

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена»

На правах рукописи

**Токмакова
Арина Сергеевна**

Клеточные реакции лёгочных моллюсков на трематодную инвазию

03.02.11 – Паразитология

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор,
Геннадий Леонидович Атаев

Санкт-Петербург

2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Глава 1. Обзор литературы	9
1.1. Кровеносная система легочных моллюсков	9
1.2. Морфология и классификация гемоцитов	11
1.3. Состав плазмы гемолимфы	18
1.4. Функциональная активность гемоцитов	19
1.5. Гемопоз	32
Глава 2. Материал и методы	42
2.1. Объекты исследования	42
2.2. Методы	43
2.2.1. Содержание моллюсков	43
2.2.2. Методы гистохимии	44
2.2.3. Методы цитохимии	44
2.2.4. Методы проточной цитофлуориметрии	46
2.2.5. Методы электронной микроскопии	46
2.2.6. Методы молекулярной биологии	48
2.2.7. Компьютерные программы	48
Глава 3. Результаты и обсуждение	50
3.1. Клеточный состав гемолимфы моллюсков	50
3.1.1. Морфология гемоцитов	50
3.1.2. Цитофлуориметрический анализ гемолимфы моллюсков	62
3.1.3. Обсуждение к разделу III.1.	63
3.2. Гемопоз	64
3.2.1. Расположение и строение гемопозитического органа	64
3.2.2. Активация гемопоза при иммунизации	69
3.2.3. Обсуждение к разделу III.3.	77
3.3. Функциональная активность гемоцитов	78
3.3.1. Влияние трематодной инвазии на состав гемолимфы моллюсков	78
3.3.2. Фагоцитоз	79
3.3.3. Инкапсуляция	81
3.3.4. Агглютинации	92
3.3.5. Мантия вокруг спороцист	94
3.3.6. Обсуждение к разделу III.2.	96
Заключение	102
Выводы	107
Список литературы	108

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы 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 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 «трематода-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 гемопоэтических структурах лёгочных моллюсков,

динамике их функционирования и факторах, его регулирующих с одной стороны, а также анализ роли гемоцитов в защитных реакциях моллюсков, с другой, чрезвычайно актуальны для решения широкого круга вопросов сравнительной иммунологии, зоологии и паразитологии.

Цели и задачи

Основной целью стало изучение клеточных иммунных реакций лёгочных моллюсков на различные чужеродные факторы, в том числе на трематодную инвазию.

Соответственно были определены следующие задачи:

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

Научная новизна работы 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 изучены 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 легочных 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 морфометрии клеток гемолимфы, полученные с помощью различных методов позволяют уточнить имеющуюся классификацию гемоцитов пульмонат.

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

Методология и методы исследования

В качестве модельных объектов в работе были использованы моллюски лабораторных линий, широко использующиеся в качестве модельных объектов (*Biomphalaria glabrata*, *B. pfeifferi*), и представители фауны Европейской части

России, широко используемые в паразитологических, иммунологических и экологических исследованиях (*Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis*, *Succinea putris*, *Lymnaea stagnalis*).

Для иммунизации биомфаларий использованы трематоды *Schistosoma mansoni* и *Echinostoma caproni*. Для экспериментальной иммунизации моллюсков рассмотрены различные иммунологические агенты: бактерии, выделенный трематодный белок, ксенотрансплантат. Особое внимание уделяется изучению роли гемоцитов разных типов в иммунных реакциях моллюсков. Описаны механизмы и динамика основных форм клеточного ответа пульмонат. Изучен процесс инкапсуляции чужеродных объектов, фагоцитарная активность гемоцитов.

Для изучения основных типов циркулирующих клеток, их функциональной активности и гемопоэтических структур применялись методы световой; флуоресцентной, сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии; проточной цитофлуориметрии.

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 пульмонат 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.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные положения диссертационного исследования представлены и обсуждены на:

1. Международной научной конференции «Биоразнообразие паразитов», посвященной 75-летию Центра паразитологии (Москва, 23-25 октября 2018 г.)
2. Международной конференции «Современная паразитология – основные тренды и вызовы» (VI съезд Паразитологического общества) (Санкт-Петербург, 15-19 октября 2018 г.)
3. Второй всероссийской практической конференции «По вопросам реализации научных разработок» (Москва, 25-26 октября 2017 г.)
4. Международной конференции «Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем III» (Санкт-Петербург, 23-27 октября 2017 г.)
5. III Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы эволюционной морфологии животных» (Санкт-Петербург, 29 сентября -1 октября 2016 г.)
6. VI Всероссийской конференции с международным участием «Школа по теоретической и морской паразитологии» (Севастополь, 5-10 сентября 2016 г.)
7. XXIII Международной конференции «Ломоносов» (Москва, 11-15 апреля 2016 г.)
8. V Межрегиональной конференции «Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке». (Новосибирск, 14-16 октября 2015 г.)
9. Межвузовской конференции молодых ученых «Герценовские чтения» (Санкт-Петербург, 1-4 апреля 2014 г.).
10. XLI Межвузовской научно-практической конференции «Актуальные вопросы медицинской биологии и паразитологии» (Санкт-Петербург, 25 марта 2014 г.)

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 статей (7 из которых входят в журналы из перечня ВАК), 12 тезисов (устных докладов, постерных сессий).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из Введения, глав «Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты», «Заключения, 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.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Кровеносная система легочных моллюсков

Кровеносная система pulmonat является более замкнутой, чем у других брюхоногих моллюсков. Сердце лежит в окологердечной (перикардиальной) полости, расположенной над легочным мешком и имеющей эпителиальную выстилку – перикард. У особей, имеющих правозакрученную раковину, сердце помещается позади мантийной полости или слева над легочной полостью, у левозакрученных форм – справа. У большинства легочных моллюсков сердце двухкамерное (Акрамовский, 1976).

Атрио-вентрикулярное отверстие снабжено клапаном для предотвращения обратного тока гемолимфы. Подобный клапан описан также в начале аорты (Властов и др, 1940; Нуман, 1967).

Из желудочка сердца кровь направляется в главную аорту, которая в свою очередь разделяется на переднюю (головную) и заднюю (висцеральную) аорты (Акрамовский, 1976; Нуман, 1967). Задняя аорта снабжает гемолимфой пищеварительную железу, иногда другие участки пищеварительного тракта, овотестис и другие части репродуктивной системы.

Головная аорта направляется от главной аорты к переднему концу тела. По ходу от нее отходят ответвления (педальная, буккальная, щупальцевые и другие артерии).

Мелкие разветвления артерий изливают гемолимфу в систему синусов, окружающих различные органы (Basch, 1969; Pan, 1971). Налепой (Nalepa, 1883) описаны сети капилляров, существующие у pulmonat. Такие сети располагаются на поверхности или пронизывают все органы.

Венозная система начинается в тканевых лакунах. Главными венозными сосудами являются головной и висцеральный синусы в средней части тела, правые и левые краевые (маргинальные) синусы, ректальный синус, расположенный вдоль прямой кишки, непарные медианные и спаренные боковые педальные синусы в ноге. В итоге вся венозная кровь достигает венозного кольца – кругового сосуда,

расположенного вдоль края легочного мешка, который также включает кольцо вокруг пневмостома. От венозного кольца отходят многочисленные афферентные легочные артерии, продолжающиеся капиллярной сетью в крыше легочного мешка, где происходит газообмен. Из этой сети многочисленные эфферентные легочные вены объединяются в основную легочную вену, которая открывается в прилегающее предсердие. По-видимому, прямого перехода от артериального к венозным капиллярам в легочной сети нет. Эфферентные капилляры, смежные с нефридием переходят в нефридиальные синусы и затем собираются вместе, чтобы войти в легочную вену, прежде чем она впадает в предсердие. Таким образом сердце несет только артериальную кровь, часть которой была очищена от экскретов (Basch, 1969; Pan, 1971; Nyman, 1967).

Гистология системы кровообращения подробно изучалась Нолдом (Nold, 1924) на моллюсках *Helix pomatia*. Он показал, что стенка перикарда выстлана с двух сторон кубическим эпителием, мышцами и волокнами соединительной ткани. Эпителий перикарда продолжается по наружной поверхности сердца, стенка которого состоит из анастомозирующих пучков мышечных волокон, значительно более развитых в желудочке, чем в предсердии. Соединительная ткань образует тонкий слой над мышечными пучками, связывая мышечные волокна вместе. Эндотелиальная выстилка в сердце отсутствует.

Противоречивые взгляды на наличие истинной эндотелиальной выстилки были высказаны Нолдом (Nold, 1924), который обнаружил, что сплюсненные мышечные клетки могут имитировать эндотелий. При этом венозные сосуды не имеют определенных стенок; основные синусы, в которых собирается венозная кровь, представляют собой трубчатые каналы. У слизней *Veronicella* описаны венозные каналы, имеющие сфинктеры в виде равномерно расположенных колец мышц (Keller, 1902).

Термин диафрагма, употребляемый в некоторых работах, относится к нижней части легочного мешка. У некоторых пульмонат диафрагма продолжается до вентральной стенки тела рыхлой соединительной тканью с образованием

«цервикальной перегородки» между головными и висцеральными кровеносными синусами (Carikker, 1946).

Баш (Basch, 1969) для изучения артериальной системы моллюсков *Biomphalaria glabrata* применил импрегнацию китайской тушью. При ее введении в кровеносную систему моллюсков, последняя становится более заметной. Показано, что в артериальной системе имеется два ствола аорты: задний, который идет к кишечнику и пищеварительной железе и заканчивается в гермафродитной железе в виде гонадной артерии, и передний, дающий слепой вырост, почечную артерию и более мелкие сосуды. Последние идут к половым железам и коллумелярной мышце, заканчиваясь буккальным сосудистым сплетением. В районе окологлоточного ганглия отходят буккальная, pedalная и парные тентакулярные артерии, по которым гемолимфа поступает в цефалопедальную область. Настоящая капиллярная сеть сосудов отсутствует.

Артериальная система моллюсков *Biomphalaria glabrata* была также описана Паном (Pan, 1971) с использованием реконструкций серийных гистологических срезов. В своей работе он использовал особей, зараженных трематодами *Schistosoma mansoni*, так как при инвазии происходит гипертрофия стенок артерий, и таким образом они хорошо идентифицируются.

1.2. Морфология и классификация гемоцитов

Морфологическая классификация гемоцитов гастропод основана на исследованиях световой и электронной микроскопии (Sminia, 1972; Harris, 1975; Krupa et al., 1977; Sminia, Barendsen 1980; Sasaki et al., 2003; Walker et al., 2010; Cavalcanti et al., 2012; Ataev et al., 2016; Pila et al., 2016), проточной цитометрии (Martins-Souza et al., 2009; Travers et al., 2008; Donaghy et al., 2010; Barcante et al., 2012), функциональных исследованиях (Cheng, 1984), разделении клеток центрифугированием в градиенте плотности (Adema et al., 1994), связывании антител (Yoshino, Granath, 1985) и ферментных маркеров (Yoshino, Granath, 1983).

В разных работах описывается различное количество типов клеток гемолимфы. Ситуация осложняется разнообразием терминов, используемых для обозначения последних разными авторами: лейкоциты, лимфоциты, фагоциты,

макрофаги, гранулоциты, амебоциты и др. (Cheng, 1975; Jeong, Heyneman, 1976; Cheng, Guida, 1980a; Sminia, Barendsen, 1980; Stumpf, Gilbertson, 1980; Sminia, 1981; Barracco et al., 1993; Adamowicz, Bolaczek, 2003). Это разнообразие может быть связано с использованием различных критериев при их описании: морфологические, ультраструктурные особенности, биохимические маркеры (Pila et al., 2016).

Тем не менее, ряд авторов считает, что у брюхоногих моллюсков есть только один тип клеток – амебоциты, которые могут выполнять различные функции (Sminia, 1972; Sminia et al., 1973, 1974; Diaz Cosin, 1978).

Например, один тип клеток описан для моллюска *Lymnaea stagnalis* (van der Кнаар et al., 1993; Boisseaux et al., 2016). Считается, что с возрастом амебоциты претерпевают ряд морфологических изменений. Для молодых клеток характерно высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение, округлое ядро и большое количество свободных рибосом. В ходе созревания увеличивается диаметр клетки и количество органелл, а ядро принимает почковидную форму. Помимо этого, в клетках наблюдается увеличение активности ферментов – таких как кислые и щелочные фосфатазы, эстеразы, пероксидазы. Таким образом гетерогенность клеточного состава авторы связывают с этапами дифференцировки и созревания гемоцитов (van der Кнаар et al., 1993).

В тоже время, у моллюска *Lymnaea truncatula* на основании данных только морфологических исследований выделяют уже два типа амебоцитов (Rondelaud, Barthe, 1981). Для амебоцитов первого типа характерно наличие круглого или овального ядра, расположенного в центре клетки, и слегка зернистой цитоплазмы. Второй, менее многочисленный, имеет палочковидное ядро, расположенное ближе к периферии клетки, в цитоплазме отмечено наличие вакуолей и темных гранул (Rondelaud, Barthe, 1981).

Также два типа клеток было описано у моллюска *Planorbarius corneus* (Ottaviani, Franchini, 1988; Атаев, Полевщиков, 2004; Атаев, Прохорова, 2010; Атаев et al., 2016). Разделение гемоцитов было основано на их способности к адгезии. Первый тип – это макрофагоподобные распластывающиеся клетки, способные к

адгезии. Второй тип – это круглые гемоциты, которые не проявляют адгезивной активности. Авторы сравнивают активность этих клеток с активностью натуральных киллеров (NK) у человека, так как эти клетки принимают участие в процессах фагоцитоза чужеродных частиц и инкапсуляции (Francesch et al., 1991).

У *Oncomelania hupensis*, промежуточных хозяев *Schistosoma japonicum*, также описано два типа клеток: тип I (макрофагоподобный) и тип II (лимфоцитоподобный) различаются по форме, размеру, структуре поверхности, функциям и компонентам цитоплазмы. При этом отмечается, что клетки второго типа меньше по своим размерам (Sasaki et al., 2003).

Матрикон-Кондрад и Летокарт (Matricon-Condrat, Letocart, 1999) выделили три типа клеток у моллюска *Biomphalaria glabrata* – большие, средние и малые гемоциты, основываясь на размерных и ультраструктурных характеристиках клеток. Большие гемоциты имеют ассиметричную форму, маленькое ядерно-цитоплазматическое соотношение, в цитоплазме наблюдались многочисленные митохондрии и плотные частицы гликогена. Более симметричные средние гемоциты имеют крупное ядро; в их цитоплазме отмечается меньше органелл и несколько скоплений частиц гликогена. Малые гемоциты характеризуются наличием крупного ядра и небольшим количеством секреторных гранул. Большие и средние гемоциты представлены в кровотоке почти одинаково. По сравнению с ними количество малых гемоцитов заметно меньше.

В более поздней работе других авторов (Martins-Souza et al., 2009), у моллюсков *B. glabrata* и *B. tenagophila* также было выделено три типа гемоцитов – крупные, средние и малые. Выделение было основано на данных проточной цитометрии. Показано, что малые и средние гемоциты были наиболее многочисленны у неинфицированных моллюсков.

Другие авторы разделяют гемоциты *Lymnaea stagnalis*, *L. peregra*, *Planorbis corneus* и *Planorbis planorbis* на три типа: прогемоциты, базофильные гранулоциты и эозинофильные микрогранулоциты (по классификации Vostal, 1969) (Стадниченко и др., 1981). Разделение на данные типы клеток проводилось на основании морфологических исследований. Для прогемоцитов характерна

округлая форма и способность к фагоцитозу небольших частиц. В дальнейшем они дифференцируются на два других типа. Базофильные гранулоциты могут иметь различную форму, но не способны к образованию псевдоподий. В их цитоплазме отмечено наличие множества вакуолей, что может указывать на высокую фагоцитарную активность. Также они принимают участие в экскреции и транспорте питательных веществ. Второй тип клеток – эозинофильные микрогранулоциты представляют собой небольшие подвижные клетки, которые могут образовывать филоподии, но, несмотря на это, они не принимают участие в процессе фагоцитоза. Вместе с базофильными гранулоцитами эозинофильные микрогранулоциты принимают участие в агглютинации.

Анализ гемолимфы, взятой у моллюска *Lymnaea natalensis*, также показал наличие трех морфологических типов гемоцитов. Авторы обозначают их как – маленькие круглые гиалиноциты, большие круглые гиалиноциты и гранулоциты (El-Sayed et al., 2014).

У представителей семейства Philomycidae в гемолимфе описано три типа клеток, а именно тип I (макрофаги), тип II (лимфоцитоподобные клетки) и тип III (фибробластоподобные клетки). Отличия этих клеток основаны на морфологических и ультраструктурных особенностях (Furuta, Yamaguchi, 2001).

Два типа гемоцитов было выделено у моллюска *Helix aspersa maxima*: I (Ia и Ib) и II (Adamowicz, Wolaczek, 2003). Сферические гемоциты I типа (около 93%) – клетки, способные распластываться на субстрате и формировать многочисленные псевдоподии. Подтипы Ia и Ib – это две разные стадии дифференцировки и созревания одного типа клеток. Гемоциты II типа представляют собой овальные клетки постоянной формы, редко образующие псевдоподии.

На сегодняшний день большинство авторов выделяют два основных типа клеточных элементов гемолимфы гастропод: гранулоциты и гиалиноциты (Prowse, Tait, 1969; Cheng, 1975; 1984; Harris, 1975; Lie, Heyneman; 1976; Yoshino, 1976; Cheng, Auld, 1977; Krupa et al., 1977; Cheng, Guida, 1980b; Ottaviani, 1983; Ottaviani, Franchini 1986, 1988; Yoshino, 1986; Jourdane, Cheng, 1987; Barracco et al., 1993; Hine, 1999; Barbosa et al., 2006; Souza, Andrade, 2006; Adema et al., 2006; Ottaviani,

2006; Connors, 2003; Mahilini, Rajendran, 2008; Sokolova, 2009; Oliveira et al., 2010; Pongsakul et al., 2013 ; Ataev et al., 2016; Pila et al., 2016).

Эти две клеточные популяции выделяют, основываясь на размере клеток, способности образовывать псевдоподии, фагоцитарной активности, количественному соотношению в кровотоке, а также развитию органелл (ЭПР, аппарат Гольджи, лизосомы и др.).

Гранулоциты, называемые некоторыми авторами зернистыми лейкоцитами (Lie, Heyneman, 1976a; Jourdane, Cheng, 1987), наиболее многочисленны (90–96%) и имеют более подробное описание (Abdul-Salam, Michelson, 1980; Jourdane, Cheng, 1987; Ottaviani, Franchini, 1988; Атаев, Прохорова, 2010; Ataev et al., 2016). Это большие клетки (7.2 ± 0.9 мкм) с округлым или овальным ядром. Отличительной чертой гранулоцитов является способность образовывать разные типы псевдоподий (широкие, неразветвленные лобоподии или узкие и тонкие филлоподии), в формировании которых участвует хорошо развитый цитоскелет (Cheng, 1975; Cheng, Guida, 1980b).

В гранулоцитах хорошо развит шЭПР, аппарат Гольджи, митохондрии, лизосомоподобные структуры, гранулы гликогена, а также различные типы плотных гранул – ацидофильные и базофильные (Foley, Cheng, 1975; Sminia, 1972; Ottaviani, Franchini, 1988). При этом гранулоциты, которые содержат ацидофильные гранулы несколько меньше, чем гранулоциты с базофильными гранулами. Чаще всего одна клетка содержит какой-то один тип гранул, но некоторые гранулоциты могут содержать оба типа (см.: Атаев, Полевщиков, 2004). В более ранней работе (Cheng, 1975) было сделано предположение, что наличие в гранулоцитах определенных типов гранул зависит от метаболической активности этих клеток. Кроме этого в цитоплазме гранулоцитов отмечено наличие вакуолей, которые способны вырабатывать лизосомальные гидролазы. Наличие в гранулоцитах различных компартментов, гранул и вакуолей указывает на их активную секреторную функцию.

Гиалиноциты менее многочисленны, являются клетками в основном небольшого размера и не обладают способностью распластываться, хотя способны

к адгезии. Цитоплазма у них более светлая, чем у гранулоцитов; не содержит гранул и лизосомальных структур (Barbosa et al., 2006; Ataev et al., 2016; Pila et al., 2016).

Некоторые авторы выявляют полиморфизм среди гранулоцитов и гиалиноцитов. Так Ченг и Гида (Cheng, Guida, 1980a) различают три подкласса гранулоцитов: гранулоциты со светлым хроматином, гранулоциты с конденсированным хроматином и дегенерирующие гранулоциты. Жоки с соавторами (Joku et al., 1983) выделяет среди гранулоцитов четыре типа клеток согласно их размеру, морфологии, содержанию органелл и наличию поверхностных рецепторов.

В то же время Фенг с коллегами (Feng, 1965) выделяет три морфотипа гиалиноцитов у двустворчатого моллюска *Crassostrea virginica*. Клетки первого типа характеризуются хорошо развитым гладким ЭПР, обилием митохондрий и содержат единичные гранулы гликогена. К гиалиноцитам второго типа относятся клетки с бóльшим ядерно-цитоплазматическим соотношением, характеризующиеся наличием цистерн шЭПР и крупных скоплений гликогеновых гранул. В клетках, относящихся к третьему морфотипу, отмечено наличие развитого гладкого и шероховатого ЭПР. Позднее было высказано предположение, что выделенные различия морфологии гиалиноцитов обусловлены разными стадиями развития и метаболической активности одного типа клеток (Cheng, Cali, 1974).

Кавальканти с соавторами (Cavalcanti et al., 2012), выделяя пять типов клеток в гемолимфе моллюсков *Biomphalaria glabrata* и *B. straminea*, также разделяет гиалиноциты на три типа – по степени встречаемости, расположению ядра и способности образовывать псевдоподии.

Схожие данные были получены в результате изучения гемолимфы моллюсков *Littorina littorea* (Gorbushin, Iakovleva, 2006). Среди клеточных элементов авторы выделяют три типа гиалиноцитов: ювенильные округлые, промежуточные и зрелые клетки.

Остается неясной природа и происхождение клеток гемолимфы. Некоторые авторы считают, что гранулоциты и гиалиноциты являются отдельными типами клеток. Другие исследователи придерживаются точки зрения, что они представляют собой стадии развития одного клеточного типа (Oliveira et al., 2010). Так было высказано предположение (Sminia, 1981), что гиалиноциты являются предшественниками гранулоцитов. При проникновении патогена гранулоциты мигрируют в очаг воспаления, а параллельно этому гиалиноциты размножаются и дифференцируются в зрелые клетки (Martins-Souza et al., 2009). До конца не понятно: являются ли эти клетки отдельными клеточными линиями, которые произошли от различных стволовых клеток, или они имеют одну клетку-предшественницу.

Сминиа и Барендсен (Sminia, Barendsen, 1980) также приходят к выводу, что есть только один тип клеток в гемолимфе гастропод – амебоциты. При этом существующие отличия в морфологии клеток они объясняют последовательными стадиями их созревания. В гемолимфе содержатся молодые округлые клетки, которые имеют маленький размер. Они способны образовывать небольшие филоподии и не содержат гранул. Второй тип представлен зрелыми клетками большего размера с длинными филоподиями, многочисленными диктиосомами и лизосомами. При этом среди округлых клеток, которые по мнению авторов являются гиалиноцитами, выделяются темные и светлые клетки. Последние они относят к дегенерирующим клеткам на основании особенностей их морфологии (наличие вздутого ядра и разрушенных органелл).

Некоторые авторы выделяют в отдельный клеточный тип гастропод фагоцитирующие гемоциты (Connors et al., 1991; Matricon-Gondran, Letocart, 1999). Эти клетки содержат кислую фосфатазу, а также обладают пероксидазной активностью.

Также для разделения популяций клеток используются методы с применением лектинов (Schoenberg, Cheng, 1980, 1981; Yoshino, 1981; Joky et al., 1983; Martins-Souza et al., 2006). В экспериментах с использованием конканавалина А (*Conavalina ensiformis*), и WGA (*Triticum vulgare*) в моллюсках *Biomphalaria*

glabrata Жоки (Joky et al., 1983) выделяет четыре типа гранулоцитов, среди которых только один тип клеток связывает конканавалин А, тогда как остальные имеют рецепторы к WGA. В то же время гемоциты *B. tenagophila* имеют рецепторы к PNA (*Arachis hypogaea*) и к WGA (Martins-Souza et al., 2006).

Есть авторы, которые вообще терминологически сближают гемоциты моллюсков с клетками крови млекопитающих, которые напоминают человеческие макрофаги (van der Кнаар et al., 1993).

1.3. Состав плазмы гемолимфы

Гемолимфа моллюсков содержит растворенные гемопротейны, в том числе дыхательные пигменты (Furuta, Yamaguchi, 2001). Последние представлены гемоглобинами и гемоцианинами. Одним из наиболее часто встречающихся дыхательных пигментов у моллюсков является гемоцианин (Coates, Decker, 2017). Он обнаружен у гастропод (Albrecht et al., 2001; Beuerlein et al., 2002), цефалопод (Boisset, Mouche, 2000) и бивальвий (Morse et al., 1986). Предполагается, что этот пигмент синтезируется, хранится и высвобождается специальными клетками – рогоцитами (поровые клетки), локализованными в соединительной ткани гастропод (Sminia, 1972; Sminia, Boer, 1973; Albrecht et al., 2001; Beuerlein et al., 2002; Kokkinoroulou et al., 2015), в жаберной железе и средней кишке головоногих моллюсков (Ruth et al., 1999; Taylor, Antiss, 1999).

В пресноводных моллюсках *Biomphalaria glabrata* и *Planorbarius corneus* поровые клетки участвуют в синтезе гемоглобина (Алякринская, 1970; Lieb et al., 2006; Kokkinoroulou et al., 2014). При этом у этих представителей планорбид были обнаружены следовые количества гемоцианина (Lieb et al., 2006; Pena, Adema, 2016).

Гемоглобин также обнаружен у некоторых представителей бивальвий (Xu et al., 2015; Bao et al., 2016; Wang et al., 2017; Xu et al., 2017), однако в этих работах отсутствуют данные о локализации мест синтеза этого пигмента.

Помимо дыхательных пигментов в плазме моллюсков *Biomphalaria glabrata* выделено около 50 полипептидов различной молекулярной массы, в том числе лектины – углеводов связывающие белки, участвующие в неспецифическом

распознавании у моллюсков (Loker, Hertel, 1987; Monroy et al., 1992; Vietri, Granath, 1992). Показано, что белковые профили гемолимфы моллюсков, как резистентных, так и чувствительных к заражению трематодами, во многом схожи между собой. При трематодной инвазии наблюдается увеличение общего содержания белка в плазме (Loker, Hertel, 1987; Monroy et al., 1992). При этом регистрируемые белковые профили отличаются друг от друга при заражении трематодами разных видов: *Schistosoma mansoni* и *Echinostoma paraensei* (Monroy et al., 1992).

Гемолимфа моллюсков кроме этого обладает опсонизирующими молекулами, а также обеспечивает цитотоксичность гемоцитов (Wayne et al., 1985). Так в исследованиях *in vitro* показано, что гемоциты резистентной линии моллюсков в отличие от чувствительной могут убивать спороцист без участия каких-либо факторов. Однако плазма устойчивых линий моллюсков может обеспечивать клеточно-опосредованную цитотоксичность для гемоцитов чувствительных особей (Loker et al., 1982; Wayne et al., 1986).

1.4. Функциональная активность гемоцитов

Зрелые циркулирующие клетки гемолимфы лёгочных моллюсков выполняют в организме моллюска различные функции, среди которых наибольший интерес исследователей вызывает их участие в иммунном ответе. Именно гемоциты считаются ключевым звеном на любом уровне защитных реакций (см.: Атаев, Полевщиков, 2004).

Интерес к изучению клеток гемолимфы и их участию в иммунных реакциях моллюсков (особенно брюхоногих) во многом связан с ролью последних в качестве промежуточных хозяев в жизненных циклах трематод, многие из которых являются опасными паразитами человека и экономически важных животных.

Гемоциты играют важную роль во врожденных иммунных реакциях моллюсков. При этом наличие гуморальных факторов также является неотъемлемой частью осуществления иммунного ответа.

Эти клетки выполняют важную роль в *фагоцитозе* (Sminia, 1972, 1981; Yoshino, 1976; van der Кнаар, 1981; Furuta et al., 1986, 1987, 1990; Yamaguchi et al., 1988; Атаев, Полевщиков, 2004; Атаев et al., 2016; Pila et al., 2016; 2017),

инкапсуляции чужеродных веществ (Sminia et al., 1974; Lie et al., 1976; Lie, Heyneman 1976 a, b; Loker et al., 1982; Jourdane, Cheng, 1987; Dikkeboom et al., 1988; Ataev, Coustau, 1999; Furuta, Yamaguchi, 2001; Прохорова и др., 2015,) и **образовании цитотоксических молекул** (оксид азота, перекись водорода), участвующих в защитных реакциях (Adema et al., 1992, 1994; Lacchini et al., 2006; Humphries, Yoshino, 2008; Seppälä, Leicht 2013). Кроме этого гемоциты участвуют в процессах физиологической **регенерации** (Franchini, Ottaviani, 2000; Furuta, Yamaguchi, 2001; Hermann et al., 2005), **формировании раковины** (Mount et al., 2004), **распознавании патогенов через специфические рецепторы** (например, TLR4) (Gust et al., 2013a), **высвобождении опсонин** (например, лектины) (Horak, Deme, 1998) и **цитокинов** (De Jong-Brink 1994, Gust et al., 2013). Некоторые из этих процессов могут значительно сокращать количество циркулирующих гемоцитов, которые затем должны быть восполнены в результате гемопоэза.

Предполагается, что форменные элементы гемолимфы моллюсков различных субпопуляций, которые отличаются как химически, так и функционально, регулируют свое поведение через специфические рецепторы после связывания с соответствующим лигандом (Humphries, Yoshino, 2003).

Хемотаксис является начальным этапом в реакциях организма на чужеродные факторы. Проявление хемотаксиса циркулирующими клетками связано с наличием в гемолимфе специфических хематтрактантов – продуктов тканевой деструкции, каскадов коагуляции или продуктов жизнедеятельности паразита (Земсков, 1972; Галактионов, 2005; Атаев, Полевщиков, 2004). Так, гемоциты *Planorbarius corneus* способны к направленной миграции в сторону источника бактериальных липополисахаридов (ЛПС), а гемоциты морских гастропод *Nerita albicilla* и *Heminerita japonica* проявляют хемотаксис по отношению к бактериям *Vibrio parahaemolyticus* и *Escherichia coli* (Kumazawa et al., 1992). Также хемотаксис гемоцитов можно наблюдать по отношению к трематодам, доказательством чего является формирование скопления клеток в области проникновения паразита (Lie, Heyneman, 1975a, 1976a; Ataev Coustau, 1999). Кроме этого было показано, что экскреторно-секреторные продукты

трематод *Echinostoma paraensei* и *Schistosoma mansoni* влияют на подвижность гемоцитов *Biomphalaria glabrata* (Bayne et al., 1986; Lodes, Yoshino, 1990).

Адгезия клеток на поверхности чужеродного объекта является необходимым условием для реализации фагоцитоза как гемоцитами моллюсков (Ataev, Coustau, 1999), так и других фагоцитами многоклеточных животных. Прикрепление бактерий или иных частиц к клетке осуществляется за счет рецепторов на клеточной поверхности, различными адгезионными молекулами, в том числе гуморальными факторами, такими как агглютинины. Последние имеют рецепторы на поверхности соответствующих клеток. Способность очищенных агглютининов выступать в качестве распознающих структур продемонстрировано на примере моллюска *Helix pomatia* (Галактионов, 2005).

Оценка адгезионной активности гемоцитов двух линий *Biomphalaria glabrata* показала, что клетки моллюсков, резистентных и чувствительных к заражению трематодами *Schistosoma mansoni*, достоверно различаются по способности к адгезии. Адгезия гемоцитов резистентных моллюсков возрастает в ответ на проникновение паразита, в то время как гемоциты чувствительных моллюсков не обладают таким свойством (Ataev, Coustau, 1999). Вероятно, циркулирующие гемоциты *Biomphalaria glabrata* экспрессируют на своей поверхности интегриноподобные рецепторы, имеющие сайты связывания с последовательностями фибронектина (Davids, Yoshino, 1998).

Гастроподы не имеют классических иммунных молекул распознавания позвоночных животных, таких как иммуноглобулины, молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) или антигенных рецепторов. Однако моллюски обладают способностью различать не только «свое» от «чужого», но и различные типы «чужого», которые отличаются по химическим свойствам (Bayne, 1990; Cooper et al., 1992). Беспозвоночные, в том числе моллюски обладают несколькими классами биологически активных гуморальных факторов, которые функционально имитируют антитела. Эти молекулы, обладающие агглютинирующей активностью, могут участвовать в распознавании чужеродных объектов (Olafsen, 1986; Couch et al., 1990). Считается, что большинство

агглютининов беспозвоночных являются лектинами, некоторые из которых могут выступать в роли опсопинов (Tripp, 1970, 1992; Anderson, Good, 1976; Renwranz, Mohr, 1978; Sminia et al., 1979; van der Knaap et al., 1983; Furuta et al., 1995). Эти молекулы присутствуют не только в гемолимфе, но и в слизи, выделяемой клетками покровного эпителия (Iguchi et al., 1982, 1985; Miller, 1982; Fountain, Campbell, 1984; Fountain, 1985; Kubota et al., 1985; Furuta et al., 1995).

Многие авторы приписывают амебоцитам моллюсков **фагоцитарную способность** (Tripp, 1961; Bang, 1975; Anderson, Good, 1976; Купер, 1980; Ataev et al., 2016). Это свойство клеток является основным для реализации защитных реакций легочных моллюсков (Lie, Heuneman, 1975b; Wayne, Yoshino, 1989; Connors, 2003). Для выявления фагоцитарной активности гемоцитов в экспериментах *in vitro* чаще всего используют: зимозан, частицы латекса, эритроциты барана и меченные грамположительные или грамотрицательные бактерии. В результате было показано, что гранулоциты проявляют большую активность при фагоцитозе, чем гиалиноциты. Некоторые авторы вообще ставят под сомнение фагоцитарную активность гиалиноцитов (Seta et al., 1996). По мнению этих исследователей, только гранулоциты можно характеризовать, как клетки, участвующие в фагоцитозе. Хотя даже среди гранулоцитов можно наблюдать клетки с разной фагоцитарной емкостью, при которой клетки поглощают разное количество чужеродных частиц за одинаковое время (Sminia, Barendsen, 1980).

Процесс фагоцитоза стимулируется растворимыми факторами гемолимфы. Плазма гемолимфы обладает опсонизирующим эффектом – способностью усиливать взаимодействие между мембраной фагоцита и объектом фагоцитоза (Connors, Yoshino, 1990).

Для моллюсков *B. glabrata* показано два пути поглощения чужеродных частиц и бактериальных клеток. Первый путь, описанный для фагоцитоза гранул зимозана и латекса, осуществляется согласно модели «застежки—молнии» (zipper model), которая подразумевает последовательное взаимодействие рецепторов фагоцита со структурами поглощаемой частицы. Фагоцитоз бактерий

осуществляется согласно триггерной модели (trigger model), которая предусматривает одномоментный захват (Matricon-Gondran, Letocart, 1999).

У моллюска *Scrobicularia plana* тоже была показана способность к фагоцитозу – эритроцитов, дрожжей, флуоресцентно меченных бактерий (*Planococcus citreus*, *Vibrio tubiashii*, *Escherichia coli*), а также водорослей. В гемолимфе этого моллюска содержатся агглютенины и гликопротеины, которые обладают опсанизирующими свойствами (Wootton, Pipe, 2003).

Присный с коллегами (2011) при исследовании фагоцитарной активности *in vitro* гемоцитов моллюсков *Helix pomatia* и *Stenomphalia ravergeri* использовали культуру клеток *Saccharomyces cerevisia*. Авторами было показано, что в течение 20 мин 80 % дрожжевых клеток было фагоцитировано гемоцитами. При этом наиболее активно в процессе фагоцитоза участвовали клетки, соответствующие по морфологии гранулоцитам, в то время как клетки, схожие с гиалиноцитами, большей частью участвовали в процессах адгезии дрожжей *S. cerevisia* на своей поверхности. В результате были образованы агрегаты из гемоцитов и дрожжевых клеток, что значительно ограничивало подвижность последних.

Установлено, что фагоцитарная активность гемоцитов *Biomphalaria glabrata*, как и клеток позвоночных животных, связана с выработкой внутриклеточного цАМФ (Bezerra et al., 1999). По данным Абдул-Салам и Михельсон (Abdul-Salam, Michelson, 1979) важную роль в процессе фагоцитоза также играет гликолиз, так как ингибиторы анаэробного метаболизма более интенсивно подавляют фагоцитарную активность.

Среди циркулирующих защитных факторов особая роль отводится специальным ферментам. К примеру, в гранулоцитах гемолимфы *Biomphalaria glabrata*, зараженных *Bacillus megaterium*, количество кислой фосфатазы достаточно для останова развития и гибели бактерий (Cheng, 1977).

Инкапсуляция представляет собой одну из форм неспецифической защиты моллюсков, которая происходит в ответ на проникновение многоклеточного патогена или другого крупного объекта, которые не могут быть захвачены одной клеткой – фагоцитом.

По мнению многих авторов только один тип кровеносных клеток – гранулоциты – принимает участие в инкапсуляции инородных тел и спорцист трематод (Cheng, Garrabrant, 1977; Krupa et al., 1977; Venex, Jacobelli, 1980; Loker et al., 1982; Cheng, Jourdan, 1987; Ataev, Coustau, 1999; Атаев, 2000; Атаев, Полевщиков, 2004), нематод (Harris, 1975), фрагментов синтетических губок (Sminia et al., 1974). Эти авторы наблюдали сформированные капсулы, в которых гемоциты расположены всегда одинаковым образом: они распластываются на поверхности чужеродного объекта и образуют концентрические слои удлинённых клеток. Хотя было показано, что гиалиноциты так же могут принимать участие в этом процессе (Галактионов, 2005).

Так, у биомфаларий реакция отторжения не проявляется на введение ауто- и изотрансплантата, в отличие от алло- и ксенотрансплантата (Jourdan, Cheng, 1987; Cheng, Jourdan, 1987; Sullivan, 1990). В ходе клеточного ответа вокруг пересаженных тканей образуются так называемые фиброзно-лейкоцитные капсулы, в состав которых входят преимущественно гранулоциты (Cheng, Jourdan, 1987; Ottaviani, Vergine, 1990). При этом гранулоциты, оседающие на поверхности изогенного трансплантата, не выделяют лизосомальные гидролазы, поэтому инициации второй стадии инкапсуляции не происходит, и трансплантат не отторгается.

Имеется немало описаний капсул, формирующихся в моллюсках вокруг различных паразитов и других чужеродных объектов (Byrd, Maples, 1969; Lie, Neuneman, 1975 a, b, 1976; Loker et al., 1986; Sullivan, Hu, 1996, и др.). Наиболее детально динамика инкапсуляции описана для моллюсков *Biomphalaria glabrata* резистентной линии, зараженных партенитами *Echinostoma caproni* (Ataev, Coustau, 1999; Атаев, 2000).

Процесс инкапсуляции у моллюска *Biomphalaria glabrata* условно можно разделить на две стадии. Вначале происходит проникновение и агрегация клеток гемолимфы вокруг паразита. На второй стадии происходит преобразование этих клеточных агрегатов в фиброзные узелки. Узелки состоят из плоских клеток с

удлиненными ядрами, а также содержат фиброзные элементы, которые сложно идентифицировать в световой микроскоп (Harris, Cheng, 1975).

Ли и Хейнеман (Lie, Heyneman, 1976) показали, что у моллюсков *Biomphalaria glabrata*, резистентных к *Echinostoma lindoense*, спороцисты разрушаются непосредственно в поверхностных тканях в местах проникновения мирацидиев. У частично резистентных животных многочисленные спороцисты деградируют на всем пути их миграции в тканях хозяина, выживают только те, кто достигает желудка. У чувствительных животных все спороцисты мигрируют быстро и достигают сердца, где осуществляется их развитие. Бенекс и Джакобелли (Benex, Jacobelli, 1980) наблюдали реакцию инкапсуляции через 24 – 48 часов после проникновения мирацидия *Schistosoma mansoni* в моллюсках *Biomphalaria glabrata* резистентной линии. В то же время, Локер (Loker et al., 1982) наблюдал реакцию инкапсуляции через 7 часов после проникновения мирацидиев в резистентные штаммы *Biomphalaria glabrata* 10R2.

В некоторых случаях клетки способны секретировать различные вещества в зависимости от характера инкапсуляции. Так, Харрис (Harris, 1975) обнаружил, что амебоциты *Biomphalaria glabrata* секретируют гранулы и плотные везикулы, которые располагаются на поверхности гранулоцитов и инкапсулированных нематод. Гистохимическое изучение показало наличие в этих гранулах кислой фосфатазы, неспецифической эстеразы, щелочной фосфатазы и глюкуронидазы.

Крупа (Krupa et al., 1977) показал, что гранулоциты *Bulinus guernei* производят внутри- и внеклеточные микрофиламенты, в то время как Сминия с коллегами (Sminia et al., 1974) при инкапсуляции инородного тела у *Lymnea stagnalis* наблюдали синтез амебоцитами вещества, похожего на коллаген. Однако Локером (Loker et al., 1982) не было обнаружено подобных межклеточных структур.

Байне с коллегами (Wayne et al., 1980a, 1980b) изучали развитие *in vitro* спороцист *Schistosoma mansoni* при контакте с амебоцитами *Biomphalaria glabrata* резистентной и чувствительной линии. Они показали, что амебоциты резистентной линии сохраняют активность в присутствии плазмы от чувствительных животных,

в то же время амебоциты моллюсков чувствительной линии приобретают цитотоксичность при добавлении плазмы резистентных животных. Они приходят к выводу, что резистентность моллюсков зависит от факторов, присутствующих в гемолимфе и на амебоцитах. Эти вещества могут играть роль опсопинов также как лектины гемолимфы, приводящие к фагоцитозу бактерий (van der Knaap et al., 1982; Renwrantz et al., 1981).

Процесс формирования капсул был подробно описан Журданом и Ченгом в работе по пересадке аллотрансплантатов пищеварительных желез и поверхностных тканей ноги моллюсков (Jourdane, Cheng, 1987). Реципиентами в эксперименте служили моллюски гавайской, а донорами — бразильской линии *Biomphalaria glabrata*. Были выделены две основные стадии инкапсуляции трансплантатов. На первой стадии (стадия инициации) гемоциты скапливаются в области трансплантата и адгезируют на его поверхности. При этом гемоциты внутренних слоев формирующейся капсулы уплощаются ($6,5 \times 24$ мкм), а клетки периферических слоев остаются овальными ($14,5 \times 24,1$ мкм). Ферменты (предположительно лизосомальные гидролазы), выделяемые гранулоцитами внутренних слоев капсулы, изменяют поверхность трансплантата. Начало этого процесса в свою очередь является сигналом, инициирующим синтез фиброзных волокон. Включение фиброзного материала в состав капсулы считается началом второй стадии инкапсуляции. Она характеризуется повторной волной клеточных реакций, в ходе которой и формируется мощная фиброзно-клеточная капсула.

В результате изучения динамики инкапсуляции материнских спороцист (МС) *Echinostoma caproni* в *Biomphalaria glabrata* (Ataev, Coustau, 1999; Атаев, 2000) была предложена еще одна версия трактовки этих процессов. На первом этапе массового оседания гемоцитов на поверхности партенит не происходит – между внутренней поверхностью формирующейся капсулы и телом паразита сохраняется узкий просвет. Возможно, именно здесь накапливаются определенные вещества, выделяемые клетками гемолимфы, которые и инициируют начало процесса разрушения чужеродного объекта – тегумента материнских спороцист трематод (цит. по Атаев, Полевщиков, 2004).

Однако в ряде случаев может наблюдаться извращение защитных реакций моллюска-хозяина. При этом вокруг паразитов образуется «мантия», состоящая из гемоцитов (Schell, 1961; Галкин, 1976; Галактионов, Добровольский, 1998; Galaktionov, Dobrovolskij, 2003). Этот вариант широко используется трематодами Plagiorchiata. Клетки хозяина, входящие в состав мантии, подвергаются значительным изменениям. Гемоциты полностью теряют способность к амебоидному движению, довольно заметно меняется их ультраструктурная организация и даже обмен. Функционально они становятся частью организма паразита. В клетках мантии выявляется очень высокая активность некоторых ферментов цикла Кребса, в частности сукцинатдегидрогеназа (Гинецинская, Хари, 1975). Кроме того, в них накапливается большое количество гликогена, превышающее запасы последнего в клетках гепатопанкреаса хозяина и стенке тела самого паразита.

Гемоциты моллюска *Lymnaea stagnalis* также могут участвовать в процессе инкапсуляции. Это было показано в эксперименте с абиотическим материалом (пластиковая губка). В течение 24 часов наблюдалось скопление клеток и образование капсулы, увеличение числа таких капсул наблюдалось до трех дней. Спустя неделю, в капсулах было отмечено наличие трех слоев: внутренний и внешний слой состояли из плотно упакованных, плоских клеток, в состав среднего слоя входили круглые гемоциты. Со временем средний слой исчезал, клетки сглаживались и становились частями двух других слоев. В клетках внутреннего слоя наблюдалось множество лизосом (Sminia et al., 1974).

В работах Зауерландер (Sauerländer, 1976) рассматривается процесс инкапсуляции нематоды *Angiostrongylus cantonensis* в моллюсках *Achatina fulica*. При инвазии возрастает количество амебоцитов в гемолимфе и кровеносных синусах соединительной ткани. В течение 12 часов паразиты были инкапсулированы большим количеством амебоцитов. Через 3 дня ядра этих амебоцитов становятся веретенообразными, а капсула вокруг паразита имеет концентрические слои

В пресноводных видах *Lymnaea stagnalis* образуются капсулы вокруг биологически инертных имплантатов, при этом внутренние слои представлены уплощенными и плотно упакованными клетками. Во внешних слоях капсулы межклеточные пространства заполняются мельчайшими соединительнотканными фибриллами. Предполагается, что эти межклеточные вещества синтезируются амебоцитами, которые трансформировались в фибробласты (Sminia, 1981).

Еще одной из важных особенностей гемоцитов моллюсков является способность вырабатывать различные **цитотоксические молекулы** (оксид азота (NO), супероксиданион (O_2^-), пероксид водорода (H_2O_2)). Эти метаболиты обеспечивают разрушение клеточных мембран паразита и чужеродных агентов. В процессе «кислородного взрыва» участвует многоступенчатая система ферментов, основными из которых являются НАДФН, оксидаза, двойная оксидаза, супероксид-дисмутаза и митоген-активируемые протеинкиназы (Lockyer et al., 2007; Humphries, Yoshino, 2008).

Показано, что гемоциты моллюска *L. stagnalis* обладают НАДФН оксидазной активностью (Adema et al., 1994), а также продуцируют супероксиданион (O_2^-) при стимуляции зимозаном (Connors, Yoshino, 1990). Продукция супероксиданиона показана также для гемоцитов моллюсков *Biomphalaria glabrata*, зараженных *Schistosoma mansoni*. Однако достоверных различий в продукции супероксиданиона между гемоцитами резистентной и чувствительной к заражению линий биомфаларий не обнаружено (Hahn et al., 2001; Humbert, Coustau, 2001).

В то же время, у моллюсков чувствительных линий *Biomphalaria alexandrina* при заражении трематодами *Schistosoma mansoni* в гемоцитах значительно возрастает активность каталазы, глюкоза-6-фосфат-дегидрогеназы, глутатион-пероксидазы (Mahmoud, Rizk, 2004), что говорит об эффективности работы антиоксидантной системы, предотвращающей повреждение тканей кислородными метаболитами.

Аналогичные результаты были получены при анализе гемоцитов моллюсков *Lymnaea stagnalis*, чувствительных и резистентных к заражению *Trichobilharzia ocellata* (Dikkeboom et al., 1988). Заражение прудовиков специфическим паразитом

Trichobilharzia ocellata вызывает продукцию активных форм кислорода гемоцитами, что приводит к гибели спороцист. Заражение неспецифическим паразитом *Schistosoma mansoni* не приводит к «кислородному взрыву».

МС трематод активируют образование гемоцитами высокотоксичных перекисных соединений. В узком просвете между тегументом спороцист *S. mansoni* и капсулой гемоцитов *Lymnaea stagnalis*, обнаруживаются пероксидаза, радикалы супероксида и пероксида водорода (van der Кнаар, Loker, 1990). Применение ингибитора НАДФН-оксидазы задерживает элиминацию спороцист *Trichobilharzia ocellata* и *Schistosoma mansoni* гемоцитами устойчивых к инвазии линий *Lymnaea stagnalis* и *Biomphalaria glabrata* соответственно (Dikkeboom et al., 1988; Adema et al., 1994; 2000). Инкубация гемоцитов *B. glabrata* со стимуляторами секреции реактивных форм кислорода, напротив, приводит к увеличению продукции кислородных метаболитов (Zelck et al., 2007).

Другим механизмом уничтожения чужеродных клеток является продукция оксида азота NO. Гемоциты *Viviparus ater* способны к синтезу NO с помощью комплекса ферментов, ключевым из которых является НАДФН-зависимая нитритная окись-синтетаза. Стимуляция клеток ЛПС увеличивает активность этого фермента и продукцию NO в 2,4 раза (Conte, Ottaviani, 1995).

Как было сказано выше, кроме NO гемоциты моллюсков могут синтезировать и другие активные метаболиты, такие как \bar{O}_2 . Его продукция была обнаружена у следующих моллюсков – *L. stagnalis*, *Helixa spersa*, *Planorbarius corneus* и *B. glabrata* в ответ на стимуляцию чужеродными частицами (зимозан). Интенсивность реакции была выше у первых двух моллюсков, возможно на это повлияли экспериментальные условия, которые были более благоприятны для одних видов, чем для других (Dikkeboom et al., 1988).

Для гемоцитов *Biomphalaria glabrata* была показана способность к продукции H_2O_2 при стимуляции бычьим сывороточным альбумином (БСА) (Humphries, Yoshino, 2008). При воздействии на гемоциты восприимчивых и устойчивых улиток протеинкиназой С (PKC) у первых зарегистрирован более высокий уровень H_2O_2 . Таким образом производство H_2O_2 может играть важную

роль в определении восприимчивости или устойчивости к заражению паразитов, в частности *Schistosoma mansoni* (Bender et al., 2005).

В последние годы появилось много сообщений об обнаружении **антибактериальных катионных белков** у представителей различных таксонов беспозвоночных. При фагоцитозе эти белки поступают в фаголизосому и адсорбируются на свободной поверхности фагоцитированных бактерий. Наиболее вероятным механизмом взаимодействия между катионными белками и фагоцитированными бактериями считается электростатическое взаимодействие анионных компонентов бактериальной клетки с катионными белками. В результате этого бактерии утрачивают жизнеспособность и погибают (Пигаревский, 1978). При активации гемолимфы *Achatina fulica* ЛПС грамотрицательных бактерий общее количество гемоцитов моллюска резко увеличивается спустя 40 мин после инъекции. Гемоциты активированных моллюсков агрегируют с образованием коагулянта. Методами хроматографии из лизата гемоцитов *A. fulica* был выделен эндотоксин-чувствительный фактор с ММ 140 кДа, способный к связыванию и нейтрализации эндотоксина *E. coli* (Biswas, Mandal, 1999 – цит. по Атаев, Полевщиков, 2004).

У моллюска *Biomphalaria glabrata* в ответ на проникновение паразита *Echinostoma caproni* наблюдается повышенная секреция такого антимикробного пептида, как – аплицианин (Hanington et al., 2010).

Производство антибактериальных белков было описано и для бивальвий: *Mytilus galloprovincialis* и *M. edulis* (Mitta et al., 2000). Авторами было выделено четыре класса антимикробных пептидов: митилины, митимицины, митицины и дефензины. Эти пептиды хранятся в специальных секреторных гранулах и принимают участие в процессе фагоцитоза. Кроме этого они могут участвовать в системных реакциях путем поступления в гемолимфу. Дефензины и митицины проявляют большую активность в отношении грамположительных бактерий, а также некоторых патогенных микроорганизмов, и гораздо менее активны против грамотрицательных бактерий или грибов. Митимицины представляют собой строго противогрибковые пептиды. В свою очередь, митилины обладают широким

спектром активности. Это возможно благодаря существованию у них нескольких изоформ (B, C, D, G1). Изоформы B, C и D проявляют активность в отношении как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, в то время как митилин G1 активен только в отношении грамположительных. Но даже несмотря на большую гомологию между изоформами B и C, они различаются по спектру своей активности в отношении некоторых грибковых патогенов и грамотрицательной бактерии *Vibrio splendidus*. Скорее всего, различные антимикробные пептиды и их изоформы дополняют действия друг друга, что в свою очередь позволяет увеличить эффективность защитных реакций моллюсков.

Помимо выше перечисленных функций, гемоциты моллюсков могут принимать участие в **репаративных процессах**. Они принимают участие в регенерации поврежденных тканей (Oliveira, 2010), в том числе с их помощью происходит закупоривание поврежденных сосудов, ведущее к прекращению кровотечения и препятствующее проникновению инфекции в гемоцель моллюсков (Стадниченко, 1981). При этом наблюдается значительное снижение численности циркулирующих клеток в гемолимфе (Oliveira et al., 2010). В работе Сминия (Sminia et al., 1973) отмечено, что гемоциты моллюска *Lymnaea stagnalis* играют важную роль в заживлении ран. Однако, процесс скопления гемоцитов у моллюсков физиологически отличается от процесса свертывания крови у позвоночных.

Процесс восстановления тканей был изучен у легочного моллюска *Limax maximus* (Franchini, Ottaviani, 2000). В результате гистологического исследования было показано, что регенерация является последовательным процессом. Вначале происходит фаза инфильтрации, активация которой происходит через 24 часа после повреждения. При этом гемоциты располагаются по краям раны и активно фагоцитируют клеточный дебрис и поврежденную ткань в окружающей области. Через 24 – 72 часа образуется «гранулема», содержащая небольшие кровеносные лакуны. На гистологических срезах через 72 часа после травмирования видно, что рана заполнена соединительной тканью и покрыта слоем волокнистой ткани с толстыми нерегулярными пучками коллагеновых волокон. Гемоциты, присутствующие в кровяносных лакунах, и фибробласты участвуют в синтезе и

депонировании компонентов внеклеточного матрикса, таких как фибронектин, ретикулярные и коллагеновые волокна. Через 192 часа начинается повторная эпителизация, в ходе которой эпителиальные клетки перемещаются от края раны к центру, изменяя свою форму.

Считается, что амёбоциты играют роль в восстановлении раковины у наземных брюхоногих моллюсков путем транспортировки кальциевых и органических веществ из пищеварительной железы до участков повреждения (Abolius-Krogis, 1973, 1976). Согласно Капур и Гупта (Kapur, Gupta, 1970) у моллюсков *Euplecta indica* (Ariophantidae), в течение 1 часа после начала восстановления раковины, большое количество амёбоцитов поступает к месту регенерации. В цитоплазме этих клеток обнаружено большое количество гранул кальция и веществ, необходимых для кальцификации. Однако по мнению ряда авторов кальций хранится в специальном типе клеток соединительной ткани – кальциевые клетки (Richardot, Wautiet, 1972; Sminia, 1981), в связи с чем маловероятно, что амёбоциты участвуют в восстановлении раковины.

Для устриц было показано участие гемоцитов в формировании раковины. В этот процесс вовлечен специальный класс гранулоцитов, которые содержат кристаллы карбоната кальция. Их количество возрастает после экспериментально вызванного повреждения раковины. Гемоциты наблюдаются в области минерализации. В некоторых клетках видно высвобождение кристаллов, которые затем подвергаются трансформации (Mount et al., 2004).

Следует также обратить внимание, что в работах первой половины XX-ого века отмечена роль гемоцитов в транспорте питательных веществ (Yonge, 1926) и экскреции. В ходе последней гемоциты накапливают в цитоплазме кристаллы мочевины и уносят их в просвет почки (Fernau, 1914).

1.5. Гемопоз

Гемопоз характерен для животных, имеющих систему кровообращения, однако механизмы образования циркулирующих клеток сильно различаются у представителей разных таксонов. Традиционно основное внимание исследователи уделяли изучению кровеносной системы позвоночных животных, однако в

последнее время активно ведется исследование представителей беспозвоночных. Особенно многочисленны работы, посвященные классификации циркулирующих клеток и их функциональной активности. Такие вопросы напрямую связаны с природой, расположением и организацией гемопоэтических структур. Среди беспозвоночных моллюски наряду с насекомыми являются основными объектами для подобных исследований.

За последнее десятилетие достигнут значительный прогресс в области изучения гемопоэза у моллюсков. Определены основные сигнальные пути, а также эндогенные факторы различной природы, регулирующие и влияющие на данный процесс (Pila et al., 2016).

Среди гастропод наиболее изучены легочные моллюски *Biomphalaria glabrata* (syn. *Australorbis glabratus*), которые являются хозяевами для трематод *Schistosoma mansoni* – опасных паразитов человека. Именно для этих улиток впервые описаны гемопоэтические структуры (Pan, 1958). Пан выделил три области гемопоэза: саккулярная часть стенки почки, стенки синусов гемолимфы и участки рыхлой соединительной ткани. Эти структуры были названы «амёбоцито-продуцирующими органами» (АПО). По мнению Пана, именно в участках рыхлой соединительной ткани происходит трансформация фибробластов в амебоциты.

В дальнейшем было показано, что у *Biomphalaria glabrata* АПО располагается между передней стенкой перикарда и мантийным эпителием (Lie et al., 1975 a, b; Lie et al., 1976; Pan, 1965; Kinoti, 1971; Jeong et al., Joky et al., 1983; Joky, Matricon-Gondran, 1985; Sullivan, 1988; Атаев, 2000; Атаев, Полевщиков, 2004; Атаев, Прохорова, 2013 и др.) и состоит из небольших скоплений клеток – «узелков» (Рис. 2). Для клеток, входящих в их состав, характерны удлиненная форма, базофильная цитоплазма и ядра овальной формы. У незараженных моллюсков размеры узелков составляют 25 – 40 мкм (Lie et al., 1975 b; Атаев, Прохорова, 2013). Кроме того, на базальной мембране перикарда некоторые авторы отмечают наличие небольших митотически активных клеток, которые согласно гистохимическим и ультраструктурным исследованиям являются предшественниками гемоцитов – прогемоциты (Lie et al., 1975 b; Jeong et al., 1983;

Горышина, Чага, 1990). Однако в состав АПО помимо гемопоэтических клеток входят клетки соединительной ткани, в том числе фибробластоподобные клетки и поровые клетки (рогоциты) (Pan, 1958; Sminia, 1972; Jeong et al., 1983).

При заражении моллюсков *B. glabrata* мирацидиями трематод *Echinostoma caproni*, *E. paraensei* и *E. lindoense* в «узелках» обнаруживаются многочисленные митозы, в результате чего увеличивается общее количество клеток, входящих в состав АПО. В дальнейшем узелки сливаются, образуя единый клеточный тяж (гипертрофия и гиперплазия АПО), достигающий 230 – 400 мкм (Lie et al., 1975 a, b; Lie et al., 1976; Lie, Heuneman, 1976 a, b; Joky, Matricon-Gondran, 1985; Ataev et al., 2000; Атаев, Полевщиков, 2004; Атаев, Прохорова, 2013). В дальнейшем прогемоциты дифференцируются в гемоциты и покидают АПО, проникая в синусы кровеносной системы (Lie et al., 1975 b; Атаев, Прохорова, 2013). Обычно максимальная активация АПО и образование клеточного тяжа отмечается на третьи сутки после заражения (п.з.). Это, в свою очередь, вызывает повышение количества в гемолимфе гемоцитов. В дальнейшем активность органа снижается и примерно на седьмой день АПО возвращается к обычному состоянию (Lie et al., 1976 a; Атаев, Прохорова, 2013).

В работе Соуза и Андраде (Souza, Andrade, 2006) говорится о том, что АПО *Biomphalaria glabrata* состоит из клеток, которые плотно упакованы и покрыты общей внешней мембраной (external membrane). При этом не указывается, что представляет собой эта мембрана, является ли она клеточным или неклеточным образованием.

Орган, гомологичный АПО, ответственный за образование амебоцитов, был обнаружен и у других гастропод: *Lymnaea truncatula* и *L. palustris* (Rondelaud, Barthe, 1981), *L. stagnalis*, (Smina, 1974), *Biomphalaria tenagophila* (Oliveira et al., 2010), *B. obstructa*, *Helisoma trivolvis*, *Physa virgata* (Sullivan, 1988), *Planorbarius corneus* (Ottaviani, 1983, 2006).

У моллюсков *Lymnaea stagnalis* и *L. truncatula* в качестве предшественников гемоцитов описаны бластоподобные клетки, локализованные в АПО, либо в

циркуляции (Sminia et al., 1983; Monteil, Matricon-Gondran, 1991). При этом не обнаружено плюрипотентных или молекулярных маркеров этих клеток.

Однако в работе Мюллера (Müller, 1956) утверждается, что у моллюсков *L. stagnalis* нет специального органа гемопоэза, а образование гемоцитов происходит в соединительной ткани, в частности, в регионе, окружающем легкое. У моллюска *Physa virgata* также не описано структур, аналогичных АПО. Гемоциты здесь образуются в соединительных тканях мантии (Sullivan, 1988).

У моллюска *Lymnaea truncatula* авторы отмечают наличие гемопоэтической области, расположенной в задней части почки. Она анатомически связана с перикардом и состоит из фибробластоподобных клеток, которые отделены друг от друга тонкой соединительнотканной перегородкой (Rondelaud, Barthe, 1981). При заражении этих моллюсков трематодами *Fasciola hepatica* активность АПО длится в течение двух месяцев, а пролиферация клеток происходит с 7 по 28 день после заражения (Rondelaud, Barthe, 1981).

Для других гастропод выявлены образования, анатомически и гистологически похожие на АПО *Biomphalaria glabrata*. Так, для моллюсков *Bulinus africanus*, *B. truncatus* и *B. tropicus* описан «лимфоидный орган» овальной формы, расположенный вдоль перикарда. В нем так же выделяется узелковая область, включающая строму, в которой разбросаны предшественники амебоцитов (=гемоцитов) – амебобласты (Kinoti, 1971).

У моллюска *Helisoma trivolvis* показана группа бластоподобных клеток, которые представляют гомогенную структуру, расположенную между латеральной (обращенной к раковине) стенкой перикарда и стенкой мантийной полости. Однако здесь не наблюдалась гиперплазия и гипертрофия клеток как в АПО при заражении паразитами. Возможно, это связано с быстрым высвобождением делящихся клеток в циркуляцию (Sullivan, 1988).

Аналогичная АПО область была описана и для моллюска *Potamocorbula asinaria*. Основываясь на наблюдении делящихся клеток, было установлено, что гемопоэз происходит в полости перикарда вдоль внешней поверхности легочных и почечных вен вблизи их соединения с сердцем, а также в

перикардиальной жидкости. Вновь образованные гемоциты, как полагают авторы, хранятся в специальном органе – «ампуле», представляющий собой мешковидный орган, который лежит в полости перикарда и соединяется с сердцем через переднюю аорту (Accorsi et al., 2014).

Однако не только трематоды вызывают активацию гемопоэтических органов моллюсков. Иммунизация различными чужеродными веществами, включая экскреторно-секреторные продукты (экстракты трематод), ЛПС *E. coli* или фукоидан, также стимулирует пролиферацию клеток в АПО (Noda, 1992; Sullivan et al., 2004; Salamat, Sullivan, 2008, 2009; Sullivan et al., 2011; Sullivan et al., 2014; Zhang et al., 2016). В то же время такие вещества как изотонический солевой раствор, суспензия живых грамположительных или грамотрицательных бактерий, некоторые лектины, зимозан, бычий сывороточный альбумин (БСА) не оказывают заметного влияния на АПО (Sullivan et al., 2004).

Для доказательства гемопоэтической роли АПО были проведены исследования по трансплантации этого органа. Так после пересадки гетеротопических аллотрансплантатов передней стенки перикарда у моллюсков *Biomphalaria glabrata* было показано наличие кроветворной деятельности пересаженных участков АПО. В результате гистологического исследования было установлено, что все трансплантаты оказались жизнеспособными, и признаков их отторжения не наблюдалось (Sullivan, 1990; Sullivan et al., 1998). При трансплантации АПО от моллюсков резистентных к заражению трематодами *Schistosoma mansoni* к чувствительным, последним передалась устойчивость к трематодным инвазиям, а также повысилась способность к инкапсуляции спороцист паразита (Sullivan et al., 1995; Sullivan, Spence, 1999; Vasquez, Sullivan, 2001; Barbosa et al., 2006). Однако приобретенная резистентность может быть обусловлена различными растворимыми факторами, перенесенными трансплантированными клетками или путем секреции молекул, которые в свою очередь стимулируют реципиента к продуцированию своих собственных факторов устойчивости. Данные молекулы может синтезировать как сам имплантат, так и гемоциты (Vasquez, Sullivan, 2001).

Сходные результаты были получены и другими авторами (Barbosa et al., 2006). В результате трансплантации области АПО из резистентных моллюсков *Biomphalaria tenagophila* моллюскам, восприимчивым к заражению *Schistosoma mansoni*, наблюдалось повышение устойчивости последних к инвазии. Однако данная трактовка полученных результатов вызывает сомнение, так как вместе с регионом АПО могут быть пересажены близлежащие ткани моллюска.

Стоит отметить, что в опытах с пересадкой ксенотрансплантатов происходит отторжение либо инкапсуляция имплантированных структур (Jourdane, Cheng, 1987; Прохорова и др., 2015).

Неоднократно проводились попытки культивирования АПО моллюска *Biomphalaria glabrata*. Отпрепарированные участки помещались в питательную среду. Через 24 часа отмечалось наличие делящихся клеток, которые были похожи на основные типы клеток гемолимфы моллюска. А через 36 часов была отмечена миграция клеток. Однако такая культура клеток сохраняла жизнеспособность только в течение двух недель (Barbosa et al., 2006).

В схожем опыте других исследователей (Salamat, Sullivan, 2008) АПО *B. glabrata* сохраняло свою митотическую активность в физиологическом растворе только до 6 дней. В случае, когда АПО культивировали в присутствии экстракта паразита, его митотическая активность возрастала.

Однако некоторые авторы опровергают существование АПО как места образования форменных элементов гемолимфы, так как у зараженных моллюсков не было выявлено достоверных отличий этой структуры по сравнению с интактными особями (Souza, Andrade, 2006). По их мнению, АПО является специализированным органом фильтрации, сходным с юкстагломерулярным аппаратом почки позвоночных животных (Souza, Andrade, 2012).

Наименее понятным аспектом развития гемоцитов у брюхоногих моллюсков является транскрипционная регуляция гемопоэза. На сегодняшний день не получено никаких данных о профиле факторов транскрипции предшественников гемоцитов моллюсков.

Так, транскрипционный фактор CREB (cAMP response element-binding protein) хорошо изучен в процессах осуществления функций памяти (Carlezon et al., 2005), однако он также играет роль в пролиферации и выживании клеток (Zhang et al., 2002). CREB был идентифицирован у некоторых видов брюхоногих моллюсков (Sadamoto et al., 2004; Lee et al., 2007; Zhang, Coultas, 2011).

NF-κB является универсальным ядерным фактором транскрипции, контролирующим экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла. Гомологи NF-κB были клонированы у моллюсков *Biomphalaria glabrata* (Zhang, Coultas, 2011) и *Haliotis diversicolor* (Jiang, Wu, 2007). Было показано, что у *Biomphalaria glabrata* во время заражения трематодами *Schistosoma mansoni* происходила активация NF-κB, тогда как у *Haliotis diversicolor* экспрессия NF-κB была подавлена во время заражения вирусом сепсиса. NF-κB-подобный белок был обнаружен в аксонах *Aplysia*, но его функция, как считается, связана с коммуникацией и синаптической передачей сигнала в аксонах (Povelones et al., 1997).

С использованием методики ДНК-чипов удалось получить профиль экспрессии генов, вовлеченных в пролиферацию клеток АПО (Zhang et al., 2016). Для иммунизации были использованы вещества, имеющие митогенную активность в АПО: бактериальные патоген ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs) – ЛПС и пептидогликан, а также фукоидан – сульфатированный полисахарид, который может имитировать фукозилбогатые гликаны на поверхности спороцисты *S. mansoni*. В результате было показано, что гены, участвующие в клеточной пролиферации, относятся к наиболее дифференциально экспрессированным. Изменения в экспрессии генов были вызваны всеми тремя PAMPs, однако ЛПС вызывает особенно сильный ответ. Экспрессия гена *checkpoint 1 kinase*, которая является ключевым регулятором митоза, была сильно выражена после стимуляции ЛПС. Авторы предполагают, что экспрессия этой киназы может служить потенциальным генетическим маркером для идентификации участков пролиферации гемоцитов.

На сегодняшний день остаются нерешенными вопросы о природе и источнике факторов, вызывающих активацию АПО, пролиферацию предшественников гемоцитов и запуск защитных реакций моллюсков после проникновения патогена. При этом известно, что некоторые вещества способны влиять на клетки гемолимфы, но неясно, является ли это воздействие прямым или косвенным. Вероятно, другие типы клеток, такие как зрелые гемоциты или даже клетки самого АПО, способны продуцировать эндогенные факторы, индуцирующие клеточную пролиферацию и дифференцировку (Pila et al., 2016; Zhang et al., 2016).

Согласно одной из версий, эти молекулы могут иметь паразитическое происхождение или производиться самим моллюском, например, выделяться гемоцитами при борьбе с паразитом. В связи с этим, можно объяснить временную задержку реакции в активации АПО в ответ на проникновение паразита. Клетки, которые входят в состав АПО, скорее всего, находятся в начале интерфазы, и время, необходимое для передачи внутриклеточного сигнала, синтеза ДНК и прохождения клеточного цикла, и будет составлять наблюдаемую задержку. Кроме этого, если молекулы, необходимые для активации АПО, секретируются гемоцитами, то часть времени будет затрачена на синтез и секрецию этих молекул (Sullivan et al., 2004). Одним из возможных кандидатов на роль митоз-стимулирующих молекул являются фукозосодержащие гликопротеины, которые могут распознаваться при помощи лектинов (Nyame et al., 2002; Schmitt et al., 2002).

Для других классов моллюсков также описаны разнообразные участки локализации гемопоэтических структур. У головоногих моллюсков это белое тело – лопастной орган, который оборачивается вокруг пучка зрительных нервов (Salazar et al., 2015; Castillo et al., 2015). Морфология и структура этого органа у цефалопод была описана для *Octopus vulgaris* и *O. briareus* (Bolognari, 1949; Cowden, 1972). Вблизи поверхности органа, в свободной сети соединительной ткани, которая пронизана кровеносными сосудами обнаружено три типа клеток-предшественников (первичные, вторичные и третичные лейкобласты). Однако Форд (Ford, 1992) выделил всего две основные стадии развития гемоцитов:

гемоцитобласты и лейкобласты. Гемоцитобласты являются ретикулярными клетками с большим объемом цитоплазмы, развитым грЭПР и ядрышками. В ходе дифференцировки происходит уменьшение объема цитоплазмы, размеров ядер, и клетки превращаются в лейкобласты. Последние собраны в группы, которые соединены внеклеточными «мостиками». Зрелые гемоциты (вторичные лейкобласты) характеризуются большими размерами, реорганизацией ядра, развитым аппаратом Гольджи. В синусах белого тела лейкоциты отшнуровываются от скоплений и попадают в циркуляторное русло. Кауден (Cowden, 1972) сравнивает эти клетки с моноцитами позвоночных животных.

С помощью трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии Клаес (Claes, 1996) обнаружил четыре типа клеток у каракатицы *Sepia officinalis*: гемоцитобласты, первичные лейкобласты, вторичные лейкобласты и гемоциты. Однако несмотря на аналогию классификации клеток, схема развития гемоцитов немного отличается от предложенных ранее (Bolognari, 1949; Cowden, 1972; Ford, 1992). Клаес показал, что пролиферация происходит только на первых двух уровнях развития клеток, то есть гемоцитобласты, подвергаясь митозу дифференцируются в первичные лейкобласты, которые в свою очередь проходят еще один раунд деления для получения вторичных лейкобластов. Пролиферации вторичных лейкобластов уже не происходит, и эти клетки дифференцируются в зрелые циркулирующие гемоциты (Claes, 1996).

Определенный гемопоэтический сайт общий для всех двустворчатых моллюсков на сегодняшний день не найден. Таким образом существует несколько гипотез о происхождении гемоцитов бивальвий.

У устрицы *Crassostrea gigas* найдены клетки-предшественники гемоцитов в специализированных областях жаберного эпителия, которые представляют собой нерегулярные структуры (irregularly folded structure (IFS)) (Jemaa et al., 2014). Используя метод иммуногистохимии, авторы выявили транскрипционный фактор Sox2, являющийся маркером стволовых клеток, а также супероксиддисмутазу Zn / Cu (SOD) – специфический фермент для гемоцитов устриц. В результате была найдена популяция клеток в субэпителиальной соединительной ткани и сосудах,

которые были как Sox2, так и SOD положительными, что указывает на гемопоэтическую природу этих клеток. Именно эти клетки по мнению авторов являются клетками-предшественниками гемоцитов. Кроме этого с использованием бромдизоксиуридина (BrdU) обнаружены доказательства синтеза ДНК и пролиферации в этой популяции клеток.

В моллюске *Tapes philippinarum* образование новых гемоцитов происходит в циркуляции в результате деления клеток – гемобластов (Matozzo et al., 2008). К таким выводам авторы пришли на основании обнаружения митотического веретена деления в этих клетках.

Кроме этого интересная гипотеза происхождения гемоцитов бивальвий связана с явление неоплазии (Barber, 2004; Carballal et al., 2015; Pila et al., 2016), согласно которой происходит чрезмерная пролиферация аномальных клеток, их распространение и инфильтрация различных органов и тканей. По морфологическим характеристикам, прежде всего высокого ядерно-цитоплазматического соотношения и фагоцитарной активности, было высказано предположение, что эти аномальные клетки являются незрелыми гемоцитами (см. Barber, 2004). В подтверждение этой гипотезы в нескольких исследованиях сравнивались реакции фагоцитоза гемоцитами и неопластическими клетками у разных видов мидий и моллюсков и в неопластических клетках отмечена более низкая фагоцитарная активность (Kent et al., 1989).

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования были использованы легочные моллюски следующих видов:

Сем. Planorbidae

– *Planorbarius corneus* L., 1758; *Planorbis planorbis*, L., 1758 (из водоёмов Ленинградской области, сбор с мая по сентябрь 2013 – 2018 гг.);

– *Biomphalaria glabrata* Say, 1818, *Biomphalaria pfeifferi*, Krauss, 1848 (лабораторные линии: чувствительные и резистентные к заражению трематодами);

Сем. Lymnaeidae

– *Lymnaea (Galba) truncatula* Müller, 1774; *Lymnaea stagnalis*, L., 1758 (из водоёмов Ленинградской области, сбор с апреля по август 2016 – 2018 гг.);

Сем. Succineidae

– *Succinea putris* L., 1758 (наземные моллюски, собранные на территории Ленинградской области с мая по август 2008 – 2018 гг.).

В качестве объектов иммунизации были использованы различные чужеродные факторы (звездочкой обозначены лабораторные линии трематод):

- ✓ трематоды *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 самостоятельно выпавших чувствительных волосков кошек – вибрисс длиной 1,5 мм и диаметром 160 мкм;
- ✓ белок, выделенный из трематод *Plagiorchis multiglandularis* (сем. Plagiorchiidae), *Bilharziella polonica* (сем. Schistosomatidae).

Определение трематод было проведено Г.Л. Атаевым.

2.2. Методы

2.2.1. Содержание моллюсков

В лабораторных условиях моллюски *Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis*, *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata* и *Biomphalaria pfeifferi* содержались в пластиковых аквариумах объемом 4 – 20 литров с постоянной аэрацией при комнатной температуре (20 – 25°C) и естественном освещении. Использовали фильтрованную водопроводную воду, которую сменяли 1 – 2 раза в неделю. Корм состоял из свежих или сушеных листьев салата. Для уменьшения эрозии раковин в аквариумы добавляли CaCO₃ (колотый мел). Содержание моллюсков *Succinea putris* осуществлялось в летний период в пластиковых контейнерах во влажных условиях. Кормом для них служили свежие листья сныти.

Определение зараженности моллюсков. Собранных в природе моллюсков в лаборатории рассаживали по стаканчикам (объемом от 20 до 50 мл в зависимости от размеров объекта) и в течение нескольких дней выявляли эмитирующих церкарии особей. Вскрытие моллюсков проводилось под стереомикроскопом Leica M165C, в ходе которого уточнялась их зараженность и определялся диаметр раковины. Заключение о видовой принадлежности обнаруженных при вскрытии паразитов делалось на основе изучения строения и локализации партенит, а также морфологии отраждаемых ими церкарий. В зависимости от целей дальнейшего исследования были использованы разные фиксаторы: жидкость Буэна, 10% забуференный формалин и Иммунофикс (Биолайн).

Материал для изучения клеточных реакций на трематодную инвазию у моллюсков *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria pfeifferi* (зараженных трематодами *Echinostoma caproni*) и *Lymnaea truncatula* был предоставлен в виде буэновых фиксаций и парафиновых блоков научным руководителем Г. Л. Атаевым.

Экспериментальное заражение моллюсков *Biomphalaria glabrata* и *B. pfeifferi* трематодами *Schistosoma mansoni* осуществлялось в лаборатории «Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnements» (Перпиньян, Франция).

Для заражения моллюсков *Biomphalaria glabrata* были выбраны трематоды бразильского (SmBRE) штамма, и сенегальского (SmSEN) для *B. pfeifferi*. Яйца

трематод выделяли из печени мышей, после чего стаканчики с суспензией были помещены в светлое место на 30 мин для вылупления мирацидиев. Заражение моллюсков проводилось по 10 и 6 мирацидиев соответственно для *Biomphalaria glabrata* и *B. pfeifferi*. Фиксация моллюсков проводилась через 1, 3, 4, 5, 7, 10 и 14 дней п.з. в жидкости Буэна.

2.2.2. Методы гистохимии применялись для изучения гемопоэтических структур моллюсков, процессов инкапсуляции и формирования гемоцитарной мантии вокруг чужеродных объектов, образования агглютинаций.

Для приготовления гистологических препаратов объекты исследования фиксировали в свежеприготовленном растворе Буэна или 10% забуференном формалине. Затем материал промывали в 2 – 3-х сменах 70% этанола и после последующего обезвоживания заливали в парафин согласно стандартной методике. Приготовленные на микротоме (Leica RM2235) срезы толщиной 3 – 7 мкм окрашивали гематоксилинами Майера или Эрлиха с подкраской 0,1% водным раствором эозина. Для окрашивания препаратов гемоцитарной мантии использовали альциановый синий (по Пирс, 1962).

Для приготовления замороженных срезов материал фиксировали в смеси Иммунофикс (Биолайн). После фиксатора материал промывали в двух сменах 0,1 М PBS (pH 7,4) и проводили по растворам сахарозы восходящей концентрации (5%, 10%, 20%, 30%). В 30% растворе образцы оставляли на ночь при 4°C. Приготовленные на криотоме (Leica CM 1520) срезы толщиной 8-10 мкм окрашивали гематоксилином Эрлиха.

2.2.3. Методы цитохимии

Для приготовления временных и фиксированных препаратов гемолимфу собирали из кровеносного синуса головного отдела моллюсков с помощью стеклянной пастеровской пипетки.

Изучение гемоцитов *in vitro* проводили на образцах свежесобранной гемолимфы, которую помещали на стекла с адгезивным полилизинным покрытием. Для изучения биологических особенностей клеток гемолимфы часть препаратов инкубировали во влажной камере на протяжении 2 – 4 часов при

комнатной температуре (22 – 24°C). При этом каждые 15 – 30 мин препараты просматривали и фиксировали изменения, происходящие с выбранными группами клеток. На всех препаратах *in vitro* измеряли размеры клеток и изменения формы.

Подсчет числа клеток гемолимфы проводили с помощью камеры Горяева.

Приготовление постоянных цитологических препаратов осуществлялось путем изготовления мазков свежесобранной гемолимфы на предметных стёклах с адгезивным полилизинным покрытием. После этого проводили инкубацию гемолимфы в течение 30 мин во влажной камере. Мазки фиксировали 4 % параформальдегидом, приготовленным на 1х PBS буфере (pH 7,4). После промывки от фиксатора фильтрованной водой препараты окрашивали:

- гистологическими красителями: гематоксилин-эозином по Эрлиху (в течение 7 мин), коммерческим набором MGG (May-Grünwald Giemsa) (Биолайн);
- флуоресцентными красителями: Rhodamine phalloidin (594 нм), антителами к тубулину (488 нм), серотонину (594 нм), Hoechst 33342 (465 нм), LysoTracker Green (504/511 нм), MitoTracker Red (579/599 нм), мечеными лектинами (WGA (594 нм), Tomato lectin (488 нм)).

Мечение бактерий ФИТЦ. Бактерий *Escherichia coli* выращивали на мясо-пептонном бульоне в течение 20 ч при 37° С, после чего трижды отмывали избытком фосфатно-солевого буфера (pH 7,4) при 1000g в течение 25 мин. Бактерий фиксировали прогреванием при 95°C в течение 1 часа. Фиксированных бактерий осаждали при 1000g 25 мин, затем переводили в 1 мл 0,1 М карбонатно-бикарбонатного буфера (pH 9,5). Концентрацию бактерий доводили до 10⁸ в 1 мл по стандарту мутности. ФИТЦ растворяли в диметилсульфоксиде, получая концентрацию 1 мг/мл, и добавляли из расчета 0,05 мг на 100 млн. бактерий. Инкубацию проводили при 4°C в течение 24 часов в темноте. По завершении инкубации материал три раза отмывали фосфатно-солевым буфером от свободного ФИТЦ (1000g в течение 15 мин). Меченые частицы аликвотировали и хранили при 4°C до использования.

Методика для *оценки пролиферативной активности гемоцитов* осуществлялась на мазках свежесобранной гемолимфы с использованием 5-этинил-2-дезоксинуридина (EdU) и набора Click-iT EdU Alexa Fluor 594 Imaging Kit для его регистрации. Окрашивание проводилось согласно протоколу производителя.

Анализ полученных гистологических и цитохимических препаратов проводили на световом микроскопе Leica DM5000, в том числе в режиме фазового контраста с использованием светофильтров и на инвертированном микроскопе Leica DMi8.

Изучение флуоресцентных препаратов проводили на микроскопах Leica DM6000 (ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН) и Leica DMi8.

2.2.4. Метод проточной цитофлуориметрии

Гемолимфу собирали из кровеносного синуса головного отдела моллюсков и разбавляли раствором Чернина (Chernin, 1963) для предотвращения образования агрегатов клеток в соотношениях 1:1 (для *Planorbarius corneus* и *Biomphalaria glabrata*) и 1:4 (для *Planorbis planorbis*).

Изучение клеточного цикла было выполнено для клеток гемолимфы *Biomphalaria glabrata*. Осажденные клетки фиксировали 70% спиртом и окрашивали йодистым пропидием с добавлением РНКазы. Анализ проводили по интенсивности флуоресцирующего красителя.

Анализ образцов проводили на проточном цитометре BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, США). Для исследования клеточных фракций использовались следующие цитометрические параметры: FS – прямое светорассеивание (характеризует размеры клеток), и SS – боковое светорассеивание (характеризует структуру клеток), которые оценивались по 30000 событиям для каждой из проанализированных проб.

2.2.5. Методы электронной микроскопии

ТЭМ была применена в ходе изучения гемоцитов моллюсков и партенит трематод.

Для изучения гемоцитов свежесобранную гемолимфу фиксировали 2,5% глутаральдегидом, приготовленном на 0,05 М натрий-какодилатном буфере. Дофиксация проводилась четырехокисью осмия. После отмывок к осадку гемоцитов добавляли агар. Дальнейшую заливку проводили с агаровыми блоками согласно стандартной методике.

В качестве фиксатора для сердец моллюсков, содержащих материнские спороцисты *Echinostoma caproni* также использовали 2,5% глутаральдегид, приготовленный на 0,05 М натрий-какодилатном буфере и четырехокисью осмия.

Состав заливочной смеси: Эпон 812 – 10 мл, DDSA (отвердитель) – 8 мл, MDA – 4 мл, DMP-30 (ускоритель) – 0,33 мл. Для заливки использовали стандартные силиконовые кассеты.

Ультрамикротомию осуществляли на приборе Leica EM UC6, с применением алмазного ножа. Полученные срезы толщиной 300-500 нм помещали на опорные сетки с пленками-подложками из формвара. Контрастирование проводилось с применением уранилацетата и цитрата свинца. Изучение препаратов проводили на микроскопе JEM-1011 (Jeol) (ЦКП Электронной микроскопии Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН).

СЭМ была использована для изучения гемоцитов и спороцист трематод *Leucochloridium paradoxum*. Гемоциты изучали на мазках свежесобранной гемолимфы, которую предварительно инкубировали на покровных стёклах с адгезивным покрытием во влажной камере в течение 30 мин.

В обоих случаях материал фиксировали в 4 % параформальдегиде, приготовленном на 1х PBS буфере (рН 7,4). После промывки от фиксатора буфером препараты обезвоживали в спиртах (этанол) восходящей концентрации (начиная с 20%).

Все последующие операции по высушиванию объектов проводили в устройстве для сушки образцов в критической точке Leica EM CPD300. После напыления препараты изучали на микроскопе Zeiss EVO 40 (ЦКП Электронной микроскопии, РГПУ им. А. И. Герцена).

2.2.6. Методы молекулярной биологии

Выделение трематодного белка осуществлялось с использованием FBio-Trizol-Реагента (FractalBio) по методике, описанной в руководстве. Осадок выделенного белка разводили в 1% SDS при 54°C 10 мин. Для иммунизации моллюсков использовали по 20 мкл разведенного белка.

Для **видовой идентификации** трематод *Bilharziella polonica* было осуществлено генотипирование по участку рДНК, включающему фрагмент гена 18S, ITS1, ген 5,8S, ITS2. Выделение хромосомной ДНК осуществляли из отпрепарированных спороцист и церкарий методом экстракции фенолом-хлороформом из ядер, очищенных при центрифугировании через сахарозную подушку. Амплификация и секвенирование участка рДНК со специфическими праймерами (F: 5'-GAAGACGACCGAACTTGATCATТ-3'; R: 5'-TTTCCTCCGCTTAGTGATATGC-3') были осуществлены по стандартной методике (Ataev et al., 2016). Выявленная последовательность была аннотирована в GenBank (MK264353). Принадлежность исследуемой ДНК *Bilharziella polonica* была подтверждена путем выравнивания выявленной нуклеотидной последовательности (1109 п.н.) с представленными в GenBank участками генома *B. polonica* (EF094539.1; NM001262.1; FJ793906.1; FJ793904.1).

2.2.7. Компьютерные программы.

Для фотографирования цитохимических и гистологических препаратов, а также проведения микроскопического анализа были использованы программы «Image Score», «Image J», «LasX».

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы Microsoft Excel. Для определения различий между группами нормально распределенных данных использовали Т-критерий Стьюдента для независимых и зависимых выборок. Для оценки взаимосвязи между различными признаками использовали коэффициент корреляции Пирсона. Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Данные выражены как среднее значение с указанием среднего квадратичного отклонения.

Для определения основных фенотипов гемоцитов был проведен *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).

Список условных обозначений:

АПО – амёбоцито-продуцирующий орган	п.и. – после иммунизации
вб – вибрисс	пп – перикардальная полость
г – гемоцит	пр – предсердие
гр – гранулы	рк – раневой канал
ж – желудочек сердца	с – столон
к – капсула	со – созревающий отросток
л – ламеллоподия	спороцисты
м – мантия	т – тегумент
мп – мантийная полость	тс – трубчатая часть
МС – материнская спороциста	ф – филоподия
мэ – мантийный эпителий	я – ядро
о – зрелый отросток спороцисты	яг – ядро гемоцита
п – перикардальный эпителий	ядр – ядрышко
п.з. – после заражения	

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Клеточный состав гемолимфы моллюсков

3.1.1. Морфология гемоцитов

Клеточный состав гемолимфы был изучен для лёгочных моллюсков *Planorbarius corneus* (n=60), *Biomphalaria glabrata* (n=58), *Planorbis planorbis* (n=43), *Succinea putris* (n=27), *Lymnaea stagnalis* (n=18).

Гемоциты *Biomphalaria glabrata*. Среди циркулирующих клеток биомфаларий нами выявлено два типа клеток – гранулоциты и гиалиноциты (Рис. 1). Гранулоциты биомфаларий формируют лобоподии и длинные узкие филоподии. За счет последних общий размер клеток превосходит таковой у других моллюсков и составляет $28,0 \pm 5,0$ мкм, ядра – $7,0 \pm 1,2$ мкм. В ядрах таких гемоцитов хорошо заметно ядрышко. Размер гиалиноцитов *B. glabrata* составляет $7,2 \pm 1,0$ мкм, ядер – $3,5 \pm 0,6$ мкм.

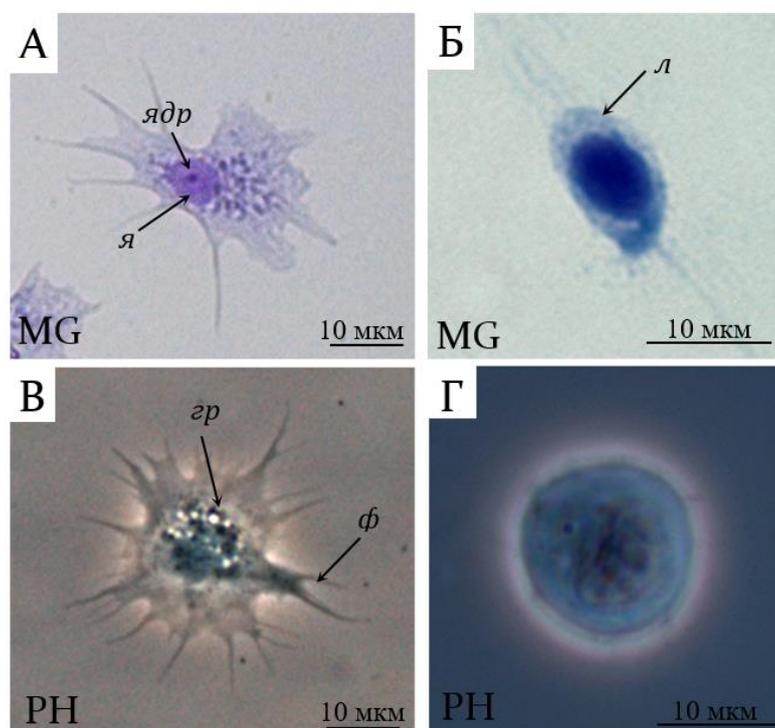


Рисунок 1. Гемоциты *Biomphalaria glabrata* (А–Г). А, В — гранулоциты; Б, Г — гиалиноциты. PH – съемка в режиме фазового контраста, MG – окрашивание MGG.

Гемоциты Planorbarius corneus по своей морфологии представлены двумя основными типами – гранулоцитами и гиалиноцитом (Рис. 2).

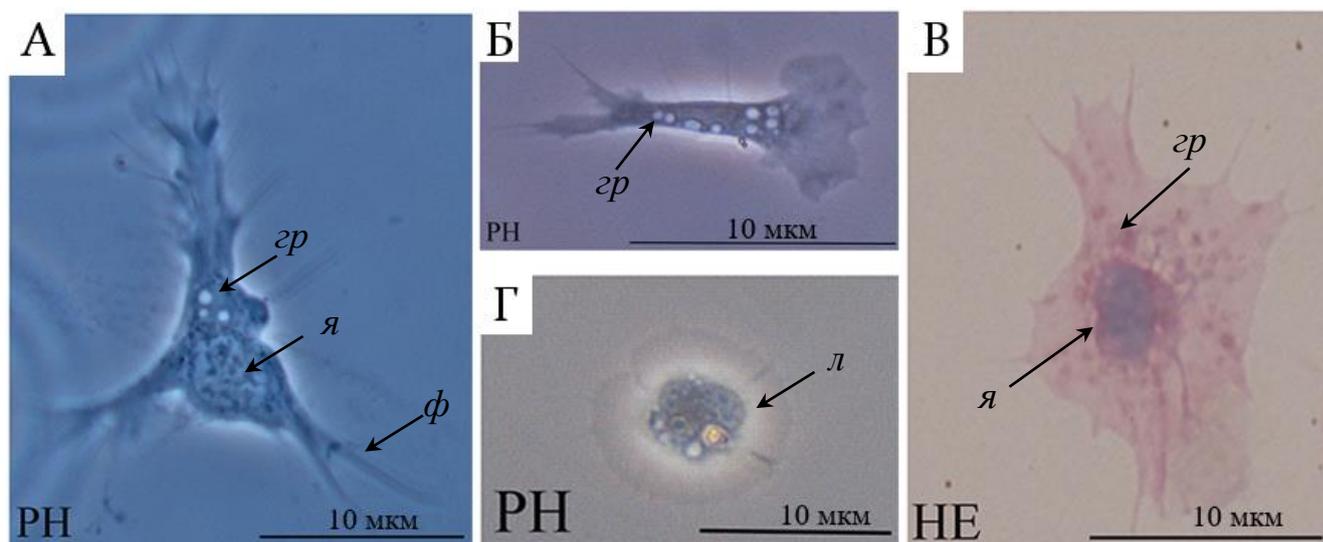


Рисунок 2. Гемоциты *Planorbarius corneus* (А–Г). А–В — гранулоциты, Г — гиалиноцит. РН – съемка в режиме фазового контраста, НЕ – окрашивание гематоксилин-эозином.

По численности гранулоциты являются преобладающей группой клеток гемолимфы. Их размер составляет $12,95 \pm 7,89 \times 9,5 \pm 5,94$ мкм. Они имеют овальные ядра размером $5,26 \pm 2,18 \times 4,08 \pm 2,76$ мкм. В цитоплазме этих клеток содержатся многочисленные гранулы и везикулы. Кроме того, эти клетки имеют способность распластываться на субстрате, формируя при этом псевдоподии: фило- и лобоподии.

Менее многочисленные клетки – гиалиноциты – имеют округлую форму и размер $8,13 \pm 1,54 \times 6,12 \pm 1,24$ мкм. Их округлые или овальные ядра диаметром $3,32 \pm 1,35 \times 2,56 \pm 1$ мкм. Эти клетки также способны формировать лобоподии.

Гемоциты Planorbis planorbis также представлены гранулоцитами и гиалиноцитами (Рис. 3). Гранулоциты имеют размеры $16,8 \pm 4,67$ мкм, диаметр их ядра – $6,5 \pm 2,41$ мкм. Стоит отметить, что эти клетки не формируют длинных филоподий. Размер гиалиноцитов составляет $6,6 \pm 1,7$ мкм, их ядер – $4,1 \pm 0,75$ мкм.

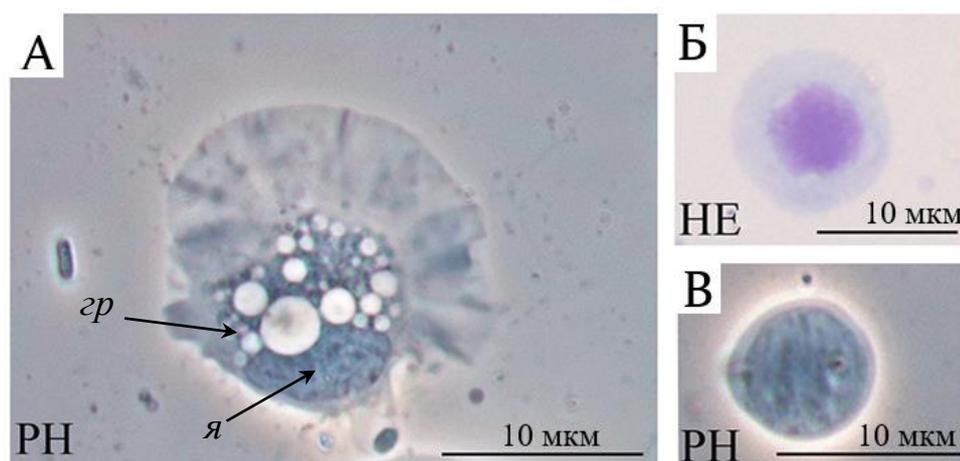


Рисунок 3. Гемоциты *Planorbis planorbis* (А–Е). А–В — гранулоциты, Г–Е — гиалиноциты. РН – съемка в режиме фазового контраста, HE – окрашивание гематоксилин-эозином.

Гемоциты Succinea putris представлены теми же популяциями клеток – гранулоцитами и гиалиноцитами (Рис. 4). Гранулоциты имеют размеры $28,5 \pm 5,23$ мкм, размер ядра – $8,9 \pm 0,78$ мкм. Эти клетки хорошо распластываются на субстрате, формируя длинные филоподии и лобоподии. В ядрах этих клеток хорошо заметно ядрышко. Размер гиалиноцитов составляет $12,4 \pm 0,4$ мкм, их ядер – $9,3 \pm 0,2$ мкм.

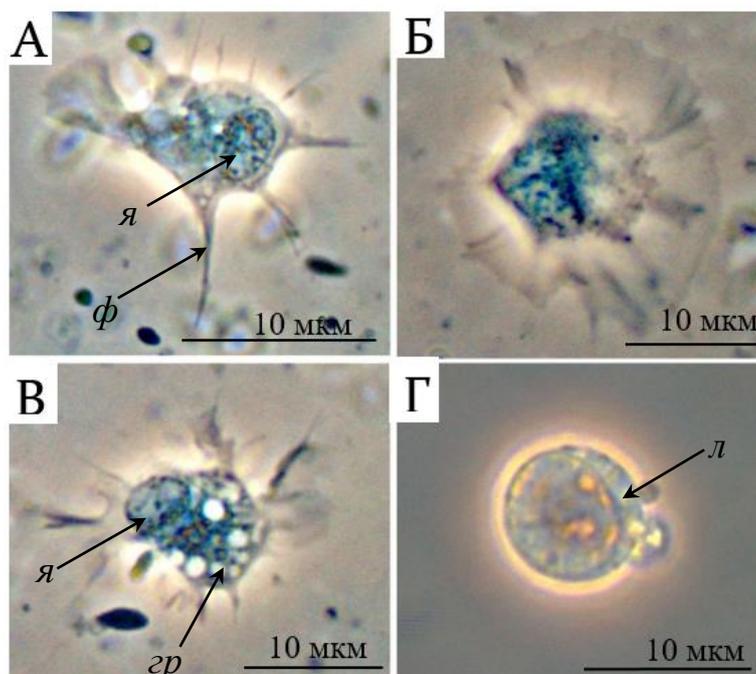


Рисунок 4. Гемоциты *Succinea putris* (А–Г). А–В — гранулоциты, Г — гиалиноцит. Съемка в режиме фазового контраста.

Гемоциты *Lymnaea stagnalis* на световом уровне также представлены двумя клеточными популяциями: гранулоцитами и гиалиноцитами (Рис. 5). Размер гранулоцитов $42,2 \pm 5,3 \times 19,9 \pm 2,7$, размер их ядер – $11,4 \pm 2,2 \times 9,04 \pm 1,2$. Эти клетки распластываются на субстрате, формируя длинные псевдоподии. Размер гиалиноцитов превышает размеры таковых у рассмотренных выше моллюсков и составляет $15,8 \pm 1,4 \times 12,4 \pm 0,3$ мкм, их ядра – $6,0 \pm 0,2$ мкм.

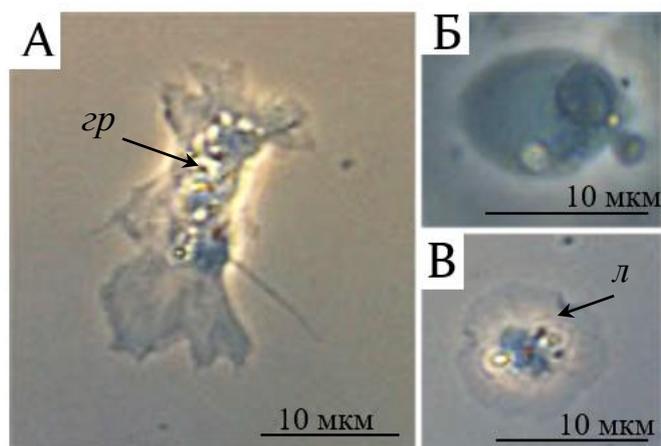


Рисунок 5. Гемоциты *Lymnaea stagnalis* (А–В). А – гранулоцит, Б, В — гиалиноциты. Съемка в режиме фазового контраста.

Для наблюдения за гемоцитами *in vitro*, гемолимфу моллюсков инкубировали на стеклах с адгезивным покрытием во влажной камере при комнатной температуре в течение 1–4 часов.

Во процессе инкубирования через каждые 20–30 минут фиксировались изменения положения клеток и их формы. Было отмечено, что гранулоциты в течение всего наблюдения постоянно изменяют свою форму, постепенно распластываются на субстрате, одновременно перемещаясь относительно первоначального места прикрепления. Гиалиноциты, напротив, медленнее закрепляются на субстрате и практически не изменяют форму в течение наблюдения.

Гранулоциты часто формируют скопления, включающие от двух до десяти клеток. На протяжении 3–4 часов наблюдений количество клеток в таких агрегациях может меняться (Рис. 6).

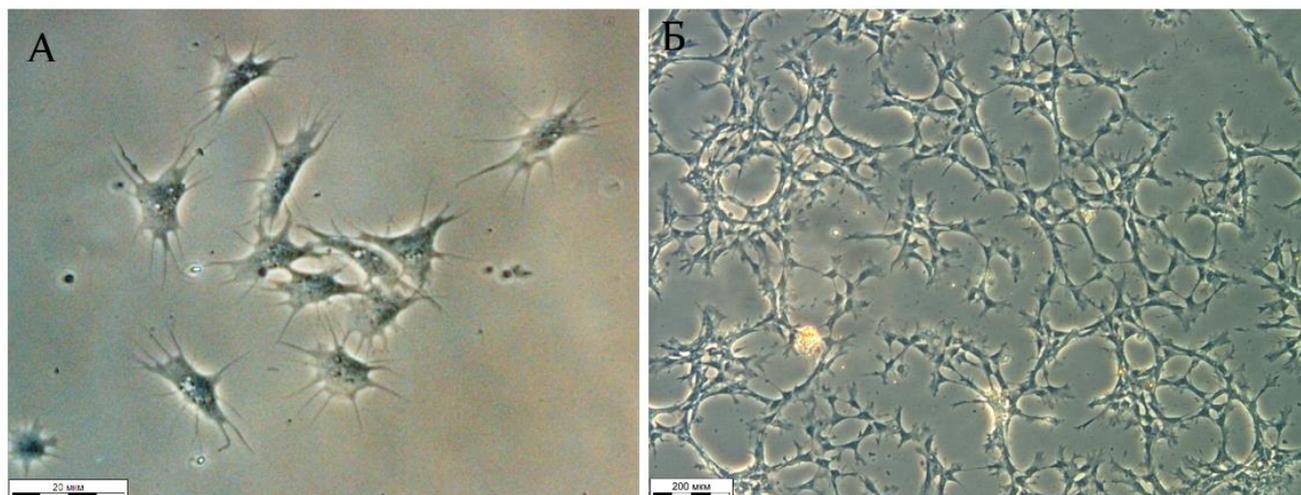


Рисунок 6. Агрегации гемоцитов *in vitro* в гемолимфе моллюсков *Biomphalaria glabrata* (А), *Lymnaea stagnalis* (Б) после 40 минут инкубирования во влажной камере. Съемка в режиме фазового контраста.

С использованием **флуоресцентной микроскопии** показана локализация основных цитоскелетных элементов гемоцитов и связанных с ними органелл у разных видов моллюсков (Рис.7–16).

Морфология циркулирующих гемоцитов pulmonat изучалась *in vitro*, на препаратах мазков, окрашенных различными флуоресцентными красителями (см. с. 45). В клетках всех видов моллюсков хорошо развит актиновый цитоскелет, который подчеркивает различия в форме гемоцитов двух типов. Микротрубочки, выявляемые специфическими антителами к тубулину, также образуют развитую сеть, особенно в гранулоцитах (Рис. 7–9). При окрашивании гемоцитов антителами к серотонину показана его связь с цитоплазматической мембраной клеток, что вероятно обусловлено участием этой молекулы в иммунных реакциях pulmonat.

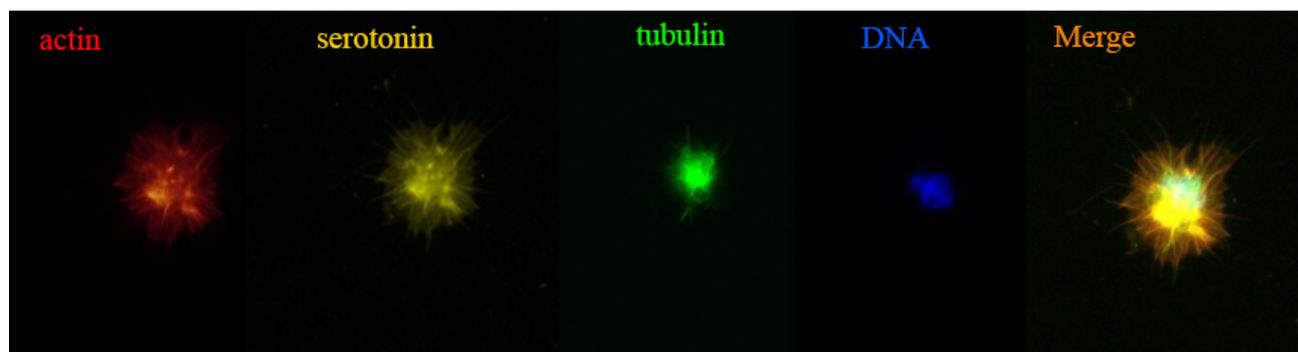


Рисунок 7. Гранулоцит *Planorbis corneus*.

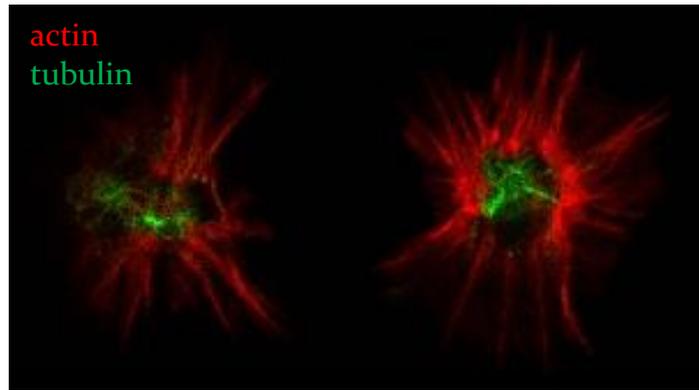


Рисунок 8. Гранулоцит *Planorbarius corneus*.

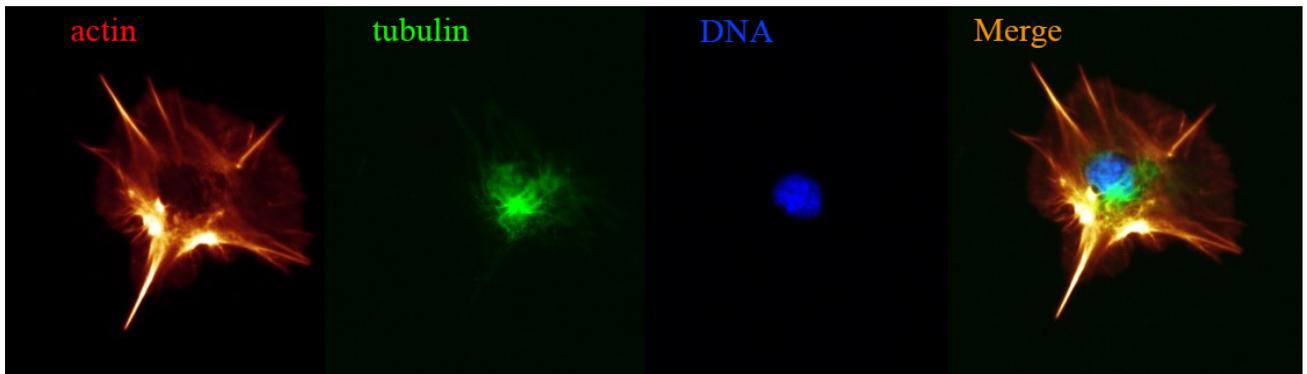


Рисунок 9. Гранулоцит *Planorbarius corneus*.

Окрашивание гемоцитов мечеными лектинами (Tomato lectin, WGA) показало их связывание с везикулярным компартментом клеток (Рис. 10, 11).

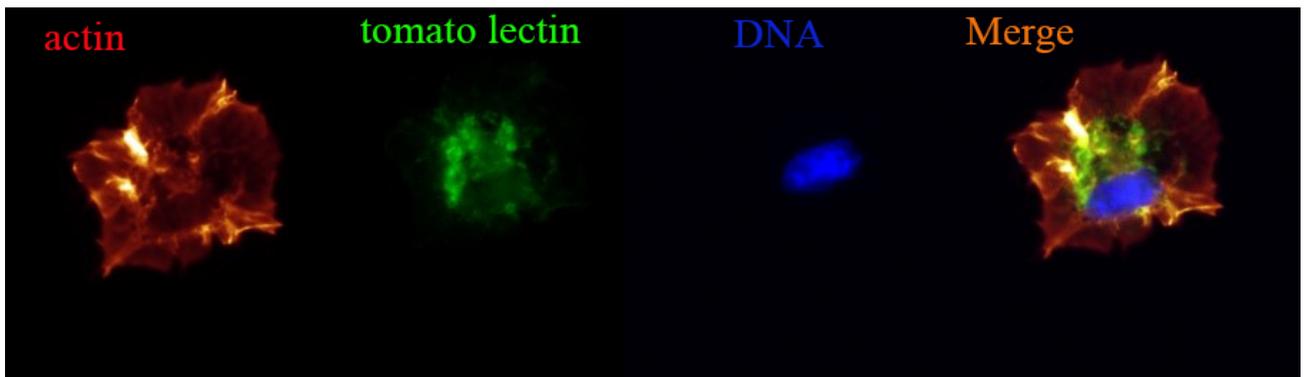


Рисунок 10. Гранулоцит *Planorbarius corneus*.

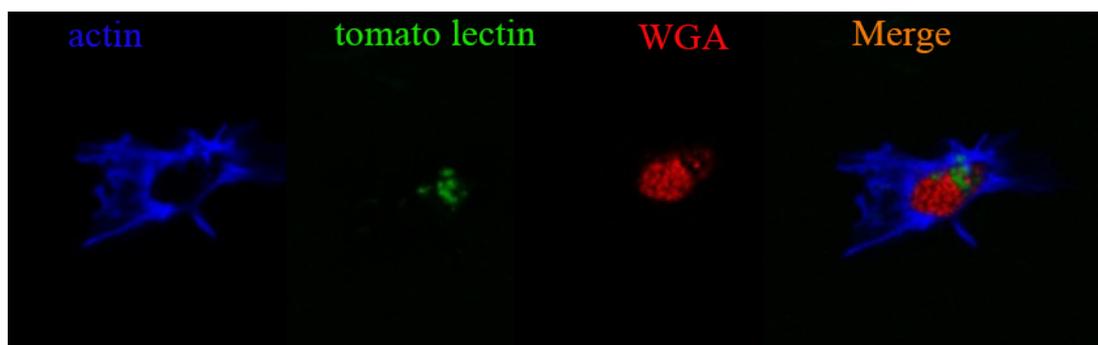


Рисунок 11. Гранулоцит *Planorbarius corneus*.

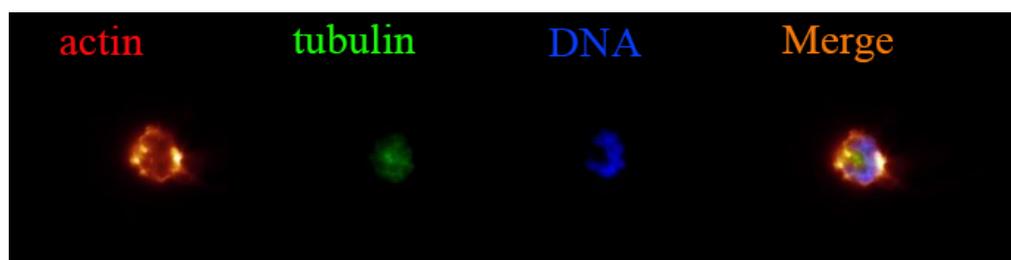


Рисунок 12. Гиалиноцит *Planorbarius corneus*.

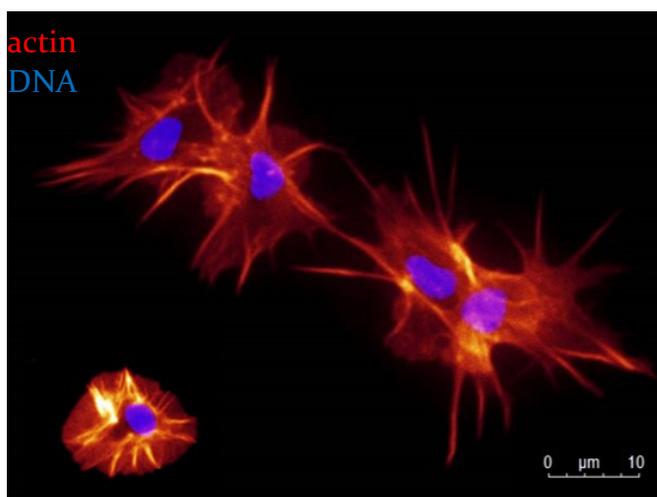


Рисунок 13. Гемоциты *Biomphalaria glabrata*

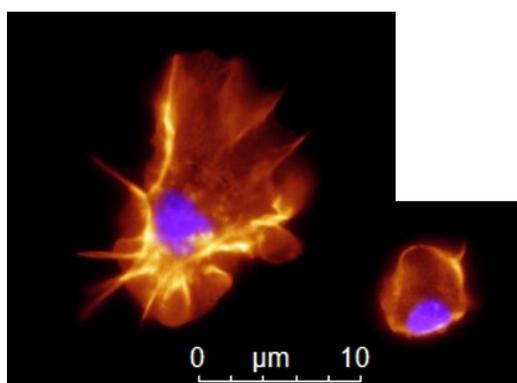


Рисунок 14. Гемоциты *Planorbis planorbis*.

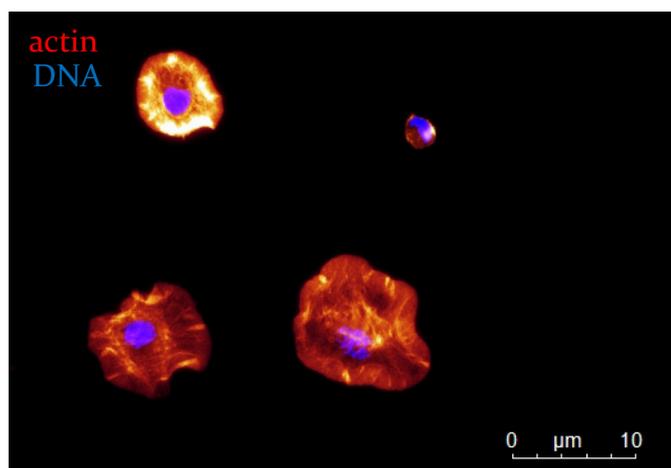


Рисунок 15. Гемоциты *Succinea putris*.

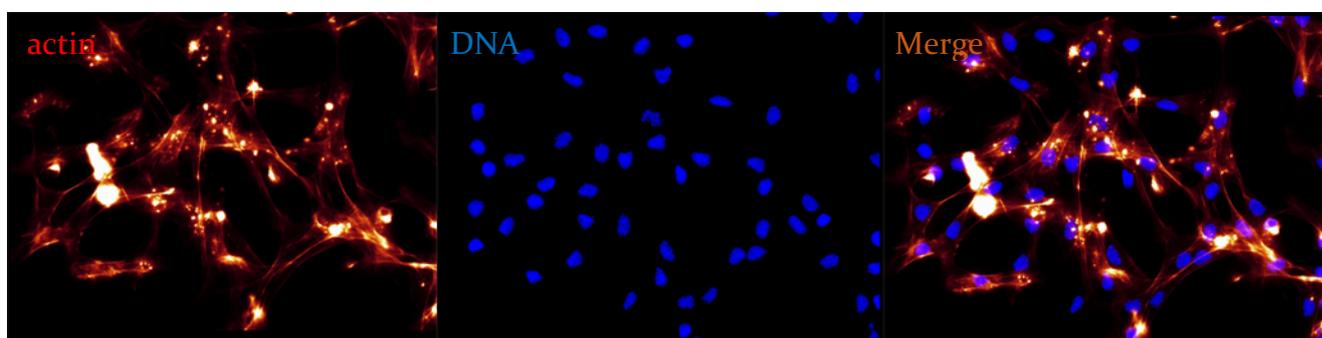


Рисунок 16. Гемоциты *Lymnaea stagnalis*.

Для визуализации лизосомального и митохондриального транспорта был проведен эксперимент с прижизненным окрашиванием гемоцитов *Planorbarius corneus* красителями LysoTracker Green (504/511 нм) и MitoTracker Red (579/599 нм) (Рис. 17).

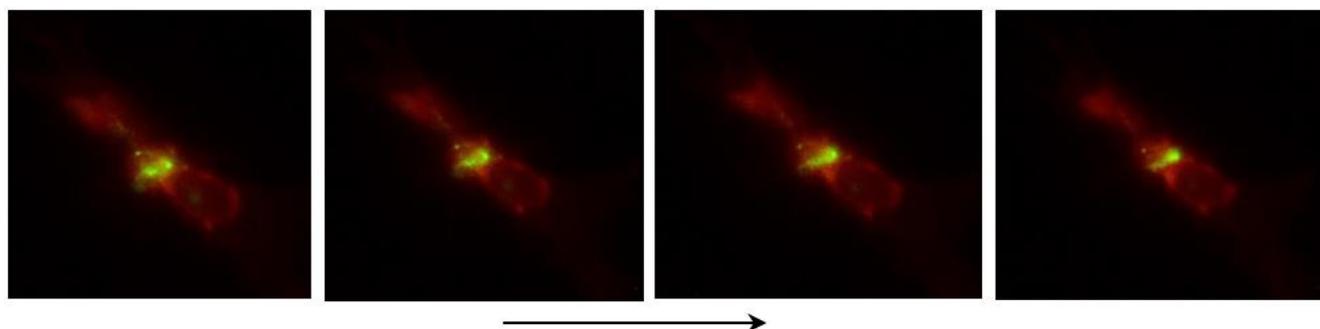


Рисунок 17. Транспорт лизосом (зеленый) и митохондрий (красный) в гемоците *Planorbarius corneus*.

Для определения основных фенотипов гемоцитов *s* был проведен *in vitro* анализ с помощью программного обеспечения CellProfiler. Полученные данные подтверждают наличие двух основных популяций циркулирующих клеток гемолимфы – гранулоцитов и гиалиноцитов (Рис. 18).

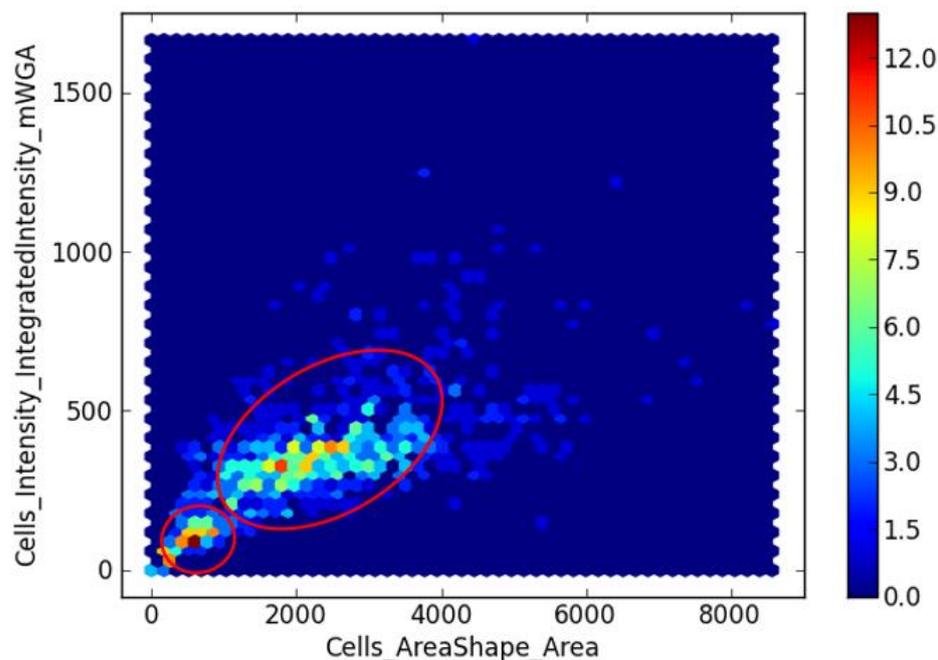


Рисунок 18. Распределение клеточных элементов в гемолимфе *Planorbarius corneus* согласно размерным характеристикам клеток и наличию лектина WGA.

Электронно-микроскопическое изучение гемоцитов *Biomphalaria glabrata* (Рис. 19) и *Planorbarius corneus* (Рис. 20) подтверждает объективность разделения клеток гемолимфы на два типа – гранулоциты и гиалиноциты. На фотографиях гиалиноцитов (Рис. 19 В, 20 А) хорошо заметно, что клетки имеют округлую форму и лишены псевдоподий. Гранулоциты в свою очередь имеют длинные разветвленные филоподии, способные анастомозировать друг с другом.

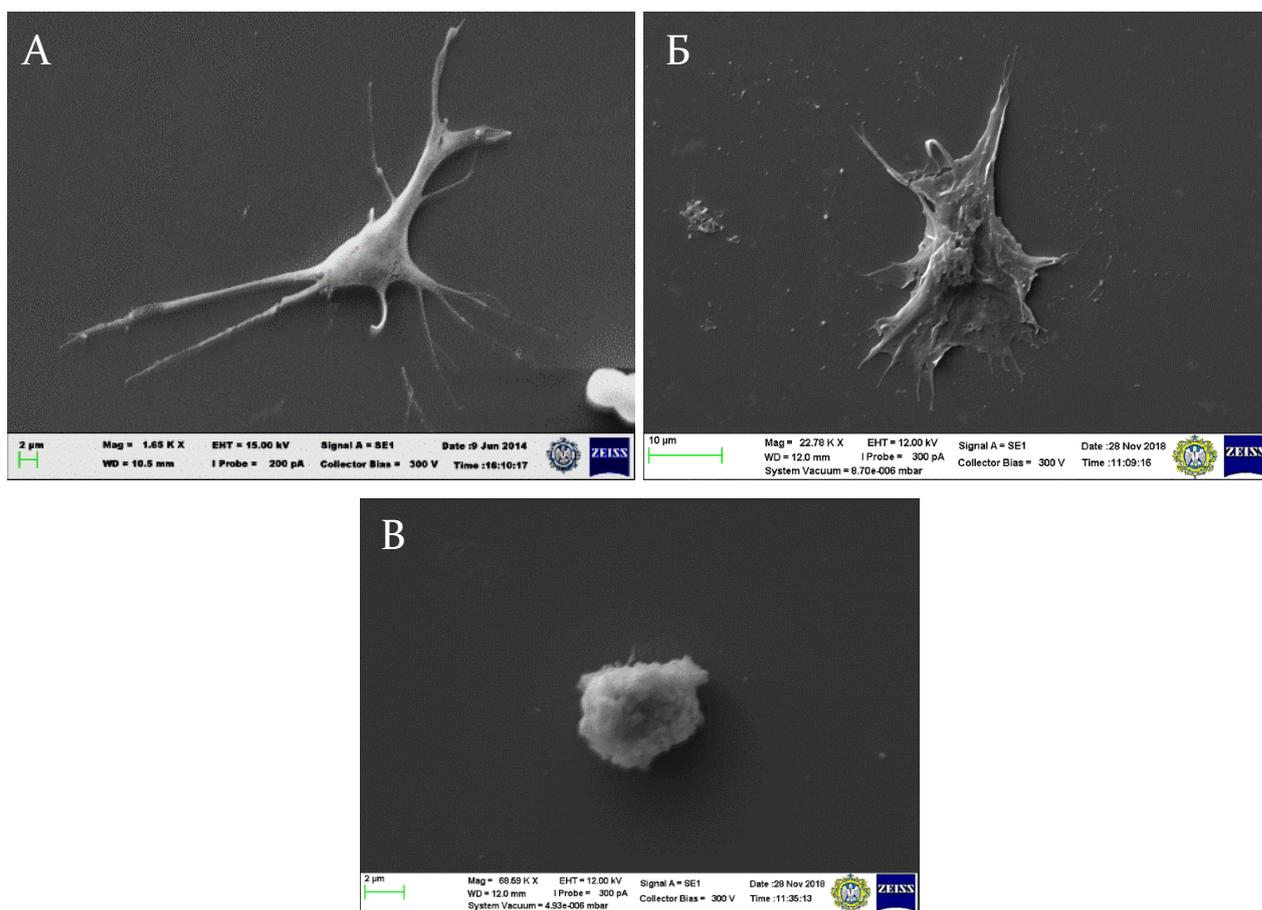


Рисунок 19. Сканирующие электронные микрофотографии гемоцитов *Biomphalaria glabrata* (А–В). А, Б — гранулоциты, В — глииноцит.

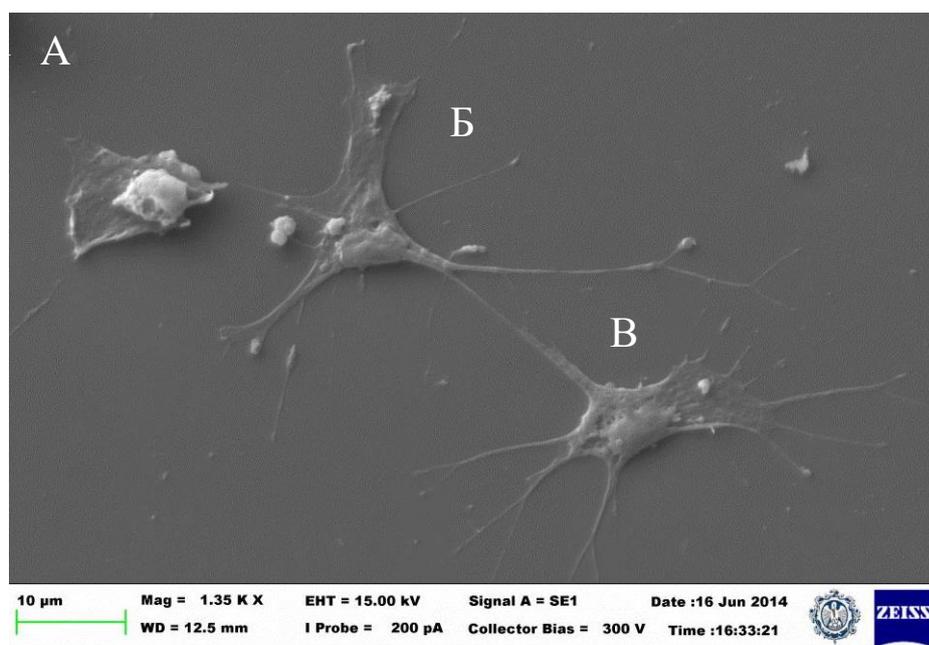


Рисунок 20. Сканирующие электронные микрофотографии гемоцитов *Planorbarius corneus* (А–В). А — глииноцит, Б, В — гранулоциты.

Гемоциты других видов пульмонат также были изучены с использованием СЭМ (Рис. 21).

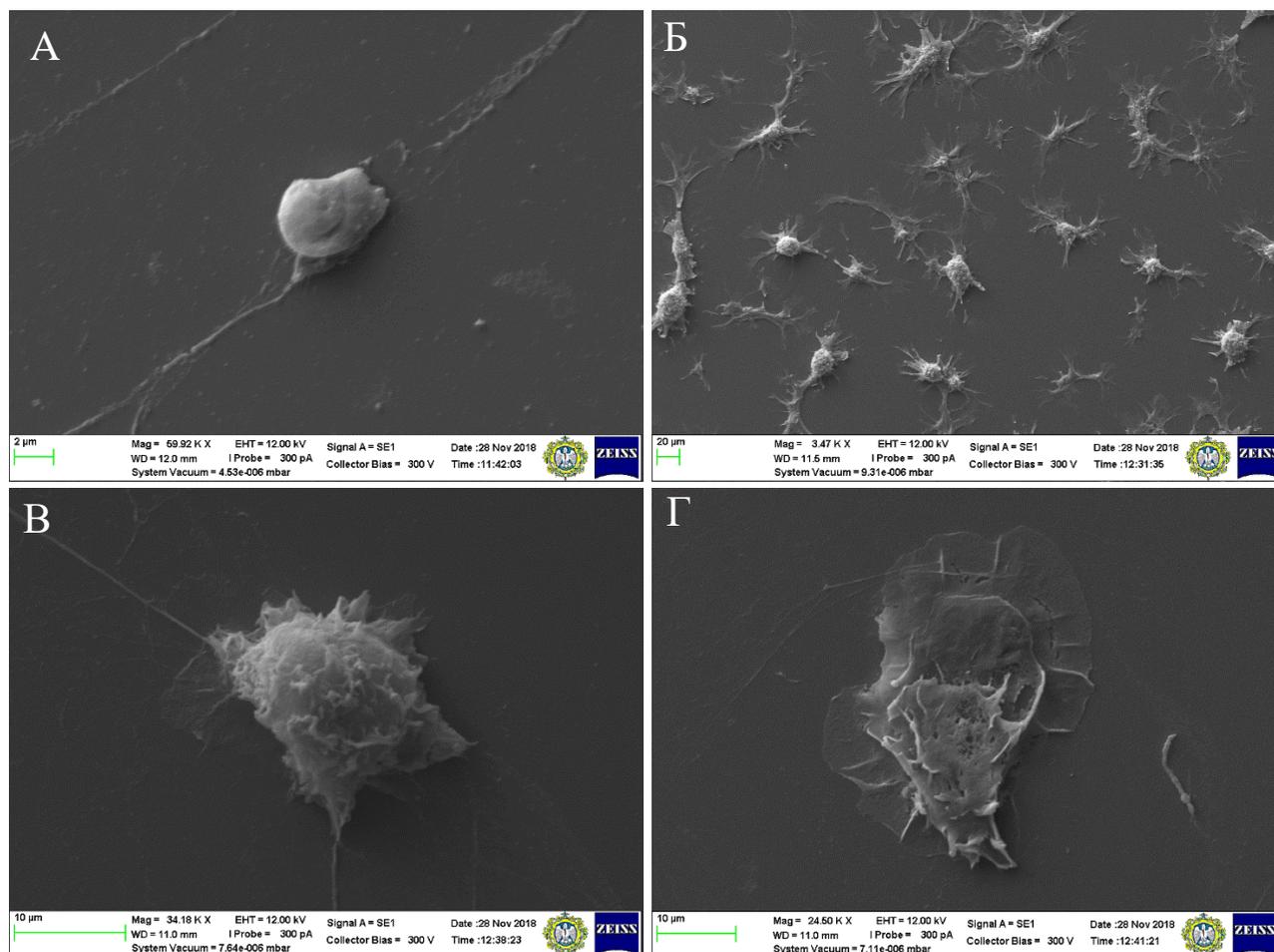


Рисунок 21. Сканирующие электронные микрофотографии гемоцитов (А–Г). А — гиалиноцит *Planorbis planorbis*, Б — *Lymnaea stagnalis*, В, Г — гранулоциты *Succinea putris*.

Ультраструктурный анализ, проведенный с помощью ТЭМ также позволяет разделить гемоциты *Biomphalaria glabrata* и *Planorbarius corneus* на два типа клеток: гиалиноциты и гранулоциты (Рис. 22, 23).

При этом видно, что ядро гранулоцитов имеет почковидную форму. Клетки могут иметь как короткие, толстые псевдоподии, так и длинные филоподии, в основании которых расположены микрофиламенты. Цитоплазма богата органеллами: многочисленными диктиосомами, везикулами с плотным содержимым, митохондриями, шЭПР и рибосомами. В периферической части

цитоплазмы имеются большие запасы гликогена, а также вакуоли, указывающие на происходящие процессы эндоцитоза.

Гиалиноциты имеют округлое ядро, которое занимает периферическое положение; хроматин распределен более диффузно, чем у гранулоцитов. В цитоплазме содержатся диктиосомы, митохондрии и вакуоли. Следует отметить, что среди гиалиноцитов встречаются клетки с крупными псевдоподиями. Именно в них находятся многочисленные диктиосомы.

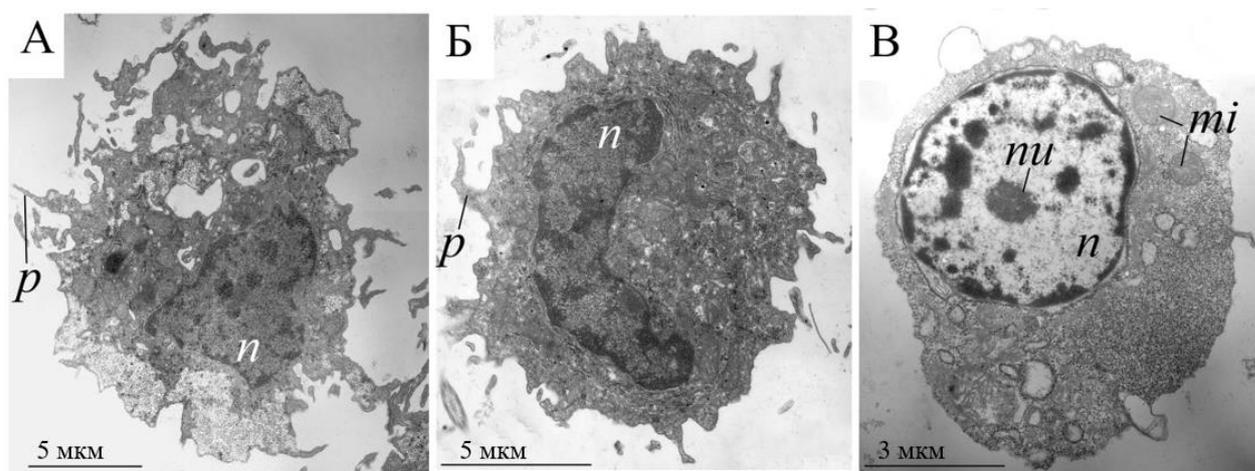


Рисунок 22. Трансмиссионные электронные микрофотографии гемоцитов *Biomphalaria glabrata* (А–В). А, Б — гранулоциты, В — гиалиноцит. Условные обозначения: *mi* – митохондрия, *n* – ядро, *nu* – ядрышко, *p* – псевдоподия.

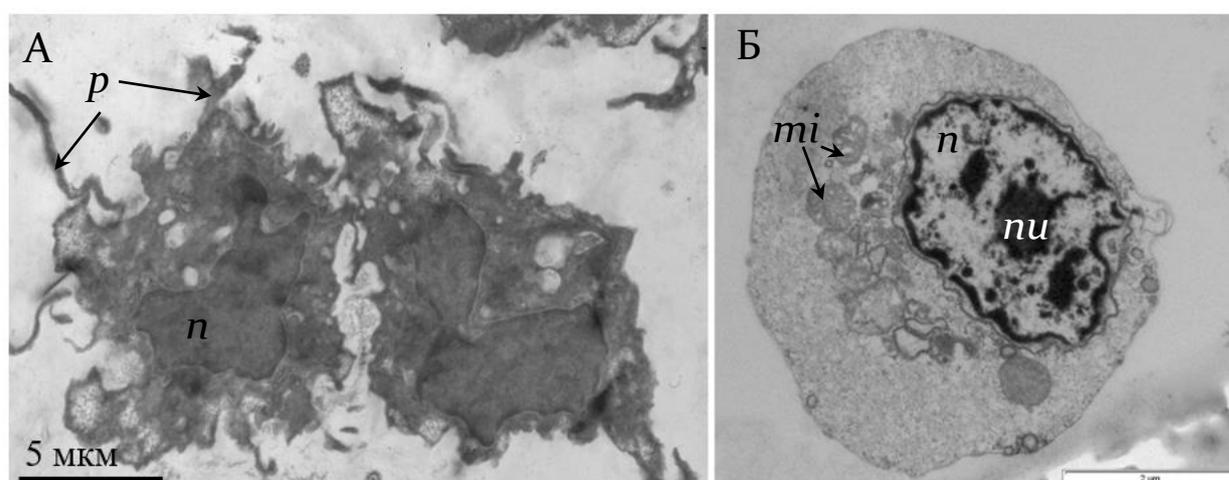


Рисунок 23. Трансмиссионные электронные микрофотографии гемоцитов *Planorbarius corneus* (А–Б). А — гранулоциты, В — гиалиноцит. Условные обозначения: *mi* – митохондрия, *n* – ядро, *nu* – ядрышко, *p* – псевдоподия.

3.1.2. Цитофлуориметрический анализ гемолимфы моллюсков

На основании анализа FS и SS гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus* (n=48), *Biomphalaria glabrata* (n=40) и *Planorbis planorbis* (n=35) можно выделить три популяции клеток (Рис. 24), обозначенные А, В и С. Популяция А представлена клетками меньшего размера. Для них характерна относительно простая организация цитоплазматического компартмента, что соответствует морфологическим характеристикам гиалиноцитов. Клетки, составляющие популяции В и С, имеют более гранулированную цитоплазму, характерную для гранулоцитов.

Следовательно, выделяемая на морфологическом уровне популяция гранулоцитов по результатам цитофлуориметрического анализа распадается на две популяции. При этом клетки популяции С более мелкие и сильнее варьируют по степени гранулярности по сравнению с гранулоцитами из популяции В.

Относительное соотношение гранулоцитов и гиалиноцитов в гемолимфе разных видов моллюсков различается. У *Planorbis planorbis* процент гранулоцитов от общего количества гемоцитов (68,35) достоверно выше ($p < 0.05$), чем у количество гранулоцитов у *P. corneus* больше, чем у *Biomphalaria glabrata* ($p < 0.05$).

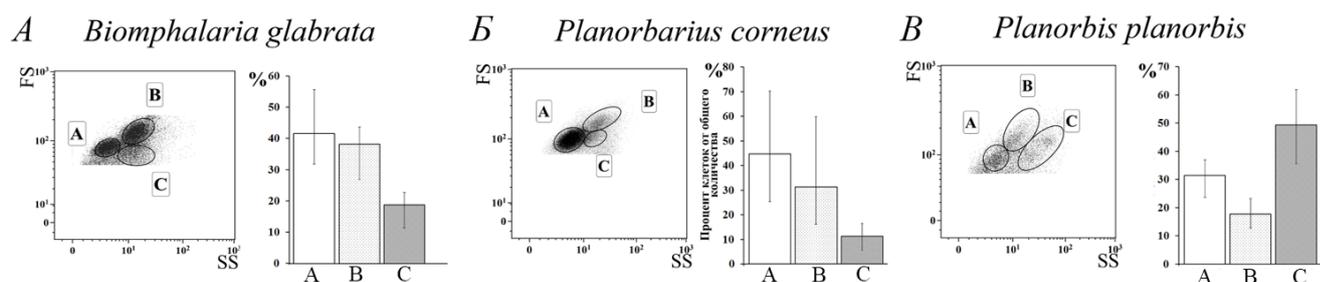


Рисунок 24. Цитограммы гемолимфы моллюсков *Biomphalaria glabrata* (А), *Planorbarius corneus* (Б), *Planorbis planorbis* (В).

Различается и соотношение популяций гранулоцитов. У *B. glabrata* и *Planorbarius corneus* большая часть гранулоцитов представлена клетками популяции В (65.00 и 77.29 % соответственно). В то же время, среди гранулоцитов *Planorbis planorbis* преобладают клетки популяции С (72.79 %). При этом у *P.*

planorbis популяция *C* является более гетерогенной по составу: клетки располагаются в пределах большего диапазона значений FS и SS и более гранулированы, чем у *Biomphalaria glabrata* и *Planorbarius corneus* ($p < 0.001$).

3.1.3. Обсуждение к разделу «Клеточный состав гемолимфы моллюсков»

В главе «Обзор литературы» уже отмечался дискуссионный характер современных представлений о клеточном составе гемолимфы моллюсков (см. с. 11). С одной стороны, большинство исследователей признаёт, что основными морфотипами циркулирующих клеток являются гиалиноциты и гранулоциты. В частности, это подтверждается для основной экспериментальной модели легочных моллюсков – *Biomphalaria glabrata* (Cheng, 1975; Harris, 1975; Sminia, Varensen, 1980; Атаев, Полевщиков, 2004; Pila et al. 2016; Zhang et al., 2016 и др.). Сходное заключение сделано и относительно гемоцитов других активно изучаемых пульмонат: *Planorbarius corneus* (Ottaviani, Franchini, 1988; Атаев et al., 2016), *Lymnea stagnalis*, и *Bulinus truncatus* (Sminia, Varensen, 1980).

В то же время среди гранулоцитов неоднократно выделялись от двух до нескольких клеточных субпопуляций. При этом многие авторы (Cheng, Guida, 1980a; Joky et al., 1983 и др.) основывались на общих морфометрических характеристиках. Такие различия можно объяснить онтогенетическими изменениями гранулоцитов. Так, Сминия и Барендсен (Sminia, Varensen, 1980) предположили, что последние гетерогенны морфологически и функционально. Соответственно, наблюдаемые различия в гранулоцитах соответствуют эволюционным событиям: превращение клеток в процессе созревания от маленьких, округлых, неспособных к образованию псевдоподий к клеткам большего размера, обладающих способностью распластываться на стекле и фагоцитировать. Согласно данным этих авторов гиалиноциты представляют конечную стадию дегенерации клеток.

Однако в некоторых работах приводятся данные о принципиальных особенностях субпопуляций, выявленных с помощью ТЭМ-исследований, а также цитохимических методов (Schoenberg, Cheng, 1980, 1981; Yoshino, 1981; Joky et al., 1983; Martins-Souza et al., 2006).

Полученные нами данные подтверждают наличие в гемолимфе pulmonat двух основных клеточных типов – гранулоцитов и гиалиноцитов. При этом у четырёх изученных видов легочных моллюсков (*Biomphalaria glabrata*, *Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis*, *Succinea putris*) внутри каждой клеточной популяции отмечается сходство морфологии гемоцитов.

В то же время методом проточной цитофлуориметрии нам удалось выявить гетерогенность популяции гранулоцитов у моллюсков *Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis* и *Biomphalaria glabrata*. Имеющиеся различия могут быть связаны с возрастными и функциональными изменениями в клетках данного типа. Соответственно, речь идёт скорее о специализации гемоцитов протекающей в разных условиях. Так, при изучении гемоцитов *in vitro* нами отмечена большая вариабельность не только размеров, но и формы гранулоцитов. На протяжении нескольких часов инкубирования клетки могут менять форму, размер и количество псевдоподий (см. с. 53). Вероятно, именно гетерогенность гранулоцитов многие авторы ошибочно принимали за дискретные типы клеток гемолимфы.

Одним из важнейших факторов, вызывающих изменения в поведении и морфологии гранулоцитов является иммунизация моллюсков. Уже на первом этапе клеточной реакции наглядно реализуется способность гранулоцитов к распластыванию на субстрате, адгезии к другим клеткам. Разнообразна форма гранулоцитов и в составе капсул, образованных вокруг трансплантатов и паразитов.

3.2. Гемопоз

В обзоре литературе отмечалось, что в настоящее время остаются актуальными две основные гипотезы мультипликации гемоцитов (см. с. 33): (1) существование одного или нескольких специализированных центров, ответственных за пролиферацию гемоцитов; (2) деление циркулирующих клеток гемолимфы.

3.2.1. Расположение и строение гемопозитического органа

Мы придерживаемся моноцентричной модели гемопоза pulmonat, допускающей существование единого центра амёбоцито-продуцирующего органа,

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».

У интактных моллюсков *Biomphalaria glabrata* АПО состоит в среднем из 3 узелков овальной формы, размер которых составляет примерно 22×44 мкм. При этом узелки состоят из рыхло упакованных удлинненных клеток и располагаются друг от друга на расстоянии до 50 мкм (Рис. 25).

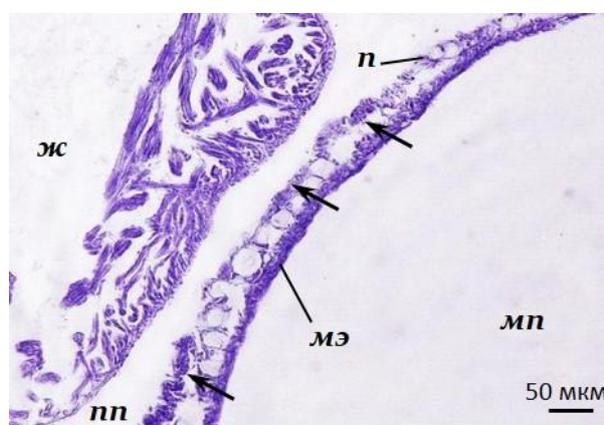


Рисунок 25. АПО незараженного моллюска *Biomphalaria glabrata*. Стрелками отмечены узелки АПО.

АПО у незараженных моллюсков *Biomphalaria pfeifferi* состоит из 3–4 клеточных узелков. Их размер составляет примерно 16×8 мкм (Рис. 26, 30 А). Локализация органа может отличаться – это может быть не только район между мантийным и перикардиальными эпителиями, но и латеральный участок перикардиального эпителия. У интактных животных АПО состоит из самостоятельных клеточных узелков, которые имеют неправильную форму и расположены близко друг к другу. Клетки, образующие АПО, имеют округлую форму. Со стороны перикарда расположены клетки небольшого размера ($3,3 \pm 0,5 \times 2,8 \pm 0,5$ мкм); их ядра ($2,4 \pm 0,5 \times 1,8 \pm 0,3$) содержат конденсированный хроматин. Клетки, составляющие основную часть клеточных узелков имеют больший размер – $5,5 \pm 0,4 \times 4,6 \pm 0,5$ (ядра $4,0 \pm 0,4 \times 3,2 \pm 0,3$). Кроме этого, в

составе узелков отмечены клетки звёздчатой формы, принимающие участие в компактизации клеток и формировании дифинитивной структуры АПО. В зоне «выхода» отмечены отдельные гемоциты, имеющие различную форму и размеры.

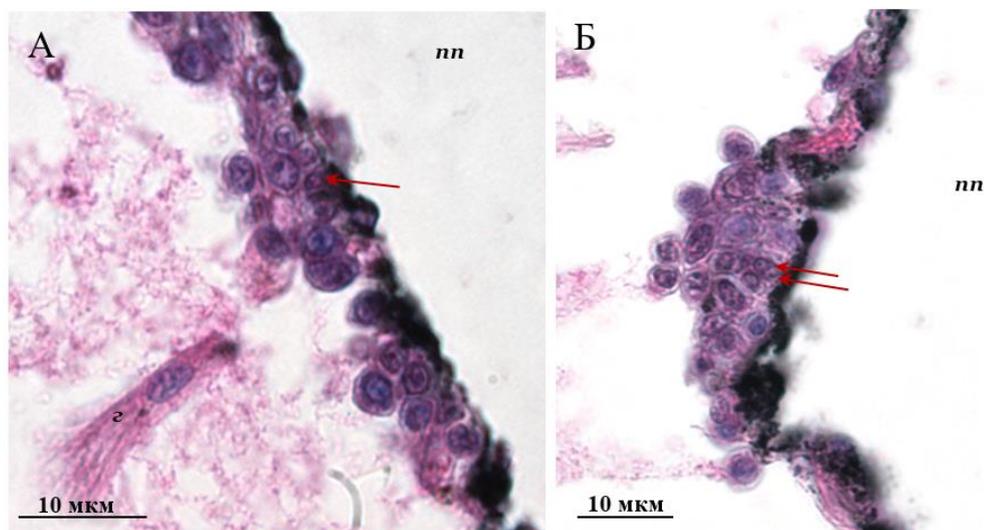


Рисунок 26. Морфология узелка АПО *Biomphalaria pfeifferi*. Стрелками отмечены недифференцированные клетки.

Подтверждено наличие АПО и у других изученных нами pulmonat (*Succinea putris*, *Planorbis planorbis* и *Planorbarius corneus*). Во всех случаях АПО расположен в районе перикарда и отмечается его активация в ответ на трематодную инвазию. Следует отметить, что для этих улиток речь идёт о природном заражении, поэтому срок инвазии не известен. Возможно, поздние сроки заражения не позволили наблюдать более эффектную картину активации АПО, характерную для начала инвазии. Тем не менее, АПО зараженных улиток во всех случаях был заметно увеличен по сравнению с интактными особями.

У наземных моллюсков *Succinea putris* АПО расположен вблизи передней стенки перикарда. В его составе насчитывается 3–4 узелка овальной формы. Расположены они на значительном расстоянии друг от друга, при этом их размеры на срезе не превышают 70×35 мкм, толщина – 15 мкм (Рис. 27). Заражение трематодами *Leucochloridium paradoxum* приводит к увеличению количества клеток, входящих в состав АПО.

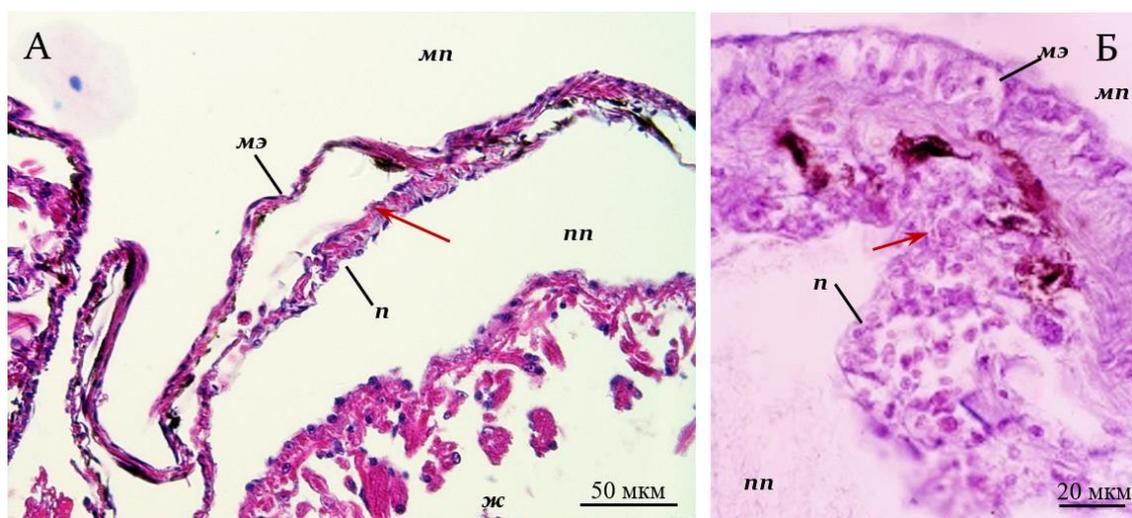


Рисунок 27. АПО моллюска *Succinea putris* (А–Б). А — незараженный моллюск, Б — моллюск, зараженный *Leucochloridium paradoxum*. Стрелками обозначены узелки АПО.

У моллюсков *Planorbis planorbis* АПО в районе передней стенки перикарда не обнаружен. Митотически активные зоны отмечены вблизи его латеральной стенки, где образуются группы бластоподобных клеток, расположенных вдоль перикарда (Рис. 28). При заражении трематодами *Cotylurus brevis* также происходит увеличение размеров АПО.

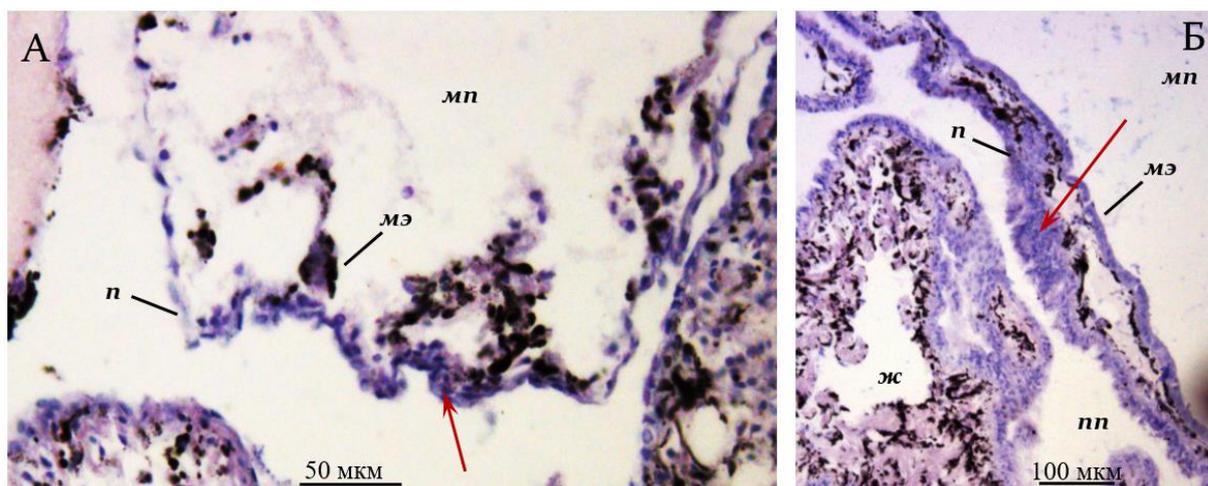


Рисунок 28. АПО моллюска *Planorbis planorbis* (А–Б). А — незараженный моллюск, Б — моллюск, зараженный *Cotylurus brevis*. Стрелками обозначены узелки АПО.

У моллюсков *Planorbarius corneus* АПО обнаружен между передней стенкой перикарда и мантийным эпителием (Рис. 29). АПО незараженных особей состоит из единичных узелков. При заражении моллюсков трематодами *Plagiorchis multiglandularis* организация АПО во многом напоминает его организацию у биомфаларий – хорошо заметные узелки с достаточно плотной упаковкой клеток.

Узелки характеризуются неправильной формой, некоторые из них вытянуты вдоль края лакун, их количество достигает 8–10, размеры – 85×25 мкм, а толщина – 24 мкм. Однако у моллюсков *Planorbarius corneus* узелки выстилают лакуны кровеносной системы не только вблизи перикарда, но и со стороны мантийного эпителия.

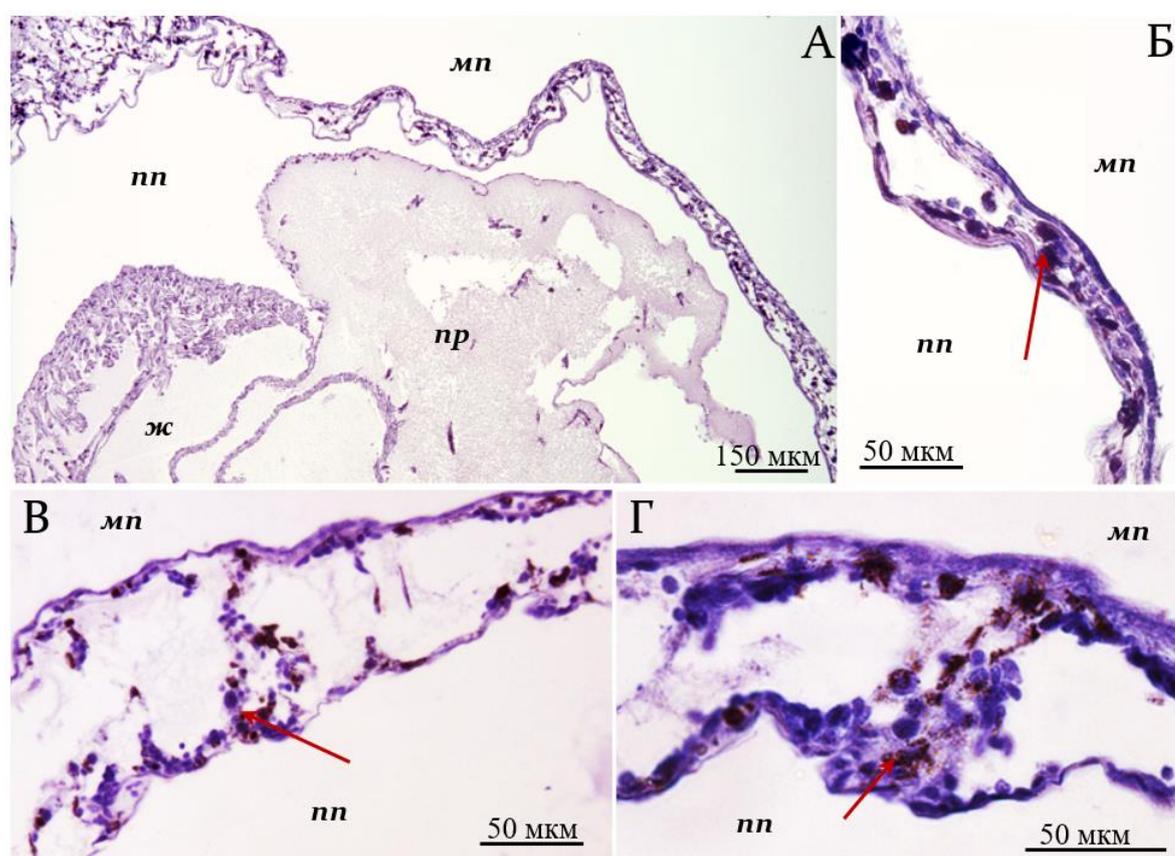


Рисунок 29. АПО моллюска *Planorbarius corneus* (А–Д). А–Б — незараженный моллюск, В–Д — моллюск, зараженный *Plagiorchis multiglandularis*. Стрелками обозначены узелки АПО.

3.2.2. Активация гемопоэза при иммунизации:

Трематоды рода *Echinostoma* и *Schistosoma*. Для иммунизации моллюсков *Biomphalaria pfeifferi* использовались трематоды *Echinostoma caproni* и *Schistosoma mansoni*. В случае иммунизации моллюсков *Biomphalaria glabrata* использовались трематоды *Schistosoma mansoni*.

В случае заражения моллюсков *Biomphalaria pfeifferi* трематодами *Echinostoma caproni* первые признаки активизации АПО замечены через 3 часа п.з. (Рис. 30).

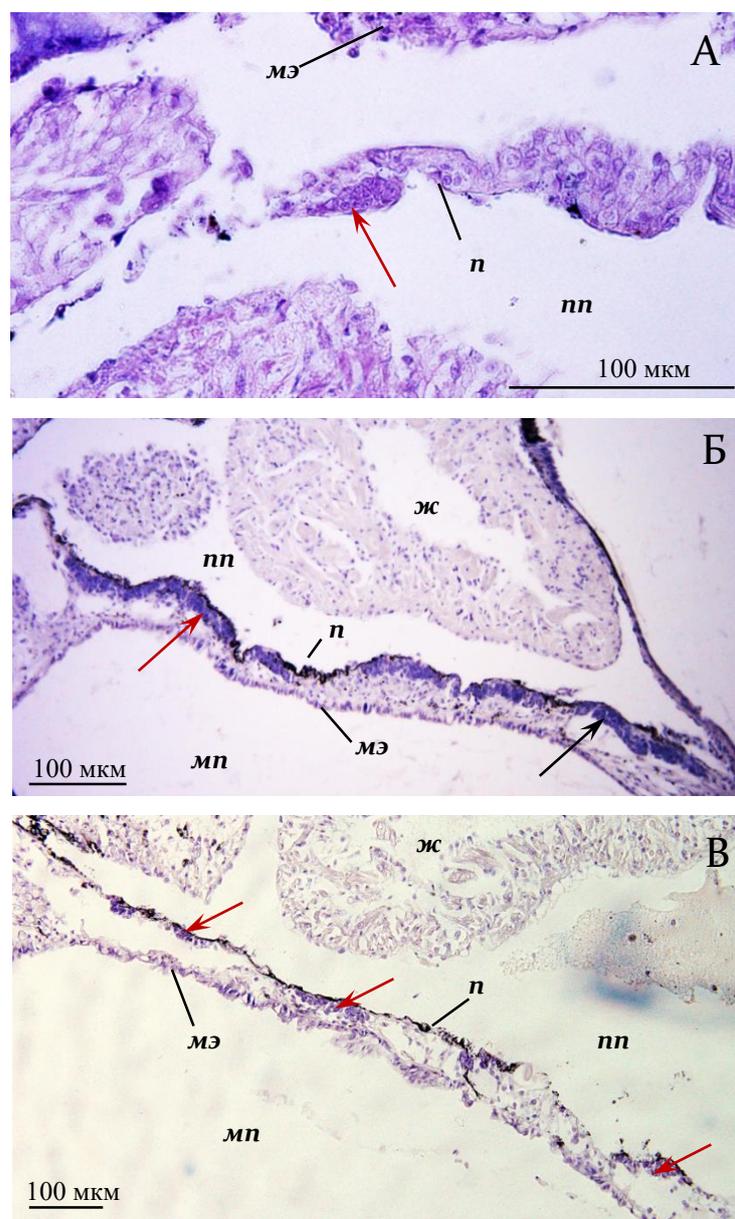


Рисунок 30. АПО моллюска *Biomphalaria pfeifferi* (А–В). А — незараженный моллюск, Б–В — моллюск, зараженный *Echinostoma caproni* через 3 дня п.з. (Б), через 10 дней п.з. (В). Стрелками обозначены узелки АПО.

Количество узелков при этом не превышает 2–3, однако их размеры увеличиваются и составляют в среднем 22×6 мкм. Клетки здесь расположены более рыхло, а их ядра имеют округлую форму. В АПО отмечены единичные клетки с веретеновидными, удлинёнными ядрами.

Через 3–4 дня п.з. АПО достигает максимальных размеров, что свидетельствует о высокой активности этого образования (Рис. 30 Б). Число узелков составляет 1–2. Через 6–7 дней п.з. отмечено уменьшение размеров АПО, а в дальнейшем (после 10 дней) происходит возврат его к исходному состоянию (Рис. 30 В). В некоторых случаях подсчет количества узелков затруднен, так как в пространстве между перикардиальным и мантийным эпителиями образуются большие скопления гемоцитов – агглютинации. Последние имеют овальную или удлинённую форму, а их минимальные и максимальные размеры на срезе составляют 150×220 и 250×380 мкм соответственно.

При заражении моллюска *Biomphalaria pfeifferi* трематодами *Schistosoma mansoni* Сенегальского штамма наблюдается проявление резистентности по отношению к паразиту (см. с. 87). При этом активации АПО не замечено (Рис. 31).

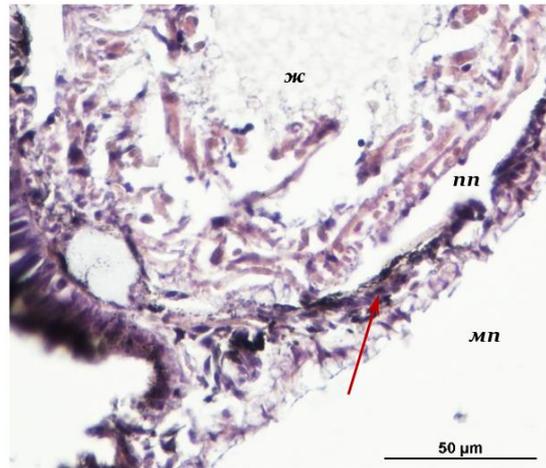


Рисунок 31. АПО моллюска *Biomphalaria pfeifferi* (А–Б). А — незараженный моллюск, Б — моллюск, зараженный *Schistosoma mansoni*. Стрелкой обозначен узелок АПО.

Максимальный пик активации АПО *Biomphalaria glabrata* при заражении трематодами *Schistosoma mansoni* происходит на 7-ые сутки п.з. (Рис. 32).

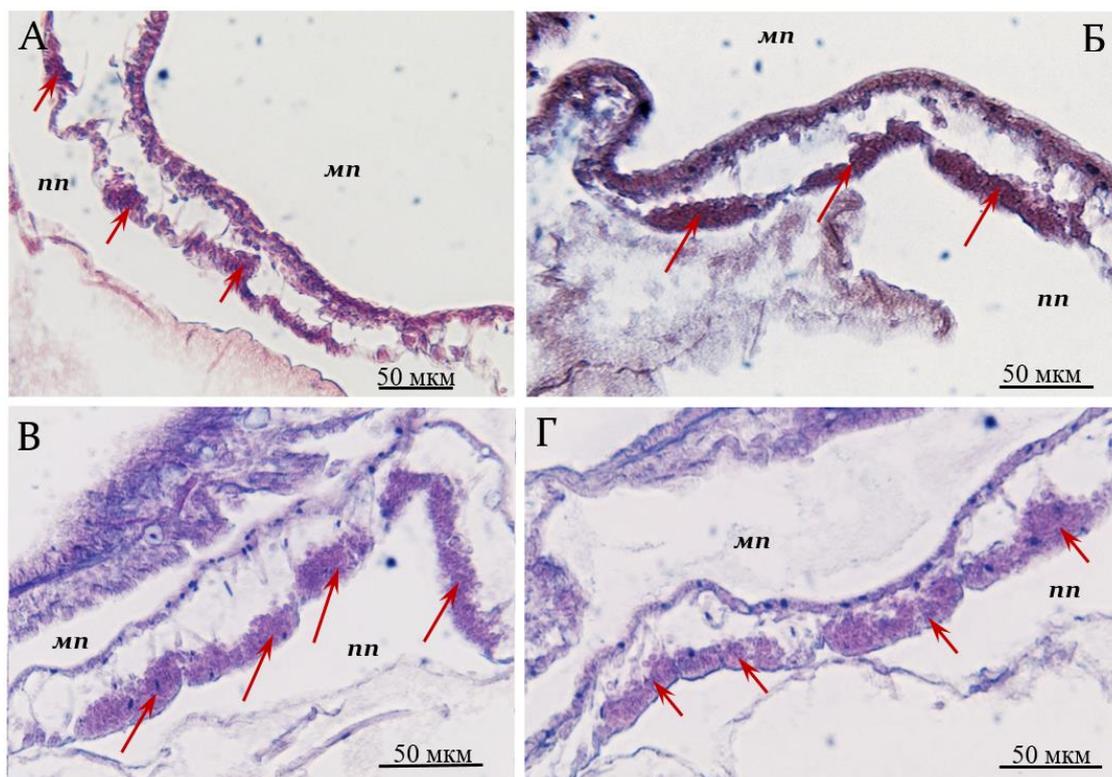


Рисунок 32. АПО моллюска *Biomphalaria glabrata*, зараженного *Schistosoma mansoni* (А–Г). А — незараженный моллюск, Б — через 3 дня п.з.; В, Г — через 7 дней п.з. Стрелками отмечены узелки АПО.

Трематодный белок. Иммунизация моллюсков трематодным белком также вызывает активацию АПО пульмонат (Рис. 33). Так, инъекция белком, выделенным из трематод *Plagiorchis multiglandularis*, приводит к увеличению размеров АПО моллюсков *Biomphalaria glabrata*. При этом отдельные узелки также сливаются вместе с образованием единого клеточного тяжа.

Стоит отметить, что при возрастании количества гемоцитов, наблюдается инфильтрация ими сердца и кровеносных синусов (Рис. 33 Г). В целом, через 3 дня после инъекции АПО *B. glabrata* по строению соответствует АПО моллюсков этого вида через 3 дня п.з. трематодами *Echinostoma caproni*.

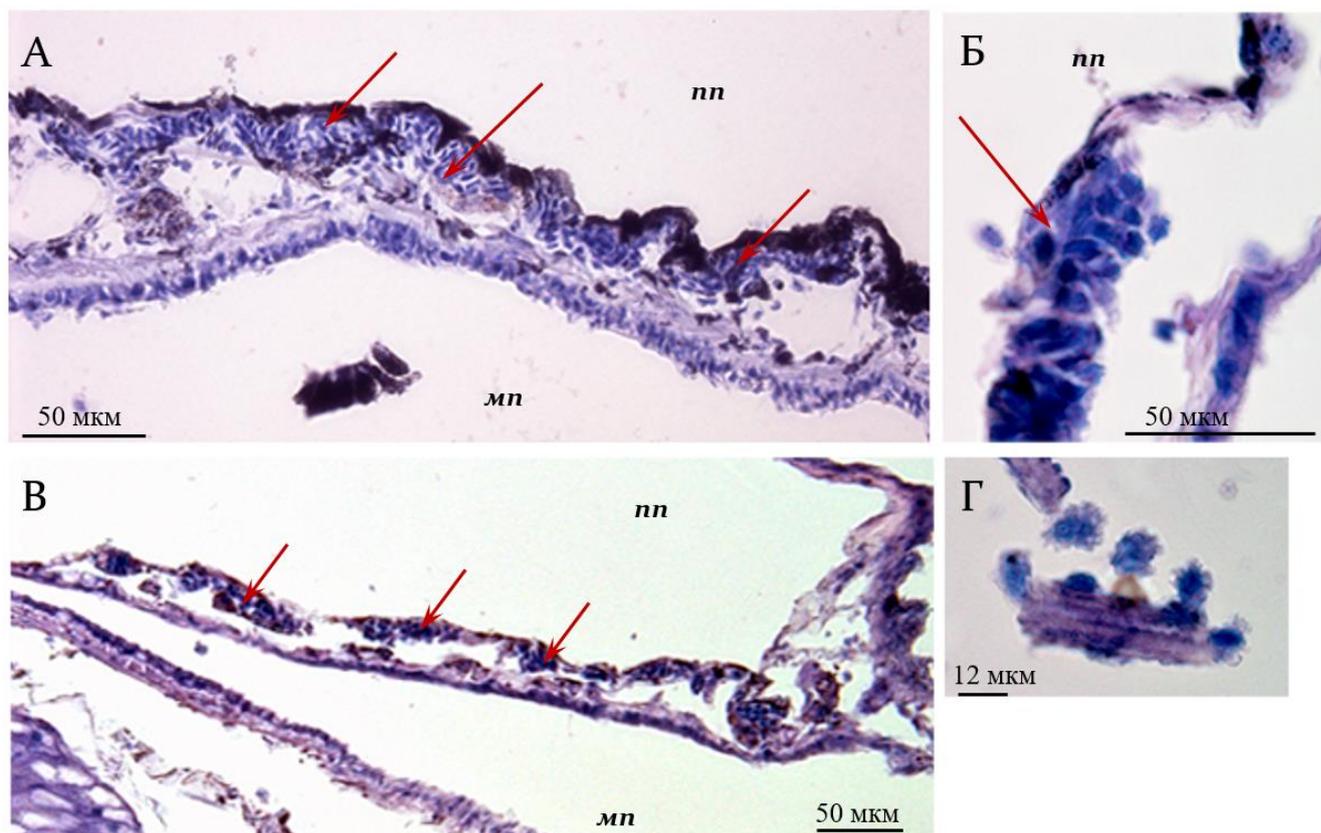


Рисунок 33. АПО моллюска *Biomphalaria glabrata* после инъекции трематодного белка, выделенного из *Plagiorchis multiglandularis* (А–Г). А–Б — инъекцированный моллюск через 3 дня, В — контроль, Г — гемоциты, оседающие на мышцы сердца моллюска. Стрелками обозначены узелки АПО.

Однако данные, полученные при цитофлуориметрическом анализе гемолимфы моллюсков *Biomphalaria glabrata*, иммунизированных белком трематод *Bilharziella polonica*, не выявили достоверных различий в изменении клеточного состава популяций гемоцитов (Рис. 34). Через 3 дня п.и. соотношение популяций гранулоцитов и гиалиноцитов не изменяется по сравнению с интактными особями.

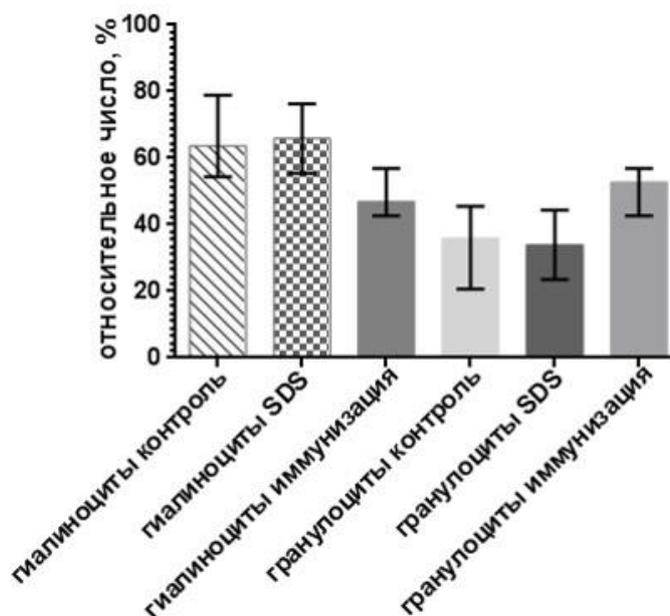


Рисунок 34. Гистограмма распределения клеточных популяций гемолимфы *Biomphalaria glabrata*, иммунизированных белком трематод *Bilharziella polonica*.

Для оценки пролиферативной активности клеток, входящих в состав гемопоэтических структур использовали **методику с применением колхицина** (перед вскрытием моллюски содержались в стаканчиках с 0,08% раствором колхицина в течение 6 часов).

Обработка иммунизированных моллюсков колхицином позволяет выявить пролиферативную активность АПО. В качестве чужеродного фактора в данном случае также использовался предварительно выделенный трематодный белок. Пролиферативная активность выявляется и у интактных особей, которые были использованы в качестве контроля. На 3 сутки п.и. количество митозов в узелках АПО значительно увеличивается по сравнению с контрольными животными (Рис. 35).

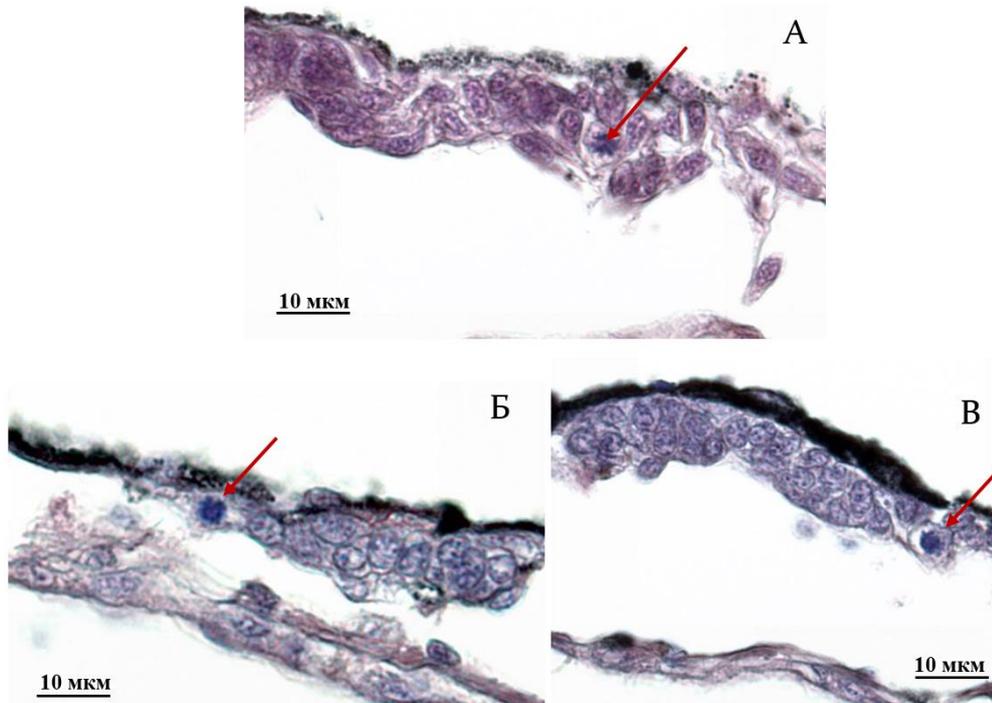


Рисунок 35. Митозы в АПО моллюска *Biomphalaria glabrata* (А–В). А — контроль, Б, В — митозы в пределах одного узелка АПО через 3 дня п.и. Стрелками обозначены митозы.

Ксенотрансплантат. Этапы активации АПО *Biomphalaria glabrata* при введении ксенотрансплантата (кошачий вибрис) в целом напоминают процессы, протекающие при трематодной инвазии и иммунизации моллюсков трематодным белком. Максимальный пик активности приходится на 3–4 сутки п.и., что приводит к слиянию узелков, образованию единого клеточного тяжа и гипертрофии органа (Рис. 36).

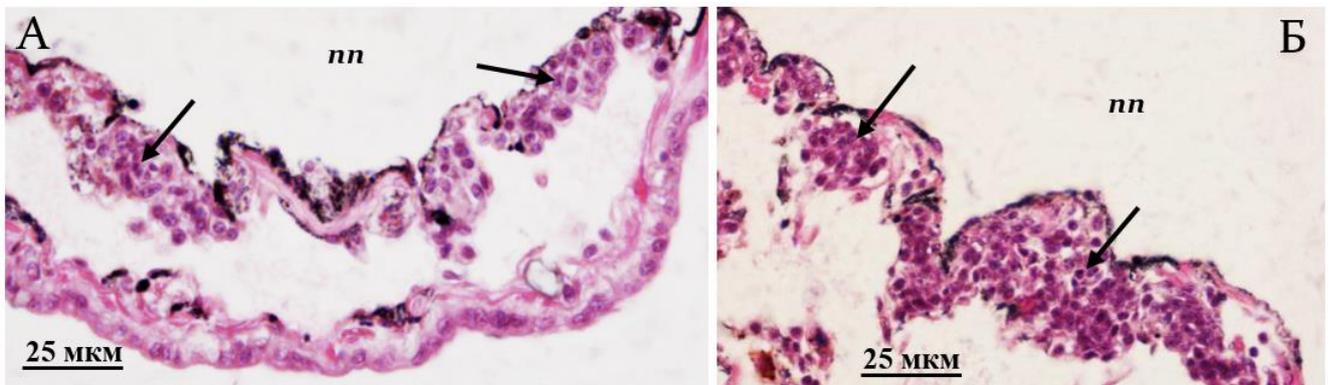


Рисунок 36. АПО моллюска *Biomphalaria glabrata* (А–Б). А — контроль, Б — через 3 дня п.и. трематодным белком. Стрелками обозначены узелки АПО.

Проллиферация циркулирующих клеток гемолимфы

В последнее время для оценки пролиферативной активности клеток большую популярность приобрел метод с использованием 5-этинил-2-дезоксисуридина (EdU), который является аналогом тимидина. Этот способ обнаружения пролиферирующих клеток является быстрым и специфичным, а также не требует денатурации ДНК в отличие от метода с использованием BrDU.

Объектами нашего исследования стали pulmonаты *Biomphalaria glabrata*, *Planorbarius corneus*, *Lymnaea stagnalis* и *Succinea putris*. Для всех изученных легочных моллюсков отмечена способность гемоцитов к накоплению EdU в ядрах дифференцированных клеток (Рис. 37), что косвенно может свидетельствовать о репликации ДНК.

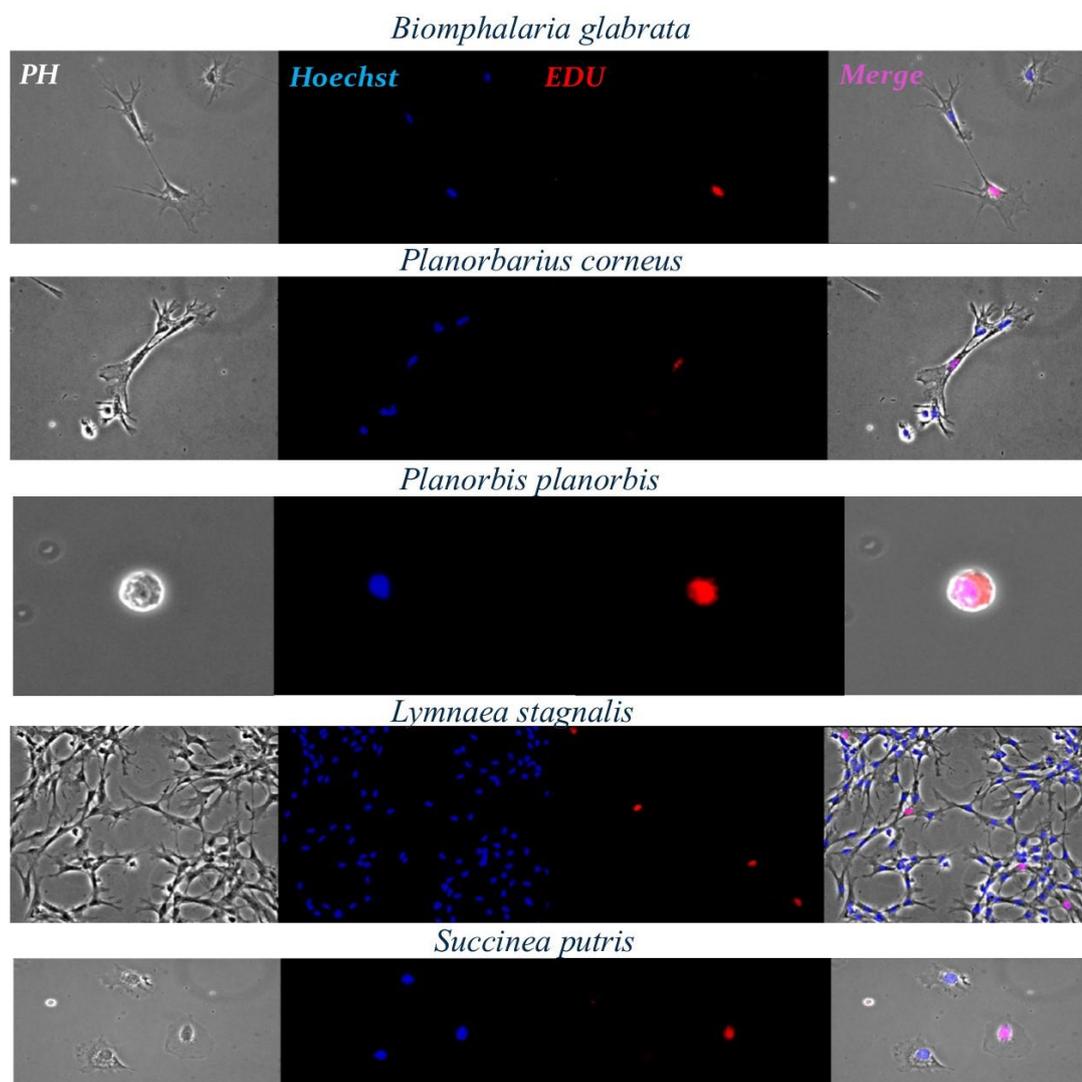


Рисунок 37. Включение EdU в ядра гемоцитов лёгочных моллюсков.

Для определения фаз клеточного цикла гемоцитов *Planorbarius corneus* был проведен *in vitro* анализ с помощью программного обеспечения CellProfiler. Показано, что все клетки находятся в G1 фазе клеточного цикла (Рис. 38). При этом метод проточной цитофлуориметрии позволил зарегистрировать случаи пролиферации клеток в гемолимфе моллюсков *Biomphalaria glabrata*. Согласно полученным результатам $90,02\% \pm 3,00\%$ клеток находятся в G1 фазе, $3,09\% \pm 2,1\%$ в G2 фазе и $6,89\% \pm 3,42\%$ в S фазе клеточного цикла (Рис. 39). Однако такие картины могут лишь косвенно подтверждать возможность деления циркулирующих зрелых гемоцитов.

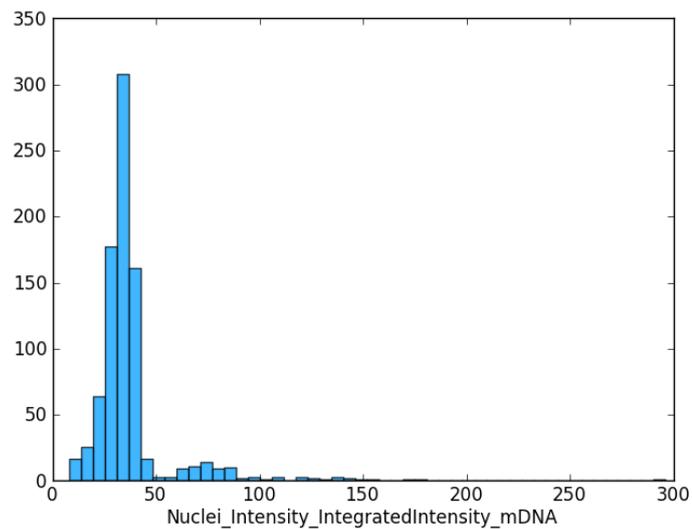


Рисунок 38. Гистограмма клеточного цикла гемоцитов *Planorbarius corneus*.

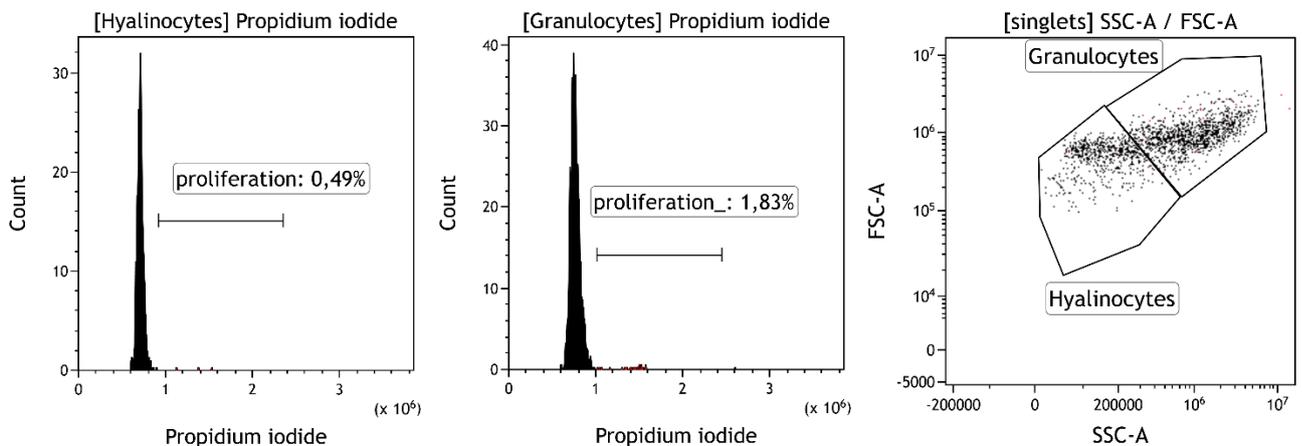


Рисунок 39. Цитограммы клеточного цикла гемоцитов *Biomphalaria glabrata*.

3.2.3. Обсуждение к разделу «Гемопоз»

Мы рассматриваем АПО как орган гемопоза легочных моллюсков. Вопрос об его универсальности для всех пульмонат остается открытым, но АПО был обнаружен у всех видов, для которых было проведено соответствующее исследование (см. с. 34). В большинстве случаев АПО описан между мантийным и перикардальным эпителиями. Для многих видов показано увеличение пролиферативной активности АПО в ответ на трематодную инвазию (Lie et al., 1975 a, b; Lie et al., 1976; Lie, Heuneman, 1976 a, b; Joky et al., 1985; Ataev et al., 2000; Атаев, Полевщиков, 2004; Атаев, Прохорова, 2013). Также гемопозитическая функция АПО была подтверждена в экспериментах *in vitro* (Barbosa et al., 2006).

Иногда в качестве аргумента против универсальной роли АПО как источника гемопоза приводятся сведения о прозобранхиях. Например, в работе Горбушина и Яковлевой, в которой показано включение меченого бромдезоксигуанидина в ядра циркулирующих гемоцитов моллюска *Littorina littorea* (Gorbushin, Iakovleva, 2008). Однако такие доводы представляются нам некорректными, так как у переднежаберных моллюсков АПО вообще не описан.

В изученных нами моллюсках АПО также топографически приурочен к перикардальному эпителию, однако является самостоятельным органом гемопоза (см. с. 65). Обычно АПО находится со стороны мантийной полости, но у некоторых моллюсков (*Planorbis planorbis*) может смещаться на латеральную сторону перикарда, ближе к аорте.

Результаты нашего изучения АПО нескольких видов пульмонат, а также анализ литературных источников на эту тему, позволяют заключить, что основой данного органа являются клеточные узелки. Клетки в составе узелков АПО проходят последовательные стадии развития: **недифференцированные клетки – прогемоциты – гемоциты**. Последние продвигаются в сторону кровеносных синусов, расположенных между мантийным и перикардальным 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.

При анализе клеточного состава АПО нам также удалось обнаружить веретенovidные клетки с удлинёнными ядрами, описанные ранее в работах других авторов (Lie et al., 1975; 1976a; Pan, 1965; Kinoti, 1971; Sullivan, 1988; Атаев, 2000; Атаев, Прохорова, 2013).

В следствие иммунизации моллюсков различными факторами (трематодами, трематодный белок, ксенотрансплантат) уже через несколько часов происходит активация АПО. Однако заметный рост численности циркулирующих гемоцитов наблюдается только через сутки п.и.

Тем не менее, существуют работы, в которых доказывается, что гемоциты могут образовываться в других участках тела моллюсков, либо возникать за счёт деления самих циркулирующих клеток (Sminia, 1979, 1982; Sminia et al., 1983; Monteil, Matricon-Gondran, 1991). Допускаемая некоторыми авторами способность гемоцитов к делению была изучена с применением проточной цитофлуориметрии и использованием EdU. Полученные результаты свидетельствуют о возможной пролиферативной активности нескольких процентов гемоцитов в циркуляции. Однако эти данные 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 гемопоэза лёгочных моллюсков.

3.3. Функциональная активность гемоцитов

Гемоциты модельных видов моллюсков были изучены на проявление функциональной активности: фагоцитоз, участие в процессе инкапсуляции, а также формировании гемоцитарной мантии вокруг чужеродных объектов, образование агглютинаций.

3.3.1. Влияние трематодной инвазии на состав гемолимфы моллюсков

Для анализа влияния трематодной инвазии на состав и соотношение гемоцитов использовались моллюски *Planorbarius corneus*, зараженные разными видами трематод. Относительное число гранулоцитов (популяции В, С) и

гиалиноцитов (популяция А) в гемолимфе интактных и зараженных моллюсков различается (Рис. 40). У незараженных моллюсков гранулоциты составляют около 54,3% от общего количества клеток. При трематодной инвазии происходит смещение соотношения клеточных субпопуляций и преобладают гранулоциты субпопуляции В.

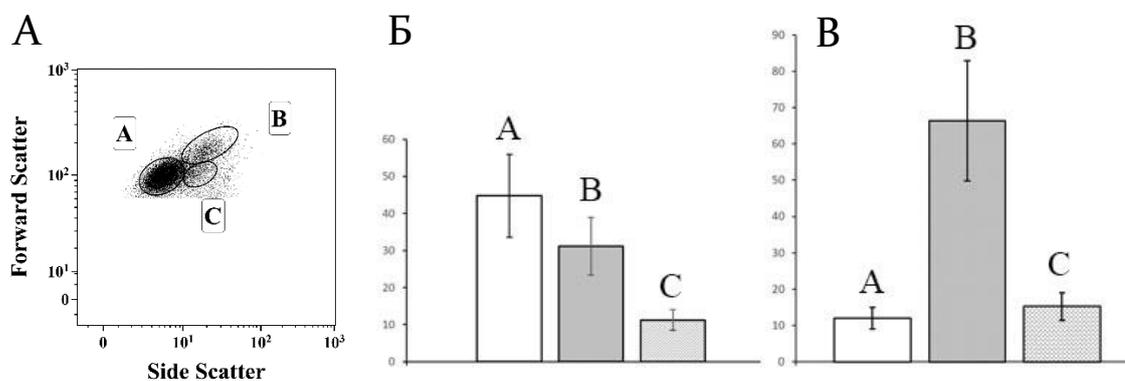


Рисунок 40. Клеточный состав гемолимфы моллюсков *Planorbarius corneus* (А–В). Интактные моллюски (А, Б), зараженные моллюски (В).

3.3.2. Фагоцитоз

Для изучения фагоцитарной активности гемоцитов *in vitro* свежесобранную гемолимфу моллюска *Biomphalaria glabrata* инкубировали с суспензиями бактерий *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* меченных флуоресцеин-5-изотиоционатом (ФИТЦ). Непосредственно перед анализом в суспензию добавляли раствор трипанового синего для подавления флуоресценции непоглощенных бактерий.

Изучение фагоцитарной активности гемоцитов с помощью проточного цитофлуориметра проводился через 30 мин после начала инкубации. Было показано, что бактерий *Staphylococcus aureus* фагоцитируют $56,9 \pm 7,0$ % (n=10) циркулирующих гемоцитов. При этом гранулоциты интенсивнее (46,1 % от общего числа гранулоцитов) поглощают стафилококков по сравнению с гиалиноцитами (7,02 % от общего числа гиалиноцитов) (Рис. 41). Гранулоциты также лучше проявляют фагоцитарную активность по отношению к бактериям *Escherichia coli*. Бактерий поглощают $45,0 \pm 8,0$ % (n=8) гемоцитов (73,0 % от общего числа гранулоцитов и 39,9 % от общего числа гиалиноцитов) (Рис. 42).

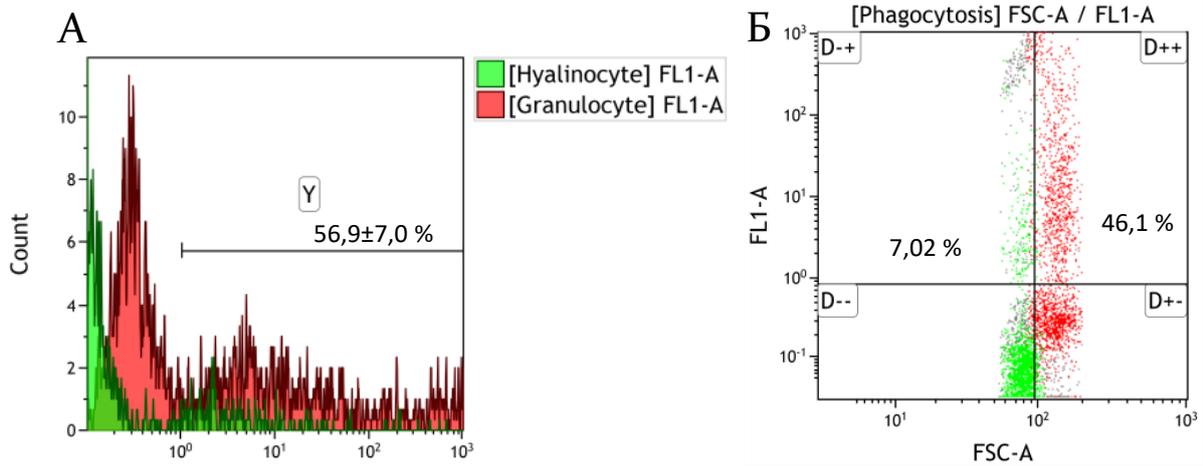


Рисунок 41. Поглощение меченных ФИТЦ бактерий *Staphylococcus aureus* гемоцитами моллюска *Biomphalaria glabrata* (А–Б). Регион Y — фагоцитировавшие бактерий гемоциты. А — гистограмма поглощения бактерий *Staphylococcus aureus*, Б — фагоцитоз бактерий *Staphylococcus aureus*.

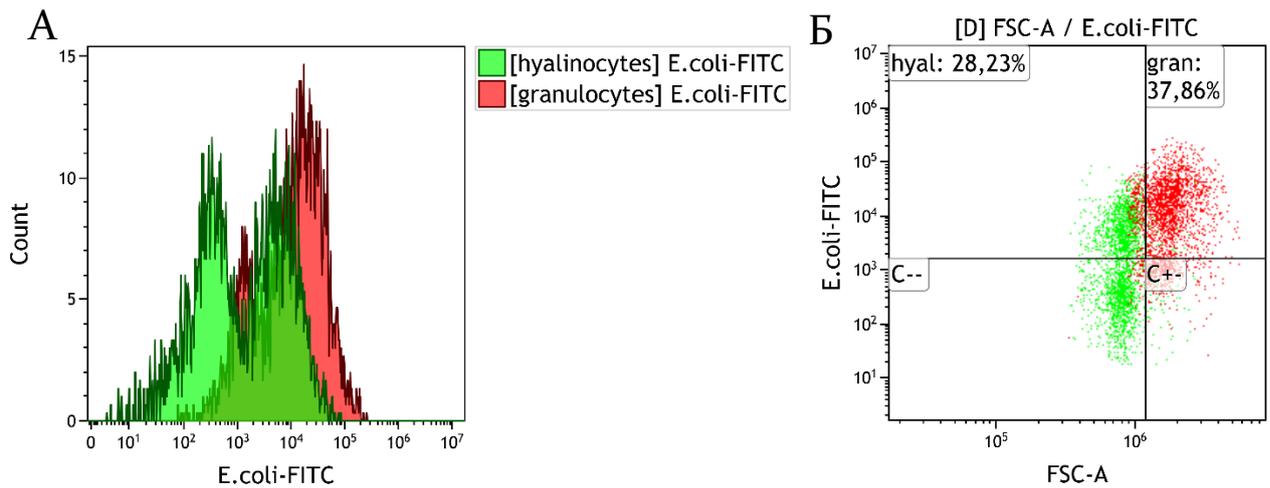


Рисунок 42. Поглощение меченных ФИТЦ бактерий *Escherichia coli* гемоцитами моллюска *Biomphalaria glabrata* (А–Б). А — гистограмма поглощения бактерий *E. coli*, Б — фагоцитоз бактерий *E. coli*.

В случае изучения *in vitro* анализ гемолимфы проводили через 30 мин и 1 час после начала инкубации. Во всех случаях флуоресцирующие структуры были обнаружены в цитоплазме гранулоцитов (Рис. 43, 44).

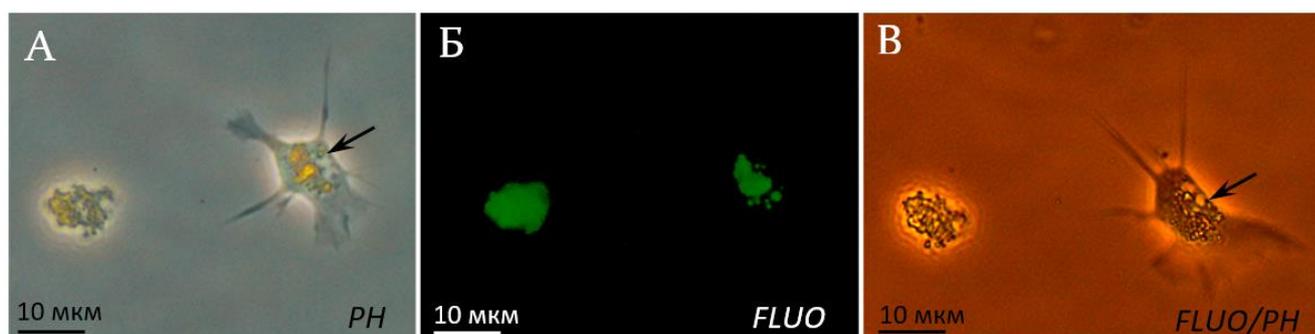


Рисунок 43. Гемоциты *Biomphalaria glabrata*, инкубированные *in vitro* с бактериями *Staphylococcus aureus* через 30 минут. FLUO — съемка в режиме флуоресценции; PH — съемка в режиме фазового контраста; FLUO/PH — съемка в совмещенном режиме. Стрелками обозначены вакуоли с фагоцитированными бактериями.

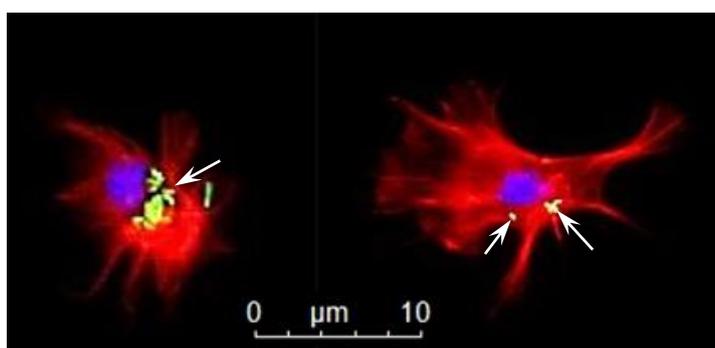


Рисунок 44. Гемоциты *Biomphalaria glabrata*, инкубированные *in vitro* с бактериями *Escherichia coli* через 30 минут. Фотографирование в режиме флуоресценции. Стрелками обозначены вакуоли с фагоцитированными бактериями.

3.3.3. Инкапсуляция

Трематодная инвазия. 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*.

Первые признаки проявления защитной реакции со стороны моллюска наблюдаются уже на начальном этапе заражения – вскоре после пенетрации мирацидия (Рис. 45).

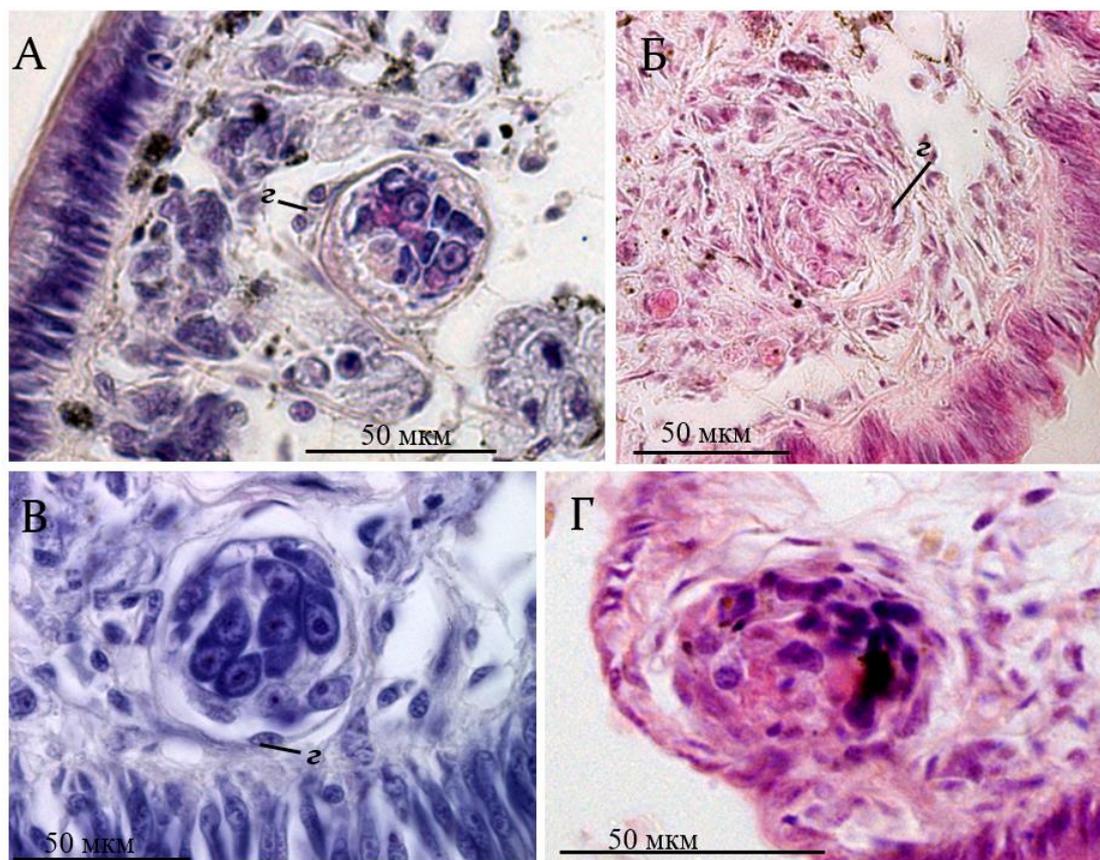


Рисунок 45. Первичная реакция гемоцитов моллюсков на инвазию партенитами трематод (А–Г). А, Б — *Biomphalaria pfeifferi* (зараженных *Echinostoma caproni*), В — *B. glabrata* (*Schistosoma mansoni*), Г — *Lymnaea truncatula* (*Fasciola hepatica*).

Проявляется она в концентрации гемоцитов моллюсков вокруг спороцисты. Данные агглютинации составляют клетки, мигрирующие из синусов, пронизывающих близлежащие ткани. Активизация АПО – относительно долгий процесс (см. с. 69), и заметно количество циркулирующих гемоцитов увеличивается только к концу первых суток п. з. Соответственно, в первые часы мы можем наблюдать «локальный очаг», сходный с реакцией моллюска на любое повреждение (см. с. 96).

Именно от степени концентрации таких «очаговых» гемоцитов вокруг паразита зависит возможность его ликвидации уже во время периода покоя (времени метаморфоза мирацидия в материнскую спороцисту – продолжается 3–6 часов п.з.). Важно подчеркнуть, 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 на этой стадии. Также стоит отметить, что характер **первичной реакции** гемоцитов в большей степени зависит от места внедрения чужеродного объекта, нежели от его природы. Наиболее выражена она в случае локализации паразита в рыхлых паренхиматозных тканях вблизи кровеносных сосудов и синусов. Уже в течение нескольких часов после заражения (Рис. 46) наблюдается инфильтрация окружающих тканей многочисленными гемоцитами. Первые из них могут оседать на поверхности материнских спороцист, однако чаще между тегументом последних и гемоцитами заметен небольшой просвет. Постепенно вокруг партенит формируется капсула, образованная слоями (количество достигает пяти) уплощенных гранулоцитов.

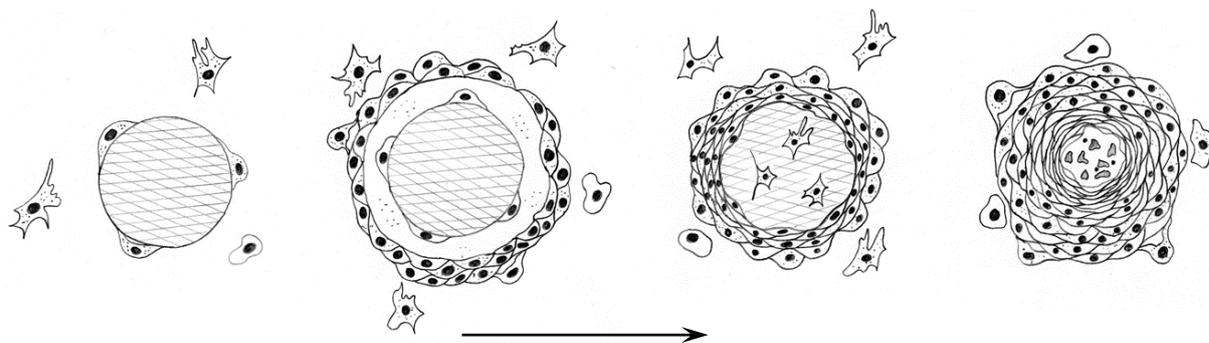


Рисунок 46. Схема инкапсуляции чужеродного объекта гемоцитами моллюска (пояснения в тексте).

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 (*Lymnaea*

truncatula – *Fasciola hepatica*, *Biomphalaria glabrata* – *Schistosoma mansoni*) капсула далее не развивается, а в ряде случаев происходит её постепенная разборка.

(2) при наличии в развитии партенит миграции к месту постоянной локализации в других частях тела моллюска (сердце, гепатопанкреас, гонада и др.) спороцисты после завершения метаморфоза начинают движение и, как правило, освобождаются от инкапсуляции (*Biomphalaria glabrata* / *B. pfeifferi* – *Echinostoma caproni*).

(3) в случае развития паразита в резистентном по отношению к нему моллюске возможно подавление развития в районе пенетрации мирацидия.

Более детально клеточная реакция моллюска, приводящая не только к изоляции, но и разрушению паразита изучена для модели *Echinostoma caproni* – *Biomphalaria glabrata* (резистентной линии). Для контроля использовались данные о клеточной реакции на партенит *Echinostoma caproni caproni* в моллюсках *Biomphalaria glabrata* чувствительной линии (Ataev, Coustau, 1999).

Первые спороцисты *Echinostoma caproni* достигают области сердца моллюска примерно через 30–40 часов п.з. (Рис. 47). К концу вторых суток большинство спороцист уже завершают миграцию.

Однако выявлена некоторая особенность в локализации спороцист в моллюсках резистентной линии. Кроме желудочка сердца и проксимальной части главной аорты, в резистентных моллюсках местом их поселения может стать полость перикарда. При заражении моллюсков по десять мирацидиев количество спороцист, способных завершить миграцию, в среднем составляет 4–6, а в отдельных случаях может достигать 9 и даже 10 особей.

Двухдневные спороцисты по своим размерам и общему развитию, в целом, соответствуют спороцистам этого возраста, развивающимся в чувствительных моллюсках. Уже на этом этапе развития инвазии хорошо заметны признаки первичной клеточной реакции биомфаларий на паразитов. Вокруг спороцист находится большое количество гемоцитов, часть из которых уже дегенерирует.



Рисунок 47. Гистологический срез через сердце моллюска *Biomphalaria glabrata* резистентной линии, зараженного *Echinostoma caproni* (1 день п.з.). Стрелкой обозначен АПО.

Интенсивное увеличение скоплений гемоцитов зачастую приводит к значительному сокращению просвета желудочка и аорты. Но настоящей инкапсуляции спорцисты пока не наблюдается. Лишь на поверхности некоторых из них обнаруживаются единичные клетки (Рис. 46, 49).

Через 3 дня п.з. развитие клеточной реакции приводит к инкапсуляции большинства спорцист, поселившихся в желудочке и аорте. Здесь принимают участие многочисленные гемоциты, образованные после активации АПО (вторичная реакция). Сначала между поверхностью спорцисты и стенкой капсулы остается небольшой просвет (Рис. 48 А), а затем наблюдается полная инкапсуляция партенит (Рис. 48 Б).

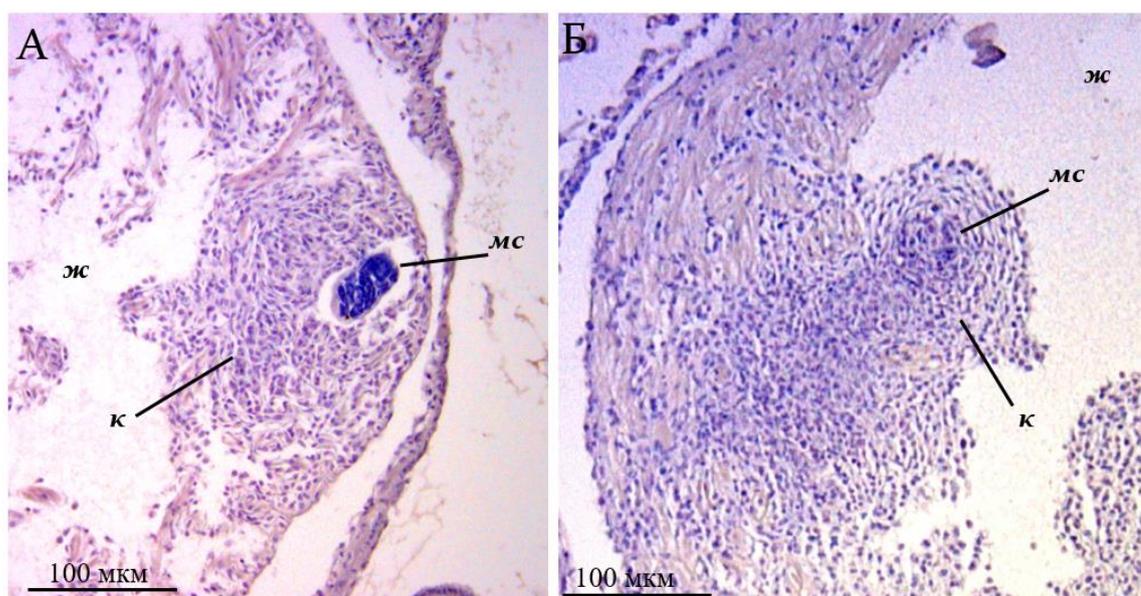


Рисунок 48. Инкапсуляция спороцисты *Echinostoma caproni* в моллюсках *Biomphalaria glabrata* резистентной линии (А–Б). А — через 3 дня п.з., Б — через 5 дней п.з.

В этом случае покровы спороцисты разрушаются и гемоциты проникают внутрь ее тела. Очевидно, процесс разрушения происходит очень быстро. Об этом свидетельствуют случаи концентрации гемоцитов вокруг остатков спороцист, представленных скоплениями дезинтегрированных, резорбирующихся клеток. Между ними расположены многочисленные, в основном дегенерирующие и мертвые гемоциты. Но миграция новых гемоцитов не прекращается. В результате, останки спороцист и группы погибающих клеток гемолимфы изолируются внутри капсулы, диаметр которой достигает 400–700 мкм. В капсуле четко выделяются две зоны (ранее показанные Ataev, Coustau, 1999): в центре – (1) зона дегенерирующих и мертвых клеток, а по периферии – (2) зона молодых активных клеток.

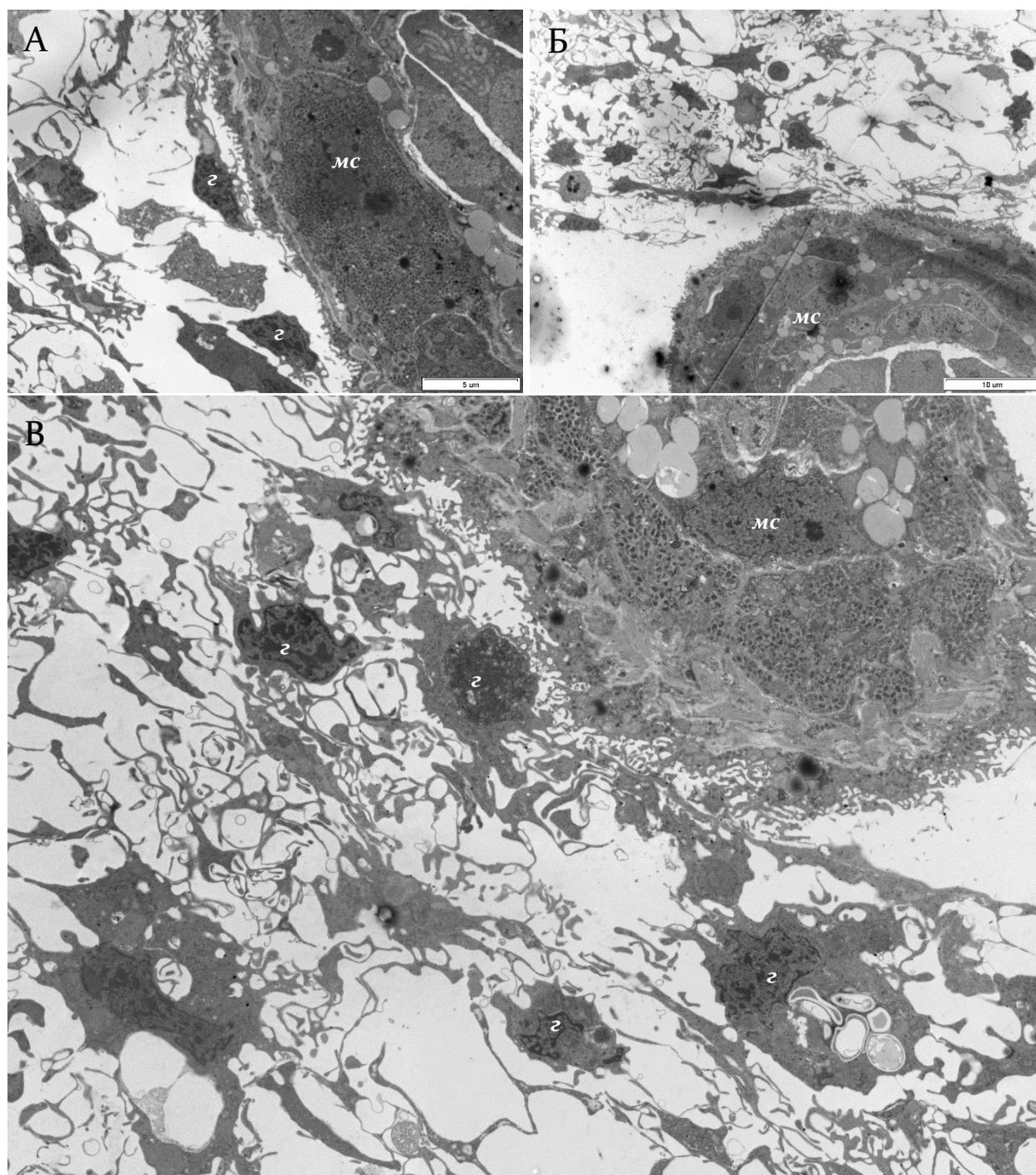


Рисунок 49. Электронная микрофотография гемоцитов на поверхности материнской спороцисты *Echinostoma caproni*, расположенной в сердце моллюска *Biomphalaria glabrata*.

Для моллюсков *B. pfeifferi*, зараженных трематодами *Schistosoma mansoni* Сенегальского штамма, отмечено проявление природной резистентности по отношению к паразиту (Рис. 50). Вокруг материнских спороцист через сутки п. з. происходит формирование многослойной капсулы. При этом активации АПО не

происходит (см. с. 70), что свидетельствует о способности к подавлению инвазии уже на стадии первичной реакции.

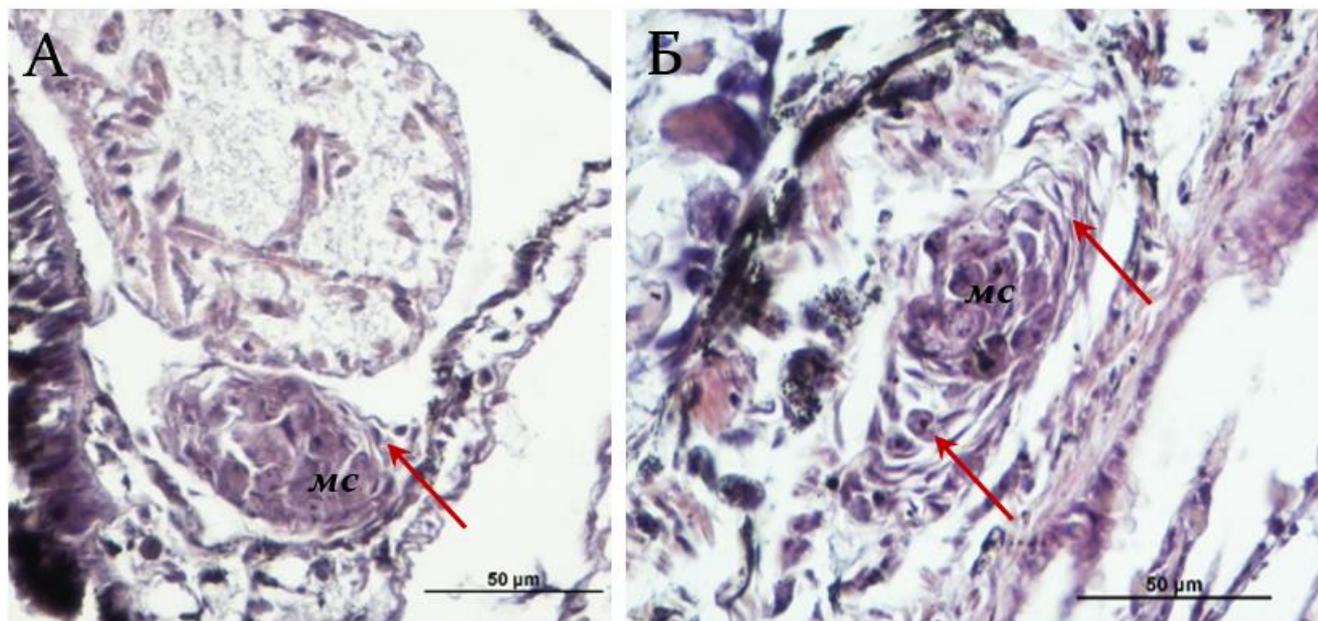


Рисунок 50. Первичная реакция гемоцитов моллюсков на инвазию *Schistosoma mansoni* в *Biomphalaria pfeifferi*. Стрелками обозначена гемоцитарная капсула.

Метацеркарии. Клеточная реакция *Planorbarius corneus* изучалась также в ответ на заражение метацеркариями *Echinostoma spiniferum*. В основном метацеркарии располагались в районе мантии, полости перикарда и почки моллюсков. Первичная реакция гемоцитов протекала также, как и в случае проникновения партенит – вокруг цист наблюдалось скопление гемоцитов, часть из которых прикреплялась к покровам метацеркарий.

В дальнейшем вокруг метацеркарий постепенно формируется всё более плотная капсула, количество слоёв гемоцитов в которой достигает 5–6. (Рис. 51). Многие цисты выглядели дегенерирующими. Мы не изучали развитие метацеркарий *Echinostoma spiniferum*, однако предполагаем, что срок их жизнеспособности, как и у других эхиностомных видов ограничен несколькими неделями (Атаев, 2010).



Рисунок 51. Клеточная реакция моллюсков *Planorbarius corneus* на метациркарый *Echinostoma spiniferum*.

Ксенотрансплантат. Реакция на ксенотрансплантат изучалась при введении фрагмента вибриссы кошки под эпителий ноги моллюсков *Planorbarius corneus* и *Biomphalaria glabrata*. Гистологический анализ показал, что через сутки после введения трансплантата вокруг него наблюдается хорошо заметное скопление гемоцитов (Рис. 52, 53). На поверхности волоска располагаются распластаные гемоциты (вероятно, гранулоциты), образуя 1–2 слоя (Рис. 52 Б, В, Д; 53 В, Д). Сам трансплантат находится в канале, образованном в ткани моллюска инъекционной иглой (Рис. 52 А–В; 53 В–Д). В течение суток после инъекции этот канал отчетливо прослеживается на всём протяжении введения иглы. Его стенка также купирована слоями (от 5 до 15) уплощенных гемоцитов. Максимальная толщина стенки капсулы составляет 48 мкм.

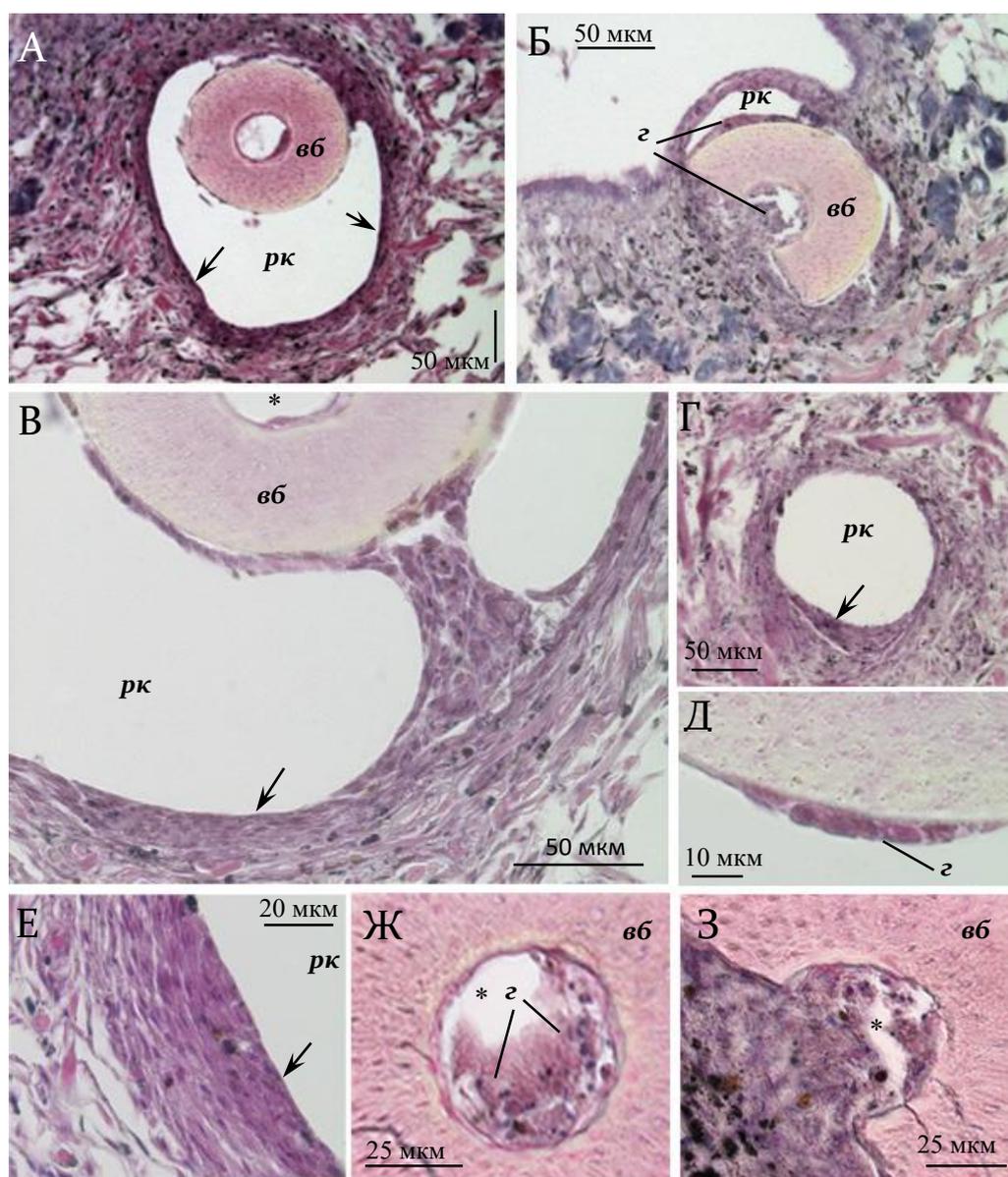


Рисунок 52. Гемоцитарная реакция моллюска *Planorbarius corneus* через 1 сутки после введения ксенотрансплантата (вибрисса кошки) (А–З). А — срез через середину трансплантата, Б — срез через проксимальную часть трансплантата (со стороны подошвы моллюска), В — заполнение раневого канала гемоцитами, Г — дистальная часть раневого канала; Д — распластывание гемоцитов на поверхности вибриссы, Е — многослойная стенка раневого канала, Ж–З — заполнение сердцевин ксенотрансплантата (вибрисса) гемоцитами моллюска. Стрелками обозначена гемоцитарная капсула, звездочкой – сердцевина вибриссы.

Интересно проникновение гемоцитов в полость сердцевинной части волоска. Наиболее многочисленны они со стороны входа в полость (Рис. 52 Ж, З; 53 Е). В

основном в этих скоплениях присутствуют гранулоциты, обладающие хорошо заметными псевдоподиями (Рис. 52 3; 53 3).

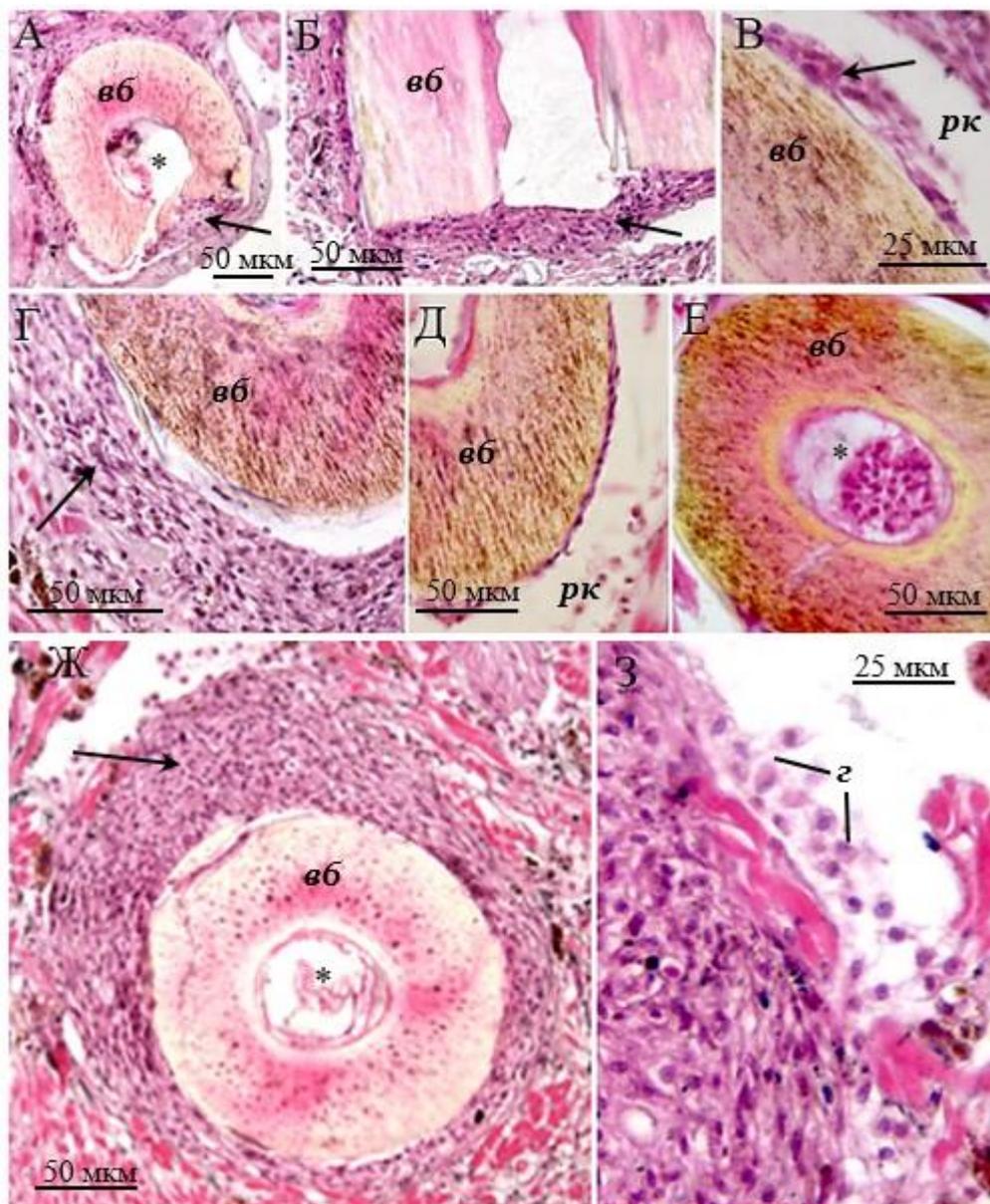


Рисунок 53. Гемоцитарная реакция моллюска *Biomphalaria glabrata* через 1 сутки (А–Е) и 3 суток (Ж–З) после введения ксенотрансплантата (вибрисса кошки). Стрелками обозначена гемоцитарная капсула, звездочкой – сердцевина вибриссы.

Таким образом, на срезе отчетливо видны два концентрических скопления гемоцитов: одно непосредственно на поверхности трансплантата, а другое выстилает раневой канал со стороны окружающих тканей моллюска. Между ними остаётся широкий просвет, в котором наблюдаются лишь отдельные клетки. В то

же время ближе к дистальному участку введенного трансплантата со стороны стенки раневого канала образуется скопление гемоцитов, достигающее поверхности волоска и окружающее его несколькими слоями (Рис. 52, 53). Составляющие это скопление клетки характеризуются хорошо заметными псевдоподиями, свидетельствующими об их подвижности. Можно предположить, что в дальнейшем это скопление увеличилось бы в размерах и постепенно заполнило весь просвет раневого канала, надёжно изолировав ксенотрансплантат от окружающих тканей.

Выше отмечалось, что гемоциты моллюсков *Planorbarius corneus* представлены гранулоцитами и гиалиноцитами. Во время инкубации участка вибрисса во влажной камере с гемолимфой *in vitro* наблюдается постепенное налипание и распластывание гемоцитов на волосе (Рис. 54). По морфологии и размерам клетки адгезирующие на поверхности вибрисса напоминают гранулоциты.

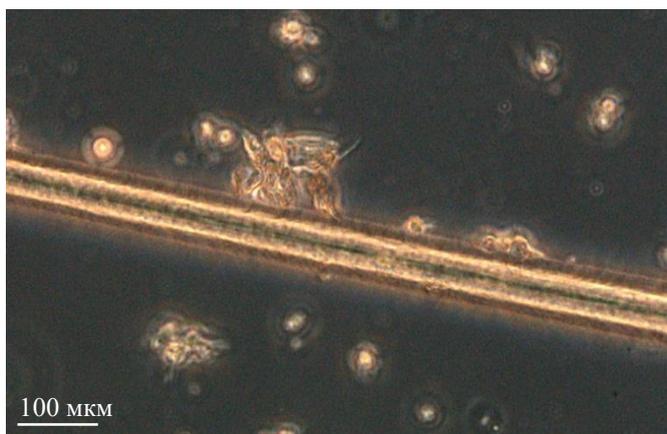


Рисунок 54. Оседание гемоцитов на вибрисс при инкубировании в гемолимфе *Planorbarius corneus*.

3.3.4. Агглютинации

Через 5 дней п.з. моллюсков трематодами, в следствие активации гемопоэза, происходит значительное увеличение в циркуляции количества гемоцитов, которые скапливаются в перикардиальной полости. Зачастую это приводит к формированию своеобразной выстилки толщиной 25–100 мкм, которая покрывает большую часть внутренней поверхности стенок перикарда и наружной

поверхности стенки желудочка (Рис. 55). В полости перикарда может находиться также до 10 округлых агглютинаций.

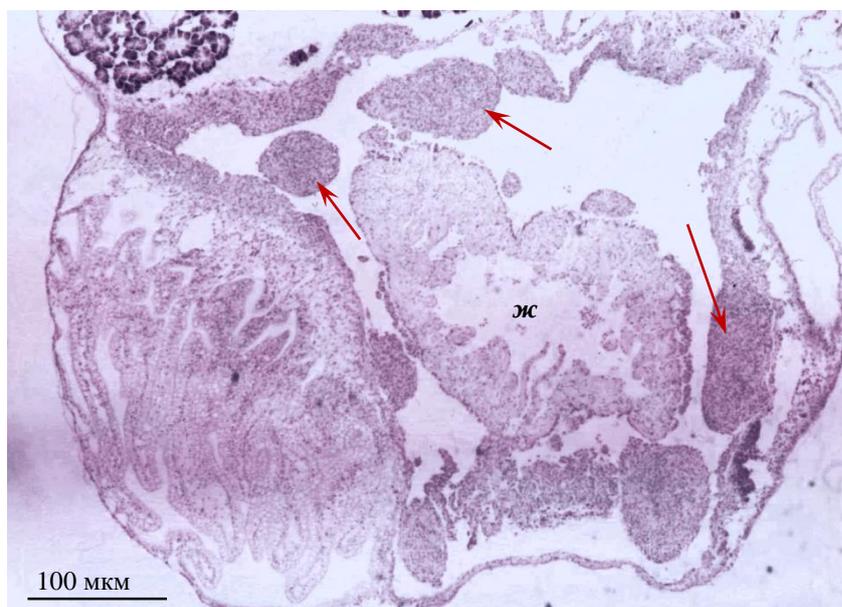


Рисунок 55. Гистологический срез через сердце моллюска *Biomphalaria glabrata* резистентной линии, зараженного *Echinostoma caproni* (5 дней п.з.). Стрелками обозначены агглютинации гемоцитов.

В некоторых случаях происходит формирование скоплений гемоцитов вокруг трематод, не приводящее к гибели паразитов (Рис. 56).

К 10 дню п.з. интенсивный приток новых гемоцитов завершается. В моллюсках еще сохраняется большое число агглютинаций, но в них уже не удастся обнаружить даже следов пребывания спороцист. В дальнейшем наблюдается интенсивное разрушение всех форм агглютинаций и на 13–15 день п.з. на гистологических препаратах не удаётся обнаружить последствий инвазии.

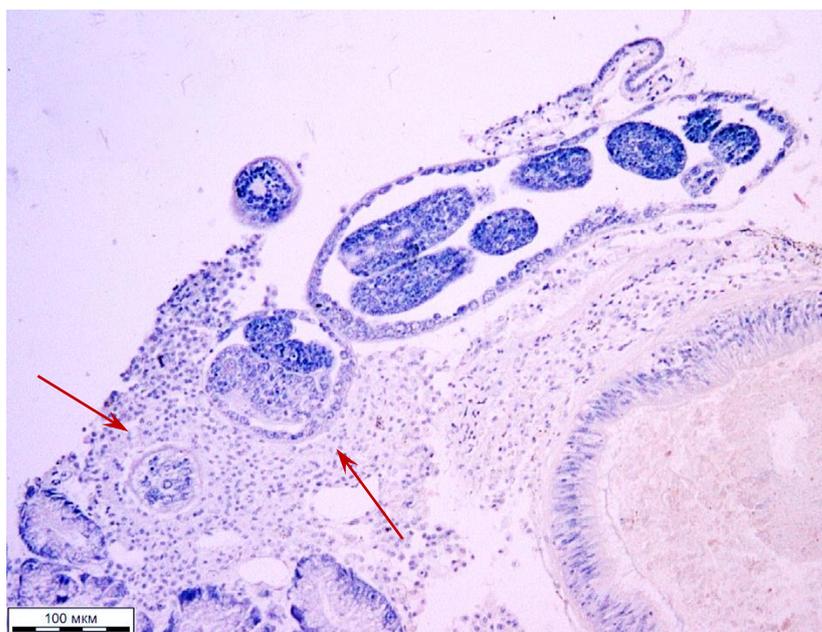


Рисунок 56. Гистологический срез через сердце моллюска *Biomphalaria glabrata* резистентной линии, зараженного *Echinostoma caproni* (5 дней п.з.). Стрелками обозначены агглютинации гемоцитов.

3.3.5. Мантия вокруг спороцист

Тело спороцист *Leucochloridium paradoxum* представляет собой разветвленный стolon, который с помощью трубчатых участков соединен со зрелыми отростками, окрашенными в зеленый цвет (Рис. 57).

С помощью СЭМ на поверхности спороцисты, развивающейся в гемоцеле моллюска *Succinea putris*, обнаружена мантия, ранее у партенит семейства Brachylaemidae не описанная. В центральной части stolона спороцисты она представлена гемоцитами моллюсков, распластывающимися по поверхности паразита (Рис. 58 Б).

При этом хорошо заметны ядра этих клеток и псевдоподии. Сама мантия здесь рыхлая, в ней заметны многочисленные отверстия, через которые видна складчатая поверхность тегумента спороцисты. На поверхности трубчатых участков и отростков мантия представляет собой сплошной тонкий слой, ядра образующих её гемоцитов не заметны (Рис. 58 А).



Рисунок 57. Спороциста *Leucochloridium paradoxum*.

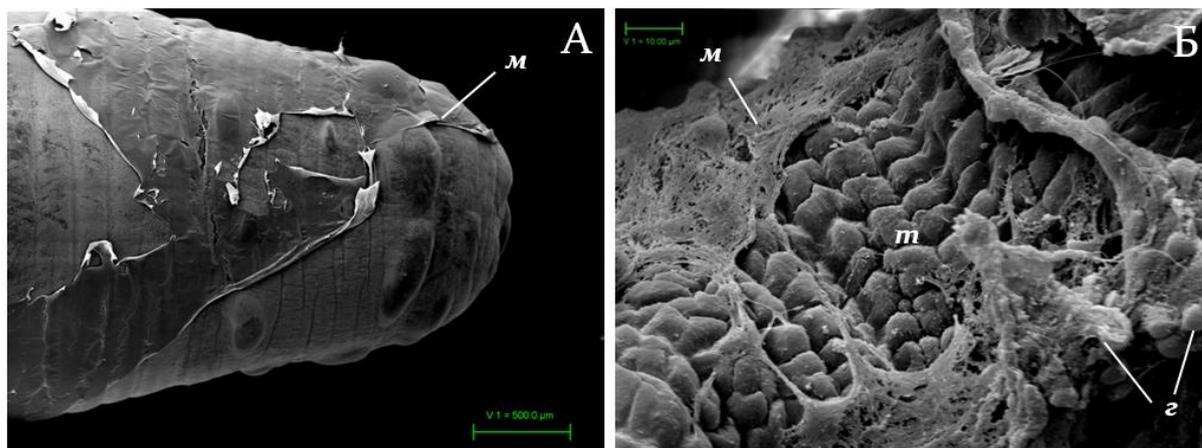


Рисунок 58. Микрофотографии (СЭМ) спороцисты *Leucochloridium paradoxum* (А–Б). А — зрелый отросток, Б — столон спороцисты.

Однако они хорошо видны на гистологических срезах (Рис. 59), а также на тотальных препаратах, окрашенных флуоресцентным красителем Hoechst 33342 (Рис. 60).

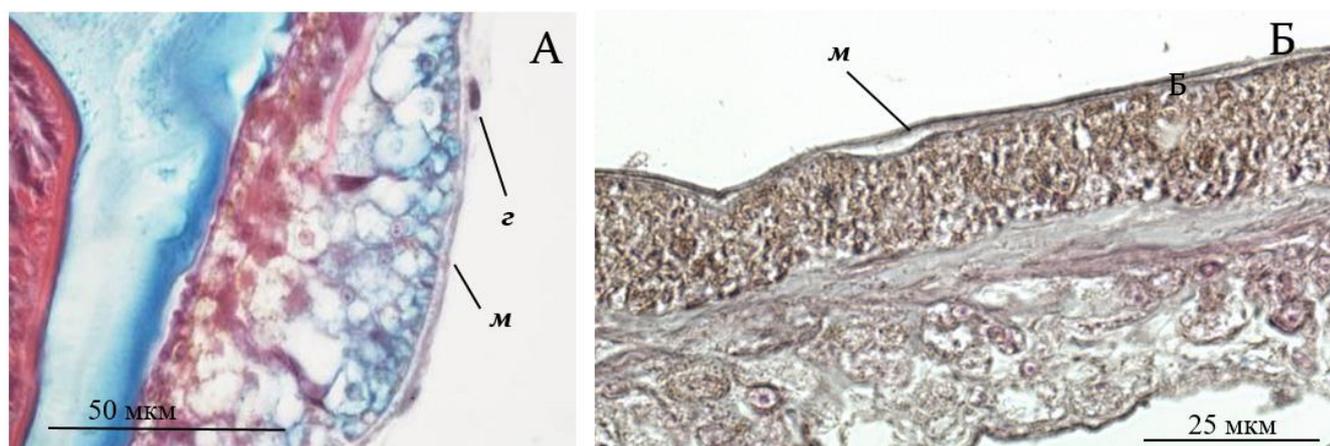


Рисунок 59. Гистологические срезы через отросток спороцисты *Leucochloridium paradoxum* (А–Б). А — окрашивание альциановым синим, Б — окрашивание гематоксилином Эрлиха).

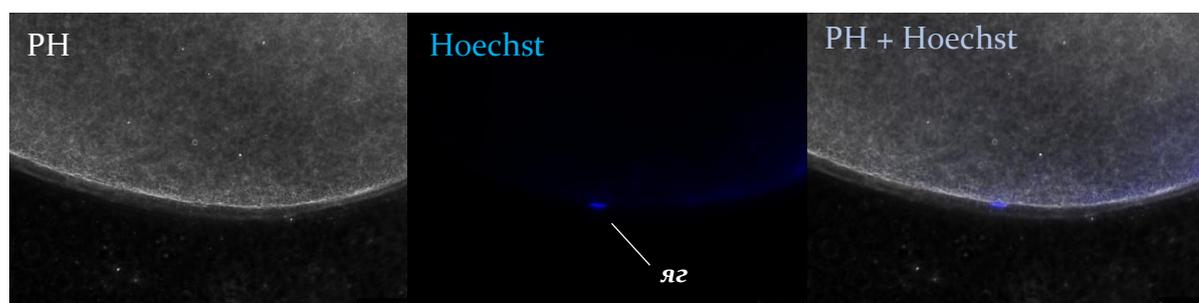


Рисунок 60. Мантия на поверхности отростка спороцисты *Leucochloridium paradoxum*.

3.3.6. Обсуждение к разделу «Функциональная активность гемоцитов»

И. И. Мечников еще в конце XIX века показал роль клеток в осуществлении иммунных реакций. Он впервые установил, что в основе защитных клеточных реакций лежит фагоцитарная активность клеток, для которой обычно не требуется специфичности. Выше отмечалось, что фагоцитоз является универсальным свойством циркулирующих клеток гемолимфы пульмонат (Tripp, 1961; Cheng, Galloway, 1970; Sminia, 1972; Bang, 1975; Anderson, 1977; Купер, 1980; Прохорова и др., 2010; Ataev et al., 2016 и др.). Нам удалось подтвердить фагоцитарную активность гемоцитов экспериментально с использованием бактерий *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, меченых ФИТЦ. Было показано, что гемоциты

Biomphalaria glabrata способны в равной степени фагоцитировать бактерий. Эти данные согласуются с полученными ранее (Прохорова, 2009; Ataev et al., 2016).

Инородные тела, которые элиминируются фагоцитозом, имеют очень маленький размер по сравнению с гемоцитами моллюсков, ответственными за выполнение этой функции. Тела большего размера не могут быть фагоцитированы отдельными клетками, они изолируются большим количеством гемоцитов с образованием капсул.

На протяжении многих десятилетий основной моделью для изучения иммунных, в том числе, клеточных реакций лёгочных моллюсков является *Biomphalaria glabrata*. Многократно проводились эксперименты по их иммунизации разнообразными факторами, среди которых использовались различные виды трематод, бактерии, инъекции белка и др. (Rifkin et al., 1969; Cheng, Rifkin, 1970; Harris, 1975; Yoshino, 1976; Krupa et al., 1977; Cheng, Garrabrant, 1977; Kassim, Richards, 1979; Loker et al., 1982; Ataev, Coustau, 1999).

Именно на биомфалариях впервые было отмечено, что популяции моллюсков могут различаться по ответу на инвазию. Эти природные отличия были селективно закреплены в лабораторных линиях моллюсков – чувствительных и резистентных по отношению к трематодной инвазии видами *Schistosoma mansoni*, *Echinostoma caproni* и др. (Newton, 1953, 1955; Richards, 1970; Richards, Shade, 1987).

Полученные нами результаты в целом подтвердили сходный характер протекания клеточной реакции на иммунизацию различными факторами. В частности, были рассмотрены механизмы развития защитных реакций пульмонат на трематодную инвазию. Вскоре после пенетрации вокруг паразитов скапливаются гемоциты из близлежащих тканей (включая синусы кровеносной системы). Однако у биомфаларий чувствительной линии на момент заражения имеющегося количества гемоцитов недостаточно для купирования инвазии. У биомфаларий резистентной линии еще до активации АПО эти скопления могут преобразовываться в капсулы в месте проникновения паразита (нога, мантия). Такой феномен описан ранее как **первичная реакция** (см. с. 83).

Итак, уже на начальном этапе заражения партениты привлекают к себе гемоциты моллюсков. Однако, как правило, материнские спороцисты успевают завершить метаморфоз и приступить к миграции раньше, чем вокруг них сформируются настоящие капсулы.

Нам не удавалось наблюдать устранение паразита из моллюска, как это происходит при попытке заражения резистентных *Biomphalaria glabrata* партенитами *Echinostoma lindoense* (Lie, Heuneman, 1975b; 1976). По данным этих авторов, имеется три способа предотвращения инвазии: (1) инкапсуляция амебоцитами и последующее разрушение спороцист; (2) удаление МС через эпителий после инкапсуляции в субэпителиальном слое; (3) препятствие проникновению паразита в субэпителиальный слой с помощью образования в последнем мощного скопления гемоцитов.

Мы косвенно подтвердили действие только первого из описанных механизмов, блокирующих развитие МС на самых ранних стадиях их пребывания в моллюске. Остальные варианты не были отмечены ни нами, ни другими авторами, изучающими развитие различных эхиностом. Однако при экспериментальной иммунизации (введение ксенотрансплантата) мы наблюдаем увеличение количества гемоцитов в субэпителиальном слое. Эти гемоциты образуют плотное скопление, которое «выдавливает» чужеродный объект из организма хозяина. В дальнейшем происходит разборка гемоцитарной агглютинации.

Случаев скопления гемоцитов вблизи мигрирующих спороцист *Echinostoma caproni* нами не зарегистрировано. Очевидно, этому препятствует достаточно высокая скорость их передвижения. В результате паразит способен преодолеть первичный барьер защитной реакции и мигрировать к месту своей окончательной локализации.

Именно здесь развивается **вторичная реакция**, в которой принимают участие многочисленные гемоциты образованные в результате активации АПО. В резистентных моллюсках этот процесс начинается уже через несколько часов, однако только через сутки п.з. концентрация циркулирующих клеток гемолимфы

становится достаточной для формирования капсулы. Последняя уже надёжно изолирует партенит трематод и блокирует их движение. После этого внутри капсулы изолировано от окружающих тканей моллюска происходит разрушение паразита.

Процесс инкапсуляции в ряде случаев завершается дегенерацией отдельных МС уже на второй день с начала заражения, но тотальное разрушение партенит наблюдалось только на 3–4-ые сутки п.з. Механизм инкапсуляции в биомфалариях резистентной линии отработан настолько, что уже через 7 – 10 дней п.з. не только погибают трематоды и разрушаются их ткани, но и бесследно исчезают все формы агглютинаций гемоцитов. При этом активность АПО возвращается в исходное состояние.

Изучение клеточного иммунного ответа моллюсков *Biomphalaria pfeifferi*, *Lymnaea truncatula* показало сходный с *Biomphalaria glabrata* характер протекания защитных реакций при заражении трематодами *Echinostoma caproni* и *Fasciola hepatica* соответственно. Клеточный ответ, наблюдаемый в *Biomphalaria pfeifferi*, протекает аналогично описанному для моллюсков *B. glabrata* чувствительной линии. Здесь также наблюдается первичная реакция на МС, как правило, неспособная привести к гибели паразита. Исключением может стать случай пенетрации мирацидия в ткани моллюска-хозяина, откуда затруднена миграция к месту окончательного поселения (Атаев, Coustau, 1999).

После завершения миграции в непосредственной близости от спороцисты образуются крупные агглютинации гемоцитов, однако случаев формирования ими капсулы в биомфалариях чувствительной линии не зарегистрировано.

По мнению многих авторов в инкапсуляции инородных тел, включая партенит трематод, принимает участие только один тип гемоцитов – гранулоциты (Sminia et al., 1974; Harris, 1975; Cheng, Garrabrant, 1977; Krupa et al., 1977; Venex, Jacobelli, 1980; Loker et al., 1982). Эти авторы наблюдали хорошо сформированные капсулы, где гранулоциты располагаются одинаковым образом: они распластываются и образуют концентрические слои удлинённых клеток.

Нам также удалось наблюдать подобное распределение гемоцитов в стенке капсулы, образуемой вокруг партенит трематод. Отличительной особенностью зрелой капсулы является её зональность (Ataev, Coustau, 1999). В центре такой капсулы располагаются дегенерирующие и мертвые клетки, а по периферии находятся молодые активные клетки. Благодаря такому распределению процесс разрушения паразита протекает изолировано от окружающих тканей моллюска. При этом на начальных этапах инкапсуляции вблизи чужеродного фактора наблюдается концентрация как гранулоцитов, так и гиалиноцитов.

Есть данные, что клетки способны производить различный материал в зависимости от характера элементов для инкапсуляции. Так, Харрис (Harris, 1975) обнаружил, что гранулоциты *Biomphalaria glabrata* секретируют гранулы и плотные везикулы, которые располагаются на поверхности гранулоцитов при инкапсуляции нематод. Крупа с коллегами (Krupa et al., 1977) отмечали, что гранулоциты *Bulinus guernei* производят внутри- и внеклеточные микрофиламенты, в то время как Сминия (Sminia et al., 1974) утверждали, что амебоциты моллюсков *Lymnaea stagnalis* синтезируют вещество, похожее на коллаген, при инкапсуляции фрагментов синтетической губки (Sminia et al., 1974).

При анализе зрелой капсулы нам, также, как и Локеру с соавторами (Loker et al., 1982), не удалось увидеть никаких элементов внеклеточного материала, похожего на микрофиламенты и коллаген. Клетки стенки капсулы при этом очень распластаны и сплюснуты, а межклеточное пространство очень редуцировано. Очевидно, косвенным доказательством отсутствия фиброзного материала в стенке капсулы является факт быстрой разборки всех форм гемоцитарных агглютинаций (включая капсулы).

Формирование капсул было зарегистрировано также вокруг метацеркарий *Echinostoma spiniferum* в моллюсках *Planorbarius corneus*. Вскоре после инцистирования церкарий вокруг образовавшихся метацеркарий наблюдается скопление гемоцитов. Гемоциты окружают их 5–6-ю слоями, однако это не препятствует развитию паразита. Тем не менее, эти инкапсуляции сохраняются вплоть до естественной гибели метацеркарий (около месяца п.з.). Вероятно, эти

капсулы призваны изолировать метацеркарий, чтобы после гибели последних защитить внутреннюю среду моллюска от последствий дегенерации тканей паразита.

В специфичных паразито-хозяйных системах инкапсуляции партенит трематод после завершения их миграции не происходит. В непосредственной близости от спороцист образуются крупные агглютинации гемоцитов, но они не влияют на развитие паразита и в дальнейшем разбираются.

В ходе изучения клеточной реакции моллюсков на различные фазы развития трематод мы столкнулись с явлением мало обсуждаемым в сравнительно-иммунологической литературе. Речь идёт о так называемых мантиях – образованиях, возникающих вокруг паразита в результате извращения защитной реакции хозяина. Мантия представляет собой крайне специализированный вариант инкапсуляции, при котором вокруг паразита образуется плотная капсула, клетки которой плотно прилегают к его поверхности. При этом партениты трематод (показаны в основном для спороцист семейства плагиорхиид, – см.: Галактионов, Добровольский, 1998) остаются не только жизнеспособными, но и развиваются, формируют многочисленное потомство. Кроме того, мантия надёжно укрывает их от гуморальных реакций моллюсков, не препятствуя их контакту с трофическими ресурсами хозяина (тонкие выросты гликокаликса тегумента прорастают насквозь стенку мантии).

Нам впервые удалось обнаружить вокруг спороцист *Leucochloridium paradoxum*, развивающихся в моллюсках *Succinea putris*, формирование мантии (см. с. 94). Последняя сплошным слоем покрывает только зрелые отростки и трубчатые участки спороцисты. При этом центральная часть столона покрыта рыхлым слоем распластанных гемоцитов. Очевидно, через щели между их отростками осуществляется контакт партенит с гемоцелом моллюска-хозяина.

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, тем не менее в гемолимфе, как правило, преобладают гранулоциты. 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 моллюсков. 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 мирацидия с помощью мощного скопления гемоцитов вблизи эпителия (Lie, Heyneman, 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 др. органам хозяина. Здесь возможно несколько основных вариантов поведения гемоцитов, мультимпликация 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 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-хозяйинных 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 агглютинации 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 агглютинации 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.

Отмеченные основные типы проявления иммунных реакций, сопряженные 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 легочных 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 легочных 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. 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 ее поверхности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акрамовский, Н. Н. Фауна Армянской ССР. Моллюски / Н. Н. Акрамовский. – Ереван: Издательство Академии наук Армянской ССР, 1976. – 272 с.
2. Алякринская, И. О. Количественная характеристика гемолимфы и гемоглобина роговой катушки *Planorbis corneus* (Gastropoda, Pulmonata) / И. О. Алякринская // Зоологический журнал. – 1970. – Т. 69, N. 3. – С. 349–353.
3. Атаев, Г. Л. Развитие партенит трематод: автореф. дис. ... докт. биол. наук / Атаев Геннадий Леонидович. СПб: СПбГУ, 2000. – 34 с.
4. Атаев, Г. Л. Защитные реакции брюхоногих моллюсков: 1. Клеточные реакции / Г. Л. Атаев, А. В. Полевщиков // Паразитология. – 2004. – Т. 38, N. 4. – С. 342–351.
5. Атаев, Г. Л. Защитные реакции моллюсков семейства Planorbidae (Gastropoda, Pulmonata) на трематодную инвазию / Г. Л. Атаев, Е. Е. Прохорова // Известия Российского государственного педагогического университета им. А. И. Герцена. – 2010. – N. 122. – С. 91–107.
6. Атаев, Г. Л. Изменения в амeboцито–продуцирующем органе моллюсков *Biomphalaria glabrata* при заражении трематодами *Echinostoma caproni* / Г. Л. Атаев, Е. Е. Прохорова // Паразитология. – 2013. – Т. 47, N. 6. – С. 472–479.
7. Властов, В. В. Руководство по зоологии. Т. 2. Беспозвоночные, кольчатые черви, моллюски / В. В. Властов, Н. Н. Кондаков, Н. А. Ливанов. – М.: Л.: Изд-во АН СССР, 1940. – 683 с.
8. Галактионов, В. Г. Эволюционная иммунология / В. Г. Галактионов. М.: Академкнига, 2005. – 408с.
9. Галактионов, К. В. Происхождение и эволюция жизненных циклов трематод / К. В. Галактионов, А. А. Добровольский. – СПб.: Наука, 1998. – 404 с.
10. Галкин, А. К. Клеточные и тканевые защитные реакции моллюска *Ooeretus corneus* на поселение спороцист *Astiotrema trituri* / А. К. Галкин // II Всесоюзный симпозиум по болезням и паразитам водных беспозвоночных: сб. науч. тр. – Л., 1976. – С. 14–15.

11. Гинецинская, Т. А. Локализация фермента сукцинатдегидрогеназы и запасных питательных веществ в теле партенит и личинок трематод / Т. А. Гинецинская, Б. И. Хари // Экологическая и экспериментальная паразитология. – 1975. – Т. 1. – С. 108–124.
12. Горышина, Е. Н. Сравнительная гистология тканей внутренней среды с основами иммунологии: учебное пособие / Е. Н. Горышина, О. Ю. Чага; под ред А. А. Заварзина. – Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1990. – 320 с.
13. Добровольский, А. А. Жизненный цикл *Haplometra cylindracea* Zeder 1800 (Trematoda, Plagiorchiidae) / А. А. Добровольский, А. С. Райхель // Вестник Ленинградского университета. – 1973. – № 3. – С. 5–13.
14. Земсков, В. М. Фагоцитоз: физиологические и молекулярные аспекты / В. М. Земсков // Успехи современной биологии. – 1972. – Т. 98, N. 2. – С. 1–20.
15. Купер, Э. Сравнительная иммунология / Э. Купер. – М.: Мир, 1980. – 422 с.
16. Пигаревский, В. Е. Зернистые лейкоциты и их свойства / В. Е. Пигаревский. – М.: Медицина, 1978. – 128 с.
17. Пирс, Э. Гистохимия. Теоретическая и прикладная / Э. Пирс. – М.: Иностранная литература, 1962. – 962 с.
18. Присный, А. А. Морфофункциональные особенности гемоцитов сухопутных брюхоногих моллюсков / А. А. Присный, Т. А. Пигалева, С. В. Кулько // Фундаментальные исследования. – 2011. – Т. 5. – С. 206–210.
19. Прохорова, Е. Е. Защитные реакции пульмонат (Gastropoda): автореф. дис. ... канд. биол. наук / Прохорова Елена Евгеньевна. СПб: СПбГУ, 2009. – 18 с.
20. Прохорова, Е. Е. Экспрессия генов фактора защитных реакций у моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) при заражении трематодами / Е. Е. Прохорова, Н. В. Цымбаленко, Г. Л. Атаев // Паразитология. – 2010. – Т. 44, N. 4. – С. 310–325.
21. Прохорова, Е. Е. Реакция гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus* на ксенотрансплантат / Е. Е. Прохорова, А. С. Токмакова, Г. Л. Атаев // Паразитология. – 2015. – Т. 49, N. 2. – С. 128–132.

22. Стадниченко, А. П. Патоморфологические изменения клеточных элементов гемолимфы пресноводных легочных и переднежаберных моллюсков при инвазии их партенитами трематод / А. П. Стадниченко, Л. Д. Иваненко, Н. А. Колосенко, А. Б. Бубон, Р. В. Литвинчук // Паразитология. – 1981. – Т. 15, N. 5. – С. 407–413.
23. Abdul-Salam, J. M. *Biomphalaria glabrata* amoebocytes: assay of factors influencing in vitro phagocytosis / J. M. Abdul-Salam, E. H. Michelson // Journal of Invertebrate Pathology. – 1980. – Vol. 36. – P. 52–59.
24. Abolius-Krogis, A. Fluorescence and histochemical studies of the calcification initiating lipofuscin type pigment granules in shell-repair membrane of the snail, *Helix pomatia* / A. Abolius-Krogis // Zeitschrift für Zellforschung Mikroskopische Anatomie. – 1973. – Vol. 142. – P. 205–221.
25. Abolius-Krogis, A. Ultrastructural study of the shell-repair membrane in the snail, *Helix pomatia* L. / A. Abolius-Krogis // Cell and Tissue Research. – 1976. – Vol. 172. – P. 455–476.
26. Accorsi, A. Effects of repeated hemolymph withdrawals on the hemocyte populations and hematopoiesis in *Pomacea canaliculata* / Accorsi A., Ottaviani E., Malagoli D. // Fish and Shellfish Immunology. – 2014. – Vol. 38, N. 1. – P. 56 – 64.
27. Adamowicz, A. Blood cells morphology of the snail helix *Aspersa maxima* (Helicidae) / A. Adamowicz, M. Bolaczek // Zoologica Poloniae. – 2003. – Vol. 48, N. 1–4. – P. 93–101.
28. Adema, C. M. A comparative study of hemocytes from six different snails: morphology and functional aspects / C. M. Adema, R. A. Harris, E. C. van Deutekom–Mulder // Journal of Invertebrate Pathology. – 1992. – Vol.59. – P. 24–32.
29. Adema, C. M. Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* haemocytes: the role of oxygen radicals / C. M. Adema, E. C. van Deutekom–Mulder, W. P. van der Knaap, T. Sminia // Parasitology. – 1994. – Vol. 109, N. 4. – P. 479–485.
30. Adema, C. M. Immunobiology of the relationship of echinostomes with snail intermediate hosts / C. M. Adema, K. K. Sapp, L. A. Hertel, E. S. Loker // Echinostomes as experimental models for biological research. – Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 2000. – P. 149–173.

31. Adema, C. M. A bacterial artificial chromosome library for *Biomphalaria glabrata*, intermediate snail host of *Schistosoma mansoni* / C. M. Adema, M. Z. Luo, B. Hanelt, L. A. Hertel, J. J. Marshall, S. M. Zhang, R. J. DeJong, H. R. Kim, D. Kudrna, R. A. Wing, C. Soderlund, M. Knight, F. A. Lewis, R. L. Caldeira, L. K. Jannotti–Passos, S. Carvalho Odos, E. S. Loker // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. – 2006. – Vol. 101. – P. 167–177.
32. Albrecht, U. Rhogocytes (pore cells) as the site of hemocyanin biosynthesis in the marine gastropod *Haliotis tuberculata* / U. Albrecht, H. Keller, W. Gebauer, J. Markl // *Cell Tissue Reserch*. – 2001. – Vol. 304. – P. 455–462.
33. Anderson, R. S. Opsonic involvement in phagocytosis by mollusk hemocytes / R. S. Anderson, R. A. Good // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1976. – Vol. 27. – P. 57–64.
34. Ataev, G. L. Cellular response to *Echinostoma caproni* infection in *Biomphalaria glabrata* strains selected for susceptibility/ resistance / G. L. Ataev, C. Coustau // *Developmental and Comparative Immunology*. – 1999. – Vol. 23. – P. 187–198.
35. Ataev, G. L. Significance of the amoebocyte–producing organ of *Biomphalaria glabrata* snails (strains selected for susceptibility/resistance) in cellular response to *Echinostoma caproni* mother sporocyst infection / G. L. Ataev, A. A. Dobrovolskij, A. V. Avanssian, C. Coustau // *Bulletin of the Scandinavian Society for Parasitology*. – 2000. – Vol. 10, N. 2. – P. 65–94.
36. Ataev, G. L. The influence of trematode infection on the hemocyte composition in *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) / G. L. Ataev, E. E. Prokhorova, I. V. Kudryavtsev, A. V. Polevshchikov // *Invertebrate Survival Journal*. – 2016. – Vol. 13. – P. 164–171.
37. Bang, F. B. Phagocytosis in invertebrates // In *Invertebrate immunity*, K. Maramorosch, R. E. Shope (Eds) // New–York–London, Academic Press, 1975. – P. 137–151.
38. Bao, Y. A preliminary study on the antibacterial mechanism of *Tegillarca granosa* hemoglobin by derived peptides and peroxidase activity / Y. Bao, J. Wang, C. Li, P. Li, S. Wang, Z. Lin // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2016. – Vol. 51, N. – P. 9–16.

39. Barber, B. J. Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves / B. J. Barber // *Aquatic Living Resources*. – 2004. – Vol. 17. – P. 449–466.
40. Barbosa, L. Primary culture of the region of the amebocyte-producing organ of the snail *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni* / L. Barbosa, L. M. Silva, P. M. Z. Coelho, S. R. Santos, C. L. Fortes–Dias // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. – 2006a. – Vol. 101, N. 6. – P. 639–643.
41. Barbosa, L. Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantation of APO *Biomphalaria tenagophila* / L. Barbosa, R. L. Caldeira, O. S. Carvalho, T. H. D. A. Vidigal, L. K. Jannotti–Passos, P. M. Z. Coelho // *Parasite Immunology*. – 2006b. – Vol. 28. – P. 209–212.
42. Barcante, T. A. Analysis of circulating haemocytes from *Biomphalaria glabrata* following *Angiostrongylus vasorum* infection using flow cytometry / T. A. Barcante, J. P. Barcante, R. T. Fujiwara, W. S. Lima // *Journal of Parasitology Research*. – 2012. – Vol. 2012.
43. Barracco, M. A. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila* / M. A. Barracco, A. A. Steil, R. Garqioni // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. – 1993. – Vol. 88, N. 1. – P. 73–83.
44. Basch, P. F. The arterial system of *Biomphalaria glabrata* (Say) / P. F. Basch // *Malacologia*. – 1969. – Vol. 7, N. 2–3. – P. 169–181.
45. Basch, P. F. Antagonist interaction between strigeid and schistosome sporocysts within a snail host / P. F. Basch, K. J. Lie, D. Heyneman // *Journal of Parasitology*. – 1969. – Vol. 55. – P. 753–758.
46. Bayne, C. J. Macrophage-like hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* in vitro / C. J. Bayne, P. M. Buckley, P. C. Dewan // *Journal of Parasitology*. – 1980a. – Vol. 66. – P. 413–419.
47. Bayne, C. J. *Schistosoma mansoni*: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata* / C. J. Bayne, P. M. Buckley, P. C. Dewan // *Experimental Parasitology*. – 1980b. – Vol. 50. – P. 409–416.

48. Bayne, C. J. Plasma components which mediate cellular defences in the gastropod mollusk *Biomphalaria glabrata* / C. J. Bayne, C. A. Boswell, E. S. Loker, M. A. Yui // *Developmental and Comparative Immunology*. – 1985. – Vol. 9. – P. 523–530.
49. Bayne, C. J. Interactions between plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) and the sporocyst tegument of *Schistosoma mansoni* (Trematoda) / C. J. Bayne, E. S. Loker, M. A. Yui // *Parasitology*. – 1986. – Vol. 92. – P. 653–664.
50. Bayne, C. J. Determinants of compatibility in mollusc–trematode parasitism / C. J. Bayne, T. P. Yoshino // *American Zoologist*. – 1989. – Vol. 29. – P. 399–407.
51. Bayne, C. J. Phagocytosis and non–self-recognition in invertebrates / C. J. Bayne // *BioScience*. – 1990. – Vol. 40, N. 10. – P. 723–731.
52. Bender, R. C. Respiratory burst of *Biomphalaria glabrata* haemocytes: *Schistosoma mansoni* – resistant snails produce more extracellular H₂O₂ than susceptible snails / R. C. Bender, E. J. Broderick, C. P. Goodall, C. J. Bayne // *Journal of Parasitology*. – 2005. – Vol. 91, N. 2. – P. 275 – 279.
53. Benex, J.. Exploitation de l'immunité cellulaire chez les mollusques hôtes des Schistosomes. Premiers résultats relatifs à *Biomphalaria glabrata* / J. Benex, G. Jacobelli // *Bulletin de la Société de pathologie exotique*. – 1980. – Vol. 73. – P. 206–213.
54. Beuerlein, K. Hemocyanin and the branchial heart complex of *Sepia officinalis*: are the hemocytes involved in hemocyanin metabolism of coleoid cephalopods? / K. Beuerlein, P. Ruth, B. Westermann, S. Löhr, R. Schipp // *Cell Tissue Research*. – 2002. – Vol. 310. – P. 373–381.
55. Bezerra, F. S. Comparative study on the effect of cyclic nucleotides related to the function of *Biomphalaria glabrata* hemocytes and human granulocytes / F. S. Bezerra, P. M. Coelho, M. M. Chaves, R. L. Martins, J. A. Nogueira–Machado // *Acta Tropica*. – 1999. – Vol. 72, N. 3. – P. 275–280.
56. Biswas, C. The role of amoebocytes in endotoxin–mediated coagulation in the innate immunity of *Achatina fulica* snails / C. Biswas, C. Mandal // *Scandinavian Journal of Immunology*. – 1999. – Vol. 49, N. 2. – P. 131–138.
57. Boisseaux, P. Analysis of hemocytes in *Lymnaea stagnalis*: Characterization and effects of repeated hemolymph collections / P. Boisseaux, M.–L. Delignette–Muller, K.

- Abbaci, H. Thomas, J. Garric // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2016. – Vol. 57. – P. 116–126.
58. Boisset, N. *Sepia officinalis* Hemocyanin: A refined 3D structure from field emission gun cryoelectron microscopy / N. Boisset, F. Mouche // *Journal of Molecular Biology*. – 2000. – Vol. 296. – P. 459–472.
59. Bolognari, A. Morfologia, struttura e funaione del “corpo bianco” dei Cefalopodi / A. Bolognari // *Morfologia. Archivio Zoologico Italiano*. – 1949. – Vol. 34. – P. 79–97.
60. Byrd, E. E. Intramolluscan stages of *Dasymetra conferta* Nicoll, 1911 (Trematoda: Plagiorchiidae) / E. E. Byrd, W. P. Maples // *Journal of Parasitology*. – 1969. – Vol. 55, N. 3. – P. 509–526.
61. Carballal, M. J. In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Haemocytes / M. J. Carballal, C. Lopez, C. Azevedo, A. Villalba // *Fish and Shellfish Immunology*. – 1997. – Vol. 7, N. 6. – P. 403 – 416.
62. Carriker, M. R. Observations on the functioning of the alimentary system of the snail *Lymnaea stagnalis appressa* Say / M.R. Carriker // *Biological bulletin*. – 1946. – Vol. 91, N. 1. – P. 88–111.
63. Carlezon, W. A. The many faces of CREB / W. A. Carlezon, R. S. Duman, E. J. Nestler // *Trends in Neurosciences*. – 2005. – Vol. 28. – P. 436–445.
64. Castillo, M. G. The immune response of cephalopods from head to foot / M. G. Castillo, K. A. Salazar, N. R. Joffe // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2015. – Vol. 46, N.1. – P. 145 – 160.
65. Cavalcanti, M. G. S. Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea* / M. G. S. Cavalcanti, F. C. Filho, A. M. B. Mendonc, G. R. Duarte, C. C. G. S. Barbosa, C. M. M. B. De Castro, L. C. Alves, F. A. Brayner // *Micron*. – 2012. – Vol. 43. – P. 285–291.
66. Cheng, T. C. Transplantation immunity in mollusks: the histoincompatibility of *Helistoma duryi normale* with allografts and xenografts / T. C. Cheng, P. C. Galloway // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1970. Vol. 15. – P. 177–192.

67. Cheng, T. C. Cellular reactions in marine molluscs in response to helminth parasitism / T. C. Cheng, E. Rifkin // In A symposium on diseases of fishes and shellfishes, F. S. Snieszko (ed.). – 1970. – Vol. 5. – P. 443–496.
68. Cheng, T. C. An electron microscope study of the tegument of the fate of bacteria phagocytized by granulocytes of *Crassostrea virginica* / T. C. Cheng, A. Cali // Contemporary Topics in Immunobiology. – 1974. – Vol. 4. – P. 25–35.
69. Cheng, T. C. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes / T. C. Cheng // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1975. – Vol. 266. – P. 343–379.
70. Cheng, T. C. The role of hemocytic hydrolases in the defence of Molluscs against invading parasites / T. C. Cheng // Haliotis. – 1977. – Vol. 8. – P. 193–209.
71. Cheng, T. C. Hemocytes of the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata* / T. C. Cheng, K. R. Auld. // Journal of Invertebrate Pathology. – 1977. – Vol. 30. – P. 119–122.
72. Cheng, T. C. Acid phosphatase in granulocytic capsules formed in strains of *Biomphalaria glabrata* totally and partially resistant to *Schistosoma mansoni* / T. C. Cheng, T. A. Garrabrant // International Journal for Parasitology. – 1977. – Vol. 7, N. 6. – P. 467–72.
73. Cheng, T. C. Hemocytes of *Bulinus truncatus rohlfsi* (Mollusca, Ggastropoda) / T. C. Cheng, V. G. Guida // Journal of Invertebrate Pathology. – 1980a. – Vol. 35. – P. 158–167.
74. Cheng, T. C. Behavior of *Bulinus truncatus rohlfsi* hemocytes (Gastropoda, Pulmonata) / T. C. Cheng, V. G. Guida // Transactions of the American Microscopical Society. – 1980b. – Vol. 99. – P. 101–110.
75. Cheng, T. C. A classification of molluscan hemocytes based on functional evidence / T. C. Cheng // Comparative Pathobiology. – 1984. – Vol. 6. – P. 111–146.
76. Cheng, T. C. Transient cellular reaction in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) to heterotopic isografts / T. C. Cheng, J. Jourdane // Journal of Invertebrate Pathology. – 1987. – Vol. 49. – P. 273–278.

77. Claes, M. F. Functional Morphology of the White Bodies of the Cephalopod Mollusc *Sepia officinalis* / M. F. Claes // *Acfa Zoologica*. – 1996. – Vol. 77, N. 2. – P. 173–190.
78. Coates, C. J. Immunological properties of oxygen–transport proteins: hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin / C. J. Coates, H. Decker // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2017. – Vol. 74. – P. 293–317.
79. Connors, V. A. In vitro effect of larval *Schistosoma mansoni* excretory–secretory products on phagocytosis–stimulated superoxide production in hemocytes from *Biomphalaria glabrata* / V. A. Connors, T. P. Yoshino // *Journal of Parasitology*. – 1990. – Vol. 76, N. 6. – P. 895–902.
80. Connors, V. A. Identification of *Schistosoma mansoni* sporocyst excretory secretory antioxidant molecule and its effect on superoxide production by *Biomphalaria glabrata* hemocytes / V. A. Connors, M. J. Lodes, T. P. Yoshino // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1991. – Vol. 58. – P. 387–395.
81. Connors, V. A. The schistosome–snail interaction: factors involved in host immunodefense activation and parasite killing in susceptible and resistant *Biomphalaria glabrata* / V. A. Connors // *Taxonomie, Écologie et Évolution des Métazoaires parasites. Taxonomy, ecology and evolution of metazoan parasites. Tome I*. C. Combes, J. Jourdane (eds). // Perpignan, Presses de l’Université de Perpignan. – 2003. – Vol. 1. – P. 203–224.
82. Conte, A. Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes / A. Conte, E. Ottaviani // *FEBS letters*. – 1995. – Vol. 365, N. 2–3. – P. 120–124.
83. Cooper, E. L. Invertebrate immunity: another viewpoint. / E. L. Cooper, B. Rinkevich, G. Uhlenbruch, P. Valembois // *Scandinavian Journal of Immunology*. – 1992. – Vol. 35. – P. 247–266.
84. Couch, L. Humoral response of the snail *Biomphalaria glabrata* to trematode infection: observation on circulating hemagglutinin / L. Couch, L. A. Hertel, E. S. Loker // *Journal of Experimental Zoology*. – 1990. – Vol. 255. – P. 340–349.
85. Cowden, R. R. Some cytological and cytochemical observations on leukopoietic organs, white bodies, of *Octopus vulgaris* / R. R. Cowden // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1972. – Vol. 19, N. 1. – P. 113–119.

86. Davids, B. J. Integrin-like RGD-dependent binding mechanism involved in the spreading response of circulating molluscan phagocytes / B. J. Davids, T. P. Yoshino // *Developmental and Comparative Immunology*. – 1998. – Vol. 22, N. 1. – P. 39–53.
87. De Jong-Brink, M. How schistosomes profit from the stress responses they elicit in their hosts / M. De Jong-Brink // *Advances in Parasitology*. – 1994. – Vol. 35. – P. 177–256.
88. Diaz Cosin, D. J. Ultrastructure de los amebocitos pulmonares de *Thebapisana* (O.F. Miiller) / D. J. Diaz Cosin // *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural*. – 1978. – Vol. 76. – P. 187 – 203.
89. Dikkeboom, R. The production of toxic oxygen metabolites by hemocytes of different snail species / R. Dikkeboom, W. P. van der Knaap, W. van den Bovenkamp, J. M. Tijnagel, C. J. Bayne // *Developmental and Comparative Immunology*. – 1988. – Vol. 12, N. 3. – P. 509–520.
90. Donaghy, L. First characterisation of the populations and immune-related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the spiny top shell, *Turbo cornutus* / L. Donaghy, H.-K. Hong, C. Lambert, H.-S. Park, W. J. Shim, K.-S. Choi // *Fish and Shellfish Immunol.* – 2010. – Vol. 28, N. 1. – P. 87–97.
91. El-Sayed, K. A. A comparative study of haemocytes from resistant and susceptible *Lymnaea natalensis* snails exposed to *Fasciola gigantica* miracidia / K. A. El-Sayed, A. H. El-Din, R. M. Gad EL-KAarim // *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. – 2014. – Vol. 44, N. 3. – P. 653 – 660.
92. Feng, S. Y. Heart rate and leucocyte circulation in *Crassostrea virginica* (Gmelin) / S.Y. Feng // *The Biological Bulletin*. – 1965. – Vol. 28. – P. 198–210.
93. Fernau W. Die Niere von *Anodonta cellensis* Schrot / W. Fernau // *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*. – 1914. – Vol. 3. – P. 569–644.
94. Foley, D. A. A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria* / D. A. Foley, T. C. Cheng // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1975. – Vol. 25. N. 2. – P. 189–197.

95. Ford, L. A. Host defense mechanisms of Cephalopods / L. A. Ford // Annual Review of Fish Diseases. – 1992. – Vol. 2. – P. 25–41.
96. Fountain, D.W. A lectin isolated from mucus of *Helix aspersa* / D.W. Fountain, B.A. Campbell // Comparative Biochemistry and Physiology. – 1984. – Vol. 77, N. 2. – P. 419–225.
97. Fountain, D.W. The lectin-like activity of *Helix aspersa* mucus / D. W. Fountain // Comparative Biochemistry and Physiology. – 1985. – Vol. 80, N. 4. – P. 795–800.
98. Francesch, C. Cytotoxicity and immunocyte markers in cells from the freshwater snail *Planorbis corneus* (L.) (Gastropoda pulmonata): implications for the evolution of natural killer cells / C. Francesch, A. Cossarizza, D. Monti, E. Ottaviani // European Journal of Immunology. – 1991. – Vol. 21. – P. 489–493.
99. Franchini, A. Repair of molluscan tissue injury: role of PDGF and TGF-beta1 / A. Franchini, E. Ottaviani // Tissue Cell. – 2000. – Vol. 32, N. 4. – P. 312 – 321.
100. Fried, B. An update on hemocytes in *Biomphalaria* snails / B. Fried // Journal of Hematology and Oncology Research. – 2016. – Vol. 2, N. 2. – P. 20-26.
101. Furuta, E. The ultrastructure of hemolymph cells of the land slug, *Incilaria fruhstorferi* Collinge (Gastropoda: Pulmonata) / E. Furuta, K. Yamaguchi, A. Shimozawa // Anatomischer Anzeiger. – 1986. – Vol. 162. – P. 215–224.
102. Furuta, E. Phagocytosis by hemolymph cells of the land slug, *Incilaria fruhstorferi* Collinge (Gastropoda: Pulmonata) / E. Furuta, K. Yamaguchi, M. Aikawa, A. Shimozawa // Anatomischer Anzeiger. – 1987. – Vol. 163. – P. 89–99.
103. Furuta, E. Hemolymph cells and the platelet-like structures of the land slug, *Incilaria bilineata* (Gastropoda: Pulmonata) / E. Furuta, K. Yamaguchi, A. Shimozawa // Anatomischer Anzeiger. – 1990. – Vol. 170. – P. 99–109.
104. Furuta, E. *Incilaria* mucus agglutinated human erythrocytes / E. Furuta, T. Takagi, K. Yamaguchi, A. Shimozawa // Journal of Experimental Zoology. – 1995. – Vol. 271. – P. 340–347.
105. Furuta, E. Haemolymph: blood cell morphology and function / E. Furuta, K. Yamaguchi / The biology of terrestrial molluscs, G.M. Barker (ed.), 2001. – P. 289–306.

106. Galaktionov, K. V. The biology and evolution of trematodes / K. V. Galaktionov, A. A. Dobrovolskij. – Boston; Dordrecht; London, 2003. – 592 p.
107. Gorbushin, A. M. Haemogram of *Littorina littorea* / A. M. Gorbushin, N. V. Iakovleva // Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. – 2006. – Vol. 86. – P. 1175–1181.
108. Grosholz, E. D. The effects of host genotype and spatial distribution on trematode parasitism in a bivalve population / E. D. Grosholz // Evolution. – 1994. – Vol. 48, N. 5. – P. 1514–1524.
109. Gust, M. Effects of short-term exposure to environmentally relevant concentrations of different pharmaceutical mixtures on the immune response of the pond snail *Lymnaea stagnalis* / M. Gust, M. Fortier, J. Garric, M. Fournier, F. Gagne // Science of the Total Environment. – 2013a. – Vol. 445–446. – P. 210–218.
110. Gust, M. Immunotoxicity of surface waters contaminated by municipal effluents to the snail *Lymnaea stagnalis* / M. Gust, M. Fortier, J. Garric, M. Fournier, F. Gagne // Aquatic Toxicology. – 2013b. – Vol. 126. – P. 393–403.
111. Hahn, U. K. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species / U. K. Hahn, R. C. Bender, C. J. Bayne // Journal of Parasitology. – 2001. – Vol. 87, N. 2. – P. 292–299.
112. Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T. A. Hall // Nucleic Acids Symposium Series. – 1999. – Vol.41. – P. 95–98.
113. Hanington, P. C. Role for a somatically diversified lectin in resistance of an invertebrate to parasite infection / P. C. Hanington, M. A. Forys, J. W. Dragoo, S. M. Zhang, C. M. Adema, E. S. Loker // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – Vol. 107, N. 49. – P. 21087–21092.
114. Harris, K. R. The fine structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata* / K. R. Harris // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1975. – Vol. 266. – P. 446–464.
115. Harris, K. R. The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the metastrongylid *Angiostrongylus cantonensis*: light microscopy / K. R.

- Harris, T. C. Cheng // *International Journal for Parasitology*. – 1975. –Vol. 5. –P. 521 – 528.
116. Hermann, P. M. Epidermal growth factor–dependent enhancement of axonal regeneration in the pond snail *Lymnaea stagnalis*: role of phagocyte survival / P. M. Hermann, J. J. Nicol, G. T. Nagle, A. G. Bulloch, W. C. Wildering // *Journal of Comparative Neurology*. –2005. –Vol. 492, N. 4. –P. 383 – 400.
117. Hine, P. M. The inter–relationships of bivalve haemocytes / P. M. Hine // *Fish and Shellfish Immunology*. – 1999. –Vol. 9. –P. 367 – 385.
118. Horak, P. Lectins and saccharides in *Lymnaea stagnalis* hemocyte recognition / P. Horak, R. Deme // *Comparative Hematology International*. – 1998. – Vol. 8, N. 4. – P. 210-218.
119. Humbert E. Refractoriness of host haemocytes to parasite immunosuppressive factors as a putative resistance mechanism in the *Biomphalaria glabrata*–*Echinostoma caproni* system / E. Humbert, C. Coustau // *Parasitology*. – 2001. – Vol. 122. – P. 651–660.
120. Humphries, J. E. Cellular Receptors and Signal Transduction in Molluscan Hemocytes: Connections with the Innate Immune System of Vertebrates / J. E. Humphries, T. P. Yoshino // *Integrative and Comparative Biology*. – 2003. –Vol. 43. –P. 305–312.
121. Humphries J. E., Yoshino T. P. Regulation of hydrogen peroxide release in circulating hemocytes of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata* // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2008. – Vol. 32. N. 5. – P. 554–562.
122. Hyman, L.H. *The Invertebrates: Mollusca I* (vol. VI) / L.H. Hyman. – New York: McGraw–Hill book company. – 1967. – 792 p.
123. Iguchi, S.M.M. Antibacterial activity of snail mucus mucin / S. M. M. Iguchi, T. Aikawa, J. J. Matsumoto // *Comparative Biochemistry and Physiology*. – 1982. – Vol. 72. – P. 571–574.
124. Iguchi, S. M. M. An *N*–acetylneuraminic acid–specific lectin from the body surface mucus of African giant snail / S. M. M. Iguchi, T. M. Momoi, K. Egawa, J. J. Matsumoto // *Comparative Biochemistry and Physiology*. – 1985. – Vol. 81. – P. 897–900.

125. Jemaa, M. Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oysters / M. Jemaa, N. Morin, P. Cavelier, J. Cau, J. M. Strub, C. Delsert // *Journal of Experimental Biology*. – 2014. – Vol. 217. – P. 3067–3077.
126. Jeong, K. H. Leukocytes of *Biomphalaria glabrata*: morphology and behavior of granulocytic cell in vitro / K. H. Jeong, D. Heyneman // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1976. – Vol. 28. – P. 357–362.
127. Jeong, K. H. The ultrastructure of the amoebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata* / K. H. Jeong, K. J. Lie, D. Heyneman // *Developmental and Comparative Immunology*. – 1983. – Vol. 7. – P. 217–228.
128. Jiang, Y. Characterization of a Rel/NF- κ B homologue in a gastropod abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* / Y. Jiang, X. Wu // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2007. – Vol. 31. – P. 121–131.
129. Joky, A. Fine structural differences in the amoebocytes of *Biomphalaria glabrata* / A. Joky, M. Matricon-Gondran, J. Benex // *Developmental and Comparative Immunology*. – 1983. – Vol. 7. – P. 669–672.
130. Joky, A. Response to the amoebocyte-producing organ of sensitized *Biomphalaria glabrata* after exposure to *Echinostoma caproni* miracidia / A. Joky, M. Matricon-Gondran // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1985. – Vol. 45. – P. 28–33.
131. Jourdane, J. The two-phase recognition process of allografts in Brazilian strain of *Biomphalaria glabrata* / J. Jourdane, T. C. Cheng // *The Journal of Invertebrate Parasitology*. – 1987. – Vol. 49. – P. 145 – 158.
132. Kapur, S. P. The role of amoebocytes in the regeneration of shell in the land pulmonate, *Euplecta indica* (Pfieffer) / S. P. Kapur, A. S. Gupta // *Biological Bulletin*. – 1970. – Vol. 139, N. 3. – P. 502–509.
133. Kassim, O. O. Radioisotope labeling of *Schistosoma mansoni* miracidia for in vivo studies in *Biomphalaria glabrata* / O. O. Kassim, C. S. Richards // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1979. – Vol. 33, N. 3. – P. 385–386.
134. Keller, W. Die Anatomie von *Vaginula gayi* / W. Keller // *Zoologische Jahrbücher*. – 1902. Suppl. 5.

135. Kent, M. L. Impaired defense mechanisms in bay mussels, *Mytilus edulis*, with hemic neoplasia / M. L. Kent, R. A. Elston, Wilkinson M. T., Drum A. S. // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1989. – Vol. 53. – P. 378–386.
136. Kinoti, G. K. Observation on the infection of bulinid snails with *Schistosoma mantheei*. II. The mechanism of resistance to infection / G. K. Kinoti // *Parasitology*. – 1971. – Vol. 62. – P. 161–170.
137. Kokkinopoulou, M. 3D–ultrastructure, functions and stress responses of gastropod (*Biomphalaria glabrata*) rhogocytes / M. Kokkinopoulou, M. A. Güler, B. Lieb, M. Barbeck, S. Ghanaati, J. Markl // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, N. 6. – e101078.
138. Kokkinopoulou, M. On the ultrastructure and function of rhogocytes from the pond snail *Lymnaea stagnalis* / M. Kokkinopoulou, L. Spiecker, C. Messerschmidt, M. Barbeck, S. Ghanaati, K. Landfester, J. Markl // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, N. 10. – e0141195.
139. Krupa, P. L. *Schistosoma heamotobium* in *Bulinus guernei*. Electron microscopy of hemocyte–sporocyst interactions / P. L. Krupa, L. M. Lewis, P. D. Vecchio // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1977. – Vol. 30. – P. 35–45.
140. Kubota, Y. Purification and characterization of an antibacterial factor from snail mucus / Y. Kubota, Y. Watanabe, H. Otsuka, T. Tamiya, T. Tsuchiya, J. J. Matsumoto // *Comparative Biochemistry and Physiology*. – 1985. – Vol. 82. – P. 45–348.
141. Kumazawa, N. H. Chemotactic activity of hemocytes derived from two marine neritid gastropod molluscs, *Nerita albicilla* and *Heminerita japonica*, to *Vibrio parahaemolyticus* and *Escherichia coli* strains / N. H. Kumazawa, K. Iwao, N. Morimoto // *The Journal of Veterinary Medical Science*. – 1992. – Vol. 54, N. 2. – P. 243–247.
142. Lacchini, A. H. β –1,3–glucan modulates PKC signalling in *Lymnaea stagnalis* defence cells: a role for PKC in H₂O₂ production and downstream ERK activation / A. H. Lacchini, A. J. Davies, D Mackintosh, A. J. Walker // *The Journal of Experimental Biology*. – 2006. – Vol. 209. – P. 4829–4840.
143. Lee, S. H. Nuclear translocation of CAM–associated protein activates transcription for long–term facilitation in *Aplysia* / S. H. Lee, S.–S. Lim, H. Park, J.–A. Lee, J. H. Han, H. Kim, Y.–H. Cheang, S.–H. Lee, Y.–S. Lee, H.–G. Ko, D.–H. Jang, H. Kim, C. M.

- Miniaci, D. Bartsch, E. Kim, C. H. Bailey, E. R. Kandel, B.–K. Kaang // *Cell*. – 2007. – Vol. 129. – P. 801–812.
144. Lie, K. J. Studies on resistance in snails: a specific tissue reaction to *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails / K. J. Lie, D. Heyneman // *International Journal for Parasitology*. – 1975a. – Vol. 5. – P. 621–625.
145. Lie, K. J. Studies on resistance in snails: specific resistance induced by irradiated miracidia of *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails / K. J. Lie, D. Heyneman // *International Journal for Parasitology*. – 1975b. – Vol. 5. – P. 627–631.
146. Lie, K. J. Studies on resistance in snails. 3. Tissue reaction to *Echinostoma lindoense* sporocysts in sensitized and resensitized *Biomphalaria glabrata* / K. J. Lie, D. Heyneman // *Journal of Parasitology*. – 1976a. – Vol. 62, N. 1. – P. 51–58.
147. Lie, K. J. Studies on resistance in snails. 6. Escape of *Echinostoma lindoense* sporocysts from encapsulation in the snail heart and subsequent loss of the host's ability to resist by the same parasite / K. J. Lie, D. Heyneman // *Journal of Parasitology*. – 1976b. – Vol. 62, N. 2. – P. 298–302.
148. Lieb, B. Red blood with blue-blood ancestry: intriguing structure of a snail hemoglobin / B. Lieb, K. Dimitrova, H. S. Kang, S. Braun, W. Gebauer, A. Martin, B. Hanelt, S. A. Saenz, C. M. Adema, J. Markl // *Proceedings of the National Academy of Science*. – 2006. – Vol. 103, N. 32. – P. 12011–12016.
149. Lockyer, A. E. *Biomphalaria glabrata* transcriptome: Identification of cell–signalling, transcriptional control and immune–related genes from open reading frame expressed sequence tags (ORESTES) / A. E. Lockyer, J. N. Spinks, A. J. Walker, R. A. Kane, L. R. Noble, D. Rollinson, E. Dias–Neto, C. S. Jones // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2007. – Vol. 31. – P. 763–782.
150. Lodes, M. J. The effect of schistosome excretory–secretory products on *Biomphalaria glabrata* haemocyte motility / M. J. Lodes, T. P. M. J. Yoshino // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1990. – Vol. 56, N. 1. – P. 75–85.
151. Loker, E. S. Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of the juveniles of the 10–R2 strain of *Biomphalaria glabrata*

(Mollusca: Gastropoda) / E. S. Loker, C. J. Bayne, P. M. Buckley, K. T. Kruse // *Journal of Parasitology*. – 1982. – Vol. 68. – P. 84–94.

152. Loker, E. S. *Echinostoma paraensei*: hemocytes of *Biomphalaria glabrata* as targets of Echinostome mediated interference with host resistance to *Schistosoma mansoni* / E. S. Loker, C. J. Bayne, M. A. Yui // *Experimental Parasitology*. – 1986. – Vol. 62. – P. 149–154.

153. Loker, E. S. Alterations in *Biomphalaria glabrata* plasma induced by infection with the digenetic trematode *Echinostoma paraensei* / E. S. Loker, L. A. Hertel // *Journal of Parasitology*. – 1987. – Vol. 73, N. 3. – P. 503–513.

154. Mahilini, H. M. Categorization of hemocytes of three gastropod species *Trachea vittata* (Muller), *Pila globosa* (Swainson) and *Indoplanorbis exustus* (Dehays) / H. M. Mahilini, A. Rajendran // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2008. – Vol. 97, N. 1. – P. 20–26.

155. Mahmoud, A. H. Free radical scavengers in susceptible/resistant *Biomphalaria alexandrina* snails before and after infection / A. H. Mahmoud, M. Z. Rizk // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology and Pharmacology*. – 2004. – Vol. 138. – P. 523–530.

156. Martins–Souza, R. Differential lectin labelling of circulating hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* resistant or susceptible to *Schistosoma mansoni* infection / R. Martins–Souza, C. Pereira, O. M. Filho, P. Coelho, Jr. A. Corrêa, D. Negrão–Corrêa // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. – 2006. – Vol. 101. – P. 185–192.

157. Martins–Souza, R. L. Flow cytometry analysis of the circulating haemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* following *Schistosoma mansoni* infection / R. L. Martins–Souza, C. A. J. Pereira, P. M. Z. Coelho, O. A. Martins–Filho, D. Negrão–Corrêa // *Parasitology*. – 2009. – Vol. 136. – P. 67–76.

158. Matozzo, V. First evidence of cell division in circulating haemocytes from the Manila clam *Tapes philippinarum* / V. Matozzo, M. G. Marina, F. Cima, L. Ballarina // *Cell Biology International*. – 2008. – Vol. 32, N. 7. – P. 865–868.

159. Matricon–Gondran, M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. I. Characterization of hemocytes and fixed phagocytes / M. Matricon–Gondran, M. Letocart // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1999. – Vol. 74, N. 3. – P. 224–234.
160. McGinnis, S. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools / S. McGinnis, T. L. Madden // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol. 32. – P. 20–25.
161. Miller, R. L. A sialic acid–specific lectin from the slug *Limax flavus* / R. L. Miller // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1982. – Vol. 39. – P. 210–214.
162. Mitta, G. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity / G. Mitta, F. Vandebulcke, P. Roch // *FEBS letters*. – 2000. – Vol. 486, N. 3. – P. 185–190.
163. Monroy, F. Carbohydrate–binding plasma proteins from the gastropod *Biomphalaria glabrata*: strain specificity and the effects of trematode infection / F. Monroy, L. A. Hertel, E. S. Loker // *Developmental and Comparative Immunology*. – 1992. – Vol. 16. – P. 355–366.
164. Monteil, J. F. Hemocyte production in trematode–infected *Lymnaea truncatula* / J. F. Monteil, M. Matricon–Gondran // *Parasitology Research*. – 1991. – Vol. 77. – P. 491–497.
165. Morse, M. P. Hemocyanin respiratory pigment in bivalve mollusks / M. P. Morse, E. Meyhöfer, J. J. Otto, A. M. Kuzirian // *Science*. – 1986. – Vol. 231, N. 4743. – P. 1302–1304.
166. Mount, A. S. Hemocyte–mediated shell mineralization in the Eastern oyster / A. S. Mount, A. P. Wheeler, R. P. Paradkar, D. Snider // *Science*. – 2004. – Vol. 304, N. 5668. – P. 297–300.
167. Müller, G. Morphologie, Lebensablauf und Bildunsort der Blutzellen von *Lymnaea stagnalis* L. / G. Müller // *Zeltschr. Zellforsch.* – 1956. – Vol. 44, N. 5. – P. 519–556.
168. Nalepa, A. Beiträge zur Anatomie der Stylommatophora, Sitzber. Akad. Wiss. Wein. 87. 1884. Die Interzellularräume des Epithels und ihre physiologische Bedeutung bei den Pulmonaten, Sitzber / A. Nalepa // *Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften*. – Vol. 38. – 1883.

169. Newton, W. L. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus* / W. L. Newton // *Experimental Parasitology*. – 1953. – Vol. 2. – P. 242–257.
170. Newton, W. L. The establishment of a strain of *Australorbis glabratus* which combines albinism and a high susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* / W. L. Newton // *Journal of Parasitology*. – 1955. – Vol. 41. – P. 526–528.
171. Noda, S. Effects of excretory–secretory products of *Echinostoma paraensei* larvae on the hematopoietic organ of M–line *Biomphalaria glabrata* snails / S. Noda // *Journal of Parasitology*. – 1992. – Vol. 78, N. 3. – P. 512–517.
172. Nold, R. Die Histologie des Blutgefäßsystems und des Herzens von *Helix pomatia* / R. Nold // *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*. – 1924. – Vol. 123.
173. Nyame, A. K. Differential expression of LacdiNAc, fucosylated LacdiNAc, and Lewis x glycan antigens in intramolluscan stages of *Schistosoma mansoni* / A. K. Nyame, T. P. Yoshino, R. D. Cummings // *Journal of Parasitology*. – 2002. – Vol. 88, N. 5. – P. 890 – 897.
174. Olafsen, J.A. Invertebrate lectins: biochemical heterogeneity as a possible key to their biochemical function / J. A. Olafsen // In: *Immunity in Invertebrates* Brehelin, M. (ed.). Springer–Verlag, Berlin, 1986. – P. 94–111.
175. Oliveira, A. L. D. Differences in the number of hemocytes in the snail host *Biomphalaria glabrata*, resistant and susceptible to *Schistosoma mansoni* infection / A. L. D. Oliveira, P. M. Levada, E. M. Zanotti–Magalhaes, L. A. Magalhaes, J. Ribeiro–Paes // *Genetics and Molecular Research*. – 2010. – Vol. 9, N. 4. – P. 2436–2445.
176. Ottaviani, E. The blood cells of the freshwater snail *Planorbis corneus* (Gastropoda, Pulmonata) / E. Ottaviani // *Developmental and Comparative Immunology*. – 1983. – Vol. 7. – P. 209–216.
177. Ottaviani, E. Cytochemical observations of the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata) haemocytes / E. Ottaviani, A. Franchini // *European journal of basic and applied histochemistry*– 1986. – P. 147.

178. Ottaviani, E. Ultrastructural study of haemocytes of the freshwater snail *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) / E. Ottaviani, A. Franchini // *Acta Zoolologica*. – 1988. – Vol. 69, N. 3. – P. 157–162.
179. Ottaviani, E. Allo-implant in the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata). I. Histological and histochemical study / E. Ottaviani, C. Vergine // *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere.* – 1990. – Vol. 94. – P. 261–267.
180. Ottaviani, E. Molluscan immunorecognition / E. Ottaviani // *Invertebrate Survival Journal*. – 2006. – Vol. 3. – P. 50 – 63.
181. Pan, C. T. The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus* / C. T. Pan // *Bulletin of Museum of Comparative Zoology. Harvard collection*. – 1958. – Vol. 119. – P. 237–299.
182. Pan, C. T. Studies on the host–parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus* / C. T. Pan // *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. – 1965. – Vol. 14. – P. 931–976.
183. Pan, C. T. The arterial system of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata* / C. T. Pan // *Transactions of the American Microscopical Society*. – 1971. – Vol. 90, N. 4. – P. 434–440.
184. Pena, J. J. The planorbid snail *Biomphalaria glabrata* expresses a hemocyanin–like sequence in the albumen gland / J. J. Pena, C. M. Adema // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, N. 12. – e0168665.
185. Pengsakul, T. Morphological and structural characterization of haemocytes of *Oncomelania hupensis* (Gastropoda: Pomatiopsidae) / T. Pengsakul, Y. A. Suleiman, Z. Cheng // *Italian Journal of Zoology*. – 2013. – Vol. 80, N. 4. – P. 494–502.
186. Pila, E. A. Haematopoiesis in molluscs: A review of haemocyte development and function in gastropods, cephalopods and bivalves / E. A. Pila, J. T. Sullivan, X. Z. Wu, J. Fang, S. P. Rudko, M. A. Gordy, P. C. Hanington // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2016. – Vol. 58. – P. 119 – 128.

187. Pila, E. A. Schistosomiasis from a snail's perspective: advances in snail immunity / E. A. Pila, H. Li, J. R. Hambrook, X. Wu, P. C. Hanington // *Trends of Parasitology*. – 2017. – Vol. 33, N. 11. – P. 845–857.
188. Portet, A. BgTEP: An antiprotease involved in innate immune sensing in *Biomphalaria glabrata* / A. Portet, R. Galinier, S. Pinaud, J. Portela, F. Nowacki, B. Gourbal, D. Duval // *Front Immunol*. – 2018. – Vol. 9. – 16 p.
189. Povelones, M. An NF- κ B-like transcription factor in axoplasm is rapidly inactivated after nerve injury in *Aplysia* / M. Povelones, K. Tran, D. Thanos, R. T. Ambron // *Journal of Neuroscience*. – 1997. – Vol. 17, N 13. – P. 4915–4920.
190. Prowse, R. H. In vitro phagocytosis by amoebocytes from the hemolymph of *Helix aspersa* (Müller). I. Evidence for opsonic factor(s) in serum / R. H. Prowse, N. N. Tait // *Immunology*. – 1969. – Vol. 17. – P. 437–443.
191. Renwrantz, L. Opsonizing effects of serum and albumin gland extracts on the elimination of human erythrocytes from circulation of *Helix pomatia* / L. Renwrantz, W. Mohr // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1978. – Vol. 31. – P. 164–174.
192. Renwrantz, L. R. Discriminative ability and function of the immunobiological recognition system of the snail *Helix pomatia* / L. R. Renwrantz, W. Schänke, H. Harm, H. Erl, H. Liebsch, J. Gercken // *Journal of Comparative Physiology*. – 1981. – Vol. 141. – P. 477–488.
193. Richardot, M. Les cellules a calcium du conjonctif de *Ferrissia wautieri* (Moll. Ancyliidae) / M. Richardot, J. Wautier // *Zeitschrift fer Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*. – 1972. – Vol. 134. – P. 227–243.
194. Richards, C. S. Genetics of a molluscan vector of Schistosomiasis / C. S. Richards // *Nature*. – 1970. – Vol. 227. – P. 806–810.
195. Richards, C. S. The genetic variation of compatibility in *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* / C. S. Richards, P. C. Shade // *Journal of Parasitology*. – 1987. – Vol. 73. – P. 1146–1151.
196. Rifkin, E. T. An electron microscope study of the constituents of encapsulating cysts in *Crassostrea virginica* formed in response to *Tylocephalum metacestodes* / E. T.

- Rifkin, T. C. Cheng, H. R. Hohl // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1969. – Vol. 14. – P. 211–226.
197. Rodelaud, D. The development of the amoebocyte-producing organ in *Lymnaea truncatula* Müller infected by *Fasciola hepatica* L. / D. Rodelaud, D. Barthe // *Zeitschrift für Parasitenkunde*. – 1981. – Vol. 65. – P. 331–341.
198. Ruth, P. Comparative immunocytochemical investigations on the localization of haemocyanin synthesis in dibranchiate and tetrabranchiate cephalopods (*Sepia* and *Nautilus*) / P. Ruth, R. Schimmelpfennig, R. Schipp // In: *Advancing research in living and fossil cephalopods*. Olóriz F, Rodríguez-Tovar FJ (eds). New York: Kluwer Academic/Plenum, 1999. – P. 189–202.
199. Sadamoto, H. CREB in the pond snail *Lymnaea stagnalis*: Cloning, gene expression, and function in identifiable neurons of the central nervous system / H. Sadamoto, H. Sato, S. Kobayashi, J. Murakami, H. Aonuma, H. Ando, Y. Fujito, K. Hamano, M. Awaji, K. Lukowiak, A. Urano, E. Ito // *Journal of Neurobiology*. – 2004. – Vol. 58, N. 4. – P. 455–466.
200. Salamat, Z. In vitro mitotic responses of the amoebocyte-producing organ of *Biomphalaria glabrata* to extracts of *Schistosoma mansoni* / Z. Salamat, J. Sullivan // *Journal of Parasitology*. – 2008. – Vol. 94, N. 5. – P. 1170–1173.
201. Salamat, Z. Involvement of protein kinase C signalling and mitogen-activated protein kinase in the amoebocyte-producing organ of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) / Z. Salamat, J. Sullivan // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2009. – Vol. 33. – P. 725–727.
202. Salazar, K. A. Transcriptome analysis of the white body of the Squid *Euprymna tasmanica* with emphasis on immune and hematopoietic gene discovery/ K. A. Salazar, N. R. Joffe, N. Dinguirard, P. Houde, M. G. Castillo // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – P. 1–20.
203. Sasaki, Y. Comparative studies of the internal defense system of schistosome-resistant and -susceptible amphibious snail *Oncomelania nosophora*: 1. Comparative morphological and functional studies on hemocytes from both snails / Y. Sasaki, E.

- Furuta, M. Kirinoki, N. Seo, H. Matsuda // *Zoological Science*. – 2003. – Vol. 20. – P. 1215–1222.
204. Sauerländer, R. Histologische Veränderungen bei experimentell mit *Angiostrongylus vasorum* oder *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda) infizierten Achat Schnecken (*Achatina fulica*) / R. Sauerländer // *Zeitschrift für Parasitenkunde*. – 1976. – Vol. 49. – P. 263–280.
205. Schell, S. C. Development of mother and daughter sporocysts of *Haplometrana intestinalis* Lucker, a plagiorchoid trematode of frogs / S. C. Schell // *Journal of Parasitology*. – 1961. – Vol. 47, N. 3. – P. 493–500.
206. Schell, S. C. The life history of *Haematoloechus breviplexus* Stafford, 1902 (Trematoda: Haplometridae McMullen, 1937) with emphasis on the development of the sporocysts / S. C. Schell // *Journal of Parasitology*. – 1965. – Vol. 51, N. 4. – P. 587–593.
207. Schmitt, J. *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*: identification and characterization of glycoconjugate antigens in the hemolymph of infected vector snails / J. Schmitt, M. Wuhrer, J. Hamburger, J. Jourdane, R. M. Ramzy, R. Geyer, A. Ruppel // *Journal of Parasitology*. – 2002. – Vol. 88, N. 3. – P. 505 – 513.
208. Schoenberg, D. A. Phagocytic funnel-like pseudopodia in lectin-treated gastropod hemocytes / D. A. Schoenberg, T. C. Cheng // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1980. – Vol. 36, N. 1. – P. 141–143.
209. Schoenberg, D. A. The Behavior of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Pulmonata) hemocytes following exposure to lectins / D. A. Schoenberg, T. C. Cheng // *Transactions of the American Microscopical Society*. – 1981. – Vol. 100, N. 4. – P. 345–354.
210. Seppala, O. Activation of the immune defence of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* by different immune elicitors / O. Seppala, K. Leicht // *Journal of Experimental Biology*. – 2013. – Vol. 216. – P. 2902–2907.
211. Seta, L. Behavior of hemolymph amebocytes from Planorbidae in the presence of *Schistosoma mansoni* larvae parasitism, by inoculation of Indian ink or fracture of the shell / L. Seta, L. A. Magalhaes, J. F. Carvalho // *Revista de Saúde Pública*. – 1996. – Vol. 30. – P. 332 – 340.

212. Sminia, T. Structure and function of blood and connective tissue cells of the fresh-water pulmonate *Lymnea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry / T. Sminia // *Zeitschrift fur Zellforschung*. – 1972. – Vol. 130. – P. 497–526.
213. Sminia, T. Haemocyanin production in pore cells of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* / T. Sminia, H. H. Boer // *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. – 1973. – Vol. 145. – P. 443–445.
214. Sminia, T. Histological and ultrastructural observations on wound healing in the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* / T. Sminia, K. Pietersma, J. E. Scheerboom // *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. – 1973. – Vol. 141, N. 4. – P. 561 – 573.
215. Sminia, T. Haematopoiesis in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and autoradiography / T. Sminia // *Cell and Tissue Research*. – 1974. – Vol. 150. – P. 443–454.
216. Sminia, T. Encapsulation of foreign material experimentally introduced into the fresh water snail *Lymnaea stagnalis*: an electron microscopic and autoradiographic study / T. Sminia, E. Borghart–Reinders, A. W. Van de Linde // *Cell and Tissue Research*. – 1974. – Vol. 153. – P. 307–326.
217. Sminia, T. The role of serum factors in phagocytosis of foreign particles by blood cells of *Lymnaea stagnalis* / T. Sminia, W.P.W. van der Knaap, R. Edelenbosch // *Developmental and Comparative Immunology*. – 1979. – Vol. 3. – P. 37–44.
218. Sminia, T. A comparative morphological and enzymes histochemical study on blood cells of the freshwater snails *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata*, and *Bulinus truncates* / T. Sminia, L. Barendsen // *Journal of Morphology*. – 1980. – Vol. 165. – P. 31–39.
219. Sminia, T. Gastropods / T. Sminia // In: *Invertebrate Blood Cells*, N. A. Ratcliffe, A. F. Rowley (eds), Vol. I. London: Academic Press, 1981. – P. 190–232.
220. Sminia, T. Blood cell types and blood cell formation in gastropod molluscs // *Developmental and Comparative immunology*. – 1983. – Vol. 7. – P. 665–668.

221. Sokolova, I. M. Apoptosis in molluscan immune defense / I. M. Sokolova // *Invertebrate Survival Journal* – 2009. – Vol. 6. – P. 49–58.
222. Souza, S. S. On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes / S. S. Souza, Z. A. Andrade // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. – 2006. – Vol. 101. – P. 213–218.
223. Souza, S. S. The significance of the amoebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata* / S. S. Souza, Z. A. Andrade // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. – 2012. – Vol. 107, N. 5. – P. 598–603.
224. Stumpf, J. L. Differential leukocytic responses of *Biomphalaria glabrata* to infection with *Schistosoma mansoni* / J. L. Stumpf, D. E. Gilbertson // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1980. – Vol. 35, N. 2. – P. 217–218.
225. Sullivan, J. T. Hematopoiesis in three species of Gastropods following infection with *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae) / J. T. Sullivan // *Transactions of the American Microscopical Society*. – 1988. – Vol. 107, N. 4. – P. 335–361.
226. Sullivan, J. T. Long-term survival of heterotopic allografts of the amoebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) / J. T. Sullivan // *Transactions of the American Microscopical Society*. – 1990. – Vol. 109, N. 1. – P. 52–60.
227. Sullivan, J. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts in *Biomphalaria glabrata* implanted with amoebocyte-producing organ allografts from resistant snails / J. T. Sullivan, J. V. Spence, J. K. Nunez // *Journal of Parasitology*. – 1995. – Vol. 81, N. 5. – P. 829–33.
228. Sullivan, J. T. Fate of *Shistosoma mansoni* in *Biomphalaria obstructa* / J. T. Sullivan, P. Hu // *Journal of Parasitology*. – 1996. – Vol. 82, N. 2. – P. 743–747.
229. Sullivan, J. T. *Schistosoma mansoni* infection inhibits maturation of ovotestis allografts in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) / J. T. Sullivan, R. R. Lares, A. G. Galvan // *Journal of Parasitology*. – 1998. – Vol. 84, N. 1. – P. 82–87.
230. Sullivan, T. J. Factors affecting adoptive transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Biomphalaria glabrata* / T. J. Sullivan, J. V. Spence // *Journal of Parasitology*. – 1999. – Vol. 85, N. 6. – P. 1065–1071.

231. Sullivan, J. T. Mitotic responses to extracts of miracidia and cercariae of *Schistosoma mansoni* in the amebocyte-producing organ of the snail intermediate host *Biomphalaria glabrata* / J. T. Sullivan, S. S. Pikios, A. Q. Alonzo // *Journal of Parasitology*. – 2004. – Vol. 90, N. 1. – P. 92–96.
232. Sullivan, J. T. Effect of crude lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O127:B8 on the amebocyte-producing organ of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) / J. T. Sullivan, C. A. Bulman, Z. Salamat // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2011. – Vol. 35. – P. 1182–1185.
233. Sullivan, J. T. Fucoidan stimulates cell division in the amebocyte-producing organ of the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* / J. T. Sullivan, J. A. Belloir, R. V. Beltran, A. Grivakis, K. A. Ransone // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2014. – Vol. 123. – P. 13-16.
234. Taylor, H. H. Copper and haemocyanin dynamics in aquatic invertebrates / H. H. Taylor, J. M. Anstiss // *Mar Freshwater Res.* – 1999. – Vol. 50. – P. 907–931.
235. Travers, M. A. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. / M. A. Travers, P. Mirella da Silva, N. Le Goic, D. Marie, A. Donval, S. Huchette, M. Koken, C. Paillard // *Fish and Shellfish Immunology*. – 2008. – Vol. 24. – P. 400–411.
236. Tripp, M. R. The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail *Austalorbis glabratus* / M. R. Tripp // *Journal of Parasitology*. – 1961. – Vol. 23. – P. 90–133.
237. Tripp, M. R. Defense mechanisms of mollusks / M. R. Tripp // *Journal of the Reticuloendothelial Society*. – 1970. – Vol. 7. – P. 173–182.
238. Tripp, M. R. Phagocytosis by hemocytes of the hard clam, *Mercenaria mercenaria* / M. R. Tripp // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1992. – Vol. 59. – P. 222 – 227.
239. van der Knaap, W.P.W. Recognition of foreignness in the internal defence system of the fresh-water gastropod *Lymnaea stagnalis* / W. P. W. van der Knaap // *Developmental and Comparative Immunology*. – 1981. – Vol. 1. – P. 91–97.

240. van der Knaap, W. P. W. Some properties of an agglutinin in the haemolymph of the pond snail *Lymnaea stagnalis* / W. P. W. van der Knaap, A. Doderer, L. H. Boerrigter–Barendsen, T. Sminia // *The Biological Bulletin*. – 1982. – Vol. 162. – P. 404–412.
241. van der Knaap, W.P.W. Cytophilic receptors for foreignness and some factors which influence phagocytosis by invertebrate leukocytes: *in vitro* phagocytosis by amoebocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* / W. P. W. van der Knaap, T. Sminia, R. Schutte, L. H. Boerrigter–Barendsen // *Immunology*. – 1983. – Vol. 48. – P. 377–383.
242. van der Knaap, W. P. W. Immune mechanisms in trematode – snail interactions / W. P. W. van der Knaap, E. S. Loker // *Parasitology Today*. – 1990. – Vol. 6, N. 6. – P. 176–182.
243. van der Knaap, W.P.W. Invertebrate blood cells: morphological and functional aspects of the haemocytes in the pond snail *Lymnaea stagnalis* / W.P. van der Knaap, C. M. Adema, T. Sminia // *Comparative Haematology International*. –1993. –Vol. 3. –P. 20 – 26.
244. Vasquez, R. E. Hematopoietic tissue allografts in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) induce humoral immunity to *Schistosoma mansoni* / R. E. Vasquez, J. T. Sullivan // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2001. – Vol. 25, N. 7. – P. 561–564.
245. Vietri, N. J. Identification, comparison and partial characterization of glycoproteins in the hemolymph of *Schistosoma mansoni* (Trematoda)–susceptible and resistant *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) / N. J. Vietri, W. O. Granath // *Comparative Biochemistry and Physiology*– 1992. – Vol. 102, N. 2. – P. 315–323.
246. Walker, A. J. Spreading by snail (*Lymnaea stagnalis*) defence cells is regulated through integrated PKC, FAK and Src signaling / A. J. Walker, A. H. Lacchini, K. L. Sealey, D. Mackintosh, A. J. Davies // *Cell Tissue Research*. – 2010. – Vol. 341, N. 1. – P. 131–145.
247. Wang, S. Hemoglobins likely function as peroxidase in blood clam *Tegillarca granosa* hemocytes / S. Wang, X. Yu, Z. Lin, S. Zhang, L. Xue, Q. Xue, Y. Bao // *Journal of Immunology Research*. – 2017. – Vol. 2017. – 10 p.

248. Wootton, E. C. Structural and functional characterisation of the blood cells of the bivalve mollusk, *Scrobicularia plana* / E. C. Wootton, R. K. Pipe // Fish and Shellfish Immunology. – 2003. – Vol. 15, N. 3. – P. 249–262.
249. Xu, B. Role of hemoglobin from blood clam *Scapharca kagoshimensis* beyond oxygen transport / B. Xu, J. Zhao, Z. Jing, Y. Zhang, Y. Shi, T. Fan // Fish and Shellfish Immunology. – 2015. – Vol. 44. – P. 248–256.
250. Xu, B. Molecular characteristics of hemoglobins in blood clam and their immune responses to bacterial infection / B. Xu, Y. Zhang, Z. Jing, T. Fan // International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – Vol. 99. – P. 375–383.
251. Yamaguchi, K. Morphological and functional studies on hemolymph cells of land slug, *Incilaria bilineata*, *in vivo* and *in vitro* / K. Yamaguchi, E. Furuta, A. Shimozawa // In: Invertebrate and Fish Tissue Culture, Y. Kuroda, E. Kurstak, K. Maramorosch (eds). Japan Scientific Societies Press, Tokyo/ Springer-Verlag, Berlin, 1988. – P. 247–250.
252. Yonge, C. M. Ciliary feeding mechanisms in the Thecosomatous Pteropods / C. M. Yonge // Zoological Journal of the Linnean Society. – 1926. – Vol. 36, N. 245. – P. 417–429.
253. Yoshino, T. P. The Ultrastructure of circulating hemolymph cells of the marine snail *Cerithidea californica* (Gastropoda: Prosobranchiata) / T. P. Yoshino // Journal of Morphology. – 1976. – Vol. 150. – P. 148–56.
254. Yoshino, T. P. Comparison of concanavalin-A determinants on haemocytes of two *Biomphalaria glabrata* snail stocks: Receptor binding and redistribution / T. P. Yoshino // Developmental and Comparative Immunology. – 1981. – Vol. 5, N. 2. – P. 229–240.
255. Yoshino, T. P. Identification of antigenically distinct hemocyte subpopulations in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) using monoclonal antibodies to surface membrane markers / T. P. Yoshino, W. O. Granath // Cell Tissue Research. – 1983. – Vol. 232. – P. 553–564.
256. Yoshino, T. P. Surface antigens of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) hemocytes: functional heterogeneity in cell subpopulations recognized by a monoclonal antibody / T. P. Yoshino, W. O. Granath // Journal of Invertebrate Pathology. – 1985. – Vol. 45. – P. 174–186.

257. Yoshino, T. P. Surface membrane components of circulating invertebrate blood cells and their role in internal defence / T. P. Yoshino // Immunity in invertebrates, M. Brehélin (ed.), Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg, 1986. – P. 12–24.
258. Zelck, U. E. Specific inhibitors of mitogen-activated protein kinase and PI3-K pathways impair immune responses by hemocytes of trematode intermediate host snails / U. E. Zelck, B. E. Gege, S. Schmid // Developmental and Comparative Immunology. – 2007. – Vol. 31. – P. 321–331.
259. Zhang, C. Impaired proliferation and survival of activated B cells in transgenic mice that express a dominant-negative cAMP-response element-binding protein transcription factor in B Cells / C. Zhang, Y.-L. Wu, L. M. Boxer // Journal of Biological Chemistry. – 2002. – Vol. 277, N. 50. – P. 48359–48365.
260. Zhang, S.-M. Identification and characterization of five transcription factors that are associated with evolutionarily conserved immune signaling pathways in the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* / S.-M. Zhang, K. A. Coultas // Molecular Immunology. – 2011. – Vol. 48. – P. 1868–1881.
261. Zhang, S.-M. Pathogen-associated molecular patterns activate expression of genes involved in cell proliferation, immunity and detoxification in the amebocyte-producing organ of the snail *Biomphalaria glabrata* / S.-M. Zhang, E. S. Loker, J. T. Sullivan // Developmental and Comparative Immunology. – 2016. – Vol. 56. – P. 25–36.