérrez-Rivera J.N., Arcos-Ortega G.F., Luna-González A., Rodríguez-Jaramillo M.C., Arechiga-Carvajal E.T., Vázquez-Juárez R. Differential expression of serine protease inhibitors 1 and 2 in *Crassostrea corteziensis* and *C. virginica* infected with *Perkinsus marinus* // *Dis. Aquat. Org.* 2015. Vol. 112, № 3. P. 185–197.
127. Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle // *Proceedings of the National Academy of Sciences. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. Vol. 99, № 16. P. 10231–10233.
128. Hasan I., Gerdol M., Fujii Y., Ozeki Y. Functional Characterization of OXYL, A SghC1qDC LacNAc-specific Lectin from The Crinoid Feather Star *Anneissia Japonica*: 2 // *Marine Drugs*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2019. Vol. 17, № 2. P. 136.
129. Hasan I., Gerdol M., Fujii Y., Rajia S., Koide Y., Yamamoto D. et al. cDNA and Gene Structure of MytiLec-1, A Bacteriostatic R-Type Lectin from the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) // *Mar Drugs*. 2016. Vol. 14, № 5.
130. Hassan S.-U., Donia A., Sial U., Zhang X., Bokhari H. Glycoprotein- and Lectin-Based Approaches for Detection of Pathogens // *Pathogens*. 2020. Vol. 9, № 9.
131. He C., Yu H., Liu W., Su H., Shan Z., Bao X. et al. A goose-type lysozyme gene in Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*): cDNA cloning, mRNA expression and promoter sequence analysis // *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 2012. Vol. 162, № 1–3. P. 34–43.
132. He X., Zhang Y., Yu F., Yu Z. A novel sialic acid binding lectin with anti-bacterial activity from the Hong Kong oyster (*Crassostrea hongkongensis*) // *Fish Shellfish Immunol.* 2011. Vol. 31, № 6. P. 1247–1250.
133. Hellio C., Bado-Nilles A., Gagnaire B., Renault T., Thomas-Guyon H. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in vitro // *Fish Shellfish Immunol.* 2007. Vol. 22, № 4. P. 433–440.
134. Hendrickson O.D., Zherdev A.V. Analytical Application of Lectins // *Crit Rev Anal Chem.* 2018. Vol. 48, № 4. P. 279–292.
135. Hernroth B., Baden S., Tassidis H., Hörnaeus K., Guillemant J., Bergström Lind S. Impact of ocean acidification on antimicrobial activity in gills of the blue mussel (*Mytilus edulis*) // *Fish Shellfish Immunol.* 2016. Vol. 55. P. 452–459.

136. Höher N., Köhler A., Strand J., Broeg K. Effects of various pollutant mixtures on immune responses of the blue mussel (*Mytilus edulis*) collected at a salinity gradient in Danish coastal waters // Marine Environmental Research. 2012. Vol. 75. P. 35–44.
137. Hu B., Guo W., Wang L.-H., Wang J.-G., Liu X.-Y., Jiao B.-H. Purification and characterization of gigantoxin-4, a new actinoporin from the sea anemone *Stichodactyla gigantea* // Int. J. Biol. Sci. 2011. Vol. 7, № 6. P. 729–739.
138. Hu X., Hu X., Hu B., Wen C., Xie Y., Wu D. et al. Molecular cloning and characterization of cathepsin L from freshwater mussel, *Cristaria plicata* // Fish Shellfish Immunol. 2014. Vol. 40, № 2. P. 446–454.
139. Huang B., Zhang L., Li L., Tang X., Zhang G. Highly diverse fibrinogen-related proteins in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* // Fish Shellfish Immunol. 2015a. Vol. 43, № 2. P. 485–490.
140. Huang M., Song X., Zhao J., Mu C., Wang L., Zhang H. et al. A C-type lectin (AiCTL-3) from bay scallop *Argopecten irradians* with mannose/galactose binding ability to bind various bacteria // Gene. 2013. Vol. 531, № 1. P. 31–38.
141. Huang M., Zhang H., Jiang S., Wang L., Liu R., Yi Q. et al. An EPD/WSD motifs containing C-type lectin from *Argopectens irradians* recognizes and binds microbes with broad spectrum // Fish Shellfish Immunol. 2015b. Vol. 43, № 1. P. 287–293.
142. Huang Y., Wang W., Ren Q. Identification and function of a novel C1q domain-containing (C1qDC) protein in triangle-shell pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*) // Fish Shellfish Immunol. 2016. Vol. 58. P. 612–621.
143. Hubert F., Noel T., Roch P. A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) // Eur. J. Biochem. 1996. Vol. 240, № 1. P. 302–306.
144. Ikuta T., Tame A., Saito M., Aoki Y., Nagai Y., Sugimura M. et al. Identification of cells expressing two peptidoglycan recognition proteins in the gill of the vent mussel, *Bathymodiolus septemdiarium* // Fish Shellfish Immunol. 2019. Vol. 93. P. 815–822.
145. Iobst S.T., Drickamer K. Binding of sugar ligands to Ca(2+)-dependent animal lectins. II. Generation of high-affinity galactose binding by site-directed mutagenesis. // Journal of Biological Chemistry. 1994. Vol. 269, № 22. P. 15512–15519.
146. Iobst S.T., Wormald M.R., Weis W.I., Dwek R.A., Drickamer K. Binding of sugar ligands to Ca(2+)-dependent animal lectins. I. Analysis of mannose binding by site-directed mutagenesis and NMR. // Journal of Biological Chemistry. 1994. Vol. 269, № 22. P. 15505–15511.
147. Itoh N., Takahashi K.G. A novel peptidoglycan recognition protein containing a goose-type lysozyme domain from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* // Mol. Immunol. 2009. Vol. 46, № 8–9. P. 1768–1774.

148. Itoh N., Xue Q., Li Y., Cooper R.K., La Peyre J.F. cDNA cloning and tissue expression of plasma lysozyme in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* // Fish Shellfish Immunol. 2007. Vol. 23, № 5. P. 957–968.
149. Ivanina A.V., Hawkins C., Sokolova I.M. Immunomodulation by the interactive effects of cadmium and hypercapnia in marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria* // Fish Shellfish Immunol. 2014. Vol. 37, № 2. P. 299–312.
150. Jakób M., Lubkowski J., O’Keefe B.R., Wlodawer A. Structure of a lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* (CGL) // Acta Crystallogr F Struct Biol Commun. 2015. Vol. 71, № 11. P. 1429–1436.
151. Jayanthi S., Ishwarya R., Anjugam M., Iswarya A., Karthikeyan S., Vaseeharan B. Purification, characterization and functional analysis of the immune molecule lectin from the haemolymph of blue swimmer crab *Portunus pelagicus* and their antibiofilm properties // Fish Shellfish Immunol. 2017. Vol. 62. P. 227–237.
152. Jiang J., Xing J., Sheng X., Zhan W. Characterization of Phenoloxidase from the Bay Scallop *Argopecten irradians* // shre. National Shellfisheries Association, 2011. Vol. 30, № 2. P. 273–277.
153. Jiang S., Li H., Zhang D., Zhang H., Wang L., Sun J. et al. A C1q domain containing protein from *Crassostrea gigas* serves as pattern recognition receptor and opsonin with high binding affinity to LPS // Fish Shellfish Immunol. 2015. Vol. 45, № 2. P. 583–591.
154. Jing X., Espinosa E.P., Perrigault M., Allam B. et al. Identification, molecular characterization and expression analysis of a mucosal C-type lectin in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* // Fish Shellfish Immunol. 2011. Vol. 30, № 3. P. 851–858.
155. Kang Y.-S., Kim Y.-M., Park K.-I., Kim Cho S., Choi K.-S., Cho M. Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni* // Dev. Comp. Immunol. 2006. Vol. 30, № 12. P. 1119–1131.
156. Kavun V.Ya., Podgurskaya O.V. Adaptation strategy of bivalve *Modiolus modiolus* from upwelling regions of the Kuril Islands shelf (Sea of Okhotsk) to heavy metal effects // Continental Shelf Research. 2009. Vol. 29, № 13. P. 1597–1604.
157. Kavun V.Ya., Shulkin V.M., Khristoforova N.K. Metal accumulation in mussels of the Kuril Islands, north-west Pacific Ocean // Marine Environmental Research. 2002. Vol. 53, № 3. P. 219–226.
158. Kawsar S.M.A., Matsumoto R., Fujii Y., Yasumitsu H., Dogasaki C., Hosono M. et al. Purification and biochemical characterization of a D-galactose binding lectin from Japanese sea hare (*Aplysia kurodai*) eggs // Biochemistry Mosc. 2009. Vol. 74, № 7. P. 709–716.

159. Kim H.J., Lee J.H., Hur Y.B., Lee C.W., Park S.-H., Koo B.-W. Marine Antifreeze Proteins: Structure, Function, and Application to Cryopreservation as a Potential Cryoprotectant // *Mar Drugs*. 2017. Vol. 15, № 2.
160. Kim Y.M., Park K.-I., Choi K.-S., Alvarez R.A., Cummings R.D., Cho M. Lectin from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni* // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 37. P. 26854–26864.
161. Kobata A., Amano J. Altered glycosylation of proteins produced by malignant cells, and application for the diagnosis and immunotherapy of tumours // *Immunology & Cell Biology*. 2005. Vol. 83, № 4. P. 429–439.
162. Kong P., Zhang H., Wang L., Zhou Z., Yang J., Zhang Y. et al. AiC1qDC-1, a novel gC1q-domain-containing protein from bay scallop *Argopecten irradians* with fungi agglutinating activity // *Dev. Comp. Immunol.* 2010. Vol. 34, № 8. P. 837–846.
163. Korourian S., Siegel E., Kieber-Emmons T., Monzavi-Karbassi B. Expression analysis of carbohydrate antigens in ductal carcinoma in situ of the breast by lectin histochemistry // *BMC Cancer*. 2008. Vol. 8, № 1. P. 136.
164. Kovalchuk S.N., Chikalovets I.V., Chernikov O.V., Molchanova V.I., Li W., Rasskazov V.A. et al. cDNA cloning and structural characterization of a lectin from the mussel *Crenomytilus grayanus* with a unique amino acid sequence and antibacterial activity // *Fish Shellfish Immunol.* 2013. Vol. 35, № 4. P. 1320–1324.
165. Kumeiko V.V., Sokolnikova Y.N., Grinchenko A.V., Mokrina M.S., Kniazkina M.I. Immune state correlates with histopathological level and reveals molluscan health in populations of *Modiolus kurilensis* by integral health index (IHI) // *J. Invertebr. Pathol.* 2018. Vol. 154. P. 42–57.
166. Kurz S., Jin C., Hykollari A., Gregorich D., Giomarelli B., Vasta G.R. et al. Hemocytes and plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) display a diverse repertoire of sulfated and blood group A-modified N-glycans // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288, № 34. P. 24410–24428.
167. La Peyre J.F., Chu F.-L.E., Meyers J.M. Haemocytic and humoral activities of eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus* // *Fish & Shellfish Immunology*. Elsevier, 1995. Vol. 5, № 3. P. 179–190.
168. La Peyre J.F., Xue Q.-G., Itoh N., Li Y., Cooper R.K. Serine protease inhibitor cvSI-1 potential role in the eastern oyster host defense against the protozoan parasite *Perkinsus marinus* // *Dev. Comp. Immunol.* 2010. Vol. 34, № 1. P. 84–92.
169. Laaf D., Bojarová P., Elling L., Křen V. Galectin-Carbohydrate Interactions in Biomedicine and Biotechnology // *Trends Biotechnol.* 2019. Vol. 37, № 4. P. 402–415.

170. Lacroix C., Duvieilbourg E., Guillou N., Guyomarch J., Bassoulet C., Moraga D. et al. Seasonal monitoring of blue mussel (*Mytilus* spp.) populations in a harbor area: A focus on responses to environmental factors and chronic contamination // *Mar. Environ. Res.* 2017. Vol. 129. P. 24–35.
171. Laemmli U.K. SDS-page Laemmli method // *Nature*. 1970. Vol. 227. P. 680–685.
172. Lafont M., Petton B., Vergnes A., Pauletto M., Segarra A., Gourbal B. et al. Long-lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas* // *Sci Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 13143.
173. Le Pendu J., Marionneau S., Cailleau-Thomas A., Rocher J., Le Moullac-Vaidye B., Clément M. ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer // *APMIS*. 2001. Vol. 109, № 1. P. 9–26.
174. Lee Y., Kwak H., Shin J., Kim S.-C., Kim T., Park J.-K. A mitochondrial genome phylogeny of Mytilidae (Bivalvia: Mytilida) // *Molecular phylogenetics and evolution*. Elsevier, 2019. Vol. 139. P. 106533.
175. Leite R.B., Milan M., Coppe A., Bortoluzzi S., dos Anjos A., Reinhardt R. et al. mRNA-Seq and microarray development for the Grooved Carpet shell clam, *Ruditapes decussatus*: a functional approach to unravel host-parasite interaction // *BMC Genomics*. 2013. Vol. 14. P. 741.
176. Leoni G., De Poli A., Mardirossian M., Gambato S., Florian F., Venier P. et al. Myticalins: A Novel Multigenic Family of Linear, Cationic Antimicrobial Peptides from Marine Mussels (*Mytilus* spp.) // *Mar Drugs*. 2017. Vol. 15, № 8.
177. Li C., Yu S., Zhao J., Su X., Li T. Cloning and characterization of a sialic acid binding lectins (SABL) from Manila clam *Venerupis philippinarum* // *Fish Shellfish Immunol.* 2011. Vol. 30, № 4–5. P. 1202–1206.
178. Li G., Mei S., Cheng J., Wu T., Luo J. *Haliotis discus discus* Sialic Acid-Binding Lectin Reduces the Oncolytic Vaccinia Virus Induced Toxicity in a Glioblastoma Mouse Model: 5 // *Marine Drugs*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2018. Vol. 16, № 5. P. 141.
179. Li H., Venier P., Prado-Alvárez M., Gestal C., Toubiana M., Quartesan R. et al. Expression of *Mytilus* immune genes in response to experimental challenges varied according to the site of collection // *Fish Shellfish Immunol.* 2010. Vol. 28, № 4. P. 640–648.
180. Li H., Zhang H., Jiang S., Wang W., Xin L., Wang H. et al. A single-CRD C-type lectin from oyster *Crassostrea gigas* mediates immune recognition and pathogen elimination with a potential role in the activation of complement system // *Fish Shellfish Immunol.* 2015. Vol. 44, № 2. P. 566–575.
181. Li J., Chen J., Zhang Y., Yu Z. Expression of allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) in response to bacterial challenge and tissue injury in the pearl oyster, *Pinctada martensii* // *Fish Shellfish Immunol.* 2013a. Vol. 34, № 1. P. 365–371.

182. Li J., Zhang Y., Zhang Y., Xiang Z., Tong Y., Qu F. et al. Genomic characterization and expression analysis of five novel IL-17 genes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* // Fish Shellfish Immunol. 2014. Vol. 40, № 2. P. 455–465.
183. Li L., Zhao J., Wang L., Qiu L., Song L. Genomic organization, polymorphisms and molecular evolution of the goose-type lysozyme gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri* // Gene. 2013b. Vol. 513, № 1. P. 40–52.
184. Li M., Zhu L., Zhou C., Sun S., Fan Y., Zhuang Z. Molecular characterization and expression of a novel big defensin (Sb-BDef1) from ark shell, *Scapharca broughtonii* // Fish Shellfish Immunol. 2012. Vol. 33, № 5. P. 1167–1173.
185. Liao Z., Wang X., Liu H., Fan M., Sun J., Shen W. Molecular characterization of a novel antimicrobial peptide from *Mytilus coruscus* // Fish Shellfish Immunol. 2013. Vol. 34, № 2. P. 610–616.
186. Liu F., Wang D.-Z., Wang W.-X. Cadmium-induced changes in trace element bioaccumulation and proteomics perspective in four marine bivalves // Environ. Toxicol. Chem. 2012. Vol. 31, № 6. P. 1292–1300.
187. Liu H.-H., Xiang L.-X., Shao J.-Z. A novel C1q-domain-containing (C1qDC) protein from *Mytilus coruscus* with the transcriptional analysis against marine pathogens and heavy metals // Dev. Comp. Immunol. 2014a. Vol. 44, № 1. P. 70–75.
188. 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, № 7. P. 678–682.
189. Liu W., He J., Bao X. Mitochondrial DNA supports validity of *Modiolus kurilensis* F.R. Bernard, 1983 // Shell Discoveries. 2014b. Vol. 1, № 3. P. 18–19.
190. Loker E.S., Bayne C.J. Molluscan Immunobiology: Challenges in the Anthropocene Epoch // Advances in Comparative Immunology / ed. Cooper E.L. Cham: Springer International Publishing, 2018. P. 343–407.
191. Luna-Acosta A., Breitwieser M., Renault T., Thomas-Guyon H. Recent findings on phenoloxidases in bivalves // Mar. Pollut. Bull. 2017. Vol. 122, № 1–2. P. 5–16.
192. Mafra L.L., Bricelj V.M., Fennel K. Domoic acid uptake and elimination kinetics in oysters and mussels in relation to body size and anatomical distribution of toxin // Aquat. Toxicol. 2010. Vol. 100, № 1. P. 17–29.
193. Malagoli D., Casarini L., Ottaviani E. Monitoring of the immune efficiency of *Mytilus galloprovincialis* in Adriatic sea mussel farms in 2006: Regular changes of cytotoxicity during the year // Invertebrate Survival Journal. 2007. Vol. 4.

194. Maldonado-Aguayo W., Núñez-Acuña G., Valenzuela-Muñoz V., Chávez-Mardones J., Gallardo-Escárate C. Molecular characterization of two kazal-type serine proteinase inhibitor genes in the surf clam *Mesodesma donacium* exposed to *Vibrio anguillarum* // Fish Shellfish Immunol. 2013. Vol. 34, № 6. P. 1448–1454.
195. Manning J.C., Romero A., Habermann F.A., García Caballero G., Kaltner H., Gabius H.-J. Lectins: a primer for histochemists and cell biologists // Histochem. Cell Biol. 2017. Vol. 147, № 2. P. 199–222.
196. Martínez-Lopez A., Encinar J.A., Medina-Gali R.M., Balseiro P., Garcia-Valtanen P., Figueras A. et al. Molecular characterisation of TNF, AIF, dermatopontin and VAMP genes of the flat oyster *Ostrea edulis* and analysis of their modulation by diseases // Gene. 2014. Vol. 533, № 1. P. 208–217.
197. Martín-Gómez L., Villalba A., Carballal M.J., Abollo E. pH-dependent solution structure and activity of a reduced form of the host-defense peptide myticin C (Myt C) from the mussel *Mytilus galloprovincialis* // Mar Drugs. 2013. Vol. 11, № 7. P. 2328–2346.
198. Martins E., Figueras A., Novoa B., Santos R.S., Moreira R., Bettencourt R. Comparative study of immune responses in the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* and the shallow-water mussel *Mytilus galloprovincialis* challenged with *Vibrio bacteria* // Fish Shellfish Immunol. 2014. Vol. 40, № 2. P. 485–499.
199. Martins E., Santos R.S., Bettencourt R. *Vibrio diabolicus* challenge in *Bathymodiolus azoricus* populations from Menez Gwen and Lucky Strike hydrothermal vent sites // Fish Shellfish Immunol. 2015. Vol. 47, № 2. P. 962–977.
200. Martins I., Goulart J., Martins E., Morales-Román R., Marín S., Riou V. et al. Physiological impacts of acute Cu exposure on deep-sea vent mussel *Bathymodiolus azoricus* under a deep-sea mining activity scenario // Aquat Toxicol. 2017. Vol. 193. P. 40–49.
201. Matozzo V., Binelli A., Parolini M., Locatello L., Marin M.G. Biomarker responses and contamination levels in the clam *Ruditapes philippinarum* for biomonitoring the Lagoon of Venice (Italy) // J Environ Monit. 2010. Vol. 12, № 3. P. 776–786.
202. Matozzo V., Da Ros L., Ballarin L., Meneghetti F., Marin M. Functional responses of haemocytes in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice: Fishing impact and seasonal variations // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2011. Vol. 60. P. 949–958.
203. Matozzo V., Giacomazzo M., Finos L., Marin M.G., Bargelloni L., Milan M. Can ecological history influence immunomarker responses and antioxidant enzyme activities in bivalves that have been experimentally exposed to contaminants? A new subject for discussion in “eco-immunology” studies // Fish Shellfish Immunol. 2013. Vol. 35, № 1. P. 126–135.

204. Matozzo V., Ros L.D., Ballarin L., Meneghetti F., Marin M.G. Functional responses of haemocytes in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice: fishing impact and seasonal variations // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. NRC Research Press, 2003. Vol. 60, № 8. P. 949–958.
205. Matsumoto T., Nakamura A.M., Takahashi K.G. Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* // Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. 2006. Vol. 145, № 3–4. P. 325–330.
206. Mayer S., Raulf M.-K., Lepenies B. C-type lectins: their network and roles in pathogen recognition and immunity // Histochem Cell Biol. 2017. Vol. 147, № 2. P. 223–237.
207. Mazalovska M., Kouokam J.C. Lectins as Promising Therapeutics for the Prevention and Treatment of HIV and Other Potential Coinfections // Biomed Res Int. 2018. Vol. 2018. P. 3750646.
208. Mazalovska M., Kouokam J.C. Plant-Derived Lectins as Potential Cancer Therapeutics and Diagnostic Tools // Biomed Res Int. 2020. Vol. 2020. P. 1631394.
209. McKinnon L., Parry G., Leporati S., Heislars S., Werner G., Gason A. et al. The Environmental Effects of Blue Mussel (*Mytilus edulis*) Aquaculture in Port Phillip Bay. 2003.
210. Mishra A., Behura A., Mawatwal S., Kumar A., Naik L., Mohanty S.S. et al. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity // Food Chem. Toxicol. 2019. Vol. 134. P. 110827.
211. Mitchell C.A., Ramessar K., O’Keefe B.R. Antiviral lectins: Selective inhibitors of viral entry // Antiviral Res. 2017. Vol. 142. P. 37–54.
212. Mitta G., Hubert F., Dyrinda E.A., Boudry P., Roch P. Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis // Dev. Comp. Immunol. 2000a. Vol. 24, № 4. P. 381–393.
213. Mitta G., Hubert F., Noël T., Roch P. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis* // Eur. J. Biochem. 1999. Vol. 265, № 1. P. 71–78.
214. Mitta G., Vandenbulcke F., Hubert F., Salzet M., Roch P. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense // J. Biol. Chem. 2000b. Vol. 275, № 17. P. 12954–12962.
215. Mitta G., Vandenbulcke F., Roch P. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity // FEBS Lett. 2000. Vol. 486, № 3. P. 185–190.
216. Montagnani C., Le Roux F., Berthe F., Escoubas J.M. Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms(1) // FEBS Lett. 2001. Vol. 500, № 1–2. P. 64–70.

217. Montaña A.M., Tsujino F., Takahata N., Satta Y. Evolutionary origin of peptidoglycan recognition proteins in vertebrate innate immune system // *BMC Evol. Biol.* 2011. Vol. 11. P. 79.
218. Moreira R., Balseiro P., Planas J.V., Fuste B., Beltran S., Novoa B. et al. Transcriptomics of in vitro immune-stimulated hemocytes from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* using high-throughput sequencing // *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7, № 4. P. e35009.
219. Moreira R., Milan M., Balseiro P., Romero A., Babbucci M., Figueras A. et al. Gene expression profile analysis of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) hemocytes after a *Vibrio alginolyticus* challenge using an immune-enriched oligo-microarray // *BMC Genomics*. 2014. Vol. 15. P. 267.
220. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays // *Journal of Immunological Methods*. 1983. Vol. 65, № 1. P. 55–63.
221. Moy G.W., Springer S.A., Adams S.L., Swanson W.J., Vacquier V.D. Extraordinary intraspecific diversity in oyster sperm bindin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. Vol. 105, № 6. P. 1993–1998.
222. Moy G.W., Vacquier V.D. Bindin genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* // *Gene*. 2008. Vol. 423, № 2. P. 215–220.
223. Mu C., Chen L., Zhao J., Wang C. Molecular cloning and expression of a C-type lectin gene from *Venerupis philippinarum* // *Mol. Biol. Rep.* 2014. Vol. 41, № 1. P. 139–144.
224. Mun S., Kim Y.-J., Markkandan K., Shin W., Oh S., Woo J. et al. The Whole-Genome and Transcriptome of the Manila Clam (*Ruditapes philippinarum*) // *Genome Biol Evol.* 2017. Vol. 9, № 6. P. 1487–1498.
225. Munari M., Matozzo V., Chemello G., Riedl V., Pastore P., Badocco D. et al. Seawater acidification and emerging contaminants: A dangerous marriage for haemocytes of marine bivalves // *Environ. Res.* 2019. Vol. 175. P. 11–21.
226. Nascimento-Neto L.G. do, Cabral M.G., Carneiro R.F., Silva Z., Arruda F.V.S., Nagano C.S. et al. Halilectin-3, a Lectin from the Marine Sponge *Haliclona caerulea*, Induces Apoptosis and Autophagy in Human Breast Cancer MCF7 Cells Through Caspase-9 Pathway and LC3-II Protein Expression // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2018. Vol. 18, № 4. P. 521–528.
227. Nilsen I.W., Overbø K., Sandsdalen E., Sandaker E., Sletten K., Myrnes B. Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity // *FEBS Lett.* 1999. Vol. 464, № 3. P. 153–158.
228. Nitta K., Ozaki K., Ishikawa M., Furusawa S., Hosono M., Kawauchi H. et al. Inhibition of cell proliferation by *Rana catesbeiana* and *Rana japonica* lectins belonging to the ribonuclease superfamily // *Cancer Res.* 1994. Vol. 54, № 4. P. 920–927.
229. Nitta K., Takayanagi G., Kawauchi H., Hakomori S. Isolation and characterization of *Rana*

- catesbeiana* lectin and demonstration of the lectin-binding glycoprotein of rodent and human tumor cell membranes // *Cancer Res.* 1987. Vol. 47, № 18. P. 4877–4883.
230. Niu D., Jin K., Wang L., Feng B., Li J. Molecular characterization and expression analysis of four cathepsin L genes in the razor clam, *Sinonovacula constricta* // *Fish Shellfish Immunol.* 2013a. Vol. 35, № 2. P. 581–588.
231. Niu D., Jin K., Wang L., Sun F., Li J. Identification of cathepsin B in the razor clam *Sinonovacula constricta* and its role in innate immune responses // *Dev. Comp. Immunol.* 2013b. Vol. 41, № 1. P. 94–99.
232. Niu D., Xie S., Bai Z., Wang L., Jin K., Li J. Identification, expression, and responses to bacterial challenge of the cathepsin C gene from the razor clam *Sinonovacula constricta* // *Dev. Comp. Immunol.* 2014. Vol. 46, № 2. P. 241–245.
233. Novoa B., Romero A., Álvarez Á.L., Moreira R., Pereiro P., Costa M.M. et al. Antiviral Activity of Myticin C Peptide from Mussel: an Ancient Defense against Herpesviruses // *J. Virol.* 2016. Vol. 90, № 17. P. 7692–7702.
234. Odom E.W., Vasta G.R. Characterization of a binary tandem domain F-type lectin from striped bass (*Morone saxatilis*) // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 3. P. 1698–1713.
235. Olafsen J.A., Fletcher T.C., Grant P.T. Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge // *Dev. Comp. Immunol.* 1992. Vol. 16, № 2–3. P. 123–138.
236. Olafsen J.A., Mikkelsen H.V., Giaever H.M., Høvik Hansen G. Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures // *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. Vol. 59, № 6. P. 1848–1854.
237. Oliveira C., Nicolau A., Teixeira J.A., Domingues L. Cytotoxic Effects of Native and Recombinant Frutalin, a Plant Galactose-Binding Lectin, on HeLa Cervical Cancer Cells // *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* Hindawi, 2011. Vol. 2011. P. e568932.
238. Ordás M.C., Ordás A., Beloso C., Figueras A. Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus* // *Fish Shellfish Immunol.* 2000. Vol. 10, № 7. P. 597–609.
239. Oubella R., Maes P., Paillard C., Auffret M. Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia) // *Diseases of aquatic organisms.* 1993. Vol. 15, № 3. P. 193–197.
240. Paillard C. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*: 4 // *Aquat. Living Resour.* EDP Sciences, 2004. Vol. 17, № 4. P. 467–475.

241. Paillard C., Le Roux F., Borrego J.J. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution // *Aquatic Living Resources*. EDP Sciences, 2004. Vol. 17, № 4. P. 477–498.
242. Pajic I., Kljajic Z., Dogovic N., Sladic D., Juranic Z., Gasic M.J. A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2002. Vol. 132, № 2. P. 213–221.
243. Parisi M.-G., Toubiana M., Mangano V., Parrinello N., Cammarata M., Roch P. MIF from mussel: coding sequence, phylogeny, polymorphism, 3D model and regulation of expression // *Dev. Comp. Immunol.* 2012. Vol. 36, № 4. P. 688–696.
244. Pees B., Yang W., Zárate-Potes A., Schulenburg H., Dierking K. High Innate Immune Specificity through Diversified C-Type Lectin-Like Domain Proteins in Invertebrates // *J Innate Immun.* 2016. Vol. 8, № 2. P. 129–142.
245. Peng K., Wang J., Sheng J., Zeng L., Hong Y. Molecular characterization and immune analysis of a defensin from freshwater pearl mussel, *Hyriopsis schlegelii* // *Aquaculture*. 2012. Vol. 334–337. P. 45–50.
246. Pezzati E., Canesi L., Damonte G., Salis A., Marsano F., Grande C. et al. Susceptibility of *Vibrio aestuarianus* 01/032 to the antibacterial activity of *Mytilus haemolymph*: identification of a serum opsonin involved in mannose-sensitive interactions // *Environ. Microbiol.* 2015. Vol. 17, № 11. P. 4271–4279.
247. Pinaud S., Portela J., Duval D., Nowacki F.C., Olive M.-A., Allienne J.-F. et al. A Shift from Cellular to Humoral Responses Contributes to Innate Immune Memory in the Vector Snail *Biomphalaria glabrata* // *PLoS Pathog.* 2016. Vol. 12, № 1. P. e1005361.
248. Pinho S.S., Reis C.A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications: 9 // *Nat Rev Cancer*. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 15, № 9. P. 540–555.
249. Pipe R.K., Coles J.A. Environmental contaminants influencing immunefunction in marine bivalve molluscs // *Fish & Shellfish Immunology*. Elsevier, 1995. Vol. 5, № 8. P. 581–595.
250. Pipe R.K., Coles J.A., Carissan F.M.M., Ramanathan K. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis* // *Aquatic toxicology*. Elsevier, 1999. Vol. 46, № 1. P. 43–54.
251. Pousset D., Piller V., Bureaud N., Monsigny M., Piller F. Increased α 2,6 Sialylation of N-Glycans in a Transgenic Mouse Model of Hepatocellular Carcinoma1 // *Cancer Research*. 1997. Vol. 57, № 19. P. 4249–4256.
252. Powell D., Subramanian S., Suwansa-ard S., Zhao M., O'Connor W., Raftos D. et al. The genome of the oyster *Saccostrea offers* insight into the environmental resilience of bivalves // *DNA Research*. 2018. Vol. 25, № 6. P. 655–665.

253. Prado-Alvarez M., Rotllant J., Gestal C., Novoa B., Figueras A. Characterization of a C3 and a factor B-like in the carpet-shell clam, *Ruditapes decussatus* // Fish Shellfish Immunol. 2009. Vol. 26, № 2. P. 305–315.
254. Qin C., Huang W., Zhou S., Wang X., Liu H., Fan M. et al. Characterization of a novel antimicrobial peptide with chitin-binding domain from *Mytilus coruscus* // Fish Shellfish Immunol. 2014. Vol. 41, № 2. P. 362–370.
255. Qu F., Xiang Z., Yu Z. The first molluscan acute phase serum amyloid A (A-SAA) identified from oyster *Crassostrea hongkongensis*: molecular cloning and functional characterization // Fish & shellfish immunology. Elsevier, 2014. Vol. 39, № 2. P. 145–151.
256. Qu F., Xiang Z., Zhang Y., Li J., Xiao S., Zhang Y. et al. Molecular identification and functional characterization of a tumor necrosis factor (TNF) gene in *Crassostrea hongkongensis* // Immunobiology. 2017. Vol. 222, № 5. P. 751–758.
257. Rabelo L., Monteiro N., Serquiz R., Santos P., Oliveira R., Oliveira A. et al. A Lactose-Binding Lectin from the Marine Sponge *Cinachyrella Apion* (Cal) Induces Cell Death in Human Cervical Adenocarcinoma Cells: 4 // Marine Drugs. Molecular Diversity Preservation International, 2012. Vol. 10, № 4. P. 727–743.
258. Raftos D.A., Kuchel R., Aladaileh S., Butt D. Infectious microbial diseases and host defense responses in Sydney rock oysters // Front Microbiol. 2014. Vol. 5. P. 135.
259. Ratcliffe N.A., Rowley A.F., Fitzgerald S.W., Rhodes C.P. Invertebrate Immunity: Basic Concepts and Recent Advances // International Review of Cytology / ed. Bourne G.H. Academic Press, 1985. Vol. 97. P. 183–350.
260. Ren Q., Qi Y.-L., Hui K.-M., Zhang Z., Zhang C.-Y., Wang W. Four invertebrate-type lysozyme genes from triangle-shell pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*) // Fish Shellfish Immunol. 2012. Vol. 33, № 4. P. 909–915.
261. Ren Q., Wang C., Jin M., Lan J., Ye T., Hui K. et al. Co-option of bacteriophage lysozyme genes by bivalve genomes // Open Biol. 2017. Vol. 7, № 1.
262. Riva C., Binelli A., Rusconi F., Colombo G., Pedriali A., Zippel R. et al. A proteomic study using zebra mussels (*D. polymorpha*) exposed to benzo(a)pyrene: the role of gender and exposure concentrations // Aquat. Toxicol. 2011. Vol. 104, № 1–2. P. 14–22.
263. Riva C., Cristoni S., Binelli A. Effects of triclosan in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*: a proteomic investigation // Aquat. Toxicol. 2012. Vol. 118–119. P. 62–71.
264. Roberts S., Gueguen Y., de Lorgeril J., Goetz F. Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure // Dev. Comp. Immunol. 2008. Vol. 32, № 9. P. 1099–1104.

265. Rodríguez-Ortega M.J., Grøsvik B.E., Rodríguez-Ariza A., Goksøyr A., López-Barea J. Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants // *Proteomics*. 2003. Vol. 3, № 8. P. 1535–1543.
266. Romanenko L.A., Uchino M., Kalinovskaya N.I., Mikhailov V.V. Isolation, phylogenetic analysis and screening of marine mollusc-associated bacteria for antimicrobial, hemolytic and surface activities // *Microbiol. Res.* 2008. Vol. 163, № 6. P. 633–644.
267. Romero A., Dios S., Poisa-Beiro L., Costa M.M., Posada D., Figueras A. et al. Individual sequence variability and functional activities of fibrinogen-related proteins (FREPs) in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) suggest ancient and complex immune recognition models in invertebrates // *Dev. Comp. Immunol.* 2011. Vol. 35, № 3. P. 334–344.
268. Rosa R.D., Santini A., Fievet J., Bulet P., Destoumieux-Garzón D., Bachère E. Big defensins, a diverse family of antimicrobial peptides that follows different patterns of expression in hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas* // *PLoS ONE*. 2011. Vol. 6, № 9. P. e25594.
269. Rowe G.E., Welch R.A. Assays of hemolytic toxins // *Meth. Enzymol.* 1994. Vol. 235. P. 657–667.
270. Royet J., Dziarski R. Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences // *Nat. Rev. Microbiol.* 2007. Vol. 5, № 4. P. 264–277.
271. Rubin E., Werneburg G.T., Pales Espinosa E., Thanassi D.G., Allam B. Identification and characterization of peptidases secreted by quahog parasite unknown (QPX), the protistan parasite of hard clams // *Dis. Aquat. Org.* 2016. Vol. 122, № 1. P. 21–33.
272. Santarem M., Robledo J., Figueras A. Seasonal changes in hemocytes and serum defense factors in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* // *Dis. Aquat. Org.* 1994. Vol. 18. P. 217–222.
273. Schleder D.D., Kayser M., Sühnel S., Ferreira J.F., Rupp G.S., Barracco M.A. Evaluation of hemato-immunological parameters during the reproductive cycle of the scallop *Nodipecten nodosus* in association with a carotenoid-enriched diet // *Aquaculture*. 2008. Vol. 280, № 1. P. 256–263.
274. Seo J.-K., Lee M.J., Nam B.-H., Park N.G. cgMolluscidin, a novel dibasic residue repeat rich antimicrobial peptide, purified from the gill of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* // *Fish Shellfish Immunol.* 2013. Vol. 35, № 2. P. 480–488.
275. Seo J.-K., Stephenson J., Noga E.J. Multiple antibacterial histone H2B proteins are expressed in tissues of American oyster // *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 2011. Vol. 158, № 3. P. 223–229.
276. Sharon N., Lis H. *Lectins*. 2. ed. Dordrecht: Springer, 2007. 454 p.
277. Sievers F., Higgins D.G. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences // *Protein Science*. 2018. Vol. 27, № 1. P. 135–145.

278. Singh R.S., Walia A.K. Lectins from red algae and their biomedical potential // *J. Appl. Phycol.* 2018. Vol. 30, № 3. P. 1833–1858.
279. Sokolnikova Y., Magarlamov T., Stenkova A., Kumeiko V. Permanent culture and parasitic impact of the microalga *Coccomyxa parasitica*, isolated from horse mussel *Modiolus kurilensis* // *Journal of Invertebrate Pathology.* 2016. Vol. 140. P. 25–34.
280. Song L., Wang L., Qiu L., Zhang H. Bivalve Immunity // *Invertebrate Immunity* / ed. Söderhäll K. Boston, MA: Springer US, 2010a. P. 44–65.
281. Song X., Zhang H., Zhao J., Wang L., Qiu L., Mu C. et al. An immune responsive multidomain galectin from bay scallop *Argopectens irradians* // *Fish Shellfish Immunol.* 2010b. Vol. 28, № 2. P. 326–332.
282. Sonthi M., Toubiana M., Pallavicini A., Venier P., Roch P. Diversity of coding sequences and gene structures of the antifungal peptide mytimycin (MytM) from the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* // *Mar. Biotechnol.* 2011. Vol. 13, № 5. P. 857–867.
283. Soudant P., Paillard C., Choquet G., Lambert C., Reid H.I., Marhic A. et al. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis* (= *Tapes*, = *Ruditapes*) *philippinarum* // *Aquaculture.* 2004. Vol. 229, № 1. P. 401–418.
284. Springer S.A., Moy G.W., Friend D.S., Swanson W.J., Vacquier V.D. Oyster sperm bindin is a combinatorial fucose lectin with remarkable intra-species diversity // *Int. J. Dev. Biol.* 2008. Vol. 52, № 5–6. P. 759–768.
285. Su J., Ni D., Song L., Zhao J., Qiu L. Molecular cloning and characterization of a short type peptidoglycan recognition protein (CfPGRP-S1) cDNA from Zhikong scallop *Chlamys farreri* // *Fish Shellfish Immunol.* 2007. Vol. 23, № 3. P. 646–656.
286. Sun J., Zhang Y., Xu T., Zhang Y., Mu H., Zhang Y. et al. Adaptation to deep-sea chemosynthetic environments as revealed by mussel genomes: 5 // *Nat Ecol Evol.* Nature Publishing Group, 2017. Vol. 1, № 5. P. 1–7.
287. Sun Y., Zhou Z., Wang L., Yang C., Jianga S., Song L. The immunomodulation of a novel tumor necrosis factor (CgTNF-1) in oyster *Crassostrea gigas* // *Dev. Comp. Immunol.* 2014. Vol. 45, № 2. P. 291–299.
288. Suzuki T., Sugiyama K., Hirai H., Ito H., Morita T., Dohra H. et al. Mannose-specific lectin from the mushroom *Hygrophorus russula* // *Glycobiology.* 2012. Vol. 22, № 5. P. 616–629.
289. Takahashi K.G., Kuroda T., Muroga K. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* // *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 2008. Vol. 150, № 1. P. 45–52.
290. Takeuchi T., Koyanagi R., Gyoja F., Kanda M., Hisata K., Fujie M. et al. Bivalve-specific gene

- expansion in the pearl oyster genome: implications of adaptation to a sessile lifestyle // *Zoological Letters*. 2016. Vol. 2, № 1. P. 3.
291. Tang H. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila* // *Fly (Austin)*. 2009. Vol. 3, № 1. P. 105–111.
292. Tasumi S., Vasta G.R. A galectin of unique domain organization from hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus* // *J. Immunol*. 2007. Vol. 179, № 5. P. 3086–3098.
293. Tatsumi M., Hosokawa N., Arai Y., Itoh T. Purification of lectin from some shellfish and ascidiacea // *Carbohydr. Res*. 1982. Vol. 108, № 1. P. 148–152.
294. Tatsuta T., Sugawara S., Takahashi K., Ogawa Y., Hosono M., Nitta K. Leczyme: A New Candidate Drug for Cancer Therapy // *BioMed Research International*. Hindawi, 2014. Vol. 2014. P. e421415.
295. Terada D., Kawai F., Noguchi H., Unzai S., Hasan I., Fujii Y. et al. Crystal structure of MytiLec, a galactose-binding lectin from the mussel *Mytilus galloprovincialis* with cytotoxicity against certain cancer cell types // *Sci Rep*. 2016. Vol. 6. P. 28344.
296. Terada D., Voet A.R.D., Noguchi H., Kamata K., Ohki M., Addy C. et al. Computational design of a symmetrical β -trefoil lectin with cancer cell binding activity // *Sci Rep*. 2017. Vol. 7, № 1. P. 5943.
297. Tran N.H., Rahman M.Z., He L., Xin L., Shan B., Li M. Complete De Novo Assembly of Monoclonal Antibody Sequences: 1 // *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 6, № 1. P. 31730.
298. Tunkijjanukij S., Giaever H., Chin C.C., Olafsen J.A. Sialic acid in hemolymph and affinity purified lectins from two marine bivalves // *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol*. 1998. Vol. 119, № 4. P. 705–713.
299. Tunkijjanukij S., Mikkelsen H.V., Olafsen J.A. A heterogeneous sialic acid-binding lectin with affinity for bacterial LPS from horse mussel (*Modiolus modiolus*) hemolymph // *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol*. 1997. Vol. 117, № 2. P. 273–286.
300. Tunkijjanukij S., Olafsen J.A. Sialic acid-binding lectin with antibacterial activity from the horse mussel: further characterization and immunolocalization // *Dev. Comp. Immunol*. 1998. Vol. 22, № 2. P. 139–150.
301. Vasta G.R. Roles of galectins in infection // *Nat. Rev. Microbiol*. 2009. Vol. 7, № 6. P. 424–438.
302. Vasta G.R., Ahmed H. *Animal Lectins: A Functional View*. Boca Raton: CRC Press, 2008. 596 p.
303. Vasta G.R., Ahmed H., Bianchet M.A., Fernández-Robledo J.A., Amzel L.M. Diversity in recognition of glycans by F-type lectins and galectins: molecular, structural, and biophysical aspects // *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2012a. Vol. 1253. P. E14–26.

304. Vasta G.R., Ahmed H., Nita-Lazar M., Banerjee A., Pasek M., Shridhar S. et al. Galectins as self/non-self recognition receptors in innate and adaptive immunity: an unresolved paradox // *Front Immunol.* 2012b. Vol. 3. P. 199.
305. Vasta G.R., Ahmed H., Tasumi S., Odom E.W., Saito K. Biological roles of lectins in innate immunity: molecular and structural basis for diversity in self/non-self recognition // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007. Vol. 598. P. 389–406.
306. Vasta G.R., Feng C., Bianchet M.A., Bachvaroff T.R., Tasumi S. Structural, functional, and evolutionary aspects of galectins in aquatic mollusks: From a sweet tooth to the Trojan horse // *Fish Shellfish Immunol.* 2015. Vol. 46, № 1. P. 94–106.
307. Veldhoen N., Kobylarz M., Lowe C.J., Meloche L., deBruyn A.M.H., Helbing C.C. Relationship between mRNA biomarker candidates and location near a marine municipal wastewater outfall in the benthic indicator species *Modiolus modiolus* (L.) // *Aquat. Toxicol.* 2011. Vol. 105, № 1–2. P. 119–126.
308. Venier P., De Pittà C., Bernante F., Varotto L., De Nardi B., Bovo G. et al. MytiBase: a knowledgebase of mussel (*M. galloprovincialis*) transcribed sequences // *BMC Genomics.* 2009. Vol. 10. P. 72.
309. Višnjari T., Romih R., Zupančič D. Lectins as possible tools for improved urinary bladder cancer management // *Glycobiology.* 2019. Vol. 29, № 5. P. 355–365.
310. Waite J.H., Wilbur K.M. Phenoloxidase in the periostracum of the marine bivalve *Modiolus demissus* Dillwyn // *Journal of Experimental Zoology.* Wiley Online Library, 1976. Vol. 195, № 3. P. 359–367.
311. Wang A., Wang Y., Gu Z., Li S., Shi Y., Guo X. Development of expressed sequence tags from the pearl oyster, *Pinctada martensii* Dunker // *Mar. Biotechnol.* 2011a. Vol. 13, № 2. P. 275–283.
312. Wang B., Zhao J., Song L., Zhang H., Wang L., Li C. et al. Molecular cloning and expression of a novel Kazal-type serine proteinase inhibitor gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri*, and the inhibitory activity of its recombinant domain // *Fish Shellfish Immunol.* 2008. Vol. 24, № 5. P. 629–637.
313. Wang C., Yue X., Lu X., Liu B. The role of catalase in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix* // *Fish Shellfish Immunol.* 2013a. Vol. 34, № 1. P. 91–99.
314. Wang G.-L., Xia X.-L., Li X.-L., Dong S.-J., Li J.-L. Molecular characterization and expression patterns of the big defensin gene in freshwater mussel (*Hyriopsis cumingii*) // *Genet. Mol. Res.* 2014. Vol. 13, № 1. P. 704–715.

315. Wang H., Song L., Li C., Zhao J., Zhang H., Ni D. et al. Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri* // Mol. Immunol. 2007. Vol. 44, № 5. P. 722–731.
316. Wang L., Song X., Song L. The oyster immunity // Dev. Comp. Immunol. 2018. Vol. 80. P. 99–118.
317. Wang L., Wang L., Kong P., Yang J., Zhang H., Wang M. et al. A novel C1qDC protein acting as pattern recognition receptor in scallop *Argopecten irradians* // Fish Shellfish Immunol. 2012a. Vol. 33, № 2. P. 427–435.
318. Wang L., Wang L., Yang J., Zhang H., Huang M., Kong P. et al. A multi-CRD C-type lectin with broad recognition spectrum and cellular adhesion from *Argopecten irradians* // Dev Comp Immunol. 2012. Vol. 36, № 3. P. 591–601.
319. Wang L., Wang L., Zhang D., Jiang Q., Sun R., Wang H. et al. A novel multi-domain C1qDC protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri* provides new insights into the function of invertebrate C1qDC proteins // Dev. Comp. Immunol. 2015a. Vol. 52, № 2. P. 202–214.
320. Wang L., Wang L., Zhang H., Zhou Z., Siva V.S., Song L. A C1q domain containing protein from scallop *Chlamys farreri* serving as pattern recognition receptor with heat-aggregated IgG binding activity // PLoS ONE. 2012c. Vol. 7, № 8. P. e43289.
321. Wang L., Yue F., Song X., Song L. Maternal immune transfer in mollusc // Dev. Comp. Immunol. 2015b. Vol. 48, № 2. P. 354–359.
322. Wang L., Zhang H., Wang L., Zhang D., Lv Z., Liu Z. et al. The RNA-seq analysis suggests a potential multi-component complement system in oyster *Crassostrea gigas* // Dev. Comp. Immunol. 2017. Vol. 76. P. 209–219.
323. 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. 2013b. Vol. 8, № 6. P. e67469.
324. Wang Q., Zhang L., Yang D., Yu Q., Li F., Cong M. et al. Molecular diversity and evolution of defensins in the manila clam *Ruditapes philippinarum* // Fish Shellfish Immunol. 2015c. Vol. 47, № 1. P. 302–312.
325. Wang Z., Jian J., Lu Y., Wang B., Wu Z. A tandem-repeat galectin involved in innate immune response of the pearl oyster *Pinctada fucata* // Mar Genomics. 2011b. Vol. 4, № 3. P. 229–236.
326. Wei X., Yang J., Liu X., Yang D., Xu J., Fang J. et al. Identification and transcriptional analysis of two types of lectins (SgCTL-1 and SgGal-1) from mollusk *Solen grandis* // Fish Shellfish Immunol. 2012a. Vol. 33, № 2. P. 204–212.

327. Wei X., Yang J., Yang D., Xu J., Liu X., Yang J. et al. Molecular cloning and mRNA expression of two peptidoglycan recognition protein (PGRP) genes from mollusk *Solen grandis* // Fish Shellfish Immunol. 2012b. Vol. 32, № 1. P. 178–185.
328. Wu A.M., Liu J.H. Lectins and ELLSA as powerful tools for glycoconjugate recognition analyses // Glycoconj. J. 2019. Vol. 36, № 2. P. 175–183.
329. Wu B., Mei S., Cui L., Zhao Z., Chen J., Wu T. et al. Marine Lectins DIFBL and HddSBL Fused with Soluble Coxsackie-Adenovirus Receptor Facilitate Adenovirus Infection in Cancer Cells BUT Have Different Effects on Cell Survival: 3 // Marine Drugs. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2017. Vol. 15, № 3. P. 73.
330. Wu S.-Z., Huang X.-D., Li Q., He M.-X. Interleukin-17 in pearl oyster (*Pinctada fucata*): molecular cloning and functional characterization // Fish Shellfish Immunol. 2013. Vol. 34, № 5. P. 1050–1056.
331. Xiang Z., Qu F., Wang F., Li J., Zhang Y., Yu Z. Characteristic and functional analysis of a ficolin-like protein from the oyster *Crassostrea hongkongensis* // Fish Shellfish Immunol. 2014. Vol. 40, № 2. P. 514–523.
332. Xin L., Zhang H., Du X., Li Y., Li M., Wang L. et al. The systematic regulation of oyster CgIL17-1 and CgIL17-5 in response to air exposure // Dev. Comp. Immunol. 2016. Vol. 63. P. 144–155.
333. Xing J., Jiang J., Zhan W. Phenoloxidase in the scallop *Chlamys farreri*: purification and antibacterial activity of its reaction products generated in vitro // Fish Shellfish Immunol. 2012. Vol. 32, № 1. P. 89–93.
334. Xiong X., Li C., Zheng Z., Du X. Novel globular C1q domain-containing protein (PmC1qDC-1) participates in shell formation and responses to pathogen-associated molecular patterns stimulation in *Pinctada fucata martensii*: 1 // Sci Rep. Nature Publishing Group, 2021. Vol. 11, № 1. P. 1105.
335. Xu T., Xie J., Li J., Luo M., Ye S., Wu X. Identification of expressed genes in cDNA library of hemocytes from the RLO-challenged oyster, *Crassostrea ariakensis* Gould with special functional implication of three complement-related fragments (CaC1q1, CaC1q2 and CaC3) // Fish Shellfish Immunol. 2012a. Vol. 32, № 6. P. 1106–1116.
336. Xu T., Yang S., Xie J., Ye S., Luo M., Zhu Z. et al. HMGB in mollusk *Crassostrea ariakensis* Gould: structure, pro-inflammatory cytokine function characterization and anti-infection role of its antibody // PLoS ONE. 2012b. Vol. 7, № 11. P. e50789.
337. Xu W., Faisal M. Defensin of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): molecular structure, in vitro expression, antimicrobial activity, and potential functions // Mol. Immunol. 2010. Vol. 47, № 11–12. P. 2138–2147.

338. Xue Q.-G., Itoh N., Schey K.L., Li Y.-L., Cooper R.K., La Peyre J.F. A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of i-type lysozymes // Cell. Mol. Life Sci. 2007. Vol. 64, № 1. P. 82–95.
339. Xue Q.-G., Waldrop G.L., Schey K.L., Itoh N., Ogawa M., Cooper R.K. et al. A novel slow-tight binding serine protease inhibitor from eastern oyster (*Crassostrea virginica*) plasma inhibits perkinsin, the major extracellular protease of the oyster protozoan parasite *Perkinsus marinus* // Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. 2006. Vol. 145, № 1. P. 16–26.
340. Yabe R., Suzuki R., Kuno A., Fujimoto Z., Jigami Y., Hirabayashi J. Tailoring a Novel Sialic Acid-Binding Lectin from a Ricin-B Chain-like Galactose-Binding Protein by Natural Evolution-Mimicry // The Journal of Biochemistry. 2007. Vol. 141, № 3. P. 389–399.
341. Yamaura K., Takahashi K.G., Suzuki T. Identification and tissue expression analysis of C-type lectin and galectin in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* // Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. 2008. Vol. 149, № 1. P. 168–175.
342. Yang C., Wang L., Zhang H., Wang L., Huang M., Sun Z. et al. A new fibrinogen-related protein from *Argopecten irradians* (AiFREP-2) with broad recognition spectrum and bacteria agglutination activity // Fish Shellfish Immunol. 2014. Vol. 38, № 1. P. 221–229.
343. Yang J., Huang M., Zhang H., Wang L., Wang H., Wang L. et al. CfLec-3 from scallop: an entrance to non-self recognition mechanism of invertebrate C-type lectin // Sci Rep. 2015. Vol. 5. P. 10068.
344. Yang J., Luo J., Zheng H., Lu Y., Zhang H. Cloning and transcriptional analysis of two sialic acid-binding lectins (SABLs) from razor clam *Solen grandis* // Fish Shellfish Immunol. 2012. Vol. 32, № 4. P. 578–585.
345. Yang J., Luo J., Zheng H., Lu Y., Zhang H. Cloning of a big defensin gene and its response to *Vibrio parahaemolyticus* challenge in the noble scallop *Chlamys nobilis* (Bivalve: Pectinidae) // Fish Shellfish Immunol. 2016. Vol. 56. P. 445–449.
346. Yang J., Wei X., Liu X., Xu J., Yang D., Yang J. et al. C-type lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-1) mediating immune recognition and opsonization // PLoS ONE. 2011. Vol. 6, № 2. P. e17089.
347. Yang X., Wu L., Duan X., Cui L., Luo J., Li G. Adenovirus Carrying Gene Encoding *Haliotis discus discus* Sialic Acid Binding Lectin Induces Cancer Cell Apoptosis: 7 // Marine Drugs. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2014. Vol. 12, № 7. P. 3994–4004.
348. Yang Z., Li J., Li Y., Wu H., Wang X. Molecular cloning and functional characterization of a short peptidoglycan recognition protein (HcPGRPS1) from the freshwater mussel, *Hyriopsis cumingii* // Mol. Immunol. 2013. Vol. 56, № 4. P. 729–738.
349. Yoshimizu M., Kimura T. Study on the intestinal microflora of salmonids // Fish pathology. 1976. Vol. 10, № 2. P. 243–259.

350. Yoshino T.P., Dinguirard N., Kunert J., Hokke C.H. Molecular and functional characterization of a tandem-repeat galectin from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of the human blood fluke *Schistosoma mansoni* // Gene. 2008. Vol. 411, № 1–2. P. 46–58.
351. Yu J.-H., Choi M.-C., Park K.-I., Park S.-W. Effects of anoxia on immune functions in the surf clam *Macra veneriformis* // Zoological Studies. 2010. Vol. 49, № 1. P. 94–101.
352. Yu Q., Yang D., Wang Q., Zhang Y., Cong M., Wu H. et al. Molecular characterization, expression and functional analysis of two Kazal-type serine protease inhibitors from *Venerupis philippinarum* // Fish Shellfish Immunol. 2017. Vol. 70. P. 156–163.
353. Yue X., Liu B., Xue Q. An i-type lysozyme from the Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* potentially functioning in host immunity // Fish Shellfish Immunol. 2011. Vol. 30, № 2. P. 550–558.
354. Yurchenko O.V., Vaschenko M.A. Morphology of spermatogenic and accessory cells in the mussel *Modiolus kurilensis* under environmental pollution // Mar. Environ. Res. 2010. Vol. 70, № 2. P. 171–180.
355. Zannella C., Mosca F., Mariani F., Franci G., Folliero V., Galdiero M. et al. Microbial Diseases of Bivalve Mollusks: Infections, Immunology and Antimicrobial Defense // Mar Drugs. 2017. Vol. 15, № 6.
356. Zelensky A.N., Gready J.E. The C-type lectin-like domain superfamily // FEBS J. 2005. Vol. 272, № 24. P. 6179–6217.
357. Zhang D., Jiang S., Hu Y., Cui S., Guo H., Wu K. et al. A multidomain galectin involved in innate immune response of pearl oyster *Pinctada fucata* // Dev. Comp. Immunol. 2011a. Vol. 35, № 1. P. 1–6.
358. Zhang D., Ma J., Jiang J., Qiu L., Zhu C., Su T. et al. Molecular characterization and expression analysis of lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding protein (LGBP) from pearl oyster *Pinctada fucata* // Mol. Biol. Rep. 2010. Vol. 37, № 7. P. 3335–3343.
359. Zhang H., Song L., Li C., Zhao J., Wang H., Qiu L. et al. A novel C1q-domain-containing protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri* with lipopolysaccharide binding activity // Fish Shellfish Immunol. 2008. Vol. 25, № 3. P. 281–289.
360. Zhang H., Wang L., Song L., Song X., Wang B., Mu C. et al. A fibrinogen-related protein from bay scallop *Argopecten irradians* involved in innate immunity as pattern recognition receptor // Fish Shellfish Immunol. 2009. Vol. 26, № 1. P. 56–64.
361. Zhang L., Li L., Guo X., Litman G.W., Dishaw L.J., Zhang G. Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome // Sci Rep. 2015. Vol. 5. P. 8693.

362. Zhang L., Li L., Zhu Y., Zhang G., Guo X. Transcriptome analysis reveals a rich gene set related to innate immunity in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) // Mar. Biotechnol. 2014a. Vol. 16, № 1. P. 17–33.
363. Zhang T., Qiu L., Sun Z., Wang L., Zhou Z., Liu R. et al. The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus* // Dev. Comp. Immunol. 2014b. Vol. 45, № 1. P. 141–150.
364. Zhang Y., He X., Li X., Fu D., Chen J., Yu Z. The second bactericidal permeability increasing protein (BPI) and its revelation of the gene duplication in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* // Fish Shellfish Immunol. 2011b. Vol. 30, № 3. P. 954–963.
365. Zhang Y., Li J., Yu F., He X., Yu Z. Allograft inflammatory factor-1 stimulates hemocyte immune activation by enhancing phagocytosis and expression of inflammatory cytokines in *Crassostrea gigas* // Fish Shellfish Immunol. 2013. Vol. 34, № 5. P. 1071–1077.
366. Zhao J., Li C., Chen A., Li L., Su X., Li T. Molecular characterization of a novel big defensin from clam *Venerupis philippinarum* // PLoS ONE. 2010a. Vol. 5, № 10. P. e13480.
367. Zhao J., Qiu L., Ning X., Chen A., Wu H., Li C. Cloning and characterization of an invertebrate type lysozyme from *Venerupis philippinarum* // Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. 2010b. Vol. 156, № 1. P. 56–60.
368. Zhao J., Song L., Li C., Zou H., Ni D., Wang W. et al. Molecular cloning of an invertebrate goose-type lysozyme gene from *Chlamys farreri*, and lytic activity of the recombinant protein // Mol. Immunol. 2007. Vol. 44, № 6. P. 1198–1208.
369. Zhao L.-L., Jin M., Li X.-C., Ren Q., Lan J.-F. Four C1q domain-containing proteins involved in the innate immune response in *Hyriopsis cumingii* // Fish Shellfish Immunol. 2016. Vol. 55. P. 323–331.
370. Zheng C., Terreni M., Sollogoub M., Zhang Y. Ganglioside GM3 and Its Role in Cancer // Current Medicinal Chemistry. 2019. Vol. 26, № 16. P. 2933–2947.
371. Zheng P., Wang H., Zhao J., Song L., Qiu L., Dong C. et al. A lectin (CfLec-2) aggregating *Staphylococcus haemolyticus* from scallop *Chlamys farreri* // Fish Shellfish Immunol. 2008. Vol. 24, № 3. P. 286–293.
372. Zhou L., Li M., Zhong Z., Chen H., Wang X., Wang M. et al. Biochemical and metabolic responses of the deep-sea mussel *Bathymodiolus platifrons* to cadmium and copper exposure // Aquat Toxicol. 2021. Vol. 236. P. 105845.
373. Zhu L., Song L., Chang Y., Xu W., Wu L. Molecular cloning, characterization and expression of a novel serine proteinase inhibitor gene in bay scallops (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) // Fish Shellfish Immunol. 2006. Vol. 20, № 3. P. 320–331.

374. Zhu L., Song L., Xu W., Qian P.-Y. Identification of a C-type lectin from the bay scallop *Argopecten irradians* // Mol. Biol. Rep. 2009. Vol. 36, № 5. P. 1167–1173.
375. Zhu L., Song L., Xu W., Qian P.-Y. Molecular cloning and immune responsive expression of a novel C-type lectin gene from bay scallop *Argopecten irradians* // Fish Shellfish Immunol. 2008. Vol. 25, № 3. P. 231–238.
376. Zimmer R.K., Ferrier G.A., Kim S.J., Ogorzalek Loo R.R., Zimmer C.A., Loo J.A. Keystone predation and molecules of keystone significance // Ecology. 2017. Vol. 98, № 6. P. 1710–1721.