

На правах рукописи

ТОКМАКОВА
Арина Сергеевна

**КЛЕТОЧНЫЕ РЕАКЦИИ ЛЁГОЧНЫХ МОЛЛЮСКОВ
НА ТРЕМАТОДНУЮ ИНВАЗИЮ**

03.02.11 – Паразитология

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена»

Научный руководитель:

Атаев Геннадий Леонидович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена», заведующий кафедрой.

Официальные оппоненты:

Слюсарев Георгий Сергеевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», профессор.

Бажанова Елена Давыдовна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», заведующая лабораторией.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук.

Защита состоится «__» _____ 2019 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 002.223.01 на базе Зоологического института РАН по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 1.

Факс: (812) 328-29-41

E-mail: olga.ovtshinnikova@zin.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Зоологического института РАН, <https://www.zin.ru/boards/00222301/theses.html>

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, д. б. н.

Овчинникова Ольга Георгиевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В последнее время заметно увеличился интерес к сравнительному изучению иммунных реакций животных. Во многом это стало следствием переоценки роли врождённого иммунитета в защитных реакциях позвоночных животных, а также эволюционных аспектов их становления. Соответственно возникла необходимость в разработке новых моделей для раскрытия механизмов иммунного ответа. Среди беспозвоночных, наряду с членистоногими, одной из наиболее изучаемых групп животных в области защитных реакций являются моллюски и, прежде всего, pulmonаты, представители которых имеют большое хозяйственное значение.

Актуальность изучения защитных реакций лёгочных моллюсков обусловлена также их ролью промежуточных хозяев в жизненных циклах трематод, многие из которых являются опасными паразитами человека и экономически важных животных. Именно информация о защитных реакциях моллюсков и путях их преодоления трематодами позволит раскрыть многие механизмы устойчивости паразито-хозяинной системы «трематоды-моллюски».

Несмотря на актуальность изучения клеточных защитных реакций pulmonат, большинство вопросов, связанных с гемопоэзом, а также с составом и функциональной активностью гемоцитов остаются дискуссионными. Даже относительно классификации циркулирующих клеток нет единого мнения – разные авторы выделяют от одного до нескольких десятков типов гемоцитов. То же разногласие наблюдается среди исследователей и в отношении мультипликации клеток гемолимфы (от признания единого центра гемопоэза до констатации пролиферативной способности циркулирующих гемоцитов).

Многоуровневая система врождённого иммунитета у всех изученных в этом отношении pulmonат представлена клеточными и гуморальными компонентами. Но ключевым звеном защитных реакций на любом уровне признаются именно гемоциты (Loker et al., 1986; Купер, 1980; Атаев, Полевщиков, 2004; Fried, 2016). Соответственно новые знания о гемопоэзе лёгочных моллюсков – динамике функционирования гемопоэтических структур, а также роли гемоцитов в защитных реакциях – чрезвычайно актуальны для решения широкого круга вопросов сравнительной иммунологии, зоологии и паразитологии.

Цель работы – изучение клеточных иммунных реакций лёгочных моллюсков на различные чужеродные факторы, в том числе на трематодную инвазию.

Основные задачи исследования:

1. Определить основные типы клеток гемолимфы моллюсков *Biomphalaria glabrata*, *Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis*, *Lymnaea stagnalis*, *Succinea putris*.
2. Установить популяционный состав клеток гемолимфы интактных моллюсков.
3. Изучить гемопоэз лёгочных моллюсков.
4. Изучить влияние чужеродных факторов на клеточный состав гемолимфы моллюсков.
5. Изучить гемоцитарные реакции моллюсков на чужеродные факторы (включая трематодную инвазию).

Научная новизна заключается в многостороннем подходе к изучению клеточного иммунитета лёгочных моллюсков. Впервые комплексно изучены клеточные иммунные реакции лёгочных моллюсков как на природных моделях, так и в условиях экспериментального заражения.

Для решения поставленных задач по изучению клеточного иммунитета, впервые комплексно изучен гемопоэз и функциональная активность гемоцитов. Научная новизна заключается в анализе природы гемопоэтических структур интактных и заражённых улиток, определении их морфологии и механизмов мультипликации клеточных элементов гемолимфы у моллюсков разных видов. Соответственно, для получения объективной картины значительно расширен круг изучаемых моделей.

В работе использованы как классические подходы экспериментальной зоологии, иммунологии, паразитологии так и современные иммуногистохимические и молекулярно-генетические методы. Впервые охарактеризована функциональная активность гемоцитов моллюсков разных видов при иммунизации различными антигенами. Использование моллюсков, заражённых трематодами разных видов, позволило оценить специфичность клеточного ответа на различные патогены.

Теоретическая и практическая значимость работы

Использование в работе именно лёгочных моллюсков обусловлено, прежде всего, их практической ценностью в области контроля зараженности трематодами природных популяций моллюсков, который рассматривается как один из наиболее эффективных способов борьбы с распространением трематодозов. Кроме того, трематодная инвазия резко снижает возможность хозяйственного использования моллюсков, многие представители которых используются в пищевой, фармацевтической, косметической промышленности.

Отдельный интерес представляют сведения о клеточном составе гемолимфы при постановке мониторинга за экологическим состоянием

водоемов, так как анализ гемолимфы является важным показателем физиологического состояния моллюсков. Сведения о морфологии клеток гемолимфы, полученные с помощью различных методов, позволяют также уточнить имеющуюся классификацию гемоцитов pulmonat.

Проведенное исследование позволяет оценить характер протекания жизненных циклов трематод, а также определить основные факторы, регулирующие их реализацию в моллюсках.

Положения, выносимые на защиту

1. Основными клеточными элементами гемолимфы лёгочных моллюсков являются гранулоциты и гиалиноциты, количественное соотношение между которыми определяется физиологическим состоянием улиток.

2. Трематодная инвазия приводит к изменению в гемолимфе pulmonat соотношения гемоцитов разных типов.

3. Клеточный иммунный ответ лёгочных моллюсков на чужеродные факторы различной природы носит универсальный характер. Во всех случаях гемоцитарная реакция проходит в два этапа: в начале в ней участвуют гемоциты из близлежащих тканей и циркуляции, на втором этапе участвуют гемоциты, сформированные в результате активации гемопоэза.

4. Мультипликация гемоцитов приурочена к специализированным гемопоэтическим органам.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены на 10 конференциях, 4 из которых являются международными: Международная научная конференция «Биоразнообразие паразитов», посвященная 75-летию Центра паразитологии (Москва, 23-25 октября 2018 г.), Международная конференция «Современная паразитология – основные тренды и вызовы» (VI съезд Паразитологического общества) (Санкт-Петербург, 15-19 октября 2018 г.), Вторая всероссийская практическая конференция «По вопросам реализации научных разработок» (Москва, 25-26 октября 2017 г.), Международная конференция «Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем III» (Санкт-Петербург, 23-27 октября 2017 г.), III Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы эволюционной морфологии животных» (Санкт-Петербург, 29 сентября -1 октября 2016 г.), VI Всероссийская конференция с международным участием «Школа по теоретической и морской паразитологии» (Севастополь, 5-10 сентября 2016 г.), XXIII Международная конференция «Ломоносов» (Москва, 11-15 апреля 2016 г.), V Межрегиональная конференция «Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке» (Новосибирск, 14-16 октября 2015 г.), Межвузовская конференция молодых ученых «Герценовские чтения» (Санкт-Петербург, 1-4 апреля 2014 г.),

XLI Межвузовская научно-практическая конференция «Актуальные вопросы медицинской биологии и паразитологии» (Санкт-Петербург, 25 марта 2014 г.).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из Введения, глав «Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты», Заключение, Выводов, Списка литературы. Каждый из разделов главы «Результаты» завершается обсуждением. Работа изложена на 136 страницах. Список литературы насчитывает 261 источник, из них 239 на иностранном языке. Диссертация иллюстрирована 60 рисунками.

Благодарности

Считаю своим приятным долгом выразить глубокую благодарность научному руководителю Г. Л. Атаеву за многолетнее внимание к моим исследованиям и помощь в подготовке диссертации. Отдельная благодарность Е. Е. Прохоровой и всему коллективу кафедры зоологии РГПУ им. А. И. Герцена. Также хочу поблагодарить за практические консультации, помощь и поддержку К. В. Галактионова, А. В. Полевщикова, М. К. Серебрякову, И. В. Кудрявцева, Е. Б. Цитрина, А. А. Цитрину, Р. Р. Усманову, К. Кусто (С. Coustau), Б. Гурбаля (В. Gourbal), Г. Митту (G. Mitta), коллектив ЦКП Электронной микроскопии Института биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН.

Работа выполнена при поддержке: гранта Министерства образования и науки РФ № 4.8040.2013 «Применение метода цитофлуориметрической экспресс-диагностики пресноводных моллюсков при выявлении инвазии трематодами, патогенными для человека и животных» (2013 г.), гранта Министерства образования и науки РФ №6.1278.2014/К «Изучение функциональной активности гемоцитов брюхоногих моллюсков» (2014-2016 гг.), гранта Министерства образования и науки РФ № 6.7509.2017/БЧ «Сравнительный анализ иммунных реакций лёгочных моллюсков» (2017-2019 гг.), гранта РФФИ №18-34-00522 мол_а «Экспрессия генов иммунного ответа у лёгочных моллюсков при трематодной инвазии» (2018-2019 гг.).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В разделе приводятся сведения о строении кровеносной системы лёгочных моллюсков, вариантах классификации циркулирующих клеток гемолимфы, основных механизмах гемопоза пульмонат. При этом основное внимание уделено анализу современных взглядов на происхождение циркулирующих клеток гемолимфы и их функциональной активности.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В качестве объектов исследования были использованы лёгочные моллюски следующих видов: *Planorbarius corneus* L.,

1758; *Planorbis planorbis*, L., 1758; *Biomphalaria glabrata* Say, 1818, *Biomphalaria pfeifferi*, Krauss, 1848; *Lymnaea (Galba) truncatula* Müller, 1774; *Lymnaea stagnalis*, L., 1758; *Succinea putris* L., 1758.

Для иммунизации моллюсков были использованы:

- ✓ трематоды (*лабораторные линии) *Cotylurus brevis* Dubois and Rausch, 1950 (сем. Strigeidae), *Echinostoma caproni** Richard, 1964, *E. spiniferum* La Valette, 1855 (сем. Echinostomatidae), *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (сем. Fasciolidae), *Leucochloridium paradoxum* Carus, 1835 (сем. Leucochloridiidae), *Plagiorchis multiglandularis* Rudolphi 1802 (сем. Plagiorchiidae), *Schistosoma mansoni** Sambon, 1907 (бразильский и сенегальский штамм) (сем. Schistosomatidae);
- ✓ бактерии *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*;
- ✓ ксенотрансплантат – фрагменты вибрисс кошек;
- ✓ белок, выделенный из трематод *Plagiorchis multiglandularis* (сем. Plagiorchiidae), *Bilharziella polonica* (сем. Schistosomatidae).

Основные методы исследования. Для изучения морфологии гемоцитов применялась **световая микроскопия** с использованием методов фазового контраста и светлого поля; **флуоресцентная** и **лазерная сканирующая конфокальная микроскопия**. Развитие клеточных реакций моллюсков изучали на замороженных и парафиновых срезах, окрашенных различными гистологическими красителями. В работе также была использована **трансмиссионная** и **сканирующая электронная микроскопия**. Для анализа клеточного состава гемолимфы и влияния на него иммунизации был проведен **цитофлуориметрический анализ**. Методика **оценки пролиферативной активности гемоцитов** осуществлялась на мазках гемолимфы с использованием 5-этинил-2-дезоксинуридина (EdU). Выделение белка для иммунизации моллюсков проводили с использованием FBio-Trizol-Реагента (FractalBio). Для видовой идентификации трематод *Bilharziella polonica* было осуществлено **генотипирование** по участку рДНК, включающему фрагмент гена 18S, ITS1, ген 5,8S, ITS2 (GenBank MK264353).

Для проведения микроскопического анализа и регистрации данных были использованы программы «Image Scope», «Image J», «LasX». Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программ Microsoft Excel и Statistica. Для определения основных фенотипов гемоцитов был проведён *in vitro* анализ с помощью программного обеспечения CellProfiler. Обработку секвенограмм осуществляли с помощью программы BioEdit (Hall, 1999). Для анализа гомологии использовали программу BLAST (McGinnis, Madden, 2004).

Обработку данных, полученных с помощью проточной цитометрии проводили в программе Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Клеточный состав гемолимфы моллюсков

Клетки гемолимфы были изучены у pulmonat *Planorbarius corneus*, *Biomphalaria glabrata*, *Planorbis planorbis*, *Succinea putris*, *Lymnaea stagnalis*. На световом уровне гемоциты этих моллюсков разделяются на два типа клеток – гранулоциты и гиалиноциты, которые отличаются по размерам, способности распластываться на субстрате и наличию гранул в цитоплазме (Рис. 1).

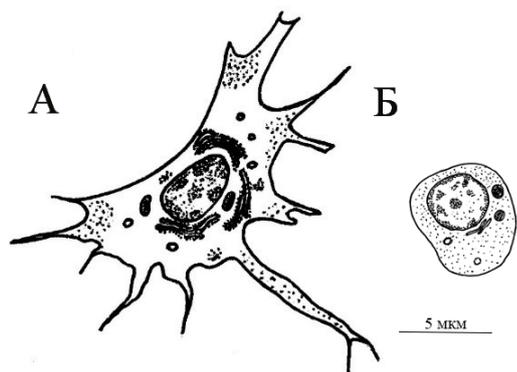


Рисунок 1. Основные фенотипы гемоцитов лёгочных моллюсков. А – гранулоцит, Б – гиалиноцит.

Для *Planorbarius corneus* был выполнен фенотипический анализ гемоцитов *in vitro* с помощью программного обеспечения CellProfiler. Полученные данные также подтвердили наличие двух основных популяций циркулирующих клеток гемолимфы.

С использованием **флуоресцентной и конфокальной микроскопии** показана локализация основных цитоскелетных элементов гемоцитов и связанных с ними органелл у разных видов лёгочных моллюсков (Рис. 2).

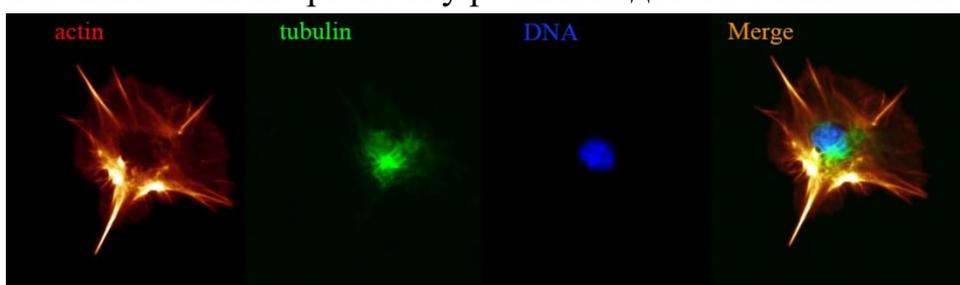


Рисунок 2. Гранулоцит *Planorbarius corneus*.

Изучение гемоцитов *P. corneus* и *Biomphalaria glabrata* с использованием **трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии** подтвердило объективность разделения клеток гемолимфы на два типа – гранулоциты и гиалиноциты (Рис. 3). При этом ТЭМ позволила выявить различия в морфологии ядер и организации цитоплазмы между этими клетками.

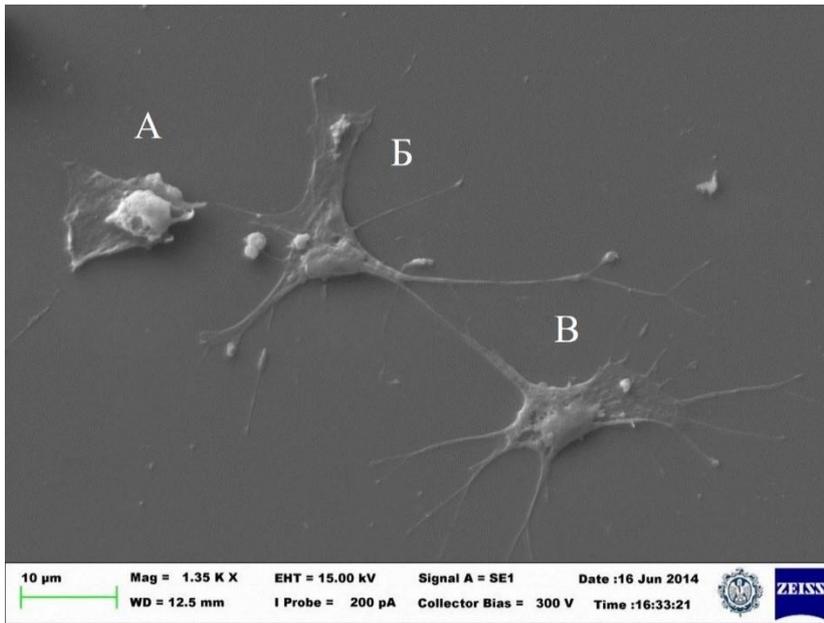


Рисунок 3. Сканирующие электронные микрофотографии гемоцитов *Planorbarius corneus*.

А — гиаиноцит, Б, В — гранулоциты.

На основании **цитофлуориметрического анализа** по параметрам FS и SS гемоциты моллюсков *Planorbarius corneus* (n=48), *Biomphalaria glabrata* (n=40) и *Planorbis planorbis* (n=35) разделяются на три популяции, обозначенные А, В и С (Рис. 4). Популяция А представлена клетками меньшего размера. Для них характерна относительно простая организация цитоплазматического компартмента, что соответствует морфологическим характеристикам гиаиноцитов. Клетки, составляющие популяции В и С, имеют более гранулированную цитоплазму, характерную для гранулоцитов.

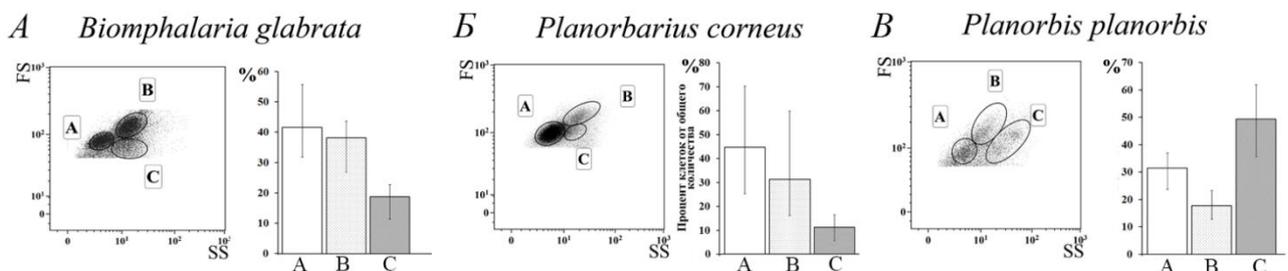


Рисунок 4. Цитогаммы гемолимфы моллюсков *Biomphalaria glabrata*, *Planorbarius corneus* и *Planorbis planorbis*.

Обсуждение к разделу «Клеточный состав гемолимфы моллюсков»

Полученные данные цитохимического и электронно-микроскопического изучения подтверждают наличие в гемолимфе пульмонат двух основных клеточных типов – гранулоцитов и гиаиноцитов. При этом у моллюсков *Biomphalaria glabrata*, *Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis*, *Succinea putris* отмечается сходство морфологии клеток внутри каждой популяции гемоцитов.

В то же время методом проточной цитофлуориметрии удалось выявить гетерогенность популяции гранулоцитов моллюсков *Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis* и *Biomphalaria glabrata*. Имеющиеся различия могут быть

обусловлены возрастными и функциональными изменениями в клетках. На протяжении нескольких часов инкубирования клетки могут менять форму, размер и количество псевдоподий. Вероятно, подобная гетерогенность гранулоцитов лежит в основе описания некоторыми авторами многочисленных дискретных типов клеток гемолимфы. Одним из факторов, вызывающих изменения в поведении и морфологии гранулоцитов, является иммунизация моллюсков. Уже на первом этапе клеточной реакции реализуется способность гранулоцитов к адгезии и распластыванию на субстрате.

3.2. Гемопоз

Мы придерживаемся моноцентричной модели гемопоза pulmonat – существования единого центра амёбоцито-продуцирующего органа (АПО), впервые описанного Паном (Pan, 1958). АПО топографически приурочен к перикардиальному эпителию, но является самостоятельной структурой. У интактных животных АПО состоит из самостоятельных клеточных узелков, в которых можно выделить 3 зоны: зона недифференцированных клеток; зона деления и созревания; зона «выхода».

АПО незараженных моллюсков *Biomphalaria pfeifferi* состоит из 3–4 клеточных узелков. Их размер составляет около 16x8 мкм. Узелки имеют неправильную форму и расположены близко друг к другу. Клетки, образующие АПО, имеют округлую форму (Рис. 5). В случае заражения моллюсков *B. pfeifferi* трематодами *Echinostoma caproni* первые признаки активации АПО замечены через 3 часа после заражения (п.з.). Количество узелков при этом составляет 2–3, однако их размеры увеличиваются и составляют в среднем 22x6 мкм. Через 3–4 дня п.з. АПО достигает максимального размера, что свидетельствует о его высокой активности. Отдельные узелки сливаются. В результате их количество сокращается до 1–2. Через 6–7 дней п.з. размеры АПО уменьшаются, и уже через 10 дней п.з. происходит возврат его к исходному состоянию.

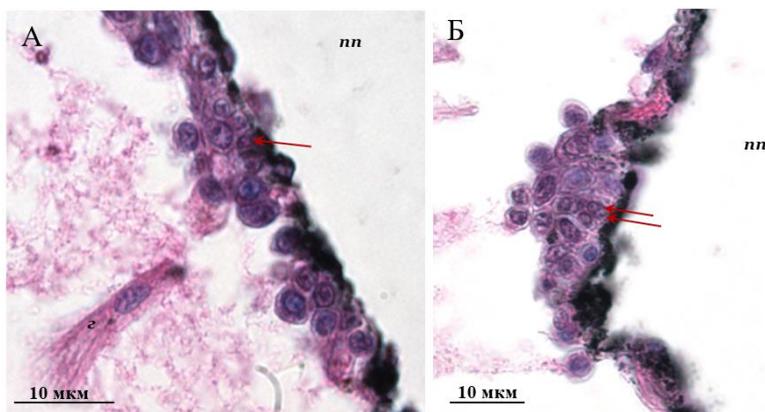


Рисунок 5. Гистологические срезы через АПО *Biomphalaria pfeifferi* (А–Б). z – гемоцит в циркуляции, nn – перикардиальная полость. Стрелками отмечены недифференцированные клетки.

При заражении трематодами *Schistosoma mansoni* моллюсков *Biomphalaria glabrata* максимальный пик активации АПО происходит позже – на 7-ые сутки п.з. В случае заражения *B. pfeifferi* трематодами *Schistosoma mansoni*

Сенегальского штамма моллюски проявляли резистентность. При этом активации АПО не отмечалось.

Подтверждено наличие АПО и у других изученных нами пульмонат (*Succinea putris*, *Planorbis planorbis*, *Planorbarius corneus*). Во всех случаях АПО расположен в районе перикарда и отмечена его активация в результате трематодной инвазии. Однако эти моллюски были природнозаражённые, поэтому срок их инвазии не известен. Тем не менее, АПО заражённых улиток во всех случаях был заметно увеличен по сравнению с интактными особями.

У моллюсков *Planorbarius corneus* и *Succinea putris* АПО также расположен вблизи передней стенки перикарда. В его составе насчитывается 3–4 узелка овальной формы, расположенные на значительном расстоянии друг от друга. При заражении катушек и янтарок трематодами *Plagiorchis multiglandularis* и *Leucochloridium paradoxum* соответственно происходит увеличение количества клеток, входящих в состав АПО. У моллюсков *Planorbis planorbis* АПО смещается на латеральную сторону перикарда. Здесь заметны группы бластоподобных клеток. При заражении трематодами *Cotylurus brevis* наблюдается увеличение размеров АПО.

Иммунизация моллюсков трематодным белком и ксенотрансплантатом (Рис. 6) также приводит к активации АПО, которая выражается в его гиперплазии и гипертрофии.

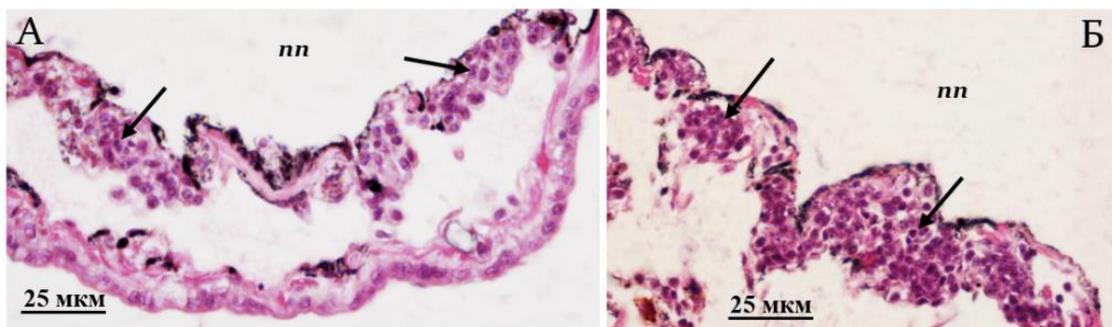


Рисунок 6. АПО *Biomphalaria glabrata*. А — контроль, Б — через 3 дня после введения ксенотрансплантата. Стрелками обозначены узелки АПО.

В последнее время для оценки пролиферативной активности клеток большую популярность приобрел метод с использованием 5-этинил-2-дезоксинуридина (EdU), который является аналогом тимидина. Для этого исследования были использованы пульмонаты *Biomphalaria glabrata*, *Planorbarius corneus*, *Lymnaea stagnalis* и *Succinea putris*. Во всех случаях отмечена способность гемоцитов к накоплению EdU в ядрах, что может косвенно свидетельствовать о репликации ДНК.

Обсуждение к разделу «Гемопоз»

В изученных моллюсках АПО топографически приурочен к перикардiallyму эпителию, однако является самостоятельным органом гемопоза. Обычно АПО находится со стороны мантийной полости, но у некоторых моллюсков (например, *Planorbis planorbis*) он смещается на латеральную сторону перикарда. Собственные и литературные данные (Lie et al., 1975; 1976a; Pan, 1965; Kinoti, 1971; Sullivan, 1988; Атаев, Прохорова, 2013) позволяют заключить, что основой данного органа являются клеточные узелки.

Клетки в составе узелков АПО, вероятно, проходят последовательные стадии развития: **недифференцированные клетки – прогемоциты – гемоциты**. Последние продвигаются в сторону кровеносных синусов, расположенных между мантийным и перикардiallyм эпителиями. При этом происходит увеличение размеров клеток, они приобретают лопастное ядро и способность формировать псевдоподии. Затем молодые гемоциты покидают АПО и выходят в просвет кровеносных синусов. Вопрос о последующей специализации циркулирующих клеток гемолимфы в грануло- и гиалиноциты остаётся открытым.

Иммунизация моллюсков различными факторами (трематоды, трематодный белок, ксенотрансплантат) уже через несколько часов вызывает активацию АПО. Узелки сливаются с образованием единого клеточного тяжа, наблюдается гипертрофия и гиперплазия АПО. Через сутки после иммунизации активация АПО приводит к значительному росту численности циркулирующих гемоцитов.

Допускаемая некоторыми авторами способность к делению клеток гемолимфы пульмонат (Sminia et al., 1983; Monteil, Matricon-Gondran, 1991) была изучена с применением проточной цитофлуориметрии и использованием EdU. Полученные результаты свидетельствуют о возможной пролиферативной активности нескольких процентов гемоцитов в циркуляции. Однако эти данные также могут быть обусловлены репаративными процессами и не могут рассматриваться как прямые доказательства их способности к делению. Соответственно, пока мы признаём универсальность АПО как единственного органа гемопоза лёгочных моллюсков.

3.3. Функциональная активность гемоцитов

В качестве проявлений функциональной активности гемоцитов моллюсков были рассмотрены: фагоцитоз, участие в инкапсуляции и в формировании гемоцитарной мантии вокруг чужеродных объектов, образование агглютинаций.

Цитофлуориметрический анализ фагоцитарной активности гемоцитов *Biomphalaria glabrata* проводился на образцах свежесобранной гемолимфы, инкубированной с суспензией бактерий, меченных ФИТЦ. Показано, что

бактерий *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* фагоцитируют $56,9 \pm 7,0$ % (n=10) и $45,0 \pm 8,0$ % (n=8) циркулирующих гемоцитов соответственно. В целом гранулоциты интенсивнее поглощают бактерий, чем гиалиноциты.

Для изучения влияния трематодной инвазии на состав и соотношение гемоцитов использовались моллюски *Planorbarius corneus*, зараженные разными видами трематод. У незаражённых особей гранулоциты составляют около 54,3% от общего количества клеток. При трематодной инвазии происходит значительное сокращение количества гиалиноцитов и увеличение числа гранулоцитов субпопуляции В (см. с. 9).

Клеточная реакция моллюсков на заражение трематодами была изучена для паразито-хозяйинных моделей: *Echinostoma caproni* – *Biomphalaria pfeifferi*; *E. caproni* – *B. glabrata* (резистентной линии); *Schistosoma mansoni* – *B. glabrata*, *S. mansoni* – *B. pfeifferi*; *Fasciola hepatica* – *Lymnaea truncatula*; *Leucochloridium paradoxum* – *Succinea putris*.

Первые признаки проявления защитной реакции моллюсков на заражение трематодами наблюдаются вскоре после заражения. Вокруг материнской спороцисты концентрируются гемоциты из близлежащих тканей. Соответственно, в первые часы вблизи паразита можно наблюдать «локальный очаг», сходный с реакцией моллюска на любое повреждение. Именно от степени концентрации таких «очаговых» гемоцитов вокруг паразита зависит вероятность его инкапсуляции уже на начальном этапе заражения. Важно отметить, что подобные скопления гемоцитов вблизи партенит в начале инвазии регистрировались в биомфалариях чувствительной и резистентной линий, а также у лимнеид, что свидетельствует о неспецифичности клеточной реакции. При этом характер первичной реакции гемоцитов зависит как от места внедрения чужеродного объекта, так и от его природы.

В дальнейшем возможны различные варианты развития первичной гемоцитарной реакции: (1) в случае устойчивой паразито-хозяйинной системы, а также постоянной локализации материнских спороцист в районе пенетрации мирацидия (*Fasciola hepatica* – *Lymnaea truncatula*, *Schistosoma mansoni* – *Biomphalaria glabrata*) капсула далее не развивается; (2) при наличии миграции к месту постоянной локализации (сердце, гепатопанкреас, гонада и др.) спороцисты освобождаются от инкапсуляции (*Echinostoma caproni* – *Biomphalaria glabrata* / *B. pfeifferi*); (3) в случае развития паразита в резистентном моллюске возможно подавление его развития в районе пенетрации мирацидия.

Для моллюсков *B. pfeifferi*, заражённых трематодами *Schistosoma mansoni* Сенегальского штамма, отмечено проявление природной резистентности по отношению к паразиту. Вокруг спороцист происходит формирование многослойной капсулы уже через сутки п.з. Однако активации АПО не

происходит, что свидетельствует о способности к подавлению инвазии на стадии первичной реакции.

Инкапсуляция материнских спороцист *Echinostoma caproni* изучалась в *Biomphalaria glabrata* резистентной линии. Первые спороцисты достигают сердца моллюска через 30–40 часов п.з. Вокруг партенит концентрируется большое количество гемоцитов, но их инкапсуляции ещё не происходит. Через 3 дня п.з. наблюдается инкапсуляция большинства спороцист, в которой принимают участие многочисленные гемоциты, образованные после активации АПО (вторичная реакция) (Рис. 7, 8 А). Диаметр капсулы достигает 400–700 мкм. В ней выделяются две зоны (Ataev, Coustau, 1999): в центре находится зона дегенерирующих клеток спороцист и гемоцитов, а по периферии – зона активных гемоцитов.

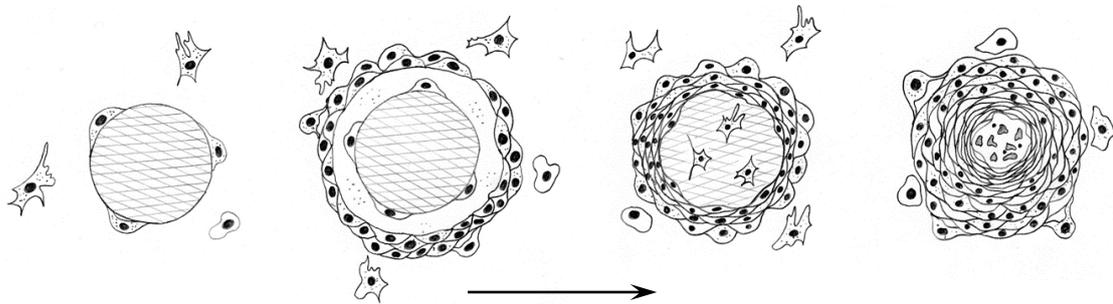


Рисунок 7. Схема клеточной реакции пульмонат на трематодную инвазию.

Клеточная реакция *Planorbarius corneus* изучалась также в ответ на заражение метацеркариями *Echinostoma spiniferum*. Проявление первичной реакции протекает в виде скопления гемоцитов вокруг цист, часть из которых прикрепляется к их покровам. В дальнейшем формируется многослойная капсула.

Реакция на ксенотрансплантат изучалась при введении фрагмента вибрисса кошки под эпителий ноги моллюсков *Planorbarius corneus* и *Biomphalaria glabrata*. Через сутки после введения трансплантата вокруг него наблюдается скопление из 1–2 слоев гемоцитов. Раневой канал также купирован слоями (от 5 до 15) уплощённых клеток (Рис. 8 Б). Таким образом, образуются два концентрических скопления гемоцитов: одно на поверхности трансплантата, а другое выстилает раневой канал со стороны окружающих тканей моллюска.

Иногда защитная реакция сопровождается формированием агглютинаций гемоцитов вокруг трематод (например, *Echinostoma caproni* – *Biomphalaria glabrata* чувствительной линии), не приводящих к гибели паразитов. Через 10 дней п.з. приток гемоцитов завершается, и на 13–15 день п.з. наблюдается интенсивное разрушение агглютинаций.

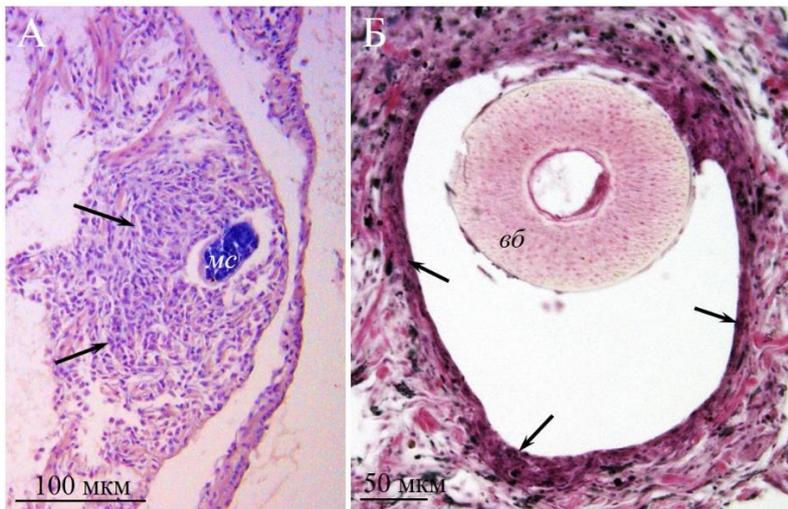


Рисунок 8. Формирование капсулы. А — вокруг материнской спороцисты (мс) *Echinostoma caproni* в *Biomphalaria glabrata*, Б — вокруг ксенотрансплантата в *Planorbarius corneus*. вб – вибрисс. Стрелками обозначена капсула.

Вокруг спороцист *Leucochloridium paradoxum*, развивающихся в моллюсках *Succinea putris*, в результате извращения клеточной реакции формируется особый тип гемоцитарных скоплений – мантия. Тело спороцисты *Leucochloridium paradoxum* представляет собой сильно разветвленный стolon, который с помощью трубчатых участков соединен со зрелыми отростками, окрашенными в зелёный цвет. В центральной части stolона мантия представлена гемоцитами, распластанными по поверхности паразита. Мантия здесь рыхлая, в ней заметны многочисленные отверстия, через которые видна складчатая поверхность тегумента спороцисты. На поверхности отростков мантия образует сплошной тонкий слой, ядра гемоцитов уже не заметны, однако они видны на срезах.

Обсуждение к разделу «Функциональная активность гемоцитов»

Фагоцитоз является универсальным свойством клеток гемолимфы pulmonat (Tripp, 1961; Cheng, Galloway, 1970; Sminia, 1972; Bang, 1975; Anderson, 1977; Купер, 1980; Прохорова и др., 2010; Ataev et al., 2016 и др.). Нам также удалось подтвердить фагоцитарную активность гемоцитов *Biomphalaria glabrata* с использованием бактерий *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, меченых ФИТЦ. Было подтверждено, что гемоциты этих моллюсков способны в равной степени фагоцитировать бактерий.

В результате иммунизации моллюсков различными факторами отмечен двухэтапный характер протекания клеточных реакций. Первичная реакция обеспечивается за счёт гемоцитов из близлежащих тканей (включая синусы кровеносной системы). Во вторичной реакции также принимают участие гемоциты, образованные в результате активации АПО (см. с. 17).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования подтвердили точку зрения, что клетки гемолимфы лёгочных моллюсков представлены двумя популяциями – гранулоцитами и гиалиноцитами. Эти клетки отличаются между собой по

морфологии, способности к адгезии и функциональной активности. Соотношение клеточных популяций гранулоцитов и гиалиноцитов в циркуляции может различаться даже у одного вида улиток. На соотношение гемоцитов разных типов влияют различные факторы, одним из которых является трематодная инвазия. При этом в защитных реакциях участвуют как гранулоциты, так и гиалиноциты (проявляют фагоцитарную активность, участвуют в формировании капсул, агглютинаций и др.).

Остается неясным, являются ли гранулоциты и гиалиноциты производными разных клеточных линий (полифилетическая теория) или происходят от одной стволовой клетки (монофилетическая теория). Мы считаем, что популяции гемоцитов являются самостоятельными клеточными типами, которые формируются из прогемоцитов, локализованных в АПО. В свою очередь прогемоциты возникают из недифференцированных (стволовых) клеток. Возможно, последние способны также дифференцироваться в клетки соединительной ткани, участвующие в образовании дефинитивной структуры клеточных узелков АПО. Однако нет достоверной информации о количестве клеточных циклов, претерпеваемых прогемоцитами до появления гемоцитов.

Вероятно, прогемоциты можно отождествлять с бластоподобными клетками (*blast-like cells*), описанными у биомфаларий (Cavalcanti, 2012; Portet et al., 2018). В циркуляции нами также отмечается несколько процентов делящихся клеток. Можем предположить, что это прогемоциты, которые «преждевременно» покидают АПО.

В то же время полученные результаты о включении EdU в ядра дифференцированных циркулирующих клеток не могут рассматриваться в качестве доказательства пролиферативной активности гемоцитов, так как подобные картины могут объясняться другими причинами (например, репарацией). Поэтому на сегодняшний день мы продолжаем считать АПО универсальным центром гемопоэза пульмонат. Тем не менее, вопрос о его локализации остается открытым. Количество лёгочных моллюсков, изученных в этом отношении невелико, а имеющиеся сведения зачастую противоречивы. Однако расположение гемопоэтических структур в тесном контакте с перикардальным эпителием – со стороны мантийной полости, почки и др. – представляется логичным (у всех изученных нами видов именно такое расположение АПО). Такая локализация свидетельствует об их мезодермальном происхождении, что укладывается в общие представления о природе гемопоэза беспозвоночных и позвоночных животных.

Главной функцией гемоцитов является защита внутренней среды организма хозяина от различных чужеродных факторов. Тем не менее гемоциты обладают ограниченной способностью распознавать чужеродные факторы, в

связи с чем **первичная клеточная реакция** лёгочных моллюсков на проникновение чужеродного фактора признается неспецифической формой проявления клеточного ответа. Она осуществляется за счет гемоцитов, устремляющихся из близлежащих тканей и циркуляции в очаг воспаления, где они способны к дальнейшей агрегации, агглютинации, инкапсуляции и фагоцитозу проникших патогенов.

Неспецифичность этой реакции выражена в сходном протекании в ответ на внедрение чужеродного фактора любой природы (алло- и ксенотрансплантаты, паразиты). Во всех случаях вокруг патогена образуется скопление распластывающихся гемоцитов, пытающихся изолировать его от окружающих тканей. Результатом эффективной первичной реакции может стать: гибель патогена; его долговременная изоляция внутри гемоцитарной капсулы; в случае локализации патогена вблизи покровов моллюска возможно его «выдавливание» во внешнюю среду и купирование тканевых последствий проникновения.

При заражении трематодами мы отмечали первичную реакцию, приводящую в дальнейшем к гибели паразита через инкапсуляцию. Остальные механизмы клеточного ответа мы наблюдали только в ответ на введение трансплантата. Однако в литературе есть описание удаления материнской спороцисты *Echinostoma lindoense* из моллюска *Biomphalaria glabrata* после её инкапсуляции в субэпителиальном слое и даже препятствие проникновению мигрирующей с помощью мощного скопления гемоцитов вблизи эпителия (Lie, Neupman, 1975, 1976). При повторном заражении наблюдается более эффективная реализация этих форм первичной реакции.

Все вышеперечисленные механизмы первичной клеточной реакции могут реализоваться при трематодной инвазии pulmonat. В зависимости от вида (линии) моллюска и вида трематод, а также их локализации в хозяине первичная реакция выражена по-разному. Во многих случаях она приводит не только к изоляции паразита, но и к его гибели.

Однако в большинстве случаев, независимо от последствий первичной реакции, наблюдается активация гемопоэза лёгочных моллюсков, обеспечивающая запуск **вторичной клеточной реакции**. Необходимость в ней обусловлена недостатком имеющихся в циркуляции гемоцитов. В случае эффективности первичной реакции задачей вновь образованных клеток является участие в ликвидации её последствий, либо завершение инкапсуляции паразита в районе его изначальной локализации в хозяине.

Более сложно она протекает при миграции материнской спороцисты после завершения ею метаморфоза. Если клеточная защитная реакция оказалась недостаточной для изоляции и гибели спороцисты, то последняя покидает район

изначальной локализации и перемещается, в зависимости от модели, к сердцу; сосудам, синусам кровеносной системы; гепатопанкреасу и другим органам хозяина. Здесь возможно несколько основных вариантов поведения гемоцитов, мультипликация которых вызвана трематодной инвазией.

Первый, и наиболее естественный для понимания клеточных иммунных реакций, вариант – отмеченное выше продолжение первичной реакции в форме инкапсуляции, либо формирование капсулы вокруг партенит, окончательно поселившихся во внутренних органах моллюска-хозяина. Многочисленные гемоциты образуют вокруг паразита мощную капсулу, внутри которой происходит его гибель, а затем фагоцитоз мертвых клеток спороцисты и внутренних слоёв капсулы. После ликвидации очага воспаления наблюдается разборка внешних слоев капсулы. При этом строение АПО и количественные характеристики клеточного состава гемолимфы возвращаются в исходное состояние. Аналогичные проявления клеточного иммунитета в формировании капсул вокруг чужеродных факторов описаны как для беспозвоночных, так и позвоночных животных. Более того, описанная двухэтапность клеточной защитной реакции пульмонат аналогична воспалительной реакции млекопитающих, у которых патоген вначале также вызывает воспалительный процесс, а позднее в реакцию вовлекаются форменные элементы, сформированные в результате активации гемопоэтических структур.

В специфичных паразито-хозяинных системах инкапсуляции трематод в результате вторичной реакции не происходит, несмотря на выраженную активацию гемопоэза и повышение адгезионной способности формируемых гемоцитов. Последние обнаруживают партенит, могут образовывать крупные агглютинатии в районе их локализации, иногда даже на поверхности спороцист. Однако инкапсуляции не происходит, и паразиты продолжают нормально развиваться, несмотря на такое соседство. В дальнейшем подобные агглютинатии разбираются, и внешних проявлений клеточных реакций на трематодную инвазию не наблюдается, хотя в гемолимфе зараженного моллюска отмечается повышенное количество гемоцитов по сравнению с интактным.

Третий тип – образование гемоцитарной мантии вокруг паразита в результате извращения защитной клеточной реакции хозяина на паразитирование партенит трематод. Последние оказываются изолированным от окружающих тканей хозяина, однако не подвергаются воздействиям иммунной системы, скорее наоборот находятся под её защитой.

Изначально такое образование было описано у спороцист отряда Plagiorchiata (Schell, 1965; Добровольский, Райхель, 1973). Мы предлагаем расширить применение термина «мантия» на все случаи гемоцитарной изоляции трематод, при которой паразит не только не погибает, но и способен завершить

своё развитие. Остальные отличия характеризуют частные случаи адаптаций трематод к паразитизму и не меняют общей картины взаимоотношений, складывающихся у них с моллюском-хозяином. Мантия обычно покрывает все тело паразита. При этом у него сохраняется возможность использовать ресурсы хозяина. Однако она может и прерываться в определенных участках. Такой пример демонстрируют спороцисты рода *Leucochloridium*, вокруг зрелых отростков которых образуется сплошная мантия, но в районе центральной части столона она представлена крупноячеистой сетью. Можем предположить, что сплошное покрытие предохраняет тегумент отростков от высыхания в атмосферных условиях в случае их самостоятельного выхода (Ataev et al., 2016). В то же время мантия не препятствует контакту центральной части столона с гемоцелом моллюска-хозяина.

Отмеченные основные типы проявления иммунных реакций, сопряжённые с активацией гемопоэза являются более видоспецифичными, в связи с чем возникает вопрос о механизмах их возникновения в процессе эволюции. Являются ли эти типы последовательными этапами становления антипаразитарного ответа пульмонат или они сформировались независимо?

В рамках диссертации мы всего лишь обозначили этот вопрос, однако можем предположить, что исходным вариантом клеточных защитных реакций является инкапсуляция. В таком случае формирование агглютинаций и мантий является вариантом нейтрализации таких реакций. При этом формирование мантии является более специализированным способом избегания инкапсуляции, при котором происходит не только извращение клеточной защитной реакции, но и морфологические и физиологические преобразования трематод.

Подобные рассуждения позволяют ещё раз взглянуть на феномен устойчивости паразито-хозяинных отношений в системе «трематоды-моллюски» как возникший в ходе долгой эволюции. Соответственно, можно рассматривать резистентность улиток в качестве их естественного свойства, а чувствительность к заражению трематодами, напротив, возникает в ходе длительной эволюции и является уникальным явлением. Именно с ним и связана специфичность определенных видов и даже линий моллюсков для конкретных трематод – «полиморфизм по признаку резистентности к инвазии» (Grosholz, 1994). Вероятно, постоянные провокации клеточных защитных реакций пульмонат трематодными инвазиями во многом и определили условия и механизмы их проявления.

ВЫВОДЫ

1. Клетки гемолимфы лёгочных моллюсков представлены двумя основными типами – гранулоцитами и гиалиноцитами. Для обоих типов клеток характерна фагоцитарная активность и участие в защитных реакциях, включая инкапсуляцию.

2. Клеточный состав гемолимфы зависит от различных факторов, среди которых заметную роль играет трематодная инвазия.

3. Источником гемопоэза лёгочных моллюсков является специализированный гемопоэтический орган (АПО), топографически приуроченный к перикардiallyму эпителию. Здесь происходит мультипликация прогемоцитов, часть из которых дифференцируется в гемоциты, выходящие в кровоток. Иммунизация моллюсков различными факторами, включая трематодную инвазию, вызывает активацию гемопоэза.

4. Клеточные защитные реакции на иммунизацию чужеродными факторами различной природы в целом носят универсальный характер и происходят в два этапа. Первичная (неспецифическая) реакция в месте пенетрации патогена представляет собой попытку его изоляции за счет гемоцитов из близлежащих тканей и циркуляции. Во вторичной клеточной реакции задействованы гемоциты, образованные после активации гемопоэза. Исходно она направлена на завершение инкапсуляции патогена.

5. Основными вариантами вторичных реакций на трематодную инвазию являются: инкапсуляция, образование крупных агглютинаций вблизи материнской спороцисты, формирование мантии на её поверхности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК:

1. Ataev, G. L. Study of the sporocyst broodsac coloring of *Leucochloridium paradoxum* (Trematoda: Brachylaemidae) / G. L. Ataev, P. S. Babich, A. S. Tokmakova // Parasitologiya. – 2013. – Vol. 47, № 5. – P. 372–379.
2. Прохорова, Е. Е. Реакция гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus* на ксенотрансплантат / Е. Е. Прохорова, А. С. Токмакова, Г. Л. Атаев // Паразитология. – 2015. – Т. 49, № 2. – С. 128–132.
3. Серебрякова, М. К. Новый метод разделения популяций циркулирующих гемоцитов легочных моллюсков с помощью проточной цитометрии / М. К. Серебрякова, Е. Е. Прохорова, А. С. Токмакова, И. В. Кудрявцев, А. В. Полевщиков, Г. Л. Атаев // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 160–162.
4. Серебрякова, М. К. Цитофлуориметрический анализ гемолимфы моллюсков *Biomphalaria glabrata* резистентной и чувствительной линий / М. К.

Серебрякова, Е. Е. Прохорова, **А. С. Токмакова**, И. В. Кудрявцев, А. В. Полевщиков., Г. Л. Атаев // Российский иммунологический журнал. – 2016. – Т. 10 (19), № 2 (1). – С. 116–118.

5. Ataev, G. L. Multiple infection of amber snails *Succinea putris* with sporocysts of *Leucochloridium spp.* (Trematoda) / G. L. Ataev, A. A. Zhukova, **A. S. Tokmakova**, E. E. Prokhorova // Parasitology Research. – 2016. – Vol. 115, № 8. – P. 3203–3208.
6. Прохорова, Е. Е. Анализ клеточного состава гемолимфы трёх видов планорбид (Gastropoda: Pulmonata) / Е. Е. Прохорова, М. К. Серебрякова, **А. С. Токмакова**, И. В. Кудрявцев, Р. Р. Усманова, Г. Л. Атаев // Invertebrate Zoology. – 2018. – Т. 15, № 1. – С. 103–113.
7. Ataev, G. L. Reproduction of *Echinostoma caproni* mother sporocysts (Trematoda) / G. L. Ataev, **A. S. Tokmakova** // Parasitology Research. – 2018. – Vol. 117, № 8. – P. 2419–2426.
8. Prokhorova, E. E. Hemocytes of mollusc *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Pulmonata) / E. E. Prokhorova, M. K. Serebryakova, **A. S. Tokmakova**, G. L. Ataev // Invertebrate survival journal. – 2018. – Vol. 15. – P. 346–351.

Статьи, опубликованные в других изданиях:

1. **Токмакова, А. С.** Современные представления о гемопозе pulmonat / А. С. Токмакова // Функциональная морфология, экология и жизненные циклы животных: научные труды кафедры зоологии РГПУ им. А.И. Герцена. – СПб: Тесса. – 2017. – Т. 1. – С. 12–24.

Работы, опубликованные в материалах конференций:

1. **Токмакова, А. С.** Современные представления о гемопозе лёгочных моллюсков / А. С. Токмакова, Р. Р. Усманова // Актуальные вопросы медицинской биологии и паразитологии: мат. ХLI межвуз. научно-практической конф. (Санкт-Петербург, 23.03.2014). – Санкт-Петербург, 2014. – С. 17–18.
2. **Токмакова, А. С.** Гемопоз в моллюсках *Biomphalaria pfeifferi* (Pulmonata) / А. С. Токмакова, Р. Р. Усманова // Герценовские чтения: мат. Межвуз. конф. молод. уч. (Санкт-Петербург, 1.04.–4.04.2014), Вып. 14, Санкт-Петербург, 2014. – С. 51–52.
3. Атаев, Г. Л. Организация гемопоэтических структур pulmonat / Г. Л. Атаев, **А. С. Токмакова** // Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке: мат. V Межрег. конф. (14.09.–16.09.2015). – Новосибирск, 2015. – С. 5–6.
4. **Токмакова, А. С.** Клеточные защитные реакции моллюсков семейства Planorbidae / А. С. Токмакова, Р. Р. Усманова // Мат. XXIII Международ. конф. «Ломоносов» (Москва, 11–15.04.2016). - Москва, 2016. [Электронный ресурс].

5. Прохорова, Е. Е. Влияние трематодной инвазии на клеточный состав гемолимфы брюхоногих моллюсков / Е. Е. Прохорова, М. К. Серебрякова, **А. С. Токмакова**, Р. Р. Усманова, Г. Л. Атаев // Современные проблемы теоретической и морской паразитологии: мат. VI Всерос. конф. с международ. уч. (Севастополь, 5.09.–10.09.2016). – Севастополь, 2016. – С. 125–126.
6. **Токмакова, А. С.** Изучение гемопоэза лёгочных моллюсков / А. С. Токмакова, Г. Л. Атаев // Современные проблемы теоретической и морской паразитологии: мат. VI Всерос. конф. с международ. уч. (Севастополь, 5.09.–10.09.2016). – Севастополь, 2016. – С. 203–204.
7. Серебрякова, М. К. Анализ клеточного состава гемолимфы лёгочных моллюсков / М. К. Серебрякова, Е. Е. Прохорова, **А. С. Токмакова**, И. В. Кудрявцев, А. В. Полевщиков, Г. Л. Атаев // Современные проблемы эволюционной морфологии животных: мат. III Всерос. конф. с международ. уч. (Санкт-Петербург, 29.09.–1.10.2016). – Санкт-Петербург, 2016. – С. 209.
8. Прохорова, Е. Е. Использование проточной цитофлуориметрии для определения зараженности лёгочных моллюсков трематодами / Е. Е. Прохорова, М. К. Серебрякова, **А. С. Токмакова**, Г. Л. Атаев // Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем III: мат. Международ. конф. (Санкт-Петербург, 23–27.10.2017). – Санкт-Петербург, 2017. – С. 266–269.
9. Прохорова, Е. Е. Способ анализа зараженности брюхоногих моллюсков трематодами / Е. Е. Прохорова, М. К. Серебрякова, **А. С. Токмакова**, Г. Л. Атаев // Мат. II Всерос. научно-практической конф. по вопросам реализации научных разработок (Москва, 25–26.10.2017). – Москва, 2017. – С. 31.
10. Прохорова, Е. Е. Изменение клеточного состава гемолимфы гастропод, вызываемое трематодной инвазией / Е. Е. Прохорова, М. К. Серебрякова, **А. С. Токмакова**, Г. Л. Атаев // Современная паразитология – основные тренды и вызовы: мат. VI Съезда Паразитологического общества (Санкт-Петербург, 15–19.10.2018). – Санкт-Петербург, 2018. – С. 195.
11. **Токмакова, А. С.** Клеточные основы защитных реакций планорбид / А. С. Токмакова, Е. Е. Прохорова, Г. Л. Атаев // Современная паразитология – основные тренды и вызовы: мат. VI Съезда Паразитологического общества (Санкт-Петербург, 15–19.10.2018). – Санкт-Петербург, 2018. – С. 241
12. **Токмакова, А. С.** Изучение пролиферативной способности циркулирующих клеток гемолимфы пульмонат / А. С. Токмакова, Г. Л. Атаев // Труды центра паразитологии: мат. Международ. науч. конф. «Биоразнообразие паразитов» (Москва, 23–25.10.2018). – М.: Наука. – С. 254.