

На правах рукописи



ПРОХОРОВА
Елена Евгеньевна

ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ ЛЁГОЧНЫХ МОЛЛЮСКОВ

1.5.12 – Зоология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Новосибирск
2026

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

Научный консультант: **Атаев Геннадий Леонидович**
заслуженный деятель науки РФ, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой зоологии и генетики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена»

Официальные оппоненты: **Гранович Андрей Игоревич**
доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой зоологии беспозвоночных им. В. А. Догеля Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Прокофьев Владимир Викторович
доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой общей биологии и биомедицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Псковский государственный университет»

Токарев Юрий Сергеевич
доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией патологии насекомых и биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН».

Защита диссертации состоится 13 октября 2026 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 003.033.01 на базе ФГБУН «Институт систематики и экологии животных СО РАН» по адресу: 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, д. 11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН «Институт систематики и экологии животных СО РАН» и на сайте организации <http://www.eco.nsc.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Петрожицкая
Людмила Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы. Моллюски представляют собой одну из наиболее высокоорганизованных групп беспозвоночных животных. Для них характерны сложная дифференцировка тела и тонкие механизмы регуляции физиологических процессов. За сотни миллионов лет эволюции моллюски сформировали разнообразные варианты строения и организации кровеносной и дыхательной систем, а также приобрели широкий круг паразитов, относящихся к разным систематическим группам – от протистов до целомических червей (см. Атаев и др., 2020). Среди патогенов моллюсков особое место занимают трематоды, которые используют моллюсков в качестве промежуточных хозяев. Помимо значимости в контексте паразитологических исследований, брюхоногие и двустворчатые моллюски выступают как модельные объекты для физиологических, биохимических и экологических исследований. Некоторые виды широко применяются в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности.

Одной из наиболее продвинутых групп моллюсков считаются лёгочные моллюски, которые успешно существуют как на суше, так и в пресноводных и морских биотопах (Рупперт и др., 2008). Пульмонаты наряду с насекомыми стали одними из первых объектов для анализа защитных реакций среди беспозвоночных животных. Однако несмотря на сравнительно-иммунологическую направленность таких работ, долгое время по отношению к моллюскам и другим беспозвоночным не использовали термин «иммунитет». Это отражало сложившееся представление о принципиальном отличии защитных систем беспозвоночных от иммунной системы позвоночных (Купер, 1980). У последних помимо врождённого иммунитета присутствует адаптивный компонент иммунной системы. В его функционировании участвуют лимфоциты со специфическими антигенраспознающими рецепторами (АРР). Большинство животных, включая высокоорганизованных беспозвоночных, обладают лишь системой врождённого иммунитета. Её механизмы длительное время считались менее эффективными и обозначались как «доиммунные» – их противопоставляли адаптивным иммунным реакциям. В связи с этим по отношению к беспозвоночным практически всегда вместо термина «иммунитет» применяли термин «защитные реакции» (Lackie, 1980; Купер, 1980).

В то же время, иммунология как наука сложилась во многом благодаря изучению защитных реакций у беспозвоночных животных. Именно по результатам изучения фагоцитоза у беспозвоночных разных групп И. И. Мечниковым была сформулирована фагоцитарная теория иммунитета, ставшая одной из основных концепций иммунологической науки (Мечников, 1951).

В конце XX века было установлено, что распознавание в системе врождённого иммунитета не является исключительно неспецифическим

(Medzhitov, Janeway, 1997). Клетки врождённого иммунитета распознают патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП) (Janeway, Medzhitov 2002). Эту функцию выполняют паттерн-распознающие (или патогенраспознающие) рецепторы (ПРР), которые широко представлены у всех многоклеточных (Меджитов, Джаневей, 2004; Kumar et al., 2011). Было показано, что ПРР проявляют избирательность к патогенам разных групп (Kumar et al., 2011). Это открытие привело к пересмотру понятия «специфичность», переосмыслению концепции врождённого иммунитета и возобновлению интереса к изучению иммунитета беспозвоночных (Söderhäll, 2010).

Первые исследования защитных реакций моллюсков относятся к началу XX века (Agensborg, 1925). С тех пор накопился значительный массив данных о проявлениях иммунитета у представителей разных групп моллюсков (см. Атаев и др., 2024). Бóльшая часть сведений о защитных реакциях pulmonat получена на лабораторных линиях видов рода *Biomphalaria*, являющихся промежуточными хозяевами трематод рода *Schistosoma* (см. Атаев и др., 2005b; Loker, 2010; Castillo et al., 2020). Исследования других видов pulmonat немногочисленны. Однако их результаты свидетельствуют о наличии видовых особенностей защитных реакций лёгочных моллюсков (см. Атаев и др., 2024a). Существенной проблемой в области изучения иммунитета pulmonat остаётся отсутствие единых подходов и стандартизированной терминологии. Из-за этого результаты, полученные для разных видов, часто оказываются противоречивыми или фрагментарными.

Для продуктивного продолжения исследований иммунных реакций лёгочных моллюсков в первую очередь требуется обобщить и критически осмыслить накопленные данные. Построение целостной картины организации иммунной защиты pulmonat обуславливает необходимость комплексного анализа клеточных и гуморальных компонентов их иммунной системы, а также расширение количества изучаемых модельных объектов. Важным условием проведения исследований новых модельных объектов является их детальная характеристика, включающая точную видовую идентификацию. Это обеспечит корректный анализ избирательности иммунных реакций и интерпретацию межвидовых различий.

Цель работы – изучить клеточные механизмы и молекулярные основы защитных реакций лёгочных моллюсков.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать клеточный состав гемолимфы лёгочных моллюсков, учитывая морфологические и функциональные особенности гемоцитов моллюсков модельных видов. На основе полученных результатов и литературных данных разработать классификацию гемоцитов лёгочных моллюсков.

2. Изучить изменения клеточного состава гемолимфы и динамику гемопоэза моллюсков в условиях воздействия чужеродных факторов различной природы.

3. Изучить механизмы клеточных иммунных реакций лёгочных моллюсков на иммунизацию различными патогенами.

4. Выполнить анализ экспрессии генов иммунного ответа в клетках гемолимфы и других тканей моллюсков.

5. Провести сравнительный анализ транскриптомов гемоцитов интактных и иммунизированных трематодами моллюсков с выявлением закодированных в нем факторов иммунного ответа, включая патогенраспознающие рецепторы и факторы цитотоксичности.

6. Разработать новые модели для экспериментального изучения защитных реакций лёгочных моллюсков. Для этого провести видовую идентификацию следующих видов из природных популяций: *Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis*, *Lymnaea stagnalis*, *Succinea putris*, *Ampullaceana lagotis*, *Cochlicopa lubrica*, *Arianta arbustorum*. Также провести идентификацию трематод, паразитирующих в модельных моллюсках и рассматриваемых в исследовании как факторы иммунизации.

7. Оценить универсальность и избирательность иммунных реакций лёгочных моллюсков на патогены различной природы.

Научная новизна. Впервые выполнена видовая идентификация и анализ генотипического разнообразия моллюсков *Planorbarius corneus* и *Succinea putris* из нескольких популяций по протяжённым фрагментам рДНК и митохондриальных генов *cox1* и *cytB*. Впервые генотипированы по протяжённому участку рДНК моллюски *Planorbis planorbis*, *Cochlicopa lubrica*, *Arianta arbustorum*, собранные на территории европейской части России. Впервые по участкам рДНК и гену *cox1* генотипированы моллюски *Ampullaceana lagotis*, собранные в водоёмах плато Укок.

Впервые исследование иммунных реакций лёгочных моллюсков выполнено на природных моделях, для которых проведена точная видовая идентификация фактора иммунизации с использованием генетических маркеров: *Succinea putris* – *Leucochloridium paradoxum*, *Planorbarius corneus* – *Bilharziella polonica*, *Cotylurus brevis*, *Echinostoma spiniferum*, *Notocotylus ephemera*, *Plagiorchis multiglandularis*.

Впервые выполнен сравнительно-морфологический анализ клеточного состава гемолимфы лёгочных моллюсков 7 видов, относящихся к 4 семействам. Показано, что концентрация гемоцитов и соотношение гранулоцитов и гиалиноцитов различаются у моллюсков разных размеров, а также иммунизированных и неиммунизированных особей. Показано, что динамика изменения гемоцитарной формулы при иммунизации соответствует процессу активации амёбоцит-продуцирующего органа (АПО), а также развития первичной и вторичной клеточной реакции.

Впервые анализ клеточных реакций выполнен на природных моделях с использованием различных факторов иммунизации: бактерий, партенит трематод,

метацеркарий трематод, ксенотрансплантатов. Подтверждена универсальность основных механизмов клеточного иммунного ответа лёгочных моллюсков.

Впервые получен и проанализирован транскриптом гемоцитов моллюсков *P. corneus*, в том числе природнозаражённых трематодами *B. polonica*. Установлено, что в транскриптом гемоцитов закодированы факторы, относящиеся ко всем группам факторов врождённого иммунитета. Впервые на основе данных транскриптома предсказана доменная структура ПРР моллюсков *P. corneus*. Впервые для лёгочных моллюсков предсказаны варианты скавенджер-рецепторов (СР) с нетипичными сочетаниями доменов. На основе полученных в исследовании и представленных в литературе данных о структуре ПРР, предложен вариант классификации ПРР моллюсков.

Впервые для моллюсков из природных популяций, заражённых трематодами разных видов, выполнен анализ экспрессии генов ПРР, включая гены толл-подобных рецепторов (ТПР), лектинов, фибриногенподобных белков (ФБ), а также молекулы адгезии – β -интегрин. Показано, что заражение разными видами трематод приводит к избирательному изменению экспрессии генов ТПР.

Впервые выполнен параллельный анализ экспрессии генов ПРР и факторов цитотоксичности в гемолимфе и тканях сердца, гепатопанкреаса, железистой железы, ноги моллюсков, заражённых трематодами разных видов. Для генов ФБ, ТПР, каталазы, пероксидазы, биомфализина выявлены существенные различия в экспрессии между моллюсками, заражёнными трематодами разных видов.

Впервые выполнен анализ иммунных реакций лёгочных моллюсков нескольких видов с последующим обобщением данных в контексте современной концепции врождённого иммунитета. В результате исследования выявлены общие характеристики системы врождённого иммунитета лёгочных моллюсков.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования важны для понимания механизмов и путей формирования системы врождённого иммунитета моллюсков и беспозвоночных животных в целом. Полученные данные об иммунных реакциях лёгочных моллюсков на заражение трематодами расширяют представления о механизмах взаимодействия в паразито-хозяйинной системе «трематоды-моллюск». Данные об избирательности иммунных реакций на заражение трематодами разных видов могут быть использованы в разработке мер биологического контроля над распространением опасных трематодных инвазий.

Разработанные в ходе исследования подходы и методические наработки могут быть применены для изучения системы врождённого иммунитета беспозвоночных животных других групп. Полученные геномные последовательности моллюсков и трематод представлены в открытые базы данных

и могут быть задействованы для дальнейшего изучения генотипического разнообразия этих видов.

Полученные последовательности транскриптома гемоцитов депонированы в открытых базах данных и могут послужить материалом для сравнительно-иммунологических исследований. Предложенная классификация ПРР моллюсков может быть использована в качестве основы для классификации ПРР многоклеточных.

Полученные в ходе исследования данные и методические наработки диссертации могут быть включены в учебные курсы по зоологии беспозвоночных, цитологии, паразитологии, молекулярной биологии, эволюционной иммунологии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Специализированными клеточными элементами системы врождённого иммунитета моллюсков являются клетки гемолимфы – гемоциты. Их основные типы – гиалиноциты и гранулоциты – различающиеся морфологически и функционально, соответствуют разным стадиям дифференцировки и функциональной специализации клеток гемолимфы.

2. Динамика клеточного состава гемолимфы пульмонат зависит от физиологического состояния моллюска, природы патогена, срока и повторности иммунизации.

3. Клеточные иммунные реакции лёгочных моллюсков на патогены различной природы реализуются посредством универсальных эффекторных механизмов врождённого иммунитета, таких как фагоцитоз, инкапсуляция и формирование агглютинаций.

4. В иммунных реакциях моллюсков помимо гемоцитов участвуют клетки других тканей – белковой железы, гепатопанкреаса, сердца, ноги др.

5. Набор патогенраспознающих рецепторов лёгочных моллюсков является видоспецифическим признаком. Выявленное разнообразие патогенраспознающих рецепторов моллюсков служит механизмом адаптации к взаимодействию с уникальным набором патогенов в условиях отсутствия адаптивного иммунитета.

6. Иммунные реакции лёгочных моллюсков на патогены различной природы проявляют признаки избирательности – при заражении патогенами разных видов наблюдается разная динамика клеточных реакций и экспрессии генов факторов иммунного ответа.

7. Поскольку иммунные реакции лёгочных моллюсков имеют видовые особенности и проявляют избирательность, их исследование следует проводить на объектах, которые прошли точную видовую идентификацию. Проведённая с использованием морфологических и молекулярно-генетических методов видовая идентификация моллюсков *Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis*, *Lymnaea stagnalis*, *Succinea putris*, *Ampullaceana lagotis*, *Cochlicopa lubrica*, *Arianta*

arbustorum показала небольшую генотипическую вариабельность видов в пределах исследуемого ареала, что позволяет использовать их в качестве модельных объектов для изучения общих закономерностей и видовых особенностей иммунных реакций лёгочных моллюсков.

Степень достоверности результатов и апробация результатов. Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается использованием адекватных методов, соответствующих поставленным задачам, воспроизводимостью результатов, применением методов статистического анализа, всесторонним анализом имеющихся литературных данных.

Помимо этого, основные результаты диссертации опубликованы в ведущих отечественных и международных изданиях, а также представлены на конгрессах, съездах, конференциях, симпозиумах: Международной конференции «Экология водных беспозвоночных» (2010); Межвузовской конференции «Герценовские чтения» (2020, 2021, 2024), XVII Международной школе-конференции «Биология – наука XXI века» (2013); VI Международной школе-конференции «Геномика и системная биология» (2014), Всероссийском Симпозиуме «V Съезд физиологов России и V Съезд биохимиков СНГ» (2016), Международном семинаре «Методология изучения партенит трематод» (2015), Межрегиональной конференции «Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке» (2015), Калининградском научном иммунологическом форуме (2016), Школе-конференции «Современные проблемы эволюционной морфологии животных» (2016), Международном симпозиуме «Современные достижения в популяционной, эволюционной и экологической генетике» (2015, 2025), VI Всероссийской конференции «Школа по теоретической и морской паразитологии» (2019, 2020), Международной конференции «Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем» (2017), Всероссийской научно-практической конференции «По вопросам реализации научных разработок» (2017), Международной конференций «Биоразнообразие паразитов» (2018), Всероссийской конференции с международным участием «Моллюски: биология, экология, эволюция и формирование малакофаун» (2019), Международной конференции «Концептуальные и прикладные аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных» (2020), Межвузовской конференции «Актуальные проблемы биологии и медицинской паразитологии» (2020, 2026), Международной научно-практической конференции «Изучение водных и наземных экосистем: история и современность» (2021, 2022, 2024), Международных конференциях «V–VII Съезд паразитологического общества» (2015, 2018, 2023), Втором всероссийском орнитологическом конгрессе (2023), Международной научно-практической конференции «Паразитологические исследования в Беларуси и на сопредельных территориях» (2025).

Публикации. Результаты диссертационного исследования опубликованы в 30 статьях в журналах, рекомендованных ВАК, включая монографическую статью. Кроме того, материалы диссертации вошли в учебное пособие.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 445 страницах текста, содержит Введение, главы «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», Заключение, Выводы, Список сокращений, Словарь терминов, Список литературы, Приложения. Материал иллюстрирован 153 рисунками, 51 таблицами и 28 приложениями. Список цитируемой литературы содержит 890 источника, в том числе 128 работ на русском и 762 – на иностранных языках.

Личный вклад автора. Представленная к защите работа является результатом 20-летних исследований автора. Автором лично были определены цель и задачи исследования, собрана значительная часть материала, получены основные результаты, выполнены анализ и интерпретация полученных результатов, подготовлен текст диссертации, сформулированы положения и выводы. Подготовка и написание публикаций, подготовка и презентация докладов по результатам работ осуществлялись автором или при его непосредственном участии.

Настоящая работа выполнялась в Лаборатории экспериментальной зоологии РГПУ им. А. И. Герцена в рамках основного научного направления исследований, а также грантов Министерства Образования и Науки РФ, Министерства Просвещения РФ, РФФИ, РНФ, Президента РФ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава I. Обзор литературы

Проанализированы подходы и методы, используемые для изучения защитных реакций моллюсков (раздел I.1), освещены основные этапы формирования представлений об иммунитете pulmonat (раздел I.2). Выполнен анализ современных представлений о конститутивных основах и механизмах иммунных реакций лёгочных моллюсков. Особое внимание уделено строению кровеносной системы (раздел I.3.1), механизмам клеточных защитных реакций, обобщению данных о разнообразии и вариантах классификации гемоцитов, о роли гуморальных компонентов в иммунном ответе (I.3.2).

Глава II. Материалы и методы

II. 1. Объекты исследования. В качестве объектов исследования в работе были использованы лёгочные моллюски (Gastropoda, Pulmonata) девяти видов:

- | | |
|------------------|---|
| сем. Planorbidae | (1) <i>Planorbarius corneus</i> (Linnaeus, 1758)
(2) <i>Planorbis planorbis</i> (Linnaeus, 1758)
(3) <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818)
(4) <i>Biomphalaria pfeifferi</i> (Krauss, 1848) |
| сем. Lymnaeidae | (5) <i>Lymnaea stagnalis</i> (Linnaeus, 1758)
(6) <i>Ampullaceaana lagotis</i> (Schränk, 1803) |
| сем. Succineidae | (7) <i>Succinea putris</i> (Linnaeus, 1758) |

сем. Helicidae (8) *Arianta arbustorum* (Linnaeus, 1758)

сем. Cochlicopidae (9) *Cochlicopa lubrica* (Müller, 1774)

Виды (3) и (4) представлены лабораторными линиями, остальные моллюски собраны в природных биотопах (рис. 1).



Рисунок 1. Карта-схема мест сбора моллюсков.

Обозначения: Л – Ленинградская обл., Ка – Калининградская обл., М – Московская обл., Ки – Кировская обл., Г – Гомельская обл., В – Витебская обл., А – респ. Алтай. Цифрами обозначены виды моллюсков (см. текст).

Для **экспериментальной иммунизации** моллюсков в работе были использованы: бактерии *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, ксенотрансплантаты (фрагменты вибрисс кошки), трематоды *Echinostoma caproni* (сем. Echinostomatidae).

В качестве факторов **природной иммунизации** в работе рассматриваются трематоды: *E. spiniferum*, *E. revolutum* (сем. Echinostomatidae), *Bilharziella polonica* (сем. Schistosomatidae), *Cotylurus brevis* (сем. Strigeidae), *Notocotylus ephemera* (сем. Notocotylidae), *Plagiorchis multiglandularis*, *Aptorchis* sp. (сем. Plagiorchiidae), *Diplostomum pseudospathaceum* (сем. Diplostomidae), *Rubensstrema exasperatum* (сем. Omphalometridae), *Leucochloridium paradoxum* (сем. Leucochloridiidae).

II. 2. Методы исследования

Основная часть исследований выполнена в Лаборатории экспериментальной зоологии РГПУ им. А. И. Герцена.

Видовую идентификацию моллюсков осуществляли с использованием морфологических и молекулярно-генетических методов. В качестве генетических маркеров были использованы участки рДНК и митохондриальных генов *cytB* и *cox1*. Алгоритм генотипирования описан в работах: Прохорова и др., 2015a; Prokhorova et al., 2020; Прохорова, Усманова, 2020; Атаев, ... Prokhorova, Glupov, 2024a. Для получения препаратов хромосом *P. corneus* использовали метод воздушно-сухих препаратов, для изучения генотипического полиморфизма – RAPD-анализ (Прохорова и др., 2014).

Видовую идентификацию трематод проводили по морфологии церкарий. Определение трематод было выполнено Г. Л. Атаевым, Н. П. Исаковой и Р. Р. Усмановой. Для уточнения видовой принадлежности трематоды рода *Leucochloridium* были генотипированы по участкам рДНК и фрагменту гена *cox1*, трематоды *N. ephemera*, *B. polonica* и *Aptorchis* sp. – по участку рДНК. Трематоды *C. brevis* и *E. spiniferum* – по участку 28S рДНК, трематоды *P. multiglandularis* – по участку гена *cox1*. Алгоритм генотипирования описан в публикациях: Жукова, Прохорова и др., 2012; Zhukova, Prokhorova et al., 2014; Ataev, ... Prokhorova, 2016b; Prokhorova et al., 2017; Прохорова и др., 2018b; Усманова, ... Прохорова, 2021; Usmanova, ... Prokhorova, 2023, Виноградова, Прохорова и др., 2026.

Для **филогенетических реконструкций**, подсчёта генетических дистанций использовали программы BioEdit v. 7.2.5, MEGA v.10.2.4, BEAST v.2.5. Для визуализации деревьев – программу FigTree v.1.4.0, для построения гаплосетей – программу PopArt v.4.8.4, для построения вторичных структур транскриптов рДНК – программу Mfold v.3.0.

Гистологические исследования проводили для изучения гемопоэтических структур и клеточных реакций. Изучение тканей моллюсков осуществляли на парафиновых срезах (Атаев, Прохорова, 2013; Прохорова и др., 2015b). Гистологические срезы *B. glabrata* и *B. pfeifferi*, заражённых трематодами, были предоставлены Г. Л. Атаевым.

Для **микроскопического исследования** гемолимфу **собирали** из кровеносного синуса в головном отделе моллюсков с помощью стеклянной пипетки Пастера. **Подсчет числа клеток гемолимфы** проводили в камере Горяева. Для изучения биологических особенностей гемоцитов *in vitro* препараты инкубировали во влажной камере на протяжении 4–8 часов. Для **приготовления постоянных препаратов** мазки гемолимфы фиксировали и окрашивали (Прохорова и др., 2018b). Для **флуоресцентной микроскопии** ядра гемоцитов окрашивали красителем Hoechst, визуализацию цитоскелета осуществляли с помощью специфических антител к α -тубулину и фаллоидин-родамина (Прохорова и др., 2018a; Tokmakova, ... Prokhorova, Ataev, 2020). Для **анализа фагоцитарной активности** гемоцитов использовали суспензию меченных ФИТЦ бактерий *S. aureus* и *E. coli* в ФСБ, которую инъецировали моллюскам в ногу, либо инкубировали с гемолимфой (Ataev, Prokhorova et al., 2016a). Для **изучения пролиферативной активности** циркулирующих клеток использовали EdU (Tokmakova, ... Prokhorova, Ataev, 2020). **Трансмиссионная электронная микроскопия** (ЦКП Электронной микроскопии Института биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина, Борок) была использована для изучения морфологии гемоцитов (Prokhorova et al., 2018). **Сканирующая электронная микроскопия** была использована для изучения гемоцитарной мантии на спороцистах *L. paradoxum*. Спороцист фиксировали в 2.5% глутаральдегиде, обезвоживали, напыляли золотом, препараты изучали на микроскопе Zeiss EVO 40 (ЦКП Электронной микроскопии РГПУ им. А. И. Герцена, Санкт-Петербург).

Методы проточной цитофлуориметрии использовали для изучения особенностей клеточного состава гемолимфы моллюсков – в том числе у особей разного размера и у моллюсков, заражённых разными видами трематод, а также для

оценки продукции активных форм кислорода (АФК) и фагоцитарной активности гемоцитов. Цитометрические исследования были выполнены совместно с Серебряковой М. К. Часть работ выполнена на базе Отдела иммунологии Института экспериментальной медицины (Санкт-Петербург).

Для определения морфологических и функциональных характеристик гемоцитов оценивали параметры FS, SS, интенсивности флуоресценции красителей SYTO62, SYTO16 (окрашивают нуклеиновые кислоты), LysoTracker (накапливается в лизосомах) и MitoTracker (накапливается в митохондриях). В каждом образце анализировали 30000 событий (Серебрякова, Прохорова и др., 2015; Ataev, Prokhorova et al., 2016a; Прохорова и др., 2018a; Serebryakova,...Prokhorova, Ataev, 2022). **Визуализацию** анализируемых на проточном цитометре гемоцитов осуществили с помощью цитометра Amnis® на базе Лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии Национального медицинского исследовательского центра здоровья детей (Москва) совместно с Петричук С. В. (Serebryakova,...Prokhorova, Ataev, 2022). **Разделение гемоцитов** с использованием системы сортировки клеток SONY SH800 было выполнено совместно с Беловежец Т. Н. в Лаборатории инженерии антител Института молекулярной и клеточной биологии (Новосибирск). Для анализа **продукции активных форм кислорода** гемоцитами гемолимфу инкубировали с КДФДА, затем добавляли раствор PI и проводили анализ на проточном цитометре. Для изучения **пролиферативной активности** методом проточной цитометрии использовали EdU (Tokmakova,...Prokhorova, Ataev, 2020). Обработку результатов цитометрического анализа проводили в программе Kaluza™ v.1.3.

Методы изучения экспрессии генов факторов защитных реакций. Препараты РНК выделяли из всего тела моллюсков, а также гемоцитов, фрагментов гепатопанкреаса, белковой железы, сердца и ноги (Прохорова и др., 2010b). С использованием полученного в работе транскриптома гемоцитов (Orlov,...Prokhorova, 2023) и представленных в базах данных нуклеотидных последовательностей других моллюсков, были подобраны специфические праймеры. Экспрессию генов иммунного ответа оценивали относительно гена β -актина методом полуколичественной ОТ-ПЦР (Прохорова и др., 2010b), а также посредством ПЦР в реальном времени относительно генов β -актина и GAPDH методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Прохорова и др., 2025).

Биоинформатические методы. Биоинформатический анализ данных транскриптома гемоцитов *P. corneus* был выполнен совместно с Орловым Ю. А. и Бобровской А. В. на сервере Института цитологии и генетики (Новосибирск). Алгоритм получения и анализа транскриптома подробно описан в публикации: Orlov,...Prokhorova, 2023. Для выравнивания CDS транскриптов, содержащих домены PPP, использовали BLAST. Для визуализации доменной структуры PPP был использован онлайн-сервис SMART (Прохорова и др., 2024). Филогенетическая реконструкция с использованием аминокислотных последовательностей TIR-домена была выполнена в программе MEGA v. 10.2.4 (Бобровская, ...Прохорова, 2024).

Статистическую обработку и визуализацию результатов в виде гистограмм проводили в пакетах программ MS Excel, Statistica 8.0 и GraphPad Prism

6.01. Нормальность распределения в выборках оценивали при помощи критерия Колмогорова-Смирнова. Для сравнения парных количественных значений использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

Глава III. Результаты и обсуждение

III.1. Характеристика модельных объектов для изучения иммунных реакций лёгочных моллюсков

Моллюски *Planorbarius corneus* (сем. Planorbidae) широко распространены на территории Европы, Западной Сибири до Оби в крупных стоячих и проточных водоёмах (Цалолихин, 2004; Винарский, Кантор, 2016). Некоторые авторы рассматривают роговых катушек как надвидовой комплекс, включающий 5–8 видов (Стадниченко, 1990).

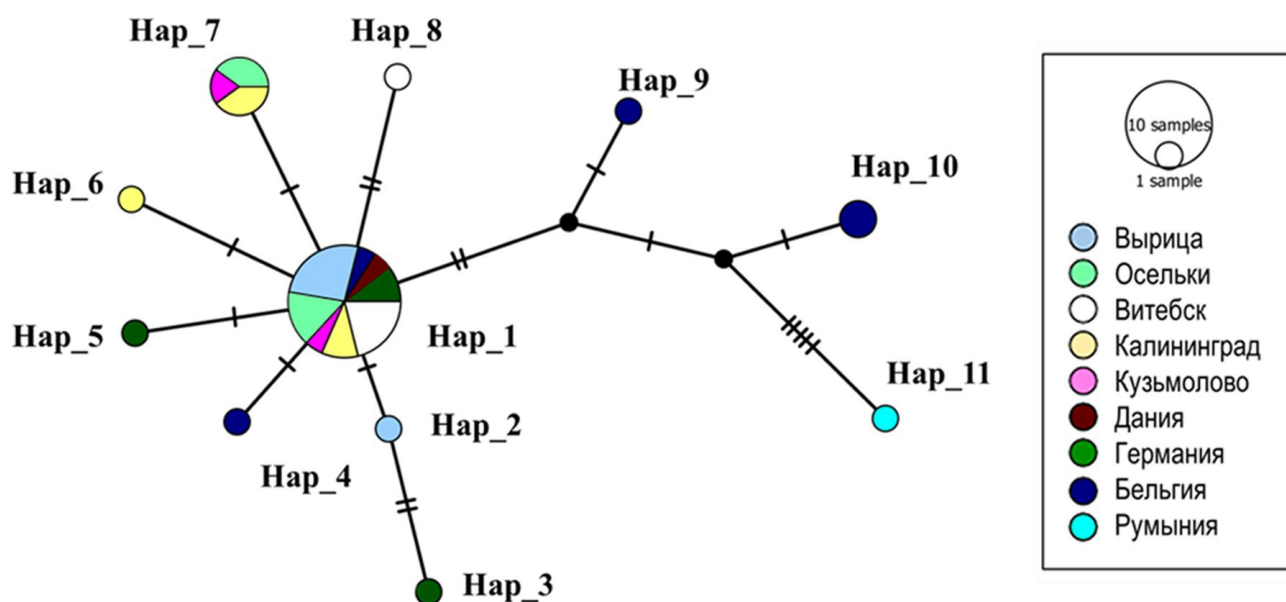


Рисунок 2. Разнообразие гаплотипов гена *cox1* моллюсков *P. corneus*. Обозначения: размер кружочков пропорционален частоте встречаемости гаплотипа; штриховки показывают нуклеотидные замены; цветами обозначены разные популяции; чёрные кружки обозначают гипотетические гаплотипы. Длина выравнивания – 606 п.н.

Выявлена большая вариабельность конхологических признаков. По строению половой системы моллюски из разных точек сбора не различаются. Хромосомная формула – $2n=18m+18sm=36$. Различий между кариотипами моллюсков из разных популяций не найдено. Генетические дистанции по участкам рДНК (1653 п.н.) и участкам митохондриальных генов *cox1* (606 п.н.) и *cytB* (575 п.н.) находятся в пределах внутривидовых для сем. Planorbidae (табл. 1). Выявлено 12 гаплотипов гена *cytB* и 11 гаплогипов гена *cox1* (рис. 2). На филогенетических реконструкциях все образцы *P. corneus* формируют единую кладу (Prokhorova et al., 2015a). По данным RAPD-анализа установлен небольшой внутри- и межпопуляционный генотипический полиморфизм, средний коэффициент подобия по Дайсу – 0.78 (Прохорова и др., 2014).

Моллюски *Planorbis planorbis* (сем. Planorbidae) распространены в Европе, Северной Африке, южной части Сибири и средней Азии (Glöer, 2002). Обитают в пресных, преимущественно стоячих и медленно текущих водоёмах (Жадин, 1952).

В модельных водоёмах моллюски морфологически однородны. Генотипирование по участку рДНК (3792 п.н.) подтвердило принадлежность использованных в работе окаймлённых катушек к виду *P. planorbis*. Нуклеотидные последовательности моллюсков из модельных водоёмов полностью идентичны между собой и на 99.99% совпадают с последовательностями моллюсков из Европы и Африки. Таким образом, для вида характерна небольшая генетическая вариабельность, что делает его удобным модельным объектом для изучения защитных реакций.

Моллюски *Succinea putris* (сем. Succineidae) имеют транспалеарктическое распространение (Кантор, Сысоев, 2005). Основной ареал включает территорию Европы и Западной Сибири. Встречаются как во влажных биотопах (заросли по берегам пресных водоёмов, овраги), так и в относительно сухих местах обитания – на высокотравных лугах, кустарниках, в мелколесье (Лепнева и др., 1950). Формируют специфические паразито-хозяйинные отношения с трематодами рода *Leucochloridium* и паразитами других групп (Токмакова, Прохорова и др., 2025).

Вид характеризуется морфологическим полиморфизмом и на части ареала встречается совместно с другими схожими видами янтарок. Проведённая идентификация по строению раковины, радулы и половой системы не выявила достоверных различий между улитками из разных популяций. Генотипирование по участку рДНК (1653 п.н.) и фрагментам генов *cox1* (606 п.н.) и *cytB* (575 п.н.) показало незначительную генотипическую вариабельность вида (табл. 1). Ввиду консервативности участков рДНК для определения янтарок могут быть использованы вторичные структуры транскриптов ITS2 (Prokhorova et al., 2020).

Таблица 1. Средние генетические дистанции, полученные на основе анализа нуклеотидных последовательностей моллюсков модельных видов

Маркер Вид	Внутривидовая дистанция / межвидовая дистанция для рода			
	ITS1	ITS2	<i>cytB</i>	<i>cox1</i>
<i>P. corneus</i>	0.029 / —	0.009 / —	0.009 / —	0.0210 / —
<i>P. planorbis</i>	0 / —	0 / —	—	—
<i>B. glabrata</i>	0.0153	0.0702	0.022	0.013
<i>B. pfeifferi</i>	0.027 / 0.278	0.0041 / 0.0974	0.011 / 0.118	0.025 / 0.062
<i>S. putris</i>	0 / —	0 / 0.1108	0.008 / —	0.005 / 0.177
<i>L. stagnalis</i>	0.010 / 0.188	0.0121 / 0.0520	—	—
<i>A. lagotis</i>	0.019 / 0.043	0.0020 / 0.0197	—	—
<i>C. lubrica</i>	0.003 / 0.076	0.0024 / 0.0109	—	—

Моллюски *Lymnaea stagnalis* (сем. Lymnaeidae) являются одним из наиболее распространённых пресноводных видов Голарктики. Ареал простирается от Северной Африки через Европу до Северной и Центральной Азии и Северной Америки (Винарский, Кантор, 2016). Вид завезён в Тасманию и Новую Зеландию (Жадин, 1952). Встречаются в стоячих, медленно текущих и пересыхающих водоёмах. Моллюски из разных водоёмов имеют разную окраску, толщину и рисунок исчерченности раковины. Варьируют форма последнего оборота, форма устья, интенсивность пигментации тела и мантии. Эти признаки у прудовиков сильно зависят от факторов среды (Винарский, 2016).

Генотипирование прудовиков из модельных водоёмов из по рДНК (853 п.н.) показало их соответствие типовым последовательностям *L. stagnalis* (Vinarski, 2015; Aksenova et al., 2023, 2024; Vinarski, 2024). Идентичность участков ITS1–5.8S–ITS2 между всеми особями составляет 99–99.5%. Тем не менее, ввиду морфологической вариабельности при заборе прудовиков из нового модельного водоёма необходимо подтверждать видовую принадлежность генотипированием.

Моллюски *Ampullaceana lagotis* (сем. Lymnaeidae) распространены в Европе, Сибири и некоторых районах Центральной Азии (Glöer, 2002; Винарский, Кантор, 2016). Предпочитают стоячие или медленно текущие воды, встречаются в озерах, ручьях с непостоянным водным режимом (Жадин, 1952).

Использованные в работе моллюски из озёр Укок и Кальджин-Коль (плоскогорье Укок) различались по характеристикам раковины, но анализ строения половой системы не выявил достоверных различий между популяциями (Атаев,...Prokhorova, Glupov, 2024a). Генотипирование по участку рДНК (1515–1771 п.н.) и гену *cox1* (656–659 п.н.) подтвердило принадлежность всех образцов к одному виду – *A. lagotis* (табл.1). Ввиду большой морфологической вариабельности вида моллюсков *A. lagotis* из новых водоёмов необходимо генотипировать перед использованием в качестве модельных объектов.

Моллюски *Cochlicopa lubrica* (Сем. Cochlicopidae) распространены в Голарктике. Эврибионтный вид, населяет биотопы с мезофильными условиями. Чаще встречаются в подстилке, траве, мху (Шилейко, 1978; Кантор, Сысоев, 2005). Определение моллюсков рода *Cochlicopa* затруднено из-за схожего строения их раковин (Шилейко, 1984).

В результате генотипирования *C. lubrica* были получены участки рДНК, длиной 1670 п.н., которые оказались идентичными для всех исследованных особей. Генетическая дистанция с образцами кохликоп из Европы также невелика (табл. 1). На филогенетической реконструкции на одной ветви с моллюсками *C. lubrica* кластеризуется образец *C. lubricella* из Великобритании (рис. 3). Данный вид имеет спорное таксономическое положение и по мнению некоторых исследователей является надвидовым комплексом (Ambruster, Schlegel, 1994).

Генетическая однородность *C. lubrica*, связанная с автогамией, делает вид перспективным объектом для сравнительно-иммунологических исследований. Однако сложность морфологического определения и спорный статус *C. lubricella*, приводят к необходимости генотипирования улиток из новых точек сбора.

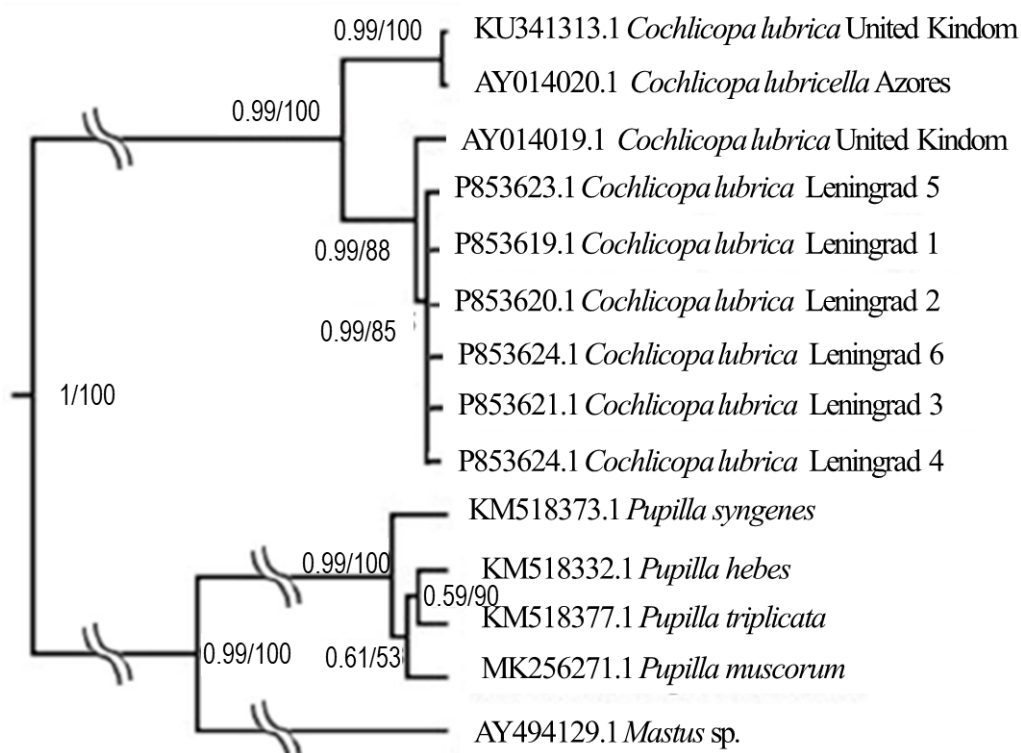


Рисунок 3. Баесовская филогенетическая реконструкция моллюсков рода *Cochlicopa* на основании участка ITS2–5.8S рДНК (660 п.н.). Обозначения: указаны бутстрепные поддержки для 1000 реплик для ML и значения апостериорных вероятностей для BA.

Моллюски *Arianta arbustorum* (сем. Helicidae) распространены в Северной и Центральной Европе (Schileyko, 2013). На территории России является вселенцем, отмечен в Центральной и Северо-Западной частях страны (Шиков, 2022). Предпочитают широколиственные и мелколиственные пойменные леса, заселяет парки, сады, высокотравье (Gloer, 2002). *A. arbustorum* хорошо содержится в лабораторных условиях.

Древесные улитки из природной популяции, использованной в исследовании, были выборочно генотипированы по участку рДНК (1598–1656 п.н.). Полученные последовательности идентичны на 96.32–99.94% представленным в GenBank последовательностям *A. arbustorum*. На филогенетической реконструкции образцы объединяются с улитками из разных регионов Европы. Это может свидетельствовать об их происхождении из разных источников. *A. arbustorum* удобен для сравнительно-анатомических и физиологических исследований благодаря массовости и неприхотливости в содержании (Zhuravlev et al., 1999; Gittenberger et al., 2004).

Моллюски *Biomphalaria pfeifferi* и *B. glabrata* (сем. Planorbidae) представлены в работе лабораторными линиями. В природе биомфаларии встречаются в небольших реках, ручьях, прудах и болотах (Brown, 1994). Естественный ареал *B. glabrata* простирается от Больших Антильских островов до южной Бразилии. Ареал *B. pfeifferi* включает Западную, Восточную и Южную Африку (Brown, 1994). Представители рода *Biomphalaria* служат промежуточными хозяевами трематод рода *Schistosoma*, вызывающих различные варианты шистосомозов у человека (Беэр, Воронин, 2011). В связи с этим они стали основными моделями для изучения иммунитета pulmonat и культивируются в лабораториях более полувека (см. Прохорова, Атаев, 2008). Моллюски лабораторных линий (Paraense, Correa, 1963) были предоставлены коллегами из Университета Перпиньяна (Франция) в 2000 году. С тех пор культуры содержатся в Лаборатории экспериментальной зоологии РГПУ им. А. И. Герцена.

Обсуждение к разделу III. 1

Исследованные в работе модельные виды моллюсков отвечают нескольким требованиям. В первую очередь были использованы виды моллюсков, широко распространённые на территории европейской части России, которые являются объектами зоологических и физиологических исследований, а также служат промежуточными хозяевами трематод. Были выбраны представители пяти разных семейств, в том числе виды с разными местами обитания – пресноводные и наземные. Кроме того, в работе задействованы моллюски двух лабораторных линий – традиционных модельных объектов для изучения иммунитета pulmonat.

Для исследуемых нами популяций моллюсков *P. corneus*, *P. planorbis*, *L. stagnalis*, *S. putris*, *A. arbustorum*, *C. lubrica* показан небольшой генотипический полиморфизм по исследуемым маркерам. Это позволяет рассматривать виды в качестве модельных объектов для изучения иммунитета pulmonat, выявления общих закономерностей иммунных реакций и их видовых особенностей.

III.2. Гемоциты как специализированные клетки врождённого иммунитета лёгочных моллюсков

Клетки гемолимфы моллюсков всех модельных видов относятся к двум основным **морфологическим типам** – гранулоцитам и гиалиноцитам. **Гранулоциты** – крупные клетки, хорошо распластывающиеся на субстрате, и активно формирующие лобоподии и филоподии (рис. 4). Цитоплазма богата органеллами: содержит небольшие диктиосомы, мультивезикулярные тела, митохондрии и развитый гранулярный ЭПР. Во внутреннем слое цитоплазмы гранулоцитов содержатся гранулы. Ядро овальной или бобовидной формы, расположено эксцентрично, содержит глыбки гетерохроматина, ядрышко отсутствует (Prokhorova et al., 2018). Форма клетки, размер и количество цитоплазмы значительно варьируют. **Гиалиноциты** – клетки овальной или

округлой формы, плохо распластывающиеся на субстрате. Иногда формируют лобоподии. Ядро округлое, хроматин диффузный, ядрышко хорошо выражено. В цитоплазме располагаются многочисленные свободные рибосомы, аппарат Гольджи, немногочисленные митохондрии (рис. 4). В среднем 0.46–1.5 % от гемоцитов в мазках представлены гиалиноцитами с очень высоким ЯЦО (до 0.9) – «малыми гиалиноцитами». Все гемоциты имеют хорошо развитый цитоскелет (Serebryakova,...Prokhorova, Ataev, 2022). Для гемоцитов обоих типов характерна значительная вариабельность морфологических параметров. Некоторые клетки имеют промежуточный морфотип.

Морфологические особенности гемоцитов и их **соотношение** варьируют у моллюсков разных видов (рис. 4, табл. 2). Цитометрический анализ гемолимфы подтвердил присутствие в гемолимфе клеток двух основных типов – гемоцитов с небольшими параметрами FS и SS (популяция А, соответствует гиалиноцитам) и гемоцитов с большими параметрами FS и SS (соответствуют гранулоцитам). Поскольку гранулоциты сильно варьируют по размеру и гранулярности, по данным цитометрии они распадаются на две популяции – В и С (рис. 5А, 5Б). Полученные изображения гемоцитов в проточной ячейке цитометра Amnis и сортировка клеток с последующим морфологическим анализом подтверждают соответствие выделяемых при цитометрии популяций основным морфотипам гемоцитов (Tokmakova,... Prokhorova, Ataev, 2020).

Таблица 2. Концентрация и размеры гемоцитов моллюсков модельных видов

Виды	Клеток в 1 мкл (Ме, диапазон)	Гранулоциты (диаметр, мкм)	Гиалиноциты (диаметр, мкм)
<i>B. glabrata</i>	160 (54–540)	14.03±4.5 × 27.57±6.6	7.21±1.01
<i>P. corneus</i>	437 (55–1900)	10.2±5.61 × 15.94±7.79	6.43±1.82 × 8.22±1.65
<i>P. planorbis</i>	490 (50–1812)	16.64±4.74	6.59±2.38
<i>L. stagnalis</i>	663 (90–2500)	22.03±3.67 × 40.89±6.01	12.07±0.95 × 15.62±1.41
<i>S. putris</i>	146 (108–192)	18.03±5.31	10.89±1.23
<i>C. lubrica</i>	87 (65–176)	11.03±2.6	6.01±1.23
<i>A. arbustorum</i>	231 (130–288)	24.35±8.6	14.03±3.11
ЯЦО		0.07–0.13	0.19–0.81

Численность гемоцитов в циркуляции и **соотношение** гранулоцитов и гиалиноцитов различаются у моллюсков разных видов (табл. 2, рис. 5Б). Так у *B. glabrata* число гранулоцитов обеих популяций (58.5%), больше ($p<0.05$), чем у *P. corneus* (54.34%). У обоих видов относительное количество гранулоцитов достоверно меньше ($p<0.05$), чем у *P. planorbis* (68.35%). У *L. stagnalis* относительное количество гранулоцитов (86.28%) достоверно выше ($p<0.05$), чем у видов моллюсков сем. Planorbidae. При этом для каждого из модельных видов характерна значительная внутривидовая вариабельность этих параметров.

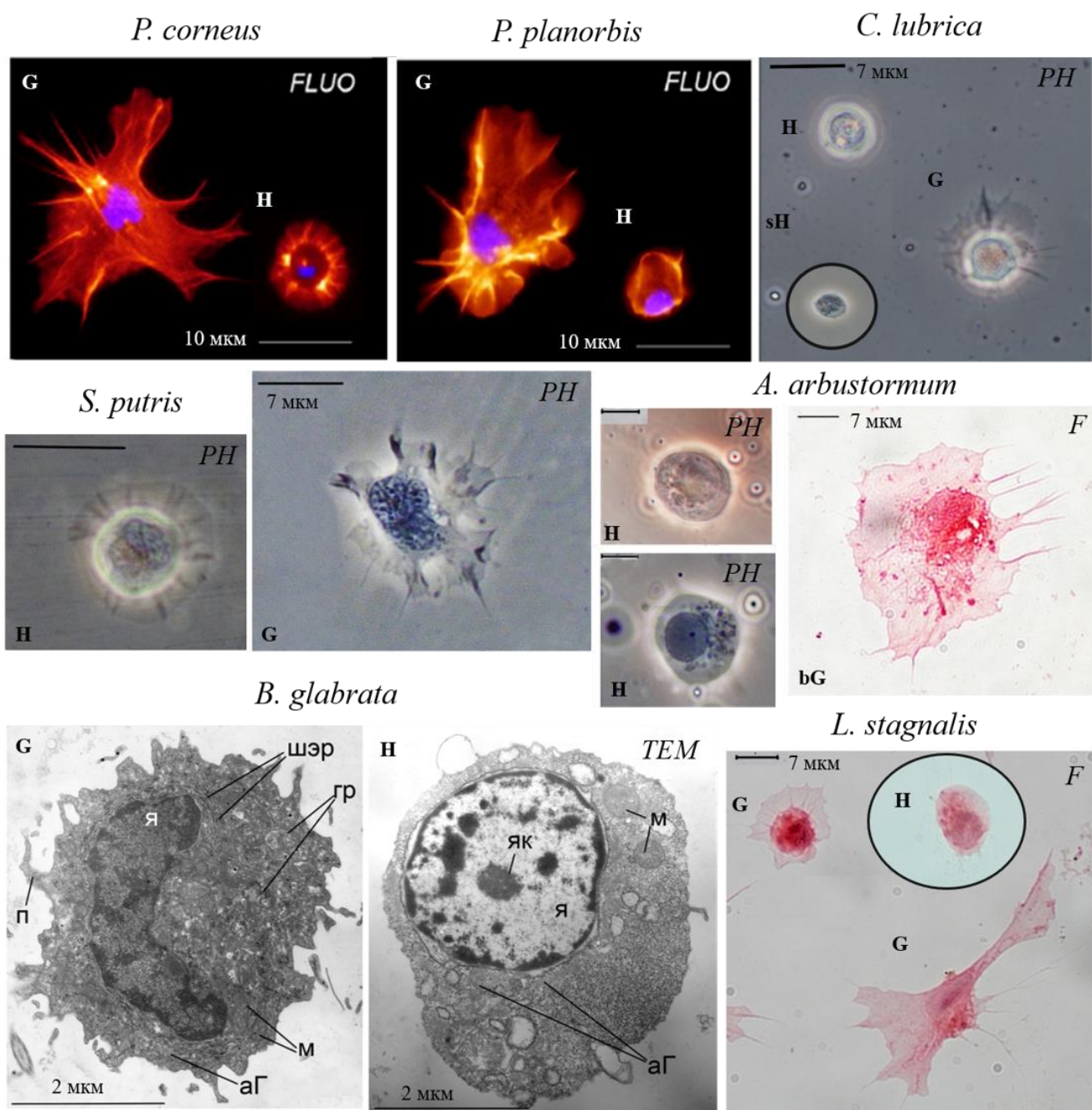


Рисунок 4. Гемоциты моллюсков модельных видов.

Обозначения: FLUO – окрашивание фаллоидин-родамином (красный) и Hoechst (синий); PH – живые клетки, фото в режиме фазового контраста; F – окрашивание гематоксилин-эозином; TEM – трансмиссионная электронная микроскопия; G – гранулоцит; H – гиалиноцит; bG – большой гранулоцит; sH – малый гиалиноцит; аГ – аппарат Гольджи; гр – гранулы; м – митохондрия; п – псевдоподия; шэр – шероховатый эндоплазматический ретикулум, я – ядро, як – ядрышко. Морфологический тип не обозначен для клеток, имеющих промежуточную между гранулоцитами и гиалиноцитами морфологию.

Для *P. corneus*, *P. planorbis*, *B. glabrata*, *L. stagnalis* установлены достоверные различия в концентрации и относительном количестве гранулоцитов и гиалиноцитов у моллюсков разных размерных классов. Наибольшая концентрация гемоцитов характерна для особей небольших размеров и самых крупных улиток.

Показана тенденция к уменьшению относительной доли гиалиноцитов с ростом размера раковины (Ataev, Prokhorova et al., 2016a). Для моллюсков *P. corneus* коэффициент корреляции между диаметром раковины (21–36 мм) и числом гиалиноцитов составляет $r = -0.95$, для *B. glabrata* (12–19 мм) – $r = -0.94$, для *P. planorbis* (8–15 мм) – $r = -0.86$, для моллюсков *L. stagnalis* (высота раковины 32–51 мм) – $r = -0.85$.

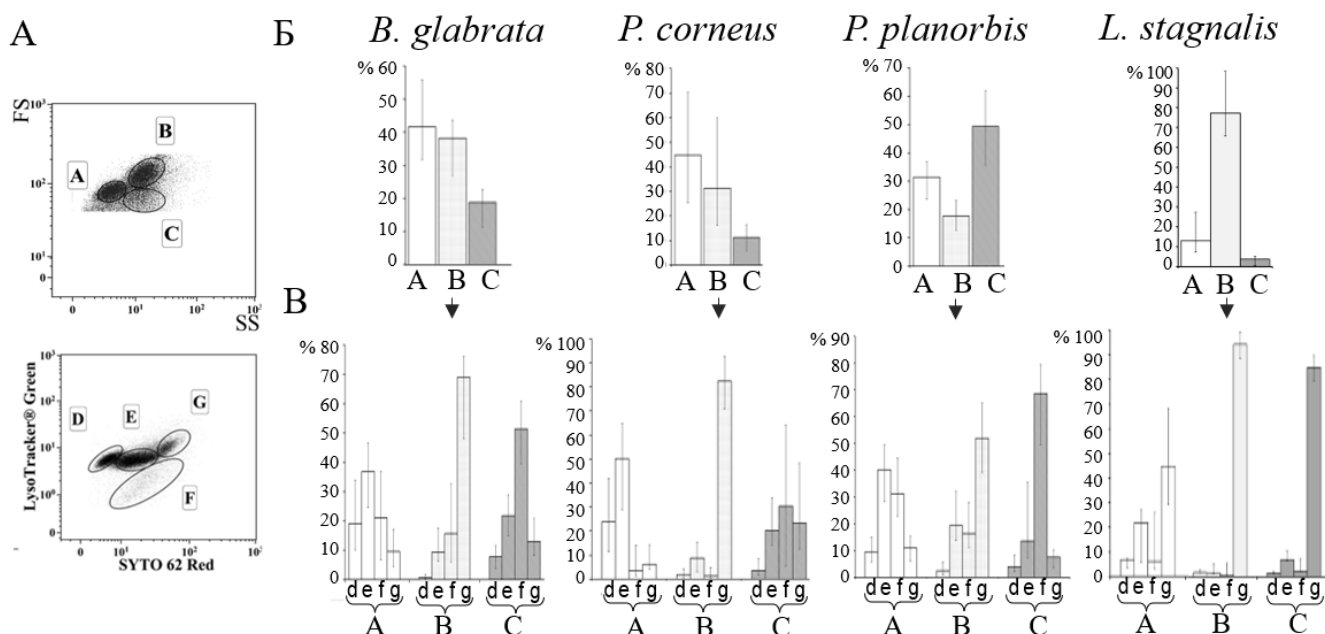


Рисунок 5. Популяции гемоцитов моллюсков по данным цитофлуориметрического анализа. А – цитограммы гемоцитов моллюска *P. corneus*; Б – соотношение популяций гемоцитов, выделяемых по параметрам FS и SS; В – соотношение групп гемоцитов, выделяемых при последовательном гейтировании по параметрам накопления красителей Syto62 и LysoTracker.

Обозначения: на гистограммах по осям абсцисс обозначены популяции и субпопуляции гемоцитов, по осям ординат – процент клеток относительно общего количества.

Функциональные особенности гемоцитов. В транскриптоме гемоцитов *P. corneus*, было предсказано 2687 закодированных молекул с доменами, гомологичными факторам врождённого иммунитета. Представлены **домены** факторов врождённого иммунитета всех групп. Большинство относятся к суперсемействам иммуноглобулинов и лектинов, а также факторам цитотоксичности разных групп (Orlov, ...Prokhorova, 2023).

В условиях *in vitro* гранулоциты проявляют **подвижность** и формируют **агрегации** – с другими гемоцитами, вокруг бактерий, партенит, метацеркарий трематод (рис. 6А–В). В состав агрегаций входит от 13.02 (у *C. lubrica*) до 46.42% (у *L. stagnalis*) гемоцитов в препаратах. Доля гемоцитов в составе агрегаций у иммунизированных моллюсков больше, чем у неиммунизированных: у *P. corneus* –

в среднем 39.20% и 26.63% ($p < 0.05$), у *L. stagnalis* – 83.31% и 46.42% соответственно.

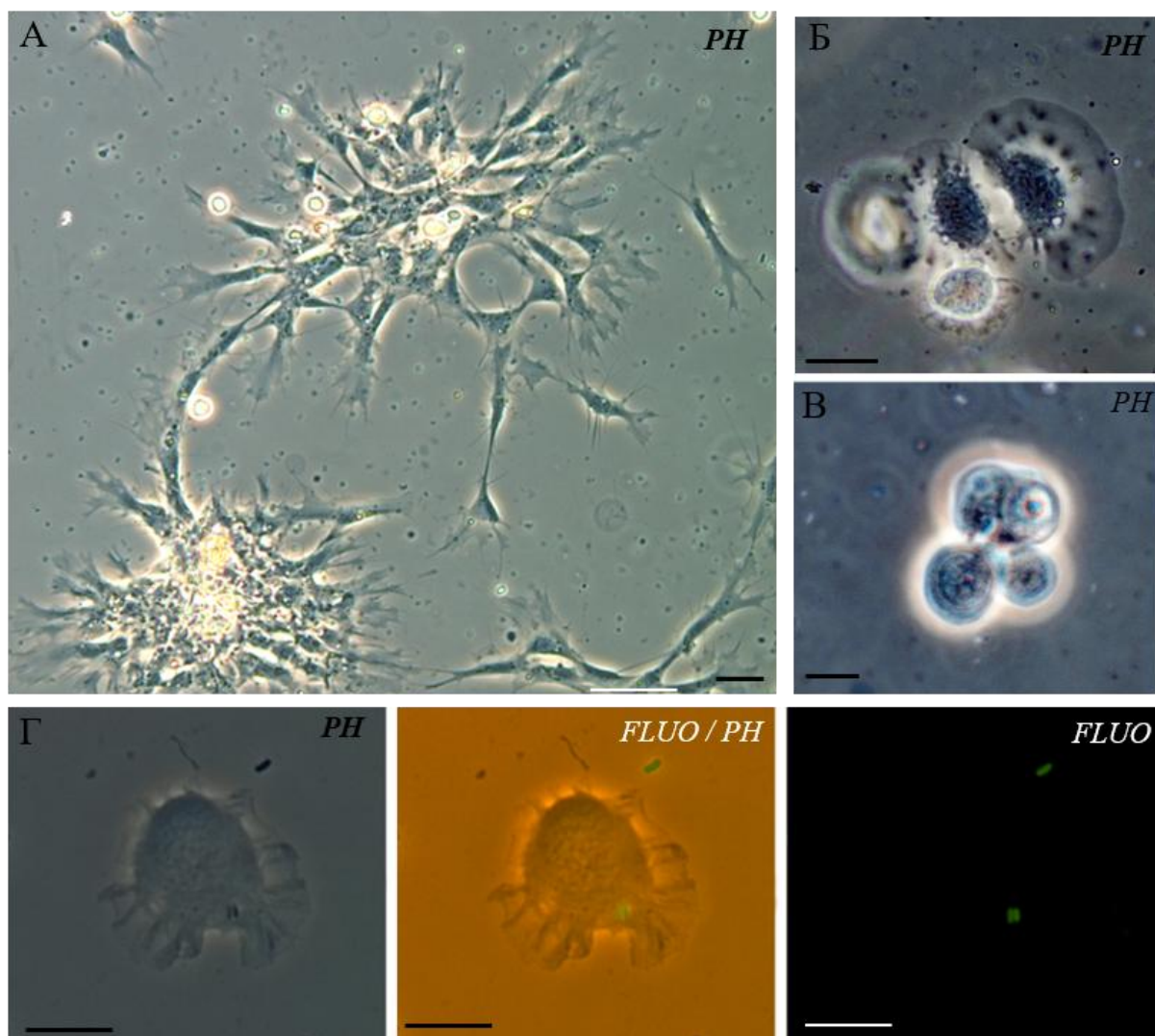


Рисунок 6. Проявления функциональной активности гемоцитов. А–В – агрегации гемоцитов (А–*L. stagnalis*; Б–*A. arbustorum*, В–*C. lubrica*), Г – фагоцитоз бактерий *in vitro* (*S. putris*). Обозначения: см. рис. 4. Масштабная линейка – 7 мкм.

Гранулоциты проявляют бóльшую **фагоцитарную активность**, чем гиалиноциты (Ataev, Prokhorova et al., 2016a). У моллюсков *P. corneus* фагоцитарную активность в отношении бактерий *E. coli* проявляют в среднем 22.40% гиалиноцитов и 40.82% гранулоцитов, в отношении *S. aureus* – 11.43% гиалиноцитов и 18.79% гранулоцитов. И гранулоциты, и гиалиноциты фагоцитируют *E. coli* в два раза чаще, чем *S. aureus* ($p < 0.05$ и $p < 0.01$). В аликвотах гемолимфы *P. corneus*, инкубированной с бактериями *E. coli*, отмечено снижение доли гиалиноцитов – в среднем с 48.93% до 35.58% ($p < 0.01$). В аликвотах гемолимфы *L. stagnalis* после инкубации с *E. coli* и *S. aureus* снижается доля гранулоцитов популяции В – в среднем с 69.64% до 41.57–50.40% ($p < 0.01$). Опсонизирующая активность в отношении разных бактерий у гранулоцитов и

гиалиноцитов не различается. Гемоциты моллюска *L. stagnalis*, интенсивнее фагоцитируют *S. aureus*, чем *E. coli* – в среднем 22.04% и 10.84% соответственно ($p < 0.01$). Гемоциты прудовиков, заражённых трематодами *E. revolutum*, активнее фагоцитируют бактерий, чем гемоциты незаражённых особей. Через 30 мин совместной инкубации в гемоцитах хорошо заметны вакуоли с бактериями (рис. 6Г).

Окрашивание гемоцитов красителями LysoTracker и SYTO62 с последующим цитофлуориметрическим анализом позволило выделить четыре **функциональные популяции** гемоцитов – D, E, F, C, отличающиеся по содержанию лизосом и метаболической (биосинтетической) активности (рис. 5В). С помощью последовательного гейтирования была определена доля клеток этих популяций среди гиалиноцитов и гранулоцитов (Прохорова и др., 2018а). Соотношение выделенных функциональных популяций гемоцитов различается у моллюсков разных видов (рис. 5В). У всех моллюсков среди гиалиноцитов преобладают клетки популяции E (субпопуляция Ae), для которых характерен средний уровень накопления лизосомного и нуклеинового красителей. У моллюсков сем. Planorbidae большая часть гранулоцитов относится к субпопуляции Bg, которая интенсивно окрашивается обоими флуорохромами. У моллюсков *L. stagnalis* большая часть гранулоцитов популяции B представлена клетками фракции E. Среди гранулоцитов популяции C у моллюсков сем. Planorbidae преобладают клетки субпопуляции F, которые слабо накапливают лизосомный краситель. У прудовика преобладает субпопуляция Cg (рис. 5В).

По интенсивности окисления КДФДА гемоциты моллюсков модельных видов были разделены на интенсивно продуцирующие **АФК** (АФК++) и относительно слабо вырабатывающие АФК (АФК+–). У моллюсков исследованных модельных видов среди гранулоцитов достоверно больше клеток АФК++, чем среди гиалиноцитов: у *P. corneus* – в среднем почти в 2 раза ($p < 0.05$), у *P. planorbis* – более, чем в 2 раза ($p < 0.01$), у *B. glabrata* – в 3 раза ($p < 0.01$), у *L. stagnalis* – в 1.5 раза ($p < 0.05$). У моллюсков *P. corneus*, заражённых трематодами *R. exasperatum* и *E. spiniferum*, гемоцитов группы АФК++ достоверно меньше, как среди гранулоцитов (в среднем 2 раза, $p < 0.01$), так и среди гиалиноцитов (в среднем 2 раза, $p < 0.01$).

Гемопозитические структуры, схожие по расположению и строению, были найдены у моллюсков четырёх модельных видов – *B. glabrata*, *B. pfeifferi*, *P. corneus* и *P. planorbis*. У этих планорбид местом гемопоза является АПО, расположенный вблизи почки и приуроченный к перикардiallyму эпителию. АПО состоит их групп округлых, овальных или вытянутых клеток – узелков. Их число колеблется от 3 до 10. В узелках у незаражённых улиток содержится 28–105 клеток, расположенных рыхло. Расстояние между соседними узелками достигает до 50 мкм. Вблизи АПО присутствуют клетки, морфологически соответствующие гиалиноцитам с высоким ЯЦО.

При заражении моллюсков *B. glabrata* мирацидиями трематод *E. caproni* происходит активация АПО В составе узелков наблюдаются митозы, количество клеток в них и размер узелков увеличиваются. Узелки достигают максимальных размеров у моллюсков резистентной линии через 4 сут п.з., у моллюсков чувствительной линии – через 5 сут п.з. Для резистентных моллюсков характерны максимальные показатели числа клеток в узелках (550 ± 15.7 клеток). К 10–14 сут п.з. АПО возвращается в исходное состояние (Атаев, Прохорова, 2013).

Циркулирующие гемоциты моллюсков *B. glabrata*, *P. corneus*, *P. planorbis*, *L. stagnalis* и *S. putris* включают аналог тимидина EdU. Цитометрический анализ с использованием нуклеин-связывающего красителя DAPI показал, что доля гемоцитов в фазе G2/M составляет 0.31–6.19% (Tokmakova, ...Prokhorova, Ataev, 2020).

Обсуждение к разделу III.2

Данные морфологического и цитометрического анализа подтверждают деление гемоцитов пульмонат на два основных морфологических типа – гранулоциты и гиалиноциты. Некоторые авторы выделяют в отдельные типы клетки с промежуточной между гиалиноцитами и гранулоцитами морфологией (Matricon-Gondran, Letocart, 1999; Cavalcanti et al., 2012). Однако отсутствуют признаки, которые позволили бы достоверно различать разные типы гемоцитов. Более того, гемоциты могут изменять свои морфологические характеристики на протяжении инкубирования (Прохорова, 2009) или участия в клеточной реакции (Lie, Heyneman, 1976a; Ataev, Coustau, 1999). Использование биохимических маркеров и антител также не позволяет разделить гемоциты разных типов (Dikkeboom et al., 1988; Ottaviani, Montagnani, 1989). Транскриптомные метки единичных гемоцитов *B. glabrata* «образуют континуум» и свидетельствуют об их большой пластичности и «возможности задействовать разные пути активации» (Pichon et al., 2022). Таким образом, гиалиноциты и гранулоциты представляют собой полиморфные клеточные типы, чёткая граница между которыми отсутствует. Это позволяет предположить, что морфологические типы гемоцитов являются вариантами клеток единой клеточной линии, находящимися на разных этапах дифференцировки и функциональной специализации. По всем характеристикам (продукции АФК, фагоцитарной активности, подвижности) гранулоциты проявляют себя как более активные иммуноциты.

Численность и соотношение гемоцитов разных типов в циркуляции являются видоспецифическими признаками. Для этих параметров также характерна большая внутривидовая вариабельность. На концентрацию и активность гемоцитов влияют многие факторы среды (Nelson et al., 2016; Сокольников, 2021). Доля гранулоцитов увеличивается по мере увеличения размера моллюсков, а также при иммунизации (Атаев, Prokhorova et al., 2016a). Рост численности гемоцитов и повышение доли гранулоцитов были неоднократно показаны в опытах с экспериментальной

иммунизацией улиток (Ataev, Coustau, 1999; Barcante et al., 2012). Это также подтверждает роль гранулоцитов как основных функционально активных клеток иммунных реакций.

Полученные данные подтверждают роль АПО как универсального источника гемопоэза пульмонат. Теоретически существование АПО не противоречит возможности деления клеток гемолимфы на периферии. Однако пока не удалось убедительно подтвердить, что пролиферация клеток на периферии вносит значимый вклад в пополнение пула гемоцитов: доля клеток с признаками синтеза ДНК невелика. Кроме того, включение аналогов нуклеотидов в ДНК может происходить не только при репликации, но и при репарации (Wiley et al., 2019; Tokmakova, ... Prokhorova, Ataev, 2020).

III.3. Распознавание чужеродного в иммунном ответе лёгочных моллюсков

В транскриптоме гемоцитов *P. corneus* выявлено 1776 транскриптов, кодирующих ПРР, что составляет более половины всех выявленных иммуноассоциированных транскриптов. Среди них присутствуют транскрипты ПРР всех основных групп. Самыми представленными оказались транскрипты лектинов, членов иммуноглобулинового суперсемейства, молекул адгезии и ТПР (Прохорова и др., 2024). На основе предсказанных аминокислотных последовательностей транскриптов определена доменная структура кодируемых ими белков (рис. 10).

Среди ПРР *P. corneus* присутствуют, как мембранные, так растворимые молекулы. Доменный состав ряда предсказанных ПРР уникален и ранее не описывался у других животных. В частности, выявлены уникальные варианты С-лектинов, содержащие домены LINK (рис. 7: 1), домен CUB (рис. 7: 5), 13 доменов ЭФР, (рис. 7: 4). Предсказан вариант молекулы фуколектина с липид-связывающим доменом MD, среди ФБ – варианты молекул с PAN/Apple-подобным доменом (рис. 7: 8) и доменом SCAN (Прохорова и др., 2024). Из четырёх вариантов СР *P. corneus* только один имеет описанный ранее доменный состав (рис. 7: 17–20).

ТПР роговой катушки представлены 11 вариантами рецепторов с каноничной структурой (Бобровская, ... Прохорова, 2024). Кроме того, выявлены транскрипты, кодирующие либо LRR-домены, либо TIR-домен (рис. 7: 13–16). Идентичность аминокислотных последовательностей TIR-доменов *P. corneus* с TIR-доменами пульмонат других видов составляет 49.27–70.03%. Часть последовательностей ТПР ближе *P. corneus* к ТПР прозобранхий, двустворчатых моллюсков и полихет.

Рецепторы распознавания нуклеотидов представлены двумя вариантами RIG-I-подобных рецепторов и молекулой с доменом HOLI, который обеспечивает связывание ДНК (рис. 7: 21–22). Предсказанные варианты молекул адгезии – интегринов, селектинов, МКА разнообразны по структуре, но во всех случаях

содержат стандартный набор доменов, характерный для молекул этих групп (рис.7: 23–24).

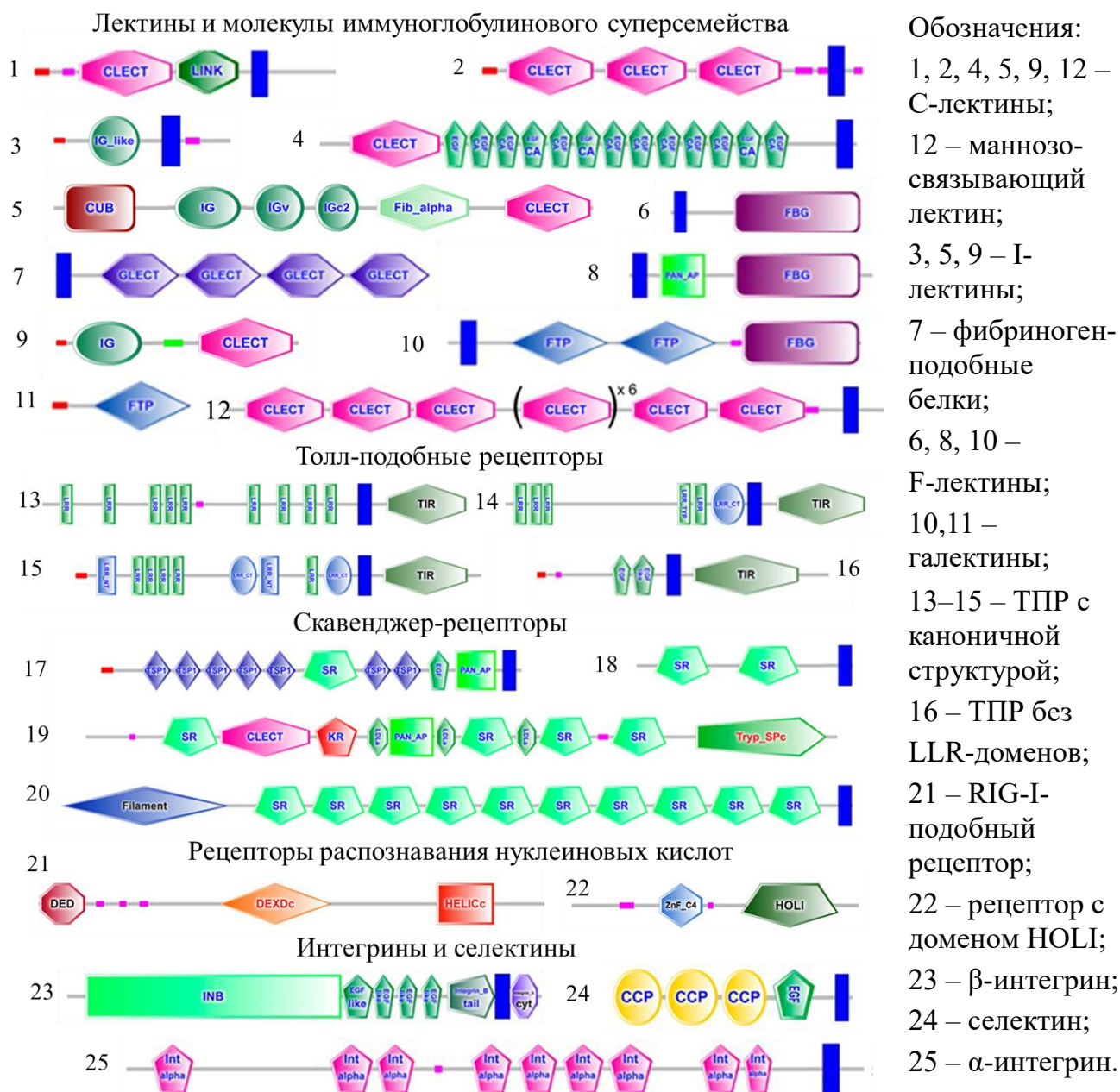


Рисунок 7. Варианты предсказанной доменной структуры патогенраспознающих рецепторов и молекул адгезии гемоцитов моллюсков *P. corneus*.

Для анализа *экспрессии генов, кодирующих ПРР*, были использованы данные транскриптома гемоцитов моллюсков *P. corneus*, заражённых трематодами *B. polonica*. Согласно метрике TPM, общая представленность транскриптов всех групп ПРР не различается у незаражённых и заражённых улиток. Однако анализ по группам рецепторов позволил выявить такие различия: у заражённых моллюсков выше относительная представленность хилектинов, Н-лектинов и F-лектинов, но снижена экспрессия коллектинов. Также выявлены различия для генов ТПР: транскриптов РсТПР2 и РсТПР7 больше в гемоцитах незаражённых улиток, а

РсТТР3, РсТТР10 и РсТТР11 – в гемоцитах заражённых (Бобровская,...Прохорова, 2024).

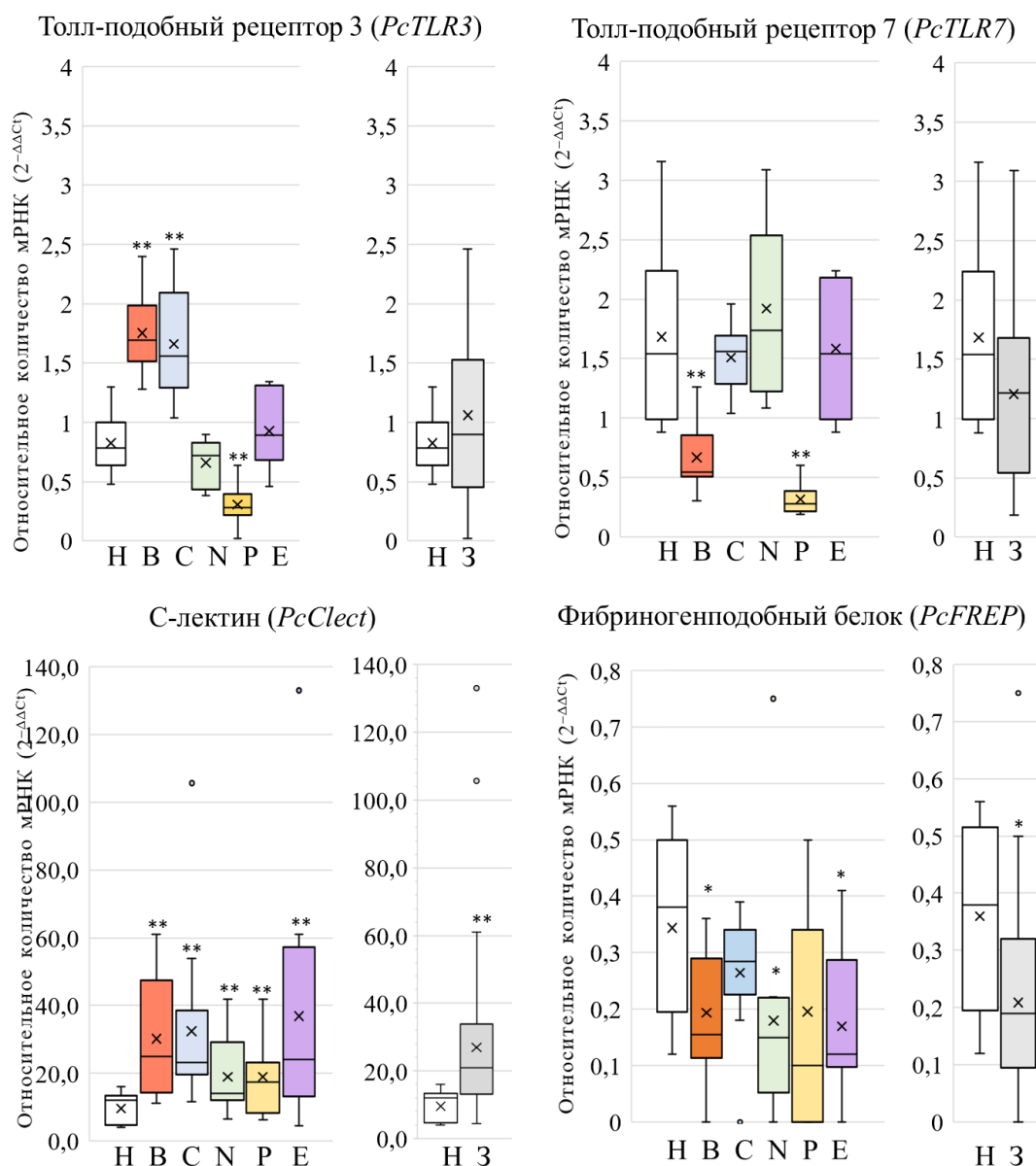


Рисунок 8. Относительный уровень экспрессии генов ПТР и β -интегрина в гемоцитах моллюсков *P. corneus*.

Обозначения: Н – незаражённые; З – заражённые (вся выборка); заражённые трематодами разных видов: В – *B. polonica*, С – *C. brevis*, N – *N. ephemera*, Р – *P. multiglandularis*, Е – *E. spiniferum*. Значимые различия относительно незаражённых: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.001$.

Анализ экспрессии ПТР в гемоцитах моллюсков *P. corneus* методом ОТ-ПЦР со специфическим праймерами, выявил достоверные различия в экспрессии генов ряда ПТР у моллюсков, заражённых трематодами разных видов (рис. 8). Экспрессия гена С-лектина повышается во всех группах заражённых моллюсков, однако у заражённых *P. multiglandularis* и *N. ephemera* экспрессия гена ниже, чем в других группах заражённых ($p < 0.01$) (Прохорова и др., 2010b). Для гена, кодирующего ФБ – *PcFREP*, – установлено снижение экспрессии во всех группах заражённых улиток, при этом количество мРНК достоверно больше у заражённых *C. brevis*, чем у заражённых *N. ephemera* ($p < 0.05$). Для гена *PcTPR3* выявлено повышение

экспрессии у заражённых *B. polonica* и *C. brevis* моллюсков, и снижение экспрессии – у заражённых *P. multiglandularis* (рис. 8). Экспрессия гена *PcTPR7* ослаблена у улиток, заражённых *B. polonica* и *P. multiglandularis* (Прохорова и др., 2025).

Обсуждение к разделу III.3.

У лёгочных моллюсков присутствуют ПРР всех основных групп. Большинство описанных ПРР *P. corneus* и других моллюсков могут быть отнесены к тем же классам, что и ПРР позвоночных. Но помимо вариантов рецепторов с каноничной структурой, у моллюсков встречаются варианты лектинов (Adema et al., 1997; Moy et al., 2008), СР (Wei et al., 2018), ТПР (Kron, 2022; Bobrovskaya, Ataev, Prokhorova, 2026), рецепторов распознавания нуклеотидов (Kron, 2022) с уникальными сочетаниями доменов. Такие варианты не всегда укладываются в принятую классификацию ПРР. Классификацию затрудняет также скудность данных о лигандной специфичности ПРР моллюсков (Zhang et al., 2009; Wang et al., 2012). Поэтому для систематизации ПРР лёгочных моллюсков целесообразно использовать перекрёстную классификацию по набору доменов. Она помогает прогнозированию функций белков с новыми сочетаниями доменов.

ПРР моллюсков характеризуются значительным межвидовым разнообразием. Так в пределах сем. Planorbidae ФБ каноничной структуры выявлены только у представителей рода *Biomphalaria* (Прохорова, Атаев, 2021). У *P. corneus* выявлены варианты СР, которые не описаны у других пульмонат (рис. 7). Разнообразие ПРР моллюсков превосходит разнообразие ПРР позвоночных животных. При отсутствии специфических АРР расширение репертуара распознаваемых лигандов достигается за счёт увеличения количества вариантов ПРР, набор которых генотипически запрограммирован и определяется, вероятно, конкретным набором патогенов, с которым взаимодействует вид.

Профиль экспрессии ПРР в гемоцитах различается у улиток, заражённых паразитами разных видов. Избирательное повышение экспрессии генов отдельных ПРР также показано в работах с экспериментальной иммунизацией (Mitta et al., 2005; Adema et al., 2010; Zhao et al., 2018). Специфичное повышение экспрессии отдельных ПРР при заражении паразитами разных видов свидетельствует об избирательности участия ПРР в распознавании лигандов, либо разной их эффективности по отношению к различным ПАМП. Избирательность распознавания патогенов ПРР у лёгочных моллюсков является наиболее вероятным механизмом тренированного иммунитета (Portela et al., 2013; Pinaud et al., 2016).

III.4. Проявления иммунных реакций лёгочных моллюсков

Наиболее универсальными вариантами **клеточной реакции** у лёгочных моллюсков являются: фагоцитоз (см. раздел III.2) и инкапсуляция. **Гемоцитарные капсулы** формируются вокруг партенит, метацеркарий трематод, ксенотрансплантатов. Уже через 24 ч после введения в ногу моллюска *P. corneus*

ксенотрансплантата наблюдается формирование гемоцитарных капсул, которые изолируют патогена от окружающих тканей и купируют раневой канал (Прохорова и др., 2015b). Капсулы вокруг трансплантатов и паразитов имеют схожее строение: включают несколько concentрических слоёв гемоцитов которые не плотно прилегают к патогену, оставляя просвет (рис. 9А).

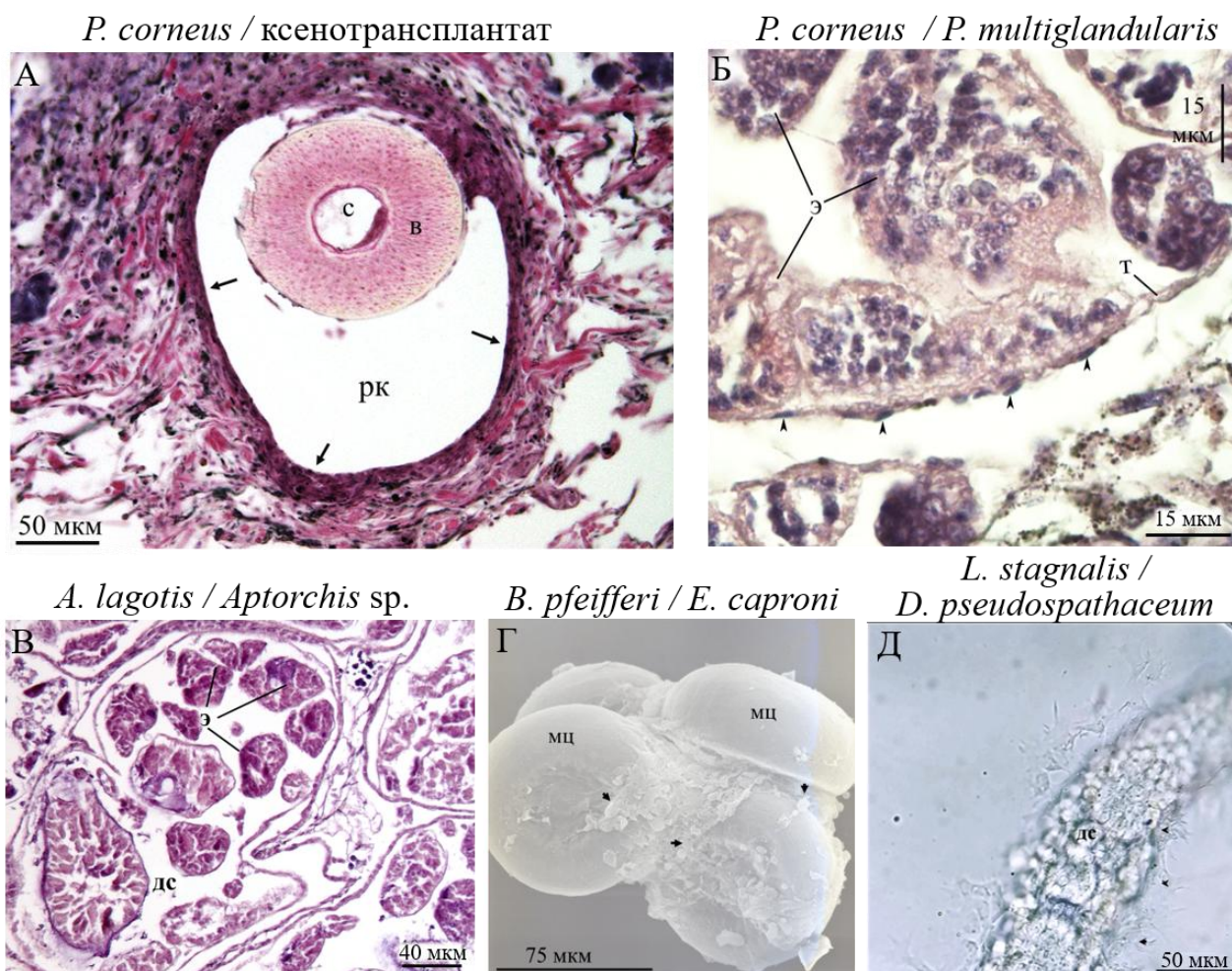


Рисунок 9. Варианты проявления клеточной реакции у лёгочных моллюсков. А – гемоцитарная капсула, Б – гемоцитарная мантия; В – отсутствие выраженной реакции при зрелом заражении; Г – агглютинация гемоцитами метацеркарий; Д – изоляция паразита гемоцитами.

Обозначения: в – вибрисс, с – сердцевина вибриссы, рк – раневой канал, э – эмбрионы церкарий, т – тегумент, г – гемоциты, мц – метацеркарии, дс – дочерняя спороциста.

При заражении некоторыми трематодами также наблюдается своеобразный вариант клеточной реакции – формирование однослойной **гемоцитарной мантии**. Гемоциты оседают на поверхности спороцист, распластываются и уплощаются, при этом не наблюдается признаков их деструктивного влияния на тегумент паразита (рис. 9Б). Такая мантия формируется у моллюсков *P. corneus* вокруг спороцист трематод *P. multiglandularis* (Serebryakova,...Prokhorova, Ataev, 2022) и у моллюсков *S. putris* на центральной части столона спороцист *L. paradoxum*

(Ataev,...Prokhorova, 2024b). Гемоциты также формируют скопления вблизи паразитов и участвуют в их **агглютинации** (рис. 9Г, Д).

В случае зрелых заражений моллюсков партенитами трематод не всегда наблюдается выраженная клеточная реакция. У моллюсков *P. corneus*, заражённых трематодами *B. polonica*, в гепатопанкреасе присутствуют многочисленные спороцисты с развивающимися в них эмбрионами церкарий, вокруг которых нет заметных скоплений гемоцитов. Схожая картина наблюдается и в гепатопанкреасе моллюсков *A. lagotis*, заражённых трематодами *Aptorchis* sp. В области локализации спороцист видны лишь единичные гемоциты обычной морфологии (рис. 9В).

Иммунизация оказывает влияние на гемоцитарный состав. Так иммунизация бактериями вызывает повышение численности гемоцитов у моллюсков через 24–48 ч п.з.: у *B. glabrata* в среднем до 160 клеток в 1 мкл ($p<0.005$), у *L. stagnalis* – до 682 ($p<0.01$), у *P. corneus* – до 466 ($p<0.01$), у *P. planorbis* – до 503 ($p<0.01$). У моллюсков со зрелыми заражениями партенитами трематод не всегда наблюдается выраженный рост количества гемоцитов.

Иммунизация моллюсков *B. glabrata* бактериями *E. coli* приводит к изменению соотношения гемоцитов разных типов в циркуляции. Уже через 1 ч после инъекции суспензии бактерий снижается количество гиалиноцитов и увеличивается доля гранулоцитов популяции В. Тенденция сохраняется до 12 ч, но через 24 ч после иммунизации количество гиалиноцитов возрастает в 2 раза ($p<0.01$), а доля гранулоцитов популяции В снижается в среднем в 1.5 раза ($p<0.01$).

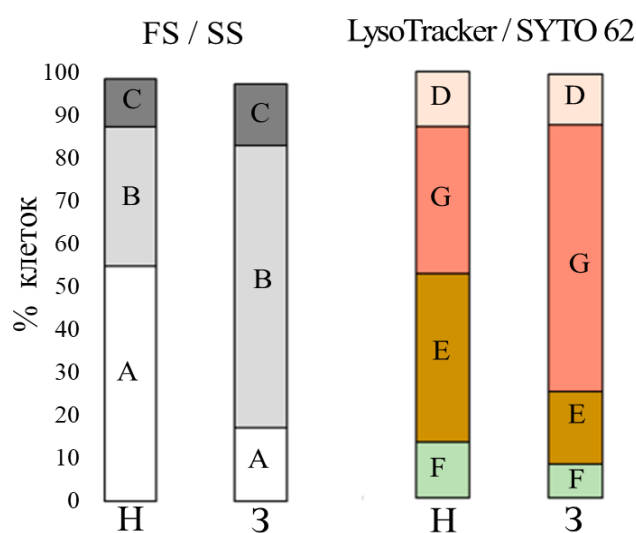


Рисунок 10. Гистограммы соотношения гемоцитов моллюсков *P. corneus*, заражённых трематодами *P. multiglandularis*, а также у незаражённых особей. Обозначения: Н – незаражённые; З – заражённые; указан процент клеток относительно общего количества.

Через 48 ч вновь наблюдается снижение численности гиалиноцитов ($p<0.05$). Относительное количество гранулоцитов популяции С после иммунизации постепенно увеличивается и достигает максимального значения через 24 ч. Через 72 ч соотношение гемоцитов восстанавливается на уровне неиммунизованных особей.

Иммунизация трематодами также влияет на соотношение гемоцитов в циркуляции. Соотношение гиалиноцитов и гранулоцитов различается у моллюсков *P. corneus*, заражённых трематодами *C. brevis*, *N. ephemera* и *P. multiglandularis* (Ataev, Prokhorova et al., 2016a). Так, у моллюсков *P. corneus*, природнозаражённых

трематодами *P. multiglandularis* происходит рост численности гранулоцитов популяции В (в среднем с 32.35 до 65.99%, $p<0.05$) и снижение доли гиалиноцитов (в среднем с 54.87 до 17.01, $p<0.001$), по сравнению с незаражёнными улитками. Также у заражённых особей отмечено уменьшение размеров части гиалиноцитов по сравнению с незаражёнными. И наоборот, часть гиалиноцитов и гранулоцитов приобретают характеристики более метаболически активных и гранулярных клеток: сильнее накапливают лизосомный и нуклеиновый красители. Такие данные свидетельствуют о вероятном переходе клеток из популяции А (гиалиноциты) в популяцию В (гранулоциты). При этом в популяции С не происходит достоверных изменений (рис. 10).

В результате **сравнения транскриптомов** заражённых *B. polonica* и незаражённых моллюсков *P. corneus* было выявлено 189 дифференциально экспрессируемых генов. Из них экспрессия 155 генов повышена, а 34 – снижена в гемоцитах заражённых моллюсков. Среди дифференциально экспрессирующихся присутствуют последовательности ретротранспозонов, гены регуляторов матричных процессов, клеточного цикла, белка теплового шока HSP7, коллагена α , темптина и др. (Orlov,...Prokhorova, 2023).

Ген	Ткани / органы моллюсков																													
	Гемолимфа						Гепатопанкреас						Белковая железа						Сердце и перикард						Нога					
Группа	В	С	Н	Р	Е	З	В	С	Н	Р	Е	З	В	С	Н	Р	Е	З	В	С	Н	Р	Е	З	В	С	Н	Р	Е	З
<i>PcFREP</i>	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>PcFREP3</i>	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>PcFREP7</i>																														
<i>PcInt</i>							x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>PcClect</i>																														
<i>PcTLR3</i>							x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>PcTLR7</i>																														
<i>PcPerox</i>																														
<i>PcCat</i>																														
<i>PcSP</i>																														
<i>PcCyst</i>	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>PcBL</i>																														
<i>PcMif</i>	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Изменение экспрессии	
усиление	ослабление
до 2 раз	до 2 раз
более 2 раз	более 2 раз
более 5 раз	более 5 раз
Более 10 раз	Более 10 раз
Более 15 раз	Более 15 раз

Условные обозначения:

- ☐ нет значимых различий
☒ измерение не проводилось

Группы заражённых моллюсков (вид трематод):
В – *B. polonica*
С – *C. brevis*
Н – *N. ephemera*
Р – *P. multiglandularis*
Е – *E. spiniferum*

Рисунок 11. Цветовая карта изменения экспрессии генов иммунного ответа в тканях моллюсков *P. corneus* при заражении трематодами.

Результаты анализа **экспрессии генов** молекул адгезии, ПРР, факторов цитотоксичности и цитокинов свидетельствуют о том, что некоторые из этих генов (*PcFREP7*, *PcClect*, *PcTLR7*, *PcCat*, *PcPeroх*, *PcSP*, *PcBL*) интенсивно работают не только в гемоцитах, но и в клетках других тканей – гепатопанкреаса, сердца и белковой железы (рис. 11). Участие в иммунном ответе клеток различных тканей подтверждается изменением экспрессии в них генов иммунного ответа при трематодной инвазии (Прохорова и др., 2010b). Так, наиболее значительное изменение экспрессии гена *PcFREP7* при заражении трематодами происходит в гепатопанкреасе (снижение, $p<0.05$) и сердце (повышение, $p<0.05$), генов *PcClect* и в *PcBL* – в сердце (повышение, $p<0.01$), генов *PcSP* (снижение, $p<0.05$), *PcCat* (повышение, $p<0.05$) – в белковой железе (Bobrovskaya,...Prokhorova, 2025).

Часть генов факторов иммунного ответа (*PcInt*, *PcClect*, *PcMif*) сходно отвечают на заражение трематодами всех видов. Для других генов (*PcFREP7*, *PcTLR7*, *PcCat*, *PcPeroх*, *PcBL*) выявлены существенные различия в экспрессии между моллюсками, заражёнными трематодами разных видов (рис. 11). Так, экспрессия гена *PcTLR7* снижена в гемоцитах только в группах заражённых *B. polonica* и *P. multiglandularis* моллюсков ($p<0.05$). При этом у заражённых *E. spiniferum* активность гена повышается в сердце ($p<0.05$) и белковой железе ($p<0.05$). Только в группе улиток, заражённых трематодами *P. multiglandularis*, выявлено снижение экспрессии генов *PcSP* в сердце и ноге ($p<0.05$) и *PcBL* – в сердце ($p<0.05$).

Обсуждение к разделу III.4

Наиболее универсальным механизмом, обеспечивающим уничтожение многоклеточных патогенов, принято считать инкапсуляцию. Выявленные нами в ходе исследования капсулы вокруг ксенотрансплантата, партенит и метацеркарий трематод морфологически схожи. Ранее структура таких многослойных гемоцитарных капсул была неоднократно описана для различных видов пульмонат (Jourdane, Cheng 1987; Ataev, Coustau, 1999; Прохорова, 2009; Токмакова; 2018). Первые признаки клеточной реакции на проникновение патогена проявляются уже через 6 ч после иммунизации (Атаев, Прохорова, 2013). Учитывая, что активация гемопоэза в АПО моллюсков начинается через сутки после иммунизации (Атаев, Coustau; 1999; Атаев, Прохорова, 2013; Токмакова, 2018), можно сделать вывод, что на этом этапе в клеточной реакции в первую очередь задействованы гемоциты из окружающих тканей. Феномен миграции гемоцитов из циркуляции в ткани описан как **первичная клеточная реакция** (Cheng, Jourdane 1987; Атаев, Полевщиков, 2004; Атаев, Прохорова, Токмакова, 2020). Неспецифичность первичной клеточной реакции проявляется в том, что во всех случаях вокруг патогена образуется скопление гемоцитов, пытающихся изолировать его от окружающих тканей (см. Атаев, Прохорова, Токмакова, 2024).

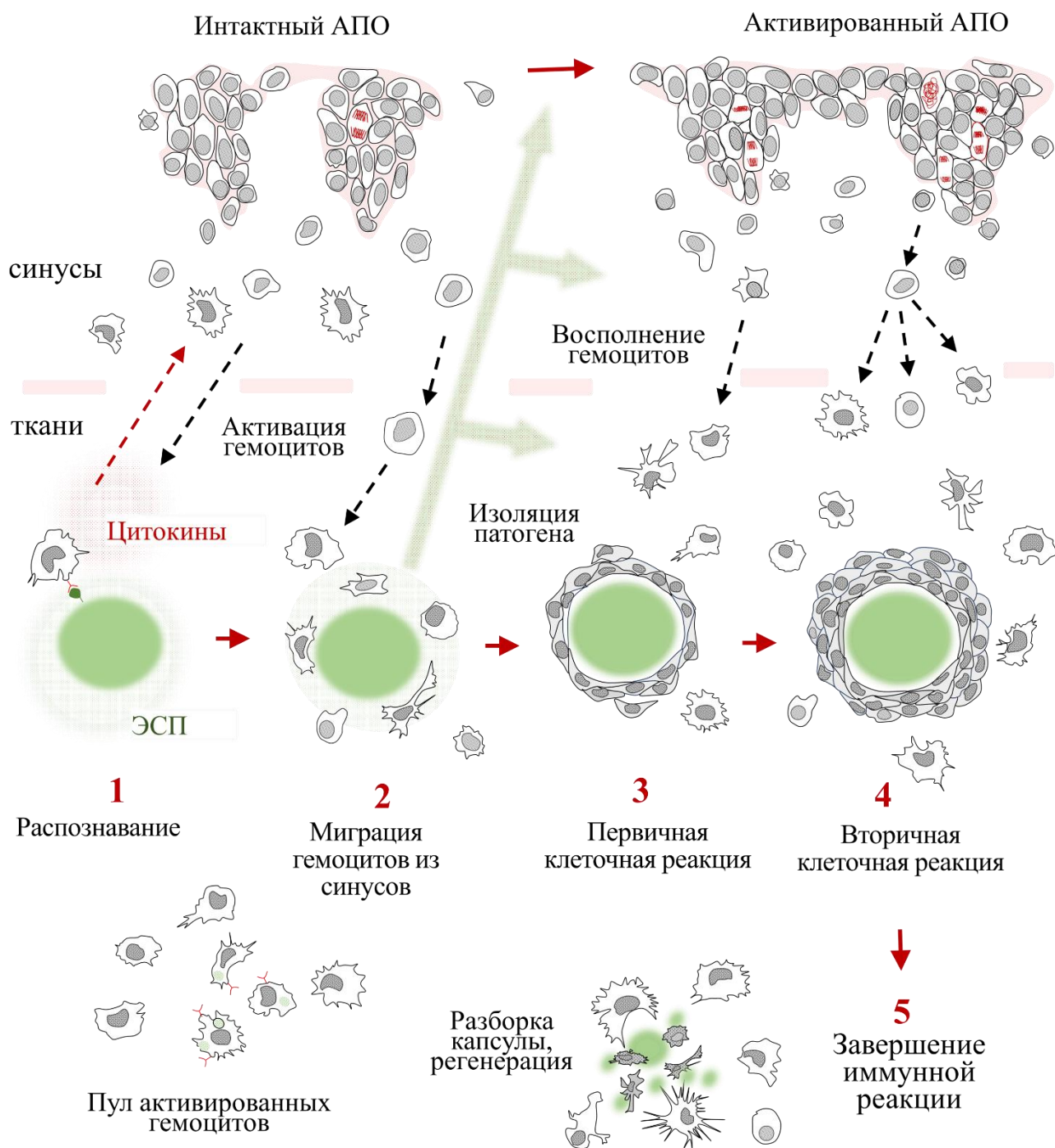


Рисунок 12. Схема иммунного ответа лёгочных моллюсков (пояснения в тексте).

Результатом эффективной первичной реакции может стать гибель патогена, его изоляция внутри гемоцитарной капсулы, его «выдавливание» во внешнюю среду и купирование повреждений в тканях (Lie, Neuneman, 1976a; Атаев, Прохорова, Токмакова, 2020). Но часто количество гемоцитов, присутствующих в тканях и циркуляции, оказывается недостаточным для элиминации патогена. И тогда запускается **вторичная клеточная реакция**, связанная с активацией гемопоэза. Вновь образованные гемоциты завершают начатые предшественниками процессы клеточной реакции, либо ликвидируют их последствия (рис. 12).

Выявленная динамика изменения клеточного состава гемолимфы при иммунизации бактериями совпадает с временными интервалами развития первичной и вторичной клеточной реакции при заражении трематодами (Прохорова, Атаев, 2010а; Атаев, Прохорова, Токмакова, 2020), а также со сроками активизации гемопоэза у биомфаларий, после иммунизации (Прохорова, Атаев, 2013). Для *B. glabrata* были получены сходные данные об активации в гемопоэза в ответ на иммунизацию бактериями (Sullivan et al., 1984). Схожие данные по изменению гемоцитарного состава были получены для моллюсков *B. tenagophila* и *B. glabrata*, иммунизированных трематодами *S. mansoni* (Martins-Souza, 2009).

В ходе клеточной реакции, вероятно, происходит функциональная специализация гемоцитов, в том числе переход части клеток с морфологией гиалиноцитов в гранулоцитарную фракцию. Об этом свидетельствует смещение гемоцитарной формулы в сторону гранулоцитов у моллюсков, иммунизированных бактериями, в аликвотах гемолимфы, инкубированной с бактериями и динамика изменения гемоцитарного состава у *P. corneus* при заражении трематодами.

Интенсивность и механизмы иммунного ответа зависят от особенностей развития трематод, заражающих моллюсков, а также от специфичности паразито-хозяинной системы «трематода — моллюск» (Bayne et al., 2001; Galaktionov, Dobrovolskij, 2003). Так соотношение гемоцитов различно у моллюсков *P. corneus*, заражённых трематодами разных видов (Атаев, Prokhorova et al., 2016a). Во всех случаях мы не обнаружили выраженной клеточной реакции на партенит трематод зрелых инфрапопуляций. Ситуации, когда в моллюске успешно развиваются и размножаются партениты дочерних генераций, вероятно, являются результатом либо неэффективной первичной клеточной реакции, либо следствием её отсутствия (Прохорова, Атаев, 2010а). Такое возможно в случае восприимчивого к заражению конкретным видом трематод фенотипа / генотипа моллюска (см. Прохорова, Атаев, 2008).

Результаты анализа экспрессии генов факторов иммунного ответа также свидетельствуют об избирательной регуляции их активности при иммунизации патогенам разных видов. Для моллюсков *B. glabrata* показан разный конститутивный уровень экспрессии генов ПРР и факторов цитотоксичности у представителей резистентных и чувствительных линий (Hertel et al., 2005; Galinier et al., 2013). Кроме того, динамика экспрессии генов иммунного ответа различается у биомфаларий разных линий и особей, иммунизированных трематодами различных видов (Adema et al., 1994; Vergote et al., 2005; Dinguirard et al., 2018; Li et al., 2020). Выборочное изменение активности генов иммунного ответа на заражение трематодами разных видов показано также для моллюсков *L. stagnalis* (Seppälä et al., 2021).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Накопленные данные о врождённых иммунных реакциях у представителей различных групп беспозвоночных, прежде всего моллюсков, артропод и аннелид, убедительно свидетельствуют о том, что их система врождённого иммунитета не является более примитивной по сравнению с таковой у позвоночных животных. Напротив, в условиях отсутствия адаптивного компонента, именно врождённый иммунитет полноценно обеспечивает поддержание целостности многоклеточного организма. Учитывая разнообразие вариантов организации в разных таксонах беспозвоночных, отдельные характеристики механизмов иммунной защиты могут различаться у представителей разных систематических групп. Таким образом, врождённые иммунные реакции беспозвоночных следует рассматривать не только с точки зрения их эквивалентности таковым у позвоночных, но и с точки зрения их **уникальных особенностей** внутри каждой группы животных.

Одной из ключевых причин неразработанности общей модели системы врождённого иммунитета лёгочных моллюсков выступает ограниченный круг исследуемых видов и отсутствие единой методологии исследований (см. раздел I.1). В частности, такие факторы, как видовая принадлежность моллюсков, особенности среды их обитания и спектр воздействующих патогенов, оказывают существенное влияние на характер и выраженность защитных иммунных реакций.

В нашем исследовании были использованы моллюски девяти модельных видов, в основном представленных улитками из природных популяций. Поэтому особое внимание было уделено их точной видовой идентификации. Кроме того, был выполнен анализ генотипического полиморфизма моллюсков части модельных видов. Для моллюсков *P. corneus*, *P. planorbis*, *L. stagnalis*, *S. putris*, *A. arbustorum*, *C. lubrica* показан небольшой генотипический полиморфизм по исследуемым маркерам (см. раздел III.1). Это позволяет рассматривать эти виды их в качестве модельных объектов для изучения иммунитета лёгочных моллюсков, выявления общих закономерностей иммунных реакций и их видовых особенностей.

Несмотря на существенные различия между моллюсками разных таксонов в строении кровеносной системы, локализации и организации процесса гемопоэза, основными эффекторными клетками их защитных реакций являются **гемоциты**. Более того, имеющиеся данные позволяют рассматривать гемоциты лёгочных моллюсков как **универсальные клетки системы врождённого иммунитета**. Гемоциты моллюсков изученных видов имеют схожие морфологические и функциональные характеристики. Они способны распознавать чужеродное и проявлять все варианты цитотоксической активности, характерной для иммуноцита (см. раздел III.2). По строению, функциональной активности, набору факторов цитотоксичности и рецепторов гемоциты моллюсков также во многом схожи с клетками гемолимфы членистоногих (Beckage, 2008; Rosales, 2017), целомоцитами

кольчатых червей (Cooper, 1996; Становова, 2019), а также лейкоцитами миелоидного ряда позвоночных (Заварзин, 1985; Varol, 2015; Хаитов, 2019).

Согласно имеющимся данным, морфологические варианты гемоцитов – гранулоциты и гиалиноциты – обладают в разной степени выраженной функциональной активностью. По большинству исследованных характеристик (фагоцитарной активности, подвижности, способности к формированию агглютинаций, продукции АФК) гранулоциты проявляют бóльшую активность (см. раздел III.2.3). Таким образом, именно гранулоциты являются наиболее активной формой иммунцитов лёгочных моллюсков. В то же время, для гемоцитов, и особенно для гранулоцитов, характерен значительный морфологический полиморфизм. Встречаются клетки промежуточной (между гранулоцитами и гиалиноцитами) морфологией, а также клетки, способные быстро изменять морфологические характеристики в течение непродолжительного изучения *in vitro*. Такие наблюдения свидетельствуют о возможности перехода клетки с морфологическими характеристиками гиалиноцита в клетку с параметрами гранулоцита.

Похожая морфофункциональная пластичность характерна для миелоидных клеток моноцитарно-макрофагальной линии позвоночных животных. Циркулирующая форма мононуклеарных фагоцитов позвоночных представлена моноцитами. После попадания в ткани моноциты плода (по последним данным, этот процесс продолжается и в течение постэмбриогенеза) дифференцируются в тканевые формы – резидентные макрофаги. Под влиянием микроокружения они приобретают специфические признаки, характерные для клеток конкретного органа, в котором они функционируют. Совокупность всех тканевых макрофагов формирует так называемую ретикулоэндотелиальную систему, которая участвует не только в элиминации патогенов, но и поддержании тканевого гомеостаза (Varol et al., 2015). Моноциты отличаются от макрофагов по размерам, составу гранул, экскреторной активности и набору поверхностных маркеров. Более того, выявлены специфические наборы транскриптов (транскрипционные сигнатуры), характерные для моноцитов и макрофагов (Ельчанинов, Фатхудинов, 2023).

До настоящего времени не выявлены поверхностные маркеры, позволяющие достоверно дифференцировать гранулоциты и гиалиноциты у лёгочных моллюсков (см. раздел III.2). В силу незамкнутости кровеносной системы моллюсков, также невозможно точно разделить циркулирующую и тканевую формы гемоцита. Однако данные анализа транскриптомов показывают, что выделяемые по морфологическим признакам пулы гемоцитов имеют переходные от одного к другому наборы транскриптов (Pichon et al., 2022). В результате транскриптомный анализ также не позволяет дифференцировать отдельные типы гемоцитов.

Гемоциты, как и моноклеарные фагоциты позвоночных – очень пластичные клетки с большим набором функций. Помимо иммунных реакций, они, как и макрофаги участвуют в процессах регенерации и тканевой регуляции (Franchini, Ottaviani, 2000; Oliveira et al., 2010). Примечательно, что гемоциты, оседающие на стенках синусов кровеносной системы моллюсков, также функционируют как своеобразная ретикулоэндотелиальная система (Curtis, Cowden, 1978; Matricon-Gondran, Letocart, 1999; Prowse, Tait, 1969; Купер, 1980).

Предположение о существовании единой линии дифференцировки гемоцитов также подтверждается динамикой изменения соотношения гранулоцитов и гиалиноцитов в онтогенезе и при иммунизации. У крупных экземпляров моллюсков относительная доля гранулоцитов выше, чем у ювенильных особей (см. раздел III.2.2). Рост доли гранулоцитов также отмечается при иммунизации бактериями, трематодами, продуктами жизнедеятельности патогенов и их ПАМП (см. раздел III.4.2). Значит, по мере контакта с бóльшим набором патогенов, увеличивается доля функционально активных клеток – гранулоцитов. Таким образом, по аналогии с миелоидными лейкоцитами позвоночных животных, различия между гемоцитами разных морфологических типов, вероятно, обусловлены именно функциональной специализацией. В таком случае наблюдаемые *морфологические типы гемоцитов* можно рассматривать как *варианты клеток единой клеточной линии*.

Вопрос о происхождении гемоцитов пульмонат остаётся дискуссионным. Однако у большинства изученных в этом отношении видов в качестве *центра гемопоэза функционирует АПО*, приуроченный к перикардiallyму эпителию. Активация АПО в процессе иммунизации сопровождается пролиферацией входящих в него клеток, увеличением размера органа и ростом численности гемоцитов. Это подтверждает его роль в пополнении пула циркулирующих гемоцитов (раздел III.4). Кроме того, клетки находящиеся в составе АПО, морфологически напоминают гиалиноциты с высоким ЯЦО (раздел III.2.1). АПО, образующиеся в нём гемоциты, их циркулирующие и тканевые формы можно рассматривать как компоненты лимфомиелоидного комплекса лёгочных моллюсков, который во всех случаях у многоклеточных образован клетками мезодермального происхождения (Галактионов, 1986).

Существование центрального органа гемопоэза не противоречит принципиальной возможности образования новых гемоцитов в других участках тела. У позвоночных животных способностью к делению обладают тканевые макрофаги, а также лимфоциты в тканях и периферических частях лимфатической системы (Luo et al., 2008; Robbins et al., 2013; Zink et al., 2017). Однако, на сегодняшний день не получено данных о присутствия в гемолимфе пульмонат значимого количества делящихся клеток (см. раздел III.2.4). Кроме того, в отличие от позвоночных животных, у моллюсков процессы центрального гемопоэза и

окончательной дифференцировки в циркуляции сложно чётко разделить по времени и локализации из-за незамкнутости кровеносной системы (см. раздел I.31). Гемолимфа изливается в лакуны и синусы, в результате гемоциты могут поступать в ткани быстро и без каких-либо барьеров в отличие от лейкоцитов позвоночных животных, которым для выхода в ткани надо осуществить транссосудистую миграцию (Rossaint et al., 2019). Также быстро гемоциты могут мобилизоваться из тканевых синусов. Поэтому динамика изменения численности гемоцитов у улиток разных видов сильно отличается – она зависит в том числе от особенностей анатомии и размеров моллюска.

Первичная клеточная реакция моллюсков на проникновение патогенов реализуется путём фагоцитоза, формирования агрегаций или капсул вокруг проникших патогенов (Атаев, Прохорова, Токмакова, 2024). Эти **формы клеточной реакции являются универсальными** для всех исследованных Metazoa, а также неспецифичными по отношению к чужеродным факторам любой природы – паразитам, трансплантатам, частицам латекса, опухолям (Галактионов, 2005). Таким образом, первичная клеточная реакция моллюсков на проникновение патогенов является неспецифической формой проявления клеточного ответа. Она осуществляется за счёт гемоцитов, поступающих в очаг воспаления из близлежащих тканей и циркуляции.

Результатом эффективной первичной реакции может стать гибель патогена либо его изоляция внутри гемоцитарной капсулы. Если патоген локализован вблизи покровов моллюска, возможно его «выдавливание» во внешнюю среду и купирование тканевых последствий проникновения (Атаев, Прохорова, Токмакова, 2020). В большинстве случаев, независимо от последствий первичной реакции у лёгочных моллюсков наблюдается активация гемопоэза, обеспечивающая запуск вторичной клеточной реакции. Сформированные в ходе неё гемоциты принимают участие в завершении инкапсуляции, а после гибели паразита участвуют в ликвидации и разборке капсулы. В ходе клеточного ответа увеличивается доля функционально активных клеток – гранулоцитов. Позднее количественные характеристики клеточного состава гемолимфы возвращаются в исходное состояние (см. раздел III.4.2). Аналогичные процессы происходят и у позвоночных животных. У последних на помощь тканевым макрофагам из циркуляции приходят нейтрофилы, а затем – воспалительные макрофаги. При длительном воспалении в реакцию вовлекаются форменные элементы, сформированные в результате активации гемопоэтических структур (Купер, 1980).

Развитие первичной и вторичной клеточной реакции согласуется с динамикой изменения соотношения гиалиноцитов и гранулоцитов при бактериальной иммунизации и заражении трематодами, а также с активностью АПО. В первые часы после иммунизации в циркуляции снижается доля гранулоцитов, затем растёт

количество гиалиноцитов и только потом значительно возрастает относительное число гранулоцитов (см. раздел III.4.2). Первоначальное снижение доли гранулоцитов обусловлено их участием в клеточной реакции в качестве первой линии защиты – эта функция всегда реализуется зрелыми, функционально активными иммунными клетками. Рост численности гиалиноцитов по времени соответствует активации гемопоэза в АПО (см. раздел III.2.4). Последующее увеличение относительной доли гранулоцитов, вероятно, обусловлено переходом в гранулоциты части образовавшихся в результате активации гемопоэза клеток.

Следует подчеркнуть, что *соотношение гранулоцитов и гиалиноцитов* у представителей разных видов различается, но при этом наблюдается и значительная внутривидовая вариабельность этого параметра (см. раздел III.2.2). Как и другие физиологические процессы, иммунный ответ имеет широкую норму реакции. На физиологическое состояние моллюска, влияет множество факторов – физико-химические характеристики среды, возраст, особенности питания, репродуктивная стадия, набор патогенов и др.

В специфичных паразито-хозяинных системах, в частности в системе «трематоды–моллюск», инкапсуляции трематод в результате вторичной реакции не происходит, несмотря на активацию гемопоэза. Гемоциты, обнаружив партенит, могут образовывать крупные агглютинации в районе их локализации, однако паразиты продолжают нормально развиваться. В некоторых случаях выраженная иммунная реакция отсутствует. В частности, при длительной инвазии, часто не удаётся обнаружить никаких следов клеточной реакции. Успешность заражения и выраженность иммунного ответа определяются совпадением индивидуальных молекулярных характеристик паразита и хозяина (Théron, Coustau, 2005). Развитие партенит в моллюске возможно только в том случае, когда иммунитет моллюска не способен распознать и элиминировать паразита. Такое взаимодействие получило название «модели совместимого молекулярного полиморфизма» (Mitta et al., 2017). Совместимость определяется как генетическими заданными особенностями хозяина (в первую очередь – способностью гемоцитов к распознаванию патогена и проявлению цитотоксичности), так и биологическими особенностями паразита (Атаев, Прохорова, Токмакова, 2020).

При заражении некоторыми трематодами наблюдается своеобразное извращение типичной клеточной реакции. Так на поверхности спороцист трематод сем. Plagiorchiidae формируется гемоцитарная мантия, которая не мешает, а способствует развитию паразита. Представители и сем. Leucochloriidae также подавляют клеточную реакцию: гемоциты оседают на поверхность спороцист без полной их изоляции, что также не препятствует нормальному развитию паразита (см. раздел III.4.1). Выявленное в гемоцитах заражённых *B. polonica* и *P. multiglandularis* моллюсков *P. corneus* снижение экспрессии ряда генов, связанных

с регуляцией клеточного цикла и реализацией иммунного ответа также, вероятно, связано с влиянием паразита на организм моллюска (см. раздел III.4.3.3).

Развитие эффективного иммунного ответа зависит от успешного распознавания патогена. У представителей беспозвоночных животных найдены ПРР всех групп, описанных ранее у позвоночных. В результате анализа транскриптов, геномов и протеомов лёгочных моллюсков также выявлено **большое разнообразие ПРР**. Большинство ПРР моллюсков могут быть отнесены к тем же группам, что и ПРР позвоночных. Но помимо вариантов рецепторов с каноничной структурой, у моллюсков встречаются варианты лектинов, СР, ТПР, молекул иммуноглобулинового суперсемейства с уникальными сочетаниями доменов (см. раздел III.3.1). Существующая система классификации ПРР не всегда позволяет отнести варианты рецепторов моллюсков к определённым группам. Кроме того, только малая часть ПРР моллюсков охарактеризованы функционально. Большинство данных о доменной структуре ПРР – результат предсказания на основе данных транскриптомов. Поэтому в качестве переходного варианта классификации ПРР моллюсков следует использовать вариант **перекрёстной классификации**, учитывающий доменный состав, в котором молекулы с новыми сочетаниями доменов относятся одновременно к разным группам ПРР.

Описанное на данный момент разнообразие ПРР моллюсков превосходит разнообразие рецепторов врождённого иммунитета у позвоночных животных. У последних основу специфического распознавания патогенов составляют АРР. Их разнообразие формируется в ходе антиген-независимого (посредством реарранжировки генов) и антиген-зависимого (клональная экспансия и созревания аффинитета) созревания лимфоцитов. Такая онтогенетическая адаптивность иммунного ответа обеспечивает успешную элиминацию патогена. У животных без системы адаптивного иммунитета (при отсутствии специфических АРР) расширение набора распознаваемых лигандов достигается за счёт увеличения количества вариантов ПРР, основной набор которых генотипически запрограммирован. Каждый вид (или даже популяция) моллюсков сталкивается с определёнными видами патогенов. Взаимодействие с конкретным набором патогенов приводит к формированию **уникального для данного вида набора ПРР**. Таким образом адаптивность иммунологического распознавания реализуется на уровне вида или популяции.

Имеющиеся данные по оценке избирательности, изменению экспрессии ПРР моллюсков и их генов при иммунизации подтверждают их широкую лигандную специфичность (см. раздел III.4.1). С другой стороны, при иммунизации паразитами разных видов уровни экспрессии некоторых ПРР различаются (см. раздел III.3.1). Существенные различия в экспрессии между моллюсками, заражёнными трематодами разных видов, выявлены для генов ФБ и ТПР. Это

свидетельствует об избирательности ПРР в распознавании лигандов, либо разной их эффективности по отношению в различным ПАМП. Такое явление избирательного распознавания патогенов ПРР у лёгочных моллюсков может играть ключевую роль в развитии тренированного иммунитета – более быстрого и эффективного иммунного ответа беспозвоночных на повторную иммунизацию. Тренированный иммунитет рядом исследователей трактуется как аналог иммунологической памяти в системе адаптивного иммунитета (Gourbal et al., 2018; Zhao et al., 2023). В качестве наиболее вероятного механизма этого явления рассматривается устойчивая длительная активация механизмов иммунного ответа после первичной иммунизации (Pinaud et al., 2016). Другая гипотеза, объясняющая феномен «врождённой иммунной памяти», предполагает, что при повторной иммунизации более эффективно работают гуморальные механизмы подавления инвазии (Coustau et al., 2016; Netea et al., 2016; Gourbal et al., 2018; Melillo et al., 2018). На наш взгляд, независимо от эффекторного механизма, именно активация клеток с подходящими набором ПРР, обеспечивающая быстрое распознавание чужеродного, является основным процессом, лежащим в основе **явления тренированного иммунитета**.

Гуморальный компонент системы врождённого иммунитета представлен растворимыми компонентами внутренней среды организма, участвующими в реакциях нейтрализации патогенов, а также опосредующими клеточные реакции и регулируемыми иммунный ответ. При этом границы между клеточными и гуморальными аспектами иммунного ответа во многом условны, так как основные иммунные реакции реализуются при совместном действии этих систем. Полученные нами данные также подтвердили, что гены факторов цитотоксичности (*PcCat*, *PcPeroх*, *PcBL*, *PcCyst*), лектинов (*PcFREP7*, *PcClect*) активно экспрессируются не только в гемоцитах, но и в клетках других тканей – гепатопанкреаса, ноги, сердца и белковой железы (см. раздел III.4.3). На моллюсках нескольких модельных видов показано совместное участие клеточных и гуморальных факторов в элиминации патогенов (см. раздел III.3.1). Совместное участие клеточных и гуморальных факторов в скоординированном иммунном ответе свидетельствует в наличии у организма не отдельных компонентов физиологической защиты от патогенов, а полноценной **системы врождённого иммунитета**.

Имеющиеся данные также указывают на **избирательность иммунного ответа** лёгочных моллюсков на заражение патогенами разных видов. Оно реализуется не только на этапе распознавания чужеродного (см. выше), но и на эффекторной стадии иммунного ответа. Активность экспрессии ряда генов иммунного ответа (*PcFREP7*, *PcTLR7*, *PcCat*, *PcPeroх*, *PcBL*) значительно различается у моллюсков *P. corneus* со зрелым заражением трематодами разных

видов (см. раздел III.4.3). Похожие результаты получены другими авторами и на моллюсках других видов. В то же время, часть исследованных генов (*PcInt*, *PcClect*, *PcMif*) сходно отвечают на заражение трематодами всех видов – различия между группами моллюсков, заражённых разными трематодами, отсутствуют или небольшие. Это свидетельствует о неизбирательном изменении их экспрессии при трематодной инвазии. Несмотря на универсальность основных механизмов клеточных реакций, они также реализуются избирательно. В ответ на различные факторы иммунизации развиваются разные формы клеточного иммунного ответа – образуются агглютинации, капсулы, гемоцитарная мантия, либо клеточная реакция не развивается (см. раздел III.4.1). Проявлением избирательности иммунного ответа является также в разной степени выраженное изменение гемоцитарной формулы (см. раздел III.4.2).

Таким образом, известные на сегодняшний день данные позволяют заключить, что лёгочные моллюски обладают полноценной системой врождённого иммунитета. При этом, конститутивные компоненты врождённого иммунитета моллюсков не всегда эквивалентны факторам врождённого иммунитета позвоночных. В частности, по ряду ключевых характеристик – разнообразию ППР и их онтогенетической вариативности, наличию феномена тренированного иммунитета, а также избирательной реакции на факторы иммунизации – врождённые иммунные реакции лёгочных моллюсков существенно отличаются от традиционных представлений, сформированных на основе изучения позвоночных животных.

ВЫВОДЫ

1. Гемоциты являются специализированными клетками системы врождённого иммунитета пульмонат. Они обладают всеми признаками макрофагоподобных иммуноцитов: имеют широкий набор патогенраспознающих рецепторов, участвуют в клеточных иммунных реакциях, а также в выработке гуморальных факторов и факторов цитотоксичности.

2. Гемоциты лёгочных моллюсков представлены двумя морфофункциональными типами клеток – гранулоцитами и гиалиноцитами. Клетки обоих типов участвуют в иммунных реакциях и представляют разные этапы дифференцировки и функциональной специализации единой клеточной линии. Гранулоциты характеризуются большей функциональной активностью, по сравнению с гиалиноцитами.

3. Клеточный состав гемолимфы лёгочных моллюсков изменяется в ответ на иммунизацию. Наиболее распространенным вариантом изменения гемоцитарной формулы является её смещение в сторону гранулоцитов, которое является

следствием функциональной специализации вовлекаемых в клеточную реакцию гемоцитов, а также активации гемопоэза.

4. Основными формами клеточного иммунного ответа лёгочных моллюсков являются фагоцитоз, инкапсуляция, формирование агрегаций. При этом механизмы клеточных защитных реакций пульмонат аналогичны основным формам врождённого иммунного ответа у животных других групп. Разная выраженность клеточных реакций обусловлена онтогенетическими и физиологическими особенностями организма и природой фактора иммунизации.

5. В выработке факторов защитных реакций у лёгочных моллюсков помимо гемоцитов участвуют клетки гепатопанкреаса, белковой железы, сердца и других органов. Иммунизация приводит к изменению экспрессии в них генов факторов иммунного ответа (лектинов, интегринов, сериновой протеазы, каталазы, пероксидазы, биомфализина, цистатинподобного белка).

6. У лёгочных моллюсков присутствуют патогенраспознающие рецепторы всех основных групп: лектины, толл-подобные рецепторы, скавенджер-рецепторы, рецепторы распознавания олигонуклеотидов, молекулы адгезии. Установлено, что разнообразие патогенраспознающих рецепторов моллюсков шире, чем у позвоночных животных.

7. Представители изученных видов пульмонат обладают уникальным набором рецепторов, включая молекулы, не описанные ранее у других организмов. В связи с этим для описания разнообразия рецепторов распознавания патогенов лёгочных моллюсков следует использовать перекрёстную классификацию, которая учитывает сочетания различных паттерн-распознающих и эффекторных доменов.

8. Выполненная по морфологическим признакам и молекулярно-генетическим маркерам видовая идентификация моллюсков (*Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis*, *Lymnaea stagnalis*, *Succinea putris*, *Ampullaceana lagotis*, *Cochlicopa lubrica*, *Arianta arbustorum*) позволяет рассматривать эти виды в качестве модельных объектов для изучения защитных реакций пульмонат. Анализ разработанных моделей с использованием патогенов различной природы: бактерий, ксенотрансплантатов, а также естественных паразитов улиток – трематод (*Bilharziella polonica*, *Plagiorchis multiglandularis*, *Cotylurus brevis*, *Notocotylus ephemera*, *Echinostoma spiniferum*, *E. caproni*, *E. revolutum*, *Diplostomum pseudospathaceum*, *Rubensstrema exasperatum*, *Leucochloridium paradoxum*, *Aporchis* sp.) показал универсальность основных механизмов иммунного ответа лёгочных моллюсков.

9. Иммунный ответ лёгочных моллюсков на заражение патогенами разных видов наряду с универсальностью проявляет признаки избирательности. Об этом свидетельствуют разная интенсивность клеточной реакции, различное изменение гемоцитарной формулы, разный профиль экспрессии генов факторов иммунного

ответа у моллюсков, иммунизированных паразитами разных видов, а также изменение динамики иммунной реакции при повторной иммунизации.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Прохорова, Е. Е. Защитные реакции моллюсков семейства Planorbidae (Gastropoda, Pulmonata) на трематодную инвазию / Е. Е. Прохорова, Г. Л. Атаев // Известия Российского государственного педагогического университета имени А. И. Герцена. – 2010а. – № 122. – С. 91–107.
2. Прохорова, Е. Е. Экспрессия генов факторов защитных реакций у моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) при заражении трематодами / Е. Е. Прохорова, Н. В. Цымбаленко, Г. Л. Атаев // Паразитология. – 2010b. – Т. 44, № 4. – С. 310–325.
3. Атаев, Г. Л. Изменения в амёбоцито-продуцирующем органе моллюсков *Biomphalaria glabrata* при заражении трематодами *Echinostoma caproni* / Г. Л. Атаев, Е. Е. Прохорова // Паразитология. – 2013. – Т. 47, № 6. – С. 472–479.
4. Жукова, А. А. Генотипирование трематод рода *Leucochloridium*, обитающих на территории Ленинградской области / А. А. Жукова, Е. Е. Прохорова, Н. В. Цымбаленко, А. С. Токмакова, Г. Л. Атаев // Паразитология. – 2012. – Т. 46, № 5. – С. 414–419.
5. Zhukova, A. A. Identification of species *Leucochloridium paradoxum* and *L. perturbatum* (Trematoda) Based on rDNA Sequences / A. A. Zhukova, Е. Е. Prokhorova, A. S. Tokmakova, N. V. Tsymbalenko, G. L. Ataev // Parazitologiya. – 2014. – Vol. 48, No. 3. – P. 185–192.
6. Прохорова, Е. Е. Использование RAPD-анализа для изучения генетической популяционной изменчивости моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) / Е. Е. Прохорова, Е. А. Жемчужникова, Г. Л. Атаев // Известия Российского государственного педагогического университета им. А. И. Герцена. – 2014. – № 168. – С. 62–68.
7. Серебрякова, М. К. Новый метод разделения популяций циркулирующих гемоцитов лёгочных моллюсков с помощью проточной цитометрии / М. К. Серебрякова, Е. Е. Прохорова, А. С. Токмакова, И. В. Кудрявцев, А. В. Полевщиков, Г. Л. Атаев // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9, № 2–1 (18). – С. 160–162.
8. Прохорова, Е. Е. Анализ ITS1 и ITS2 рибосомной ДНК в популяциях моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda) в Ленинградской и Калининградской областях России / Е. Е. Прохорова, Е. А. Жемчужникова, Г. Л. Атаев // Сибирский экологический журнал. – 2015а. – Т. 22, № 6. – С. 883–889.
Версия: Prokhorova, E. E. Analysis of ITS1 and ITS2 of ribosomal DNA in populations of *Planorbarius corneus* snails (Gastropoda) from the Leningrad and Kaliningrad oblasts of Russia / E. E. Prokhorova, E. A. Zhemchuzhnikova, G. L. Ataev // Contemporary problems of ecology. – 2015а. – Vol. 8, No. 6. – P. 729–734.
9. Прохорова, Е. Е. Реакция гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus* на ксенотрансплантат / Е. Е. Прохорова, А. С. Токмакова, Г. Л. Атаев // Паразитология. – 2015b. – Т. 49, № 2. – С. 128–132.
10. Ataev, G. L. The influence of trematode infection on the hemocyte composition in *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) / G. L. Ataev, Е. Е. Prokhorova, I. V. Kudryavtsev, A. V. Polevshchikov // Invertebrate Survival Journal. – 2016а. – Vol. 13. – P. 164–171.
11. Ataev, G. L. Multiple infection of amber *Succinea putris* snails with sporocysts of *Leucochloridium* spp. (Trematoda) / G. L. Ataev, A. A. Zhukova, A. S. Tokmakova, Е. Е. Prokhorova // Parasitology Research. – 2016b. – Vol. 115, No. 8. – P. 3203–3208.
12. Prokhorova, E. E. RAPD-markers for species identification of trematodes from the genus *Leucochloridium* / E. E. Prokhorova, A. A. Zhukova, N. V. Tsymbalenko, O. D. Lopatina, G. L. Ataev // Parazitologiya. – 2017. – Vol. 51, No. 4. – P. 339–344.

13. **Прохорова, Е. Е.** Анализ клеточного состава гемолимфы трёх видов планорбид (Gastropoda: Pulmonata) / Е. Е. Прохорова, М. С. Серебрякова, А. С. Токмакова // *Invertebrate Zoology*. – 2018a. – Т. 15, № 1. – С. 103–113.
14. **Прохорова, Е. Е.** Видовая идентификация спороцист *Leucochloridium paradoxum* (Trematoda) / Е. Е. Прохорова, А. А. Виноградова, А. С. Токмакова, Г. Л. Атаев // *Паразитология*. – 2018b. – Т. 52, № 6. – С. 442–448.
15. **Prokhorova, E. E.** Hemocytes of mollusc *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Pulmonata) / E. E. Prokhorova, A. S. Tokmakova, G. L. Ataev, M. K. Serebryakova // *Invertebrate Survival Journal*. – 2018. – Vol. 15. – P. 346–351.
16. **Prokhorova, E. E.** An analysis of morphological and molecular genetic characters for species identification of amber snails *Succinea putris* (Succineidae) / E. E. Prokhorova, R. R. Usmanova, G. L. Ataev // *Invertebrate Zoology*. – 2020. – Vol. 17, No. 1. – P. 1–17.
17. Tokmakova, A. S. Study of the proliferative activity of hemolymph cells in pulmonate molluscs / A. S. Tokmakova, M. K. Serebryakova, **E. E. Prokhorova**, G. L. Ataev // *Invertebrate Survival Journal*. – 2020. – Vol. 17, No. 1. – P. 63–74.
18. Атаев, Г. Л. Защитные реакции лёгочных моллюсков при паразитарной инвазии / Г. Л. Атаев, **Е. Е. Прохорова**, А. С. Токмакова // *Паразитология*. – 2020. – Т. 54, № 5. – С. 371–401.
19. **Прохорова, Е. Е.** Фибриногенподобные белки гастропод / Е. Е. Прохорова, Г. Л. Атаев // *Паразитология*. – 2021. – Т. 55, № 6. – С. 443–464.
- Версия:* **Prokhorova E. E.** Fibrinogen-related proteins of Gastropoda molluscs / Prokhorova E. E., Ataev G. L. // *Biology Bulletin Reviews*. – 2023. – Volume 13, Issue S2. – P. S184–S198.
20. Усманова, Р. Р. Генетический полиморфизм трематод *Leucochloridium paradoxum* на территории Ленинградской области по фрагменту митохондриального гена *cox1* / Р. Р. Усманова, А. С. Токмакова, О. Д. Лопатина, **Е. Е. Прохорова** // *Паразитология*. – 2021. – Т. 55, № 5. – С. 355–361.
21. Serebryakova, M. K. Changes in the cell composition of the hemolymph in the snail *Planorbarius corneus* after infection with the trematode *Plagiorchis* sp. / M. K. Serebryakova, A. S. Tokmakova, **E. E. Prokhorova**, G. L. Ataev // *Invertebrate Biology*. – 2022. – Vol. 141, No. 4. – Art. e12389.
22. Usmanova, R. R. Genotypic and morphological diversity of trematodes *Leucochloridium paradoxum* / R. R. Usmanova, G. L. Ataev, A. S. Tokmakova, N. V. Tsymbalenko, **E. E. Prokhorova** // *Parasitology Research*. – 2023. – Vol. 122, No. 4. – P. 997–1007.
23. Orlov, I. A. The transcriptomic analysis of *Planorbarius corneus* hemocytes (Gastropoda) naturally infected with *Bilharziella polonica* (Schistosomatidae) / I. A. Orlov, G. L. Ataev, B. Gourbal, A. S. Tokmakova, A. V. Bobrovskaya, **E. E. Prokhorova** // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2023. – Vol. 140. – Art. 104607.
24. Атаев, Г. Л. Иммуитет брюхоногих и двустворчатых моллюсков / Г. Л. Атаев, **Е. Е. Прохорова**, А. С. Токмакова // *Амурский зоологический журнал*. – 2024. – Т. 16, № S3. – С. 1–74 (монографическая статья).
25. Ataev, G. L. A malacological study of the Ukok Plateau lakes / G. L. Ataev, R. R. Usmanova, **E. E. Prokhorova**, V. V. Glupov // *Amurian Zoological Journal*. – 2024a. – Т. 16, № 3. – С. 633–644.
26. Ataev, G. L. Development and reproduction of sporocysts of *Leucochloridium paradoxum* (Trematoda) / G. L. Ataev, R. R. Usmanova, A. A. Vinogradova, **E. E. Prokhorova**, A. S. Tokmakova // *Invertebrate Biology*. – 2024b. – Vol. 143, No. 4. – Art. e12443.
27. **Прохорова, Е. Е.** Патогенраспознающие молекулы гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus* (Planorbidae, Pulmonata) / Е. Е. Прохорова, А. В. Бобровская, Н. В. Цымбаленко // *Амурский зоологический журнал*. – 2024. – Т. 16, № 1. – С. 36–55.
28. Бобровская А. В. Разнообразие транскриптов толл-подобных рецепторов в гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata), не заражённых и заражённых трематодами *Bilharziella polonica* / А. В. Бобровская, Ю. А. Орлов, **Е. Е. Прохорова** // *Паразитология*. – 2024. – Т. 58, № 1. – С. 45–55.

Версия: Bobrovskaya, A. V. Diversity of Toll-like receptor gene transcripts in hemocytes of *Planorbarius corneus* mollusks (Gastropoda, Pulmonata) uninfected and infected with *Bilharziella polonica* / A. V. Bobrovskaya, Yu. A. Orlov, **Е. Е. Прохорова** // Doklady Biological Sciences. – 2025. – Т. 525, № 1. – С. 390–396.

29. Токмакова, А. С. Паразитофауна *Succinea putris* (Mollusca: Pulmonata) на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области / А. С. Токмакова, **Е. Е. Прохорова**, Р. Р. Усманова, А. А. Корниенко, А. А. Виноградова, Е. А. Пчеленок, Г. Л. Атаев // Паразитология. – 2025. – Т. 59, № 1. – С. 34–48.

30. Bobrovskaya, A. V. Immune-relevant transcripts of the mollusc *Succinea putris* (Gastropoda, Pulmonata) / A. V. Bobrovskaya, G. L. Ataev, **Е. Е. Прохорова** // Developmental and Comparative Immunology. – 2026. – Vol. 179. – Art. 105607.

Учебные пособия:

1. Атаев Г. Л. Иммунные реакции моллюсков: учебное пособие / Г. Л. Атаев, А. С. Токмакова, **Е. Е. Прохорова**, Санкт-Петербург: Издательство РГПУ им. А. И. Герцена, 2023. – 112 с. – ISBN: 978-5-8064-3359-7.

Материалы конференций (основные):

1. **Прохорова, Е. Е.** Экспрессия гена, кодирующего С-лектин у моллюсков *Planorbarius corneus*, заражённых партенитами трематод / Е. Е. Прохорова, Г. Л. Атаев // Научные труды V съезда физиологов СНГ. – АСТА NATURAE. – Т. 1. – 2016. – С. 212.

2. **Прохорова, Е. Е.** Использование проточной цитофлуориметрии для определения заражённости лёгочных моллюсков трематодами / Е. Е. Прохорова, М. К. Серебрякова, А. С. Токмакова, Г. Л. Атаев // Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем III: материалы Междунар. конф.– Санкт-Петербург, 2017. – С. 266–269.

3. **Прохорова, Е. Е.** Изменение клеточного состава гемолимфы гастропод, вызываемое трематодной инвазией / Е. Е. Прохорова, М. К. Серебрякова, А. С. Токмакова, Г. Л. Атаев // Материалы VI Съезда Паразитологического общества. – Санкт-Петербург, 2018. – С. 195.

4. Токмакова, А.С. Функциональная активность гемоцитов лёгочных моллюсков / А. С. Токмакова, **Е. Е. Прохорова**, М. К. Серебрякова, Г. Л. Атаев // Концептуальные и прикладные аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных. – Томск, 2020. – С. 153–157.

5. **Прохорова, Е. Е.** Генетический полиморфизм моллюсков *Succinea putris* (Gastropoda, Pulmonata) / Е. Е. Прохорова, Р. Р. Усманова // Концептуальные и прикладные аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных: сборник статей. – Томск, 2020. – С. 133–136.

6. Орлов, Ю.А. Изучение факторов иммунного ответа моллюсков *Planorbarius corneus* / Ю. А. Орлов, А. С. Токмакова, **Е. Е. Прохорова** // Понт Эвксинский — 2021: материалы XII Всероссийской научно-практич. конф. для молодых учёных. – Севастополь, 2021. – С. 82–83.

7. Виноградова, А. А. Видовая идентификация трематод семейства *Notocotylidae* — паразитов утиных / А. А. Виноградова, **Е. Е. Прохорова** // Школа по теоретической и морской паразитологии: тезисы докладов VIII Всероссийской конф. с междун. участием. – Севастополь, 2022. – С. 29.

8. **Прохорова, Е. Е.** Экспрессия генов фибриногенподобных белков у моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda) при трематодной инвазии / Е. Е. Прохорова, А. В. Бобровская, Ю. А. Орлов, Г. Л. Атаев // Изучение водных и наземных экосистем: история и современность: тезисы докладов II Междун. научно-практич. конф. – Севастополь, 2022. – С. 206.

9. **Прохорова, Е. Е.** Иммунные реакции лёгочных моллюсков на трематодную инвазию / Е. Е. Прохорова // VII Съезд Паразитологического общества: тезисы докладов. – 2023. – С. 285–286.

10. Прохорова, Е. Е. Экспрессия генов иммунного ответа в гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) при заражении трематодами / Е. Е. Прохорова, К. В. Столярова, А. В. Бобровская // Паразитологические исследования в Беларуси и на сопредельных территориях: сборник научных статей. – Минск, 2025. – 171–174.

11. Bobrovskaya, A. V. Expression of lectins in *Planorbarius corneus* snails infected by trematodes / A. V. Bobrovskaya, K. V. Stolyarova, E. E. Prokhorova // Modern Achievements in Population, Evolutionary, and Ecological Genetics: International Symposium. – Владивосток, 2025. – P. 1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АПО – амёбоцит-продуцирующий орган;
APP – антигенраспознающие рецепторы;
КДФДА – карбокси-2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат;
ПАМП – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны;
ППР – паттерн-распознающие (патогенраспознающие) рецепторы;
ТПР – толл-подобные рецепторы;
ФБ – фибриногенподобные белки;
БА – Байесовский анализ;
CDS – кодирующая последовательность;
FS – прямое светорассеивание;
GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа;
ML – метод максимального правдоподобия;
SS – боковое светорассеивание;
PI – йодид пропидия;
ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с полимеразной цепной реакцией;
ЭПР – эндоплазматический ретикулум;
ЭСП – экскреторно-секреторные продукты;
сут п.з. – суток после заражения;
ЭФР – эпидермальный фактор роста;
СР – скавенджер-рецептор;
МКА – молекула клеточной адгезии;
ч – часов;
ч п.з. – часов после заражения.

Обозначения доменов белков:

CLECT – лектиновый домен С-типа;
LINK – связывающий гиалуронан домен;
IG_like – иммуноглобулиноподобный домен;
CUB – домен CUB;
IG – иммуноглобулиновый домен;
IGv – иммуноглобулиновый домен V-типа;
IgGc2 – иммуноглобулиновый домен C2-типа;
LRR – лейцин-богатый повтор;
Fib_alpha – домен фибронектина типа I;
FBG – галактозосвязывающий лектин;
FTP – домен фуколектина;

TIR – TIR-домен;
SR – богатый цистеином домен скавенджер-рецептора;
Tryp_SPc – домен трипсиноподобной сериновой протеазы;
PAN_AP – APPLE-подобный домен;
SCAN – область, богатая лейцином;
Filament – домен промежуточного филамента;
DED – домен эффектора смерти (апоптоза);
DEXDc – домен DEAD-подобных хеликаз;
HELICc – С-концевой семейства хеликаз;
ZnF_C4 – домен цинковых пальцев;
HOLI – домен связывания нуклеиновых кислот;
INB – домен β -интегрина;
CCP – домен контроля комплемента;
Int_alpha – домен α -интегрина.

Обозначения генов:

cytB – ген цитохрома b;
cox1 – ген субъединицы I цитохром с-оксидазы;
ITS – внутренний транскрибируемый спейсер рДНК;
PcFREP – ген фибриногенподобного белка;
PcInt – ген β -интегрина;
PcClect – ген С-лектина;
PcTLR – ген толл-подобного рецептора;
PcPerox – ген миелопероксидазы;
PcCat – ген каталазы;
PcSP – ген катепсинподобной сериновой протеазы;
PcCyst – ген цистатинподобного белка;
PcBL – ген биомфализина;
PcMif – ген фактора, ингибирующего миграцию макрофагов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю признательность своему научному консультанту Г. Л. Атаеву за профессиональное руководство, постоянную поддержку и неоценимую помощь на всех этапах выполнения работы. Автор также сердечно благодарен Н. В. Цымбаленко за мудрое наставничество, поддержку и ценные рекомендации. Глубокую признательность автор выражает коллективу кафедры зоологии и генетики РГПУ им. А. И. Герцена за содействие в проведении исследований и подготовке диссертационной работы. Особую благодарность автор приносит Н. П. Исаковой – за практические консультации, помощь в сборе материала и определении трематод, М. К. Серебряковой – за помощь в проведении цитофлуориметрических исследований, А. С. Токмаковой и Р. Р. Усмановой – за предоставление материалов и помощь в приготовлении и анализе гистологических препаратов, А. В. Бобровской и Ю. А. Орлову – за совместную продуктивную работу по анализу транскриптомов, А. А. Корниенко и А. М. Войтюк – за помощь в сборе материала. Автор также благодарит заведующего Лабораторией экологической паразитологии Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина А. Е. Жохова – за предоставленные материалы, а также научного сотрудника Лаборатории инженерии антител Института молекулярной и клеточной биологии Т. Н. Беловежец – за помощь в исследовании гемолимфы на сортере. Также автор от всего сердца благодарит свою семью – Александра, Наташу, Лёву и Осю – за бесконечное терпение и поддержку.