

СОКОЛЬНИКОВА

Юлия Николаевна

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

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Владивосток – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Дальневосточный федеральный университет»

Научный руководитель:

кандидат биологических наук **Кумейко Вадим Владимирович**

Официальные оппоненты:

Присный Андрей Андреевич, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», заведующий кафедрой биологии

Андреева Александра Юрьевна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН», старший научный сотрудник Отдела физиологии животных и биохимии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук

Защита диссертации состоится «15» июня 2021 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041 г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17

Факс: (423) 2310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук: <http://www.imb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/sovet-d-005-008-01/53-sokolnikova-yuliya-nikolaevna>

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук

Ващенко

Ващенко Марина Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Двустворчатые моллюски – одни из наиболее массовых представителей морской фауны бентосных сообществ, многие из которых являются ценными объектами промысла и аквакультуры. Под влиянием неблагоприятных факторов среды происходит напряжение их адапционных и защитных систем, и как следствие снижаются темпы роста и развития, повышаются заболеваемость и смертность. Для оперативной оценки экологической безопасности и сохранения биоразнообразия, а также развития морских хозяйств, требуются простые и надежные технологии диагностики состояния здоровья морских гидробионтов и среды их обитания. В настоящее время методы контроля физиологического состояния морских организмов недостаточно хорошо развиты, что связано с отсутствием четких критериев проведения подобных работ и недостатком сведений о границах нормы и патологии. Гемолимфа моллюсков, отвечающая за формирование физиологических адаптаций, поддержание гомеостаза и обеспечение иммунной защиты, выступает в качестве одного из наиболее перспективных и доступных объектов для диагностики здоровья этих организмов.

Степень разработанности темы. В течение последних двух десятилетий разнообразные гистологические параметры органов рыб и двустворчатых моллюсков были исследованы и использованы в качестве биомаркеров качества окружающей среды и состояния здоровья организмов (Cajaraville et al., 1992; Au, 2004; Marigomez et al., 2006; Schettino et al., 2012), некоторые из которых успешно применяются в крупных национальных и международных программах мониторинга (Kumeiko et al., 2018). Однако данный подход позволяет регистрировать изменения в основном на поздних стадиях их развития. В ряде работ показано, что при каких-либо нарушениях в организме, даже не выраженных на тканевом уровне, в первую очередь происходит изменение характеристик гемоцитов, их мобилизация и миграция к органу, испытывающему наибольшую нагрузку со стороны повреждающего фактора (Allam et al., 2000; Sheir et al., 2010). Проявляемая в данном случае лабильность гематологических параметров отражает высокую степень их чувствительности и реактивности, что является первоочередным требованием, предъявляемым к подобным индикаторам для диагностики здоровья. К тому же большинство иммунологических методов являются количественными, что особенно важно для установления зависимости между дозой, эффектом и временем воздействия на организм. Таким образом, комплексный учет иммунологических и гистоморфологических показателей, наиболее достоверно отражающих физиологическое состояние моллюсков, может обеспечить наиболее релевантную и интегральную характеристику здоровья морских организмов (Au, 2004; Montaudouin et al., 2010; Bignell et al., 2011; Matozzo et al., 2018).

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлся анализ клеточных защитных реакций в диагностике здоровья двустворчатых моллюсков *Modiolus kurilensis*. Для достижения цели были поставлены задачи:

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

Научная новизна. Впервые выполнена идентификация гемоцитов *M. kurilensis*, основанная не только на морфологических критериях, но и учитывающая комплекс морфофункциональных признаков, в результате которой были описаны четыре типа клеток гемолимфы, характеризующиеся исключительными признаками: гемобласты, агранулоциты, базофильные и эозинофильные гранулоциты.

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

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

В результате данной работы разработан простой и универсальный способ оценки здоровья двустворчатых моллюсков, выраженный в виде интегрального индекса здоровья (ИИЗ), основанный на нормализации и интеграции достоверно различающихся между исследуемыми выборками параметров физиологического состояния моллюсков.

Из тканей морфологически атипичных *M. kurilensis* была впервые изолирована в чистом виде культура зеленой микроводоросли *Coccomyxa parasitica*. Благодаря впервые проведенному комбинированному анализу апоптоза, гистопатологических и иммунных

характеристик у естественно и экспериментально зараженных *C. parasitica* моллюсков был подтвержден паразитический статус данной микроводоросли.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные результаты содержат важные фундаментальные сведения, которые пополняют знания о системе врожденного иммунитета беспозвоночных. Важнейшим значением работы является практический результат, описывающий референсные значения морфофункциональных параметров гемоцитов моллюсков в норме и их изменение при различных патогенетических процессах (инфицировании, потере гемолимфы, хроническом загрязнении, гистопатологии, паразитарной инвазии). Описанная динамика иммунного ответа при моделируемом инфицировании может быть полезной в разработке мер, направленных на повышение резистентности двустворчатых моллюсков к различным патогенам. Полученные данные об иммунном статусе моллюсков во время моделируемой потери гемолимфы могут быть полезны в прогнозе вероятных осложнений, связанных с развитием инфекций на фоне травмы еще до их клинического проявления, и в своевременном применении методов профилактической и лечебной иммунокоррекции.

Разработанный интегральный индекс здоровья является эффективным инструментом оценки здоровья как отдельных особей, так и целых популяций, и его можно применять для динамического наблюдения за состоянием моллюсков и среды их обитания.

Кроме того, результаты работы пополняют фундаментальные сведения о структуре и функционировании симбиоза между двустворчатыми моллюсками и микроводорослями. Практическая значимость данной части работы заключается в разработке комплексного методического подхода выделения и поддержания постоянной культуры паразитических микроводорослей *C. parasitica*.

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

Методология и методы диссертационного исследования. В данном диссертационном исследовании применены классические и современные методы клеточной биологии. Для оценки морфофункциональных параметров гемоцитов моллюсков применяли комплекс методик, основанных на цитохимических окрасках и ультраструктурном анализе клеточных фракций гемолимфы, полученных в ходе центрифугирования в градиенте плотности среды. Для оценки иммунного, гистопатологического и паразитарного статуса применяли стандартные иммунологические, гистологические и молекулярные методики

обработки и анализа материала с некоторыми модификациями. Следующий этап включал проверку результатов на предмет их аналитической ценности, статистической достоверности, корреляционных взаимосвязей и, в конечном итоге, выявление референсных границ показателей и их вероятные патологические значения. Далее, используя математико-статистические методы анализа, был разработан ИИЗ.

Положения, выносимые на защиту:

1. В гемолимфе *M. kurilensis* присутствуют четыре типа гемоцитов, характеризующихся исключительными морфофункциональными признаками: гемобласты, агранулоциты, эозинофильные и базофильные гранулоциты.
2. Морфофункциональные параметры гемоцитов *M. kurilensis*, такие как число гемоцитов, фагоцитарная активность, доля клеток с активными формами кислорода являются надежными и высокочувствительными показателями физиологического состояния моллюсков.
3. Разработанный интегральный индекс здоровья (ИИЗ) применим как для оценки иммунного статуса, так и при количественном гистопатологическом анализе, но более эффективен в комбинированной форме. ИИЗ обеспечивает унифицированную количественную характеристику, не зависящую от оператора, и служит валидным диагностическим инструментом идентификации различных патогенетических процессов.

Степень достоверности результатов. Достоверность полученных результатов обеспечивается их релевантностью поставленным задачам, репрезентативностью выборок экспериментальных животных, применением адекватных методов исследования, корректной обработкой данных с помощью современных методов математико-статистического анализа, валидизацией и воспроизводимостью разработанных технологий, фактологическим материалом в виде рисунков и таблиц, а также согласованностью полученных данных ранее опубликованным научным работам. Кроме того, большая часть полученных в ходе выполнения диссертационной работы результатов опубликована в рецензируемых международных научных изданиях, реферируемых базами данных Scopus, Web of Science и РИНЦ, и представлена на конференциях различного уровня.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на международных конференциях: «Научно-технологические разработки в области изучения и мониторинга морских биологических ресурсов» (Россия, 2017), «Unique Marine Ecosystems: Modern Technologies of Exploration and Conservation for Future Generations» (Россия, 2016), «Asian-Pacific Aquaculture» (Вьетнам, 2013), «AQUA 2012» (Чехия, 2012), «Physiomar12» (Испания, 2012), «Международный научный форум студентов, аспирантов и молодых ученых стран Азиатско-Тихоокеанского региона 2012» (Россия, 2012); на всероссийских

конференциях: Научно-практическая конференция «Наука о море в интересах России» (Владивосток, 2018), Всероссийская конференция «Научное обеспечение развития товарной аквакультуры до 2030 г.» (Москва, 2017), Вторая Всероссийская научная молодежная конференция-школа «Проблемы экологии морского шельфа» (Владивосток, 2010), Всероссийская научная школа для молодежи «Перспективы развития инноваций в биологии» (Владивосток, 2009), Научная конференция, посвященная 70-летию С.М. Коновалова «Современное состояние водных биоресурсов» (Владивосток, 2008); на региональных конференциях: «Региональная научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых учёных по естественным наукам» (Владивосток, 2016), «Региональная конференция студентов, аспирантов и научных организаций Дальнего Востока России «Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии»» (Владивосток, 2008–2012).

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

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

Личный вклад автора. Автор лично выполнял всю экспериментальную работу, осуществлял анализ полученных результатов, а также написание диссертации. Подготовка и написание основных публикаций проводилась с соавторами.

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

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

На первом этапе работы были изучены морфофункциональные особенности клеток гемолимфы широко распространенных в Японском море двустворчатых моллюсков *M. kurilensis*. На втором этапе исследования были определены границы вариативности показателей клеточного иммунитета моллюсков в условиях нормы для их дальнейшего использования в качестве инструмента диагностики физиологического состояния. Последующие этапы работы включали оценку изменения показателей иммунитета в условиях стресса (естественное изменение физико-химических параметров среды, инфицирование, травмирование, хроническое загрязнение среды, наличие гистопатологий и паразитарная инвазия). Завершающим этапом работ являлась разработка инструмента диагностики здоровья двустворчатых, основанного на интеграции исследуемых параметров и количественной оценке физиологического статуса моллюсков.

Исследование морфофункциональных особенностей клеточных популяций гемолимфы *M. kurilensis*. У моллюсков, выловленных из залива Восток, из синуса заднего мускула-аддуктора шприцом брали гемолимфу и фракционировали ее методом изопикнического центрифугирования в ступенчатом градиенте плотности разделяющей среды Percoll (Sigma-Aldrich, США). Для ультраструктурного анализа аликвоту полученных клеточных фракций заливали в смесь смол и анализировали на трансмиссионном электронном микроскопе Zeiss LIBRA 120 (Carl Zeiss, Германия). Из другой аликвоты готовили препараты, которые окрашивали по стандартной методике (Роскин, Левинсон, 1957) эозин–метиленовым синим по Май-Грюнвальду для общего морфологического анализа, прочным зеленым (рН 2,2 и 8,5) для выявления кислых и основных белков, суданом чёрным В на липиды, по Моури и кармином по Бесту для определения различных групп полисахаридов. Для выявления пролиферативной активности использовали метод включения 5-бromo-2-дезоксисуридина (БДУ) (MP Biomedicals, США) в ДНК, для изучения актиновых микрофиламентов – окраску родамин–фаллоидином (Thermo Fisher Scientific, США), для выявления лизосом – акридиновым оранжевым (Sigma-Aldrich, США), для оценки содержания активных форм кислорода (АФК) – CellROX Orange Reagent (Thermo Fisher Scientific, США). Для выявления миелопероксидазы (МПО), кислой (КФ) и щелочной (ЩФ) фосфатаз получали супернатанты лизатов клеточных фракций, цельной гемолимфы и гемоцитов, которые использовали в специфических реакциях (Xing et al., 2008). Для оценки фагоцитарного статуса к адгезированным на стекле гемоцитам добавляли термически

инактивированных и маркированных флуоресцеин-5-изотиоцианатом (изомер I ФИТЦ (FITC), MP Biomedicals, США) бактерий *Staphylococcus* sp. (№ 636), выделенных из гидробионтов и любезно предоставленных старшим научным сотрудником лаборатории морской микробиоты ННЦМБ ДВО РАН И.А. Беленовой.

Оценку состояния клеточного иммунитета *M. kurilensis* при нормальных условиях проводили у животных, выловленных из условно фоновых акваторий (бухты Троицы, бухты Киевка и залива Восток). Исследования годовой вариативности параметров фагоцитоза проводили на животных, собранных в заливе Восток. Поскольку достоверные различия исследуемых показателей в межгодовой динамике отсутствовали и варьировали в пределах средних значений показателей из других условно фоновых акваторий, то в качестве референсной группы в дальнейшем использовали выборку именно из залива Восток. Анализ сезонной вариативности морфофункциональных параметров в естественно изменяющихся физико-химических условиях среды проводили на животных, собранных в течение года (примерно каждые 45–50 сут) из залива Восток. У животных оценивали концентрацию гемоглобина, фагоцитарную активность (ФА) и АФК. Для автоматизации процесса анализа реакцию фагоцитоза проводили в черных планшетах на планшетном флуориметре DTX 880 (Bekman Coulter, США). Для исследования активности кислородзависимой противомикробной системы использовали метод восстановления нитросинего тетразолия-п (хлорида) до диформаза (НСТ-тест) (Sigma-Aldrich, США) и окраску 3,3-диаминобензидинтетрахлоридом (ДАБ) (Sigma-Aldrich, США).

Исследование краткосрочного стрессового воздействия на *M. kurilensis* в виде бактериальной инфекции или острой кровопотери осуществляли в моделируемых лабораторных условиях на моллюсках из залива Восток. При инфекционном процессе экспериментальным животным шприцом в задний мускул-аддуктор вводили инактивированных бактерий *Staphylococcus* sp., меченых родамина В изотиоцианатом (РИТЦ) (RITC, ICN Biomedicals, Inc., США), а контрольным – стерильную морскую воду того же объема. У всех животных непосредственно перед инъекцией производили отбор 500 мкл гемолимфы, который являлся показателем исходного состояния до введения антигена. Травмирование осуществляли взятием у другой группы животных 5 мл гемолимфы из заднего мускула-аддуктора, а у контрольных – 300 мкл гемолимфы. После этого животных всех групп маркировали и помещали в отдельные аквариумы. Через определенные временные промежутки (от 3 ч до 336 ч) у них повторно брали гемолимфу для оценки состояния иммунной системы уже после воздействия.

Определение физиологического статуса *M. kurilensis*, подверженных хроническому стрессу, проводили на животных из импактной акваторий –

Спортивной гавани и залива Восток, у которых количественно оценивали 12 иммунных показателей и 22 гистопатологических параметра состояния почек и ПВЖ. Далее в соответствии с концепцией о биологическом значении каждого изменения (т.е., значимости) и его распространения (т.е., выраженности) оценивали индивидуальный индекс гистопатологического состояния (гистопатологический индекс – ГИ) моллюсков (Bernet et al., 1999; Costa et al., 2013).

Для исследования физиологического состояния *M. kurilensis*, зараженных зеленой микроводорослью, моллюсков вылавливали из эвтрофицированной бухточки Подсобной бухты Средняя залива Восток. Для выделения эндобионта гемолимфу и фрагменты мантии зараженных животных механически гомогенизировали и лизировали трипсином (tissue culture grade, 1:250, Difco, Invitrogen, США), а полученный гомогенат центрифугировали в градиенте Percoll. Аликвоту очищенной таким образом суспензии микроводорослей использовали для ультраструктурного и генетического анализа. Декодированная почти полная последовательность (1728 н.п.) гена 18S рРНК зеленых микроводорослей *S. parasitica*, заражающих *M. kurilensis*, депонирована в European Nucleotide Archive под номером LN879479. Для получения и описания культуры *Coccomyxa* инокулировали 150–200×10⁶ клеток водорослей в 100 мл культуральной среды f/2 и инкубировали при 20–22°C при 16/8 часовом фотопериоде под лампой 80 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹.

Для оценки физиологического статуса *M. kurilensis* на разных стадиях развития инвазии проводили гистопатологическое обследование всех органов и оценку состояния иммунитета. Для выявления апоптотических и некротических гемоцитов применяли двойное окрашивание аннексином V-FITC и пропидия иодидом (PI) согласно протоколу производителя (Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC и PI, Thermo Fisher Scientific, США). Для определения путей проникновения микроводорослей в *M. kurilensis* моллюсков содержали в течение двух недель в морской воде с *S. parasitica* (в расчете 100–200×10⁹ клеток/особь). Затем под флуоресцентным микроскопом анализировали криосрезы всех тканей и органов животных, зараженных как в естественных, так и в лабораторных условиях.

Статистический анализ был выполнен при помощи непараметрической статистики. Для оценки различий между независимыми выборками применяли критерий Краскела–Уоллиса и парный критерий Манна–Уитни, для оценки различий между зависимыми выборками – критерий Уилкоксона. Корреляционные связи анализировали с помощью рангового коэффициента корреляции Спирмена R ($p < 0,05$). Все данные в работе представлены как среднее значение ± доверительный интервал (95%).

Результаты и обсуждение

Клеточный состав гемолимфы *M. kurilensis*. Анализ гемолимфы показал, что содержание гемоцитов у моллюсков варьирует в пределах $1,77 \pm 0,16 \times 10^6$ кл/мл и, как у всех митилид (Pipe, 1990; Wootton et al., 2003; Tame et al., 2015), преобладающим морфотипом являются гранулоциты ($85,79 \pm 0,97\%$), что согласуется с ранее проведенным цитометрическим анализом Анисимовой (2012) и Гринченко с соавторами (2014). В результате фракционирования в Percoll были выделены 4 популяции клеток (Рисунок 1). Самой малочисленной группой клеток были слабо базофильные малодифференцированные мелкие ($5,81 \pm 1,54$ мкм) с БДУ-положительным ядром гемоциты фракции 0–10%, которые в своей цитоплазме кроме митохондрий и рибосом практически ничего не содержали и не проявляли никакой иммунной реактивности, и которые мы отнесли к гемобластам (ювенильным гемоцитам), как это сделали ранее другие авторы (Hine, 1999). Другие агранулярные клетки ($23,74 \pm 3,64$ мкм) располагались в основном во фракции 30–40%: в их цитоплазме не обнаружено каких-либо везикул, но она вся была равномерно заполнена хорошо развитым белоксинтезирующим аппаратом, полисомами, гладким ретикулюмом и митохондриями. Несмотря на то, что цитоплазма этих клеток практически не окрашивалась по Май-Грюнвальду, они давали наиболее выраженную реакцию на МПО, кислые белки, гликоген и нейтральные полисахариды. Эти клетки проявляли умеренную ФА, поглощая наибольшее по сравнению с другими клетками число бактерий ($11,05 \pm 2,07$). В то же время, содержание АФК в них было сходно с таковым в эозинофилах, что, вероятно, свидетельствует о различиях в реактивности и выполняемых функциях (Chagot, 1989; Oubella et al., 1994; Santarem et al., 1994; Carballal et al., 1998; Terahara et al., 2006; Donaghy et al., 2015). У эозинофильных гранулоцитов ($17,13 \pm 7,23$ мкм), располагающихся во фракции 20–30%, в цитоплазме обнаружены лизосомы и множество крупных везикул с содержимым разной плотности. Эти клетки наиболее активно участвовали в фагоцитозе и имели наибольшее содержание фосфатаз, АФК, актина и лизосом, что согласуется с литературными данными о ключевой роли эозинофилов в иммунной реакции (Pipe et al., 1997; Russell-Pinto et al., 1994; Wang et al., 2017; Allam, Raftos, 2015; Tame et al., 2015). Несмотря на то, что в литературе достаточно редко сообщается о еще каком-либо типе гемоцитов у митилид (Garcia-Garcia et al., 2008; Parisi et al., 2008), в гемолимфе *M. kurilensis* нами, также как и Анисимовой (2012), были выявлены базофильные гранулоциты ($18,40 \pm 4,51$ мкм). В цитоплазме этих клеток присутствовало много стопок диктиосом аппарата Гольджи и мелких везикул с рыхлым содержимым. Низкое содержание актина, АФК и КФ, а также малая доля клеток, участвующих в фагоцитозе, их умеренная окраска акридиновым оранжевым указывают на то, что эти клетки, возможно, являются незрелыми гранулоцитами и могут представлять собой, например, переходную форму между ювенильными гемоцитами и эозинофильными гранулоцитами, или же, все-таки, быть самостоятельным клеточным типом, функция которого до конца не ясна (Noël et al., 1994; Tame et al., 2015; Sekine et al., 2016).

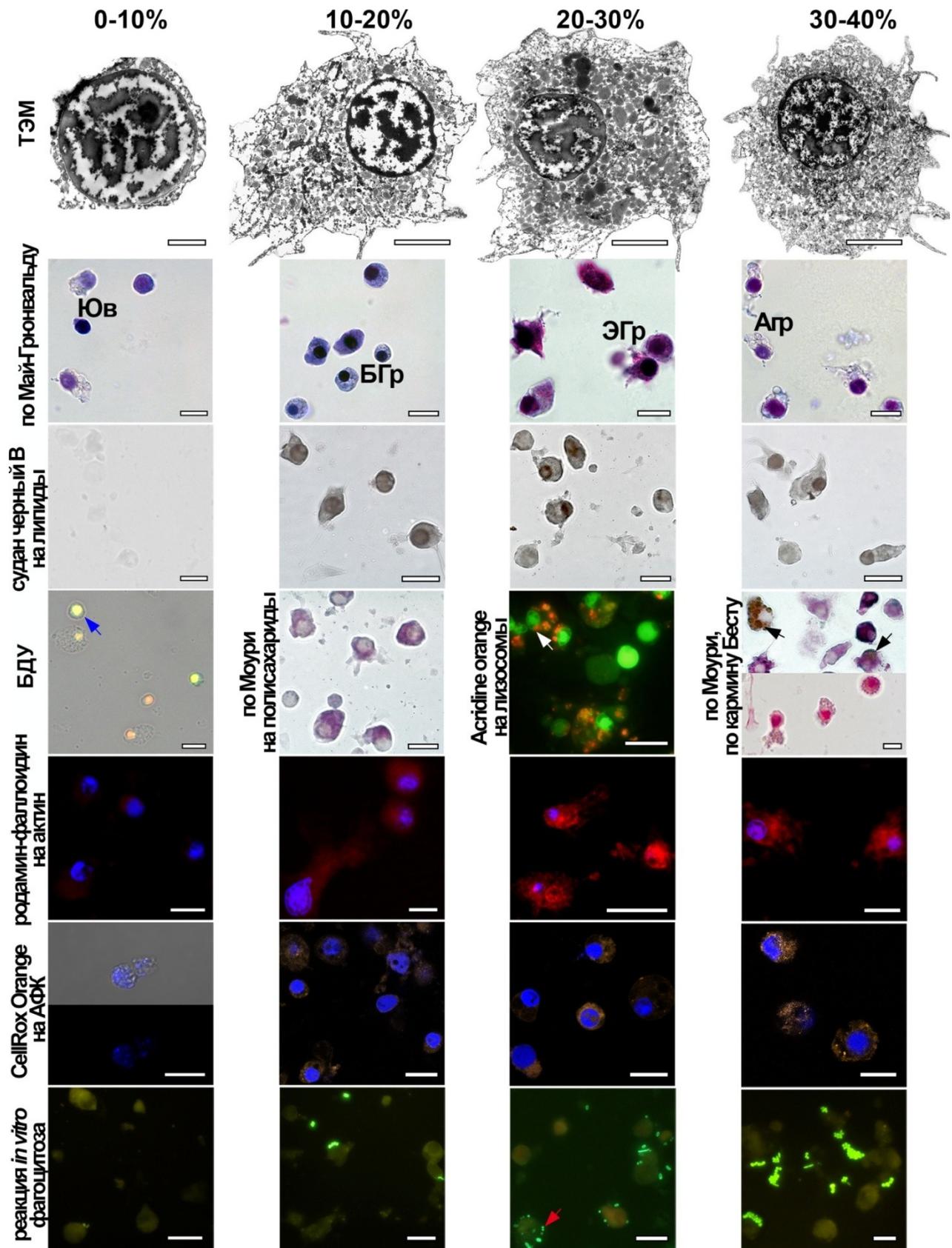


Рисунок 1. Гемоциты фракций градиента Percoll. Юв – ювенильные гемоциты, БГр – базофильные гранулоциты, ЭГр – эозинофильные гранулоциты, Агр – агранулоциты, синяя стрелка – БДУ-положительные ядра, белая стрелка – лизосомы, черные стрелки – гранулы гликогена, красная стрелка – бактерии, меченые ФИТЦ. Масштабные отрезки – 20 мкм.

Показатели клеточного иммунитета *M. kurilesis* в условиях нормы.

Флуоресцентный анализ реакций *in vitro* фагоцитоза гемоцитов моллюсков из условно фоновых акваторий Японского моря показал, что средние значения ФА достоверно не различаются и составляют для всей совокупности животных из всех акваторий $52,0 \pm 2,8\%$. Исследование влияния таких внутрипопуляционных факторов, как пол и возраст, на иммунные параметры показало снижение ФА гемоцитов у моллюсков старшего возраста и отсутствие половых различий в параметрах гемоцитов, что согласуется с ранее проведенными работами (Barracco et al., 1999; Gagne et al., 2006; Flye-Sainte-Marie et al., 2010). Анализ влияния гидрологических факторов на иммунный статус *M. kurilesis* (Рисунок 2) показал, что у моллюсков число гемоцитов и доля клеток с АФК, а также ФА имели прямую корреляцию с температурой и соленостью, а обратную – с концентрацией кислорода. Особенно сильная прямая связь между температурой и числом гемоцитов прослеживалась с января по март ($R = 0,79$). ФА показала слабую зависимость от факторов среды (R от 0 до 0,39). Наиболее сильные корреляции между иммунными параметрами обнаруживались с апреля по июнь, что, вероятно, связано с повышенной бактериальной нагрузкой в весенне-летний период и подготовкой к нересту (Ishikawa et al., 1999).

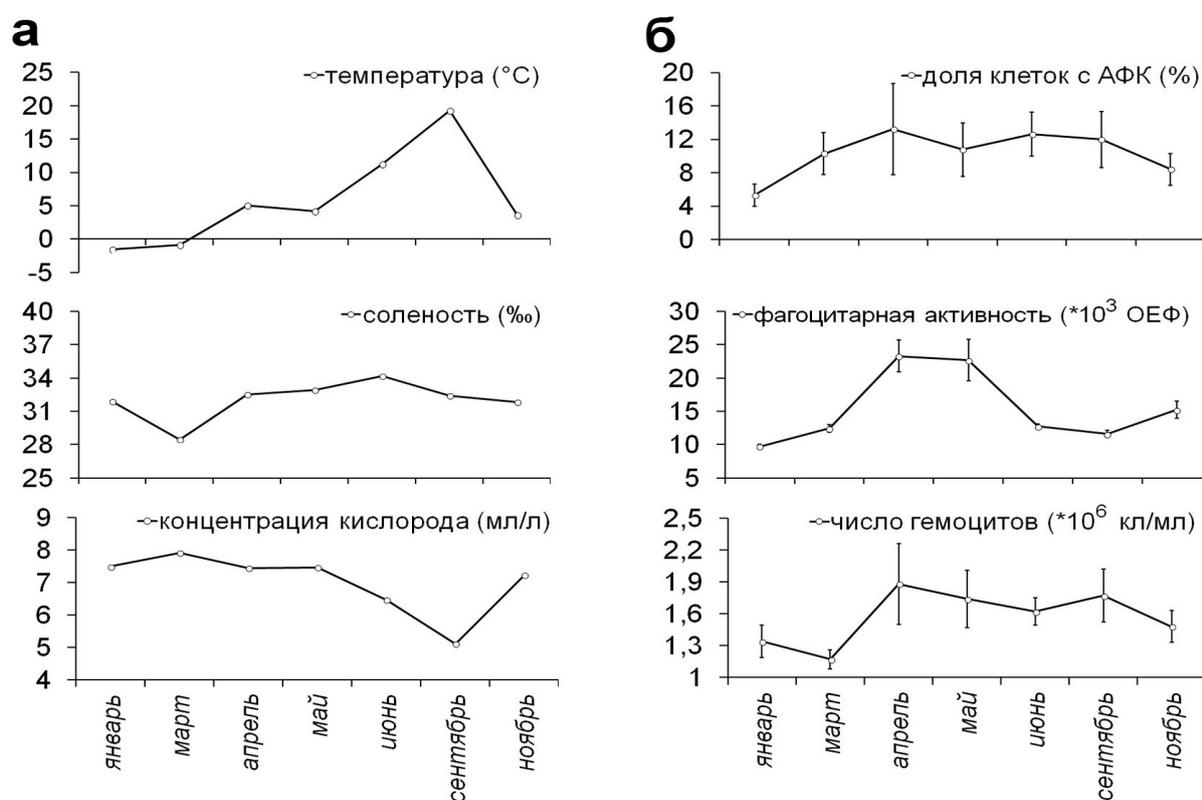


Рисунок 2. Динамика гидрологических параметров залива Восток (а) и показателей клеточного иммунитета *M. kurilesis* (б) в течение года. Приведены средние значения \pm 95% доверительные интервалы.

Динамика показателей клеточного иммунитета при моделируемом инфицировании. Среди насущных проблем аквакультуры первое место все еще по масштабности экономического урона занимают эпизоотии (Shinn et al., 2015), что связано с малой изученностью физиологии инфицирования. Проведенный нами моделируемый эксперимент инфицирования моллюсков показал, что эффекторная стадия, сопряженная с активным поглощением гемоцитами введенного антигена *in vivo*, наступает в первые 12 ч и характеризуется достоверным снижением ФА *in vitro*. Затем клеточный ответ усиливался с ярко выраженной реакцией через 36 ч и был связан с увеличением числа гемоцитов и содержанием среди них клеток с АФК, что согласуется с ранее проведенными работами на других видах *Bivalvia* (Hartland, Timoney, 1979; Allam et al., 2000, 2002; Cong et al., 2008). Далее по мере клиренса организма от антигена в течение первых 48 ч происходило постепенное снижение клеточной активности и возвращение к исходному уровню через 72 ч.

Динамика показателей клеточного иммунитета при моделируемой острой кровопотере. Еще одной важной проблемой аквакультуры является травмирование животных при их вылове, транспортировке или культивировании (Liu et al., 2013). Несмотря на то, что скорость процесса заживления ран напрямую зависит от состояния иммунитета, каких-либо исследований у двустворчатых моллюсков в этом направлении осуществлено не было. Проведенный нами эксперимент с травмированием *M. kurilesis* показал, что в первые 6 ч происходит увеличение среди циркулирующих гемоцитов числа ювенильных клеток и, как следствие, снижение ФА. Далее, по мере дифференцировки гемоцитов, ФА повышается (до 5 сут), но полностью восстанавливается до интактного состояния к 7 сут. Периодическое повышение числа агранулоцитов в течение эксперимента может свидетельствовать об их участии как в синтезе сигнальных молекул для регуляции процессов заживления, так и в синтезе межклеточного вещества для восстановления поврежденных тканей (Cheng, 1984; Suzuki et al., 1991; Delaporte et al., 2007).

Клеточные реакции в ответ на хроническое загрязнение. Показано, что наиболее чувствительными к воздействию различной природы факторов у двустворчатых моллюсков являются гемоциты, жабры, ПВЖ, гонады и почки (Au, 2004; Marigómez et al., 2013). Наши исследования показали, что у *M. kurilesis* из импактной акватории достоверно увеличивается концентрация гемоцитов и доля среди них агранулоцитов, тогда как зернистость и размеры гранулоцитов и агранулоцитов, ФА и доля клеток с АФК снижаются (Таблица 1). Это согласуется с данными немногочисленных исследований по влиянию загрязнения в естественных условиях на иммунитет двустворчатых моллюсков *Mytilus edulis*, *Crassostrea virginica* и *Ostrea edulis* (Sami et al., 1992; Dyrzynda et al., 1997, 2000; Auffret et al., 2002; Gagnaire et al., 2007; Girón-Pérez, 2010; Gillis, 2012).

Таблица 1 – Показатели клеточного иммунитета *M. kurilensis* из залива Восток и Спортивной гавани (среднее значение \pm 95 % доверительный интервал); FSC – сигнал прямого светорассеяния, SSC – сигнал бокового светорассеяния, * – достоверность различий при $p < 0,05$.

Иммунный показатель	Залив Восток	Спортивная гавань	p
Число гемоцитов, $\times 10^6$ кл/мл	1,53 \pm 0,17	2,01 \pm 0,26	< 0,01*
Доля гранулоцитов, %	86,04 \pm 0,01	85,43 \pm 0,02	0,38
FSC гранулоцитов	3,91 \pm 0,55	3,64 \pm 0,84	< 0,01*
SSC гранулоцитов	2,34 \pm 0,63	1,95 \pm 0,64	< 0,01*
Доля агранулоцитов, %	8,78 \pm 0,01	10,18 \pm 0,01	0,04*
FSC агранулоцитов	2,01 \pm 0,16	1,95 \pm 0,32	< 0,01*
SSC агранулоцитов	0,85 \pm 0,18	0,72 \pm 0,17	0,01*
Доля гемобластов, %	2,45 \pm 0,01	2,94 \pm 0,01	0,05
Фагоцитарная активность, %	61,79 \pm 0,04	43,26 \pm 0,04	< 0,01*
Фагоцитарный индекс	6 \pm 0,55	7 \pm 1,08	0,95
Доля клеток с АФК, %	11,35 \pm 2,93	4,85 \pm 3,15	< 0,01*
Доля клеток с пероксидазой, %	2,15 \pm 0,68	2,76 \pm 1,05	0,26

Из всех существующих в современной литературе способов оценки гистопатологических изменений органов наиболее релевантным является полуколичественный подход, сформулированный Бернетом с соавторами (Bernet et al., 1999), который в дальнейшем был успешно применен на *Ruditapes decussatus* (Giltrap et al., 2016), *M. edulis* (Barmo et al., 2013; Cuevas et al., 2015; Pagano et al., 2016; Rocha et al., 2016) и *Mytilus galloprovincialis* (Costa et al., 2013) для диагностики состояния ПВЖ, жабр и гонад. Для того чтобы сделать оценку абсолютно количественной и повысить достоверность получаемых данных, мы разработали ряд формул и провели морфометрический анализ 22 гистологических параметров ПВЖ и почек. В итоге вычисленный ГИ был достоверно выше для обоих органов у животных из импактной акватории, притом наибольшая встречаемость и тяжесть патологий наблюдалась в ПВЖ (Таблица 2).

Таблица 2 – Гистопатологический индекс (ГИ) состояния почек и ПВЖ у животных из залива Восток и Спортивной гавани (среднее значение \pm 95 % доверительный интервал); * – достоверность различий при $p < 0,05$.

Индекс гистопатологического состояния	Залив Восток	Спортивная гавань	p
ГИ пищеварительной железы	0,16 \pm 0,05	0,27 \pm 0,05	< 0,01*
ГИ трубочки	0,12 \pm 0,05	0,18 \pm 0,05	0,04*
ГИ интерстициального пространства	0,19 \pm 0,07	0,34 \pm 0,10	0,02*
ГИ паразитарной инвазии	0,19 \pm 0,09	0,40 \pm 0,11	< 0,01*
ГИ почек	0,13 \pm 0,02	0,25 \pm 0,05	< 0,01*
ГИ трубочки	0,14 \pm 0,02	0,27 \pm 0,04	< 0,01*
ГИ интерстициального пространства	0,15 \pm 0,07	0,27 \pm 0,13	0,41
ГИ паразитарной инвазии	0,04 \pm 0,05	0,14 \pm 0,12	0,15
Общий ГИ (два органа)	0,15 \pm 0,02	0,26 \pm 0,04	< 0,01*
ГИ трубочки	0,13 \pm 0,03	0,22 \pm 0,04	< 0,01*
ГИ интерстициального пространства	0,17 \pm 0,04	0,31 \pm 0,09	0,04*
ГИ паразитарной инвазии	0,22 \pm 0,16	0,62 \pm 0,35	< 0,01*

Наиболее репрезентативными показателями гистопатологического статуса двустворчатых моллюсков, обитающих в условиях хронического загрязнения, являлись: кариопикноз, площадь конкреций, толщина базальной мембраны, форма нефроцитов почек, а также кариопикноз, некроз, гипервакуолизация, инфильтрация, гранулема/фиброма и инвазия ПВЖ. Иммуные параметры, такие как гранулированность клеток, их число, доля клеток с АФК, ФА, показали также наибольшее число достоверных связей с ПВЖ.

Физиологическое состояние моллюсков, зараженных *C. parasitica*. В одной из бухт залива Восток были выловлены особи *M. kurilensis* с деформированной раковиной и внутренними органами, имеющими зеленую окраску (Рисунок 3а). Ультраструктурный и генетический анализ показали присутствие в тканях моллюсков зеленой микроводоросли *C. parasitica*, которая ранее была обнаружена у модиолусов из бухты Витязь (Syasina et al., 2012), а также другими исследователями у ряда митилид в Америке и Европе (Rodríguez et al., 2008; Crespo et al., 2009; Зуков et al., 2018). Благодаря разработанной методике выделения микроводорослей из тканей хозяина нам впервые удалось получить культуру этой водоросли и пронаблюдать фазы ее развития (Рисунок 3б, в).

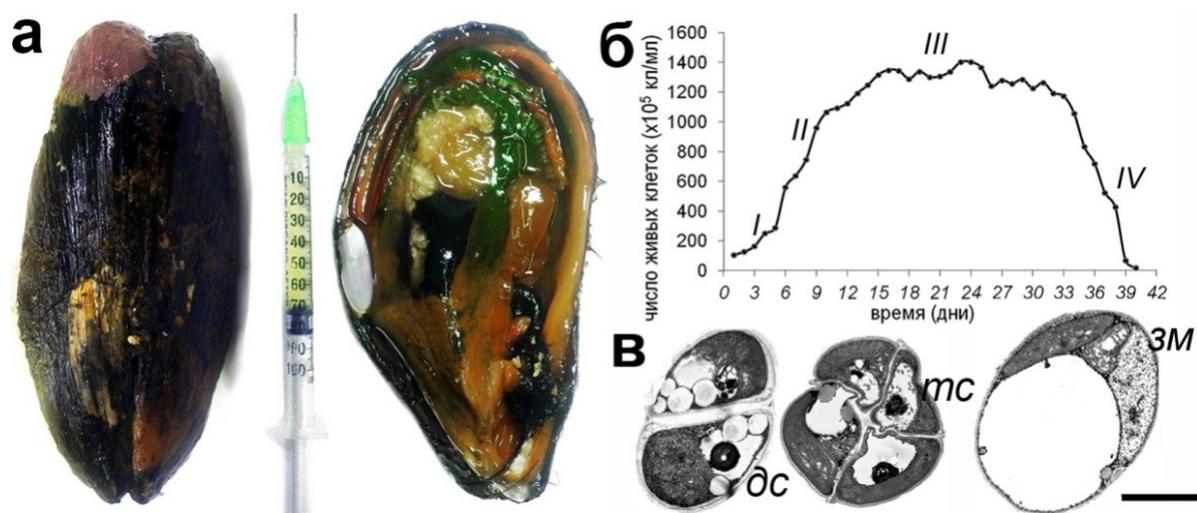


Рисунок 3. Модиолус *M. kurilensis* с деформированной раковиной, зараженный зелеными микроводорослями *C. parasitica* (а) и фазы жизненного цикла ее культуры: I – лаг-фаза, II – фаза экспоненциального роста, III – стационарная фаза роста, IV – фаза отмирания (зеленая автофлуоресценция водорослей), дс – диспора, тс – тетраспора, зв – зрелая микроводоросль. Масштабный отрезок – 2 мкм.

При детальном анализе тканей моллюсков мы выяснили, что животные различаются степенью заражения: у моллюсков без видимых аномалий микроводоросли присутствуют только в гемолимфе, далее инфильтрируются ткани задней кишки, затем заражению

подвергаются сифоны и мантия (которые становятся основным депо паразита), а затем уже – ткани гонады, почек, ПВЖ, жабр, что согласуется с ранее проведенными исследованиями (Naidu, 1970; Stevenson, South, 1974; Hartman, Pratt, 1976; Mortensen et al., 2005; Vaschenko et al., 2013; Zuykov et al., 2018). При этом инвазия вызывает наиболее существенные аномалии в мантии, а наименьшие в жабрах и гонадах, и во всех органах наблюдается инфильтрация гемоцитами (в том числе с микроводорослями) (Рисунок 4).

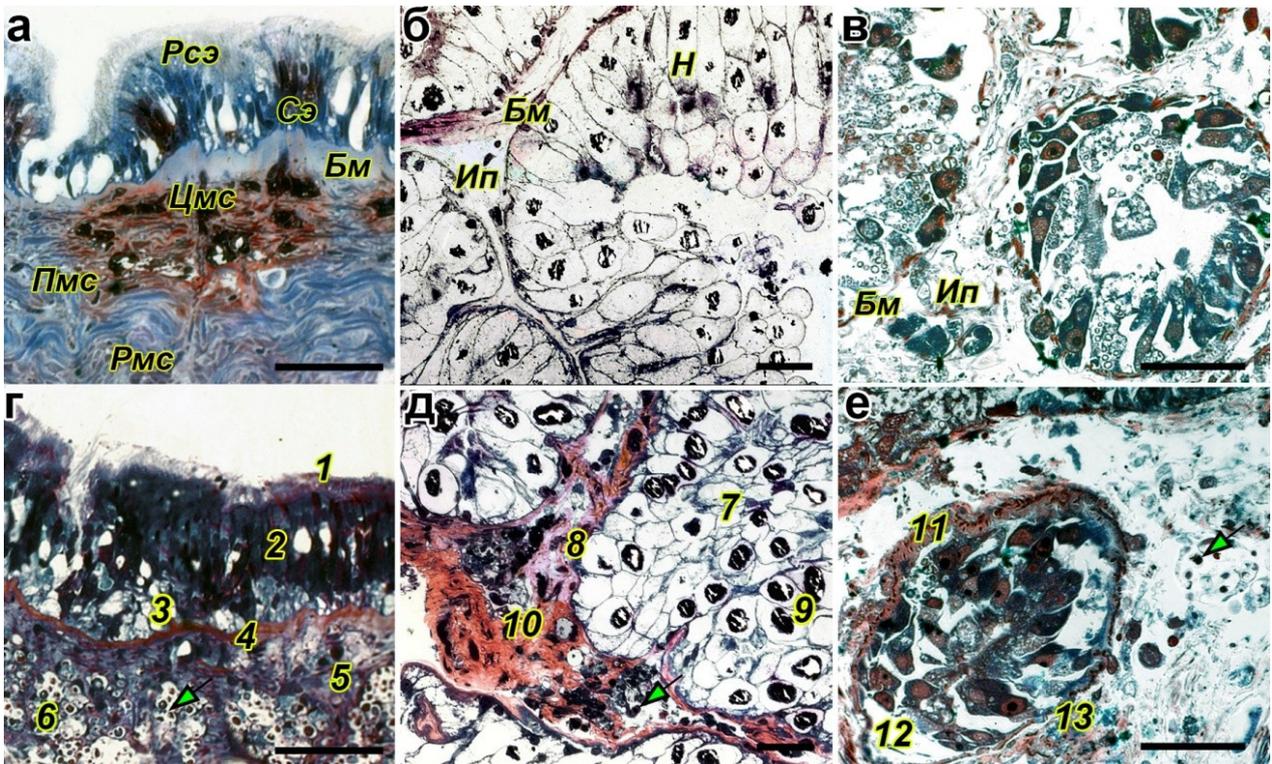


Рисунок 4. Мантия (а, г), почка (б, д) и ПВЖ (в, е) здоровых (а–в) и зараженных *Sossoutuxa* (г–е) *M. kurilensis*: Рсэ – ресничный столбчатый эпителий, Сэ – слизистый эпителий, Бм – базальная мембрана, Цмс – циркуляторный мышечный слой, Пмс – продольный мышечный слой, Рмс – радиальный мышечный слой, Ип – интерстициальное пространство, Н – нефроцит, 1 – увеличение активности слизистых клеток, 2 – сужение эпителиальных клеток, 3 – вакуолизация эпителиальных клеток, 4 – утончение базальной мембраны, 5 – деформация продольного и радиального мышечных слоев, 6 – очаг инкапсуляции водорослей гемоцитами, 7 – гиперплазия и вакуолизация нефроцитов с изменением размера и формы клеток (ошаривание и уменьшение), 8 – утолщение базальной мембраны, 9 – увеличение числа и размера конкреций, 10 – фиброз и инфильтрация интерстициального пространства гемоцитами, 11 – утолщение базальной мембраны, 12 – оголение базальной мембраны, 13 – инфильтрация гемоцитами интерстициального пространства, зеленая стрелка – микроводоросли. Масштабные отрезки – 30 мкм.

Из литературных источников известно, что при заражении некоторыми паразитами, такими как, например, *Perkinsus*, происходит супрессия иммунных функций хозяина (Pales Espinosa et al., 2014; Lau et al., 2018). В нашем случае с развитием инфекции у зараженных моллюсков понижался лишь фагоцитарный индекс (число поглощенных бактерий *in vitro*), тогда как концентрация гемоцитов, число мертвых клеток, ФА, доля клеток с АФК и пероксидазой достоверно повышались (Рисунок 5). Однако на терминальных стадиях гибель гемоцитов и выработка цитотоксических факторов снижались (апоптотический индекс был равен таковому у интактных гемоцитов).

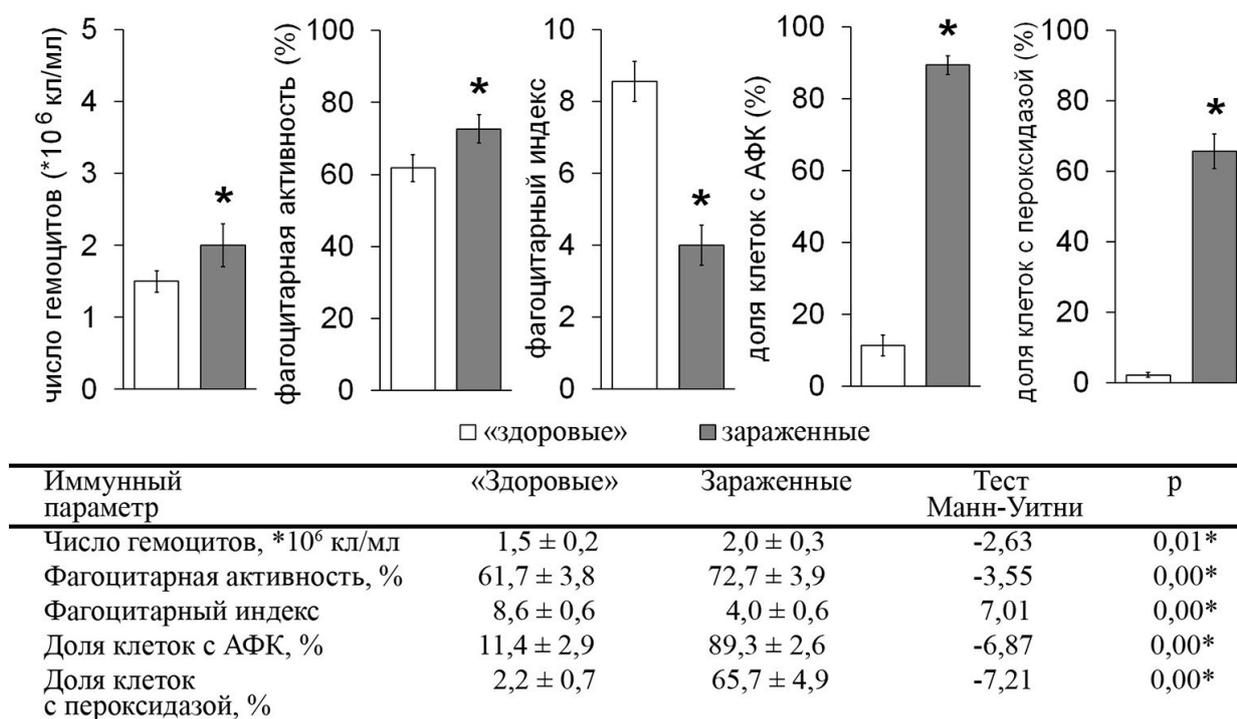


Рисунок 5. Показатели клеточного иммунитета «здоровых» *M. kurilensis* и зараженных *S. parasitica*. Гистограммы и таблица показывают средние значения ± 95 % доверительные интервалы; * – достоверность различий при $p < 0,05$.

Интегральный индекс здоровья. За последние два десятилетия возросла потребность в корректной интегральной оценке состояния организмов на разных уровнях их организации (Marigómez et al., 2013; Hook et al., 2014). И для решения этой проблемы были разработаны различные индексы. Одна из групп наиболее часто используемых индексов основывается на оценке лишь одного уровня организации организма или включает сложные математические манипуляции (индекс биомаркеров (Narbonne et al., 1999), IBR (Beliaeff, Burgeot, 2002), BAI (Broegetal., 2003; Broeg et al., 2005)), а другая базируется на присвоении полученным данным в зависимости от степени тяжести некоего ранга, что в свою очередь

уменьшает различия между переменными (НАИ (Adams et al., 1993), ВІ (Chèvre et al., 2003)). Мы предприняли попытку разработать интегральный индекс для оценки здоровья моллюсков, который бы основывался на количественных данных иммунологического и гистопатологического анализа. И поскольку оцененные нами параметры имели разные шкалы измерения, то для их интегрирования мы провели нормализацию значений по разработанной нами формуле (под цифрой 1), которая учитывает стандартное отклонение от среднего значения по всем акваториям каждого из параметров у каждой особи:

$$P = \frac{P - P_m}{sd}, \quad (1)$$

где P – нормализованное значение параметра; p – численное значение параметра для каждого моллюска; p_m – среднее значение исследуемого параметра, рассчитанное для всех выборок; sd – стандартное отклонение, рассчитанное для всех выборок. В противном случае, для сравнительного анализа было использовано объединенное значение от каждого образца для каждой выборки.

Далее полученные значения интегрировали в формулу под цифрой 2, которая и отражает интегральный индекс здоровья:

$$IHI = \frac{\sum P}{n}, \quad (2)$$

где IHI – Integral Health Index или интегральный индекс здоровья (ИИЗ); P – нормализованное значение параметра, который демонстрирует достоверные различия между выборками; n – число этих параметров.

В нашем исследовании ИИЗ, вычисленный в трех вариантах: для иммунных параметров, для гистологических параметров и для их сочетания, показал достоверные различия в каждом из случаев, но наибольшие различия наблюдались при комбинации параметров. Оценка ИИЗ у животных с разной степенью инвазии показала валидность его применения не только в случае терминальных последствий, но и при контроле динамики реакции организма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данного исследования в гемолимфе *M. kurilensis* было идентифицировано четыре морфологически и функционально различающих типа гемоцитов и установлены границы вариативности их параметров при естественно изменяющихся факторах среды, хроническом загрязнении, инфицировании, острой кровопотере, гистопатологиях и паразитарной инвазии.

Установлено, что концентрация гемоцитов, ФА и доля клеток с АФК достоверно изменяются при различных патогенетических процессах и могут быть использованы в качестве универсальных параметров для оценки клеточного иммунитета двустворчатых моллюсков. При этом в почках наблюдается кариопикноз, увеличение числа и размера конкреций, утолщение базальной мембраны и изменение формы нефроцитов, а в ПВЖ – кариопикноз, некроз, гипервакуолизация, инфильтрация, гранулема/фиброма и паразитарная инвазия. Наиболее интенсивные патологические изменения наблюдаются в ПВЖ.

Для комплексной диагностики физиологического состояния двустворчатых моллюсков был разработан интегральный индекс здоровья (ИИЗ), основанный на количественной оценке нормализованных параметров гистопатологического и иммунного статуса, имеющих достоверные различия между исследуемыми выборками. Показано, что ИИЗ применим как для оценки иммунного, так и гистопатологического статуса, но более эффективен в комбинированной форме. Данный способ отвечает всем требованиям, предъявляемым к разрабатываемым индексам, позволяет сравнивать одни из ключевых показателей физиологического состояния животных – гистопатологические и иммунологические, имеющих, как правило, разную шкалу измерений, включает исключительно проверенные биомаркеры, отражающие индуцированные изменения на разных уровнях биологической организации.

ВЫВОДЫ

1. В гемолимфе *M. kurilensis* идентифицировано четыре типа гемоцитов: мелкие недифференцированные базофильные гемобласты ($2,20 \pm 0,85$ %) с пролиферативной активностью; агранулоциты ($24,11 \pm 2,40$ %) с выраженной синтетической активностью; эозинофильные гранулоциты ($62,64 \pm 9,32$ %) с наибольшей фагоцитарной активностью; базофильные гранулоциты ($14,21 \pm 0,34$ %), обладающие сходными, но менее выраженными по сравнению с эозинофилами признаками.
2. Установлено, что у *M. kurilensis* число циркулирующих гемоцитов и доля среди них клеток с АФК не зависят от пола и возраста моллюсков, но имеют прямую корреляцию с температурой и соленостью среды, а обратную – с концентрацией кислорода, тогда как фагоцитарная активность зависит от возраста особей и имеет прямые корреляции с температурой и соленостью.
3. Выявлено, что при инфицировании *M. kurilensis* термически инактивированными бактериями *Staphylococcus*, эффекторная стадия иммунного ответа наступает в первые 12 ч и характеризуется достоверным снижением *in vitro* ФА, но повышением доли клеток с АФК, что связано с клиренсом введенного антигена в первые 48 ч, после которого

происходит снижение клеточной активности факторов гемолимфы, с постепенным возвращением к 72 ч иммунной системы к исходному состоянию.

4. Впервые описано состояние иммунитета двустворчатых моллюсков при массивной острой кровопотере, которое характеризуется у *M. kurilensis* в первые 6 ч достоверным снижением фагоцитарной активности гемоцитов и связано с увеличением среди циркулирующих клеток числа незрелых форм, а в последующие 9–120 ч – активацией гранулоцитов и восстановлением их фагоцитарной способности, что приводит клеточный иммунитет на 7 сут к исходному состоянию.
5. У животных из импактной акватории выявлено достоверное снижение степени зернистости и размера гемоцитов, их фагоцитарной активности и доли клеток с АФК, но повышение общего числа циркулирующих гемоцитов и доли среди них агранулоцитов.
6. Впервые проведенная количественная оценка гистопатологического состояния двустворчатых моллюсков показала достоверное повышение частоты встречаемости и степени выраженности у животных из импактной акватории таких изменений в почках как: кариопикноз, площадь конкреций, толщина базальной мембраны и форма нефроцитов, а в пищеварительной железе – кариопикноз, некроз, гипервакуолизация, инфильтрация, гранулема/фиброма и инвазия.
7. У *M. kurilensis*, имеющих гистопатологии, такие параметры иммунитета как гранулированность гемоцитов, их число, доля клеток с АФК, и фагоцитарная активность показали наибольшее число достоверных связей с кариопикнозом, гипервакуолизацией, изменениями интерстициального пространства и паразитарными инвазиями пищеварительной железы, а со структурными изменениями почек они коррелировали меньше и касались в основном изменения формы эпителия и инфильтрации.
8. Впервые проведенный иммунологический и гистологический анализ тканей *M. kurilensis*, зараженных микроводорослями *C. parasitica*, и показавший значительные гистоморфологические аномалии и выраженную воспалительную реакцию практически во всех органах моллюсков, достоверно подтвердил паразитический статус эндобионта.
9. У *M. kurilensis*, с повышением степени заражения *C. parasitica*, выявлено постепенное и достоверное повышение числа гемоцитов, доли среди них мертвых гемоцитов, доли клеток с АФК и пероксидазой, а также фагоцитарной активности, но снижение фагоцитарного и апоптотического индекса.
10. Разработан валидный способ оценки состояния здоровья двустворчатых моллюсков на основе количественной оценки нормализованных параметров гистопатологического и иммунного статуса, и выражаемый в виде интегрального индекса здоровья.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИСЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. **Сокольникова Ю.Н.**, Трубецкая Е.В., Беленева И.А., Гринченко А.В., Кумейко В.В. Флуоресцентный анализ реакций *in vitro* фагоцитоза как эффективный метод оценки активности гемоцитов двустворчатого моллюска *Modiolus kurilensis* (Bernard, 1983) из фоновых и импактной акваторий // Биология моря. 2015. Т. 41, № 2. С. 122–129.
2. Grinchenko A., **Sokolnikova Y.**, Korneiko D., Kumeiko V. Dynamics of the immune response of the horse mussel *Modiolus kurilensis* (Bernard, 1983) following challenge with heat-inactivated bacteria // Journal of Shellfish Research. 2015. Vol. 34, № 3. P. 909–917.
3. **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.
4. Kumeiko V.V., **Sokolnikova Y.N.**, Grinchenko A.V., Mokrina M.S., Kniazkina M.I. Immune state correlates with histopathological level and reveals molluscan health in populations of *Modiolus kurilensis* by integral health index (IHI) // Journal of Invertebrate Pathology. 2018. Vol. 154. P. 42–57.

Патенты:

5. Кумейко В.В., Гринченко А.В., **Сокольникова Ю.Н.** Способ оценки здоровья морских двустворчатых моллюсков и состояния среды их обитания: Патент № RU2571817C1. 2015.

Работы в материалах конференций:

6. **Сокольникова Ю.Н.**, Табакова Е.В., Кумейко В.В. Показатели фагоцитоза гемоцитов *Modiolus kurilensis* из бухты Троицы, как модельной олиготрофной акватории с незначительной антропогенной нагрузкой // Материалы VIII региональной конференции студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России «Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии». Владивосток: Изд-во Дальневосточ. ун-та, 2008. С. 186–188.
7. Табакова Е.В., **Сокольникова Ю.Н.**, Гринченко А.В., Кумейко В.В., Рыбалкина С.М. Бузолева Л.С. Применение методов иммунологического анализа для оценки физиологического состояния двустворчатых моллюсков на примере *Modiolus kurilensis* // Материалы научной конференции, посвященной 70-летию С.М. Коновалова «Современное состояние водных биоресурсов». Владивосток: Изд-во ТИНРО-центра, 2008. С. 643–646.
8. **Сокольникова Ю.Н.**, Кумейко В.В. Исследование иммунологического состояния двустворчатых моллюсков *Modiolus kurilensis* из фоновых акваторий Японского моря с незначительной антропогенной нагрузкой // Материалы IX региональной конференции

студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России «Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии». Владивосток: Изд-во Дальневосточ. ун-та, 2009. С. 190–191.

9. **Сокольникова Ю.Н.**, Кумейко В.В. Показатели фагоцитоза гемоцитов двустворчатых моллюсков *Modiolus kurilensis* из некоторых акваторий Японского моря с незначительной антропогенной нагрузкой // Материалы Всероссийской научной школы для молодежи «Перспективы развития инноваций в биологии». Владивосток: Изд-во Дальневосточ. ун-та, 2010. С. 66–67.
10. **Сокольникова Ю.Н.**, Кумейко В.В. Оценка фагоцитарных показателей гемоцитов двустворчатых моллюсков *Modiolus kurilensis* из фоновых и импактных акваторий Японского моря // Материалы X региональной конференции студентов, аспирантов и научных организаций Дальнего Востока России «Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии». Владивосток: Изд-во Дальневост. фед. ун-та, 2011. С. 263–265.
11. **Сокольникова Ю.Н.**, Кумейко В.В. Анализ фагоцитарных показателей гемоцитов двустворчатых моллюсков *Anadara broughtonii* из фоновых и *Modiolus kurilensis* из фоновых и импактных акваторий Японского моря // Материалы Второй Всероссийской научной молодежной конференции-школы «Проблемы экологии морского шельфа». Владивосток: Изд-во Дальневост. фед. ун-та, 2011. С. 121–125.
12. **Сокольникова Ю.Н.**, Кумейко В.В. Зеленые одноклеточные водоросли, вызывающие патогенетические изменения у двустворчатых моллюсков *Modiolus modiolus kurilensis* Японского моря // Материалы международного научного форума студентов, аспирантов и молодых ученых стран Азиатско-Тихоокеанского региона-2012. Владивосток: Изд-во Дальневост. фед. ун-та, 2012. С. 174–175.
13. **Сокольникова Ю.Н.**, Кумейко В.В. Разработка и апробирование метода диагностики физиологического состояния *Modiolus kurilensis* (Bivalvia) на основе флуориметрического анализа реакций *in vitro* фагоцитоза // Материалы XI региональной конференции студентов, аспирантов и научных организаций Дальнего Востока России «Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии». Владивосток: Изд-во Дальневост. фед. ун-та, 2012. С. 260–266.
14. **Sokolnikova Y.**, Kumeiko V., Magarlamov T. Morphology and fine structure of parasitic green microalgae infecting of the bivalve *Modiolus modiolus kurilensis* from the Sea of Japan // World Aquaculture Conference AQUA 2012: collected abstracts. Prague: «World Aquaculture Society» Press, 2012. P. 1045.

15. **Sokolnikova Y.**, Kumeiko V.V. The green microalgae account for pathological changes of the bivalve *Modiolus modiolus kurilensis* from the Sea of Japan // Physiomar12: collected abstracts. Santiago De Compostela: Press of Universidade de Santiago de Compostela, 2012. P. 48.
16. **Sokolnikova Y.**, Kumeiko V. Fluorescent *in vitro* phagocytosis assay as an effective assessment of environmental impact on hemocyte activity of the bivalve *Modiolus modiolus* from the Sea of Japan // Asian-Pacific Aquaculture 2013: collected abstracts. HoChiMinhCity: «WorldAquacultureSociety» Press, 2013. P. 421.
17. Белоусов А.С., Старинец А.А., **Сокольникова Ю.Н.** Диагностика иммунологического состояния двустворчатых моллюсков *Modiolus modiolus* из фоновых и импактной акваторий Японского моря // Материалы XV–XVI студенческой международной заочной научно-практической конференции «Молодежный научный форум: естественные и медицинские науки». Москва: Изд-во «МЦНО», 2014. С. 14–19.
18. Grinchenko A.V., Mokrina M.S., **Sokolnikova Y.N.**, Kumeiko V.V. The immune parameters displaying the physiological state of bivalve mollusks from impacted and non-impacted water areas // Unique Marine Ecosystems: Modern Technologies of Exploration and Conservation for Future Generations: collected abstracts. Vladivostok: Press of Far Eastern Federal University, 2016. P. 50.
19. СергееваН.А., **СокольниковаЮ.Н.**, ГринченкоА.В., КумейкоВ.В. Роль иммунной системы двустворчатых моллюсков *Modiolus kurilensis* в патогенезе паразитарной инвазии зеленых микроводорослей *Coccomyxa parasitica* // Материалы региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных по естественным наукам. Владивосток: Изд-во Дальневост. фед. ун-та, 2016. С. 11–13.
20. **Сокольникова Ю.Н.**, Гринченко А.В. Микроводоросли *Coccomyxa parasitica*, инфицирующие двустворчатых моллюсков // Материалы VIII Международной научно-практической конференции «Современные технологии в мировом научном пространстве». Казань: Изд-во «АЭТЕРНА», 2016. С. 123–128.
21. Гринченко А.В., **Сокольникова Ю.Н.** Способ оценки здоровья двустворчатых моллюсков и состояния среды их обитания // Материалы международной научно-практической конференции «Проблемы и перспективы развития науки в России». Уфа: Изд-во «АЭТЕРНА», 2016. С. 11–13.
22. Mokrina M.S., **Sokolnikova Y.N.**, Grinchenko A.V., Kumeiko V.V. A method of assessing the health of marine bivalves and the state of their habitat // Scientific and Technological Developments of Research and Monitoring of Marine Biological Resources: collected abstracts. Vladivostok: Press of Far Eastern Federal University, 2017. P. 81.

СОКОЛЬНИКОВА

Юлия Николаевна

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

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук