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

УДК 594.38

На правах рукописи

Прохорова Елена Евгеньевна

ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ ЛЁГОЧНЫХ МОЛЛЮСКОВ

1.5.12 – Зоология

Диссертация на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
заслуженный деятель науки РФ
доктор биологических наук, профессор,
Атаев Геннадий Леонидович

Новосибирск
2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение……..……..4

Глава I. Обзор литературы ……..14

I.1. Основные подходы и методы изучения защитных реакций моллюсков…….....14

I.2. Развитие представлений об иммунитете моллюсков……..…..21

I.3. Конститутивные основы и механизмы иммунных реакций лёгочных моллюсков…...24

I.3.1. Организация кровеносной системы……..……...…..24

I.3.2. Клеточные и гуморальные механизмы защитных реакций…….…….....30

Глава II. Материалы и методы……..…….....…39

II. 1. Объекты исследования…….…….....39

II. 2. Методы исследования……..…..44

II. 2. 1. Видовая идентификация модельных объектов и филогенетический анализ…...44

II. 2. 2. Экспериментальная иммунизация моллюсков……..…..50

II. 2. 3. Гистологические исследования……..…….....51

II. 2. 4. Методы световой и электронной микроскопии……..…….....51

II. 2. 5. Методы проточной цитофлуориметрии ……....….54

II. 2. 7. Методы изучения экспрессии генов факторов защитных реакций……...….57

II. 2. 7. Биоинформатические методы…….……..…….....62

Глава III. Результаты и обсуждение……..……..……..65

III.1. Характеристика модельных объектов для изучения иммунных реакций лёгочных моллюсков ……..…….....65

III.1.1. Моллюски *Planorbarius corneus*……..……..…..66

Обсуждение к разделу III.1.1……..……..……...79

III.1.2. Моллюски *Planorbis planorbis* ……..……...81

Обсуждение к разделу III.1.2……..……..…87

III.1.3. Моллюски *Succinea putris*……..……..…….....88

Обсуждение к разделу III.1.3……..…….....100

III.1.4. Моллюски *Lymnaea stagnalis*……..……..…….....103

Обсуждение к разделу III.1.4……...……....107

III.1.5. Моллюски *Ampullaceana lagotis*……..……....108

Обсуждение к разделу III.1.5……..……...113

III.1.6. Моллюски *Cochlicopa lubrica*……..……..……...114

Обсуждение к разделу III.1.6……..…….....117

III.1.7. Моллюски *Arianta arbustorum*……..……..…….....118

Обсуждение к разделу III.1.7……..……..……..…..120

III.1.8. Моллюски *Biomphalaria glabrata* и *B. pfeifferi* ……...……...……...122

III.2. Гемоциты как специализированные клетки врождённого иммунитета лёгочных моллюсков……127
III.2.1. Основные морфологические типы гемоцитов……127
Обсуждение к разделу III.2.1……142
III.2.2. Концентрация и соотношение типов гемоцитов в циркуляции……145
Обсуждение к разделу III.2.2……155
III.2.3. Функциональные особенности гемоцитов……159
Обсуждение к разделу III.2.3……184
III.2.4. Изучение гемопоэза ……190
Обсуждение к разделу III.2.4……202
III.3. Распознавание чужеродного в иммунном ответе лёгочных моллюсков……208
III.3.1. Рецепторы врождённого иммунитета лёгочных моллюсков……208
Обсуждение к разделу III.3.1……218
III.3.2. Экспрессия генов патогенраспознающих рецепторов и молекул адгезии при иммунизации……237
Обсуждение к разделу III.3.2……243
III.4. Проявления иммунных реакций лёгочных моллюсков……250
III.4.1. Проявления клеточных реакций……250
Обсуждение к разделу III.4.1. ……262
III.4.2. Изменение гемоцитарного состава при иммунизации……266
Обсуждение к разделу III. 4.2……286
III.4.3. Экспрессия генов иммунного ответа при иммунизации……291
III.4.3.1. Экспрессия генов иммунного ответа по данным анализа транскриптома……291
III.4.3.2. Экспрессия генов иммунного ответа у моллюсков, зараженных трематодами разных видов ……293
III.4.3.3. Экспрессия генов иммунного ответа в органах и тканях моллюсков, зараженных трематодами разных видов……299
Обсуждение к разделу III.4.3……309
Заключение……323
Выводы ……335
Список сокращений, используемых в тексте……337
Словарь терминов……339
Список цитируемой литературы……347
Приложения (1–28)……405

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы. Моллюски являются одними из наиболее удобных и перспективных объектов для изучения иммунных реакций у беспозвоночных животных. За сотни миллионов лет эволюции моллюски сформировали разнообразные варианты строения и организации кровеносной и дыхательной систем, а также обзавелись широким кругом паразитов и патогенов (Nyholm, McFall-Ngai, 2004; McFall-Ngai et al., 2010). Интерес к иммунным реакциям моллюсков обусловлен также тем, что они имеют большое практическое значение. Брюхоногие и двустворчатые моллюски используются в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности, а некоторые виды являются биоиндикаторами в экологических исследованиях. В таких работах проводится анализ влияния абиотических, биотических и антропогенных факторов на физиологическое состояние и внутреннюю среду моллюсков (Gestal, Castellanos-Martínez, 2015). Однако особое внимание уделяется защитным реакциям моллюсков на вирусные, бактериальные, протозойные и метазойные инфекции (см. Wang et al., 2018). Актуальность изучения иммунных реакций лёгочных моллюсков обусловлена прежде всего их ролью промежуточных хозяев трематод (см. Атаев и др., 2020a).

Ввиду развития молекулярной филогенетики на протяжении двух последних десятилетий систематический статус лёгочных моллюсков неоднократно пересматривался (Bouchet, Rocroi, 2005; Schrödl, Stöger, 2014; Bouchet et al., 2017). В настоящее время пульмонаты рассматриваются как парафилетическая группа. Однако, в нашей работе мы используем термины «лёгочные моллюски» и «пульмонаты» не в качестве таксономических, а в традиционном зоологическом понимании – для обозначения гастропод, у которых в качестве органа дыхания выступает непарное лёгкое, являющееся участком мантии (Cuvier, 1817).

В настоящее время защитные реакции описаны у представителей всех групп многоклеточных животных (Купер, 1980). Первые данные о проявлениях иммунитета у беспозвоночных животных были освещены в трудах И. И. Мечникова. Именно благодаря изучению процессов фагоцитоза у беспозвоночных Мечниковым была сформулирована фагоцитарная теория иммунитета, ставшая одной из основных концепций иммунологической науки (Мечников, 1951).

Согласно современным представлениям, одним из ключевых условий формирования многоклеточности и эволюционного прогресса Metazoa является способность организмов распознавать «своё-чужое». Этот механизм позволяет определять потенциально опасные объекты, контактирующие с организмом и попадающие в его внутреннюю среду. По мере усложнения организации происходит и усложнение механизмов защитных реакций, которые обеспечивают не только защиту индивидуума от поступающих извне патогенов, но и тканевую

целостность, участвуя в процессах дифференцировки клеток и восстановления тканей (Бернет, 1964; Галактионов, 2005).

Иммунную систему принято рассматривать на двух уровнях организации – врождённом и адаптивном. Последний характерен исключительно для позвоночных животных. Именно на позвоночных выполнена бóльшая часть работ по анатомии, физиологии и механизмам иммунных реакций. У челюстноротых система врождённого иммунитета представлена в основном лейкоцитами миелоидного происхождения, которые обеспечивают быструю неспецифическую реакцию на чужеродное. В системе адаптивного иммунитета основными эффекторами являются специализированные клетки – лимфоциты, которые созревают, циркулируют, взаимодействуют в структурах, образованных лимфоидной тканью. В связи с этим, присутствие специализированного лимфомиелоидного комплекса рассматривается в качестве одного их основных критериев наличия у организма системы иммунитета (Петренко, 2003; Галактионов, 2005).

Другой отличительной особенностью системы адаптивного иммунитета является способ распознавания чужеродного. Лимфоциты различают уникальные антигены посредством специфических рецепторов, относящихся к иммуноглобулиновому суперсемейству. В процессе созревания лимфоцитов происходит реарранжировка генов, кодирующих антигенрапознающие рецепторы, в результате чего популяция лимфоцитов состоит из клонов с рецепторами разной специфичности (Tonegawa, 1983; см: Хаитов, 2000). При запуске иммунного ответа активируется пролиферация лимфоцитов со специфичным антигену рецептором, которая сопровождается гипермутагенезом, что также увеличивает эффективность иммунного ответа вследствие усиления аффинности рецепторов. Третий механизм, обеспечивающий адаптивность иммунитета – наличие иммунологической памяти, позволяющей более эффективно элиминировать патогены при повторной иммунизации (Ярилин, 2010; Pancer, Cooper, 2006).

В связи с тем, что именно позвоночные часто принимаются в качестве эталона в сравнительно-иммунологических работах, наличие адаптивного компонента долгое время рассматривалось как необходимое условие существования у организма истиной иммунной системы. В то же время, у бóльшей части животных, в том числе сложноорганизованных беспозвоночных, имеется только система врождённого иммунитета. И поскольку у беспозвоночных отсутствует лимфоидная система, специализированные лимфоидные клетки с антигенраспознающими рецепторами и настоящая иммунологическая память, по отношению к ним практически не использовался сам термин «иммунитет». Чаще применяли термин «защитные реакции». А механизмы врождённого иммунитета считались менее эффективными, и во многом противопоставлялись адаптивным иммунным реакциям. В результате при изучении

проявлений защитных реакций у беспозвоночных не применялись общие методические подходы, а также не разрабатывалось общей терминологии для их описания. Это вызывает затруднения при попытках обобщить данные о защитных реакциях у животных разных групп (Lackie, 1980; Купер, 1980; Галактионов, 2005).

Возобновление интереса к иммунным реакциям беспозвоночных произошло во многом благодаря пересмотру концепции врождённого иммунитета (Medzhitov, Janeway, 1997). Выяснилось, что распознавание в системе врождённого иммунитета не является исключительно неспецифическим. Клетки врождённого иммунитета распознают так называемые патоген-ассоциированные молекулярные паттерны – группы молекул, свидетельствующие о потенциальной опасности их носителя (Janeway, Medzhitov 2002). Функцию распознавания чужеродного выполняют многочисленные паттерн-распознающие (или патогенраспознающие) рецепторы, которые широко представлены как у примитивных многоклеточных, так и у высокоорганизованных первичноротых и вторичноротых животных (Меджитов, Джаневей, 2004; Kumar et al., 2011; Ottaviani, 2011).

Было показано, что паттерн-распознающие рецепторы позвоночных проявляют избирательность к патогенам разных групп (Kumar et al., 2011). Это привело к пересмотру самого понятия «специфичность». Также было доказано, что запуск основных форм адаптивного иммунного ответа невозможен без участия клеток врождённого иммунитета. Вследствие неспособности большинства Т-лимфоцитов распознавать нативные антигены, подготовленные эпитопы этих антигенов презентируются им, в том числе миелоидными клетками. Кроме того, эффекторные механизмы адаптивного иммунитета зачастую реализуются с участием клеток врождённого иммунитета (Ярилин, 2010; Roth-Walter et al., 2013).

Использование молекулярно-генетических подходов подтвердило, что патогенраспознающие рецепторы есть у всех многоклеточных, а механизмы иммунных реакций беспозвоночных во многом схожи с таковыми у позвоночных животных. Более того, у моллюсков и членистоногих выявлены патогенраспознающие рецепторы, проявляющие признаки соматической диверсификации. Это позволяет рассматривать распознавание в системе врожденного иммунитета не как «неиммунное распознавание» (Галактионов, 1986), а как избирательный процесс (Adema et al., 1997; Dong et al., 2006). Также появились данные, указывающие на существование «тренированного иммунитета» у беспозвоночных, который проявляется более быстрым и эффективным иммунным ответом при повторной иммунизации (Coustau et al., 2016; Netea et al., 2016; Gourbal et al., 2018; Melillo et al., 2018).

Таким образом, стало понятно, что система врождённого иммунитета беспозвоночных устроена более сложно и разнообразно, чем предполагалось ранее. Из-за отсутствия адаптивного компонента механизмы функционирования и взаимодействия её элементов могут

значительно отличаться от таковых в системе врождённого иммунитета позвоночных (Mandujano-Tinoco et al., 2021).

Первые работы по защитным реакциям моллюсков появились около ста лет назад (Agensborg, 1925; Schreiber, Schubert, 1949). С тех пор накопился большой массив данных о проявлениях защитных реакций (преимущественно клеточных) у моллюсков разных групп (в основном брюхоногих и двустворчатых). Пересмотр концепции врождённого иммунитета и развитие новых методов стимулировали многочисленные работы, которые раскрывают природу и механизмы защитных реакций моллюсков (см. Атаев и др., 2024a).

В настоящее время бóльшая часть сведений о защитных реакциях лёгочных моллюсков получена на представителях лабораторных линий видов рода *Biomphalaria*, являющихся промежуточными хозяевами трематод рода *Schistosoma*. В частности, установлено, что основными эффекторными элементами защитных реакции моллюсков являются циркулирующие клетки гемолимфы – гемоциты, описаны проявления клеточных и гуморальных реакций, выявлены патогенраспознающие и цитотоксические молекулы (см. Атаев и др., 2005b; Vorontsova et al., 2008; Loker, 2010; Castillo et al., 2020; Атаев и др., 2024a).

В то же время, относительно немногочисленные данные, полученные для других видов пульмонат, свидетельствуют о существовании видовых особенностей защитных реакций, которые необходимо учитывать при рассмотрении степени избирательности реакций врождённого иммунитета (см. Атаев и др., 2024a). Большинство исследований посвящено отдельным аспектам защитных реакций моллюсков. Результаты, полученные для разных объектов с помощью различных методов и описанные с пользованием разной терминологии, зачастую оказываются противоречивыми. Поэтому, несмотря на большой интерес к данному вопросу, сведения о защитных реакциях лёгочных моллюсков остаются во многом фрагментарными. В результате сформулировать полное представление об организации их иммунной системы сегодня затруднительно.

Для продуктивного продолжения исследований иммунных реакций лёгочных моллюсков в первую очередь требуется обобщить и критически осмыслить накопленные данные. Чтобы получить целостное представление об организации иммунной защиты пульмонат, необходим комплексный анализ клеточных и гуморальных компонентов системы и расширение количества изучаемых модельных объектов. Это позволит выявить как общие закономерности, так и особенности защитных реакций, характерные для конкретных видов (групп) моллюсков при иммунизации различными патогенами.

Важным условием проведения системных исследований новых модельных объектов является их детальная характеристика, включая точную видовую идентификацию. Это обеспечит корректный анализ избирательности иммунных реакций и интерпретацию

межвидовых различий. Особое внимание следует уделить эффекторным клеткам защитных реакций моллюсков – гемоцитам – и их сопоставлению со специализированными клетками системы врождённого иммунитета. Другое важное направление – анализ набора молекул, участвующих в распознавании патогенов, поскольку именно они обеспечивают запуск иммунных реакций.

Цель и задачи исследования. 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 с учётом морфологических и функциональных особенностей гемоцитов моллюсков модельных видов. На основе полученных результатов и литературных данных разработать классификацию гемоцитов лёгочных моллюсков.
2. Изучить изменение 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 легочных 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-ми видов, относящихся к 4-м 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 динамике активации АПО, а также развития первичной и вторичной клеточной реакции. Установлено, что пролиферация клеток гемолимфы в циркуляции не вносит значимого вклада в пополнение пула гемоцитов.

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 *Planorbarius corneus*, в том числе природнозаражённых трематодами *Bilharziella polonica.* Выявлены и охарактеризованы транскрипты, кодирующие факторы иммунного ответа. Установлено, что в транскриптоме гемоцитов закодированы факторы иммунного ответа, относящиеся ко всем группам факторов врождённого иммунитета. Впервые на основе данных транскриптома предсказана доменная структура патогенраспознающих рецепторов моллюсков *Planorbarius corneus.* Впервые для лёгочных моллюсков предсказаны варианты скавенджер-рецепторов с нетипичными сочетаниями доменов. На основе полученных в исследовании и представленных в литературе данных о доменном составе паттерн-распознающих рецепторов моллюсков, предложен вариант классификации патогенраспознающих рецепторов моллюсков.

Впервые для моллюсков из природных популяций, заражённых трематодами разных видов, выполнен анализ экспрессии генов патогенраспознающих рецепторов, включая толл-подобные рецепторы, лектины, фибриногенпоподобные белки, а также молекулы адгезии – ß-интегрина. Показано, что заражение трематодами разных видов приводит к избирательному изменению экспрессии генов толл-подобных рецепторов.

Впервые выполнен параллельный анализ экспрессии генов патогенраспознающих рецепторов и факторов цитотоксичности в гемолимфе и тканях сердца, гепатопанкреаса, белковой железы, ноги моллюсков, заражённых трематодами разных видов. Для генов фибриногенподобных белков, толл-подобных рецепторов, каталазы, пероксидазы, биомфализина выявлены существенные различия в экспрессии между моллюсками, заражёнными трематодами разных видов.

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

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 переделах

исследуемого ареала, что позволяет использовать их в качестве модельных объектов для изучения общих закономерностей и видовых особенностей иммунных реакций лёгочных моллюсков.

Теоретическая и практическая значимость работы. Всесторонний анализ иммунных реакций с использованием нескольких модельных объектов позволил выявить общие характеристики системы врождённого иммунитета лёгочных моллюсков. Результаты исследования важны для понимания механизмов и путей формирования иммунных реакций моллюсков и беспозвоночных животных в целом.

Полученные данные об иммунных реакциях лёгочных моллюсков на заражение трематодами разных видов расширяют представления о механизмах взаимодействия в паразито-хозяинной 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 данные о геномных последовательностях моллюсков модельных видов, а также трематод, использованных в качестве факторов иммунизации, представлены в открытые базы данных и могут быть задействованы для дальнейшего изучения генотипического разнообразия данных видов. Полученные данные транскриптома гемоцитов представлены в открытые базы данных и могут послужить материалом для сравнительно-иммунологических исследований. Предложенная классификация патогенраспознающих рецепторов лёгочных моллюсков может быть использована в качестве основы для классификации патогенраспознающих рецепторов системы врождённого иммунитета многоклеточных.

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

Степень достоверности результатов и апробация результатов. Достоверность результатов подтверждается публикациями в ведущих отечественных и международных изданиях. Результаты исследований были представлены на конгрессах, съездах, конференциях, симпозиумах: Международной конференции «Экология водных беспозвоночных» (Борок, 2010), Межвузовской конференции молодых ученых «Герценовские чтения» (Санкт-Петербург, 2020, 2021, 2024), XVII Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2013), VI Международной школе-конференции молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и системная биология» (Москва-Звенигород, 2014),

Всероссийском Симпозиуме «V Съезд физиологов России и V Съезд биохимиков СНГ» (Сочи-Дагомыс, 2016), Международном семинаре «Методология изучения партенит трематод» (Санкт-Петербург, 2015), V Межрегиональной конференции «Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке» (Новосибирск, 2015), I Калининградском научном иммунологическом форуме (Калининград, 2016), Школе-конференции для молодых специалистов и студентов с международным участием «Современные проблемы эволюционной морфологии животных» (Санкт-Петербург, 2016), Международном симпозиуме «Современные достижения в популяционной, эволюционной и экологической генетике» (Владивосток, 2015, 2025), VI Всероссийской конференции с международным участием «Школа по теоретической и морской паразитологии». (Севастополь, 2016, 2019, 2020), Международной конференция «Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем» (Санкт-Петербург, 2017), Второй Всероссийской научно-практической конференции «По вопросам реализации научных разработок» (Москва, 2017), Международной научной конференций «Биоразнообразие паразитов» (Москва, 2018), Всероссийской научной конференции с международным участием «Моллюски: биология, экология, эволюция и формирование малакофаун» (Борок, 2019), V Международной конференции «Концептуальные и прикладные аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных» (Томск, 2020), Межвузовской конференции «Актуальные проблемы биологии и медицинской паразитологии» (Санкт-Петербург, 2020, 2026), Международной научно-практической конференция «Изучение водных и наземных экосистем: история и современность» (Севастополь, 2021, 2022, 2024), Международной конференции «V Съезд паразитологического общества» (Новосибирск, 2013), «VI Съезд паразитологического общества» (Санкт Петербург, 2018), «VII Съезд паразитологического общества» (Петрозаводск, 2023), Втором всероссийском орнитологическом конгрессе (Санкт-Петербург, 2023), Международной научно-практической конференции «Паразитологические исследования в Беларуси и на сопредельных территориях» (Минск, 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 «Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты и обсуждение», Заключение, Выводы, Список сокращений, Словарь терминов, Список цитируемой литературы, Приложения. Материал иллюстрирован 153 рисунками, 51 таблицами и 28 приложениями. Все иллюстрации являются авторскими, соавторы совместных

иллюстраций указаны в подписях к ним. Список цитируемой литературы содержит 890 источников, 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, проведён сбор значительной части материала, получены основные результаты, осуществлён анализ данных и интерпретация полученных результатов, подготовлен текст диссертации, сформулированы основные положения и выводы. Подготовка и написание публикаций по теме диссертации, подготовка и презентация докладов по результатам работ на конференциях 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 и сотрудничества с отечественными и зарубежными учеными.

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 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.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В настоящее время накоплено большое количество данных о защитных реакциях лёгочных моллюсков. Большинство работ посвящено отдельным аспектам этих реакций, а сами данные получены с использованием разных методов – как зоологических, так и иммунологических. Однако результаты, полученные для разных объектов разными методами и описанные с использованием различной терминологии, зачастую трудно сопоставимы. Для корректной интерпретации таких данных важно понимать, какие методологические подходы были использованы. В связи с этим в литературном обзоре перед рассмотрением конституциональных основ и механизмов защитных реакций моллюсков освещены основные подходы, применяемые для их изучения. Также рассмотрены исторические этапы развития представлений об иммунных реакциях моллюсков.

I.1. Основные подходы и методы изучения защитных реакций моллюсков

Современные представления о защитных реакциях моллюсков основаны на результатах изучения небольшого числа модельных видов и связанных с ними паразито-хозяинных систем. Наиболее изученной является одна из групп гастропод – лёгочные моллюски.

Подавляющее число работ по иммунитету моллюсков выполнено на представителях одного рода – *Biomphalaria*, который распространён преимущественно в тропических и субтропических широтах Африки и Южной Америки (Brown, 1994). Интерес к изучению биологии биомфалярий обусловлен тем, что несколько видов рода являются промежуточными хозяевами кровяных двуусток – *Schistosoma mansoni* и *S. haematobium* (Malek, 1985; DeJong et al., 2001; Morgan et al., 2002). Несмотря на многочисленные меры борьбы с распространением шистомосомоза, включающие санитарно-эпидемиологические мероприятия и использование малакоцидов, в мире от этой опасной болезни страдают более 250 млн человек (Hotez et al., 2019; Hambrook, Hanington, 2021; WHO, 2023). Именно поэтому изучение защитных реакций моллюсков долгое время рассматривалось как один из путей понимания механизмов формирования иммунитета к шистосомозам и разработки мер биологической борьбы с распространением шистосом (Bayer, 1954; Hambrook, Hanington, 2021).

Уже в первых работах по экспериментальному заражению моллюсков *Biomphalaria glabrata* было установлено, что улитки из разных популяций различаются по степени резистентности/чувствительности к заражению трематодами разных видов и рас (Files, 1951). Путём направленных скрещиваний и отбора были получены линии моллюсков *Australorbis glabratus* (*Biomphalaria glabrata)*, отличающиеся по восприимчивости к инвазии трематодами родов *Schistosoma* (Newton, 1953, 1954, 1955; см. Richards, Shade, 1987) и *Echinostoma* (см.

Adema et al., 2000). Таким образом был доказан сам факт наследуемости степени резистентности, а значит, и особенностей защитных реакции. В многочисленных лабораторных исследованиях паразито-хозяинной системы «биомфалярия–шистосома» были получены данные о механизмах и динамике клеточных реакций, клеточном составе гемолимфы, проявлениях трансплантационного иммунитета, местах гемопоэза и молекулярных основах защитных реакций биомфалярий (Abdul-Salam, Michelson, 1980; Jourdane, Cheng, 1987; Cheng, Jourdane, 1987; Sullivan, 1990; Yoshino, Coustau, 2011 и др.).

Сведения о компонентах иммунитета и защитных реакциях лёгочных моллюсков других видов немногочисленны. Некоторые из наблюдений, полученных в экспериментах с моллюском *Biomphalaria glabrata,* были подтверждены на других представителях рода – *B. pfeifferi* (Buddenborg et al., 2017), *B. tenagophila* (Pereira et al., 2008; Martins-Souza, 2006) и *B. alexandrina* (Helal et al., 2014). Клеточный состав гемолимфы и функциональные характеристики гемоцитов исследовали у нескольких видов брюхоногих моллюсков, являющихся объектами экологических и физиологических исследований – *Lymnaea stagnalis* (Канев, 1987; Стадниченко и др., 1981; Connors, Yoshhino,1990; Adema et al., 1994; Plows et al., 2004; Vorontsova et al., 2008; Dikkeboom et al., 1988; van der Knaap, Loker, 1990; Adema et al., 1994), *L. natalensis* (El-Sayed et al., 2014), *Lymnaea truncatula* (Rondelaud, Barthe, 1981), *Planorbarius corneus* (Ottaviani, 1983, 1989; Ottaviani, Franchini, 1988), *Physa gyryna* (Byrd, Maples, 1969), *Oncomelania hupensis* (Sasaki et al., 2003; Zhang et al., 2021), *Helix aspersa* (Connors, Yoshhino,1990), *Aplysia californica* (Martin et al., 2007), *Radix lagotis* (Skala et al., 2014) и др. Однако для большинства из этих видов выполнены только единичные исследования защитных реакций и не проводилось их комплексного анализа. До сегодняшнего дня среди объектов сравнительно-иммунологических исследований ни один вид не изучен так подробно как моллюски *Biomphalaria glabrata.*

Среди брюхоногих моллюсков других групп число модельных видов для изучения защитных реакций также очень ограничено. Из жаберных моллюсков наиболее активно исследуются представители рода *Haliotis*, которые представляют интерес как коммерчески важная аквакультура. Поэтому большинство работ, имеющих какое-либо отношение к компонентам иммунитета морских ушек, посвящено влиянию условий среды (физические параметры, вирусные инфекции) на характеристики клеток гемолимфы (Travers et al., 2008; Gopalakrishnan et al., 2009; Grandiosa et al., 2018).

Методы изучения иммунитета моллюсков условно можно отнести к двум основным группам. Первая – это подходы, традиционно используемые в иммунологии и клеточной биологии. К ним относятся проточная цитометрия, культивирование клеток, иммуноцитохимия, гибридизация, иммунологические тесты: такие как реакция агглютинации, антиген-специфичные тесты и др. (Лефковитс и др., 1988). Большая часть этих подходов изначально

разрабатывалась и адаптировалась для изучения иммунитета млекопитающих. Для применения в отношении моллюсков такие методики требуют значительной адаптации. Вторая группа – методики, разработанные для исследования паразито-хозяинных систем и моллюсков, являющихся промежуточными хозяевами трематод. Сюда входят экспериментальные заражения, исследования защитных реакций при множественных и повторных инвазиях, анализ влияния условий среды на иммунитет (см. Loker, 2010). В последние годы иммунологические и паразитологические подходы дополнились целым арсеналом молекулярно-биологических методов, таких как анализ геномов, транскриптомов, дифференциальный анализ экспрессии генов, гибридизация *in situ* и др. Ниже будут рассмотрены основные подходы, применение которых внесло вклад в формирование представлений о защитных реакциях моллюсков.

Изучение клеточного состава гемолимфы. Основой изучения клеточного иммунитета у моллюсков служит комплексный морфофункциональный анализ гемоцитов с последующей их классификацией. Большинство классификаций гемоцитов выполнено на основе **микроскопического исследования** – как морфологического анализа гемоцитов на фиксированных препаратах, так и функционального и в условиях *in vitro.* В последнем случае для характеристики гемоцитов используются стандартные иммунологические методики – оценка способности к адгезии, связыванию лектинов, фагоцитозу, подвижности, способности к агглютинации (Cheng, 1975, 1996). Однако отсутствие общепринятых протоколов для исследования клеток моллюсков и необъективность некоторых характеристик (например, численность клеток, их размер, способность к адгезии, фагоцитозу и др.) привели к тому, что результаты исследований разных авторов зачастую несопоставимы (см. Атаев, Полевщиков, 2004). В частности, размерные характеристики гемоцитов, описанных на гистологических срезах, электронно-микроскопических фотографиях и в исследованиях *in vitro* значительно отличаются (Прохорова, 2009). Рядом авторов был осуществлён поиск **иммунологических маркеров** гемоцитов моллюсков (Ottaviani, Montagnani, 1989; Ottaviani, Cozarizza, 1990; Yoshino, Granath, 1983; Dikkeboom et al., 1988). Однако он также не дал результатов, позволяющих достоверно разделять гемоциты разных популяций (или функциональных групп).

Большой вклад в стандартизацию типирования клеток гемолимфы моллюсков внесло использование **проточной цитометрии,** которая позволяет поштучно анализировать характеристики большого числа клеток в проточной системе по показаниям светорассеивания и флуоресценции (Зурочка и др., 2014). Впервые метод проточной цитометрии для анализа гемолимфы моллюсков применил в своих работах Энзо Оттавиани (Ottaviani, Montagnani, 1989; Ottaviani et al., 1991), подтвердив присутствие в гемолимфе *Vivipaus ater* (Prosibranchia) одного, а в гемолимфе *Planorbarius corneus* – двух типов клеток, различающихся по параметрам прямого и бокового светорассеивания. Позднее использование флуоресцентных красителей

помогло более точно определять характеристики выделяемых вариантов гемоцитов (Martins-Souza et al., 2009; Donaghy et al., 2010). Возможность анализировать большое число особей и клеток позволяет использовать проточную цитометрию для анализа изменения клеточного состава гемолимфы моллюсков при паразитарной инвазии, бактериальной иммунизации, изменении условий среды (Allam et al., 2001; Barcante et al., 2012; Cueto et al., 2015 и др.) Следует отметить, что проточная цитометрия чаще применяется для изучения гемолимфы двустворчатых моллюсков, чем для брюхоногих. Возможности применения этого метода ограничены количеством гемолимфы, которое можно забрать у моллюска.

Культивирование клеток. В присутствии сбалансированных сред и растворов гемоциты пульмонат сохраняют жизнеспособность от нескольких часов до трёх дней (Chernin, 1963; Yoshino et al., 2013a). В таких кратковременных культурах была получена бóльшая часть данных о функциональных характеристиках гемоцитов *in vitro*: описаны фагоцитоз, агглютинация, влияние различных факторов на гемоциты и их взаимодействие с патогенами различной природы (Abdul-Salam, Michelson, 1980; Connors, Yoshino, 1990; Прохорова, 2009; Cueto et al., 2013). Так, в результате совместного культивирования гемоцитов *Biomphalaria glabrata* со спороцистами *S. mansoni* были выявлены различия в способности к фагоцитозу и инкапсуляции гемоцитов моллюсков резистентных и чувствительных к заражению линий (Loker et al., 1982). Также показана роль плазмы гемолимфы в распознавании чужеродных агентов (Van der Knaap, 1983; Bayne, Yoshino, 1989) и установлено влияние экскреторно-секреторных продуктов трематод на иммунную активность клеток гемолимфы (Lodes, Yoshino, 1989, 1994).

Для двустворчатых моллюсков *Dreissena polymorpha* удалось установить культуру гемоцитов, сохраняющуюся до 15 дней и частично переживающую непродолжительную криоконсервацию (Parolini et al., 2011). У бивальвий *Mytilus edulis* и *Cerastoderma edule* выделены неопластичекие гемоциты, культура которых способна к делению и сохраняется более 90 дней (Elston et al., 1988; Smolowitz et al., 1989; Walker et al., 2009).

Недолговечность культур гемоцитов моллюсков обусловлена как высокой степенью их дифференцировки, так и сложностью подбора оптимальных культуральных сред, максимально воспроизводящих физиологические условия, включая необходимые для клеточного деления ростовые факторы (Yoshino et al., 2013a). В настоящее время единственной долгосрочной культурой клеток моллюсков является культура эмбриональных клеток *Biomphalaria glabrata* (*B. glabrata* embryonic cell line, Bge cell line), которая была создана из обособленных с помощью трипсина клеток трохофоры биомфалярии (Hansen, 1976). Практически сразу культуру Bge-клеток стали рассматривать в качестве перспективной модели для изучения взаимодействия клеток моллюска с трематодами (Bayne et al., 1978). Клетки Bge по морфологии напоминают фибробластоподобные клетки и гемоциты, а также обладают многими активностями гемоцитов:

они подвижны, способны распознавать, и фагоцитировать чужеродные объекты, а также инкапсулировать партенит трематод (Bayne, 1978; Loker et al., 1982; Yoshino, Laursen, 1995; Yoshino, Coustau, 2011). Однако в капсулах из Bge-клеток спороцисты не только длительно развиваются, но отрождают дочерних спороцист, которые, в свою очередь, продуцируют церкарий (Ataev et al., 1998; Coustau, Yoshino, 2000). Возможность длительного взаимодействия Bge-клеток с паразитом была использована для изучения молекулярных механизмов распознавания паразита моллюском (Laursen, Yoshino, 1999; Castillo et al., 2007). Было показано, что клетки моллюска распознают определённые углеводные детерминанты на поверхности тегумента трематод. Эти детерминанты позднее были названы полиморфными муцинами (Mone et al., 2010). Кроме того, с использованием культуры Bge-клеток была доказана роль лектинов в распознавании клетками биомфалярии чужеродных агентов и формировании устойчивой системы «трематоды-моллюск» (Mitta et al., 2012). Геном Bge-клеток полностью секвенирован (Wheeler et al., 2018), что делает эту клеточную линию удобным объектом для изучения молекулярно-генетических основ иммунных реакций.

Некоторым исследователям удавалось получать кратковременные культуры различных тканей моллюсков: амёбоцит-продуцирующего органа (АПО) (Barbosa et al., 2006), сердца (Chernin, 1963), участков гонад (Bayne et al., 1975). В этих культурах наблюдали миграцию клеток, морфологически сходных с гемоцитами, из культивируемых тканей в окружающую среду.

Иммунизация. Традиционно в качестве основного фактора, вызывающего развитие защитных реакций моллюсков, рассматриваются трематоды. Именно интерес к трематодам и вызываемым ими инвазиям стимулировал исследование защитных реакций моллюсков. Первые сведения о влиянии трематод на ткани моллюсков были получены для представителей гастропод – промежуточных хозяев опасных шистосоматид (Faust, 1920; Agensborg, 1924). Первоначально защитные реакции моллюсков рассматривались исключительно как фактор, определяющий либо ограничивающий развитие партенит трематод (Files, Cram, 1949; Schreiber, Schubert, 1949). Поиски механизмов совместимости паразито-хозяинной системы «трематоды-моллюск» привели к открытию способов распознавания моллюском чужеродного, путей подавления защитных реакций паразитом и выявлению особенностей взаимодействия трематод и организма моллюска на молекулярном уровне (см. раздел I.2). В то же время, в качестве факторов иммунизации рассматриваются и другие патогены – паразитические нематоды (Barçante et al., 2012), простейшие (Tasumi, Vasta, 2007), бактерии (Seppälä et al., 2021), вирусы (Green et al., 2015). Также во многих работах применяют стандартные иммунологические тесты с использованием зимозана, эритроцитов, частиц латекса, дрожжей и др. (Yamaguchi et al., 1988;

Ford, 1992; Matricon-Gondran, Letocart, 1999; Ataev et al., 2016b; Pila et al., 2016b; Novoa et al., 2002 и др.).

Бóльшая часть работ выполнена на лабораторных моделях с экспериментальным заражением. В таких исследованиях возможна оценка временной динамики защитных реакций и сравнение особенностей иммунного ответа у моллюсков разных линий, возрастов и с различной интенсивностью инвазии (Loker, 2010). Модели с природным заражением изучаются гораздо менее интенсивно из-за сложности стандартизации условий эксперимента и интерпретации полученных данных. В то же время анализ моллюсков с естественным заражением позволяет значительно расширить спектр исследуемых моделей и, следовательно, сформировать более объективную картину защитных реакций лёгочных моллюсков (см. Прохорова, 2009).

Особый интерес представляют работы по повторному заражению моллюсков (Lie, Heyneman, 1976a, 1976b; Sullivan, Hu, 1996; Ataev, Coustau, 1999). Такие исследования направлены на выявление признаков тренированного иммунитета и иммунологической памяти (Gourbal et al., 2018). В качестве фактора повторной иммунизации могут быть использованы как паразиты того же вида, что и при первичном заражении, так и паразиты других видов. Соответственно, по результатам таких экспериментов анализируется степень специфичности защитных реакций моллюсков (Basch et al., 1969; Loker et al., 1992; Adema, Loker, 2015).

В качестве одного из стандартных факторов иммунизации используются трансплантаты органов и тканей. Уже в первых работах по изучению трансплантационного иммунитета пульмонат было показано, что изогенные трансплантаты не вызывают эффективной клеточной реакции (Cheng, Jourdane, 1987), тогда как алло- и ксенотрансплантаты инкапсулируются и деструктурируются гемоцитами (Jourdane, Cheng, 1987; Sullivan, 1990). Также метод трансплантации был использован у лёгочных моллюсков для доказательства гемопоэтической роли АПО и выявления различий между моллюсками из резистентных и чувствительных к трематодной инвазии линий (Sullivan, Spence, 1994, 1999; Vasquez, Sullivan, 2001).

Молекулярно-генетические методы. В последние десятилетия в сравнительно-иммунологических исследованиях применяются интенсивно развивающиеся методы геномики, транскриптомики, протеомики и биоинформатики. Благодаря развитию технологий высокопроизводительного секвенирования получены **геномы** моллюсков *Biomphalaria glabrata* (Adema et al., 2017), *B. straminea* (Nong et al., 2022), *Bulinus truncatus* (Young et al., 2022) и др. Усилиями многих исследовательских коллективов было идентифицировано множество генов, продукты которых могут участвовать в иммунном ответе: гены патогенраспознающих рецепторов, белков адгезии, антимикробных белков, факторов цитотоксичности, компонентов комплемента, цитокинов (см. Атаев и др., 2024а). Кроме того, данные анализа геномов

позволяют выявлять уникальные характеристики (полиморфизмы) моллюсков, резистентных и восприимчивых к заражению трематодами. Одним из достижений последних лет стало открытие гваделупского комплекса устойчивости *Biomphalaria glabrata*. Так назвали область генома, включающую 15 генов, отвечающих за резистентность к *Schistosoma mansoni* (Tenessen et al., 2015; Mitta et al., 2012). Раскрытие генетических основ резистентности позволяет прояснить механизмы распространения трематодных инвазий и разрабатывать эффективные методы борьбы с ними (Au et al., 2023).

Для нескольких видов моллюсков был выполнен **анализ транскриптомов** при иммунизации различными факторами (Lockyer et al., 2007; Adema et al., 2010; Collins et al., 2012; Dheilly et al., 2015; Buddenborg et al., 2017; Gerdol et al., 2018; Seppälä et al., 2021). Сопоставление транскриптомов даёт информацию о функциональной специализации и дифференцировке клеток. Кроме того, анализ дифференциальной экспрессии генов у моллюсков на разных сроках заражения позволяет анализировать временную динамику иммунного ответа и его регуляцию. Благодаря сравнительному анализу транскриптомов у биомфалярий было обнаружено явление соматической диверсификации генов фибриногенподобных белков (Hanington et al., 2010a, 2010b; Adema, 2015; Dheilly et al., 2015).

Большой интерес для понимания механизмов защитных реакций представляет метод гибридизации *in situ*, позволяющий локализовать клетки, в которых работают гены интереса. В отношении генов с иммунной функцией этот метод был успешно применён для изучения экспрессии генов антибактериальных белков у двустворчатых моллюсков *Mytilus galloprovincialis* (Mitta et al., 1999) и гастропод *Biomphalaria glabrata* (Guillou et al., 2007).

Протеомный анализ чаще всего используется в двух направлениях изучения иммунитета моллюсков: поиске и характеристике белков гемолимфы, участвующих в распознавании чужеродного и взаимодействии с патогенами (прежде всего, с трематодами), а также выявлении факторов, участвующих в реакциях клеточной цитотоксичности. Бóльшая часть работ по протеомному анализу моллюсков посвящена поиску белков, отвечающих за резистентность, а также сравнению белкового состава гемолимфы резистентных и чувствительных к заражению моллюсков (Vergote et al., 2005; Bouchut et al., 2006). Сопоставление конститутивного протеома плазмы гемолимфы *B. glabrata* и протеома плазмы, в которой инкубировали спороцист трематод *Schistosoma mansoni,* позволило выявить белки, взаимодействующие с паразитами: биомфализин, альфа-амилазу, дерматопонтин, лектины и др. (Duclermortier et al., 1999; Galinier et al., 2013; Tetreau et al., 2017; Wu et al., 2017). Методами белкового анализа в гемоцитах моллюсков выявлены такие ферменты, как фенолоксидаза, супероксиддисмутаза, сериновая протеаза, пероксидаза (Jiménez-Vega et al., 2005; Vorontsova et al., 2014; Бабич и др., 2017) и др.

I.2. Развитие представлений об иммунитете моллюсков

Возникновение системы иммунитета стало является из основных условий становления многоклеточности и эволюционного прогресса животных (Галактионов, 2005). Именно иммунитет обеспечивает, с одной стороны, функционирование многоклеточного организма как единого целого, осуществляя элиминацию генетически переродившихся (мутантных) клеток, с другой стороны – защиту организма животного от чужеродного, распознавая и обезвреживая возможные патогены (Бернет, 1964). Традиционно систему иммунитета принято рассматривать с точки зрения двух основных составляющих – врождённых и адаптивных иммунных реакций.

Адаптивный компонент иммунной системы присутствует только у позвоночных животных, имеющих специализированную лимфоидную систему. Лимфоидные клетки – лимфоциты – формируют специфические антигенраспознающие рецепторы (АРР) и продуцируют антитела, относящиеся к молекулам иммуноглобулинового суперсемейства. Благодаря сложному механизму реарранжировки генов, кодирующих антигенраспознающие рецепторы, образуется огромное количество уникальных клонов лимфоцитов, отличающихся по специфичности их рецепторов к антигенам (Pancer, Cooper, 2006; Kumar et al., 2011). Сопряжённая с распознаванием антигена клональная селекция, последующая клональная экспансия и выработка высокоаффинных антител обеспечивают эффективное обезвреживание патогенов. Иммунологическая память, формирующаяся в ходе первичного ответа, делает вторичный иммунный ответ более эффективным.

Бóльшая часть животных, в том числе сложноорганизованных беспозвоночных, являются обладателями только системы врождённого иммунитета. У беспозвоночных животных отсутствуют аналогичные позвоночным АРР и лимфоидная система. Поэтому механизмы врождённого иммунитета долгое время считались менее эффективными, по сравнению с механизмами адаптивного. Врождённый иммунитет в противоположность адаптивному рассматривался как неспецифический. Более того, по отношению к беспозвоночным практически не применялся сам термин «иммунитет». Реакции беспозвоночных животных на патогены обозначали как «доиммунные механизмы», «факторы неспецифической резистентности», «защитные реакции», «внутренняя защитная система» (Sminia, 1981, 1985; Bayne, Yoshino, 1989; Хаитов, 2000).

В то же время иммунология как отдельный раздел биологической науки сформировалась благодаря трудам И. И. Мечникова, который сформулировал фагоцитарную теорию иммунитета. В её основу легли исследования фагоцитарной активности мезенхимальных клеток у беспозвоночных разных групп – от губок до моллюсков и иглокожих (Мечников, 1951). Таким образом, уже в трудах И. И. Мечникова были заложены методологические основы

сравнительной иммунологии. Тем не менее на протяжении многих лет представления об иммунитете были практически полностью основаны на изучении только позвоночных, составляющих менее 5% от числа видов животных. Попытки выявить общие механизмы защитных реакций у беспозвоночных (помимо фагоцитоза) затруднялись из-за огромного разнообразия их морфологической и физиологической организации (Купер, 1960; Hildemann, Reddy, 1973; Lemmi et al., 1974; Галактионов, 1995).

Возобновление интереса к иммунитету беспозвоночных произошло в конце XX века и связано с разработкой новой концепции врождённого иммунитета (Medzhitov, Janeway, 1997). Согласно концепции Джейнуэя и Меджитова, клетки врождённого иммунитета распознают так называемые патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns, PAMP, ПАМП). Эти консервативные молекулярные структуры служат маркерами потенциальной опасности их носителя и присутствуют у широкого круга патогенов. Было показано, что паттерн-распознающие (обозначаемые также как патоген- или образраспознающие) рецепторы (ПРР) отличаются значительным разнообразием и избирательностью по отношению к лигандам, обладая так называемой групповой специфичностью (Janeway, Medzhitov, 2002). Это представление позволило по-новому взглянуть на проблему специфичности в системе врождённого иммунитета. Кроме того, концепция постулирует, что активация реакций адаптивного иммунитета невозможна без предварительного запуска механизмов врождённого иммунитета.

Стало понятно, что механизм распознавания может служить общей чертой систем врождённого иммунитета позвоночных и беспозвоночных животных. Реакции врождённого иммунитета у беспозвоночных стали рассматривать как аналогичные реакциям у позвоночных, и постепенно термин «иммунитет» начали применять по отношению к различным группам беспозвоночных (Söderhäll, 2010). Среди беспозвоночных наибольшее интенсивно в отношении врождённого иммунитета исследуются высокоорганизованные первичноротые – артроподы и моллюски. Эти группы лидируют по числу видов и характеризуются широким разнообразием сред обитания. При этом членистоногие традиционно вызывают больший интерес иммунологов и зоологов ввиду их высокой практической значимости (Глупов, 2004; Beckage, 2008; Rosales, 2017).

В то же время, именно моллюски являются одними из наиболее удобных и перспективных объектов для сравнительно-иммунологических исследований. За сотни миллионов лет эволюции они сформировали разнообразные варианты строения и организации кровеносной и дыхательной систем, а также обзавелись широким кругом паразитов и патогенов (Nyholm, McFall-Ngai, 2004; McFall-Ngai et al., 2010). Среди паразитов моллюсков особое место занимают трематоды, многие из которых вызывают тяжёлые заболевания человека и животных.

В результате длительной коэволюции между трематодами и моллюсками сложились тесные взаимодействия (Lockyer et al., 2004).

Трематоды часто демонстрируют узкую специфичность по отношению к моллюскам определённых видов и линий. При этом моллюски из разных популяций отличаются по восприимчивости к заражению конкретными трематодами (Files, 1951). Явление резистентности моллюсков к трематодной инвазии рассматривали как один из возможных механизмов борьбы с трематодозами (Bayer, 1954). На моллюсках *Biomphalaria glabrata*, различающихся по восприимчивости к инвазии трематодами, впервые была описана клеточная реакция, проявляющаяся в виде скопления клеток моллюска вокруг мирацидиев и спороцист трематод (Newton, 1952; Pan, 1961). Уже в первых работах клетки моллюска, окружающие паразиты и патогены описываются как типичные фагоциты и обозначаются чаще всего как «амёбоциты» (Tripp, 1961; Byrd, Maples, 1969).

Следующим этапом в изучении защитных реакций моллюсков стало описание универсального механизма клеточного ответа – инкапсуляции. Было показано, что гемоциты формируют скопления и многослойные капсулы вокруг партенит трематод и трансплантатов (Byrd, Maples, 1969; Lie, Heyneman, 1975a, 1975b, 1976a; Loker et al., 1986). Гемоциты этих капсул секретируют вещества, способствующие гибели патогена, затем инкапсулируют его остатки, а впоследствии другие клетки разрушают сами гемоцитарные структуры (Ataev, Coustau, 1999).

В экспериментах по трансплантации тканевых фрагментов установлено, что гемоциты способны различать алло- и изотрансплантаты (чужеродные и собственные). При этом изотрансплантаты не разрушаются гемоцитами, что указывает на способность клеток распознавать «своё» и «чужое» (Cheng, Jourdane, 1987).

Значительный прогресс в изучении иммунных реакций моллюсков был достигнут благодаря освоению молекулярно-генетических методов. Развитие технологий высокопроизводительного секвенирования позволило выявлять транскрипты веществ, участвующих в иммунном ответе, описать пространственную и временную динамику их экспрессии. В настоящее время накапливаются данные о транскриптомных профилях моллюсков различных видов (Loker, 2010; Castillo et al., 2020; Атаев и др., 2024а). Однако большая часть исследований выполнена на представителях ограниченного числа модельных видов. Среди брюхоногих моллюсков активно исследуются виды рода *Biomphalaria – B. glabrata* и *B. pfeifferi*, являющиеся переносчиками шистосомоза (Adema et al., 2010; Buddenborg et al., 2017). Среди двустворчатых моллюсков основное внимание уделяется промысловым и культивируемым видам: *Crassostrea virginica*, *C. gigas*, *Argopecten irradians*, *Mytilus galloprovincialis* и *M. edulis* (Song et al., 2010; Romero et al., 2013; Gerdol et al., 2018). Среди

цефалопод исследуются *Octopus vulgaris* и *Euprymna scolopes* (Novoa et al., 2002, Castillo et al., 2015; Gestal et al., 2015). Таким образом, современные представления об иммунитете моллюсков основаны на изучении ограниченного числа видов.

В то же время разнообразие моллюсков внутри каждого класса огромно. Чтобы выявить общие закономерности функционирования иммунной системы лёгочных моллюсков, требуется исследовать большее число видов, включая особей из природных популяций.

I.3. Конститутивные основы и механизмы иммунных реакций лёгочных моллюсков

I.3.1. Организация кровеносной системы

Согласно классическим представлениям сравнительной иммунологии, становление системы иммунитета осуществлялось в три этапа (Hildemann, Reddy, 1973). Первый этап – квазимунное распознавание, проявляющееся в способности организма (а точнее – отдельных его клеток) отличать «своё» от «чужого». Второй этап – примитивный клеточный иммунитет, проявляющиеся в обширной клеточной реакции на пересадку трансплантатов. У беспозвоночных такой ответ осуществляют гемоциты или целомоциты. На этом уровне начинает проявляться специфичность иммунных реакций и формируются зачатки иммунной памяти. Третий уровень – интегрированный клеточный и гуморальный иммунитет, включающий взаимодействующие между собой клетки и молекулы.

Существование интегрированного клеточного и гуморального иммунитета возможно благодаря совместному функционированию органов и тканей, обеспечивающих взаимодействие компонентов иммунитета между собой (Купер, 1980). У позвоночных животных комплекс органов и тканей, обеспечивающих иммунный ответ, получил название лимфомиелоидного комплекса (Yoffey, 1985). Лимфомиелоидный комплекс включает в себя кроветворные органы и структуры, в которых происходит созревание лимфоцитов – костный мозг, тимус, селезёнку, лимфатические узлы, неинкапсулированные лимфоидные образования и соединительную ткань. По сути, лимфомиелоидный комплекс представляет собой морфологическую основу иммунной системы позвоночных животных. Он обеспечивает взаимодействие и совместное функционирование всех компонентов иммунитета. Основу лимфомиелоидного комплекса составляют клетки мезенхимального происхождения.

По отношению к беспозвоночным животных термины «лимфомиелоидный комплекс» и «иммунная система» практически не используется. При отсутствии настоящей лимфоидной ткани основой для функционирования иммунитета служат системы, обеспечивающие циркуляцию клеток-иммуноцитов – целом и кровеносная система. Их особенности организации влияют на стратегии иммунной защиты.

Кровеносная система пульмонат состоит из сердца, системы артериальных и венозных сосудов и системы лакун (рисунок 1) (Baecker, 1932; Jones, 1983; Ноздрачев и др., 1999).

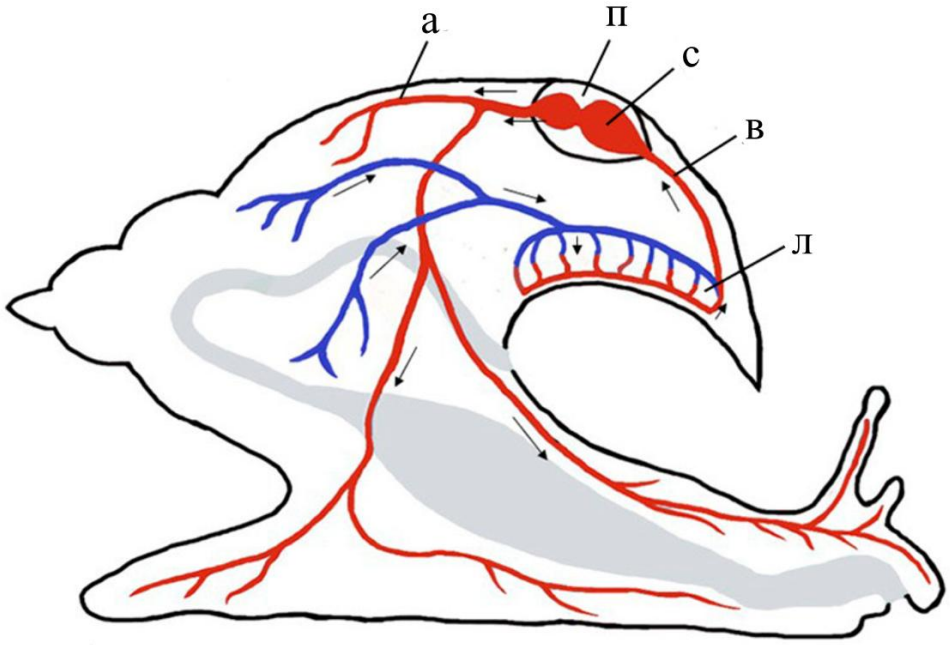


Рисунок 1. Общепринятая схема строения кровеносной системы лёгочных моллюсков. Условные обозначения: а – артерии; в – вены; л – лёгкое; п – перикард; с – сердце.

Кровеносная система моллюсков имеет мезодермальное происхождение. У моллюсков сердце, перикард, почки и гонады развиваются из общего зачатка (Иванова-Казас, 1977). В мезенхимальной ткани, обособляющейся после распада мезодермальных полосок (формируются из небольшого числа мезобластов (мезодермальных телобластов), «образуются два скопления клеток», которые потом «объединяются под кишкой и дифференцируются на медианный зачаток перикарда и два боковых зачатка почек» (Иванова-Казас, 1977). У некоторых Caenogastropoda перикард закладывается в виде парного образования из остатков целомических мешков или разрастаний брюшной эктодермы. У изученных пульмонат (*Arion* sp., *Limax* sp.) зачаток перикарда всегда непарный и расположен справа. Мезенхимальные клетки зачатка расходятся, освобождая полость перикардиального пузырька и формируя эпителий перикарда. Зачаток сердца формируется путём впячивания стенки перикарда. Желобок замыкается, формируя трубку, которая сообщается с общей полостью тела. Желудочек и предсердие обосабливаются путем перетяжки сердечной трубки. Затем стенки сердца дифференцируются на эндотелиальный и мышечный слои. «Кровеносные сосуды образуются из сохраняющихся в массе мезенхимальных клеток остатков первичной полости тела» (Иванова-Казас, 1977).

Таким образом, перикардиальная полость моллюсков представляет собой участок целома, а кровеносные сосуды – остатки первичной полости тела. Кроме того, кровеносная система моллюсков не замкнута. Из сосудов кровь попадает в лакуны и синусы. Поэтому по отношению к циркулирующей жидкости кровеносной системы моллюсков используют термин «гемолимфа».

Сердце лежит в околосердечной (перикардиальной) полости, расположенной над лёгочным мешком и имеющей эпителиальную выстилку – перикард (Иванов, 1940). Перикардиальная сумка сообщается с просветом почки через реноперикардиальное отверстие. Перикард окружен частью мешковидной почки и мантии (Pan, 1958). У особей, имеющих правозакрученную раковину, сердце помещается позади мантийной полости или слева над лёгочной полостью, у левозакрученных форм – справа (Акрамовский, 1976).

Сердце соединяется с перикардом около верхней части желудочка и предсердия (Sminia, 1981). Предсердие грушевидной формы расположено впереди желудочка. Стенки предсердия тонкие и эластичные (Иванов, 1940; Pan, 1958). Просвет предсердия может быть в несколько раз больше полости желудочка (Pan, 1958; Sminia, 1981). Мышечная стенка желудочка прудовика и виноградной улитки в 8–10 раз толще стенки предсердия (Bekius, 1972; Быстрова, 2001).

Внешний слой сердца – эпикард – сформирован сплошным слоем эпителиальных клеток, очертания которых изменяются от округлых и столбчатых до уплощённо-растянутых в разные фазы сердечного цикла (Pan, 1958). Поверхность эпителиальных клеток эпикарда покрыта микроворсинками (Hill, 1987).

Миокард состоит из одноядерных мышечных клеток. У виноградной улитки миоциты взаимодействуют между собой посредством многочисленных контактов десмосом, нексусов и интеркалярных дисков (Быстрова, 2001). Кардиомиоциты желудочка гастропод крупнее миоцитов предсердия. В желудочке миоциты формируют трехмерную сеть разветвляющихся и анастомозирующих мышечных волокон, которая уплотняется рядом с эпикардом (North, 1963; Elekes et al., 1973). В миокарде предсердия виноградной улитки, ахатины и обыкновенного прудовика также присутствуют клетки, содержащие скопления белковых гранул. Гранулярные клетки предположительно выполняют эндокринную функцию, регулируя деятельность сердца (Sminia, 1972; Steinbach, 1977; Быстрова, 2001; Шабельников, 2008). Миокард иннервируется большим количеством нервных окончаний (Martin, 1980; Koester, Alevizos, 1989; Kodirov et al., 2011).

Эндокард представлен слоем эндотелиальных клеток в желудочке и прерывистым слоем эндотелиоцитов в предсердии (Pan, 1958; Wendelaar Bonga, Boer, 1969), либо отдельными эндотелиальными клетками, примыкающими к миокарду (Jones, 1983).

Атриовентрикулярное отверстие снабжено клапаном, пропускающим кровь только в одном направлении (из предсердия в желудочек). Клапан имеет вид мышечных складок, вдающихся в полость желудочка (Иванов и др., 1985). Его поверхность покрыта клетками, морфологически сходными с клетками эпикарда (Pan, 1958). Функциональная эффективность клапана подтверждена в экспериментах со слизнями: инъекции в желудочек и аорту никогда не приводили к поступлению вводимой жидкости в предсердие (Duval, Runham, 1981).

У части изученных пульмонат также имеется клапан в начале аорты. В частности, аортальный клапан описан у *Biomphalaria glabrata* (Pan, 1958), *Lymnaea stagnalis* (Bekius, 1972). В тоже время у шести изученных видов слизней (*Arion ater*, *A. hortensis, Deroceras reticulatum*, *D. caruanae*, *Milax budapestensis*, *Limax pseudoflavus*) он отсутствует (Duval, Runham, 1981).

Сосуды и синусы. Среди брюхоногих моллюсков пульмонаты характеризуются наиболее хорошо развитой артериальной и венозной системами (Беклемишев, 1964; Иванов, 1985).

От желудочка отходит толстая аорта, которая вскоре делится на переднюю (головную) аорту и заднюю (внутренностную, висцеральную) аорту. От головной затем отходит половая артерия, которая снабжает семяприемник, семяпровод, гермафродитный проток, белковую железу и половой аппарат. Основной ствол головной аорты разветвляется на сосуды, поступающие к голове, мантии, пищеводу, слюнным железам, глотке, желудку, кишечнику, гонаде, коллумелярному мускулу, мускулатуре ноги (педальная артерия), буккальной массе.

Артерии переходят в тонкие сосуды, которые разветвляются во всех органах. Кровь из артерий попадает в артериальные синусы, которые разветвляются во всех органах. Из артериальных синусов гемолимфа попадает в лакунарные пространства, а затем в венозные синусы. Последние являются участками первичной полости тела, ограниченными «соединительнотканными мембранами и сообщающимися между собой порами в этих мембранах» (Иванов, 1985). Некоторые органы улиток, такие как желудок, буккальная масса (мышечный комплекс в области глотки) и нога, сильно васкуляризированы. Другие структуры, например железы и нервные стволы, не имеют внутренних лакун и располагаются в крупных венозных синусах. Нервные ганглии, напротив, пронизаны разветвлённой сетью капилляров (Bekius, 1972).

Венозная система пульмонат имеет более разнообразное строение, чем артериальная. Однако у всех представителей этой группы хорошо развиты левая и правая краевые вены. В левую краевую вену оттекает поступает от нижнего и переднего отделов тела, а в правую краевую – из внутренних органов, в том числе из гепатопанкреаса. Левая и правая краевые вены соединяются с круговой веной, образуя венозное кольцо в основании лёгкого – вдоль края

лёгочного мешка (Bekius, 1972; Иванов, 1985). По афферентным сосудам из кольца гемолимфа направляется в капиллярную сеть лёгкого для газообмена (Bekius, 1972; Иванов, 1985).

У пульмонат одновременно с лёгочным дыханием функционирует так называемое кожное дыхание. Через покровы тела осуществляется до половины всего газообмена (Jones, 1971). У изученных видов – *Helix pomatia*, *Oncidium verraculatum*, *Lymnaea stagnalis* – кожные покровы обильно васкуляризированы (Awati, 1932–1933; Bekius, 1972). Поскольку мельчайшие синусы в покровах переходят в лакуны, в которых отсутствует базальная мембрана, газообмен в таких участках происходит очень эффективно (Duval, Runham, 1981). Кислород, проникающий через кожу головы и ноги, транспортируется в боковые вены. Одна часть этих вен питает почку, другая направляется к переднему отделу крыши лёгкого.

Частично (из правой части лёгкого у *Helix pomatia*) или полностью артериальная кровь из эфферентных лёгочных сосудов поступает в почку. Выносящие сосуды лёгкого и часть выносящих сосудов передней части почки впадают в лёгочную вену. По ней кровь попадает в предсердие. Таким образом, в сердце поступает артериальная гемолимфа, прошедшая фильтрацию в почках (Basch, 1969; Pan, 1971).

Отдельного внимания заслуживает организация **стенок сосудов**. У моллюсков *H. pomatia*, *Biomphalaria glabtata*, *Achatina fulica* крупные артерии имеют собственные стенки (Nold, 1924; Иванов 1985; Pan, 1971; Fernandez, 1971), включающие три слоя: наружный – соединительнотканный, средний – образован гладкомышечными волокнами (преимущественно круговыми), внутренний – выстилка сосудов – в разной степени развит у представителей разных видов пульмонат (Pan, 1958; Jones, 1983; Curtis, Cowde, 1979).

В ряде работ упоминается присутствие «эндотелиоподобного слоя в сосудах». У слизня *Limax maximus* внутренняя выстилка описана в аорте, а в его крупных артериях имеется неполный слой выстилающих клеток (Curtis, Cowden 1979). У моллюсков *Biomphalaria glabrata* в аорте и крупных артериях описаны «выстилающие фибробластоподобные клетки» (Pan, 1958, 1971). Однако электронно-микроскопические исследования крупных артерий *Helix pomatia* не выявили признаков эндотелиальной выстилки (Vosswinkel, 1982). Кроме того, установлено, что стенка капилляров в соединительнотканной оболочке нервных ганглиев образована неклеточным материалом, окружающим мышечные и соединительнотканные клетки (Fernandez, 1971). Вероятно, фибробластоподобные клетки, выстилающие в отдельных участках сосуды кровеносной системы пульмонат имеют гемоцитарное происхождение.

Интересной особенностью сосудов некоторых пульмонат является присутствие кальцинированных включений в клетках внешнего слоя артерий. В этом случае артерии имеют белёсый оттенок. Такую обызвествленную адвентициальную ткань стенок сосудов моллюсков первоначально описали как «хондроидную» (Barfurth, 1881; Nold, 1924; Hyman, 1967). У

слизней *Limax maximus, Arion ater* и наземных улиток *Anguispira alternata* кальцинирована задняя аорта и стенки все её ветвей, включая самые мелкие. При этом передняя аорта не кальцинирована, но имеет более мощный мышечный слой (Tompa, Watabe, 1976; Curtis, Cowden, 1979). Возможным объяснением такой организации стенок артерий является механическая функция кристаллических включений, которые придают бóльшую прочность сосудам, предотвращая их разрушение от большого давления в циркуляции (Nold, 1924). Другая возможная функция таких клеток – синтез дыхательных пигментов (Sminia, 1972) или поддержание буферного баланса гемолимфы (Tompa, Watabe, 1976). Общий вид гранул в этих клетках напоминает молекулы гемоцианина (Fernandez, 1971). В то же время, только в одном из многочисленных исследований строения кровеносной системы *Lymnaea stagnalis* описано отложение солей вокруг сосудов (Carriker, 1947). У хорошо изученной *Helix pomatia* таких структур также не описано (Nold, 1924; North, 1963; Hill, Welsh, 1966).

Вены пульмонат имеют различное строение. У *Biomphalaria glabrata* они лишены чётко выраженной стенки и представляют собой тканевые пространства, частично выстланные фибробластоподобными клетками. Из-за этого вены морфологически трудно отличимы от окружающих тканей и свободно переходят в кровеносные синусы (Pan, 1958). У моллюсков *Lymnaea stagnalis* афферентные вены имеют четко выраженную стенку, в то время как у эфферентных сосудов стенка отсутствует (Bekius, 1972). Такое различие может быть связано с преобладанием транспортной функции в одних участках кровотока и обменной – в других (Ноздрачев и др., 1999).

Кровеносные синусы представляют собой тканевые пространства, которые обильно пронизаны фибробластами. Предположительно некоторые из них формируют трабекулярную опору (Pan, 1958). Структурно синусы являются компонентами тканей, в которых они расположены. Так оболочка синусов, питающих нервные ганглии моллюска *Helix aspera,* является продолжением оболочки нервных ганглиев (Fernandez, 1971), а синусы пищеварительной железы *Eobania vermiculata* – продолжением окружающей её соединительной ткани (Bani, Delfino, 1973).

Кровообращение. Моллюски обладают почти полностью закрытым перикардом. Установлено, что нарушение целостности перикарда у пульмонат влияет на частоту и ритм сердечных сокращений. Это может свидетельствовать о том, что давление в полости перикарда необходимо для эффективной работы сердца. В закрытой полости перикарда сокращение желудочка должно оказывать всасывающее действие на стенку перикарда (как гидравлический насос). Это приводит к расширению предсердия и поступлению в него крови из венозной части кровотока (Krijgsman, Divaris, 1955; Hill, Welsh, 1966). В предсердии и желудочке пульмонат

зарегистрировано большое давление, в 2–5 раз превышающее давление в отделах сердца прозобранхий и бивальвий (Smith, 1985).

Частота сокращений сердца у моллюсков сильно варьирует и во многом зависит от температуры окружающей среды. Так у *Helix pomatia* средняя частота сердечных сокращений составляет 36–46 раз в минуту и варьирует от 2 (при 0 ºС) до 82 (при 36 ºС) систол в минуту (Иванов, 1940).

Сердце пульмонат составляет менее 0.1% массы их тела. В связи с этим высказывалось предположение, что что одних сердечных сокращений недостаточно для полноценного обеспечения кровообращения в организме моллюска. Брюхоногий моллюск *Haliotis* может оставаться живым в течение 5 дней после удаления сердца (Bekius, 1972). Это позволяет предположить, что кровеносной системе помогают пульсирующие движения мышечных структур других органов (Bekius, 1972). Такие органы как органы желудок и буккальная масса имеют внутреннюю васкуляризацию. Соответственно кровоток в венозной системе моллюсков в значительной степени регулируется мышечными движениями как органов, так и всего животного. Сокращение мускулатуры ноги приводит к усилению венозного оттока крови к респираторным структурам и предсердию (Schipp, 1987). Для прудовиков *Lymnaea stagnalis* показано, что периодическое сокращение колумеллярной мышцы необходимо для кровообращения (Bekius, 1972).

I.3.2. Клеточные и гуморальные механизмы защитных реакций

Принято считать, что на формирование защитных реакций у лёгочных моллюсков большое влияние оказало их взаимодействие с трематодами в рамках эволюционно сложившихся специфичных взаимоотношений (Cribb et al., 2001; Атаев, Полевщиков, 2004; Lockyer et al., 2004; Adema, Loker, 2015). Поэтому основные представления об иммунных реакциях моллюсков основаны на изучении паразито-хозяинных систем «трематоды–моллюски». Однако в настоящее время показано, что кроме трематод в пульмонатах распространены патогены других групп – метацестоды, нематоды, протисты, патогенные бактерии и вирусы (Grewal et al., 2003; Fernández Robledo et al., 2014; Токмакова и др., 2025; Du et al., 2025). Поэтому отдельно изучаются такие составляющие иммунитета моллюсков как антибактериальный, противовирусный, противопротозойный иммунитет (Green et al., 2015; Zannella et al., 2017; Portet et al., 2018).

В данном разделе описаны общие представления о защитных реакция лёгочных моллюсков. Отдельные компоненты иммунных реакций будут подробно рассмотрены при обсуждении результатов в главе III.

Традиционно рассматриваются два аспекта иммунных реакций животных: клеточный и гуморальный. Однако ключевым звеном осуществления иммунных реакций на любом уровне признаются циркулирующие клетки, которые, кроме участия в элиминации чужеродного, также задействованы в образовании гуморальных факторов (Adema, Loker, 2015). Таким образом, провести чёткую границу между клеточным и гуморальным иммунитетом зачастую невозможно.

У моллюсков за выполнение иммунных реакций отвечают циркулирующие клетки гемолимфы моллюсков – **гемоциты** (Атаев, Полевщиков, 2004; Pila et al., 2016a). Морфологическая классификация гемоцитов пульмонат основана на исследованиях, проведенных с помощью световой и электронной микроскопии (Sminia, 1972; Harris, 1975; Sminia, Barendsen, 1980a; Ottaviani, 1983; Adema et al., 1992; Sasaki et al., 2003; Cavalcanti et al., 2012; Ataev et al., 2016b; Pila et al., 2016a; Prokhorova et al., 2018; Tokmakova et al., 2020), проточной цитометрии (Martins-Souza et al., 2009; Barcante et al., 2012; Ataev et al., 2016b; Prokhorova et al., 2018; Tokmakova et al., 2020), на данных по изучению функциональной активности клеток (Cheng, 1984), по разделению клеток центрифугированием в градиенте плотности (Adema et al., 1994), по связыванию антител (Yoshino, Granath, 1985) и ферментных маркеров (Sminia, Barendsen, 1980a; Joky et al., 1983; Yoshino, Granath, 1983).

В разных работах описывается различное количество типов клеток гемолимфы пульмонат (Sminia, 1972; Rondelaud, Barthe, 1981; Ottaviani, Franchini, 1988; van der Knaap et al., 1993; Matricon-Condrat, Letocart, 1999; Martins-Souza et al., 2009; Cavalcanti et al., 2012; Прохорова и др., 2018a; Присный, Кулько, 2022 и др.) (таблица 1). Кроме того, из-за отсутствия общей классификации и критериев типирования гемоцитов для их обозначения используются разные термины: лейкоциты, лимфоциты, фагоциты, макрофаги, гранулоциты, амебоциты и др. (Cheng, 1975; Jeong, Heyneman, 1976; Cheng, Guida, 1980; Sminia, Barendsen, 1980b; Stumpf, Gilbertson, 1978; Sminia, 1981; Barracco et al., 1993; Adamowicz, Bolaczek, 2003) (см. таблицу 1).

Различия в характеристиках гемоцитов чаще всего обусловлены применением разных методов исследования (микроскопия, проточная цитометрия, иммуноцитохимия) и использованием различных критериев описания: морфологических, ультраструктурных и функциональных особенностей, а также биохимических маркеров (Pila et al., 2016a; Атаев и др., 2020).

В то же время, большинство исследователей выделяют у лёгочных моллюсков два основных типа клеток гемолимфы – гранулоциты и гиалиноциты (Cheng, 1975, 1984; Ottaviani, 2006; Yoshino et al., 2013b; Ataev et al., 2016b; Pila et al., 2016a, 2017; Prokhorova et al., 2018; Tokmakova et al., 2020). Эти клетки различаются по ряду признаков: размеру, способности

образовывать псевдоподии, фагоцитарной активности, количественному соотношению в кровотоке, а также набором и строением органелл (Barbosa et al., 2006; Souza, Andrade, 2006).

Таблица 1. Клеточный состав гемолимфы лёгочных моллюсков
(Атаев, Прохорова, Токмакова, 2024, с изменениями)

Виды пульмонат	Количество типов гемоцитов	Авторы
Achatina achatina, *Achatina fulica,* *Biomphalaria glabrata,* *Bulinus natalensis,* *Helix aspersa,* *Lgmnaea stagnalis*	2	Adema et al., 1992
Biomphalaria glabrata	2	Jeong, Heyneman, 1976, Прохорова и др., 2018a Yoshino, Coustau, 2011 Yoshino et al., 2013b
Biomphalaria glabrata	3	Matricon-Condrat, Letocart, 1999 Portet et al., 2019
Biomphalaria glabrata, *Biomphalaria straminea*	5	Cavalcanti et al., 2012
Helix aspersa	2	Furuta, Yamaguchi, 2001
Helix aspersa maxima	2	Adamowicz, Bolaczek, 2003
Indoplanorbis exustus	2	Mahilini, Rajendran ,2008
Lymnaea natalensis	3	El-Sayed et al., 2014
Lymnaea stagnalis	1	Sminia et al., 1983 van der Knaap et al., 1993 Boisseaux et al., 2016
Lymnaea truncatula	2	Rondelaud, Barthe, 1981
Lymnaea stagnalis, *Lymnaea peregra,* *Planorbarius corneus,* *Planorbis planorbis*	4	Стадниченко и др., 1981
Planorbarius corneus		Ottaviani, Franchini,1988 Прохорова и др., 2018a
Planorbis planorbis	2	Прохорова и др., 2018a
Oncomelania hupensis	2	Sasaki et al., 2003

Гранулоциты (гранулярные гемоциты, распластывающиеся гемоциты, большие гемоциты) представляют собой макрофагоподобные клетки – в разной степени гранулярные, с выраженной способностью к фагоцитозу и образованию агглютинаций. Гиалиноциты (округлые клетки, агранулярные клетки, агранулоциты, малые гемоциты) – клетки со слабой способностью к адгезии и небольшим количеством гранул в цитоплазме. Некоторые авторы в отдельный тип выделяют бластоподобные клетки. Морфологически они напоминают гиалиноциты с большим ядерно-цитоплазматическим отношением (Gorbushin, Iakovleva, 2006; Portet et al. 2019).

Следует отметить, что гемоциты не являются исключительно иммуноцитами. Помимо участия в защитных реакциях, они участвуют в процессах регенерации, тромбообразования, формирования раковины, а также в переносе газов и питательных веществ в организме моллюска (Sminia, 1972; Franchini, Ottaviani, 2000; Furuta, Yamaguchi, 2001; Hermann et al., 2005). При этом одной из ключевых функций гемоцитов остаётся защита внутренней среды организма от различных чужеродных факторов.

Гемоциты проявляют свойства, характерные для любых иммуноцитов, вовлечённых реакции врожденного иммунитета. Они способны к хемотаксису, адгезии (Horak, Deme, 1998), распознаванию чужеродного (Song et al., 2010; Gust et al., 2013; Castillo et al., 2015), фагоцитозу (Sminia, 1972, 1981; van der Knaap, 1981; Yamaguchi et al., 1988; Ataev et al., 2016b; Pila et al., 2016a, 2017), выработке цитотоксических факторов (Dikkeboom et al., 1988; Adema et al., 1992, 1994; Humphries, Yoshino, 2008; Seppälä, Leicht, 2013; Vorontsova et al., 2019; Li et al., 2020). Гемоциты принимают участие в продукции цитокинов (De Jong-Brink, 1994; Gust et al., 2013), инкапсуляции чужеродных объектов (Sminia, 1974; Harris, 1975; Lie, Heyneman, 1976; Loker et al., 1982; Jourdane, Cheng, 1987; Ataev, Coustau, 1999; Furuta, Yamaguchi, 2001).

Основными формами **клеточного иммунного ответа** у лёгочных моллюсков, являются фагоцитоз, формирование агрегаций гемоцитов, инкапсуляция.

Гемоциты являются универсальными фагоцитами. Они поглощают бактерий, дрожжей, эритроциты, частицы зимозана, латексные шарики, разрушенные гемоциты и др. (van der Knaap, 1981; Yamaguchi et al., 1988; Ford, 1992; Ataev et al., 2016b; Pila et al., 2016b и др.). Для гемоцитов показана способность к продукции всего набора гидролитических ферментов, а также активных метаболитов кислорода и азота (АФК и АФА) (Dikkeboom et al., 1988; Schultz, Adema, 2017 и др.).

Помимо АФК и АФА у моллюсков в качестве фактора цитотоксичности функционирует фенолоксидазная система. Имеются данные о присутствии фенолоксидаз в мантии, кишечнике и других органах моллюсков (Luna-Acosta et al., 2011; Zhou et al., 2012; Huan et al., 2013; Jiang et al., 2014; Yu et al., 2014; Бабич и др., 2017). Гемоциты могут способствовать образованию

меланотических узелков, ограничивающих распространение патогенных организмов или повреждённых тканей (Luna-Gonzalez et al., 2002; Jimenez-Vega et al., 2005).

Наиболее универсальным механизмом, обеспечивающим уничтожение патогенов, является инкапсуляция. Лучше всего описаны гемоцитарные капсулы, формирующиеся вокруг трематод в мышечных тканях и внутренних органах лёгочных моллюсков (Ataev, Coustau 1999). Гемоциты в составе капсул располагаются концентрическими слоями, клетки внутренних слоёв уплощаются. Между внутренней поверхностью капсулы и телом паразита обычно имеется узкий просвет, в котором накапливаются цитотоксические вещества, выделяемые клетками гемолимфы (Connors, Yoshino, 1990; Connors et al., 1991; Adema et al., 2000; Атаев и др., 2005b). Внутри такой капсулы происходит гибель паразита, а затем фагоцитоз его останков и внутренних слоёв капсулы (Ataev, Coustau, 1999; Атаев, Полевщиков, 2004). Сходный механизм описан у пульмонат при инкапсуляции трансплантатов различной природы (Jourdane, Cheng, 1987; Cheng, Jourdane, 1987). Кроме инкапсуляции, приводящей к элиминации паразита, описаны случаи выталкивания спороцист, инкапсулированных в субэпителиальных тканях моллюсков через разрывы в эпителии моллюсков (Lie, Heyneman, 1976b).

Другой вариант клеточной реакции – формирование агглютинаций гемоцитов в районе локализации паразита. При этом инкапсуляции последнего не происходит, и паразиты продолжают нормально развиваться (Ataev, Coustau, 1999). Предполагается, что такой вариант реакции характерен для специфичных паразито-хозяинных систем.

В большинстве случаев наблюдается при иммунизации активация гемопоэза и в иммунную реакцию вступают вновь образовавшиеся клетки. В настоящее время отсутствует общепринятая гипотеза о механизме **гемопоэза** лёгочных моллюсков. У большинства изученных пульмонат образование гемоцитов происходит в АПО, который расположен между перикардиальным и мантийным эпителиями (Pan, 1958; Lie et al., 1975; Jeong et al.,1983; Sullivan 1988). АПО состоит из небольших групп клеток удлиненной формы – «узелков». Клетки в составе АПО способны к делению. Их пролиферативная активность возрастает при иммунизации. Размеры АПО увеличиваются при трематодной инвазии, пересадке трансплантатов, инъекциях бактерий и продуктов жизнедеятельности патогенов (Lie et al., 1976; Joky et al., 1985; Атаев, Полевщиков, 2004; Salamat, Sullivan, 2008, 2009; Sullivan et al., 2011; Токмакова, 2018). Активация АПО сопровождается ростом численности гемоцитов в циркуляции (Ataev, Coustau, 1999). Также высказывались гипотезы, допускающие у пульмонат образование гемоцитов из клеток соединительной ткани (Sullivan, 1990; Souza, Andrade, 2006), либо пролиферацию циркулирующих клеток гемолимфы (Sminia et al., 1983; Monteil, Matricon-Gondran, 1991; Portet et al., 2019).

Гуморальный иммунитет включает в себя механизмы элиминации патогенов с помощью молекул и молекулярных комплексов, находящихся вне клеток. При этом, гуморальные компоненты иммунитета могут функционировать как в виде секретируемых в плазму молекул, так и в контакте с рецепторными комплексами гемоцитов. Они обеспечивают распознавание чужеродного, активацию гемоцитов, опсонизацию патогенов (повышающую эффективность фагоцитоза), антибактериальный эффект, регуляцию иммунных реакций, а также обладают агглютинирующей и литической активностями (Jourdane, Cheng, 1987; van der Knaap, Loker, 1990; Sullivan, Spence, 1999; Connors, 2003).

У моллюсков описаны факторы гуморального иммунитета основных групп: протеазы, ингибиторы протеаз, компоненты комплемента, антибактериальные белки, токсины, белки острой фазы, активные кислородные метаболиты, антиоксидантные ферменты и др. (Olafsen, 1988; Song et al., 2010; Adema, Loker, 2015; Castillo et al., 2015; Dinguirard et al., 2018; Vorontsova et al., 2019; Li et al., 2020) (таблица 2).

Для факторов некоторых групп доказана ведущая роль в антипаразитарном иммунном ответе. Так у биомфалярий антибактериальные белки накапливаются в гемоцитах в ответ на заражение трематодами *Echinostoma caproni* (Mitta et al., 2005). Антибактериальные белки биомфализины способны связываться с поверхностью спороцист, бактериями и дрожжами (Li et al., 2020). Также доказана роль цистатина, катепсина B и эластазы в антитрематодном ответе (Myers et al., 2008; Ittiprasert et al., 2010; Lockyer et al., 2012). Экспрессия этих факторов возрастает в гемоцитах *Biomphalaria glabrata*, локализованных в капсулах вокруг спороцист трематод *Echinostoma caproni* (Guillou et al., 2007).

У моллюсков всех групп выявлены гомологи компонента комплемента C3 – тиоэфирсодержащего белка (thioester-containing protein, TEP, ТСБ), являющегося ключевой молекулой системы комплемента (Collins et al., 2012; Pinaud et al., 2019; см. Wang, 2021). Ген *C3* жемчужной устрицы *Pinctada fucata* обладает всеми структурными особенностями, характерными для генов *C3* позвоночных, в том числе содержит тиоэфирный мотив и сайт расщепления конвертазы комплемента (Wang et al., 2021). Он экспрессируется во всех исследованных тканях, включая жабры, пищеварительную железу, приводящую мышцу, мантию и ногу. Заражение *Vibrio alginolyticus* приводит к значительному повышению его экспрессии в гемоцитах, а нокдаун с помощью миРНК снижает фагоцитоз бактерий гемоцитами *in vitro* (Wang et al., 2021). Содержащаяся в тиоэфирном домене этого белка β-цистеинил-γ-глутамильная связь обладает высокой реакционной способностью и позволяет ТСБ образовывать ковалентные связи с молекулами-мишенями на поверхности микроорганизмов и паразитов (Bender et al., 1992; Mone et al., 2010; Portet et al., 2018; Castillo et al., 2020). Иммуноцитохимическое исследование показало наличие ТСБ в гемоцитарной капсуле,

формируемой вокруг спороцист трематод *Schistosoma mansoni*, а также в гемоцитах в непосредственной близости от неё (Castillo et al., 2020). Установлено, что ТСБ могут формировать комплексы с другими гуморальными компонентами – фибриногенподобными белками (ФБ). Такие комплексы способны взаимодействовать с поверхностью тегумента спороцист *Schistosoma mansoni* (Li et al., 2020).

Таблица 2. Компоненты гуморального иммунитета лёгочных моллюсков (Атаев, Прохорова, Токмакова, 2024, с изменениями)

Группа факторов	Факторы	Ссылки
Антимикробные белки	• митамацин • перфорин • теромацин • ахацин • аплизианин • глабрализин • биомфализины	Galinier et al., 2013; Tetreau et al., 2017; Li et al., 2020; Pinaud et al., 2019
Протеазы	• лизоцимы • серпины • катепсин • эластаза • цинк-зависимая • металлопротеаза • цистатины	Myers et al., 2008; Ittiprasert et al., 2010; Lockyer et al., 2012; Guillou et al., 2007
Компоненты комплемента	• C1q • C3 • тиоэфирсодержащий белок	Portet et al., 2018; Duval et al., 2020; Guillou et al., 2007
Цитокины	• транскрипционный фактор NF-κB • ингибирующий миграцию макрофагов фактор • фактор некроза опухолей α (TNF-α) • трансформирующий фактор роста бета b1 (TGF-b1) • интерлейкин IL-1a, b (IL-1a, b) • интерлейкин 2 (IL-2) • интерлейкин 6 (IL-6) • тромбоцитарный фактор роста (PDGF-AB)	Mitta et al., 2005; Garcia et al., 2010; Ottaviani et al., 2004; Li et al., 2013

Кроме того, комплекс ФБ–ТСБ может усиливать активность антибактериального белка биомфализина (Galinier et al., 2013) и вызывать его олигомеризацию. При этом у моллюсков и чувствительных и резистентных линий может образовываться комплекс ФБ-ТП-биомфализин,

но только у резистентных особей этот комплекс привлекает дополнительные молекулы ФБ (Li et al., 2020).

Одно из интенсивно развивающихся направлений сравнительной иммунологии моллюсков – поиск молекул, участвующих в **распознавании патогенов**. Благодаря развитию технологий высокопроизводительного секвенирования и протеомного анализа (см. раздел I.1) в последние годы доказано наличие основных групп ПРР у моллюсков: толл-подобных рецепторов, лектинов, скавенджер-рецепторов, рецепторы распознавания олигонуклеотидов и др. (рисунок 2).

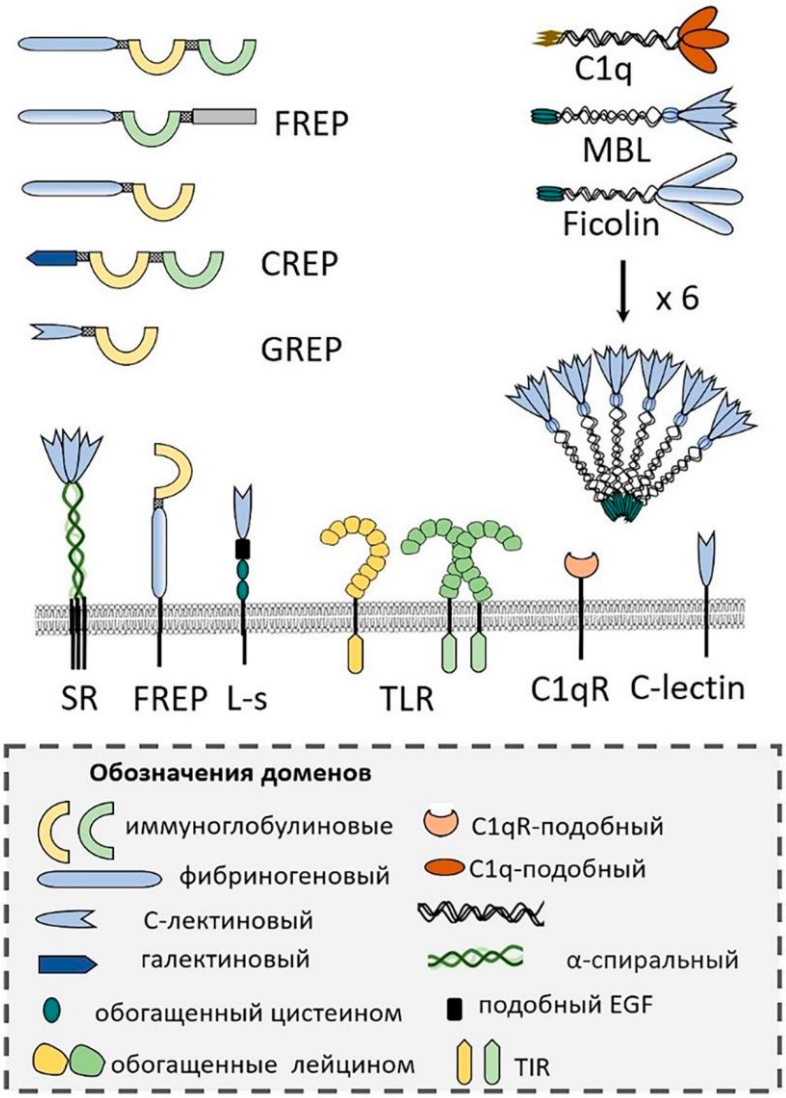


Рисунок 2. Патогенраспознающие молекулы моллюсков. Условные обозначения: C1q – подобный C1q компоненту комплемента белок; C1qR – подобный C1qR рецептор; CREP – C-лектинподобные белки; EGF – эпидермальный фактор роста; FREP – фибриногенподобные белки; GREP – галектинподобные белки; L-s – L-селектин; MBL – связывающий маннозу лектин; SR – скавенджер-рецептор; TLR –толл-подобные рецепторы.

Наиболее разнообразной группой ПРР моллюсков являются лектины (Полевщиков, 1996; Баскаков, 2002). Именно среди лектинов выявлены молекулы, проявляющие признаки

соматической диверсификации – ФБ (см. Adema et al., 2015; Dheilly et al., 2015). Кроме того, для ФБ доказана избирательная активность в отношении патогенов разных видов (Zhang et al., 2008; Moné et al., 2010; Yang et al., 2014). Поэтому в настоящее время изучение разнообразия ФБ является одним из основных направлений поиска механизмов возможной специфичности иммунитета моллюсков.

Среди толл-подобных рецепторов, скавенджер-рецепторов, лектинов моллюсков выявлены варианты, ранее не описанные у позвоночных животных. С одной стороны, это затрудняет классификацию ПРР моллюсков, с другой стороны, определяет необходимость изучения бóльшего числа видов с целью установления общих для всех моллюсков вариантов ПРР (см. Атаев и др., 2024а). Более подробно вопрос о разнообразии ПРР у моллюсков будет рассмотрен в разделе III.3.1.

Современные представления о защитных реакциях лёгочных моллюсков в значительной степени основаны на исследованиях ограниченного числа модельных видов. Разнообразие применяемых методов – от классических зоологических и иммунологических до молекулярно-биологических– позволило существенно продвинуться в понимании механизмов иммунитета моллюсков. Однако отсутствие единых подходов затрудняет сопоставление данных. Выявлены ключевые компоненты клеточного и гуморального иммунитета, но, в то же время, многие аспекты иммунных реакций остаются недостаточно изученными. В частности, не разработана классификация гемоцитов, слабо охарактеризованы их функциональные особенности, не систематизированы паттерн-распознающие рецепторы, практически не описаны особенности иммунного ответа у моллюсков из природных популяций и при заражении патогенами различной природы.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

II.1. Объекты исследования

В качестве **объектов исследований** в работе были использованы лёгочные моллюски (Gastropoda, Pulmonata) девяти видов, из которых семь видов представлены моллюсками из природных популяций:

Сем. Planorbidae

– *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758) (из природных водоёмов, см. таблицу 3)

– *Planorbis planorbis* (Linnaeus, 1758) (из природных водоёмов, см. таблицу 3)

– *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (лабораторные линии)

– *Biomphalaria pfeifferi* (Krauss, 1848) (лабораторная линия)

Сем. Lymnaeidae

– *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) (из природных водоёмов, см. таблицу 3)

– *Ampullaceana lagotis* (Schrank, 1803) (из природных водоёмов, см. таблицу 3)

Сем. Succineidae

– *Succinea putris* (Linnaeus, 1758) (из природных биотопов, см. таблицу 3)

Сем. Helicidae

– *Arianta arbustorum* (Linnaeus, 1758) (из природных биотопов, см. таблицу 3)

Сем. Cochlicopidae

– *Cochlicopa lubrica* (Müller, 1774) (из природных биотопов, см. таблицу 3)

Сбор моллюсков из природных биотопов проводился регулярно в тёплый сезон с 2009 по 2025 гг. в нескольких точках на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Также были осуществлены отдельные сборы на территории Калининградской, Московской, Кировской областей, республики Алтай и Гомельской и Витебской областей Белоруссии (таблица 3, рисунки 3, 4).

Пресноводных моллюсков *Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis*, *Lymnaea stagnalis, Ampullaceana lagotis* собирали в озёрах, прудах, заводях рек с небольшим течением. Сбор улиток производился с водной растительность вблизи берега или в заводях из лодки при помощи водного сачка.

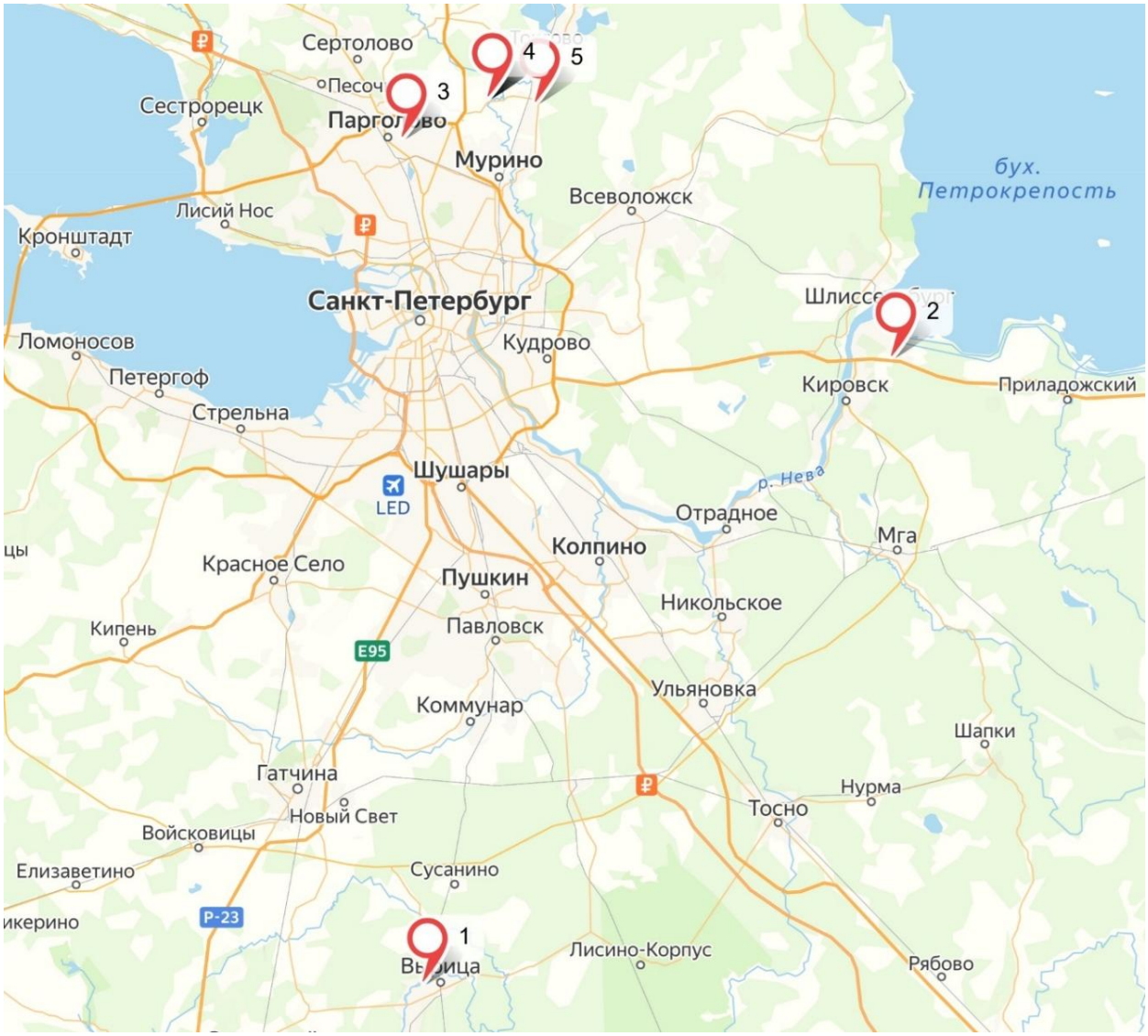


Рисунок 3. Точки сбора моллюсков в Санкт-Петербурге и окрестностях (координаты см. в таблице 3).

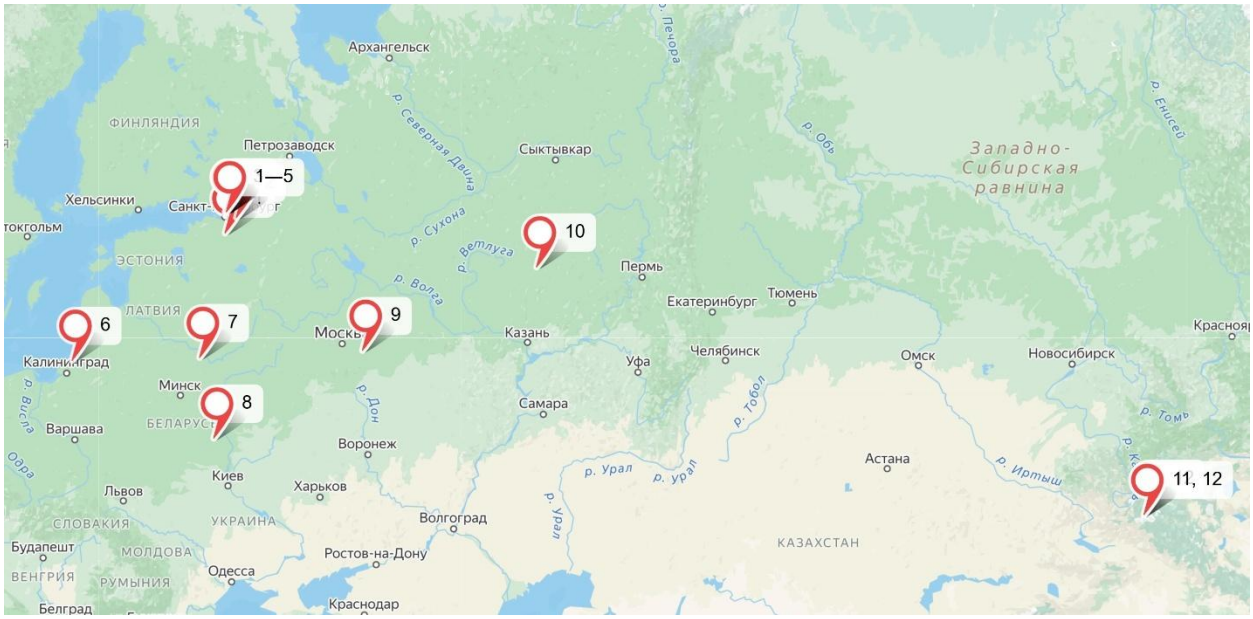


Рисунок 4. Точки сбора моллюсков (координаты см. в таблице 3).

Таблица 3. Точки сбора моллюсков

Вид / сроки сбора	Точка сбора (обозначение на карте)	Координаты	Кем собран материал
Planorbarius corneus / 2009–2025 гг.	Россия, Ленинградская область, пос. Вырица (1)	59°24'50"N 30°20'50"E	Прохорова Е. Е., Атаев Г. Л., Исакова Н. П., Серебрякова М. К.
	Россия, Ленинградская область, пос. Оселькы (4)	60°14′00″ N 30°26′15″ E	
	Россия, Ленинградская область, по пос. Кузьмолово (5)	60°06'34.0"N 30°29'42.3"E	
	Россия, Ленинградская область, пос. Синявино (2)	59°54′28″ N 31°04′21″E	Прохорова Е. Е.
	Россия, г. Санкт-Петербург, оз. Финское (3)	60°08′33.47″ N 30°28′61.79″E	Исакова Н. П.
	Россия, Калининградская обл., пос. Рыбачий (6)	55°09'00"N 20°51'00"E	Атаев Г. Л.
	Белоруссия, Витебская обл. (7)	55°13'27.3"N 28°57'51.2"E	Войтюк А.М.
Planorbis planorbis / 2009–2025 гг.	Россия, Ленинградская область, пос. Вырица (1)	59°24'50"N 30°20'50"E	Прохорова Е. Е., Токмакова А.С., Исакова Н. П., Усманова Р.Р.
	Россия, г. Санкт-Петербург, оз. Финское (3)	60°08′33.47″ N 30°28′61.79″E	
Lymnaea stagnalis / 2009–2025 гг.	Россия, Ленинградская область, пос. Вырица (1)	59°24'50"N 30°20'50"E	Прохорова Е. Е., Токмакова А.С., Исакова Н. П.
	Россия, г. Санкт-Петербург, оз. Финское (3)	60°08′33.47″ N 30°28′61.79″E	
Ampullaceana lagotis / 2021 г.	Россия, республика Алтай, плоскогорье Укок, оз. Укок (11)	49°15′52″ N 87°22′56″ E	Атаев Г. Л.
	Россия, республика Алтай, плоскогорье Укок, оз. Кальджин-Коль (12)	49°19′24″N, 87°27′29″ E	
Succinea putris / 2009–2025 гг.	Россия, Ленинградская область, пос. Вырица (1)	59°24'42.3"N 30°19'08.1"E	Токмакова А. С., Усманова Р. Р., Корниенко А. А.
	Россия, Московская область (9)	58°47'13.7"N 52°14'38.0"E	Калинин Р.С.

Таблица 3 (продолжение)

Succinea putris / 2009–2025 гг.	Россия, Кировская область (10)	55°33'52.4"N 37°54'45.6"E	Калинин Р.С.
	Россия, Калининградская область (6)	55°08'48.9"N 20°49'41.3"E	Калинин Р.С.
	Белоруссия, Гомельская обл. (8)	53°29′32.9″N 30°17′00.8″E	Жохов А. Е.
	Белоруссия, Витебская обл. (7)	54°43′38.1″N 29°42′31.0″E	Войтюк А.М.
Arianta arbustorum / 2020–2025 гг.	Россия, Ленинградская область, пос. Синявино (2)	59°54'28.1"N 31°04'21.4"E	Прохорова Е. Е., Прохоров Л.К., Андреев И.А.
Cochlicopa lubrica / 2020–2025 гг.	Россия, Ленинградская область, пос. Вырица (1)	59°24'20.0"N 30°21'52.4"E	Усманова Р.Р., Корниенко А.А.
	Россия, Ленинградская область, пос. Синявино (2)	59°54'31.4"N 31°07'32.9"E	Прохорова Е. Е., Прохорова Н.К.

Наземных моллюсков *Succinea putris, Arianta arbustorum* собирали в лесных биотопах, на кустарниковой и травянистой растительности на опушках, полянах, вдоль тропинок, в лесной подстилке, а также на обочинах дорог. Моллюсков *Cochlicopa lubrica* собирали во влажном мху и в подстилочном ярусе с помощью системы почвенных сит.

Для осуществления исследований собранных в природе моллюсков содержали в лаборатории на протяжении 1–24 месяцев. Моллюсков *Planorbarius corneus, Planorbis planorbis, Lymnaea stagnalis* содержали в аквариумах объёмом 5–20 литров из оргстекла при естественном освещении. Моллюсков лабораторной линии *Biomphalaria glabrata* содержали в аквариумах объёмом 20 литров с искусственным освещением. Использовали фильтрованную водопроводную воду, которую сменяли 1–2 раза в неделю. Все аквариумы постоянно аэрировались. Корм состоял преимущественно из свежих листьев салата. В летний период моллюски *Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis* и *Lymnaea stagnalis* также получали предварительно размоченные ивовые и кленовые листья. Для предотвращения эрозии раковин в аквариумы добавляли колотый мел.

Моллюсков *Succinea putris*, *Arianta arbustorum* и *Cochlicopa lubrica* содержали в пластиковых контейнерах объемом 1–2 литра во влажных условиях в хладотермостате. Контейнеры были оснащены вентиляционными отверстиями на крышках и стенках (диаметром 2–4 мм). В качестве субстрата использовали кварцевый песок (фракция 0.4–0.8 мм) и сухие

листья. Моллюсков *C. lubrica* содержали в подстилке из мха сфагнума и почвы с места сбора моллюсков. В качестве корма для *Succinea putris* и *Arianta arbustorum* использовали листья сныти, одуванчиков и капусты.

Для **экспериментальной иммунизации** моллюсков в работе были использованы:

Бактерии

– *Escherichia coli* (культура)
– *Staphylococcus aureus* (стафилококковый реагент (НИИЭМ им. Пастера, Россия)

Ксенотрансплантаты

– фрагменты вибрисс кошки (длиной 1.5 мм и диаметром 160 мкм)

Трематоды

– *Echinostoma caproni* Richard, 1964 (сем. Echinostomatidae)

В качестве факторов **природной иммунизации** в работе рассматриваются трематоды:

– *Echinostoma spiniferum* (La Valette, 1855) (сем. Echinostomatidae)
– *Echinostoma revolutum* (Fröhlich, 1802) (сем. Echinostomatidae)
– *Bilharziella polonica* (Kowalewski, 1895) (сем. Schistosomatidae)
– *Cotylurus brevis* Dubois et Rausch, 1950 (сем. Strigeidae)
– *Notocotylus ephemera* (Nitzsch, 1907) (сем. Notocotylidae)
– *Plagiorchis multiglandularis* Semenov, 1927 (сем. Plagiorchiidae)
– *Aptorchis* sp. (сем. Plagiorchiidae)
– *Diplostomum pseudospathaceum* Niewiadomska, 1984 (сем. Diplostomidae)
– *Leucochloridium paradoxum* Carus, 1835 (сем. Leucochloridiidae)
– *Rubenstrema exasperatum* (Rudolphi, 1819) (сем. Omphalometridae)

Для выявления заражённости трематодами моллюсков, собранных из природных водоёмов, применяли метод наблюдения за эмиссией церкарий. Моллюсков рассаживали индивидуально по стаканчикам и в течение нескольких дней выявляли особей, эмитирующих церкарии. В дальнейшем, под стереомикроскопом Leica M125 проводили вскрытие моллюсков, в ходе которого уточняли их заражённость и определяли диаметр раковины. Часть материала фиксировали для последующей гистологической и обработки. Заражённость моллюсков *Succinea putris* определяли при вскрытии.

II. 2. Методы исследования

II. 2. 1. Видовая идентификация модельных объектов и филогенетический анализ

Видовую идентификацию моллюсков осуществляли с использованием морфологических и молекулярно-генетических методов.

При определении моллюсков особое внимание уделяли морфометрическим параметрам раковины и особенностям строения половой системы (Лепнева и др., 1950; Жадин, 1952; Лихарев, Раммельмейер, 1952; Шилейко, Лихарев, 1986; Стадниченко, 1990; Солдатенко, 1997; Glöer, 2002; Стадниченко, 2004; Старобогатов и др., 2004; Цалолихин, 2004; Кантор, Сысоев, 2005; Круглов, 2005a; Круглов, 2005b; Mezhzherin et al., 2008; Хохуткин, Винарский, 2013; Балашов, 2016; Винарский, Кантор, 2016; Боголюбов, Кравченко, 2018; Vinarski, 2014 и др.).

Для построения карт с точками сбора моллюсков и обозначениями ареалов был использован онлайн-сервис «Конструктор карт Яндекса» (https://yandex.ru/map-constructor), а также раздел «Карты» на сайте iNaturalist (https://www.inaturalist.org).

Для морфологического описания внешнего вида моллюска с помощью штангенциркуля измеряли высоту и ширину раковины, изучали ее форму, структуру поверхности. Моллюсков анестезировали с помощью 0.5% раствора новокаина и фиксировали в 70% растворе этанола. Затем моллюсков препарировали по стандартной методике (Лихарев, 1968) под стереомикроскопом LeicaM165C.

Вскрытие лёгочной полости проводили путем нанесения надреза через пневмостом по правой стороне полости до ее верхнего конца. Затем осуществляли надрез, перпендикулярный продольной оси тела животного в месте срастания края мантии с головой. Образованный надрезами лоскут отгибали. После этого удаляли эпителий, выстилающий нижнюю стенку лёгочной полости. Затем вскрытие продолжали по направлению к верхним оборотам внутренностного мешка. Голову препарировали в последнюю очередь для того, чтобы проследить за направлением выводных протоков половой системы и местом их выхода на поверхность тела. Для приготовления гистологических препаратов фрагменты моллюсков фиксировали в свежеприготовленном растворе Буэна.

Раковины, радулы и челюсти улиток *Succinea putris* были обезвожены в восходящем спиртовом растворе, покрыты золотом с помощью напылителя Quorum Technologies SC7620 и исследованы под сканирующим электронным микроскопом EVO-40 (Carl Zeiss).

Для моллюсков *Planorbarius corneus* было выполнено **кариотипирование**. Для получения препаратов хромосом роговых катушек был адаптирован метод воздушно-сухих препаратов (Ford, Hamerton, 1956) с предварительным выдерживанием моллюсков в 0.02% растворе колхицина в течение 3 часов. После вскрытия, образцы тканей ноги и гепатопанкреаса

моллюсков выдерживали в трёх сменах дистиллированной воды (гипотоническая обработка) и фиксировали в смеси этанола и ледяной уксусной кислоты (в соотношении 3:1). После фиксации кусочки тканей наносили мазками на предметные стекла и высушивали над пламенем спиртовки.

Поиск метафазных пластинок на препаратах и фотосъёмку осуществляли на световом микроскопе Leica DM5000. Для первичной обработки изображений и измерения длин плеч хромосом использовали программу ImageScope (CMA, Россия). Составление кариотипов осуществляли с помощью программы Adobe Photoshop 7.0 (http://www.adobe.com). Вычисление центромерного индекса и определение формы хромосом производили согласно общепринятой классификации Левана (Levan et al., 1964).

Генотипирование моллюсков. Образцы тканей моллюсков для генотипирования хранили при температуре −80°C. Часть материала фиксировали в полевых условиях в 70% этаноле. Перед выделением ДНК такие образцы 3−5 раз отмывали в дистиллированной воде. Для выделения ДНК использовали коммерческий набор ДНК-сорб-С-М (Аплисенс, Россия). Выделение проводили согласно инструкции производителя. Оценку качества выделенной ДНК осуществляли посредством электрофореза в 0.8% агарозном геле. Концентрацию и чистоту препаратов определяли спектрофотометрически (Implen NanoPhotometer).

Выбор маркеров для генотипирования был обусловлен доступностью данных для сравнения в GenBank, а также разработанностью моделей. Моллюски *Planorbarius corneus* и *Succinea putris* были генотипированы по участкам 18S–ITS1–5.8S–ITS2–28S рДНК и митохондриальных генов *cytB* и *coxI*. Моллюски *Ampullaceana lagotis* были генотипированы по участку рДНК и гену *cox1*. Моллюски *Planorbis planorbis*, *Lymnaea stagnalis*, *Arianta arbustorum* и *Cochlicopa lubrica* были генотипированы по участку рДНК.

Специфические праймеры для ПЦР подбирали с помощью компьютерных программ Primer3 (http://primer3.ut.ee) и GeneRunner (http://www.generunner.net).

Праймеры на участки рДНК (1F−1R и 2R) подбирали с использованием представленных в базе данных GeneBank нуклеотидных последовательностей *Planorbarius corneus* (FR797811.1, Vinarski et al., 2011; AY465059.1, Morgan et al., 2002) и *Biomphalaria glabrta* (AY030377.1, DeJong et al., 2001). После получения нуклеотидных последовательностей генотипируемых моллюсков были подобраны дополнительные пары праймеров (таблица 4).

На участки митохондриальных генов цитохрома b (*cytB*) и первой субъединицы цитохром-с-оксидазы (*cox1*) подбирали две пары праймеров – с использованием полного митохондриального генома моллюска *Planorbarius corneus* (MT862415.1, Leerhoei, 2020) и митохондриального генома моллюска *Succinea putris* (JN627206.1, White et al., 2011). Праймеры синтезировали в коммерческой организации «Синтол» (Москва). Нуклеотидные

последовательности праймеров, рабочие температуры отжига и расчётные длины продуктов ПЦР представлены в таблице 4.

Таблица 4. Праймеры, использованные для генотипирования моллюсков

Ген	Обозначения праймеров	Нуклеотидные последовательности прямого (F) и обратного (R) праймеров (5'–3')	Температура отжига, °C	Расчётная длина продукта (п.н.)
18S–ITS1–5.8S	1F	TCGGATTGGTCTCGGTCTG	62.8	933
	1R	GCGTTCAAGATGTCGATGTTC		
ITS2–5.8S–28S	2F	TTGCAGAACACATTGAACATCG	64	889
	2R	GGAGTTTACCACCCGCTTTG		
ITS1–5.8S–ITS2	3F	GTTGGTGACAAGGAAACAAA	54.1	200
	3R	ATTGCTTTAAGCCAACCGA		
cytB	cytF1	TTTCAGTTGGGCAAGCAACAC	53.1	1070
	cytR1	ACAAGGAACCGCTAAAGACG		
coxI	coxF1	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	53.1	745
	coxR1	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		
cytB	cytF2	GCATTTTTAGGTTATGTTTTACCGT	54.3	1100
	cytR2	GGCGAATAAAAAGTATCATTCAGGT		
coxI	coxF2	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	56.2	460
	coxR2	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		

ПЦР осуществляли с помощью DreamTaq-ДНК-полимеразы (Thermo Scientific, Литва). Для ПЦР использовали по 1 нг ДНК на 20 мкл реакционной смеси, содержащей 0.2 мкл Taq-полимеразы, 0.2 мкл dNTPs, 5хПЦР-буфера – 4 мкл и по 0.5 мкл каждого праймера (Синтол, Москва). Температурный профиль для ДНК моллюсков каждого вида подбирался экспериментально. В общем виде ПЦР включала в себя: 1 цикл предварительной денатурации (94ºC, в течение 5 мин), 35 циклов амплификации (94ºC, 1 мин; 53.1–64ºC (Tº отжига), 30 сек и 64ºC, 1 мин 20 сек, 72ºC), а также 1 цикл дополнительной элонгации (72ºC, в течение 7 мин). Подробные условия ПЦР с использованными праймерами описаны в публикациях: Прохорова и др., 2015а; Prokhorova et al., 2020; Прохорова, Усманова, 2020; Атаев, Усманова, Прохорова, Глупов, 2024.

Электрофоретический анализ продуктов ПЦР осуществляли в 1.4% агарозном геле по стандартной методике (Sambrook et al., 1989). Полученные ПЦР-продукты очищали на колонках WizardSVGel (Promega Corporation, США) согласно протоколу производителя и секвенировали в коммерческой лаборатории «ЗАО Евроген» (Москва) с помощью секвенатора ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Секвенирование каждого ПЦР-продукта осуществлялось в двух направлениях.

Анализ секвенограмм, сборку и выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программ BioEdit v. 7.2.5 (Hall, 1999), MEGA v.10.2.4 (Kumar et al., 2018). Для установления гомологии нуклеотидных последовательностей использовали программное обеспечение BLAST на сервере NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Номера полученных нуклеотидных последовательностей моллюсков в GenBank указаны на рисунках в разделе III.1 и в приложениях 1–6.

Медианные сети гаплотипов конструировали при помощи программы PopArt v.4.8.4 (Leigh, Bryant, 2015). Расчеты индексов гаплотипического и нуклеотидного разнообразия были выполнены с использованием программы DnaSP v.6 (Rozas et al., 2017). Построение вторичных структур транскриптов ITS рДНК осуществляли с помощью программы Mfold v.3.0 (http://mfold.rit.albany.edu).

Для подсчёта генетических расстояний (p-distance) использовали MEGA v.10.2.4 (Kumar et al., 2018). Математическую модель для расчета генетических дистанций при построении филогенетических реконструкций выбирали с использованием критерия Акаике и Байесовского информационного критерия в программе jModelTest v. 2.1.7 (Darriba et al., 2012). Для филогенетических реконструкций по участку рДНК была использована модель GTR+I+G, для гена *cox1* – HKY+G, для гена *cytB* – HKY+I (Kimura, 1980; Hasegawa et al., 1985; Nei, Kumar 2000). Филогенетические реконструкции с использованием метода максимального правдоподобия (ML) проводили в программе MEGA v.10.2.4 (Kumar et al., 2018). Бутстреп-поддержка для деревьев, построенных методом ML, была посчитана на основе 1000 реплик (Felsenstein, 1985). Байесовский анализ (BA) проводили в программе BEAST v.2.5 (Bouckaert et al., 2019) с одновременным запуском четырёх цепей в 10 млн поколений с отбором каждого 1000. Достоверность топологии BA-деревьев оценивали по рассчитанной величине апостериорной вероятности. Для получения филогенетических реконструкций использовали программу TreeAnnotator v.1.7.5, визуализацию деревьев осуществляли с помощью программы FigTree v.1.4.0 (Helfrich et al., 2018). Номера нуклеотидных последовательностей в GenBank, использованных для расчёта генетических дистанций и в качестве внешних групп, указаны на филогенетических реконструкциях (раздел III.1) и в приложениях 1–10.

С целью оценки популяционной изменчивости для моллюсков *Planorbarius corneus* была разработана методика RAPD-анализа. В работе использовали 10-нуклеотидные случайные праймеры (таблица 5), которые ранее были применены для выявления генотипических различий между видами и линиями моллюсков рода *Biomphalaria* и двустворчатых моллюсков (Spada et al., 2002; Holmes et al., 2003; Abdel-Hamid et al., 2006; Sleem, Ali, 2008). Праймеры использовали индивидуально и комбинировали между собой.

Таблица 5. Нуклеотидные последовательности и температуры отжига случайных праймеров, использованных для генотипирования моллюсков *Planorbarius corneus*

Обозначение праймера	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Температура отжига, ºС
P1	TTGAGGCCCT	36
P2	TGTTGTGCCC	36
P3	CTCATACGCG	36
P4	GTGGCTAGGT	39
P5	GGGAATTCGG	36
P6	GCTGCGTGAC	39
P7	CCAATTCACG	37
P8	CGGTTTGGAA	36
P9	TGGTGACTGA	38
P10	GTCCCGACGA	39
P11	GAAACGGGTG	37

Обозначение праймера	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Температура отжига, ºС
G1	TGCCGAGCTG	37
G2	GTTGCCAGCC	40
G3	AGGGAACGA	37
G4	GGTCCCTGAC	35
G5	CAGGCCCTTC	40
G6	CTCTCCGCCA	38
G7	AGTGCTACGT	39
G8	CTGATGCTAC	38
G9	GGGTAACGCC	37
G10	CTGCTGGGAC	39

Амплификацию ДНК со случайными праймерами осуществляли на термоциклере Терцик-МС2 (ДНК-Технология). Оптимальный состав реакционной смеси и температурные профили для амплификации были подобраны экспериментальным путём. ДНК в количестве 5 нг, 10 нг, 15 нг, 20 нг амплифицировали в реакционной смеси (20 мкл), содержащей 2 ед Taq-полимеразы (Синтол, Москва), 200 мкМ каждого дНТФ, 2 мкл инкубационного буфера (1.5 мМ MgCl2, 50мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 8.5), 6.4 пМ каждого праймера (Прохорова и др., 2014).

Электрофоретический анализ амплифицированных RAPD-фрагментов осуществляли в 2% агарозном геле по стандартной методике (Sambrook et al., 1989). В каждой выборке подсчитывали общее число RAPD-фрагментов и число полиморфных фрагментов, характерных только для выборки. Примерные длины RAPD-фрагментов определяли графическим методом. Процент полиморфных локусов (%P) рассчитывали по формуле %P = (F/ P) × 100%, где F – число амплифицированных фрагментов, P – число полиморфных локусов. Индекс фенотипического разнообразия Шеннона (H_0) рассчитывали по формуле: $H_0 = -\sum F \log_2 F$, где F – частота присутствия или отсутствия амплифицированного фрагмента.

Коэффициент подобия между популяциями по Дайсу (S) рассчитывали по формуле $S = 2\,a/2a + b + c$, где a – количество фрагментов, полученных на ДНК моллюсков обоих популяции; b – количество фрагментов, полученных на ДНК моллюсков одной популяции; c – количество фрагментов, полученных на ДНК моллюсков другой популяции.

Видовую идентификацию трематод проводили по морфологии церкарий, а также при вскрытии моллюсков – по морфологическим особенностям партенит. Определение трематод было выполнено Г.Л. Атаевым, Н. П. Исаковой и Р. Р. Усмановой.

Генотипирование трематод осуществляли при возникновении трудностей с их определением по морфологическим критериям. Методы генотипирования использовали те же, что и для моллюсков (см. выше). Специфические праймеры, использованные для генотипирования трематод, представлены в таблице 6.

Таблица 6. Праймеры, использованные для генотипирования трематод

Ген	Обозначения праймеров	Нуклеотидные последовательности прямого и обратного праймеров (5'–3')	Температура отжига, °C	Расчётная длина продукта (п.н.)
18S–ITS1–5.8S–ITS2–28S	LI	ATGCTCTGATGGTATGCTCGTAG	921	62
	L2	TTTCCTCCGCTTAGTGATATGC		
18S–ITS1	F2	TCCTGGTAAGTGCAAGTCATAAG	890	65
	R2	TGCACTCTTCATCGACACAC		
ITS2–28S	F3	TGATGGTAGTGTGTGTCTCGC	630	63
	R3	CGTTACCCGTTATCACCATG		
ITS2–28S	dig12	AAGCATATCACTAAGCGG	1100	56
	1500R	GCTATCCTGAGRGAAACTTCG		
18S–ITS1–5.8S–ITS2	BR	GTAGGTGAACCTGCGGA	1000	54.7
	dig11	GTGATATGCTTAAGTTCAGC		
cox1	JB3	TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT	1000	55
	CoxL	TCCTCCCCAGACCAGTCATAG		

На первом этапе работы для подбора праймеров на участки рДНК трематод использовали нуклеотидную последовательность *Leucochloridium* sp. (AY258145.1, Casey et al., 2003). Остальные пары праймеров на участки рДНК подобрали с использованием полученных нуклеотидных последовательностей исследуемых трематод. Для подбора праймера CoxL на участок гена *cox1* использована последовательность *L. paradoxum* (LC466790.1, Nakao et al., 2019). Также из литературных источников были взяты следующие праймеры: JB3 (Bowles et al., 1993), Dig12–1500R (Izrailskaia et al., 2019), BR–Dig11 (Boyce et al., 2012).

Подробные условия ПЦР с использованными праймерами на ДНК трематод описаны в публикациях: Жукова, Прохорова и др., 2012; Zhukova, Prokhorova et al., 2014; Ataev, Zhukova, Tokmakova, Prokhorova, 2016; Прохорова и др., 2018b; Усманова, Токмакова, Лопатина, Прохорова, 2021; Усманова, Прохорова, 2022; Usmanova, Ataev, Tokmakova, Tsymbalenko, Prokhorova, 2023.

Поскольку в начале исследования не были разработаны чёткие критерии для видовой идентификации трематод рода *Leucochloridium*, была выполнена работа по выявлению генетических маркеров, подходящих для определения видов рода (Жукова, Прохорова и др., 2012; Zhukova, Prokhorova et al., 2014). Было установлено, что окраска и рисунок отростков спороцист этого рода являются видоспецифическими признаками (Ataev, Zhukova, Tokmakova, Prokhorova, 2016; Прохорова и др., 2018b). Кроме того, для трематод *L. paradoxum* была изучена морфологическая и генотипическая вариабельность. Установлено, что генотипическое разнообразие по участкам рДНК и митохондриальным маркерам у этого вида невелико (Усманова, Токмакова, Лопатина, Прохорова, 2021; Usmanova, Ataev, Tokmakova, Tsymbalenko, Prokhorova, 2023). Но поскольку окрашенные спороцисты характерны только для зрелых заражений, а также встречаются случаи множественного заражения, при которых бывает сложно отделить столоны разных спороцист друг от друга, были разработаны методики видовой идентификации трематод *L. paradoxum* и *L. perturbatum* и *L. vogtianum* с помощью RAPD-анализа и SCAR-маркеров (Prokhorova et al., 2017).

Трематоды рода *Leucochloridium* были генотипированы по участкам 18S–ITS1–5.8S–ITS2–28S рДНК и фрагменту гена *cox1*. Трематоды *Notocotylus ephemera, Bilharziella polonica* и *Aptorchis* sp. были генотипированы по участку 18S–ITS1–5.8S–ITS2–28S рДНК. Трематоды *Cotylurus brevis* и *Echinostoma spiniferum* были генотипированы по участку 28S рДНК. Трематоды *Plagiorchis multiglandulari*s были генотипированы по участку гена *cox1*. Номера полученных нуклеотидных последовательностей трематод в GenBank представлены в приложении 11.

II. 2. 2. Экспериментальная иммунизация моллюсков

Иммунизация моллюсков *Biomphalaria glabrata* и *B. pfeifferi* была выполнена Г. Л. Атаевым в Лаборатории биологии животных Перпиньянского университета (Франция). Улитки заражались трематодами *Echinostoma caproni*, каждая дозой по 10 мирацидиев. Фиксация моллюсков проводилась через 12 часов, 1, 4, 7, и 14 дней п.з. в жидкости Буэна.

Для введения ксенотрансплантатов были использованы незаражённые моллюски *Planorbarius corneus*, культивируемые в лаборатории, с диаметром раковины 25 мм. В качестве ксенотрансплантата использовались фрагменты самостоятельно выпавших вибрисс кошек

(длиной 1.5 мм и диаметром 160 мкм). Выбор данного трансплантата обусловлен его подходящими размерными и механическими характеристиками. Трансплантаты вводили в ткани моллюска с помощью инъекционной иглы (наружный диаметр 450 мкм). Инъецированные улитки были зафиксированы в жидкости Буэна.

Иммунизацию бактериями *E. coli*, *S. aureus* осуществляли с помощью инсулинового шприца. Суспензии бактерий вводили моллюскам в ногу с помощью иглы с наружным диаметром 450 мкм.

II. 2. 3. Гистологические исследования

Для изучения гемопоэтических структур и клеточной реакции на факторы иммунизации использовали гистологические препараты. С целью приготовления гистологических препаратов объекты исследования фиксировали в свежеприготовленном растворе Буэна. Затем материал промывали в 2–3 сменах 70% этанола, обезвоживали и заливали в парафин согласно стандартной методике (Лилли, 1969). Приготовленные на микротоме (Leica RM2235) срезы (толщиной 4−5 мкм) окрашивали гематоксилинами Майера и Эрлиха с подкраской 0.1% раствором эозина (Биовитрум, Санкт-Петербург). Анализ препаратов проводили на световом микроскопе Leica DM5000 и Nikon Eclipse E200 в режиме светлого поля. Снимки срезов делали с помощью фотокамер Nikon DS-Fi1 и TrueChrome 4K Pro. Анализ микрофотографий выполняли в программном обеспечении ImageScope и ImageJ (CMA, Россия).

Гистологически срезы моллюсков *Biomphalaria glabrata* и *B. pfeifferi*, заражённых трематодами, были предоставлены Г. Л. Атаевым.

II. 2. 4. Методы световой и электронной микроскопии

Для микроскопического исследования **гемолимфу** собирали из кровеносного синуса в головном отделе моллюсков с помощью стеклянной пипетки Пастера. Морфологический и количественный анализ клеток гемолимфы одновременно проводили на временных и фиксированных препаратах.

Подсчет числа клеток гемолимфы проводили с помощью камеры Горяева на световом микроскопе (Leica DM5000) в режиме фазового контраста. Использовали как свежесобранную гемолимфу, так и фиксированные 4% уксусной кислотой и окрашенные нейтральным красным (1:100000) препараты. Для дополнительного контроля численности гемоцитов по 1 мкл гемолимфы от каждого моллюска микропипеткой переносили в 3–5 ячеек (диаметр 3 мм) многоячеистого стекла с тефлоновым покрытием (Cell-Line Associates). После заполнения стекло переносили во влажную камеру (при комнатной температуре, 22–24°C). Через 30 мин пробы анализировали на инвертированном микроскопе (Leica DMIL).

Для **изучения гемоцитов *in vitro*** свежесобранную гемолимфу помещали на предметные многоячеистые стекла с тефлоновым покрытием (диаметр ячейки 5 мм), на предметные стекла с адгезивным полилизиновым покрытием и в пластиковые чашки Петри. Изучение гемоцитов проводили на световом микроскопе (Leica DM5000) в режиме фазового контраста с использованием светофильтров и на инвертированном микроскопе (Leica DMIL). Для изучения биологических особенностей клеток гемолимфы часть препаратов инкубировали во влажной камере на протяжении 4–8 часов при комнатной температуре (22–24°C). При этом каждые 15–30 мин препараты просматривали и фиксировали изменения, происходящие с выбранными группами клеток. На всех препаратах *in vitro* измеряли размеры клеток, регистрировали скорость их распластывания на субстрате и изменения формы.

Для **приготовления постоянных препаратов** гемоцитов изготовляли мазки свежесобранной гемолимфы на предметных стёклах с адгезивным полилизиновым покрытием и в пластиковых чашках Петри (CITOTEST, Китай). Кроме того, проводили предварительную инкубацию гемолимфы в физиологическом растворе в течение 30 мин во влажной камере. Мазки фиксировали и 4% параформальдегиде, приготовленном на фосфатно-солевом буфере (ФСБ). После промывки от фиксатора фильтрованной водой препараты окрашивали гистологическими красителями: гематоксилин-эозином по Эрлиху (в течение 7 мин), 4% раствором эозина метиленового синего по Романовскому-Гимзе (в течение 25 мин) (Луговская и др., 2002). Анализ микрофотографий препаратов гемоцитов выполняли в программном обеспечении ImageScope и ImageJ (CMA, Россия).

Для **флуоресцентного окрашивания** гемоциты после фиксации инкубировали в 0.1 растворе TritonX-100, приготовленном на ФСБ в течение 5 мин. Визуализацию цитоскелета осуществляли с помощью специфических антител к α-тубулину Alexa Fluor 488 (зеленый) и фаллоидин-родамина (красный) (ThermoFisher Scientific, США). Ядра гемоцитов окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst (Thermo Fisher Scientific, США). Анализ препаратов проведен на флуоресцентном микроскопе Leica DMi8. Обработка изображений была выполнена с помощью программного обеспечения LASX (Leica Microsystems, Германия).

Для изучения **фагоцитарной активности** гемоцитов использовали суспензию меченных флуоресцеин-5-изотиоционатом (ФИТЦ) (Люмипроб, Россия) бактерий *S. aureus*, *E. coli* (концентрация – 10^7 клеток/мл). Суспензию бактерий в ФСБ инъецировали моллюскам в ногу по 80–100 мкл. Гемолимфу для микроскопического анализа забирали через 0.5–12 часов после инъекции.

Для изучения фагоцитарной активности гемоцитов *in vitro* свежесобранную гемолимфу инкубировали с суспензиями бактерий или частиц латекса диаметром 1.5 мкм (Диаэм, Россия) во влажной камере при комнатной температуре (22–24°C). Конечную концентрацию бактерий

при этом доводили 10^6 клеток/мл. Суспензию латекса (10%) разводили в растворе Чернина (в соотношении 1 : 10000) и добавляли по 2 мкл на 100 мкл гемолимфы. Препараты гемолимфы анализировали через каждые 20 мин в течение 3 часов. Часть препаратов анализировали непрерывно в течение 3 часов после внесения суспензии бактерий. Максимум возбуждения/ флуоресценции ФИТЦ – 495/516 нм. Все препараты анализировали микроскопически и фотографировали (Leica DM5000) в режиме фазового контраста (PH), флуоресценции (FLUO) и совмещенном режиме (FLUO/PH) с использованием светофильтров.

Для изучения **пролиферативной активности** циркулирующих клеток использовали 5-этинил-2-дезоксиуридин (5-ethynyl-2′-deoxyuridine, EdU). EdU является аналогом тимидина и способен включаться в синтезируемую ДНК (Buck et al., 2008; Cappella et al., 2008). Свежесобранную гемолимфу инкубировали с 20 мМ EdU в течение 30 мин на предметных стеклах во влажной камере. Проявление метки EdU выполнено с использованием набора Click-iT EdU Alexa Fluor 594 Imaging Kit согласно протоколу производителя (ThermoFisher Scientific). Ядра гемоцитов окрашивали красителем Hoechst (ThermoFisher Scientific). Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе LeicaDMi8. Обработка изображений была выполнена с помощью программного обеспечения LASX (Leica Microsystems, Германия).

Трансмиссионная электронная микроскопия была использована для изучения морфологии гемоцитов. Для фиксации гемолимфы использовали 2.5% глутаральдегид на 0.05М натрий-какодилатном буфере при pH 7.4. Образцы промывали в 0.05М натрий-какодилатном буфере при pH 7.2 и помещали в 1.5% раствор легкоплавкой агарозы. Полученные агарозные блоки фиксировали в 1% растворе четырехокиси осмия в какодилатном буфере в течение 1 часа. Обезвоживание блоков проводили с помощью этанола в восходящей концентрации и ацетона. После этого блоки заливали в эпоксидную среду Epon 812. Ультрамикротомию осуществляли на приборе Leica EM UC6, с применением алмазного ножа. Ультратонкие срезы (толщиной 30–50 нм) были контрастированы уранилацетатом и цитратом свинца. Изучение препаратов проводили на электронном микроскопе JEM-1011 (ЦКП Электронной микроскопии Института биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН, Борок).

Сканирующая электронная микроскопия была использована для изучения гемоцитарной мантии на спороцистах трематод *Leucochloridium paradoxum*. Отпрепарированных спороцист фиксировали в 2.5% глутаральдегиде и обезвоживали с помощью устройства для сушки образцов Leica EM CPD300. После напыления золотом препараты изучали на микроскопе Zeiss EVO 40 (ЦКП Электронной микроскопии РГПУ им. А. И. Герцена, Санкт-Петербург).

II. 2. 5. Методы проточной цитофлуориметрии

Цитофлуориметрический анализ гемолимфы осуществляли на проточных цитометрах BD Accuri™C6, Coulter Epics Altra (отдел иммунологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург), Navios (отдел иммунологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург), Amnis®ImageStream (лаборатория экспериментальной иммунологии и вирусологии Национального медицинского исследовательского центра здоровья детей, Москва), LongCyte (предоставлен в демонстрационных целях компанией ЛабТекДиагностика), а также на системе сортировки клеток SONY SH800 (лаборатория инженерии антител Института молекулярной и клеточной биологии, Новосибирск).

Цитофлуориметрические исследования были выполнены совместно с научным сотрудником Лаборатории экспериментальной зоологии РГПУ им. А. И. Герцена Серебряковой М. К. и главным научным сотрудником лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии Национального медицинского исследовательского центра здоровья детей Петричук С. В.

Для предотвращения реакций агглютинации, свежесобранную гемолимфу моллюсков смешивали с раствором Чернина (Chernin, 1963) в соотношениях 1:1 (*Planorbarius corneus* и *Biomphalaria glabrata*) и 1:4 (для *Planorbis planorbis*). Разведение определялось объёмом образца, необходимым для осуществления цитофруориметрического исследования. Гемолимфу прудовиков *Lymnaea stagnalis* изучали без разведения буфером. Во всех случаях проводился анализ только свежесобранной гемолимфы

Для исследования клеточных фракций использовались следующие цитометрические параметры: FS (forward scatter) – прямое светорассеивание (характеризует размеры клеток) и SS (side scatter) – боковое светорассеивание (характеризует структуру клеток), которые оценивались по 30000 событий для каждой из проанализированных проб. Количественный анализ популяционного состава клеток гемолимфы по параметрам FS и SS был осуществлён на цитометрах BD Accuri™C6 и Coulter Epics Altra.

С целью **анализа функциональных особенностей** гемоцитов образцы гемолимфы окрашивали специфическими красителями SYTO62®Red, SYTO16®Green, LysoTracker®Green и MitoTracker®Red (Thermo Fisher Scientific, США). Эти красители спонтанно проникают через клеточные мембраны. Красители семейства SYTO связываются с нуклеиновыми кислотами (ДНК и РНК) в цитоплазме, ядре и митохондриях клетки (Wlodkowic et al., 2009). Краситель LysoTracker накапливается в лизосомах (MacIntyre et al., 1988), а краситель MitoTracker концентрируется в митохондриях (Monteiro et al., 2020). Красители добавляли в свежесобранную гемолимфу до конечной концентрации 250 нМ для SYTO62, 200 нМ для

SYTO16 и MitoTracker, 100 нМ для LysoTracker. Затем образцы инкубировали в течение 10 мин в темноте на льду.

Анализ образцов проводили сразу после окрашивания на проточных цитометрах BD Accuri™C6 и Amnis®ImageStream®. Оценивали значения FS, SS и интенсивность флуоресценции красителей. Максимум возбуждения/флуоресценции для SYTO62®Red – 649/680 нм, для SYTO16®Green – 488/518 нм, для LysoTracker®Green – 504/511 нм, для MitoTracker®Red – 579/599 нм. В каждом образце анализировали 30000 событий. Анализ популяционного состава выполняли на основании двухпараметровой гистограмм, где по одной оси откладывали значения флуоресценции красителей. Параллельно осуществляли анализ параметров FS и SS.

Для **анализа продукции активных форм кислорода** гемоцитами использовали карбокси-2′,7′-дихлородигидро-флуоресцеин диацетат (CDFDA, КДФДА) (Люмипроб, Россия). Это вещество проникает через плазматическую мембрану и взаимодействует с клеточными эстеразами и АФК, в результате оно окисляется. После отщепления от КДФДА ацетильных групп образуется этом 6-карбокси-2′,7′-дихлорофлуоресцеин (Heredi-Szabo et al., 2008; Pogue et al., 2012), который ярко флуоресцирует в зелёной области спектра (максимум возбуждения/ флуоресценции – 504/535 нм). Краситель добавляли к образцам гемолимфы в конечной концентрации 10 мкМ, после чего инкубировали 30 мин в темноте. Затем добавляли раствор йодистого пропидия (propidium iodide, PI) в конечной концентрации 5 мкг/мл и проводили анализ на проточном цитометре BD Accuri™C6. PI использовали для удаления из зоны анализа поврежденных и мертвых клеток (Kasibhatla et al., 2006). Интенсивность флуоресценции АФК-зонда оценивалась для гемоцитов каждой популяции, которые не окрашивались PI. В популяциях гемоцитов были выделены субпопуляции с высокой и низкой интенсивностью флуоресценции.

Цитофлуориметрический анализ **фагоцитарной активности** гемоцитов производили на препаратах гемолимфы, инкубированных с бактериями *in vitro*. Для этого в образцы гемолимфы добавляли суспензию меченных ФИТЦ бактерий *E. coli* и *S. aureus* (концентрация – 10^7 клеток/мл) в соотношении клеток к бактериям 10 : 1. Образцы инкубировали в темноте 30 мин. Далее к образцам добавляли раствор трипанового синего в финальной концентрации 1 мкг/мл (Wan et al., 1993) и проводили анализ на проточном цитометре BD Accuri C6.

Подготовка бактерий. Бактерий *E. coli* выращивали на мясопептонном бульоне в течение 24 ч при 37°С, после чего переносили в пробирки и трижды отмывали избытком ФСБ (pH 7.4) при 1000g в течение 25 мин. Осадок ресуспендировали в 10 мл ФСБ, бактерий фиксировали прогреванием при 95°С в течение 1 часа. Фиксированные бактерии осаждали при 1000g 25 мин, переводили в 1 мл 0.1 М карбонатно-бикарбонатного буфера (pH 9.5) и хранили

при 4°С до использования. Концентрацию бактерий доводили до 10^8 в 1 мл по стандарту мутности.

Бактерий *S. aureus* использовали в виде стафилококкового реагента (НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург), который 5 раз отмывали избытком ФСБ и 2 раза карбонат-бикарбонатным буфером при 400g в течение 15 мин. Концентрацию бактерий в карбонат-бикарбонатном буфере доводили до 10^8 в 1 мл.

ФИТЦ растворяли в диметилсульфоксиде, получая концентрацию 1 мг/мл, и добавляли из расчета 0.05 мг на 100 млн бактерий и 0.01 мг на 100 млн дрожжей. Инкубацию проводили при 4°С в течение 24 часов в темноте. По завершении инкубации материал три раза отмывали ФСБ от свободного ФИТЦ (1000g в течение 15 мин). Меченые частицы аликвотировали и хранили при 4°С до использования. Непосредственно перед постановкой реакции объект фагоцитоза дважды отмывали физиологическим раствором, и концентрацию частиц устанавливали равной 10^7 клеток/мл.

Для изучения **пролиферативной активности** была использована гемолимфа неиммунизированных моллюсков средних размерных классов (см. раздел III.2.4). Гемолимфу инкубировали с 20 мкМ EdU в течение 30 мин в цитометрических пробирках. Проявление метки EdU выполнено согласно протоколу производителя (ThermoFisher, США). На последнем этапе пробоподготовки в образцы вносили DAPI (максимум возбуждения/ флуоресценции – 360/460 нм) для последующего анализа распределения циркулирующих клеток гемолимфы по фазам клеточного цикла (Firsanov et al., 2017). В качестве положительного контроля использовали культуру клеток моноцитарной лейкемии THP-1 (monocytic leukemia THP-1 cells, в которой количество составляет около 30%. Протокол пробоподготовки для клеток THP-1 полностью совпадал с протоколом для гемоцитов (Tokmakova, Serebryakova, Prokhorova, Ataev, 2020). В качестве отрицательного контроля использовали гемоциты, которые предварительно не были инкубированы с EdU, но были проведены через все последующие этапы протокола. Анализ проб производили на проточном цитофлуориметре Navios 10/3 (Beckman Coulter, США). Для каждого образца анализировали не менее 5000 ДНК-содержащих событий.

Обработку результатов цитометрического анализа проводили в программе Kaluza™ v.1.3 (Beckman Coulter, США). Анализ в пределах каждой группы улиток выполняли отдельно для каждой особи. Кроме того, для выявления наиболее типичных клеточных популяций в рамках проведенного исследования был использован подход, основанный на слиянии в один файл данных, полученных от нескольких особей, после чего задавались границы для разделения популяций клеток, которые в дальнейшем применялись ко всей исследуемой выборке. Расчет параметров клеточного цикла производился в автоматическом режиме при помощи встроенного в ПО Kaluza™ v.2.0 CellCycle модуля.

Статистическую обработку и визуализацию результатов в виде гистограмм проводили в пакетах программ MS Excel (MicroSoft, США), Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc, США). Нормальность распределения в полученных выборках оценивали при помощи критерия Колмогорова-Смирнова. Так как полученные нами данные имели ненормальное распределение, то данные были представлены в виде медианы (Me) и интерквантильного размаха (К25, К75), а для сравнения парных количественных значений использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

Визуализацию анализируемых на проточном цитометре гемоцитов осуществили с помощью проточного цитометра Amnis®ImageStream. Проточный цитометр Amnis позволяет одновременно получать цитометрические данные об образце гемолимфы и визуализацию событий на цитограмме. При исследовании регистрировали сигналы, характеризующие морфологию клеток (Ch01, Ch06), и флуоресценция SYTO62 по каналу Ch11. Для всех образцов было проанализировано не менее 200 000 событий, включая калибровочные частицы. Данные, полученные с помощью технологии ImageStream, были использованы для построения двухпараметрической гистограммы, на которой значения, характеризующие структуру клетки (Intencity MC Ch06) были нанесены вдоль оси абсцисс, а значения площади ячейки (площадь M01) были нанесены вдоль оси ординат. Область M01 – это параметр, наиболее близкий к прямому рассеянию классического проточного цитометра. Также были получены изображения отдельных клеток на гистограмме.

Разделение гемоцитов с использованием системы сортировки клеток SONY SH800 было выполнено совместно с научным сотрудником Лаборатории инженерии антител Института молекулярной и клеточной биологии Беловежец Т. Н. На приборе определяли диапазоны FS и SS, соответствующие разным популяциям гемоцитов. Клетки с соответствующими показателями FS и SS клетки в отдельные ячейки 96-луночного планшета. Полученные в результате сортировки гемоциты были использованы для изготовления мазков в соответствии с методикой, описанной выше.

II. 2. 6. Методы изучения экспрессии генов факторов защитных реакций

Вскрытие моллюсков проводилось с использованием бинокуляра Leica M135 на льду. Перед вскрытием измерялась масса моллюска, а также размер раковины. В работе были использованы моллюски с диаметром раковины 20–25 мм. Гемолимфу собирали с помощью стерильной пипетки Пастера из головного синуса. После отделения раковины, часть моллюсков фиксировали тотально (всё тело без раковины). У остальных особей отсекали фрагмент из средней части ноги, белковую железу, сердце с перикардом и фрагмент печени. Отбор фрагментов моллюска осуществлялся с помощью стерильных препаровальной иглы, скальпеля

и ножниц. Пробы помещали в фиксатор IntactRNA (Евроген, Москва) и хранили при −80°C в низкотемпературном замораживателе Sanyo MDF-U3286S до момента выделения РНК.

Экстракцию РНК осуществляли с использованием реактива PureZOL RNA Isolation Reagent (Bio-Rad Laboratories, США) в полном соответствии с инструкцией производителя. Чистоту и нативность полученных препаратов РНК проверяли спектрофотометрически (Implen NanoPhotometer) и электрофоретически. Препараты РНК ($A_{260/280}$=1.9) по данным электрофореза в 1% агарозном геле не содержали примесей ДНК и продуктов деградации РНК. Образцы РНК хранили при −80°C в низкотемпературном замораживателе Sanyo MDF-U3286S.

Гель-электрофорез РНК проводили в агарозе типа V на TBE-буфере (pH 8.0), содержащем 0.089 M Tris, 0.089 M борную кислоту и 0.002 M ЭДТА, с 0.5 мкг/мл бромистого этидия по стандартной методике (Sambrook et al., 1989).

Обратная транскрипция. Для удаления возможного загрязнения ДНК полученные препараты РНК обрабатывали ДНК-азой E (Евроген, Москва) согласно протоколу производителя. Синтез кДНК с помощью обратной транскрипции проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг тотальной РНК, 200 единиц обратной транскриптазы MMLV (Евроген, Москва), однократный буфер для обратной транскриптазы, эквимолярную смесь четырёх dNTP по 500 мкМ каждого, 1 мкМ смеси случайных праймеров и 25 единиц ингибитора РНКаз RiboCare (Евроген, Москва). Перед добавлением в реакционную смесь РНК инкубировали со случайными праймерами (отжигали в течение 5 мин при 70°C). Реакцию обратной транскрипции проводили в течение 1 часа при 37°C, затем 10 мин – при 70°C (амплификатор BioRad T100). Затем образцы охлаждали во льду.

Получение транскриптома. Качество РНК из гемоцитов моллюсков, предназначенной для получения транскриптома, дополнительно контролировали методом капиллярного электрофореза на биоанализаторе Agilent (приложение 12–1). Затем осуществили обогащение образцов мРНК методом амплификации с поли-Т праймерами (Mint-2, Евроген, Россия). Библиотека секвенирования была подготовлена с использованием набора QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN, Нидерланды). Подготовленные библиотеки (приложение 12–2) со средним размером фрагмента 450 п.н. были секвенированы в коммерческой организации (Генотек, Москва). Секвенирование было осуществлено на приборе Illumina HiSeq2500 методом парных прочтений длиной 100 п.н с использованием набора QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN). Сборка и анализ транскриптома описаны в разделе II.2.8.

Подбор специфических праймеров для анализа экспрессии генов иммунного ответа осуществляли с использованием программ Primer3 (http://primer3.ut.ee), GeneRunner (http://www.generunner.net), а также онлайн-инструмента Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). Для подбора праймеров использовали

представленные в GenBank последовательности моллюска *Biomphalaria glabrata* (таблица 7), а также последовательности транскриптов гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus,* полученные в ходе исследования (GenBank: PRJEB60803, PRJNA865135, Orlov et al., 2023; таблица 8).

ПРЦ со специфическим праймерами проводили в 20 мкл смеси, содержащей 1 мкл синтезированной кДНК, 1.5 единицы Taq-полимеразы (ИнтерЛабСервис, Москва), однократный ПЦР-буфер для Taq-полимеразы, эквимолярную смесь четырёх dNTP по 200 мкМ каждого, по 100 пМ каждого из пары специфических праймеров (амплификатор BioRad T100). Температурные профили ПЦР представлены в приложении 13.

Таблица 7. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для анализа экспрессии генов факторов иммунных реакций методом полуколичественного анализа

Ген	Нуклеотидные последовательности прямого (F) и обратного (R) праймеров (5'→ 3')		Последовательности, использованные для подбора праймеров
β-actin	F	ATTATGAGGTTAGATTTGGCTGGTC	AF329436 (Adema, 2002)
	R	CTGTGATTTCTTTCTGCATTCTGTC	
PcFREP	F	TATAGAGGCTGGCAGGAGTATCGTG	AY028462 (Zhang et al., 2001)
	R	GACATGTGCAGTTTGAAGTAGCGTG	
PcFREP3	F	CACCCCAACTTGTGATCAACTG	AF550185 (Zhang et al., 2004)
	R	TGTCCCTTCTGCATTGTCTCC	
PcFREP7	F	CAACCAGACATCATTTCAGCGGAG	AH010485 (Zhang et al., 2001)
	R	ATTCGTTTCATATTCTACCGTCTTC	
PcClect	F	ACCAATGGAGGAGGCTACCC	EB709537 (Guillou et al., 2007)
	R	TCAATGCAATCTTCGTTTCCA	
PcCaBP	F	CTTGCTATTATTGCTGTTG	EB709539 (Guillou et al., 2007)
	R	AAGAGATGGAAGATGTGTG	
PcCyst	F	GGATCCCGTCTGTAACTC	EB709538 (Guillou et al., 2007)
	R	AACAATGAAAGGCAATGG	
PcMIF	F	GCTTCCTTCCACAAAGACATCAC	FC859400 (Guillou et al., 2007)
	R	TCTCCCTTGAGGTCTTAATCACA	

Для оценки относительного уровня экспрессии в качестве референсного использовали ген β-актина. Концентрацию амплификатов оценивали по плотности зон электрофореза полуколичественным методом с помощью компьютерной программы «ScionImage» (https://scion-image.software.informer.com). Результаты анализа выражены в условных единицах

как отношение количества ПЦР-продукта, полученного со специфическими праймерами на образце мРНК к количеству ПЦР-продукта, полученного на той же мРНК с праймерами на кДНК β-актина. В результатах представлены средние значения из трёх и более независимых экспериментов.

Электрофоретический анализ ПЦР-продуктов проводили в 1.4% агарозном геле, который окрашивали бромистым этидием, с использованием камеры для горизонтального электрофореза или в 8% полиакриламидном геле, который окрашивали азотнокислым серебром (Sambrook et al., 1989), с использованием камеры для вертикального электрофореза (Хеликон, Москва). Фотографии с примерами гель-электрофорезов ПЦР-продуктов представлена в приложении 14.

ПЦР в реальном времени со специфическими праймерами проводили с использованием реакционной смеси 5xqPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) на амплификаторе BioRAD CFX96 Touch. Оптимальный состав реакционной смеси и температурные профили для ПЦР с каждой парой праймеров были подобраны экспериментальным путём. Рабочие профили ПЦР представлены в приложении 15. В каждом цикле на этапе отжига праймеров проводили измерение сигнала флюоресценции по каналу SYBR/FAM. В качестве референсных использовали гены, кодирующие глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) и β-актин – *PcGapdh* и *PcActin* (таблица 8).

Для определения эффективности ПЦР с каждой парой праймеров, проводили серию реакций с 10-кратными разведениями кДНК (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} и 10^{-5}). Затем по полученным значениям Ct строили калибровочные кривые в программе CFX Manager (BioRad, США), после чего определяли коэффициент корреляции R2. Для экспериментов использовали пары праймеров с R2 не менее 0.99 и эффективностью не менее 95%.

Для проверки специфичности полученных продуктов амплификации производили анализ кривых плавления продуктов реакции, а также электрофоретический анализ ПЦР-продуктов (приложение 16). Для каждого гена ПЦР проводили минимум в 3 технических проворностях, для каждой реакции ставили отрицательный контроль.

Анализ данных ПЦР в реальном времени осуществляли с помощью программы CFX Manager (BioRad). Уровень экспрессии оценивали методом сравнения пороговых циклов с нормировкой на референсные гены. Для каждого образца вычислялось среднее значение уровня экспрессии референсных генов – Ct:

$$Ct = 1/2\ (Ct\ (\textit{PcActin}) + Ct\ (\textit{PcGAPDH}))$$

Изменения в количестве мРНК оценивали методом $2^{\wedge\text{-}\Delta\Delta Ct}$, основанном на анализе экспрессии целевого гена по отношению к референсным (Livak, Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2008; Taylor et al., 2019).

Таблица 8. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для анализа экспрессии генов факторов иммунных реакций методом ПЦР в реальном времени

Ген	Нуклеотидные последовательности прямого (F) и обратного (R) праймеров (5'→ 3')	Транскрипт *Planorbarius corneus*, использованный для подбора праймеров
PcGapdh	F: TTGGCTACAGCATCAGGGTG	TRINITY DN106052
	R: GGGGAGAATCAGTGTGGTGG	
PcActin	F: GGCACCTCATAATCCTAAAG	TRINITY DN173859
	R: ACACCATCACCAGAATCCAT	
PcPerox	F: TTGGTGTGGACGACGAAGAG	TRINITY DN67698
	R: CAAAATCGCCGCCAGTGTAT	
PcSP	F: AGACGCACAGACAGACATACTT	TRINITY DN33943
	R: TACACACATCCCAACGCAAAAC	
	R: CTGGAACTGAATGAAAACAAGGA	
PcClect	F: ACCAATGGAGGAGGCTAC	TRINITY DN2847
	R: TCAATGCAATCTTCGTTT C	
PcTLR3	F: TGTTTTCGTTTCGTTCGCCA	TRINITY DN67225
	R: CGTTCTGCGACTGGACTGTA	
PcTLR7	F: GCGAGAATGTTGGGGAGAGT	TRINITY DN340328
	R: GCGTTCTTCGTGACAGCATA	
PcInt	F: AGTTTACTACCTGGGAGTTGTTGA	TRINITY DN234076
	R: TCGACCACTTTGATTCCATGTCT	
PcFREP7	F: TCAAGACATCAACCCCGATACAG	TRINITY DN7461
	R: GTAGACGCCACTGACTTTTGTTC	
PcCat	F: TGCAAGTTCCATTGCAAGACTG	TRINITY DN1577
	R: TCAGCAAACGTCATCACCTGTA	
PcBl	F: ACTCTGCCCGTACTTGATTTCTT	TRINITY DN75495
	R: TTTTACAGATCGGGAGATGGGTG	

Для статистического анализа и построения гистограмм использовали программное обеспечение MS Excel (MicroSoft, США) и Prism7 (https://www.pubcompare.ai). Нормальность распределения оценивали с применением критерия Шапиро–Уилка. Значимость различий в количестве мРНК генов интереса у моллюсков разных групп оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. Различия между группами считали статистически значимыми при $p<0.05$.

II. 2. 7. Биоинформатические методы

Биоинформатический анализ данных транскриптома был выполнен совместно с научным сотрудником Лаборатории экспериментальной зоологии РГПУ им. А. И. Герцена Орловым Ю. А. и аспирантом кафедры зоологии и генетики РГПУ им. А. И. Герцена Бобровской А. В.

Сборка и анализ транскриптома. В ходе предобработки данных у каждого прочтения сначала были удалены специфичные для библиотеки адаптеры и полиА-хвосты, неизвестные (N-base) и низкокачественные основания (phred<5) с обоих концов. Эта операция обусловлена обнаруженной диспропорцией в доли определённых оснований на концах прочтения относительно внутренней его части. Все прочтения короче 20 п.н. отбрасывались. Предобработка прочтений производилась с помощью cutadapt (Marcel, 2011). Полученные в результате предобработки прочтения сопоставлялись с кластером, кодирующим химерную рРНК с использованием hisat2 (Kim et al., 2015) со стандартными параметрами. При этом отбрасывали все совпадающие прочтения. Для этого был сконструирован кластер, кодирующий рДНК с использованием фрагмента этого участка рРНК *Planorbarius corneus,* полученного ранее (MK264353.1, Прохорова и др., 2015a). Все предварительно обработанные прочтения были классифицированы с помощью программного обеспечения kraken2 (Wood et al., 2019) с использованием базы данных NCBI nt (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/) с параметром достоверности, равным 0.6.

Затем была проведена фильтрация тех прочтений, которые содержали k-меры размера 27 из специально созданной с помощью программы BBduk (https://sourceforge.net/projects/bbmap/) базы данных. Эта база данных состояла из последовательностей (геномных, мтДНК, рРНК) наблюдаемых контаминирующих организмов или видов, тесно связанных с ними. Эталонный транскриптом гемоцитов *P. corneus* собрали с помощью *de novo* сборщика Trinity (Grabherr et al., 2011), используя прочтения от зараженных и незараженных моллюсков. Оценка качества сборки включала в себя оценку технических показателей, таких как показатели, полученные TransRate (Smith-Unna et al., 2016), и биологически релевантное количество универсальных однокопийных ортологов (USCO), обнаруженных BUSCO (Seppey et al., 2019).

Открытые рамки считывания (ORF) были предсказаны и извлечены с помощью TransDecoder (https://github.com/TransDecoder/TransDecoder/wiki). Затем кодированные белковые последовательности были сгруппированы на основе 99% идентичности и впоследствии аннотированы с помощью BLASTp. Порог e-значения равен 1e-5, по базе данных NCBI nr (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/) и InterProScan с настройками по умолчанию, используемыми для прогнозирования функциональных доменов (Jones et al., 2014).

Считывания из обоих образцов (из незаражённых и заражённых моллюсков) были объединены и использованы сборки эталонного транскриптома *de novo* с использованием Trinity

(Grabherr et al., 2011). Оценка качества сборки включала оценку технических показателей, таких как показатели, полученные TransRate (Smith-Unna et al., 2016), и биологически значимое количество универсальных ортологов в единственном экземпляре (USCO), обнаруженных BUSCO (Seppey et al., 2019). Транскрипты длиной более 200 п.н. были сгруппированы на основе 95% идентичности последовательностей с использованием CD-hitEST (Fu et al., 2012).

В этой аннотации был выполнен поиск белков, содержащих домены факторов иммунитета или имеющие сходство с ранее идентифицированными белками с иммунной функцией с помощью скрипта Python (https://github.com/AlexandraBobrovskaya/The-transcriptomic-analysis-of-Planorbarius-corneus-hemocytes-/tree/main, автор скрипта – Бобровская А. В.). Чтобы выполнить функциональную аннотацию, была использована база данных KEGG с соответствующим инструментом BlastKOALA. Присвоенные номера K были сопоставлены с модулями KEGG с использованием инструмента KEGG Mapper – Reconstruct (https://www.genome.jp/kegg/mapper/ reconstruct.html). В аннотации был выполнен поиск белков, содержащих домены, связанные с иммунитетом, или имеющие сходство с ранее идентифицированными полипептидами с иммунной функцией.

Для подсчета количества прочтений каждого транскрипта был использован Salmon (Patro et al., 2017). Полученные значения вместе с матрицей смещения были импортированы в пакет EdgeR (Robinson et al., 2010) для R с помощью пакета tximport (Soneson et al., 2015). Для проведения дифференциального анализа экспрессии генов с помощью тестов отношения правдоподобия (glmLRT) было указано консервативное значение биологического коэффициента вариации BCV=0.4. Транскрипты, удовлетворяющие следующим условиям, считались дифференциально экспрессируемыми (DE): |logFC| (логарифм кратности изменения) >2 и FDR (частота ложных срабатываний) <0,05. Гемоциты незаражённых моллюсков принимали в качестве эталона для сравнения. Выводы об относительной представленности транскриптов, кодирующих полноразмерные канонические ТПР, у заражённых и незаражённых моллюсков делали на основе метрики TPM (transcripts per million), определенной для каждого транскрипта с помощью Salmon (Patro et al., 2017).

Последовательности транскриптов, кодирующих домены ПРР (coding sequences, CDS), выравнивали, используя BioEdit (Hall, 1999) и онлайн-сервис BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). **Доменный состав** предполагаемых аминокислотных последовательностей ПРР был визуализирован с помощью ресурса аннотации белковых доменов SMART (http://smart.embl-heidelberg.de, Letunic et al., 2021) в нормальном режиме.

Филогенетическая реконструкция с использованием аминокислотных последовательностей TIR-домена (домен TLR/интерлейкина-1) была выполнена в программе MEGA v. 10.2.4 (Kumar et. al., 2016) методом ближайшего соседа (Neighbor-Joining, NJ) с

использованием модели числа различий (number of differences) (Nei, Kumar, 2000) и максимального правдоподобия (Maximum Likelyhood, ML) с использованием модели LG (Le, Gascuel, 2008). Бутстреп-поддержка была посчитана на основе 1000 реплик (Felsenstein, 1985). В качестве внешних групп использовали представленные в GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) последовательности TIR-доменов моллюсков (указаны в приложении 17 и на рисунке 105).

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

В работе использованы лёгочные моллюски девяти видов. Выбор модельных видов для исследования обусловлен несколькими причинами. В первую очередь в работе были использованы виды моллюсков, широко распространённые на территории европейской части России, которые являются объектами зоологических и физиологических исследований. Для таких модельных видов в той или иной мере известны особенности их жизнедеятельности, которые необходимо учитывать при оценке иммунных реакций. К таким видам относятся *Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis*, *Lymnaea stagnalis*, *Succinea putris.* Кроме того, перечисленные виды являются промежуточными хозяевами большого числа видов трематод, которые рассматриваются в работе в качестве одного из основных факторов иммунизации.

Во-вторых, с целью увеличения списка модельных объектов для изучения иммунитета пульмонат, были выбраны представители пяти разных семейств: Planorbidae, Lymnaeidae, Helicidae, Succineidae, Cochlicopidae. Исследуемые виды также характеризуются разыми местами обитания. Часть видов являются пресноводными (*Biomphalaria glabrata, B. pfeifferi, Planorbarius corneus, Planorbis planorbis, Lymnaea stagnalis, Ampullaceana lagotis*), а другая часть – сухопутными (*Succinea putris*, *Arianta arbustorum, Cochlicopa lubrica*). Использование в исследовании моллюсков, принадлежащих к различным семействам и экологическим группам, позволяет объективно оценить универсальность характеристик иммунной системы пульмонат, а также выявить специфические особенности иммунного ответа, характерные для отдельных таксономических и экологических групп.

Помимо моллюсков из природных популяций в работе были использованы улитки из лабораторных линий. Последние представлены видами *Biomphalaria glabrata* и *B. pfeifferi*, которые являются универсальными моделями для изучения иммунитета пульмонат на протяжении нескольких десятилетий. Использование их в работе позволяет сравнивать результаты, полученные на моллюсках их природных популяций с данными по лабораторным линиям.

Хорошо известно, что иммунные реакции моллюсков на различные патогены имеют видовые особенности, но в то же время могут отличаться у представителей разных популяций (лабораторных линий), относящихся к одному виду (Lewis et al., 2001). Причина таких различий – генетические особенности конкретных особей и биологические особенности паразитов, которые могут быть специфичными и неспецифичными по отношению к конкретным хозяевам (Adema et al., 2000; Webster, Davies, 2001; Adema, Loker, 2015; Mitta et al., 2017). Поэтому для

понимания общих видовых особенностей иммунных реакций, необходима точная видовая идентификация модельных объектов.

Несмотря на то, что в исследовании были рассмотрены хорошо известные и широко распространённые виды пульмонат, для части моллюсков из природных популяций возникла необходимость их видовой идентификации с использованием молекулярно-генетических маркеров. Это обусловлено высоким морфологическим полиморфизмом и сложностью определения на основе только морфологических критериев, либо спорным систематическим статусом исследуемых видов.

III.1.1. Моллюски *Planorbarius corneus*

В связи со спорностью систематического статуса для видовой идентификации роговых катушек помимо морфологических критериев были использованы молекулярно-генетические маркеры.

Видовая идентификация моллюсков *P. corneus* по морфологическим признакам. Раковина толстостенная, от светло-коричневого до оливкового или бурого цвета, дисковидная, плоскоспиральная, правозакрученная, мало инвалютная (рисунок 5). Оборотов 4–6. Ширина оборотов возрастает постепенно, последний оборот значительно шире предпоследнего. Шов глубокий, хорошо выражен с обеих сторон раковины. Верхушка раковины погруженная. Устье почковидной формы, вырезано предпоследним оборотом. Ширина устья почти равна его высоте (таблица 9). Свободный край устья прямой, острый. У молодых моллюсков на раковине видна решетчатая скульптура. На раковине хорошо заметны линии прироста.

Тело темно-серое, коричневое или коричнево-чёрное. Нога немного светлее тела. Щупальца длинные и тонкие, глаза расположены у основания щупалец.

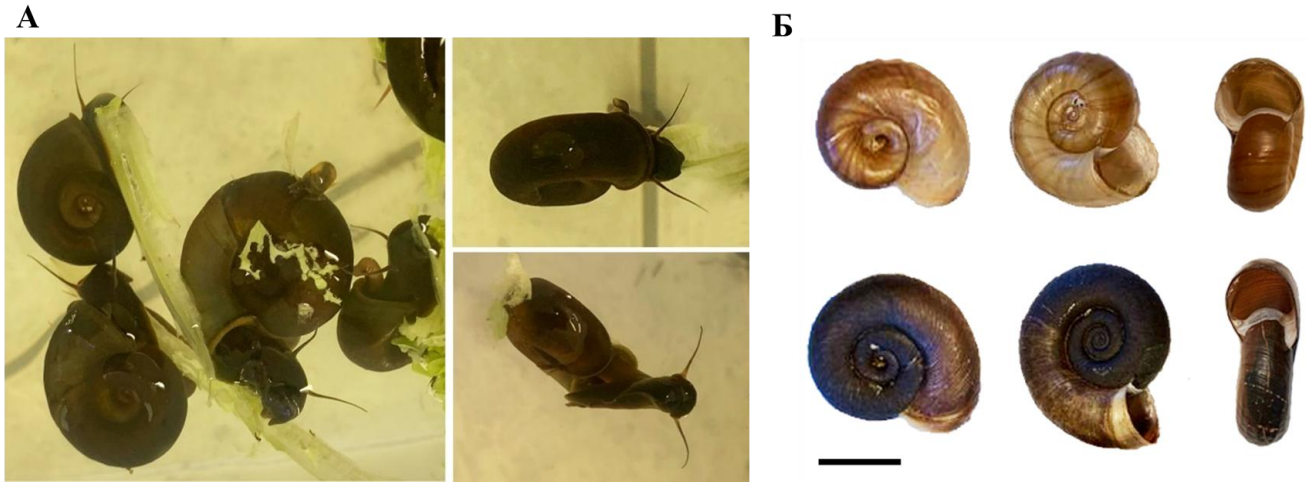


Рисунок 5. Моллюски *Planorbarius corneus.* А – внешний вид; Б – раковины. Масштабная линейка – 10 мм.

Таблица 9. Морфометрические параметры раковины моллюсков *Planorbarius corneus* (n=312)

Параметры (мм)/ ссылки	Ширина раковины	Высота раковины	Высота устья	Ширина устья	Высота/ ширина раковины
Результаты измерений					
Me (K1, K3)	26.27 (22.01; 29.10)	9.02 (8.14; 10.10)	9.19 (8.14; 10.10)	9.12 (8.27; 11.11)	0.30–0.50
Минимальное значение	14.24	6.13	8.10	6.20	
Максимальное значение	36.2	12.6	13.3	12.31	
Литературные данные					
Стадниченко, 1990	11–35	7–14	—	—	0.3–0.46
Жадин, 1952	25–32	12–14	—	—	
Максимова, 1995	—	—	—	—	0.35–0.39

Нами была отмечена большая вариабельность конхологических признаков у исследованных моллюсков. Наиболее изменчивы цвет раковины и выраженность её скульптуры. Принято считать, что окраска раковины моллюсков *P. corneus* зависит от субстрата, на котором живёт улитка – донные отложения, растительность (Стадниченко, 1990).

Гермафродитная железа смещена к вершине внутренностного мешка и несколькими рядами диветикулов. Семенной пузырёк широкий и длинный, семяпровод расширяется в направлении простаты. Простата вытянутая, кистевидная, состоит из нескольких рядов расположенных веерообразно дивертикулов, прилегает к семяпроводу. Простата имеет собственный короткий проток. Пениальная железа охватывает отверстие мешка совокупительного органа. Мешок совокупительного органа циллиндрический, короткий. Предпениальный рукав в 4–5 раз шире мешка совокупительного органа с полостью, в которой находятся два массивных образования – препуциальный орган. Орган совокупления клиновидной формы, с толстыми мышечными стенками. Внутренняя лопать меньше по размерам и узкая. Отверстие семяизвергательного канала расположено терминально. Пенис без стилета. Семяприёмник грушевидной формы и узким длинным протоком. Влагалище узкое, матка длинная и широкая. Белковая железа округленно-прямоугольной формы, состоит из многочисленных мелких фолликулов. Яйцевод широкий, уплощённый. Половое отверстие расположено на левой стороне тела.

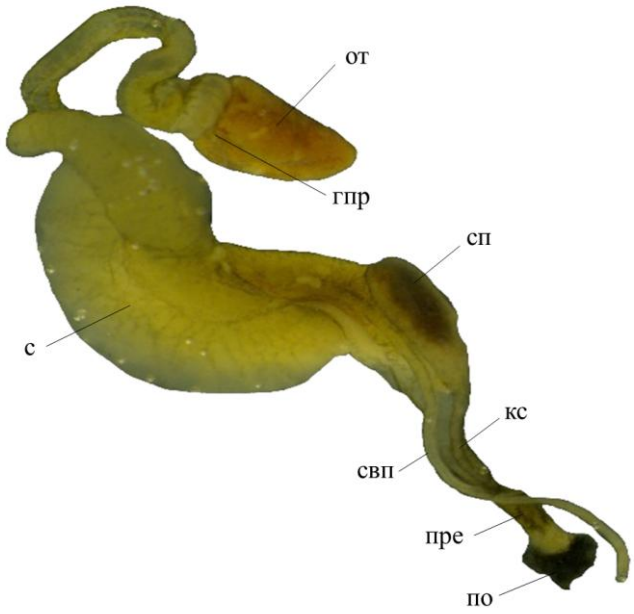


Рисунок 6. Половая система моллюска *Planorbarius corneus.* Условные обозначения: гпр – гермафродитный проток; кс – канал семяприёмника; от – овотестис; пре – препутиум; с – семевод; свп – семявыносящий проток; сп – семяприёмник; по – половое отверстие.

Анализ кариотипов осуществляли для представителей разных популяций моллюсков *P. corneus* (n=36). В большинстве метафазных пластинок (n=143) обнаружено по 18 пар хромосом (2n=36) (рисунок 7). Средняя длина хромосом колеблется в диапазоне от 1.15±0.05 мкм до 3.61±0.31мкм (таблица 10).

По форме все хромосомы являются метацентрическими и субметацентрическими. При этом, в подавляющем большинстве кариотипов, метацентрические и субметацентрические хромосомы представлены в соотношении 18:18, или с незначительными отклонениями. Хромосомы 18, 19, 20 могут иметь промежуточную морфологию между метацентриками и субметацентриками. Остальные хромосомы имеют постоянную форму: с 1 по 17– метацентрические, с 21 по 36 – субметацентрические (таблица 10, рисунок 7).

На некоторых препаратах были обнаружены полиплоидные метафазные пластинки (рисунок 7Б). На таких пластинках по 72, 196 и 424 хромосом, что соответствует уровням плоидности 4, 11 и 23.

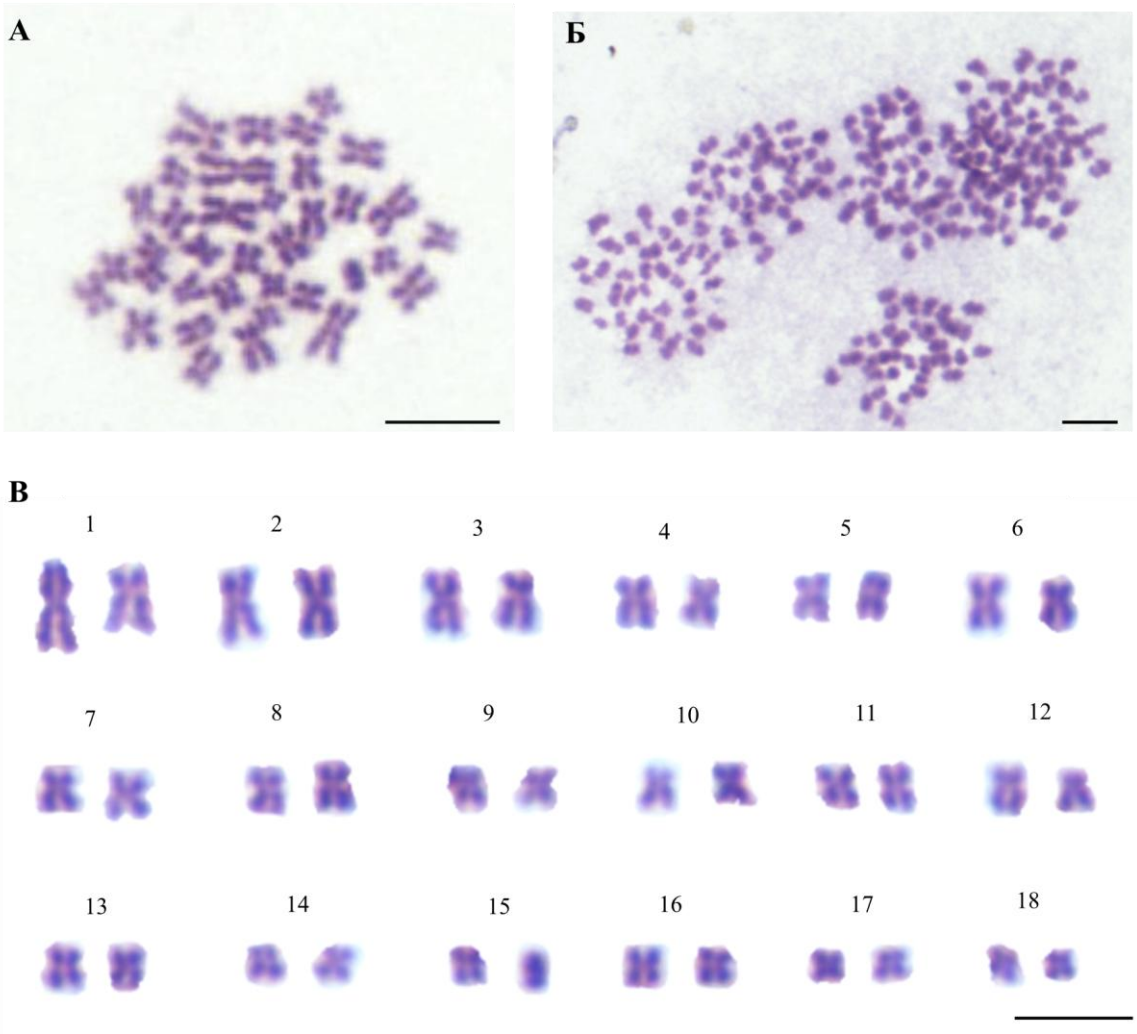


Рисунок 7. Хромосомы моллюсков *Planorbarius corneus*. Окрашивание азур-эозином по Романовскому-Гимза. А – метафазная пластинка клетки эпителия ноги (2n=36); Б – полиплоидная клетка гонады (n=196); В – идиограмма кариотипа *P. corneus*. Условные обозначения: 1–9 – метацентрические хромосомы; 10–18 – субметацентрические хромосомы. Масштабная линейка – 5 мкм.

Видовая идентификация моллюсков *P. corneus* с использованием молекулярно-генетических маркеров. В ходе исследования были генотипированы моллюски из нескольких природных водоёмов на территории Санкт-Петербурга, Гатчинского и Всеволожского районов Ленинградской области, Калининградкой области и Витебской области Белорусии. В результате молекулярно-генетического анализа были получены нуклеотидные последовательности участка рДНК (ITS1–5.8S–ITS2), а также участков митохондриальных генов *cox1* и *cytB*. Номера полученных нуклеотидных последовательностей в GenBank представлены в приложении 1.

Для анализа полиморфизма *P. corneus* по исследованным маркерам были также использованы нуклеотидные последовательности моллюсков с территории Германии, Дании, Франции, Румынии, представленные в GenBank (приложение 1). Характеристики полученных участков генома *P. corneus* представлены в таблице 11.

Таблица 10. Морфометрические параметры хромосом моллюсков *Planorbarius corneus*

Пара хромосом	Абсолютная длина (L^a), мкм	Относительная длина (L^r), мкм	Центромерный индекс	Форма хромосомы
1	3.61±0.31	4.75±0.15	50	m
2	3.13±0.22	4.13±0.09	49.5	m
3	2.64±0.18	3.50±0.04	49	m
4	2.48±0.17	3.30±0.03	49	m
5	2.41±0.16	3.20±0.03	48	m
6	2.29±0.15	3.05±0.02	48	m
7	2.18±0.13	2.90±0.02	47	m
8	2.12±0.12	2.83±0.02	47	m
9	2.03±0.12	2.70±0.02	46	m
10	1.98±0.12	2.64±0.02	45.5	m/sm
11	1.90±0.11	2.53±0.02	45	sm
12	1.81±0.10	2.41±0.02	44	sm
13	1.75±0.10	2.34±0.02	43.5	sm
14	1.68±0.10	2.24±0.03	42.5	sm
15	1.56±0.10	2.07±0.01	42	sm
16	1.48±0.07	1.98±0.02	41	sm
17	1.38±0.07	1.84±0.02	39	sm
18	1.15±0.05	1.55±0.05	35.5	sm

Условные обозначения: m – метацентрическая хромосома; sm – субметацентрическая хромосома.

Таблица 11. Генетическое разнообразие моллюсков *Planorbarius corneus* на основе генотипирования по участкам рДНК и митохондриальных генов *coxI* и *cytB*

Ген	Длина секве-нированного участка (п.н.)	N	Нуклеотидный состав (%)				H	P	k	S
			T	C	A	G				
18S	152	30	23.1	22.4	23.1	31.3	1	0	0	0
ITS1	573–582	30	24.6	24.9	23.3	27.2	5	0.0135	7.625	15
5.8 S	153–156	30	20.4	26.3	22.6	30.6	2	0.0007	1.067	3
ITS2	470–471	30	27.8	26.7	17.7	27.7	5 (8)	0.0087	4.069	22
28S	318	30	18.5	24.8	25.5	31.2	1	0	0	0
cox I	606	34	42.4	13.1	27.2	17.3	11	0.0021	1.827	18
cyt B	575	25	45.3	14.6	27.8	12.3	12	0.0039	8.07	13

Условные обозначения: N – количество образцов (последовательностей); H – число гаплотипов; P – нуклеотидное разнообразие (на сайт); k – среднее число нуклеотидных различий на последовательность; S – число вариабельных сайтов.

С использованием полученных в исследовании и представленных в открытом доступе нуклеотидных последовательностей роговой катушки (приложение 1) были посчитаны средние внутривидовые и межпопуляционные генетические дистанции по участкам генов *cytB*, *cox1* и полным последовательностям ITS1 и ITS2 (таблица 12). На участках ITS2, генов *cytB*, *cox1* генотипические различия между особями представлены однонуклеотидными полиморфизмами и делециями. Участок ITS1 оказался наиболее вариабельным из использованных маркеров. В ITS1 помимо однонуклеотидных замен и инсерций у некоторых моллюсков присутствует 4-нуклеотидная инсерция в позиции 332–335 и 4-нуклеотидная инсерция в позиции 459–463.

Выявленные различия в ITS1 и ITS2 принято считать незначительными, укладывающимися в границы внутривидовой изменчивости (DeJong et al., 2001; Yao et al., 2010). Однако для оценки значимости полученных генетических дистанций для моллюсков сем. Planorbidae был выполнен дополнительный анализ внутривидовых и межвидовых генетических дистанций моллюсков рода *Biomphalaria* (таблица 12).

Таблица 12. Средние генетические дистанции, полученные на основе анализа нуклеотидных последовательностей моллюсков *Planorbarius corneus* и моллюсков рода *Biomphalaria* из разных популяций*

Дистанция	Участок ДНК			
	ITS1	ITS2	*cytB*	cox1
Planorbarius corneus				
Средняя внутривидовая	0.0288	0.0088	0.0134	0.0210
Средняя межпопуляционная (в исследованных популяциях / для всех проанализированных образцов)	0.0226 / 0.0255	0.0079 / 0.0095	0.0171 / 0.0208	0,0011 / 0.0046
Biomphalaria glabrata				
Средняя внутривидовая	0.0153	0.0702	0.0219	0.0128
Средняя межпопуляционная	0.0107	0.0704	0.0221	0.0155
Biomphalaria pfeifferi				
Средняя внутривидовая	0.0273	0.0041	0.0108	0.0250
Средняя межпопуляционная	0.0275	0.0045	0.0103	0.0173
Biomphalaria sudanica				
Средняя внутривидовая	0.0044	0.05455	—	0.0104
Средняя межпопуляционная	0.0048	0.05455	—	0.0105
род *Biomphalaria*				
Средняя межвидовая	0.2788	0.0974	0.1183	0.0617

* номера нуклеотидных последовательностей в GenBank представлены в приложениях 1 и 10.

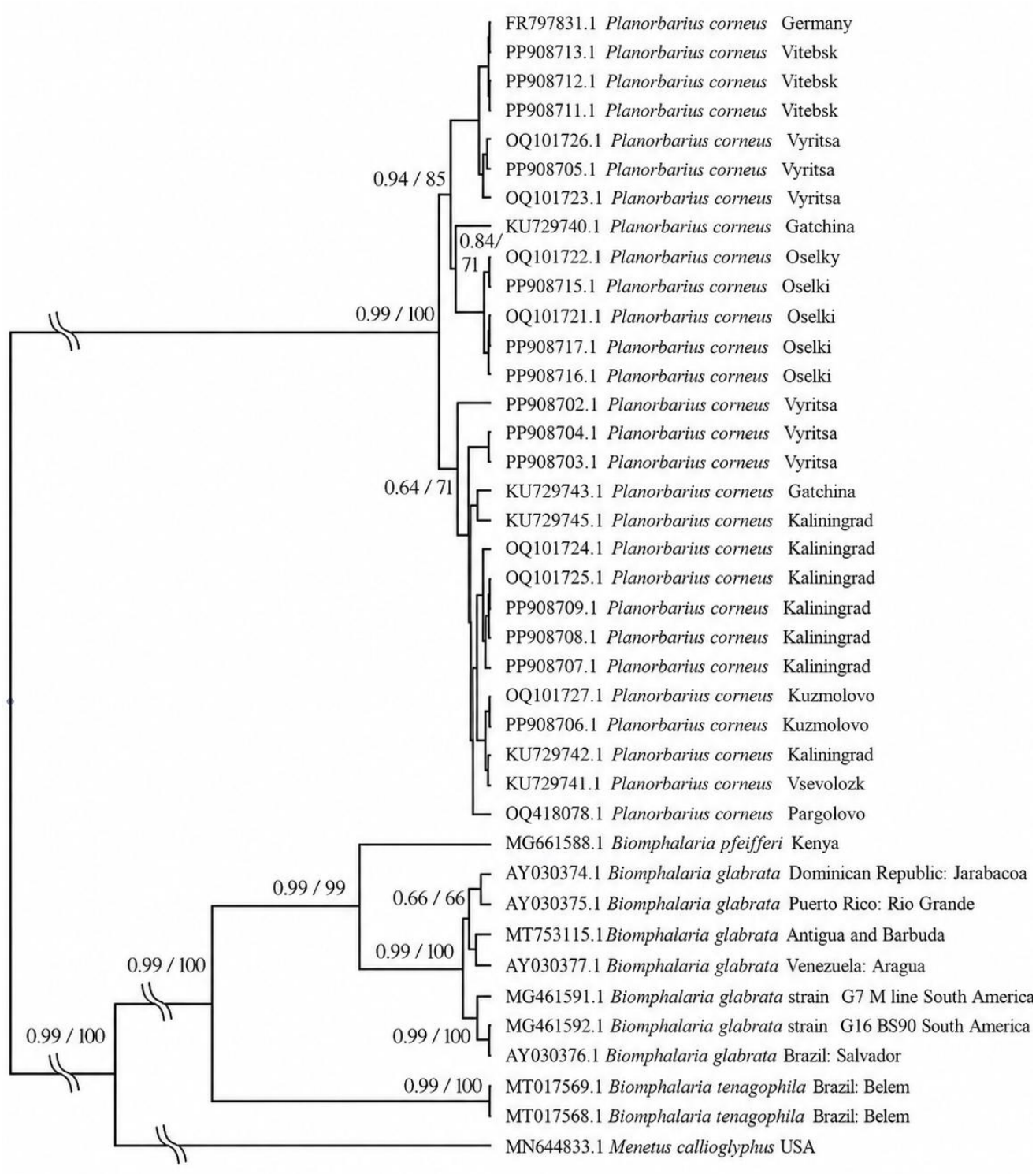


Рисунок 8. Байесовская филогенетическая реконструкция моллюсков сем. Planorbidae на основе нуклеотидных последовательностей участка рДНК (1653 п.н.), включающего участок 18S (фрагмент)–ITS15.8S–ITS2–28S (фрагмент). Дерево, полученное методом максимального правдоподобия, имело такую же топологию. Указаны значения апостериорных вероятностей для BA и бутстрепные поддержки для ML для 1000 реплик. В качестве внешних групп использованы нуклеотидные последовательности участка рДНК моллюсков сем. Planorbidae.

Средние внутривидовые и межпопуляционные различия моллюсков *Planorbarius corneus* находятся в пределах значений, полученных для трёх видов биомфалярий. Также они значительно меньше генетических дистанций между биомфаляриями разных видов. Это подтверждает принадлежность всех генотипированных роговых катушек к одному виду – *P. corneus*. На филогенетической реконструкции, выполненной с использованием нуклеотидных последовательностей участков рДНК все исследованные образцы *P. corneus* формируют единую кладу (рисунок 8). Внешние контрольные группы четко обособлены на отдельных ветвях.

Таблица 13. Генетическое разнообразие по гену *cox1* моллюсков *Planorbarius corneus* из разных географических популяций

Район сбора образцов	Обозначение популяции	N	Гаплотипы	Hd	P
Россия, Ленинградская обл., Гатчинский район	Вырица (Viritca)	6	Hap_1, Hap_2	0.3333	0
Россия, Ленинградская обл., Всеволожский район, пос. Кузьмолово	Осельки (Oselki)	5	Hap_1, Hap_7	0.4000	0.0016
Россия, Ленинградская обл., Всеволожский район, пос. Осельки	Кузьмолово (Kuzmolovo)	2	Hap_1, Hap_7	1	0.0009
Россия, Калининградская обл.	Калининград (Kaliningrad)	5	Hap_1, Hap_6, Hap_7	0.6000	0.0016
Белоруссия, Витебская обл.	Витебск (Vitebsk)	5	Hap_1, Hap_8	0.4000	0.0013
Дания	Дания (Denmark)	1	Hap_1	1	0
Германия	Германия (Germany)	4	Hap_1, Hap_3, Hap_5	0.7500	0.0033
Бельгия	Бельгия (Belgium)	5	Hap_1, Hap_4, Hap_9, Hap_10	0.8000	0.0053
Румыния	Румыния (Romania)	1	Hap_11	1	0

Условные обозначения: N – количество образцов (последовательностей); Hd – гаплотипическое разнообразие; P – нуклеотидное разнообразие.

Таблица 14. Генетическое разнообразие по гену *cytB* моллюсков *Planorbarius corneus* из разных географических популяций

Район сбора образцов	Обозначение популяции	N	Гаплотипы (на основе анализа фрагмента 575 п.н.)	Гаплотипы (на основе анализа фрагмента 505 п.н.)	Hd	P
Россия, Ленинградская обл., Гатчинский район	Вырица (Viritca)	6	Hap_1, Hap_2, Hap_3, Hap_6,	Hap_1, Hap_5, Hap_8	0.6666 / 0.5000	0.0096
Россия, Ленинградская обл., Всеволожский район, пос. Кузьмолово	Кузьмолово (Kuzmolovo)	4	Hap_7	Hap_5	1.000	0
Россия, Ленинградская обл., Всеволожский район, пос. Осельки	Осельки (Oselki)	1	Hap_9, Hap_10	Hap_9, Hap_10	2.000	0.0132
Россия, Калининградская обл.	Калининград (Kaliningrad)	3	Hap_4, Hap_8	Hap_3, Hap_6	0.6666	0.0356
Белоруссия, Витебская обл.	Витебск (Vitebsk)	5	Hap_5, Hap_9, Hap_11, Hap_12	Hap_4, Hap_9, Hap_11, Hap_12	0.8000	0.0115
Дания	Дания (Denmark)	1	—	Hap_7	1	0
Германия	Германия (Germany)	2	—	Hap_7	0.5000	0

Условные обозначения: N – количество образцов (последовательностей), Hd – гаплотипическое разнообразие, P – нуклеотидное разнообразие.

Анализ гаплотипического разнообразия митохондриальных генов показал, что ген *cox1* представлен 11 гаплотипами (таблица 13), а ген *cytB* – 12 гаплотипами (таблица 14). Гаплосеть гена *cox1* моллюсков *P. corneus* имеет звездчатую структуру (рисунок 9). Центральный гаплотип Hap_1 характерен для более, чем половины генотипированных моллюсков и встречается в большинстве исследованных точек. Часть гаплотипов уникальны и встречаются только в одном регионе. Уникальные гаплотипы выявлены у улиток из Гатчинского района Ленинградской области, моллюска из Калининградской области, три уникальных гаплотипа выявлены у моллюсков из Бельгии, два – среди образцов из Германии. Среднее гаплотипическое разнообразие по данному маркеру – 0.785, среднее нуклеотидное разнообразие – 0.0016.

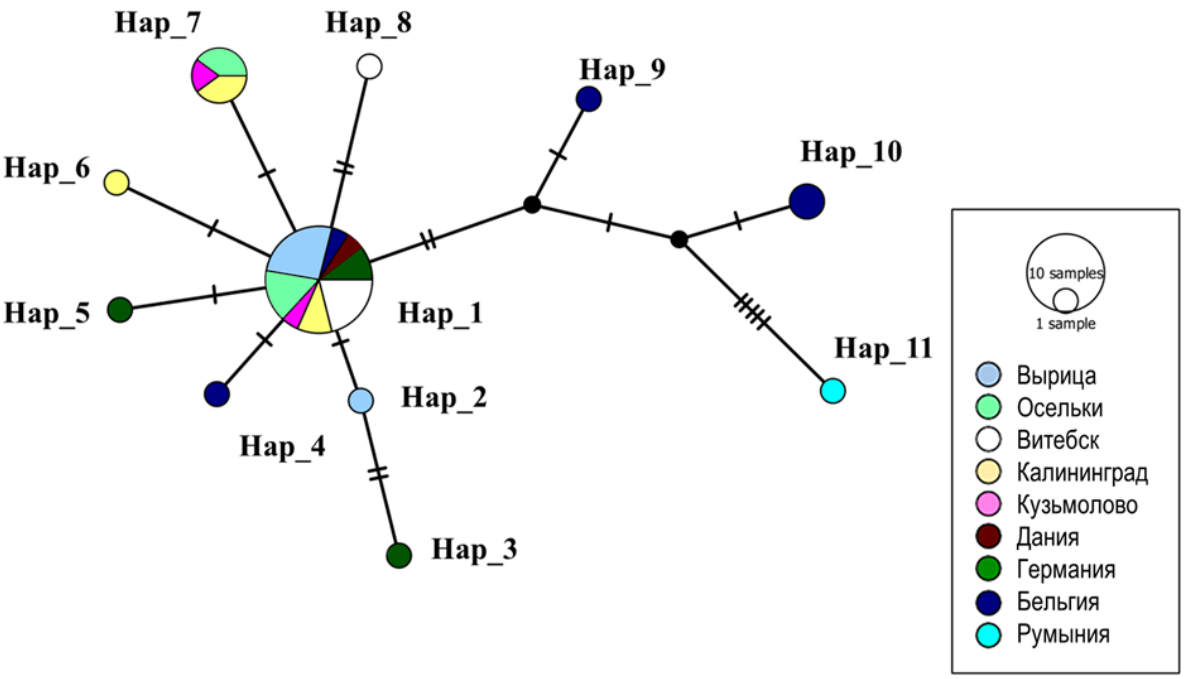


Рисунок 9. Разнообразие гаплотипов митохондриального гена *cox1* моллюсков *Planorbarius corneus.* Гаплосеть получена с использованием нуклеотидных последовательностей участка гена *cox1* длиной 606 п.н. Условные обозначения: размер кружочков пропорционален частоте встречаемости гаплотипа; штриховки показывают нуклеотидные замены; цветами обозначены разные популяции; чёрные сплошные кружки обозначают ненаблюдаемые гипотетические гаплотипы.

Нуклеотидные последовательности гена *cytB* моллюсков *P. corneus* из европейских популяций, представленные в GenBank, короче, чем полученные в данном исследовании. Поэтому было построено два варианта гаплосетей на основе фрагмента гена *cytB* – длиной 575 п.н. (рисунок 9) и длиной 505 п.н. (рисунок 10). Это позволило выявить один дополнительный гаплотип Hap_7, встречающийся у моллюсков из Дании и Германии. Однако гаплосети построенные с использованием длинного и короткого выравнивания выявляют одинаковое количество гаплотипов. Это связано с тем, что часть полиморфизмов при обрезании выравнивания теряется. Различия между гаплотипами представлены однонуклеотидными заменами. Среднее гаплотипическое разнообразие *P. corneus* исследованному фрагменту гена *cytB* – 0.9476, среднее нуклеотидное разнообразие – 0.0116.

Несмотря на разнообразие гаплотипов генов *cox1* и *cytB*, генетические дистанции между ними не большие. Между гаплотипами гена *cox1* средняя дистанция составляет 0.0069 (0.0016–0.0181), между гаплотипами гена *cytB* – 0.0204 (0.0055–0.0587). Средние внутрипопуляционные и межпопуляционные дистанции по обоим митохондриальным маркерам значительном меньше межвидовых, характерных для видов рода *Biomphalaria* (таблица 12).

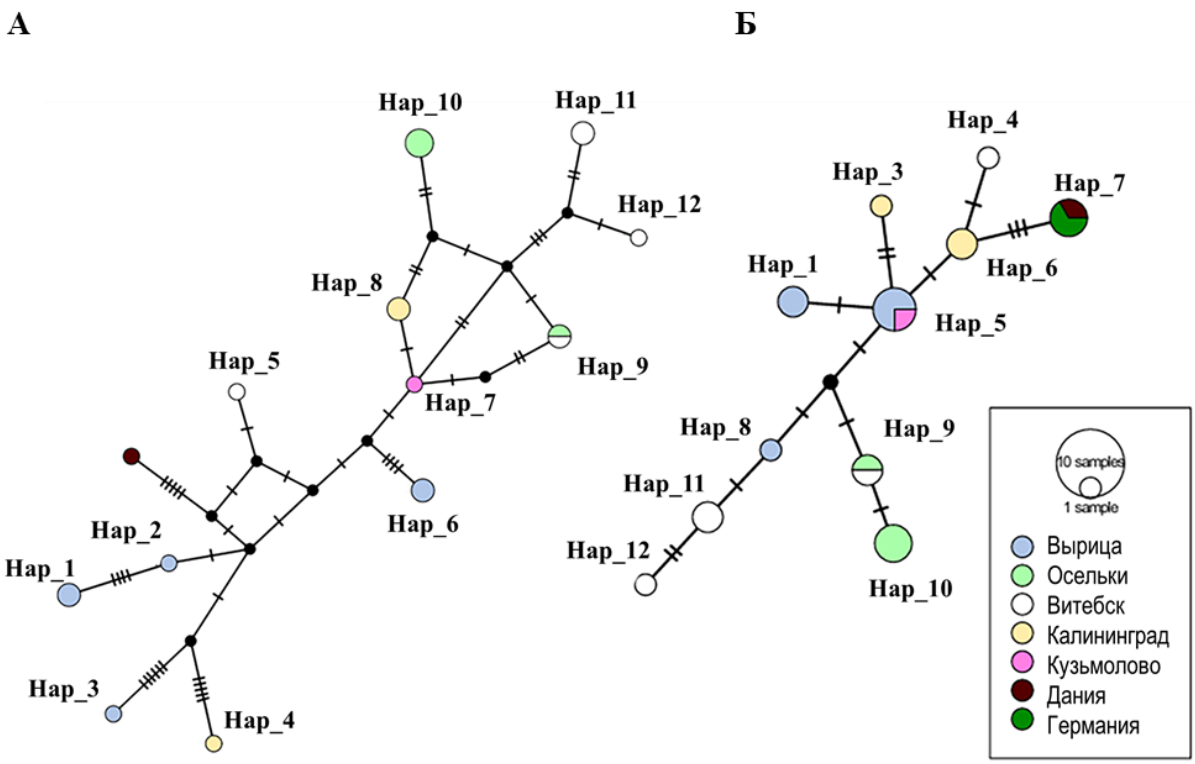


Рисунок 10. Разнообразие гаплотипов митохондриального гена *cytB* у моллюсков *Planorbarius corneus.* Гаплосети получены с использованием нуклеотидных последовательностей участка гена *cytB* длиной 575 п.н. (А) и 505 п.н. (Б). Условные обозначения: см. рисунок 9.

На филогенетические реконструкциях, выполненных с использованием нуклеотидных последовательностей митохондриальных генов, моллюски *Planorbarius corneus* формируют обособленную кладу, соответствующую единому виду (рисунки 11, 12).

Для оценки межпопуляционной и внутрипопуляционной изменчивости *P. corneus* также был выполнен анализ генотипического разнообразия моллюсков с использованием RAPD-маркеров. Были изучены моллюски двух популяций, обитающих на территории Ленинградской области и одной популяции из Калининградской области. Из использованных случайных праймеров (см. раздел II.2) наиболее пригодными для выявления межпопуляционных различий оказались праймеры G3, G7, P2+P5. Для выявления внутрипопуляционных различий были использованы праймеры G3, G7, P1, P2+P5, P2+P7, P3+P6, P4+P6, P3+P10 (Прохорова и др., 2014). По данным RAPD-анализа с этими случайными маркерами средний процент полиморфных локусов в исследуемых популяциях составил 57.6–59%, а индекс фенотипического разнообразия Шеннона – 0.21–0.23. Таким образом, показатели разнообразия различных популяций по исследованным локусам очень близки. Средний коэффициент подобия по между популяциями моллюсков из Гатчинского и Всеволожского районов Ленинградской области составил 0.81, между гатчинской и калининградской– 0.75, между всеволожской и калининградской – 0.78.

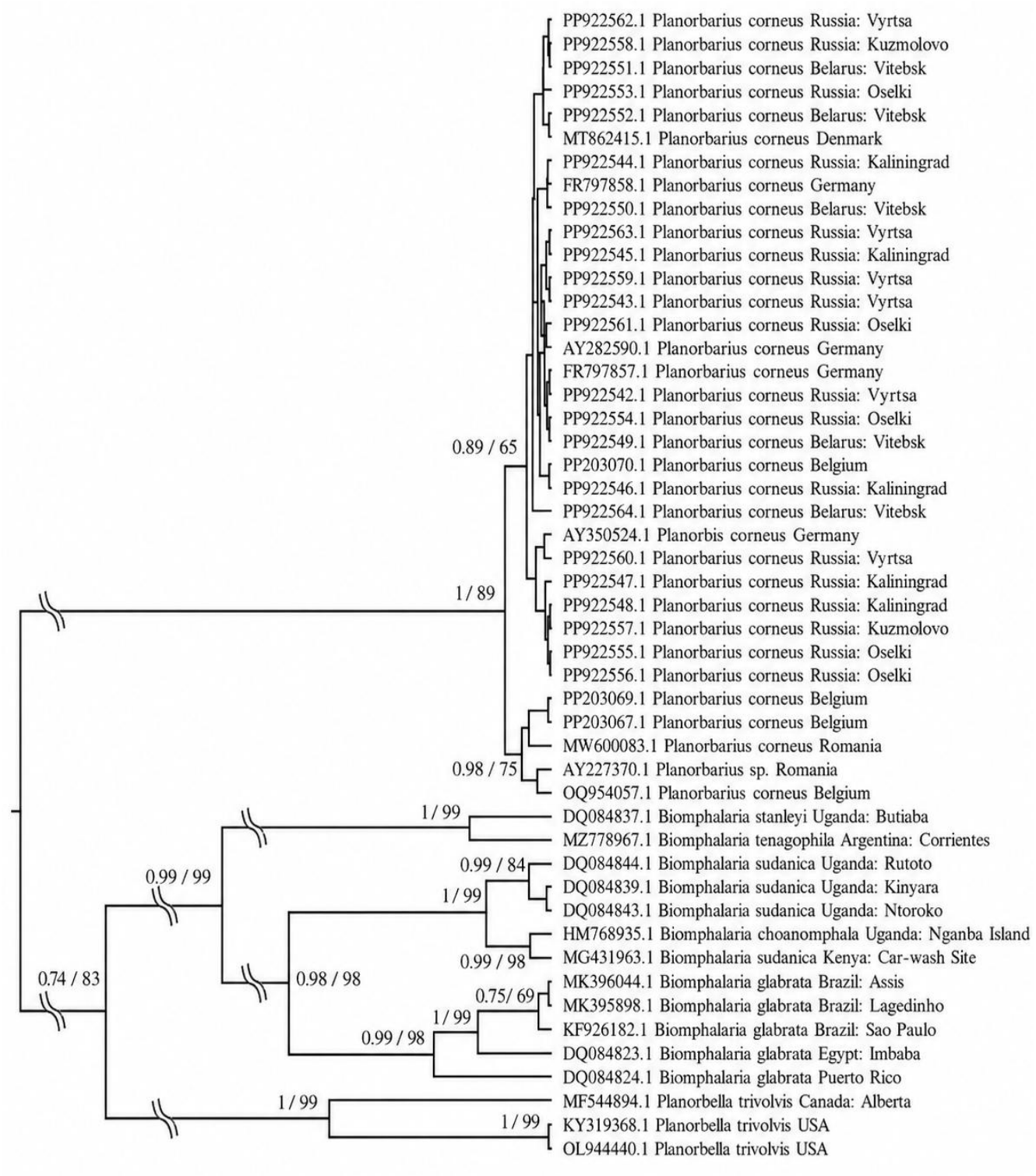


Рисунок 11. Байесовская филогенетическая реконструкция моллюсков сем. Planorbidae на основе нуклеотидных последовательностей участка гена *cox1* (607 п.н.). Дерево, полученное методом максимального правдоподобия, имело такую же топологию. Указаны значения апостериорных вероятностей для BA и бутстрепные поддержки для ML для 1000 реплик. Обозначения популяций моллюсков *Planorbarius corneus* представлены в таблице 13. Обозначены номера нуклеотидных последовательностей в GenBank.

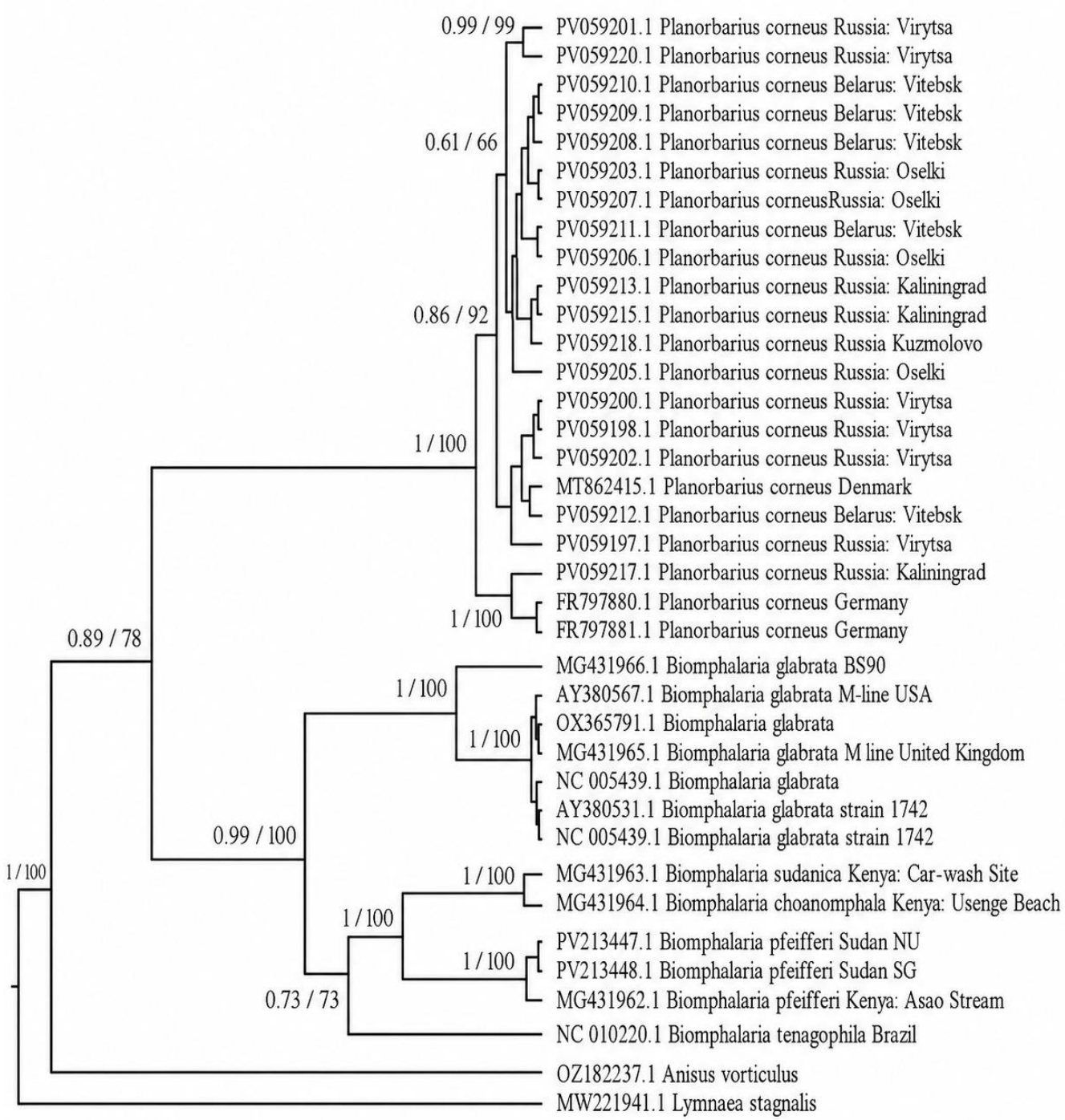


Рисунок 12. Байесовская филогенетическая реконструкция моллюсков сем. Planorbidae на основе нуклеотидных последовательностей участка гена *cytB* (505 п.н.). Дерево, полученное методом максимального правдоподобия, имело такую же топологию. Указаны значения апостериорных вероятностей для BA и бутстрепные поддержки для ML для 1000 реплик. Обозначены номера нуклеотидных последовательностей в GenBank. Обозначения популяций моллюсков *Planorbarius corneus* представлены в таблице 14.

Обсуждение к разделу III.1.1

Моллюски *Planorbarius corneus* (сем. Planorbidae) широко распространены на территории Европы, Западной Сибири до устья Оби (рисунок 13). Встречаются в крупных стоячих и проточных водоёмах (Цалолихин, 2004; Винарский, Кантор, 2016).

Рисунок 13. Ареал моллюска *Planorbarius corneus*. Карта с сайта iNaturalist (https://www.inaturalist.org).

Роговые катушки служат модельными объектами для многочисленных экологических, физиологических и паразитологических исследований. Вид *P. corneus* наряду с видами рода *Biomphalaria* стал одним из первых объектов для изучения морфологии, функциональной активности гемоцитов (Ottaviani, 1983; Ottaviani, Montagnani, 1989) и защитных реакций пульмонат (Ottaviani et al., 1993). Моллюск является промежуточным хозяином для большого числа видов трематод (Faltynkova et al., 2008; Brown et al., 2011), в том числе для *Bilharziella polonica*, которая может вызывать церкариозный дерматит у человека (Zbikowska, Marszewska, 2018).

Основными морфологическими критериями для определения видов сем. Planorbidae являются конхологические и анатомические признаки: размер и архитектура раковины, характер её закрученности, строение репродуктивной системы и радулы (Жадин, 1952; Gloer, 2002). Роговые катушки демонстрируют значительную изменчивость морфологических признаков. В связи с этим ряд авторов предлагает рассматривать их не как единый вид, а как надвидовой комплекс, включающий от пяти до восьми видов (Стадниченко, 1990; Максимова, 1995; Старобогатов и др., 2004). При этом границы между выделяемыми видами зачастую сложно

определить. В традиционной классификации *P. corneus* рассматриваются как единый полиморфный вид (Жадин, 1952; Gloer, 2002).

Использованные в исследовании моллюски из природных водоёмов также проявляют значительный морфологический полиморфизм, поэтому было выполнено кариотипирование и генотипирование роговых катушек из всех модельных водоёмов. В результате проведенного кариотипирования нами не было обнаружено различий в хромосомных наборах моллюсков *P. corneus* из разных популяций. Полиплоидность клеток гепатопанкреаса может быть связана с его участием в процессах пищеварения, а также с процессами пролиферации клеток. Ранее полиплоидные клетки были описаны в слюнных железах *P. corneus* (Зюмченко, 2002).

Выполненное ранее кариотипирование моллюсков *P. corneus* из популяций на территории Ленинградской, Калининградской областей России (Васильева, 2010) и нескольких областей Украины (Гарбар, Гарбар, 2007), также не позволило выявить достоверных различий между идиограммами моллюсков из разных популяций, в том числе, для особей, различающихся по морфологическим признакам. Во всех работах описан кариотип роговых катушек с диплоидным набором из 36 хромосом. При этом полученная нами хромосомная формула (2n=18m+18sm=36) совпадает с представленной ранее в исследовании Боттке (Bottke 1982), но расходится с описанной Гарбар (2n=30m+6sm) (Гарбар, Гарбар, 2007). Возможно, различия в хромосомных формулах связаны с особенностями методик приготовления препаратов.

Для моллюсков *P. corneus* из разных популяций на территории Украины также был выполнен анализ структурных белков и аллозимных маркеров, который не подтвердил обособленность роговых катушек «предполагаемых видов» (Межжерин и др., 2005).

По всем использованным генетическим маркерам (рДНК, *cox1*, *cytB*) вариабельность *P. corneus* не превышает пределов внутривидовой изменчивости (таблица 11, рисунки 8, 11, 12).

По данным RAPD-анализа средний коэффициент подобия по Дайсу между моллюсками *P. corneus* из разных точек сбора составляет 0.78 (Прохорова и др., 2014). Эти значения близки к полученным для видов рода *Biomphalaria* с применением тех же наборов случайных праймеров. Между моллюсками *B. arabica* из разных популяций средний коэффициент подобия по Дайсу составляет 0.89 (Al-Quraishy, 2014), между особями *B. glabrata* из разных точек сбора – от 0.43 до 0.74, из одной популяции – 0.83 (Vidigal et al., 1994; Carvalho et al., 2001), между моллюсками *B. tenagophila* из линий с разной восприимчивостью к заражению трематодами *Schistosoma mansoni* – 0.78 (Abdel-Hamid et al., 1999). Таким образом, значения генотипической вариабельности роговых катушек из исследованных популяций находятся в пределах внутривидовых.

Таким образом, данные молекулярно-генетического анализа, кариологических и белковых исследований в пределах исследованных популяций не подтверждают разделения вида *P. corneus* на несколько видов. Это позволяет использовать моллюсков из исследуемых популяций в качестве модельных объектов для анализа иммунных реакций и сравнения иммунных реакций разные факторы иммунизации.

III.1.2. Моллюски *Planorbis planorbis*

Характерные особенности строения раковины окаймлённой катушки позволяют точно определять представителей вида на основе конхологических признаков. В пределах исследуемого ареала не встречается моллюсков, которые морфологически схожи с *P. planorbis.* Однако целью подтверждения принадлежности к единому виду использованных в работе особей, а также для разработки дополнительного маркера для видовой идентификации было выполнено генотипирование моллюсков из основных точек сбора.

Видовая идентификация моллюсков *P. planorbis* по морфологическим признакам. Раковина твердостенная, роговая. Цвет раковины варьирует в зависимости от условий обитания моллюска от темного, практически черного, тёмно-коричневого, бурого до серого, светло-коричневого и полупрозрачного у моллюсков, выращенных в лабораторных условиях. Поверхность раковины косоисчерченная, матовая или блестящая. Раковина дисковидно завитая в одной плоскости в виде спирального шнура, правозакрученная, мало инволютная, оборотов 5–7 (рисунок 14). Их ширина возрастает медленно и равномерно. С верхней стороны раковины обороты немного выпуклые, снизу более плоские. Шов глубокий. Для раковины характерно наличие нитевидного киля, проходящего по периферии последнего оборота и смещенного к левой стороне. Верхушка раковины погруженная. На поверхности раковины выражена осевая исчерченность, часто заметны линии нарастания. Устье небольшое, косоовальное, слабо вырезанное стенкой предпоследнего оборота. Высота устья меньше его ширины (таблица 15). Край устья прямой, острый.

Тело окаймленной катушки тёмно-серого, часто почти чёрного цвета. Щупальца нитевидные темно-бурые или почти чёрные. У основания щупалец с внутренней стороны на небольших бугорках расположены глаза (рисунок 15). На вентральной поверхности головы расположено ротовое отверстие, которое ритмично сокращается при питании моллюска. Над ротовым отверстием, прикрывая его, располагаются две губы (околоротовые лопасти) (рисунок 15А). Нога преимущественно светло-серая, иногда беловато-серая. Нога по длине приблизительно равна половине ширины раковины, подошва имеет вытянутую овальную форму, слегка суженную к заднему концу.

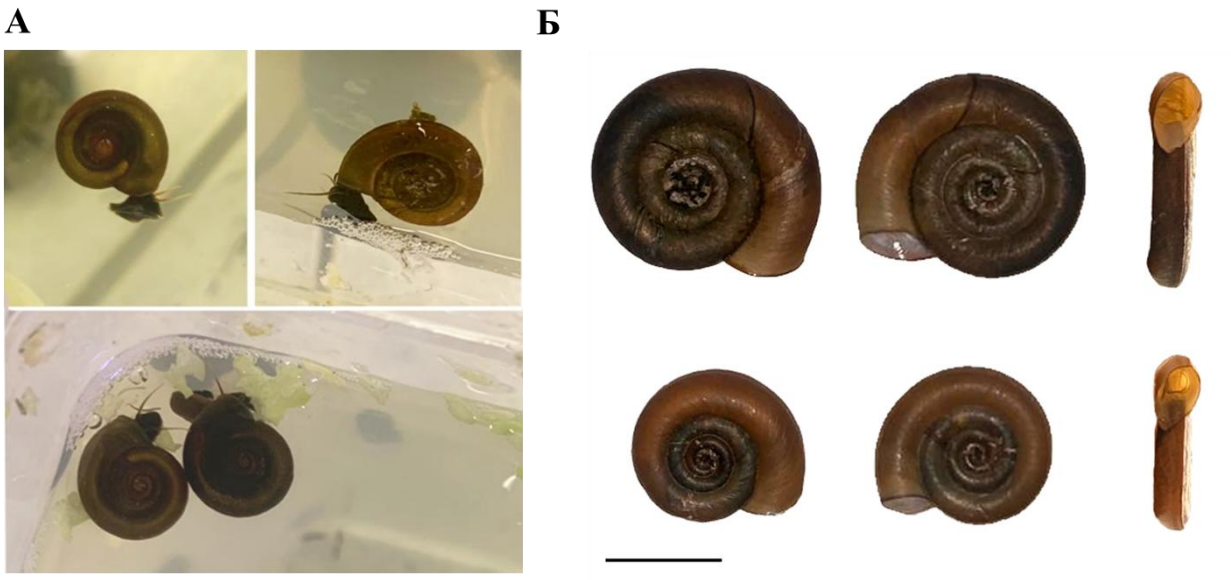


Рисунок 14. Моллюски *Planorbis planorbis.* А – внешний вид; Б – раковины моллюсков. Масштабная линейка – 10 мм.

Таблица 15. Морфометрические параметры раковины моллюсков *Planorbis planorbis* (n=174)

Параметры (мм) / ссылки	Диаметр раковины	Высота раковины	Высота устья	Ширина устья	Высота/ ширина раковины
Результаты измерений					
Me (K1, K3)	10 (9.30, 13.20)	2.15 (2.12, 2.18)	3.15 (3.11, 3.18)	4.15 (4.11, 4.18)	0.13–0.21
Минимальное значение	5.40	1.40	2.10	4.10	
Максимальное значение	15	2.38	3.50	4.50	
Литературные данные					
Боголюбов, Кравченко, 2018	19	3.7	—	—	—
Жадин, 1952	12–20	до 4	—	—	
Хохуткин, Винарский, 2013	—	—	—	—	0.2
Дягтяренко, Анистратенко, 2011	до 15	до 4	—	—	—
Солдатенко, 1997	12.71±0.62	3.1±0.12	3.15±0.13	4.32±0.17	0.25±0.01

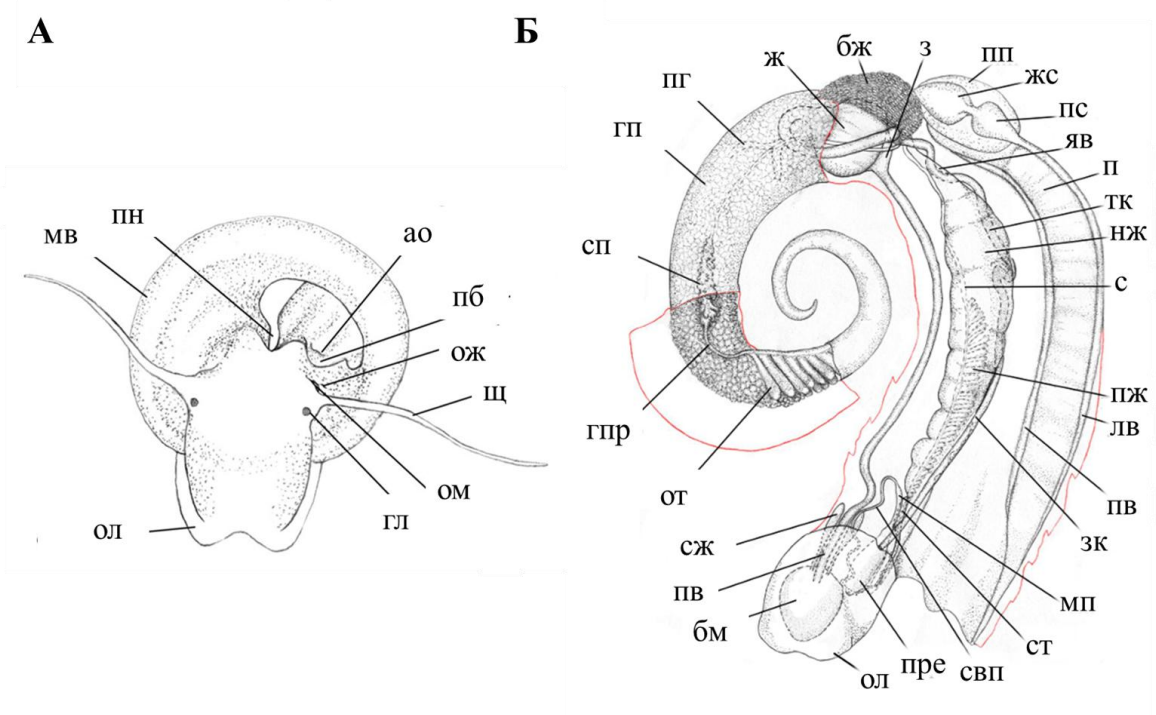


Рисунок 15. Строение моллюсков *Planorbis planorbis.* А – схема строения головы; Б – общая морфология. Условные обозначения (здесь и далее): ао – анальное отверстие; бж – белковая железа; бм – буккальная масса; гл – глаз; гп – гепатопанкреас; гпр – гермафродитный проток; ж – желудок; жс – желудочек сердца; з – зоб; зк – задняя кишка; к – карреофур; лв – легочная вена; м – матка; мв – мантийный воротничок; мп – мешок пениса; нж – нидаментальная железа; ож – отверстие женской половой системы; ол – околоротовая лопасть; от – овотестис; ом – отверстие мужской половой системы; п – почка; пв – почечная вена; пб – псевдобранх; пг – проток гепатопанкреаса; пж – предстательная железа; пн – пневмостом; пп – перикардиальная полость; пре – препутиум; пс – предсердие; с – семевод; свп – семявыносящий проток; сж – слюнная железа; сп – семенной пузырек; ст – сперматека; тк – тонкая кишка; щ – щупальца; яв – яйцевод.

Одонтофор занимает значительный объём буккальной полости (рисунок 16). В поперечном сечении он имеет подковообразную форму. В направлении от радулы к противоположной стенке одонтофор пересекают мышечные волокна. На поверхности одонтофора расположена длинная радулярная лента. Постериально радула, углубляясь, делает изгиб, который обхватывает лежащий позади неё радулярный коллостиль.

Половая система *P. planorbis* гермафродитная (рисунок 17). Гермафродитная железа расположена в верхних оборотах внутренностного мешка частично погружена в доли гепатопанкреаса. Состоит из двух рядов дивертикулов. От овотестиса отходит гермафродитный проток, в который впадают протоки от всех ацинусов железы. Примерно на середине протока располагается семенной пузырек. Проток проходит над пищеводом и под средней кишкой и впадет в карреофур, который имеет шарообразную форму (рисунок 15Б). Белковая железа имеет полусферическую форму и состоит из множества мелких трубкообразных ацуинусов. Её проток также открывается в карреофур. Из карреофура отходят семепровод и яйцевод. Внешний

диаметр яйцевода увеличивается по мере продвижения к нидаментальной железе. Железа переходит в матку, матка переходит во влагалище.

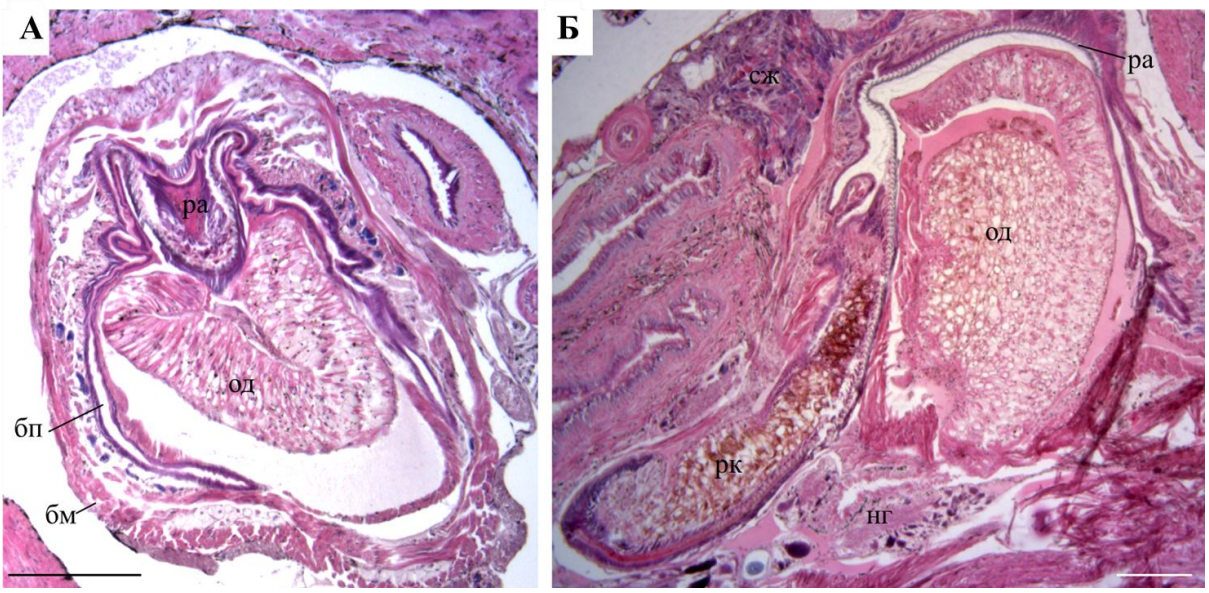


Рисунок 16. Продольный (А) и поперечный (Б) срезы через буккальную массу моллюска *Planorbis planorbis.* Условные обозначения: бм – буккальная масса; бп – буккальная полость; од – одонтофор; ра – радула; рк – радулярный коллостиль; нг – нервный ганглий; сж – слюнная железа. Масштабная линейка – 100 мкм.

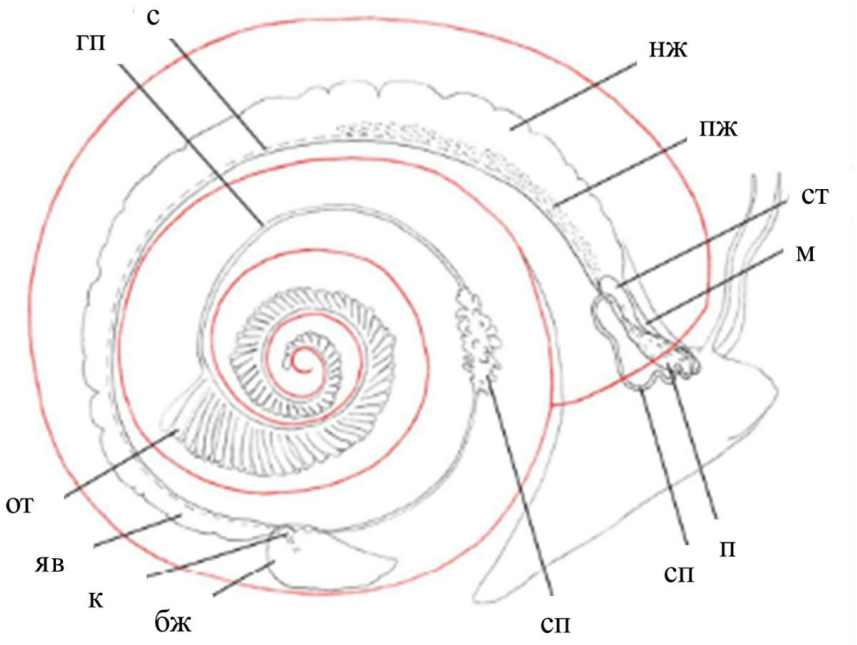


Рисунок 17. Общая схема строения половой системы моллюсков *Planorbis planorbis*. Условные обозначения: см. рисунок 15.

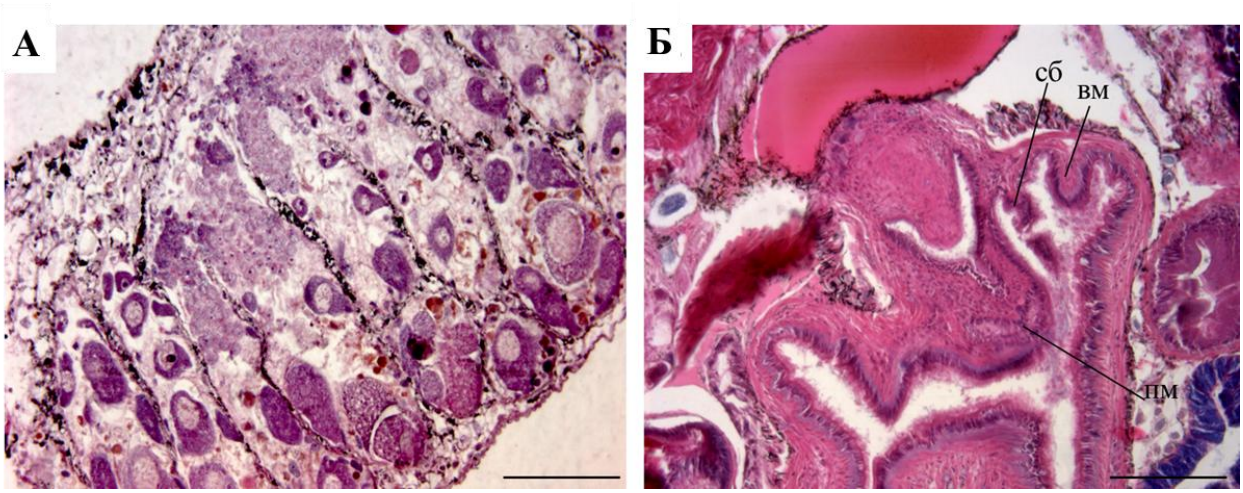


Рисунок 18. Гистологические срезы через участки половой системы *Planorbis planorbis*. А – дивертикулы овотестиса; Б – продольный срез через основание препутиума. Условные обозначения: вм – велюм; сб – саркобеллум; пм – мускульная папилла. Масштабная линейка – 100 мкм.

Мужская половая система представлена семепроводом, в который примерно на его середине открывается множество ацинусов предстательной железы. Простата имеет лентообразную форму. На уровне сперматеки предстательная железа заканчивается, семепровод переходит в семявыносящий проток, имеющий толстую мышечную стенку. Проток, достигая передней мышечной стенки тела, делает поворот и возвращается, впадая в мешок пениса. Мешок пениса, диаметр которого превышает диаметр семявыносящего протока, оканчивается выраженной мышечной папиллой. Вокруг папиллы располагаются две кольцевые складки – саркобеллум и велюм (рисунок 18). Своим дистальным концом мешок пениса впадает в препутиум. Для препутиума характерно наличие двух мышечных складок, проходящих вдоль по его стенке – пилястров. Препутиум открывается кнаружи от левого щупальца, рядом с ним расположено и отверстие протока женской части половой системы.

Видовая идентификация моллюсков *P. planorbis* с использованием молекулярно-генетических маркеров. Для видовой идентификации был использован участок рДНК, включающий гены 5.8S–ITS2–28S. Характеристики полученного участка рДНК моллюска из пос. Вырица, длиной 3792 п.н. (GenBank: PP851809.1) представлены в таблице 16.

Полученная нуклеотидная последовательность на 99.99% идентична представленным в GenBank образцам *P. planorbis* с территории Украины, Египта и Германии. Участки 28S и 5.8S всех генотипированных особей полностью идентичны. Наиболее вариабельным участком оказался регион ITS2 (таблица 16). Однако по этому фрагменту последовательности также идентичны на 99.78–99.99%.

Таблица 16. Генетическое разнообразие моллюсков *Planorbis planorbis* на основе генотипирования по участкам рДНК

Ген	Длина секвенированного участка (п.н.)	N	Нуклеотидный состав (%)				H	P	k	S
			T	C	A	G				
5.8 S	128	2	23.0	31.3	9.4	36.3	2	0.0015	1	2
ITS2	833–833	9	21.1	28.5	17.7	32.7	2	0.0048	4	7
28S	2708	3	19.9	25.3	22.8	32.1	1	0	0	0

Условные обозначения: N – количество образцов (последовательностей); H – число гаплотипов; P – нуклеотидное разнообразие (на сайт); k – среднее число нуклеотидных различий на последовательность; S – число вариабельных полиморфных сайтов.

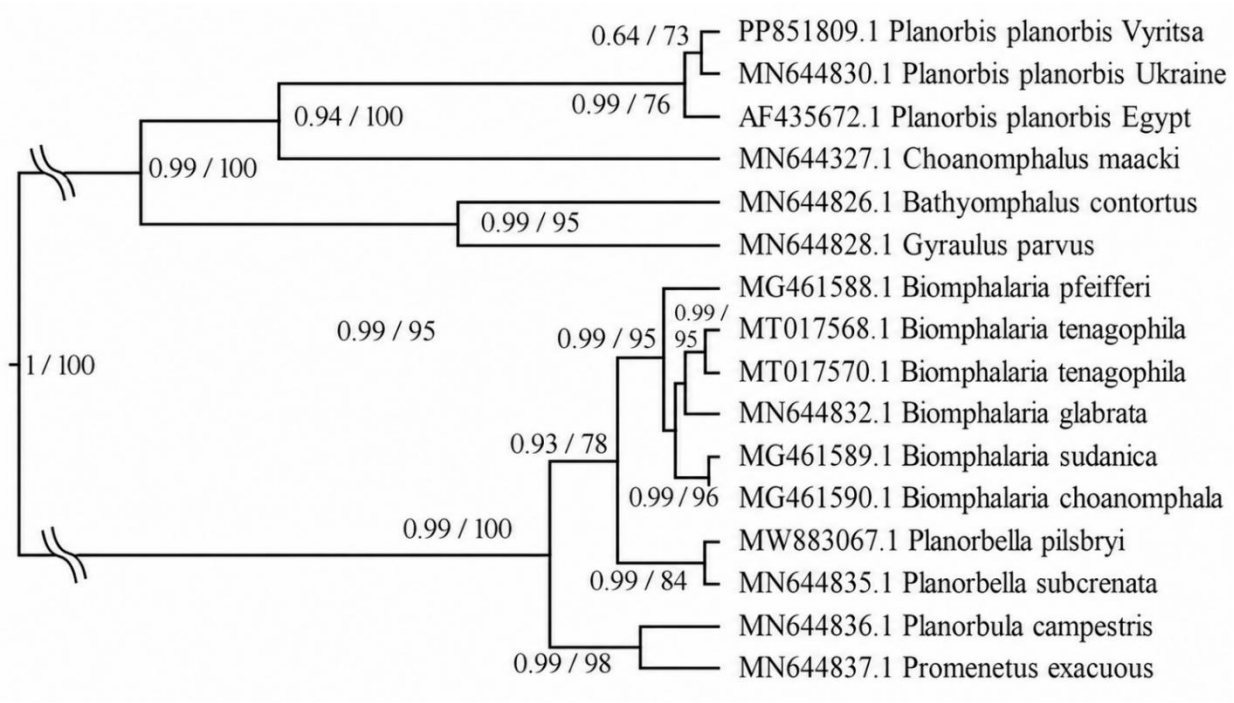


Рисунок 19. Байесовская филогенетическая реконструкция моллюсков сем. Planorbidae на основе нуклеотидных последовательностей участка рДНК, включающего частичные последовательности ITS2 и 28S (1456 п.н.). Дерево, полученное методом максимального правдоподобия, имело такую же топологию. Указаны значения апостериорных вероятностей для BA и бутстрепные поддержки для ML для 1000 реплик. Обозначены номера нуклеотидных последовательностей в GenBank.

В дальнейшем было осуществлено выборочное генотипирование моллюсков *P. planorbis* из основных водоёмов, в которых производился забор проб (n=7) по участку ITS2 рДНК. Все полученные последовательности полностью идентичны между собой и с последовательностью PP851809.1. Таким образом, окаймленная катушка проявляет консервативность по исследованному участку генома. В то же время, использование участка рДНК для

филогенетической реконструкции позволяет четко дифференцировать образцы *P. planorbis* (рисунок 19).

Обсуждение к разделу III.1.2

Моллюски *Planorbis planorbis* (сем. Planorbidae) распространены в Европе, Северной Африке, Южной части Сибири и средней Азии (Glöer, 2002) (рисунок 20). Обитают в пресных, преимущественно стоячих и медленно текущих водоёмах (Жадин, 1952).

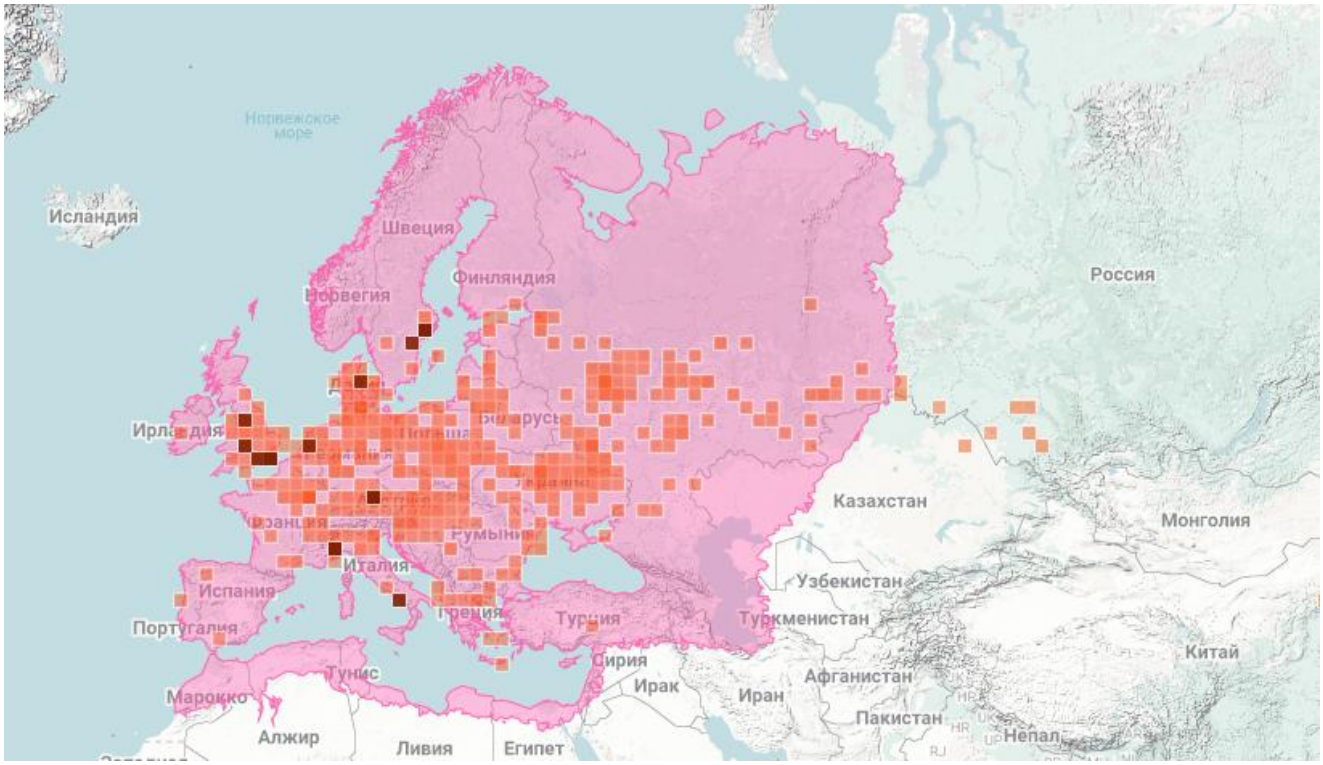


Рисунок 20. Ареал моллюска *Planorbis planorbis*. Карта с сайта iNaturalist (https://www.inaturalist.org).

Данный вид используется в качестве модели в исследованиях морфологии, физиологии, экологических особенностей моллюсков сем. Planorbidae (Matzke, 1959; Алексеев, Антипин, 1976; Costil, Daguzan, 1995). Моллюски *P. planorbis* являются промежуточными хозяевами для примерно 40 видов трематод, лидируя по этому показателю среди планорбид (Стадниченко, 1990; Faltynkova et al., 2008; Faltynkova et al., 2016). В связи с этим вид является перспективной моделью не только для паразитологических, но и для сравнительно-иммунологических исследований.

Проведённая видовая идентификация с использованием протяжённого участка рДНК подтвердила принадлежность использованных в работе окаймлённых катушек к виду *P. planorbis*. Полученные нуклеотидные последовательности моллюсков из модельных водоёмов полностью идентичны между собой и более, чем на 99% совпадают с представленными в GenBank образцами. Таким образом, по исследованным маркерам вид проявляет небольшую

генетическую вариабельность, что делает его удобным модельным объектом для изучения защитных реакций у лёгочных моллюсков.

III.1.3. Моллюски *Succinea putris*

Широта ареала и разнообразие занимаемых биотопов обуславливают большой морфологический полиморфизм моллюсков *Succinea putris* (Шилейко, Лихарев, 1986). В то же время, на части ареала вид встречается одновременно с другими видами янтарок – *S. oblonga*, *Oxyloma elegans*, *O. sarsi*, *O. dunkeri*. Видовая идентификация моллюсков сем. Succineidae по конхологическим критериям не всегда возможна и преимущественно она осуществляется по анатомическим признакам (Сачкова, Левина, 2005). Это затрудняет использование янтарок для изучения иммунных реакций. Поэтому была проведена работа по изучению морфологической и генетической однородности моллюсков *Succinea putris* из разных популяций, используемых в исследовании.

Видовая идентификация моллюсков *S. putris* по морфологическим признакам. Раковина светло-жёлтая (янтарная), яйцевидной формы, правозакрученная, турбоспиральная (рисунок 21). Стенки раковины тонкие, полупрозрачные, хрупкие. Раковина имеет 2.5–5 оборотов. Последний оборот – самый объёмный. Шов между оборотами не глубокий и очень косой. Эмбриональные обороты покрыты многочисленными углублениями, дефинитивные – едва заметными бороздками, которые направлены перпендикулярно колумелле. Устье большое, овальной формы, заострённое в области колумеллы (сверху). Колумеллярной пластинки нет. Размеры раковины значительно варьируют (таблица 17).

Тело массивное, при полном сокращении едва помещается в раковину. Покровы тела имеют разную интенсивность пигментации – от светло-жёлтой до темно-коричневой и почти черной (рисунок 21). Но пустая раковина имеет светло-янтарную окраску. На голове расположены две пары циллиндрических щупалец. Нижняя пара щупалец, выполняющая осязательную функцию, короче. Пара более длинных щупалец представляет собой омматофоры, на которых расположены глаза.

За правым омматофором лежат отверстия гермафродитной половой системы. Они открываются в общем половом атриуме, но обособлены друг от друга. На нижней стороне головы располагается ротовое отверстие, окружённое парой губ. Голова отделена от ноги бороздой, расположенной под ротовым отверстием. Подошва ноги моллюска разделена на три поля продольными бороздками.

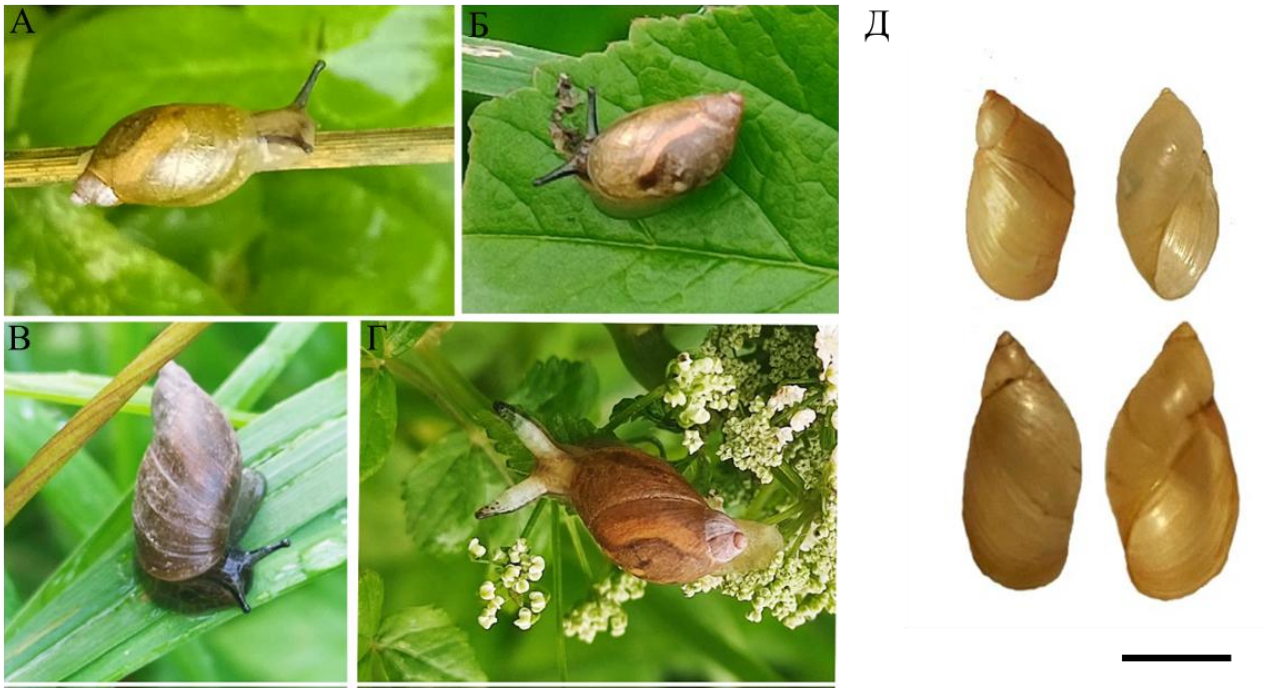


Рисунок 21. Моллюски *Succinea putris.* А–Г – внешний вид, вариации окраски особей из одной популяции; Г – моллюск, заражённый трематодами *Leucochloridium paradoxum;* Д – раковины моллюсков. Масштабная линейка – 5 мм.

Таблица 17. Морфометрические параметры раковины моллюсков *Succinea putris* (n=130)

Параметры (мм) / ссылки	Высота раковины	Ширина раковины	Высота устья	Ширина устья	Высота устья/ высота раковины
Результаты измерений					
Me (K1, K3)	12.50 (11.51; 13.55)	6.60 (6.20; 7.11)	8.70 (8.25; 9.70)	5.90 (5.60; 6.30)	0.63–0.76
Минимальное значение	8.71	4.40	5.10	3.81	
Максимальное значение	16.30	8.00	11.21	7.20	
Литературные данные					
Лихарев, Раммельмейер, 1952; Сачкова, Левина, 2005	16–22	8–11	—	—	—
Балашов, 2016	10–20	6–12	—	—	2/3

Челюсть моллюсков представлена прямоугольной пластинкой, на которой расположен выступ с режущим краем. Последний имеет слегка выгнутую форму и несёт три выступа в центральной части, а также две лопасти по краям (рисунок 22А). Сложный радулярный аппарат

представлен радулой, коллостилем и одонтофором. Радулярная формула *S. putris*: 22 : 12 : 1 : 12 : 22 (n=5). Центральный зуб каждого поперечного ряда несёт зубцы, из которых средний – наибольший по длине (рисунок 22В). Эктокон центральных зубов небольшой, мезокон – в примерно два раза крупнее эктотона. Эндокон слабо выражен и имеет вид небольшого выступ на медиальной стороне зуба. Маргинальные зубы на мете эктотона несут мелкие зубчики (рисунок 22Б). По направлению к латеральному краю радулы дифференцировка на эндо-, мезо- и эктокон становится малозаметной.

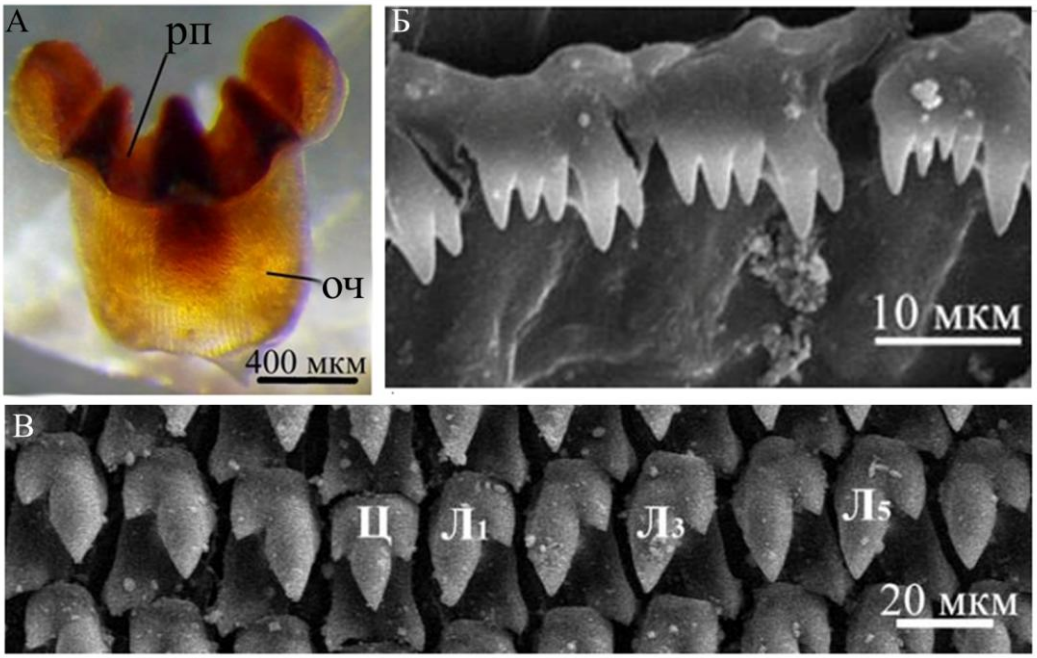


Рисунок 22. Челюсть и радула моллюска *Succinea putris.* А – челюсть; Б – маргинальные зубы радулы; В – центральный участок радулярной ленты. Условные обозначения: рп – режущая пластинка челюсти; оч – основание челюсти; Ц – центральный зуб радулы; $Л_1$–$Л_3$ – латеральные зубы радулы (по: Prokhorova et al., 2020).

Гермафродитная железа, её проток и семенной пузырёк имеют типичное для пульмонат строение и располагаются в верхних оборотах висцерального мешка (рисунок 23). Гермафродитный проток впадает в карреофур, с которым соединены два семеприёмника, лежащие в углублении массивной белковой железы. Белковая железа имеет вытянутую форму, слегка заостренную на переднем конце. Множество мелких протоков железы соединяются в один крупный, который впадает в карреофур. Продолжается половой тракт семеяйцеводом. Последний в области округлой простаты разделяется на яйцевод и семепровод. Яйцевод имеет складчатую структуру и переходит в короткое влагалище в месте впадения протока протока от шарообразной, достаточно крупной сперматеки. Влагалище открывается в половой атриум.

Пенис покрыт мышечным чехлом и подразделяется на передний (циллиндрический), задний (конический) и интеркалярный (шаровидный) отделы. Внутренний эпителий пениса

образует многочисленные бороздки и папиллы, хаотично разбросанные по поверхности. К пениальному чехлу крепится ретрактор, он охватывает семепровод в дистальной его части. На границе переднего и заднего отделов пениса есть кольцевое утолщение, которое у других видов янтарок отсутствует (Сачкова, Левина, 2005).

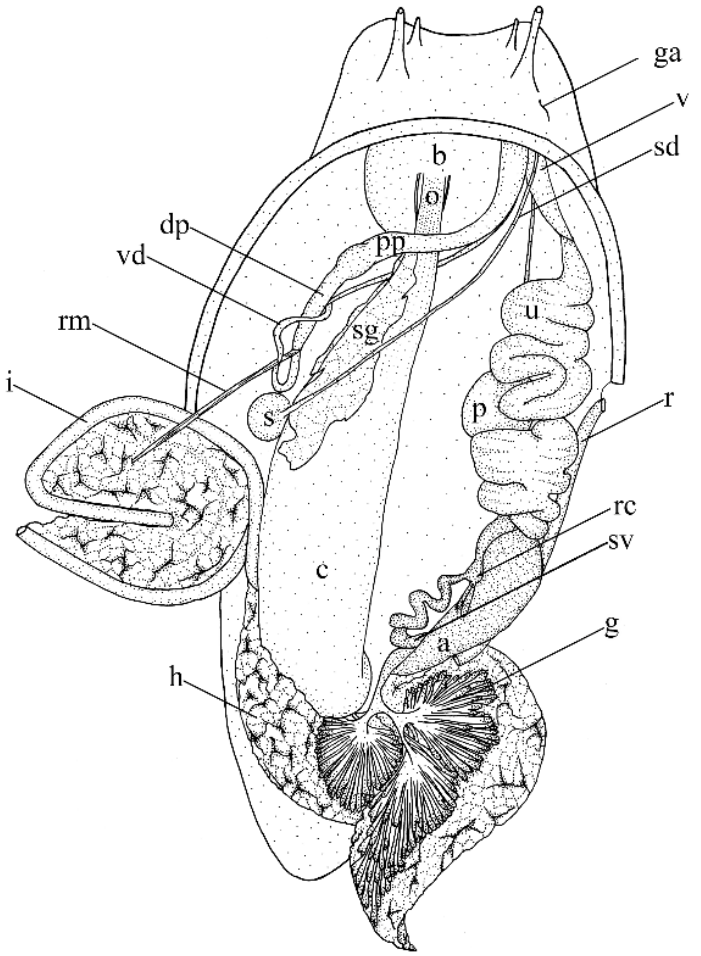


Рисунок 23. Общая морфология моллюска *Succinea putris*. Условные обозначения: a – белковая железа; b – буккальная масса; c – зоб; dp – дистальная часть пениса; g – гонада; h – гепатопанкреас; i – кишечник; o – пищевод; pg – предстательная железа; pp – проксимальная часть пениса; r – прямая кишка; rc – комплекс семяприёмника; rm – ретрактор; s – сперматека; sg – слюнная железа; sv – семенной пузырёк; u – матка; v – влагалище; vd – семявыносящий проток (по: Prokhorova et al., 2020).

Видовая идентификация моллюсков *S. putris* с использованием молекулярно-генетических маркеров. Были генотипированы моллюски, собранные на территории Калининградской, Ленинградской, Кировской, Ярославской областей России и Витебской и Гомельской областей Белоруссии. Номера полученных нуклеотидных последовательностей участка рДНК (ITS1–5.8S–ITS2) и участков митохондриальных генов *cox1* и *cytB* в GenBank

представлены в приложении 2. Характеристики исследованных участков генома представлены в таблице 18.

Таблица 18. Генетическое разнообразие моллюсков *Succinea putris* на основе генотипирования по последовательностям рДНК и митохондриальных генов *cox1* и *cytB* (Prokhorova et al., 2020)

Ген	Длина секвенированного участка (п.н.)	N	Нуклеотидный состав (%)				H	P	k	S
			T	C	A	G				
ITS1	529	18	20.3	34.9	13.1	31.7	1	0	0	0
5.8S	159	18	18.9	28.9	21.4	30.8	1	0	0	0
ITS2	710	18	19.8	35.0	14.7	30.4	1	0	0	0
cox1	1040	18	43.4	14.1	25.7	16.7	18	0.05	3.257	13
cytB	455	18	45.7	13.5	26.5	14.3	11	0.002	1.042	12

Условные обозначения: N – количество образцов (последовательностей); H – число гаплотипов; P – нуклеотидное разнообразие (на сайт); k – среднее число нуклеотидных различий на последовательность; S – число вариабельных сайтов.

На участке ITS1–5.8S–ITS2 рДНК не выявлено внутривидовых полиморфизмов среди исследованных моллюсков. Идентичность нуклеотидных последовательностей моллюсков из разных популяций составила 100%, что однозначно указывает на принадлежность образцов к одному виду.

На филогенетической реконструкции, выполненной по участку рДНК, все полученные последовательности моллюсков *S. putris* объединены в одну кладу (рисунок 24). Использованные в качестве внешних групп представители родов *Biomphalaria, Planorbarius* и *Bulinus* также демонстрируют высокую внутривидовую консервативность данного участка генома.

Имеется только один образец другого вида рода *Succinea*, который полностью генотипирован по исследуемому участку – моллюск *S. striata из* США (GenBank: AY841295.1) (Wade et al., 2006). На филогенетической реконструкции он образует единую кладу с образцами *S. putris.* Идентичность нуклеотидных последовательностей *S. putris* и *S. striata* составляет 89.5%. При этом наибольшие различия касаются ITS2, для которого идентичность между видами составила 83.45%.

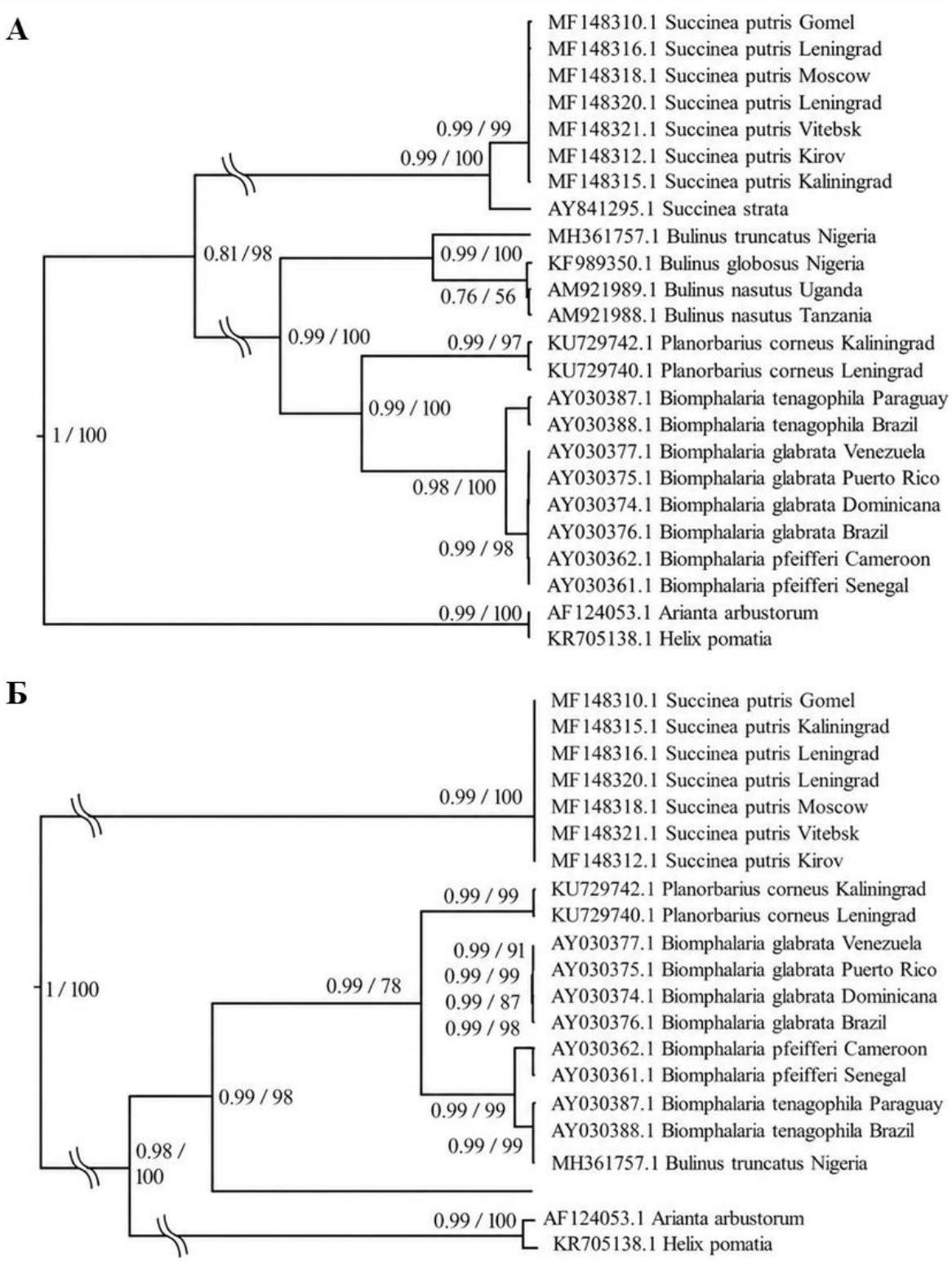


Рисунок 24. Байесовские филогенетические реконструкции на основе нуклеотидных последовательностей рДНК моллюсков рода *Succinea*. А – реконструкция по участку, включающему ITS1–5.8S–ITS2 (1390 п.н.); Б – реконструкция по фрагменту ITS2 (428 п.н.). Деревья, полученные методом максимального правдоподобия, имели такую же топологию. Указаны значения апостериорных вероятностей для BA и бутстрепные поддержки для 1000 реплик для ML. Обозначены номера нуклеотидных последовательностей в GenBank. Обозначения популяций моллюсков *S. putris* представлены в таблице 19.

Выявленные межвидовые различия в нуклеотидных последовательностях ITS2 у моллюсков *S. putris* и *S. striata* были визуализированы на топологических схемах их вторичных структур. Первичные последовательности рРНК были преобразованы в предполагаемую вторичную структуру при температуре фолдинга 20°C, затем была выбрана структура, обладающая наибольшей отрицательной свободной энергией. Предсказанные вторичные структуры двух транскриптов ITS у *S. putris* и *S. striata* имеют похожую структуру, но, тем не менее, отличаются (рисунок 25). На схемах определяются четыре спиральные шпильки (I, II, III и IV), самая длинная из них – IV. Основные различия вторичных отмечены на стеблях шпилек I, II и III. При этом структуры имеют одинаковые нуклеотидные последовательности на окончаниях спиральных шпилек. Расхождения во вторичной структуре транскриптов ITS являются одним из признаков, по которым определяется дивергенция между видами разных таксонов (Schultz et al., 2005). Для рода *Succinea* применимость этого критерия подтвердилась в нашем исследовании. Особенности топологии транскрипта ITS2 могут служить дополнительным признаком для видовой идентификации моллюсков *S. putris*.

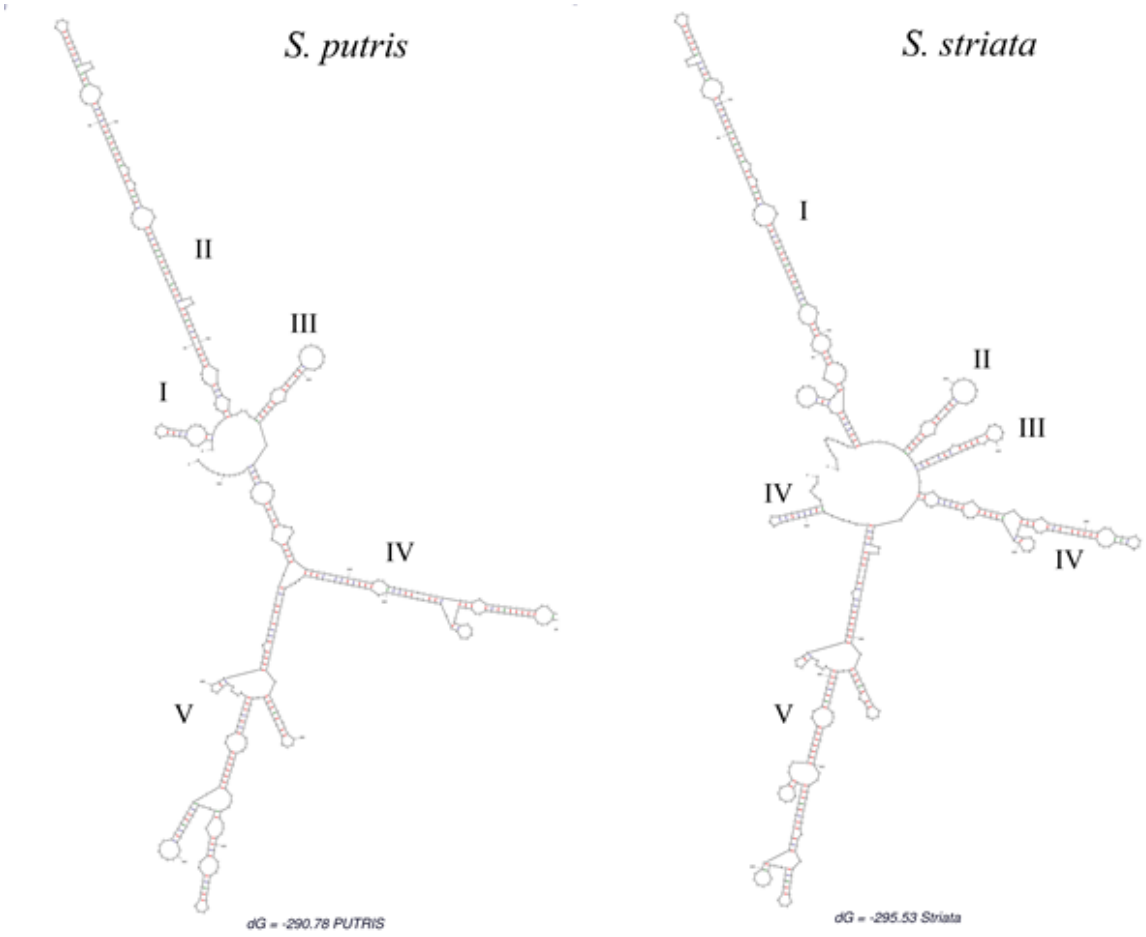


Рисунок 25. Топологические схемы вторичных структур транскриптов ITS2 моллюсков *Succinea striata* (545 п.н.) и *S. putris* (529 п.н.) Основные шпильки на вторичных структурах пронумерованы с 5’-конца (по: Prokhorova et al., 2020).

Таблица 19. Генетическое разнообразие по гену *cytB* моллюсков *Succinea putris* из разных географических популяций

Район сбора образцов	Обозначение популяции	Количество образцов	Гаплотипы	Hd	P
Россия, Ленинградская обл.	Leningrad / Rus_L	3	Hap_6, Hap_7	0.6670	0.0074
Россия, Московская обл.	Moskow / Rus_M	3	Hap_1, Hap_2, Hap_3	1	0.0059
Россия, Калининградская обл.	Kaliningrad / Rus_Kd	3	Hap_3, Hap_4, Hap_5	1	0.0074
Россия, Кировская обл.	Kirov / Rus_K	3	Hap_7	0	0
Белоруссия, Гомельская обл.	Gomel / Bel_G	3	Hap_8, Hap_9, Hap_10	1	0.0074
Белоруссия, Витебская обл.	Vitebsk / Bel_V	4	Hap_3, Hap_8	0.5000	0.0033
Франция	France / Fr	1	Hap_11	0	0

Условные обозначения: Hd – гаплотипическое разнообразие; P – нуклеотидное разнообразие.

Анализ митохондриальных маркеров *S. putris* выявил бóльшее генотипическое разнообразие. Среди исследованных моллюсков было обнаружено 10 гаплотипа гена *cytB* (таблица 19) и 9 гаплотипов гена *cox1* (таблица 20). Для построения гаплосетей были также использованы последовательности генов *cox1* и *cytB* янтарок из Франции и Канады (White et al., 2011; Telfer et al., 2015).

На гаплосети по участку гена *cytB* выделяется 11 гаплотипов, один из которых представлен образцом из Франции (рисунок 26). Полученные нами образцы формируют две основные группы гаплотипов. В одну группу входят улитки из Ленинградской и Калининградской областей, в другую объединились гаплотипы улиток из Калининградской, Ленинградской и Московской областей и Гомельской области Белорусии. Гаплотипы улиток из других регионов распределяются между группами. Различия между выявленными гаплотипами составляют 1–2 нуклеотидных замены. Среднее генетическое расстояние между ними составило 0.008. При этом среднее генетическое расстояние между ними и гаплотипом моллюска из Франции составило 0.053.

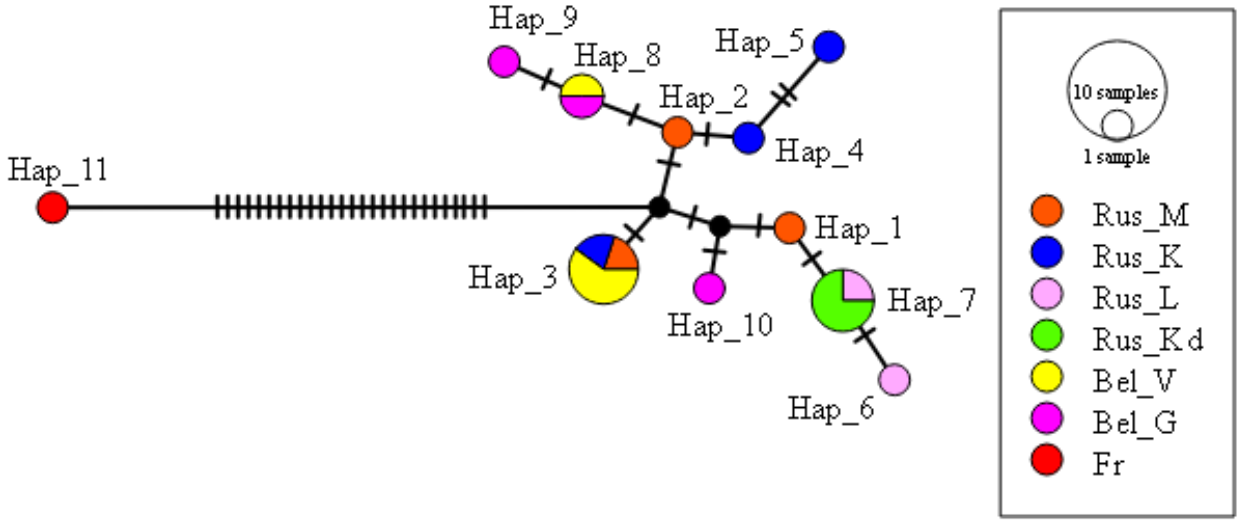


Рисунок 26. Разнообразие гаплотипов митохондриального гена *cytB* у моллюсков *Succinea putris.* Гаплосеть получена с использованием нуклеотидных последовательностей участка гена *cytB* длиной 452 п.н. Условные обозначения: размер кружочков пропорционален частоте встречаемости гаплотипа; штриховки показывают нуклеотидные замены; цветами обозначены разные популяции; чёрные сплошные кружки обозначают ненаблюдаемые гипотетические гаплотипы. Обозначения популяций указаны в таблице 19 (по: Prokhorova et al., 2020).

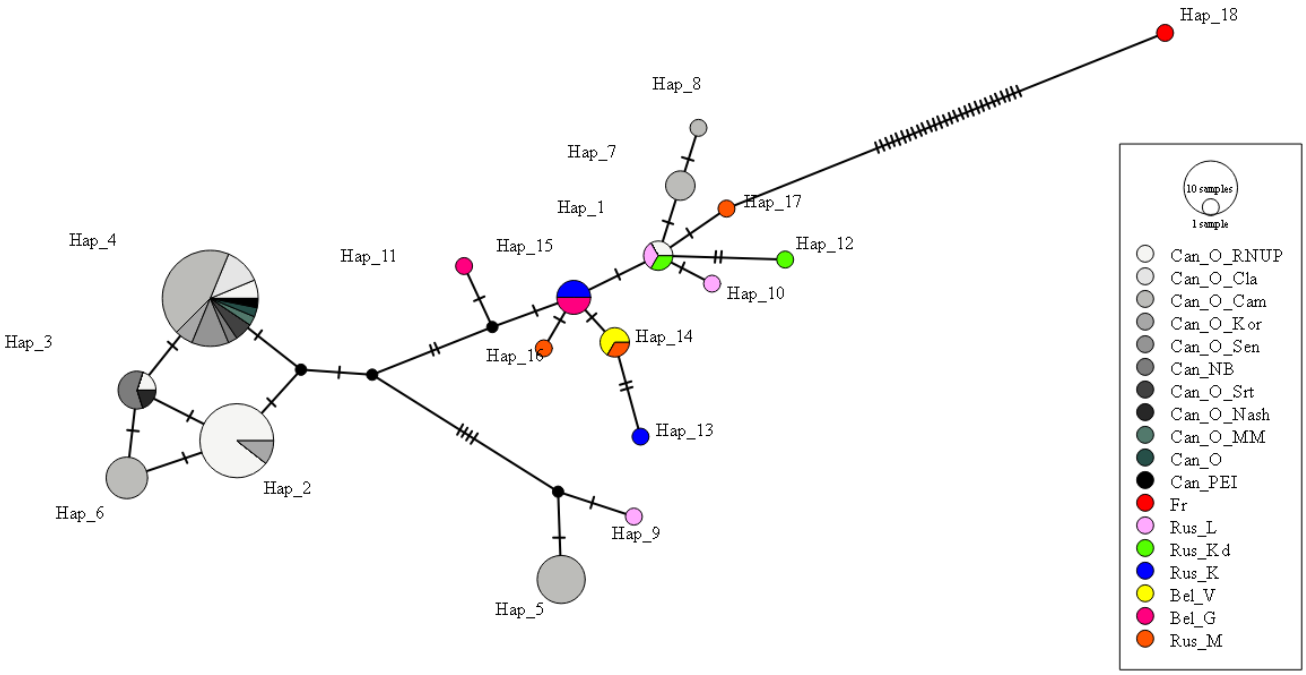


Рисунок 27. Разнообразие гаплотипов митохондриального гена *cox1* у моллюсков *Succinea putris.* Гаплосеть получена с использованием нуклеотидных последовательностей участка гена *cytB* длиной 565 п.н. Условные обозначения: см. рисунок 26. Обозначения популяций указаны в таблице 20 (по: Prokhorova et al., 2020).

Таблица 20. Генетическое разнообразие по гену *cox1* моллюсков *Succinea putris* из разных географических популяций

Район сбора образцов	Обозначение популяции	Количество образцов	Гаплотипы	Hd	P
Россия, Ленинградская обл.	Leningrad / Rus_L	3	Hap_2, Hap_6, Hap_7	1	0.0118
Россия, Московская обл.	Moskow / Rus_M	3	Hap_1, Hap_2	1	0.0047
Россия, Калининградская обл.	Kaliningrad / Rus_Kd	3	Hap_1, Hap_12	0.66700	0.0035
Россия, Кировская обл.	Kirov / Rus_K	3	Hap_11, Hap_13	0.6670	0.0354
Белоруссия, Гомельская обл.	Gomel / Bel_G	3	Hap_11, Hap_15	0.6670	0.0024
Белоруссия, Витебская обл.	Vitebsk / Bel_V	3	Hap_14	0	0.0000
Канада, Онтарио, Национальный городской парк Руж	Can_O_RNUP	23	Hap_1, Hap_2, Hap_3, Hap_4	0.4466	0.0031
Канада, Онтарио, Клейревилл	Can_O_Cla	4	Hap_4	0.0000	0.0000
Канада, Онтарио, Кембридж	Can_O_Cam	32	Hap_4, Hap_5, Hap_6, Hap_7, Hap_8	0.7238	0.0092
Канада, Онтарио, Кортрайт	Can_O_Kor)	4	Hap_2, Hap_4	0.6670	0.0024
Канада, Онтарио, Сенека	Can_O_Se	4	Hap_4	0	0
Канада, Нью-Брансуик	Can_NB	4	Hap_3	0.5000	0
Канада, Онтарио, Спидривертрейл	Can_O_Srt	2	Hap_4	0	0
Канада, Онтарио, Макмайкл	Can_O_M	1	Hap_4	0	0
Канада, Онтарио	Can_O	1	Hap_4	0	0
Канада, Остров Принца Эдуарда	Can_PE	1	Hap_4	0	0
Канада, Онтарио, Нэшвилл	Can_O_Nash	1	Hap_3	0	0
Франция	France	1	Hap_18	0	0

Таблица 21. Средние генетические дистанции, полученные на основе анализа нуклеотидных последовательностей моллюсков *Succinea putris*

Дистанция	Участок ДНК			
	ITS1	ITS2	*cytB*	*cox1*
Средняя внутривидовая	0	0	0.01285	
Средняя межпопуляционная (в исследованных популяциях/для всех проанализированных образцов)	0	0	0.0076 / 0.0236	0.0052 / 0.0340
Средняя межвидовая для рода *Succinea*	—	0.1108	—	0.177±0.01

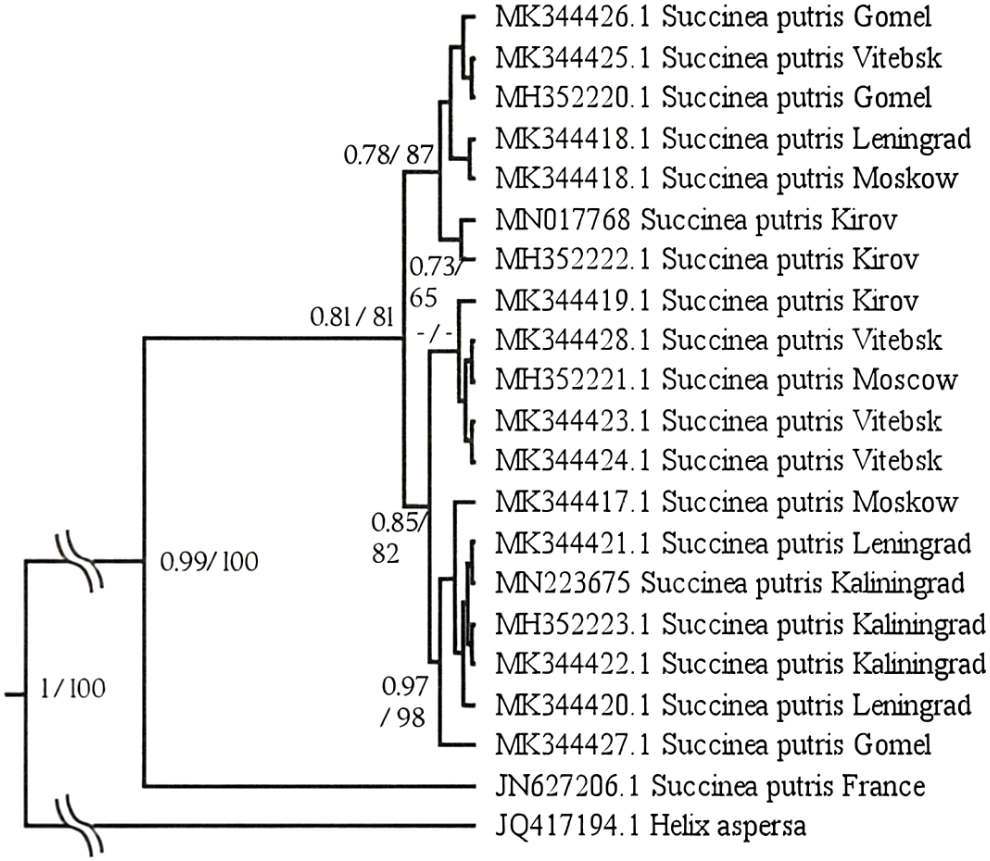


Рисунок 28. Байесовская филогенетическая реконструкция на основе нуклеотидных последовательностей участка гена *cytB* (455 п.н.) моллюсков *Succinea putris*. Дерево, полученное методом максимального правдоподобия, имело такую же топологию. Указаны значения апостериорных вероятностей для BA и бутстрепные поддержки для 1000 реплик для ML. Обозначены номера нуклеотидных последовательностей в GenBank. Обозначения популяций моллюсков *Succinea putris* представлены в таблице 19.

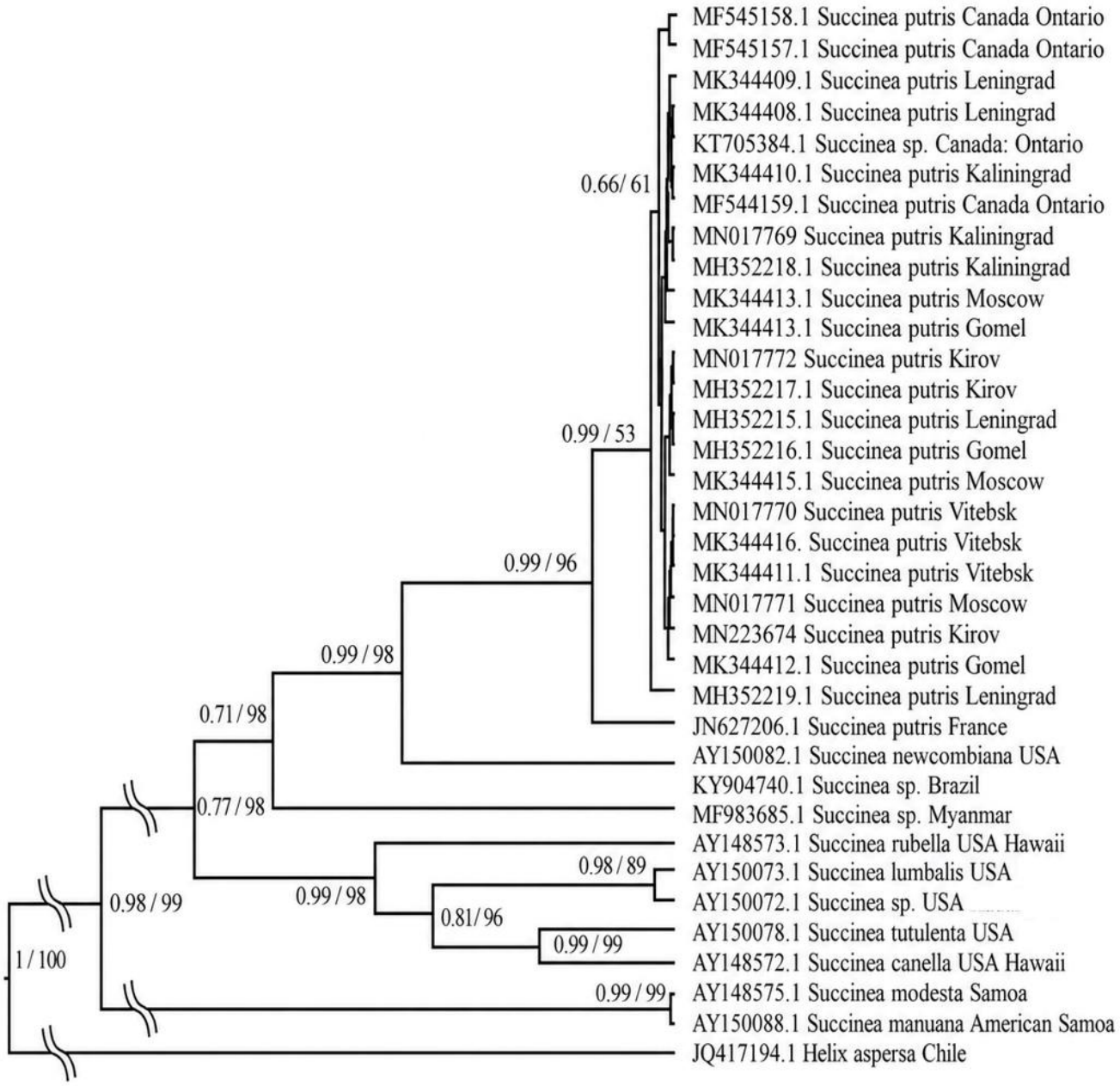


Рисунок 29. Байесовская филогенетическая реконструкция на основе нуклеотидных последовательностей участка гена *cox1* (636 п.н.) моллюсков рода *Succinea.* Дерево, полученное методом максимального правдоподобия, имело такую же топологию. Указаны значения апостериорных вероятностей для и BA и бутстрепные поддержки для 1000 реплик для ML. Обозначены номера нуклеотидных последовательностей в GenBank. Обозначения популяций моллюсков *S. putris* представлены в таблице 20.

На гаплосети по участку гена *cox1* выделяется 18 гаплотипов, которые формируют две компактные группы (рисунок 27). Одна из групп включает основном образцы из Канады (доминирует гаплотип Hap_4). Два канадских гаплотипа (Hap_7, Hap_8) расположены в той части гаплосети, которая связывает улиток *S. putris* из Европы. Большинство полученных нами гаплотипов попадаю в подгруппу гаплотипов *cytB*. Один гаплотип улиток из Ленинградской области является исключением и наиболее близок к одному их канадских гаплотипов (Hap_9). Среднее генетическое расстояние между гаплотипами гена *cox1* в изученных выборках

составило 0.009. При этом французский образец, как и в случае с геном *cytB* значительно отличится (среднее генетическое расстояние с другими гаплотипами – 0.053).

На филогенетических реконструкциях, выполненных с использованием нуклеотидных последовательностей участков генов *cox1* и *cytB* все последовательности моллюсков *S. putris* формируют единую кладу (рисунки 28, 29).

Обсуждение к разделу III.1.3

Вид *Succinea putris* (сем. Succineidae) имеет транспалеарктическое распространение (Кантор, Сысоев, 2005). Основной ареал включает территорию Европы и Западной Сибири (рисунок 31). Встречается как во влажных биотопах (заросли по берегам пресных водоёмов, овраги), так и в относительно сухих местах обитания – на высокотравных лугах, кустарниках, в мелколесье. Питаются янтарки преимущественно сгнившими растительными остатками или листьями кустарников (Лепнева и др., 1950).

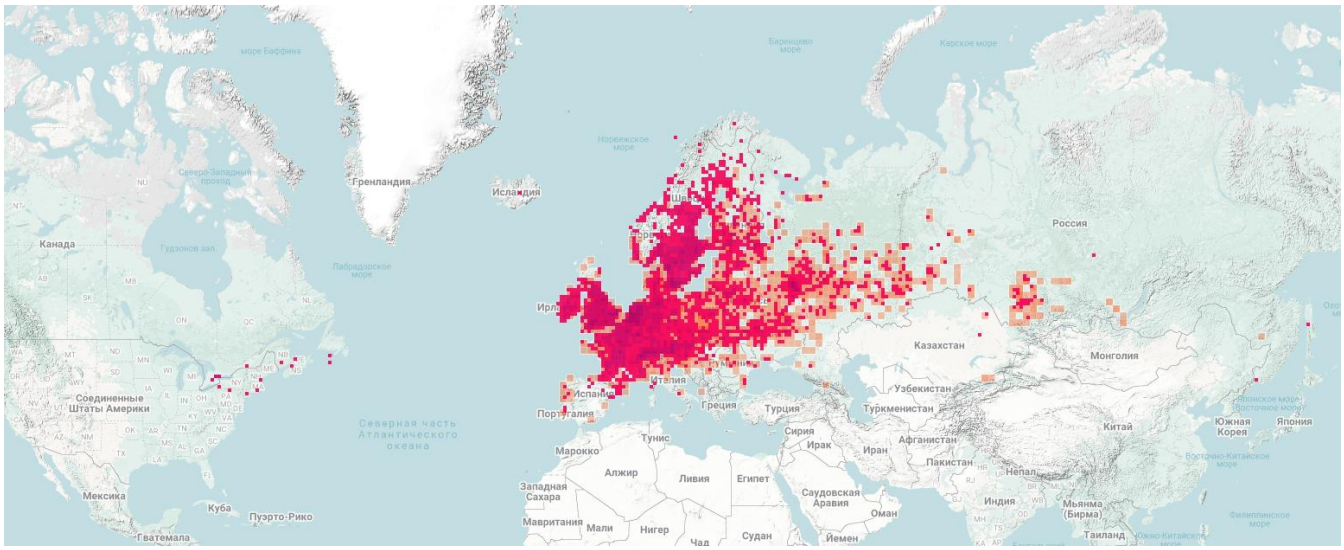


Рисунок 30. Ареал моллюска *Succinea putris*. Карта с сайта iNaturalist (https://www.inaturalist.org).

Янтарки хорошо известны зоологам как промежуточные хозяева трематод рода *Leucochloridium* (Гинецинская, 1968). Спороцисты этих трематод имеют вид столона. Его центральная часть располагается в районе гепатопанкреаса моллюска. От центральной части отходят отростки, в которых находятся метацеркарии (Усманова, 2023; Ataev et al., 2024a). Зрелые отростки спороцист часто ярко окрашены. Рисунок из полос зелёного, желтого, коричневого цветов, черных точек и «штрихов» делает их похожими на личинок насекомых. Такие отростки способны проникать в глазные щупальца моллюска и пульсировать, привлекая внимание окончательных хозяев – насекомоядных птиц. Птицы склёвывают отростки спороцист и заражаются находящимися в них метацеркариями. Согласно литературным данным,

окончательными хозяевами являются большинство птиц европейской части России из отрядов Ржанкообразные, Журавлеобразные, Воробьинообразные, Курообразные, Козодоеобразные (Громова, 1972; Быховская-Павловская, 1974; Костюнин, 1979 и др.).

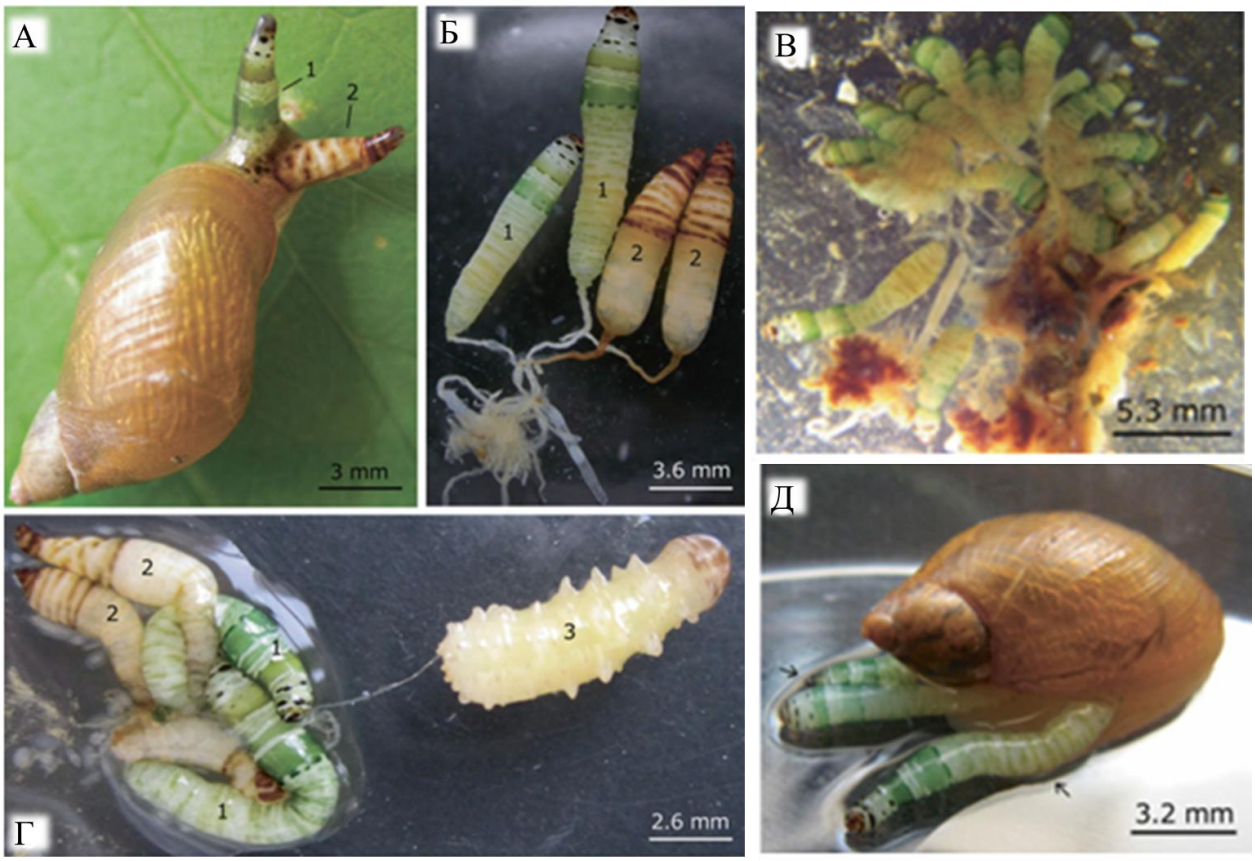


Рисунок 31. Спороцисты трематод трёх видов рода *Leucochloridium*, найденные в моллюсках *Succinea putris.* А – отростки спороцист *L. paradoxum* и *L. perturbatum* в щупальцах моллюска; Б – спороцисты *L. paradoxum* и *L. perturbatum*; В – несколько зрелых спороцист *L. paradoxum* из одного моллюска; Г – спороцисты *L. paradoxum, L. perturbatum* и *L. vogtianum;* Д – отростки спороцист *L. paradoxum* (стрелка), покидающие улитку. Условные обозначения: 1 – *L. paradoxum*, 2 – *L. perturbatum,* 3 – *L. vogtianum* (по: Ataev, Zhukova, Tokmakova, Prokhorova, 2016, с изменениями).

С использованием молекулярно-биологических подходов было установлено, что цвет и рисунок окраски отростков спороцист рода *Leucochloridium* являетются видоспецифическими признаками. Так, отростки с зелёным пигментом характерны для вида *L. paradoxum*, с коричневым – для *L. pertrubatum,* практически неокрашенные отростки с пузыреобразными выростами – для *L. vogtianum* (Жукова и др., 2012; Zhukova et al., 2014; Ataev et al., 2016a; Prokhorova et al., 2017). Использование разработанных для видовой идентификации молекулярных маркеров позволило подтвердить случаи множественного заражения янтарок трематодами рода *Leucochloridium* (рисунок 31, Ataev et al., 2016a). Лейкохлориидиды формируют очень специфические паразито-хозяинные отношения с моллюском, которые

подразумевают морфологическую и физиологическую стабильность организма хозяина (Ataev et al., 2024a).

Помимо лейкохлориидид в моллюсках *Succinea putris* встречаются трематоды других родов – метацеркарии *Brachylaima mesostoma* (сем. Brachylaimidae), *Pseudoleucochloridium soricis* (сем. Panopistidae), а также цистицеркоиды метацестод *Monocercus* sp. (сем. Dilepididae), личинки нематод сем. Mermithidae, личинки мух *Pherbellia* sp. (сем. Sciomyzidae), инфузории и коцидии (Токмакова и др., 2025). Такие случаи множественного заражения представляют интерес как для паразитологии – с точки зрения взаимодействия компонентов паразитофауны, так и для сравнительной иммунологии – как модель для изучения специфичности иммунных реакций на патогены различной природы. Поэтому *Succinea putris* является перспективным модельным объектом для изучения иммунитета у наземных видов пульмонат.

Морфологический анализ параметров раковины улиток *S. putris* из разных географических точек не показал значимых различий между ними (рисунок 32). Такие признаки, как строение челюсти, радулы и репродуктивная система, также не отличались у улиток из разных мест. По результатам генотипирования представители разных популяций имеют идентичные или совпадающие на 99% нуклеотидные последовательности участка ITS1–5.8S–ITS2 рДНК. Такие показатели вариабельности у лёгочных моллюсков находятся в пределах внутривидовой изменчивости. Так между моллюсками *Planorbarius corneus* из популяций Калининградской и Ленинградской областей значение генетической дистанции составляет всего около 0.03% (см. раздел III.1.1, Прохорова и др., 2015а). Для различных линий *Biomphalaria glabrata* идентичность этого участка генома составляет 99.1–100 % (Oliveira et al., 2010a).

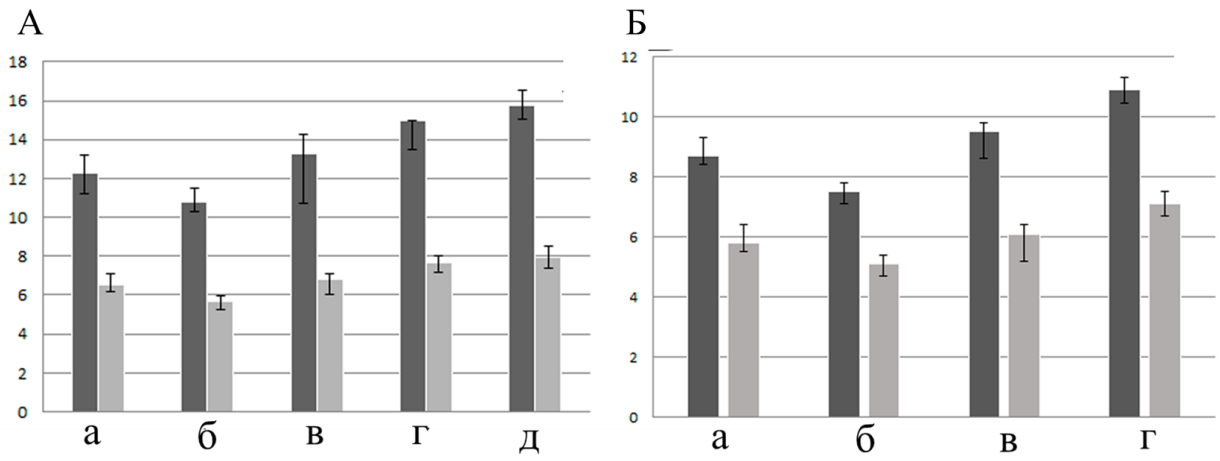


Рисунок 32. Морфометрические характеристики раковины моллюсков *Succinea putris* из разных популяций. А – размер раковины, Б – размер устья. Условные обозначения: а – Московская область (n=25); б – Кировская область (n=32); в – Ленинградская область (n=33); г – Калининградская область (n=10); д – Витебская область (n=30). Темно-серый – высота раковины, светло-серый – ширина раковины. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (К1, К3) (по: Prokhorova et al., 2020).

Благодаря своей консервативности участки ITS рДНК могут быть использованы для видовой идентификации моллюсков *Succinea putris*. В качестве дополнительного признака для определения *S. putris* могут быть использованы топологические особенности транскрипта ITS2.

Несмотря на разнообразие выявленных гаплотипов генов *cox1* и *cytB* у *S. putris,* генетические расстояния между ними невелики. Интересно, что в целом гаплотипическое разнообразие европейских образцов выше, чем канадских, хотя выборка из Канады значительно обширнее. Показатели внутривидовой вариабельности гена *cox1* сопоставимы с таковыми для другого изученного в этом отношении вида сукциней. У *S. caduca* средняя генетическая дистанция между популяциями составляет 0.028 (Holland, Cowie, 2007). Средняя генетическая дистанция между образцами *S. putris* и видами того же рода – *S. lumbaris, S. lutulenta*, *S. canella* и *S. caduca* по гену *cox1* составила 0.177±0.01. Таким образом, обнаруженные различия укладываются во внутривидовую вариабельность.

Особого упоминания заслуживает митохондриальный геном *S. putris* из Франции. Гаплотипы этого образца по генам *cox1* и *cytB* отличаются от основных групп гаплотипов на 28 и 27 нуклеотидных замен, соответственно. К сожалению, морфологическое описание и данные по другим участкам генома французской улитки не представлены (White et al., 2011). Поэтому нет достаточных оснований считать, что вид этой улитки определён верно.

S. putris является морфологически полиморфным видом, что не удивительно, учитывая огромный ареал. Тем не менее, анализ морфологического и полиморфизма не показал значимых различий между улитками из исследованных популяций. Кроме того, анализ ядерных и митохондриальных генетических маркеров моллюсков из модельных водоёмов, а также представленных в открытых базах данных особей из Европы, но и Северной Америки показал, что морфологически различные формы генетически близки и даже идентичны по используемым генетическим маркерам. Таким образом, вид демонстрирует генотипический консерватизм, что также делает его удобным модельным объектом.

III.1.4. Моллюски *Lymnaea stagnalis*

Lymnaea stagnalis является морфологически очень полиморфным видом. Генетическая изменчивость для обыкновенного прудовика хорошо изучена (Mezhzherin et al., 2008; Vinarski, 2015; Aksenova et al., 2023, 2024; Vinarski, 2024). Также существуют типовые нуклеотидные последовательности, которые могут быть использованы для видовой идентификации. Поэтому в нашей работе генотипирование было выполнено только для дополнительного подтверждения видовой принадлежности моллюсков исследуемых популяций.

Видовая идентификация моллюсков *L. stagnalis* по морфологическим признакам. Раковина крупная, турбоспиарльная, эволютная, высококоническая с вытянутым острым

завитком. Цвет раковины от розовато-рогового, рогового до коричневого или бурого цвета (рисунок 33). Раковина преимущественно тонкостенная, поверхность, умеренно блестящая с осевой исчерченностью, часто выраженными линиями приостановки роста. Оборотов 6–8, обороты выпуклые, последний заметно вздут. Завиток невысокий, устье большое, яйцевидное, как правило выше завитка (таблица 22). Свободный край устья прямой, острый. Тело от желтовато-серого до тёмно-серого. На мантии часто встречаются тёмные или коричневые мелкие пятнышки.

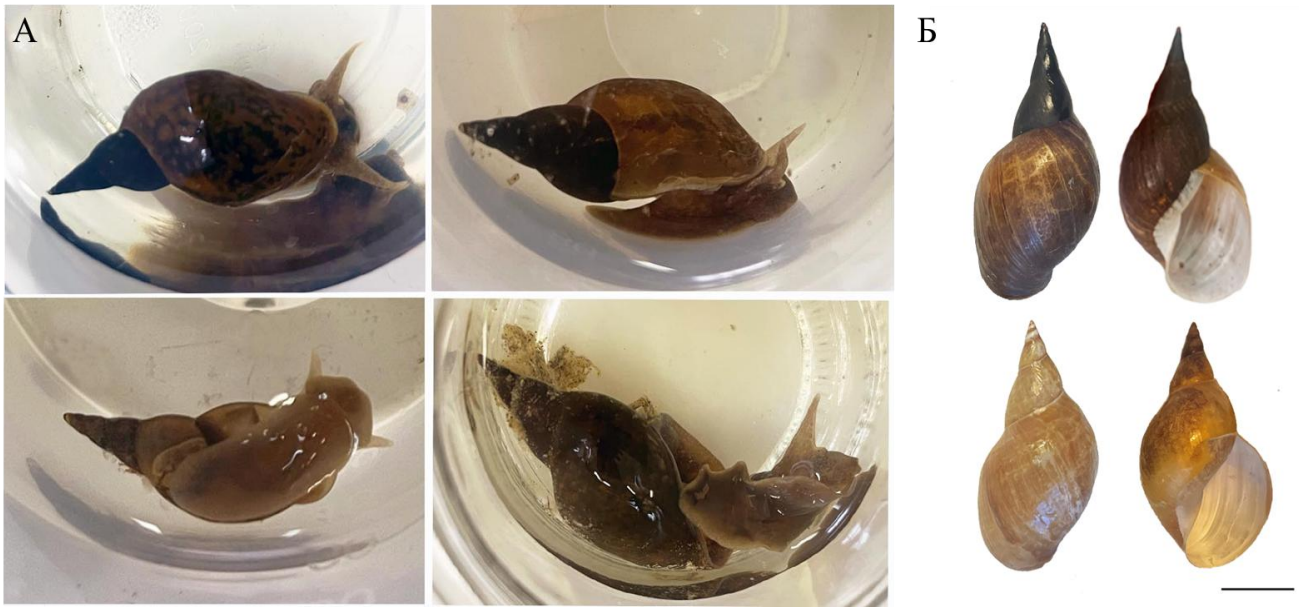


Рисунок 33. Моллюски *Lymnaea stagnalis*. А – внешний вид; Б – раковины моллюсков Масштабная линейка – 10 мм.

Моллюски из разных водоёмов имеют разную окраску, толщину и рисунок исчерченности раковины. Тело и мантия также имеют разную интенсивность пигментации. Форма последнего оборота раковины и форма устья значительно варьируют у моллюсков из одного водоёма. Указанные признаки сильно зависят у прудовиков от таких факторов как состав субстрата, состав и скорость течения воды, глубина, возраст и др. (Винарский, 2016).

Видовая идентификация моллюсков *L. stagnalis* с использованием молекулярно-генетических маркеров. В результате генотипирования исследованных особей из Ленинградской области (n=5) нами были получены участки рДНК, включающие ITS1, ITS2, а также частичные последовательности генов 28S, 5.8S и 18S рДНК (GenBank: PP866294.1; PP866295.1). Полученные нуклеотидные последовательности соответствуют представленным в GenBank последовательностям *L. stagnalis* и формируют с ними единую кладу на филогенетической реконструкции (рисунок 34). С использованием имеющихся в GenBank нуклеотидных последовательностей (приложение 4) установлено, что средняя внутривидовая

генетическая дистанция для *L. stagnalis* по участку ITS1 составляет 0.0104, по участку ITS2 – 0.0121. При этом средняя дистанция между видами *L. stagnalis*, *L. diaphana*, *L. fuscus*, *L. viatrix* и *L. cousini* по участку ITS1 составляет 0.1876. Средняя дистанция между видами *L. stagnalis*, *L. fuscus*, *L. corvus*, *L. palustris* и *L. turricola* по участку ITS2 – 0.0520. Таким образом, межвидовые дистанции по ITS1 и ITS2 значительно превышают внутривидовые. Участки ITS могут быть использованы для видовой идентификации прудовика обыкновенного в качестве дополнительного маркера.

Последующее генотипирование моллюсков из модельных водоёмов на территории Ленинградской области показало идентичность участков ITS1–5.8S–ITS2 между всеми генотипированными особями на 99–99.5%.

Таблица 22. Морфометрические параметры раковины моллюсков *Lymnaea stagnalis* (n=131)

Параметры (мм) / ссылки	Ширина раковины	Высота раковины	Высота устья	Ширина устья	Высота/ ширина раковины
Результаты измерений					
Me (K1, K3)	18.55 (17.30; 19.72)	40.71 (38.4; 43.50)	22.15 (21.0; 23.4)	14.35 (13.65; 15.76)	1.88–1.98
Минимальное значение	15.17	23.31	12.70	11.30	
Максимальное значение	29.40	49.00	28.00	17.33	
Литературные данные					
Жадин, 1952	23–27	40–47 (до 70)	23–26	15–17	—
Круглов, 2005а	22.65±0.7	43.9±0.86	22.5±0.6	16.75±0.26	1.94±0.06
Стадниченко, 2004	до 32	до 62	до 37.2	до 17.4	1.75–2.09
Дегтяренко, Анистратенко, 2011	13.0–26.7	29.2–47.7	—	—	—

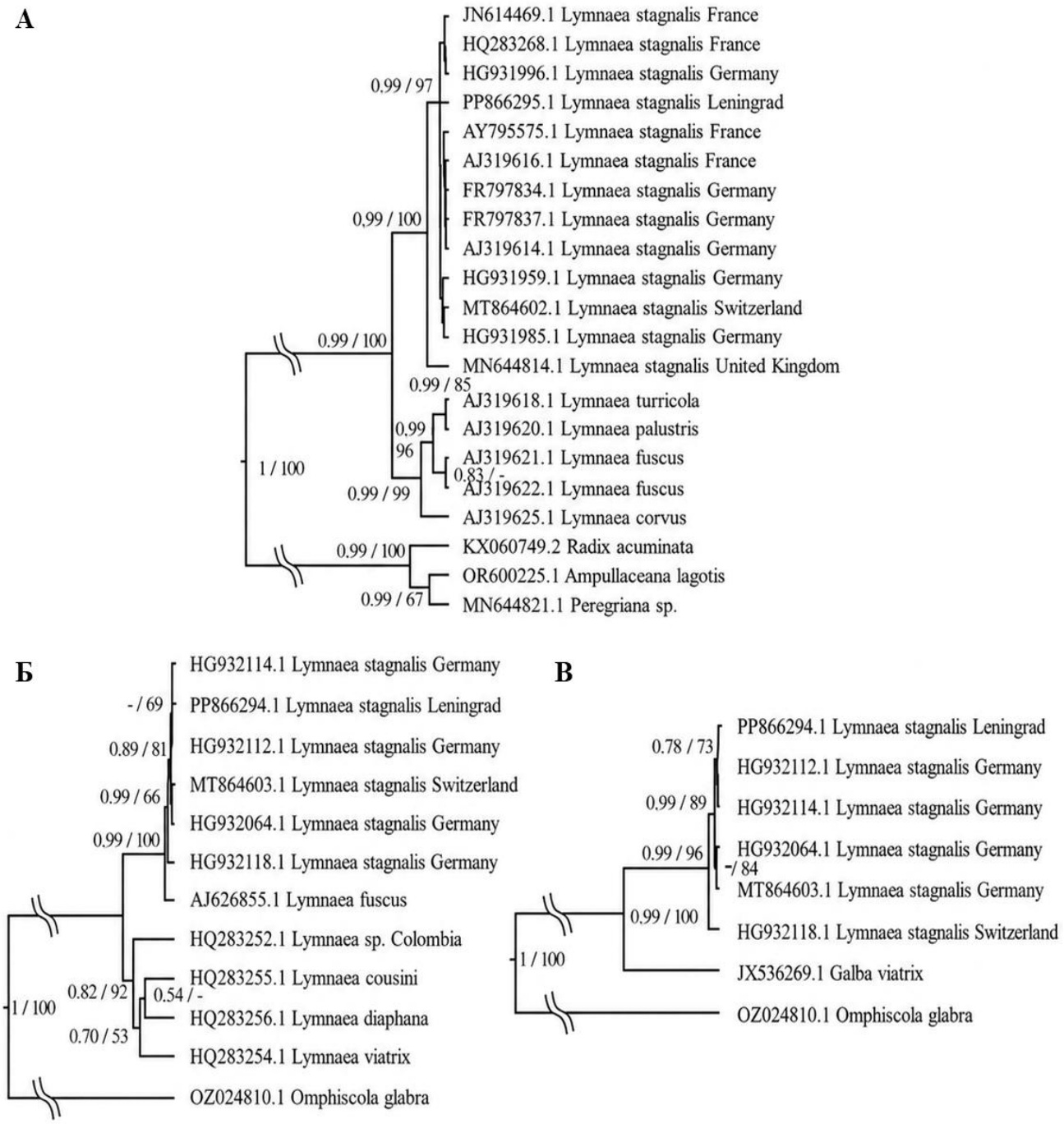


Рисунок 34. Байесовские филогенетические реконструкции моллюсков рода *Lymnaea.* А – реконструкция на основе нуклеотидных последовательностей участка 5.8S–ITS2 рДНК (560 п.н.); Б – реконструкция на основе нуклеотидных последовательностей короткого фрагмента ITS1–5.8S рДНК (273 п.н.); В – реконструкция на основе нуклеотидных последовательностей длинного фрагмента ITS1–5.8S рДНК (625 п.н.). Деревья, полученные методом максимального правдоподобия, имели такую же топологию. Указаны значения апостериорных вероятностей для BA и бутстрепные поддержки для 1000 реплик для ML. Обозначены номера нуклеотидных последовательностей в GenBank. Обозначения популяций моллюсков *L. stagnalis* представлены в приложении 3.

Обсуждение к разделу III.1.4

Прудовик *Lymnaea stagnalis* (сем. Lymneidae) является одним из наиболее распространённых пресноводных моллюсков Голарктики (рисунок 35). Ареал простирается от Северной Африки через Европу до Северной и Центральной Азии и Северной Америки (Винарский, Кантор, 2016). Также вид завезён в Тасманию и Новую Зеландию (Жадин, 1952). Встречается в стоячих, медленно текучих и пересыхающих водоёмах.

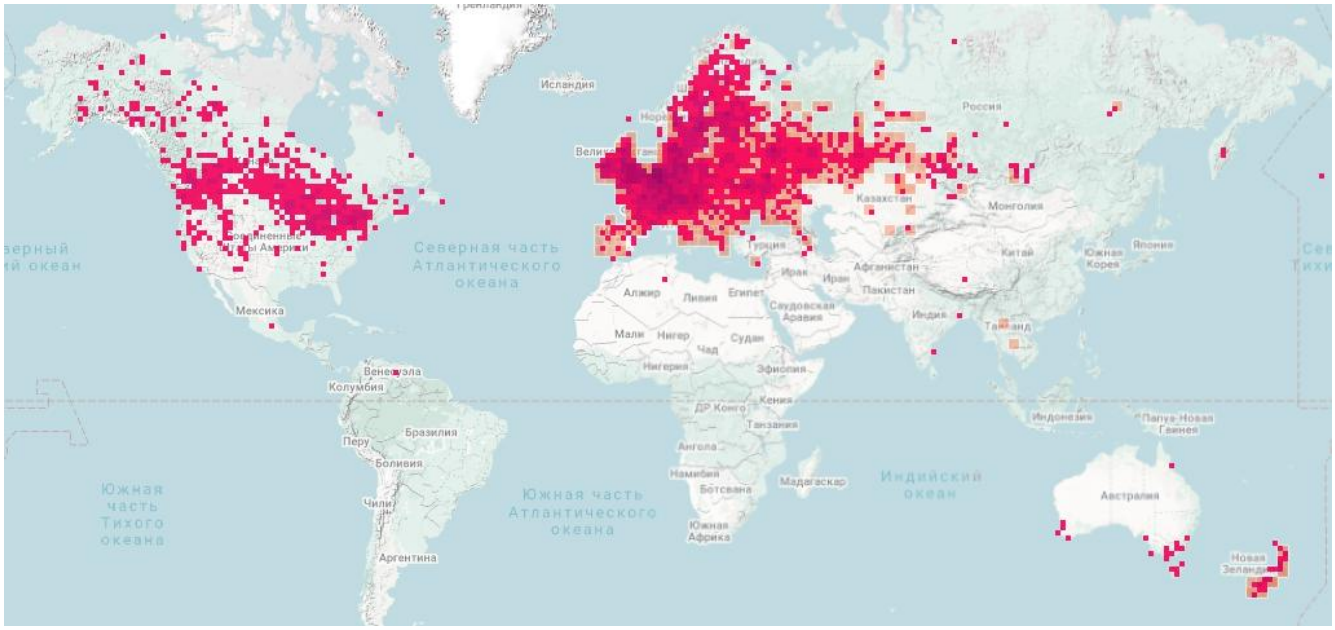


Рисунок 35. Ареал моллюска *Lymnaea stagnalis*. Карта с сайта iNaturalist (https://www.inaturalist.org).

Обыкновенный прудовик является объектом исследований во многих областях биологии и смежных наук – паразитологии (как промежуточный хозяин более чем 30 видов трематод), экологии и токсикологии (в качестве индикаторного организма), анатомии и физиологии (как модель для изучения нервной системы, рефлексов, механизмов обучения), биологии развития, защитных реакций и др. (Круглов, 2005b; Kryukova et al., 2014; Fodor et al., 2020; Harayashiki et al., 2024; Rivi et al., 2025).

Исследователям хорошо известен огромный морфологический полиморфизм, характерный для *L. stagnalis* (Hubendick, 1951). Изменчивость конхологических признаков пудовика обыкновенного отражена в определителях (Жадин, 1952; Gloer, 2002; Круглов, 2005a) и стала предметов многочисленных исследований (см. Vinarski, 2015). Различные морфологические формы прудовиков рассматривали как отдельные виды (Круглов, Старобогатов, 1985) или подвиды (Стадниченко, 2004; Круглов, 2005a). Количество выделяемых разными авторами групп прудовиков достигало трёх десятков (см. Vinarski, 2015). Молекулярно-генетические исследования не подтвердили генетической дивергенции на уровне видов между различными морфотипами прудовиков, но показали существование 2–3 алловидов (Mezhzherin

et al., 2008; Vinarski, 2015). На территории бывшего СССР распространены *L. stagnalis* var. *stagnalis* («западный» вариант) и *L. stagnalis* var. *acicularis* (Винарский, Кантор, 2016).

Нами отмечена большая вариабельность параметров раковины у исследованных особей. Однако генотипирование моллюсков из модельных водоёмов по участкам рДНК показало идентичность нуклеотидных последовательностей исследованных особей не менее, чем на 99%. Такие значения вариабельности для прудовиков находятся в пределах внутривидовых. Дистанция с особями, генотипированными на территории Европы также находится в пределах внутривидовой. Тем не менее, ввиду морфологической вариабельности при заборе прудовиков из нового модельного водоёма желательно подтверждать видовую принадлежность с использованием молекулярно-генетических маркеров.

III.1.5. Моллюски *Ampullaceana lagotis*

В работе были использованы моллюски *A. lagotis*, собранные в озёрах Укок и Кальджин-Коль, расположенных на плоскогорье Укок. Часть из озера Укок оказались заражёнными трематодами рода *Aptorchis.* Эти моллюски были использованы для изучения клеточной иммунной реакции. Моллюски из разных озёр внешне значительно различались по характеристикам раковины. Поэтому было необходимо разобраться с их видовой принадлежностью.

Видовая идентификация моллюсков *A. lagotis* по морфологическим признакам. Раковина яйцевидно-конической формы, турбоспиральная, правозакрученная, эволютная. Раковина имеет 2.5–4 оборота. Завитки плотные, дефинитивный оборот выпуклый, острие раковины высокое и узкое. Устье овальное, наружный край равномерно-выгнутый. Стенки раковины тонкие с отчётливо выраженными линиями нарастания. Тангент-линия раковины выгнутая. Для раковины характерно наличие пупочной щели, слегка прикрытой париетальным краем устья. Париетальное вдавление выражено. Шов между оборотами глубокий, косой. Раковины моллюсков их разных географических популяций значительно отличаются по размеру, что затрудняет видовую идентификацию. Моллюски из озера Укок достоверно крупнее, чем особи из озера Кальджин-Коль (таблица 23, рисунок 36).

Половая система собранных улиток во всех случаях имеет типичное для рода *Ampullaceana* строение (Aksenova et al., 2018). Копулятивный аппарат включает препутиум и мешок пениса (рисунок 36). Индекс копулятивного аппарата моллюсков варьирует от 1.08 до 1.70.

Таблица 23. Морфометрические параметры раковины моллюсков *Ampullaceana lagotis* (n=26)

Параметры (мм) /ссылки	Высота раковины	Ширина раковины	Высота устья	Ширина устья	Высота завитка	Высота последнего оборота
Результаты измерений моллюсков из озера Укок						
Me (K1, K3)	24.10 (22.80; 25.60)	15.82 (14.95; 16.42)	16.11 (15.12; 17.53)	10.72 (10.14; 12.00)	8.20 (7.25; 9.24)	21.25 (20.12; 22.37)
Минимальное значение	18.71	13.10	13.00	8.00	5.91	16.52
Максимальное значение	26.31	21.70	19.10	14.21	10.20	24.11
Результаты измерений моллюсков из озера Кальджин-Коль						
Me (K1, K3)	10.8 (9.90; 12.85)	8.8 (8.05; 9.35)	7.82 (7.35; 9.60)	5.41 (4.92; 6.45)	3.31 (2.65; 4.12)	9.58 (8.71; 11.42)
Минимальное значение	8.91	6.82	6.69	4.30	1.78	7.91
Максимальное значение	18.09	12.41	10.81	7.30	6.89	15.00
Литературные данные						
Жадин, 1952	9–20–26	5–14–21	6–16–21	3–10–12	6–6.5	—
Vinarski, 2020 (Ленинградская обл./ Таджикистан)	12.5–16.4 / 10.4–15.1	7.5–10.8 / 6.8–10.2	7.8–11.1 / 7.1–10.4	5.4–7.7 / 4.1–7.4	10.1–15.5 / 8.8–12.3	—
Vinarski, Bolotov, 2018 (Монголия)	14.8–18.6	9.3–12.3	11.0–13.4	7.0–10.1	—	—

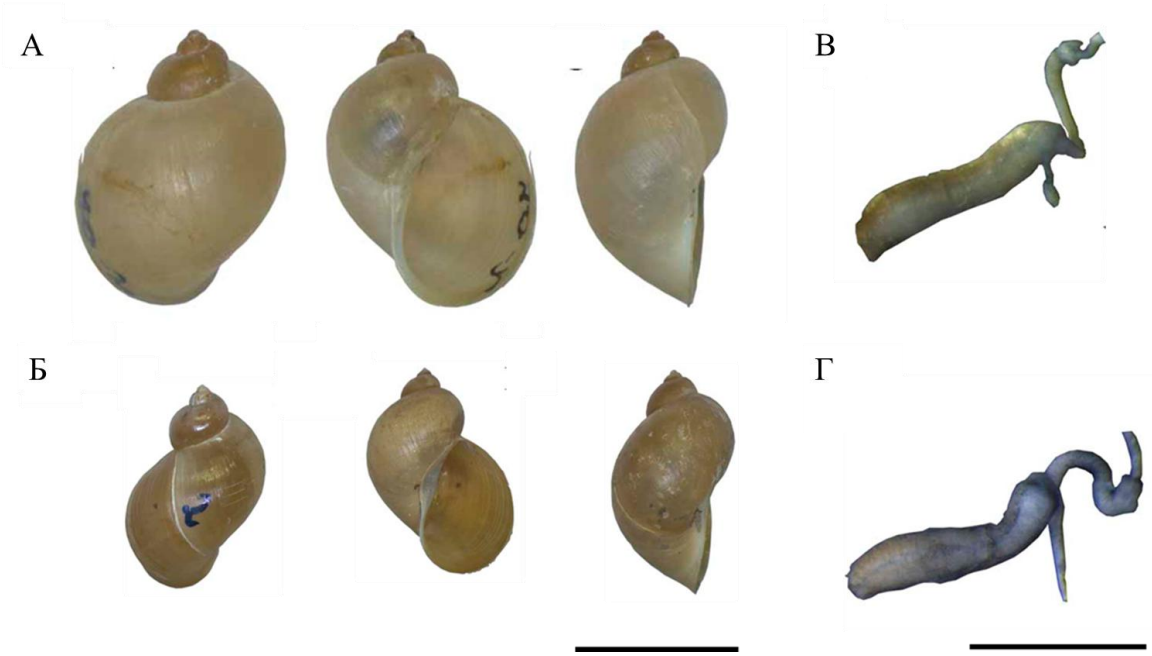


Рисунок 36. Раковины и копулятивный аппарат моллюсков *Ampullaceana lagotis.* А, В – раковины и копулятивный аппарат моллюсков из озера Укок; Б, Г – раковины и копулятивный аппарат моллюсков из озера Кальджин-Коль (по: Ataev, Usmanova, Prokhorova, Glupov, 2024).

Видовая идентификация моллюсков *A. lagotis* с использованием молекулярно-генетических маркеров. В результате генотипирования были получены нуклеотидные последовательности участка рДНК длиной 1515–1771 п.н., включающего последовательность 18S (частично)–ITS1–5.8S–ITS2–28S (частично). Длина секвенированного участка гена *cox1* составила 656–659 п.н. Номера нуклеотидных последовательностей в GenBank представлены в приложении 5.

С использованием полученных нуклеотидных последовательностей были выполнены филогенетические реконструкции (рисунки 37, 38, 39). Так как количество генотипированных по разным участкам рДНК видов отличается, по участку рДНК были выполнены две отдельные реконструкции – по фрагменту 18S–ITS1–5.8S и по фрагменту 5.8S–ITS2–28S. Для вида *A. lagotis* в литературе использовалось несколько синонимичных названий, среди которых наиболее часто встречаются *Radix lagotis* (Schniebs et al., 2015; Glöer, 2019) и *Lymnaea* (*Peregriana*) *lagotis* (Круглов, Старобогатов, 1983; Хохуткин и др., 2009). С использованием в том числе этих названий последовательности были аннотированы в GenBank, поэтому на филогенетических реконструкциях для вида в ряде случаев указаны два названия.

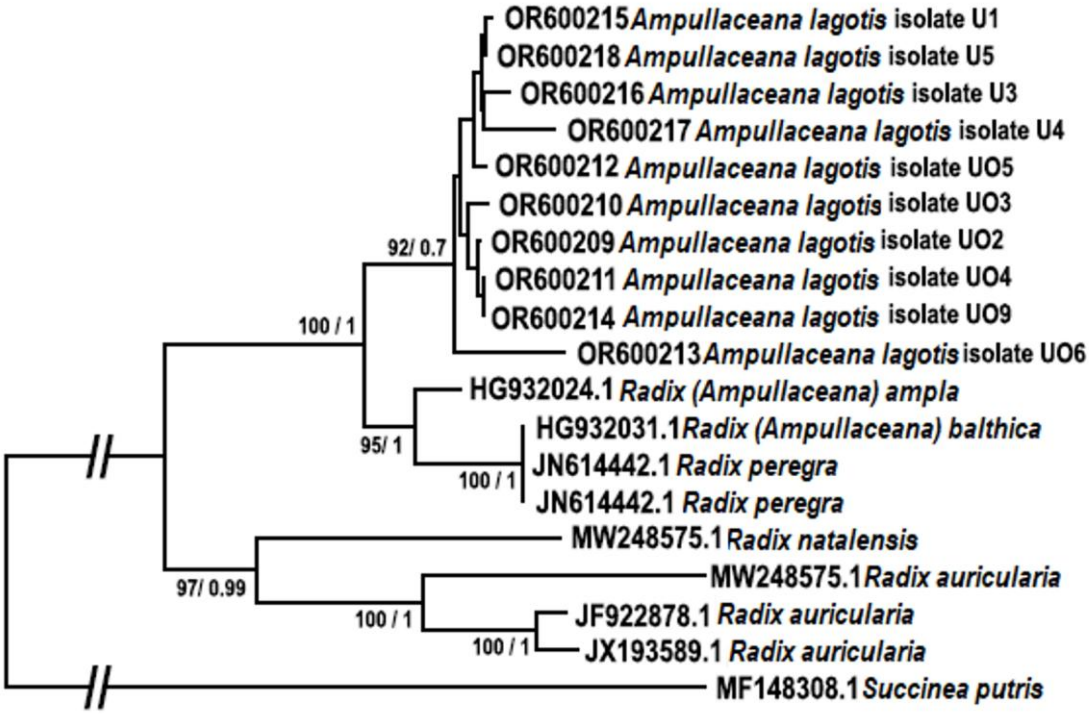


Рисунок 37. Баесовская филогенетическая реконструкция моллюсков рода *Ampullaceana* на основании участка рДНК, включающего 18S (частично)–ITS1–5.8S (частично) (690 п.н.). В узлах указаны бутстрепные поддержки для 1000 реплик для ML и значения апостериорных вероятностей для BA. Обозначены номера нуклеотидных последовательностей в GenBank (по: Ataev, Usmanova, Prokhorova, Glupov, 2024).

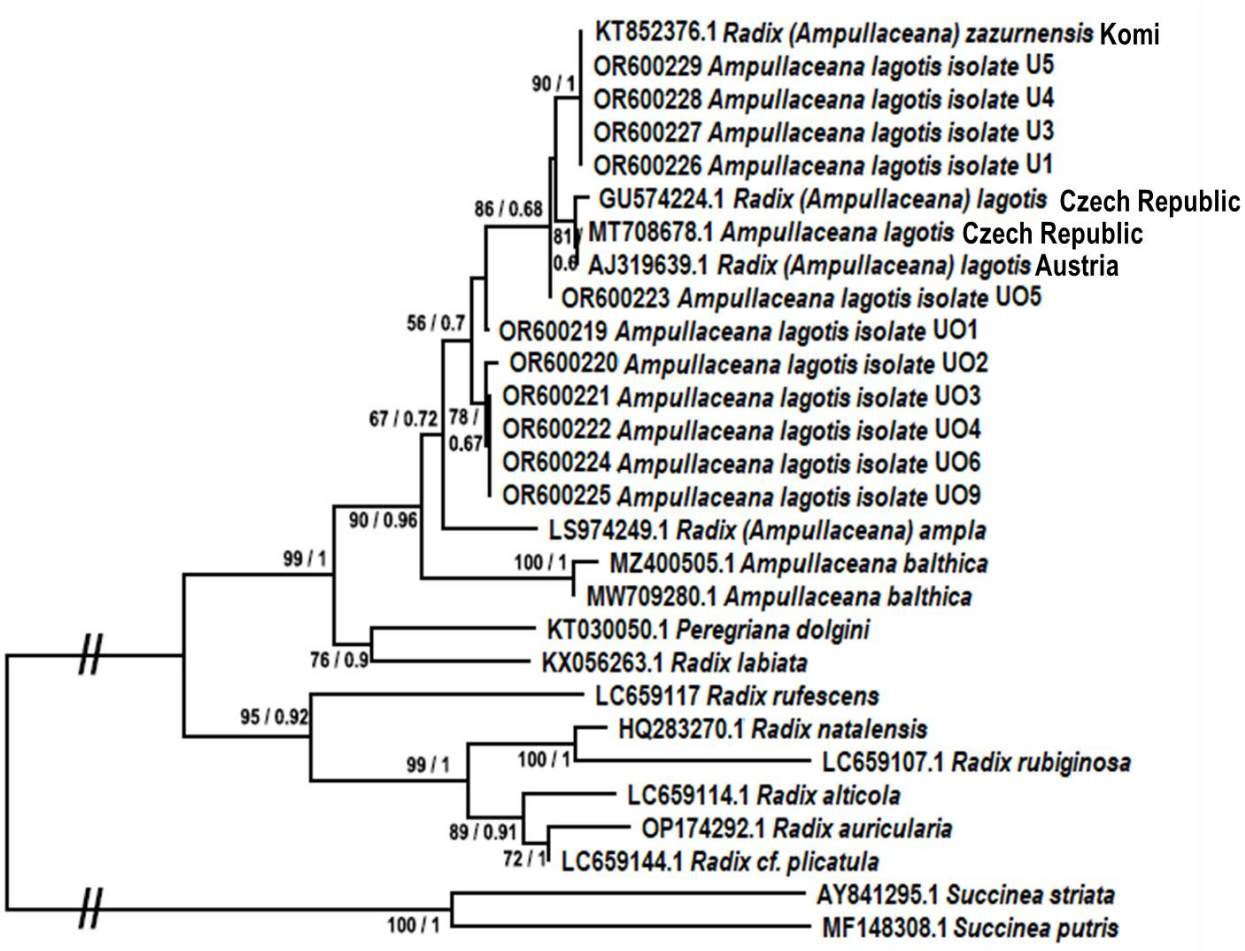


Рисунок 38. Баесовская филогенетическая реконструкция моллюсков рода моллюсков рода *Ampullaceana* на основании участка рДНК, включающего частичную последовательность ITS2–28S (711 п.н.). В узлах указаны бутстрепные поддержки для 1000 реплик для ML и значения апостериорных вероятностей для BA. Обозначены номера нуклеотидных последовательностей в GenBank (по: Ataev, Usmanova, Prokhorova, Glupov, 2024).

На всех полученных филогенетических реконструкциях моллюски, собранные на плоскогорье Укок, формируют единую кладу и объединяются с образцами *Ampullaceana lagotis.* Однако в те же клады на реконструкциях по фрагменту ITS2–28S и *cox1* входят последовательности *Radix zazurnensis* (KT852376.1 и KF918625.1 соответственно) (рисунки 38, 39). Авторы этих последовательности уже после публикации данных в GenBank признали исследуемый изолят как *Ampullaceana* (*Radix*) *lagotis* (см. Aksenova et al., 2016; Aksenova et al., 2017).

На основе имеющихся данных по моллюскам рода *Ampullaceana* были посчитаны средние внутривидовые и межвидовые генетические дистанции (таблицы 24, 25). По участку ITS1 генотипированные нами образцы являются единственными для *A. lagotis.* Дистанция по участку ITS1 между исследованными образцами и видами *A. baltica* и *A. ampla* превышает дистанцию между *A. baltica* и *A. ampla* (таблица 24). Аналогичные результаты получены и для региона ITS2 – *A. lagotis* сильнее отличается по этому участку от *A. baltica* и *A. ampla*, чем эти виды между

собой (таблица 25). Однако дистанция между образцами, собранными на плато Укок и другими представителями *A. lagotis* не превышает среднюю межвидовую, характерную для представителей данного рода.

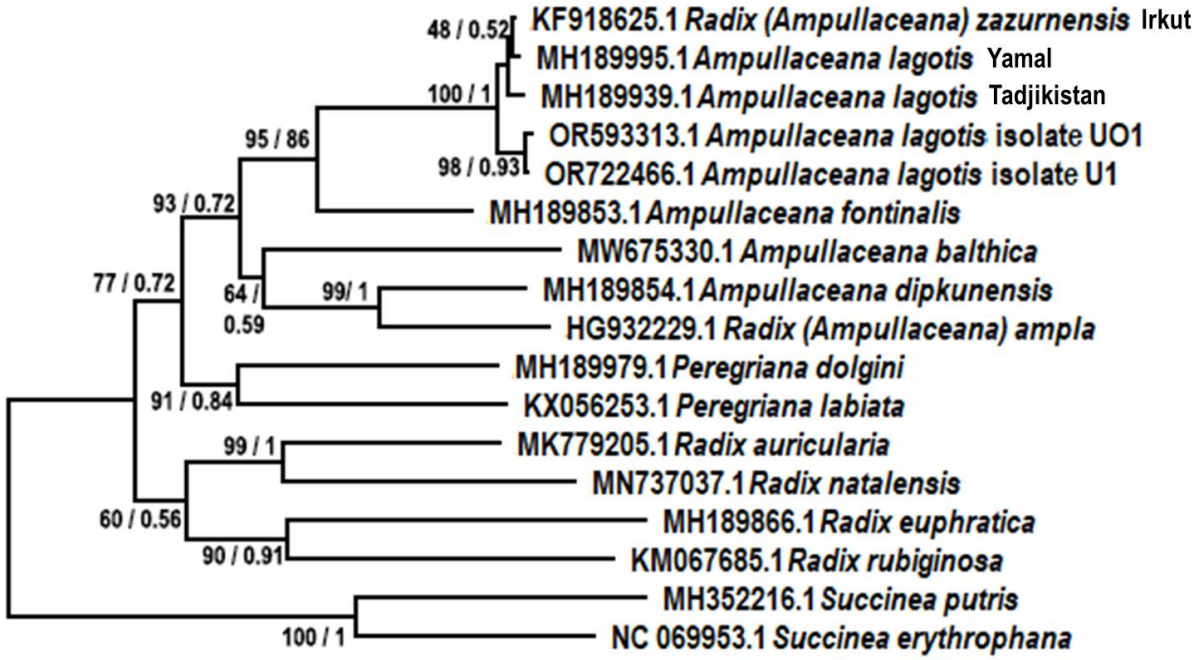


Рисунок 39**.** Баесовская филогенетическая реконструкция моллюсков рода *Ampullaceana* на основании фрагмента гена *cox1* (626 п.н.). В узлах указаны бутстрепные поддержки для 1000 реплик для ML и значения апостериорных вероятностей для BA. Обозначены номера нуклеотидных последовательностей в GenBank (по: Ataev, Usmanova, Prokhorova, Glupov, 2024).

Таблица 24. Внутривидовые и межвидовые генетические дистанции (p-distance) моллюсков рода *Ampullaceana* по фрагменту ITS1 рДНК (по: Ataev, Usmanova, Prokhorova, Glupov, 2024)

ITS1 (745–748 п.н.)	Внутривидовая	Межвидовая	
		A. baltica	*A. ampla*
A. lagotis Ukok	0.0191	0.0544	0.0427
A. baltica	0.0037	—	0.0331
A. ampla	0.0019	—	—
Средняя дистанция	0.0162	0.0434	

Наиболее вариабельным из исследованных участков генома оказался ITS2 (таблица 25). У моллюсков *A. lagotis* из озера Кальджин-Коль и у моллюсков этого вида из других регионов этот спейсер имеет длину 618 п.н. А как, у *A. lagotis* из озера Кальджин-Коль ITS2 содержит вставку из 21 нуклеотида. Подобная инсерция характерна и для моллюсков из реки Иркут (GenBank: KT852376.1) (Aksenova et al., 2017).

Таблица 25. Внутривидовые и межвидовые генетические дистанции (p-distance) моллюсков рода *Ampullaceana* по фрагменту ITS2 рДНК (по: Ataev, Usmanova, Prokhorova, Glupov, 2024)

ITS2 (618-639 п.н.)	Внутривидовая	Межвидовая		
		A. baltica	*A. ampla*	*A. lagotis*
A. baltica	0.0020	—	—	—
A. ampla	0.0025	0.0176	—	—
A. lagotis	0.0080	0.0243	0.0203	—
A. lagotis Ukok	0.0162	—	—	0.0132
Средняя дистанция	0.0071	0.0197		

Таким образом, улитки, собранные в озере Укок и Кальджин-Коль относятся к одному виду, но, вероятно, являются изолятами. Это подтверждается морфологическими и генетическими различиями между ними. Кроме того, отсутствие внутрипопуляционной вариабельности моллюсков *A. lagotis* может свидетельствовать об относительно недавнем заселении улиток этого вида в озёра Укок и Кальджин-Коль.

Обсуждение к разделу III.1.5

Ареал вида *Ampullaceana lagotis* (сем. Lymneidae) почти полностью охватывает Европу, Сибирь и некоторые районы Центральной Азии, включая Таджикистан и западный Китай (Glöer, 2002; Винарский, Кантор, 2016) (рисунок 40). Этот прудовик предпочитает спокойные, стоячие или медленно текущие воды, обычно встречается в озерах, прудах и каналах. Диапазон температур, кислотности воды и уровня кислорода очень широкий. Встречается в канавах и ручьях непостоянным водным режимом (Жадин, 1952).

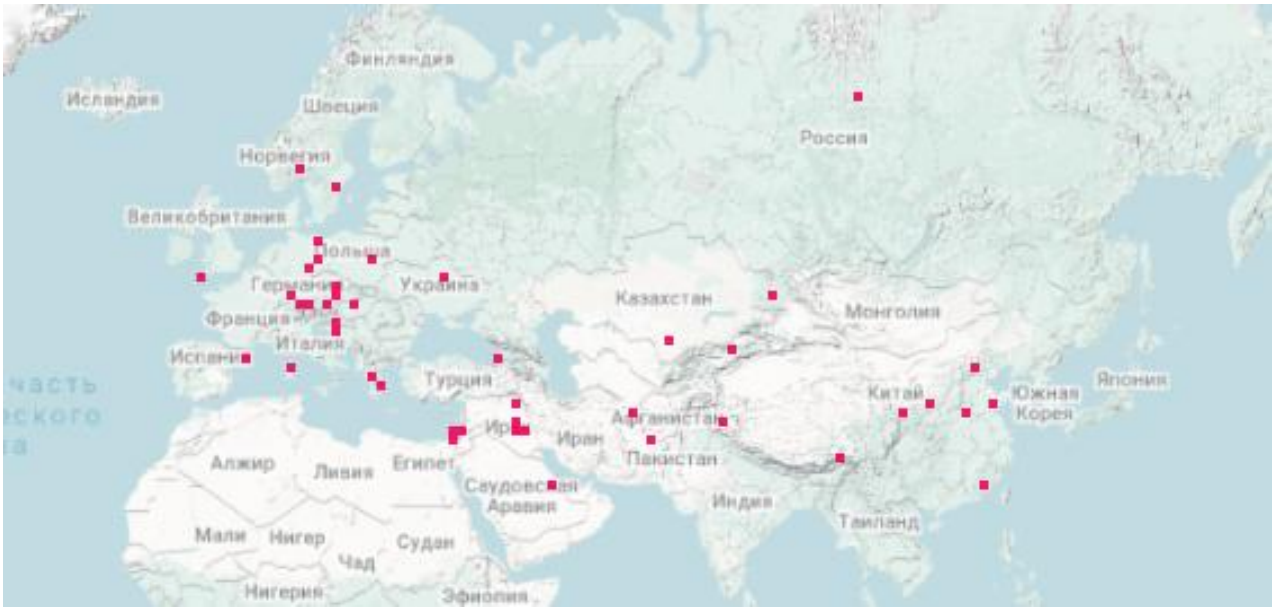


Рисунок 40. Ареал моллюсков *Ampullaceana lagotis*. Карта с сайта iNaturalist (https://www.inaturalist.org) (с дополнениями).

За долгую историю изучения вида по причине морфологической вариабельности его относили к различным родам: *Buccinum*, *Lymnaea*, *Radix*, *Peregriana*, в основном, в рамках сем. Lymnaeidae (см. Vinarski et al., 2020). Несколько изолятов описаны под отдельными названиями, но генетическая дивергенция подтверждена не для всех из них. А другие изоляты, напротив, генотипированы под отдельными видовыми названиями, но для них доказана принадлежность к виду *Ampullaceana lagotis* (Aksenova et al., 2016; Aksenova et al., 2017).

Несмотря на большую вариабельность по конхологическим критериям, генотипирование подтвердило принадлежность исследованных нами изолятов к виду *A. lagotis.* Ввиду большой морфологической вариабельности вида *A. lagotis* для использования в качестве модельных объектов моллюсков из новых водоёмов требуется их предварительное генотипирование.

III.1.6. Моллюски *Cochlicopa lubrica*

Определение моллюсков рода *Cochlicopa* затруднено из-за схожести строения их раковин (Шилейко, 1984). Для уточнения видовой принадлежности использованных для изучения клеточного состава гемолимфы моллюсков, было выполнено их генотипирование.

Видовая идентификация моллюсков *C. lubrica* по морфологическим признакам. Раковина яйцевидно-конической формы, турбоспиральная, правозакрученная, эволютная. Раковина имеет 2.5–5 оборотов. Завитки плотные, дефинитивный оборот выпуклый, острие раковины высокое и узкое. Устье овальное, внизу суженное, вверху заостренное (таблица 26). Стенки раковины тонкие, гладкие, блестящие с заметными линиями нарастания. Тангент-линия раковины выгнутая. Края устья слегка утолщены. Нога моллюска узкая, серая или почти черная. Щупальца темные (рисунок 41).

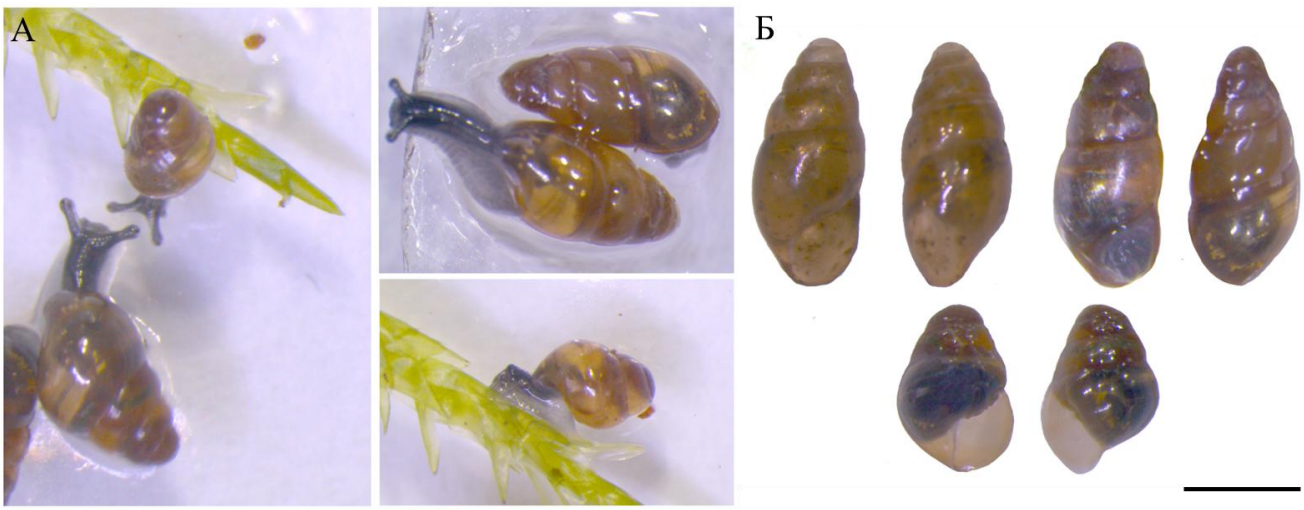


Рисунок 41. Моллюски *Cochlicopa lubrica*. А – внешний вид; Б – раковины моллюсков. Масштабная линейка – 3 мм.

Таблица 26. Морфометрические параметры раковины моллюсков *Cochlicopa lubrica* (n=26)

Параметры (мм) / ссылки	Высота раковины	Ширина раковины	Высота устья	Ширина устья
Результаты измерений				
Me (K1, K3)	4.81 (4.60; 5.01)	2.20 (2.31; 2.39)	1.80 (1.62; 2.00)	1.29 (1.19; 1.50)
Минимальное значение	3.31	2.10	1.41	1.10
Максимальное значение	5.80	2.70	2.22	1.51
Литературные данные				
Лихарев, Раммельмейер, 1952	5.5–6	2.5	2.5	1.75
Шилейко, 1978	5.3–6	2.2–2.7	—	—
Балашов, 2016	5–7.5	2.2–2.9	—	—
Осипова, 2009	3.4–5.9	2–2.6	1.8–2.3	1.1–1.6
Bowell, 1917	6	—	—	—

Видовая идентификация моллюсков *C. lubrica* с использованием молекулярно-генетических маркеров. В результате генотипирования *C. lubrica* (n=6) были получены участки рДНК, включающие полные последовательности ITS1, ITS2 и частичные последовательности генов 28S, 5.8S, 18S. Номера полученных нуклеотидных последовательностей в GenBank представлены в приложении 6.

Нуклеотидные последовательности полученных участков рДНК у всех генотипированных особей идентичны. На филогенетических реконструкциях они объединяются в общую кладу с представителями *C. lubrica* из других регионов (рисунок 42).

Средняя генетическая дистанция между собранными в Ленинградской области кохликопами и генотипированными образцами из Европы по участку ITS1 составляет 0.0028, по участку ITS2 – 0.0024. Полиморфизмы представлены однонуклеотидными заменами. Межвидовая генетическая дистанция с *C. lubricella* по участку ITS2 составляет 0.0109. Средняя межвидовая дистанция по ITS1 между видами *C. lubrica*, *C. lubricella* и *C. nitens* составляет 0.0756.

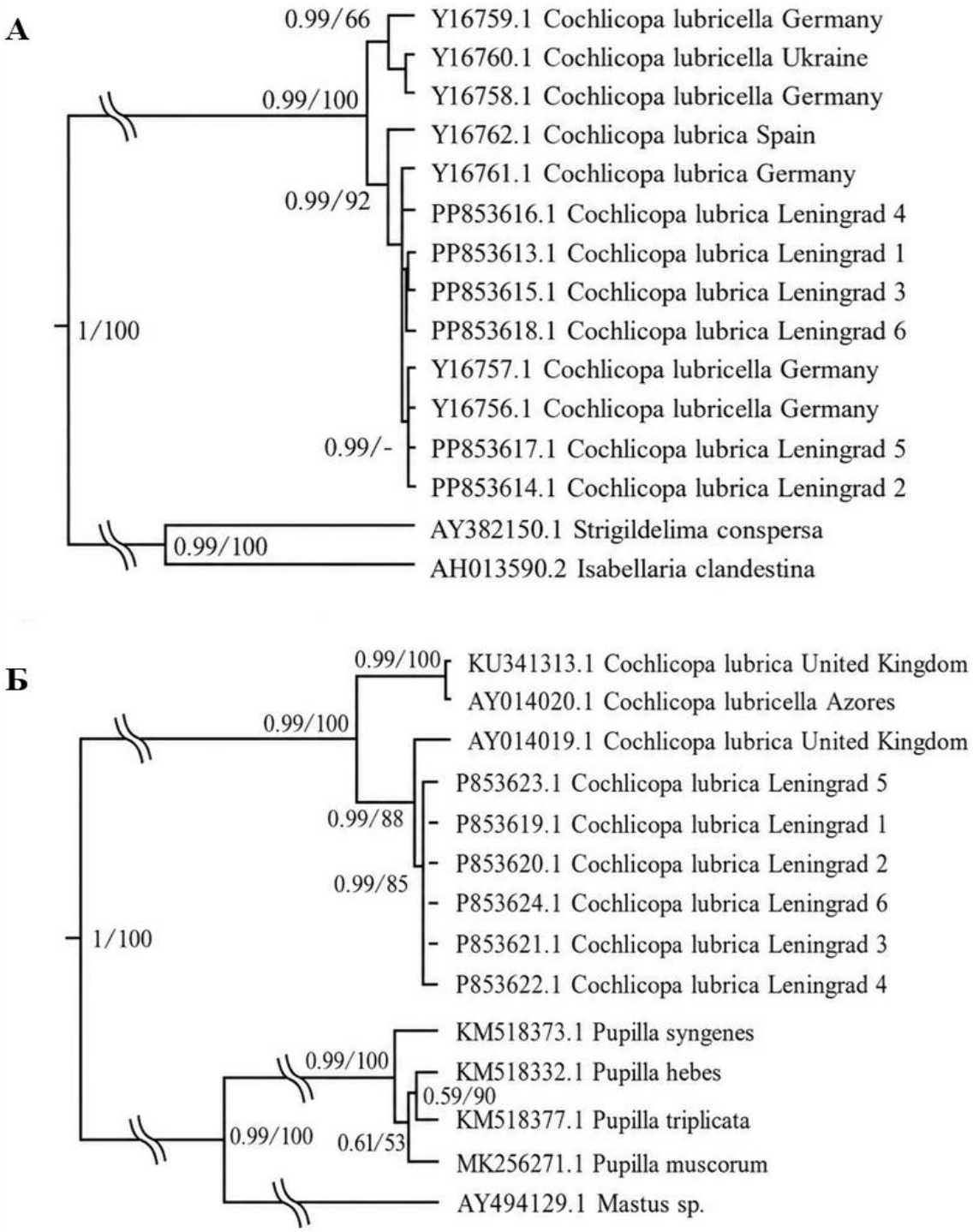


Рисунок 42. Байесовские филогенетические реконструкции моллюсков рода *Cochlicopa* на основе нуклеотидных последовательностей участков рДНК. А – реконструкция по участку, включающему 18S (фрагмент)–ITS1 рДНК (990 п.н.); Б – реконструкция по участку, включающему ITS2–5.8S рДНК (660 п.н.). Деревья, полученные методом максимального правдоподобия, имели такую же топологию. Указаны значения апостериорных вероятностей для BA и бутстрепные поддержки для 1000 реплик для ML. Обозначены номера использованных последовательностей в GenBank.

Обсуждение к разделу III.1.6

Моллюски *Cochlicopa lubrica* (Сем. Cochlicopidae) распространены в Голарктике (рисунок 43). Эврибионтный вид, населяет биотопы с мезофильными условиями. Чаще встречается в подстилке, траве, мху (Шилейко, 1978; Кантор, Сысоев, 2005). Моллюски *C. lubrica* служат промежуточными хозяевами трематод *Dicrocoelium dendriticum* (Badie et al., 1992; Бирюков и др., 2011).

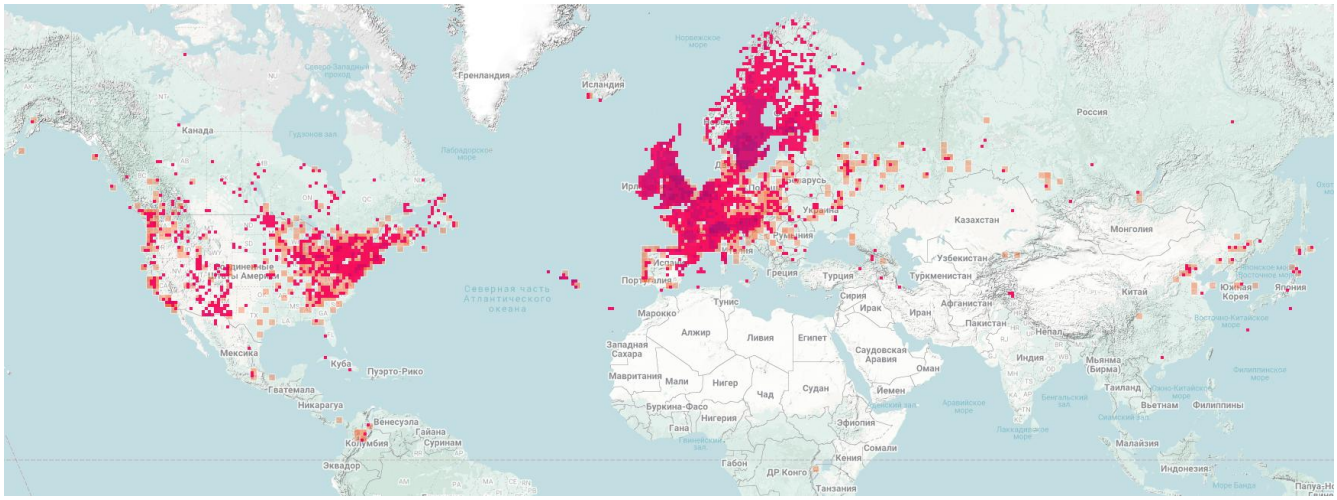


Рисунок 43. Ареал моллюска *Cochlicopa lubrica*. Карта с сайта iNaturalist (https://www.inaturalist.org).

Небольшие размеры кохликоп и связанная с этим сложность определения по конхологическим критериям привели к тому, что таксономический статус видов внутри рода неоднократно пересматривался. Например, высказывались предложения объединить *C. lubricella* и *C. lubrica* в единый вид (Outeiro et al., 1990). А моллюсков *C. repentina* одни малакологи рассматривают как разновидность *C. lubrica* (Kerney et al., 1983), другие – как отдельный вид (Gittenberger,1983), или вообще не упоминают этот таксон (Шилейко, 1982).

Один из образцов, аннотированный как *C. lubrica* (GenBank: KU341313.1) из Великобритании на филогенетической реконструкции с использованием участка ITS2–28S кластеризуется с образцом *C. lubricella* (рисунок 42). Выравнивание показывает 100% идентичность этих образцов. Также указанная последовательность упоминается в двух работах по филогении моллюсков как *C. lubricella* (Ayyagari, Sreerama, 2020; Saadi et al., 2020). На филогенетической реконструкции с использованием участка 18S–ITS1 рДНК часть образцов *C. lubricella* из Германии формируют отдельную кладу, а часть объединяются с *C. lubrica.* В целом участок ITS1 у *C. lubricella* наиболее вариабельный среди всех представителей рода *Cochlicopa.* Такой полиморфизм может рассматриваться как доказательство парафилетичности *C. lubricella.* Улитки со схожей морфологией раковины оказываются генетически более различными, чем характерно для представителей одного вида (Armbruster, Bernhard, 2008). Это подтверждает и

генетическая дистанция между двумя «ветвями» *C. lubricella*, которая составляет 0.0118, что больше средней межвидовой для рода *Cochlicopa*.

Ранее у четырёх видов рода *Cochlicopa* была изучена изменчивость 21 изоферментного локуса (Ambruster, Schlegel, 1994). Была установлена высокая частота встречаемости гомозигот во всех исследованных популяциях, которую авторы связывают с тем, что в популяциях кохликоп преобладает самооплодотворение. Это согласуется с нашими данными – все генотипированные особи полностью идентичны по исследуемым участкам рДНК. В то же время, в вышеуказанной работе изоферментный анализ показал, что *C. lubricella* является наиболее гетерогенным видом среди с исследованных. Это может свидетельствовать о том, что *C. lubricella* – не единый вид, а комплекс видов.

Генетическая однородность *C. lubrica*, связанная с автогамией, делает этот вид перспективным объектом для сравнительно-иммунологических исследований. В то же время, сложность морфологического определения и генотипический полиморфизм близкого вида *C. lubricella*, приводят к необходимости генотипирования улиток из новых точек сбора перед использованием их в качестве модельных объектов для сравнительно-иммунологических исследований.

III.1.7. Моллюски *Arianta arbustorum*

Вид *A. arbustorum* появился на территории России менее полувека назад. Несмотря на хорошую узнаваемость, он демонстрирует морфологическую полиморфность. Поскольку исследования генотипической однородности этого вида в нашей стране единичны, моллюски из модельных популяций были генотипированы.

Видовая идентификация моллюсков *A. arbustorum* по морфологическим признакам. Раковина толстостенная, прочная, шаровидно-кубаревидная, 5.5–6 оборотов. Описан значительный полиморфизм строения раковины: встречается более шаровидная с закрытым пупком и более приплюснутая с открытым пупком (Gittenberger et al., 2004). Окраска от светло- до тёмно-коричневой, иногда бледно-жёлтая (Gloer, 2002). Рисунок из светлых поперечных штрихов, часто имеется темная полоса вдоль оборота. Завиток конический. Высота завитка больше высоты устья. Устье круглое или яйцевидное, косое, края широко отвернуты. Эмбриональные завитки гладкие, постэмбриональные слабо исчерчены радиальными бороздками. Морфометрические параметры раковины сильно варьируют (таблица 27). Тело от серо-коричневого до практически черного. Две пары щупалец. Нога массивная (рисунок 44).

Видовая идентификация моллюсков *A. arbustorum* с использованием молекулярно-генетических маркеров. Древесные улитки из природной популяции, использованной в исследовании, были выборочно генотипированы по участку рДНК. Полученные нуклеотидные

последовательности, включающие ITS1–5.8S–ITS2 рДНК (1598–1656 п.н.) идентичны представленным в GenBank последовательностям *A. arbustorum* на 96.32–99.94 %. Номера нуклеотидных последовательностей моллюсков *A. arbustorum*, использованных для вычисления генетических дистанций и филогенетических реконструкций представлены в приложении 4.

Средняя генетическая дистанция между всеми образцами – 0.0071. Между полученными в исследовании образцами и улитками из стран Европы средняя дистанция составила 0.0053.

Таблица 27. Морфометрические параметры раковины моллюсков *Arianta arbustorum* (n=185)

Параметры (мм) / ссылки	Ширина раковины	Высота раковины	Высота устья	Ширина устья
Результаты измерений				
Me (K1, K3)	13.00 (11.63; 13.73)	16.75 (14.25; 18.00)	10.00 (9.13; 11.88)	7.60 (6.43; 8.80)
Минимальное значение	7.50	11.20	6.80	4.20
Максимальное значение	16.00	22.00	17.00	12.50
Литературные данные				
Шилейко, 1978	15-24	10-24	—	—
Gloer, 2002	до 24	—	—	—
Лихарев, Раммельмейер, 1952	12–22	18–25	—	—

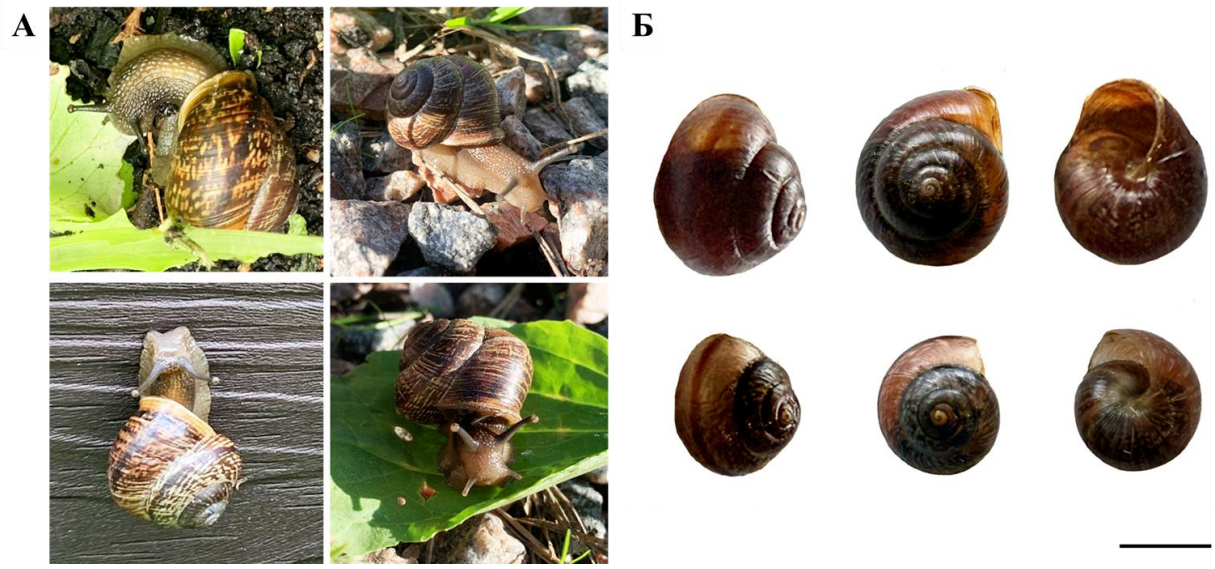


Рисунок 44. Моллюски *Arianta arbustorum.* А – внешний вид; Б – раковины моллюсков. Масштабная линейка – 10 мм.

На филогенетической реконструкции по участку, включающему 5.8S–ITS2, все имеющиеся последовательности *A. arbustorum* формируют единую кладу. Два образца объединяются с улитками из Великобритании и Германии, один – с улитками из Нидерландов (рисунок 45).

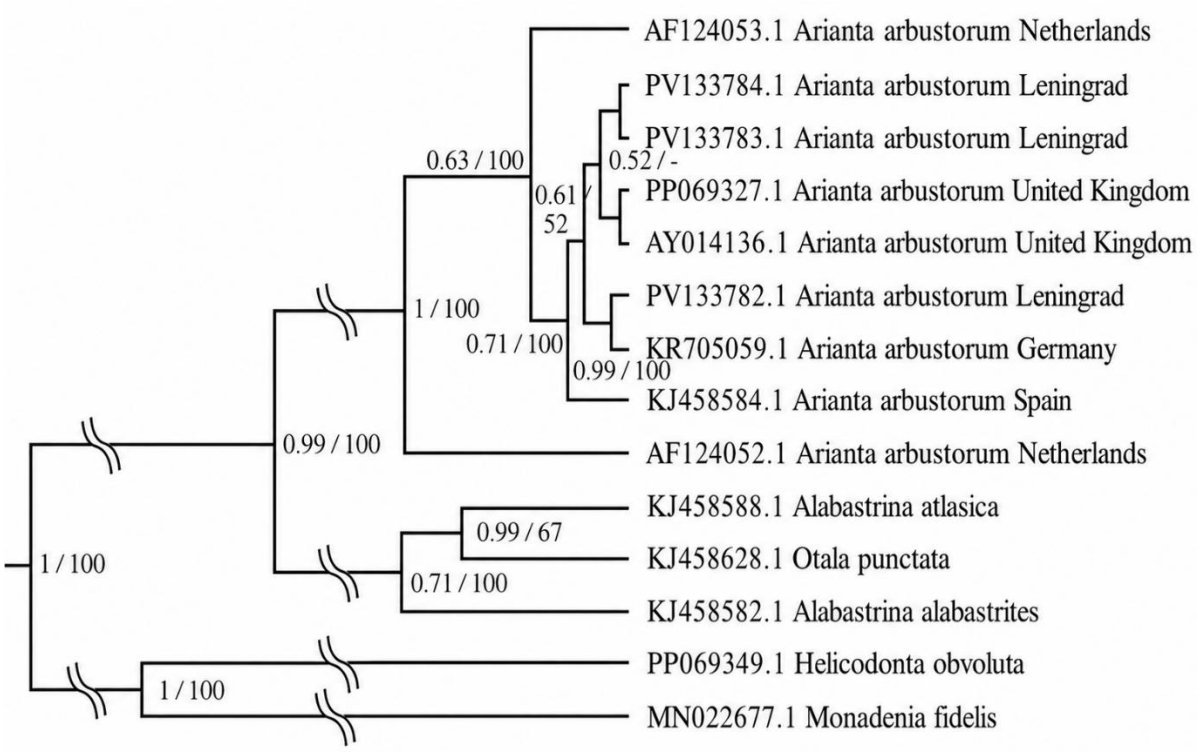


Рисунок 45. Байесовская филогенетическая реконструкция моллюсков *Arianta arbustorum* на основе нуклеотидных последовательностей участка рДНК, включающего последовательности 5.8S–ITS2 (563 п.н.). Дерево, полученное методом максимального правдоподобия, имеет такую же топологию. Указаны значения апостериорных вероятностей для BA и бутстрепные поддержки для 1000 реплик для ML. Обозначены номера использованных последовательностей в GenBank.

Обсуждение к разделу III.1.7

Древесная улитка *Arianta arbustorum* (сем. Helicidae) распространена в Северной и Центральной Европе (Schileyko, 2013) (рисунок 46). Предпочитает широколиственные и мелколиственные пойменные леса, заселяет парки, сады, высокотравье. Встречается также в открытых, достаточно влажных местах. Встречается высоко в горах (до 2500 м) (Gloer, 2002).

На территории России вид является вселенцем. По состоянию на середину XX века арианта обитала в областях Западной Украины, Калининградской области, описаны единичные находки в окрестностях Ленинграда и в Эстонии (Лихарев, Раммельмейер, 1952). В центральной России древесная улитка была описана в 1982 году на территории Московской области (Шилейко, 1982). К настоящему времени *A. arbustorum* встречается в областях как Центральной (Московской, Тверской, Ярославской), так и Северо-Западной части России (Ленинградской,

Новгородской, Псковской, Вологодской) (Шиков, 2022). Для вида характерна большая подвижность и высокая плодовитость (Baur, 1993). Плотность улиток может достигать тысяч экземпляров на квадратный метр. В результате они вытесняют местные виды наземных моллюсков. Также вид является серьёзным вредителем сельскохозяйственных угодий и садово-огородных участков. В природных фитоценозах выедает отдельные виды растений, изменяя видовой состав сообществ (Шиков, 2012).

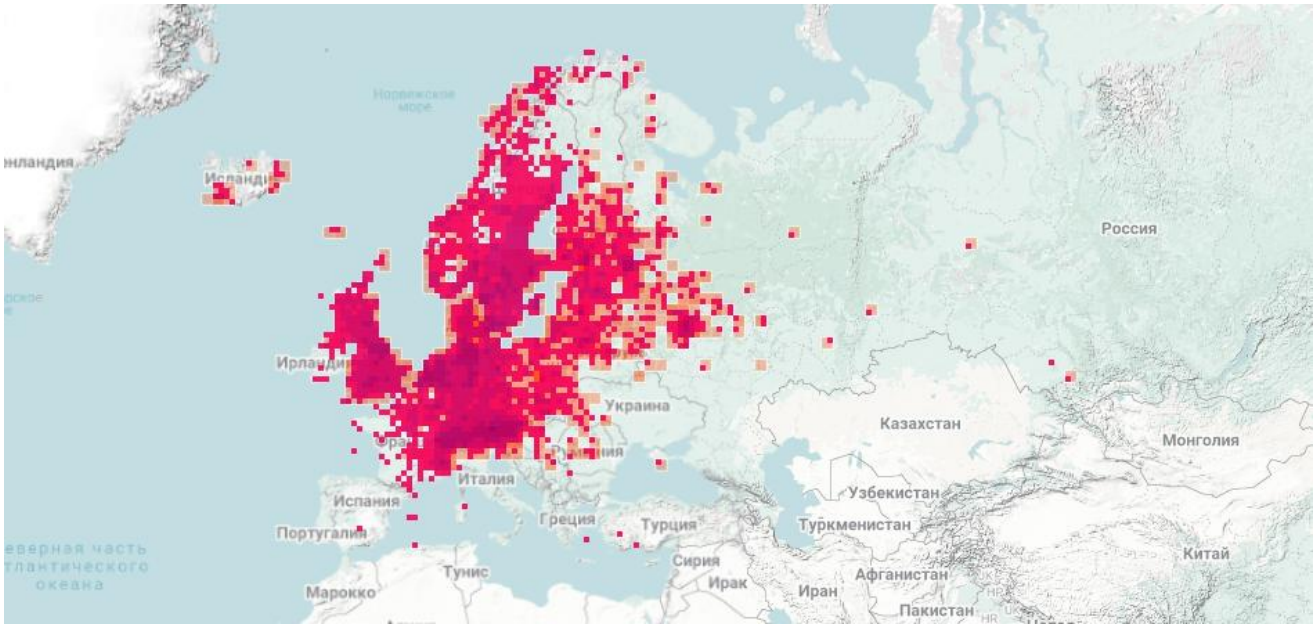


Рисунок 46. Ареал моллюска *Arianta arbustorum*. Карта с сайта iNaturalist (https://www.inaturalist.org).

A. arbustorum хорошо содержится в лабораторных условиях. Массовость распространения и неприхотливость в содержании делают древесную улитку удобным видом и для сравнительно-анатомических и физиологических, этологических исследований (Zhuravlev et al., 1999; Gittenberger et al., 2004; Beese et al., 2006). Немногочисленные исследования, касающиеся паразито-хозяинных отношений с участием *A. arbustorum,* посвящены изучению защитных реакций на заражение нематодами (Skorping, 1984; Williams, Rae, 2015; Rae, 2017) и влияния на жизнеспособность моллюсков и эктопаразитических клещей (Schupbach, Baur, 2008; Schupbach, Baur, 2010). Паразитофауна трематод ариант мало изучена. Описаны случаи обнаружения спороцист трематод *Brachylaima* sp. (сем. Brachylaimidae) в *A. arbustorum*, собранных в Минской области Белоруссии (Щендрик, 2024).

Изучение иммунитета *A. arbustorum* имеет ценность не только для сравнительный иммунологии, но и для практической зоологии. Сведения об иммунных реакциях этих моллюсков могут быть полезны для разработки мер борьбы с этим видом-интродуцентом.

Вид хорошо идентифицируется на основе внешних признаков. Генетические расстояния по участку рДНК между генотипированными представителями из разных географических

популяций небольшие. Похожие данные были получены ранее также по митохондриальным маркерам. В работе Бондаревой и др. было проанализировано 250 образцов ариант, собранных на территории Ленинградской области, и выявлено всего 4 гаплотипа гена *cox1*, различия между которыми составляют одну нуклеотидную замену. При этом общее количество гаплотипов этого митохондриального гена у древесных улиток – 156 (Бондарева и др., 2016). Образцы из Курортного района Санкт-Петербурга на гаплосети близки к образцам из Дании. Анализ гаплотипического разнообразия ариант популяций Восточной Европы также показал их близость к популяциям из Скандинавии (Bondareva et al., 2020).

В то же время, на филогенетических реконструкциях изученные нами образцы *A. arbustorum* из Ленинградской области объединяются с улитками из разных регионов Европы. Такой результат может свидетельствовать от том, что *A. arbustorum* попадала на территорию Ленинградской области из разных источников независимо. Поэтому использование этой улитки в качестве модельного вида требует предварительного анализа генотипического разнообразия популяции, из которой берутся моллюски для сравнительно-иммунологических исследований.

III.1.8. Моллюски *Biomphalaria glabrata* и *B. pfeifferi*

В работе были использованы моллюски *B. glabrata*. Также для анализа клеточных реакций были использованы гистологические срезы моллюсков *B. pfeifferi* лабораторной линии, предоставленные Г. Л. Атаевым.

Поскольку оба вида представлены в работе моллюсками из лабораторных культур, не было необходимости их видовой идентификации. Ниже представлены данные об этих видах, которые характеризуют их как объекты для изучения иммунитета лёгочных моллюсков.

Род *Biomphalaria* (сем. Planorbidae) включает по разным оценкам от 15 до 34 видов (DeJong et al., 2001). Из 34 описанных по морфологическим признакам видов биомфалярий 18 являются промежуточными хозяевами трематод рода *Schistosoma – S. mansoni, S. japonicum, S. intercalatum, S. guineansis, S. mekongi, S. haematobium,* вызывающих различные варианты шистосомозов у человека (Беэр, Воронин, 2011; Colley et al., 2014). Наиболее распространенной и опасной трематодой, паразитирующей у человека, считается *S. mansoni.* По данным ВОЗ этим паразитом заражены более 250 миллионов человек, значительная часть которых – дети (WHO, 2023).

В связи с огромной эпидемиологической значимостью моллюски рода *Biomphalaria* являются объектами многолетних исследований, в том числе сравнительно-иммунологических (см. раздел I.2.1; Атаев и др., 2024а). Контроль численности и распространения биомфалярий рассматривается в качеств одной из мер борьбы с распространением шистосомозов (Sokolov et al., 2016).

Первые данные о механизмах защитных реакций, функциональной активности гемоцитов, молекулярных основах иммунитета пульмонат были получены именно на биомфаляриях (Newton, 1955; см. Атаев и др., 2024а). Для моллюсков рода *Biomphalaria* проанализированы геномы и транскриптомы с поиском в них иммунорелевантных генов и транскриптов соответственно (Abdel-Hamid et al., 2005; см. Атаев и др., 2024а). Основными видами, используемыми в сравнительно-иммунологических исследованиях, являются *B. glabrata* и *B. pfeifferi*.

Моллюски *Biomphalaria glabrata.* Моллюск *Biomphalara glabrata* распространён в Неотропической области. Естественный ареал простирается от Больших Антильских островов до южной Бразилии (Brown, 1994). Периодически фиксируются вселения *B. glabrata* в разные части Карибского архипелага (Pointier et al., 2005). Описаны находки в Египте, где вид гибридизовался с местным видом *B. alexandrina* (рисунок 47). Гибриды заражаются трематодами *Schistosoma mansoni* (Yousif et al., 1998; Kristensen et al., 1999).

Рисунок 47. Ареал моллюсков *Biomphalaria glabrata*. Карта с сайта iNaturalist (https://www.inaturalist.org).

Biomphalaria glabrata предпочитает небольшие реки, ручьи, пруды и болота (Brown, 1994). Способна переживать длительные периоды пересыхания и анаэробные условия (Von Brand, 1950). Неприхотливость содержании сделала *B. glabrata* одним из основных культивируемых в лаборатории видов. По количеству работ, посвящённых этому объекту исследования, *B. glabrata* можно сравнить с такими модельными видами беспозвоночных как *Drosophila melanogaster* (Insecta) и *Caenorhabditis elegans* (Nematoda).

Моллюски *B. glabrata* культивируются в лабораториях более полувека (см. Прохорова, Атаев, 2008). За это время посредством направленного отбора были выведены линии, для которых характерна разная степень восприимчивости к инвазии трематодами разных видов (Newton, 1955; Lewis et al., 2001; Oliveira et al., 2010a). В работах по гибридизации биомфалярий различных линий впервые были получено подтверждение существования «генов резистентности» и генетических основ формирования защитных реакций (Richards, 1970; Richards, 1980; Richards, 1984).

По указанным выше причинам, рассмотрение общих закономерностей иммунных реакций пульмонат невозможно без использования *B. glabrata*. В нашей работе были использованы моллюски *B. glabrata* лабораторной бразильской линии BS-90 (Paraense, Correa, 1963), которые были предоставлены Г. Л. Атаеву коллегами из Университета Перпиньяна (Франция) в 2000 году. С тех пор моллюски содержатся в лаборатории экспериментальной зоологии РГПУ им. А. И. Герцена (рисунок 48).

Рисунок 48. Моллюски *Biomphalaria glabrata* лабораторной бразильской линии. Масштабная линейка – 1 см.

Моллюски *Biomphalaria pfeifferi*. Ареал моллюска *Biomphalaria pfeifferi* (сем. Planorbidae) включает Западную, Восточную и Южную Африку (Brown, 1994) (рисунок 49). Максимальная встречаемость – в тропическом поясе. Описаны случаи обнаружения на севере

Западной Африки, Аравийском полуострове и на Мадагаскаре, где этот вид является инвазивным в результате деятельности человека (Charbonnel et al., 2002).

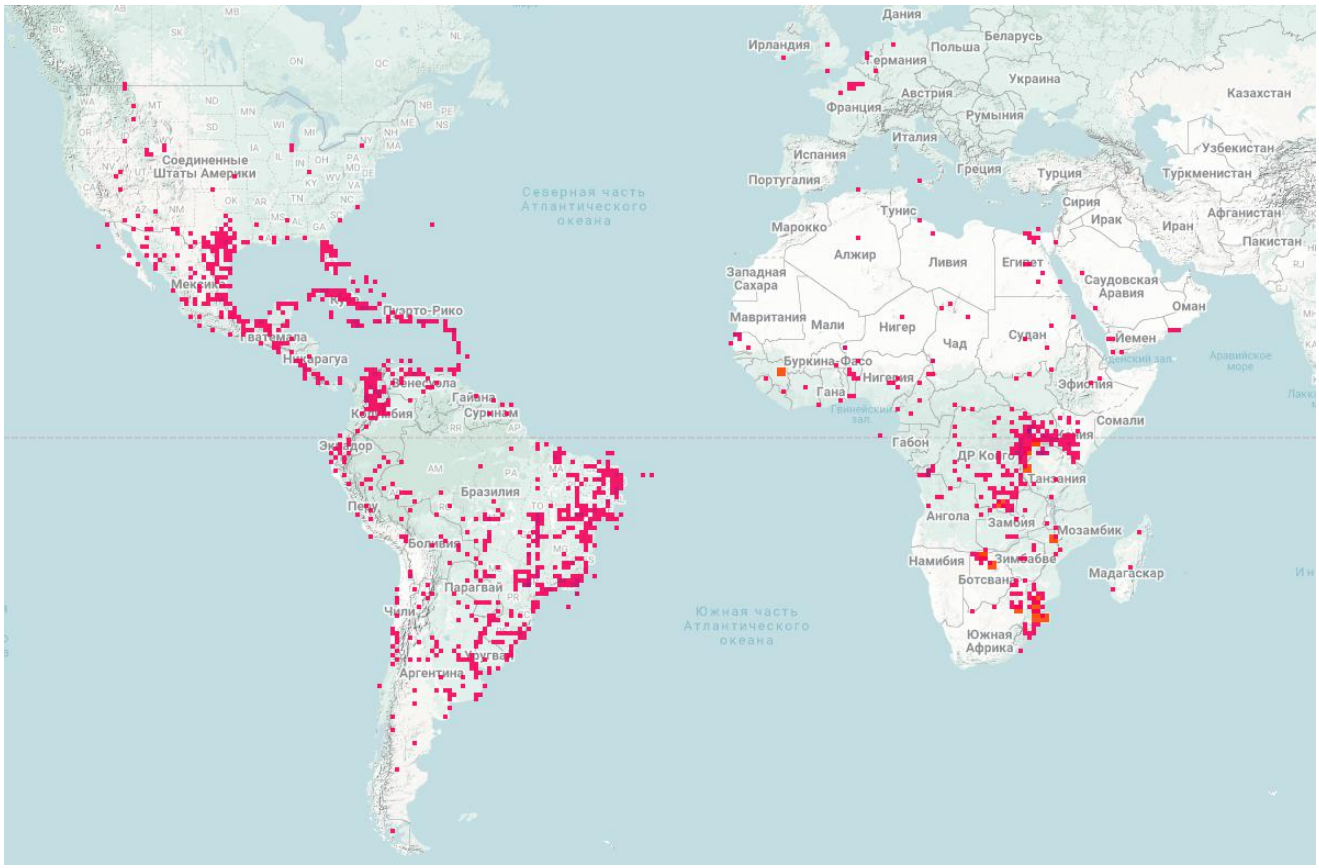


Рисунок 49. Ареал моллюсков *Biomphalaria pfeifferi*. Карта с сайта iNaturalist (https://www.inaturalist.org).

Вид встречается во всех типах пресных водоёмов, но предпочитает стоячие водоёмы и водоёмы с медленным течением. Не обитает во временных и пересыхающих водоёмах. Оптимальный диапазон температур обитания составляет 20–25°C. Однако может жить в местах с колебаниями температур от 8 до 30 °C (de Kock et al., 2004).

Так как *B. pfeifferi* является основным промежуточным хозяином трематод *Schistosoma mansoni* в Африке, её распространение в новые регионы привело к появлению и росту заболеваемости в них шистосоматозом (Picquet et al., 1996; Pointier et al., 2005). Экстенсивность инвазии *Biomphalaria pfeifferi* трематодами *Schistosoma mansoni* в природных популяциях достигает 50% (Frandsen, 1979).

Несмотря на огромную эпидемиологическую значимость *Biomphalaria pfeifferi*, основные работы по изучению паразито-хозяинных отношений биомфалярий с шистосомами, выполнены на другом виде – *B. glabrata*. Это связано с тем, что в отличие от *B. glabrata* моллюски *B. pfeifferi* плохо содержатся в лабораторных условиях. Поэтому большинство исследований выполнено на моллюсках *B. pfeifferi*, заражённых трематодами в естественных условиях. В ряде случаев для экспериментального заражения и исследования используются

улитки, содержащиеся в лаборатории непродолжительное время (Opiyo, 2020; Ataev, 2023). Для *B. pfeifferi* получены полный геном и транскриптом (Buddenborg et al., 2017; Bu et al., 2023), определены критерии для видовой идентификации (Tian-Bi et al., 2013).

Систематическая и физиологическая близость двух видов биомфалярий, делает *B. pfeifferi* связующим звеном между *B. glabrata* и другими исследуемыми модельными видами планорбид из природных популяций. Поэтому этот вид был включён в исследование.

Для моллюсков из природных популяций была подтверждена принадлежность к предполагаемым видам. Кроме того, для исследуемых популяций видов Planorbarius corneus, Planorbis planorbis, Lymnaea stagnalis, Succinea putris, Arianta arbustorum, Cochlicopa lubrica показан небольшой генотипический полиморфизм по исследуемым маркерам. Это позволяет рассматривать эти виды в качестве модельных объектов для изучения иммунитета лёгочных моллюсков, выявления общих закономерностей иммунных реакций и их видовых особенностей.

III.2. ГЕМОЦИТЫ КАК СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ ВРОЖДЁННОГО ИММУНИТЕТА ЛЁГОЧНЫХ МОЛЛЮСКОВ

Гемоциты являются основными эффекторными элементами иммунных реакций лёгочных моллюсков. В данном разделе рассмотрены представления о морфологических типах, численности, функциональной активности и механизмах пополнения пула гемоцитов.

III.2.1. Основные морфологические типы гемоцитов

Микроскопический анализ. Был изучен клеточный состав гемолимфы моллюсков семи модельных видов (таблица 28).

В мазках гемолимфы и гистологических препаратах у моллюсков исследованных видов присутствуют клетки двух основных типов – гранулоциты и гиалиноциты (рисунки 50–60).

Гранулоциты – крупные клетки, обладающие хорошей способностью к распластованною на субстрате, активно формируют лобоподиии и филоподии. Форма клетки, размер и количество цитоплазмы значительно варьируют. Ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) составляет от 0.07 до 0.13. Во внутреннем слое цитоплазмы гранулоцитов содержится разное количество гранулы и везикул. Ядро овальной или бобовидной формы, обычно расположено эксцентрично и содержит хорошо заметные гранулы гетерохроматина. Во время наблюдения во влажной камере гранулоциты проявляют подвижность, перемещаясь и изменяя форму (рисунки 60, 75, 76). Формируют небольшие скопления и большие агрегации (рисунки 76, 77, 78, 79).

Гиалиноциты – клетки овальной или округлой формы, обладающие слабой способностью к распластыванию на субстрате. Иногда формируют лобоподии. Гиалиноциты почти всегда мельче гранулоцитов. ЯЦО варьирует от 0.19 до 0.81.

Все гемоциты имеют хорошо развитый актиновый цитоскелет, обеспечивающий поддержание формы (рисунки 51, 56). Микротрубочки, выявляемые специфическими антителами к тубулину, также образуют развитую сеть, особенно в гранулоцитах (рисунок 51). Размерные характеристики гранулоцитов и гиалиноцитов моллюсков модельных видов представлены в таблице 28.

Анализ ультраструктуры гемоцитов подтверждает их разделение на два типа (рисунок 54). Ядро гранулоцитов моллюска *Biomphalaria glabrata* бобовидное или трехлопастное. В ядре заметны большие глыбки гетерохроматина, который сконцентрирован преимущественно под ядерной оболочкой. Ядрышко отсутствует. Цитоплазма гранулоцитов богата органеллами. В центре клетки расположены небольшие диктиосомы, мультивезикулярные тела, митохондрии и развитый гранулярный эндоплазматический ретикулум (ЭПР). В цитоплазме заметны свободные рибосомы и небольшие скопления гранул гликогена.

Таблица 28. Размерные характеристики гемоцитов моллюсков модельных видов

Виды моллюсков	Гранулоциты		Гиалиноциты	
	Диаметр клетки (мкм)	Диаметр ядра (мкм)	Диаметр клетки (мкм)	Диаметр ядра (мкм)
Biomphalaria glabrata (n=78)	14.03±4.5 × 27.57±6.6	7.14±1.18	7.21±1.01	3.61±1.19
Planorbarius corneus (n=463)	10.2±5.61 × 15.94±7.79	4.10±2.79 × 5.19±2.34	6.43±1.82 × 8.22±1.65	2.59±1.04 × 3.36±1.34
Planorbis planorbis (n=87)	16.64±4.74	6.48±2.40	6.59±2.38	4.19±0.81
Lymnaea stagnalis (n=54)	22.03±3.67 × 40.89±6.01	9.10±1.78 × 11.29±2.16	12.07±0.95 × 15.62±1.41	6.12±0.81
Succinea putris (n=76)	18.03±5.31	8.56±1.56	10.89±1.23	8.03±0.61
Cochlicopa lubrica (n=27)	11.03±2.6	4.14±1.8	6.01±1.23	3.93±1.1
Arianta arbustorum (n=123)	24.35±8.6	13.22±2.35	14.03±3.11	4.93±1.34
ЯЦО	0.07–0.13		0.19–0.81	

Ядро гиалиноцитов округлое, хроматин более диффузный, ядрышко хорошо выражено. Ядро чаще расположено ацентрично. В цитоплазме располагаются многочисленные свободные рибосомы, аппарат Гольджи, немногочисленные митохондрии. В гиалиноцитах никогда не обнаруживаются скопления гранул гликогена.

Для гемоцитов обоих типов характерна значительная вариабельность размеров, ЯЦО и других морфологических параметров. Некоторые клетки имеют промежуточный морфотип. Например, встречаются хорошо распластывающиеся на субстрате клетки (подобно гранулоцитам), но в их цитоплазме отсутствуют гранулы (рисунки 50, 52). Также в мазках присутствуют клетки овальной формы, с большим ЯЦО, однако в их цитоплазме есть хорошо заметные вакуоли (рисунки 50, 55).

При наблюдении за гемоцитами во влажной камере одна и та же клетка может иметь разную форму и морфометрические параметры на разных сроках инкубирования (рисунок 60). Поэтому на основе морфологического анализа живых клеток сложно посчитать средние размеры гемоцитов разных типов, а также их соотношение.

Использование фиксированных и окрашенных мазков гемолимфы позволяет более объективно оценить размеры клеток и соотношение гемоцитов разных морфологических типов.

Сведения о соотношении гемоцитов и гранулоцитов по данным морфологического анализа представлены в таблице 30.

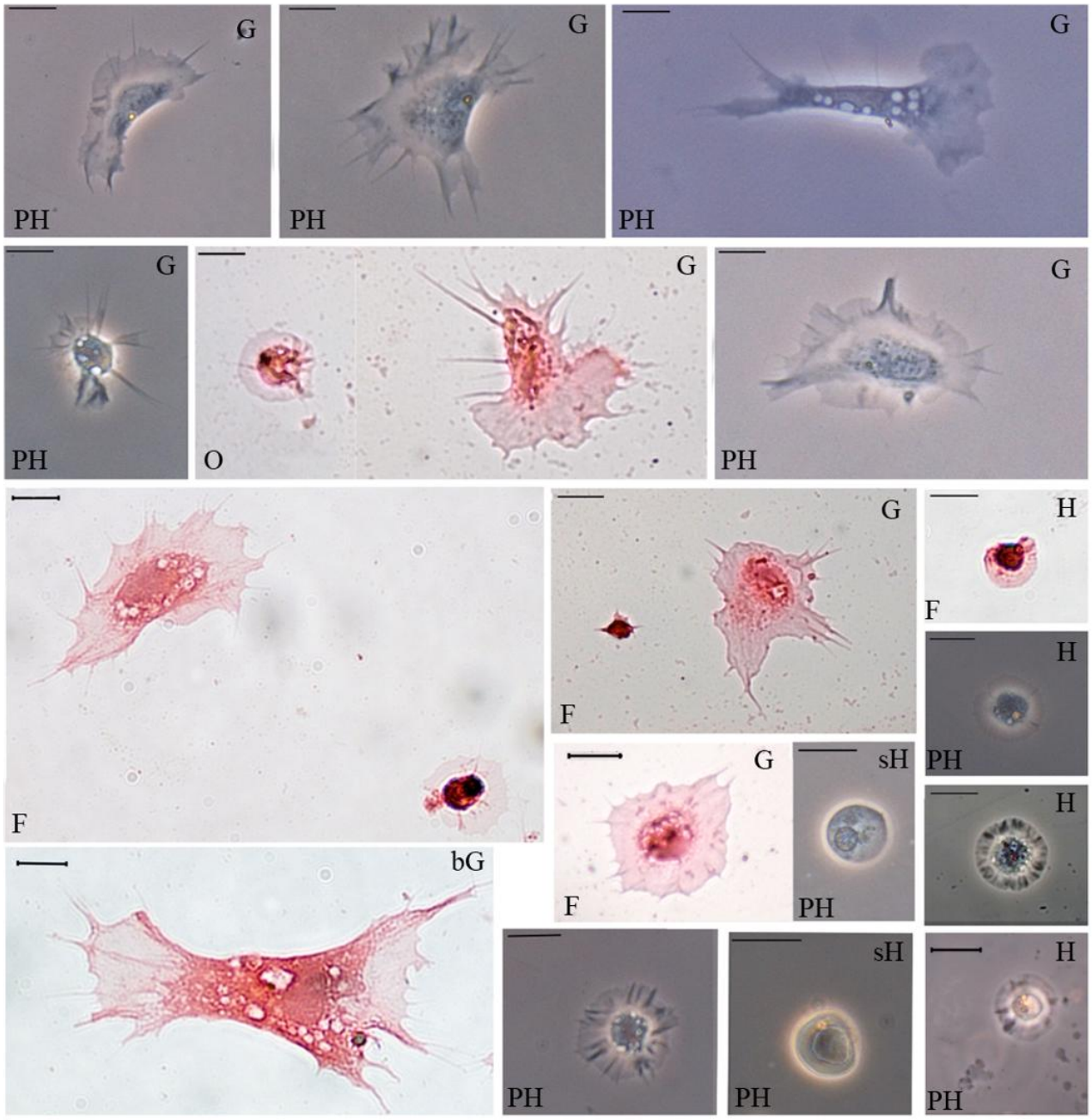


Рисунок 50. Гемоциты моллюсков *Planorbarius corneus.* Условные обозначения (здесь и далее): PH – живые гемоциты, сфотографированные в режиме фазового контраста; F – гемоциты в фиксированных мазках, окрашенные гематоксилин-эозином и сфотографированные в режиме светлого поля); G – гранулоциты; H – гиалиноциты; bG – крупные гранулоциты; sH – малые гиалиноциты. Масштабная линейка – 7 мкм. Морфологический тип не обозначен для клеток, имеющих промежуточную между гранулоцитами и гиалиноцитами морфологию.

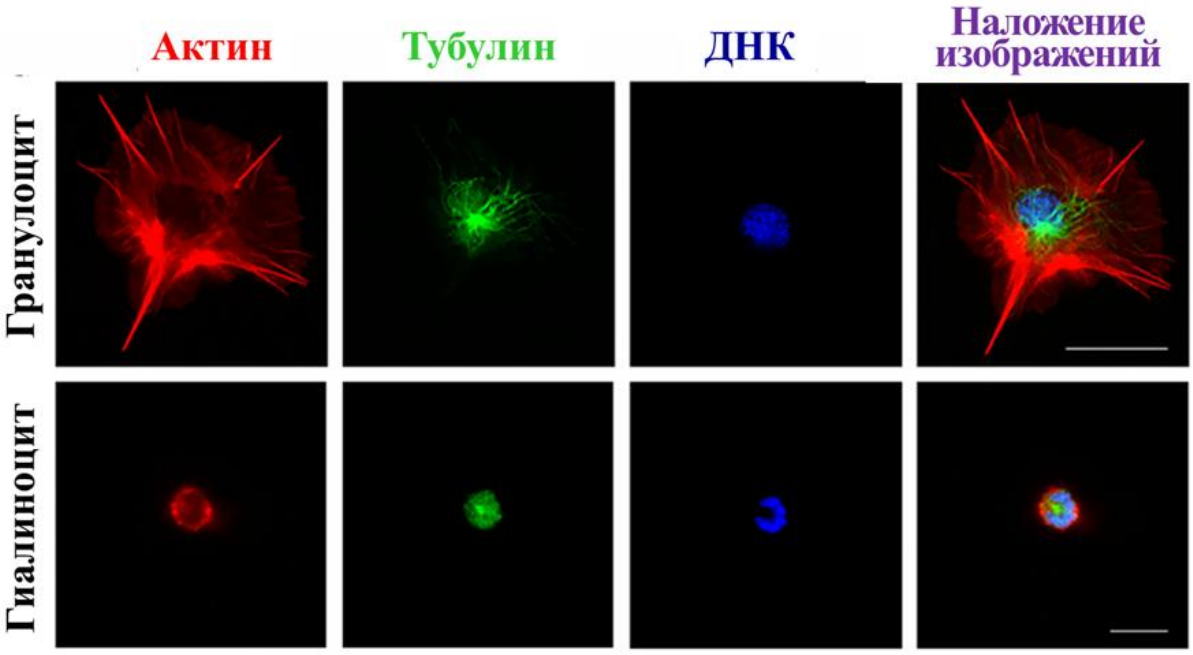


Рисунок 51. Гемоциты моллюсков *Planorbarius corneus*, сфотографированные в режиме флуоресценции, после окрашивания флуоресцентными красителями фаллоидин-родамином (красный), красителем Hoechst (синий) и антителами к тубулину (зелёный). Масштабная линейка – 7 мкм (по: Serebryakova, Tokmakova, Prokhorova, Ataev, 2022).

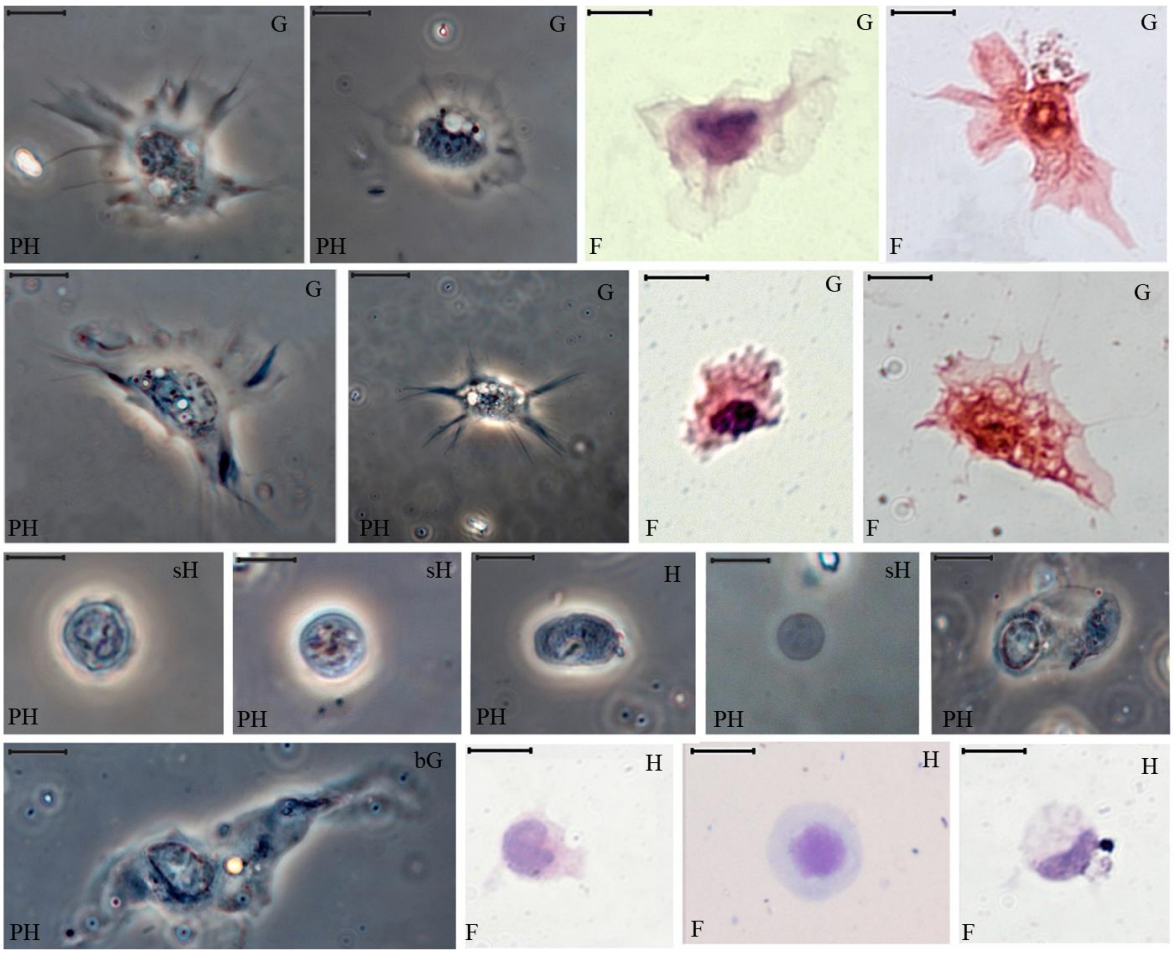


Рисунок 52. Гемоциты моллюсков *Planorbis planorbis.* Условные обозначения: см. рисунок 50. Масштабная линейка – 7 мкм.

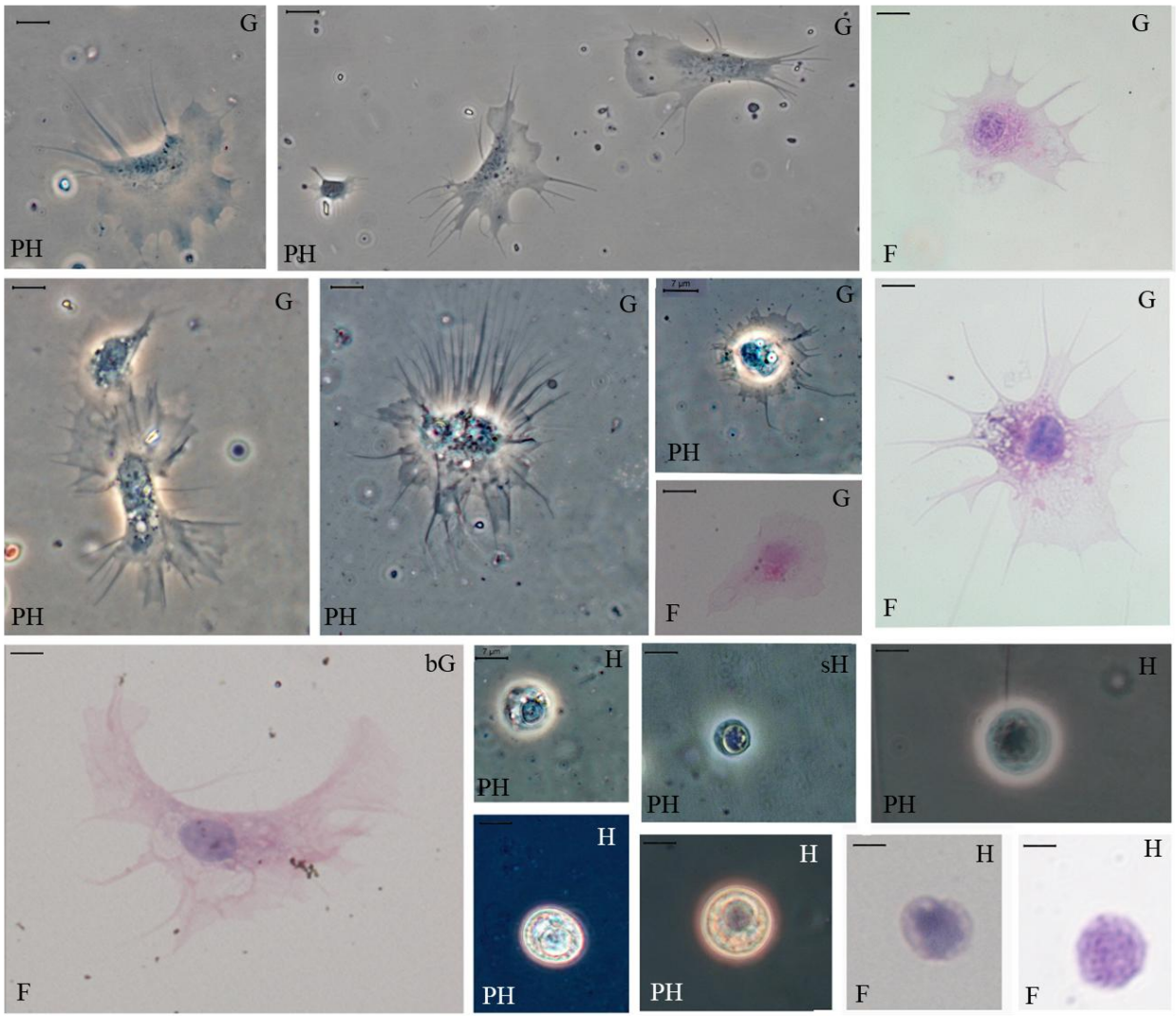


Рисунок 53. Гемоциты моллюсков *Biomphalaria glabrata.* Условные обозначения: см. рисунок 50. Масштабная линейка – 7 мкм.

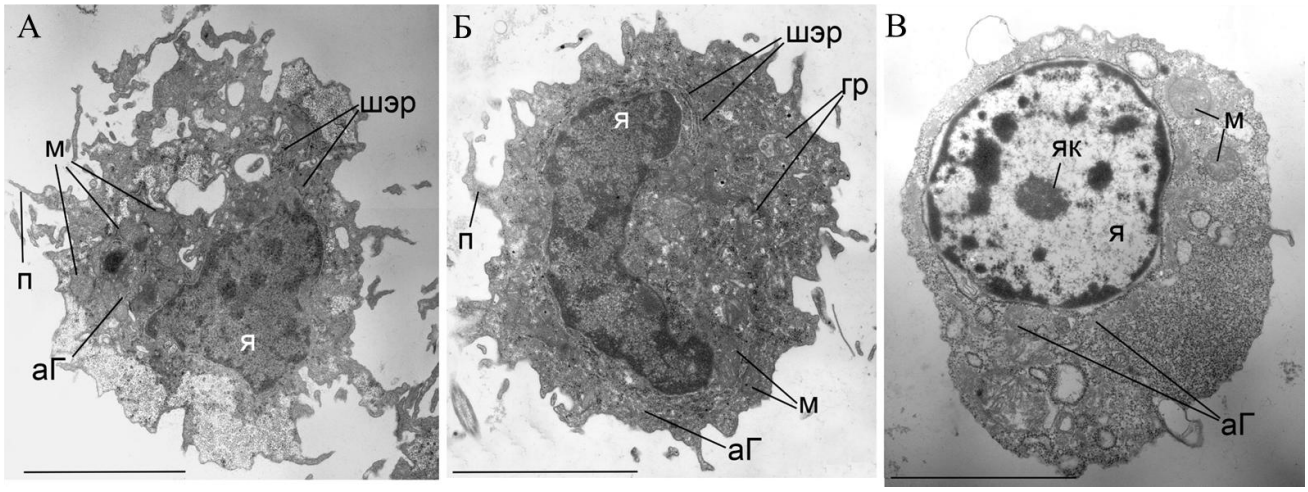


Рисунок 54. Трансмиссионные электронные микрофотографии гемоцитов моллюска *Biomphalaria glabrata.* А, Б – гранулоциты; В – гиалиноцит. Условные обозначения: аГ – аппарат Гольджи; гр – гранулы; м – митохондрия; п – псевдоподия; шэр – шероховатый эндоплазматический ретикулум; я – ядро; як – ядрышко. Масштабная линейка – 2 мкм (по: Prokhorova et al., 2018).

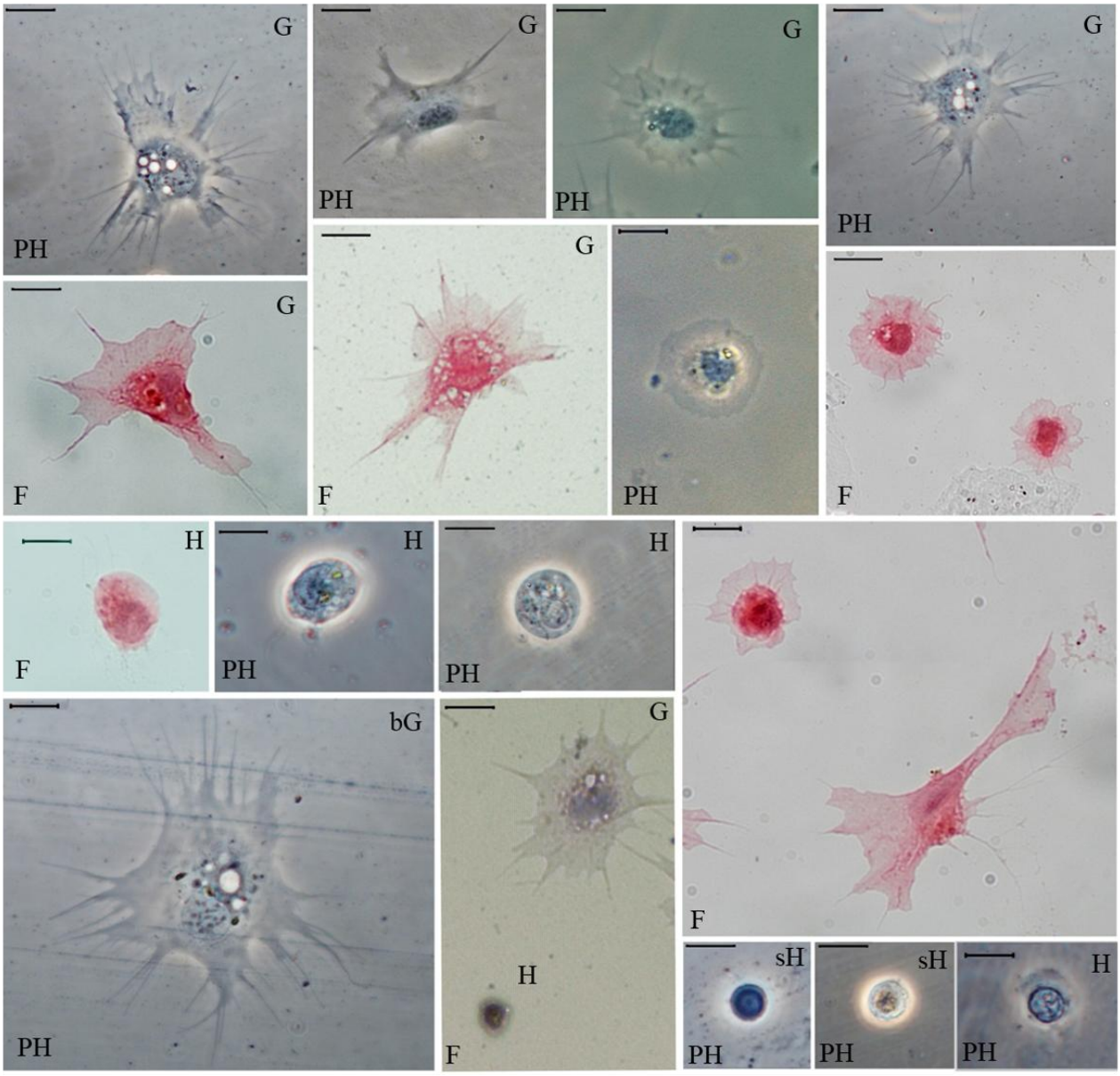


Рисунок 55. Гемоциты моллюсков *Lymnaea stagnalis.* Условные обозначения: см. рисунок 50. Масштабная линейка – 7 мкм.

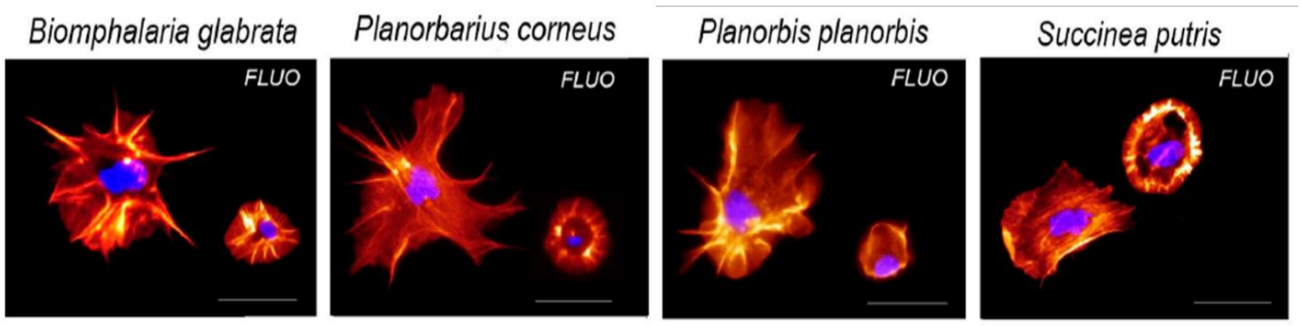


Рисунок 56. Гемоциты моллюсков, окрашенные флуоресцентными красителями: фаллоидин-родамином (красный) и Hoechst (синий) Условные обозначения: FLUO – фотографирование в режиме флуоресценции. Масштабная линейка – 10 мкм (по: Tokmakova, Serebryakova, Prokhorova, Ataev, 2020).

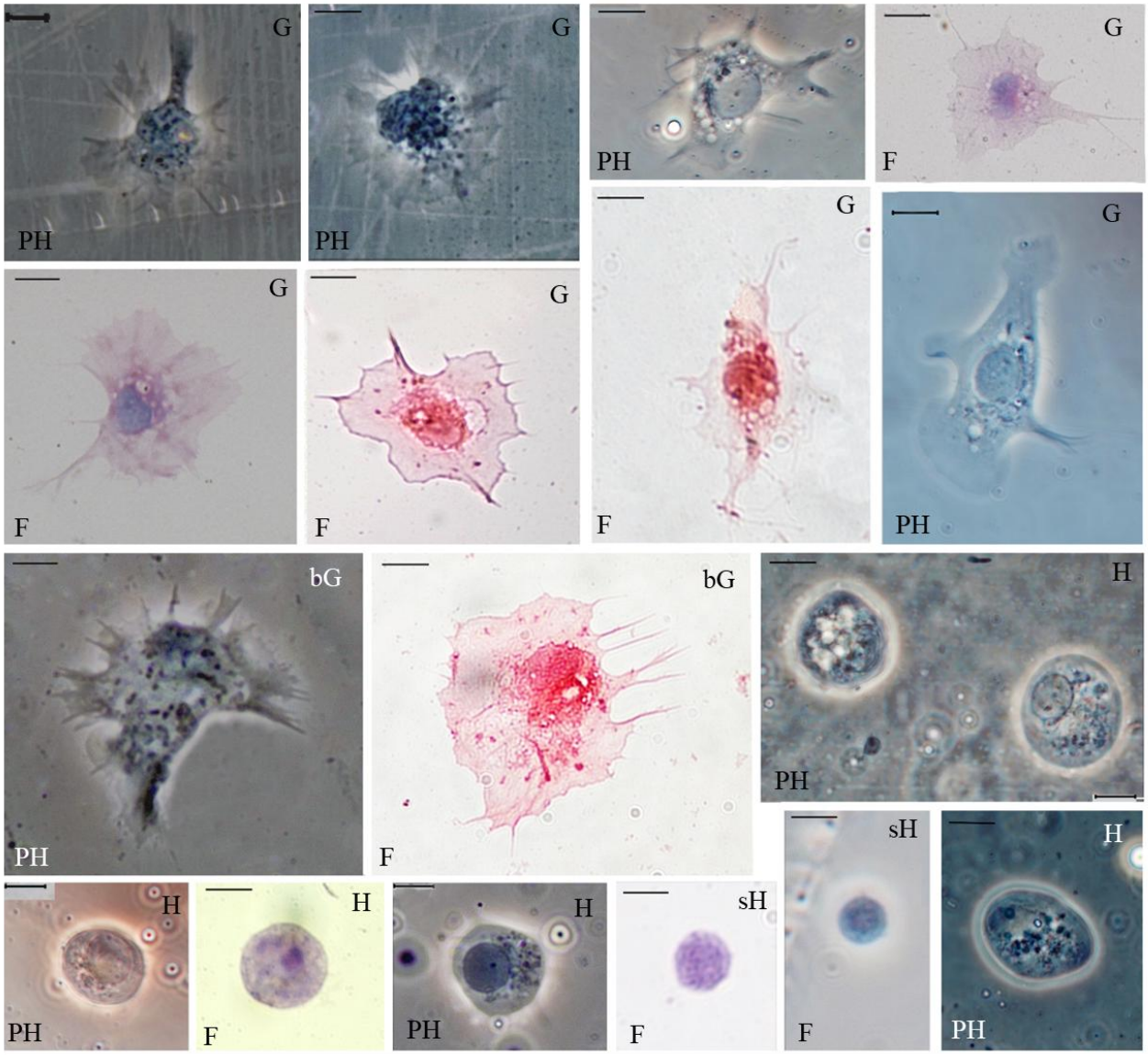


Рисунок 57. Гемоциты моллюска *Arianta arbustorum.* Условные обозначения (здесь и далее): PH – живые гемоциты, сфотографированные в режиме фазового контраста; F – гемоциты в фиксированных мазках, окрашенные гематоксилин-эозином и сфотографированные в режиме светлого поля); G – гранулоциты; H – гиалиноциты; bG – крупные гранулоциты; sH – малые гиалиноциты. Масштабная линейка – 7 мкм.

Морфологические особенности гемоцитов и их соотношение варьируют у моллюсков разных видов. Гранулоциты пресноводных улиток (*Biomphalaria glabrata, Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis, Lymnaea stagnalis*) представлены преимущественно клетками с низким ЯЦО, и соответственно – обильной цитоплазмой. Они часто формируют филоподии, длина которых может превышать диаметр основного объёма клетки (рисунки 50, 52, 53, 55). Гранулоциты моллюсков *Planorbis planorbis* вакуолизированы сильнее, чем у других планорбид (рисунок 52). Гранулоциты моллюсков наземных видов (*Succinea putris, Cochlicopa lubrica, Arianta arbustorum)* формируют меньше филоподий и медленнее распластываются на субстрате (рисунки 57, 58, 59).

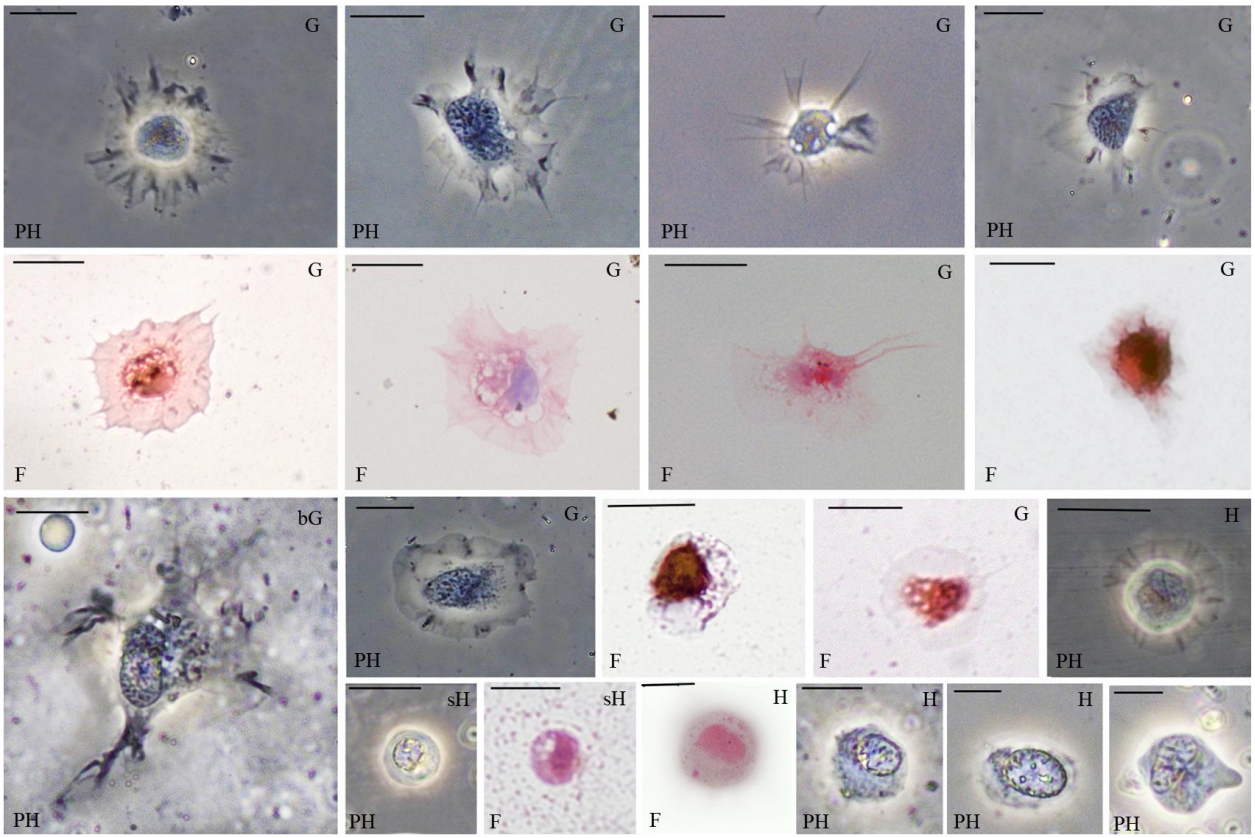


Рисунок 58. Гемоциты моллюсков *Succinea putris.* Условные обозначения: см. рисунок 57. Масштабная линейка – 7 мкм.

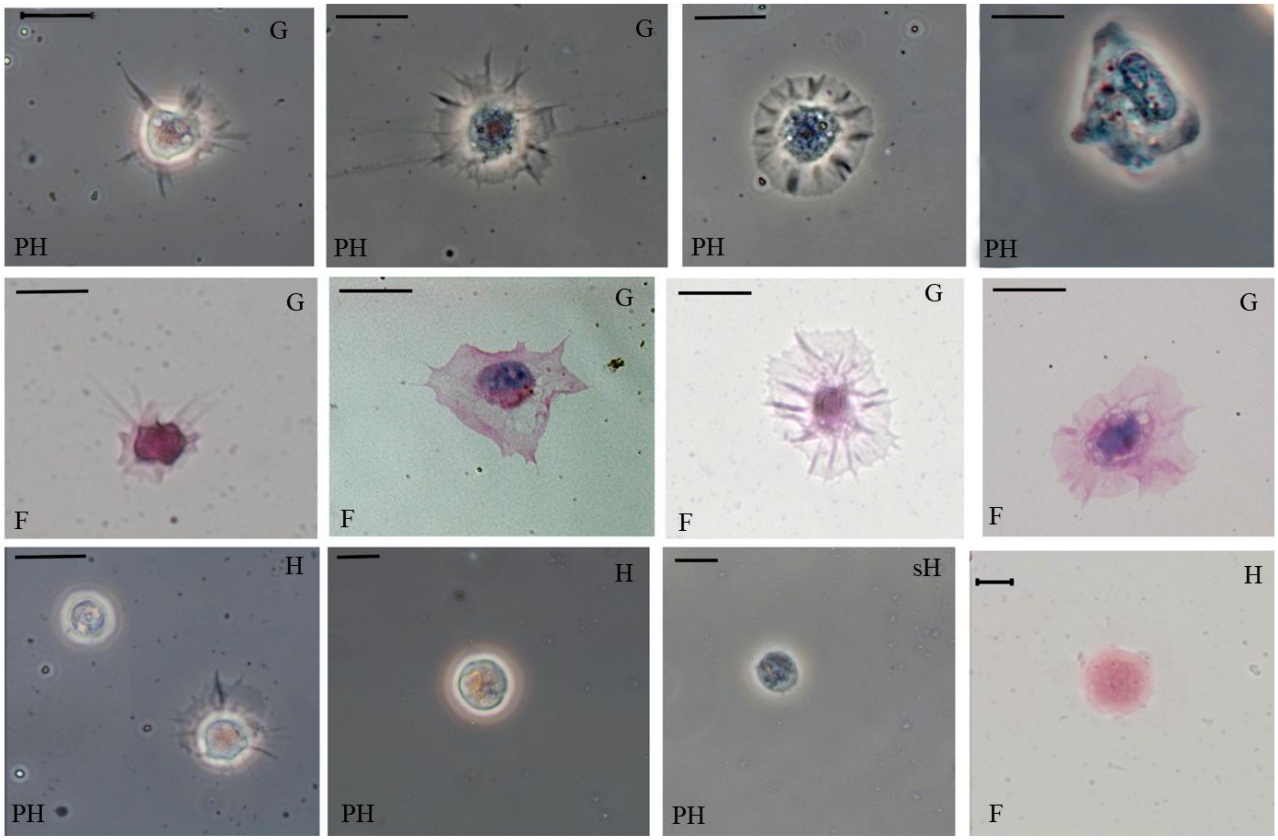


Рисунок 59. Гемоциты моллюсков *Cochlicopa lubrica*. Условные обозначения: см. рисунок 57. Масштабная линейка – 7 мкм.

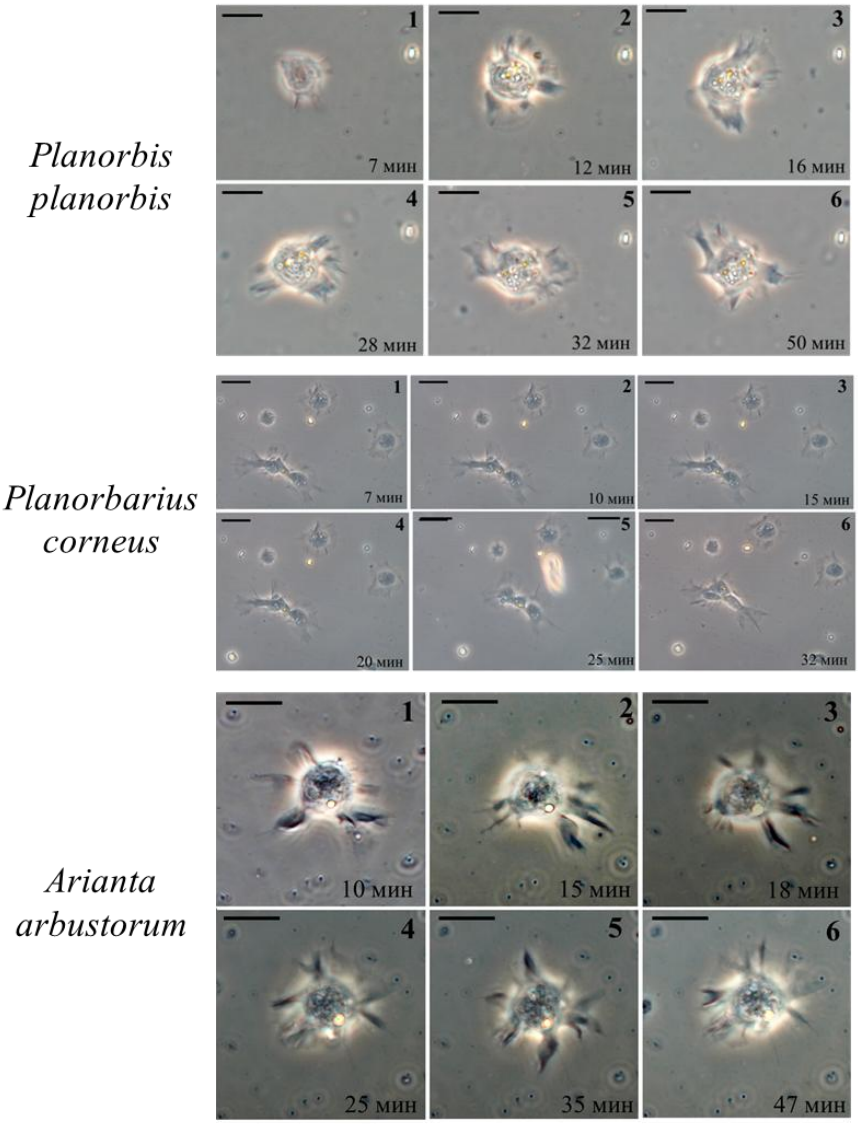


Рисунок 60. Изменение формы гемоцитов моллюсков модельных видов в процессе инкубирования во влажной камере. 1–6 – серия последовательных фотографий в режиме фазового контраста. Указано время от начала инкубирования. Масштабная линейка – 7 мкм.

Отдельно следует отметить гиалиноциты с очень высоким ЯЦО (до 0.9). Они составляют 0.46–1.5 % от гемоцитов в мазках. В связи с тем, что они в среднем мельче типичных гиалиноцитов, для их обозначения мы используем название «малые гиалиноциты» (рисунки 50, 52, 53, 55, 58, 59).

Среди гранулоцитов, напротив, встречаются клетки, размеры которых (до 40 мкм) превышают средние размеры гранулоцита за счёт обильной цитоплазмы (рисунки 50, 52, 55, 57, 58). Крупные гранулоциты чаще встречаются в окрашенных мазках, а также в препаратах гемолимфы, которые длительное время инкубировали во влажной камере (Прохорова, 2009).

Цитофлуориметрический анализ и сортировка гемоцитов. С целью повышения объективности выделения типов циркулирующих гемоцитов пульмонат был проведён цитофлуориметрический анализ гемолимфы нескольких основных модельных объектов. Для

этого исследования отобрали моллюсков, у которых возможно получить достаточный объём гемолимфы.

Первоначально по данным прямого и бокового светорассеивания (FS и SS, характеризуют размер и гранулярность клеток соответственно) на проточном цитометре Coulter Epics Altra удалось выделить две основные популяции гемоцитов в гемолимфе моллюсков *Planorbarius corneus* (n=47) и *Biomphalaria glabrata* (n=34): клетки с небольшими FS и SS и клетки с бóльшими параметрами FS и SS.

Выделяемые по данным цитофлуориметрического анализа популяции гемоцитов были обозначены как популяция A и популяция B (рисунок 61). Популяция A включает клетки относительно небольшого размера с небольшим числом гранул в цитоплазме, что соответствует морфологическим особенностям гиалиноцитов. Клетки популяции B более крупные и имеют более структурированную и гранулированную цитоплазму, что соответствует выделяемым на основе морфологических признаков гранулоцитам.

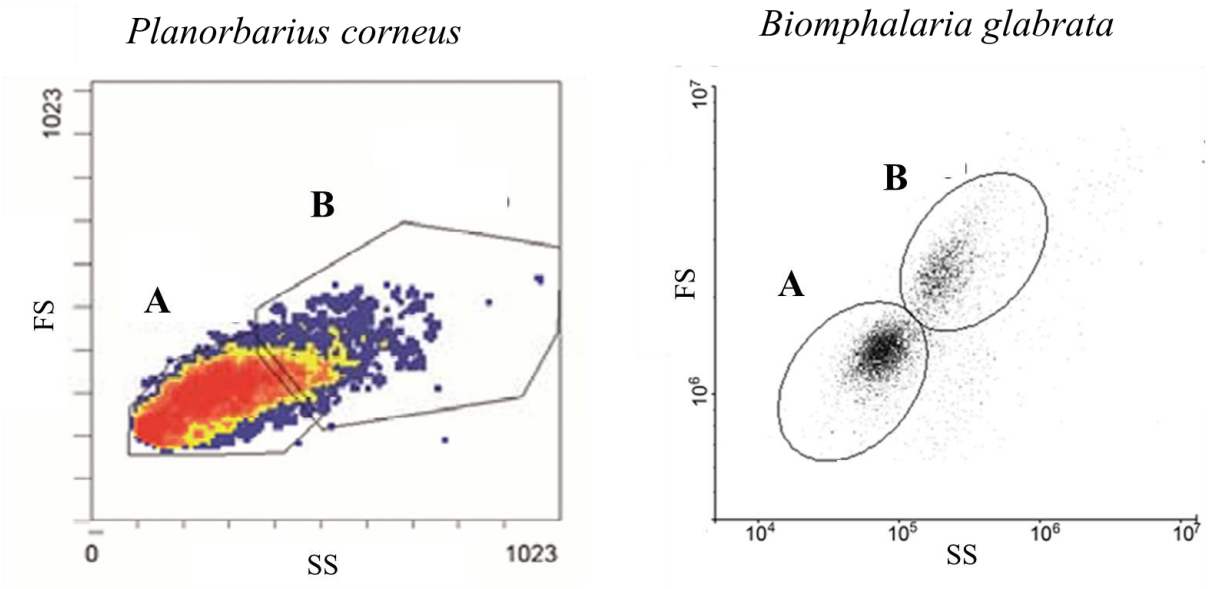


Рисунок 61. Цитофлуорграммы гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus* и *Biomphalaria glabrata*. Обозначены популяции гемоцитов, отличающиеся по параметрам прямого (FS) и бокового светорассеяния (SS). (по: Ataev, Prokhorova et al., 2016; Prokhorova et al., 2018, с изменениями).

С целью стандартизации метода определения гемоцитарной формулы у лёгочных моллюсков было выполнено цитометрическое исследование гемолимфы у бóльшей выборки. Также в работу были добавлены другие пресноводные виды – *Planorbis planorbis* и *Lymnaea stagnalis.* В результате было установлено, что у большинства особей гранулоциты представлены не единой популяцией, а двумя группами клеток – более крупные и гранулярные (популяция B), и более мелкие и сильнее варьирующие по степени по степени гранулярности (популяция C) (рисунки 62, 63).

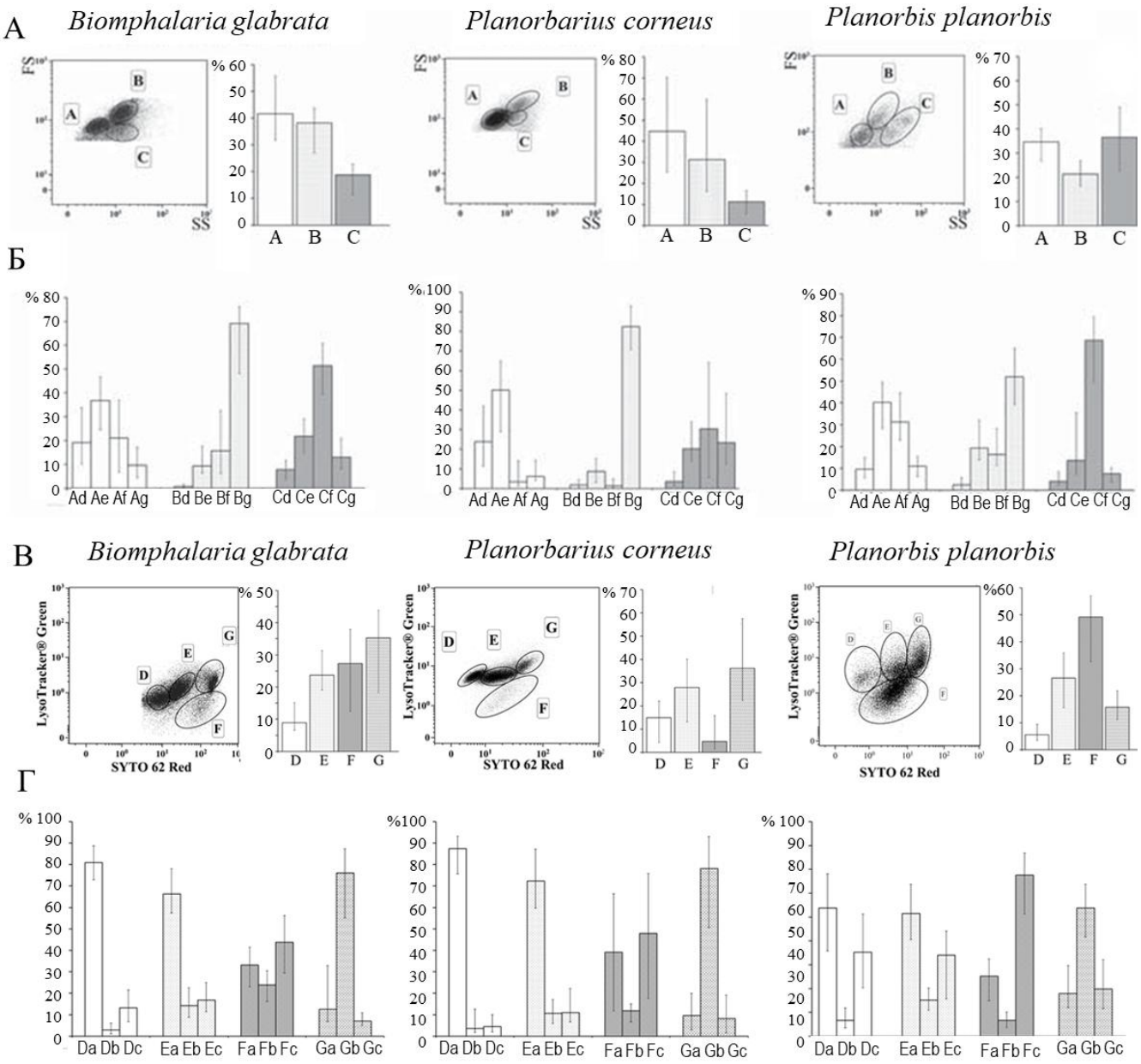


Рисунок 62. Популяции клеток гемолимфы моллюсков *Biomphalaria glabrata*, *Planorbis planorbis* и *Planorbarius corneus* (сем. Planorbidae), выявляемые при цитофлуориметрическом анализе. А – популяции гемоцитов, отличающиеся по параметрам прямого и бокового светорассеяния и их соотношение в гемолимфе улиток; Б – субпопуляции гемоцитов, определяющиеся при последующем гейтировании популяций гранулоцитов и гиалиноцитов по параметрам поглощения красителей Syto62 и LysoTracker и их относительное количество среди клеток пула; В – популяции гемоцитов, отличающиеся по параметрам поглощения красителей Syto62 и LysoTracker и их относительное содержание в гемолимфе улиток; Г – субпопуляции гемоцитов, определяющиеся при последующем гейтировании выделенных клеточных фракций по параметрам прямого и бокового светорассеяния и их соотношение. Условные обозначения: A – гиалиноциты; B, C – популяции гранулоцитов; D, E, F, G – популяции гемоцитов, выделяемые по накоплению красителей. На гистограммах по оси абсцисс обозначены популяции гемоцитов, по оси ординат указан процент клеток от общего количества в циркуляции (Me (K1; K3)). На цитограммах обозначены: FS – прямое светорассеивание; SS – боковое светорассеивание; Syto62, LysoTracker – интенсивность флуоресценции красителей. (по: Прохорова и др., 2018, с изменениями).

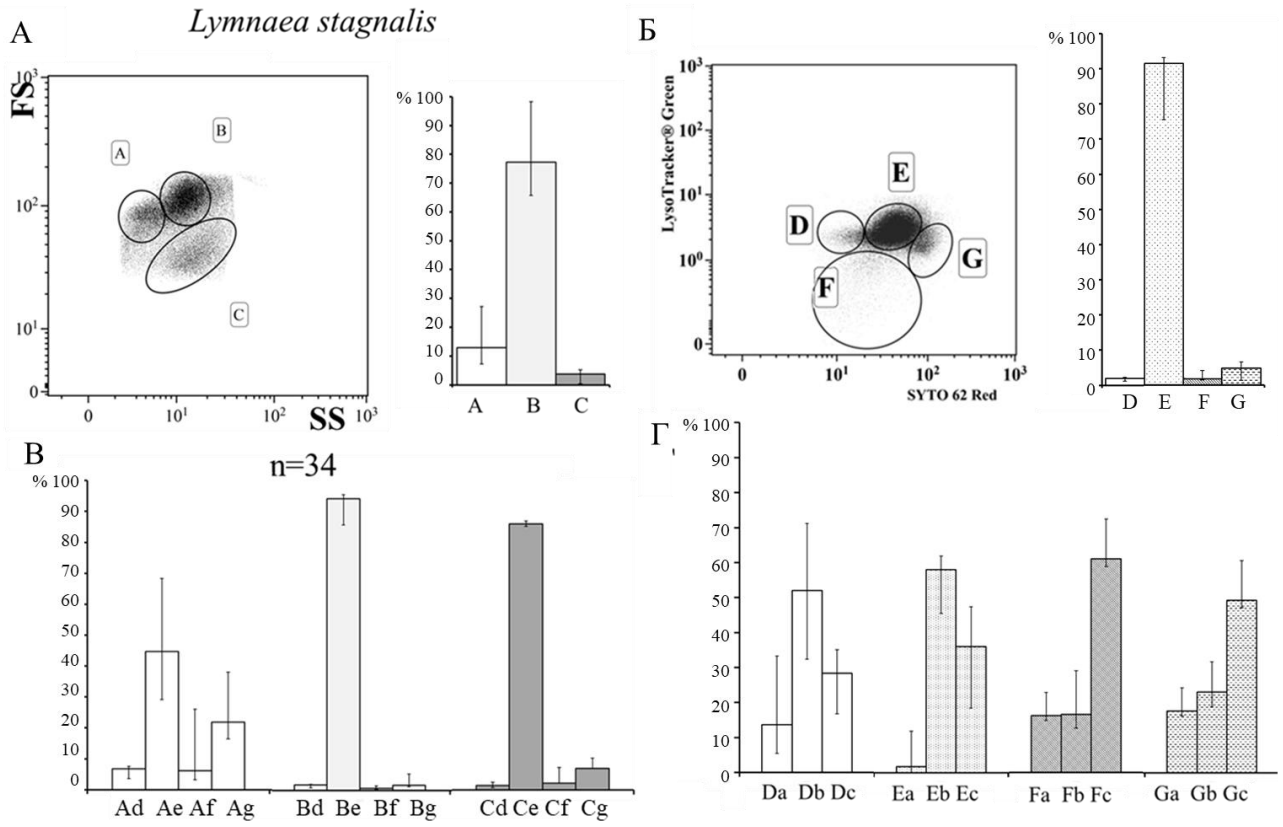


Рисунок 63. Популяции клеток гемолимфы моллюска *Lymnaea stagnalis* (сем. Lymneidae), выявляемые при цитофлуориметрическом анализе. А – популяции гемоцитов, отличающиеся по параметрам прямого и бокового светорассеяния и их соотношение в гемолимфе улиток; Б – субпопуляции гемоцитов, определяющиеся при последующем гейтировании популяций гранулоцитов и гиалиноцитов по параметрам поглощения красителей Syto62 и LysoTracker и их относительное количество среди клеток пула; В – популяции гемоцитов, отличающиеся по параметрам поглощения красителей Syto62 и LysoTracker и их относительное содержание в гемолимфе улиток; Г – субпопуляции гемоцитов, определяющиеся при последующем гейтировании выделенных клеточных фракций по параметрам прямого и бокового светорассеяния и их соотношение. Условные обозначения: см. рисунок 62.

С целью определения соответствия между выделяемыми морфологическими типами клеток гемолимфы и популяциями гемоцитов, определяемыми путём цитометрического анализа, для двух модельных видов – *Biomphalaria glabrata* и *Planorbarius corneus* – было выполнено исследование гемолимфы с использованием проточного цитометра с технологией ImageStream, позволяющей визуализировать клетки в проточной ячейке.

Полученные цитофлуорограммы и изображения гемоцитов в проточной ячейке подтверждают объективность выделения популяций гемоцитов при цитофлуориметрическом изучении гемолимфы (рисунок 64). Популяция А включает клетки с небольшим объёмом цитоплазмы без гранул (гиалиноциты). Популяция В состоит из клеток с более обильной и гранулированной цитоплазмой (гранулоцитов). Клетки популяции С представлены небольшими вакуолизированными гранулоцитами. Также в области, в которой отмечаются крупные события

(предположительно – клеточный дебрис) и которая обычно отсекается при гейтировании, были зафиксированы агрегаты гемоцитов.

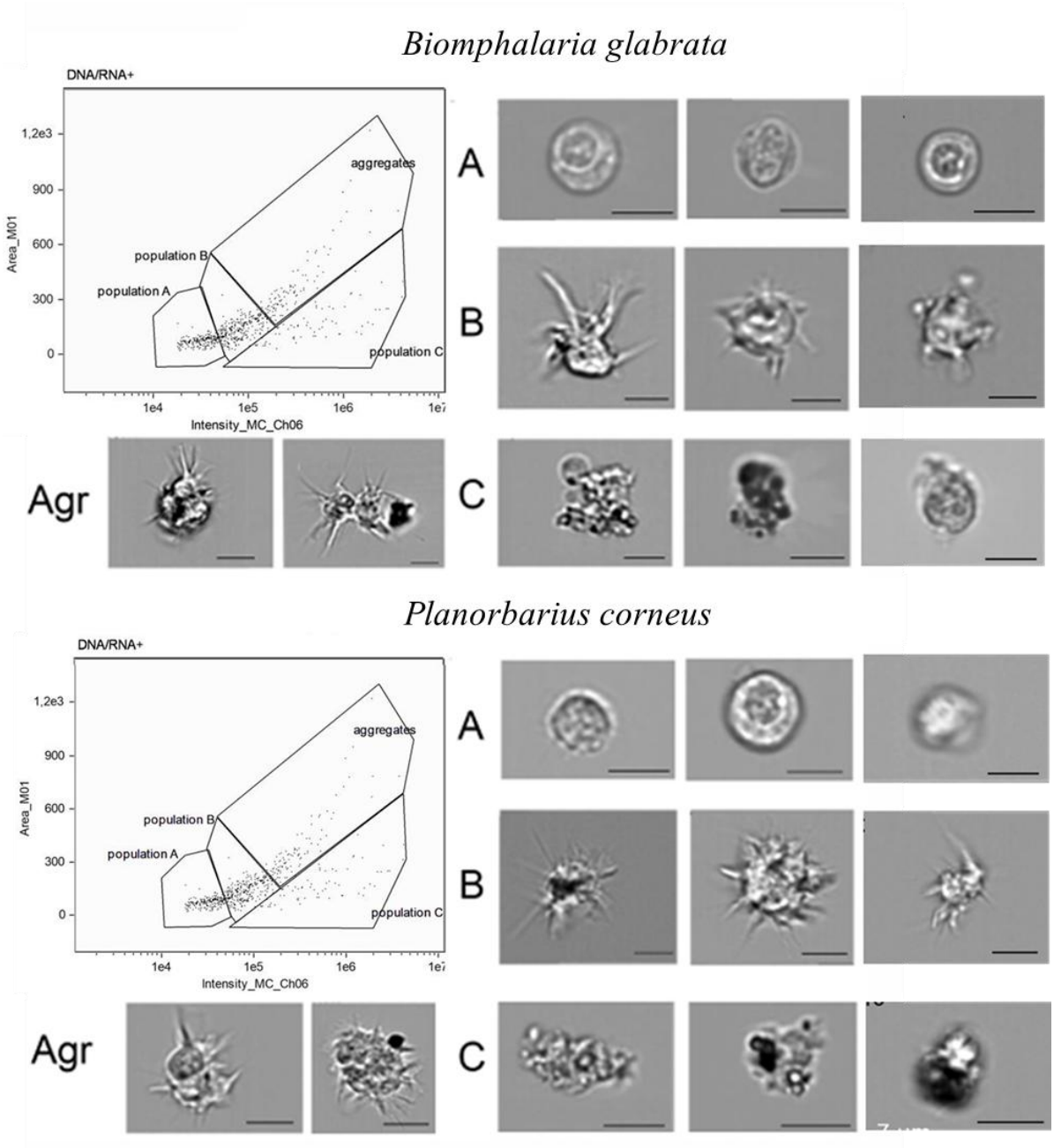


Рисунок 64. Популяционный анализ циркулирующих гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus* и *Biomphalaria glabrata* на комбинированном проточном цитометре Amnis® ImageStream. Представлены цитограммы гемолимфы (ось абсцисс – структура клеток, ось ординат – площадь клеток) и визуализация событий на них. Условные обозначения: A, B, C – популяции гемоцитов, выделяемые по параметрам прямого и бокового светорассеивания; Agr – агрегаты клеток; по оси абсцисс – показатели параметра, отражающего гранулярность клетки (аналогичен SS); по оси ординат – показатели параметра, отражающего размер клетки (аналогичен FS). Масштабная линейка – 7 мкм (по: Tokmakova, Serebryakova, Prokhorova, Ataev, 2020).

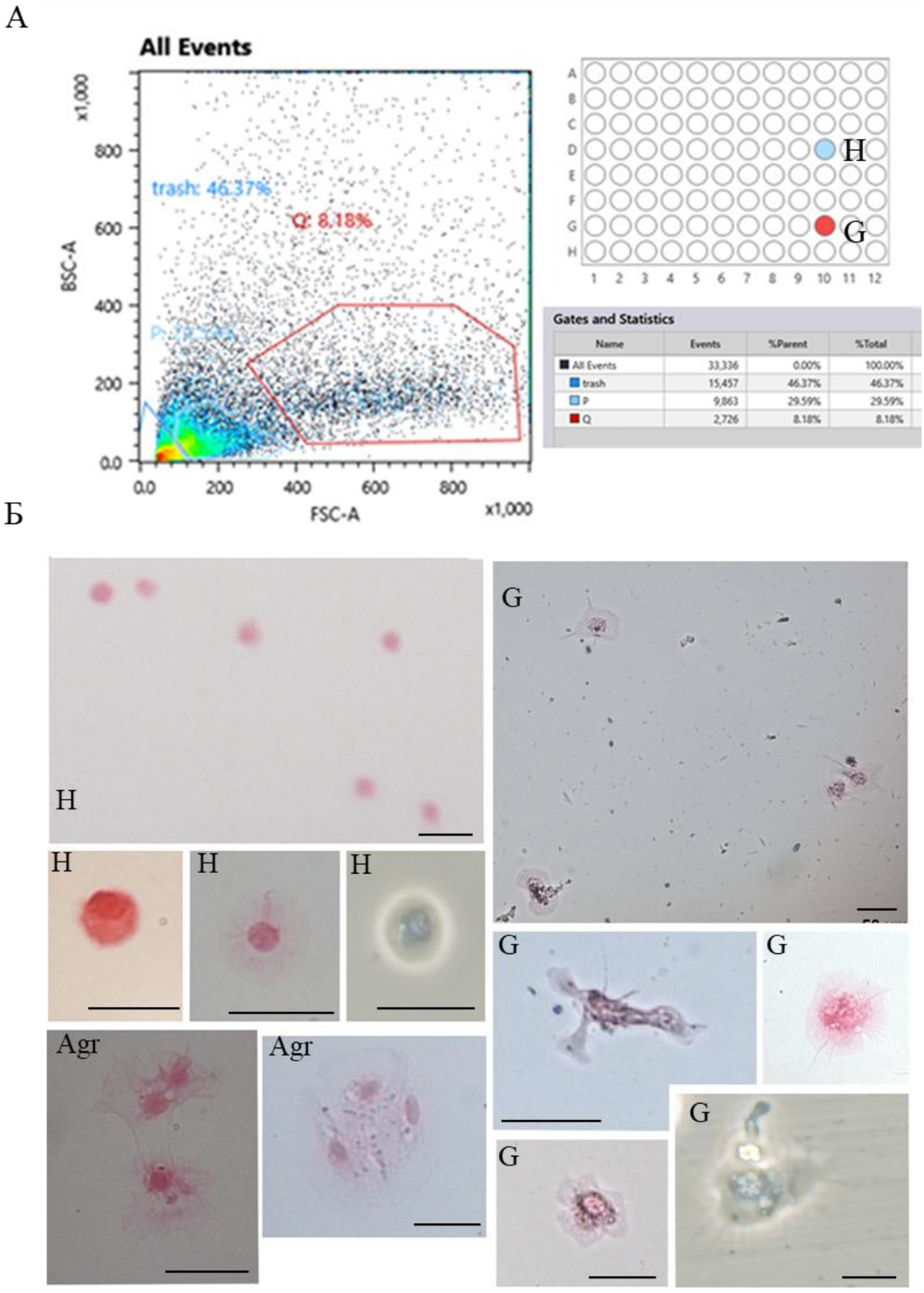


Рисунок 65. Анализ клеточного состава гемолимфы моллюсков *Biomphalaria glabrata* на сортере. А – схема разделения гемоцитов; Б – гемоциты разных морфологических типов после разделения. Условные обозначения: PH – живые гемоциты, сфотографированные в режиме фазового контраста; F – гемоциты в фиксированных мазках, окрашенные гематоксилин-эозином и сфотографированные в режиме светлого поля; H – гиалиноциты; G – гранулоциты; Agr – агрегации гемоцитов; на цитофлуорограмме по оси абсцисс – показатели параметра прямого светорассеивания (FS), по оси ординат – показатели параметра бокового светорассеивания (SS). Масштабная линейка – 10 мкм.

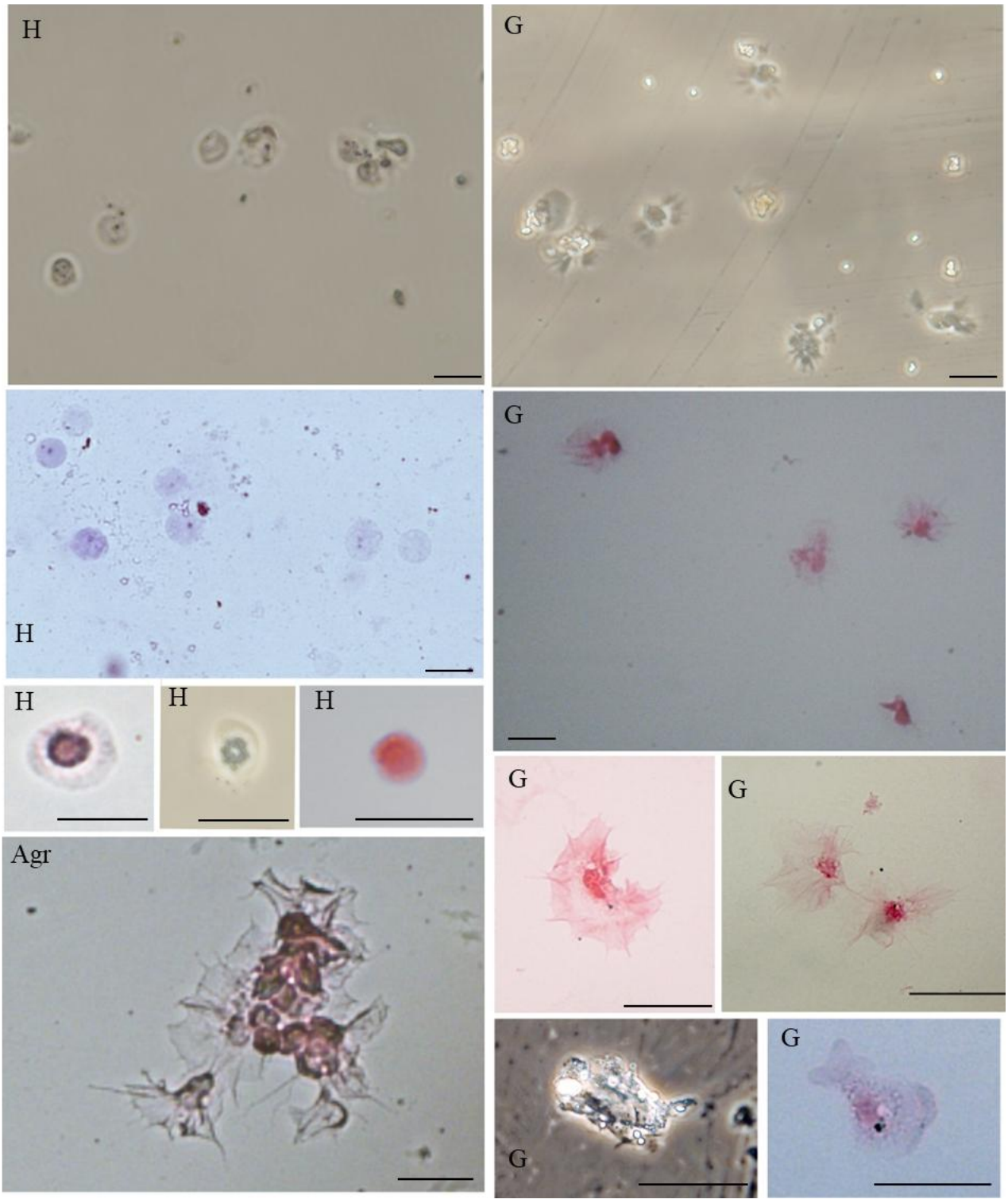


Рисунок 66. Гемоциты *Planorbarius corneus* после разделения на сортере. Условные обозначения: см. рисунок 65. Масштабная линейка – 10 мкм.

Разделение клеток на сортере с последующим морфологическим анализом гемоцитов в мазках также подтверждает соответствие популяции А морфологическому типу гиалиноцитов, а популяции В – гранулоцитов (рисунок 65А). При сортировке клеток в область клеточного дебриса также попадают единичные агрегации гемоцитов. Небольшие агрегации гемоцитов (из

2–4 клеток) также встречаются в мазках гранулоцитов (рисунки 65Б, 66). Использование раствора Чернина в качестве антикоакулянта уменьшает количество агрегаций. Следует отметить, что после сортировки мазках присутствует большое количество разрушенных гемоцитов. Это, вероятно, является следствием повреждения клеток во время длительных манипуляций – прохождения в проточной ячейке, сортировки и изготовлении мазка. Поэтому мы не проводили подсчёт соотношения гемоцитов разных морфологических типов в мазках после сортировки клеток гемолимфы.

Обсуждение к разделу III.2.1

В гемолимфе моллюсков исследованных нами модельных видов всегда имеются гемоциты двух основных морфологических типов – гранулоциты и гиалиноциты. Оба клеточных типа морфологически вариабельны. Особенно вариабельны размеры клеток: кроме биологических особенностей клеток они зависят от способа приготовления препарата (живые или фиксированные клетки, время инкубации) и способа измерения размерных параметров (диаметр или площадь клетки, с псевдоподиями или без). Поэтому размер клеток при микроскопическом анализе не может быть использован в качестве надёжного критерия для выделения морфологических типов гемоцитов.

Цитофлуориметрия как метод, основанный на количественном анализе по строго заданным параметрам, позволяет более обосновано выделить популяции гемоцитов и стандартизировать процедуру анализа гемолимфы. Так параметр FS, отражающий размер флотирующих клеток, является более объективным, чем размер распластанного гемоцита. Проточная цитометрия, сортировка клеток и их визуализация в проточной ячейке также подтверждают присутствие в гемолимфе пульмонат двух основных клеточных типов – гиалиноцитов (популяция A) и гранулоцитов (популяции B и C).

Использование проточной цитометрии даёт возможность сравнивать результаты, полученные разными исследователями. Так, вероятно, первое цитофлуориметрическое исследование гемолимфы пульмонат позволило выделить у *Planorbarius corneus* популяции больших и малых гемоцитов (Franceschi et al., 1991). На представленных в работе цитофлуорограммах они соответствуют определяемым нами популяциям A (гиалиноциты) и B (гранулоциты). Также, очевидно, гиалиноцитам и гранулоцитам соответствуют выявляемые по данным цитометрии группы «малых» и «средних-больших» гемоцитов у моллюсков *Biomphalaria glabrata* и *B. tenagophila* (Martins-Sousa et al., 2009; Barcante et al., 2012).

Сходные результаты были получены и для моллюсков других групп. На цитофлуорограммах переднежаберных улиток *Pomacea canaliculata*, *Pila globosa*, *Bellamya bengalensi*s и двустворчатых моллюсков *Ruditapes philippinarum*, *Mercenaria mercenaria*,

Crassostrea virginica и *Lamellidens marginalis* определяются две основные группы гемоцитов – агранулоциты и гранулоциты (Allam et al., 2002; Accorsi et al., 2013; Ray et al., 2013). Морфологически они также соответствуют гиалиноцитам и гранулоцитам. Авторы, в свою очередь, отмечают полиморфизм выделяемых клеточных типов.

Наиболее полиморфными по морфологическим признакам являются гранулоциты. Отсутствие общих критериев для типирования гранулоцитов приводит к тому, что их варианты часто описывают как отдельные клеточные типы. Так в составе капсул вокруг трансплантатов описаны «мегациты», «гипертрофированные фибробласты» и «эпителиоидные клетки» (Lie, Heyneman, 1976a; Cheng, Galloway, 1970; Cheng, 1984), «полигональные гемоциты» (Byrd, Maples, 1969). Однако наблюдение за гранулоцитами *in vitro* показывает возможность значительной морфологической трансформации клеток на протяжении даже непродолжительного инкубирования (рисунок 60). Схожие данные получены для лёгочных моллюсков *Bulinus truncatus* у которых морфологически разные гемоциты рассматриваются как «онтогенетические стадии одной клеточной линии» (Cheng, Guida, 1980).

В ходе длительного инкубирования количество крупных гранулоцитов относительно других гемоцитов значительно увеличивается (Прохорова, 2009). Такие изменения могут происходить вследствие влияния накапливающихся продуктов метаболизма на гемоциты (Hahn et al., 2001). Анализ морфологии гемоцитов в капсулах вокруг спороцист трематод также подтверждает их постепенное изменение (уплощение, а затем – дегенерацию) по мере роста капсулы (Lie, Heyneman, 1976a; Ataev, Coustau, 1999; Атаев, 2000). Таким образом, больше данных свидетельствует в пользу того, что все варианты гранулоцитов относятся к единому полиморфному типу клеток.

На препаратах гемоцитов присутствуют клетки, морфология которых является промежуточной между гранулоцитами и гиалиноцитами. Например, клетки, которые хорошо распластываются на субстрате, но относительно небольшого размера и без заметных гранул (рисунки 50, 52, 55). Такие морфологические особенности не позволяют отнести их ни к гранулоцитам (с гранулами и распластываются), ни к гиалиноцитам (без гранул, не распластываются). Возможно, такие клетки являются переходной формой между гиалиноцитами и гранулоцитами. При выделении клеточных популяций на проточном цитометре также выявляется область с переходными между гранулоцитами и гиалиноцитами клетками. Граница между этим популяциями становится более чёткой у иммунизированных моллюсков (см. раздел III.3.4).

Некоторые авторы выделяют в отдельные клеточные типы (или популяции) клетки с промежуточной между гиалиноцитами и гранулоцитами морфологией. Так у моллюсков *Biomphalaria glabrata* и *B. straminea* выделяют до 5 типов клеток: гранулоциты, три типа

гиалиноцитов и бластопоподобные клетки (Cavalcanti et al., 2012). Однако отсутствуют признаки, которые могли бы принципиально отличить эти типы клеток друг от друга. Например, в качестве одного из критериев для разделения вариантов гиалиноцитов служит положение ядра. В то же время, среди гранулоцитов встречаются клетки с разным положением ядра. Кроме того, оно значительно сможет изменяться при изменении цитоскелета во время перемещения клетки. На ультраструктурном уровне показаны различия между «покоящимися и активированными гемоцитами» – и у гранулярных, и у агранулярных клеток может наблюдаться значительное локальное утолщение клеточного кортекса при активации (Matricon-Gondran, Letocart, 1999).

Отдельного внимания заслуживают клетки, которые мы обозначаем как «мелкие гиалиноциты». Такие клетки, встречающиеся у разных гастропод, авторы часто относят к бластоподобным клеткам на основе небольшого размера и высокого ЯЦО (Gorbushin, Iakovleva, 2006; Portet et al., 2019). Также их обозначают как «ювенильные гемоциты» (Sminia et al., 1983; Matricon-Gondran, Letocart, 1999).

Одновременно с мнением о существовании разных типов гемоцитов, в отношении моллюсков *Biomphalaria glabrata* и *Lymnaea stagnalis* высказывалась точка зрения, что все гемоциты представлены единым клеточным типом – «универсальным фагоцитом» (Sminia et al., 1983; Boisseaux et al., 2016), а наблюдаемые морфологические варианты гемоцитов соответствуют разным «стадиям дифференцировки клеток» (van der Knaap et al., 1993). В таком случае все варианты гемоцитов можно рассматривать как ряд переходных форм, отражающих процесс дифференцировки или функциональной специализации клеток единого типа.

Одним из наиболее показательных примеров морфологического разнообразия среди клеток общего происхождения являются клетки моноцитарно-макрофагальной линии у позвоночных (van Furth et al., 1972). Циркулирующий моноцит и функционирующий в тканях макрофаг отличаются по морфологическим особенностям, составу гранул, набору поверхностных маркеров и функциональной активности. А резидентные макрофаги, созревающие под действием микроокружения тканей, приобретают специфические признаки, характерные для клеток конкретного органа, в котором они функционируют (Varol et al., 2015).

Однако для миелоидных клеток позвоночных животных известны дифференцировочные маркеры, с использованием которых доказана принадлежность моноцитов и макрофагов к единому клеточному типу. Для пульмонат неоднократно предпринимались попытки различить варианты гемоцитов с помощью поверхностных маркеров (Yoshino, Granath, 1983; Dikkeboom et al., 1988; Franceschi et al., 1991; Ottaviani et al., 1993), однако метод типирования клеток гемолимфы до сих пор не разработан.

Поскольку для лёгочных моллюсков вопрос о происхождении гемоцитов и путях их дифференцировки остаётся открытым, термины «тип гемоцитов» и «популяция гемоцитов» мы

используем для обозначения клеток гемолимфы, различающихся по морфологическим и функциональным характеристикам, не затрагивая их происхождение.

III.2.2. Концентрация и соотношение типов гемоцитов в циркуляции

Концентрация гемоцитов. Гемоциты разных морфологических типов обладают разной способностью к распластыванию на субстрате и адгезии. У гранулоцитов эти характеристики выражены значительно сильнее, чем у гиалиноцитов (см. Прохорова, 2009). Следовательно, при приготовлении препарата гиалиноцитов теряется больше. В процессе наблюдения во влажной камере клетка может значительно менять свою морфологию в течение нескольких минут (рисунки 60, 75, 76). В результате, при подсчётах численности и соотношения гемоцитов во влажной камере и фиксированных мазках зачастую получаются разные результаты. Поэтому для стандартизации подхода подсчёт численности гемоцитов осуществлялся только в фиксированных мазках.

Количество гемоцитов в 1 мкл гемолимфы лёгочных моллюсков различается у представителей разных видов (таблица 29). Кроме того, наблюдается значительная вариабельность в пределах каждого их исследованных видов. Для пресноводных моллюсков медианная численность клеток в 1 мкл гемолимфы варьирует от 160 у *Biomphalaria glabrata* до 663 у *Lymnaea stagnalis.* Среди наземных видов минимальная средняя численность гемоцитов в циркуляции зафиксирована у *Cochlicopa lubrica* (86 клеток/мкл), максимальная – у *Arianta arbustorum* (231 клетка/мкл). Средняя численность гемоцитов в 1 мкл гемолимфы у моллюсков пресноводных видов достоверно больше, чем у моллюсков наземных видов (440 и 154 соответственно, $p<0.05$).

Для четырёх пресноводных видов (*Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis, Biomphalaria glabrata, Lymnaea stagnalis*) был выполнен анализ численности гемоцитов у улиток с разным размером раковины. Для моллюсков наземных видов такой анализ отдельно выполнен не был, так как выборка была более однородной по размеру (см. раздел III.1). Поскольку объём гемолимфы у наземных моллюсков меньше, чем у представителей водных видов, в работе были использованы преимущественно крупные особи.

У моллюсков *Planorbarius corneus* в 1 мкл у гемолимфы содержится в среднем 437 гемоцитов. Однако минимальное и максимальное значения от отличаются более чем в 30 раз (таблица 29, рисунок 67). Выборка незаражённых моллюсков была разделена на 5 размерных классов по диаметру раковины: 17–20 мм (n=29), 21–24 мм (n=34), 25–28 мм (n=329), 29–32 (n=16) мм, 33–36 мм (n=40) (см. рисунок 67). В этих группах среднее количество гемоцитов в 1 мкл различается. Оно оказалось максимальным (960 клеток в 1 мкл) у моллюсков небольшого размера (раковина до 20 мм), что достоверно отличается от значений в классах 21–24 мм

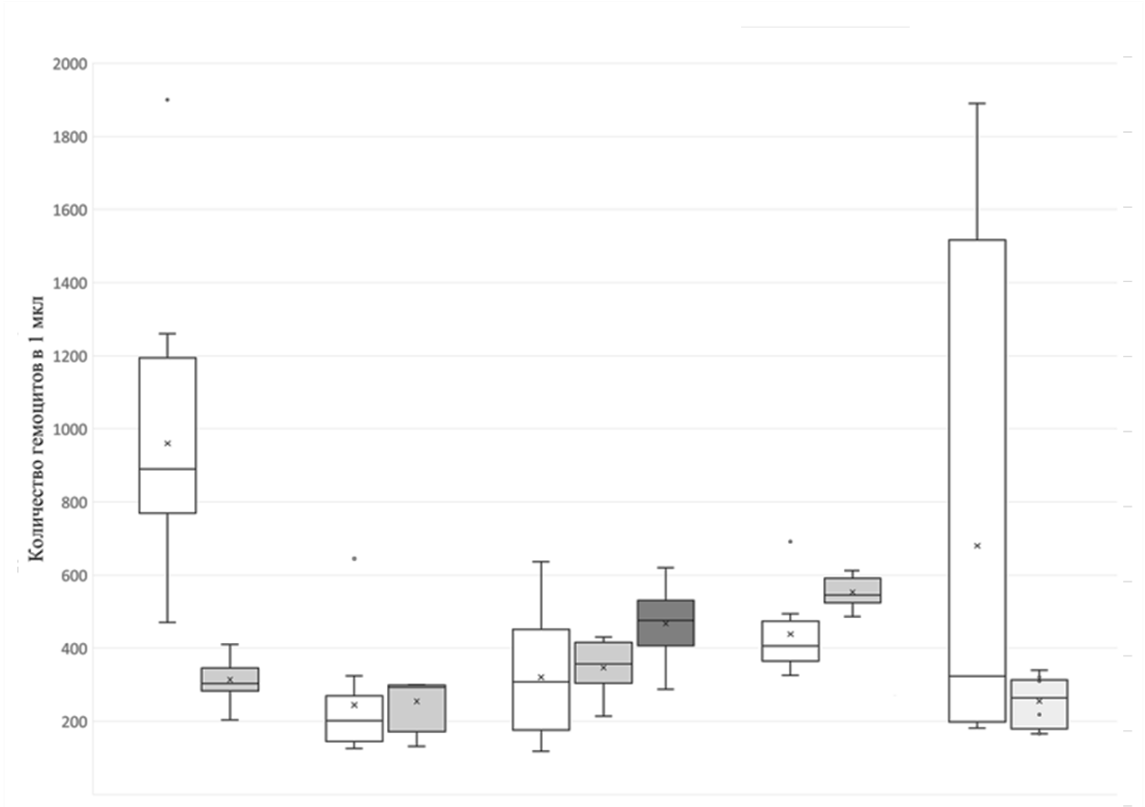
($p>0.005$), 25–28 мм ($p>0.05$) и 29–32 мм ($p>0.001$). Наименьшая концентрация гемоцитов отмечена у моллюсков с диаметром раковины 21–24 мм (в среднем 244 клетки в 1 мкл). Эти значения достоверно отличаются от показателей, полученных для групп самых маленьких ($p>0.005$) и самых больших особей ($p<0.05$). Среди моллюсков с самым большим диаметром раковины наблюдается наибольшая вариабельность численности гемоцитов в 1 мкл. Вопрос о влиянии иммунизации на численность гемоцитов рассмотрен в разделе III.4.2.

Таблица 29. Концентрация гемоцитов у моллюсков модельных видов по данным морфологического анализа

Виды моллюсков	Количество гемоцитов в 1 мкл	
	Данные автора (Me, диапазон значений)	Литературные данные (ссылки)
Biomphalaria glabrata (n=76)	160 (54–540)	118−142 (Ataev, Coustau, 1999); 167−334 (Abdul-Salam, Michelson, 1980); 550−630 (Pereira et al., 2006)
Planorbarius corneus (n=463)	437 (55–1900)	118–3267 (Алякринская, 1970)
Planorbis planorbis (n=120)	490 (50–1812)	—
Lymnaea stagnalis (n=159)	663 (90–2500)	140–1990 (Dikkeboom et al., 1985); 300–3000 (van der Knaap et al., 1993)
Succinea putris (n=62)	146 (108–192)	—
Cochlicopa lubrica (n=27)	87 (65–176)	—
Arianta arbustorum (n=80)	231 (130–288)	—

У моллюсков *Planorbis planorbis* в 1 мкл гемолимфы в среднем содержится 419 клеток. Минимальное и максимальное значения отличаются в 34 раза (таблица 29, рисунок 68). Таким образом, как и у роговой катушки, наблюдается значительная вариабельность этого показателя. Все незаражённые моллюски были разделены на 4 группы по диаметру раковины: 8–9 мм (n=28), 10–11 мм (n=23), 12–13 мм (n=24), 14–15 мм (n=13). Установлено, что наибольшая концентрация гемоцитов характерна для моллюсков с диаметром раковины 14–15 мм (в среднем 510 клеток в 1 мкл). Она достоверно выше, чем у моллюсков с диаметром раковины 12–13 мм (276 клеток в 1 мкл) ($p>0.01$). В группах окаймлённых катушек с диаметром раковины 8–9 мм, 10–11 и 12–13 мм численность гемоцитов достоверно не различается между собой. Однако

среди самых маленьких улиток чаще встречаются особи с концентрацией более 500 гемоцитов в 1 мкл. Максимальное значение – 1812 клеток в 1 мкл гемолимфы – также зафиксировано в этой группе. Таким образом, у окаймлённой катушки, также как у роговой катушки, наблюдается тенденция к наибольшей численности гемоцитов у самых маленьких и самых крупных улиток.



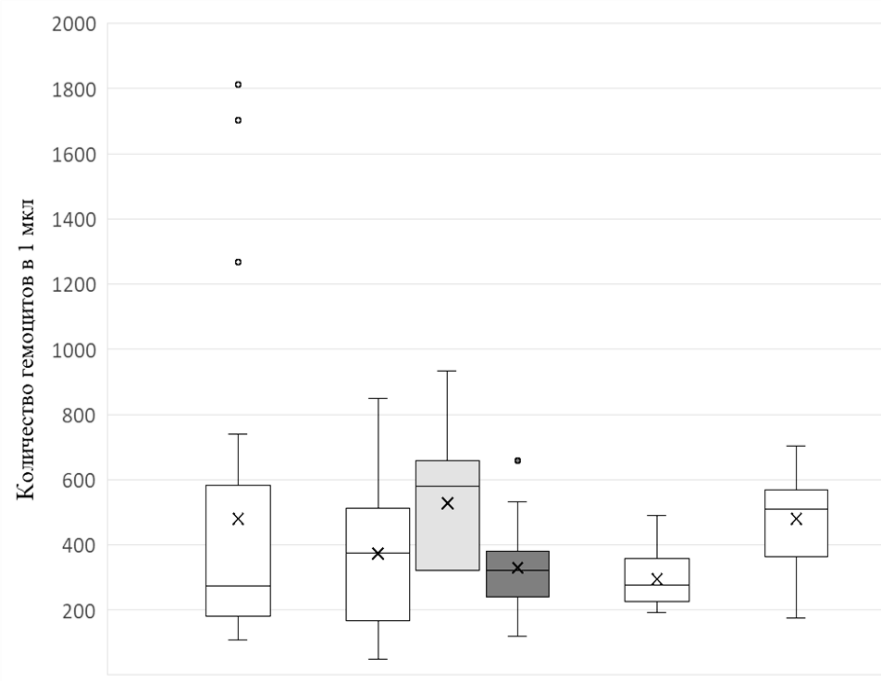
Диаметр раковины		17—20		21—24		25—28			29—32		33—36	
Иммунизация		Н	З	Н	З	Н	З	И	Н	З	Н	З
Гемоцитов в 1 мкл	медиана	890	303	202	294	307	357	477	336	576	324	264
	среднее	960	314	244	254	320	346	466	468	583	680	255
	мин.	470	203	126	131	118	214	288	355	516	182	166
	макс.	1900	410	645	299	637	430	620	721	643	1890	340

Рисунок 67. Концентрация гемоцитов у моллюсков *Planorbarius corneus* с разным диаметром раковины. Таблица и диаграмма построены с использованием общего массива значений. Столбцы таблицы соответствуют расположенным над ними элементам диаграммы. Условные обозначения (здесь и далее): верхняя и нижняя границы элементов диаграммы – К1 и К3; усы – максимальное и минимальное значения; горизонтальная черта – Ме; крест – среднее значение, точки – выбросы; Н – незаражённые моллюски; З – заражённые трематодами моллюски; И – иммунизированные бактериями моллюски.

Для моллюсков *Biomphalaria glabrata* лабораторной бразильской линии также были посчитаны концентрации гемоцитов в группах с разным диаметром раковины: 10–11 мм (n=20), 12–13 мм (n=21), 14–15 мм (n=18) и 16–17 мм (n=14). У биомфалярий максимальная концентрация гемоцитов (366 клеток / 1 мкл) характерна для самых маленьких особей

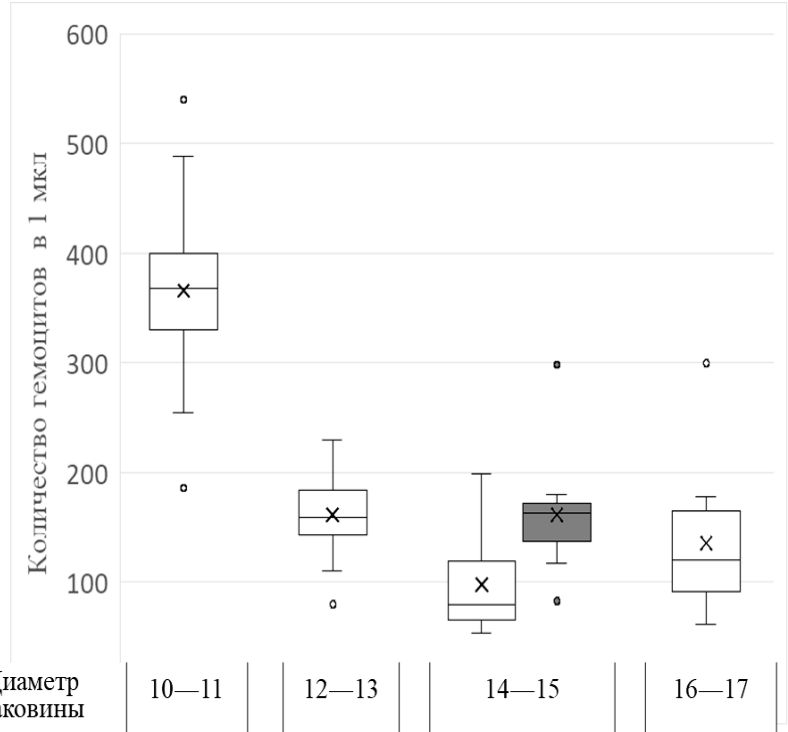
(раковина10–11 мм), что достоверно больше, чем у представителей других размерных групп ($p>0.01$). При этом у самых крупных улиток (раковина 16–17 мм) численность гемоцитов в 1 мкл достоверно выше, чем у улиток средних размеров ($p<0.05$) (рисунок 69).

Моллюски *Lymnaea stagnalis*, у которых была посчитана концентрация гемоцитов, были разделены по высоте раковины на 5 групп: 32–35 мм (n=12), 36–39 мм (n=43), 40–43 мм (n=48), 44–47 мм (n=22) и 48–51 мм (n=29). У самых мелких особей количество гемоцитов в 1 мкл достоверно выше, чем у моллюсков с бóльшей высотой раковины ($p<0.01$), кроме группы самых крупных улиток (рисунок 70). У последних численность гемоцитов достоверно выше, чем у моллюсков с раковинами высотой 44–47 мм и 40–43 мм.



Диаметр раковины		8—9	10—11			12—13	14—15
Иммунизация		Н	Н	З	И	Н	Н
Гемоцитов в 1 мкл	медиана	480	374	528	329	295	467
	среднее	275	392	579	323	276	510
	мин.	107	50	323	120	191	176
	макс.	1812	849	933	659	490	702

Рисунок 68. Концентрация гемоцитов у моллюсков *Planorbis planorbis* с разным диаметром раковины. Таблица и диаграмма построены с использованием общего массива значений. Столбцы таблицы соответствуют расположенным над ними элементам диаграммы. Условные обозначения: см. рисунок 67.

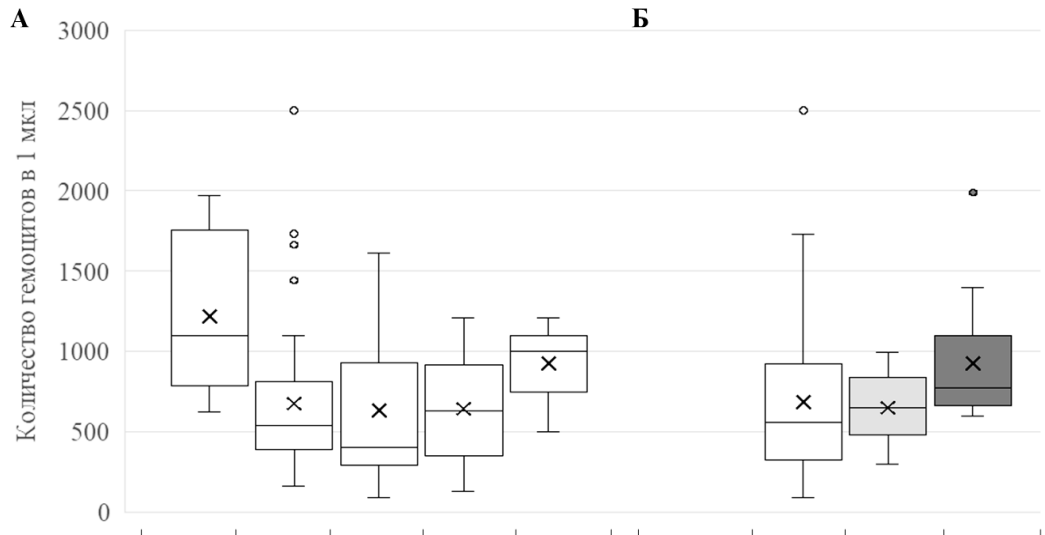


Диаметр раковины		10—11	12—13	14—15		16—17
Иммунизация		Н	Н	Н	И	Н
Гемоцитов в 1 мкл	медиана	341	163	98	144	136
	среднее	366	149	73	160	114
	мин.	186	80	54	83	62
	макс.	540	230	199	299	300

Рисунок 69. Концентрация гемоцитов у моллюсков *Biomphalaria glabrata* с разным диаметром раковины. Таблица и диаграмма построены с использованием общего массива значений. Столбцы таблицы соответствуют расположенным над ними элементам диаграммы. Условные обозначения: см. рисунок 67.

Соотношение циркулирующих гемоцитов у моллюсков разных видов. Для анализа соотношения гемоцитов разных типов в циркуляции первоначально были использованы фиксированные мазки гемолимфы. По данным морфологического анализа у моллюсков всех видов преобладают гранулоциты (таблица 30). Доля гранулоцитов от общей численности гемоцитов варьирует в диапазоне от 51 до 92%. У моллюсков пресноводных видов количество гранулоцитов по отношению к гиалиноцитам больше, чем у моллюсков наземных видов.

Полученные при цитофлуориметрическом анализе соотношения гранулоцитов и гиалиноцитов значительно отличаются от данных подсчёта гемоцитов в фиксированных мазках. По данным цитофлуориметрии у моллюсков обоих видов в циркуляции преобладают клетки популяции А – гиалиноциты (таблицы 31, 32).



Высота раковины		32—35	36—39	40—43	44—47	48—51
Гемоцитов в 1 мкл	медиана	1218	676	634	643	928
	среднее	1096	540	401	628	1004
	мин.	623	160	90	132	489
	макс.	1967	2500	1611	1212	1199

Иммуни-зация		Н	З	И
Высота раковины 36—51 мм	медиана	663	650	743
	среднее	561	648	682
	мин.	90	995	995
	макс.	2500	297	597

Рисунок 70. Концентрация гемоцитов у моллюсков *Lymnaea stagnalis.* А – концентрация гемоцитов у неиммунизированных моллюсков с разной высотой раковины; Б – численность гемоцитов у неиммунизированных и иммунизированных моллюсков. Таблицы и диаграммы построены с использованием общего массива значений. Столбцы таблицы соответствуют расположенным над ними элементам диаграммы. Условные обозначения: см. рисунок 67.

Таблица 30. Соотношение гранулоцитов и гиалиноцитов у моллюсков модельных видов по данным морфологического анализа*

Виды моллюсков (объём выборки)	Тип гемоцитов (Me (K1; K3))	
	Гранулоциты	Гиалиноциты
Biomphalaria glabrata (n=56)	81.41 (74.30; 86.54)	15.8 (11.35; 19.04)
Planorbarius corneus (n=83)	70.54 (67.10; 75.06)	24.71 (22.30; 26.14)
Planorbis planorbis (n=74)	85.24 (81.22; 89.06)	10.60 (6.44; 14.19)
Lymnaea stagnalis (n=54)	88.13 (82.92; 92.21)	6.65 (2.29; 11. 36)
Succinea putris (n=62)	53.76 (51.21; 56.55)	36.26 (32.58; 39.19)
Cochlicopa lubrica (n=27)	68.91 (65.08; 73.04)	28.74 (24.23; 32.97).
Arianta arbustorum (n=80)	62.40 (57.86; 65.54)	22.14 (17.45; 25.59)

*указан процент клеток от их общего количества.

Таблица 31. Соотношение типов гемоцитов в гемолимфе моллюсков *Planorbarius corneus* и *Biomphalaria glabrata* по данным анализа на проточном цитометре Coulter Epics Altra*

Вид моллюска (объём выборки)	Типы гемоцитов, выделяемые по параметрам FS и SS (Me (K1; K3))	
	Гиалиноциты (популяция A)	Гранулоциты (популяция B)
Planorbarius corneus (n=47)	58.52 (52.65; 66.12)	37.17 (29.83; 46.37)
Biomphalaria glabrata (n=40)	65.13 (64.11; 73.05)	35.34 (27.38; 36.10)

*указан процент клеток от их общего количества.

Соотношение гранулоцитов и гиалиноцитов среди общего числа гемоцитов отличается у моллюсков разных видов. У моллюсков *Biomphalaria glabrata* бразильской линии доля гранулоцитов обоих популяций (58.5%), больше ($p<0.05$), чем у моллюсков *Planorbarius corneus* (54.34%). При этом у обоих видов относительное количество гранулоцитов достоверно меньше ($p<0.05$), чем у моллюсков *Planorbis planorbis* (68.35%). У прудовика *Lymnaea stagnalis* относительное количество гранулоцитов (86.28%) достоверно выше ($p<0.05$), чем у трёх исследованных видов моллюсков сем. Planorbidae. При этом для каждого из модельных объектов характерна значительная индивидуальная вариабельность соотношения гранулоцитов и гиалиноцитов.

Соотношение гранулоцитов популяций B и C также различно у моллюсков разных видов. У *Biomphalaria glabrata, Planorbarius corneus* и *Lymnaea stagnalis* бóльшая часть гранулоцитов представлена клетками популяции B (65.00, 77.29 и 96.18% соответственно). У моллюска *Planorbis planorbis* основная доля гранулоцитов относится к популяции C (72.79%). Кроме того, у моллюсков *P. planorbis* и *Lymnaea stagnalis* популяция C является более разнородной: клетки находятся в области большего диапазона значений FS и SS и содержат больше гранул, чем у *Biomphalaria glabrata* и *Planorbarius corneus* ($p<0.001$).

Ранее нами были получены данные о различиях в соотношении гранулоцитов и гиалиноцитов у моллюсков *P. corneus* разных размерных классов (Прохорова, 2009; Ataev, Prokhorova et al., 2016). Было установлено, что у крупных улиток относительное содержание гранулоцитов в гемолимфе выше, чем у моллюсков небольшого размера. В дальнейшем работа была выполнена на бóльшей выборке улиток, с учётом заражённости и расширением числа видов.

Таблица 32. Соотношение популяций гемоцитов у лёгочных моллюсков по данным цитофлуориметрического анализа на проточном цитометре BD Accuri™ C6 (по: Прохорова и др, 2018, с дополнениями)

	Популяции гемоцитов			
Виды лёгочных моллюсков / Типы и популяции гемоцитов	Процент клеток в популяции от общего их количества (Me (K1; K3))			
	Biomphalaria glabrata (бразильская линия) (n=54)	***Planorbarius corneus*** (n=58)	***Planorbis planorbis*** (n=30)	***Lymnaea stagnalis*** (n=39)
Последовательное гейтирование по FS/SS, а затем по интенсивности поглощения Syto62/LysoTracker				
Гиалиноциты				
Популяция A	**41.67 (31.87; 55.81)**	**44.73 (25.21; 70.17)**	**31.38 (23.69; 37.03)**	**13.72 (7.32; 27.24)**
Субпопуляция **Ad**	19.06 (10.07; 33.61)	23.88 (11.41; 42.05)	9.52 (5.71; 14.84)	6.79 (3.64; 7.60)
Субпопуляция **Ae**	36.68 (24.43; 46.45)	50.08 (28.87; 64.93)	40.17 (28.36; 49.33)	44.72 (29.13; 68.28)
Субпопуляция **Af**	21.06 (6.62; 36.82)	3.43 (1.21; 14.18)	31.18 (22.95; 44.62)	6.18 (3.21; 25.98)
Субпопуляция **Ag**	9.6 (4.38; 17.11)	6.2 (4.11; 14.27)	10.99 (6.18; 15.29)	21.91 (16.38; 38.00)
Гранулоциты				
Популяция B	**38.26 (26.97; 43.74)**	**31.16 (16.18; 59.75)**	**23.85 (14.61; 30.12)**	**82.29 (56.07; 88.54)**
Субпопуляция **Bd**	0.68 (0.23; 1.52)	1.89 (0.59; 4.28)	2.47 (1.03; 5.77)	1.8 (0.90; 2.045)
Субпопуляция **Be**	9.24 (6.32; 17.57)	8.73 (3.22; 14.51)	19.31 (13.82; 32.10)	95.02 (86.47; 96.38)
Субпопуляция **Bf**	15.63 (5.93; 32.51)	1.39 (0.45; 4.89)	16.41 (11.19; 28.02)	0.69 (0.4; 1.55)
Субпопуляция **Bg**	68.88 (48.04; 75.89)	82.42 (70.86; 92.78)	52.03 (39.11; 65.02)	1.68 (1.28; 5.44)
Популяция *C*	**18.88 (11.48; 22.77)**	**11.25 (5.49; 16.40)**	**38.18 (23.85; 48.88)**	**3.99 (2.17; 7.13)**
Субпопуляция **Cd**	7.66 (3.85; 11.62)	3.56 (1.38; 8.53)	4.04 (2.14; 8.35)	1.53 (0.8; 1.59)
Субпопуляция **Ce**	21.7 (14.86; 28.83)	20.36 (14.10; 33.92)	13.58 (6.98; 35.51)	85.54 (79.83; 90.49)
Субпопуляция **Cf**	51.20 (39.40; 60.57)	30.47 (5.64; 64.16)	68.63 (49.61; 79.37)	2.28 (2.17; 7.27)
Субпопуляция **Cg**	12.87 (8.23; 20.8)	23.33 (12.4; 48.37)	7.55 (3.68; 10.25)	7.015 (3.17; 10.245
Последовательное гейтирование по интенсивности поглощения Syto62/LysoTracker, а затем по FS/SS				
Популяция D	**8.93 (6.61; 15.13)**	**14.87 (4.26; 22.08)**	**5.55 (3.49; 9.41)**	**1.94 (1.16; 2.15)**
*Субпопуляция **Da***	80.86 (72.91; 88.72)	87.36 (75.72; 93.17)	53.79 (35.81; 68.11)	13.66 (5.43; 33.28)
*Субпопуляция **Db***	2.97 (1.13; 6.01)	3.67 (1.76; 12.68)	6.67 (3.5; 11.88)	51.96 (32.35; 71.19)
*Субпопуляция **Dc***	13.16 (6.84; 21.61)	4.38 (1.92; 10.06)	35.26 (20.39; 51.19)	28.40 (16.74; 35.05)
Популяция E	**23.72 (19.08; 31.34)**	**27.9 (13.10; 40.05)**	**26.54 (15.63; 35.88)**	**91.41 (74.64; 92.94)**
*Субпопуляция **Ea***	66.34 (57.43; 78.04)	72.34 (59.62; 87.13)	51.53 (40.62; 63.85)	1.76 (0.37; 8.46)
*Субпопуляция **Eb***	14.18 (8.81; 22.54)	10.69 (5.97; 17.08)	15.23 (10.92; 20.13)	57.99 (43.97; 64.75)
*Субпопуляция **Ec***	16.75 (11.32; 25.05)	11.00 (6.67; 22.21)	34.04 (15.74; 44.19)	35.96 (33.78; 47.29)
Популяция F	**27.34 (12.37; 38.02)**	**4.65 (1.32; 15.81)**	**49.20 (32.57; 57.08)**	**1.85 (1.37; 4.04)**
*Субпопуляция **Fa***	33.16 (23.1; 41.46)	39.17 (11.71; 66.39)	25.20 (14.95; 32.40)	16.18 (7.53; 21.48)
*Субпопуляция **Fb***	23.88 (16.18; 30.43)	11.83 (6.66; 14.96)	6.72 (3.62; 10.15)	16.56 (12.41; 25.29)
*Субпопуляция **Fc***	43.84 (29.41; 56.28)	47.93 (17.58; 75.76)	67.52 (51.22; 77.19)	61.02 (51.30; 74.51)
Популяция G	**35.30 (18.27; 43.84)**	**36.18 (22.14; 57.84)**	**15.81 (11.20; 21.92)**	**4.79 (3.04; 8.39)**
*Субпопуляция **Ga***	12.56 (6.68; 32.97)	9.65 (2.91; 19.96)	18.01 (12.04; 29.59)	17.65 (7.53; 38.74)
*Субпопуляция **Gb***	76.11 (55.25; 87.39)	78.19 (50.62; 93.01)	53.86 (41.64; 63.79)	23.06 (19.17; 35.55)
*Субпопуляция **Gc***	7.00 (4.82; 10.96)	8.24 (1.67; 19.13)	19.83 (11.43; 32.01	49.4 (31.83; 60.78)

Условные обозначения: FS – прямое светорассеивание; SS – боковое светорассеивание; Syto 62 – флуоресцентный краситель нуклеиновых кислот; LysoTracker – флуоресцентный лизосомный краситель.

У моллюсков *P. corneus* (n=83) с небольшим диаметром раковины численность гиалиноцитов больше, чем у более крупных особей (рисунок 71). У улиток с размерами раковин 25–28 мм, 29–32 мм, 33–36 мм гиалиноцитов достоверно меньше, чем у самых маленьких улиток ($p<0.01$). Минимальное количество гиалиноцитов – у самых крупных особей: у них количество гиалиноцитов достоверно отличается от моллюсков всех остальных размерных классов ($p<0.001$). Коэффициент корреляции (по всему массиву данных без разбивки на классы) между диаметром раковины и числом гиалиноцитов r= – 0.95.

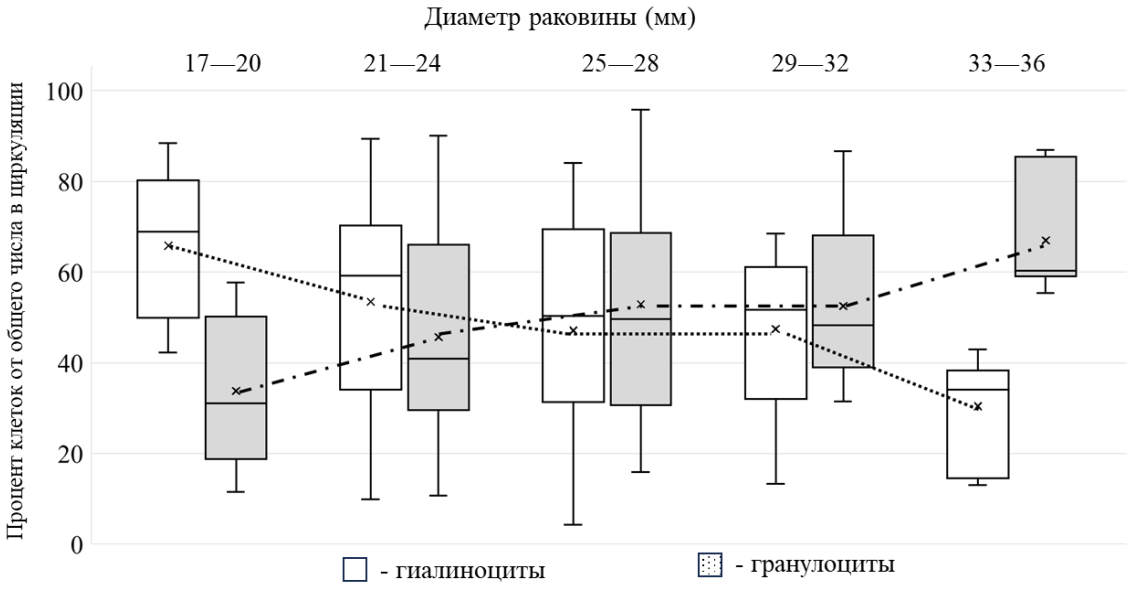


Рисунок 71. Диаграмма, отражающая относительное количество гиалиноцитов и гранулоцитов у моллюсков *Planorbarius corneus* разным диаметром раковины. Условные обозначения (здесь и далее): гиалиноциты – белые боксы; гранулоциты – серые боксы; верхняя и нижняя границы элементов диаграммы – К1 и К3, усы – максимальное и минимальное значения, горизонтальная черта – Ме, крест – среднее значение. Пунктиром показана линя тренда изменения численности гранулоцитов (тире-точки) и гиалиноцитов (точки).

Среди моллюсков *Biomphalaria glabrata* (n=53), гемолимфа которых была исследована на проточном цитометре, было выделено 5 размерных классов с шагом в 2 мм (рисунок 72). У самых маленьких улиток (диаметр раковины до 10 мм) и самых крупных (раковина 18–19 мм) среди гемоцитов преобладают гранулоциты (в среднем 56.88% и 58.60% соответственно). У моллюсков с диаметром раковины 12–13 мм количество гиалиноцитов выше, чем у молодых особей ($p<0.05$). У моллюсков более крупного размера наблюдается снижение относительного количества гиалиноцитов и рост числа гранулоцитов. У самых крупных улиток гранулоцитов достоверно больше, чем у моллюсков средних размеров ($p<0.05$). Корреляция между ростом диаметра раковины и относительного количества гранулоцитов для всего массива данных практически отсутствует (r=– 0.24). Однако при анализе улиток с раковиной 12–19 мм наблюдается отрицательная корреляция (r=– 0.94).

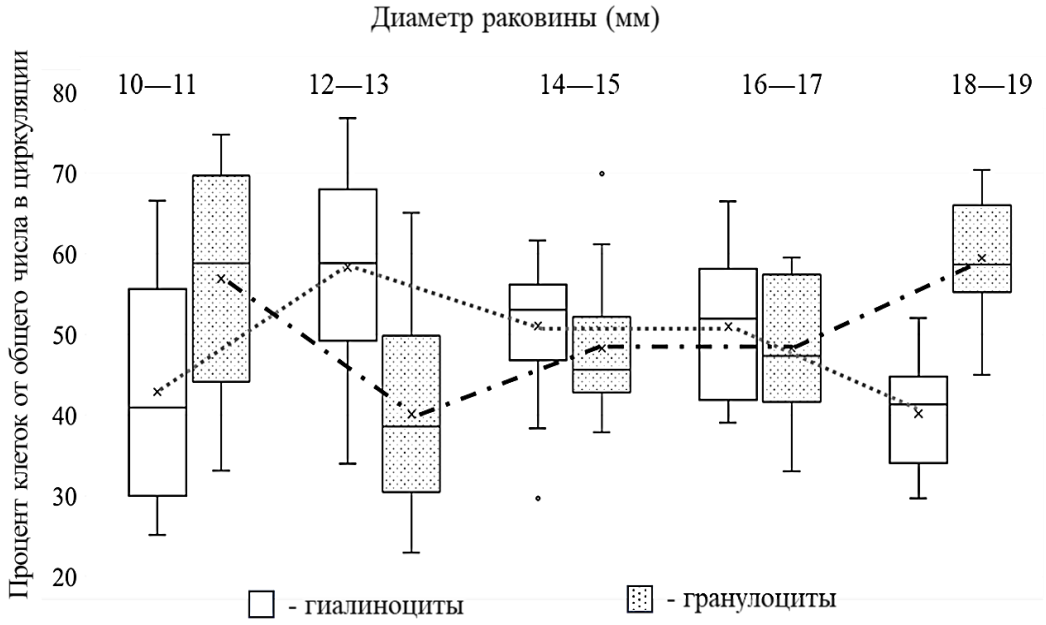


Рисунок 72. Диаграмма, отражающая относительное количество гиалиноцитов и гранулоцитов у моллюсков *Biomphalaria glabrata* с разным диаметром раковины. Условные обозначения: см. рисунок 71.

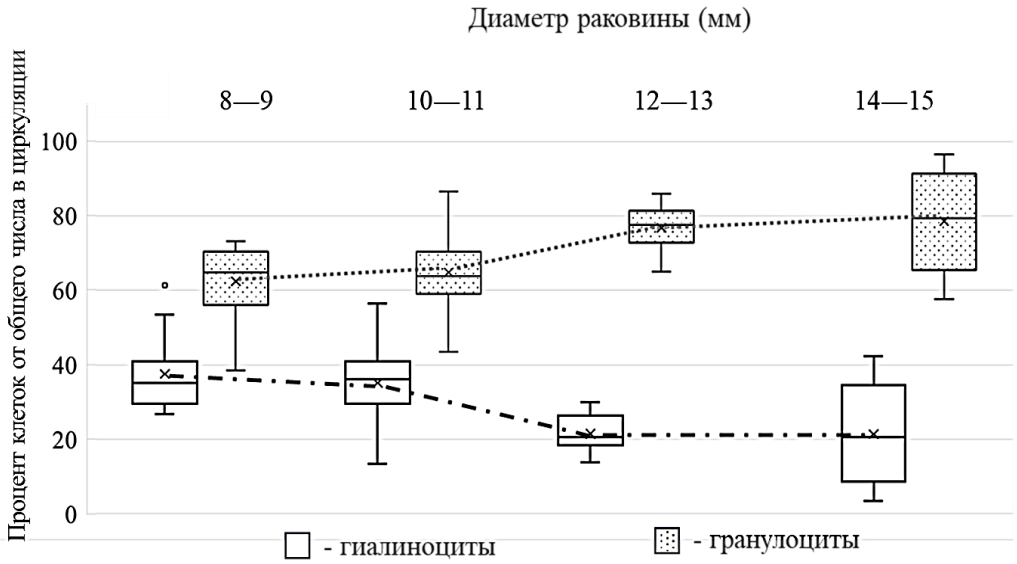


Рисунок 73. Диаграмма, отражающая относительное количество гиалиноцитов и гранулоцитов у моллюсков *Planorbis planorbis* с разным диаметром раковины. Условные обозначения: см. рисунок 71.

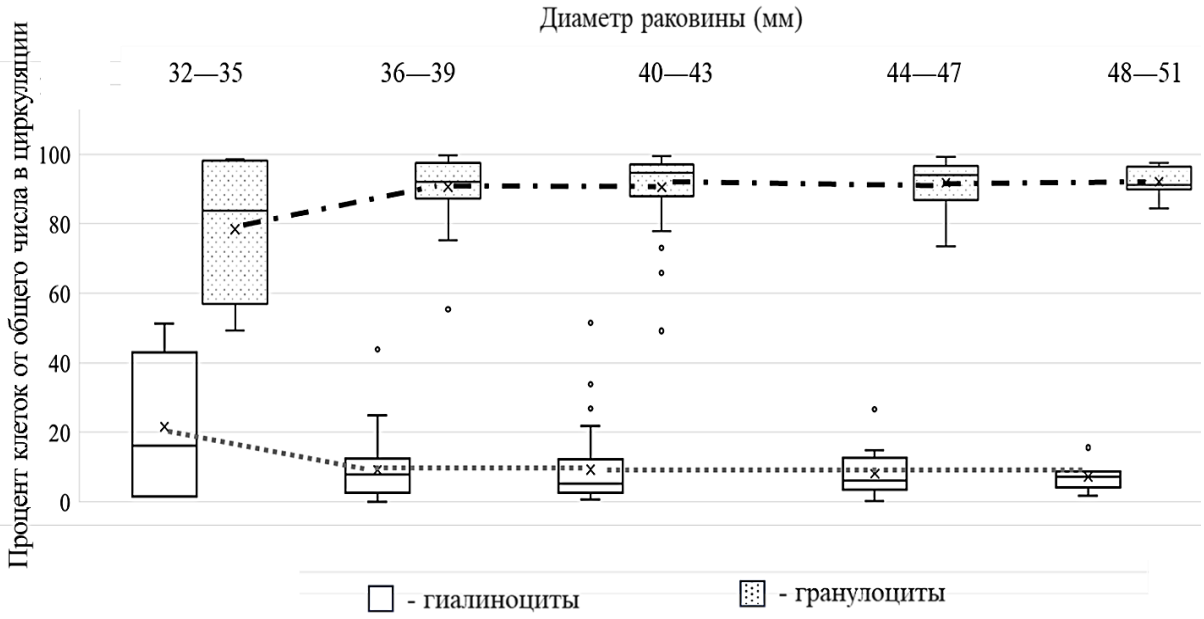


Рисунок 74. Диаграмма, отражающая относительное количество гиалиноцитов и гранулоцитов у моллюсков *Lymnaea stagnalis* с разной высотой раковины. Условные обозначения: см. рисунок 71.

У моллюсков *Planorbis planorbis* (n=41) также прослеживается тенденция к уменьшению относительного количества гиалиноцитов с ростом диаметра раковины (r=–0.86) (рисунок 73). В группах с небольшим диаметром раковины (8–9 мм и 10–11 мм) относительное количество гиалиноцитов достоверно не отличается друг от друга. Но в группах с диаметром раковины 12–13 мм и 14–15 оно достоверно выше ($p<0.05$), чем у маленьких улиток. Наиболее широкий диапазон значений соотношения гранулоцитов и гиалиноцитов характерен для самых крупных улиток.

У улиток *Lymnaea stagnalis* с высотой раковины 32–35 мм наблюдается большая вариабельность показателя соотношения гиалиноцитов и гранулоцитов (рисунок 74). Несмотря на то, что среднее относительное количество гиалиноцитов у улиток крупного размера больше, достоверных различий между улитками разных размеров не выявлено. По сравнению с планорбидами, у прудовиков количество гранулоцитов относительно невелико. Однако корреляционный анализ по всей выборке (n=98) также показал наличие отрицательной корреляции между относительным количеством гиалиноцитов и размером раковины (r= –0.85).

Обсуждение к разделу III.2.2

Численность и соотношение гемоцитов разных типов в циркуляции являются видоспецифическими признаками. Для этих параметров также характерна большая внутривидовая вариабельность. Известно, что на концентрацию и активность гемоцитов у моллюсков влияют такие факторы как как режим питания, температура, концентрация кислорода (Nelson et al., 2016; Сокольникова, 2021), репродуктивная стадия (Brokordt et al.,

2019), химический состав воды (Latire et al., 2012; Zhang et al., 2015), а также иммунизация (Noda, Loker, 1989).

Анализ влияния размеров улиток на численность гемоцитов показал, что у незаражённых моллюсков небольшого размера концентрация гемоцитов выше, чем у моллюсков средних размерных классов. Сильнее всего различия между моллюсками разных размеров проявляются у моллюсков *Planorbarius corneus* и *Lymnaea stagnalis* (см. рисунки 71, 74). При этом у крупных особей численность гемоцитов также выше, чем у улиток средних размерных групп. Кроме того, для больших улиток характерна наибольшая вариабельность показателя концентрации гемоцитов в циркуляции.

Причины подобных различий могут быть разными. Прежде всего, можно предположить, что у моллюсков небольшого размера активнее происходят процессы гемопоэза в связи с активным ростом. Известно, что помимо иммунной функции, гемоциты участвуют в процессах роста и регенерации у моллюсков (Sminia et al., 1973; Oliveira et al., 2010b). Например, у лёгочного моллюска *Limax maximus* гемоциты скапливаются в месте повреждения (разрезы на дорсальной поверхности тела), инфильтруя окружающие ткани и активно фагоцитируют клеточный дебрис, образовавшийся при повреждении тканей (Franchini, Ottaviani, 2000). Скопившиеся в очаге воспаления гемоциты формируют гранулёмы, внутри которых имеется лакуна. Гемоциты гранулёмы вырабатывают ростовые факторы (IL-1α, IL–8 и TNF–α). Через 3 дня после травмирования в месте повреждения появляется слой волокнистой соединительной ткани. Можно о предположить, что гемоциты участвуют в процессах активного роста в качестве источника цитокинов. У позвоночных животных такая функция в морфогенезе подтверждена для многих миелоидных клеток – макрофагов, базофилов, тучных клеток (Ельчанинов, Фатхудинов, 2023). Также есть данные, подтверждающие участие гемоцитов в процессах формирования раковины (Mount et al., 2004), переносе газов и питательных веществ (Sminia, 1972).

В лабораторной линии *Biomphalaria glabrata* у ювенильных особей с размером раковины до 6 мм (одного возраста) концентрация гемоцитов в два раза выше, чем у взрослых особей того же возраста с размером раковины 12 мм и более (Loker et al., 1987). У моллюсков с раковиной до 11 мм средняя концентрация гемоцитов в 2 раза больше, чем у более крупных улиток. Иммунизация мирацидиями *Echinostoma paraensei* приводит к значительному росту численности гемоцитов в обоих размерных группах, но инкапсуляция и элиминация паразита происходит более успешно в крупных улитках. Таким образом, большая концентрация гемоцитов в данном случае не приводит к бóльшей резистентности ювенильных особей. Однако следует отметить, что в обсуждаемом исследовании были использованы улитки чувствительной к заражению трематодами линии (М-линия) (Loker et al., 1987). Принято считать, что различия

между линиями биомфалярий с разной восприимчивостью к трематодной инвазии связаны в том числе с разной активностью гемоцитов в отношении патогена (см. раздел II). Это также согласуется с описанным для *Biomphalaria glabrata* феноменом «взрослой резистентности», когда молодые моллюски восприимчивы к заражению, а взрослые – резистентны (Richards, Shade, 1987; Lewis et al., 2001).

В то же время, в одном из исследований было показано увеличение численности гемоцитов у биомфалярий с увеличением размеров раковины (Stumpf, Gilbertson, 1978). Однако в упомянутой работе были использованы более крупные улитки – от 8 до 28 мм. Также авторами показано, что концентрация гемоцитов различна у моллюсков из разных линий. Это подтверждает большой вклад наследственности в формирование этого признака. Противоречивость результатов разных исследований можно связать не только с разными исходными данными (размеры улиток, условия среды), но и с тем, что диаметр раковины гастропод не всегда отражает возраст улитки и также сильно зависит от условий обитания (Шилейко, 1984; Грицюк и др., 2001; Сербина, 2008). Кроме того, динамика роста у отдельных особей может значительно варьировать (Zotin, 2018; Mažuran, Kovačević, 2021)

Интересно, что в предыдущих наших работах при сравнении моллюсков *Planorbarius corneus* с диаметром раковины 25–30 мм и 31–35 мм было выявлено увеличение численности гемоцитов у более крупных улиток (Прохорова, 2009). Однако расширение выборки показало, что этот диапазон размеров не отражает полностью общей тенденции изменения концентрации гемоцитов с ростом размера улиток.

Среди исследованных нами видов именно у биомфалярий различия в численности гемоцитов между группами моллюсков разного размера более выражены чем у других планорбид. Моллюски *Biomphalaria glabrata* – единственная лабораторная культура, использованная для анализа гемоцитарного состава, в нашей работе. Как и другие линии моллюсков, она более генетически однородна, чем моллюски из природных популяций (Lewis et al., 2001). Кроме того, лабораторные моллюски на протяжении жизни обитают в более однородных условиях среды и подвергаются воздействию меньшего количества антигенов. Набор антигенов, с которым сталкиваются отдельные особи улитки, одинаков для всех улиток в культуральном аквариуме. Поэтому влияние среды на различия в выборке биомфалярий, меньше, чем для улиток из природы. Но и у лабораторных моллюсков тенденция к бóльшей численности гемоцитов у небольших особей сохраняется.

При определении соотношения гранулоцитов и гиалиноцитов в циркуляции результаты подсчёта на фиксированных мазках и при цитометрическом анализе значительно различаются. В мазках гемолимфы моллюсков всех видов преобладают гиалиноциты, при подсчёте в проточном цитометре численность гранулоцитов относительно гиалиноцитов становится

меньше. Такие различия связаны с методическим особенностями подготовки мазков гемолимфы и меньшей способностью гиалиноцитов к адгезии на субстрате. В результате клетки этого типа теряются в процессе приготовления препарата (Прохорова, 2009). При цитометрическом исследовании анализируется свежесобранная гемолимфа без предварительной обработки, что значительно уменьшает потери клеток (Серебрякова, Прохорова и др., 2015).

Соотношение типов гемоцитов различно у представителей разных видов. Среди планорбид меньше всего гиалиноцитов у моллюсков *Planorbis planorbis.* Это прослеживается по данным как микроскопического, так и цитометрического анализа. На препаратах гемоцитов *P. planorbis* видно, что клетки сильнее вакуолизированы, чем у других улиток (рисунок 52). Поэтому по данным микроскопического анализа их сложно классифицировать.

Соотношение популяций гранулоцитов также различается у моллюсков разных видов. У *P. planorbis* преобладает популяция С, тогда как у улиток остальных исследованных видов доминирует популяция В. Среди всех исследованных видов наименьшее относительное количество гиалиноцитов – у прудовика. При этом именно у него зафиксирована наибольшая концентрация гемоцитов. Кроме того, клетки гемолимфы прудовика крупнее, чем у других моллюсков. Получается, что среди пресноводных улиток наибольшее относительное количество гранулоцитов наблюдается у наиболее крупного вида. Среди наземных моллюсков наибольшее относительное количество гранулоцитов характерно для самого мелкого из исследованных видов – *Cochlicopa lubrica*. Однако, возможно такая тенденция связана с тем, что именно кохликопы предпочитают биотопы с высокой влажностью.

У моллюсков *Planorbarius corneus, Lymnaea stagnalis* и *Planorbis planorbis* выявлена отрицательная корреляция между диаметром раковины и относительным количеством гранулоцитов. У *Biomphalaria glabrata* эта корреляция наблюдается для всех улиток, кроме самых небольших. Таким образом, с увеличением размера улитки, растёт относительное количество гранулоцитов. Ранее такая зависимость была показана также для моллюсков *Bulinus africanus* (Yssel, Wolmarans, 1989). У булинусов бóльшего веса доля гранулоцитов больше, чем у более лёгких особей.

Рост численности гемоцитов у моллюсков и повышение доли гранулоцитов при этом были неоднократно показаны в опытах с иммунизацией улиток и при сравнении заражённых и незаражённых особей (Ataev, Coustau, 1999; Прохорова 2009; Barcante at al., 2012; Ataev et al., 2016b). Результаты оценки влияния иммунизации на численность гемоцитов в циркуляции рассмотрены отдельно в разделе III.4.2. Однако для подсчёта корреляции в нашей работе были использованы только незаражённые улитки. Поэтому такую зависимость нельзя объяснить бóльшей заражённостью трематодами. Тем не менее, любые организмы по мере взросления сталкиваются и взаимодействуют с большим количеством патогенов. Происходит постепенная

иммунизация антигенами окружающей среды. Поскольку именно гранулоциты рассматриваются как наиболее функционально активные (или зрелые гемоциты) (см. раздел Ш.2.3), по мере развития моллюска среди гемоцитов может увеличиваться доля более активных клеток – гранулоцитов. Тем не менее, иммунизация может оставаться невыявленной, особенно в случае с моллюсками из природных популяций.

При иммунизации трематодами моллюсков чувствительных и резистентных линий у первых происходит более заметный рост численности гемоцитов, однако эффективность иммунной реакции ниже. Причина – меньшая эффективность работы гемоцитов против патогена (Loker et al., 1987). Возможно, относительно бóльшее количество гранулоцитов при меньшей концентрации гемоцитов (у моллюсков средних размеров) связано с большей функциональной активностью имеющихся клеток.

Таким образом, как и у позвоночных животных, у лёгочных моллюсков концентрация и соотношение типов циркулирующих иммуноцитов зависит от многих факторов – возраста, особенностей окружающей среды, наличия иммунизации и её срока.

III.2.3. Функциональные особенности гемоцитов

Транскрипты факторов иммунного ответа в гемоцитах. В результате сборки и анализа транскриптома гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus*, были выявлены транскрипты около 2500 генов, соответствующих всем основным группам факторов врождённого иммунитета (таблица 33).

Нуклеотидные последовательности транскриптов были проверены на наличие открытых рамок считывания (open reading frame, ORF). Для каждого транскрипта была выбрана одна наилучшая ORF. Полученный протеом был аннотирован и в нём был осуществлен поиск белков (с использованием BLASTp и IPS), участвующих в реакциях врождённого иммунитета. С помощью базы данных, содержащей названия связанных с иммунитетом белков, было найдено 5385 доменов (Orlov et al., 2023). Большинство из этих доменов относятся к суперсемействам иммуноглобулинов и лектинов, а также факторам цитотоксичности разных групп (приложение 18).

Одни из самых представленных групп закодированных молекул – молекулы адгезии и патогенраспознающие рецепторы. Им соответствуют 1776 транскриптов. Среди последних выявлены как многочисленные лектины, так и толл-подобные рецепторы, скавенджер-рецепторы и рецепторы распознавания олигонуклеотидов (таблица 42, раздел III.4).

Таблица 33. Функциональные группы белков, связанных с иммунитетом, транскрипты которых выявлены в гемоцитах *Planorbarius cormeus*
(по: Orlov, Ataev, Gourbal, Tokmakova, Bobrovskaya, Prokhorova, 2023)

Функциональная группа	Закодированные факторы иммунитета, согласно BLASTp
Распознавание патогенов, адгезия и межклеточные взаимодействия	
Толл-подобные рецепторы (TLR)	TLR 1, TLR 2, TLR 3, TLR 4, TLR 5, TLR 6, TLR 7, TLR 8, TLR 13, CD 180
Скавенджер-рецепторы (SR)	SR A, SR B, SR F, CD36
Лектины	C-лектин 1, 3, 4, 6, 10, 11, 18, C16a 1; I-лектин 2, 3, 5; коллектин 10, 11, 12; галектин 3, 4, 6, 7, 8; фуколектин 1, 4, 5, 7; тахилектин 4, 5a, 5b; пентраксин-1; фиколин-1; белок, связывающие бета-глюканы; белок, связывающий грамотрицательных бактерий; макрофагальный маннозный рецептор; маннозо-связывающий лектин; липидо-связывающий лектин
Молекулы, содержание фибриногеновый домен (FRED), включая фибриногенподобные белки (FREP)	FRED A, FRED, FREP 1, FREP 2, FREP 3, FREP 12, FREP B, FREP D, FREP J2
Селектины	E-селектин; полицистин-1, 2; селектин 1
Интегрины	интегрин альфа – 1, 2, 4, 8, 11, 1
Дерматопонтины	дерматопонтин 1, 2
Факторы цитотоксичности	
Антимикробные пептиды	ахацин-подобный белок; аплизиализин-подобный белок
Токсины	биомфализин 2, 3, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17; предшественник порообразующего пептида Naegleriapore b
Система комплемента	C1q-подобный белок 4; C1q-подобный рецептор; C3-подобный белок; тиоэфирсодержащие белки 1, 2, 4

Таблица 33 (продолжение)

Протеазы	химотрипсиноген; химотрипсины B, 2; эластаза, химотрипсиноподобная эластаза, эластаза поджелудочной железы; коллагеназа 3; сериновая протеаза 42, 27, 30, трансмембранная сериновая протеаза 3; нейротрипсин; трипсин 1, 2, 3
Выработка активных форм кислорода и азота	каталаза; глутатионпероксидаза; глутатионредуктаза; тиоредоксинредуктаза; тиоредоксин; тиоредоксиндисульфидизомераза; синтаза оксида азота 2; белок, взаимодействующий с синтазой оксида азота
Фенолоксидазная система	супероксиддисмутаза; Cu/Zn-супероксиддисмутаза; тирозиназа; лакказа-4
Ингибиторы	альфа-2-макроглобулин, ингибитор эластазы лейкоцитов; ингибитор сериновой протеазы типа Кунитца; ингибитор сериновой протеазы типа Казаля; ингибитор субтилизин-химотрипсина
Регуляция иммунного ответа	
Цитокины	интерлейкин 16, 17, 6; фактор, ингибирующий миграцию макрофагов; фактор некроза опухолей
Внутриклеточная регуляция	белки теплового шока: 10 кДа, 60 кДа, 82 кДа, 70 кДа, 90 кДа; серпин A3, B10, B3, B4-подобный, B6-подобный; цистатин-A-подобный белок, цистатин-B-подобный белок
Апоптоз	индуцирующий апоптоз фактор 1, 3; каспаза-1, 2, 3, 7, 9, каспаза-8 Bcl-2-подобный белок 1; белок B-клеточной лимфомы 3; MAP-киназа 7, 14; MAP-киназная фосфатаза
Метаболизм ДНК и белков	лигаза убиквитин-протеина E3; белок репарации ДНК, перекрестно дополняющий белок рентгеновской репарации 5

Другая хорошо представленная группа – факторы цитотоксичности. В гемоцитах присутствуют транскрипты основных групп факторов цитотоксичности клеток врождённого

иммунитета: антимикробные белки, токсины, каспазы, лиганды апоптоза, многочисленные протеазы, ферменты фенолоксидазного каскада и кислородного взрыва, цитокины.

Подвижность и формирование агрегаций гемоцитов. Среди гемоцитов моллюсков исследованных видов наибольшей подвижностью обладают гранулоциты. На протяжении инкубирования во влажной камере гранулоциты способны перемещаться по субстрату (стекло, пластик) на расстояние в десятки микрометров (рисунок 75).

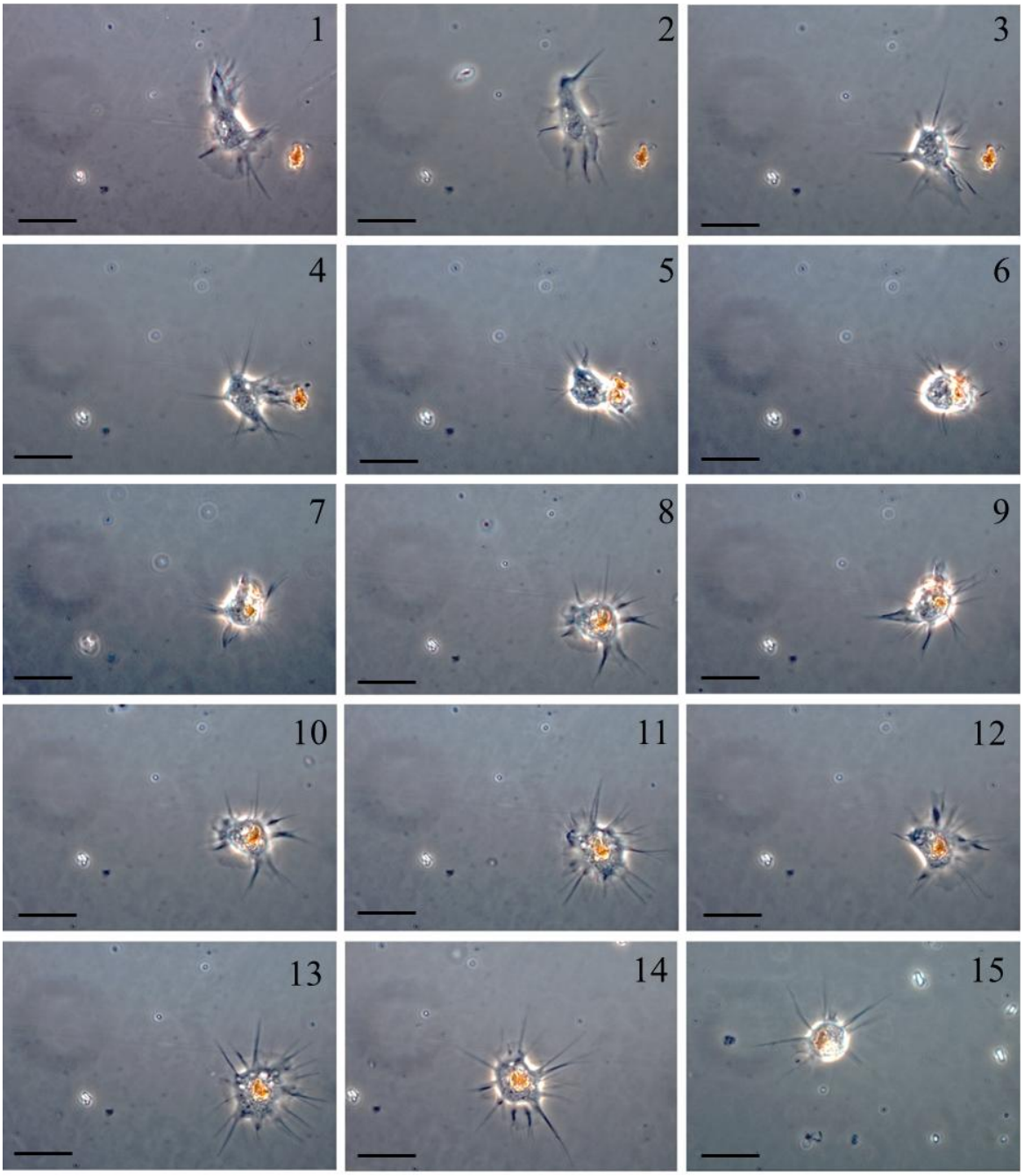


Рисунок 75. Перемещение гемоцита моллюска *Planorbis planorbis* на протяжении инкубирования во влажной камере по направлению к агглютинации бактерий *S. aureus*. Условные обозначения: 1–15 серия последовательных фотографий. Масштабная линейка – 10 мкм.

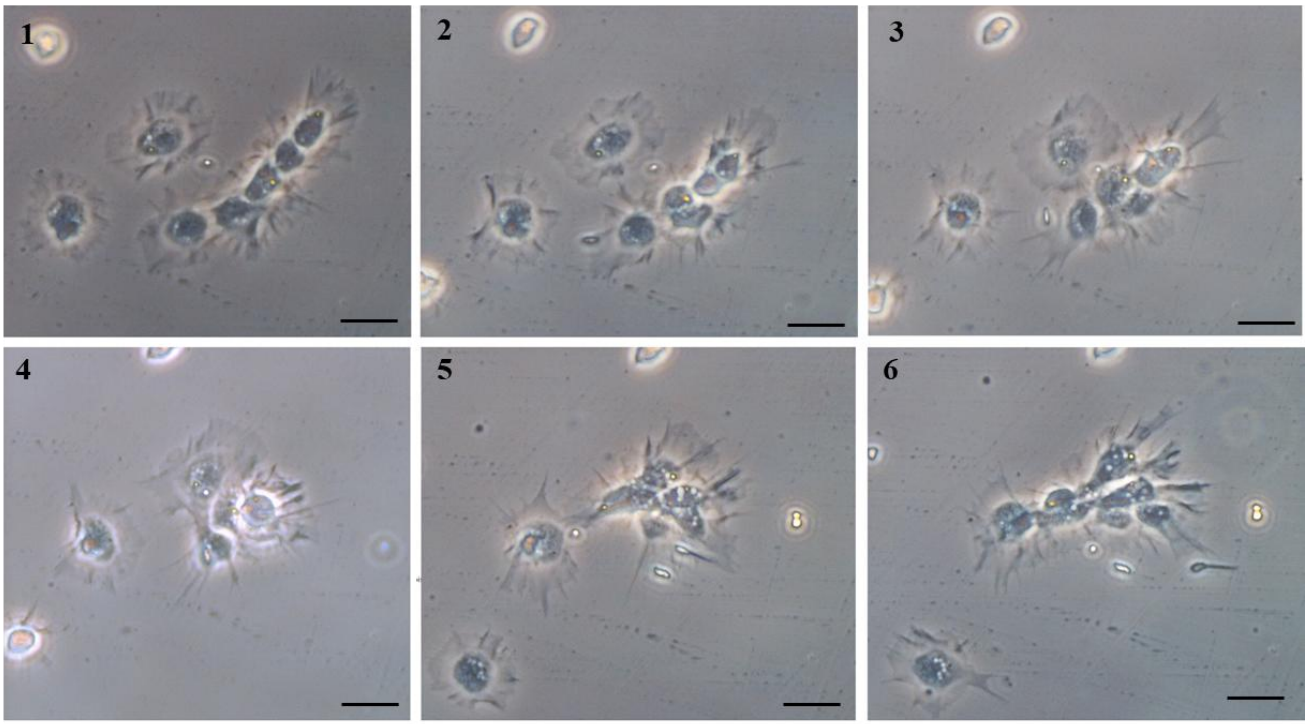


Рисунок 76. Перемещение гемоцитов моллюска *Planorbarius corneus* на протяжении инкубирования во влажной камере и формирование агглютинации. Условные обозначения: 1–6 серия последовательных фотографий. Масштабная линейка – 10 мкм.

Также гемоциты демонстрируют направленное движение по отношению к различным объектам – агглютинациям бактерий (рисунок 75, 77В, Е), частицам латекса (рисунок 77, Д), поверхности метацеркарий и спороцист трематод (рисунок 77Б, Г), другим гемоцитам (рисунки 76, 78).

По фотографиям мазков гемолимфы была посчитана доля гемоцитов в составе агрегаций относительно одиночно лежащих клеток через 30 минут инкубирования во влажной камере (таблица 34). Для данного анализа были выбраны моллюски средних размерных классов. У большинства видов моллюсков на препаратах гемолимфы в состав агрегаций входит в среднем 18–26% клеток. Наиболее активно формируют агрегации гемоциты *Lymnaea stagnalis*. На препаратах гемолимфы прудовика в состав скоплений входят в среднем 46% гемоцитов. Меньше всего агрегаций формируют гемоциты моллюсков *Cochlicopa lubrica* (в среднем 13%) и *Succinea putris* (в среднем около 17%).

Для моллюсков четырёх модельных видов было проанализировано влияние иммунизации на способность гемоцитов формировать агрегации (таблица 34). В мазках гемолимфы неиммунизированных моллюсков *Biomphalaria glabrata* в среднем 25% гемоцитов входят в состав агрегаций, у моллюсков, иммунизированных бактериями *S. aureus* – 32%.

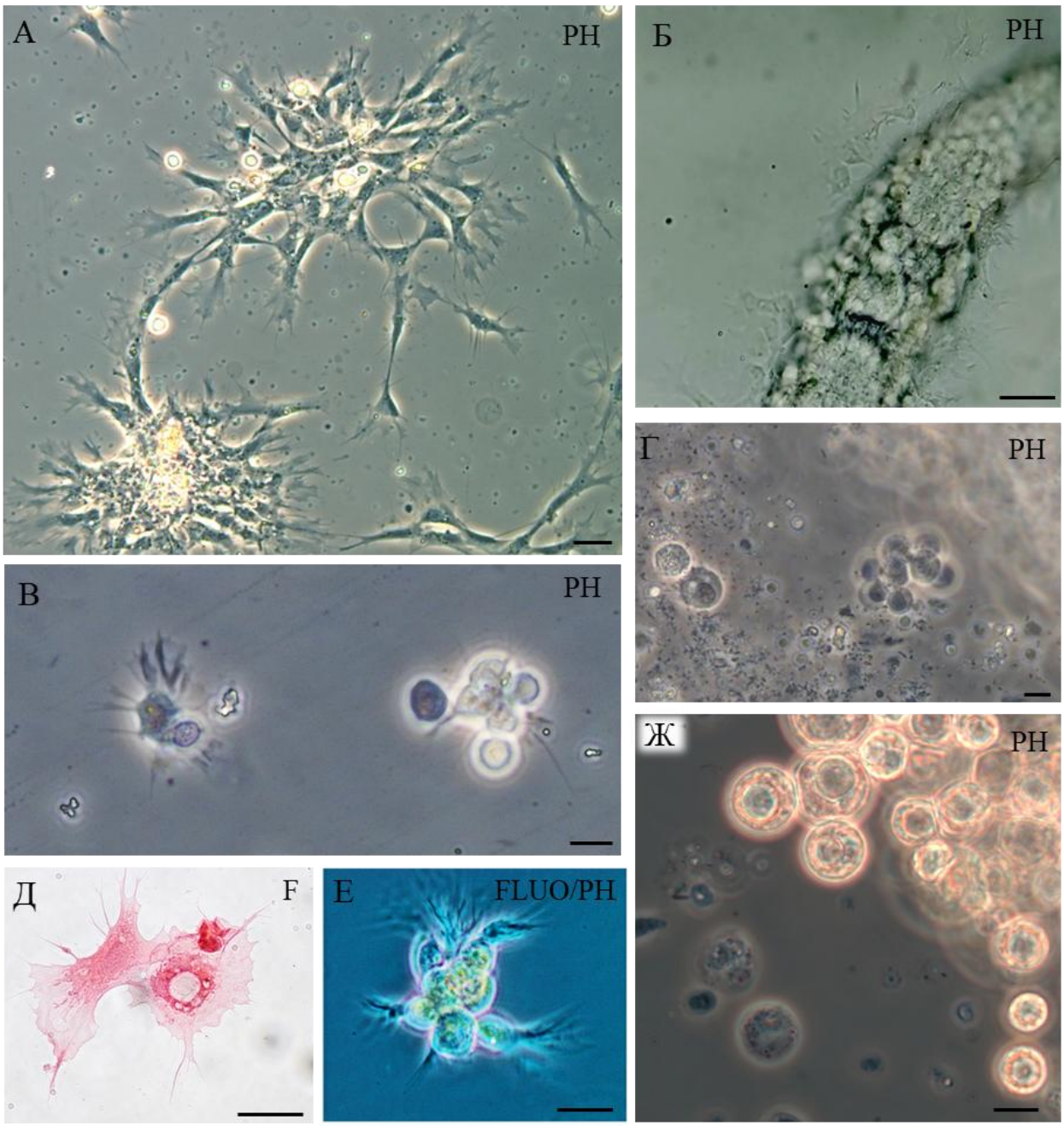


Рисунок 77. Агрегации гемоцитов лёгочных моллюсков вокруг чужеродных объектов. А – скопление гемоцитов моллюска *Lymnaea stagnalis* вокруг частиц латекса; Б – скопление гемоцитов моллюска *L. stagnalis* около спороцисты *Diplostomum pseudospathaceum*; В – агглютинация гемоцитов *Planorbis planorbis* с бактериями *S. aureus*; Г – скопление гемоцитов моллюска *Succinea putris* у поверхности метацеркарии рода *Leucochloridium*; Д – агглютинация гемоцитов моллюска *Planorbarius corneus* с частицам латекса; Е – агглютинация гемоцитов моллюска *P. corneus* с бактериями *E. coli* (окрашены FITC); Ж – агрегация гемоцитов моллюска *Biomphalaria glabrata* вокруг фрагмента водоросли. Условные обозначения: PH – фотографирование в режиме фазового контраста; F – гемоциты в фиксированных мазках, окрашенные гематоксилин-эозином и сфотографированные в режиме светлого поля; FLUO/PH – фотографирование в режиме флуоресценции, совмещенной с фазовым контрастом. Масштабная линейка – 7 мкм.

У роговых катушек, заражённых трематодами в среднем 37.5% гемоцитов в мазках находятся в составе агрегаций, у иммунизированных бактериями – 39.20%, что достоверно

больше, чем у неиммунизированных особей (в среднем – 26.63%) ($p<0.05$). Сильнее всего повышением агглютинирующей активности на иммунизацию откликаются гемоциты прудовика *Lymnaea stagnalis* (рисунок 79). У заражённых трематодами и иммунизированных бактериями прудовиков от 65 до 100% гемоцитов формируют агрегации, тогда как у незаражённых особей этот показатель не превышает 50% ($p<0.01$).

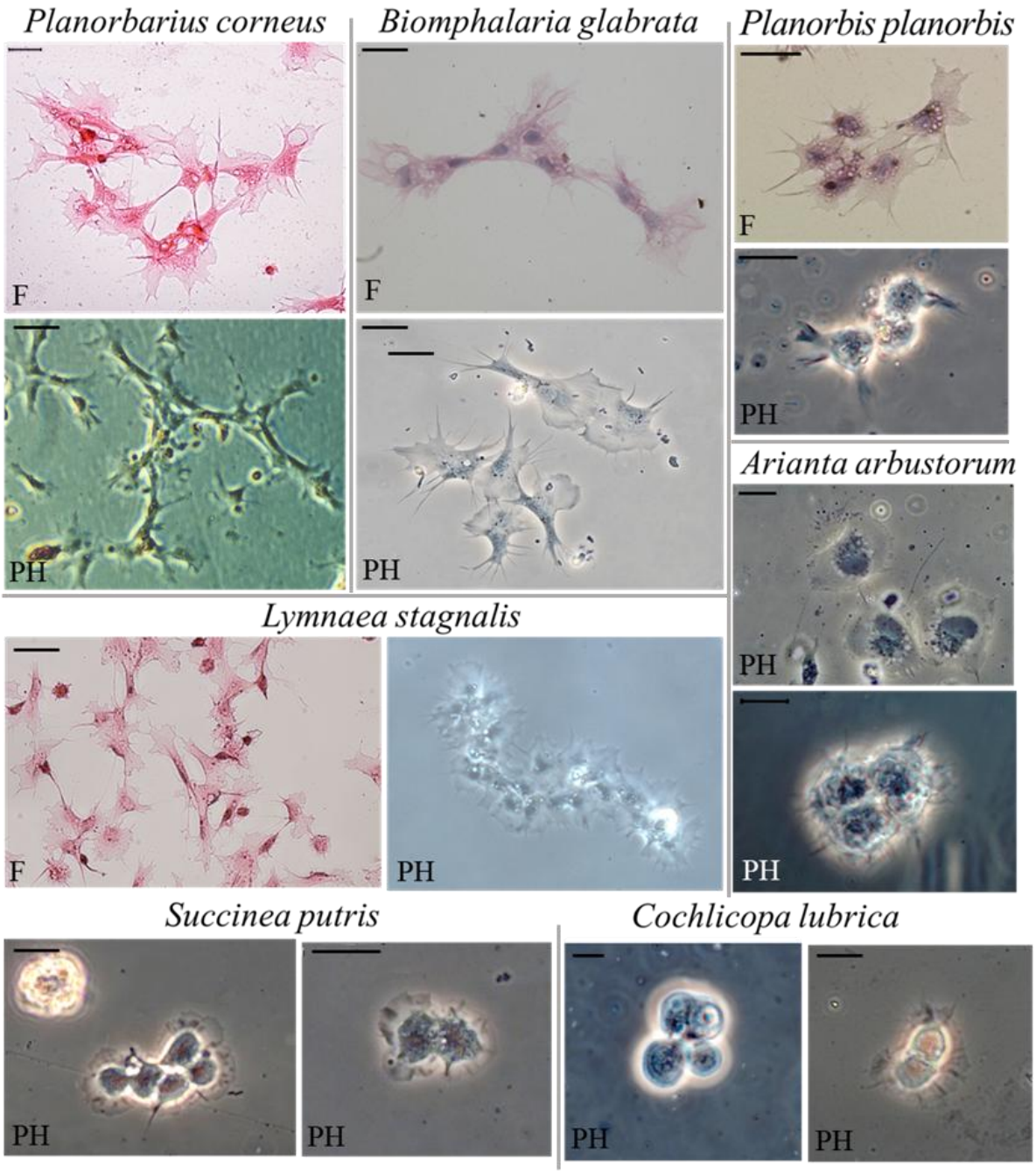


Рисунок 78. Агрегации гемоцитов лёгочных моллюсков. Условные обозначения: PH – живые гемоциты, сфотографированные в режиме фазового контраста; F – гемоциты в фиксированных мазках, окрашенные гематоксилин-эозином и сфотографированные в режиме светлого поля). Масштабная линейка – 7 мкм.

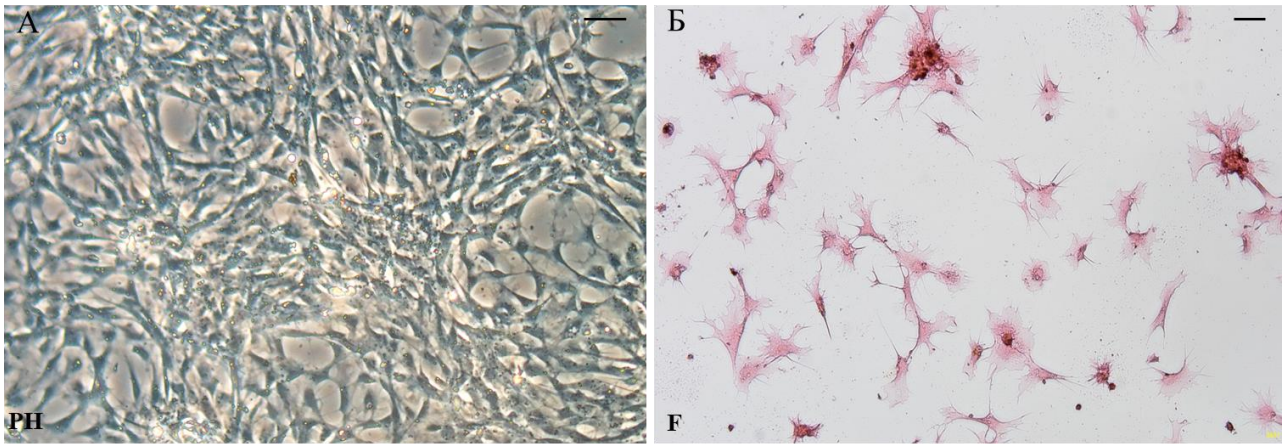


Рисунок 79. Скопления гемоцитов в мазках заражённых трематодами моллюсков *Lymnaea stagnalis* (А) и *Planorbarius corneus* (Б). Условные обозначения: см. рисунок 78. Масштабная линейка – 20 мкм.

Таблица 34. Процент гемоцитов в составе агрегаций в мазках гемолимфы лёгочных моллюсков через 30 минут инкубации во влажной камере

Виды моллюсков / иммунизация (количество проанализированных мазков)	Размер раковины (диаметр или высота, мм)	Процент гемоцитов в составе агрегаций (Me, максимальное и минимальное значения)
Biomphalaria glabrata / неиммунизированные (n=30)	15–17	24.95 (12.79; 36.60)
Biomphalaria glabrata / бактерии (n=30)		32.15 (18.09; 44.51)
Planorbarius corneus / неиммунизированные *(n=50)*	25–32	26.63 (21.67; 31.54)
Planorbarius corneus / бактерии (n=20)		39.20 (29.59; 48.35)
Planorbarius corneus / трематоды (n=36)		37.50 (33.90; 42.70)
Planorbis planorbis / неиммунизированные (n=40)	12–15	18.36 (15.03; 20.56)
Planorbis planorbis / бактерии (n=20)		20.22 (17.45; 28.46)
Planorbis planorbis / трематоды (n=36)		21.34 (17.01; 27.82)
Lymnaea stagnalis (n=40) / неиммунизированные *(n=50)*	36–43	46.42 (41.17; 50.93)
Lymnaea stagnalis (n=40) / бактерии (n=20)		83.31 (75.47; 100)
Lymnaea stagnalis (n=40) / трематоды (n=36)		78.35 (65.09; 100)
Succinea putris / неиммунизированные (n=37)	11–13	16.87 (14.09; 22.44)
Succinea putris / трематоды (n=18)		16.59 (13.25; 22.98)
Cochlicopa lubrica (n=15) / не учитывалась	4–5	13.02 (0; 19.12)
Arianta arbustorum (n=30) / не учитывалась	12–14	25.62 (17.07; 34.27)

В ходе инкубации во влажной камере временных препаратов гемоцитов в них постепенно возрастает количество скоплений гемоцитов. Они варьируются по размеру и включают от трёх до нескольких десятков клеток (см. рисунки 76–79). Наиболее крупные агрегации гемоцитов выявлены у моллюсков *Lymnaea stagnalis*, *Planorbarius corneus* и *Biomphalaria glabrata*. У *Planorbis planorbis*, несмотря на высокую концентрацию клеток в гемолимфе, агрегации состоят из относительно небольшого числа гемоцитов (до 10 клеток). У наземных видов моллюсков размер скоплений ещё меньше – они включают до 5–6 гемоцитов.

Гемоциты иммунизированных бактериями и заражённых трематодами моллюсков *Planorbis planorbis* чаще находятся в составе скоплений, чем у интактных особей. Однако для окаймлённой катушки выявленные различия не являются достоверными. У зараженных трематодами моллюсков *Succinea putris* не выявлено повышения количества гемоцитов в составе агрегаций.

Фагоцитарная активность гемоцитов. Для анализа фагоцитарной активности гемоцитов использовали бактерий *E. coli* и *S. aureus,* меченых ФИТЦ. Аликвоты гемолимфы от каждого моллюска инкубировали с бактериями каждого из видов. В качестве отрицательного контроля использовали алкивоту гемолимфы, инкубированную без бактерий. Для разделения фагоцитировавших клеток и гемоцитов, которые опсонизировали бактерий на поверхности, но не поглотили их, препараты окрашивали трипановым синим. Это позволило выделить внутри популяций гемоцитов пулы, которые опсонизировали бактерий, фагоцитировали бактерий и не проявили фагоцитарной активности (рисунок 80).

У моллюсков *Planorbarius corneus* (n=17, диаметр раковины 22–26 мм) в контрольных образцах соотношение гемоцитов в популяциях A, B и C соответствует средним значениям для данного вида и данной размерной группы. В гемолимфе, инкубированной с бактериями *E. coli,* значительно уменьшается доля гиалиноцитов ($p<0.01$), а также возрастает доля гранулоцитов популяции C ($p<0.005$). Количество гиалиноцитов относительно всех гранулоцитов также уменьшается ($p<0.005$). Относительное количество гранулоцитов популяции B возрастает, но незначительно (таблица 35).

Среди гемоцитов, инкубированных со *S. aureus,* значительным изменением является только повышение относительного количества гранулоцитов популяции C ($p<0.01$). Следует отметить, что в одной области с гранулоцитами популяции C на цитограммах могут находиться скопления бактерий. Поэтому данные об увеличении числа событий в этой области сложно интерпретировать.

В среднем гемоциты роговой катушки активнее реагируют на *E. coli,* чем *S. aureus* (рисунок 81). Относительное количество клеток, не проявивших активности по отношению *E. coli,* ниже, чем не участвовавших в нейтрализации *S. aureus* ($p<0.05$). Соответственно, в два раза

выше процент гемоцитов, которые фагоцитировали *E. coli*, чем *S. aureus* ($p<0.001$). При этом количество клеток с опсонизирующей активностью в отношении различных бактерий статистически не различается. Таким образом, примерно одинаковая опсонизация разных бактерий гемоцитами не обеспечивает одинаково эффективный фагоцитоз.

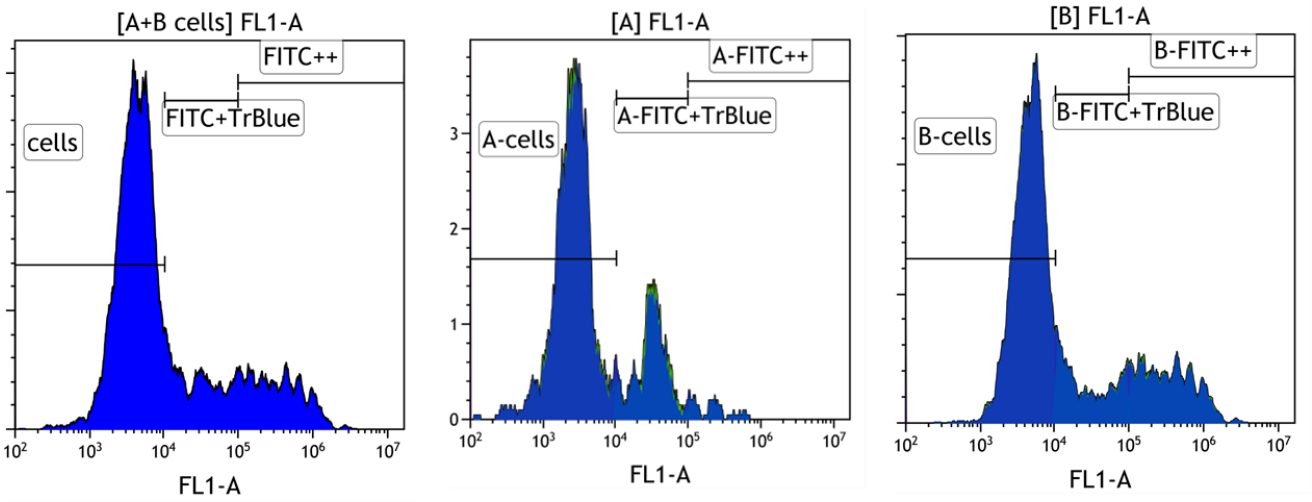


Рисунок 80. Схемы выделения клеток, проявляющих разную фагоцитарную активность в популяциях гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus*. Условные обозначения: A, B – популяции гемоцитов; FL-1 – интенсивность флуоресценции; FITC++ – гемоциты с интенсивной флуоресценцией (фагоцитировавшие бактерий), FITC+TrBlue – гемоциты со слабой флуоресценцией (опсонизировавшие бактерий); cells – клетки, не проявляющие флуоресценцию по выбранному каналу (не проявившие фагоцитарной активности).

Для обеих популяций гемоцитов – гиалиноцитов и гранулоцитов – доля клеток, фагоцитировавших *E. coli*, в два раза выше, чем доля клеток, фагоцитировавших *S. aureus* ($p<0.05$ и $p<0.01$ соответственно). Гиалиноциты и гранулоциты популяции B примерно одинаково опсонизируют *E. coli*, но относительное количество поглотивших бактерию гранулоцитов достоверно выше ($p<0.01$). Доли гранулоцитов и гиалиноцитов, которые опсонизируют *S. aureus* также практически одинаковы (в среднем около 60%). Но относительное количество гранулоцитов популяции B, поглотивших стафилококка, достоверно выше, чем относительное количеств фагоцитировавших его гиалиноцитов ($p<0.01$) (таблица 35).

Анализ гемолимфы моллюсков *Lymnaea stagnalis* ($n=39$) также показывает изменения в гемоцитарном составе в результате инкубирования гемолимфы с бактериями. В аликвотах гемолифмы, инкубированной с *E. coli* и *S. aureus*, уменьшается относительная доля гранулоцитов популяции B, по сравнению с контрольными образцами. Кроме того, относительно количество гранулоцитов достоверно больше в образцах, инкубированных с *E. coli*, чем со *S. aureus* ($p<0.01$). На относительное количество гиалиноцитов инкубация с бактериями не влияет. Количество клеток популяции C в данном исследовании у прудовиков не фиксировалось по указанным выше причинам: они находятся в одной области со скоплениями

бактерий. Кроме того, проведённые ранее исследования клеточного состава гемолимфы прудовиков показали, что гранулоциты популяции С составляют лишь небольшую часть гемоцитов (около 3%).

Таблица 35. Соотношение популяций гемоцитов и клеток с разной фагоцитарной активностью по данным цитофлуориметрического анализа у моллюсков *Planorbarius corneus*

Контроль (гемолимфа без добавления бактерий) *				
Популяции гемоцитов**		Относительное количество клеток (%)		
A+B		90.82 / 93.74 (84.20; 96.91)		
A		48.93 / 48.23 (39.91; 59.19)		
B		41.77 / 37.58 (29.09; 58.46)		
C		9.28 / 6.36 (3.02; 16.56)		
Гемолимфа, инкубированная с бактериями *E. coli**				
Популяции гемоцитов**		Фагоцитарная активность ***		
		Не проявили активности	Фагоцитировали	Опсонизировали
A+B	73.37 / 77.50 (63.47; 88.78)	18.02 / 2.74 (1.16; 39.48)	32.00 / 30.76 (1.87; 53.71)	49.98 / 53.12 (40.08; 59.00)
A	**35.58 / 37.63 (24.33; 46.77)**	23.29 / 4.51 (1.75; 47.69)	22.40 / 18.43 (0.22; 37.85)	46.53 / 44.05 (33.65; 62.12)
B	38.42 / 39.21 (28.02; 46.57)	12.96 / 0.98 (0.09; 25.63)	40.82 / 36.51 (3.57; 74.85)	42.88 / 36.61 (22.90; 65.24)
C	**25.98 / 22.84 (10.05; 37.69)**	—	—	—
Гемолимфа, инкубированная с бактериями *S. aureus**				
Популяции гемоцитов**		Фагоцитарная активность***		
		Не проявили активности	Фагоцитировали	Опсонизировали
A+B	85.97 / 91.05 (88.81; 94.50)	25.09 /18.10 (8.63; 36.65)	15.24 /13.59 (7.85; 21.11)	59.66 / 67.58 (36.00; 83.85)
A	44.18 / 49.24 (29.77; 60.72)	31.51 / 22.71 (14.81; 48.99)	11.43 / 6.53 (3.53; 14.69	57.04 / 66.85 (25.33; 86.43)
B	41.89 / 34.09 (30.23; 59.88)	19.34 / 9.55 (1.31; 32.59)	18.79 / 16.31 (10.28; 26.29)	61.86 / 67.84 (39.26; 87.35)
C	**13.91 / 8.95 (5.42; 12.86)**	—	—	—

Условные обозначения: * – данные ячейках таблицы представлены в виде среднего/ медианы и интерквартильного размаха (К1, К3), ** – процент клеток относительно всех гемоцитов, *** – указаны значения в пересчёте на число клеток в популяции. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от контрольных образцов.

Среди исследованных прудовиков часть моллюсков были заражены трематодами *Echinostoma revolutum* (n=14). Относительное количество гемоцитов разных популяций после инкубации с бактериями *E. coli* не отличается в гемолимфе незаражённых и заражённых трематодами моллюсков. Напротив, в образцах, инкубированных со *S. aureus,* обнаружены различия в относительном количестве популяций гемоцитов между незаражёнными и заражёнными улитками. У заражённых моллюсков упомянутое выше снижение доли гранулоцитов выражено сильнее и их достоверно меньше, чем у незаражённых ($p<0.01$). Относительное количество гиалиноцитов в инкубированных со стафилококком образцах гемолимфы заражённых трематодами моллюсков также меньше, чем у незаражённых.

Гемоциты *Lymnaea stagnalis* проявляют бóльшую активность по отношению к стафилококку, чем к кишечной палочке. В среднем по выборке фагоцитарная активность гемоцитов в отношении стафилококка выше, чем в отношении кишечной палочки ($p<0.01$). Однако, опсонизирующая активность по отношению к *S. aureus* ниже, чем по отношению к *E. coli* ($p<0.01$).

В аликвотах гемолимфы незаражённых моллюсков *L. stagnalis*, инкубированных с *E. coli*, более 70% гиалиноцитов и более 50% гранулоцитов не проявляют активности по отношению к бактериям. Фагоцитируют кишечную палочку в среднем 3.91% гиалиноцитов и 12.08% гранулоцитов. В препаратах гемолимфы заражённых особей доля клеток, не проявивших активности по отношению к *S. aureus,* составляет в среднем 55% для гиалиноцитов и 44% для гранулоцитов. Доля клеток, фагоцититовавших стафилококка, достоверно выше, чем фагоцитировавших кишечную палочку: в отношении *S. aureus* фагоцитарную активность проявили в среднем 10.97% гиалиноцитов ($p<0.001$) и 24.70% гранулоцитов ($p<0.00$).

Гиалиноциты заражённых трематодами прудовиков *L. stagnalis* фагоцитируют *E. coli* в два раза активнее, чем гиалиноциты незаражённых особей ($p<0.001$). Также в гемолимфе заражённых трематодами прудовиков достоверно больше гранулоцитов, которые фагоцитировали эту бактерию ($p<0.01$). Опсонизирующая активность в отношении кишечной палочки также выше у гемоцитов заражённых улиток, по сравнению с незаражёнными. Таким образом, в отношении кишечной палочки у заражённых улиток возрастает как опсонизирующая, так и фагоцитарная активность гиалиноцитов и гранулоцитов.

Гемоциты заражённых моллюсков *L. stagnalis* проявляют бóльшую активность в отношении *S. aureus*, чем гемоциты незаражённых. В пулах гемолимфы заражённых моллюсков фагоцитарная активность выше, как среди гиалиноцитов, так и среди гранулоцитов. При этом опсонизирующая активность гемоцитов в отношении *S. aureus* не различается в гемолимфе заражённых и незаражённых моллюсков.

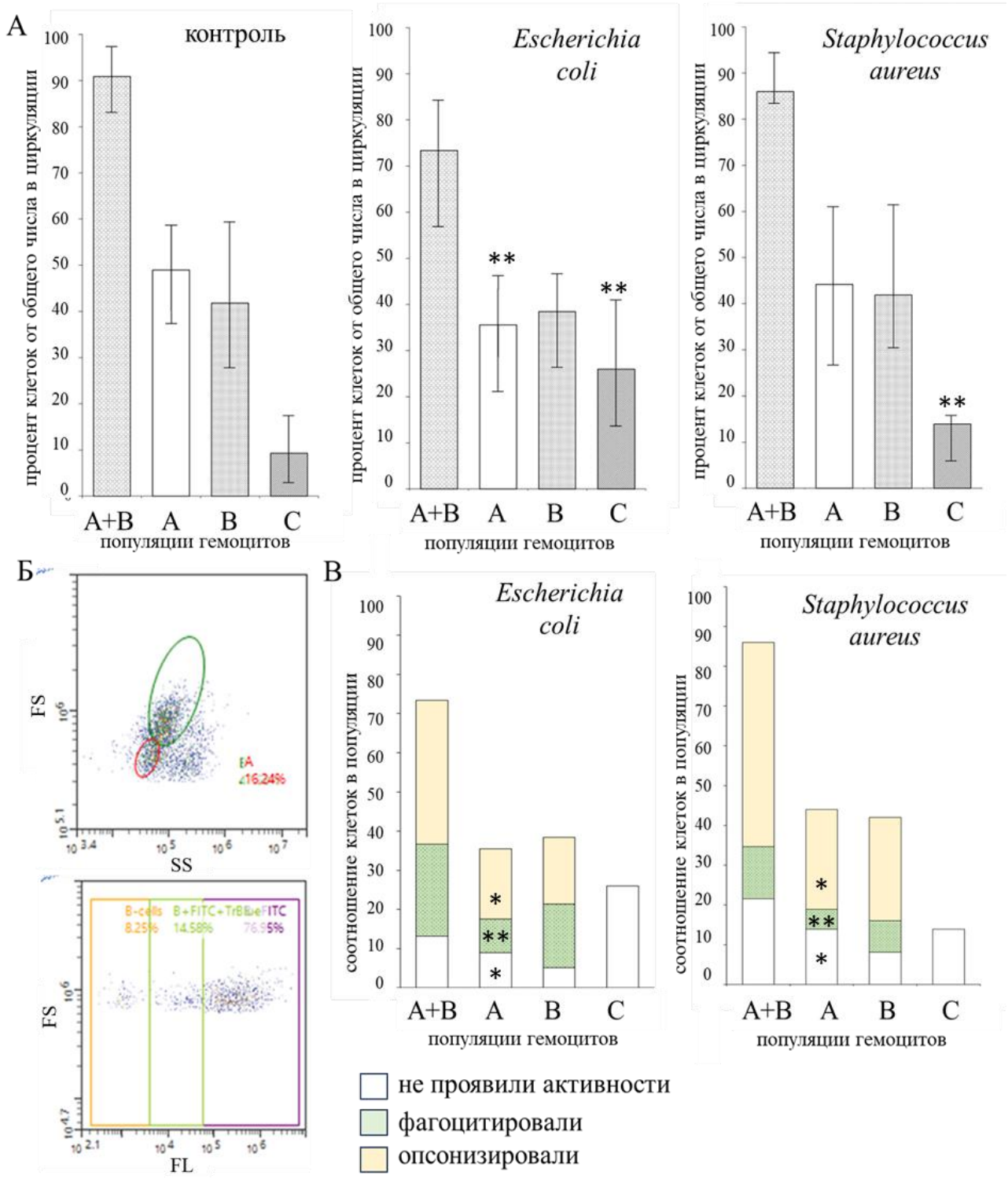


Рисунок 81. Анализ фагоцитарной активности гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus* (n=17). А – соотношение популяций гемоцитов в гемолимфе, инкубированной с бактериями и в контрольных образцах гемолимфы, инкубированной без бактерий; Б – схема выделения клеток с разной фагоцитарной активностью; В – соотношение клеток с разной фагоцитарной активностью в популяциях гемоцитов. Условные обозначения: FS – прямое светорассеивание; SS – боковое светорассеивание; FL – интенсивность флуоресценции; на рисунке А обозначены популяции гемоцитов, достоверно отличающиеся от контрольных образцов; на рисунке В обозначены группы гемоцитов, достоверно различающиеся в гемолимфе, инкубированной с разными бактериями: * – $p<0.05$, ** – $p<0.01$, ***– $p<0.005$.

Таблица 36. Соотношение популяций гемоцитов и клеток с разной фагоцитарной активностью по данным цитофлуориметрического анализа у моллюсков *Lymnaea stagnalis**

Контроль (гемолимфа без добавления бактерий)				
Популяции гемоцитов**				
A+B		97.21		
A		27.49		
B		69.64		
Гемолимфа, инкубированная с бактериями *E. coli* (вся выборка)				
Популяции гемоцитов**		Фагоцитарная активность ***		
		Не проявили активности	Фагоцитировали	Опсонизировали
A+B	76.42 / 83.55 (68.70; 90.6)	53.13 / 51.06 (41.79; 69.27)	10.84 / 9.16 (3.81; 12.37)	34.34 / 31.73 (24.70; 42.58)
A	25.87 / 26.11 (9.35; 37.46)	69.01 / 71.93 (57.16; 82.26)	5.39 / 3.02 (1.32; 7.82)	21.98 / 20.51 (13.43; 28.98)
B	**50.40 / 51.68 (36.56; 64.51)**	45.68 / 45.2 (35.55; 60.36)	13.74 / 9.54 (4.47; 17.83)	39.90 / 37.47 (30.11; 49.96)
Гемолимфа, инкубированная с бактериями *E. coli* (незаражённые)				
Популяции гемоцитов**		Фагоцитарная активность***		
		Не проявили активности	Фагоцитировали	Опсонизировали
A+B	75.43 / 83.64 (93.31; 68.77)	60.14 / 64.90 (72.49; 45.63)	9.48 / 4.90 (10.38; 1.98)	28.61 / 28.45 (31.73; 20.31)
A	26.40 / 26.11 (46.69; 5.15)	76.47 / 80.61 (83.87; 71.12)	3.91 / 1.52 (5.88; 0.39)	15.97 / 14.41 (23.03; 11.86)
B	**48.90 / 49.00 (63.62; 34.12)**	51.79 / 48.3 (71.64; 37.51)	12.08 / 8.43 (17.04; 3.8)	35.38 / 33.5 (42.86; 20.23)
Гемолимфа, инкубированная с бактериями *E. coli* (заражённые)				
Популяции гемоцитов**		Фагоцитарная активность ***		
		Не проявили активности	Фагоцитировали	Опсонизировали
A+B	78.19 / 82.08 (88.40; 66.70)	40.60 / 44.36 (49.62; 29.91)	13.28 / 9.86 (13.40; 7.99)	44.57 / 42.58 (46.99; 35.97)
A	24.91 / 26.2 (30.08; 16.60)	55.68 / 56.53 (68.44; 46.54)	8.03 / 5.94 (9.22; 3.88)	32.72 / 33.08 (42.26; 24.88)
B	**53.07 / 54.67 (64.08; 41.2)**	34.77 / 38.17 (44.44; 22.29)	16.70 / 11.51 (19.18; 8.96)	47.97 / 44.58 (51.94; 38.38)
Гемолимфа, инкубированная с бактериями *S. aureus* (вся выборка)				
Популяции гемоцитов**		Фагоцитарная активность **		
		Не проявили активности	Фагоцитировали	Опсонизировали
A+B	67.97 / 69.29 (62.89; 76.76)	48.68 / 53.38 (34.46; 65.13)	22.04 / 19.17 (10.05; 30.11)	23.85 / 22.13 (19.00; 26.53)
A	26.26 / 24.26 (11.69; 40.22)	55.64 / 58.66 (44.83; 69.27)	12.32 / 13.06 (5.77; 17.36)	22.13 / 20.12 (17.31; 26.23)
B	**41.57 / 40.87 (27.64; 53.53)**	44.51 / 49.38 (27.88; 59.86)	27.88 / 22.36 (14.31; 39.07)	24.44 / 23.24 (19.32; 27.74)

Таблица 36 (продолжение)

Гемолимфа, инкубированная с бактериями *S. aureus* (незаражённые)				
Популяции гемоцитов**		Фагоцитарная активность ***		
		Не проявили активности	Фагоцитировали	Опсонизировали
A+B	74.77 /73.1 (82.15; 68.72)	50.99 / 55.59 (68.34; 38.62)	19.04 / 15.19 (24.65; 9.06)	24.20 / 21.51 (26.72; 19.59)
A	29.33 / 20.63 (46.20; 12.84)	56.69 / 64.41 (70.45; 47.41)	10.97 / 8.67 (15.45; 3.53)	21.99 / 18.62 (26.35; 14.44)
B	**45.36 / 48.83 (59.52; 28.28)**	47.18 / 54.05 (64.92; 33.74)	24.70 /18.54 (33.74; 9.77)	24.80 / 23.7 (28.64; 19.49)
Гемолимфа, инкубированная с бактериями *S. aureus* (заражённые)				
Популяции гемоцитов**		Фагоцитарная активность ***		
		Не проявили активности	Фагоцитировали	Опсонизировали
A+B	57.94 / 63.28 (68.66; 51.45)	45.19 / 50.78 (55.51; 33.86)	27.64 / 26.44 (36.02; 17.94)	22.54 / 22.66 (25.45; 17.25)
A	22.10 / 24.47 (26.88; 12.77)	53.18 / 53.87 (66.49; 44.82)	15.42 / 15.1 (20.52; 12.41)	22.77 / 21.26 (22.88; 19.21)
B	**35.56 / 30.72 (43.56; 27.36)**	40.51 / 47.56 (53.37; 24.88)	33.96 / 30.96 (43.37; 19.61)	22.87 / 22.54 (26.55; 16.55)

Условные обозначения: * – данные ячейках таблицы представлены в виде среднего/ медианы и интерквартильного размаха (К1, К3), ** – процент клеток относительно всех гемоцитов, *** – указаны значения в пересчёте на число клеток в популяции. Жирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от контрольных образцов.

Для моллюсков *Biomphalaria glabrata* был выполнен анализ гемоцитарного состава после инъекции бактерий *E. coli* с последующим забором гемолимфы через разные промежутки времени. Подробно результаты данного исследования представлены в разделе III.4.2, посвящённом клеточным реакциям лёгочных моллюсков. Здесь стоит упомянуть, что через час после инъекции бактерий у биомфалярий увеличивается количество гранулоцитов популяции B (среднем с 41 до 52%) и падает количество гиалиноцитов (в среднем с 41 до 32%).

Для визуализации процесса фагоцитоза, препараты гемолимфы, инкубированные с бактериями, изучали на флуоресцентном микроскопе. Через 30 мин после инкубации в гемоцитах моллюсков хорошо заметны вакуоли, содержащие фагоцитированные бактерии (рисунки 83, 84, 85) (Ataev et al., 2016b).

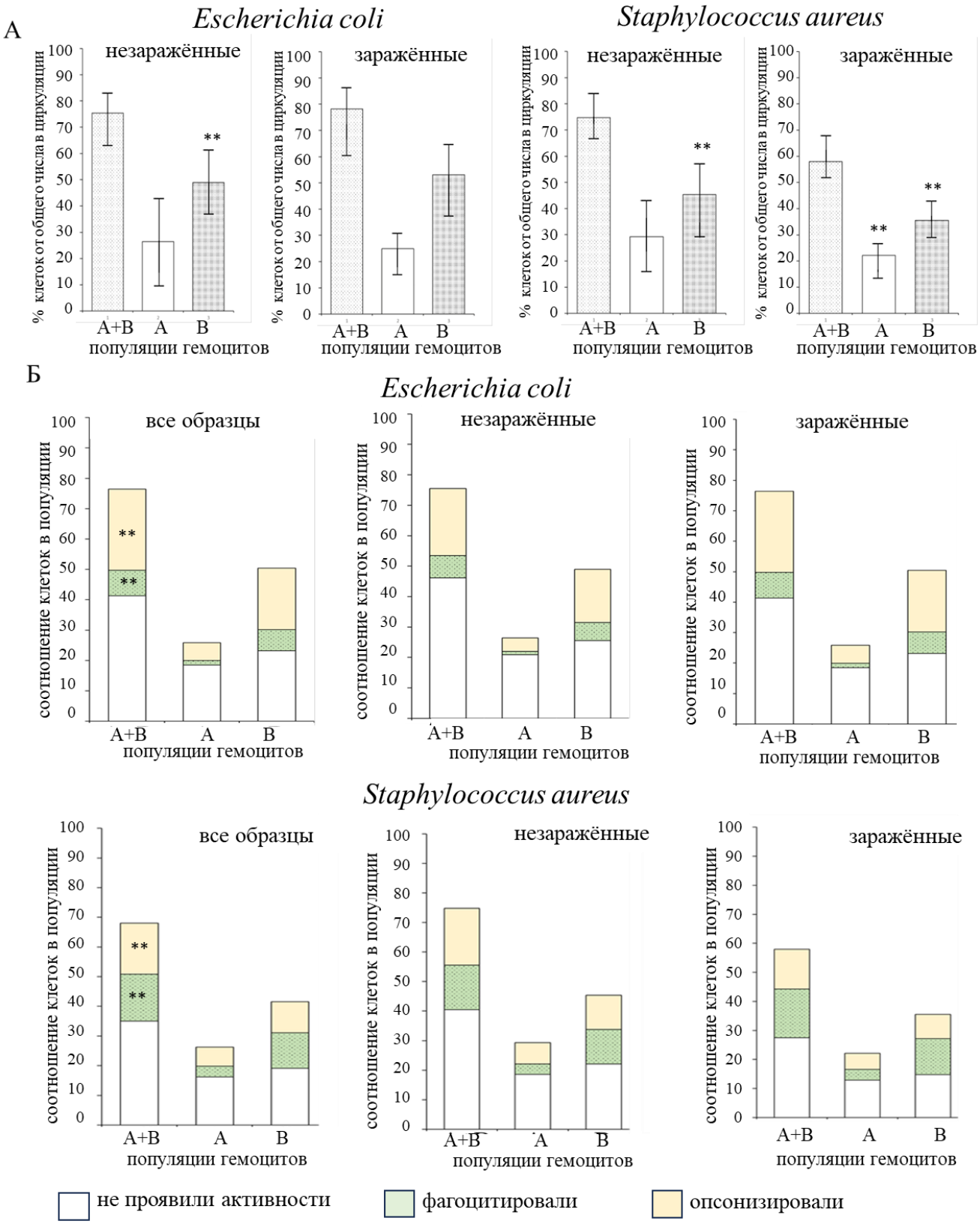


Рисунок 82. Анализ фагоцитарной активности гемоцитов моллюсков *Lymnaea stagnalis* (n=39). А – соотношение популяций гемоцитов в гемолимфе, инкубированной с бактериями и в контрольных образцах гемолимфы, инкубированной без бактерий; Б – соотношение клеток с разной фагоцитарной активностью в популяциях гемоцитов. Условные обозначения: см. рисунок 81.

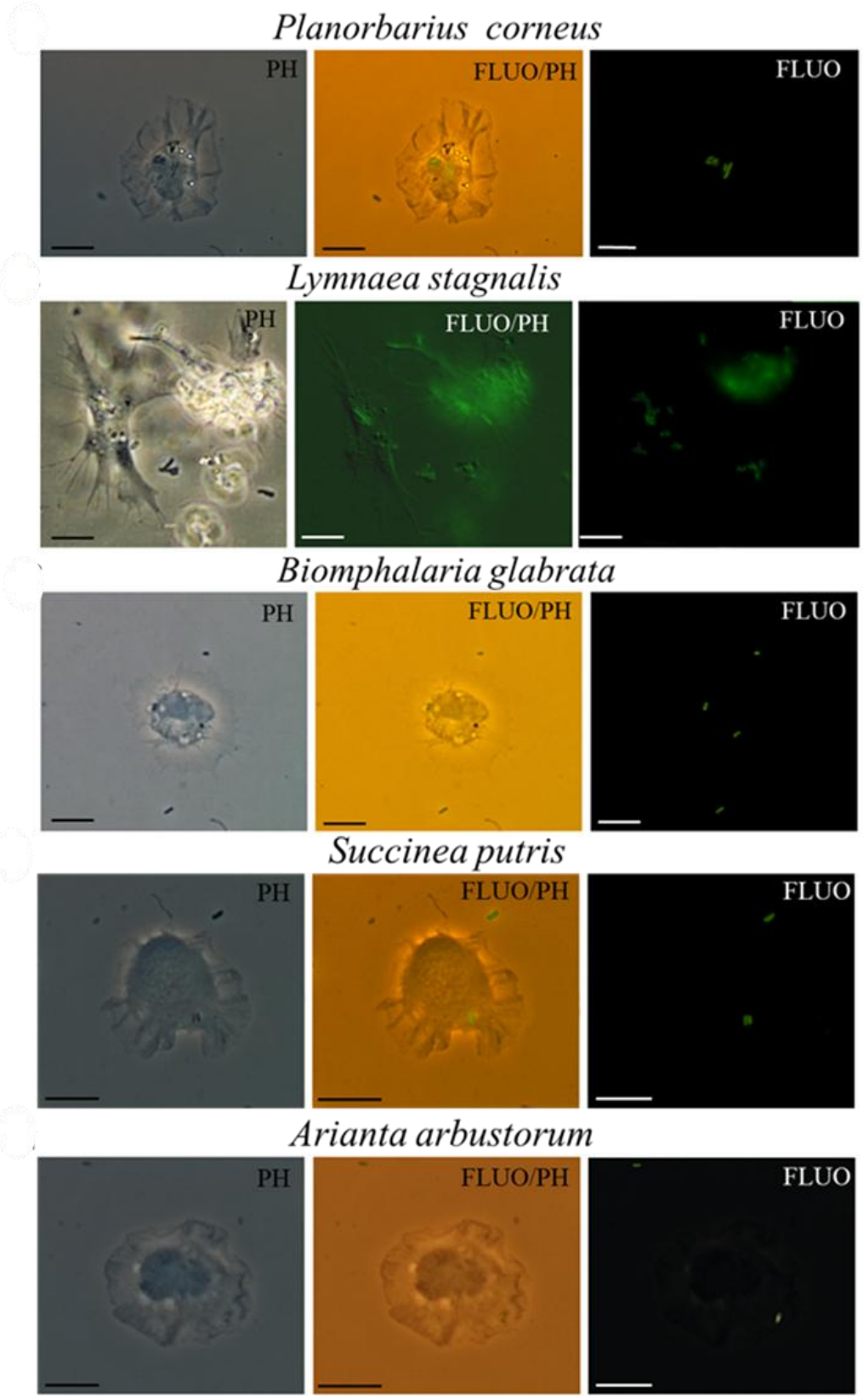


Рисунок 83. Фагоцитоз бактерий *E. coli* гемоцитами лёгочных моллюсков *in vitro* через 30–60 минут инкубации. Условные обозначения (здесь и далее): PH – фотографирование в режиме фазового контраста, FLUO – фотографирование в режиме флуоресценции, FLUO/PH – фотографирование в режиме флуоресценции, совмещенной с фазовым контрастом. Масштабная линейка – 7 мкм.

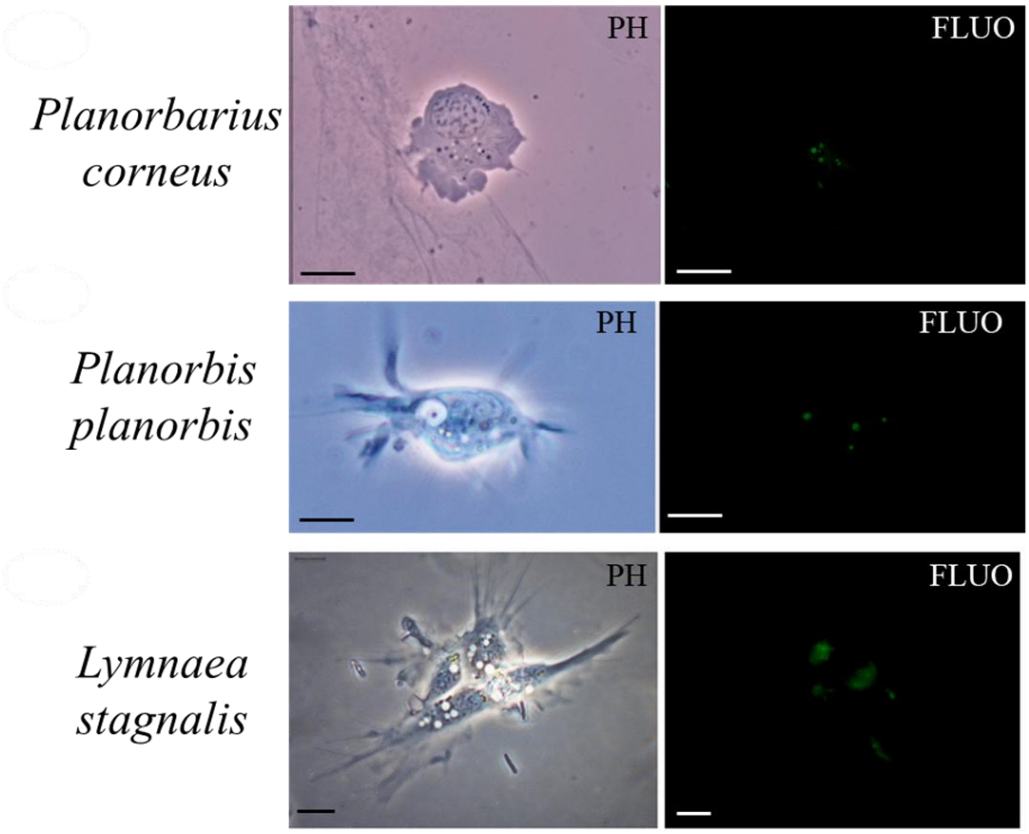


Рисунок 84. Фагоцитоз бактерий *S. aureus* гемоцитами лёгочных моллюсков *in vitro* через 30–60 минут инкубации. Условные обозначения: см. рисунок 83. Масштабная линейка – 7 мкм.

Также были осуществлены инъекции бактерий улиткам *Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis*, *Biomphalaria glabrata* и *Lymnaea stagnalis* с последующим забором гемолимфы через разные промежутки времени. Через 30–60 минут после инъекции в цитоплазме гемоцитов присутствуют фагоцитарные вакуоли с бактериями, а через 60–120 минут – вакуоли, в которых уже невозможно проследить очертания отдельных бактериальных клеток (рисунок 85). Визуально гемоциты, фагоцитировавшие бактерий *in vivo* и *in vitro,* не отличаются. На препаратах гемолимфы моллюсков, которым производили инъекцию, меньше клеточного дебриса и других посторонних объектов. Ввиду того, что при введении бактерий *in vivo* невозможно посчитать их концентрацию в гемолимфе, а также затруднительно посчитать точное количество фагоцитировавших клеток из-за быстро угасающей под действием лампы флуоресценции, подсчёт процента фагоцитировавших клеток на таких препаратах не осуществлялся.

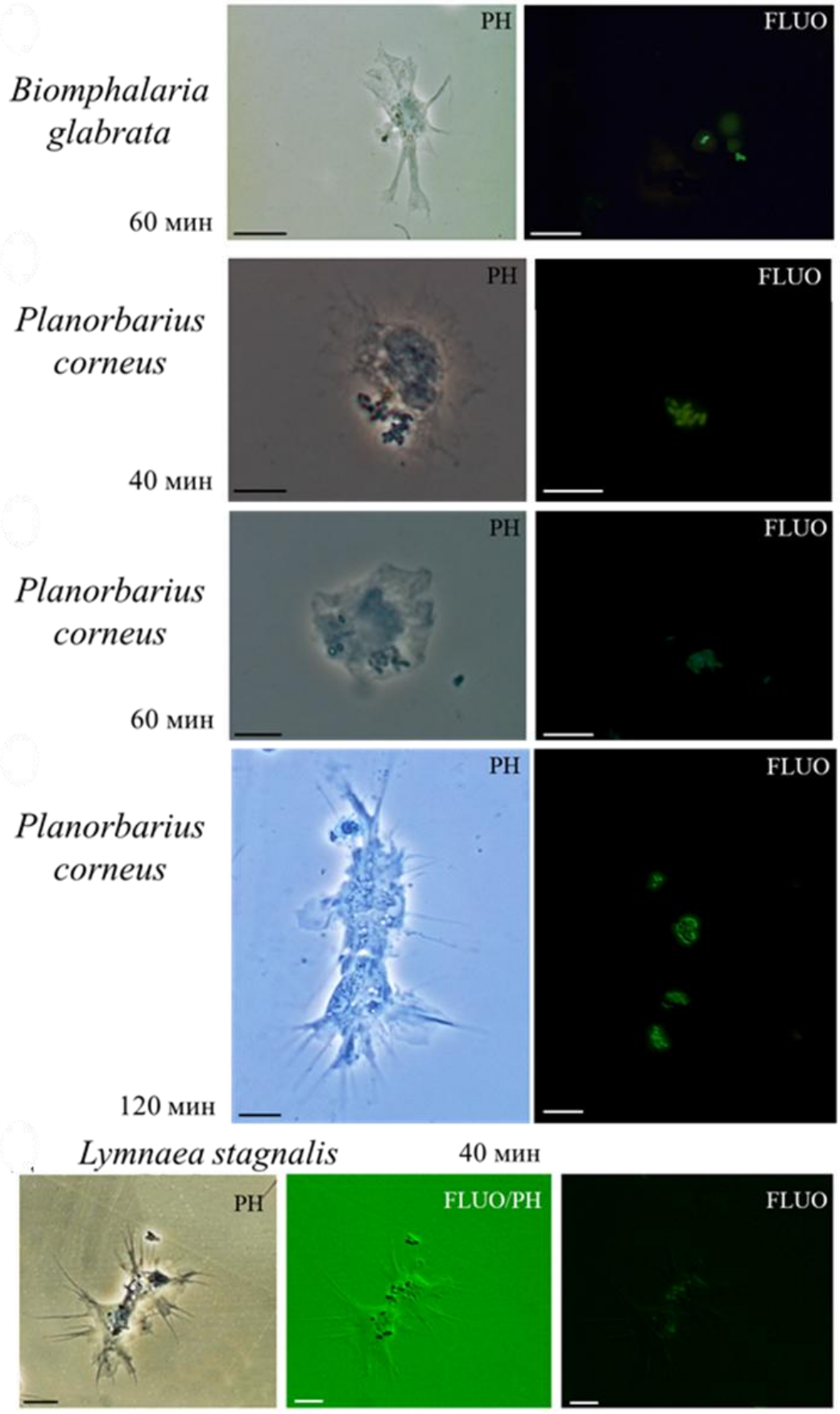


Рисунок 85. Фагоцитоз инъецированных бактерий гемоцитами лёгочных моллюсков. Условные обозначения: см. рисунок 83; указано время забора гемолимфы после инъекции с бактериями. Масштабная линейка – 6 мкм.

Функциональные группы гемоцитов. Для изучения функциональной активности гемоцитов было выполнено окрашивание клеток гемолимфы моллюсков *Planorbarius corneus* (n=58), *Planorbis planorbis* (n=30), *Biomphalaria glabrata* (n=54) и *Lymnaea stagnalis* (n=39) флуоресцентными красителями LysoTracker (накапливается в лизосомах) и SYTO62 (связывается нуклеиновыми кислотами) с последующим цитофлуориметрическим анализом.

По накоплению этих красителей гемоциты были разделены на четыре популяции – D, E, F, C, отличающиеся по содержанию лизосом и метаболической (биосинтетической) активности (рисунки 62, 63, таблица 32). Активность процессов биосинтеза и количество лизосом отражают особенности функциональной активности клеток. Поэтому выделяемые популяции мы рассматриваем как функциональные.

Клетки популяции D у моллюсков всех видов находятся в области низкой флуоресценции нуклеинового красителя. Это может свидетельствовать о низком уровне процессов биосинтеза в этих клетках. У исследованных моллюсков сем. Planorbidae наибольшее количество нуклеинового и лизосомного красителей накапливается в клетках популяции G, что может свидетельствовать о большой метаболической и ферментативной активности в этих клетках.

Клетки популяции E у занимают промежуточной положение между популяциями D и G по накоплению нуклеинового красителя. Таким образом, в ряду популяций гемоцитов пульмонат D–E–G происходит постепенное усиление окрашивания нуклеиновым красителем и рост накопления лизосомного красителя. То есть в этом ряду возрастает синтетическая и ферментативная активность в клетках. Возможно, клетки популяций D–E–G представлены созревающими гемоцитами на разных этапах дифференцировки. У моллюска *Lymnaea stagnalis* популяция гемоцитов G смещена в сторону меньшего накопления лизосомного красителя. Клетки популяции F у всех моллюсков характеризуются низким накоплением лизосомного красителя, а накопление нуклеинового красителя в них сильно варьирует

Соотношение выделенных функциональных популяций гемоцитов различается у моллюсков разных видов. Популяция F наиболее многочисленна у моллюсков *Planorbis planorbis* ($p<0.001$) и наименее выражена у прудовиков *Lymnaea stagnalis* ($p<0.001$). Также выявлено снижение численности клеток популяции G относительно других видов моллюсков у *Planorbis planorbis* ($p<0.001$) и *Lymnaea stagnalis* ($p<0.001$). Бóльшая часть гемоцитов моллюсков *L. stagnalis* представлена клетками популяции E. Её относительная численность у прудовиков достоверно выше, чем у планорбид всех видов ($p<0.001$).

Для того, чтобы сопоставить популяции гемоцитов, выделяемые по размеру и гранулярности (которые соответствуют морфологическим типам гемоцитов), с функциональными популяциями клеток, был разработан алгоритм поэтапного гейтирования событий, фиксируемых в проточном цитометре (Прохорова и др., 2018а). Сначала для всех

событий оценивали FS и SS, а затем анализировали показатели флуоресценции окрашенных клеток в рамках выявленных популяций. Также было осуществлено гейтирование в обратном порядке (рисунки 62, 63, таблица 32).

У моллюсков всех изученных видов среди гиалиноцитов (популяция A) наиболее многочисленными являются клетки популяции E (субпопуляция Ae), для которых характерен средний уровень накопления лизосомного и нуклеинового красителей. У моллюсков *Biomphalaria glabrata* и *Planorbarius corneus* среди гиалиноцитов второй по численности является фракция D (субпопуляция Ad), которая отличается наименьшим накоплением лизосомного красителя. Также у этих видов среди гиалиноцитов мало представлены клетки популяции G (субпопуляция Ag). У моллюсков *Planorbis planorbis* второй по численности среди гиалиноцитов является популяция F, накапливающая наименьшее количество лизосомного красителя (субпопуляция Af), а у *Lymnaea stagnalis* – популяция G (субпопуляция Ag). Численность клеток популяции F среди гиалиноцитов (субпопуляция Af) достоверно отличается ($p<0.001$) у моллюсков разных видов.

Гейтирование клеток в обратном порядке также подтвердило, что среди клеток фракций D и E (накапливающих наименьшее количество нуклеин-связывающего красителя) у моллюсков сем. Planorbidae преобладают гиалиноциты (популяция A). У прудовиков гиалиноциты преобладают среди клеток фракции D, а количество клеток фракции Ae достоверно ниже, чем у планорбид ($p<0.001$).

У всех моллюсков сем. Planorbidae бóльшая часть крупных гранулоцитов популяции B интенсивно окрашивается обоими флуорохромами, что позволяет отнести эти клетки к субпопуляции Bg. При этом у планорбид наименьшее число гранулоцитов популяции B относится к фракции D (субпопуляция Bd). Относительное количество клеток во фракциях E и F (субпопуляции Be и Bf), накапливающих среднее количество нуклеинового красителя, варьирует у планорбид разных видов. У моллюсков *Lymnaea stagnalis* основная часть гранулоцитов популяции B представлена клетками фракции E. Таким образом, гранулоциты прудовика накаливают меньшее количество лизосомного красителя, чем гранулоциты планорбид.

У всех изученных представителей сем. Planorbidae среди гранулоцитов популяции C преобладают клетки субпопуляции F, которые слабо накапливают лизосомный краситель. Вторые по относительному количеству – фракции E и G (субпопуляции Ce и Cf), которые характеризуются выраженным накоплением лизосомного и нуклеинового красителей. Меньше всего гранулоцитов у планорбид было отмечено в составе субпопуляции D (субпопуляция Cd). Обратное гейтирование также подтвердило, что среди клеток фракции G у *Biomphalaria*

glabrata, *Planorbarius corneus* и *Planorbis planorbis* преобладают крупные гранулоциты популяции B, а клетки фракции F в основном представлены гранулоцитами популяции C.

Таблица 37. Соотношение популяций гемоцитов у моллюсков *Biomphalaria glabrata* по данным цитофлуориметрического анализа на проточном цитометре BD Accuri™ C6 (по: Прохорова, Серебрякова и др., 2016, с дополнениями)

Типы и популяции гемоцитов	Процент клеток в популяции от общего их количества (Me (K1; K3))		p-value
	B. glabrata, чувствительная линия (n=20)	***B. glabrata,*** резистентная линия (n=20)	
Последовательное гейтирование по FS/SS, а затем по интенсивности поглощения Syto62/LysoTracker			
Гиалиноциты			
Популяция A	**41.92 (31.87; 48.23)**	**41.40 (33.6; 67.11)**	—
Субпопуляция **Ad**	16.84 (10.86; 23.92)	28.05 (10.07; 37.62)	—
Субпопуляция **Ae**	35.53 (20.69; 45.71)	37.13 (29.81; 46.57)	—
Субпопуляция **Af**	28.11 (17.06; 35.48)	9.55 (5.41; 38.89)	—
Субпопуляция **Ag**	10.45 (4.69; 17.44)	8.83 (4.03; 15.06)	—
Гранулоциты			
Популяция B	**37.97 (29.64; 42.36)**	**38.41 (18.74; 45.89)**	—
Субпопуляция **Bd**	0.57 (0.16;0.80)	0.96 (0.38;2.30)	p<0.05
Субпопуляция **Be**	9.83 (6.40;12.39)	8.32 (6.27;20.81)	—
Субпопуляция **Bf**	23.69 (11.45;36.86)	10.47 (4.39;21.36)	p<0.05
Субпопуляция **Bg**	66.85 (45;75.21)	71.32 (52.95;86.26)	—
Популяция *C*	**21.30 (16.73; 26.69)**	**14.06 (9.88; 20.74)**	**p<0.05**
Субпопуляция **Cd**	4.79 (3.68;11.66)	9.39 (6.03; 11.62)	—
Субпопуляция **Ce**	16.92 (11.37; 23.19)	26.99 (20.00; 30.92)	p<0.05
Субпопуляция **Cf**	58.97 (46.58; 67.99)	41.96 (33.84; 54.87)	p<0.05
Субпопуляция **Cg**	9.64 (6.41 ;13.83)	18.5 (10.26;28.66)	p<0.05
Последовательное гейтирование по интенсивности поглощения Syto62/LysoTracker, а затем по FS/SS			
Популяция D	**8.89 (5.72; 11.23)**	**8.93 (7.89; 19.29)**	—
*Субпопуляция **Da***	79.07 (74.22; 84.61)	83.32 (70.8; 88.72)	—
*Субпопуляция **Db***	3.9 (1.34; 5.89)	2.63 (1.13; 6.80)	—
*Субпопуляция **Dc***	17.46 (6.84; 23.84)	10.56 (6.67; 18.10)	—
Популяция E	**23.19 (16.75; 29.78)**	**25.55 (19.48; 33.92)**	—
*Субпопуляция **Ea***	67.12 (57.43; 71.21)	66.21 (57.06; 80.97)	—
*Субпопуляция **Eb***	15.44 (11.57; 21.09)	11.63 (8.04; 27.10)	—
*Субпопуляция **Ec***	17.78 (11.46; 23.06)	14.85 (10.60; 26.60)	—
Популяция F	**32.68 (22.92; 38.75)**	**13.07 (9.73; 29.40)**	**p<0.05**
*Субпопуляция **Fa***	34.09 (24.04; 38.59)	30.53 (20.98; 46.94)	—
*Субпопуляция **Fb***	25.37 (21.68; 32.59)	19.21 (12.52; 28.22)	—
*Субпопуляция **Fc***	42.51 (31.90; 49.94)	48.01 (29.41; 57.93)	—
Популяция G	**29.03 (18.27; 37.93)**	**38.06 (19.65; 48.75)**	—
*Субпопуляция **Ga***	12.56 (7.3; 31.19)	12.33 (3.88; 33.03)	—
*Субпопуляция **Gb***	75.14 (55.63; 87.39)	79.58 (54.44; 88.03)	—
*Субпопуляция **Gc***	6.14 (4.43; 10.27)	7.48 (5.59; 10.96)	—

Условные обозначения: FS – прямое светорассеивание; SS – боковое светорассеивание; Syto62 – флуоресцентный краситель нуклеиновых кислот; LysoTracker – флуоресцентный лизосомный краситель; p-value – уровень значимости для достоверных различий между моллюсками резистентной и чувствительной линий.

Так у моллюсков *P. planorbis* гранулоциты представлены в основном популяцией C. Эти клетки значительно сильнее вакуолизированы, чем гранулоциты улиток других видов (рисунок 52). Использование специфических красителей подтверждает это отличие. Бóльшую часть гранулоцитов популяции C у *P. planorbis* составляют клетки субпопуляции Cf, характеризующиеся средним накоплением лизосомного красителя и интенсивным накоплением нуклеинового красителя. В то же время субпопуляция Bg, хорошо накапливающая лизосомный краситель, менее представлена среди гранулоцитов *P. planorbis*, чем у других улиток. В результате гранулоциты популяции C моллюсков *P. planorbis* могут быть описаны как сильно гранулярные, метаболически активные клетки, содержащие небольшое количество лизосом.

У моллюсков *Lymnaea stagnalis* среди гиалиноцитов популяции C преобладает субпопуляция Cg. Это подтверждается также обратным гейтированием – около половины клеток фракций F и G представлены гранулоцитами популяции C (таблица 32).

Для моллюсков *Biomphalaria glabrata* отдельно был выполнен цитометрический анализ гемоцитарного состава у представителей чувствительной (n=20) и резистентной (n=20) линий (таблица 37). Установлено, что у моллюсков разных линий достоверно отличается относительное количество гранулоцитов популяции C, а также популяции F. У моллюсков чувствительной линии относительное количество клеток в популяции F в более чем 2 раза выше, чем у моллюсков резистентной линии. Последовательное гейтирование также показало, что среди гранулоцитов у чувствительных моллюсков больше клеток, накапливающих относительно небольшое количество лизосомного красителя: численность субпопуляций Bf и Cf у них выше, чем у резистентных. При этом среди гранулоцитов популяции C у резистентных улиток больше клеток с высоким содержанием лизосом, относящихся к субпопуляциям Cg и Ce. Таким образом, гемоциты моллюсков чувствительной линии характеризуются меньшим содержанием лизосом.

Активные кислородные метаболиты. Для анализа продукции активных форм килорода гемоцитами был использован карбокси-2′,7′-дихлородигидро-флуоресцеин диацетат (КДФДА) (см. раздел II.2).

По интенсивности флуоресценции окисленного КДФДА выделяли две группы гемоцитов: продуцирующие относительно мало АФК (АФК+–) и продуцирующие относительно много АФК (АФК++) (таблица 38). У моллюсков всех модельных видов среди гранулоцитов достоверно больше клеток АФК++, чем среди гиалиноцитов: у *Planorbarius corneus* – в среднем почти в 2 раза ($p<0.05$), *Planorbis planorbis* – более, чем в 2 раза ($p<0.01$), у *Biomphalaria glabrata* – почти в 3 раза ($p<0.01$). У прудовиков *Lymnaea stagnalis* эта тенденция выражена слабее всего – гиалиноцитов группы АФК++ примерно в 1.5 меньше, чем гиалиноцитов ($p<0.05$).

Таблица 38. Соотношение гемоцитов и интенсивность выработки активных форм кислорода гемоцитами разных популяций у лёгочных моллюсков*

Популяции гемоцитов / значения флуоресценции по каналу FL1	Интенсивность выработки АФК** / *значения флуоресценции по каналу FL1*	
	Слабая (АФК +–)	Сильная (АФК ++)
Planorbarius corneus (вся выборка, n=17)		
A	76.93 / 72.25 (67.75; 88.49) *245472 (132521; 417029)*	22.97 / 27.75 (11.43; 32.25) *1866838 (1289621; 2239794)*
B	56.82 / 56.25 (38.67; 74.11) *377531 (205003; 589683)*	43.02 / 43.56 (25.89; 61.33) *1459396 (1116138; 2464405)*
A+B	65.39 / 61.69 (56.61; 76.43) *325874 (171621; 484509)*	34.46 / 38.16 (23.57; 43.39) *1438220 (1222327; 2340190)*
P. corneus (незаражённые, n=11)		
A	69.77 / 69.06 (67.43; 71.53)	**30.10 / 30.94 (28.47; 32.51)**
B	47.45 / 44.36 (32.98; 57.72)	**52.34 / 55.56 (42.18; 66.97)**
A+B	56.89 / 58.44 (50.17; 61.29)	42.92 / 41.56 (38.63; 49.87)
P. corneus (заражённые трематодами, n=6)		
A	89.43 / 90.20 (88.49; 90.42)	**10.50 / 9.80 (9.58; 11.430**
B	72.53 / 74.11 (73.97; 76.69)	**27.40 / 25.89 (23.23; 26.03)**
A+B	79.93 / 81.09 (76.43; 81.18)	20.00 / 18.87 (18.75; 23.57)
Planorbis planorbis (n=10)		
A	83.05 / 91.02 (82.08; 94.32) *563866 (282049; 854780)*	16.38 / 8.52 (4.94; 17.91) *4898625 (3412019; 6994187)*
B	63.87 / 67.03 (50.17; 78.84) *1179796 (598876; 1229794)*	36.00 / 32.97 (21.16; 49.82) *6450827 (5104872; 9693373)*
A+B	74.04 / 80.35 (65.20; 88.56) *692036 (456681; 1034775)*	25.53 / 19.65 (11.44; 34.79) *6074089 (4621543; 8828763)*
Biomphalaria glabrata (n=10)		
A	90.95 / 94.36 (86.23; 97.42) *135198 (81442; 222109)*	7.01 / 5.31 (0.98; 10.22) *1540318 (1370343; 1819182)*
B	81.85 /84.42 (75.78; 90.35) *245721 (198544; 308235)*	18.09 / 15.58 (9.67; 24.12) *1485886 (1128460; 1976813)*
A+B	89.30 / 89.35 (86.04; 91.46) *183798 (111259; 217518)*	9.86 / 10.65 (5.17; 14.13) *1426945 (1169215; 1719282)*

Таблица 38 (продолжение)

Lymnaea stagnalis (n=10)		
A	52.73 / 52.51 (36.00; 70.10) *63129 (25361; 81205)*	47.24 / 47.49 (29.89; 64.00) *296107 (171802; 402599)*
B	31.71 / 28.94 (5.04; 52.49) *57729 (28118; 102070)*	68.28 / 71.05 (47.50; 94.95) *524452 (314087; 613189)*
A+B	38.47 / 33.69 (15.32; 59.27) *63643 (27664; 93724)*	61.52 / 66.31 (40.72; 84.68) *422390 (276706; 572222)*

Условные обозначения: * – данные ячейках таблицы представлены в виде среднего/ медианы и интерквартильного размаха (К1, К3), ** – указаны значения в пересчёте на число клеток в популяции. Курсивом обозначены значения флуоресценции для групп клеток с разной интенсивностью продукции АФК (Me (К1, К3)). Жирным шрифтом выделены значения, достоверно различающиеся у заражённых трематодами и незаражённых моллюсков.

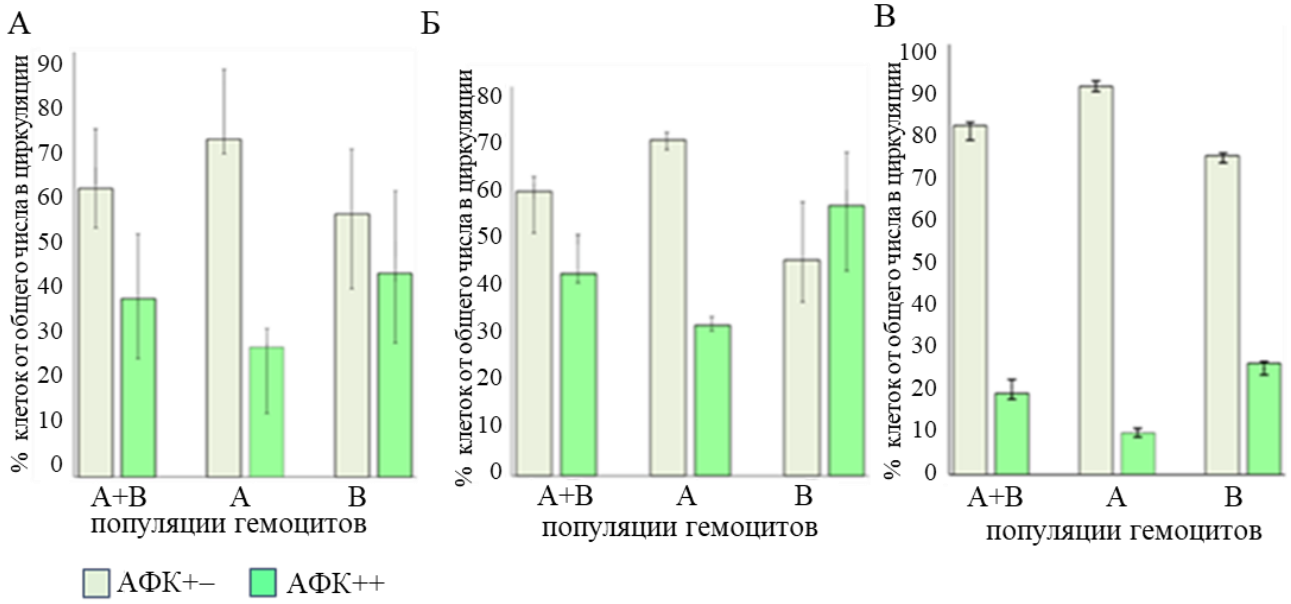


Рисунок 86. Продукция активных форм кислорода гемоцитами моллюсков *Planorbarius corneus*. А – вся выборка; Б – незаражённые моллюски; В – заражённые трематодами моллюски. Условные обозначения: по оси ординат – популяции гемоцитов, по оси абсцисс – процент гемоцитов от общего количества; АФК+– – относительно слабая продукция АФК; АФК++ – относительно сильная продукция АФК.

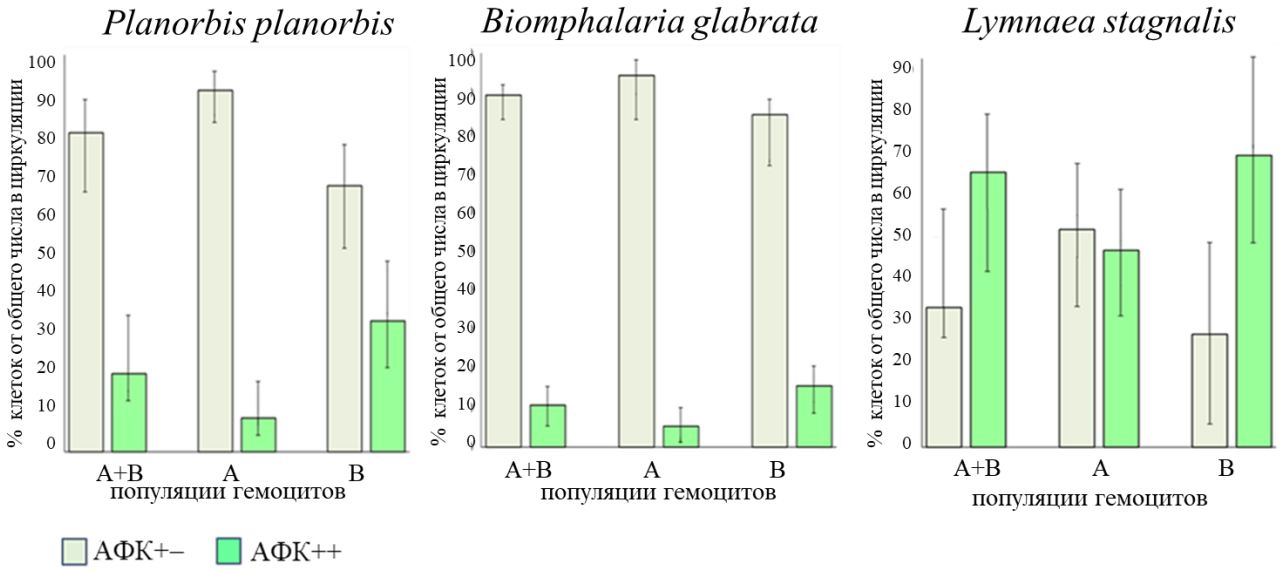


Рисунок 87. Продукция активных форм кислорода гемоцитами лёгочных моллюсков. Условные обозначения: см. рисунок 86.

Среди моллюсков *Planorbarius corneus* были особи, заражённые трематодами *Rubenstrema exasperatum* и *Echinostoma spiniferum*. В образцах гемолимфы заражённых моллюсков в 1.5 раза меньше клеток группы АФК+–, чем у незаражённых улиток (рисунок 86). Также у заражённых особей почти в 3 раза меньше гиалиноцитов группы АФК++ ($p<0.01$) и почти в 2 раза меньше гранулоцитов группы АФК++ ($p<0.01$), чем у незаражённых Таким образом, гемоциты заражённых трематодами улиток вырабатывают АФК слабее, чем гемоциты незаражённых особей (таблица 38).

Выявлены существенные различия в интенсивности продукции АФК гемоцитами между моллюсками разных видов (рисунок 87). Максимальная продукция АФК зафиксирована для гемоцитов прудовиков $p<0.01$), минимальная – для гемоцитов биомфалярий ($p<0.01$).

Обсуждение к разделу III.2.3

Мы рассматриваем гемоциты как специализированные клетки системы врождённого иммунитета. Такие клетки должны обладать набором признаков, обеспечивающих реализацию иммунной функции. К ним относятся способность к распознаванию чужеродного, подвижность, фагоцитарная активность, формирование агглютинаций, выработка факторов цитотоксичности.

Вопрос о распознавании чужеродного будет отдельно рассмотрен в разделе III.3. Сложным формам клеточного ответа и экспрессии генов иммунного ответа также посвящены отдельные разделы (III.4.1 и III.4.4 соответственно).

Универсальная роль гемоцитов в реакциях врождённого иммунитета подтверждается данными анализа транскриптомов. Набор транскриптов в гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus* кодирует основной набор факторов, присутствующих в клетках врождённого

иммунитета. Поиск иммунорелевантных генов и транскриптов был осуществлён у лёгочных моллюсков нескольких видов: *Biomphalaria glabrata* (Hanington, 2010a), *B. pfeifferi* (Buddenborg et al., 2017), *Bulinus truncatus* (Young et al., 2022), *Lymnaea stagnalis* (Seppälä et al., 2021), *Succinea putris* (Бобровская и др., 2025). Такие исследования выполнены и для нескольких видов двустворчатых и головоногих моллюсков (Collins et al., 2012; Moreira et al., 2012; Ertl et al., 2016; Romero et al., 2019; Farhat et al., 2022 и др.). Полученные данные подтверждают универсальность набора основных факторов врождённого иммунитета всех моллюсков и его аналогичность факторам иммунитета позвоночных (см. Атаев и др., 2024а). Способность гемоцитов вырабатывать весь набор факторов цитотоксичности, характерный для клеток врождённого иммунитета, подтверждена также биохимическими и гистологическими методами (см. раздел. I.3.2, III.4.3)

Результаты анализа функциональных особенностей гемоцитов разных типов свидетельствуют о том, гиалиноциты и гранулоциты заметно отличаются по всем характеристикам. Гранулоциты проявляют бóльшую способность к агглютинации, подвижности и формированию агрегаций, чем гиалиноциты. Различная способность циркулирующих клеток к адгезии и фагоцитозу может быть обусловлена разным набором молекул адгезии, что влияет на их участие в клеточных реакциях (Hermann et al., 2008). Вероятно, доля гемоцитов в агрегациях определяется относительным количеством гранулоцитов у моллюсков разных видов. Количество гемоцитов в составе агрегаций различно. Так у *Planorbis planorbis,* агрегации в препаратах инкубированных гемоцитов включают до 10 (чаще 5–7) клеток, в то время как у других видов пресноводных улиток – до нескольких десятков. В то же время, именно у окаймлённой катушки соотношение гранулоцитов смещено сторону популяции С, и в сторону более гранулярных клеток. Можно предположить, что именно эти сильно гранулярные, но содержащие немного лизосом гранулоциты (соответствующие популяции С) не участвуют в формировании первой линии защиты от патогена из-за меньшей мобильности. Возможно, эти клетки принимают участие других процессах иммунного ответа, не связанных с фагоцитарной активностью. У позвоночных одним их основных проявлений функциональной активности лейкоцитов является их способность к дегрануляции (Купер, 1980). Так специализированные гранулоциты – эозинофилы участвуют в регуляции иммунного ответа и повреждении патогенов путём секреции содержимого гранул (Колобовникова и др., 2012).

Гемоциты заражённых трематодами и иммунизированных бактериями моллюсков активнее формируют агрегации в препаратах *in vitro*. Кроме того, гемоциты заражённых трематодами моллюсков *Lymnaea stagnalis* более активно фагоцитируют бактерии, чем гемоциты незаражённых. Эти наблюдения подтверждают предположение о том, что иммунизация приводит к росту относительной доли более активных гемоцитов. Такой эффект

может быть связан с влиянием патогена – выделяемые им вещества могут усиливать подвижность и фагоцитарную активность гемоцитов. Способность активировать клетки гемолимфы моллюсков была показана для экскреторно-секреторных продуктов развивающихся трематод (Loker et al., 1992; Humbert, Coustau, 2001). Кроме того, смещение в сторону более активных клеток может быть обусловлено предшествующим контактом с патогеном и его распознаванием гемоцитами. Процесс распознавания патогена иммуноцитом запускает регуляторные механизмы, обеспечивающие его активацию (Kumar et al., 2011).

Гранулоциты и гиалиноциты проявляют разную активность по отношению к различным бактериям. Кроме того, инкубация с бактериями влияет на состав гемолимфы. В гемолимфе моллюсков *Planorbarius corneus,* инкубированной с бактериями *E. coli* и *S. aureus* уменьшается относительное количество гиалиноцитов и гранулоцитов популяции B. У прудовиков *Lymnaea stagnalis* инкубация гемолимфы с бактериями также приводит к уменьшению в ней доли гранулоцитов популяции B. При этом у моллюсков *Biomphalaria glabrata* после инъекции бактерий *E. coli* уменьшается доля гиалиноцитов и возрастает доля гранулоцитов популяции B. Таким образом, иммунизация бактериями во всех случаях приводит к уменьшению относительной доли гиалиноцитов. Можно предположить, что происходит переход гиалиноцитов в гранулоциты при контакте с патогеном. Такой процесс может быть обусловлен как созреванием клеток (вследствие активации после взаимодействия с патогеном), так и увеличением их размера и гранулярности при участии в процессе фагоцитоза.

Значительные изменения именно в гранулоцитарной фракции подтверждают ведущую роль гранулоцитов в фагоцитозе. Различия в динамике изменения состава гранулоцитов, могут быть обусловлены как видовыми особенностями, так и условиями экспериментов. *In vitro* в фагоцитозе участвуют только те клетки, которые присутствуют в используемой аликвоте гемолимфы. Кроме того, в условиях *in vitro* токсины, постепенно накапливающиеся в гемолимфе, приводят к гибели гемоцитов, включая клетки, фагоцитировавшие бактерий. Если активными фагоцитами являются большие клетки популяции B, то именно они будут быстрее погибать после нейтрализации бактерий. При введении бактерий в гемолимфу *in vivo* к месту инъекции могут прибывать новые функционально активные клетки. Возникающее при инъекции повреждение покровов моллюска также может провоцировать выход клеток из окружающих тканей (Присный, Кулько, 2022). При этом выделяемые гемоцитами цитокины привлекают новые клетки в очаг воспаления (Franchini, Ottaviani, 2000). Вероятно, поглощение бактерий *in vivo* происходит более эффективно, чем *in vitro*.

Было показано, что гранулоциты и гиалиноциты *Planorbarius corneus* активнее фагоцитируют бактерий *E. coli*, чем *S. aureus* (Ataev et al., 2016b). В то же время, ранее в эксперименте с введением моллюскам суспензии бактерий была показана бóльшая

фагоцитарная активность гемоцитов по отношению к стафилококку (Прохорова, 2009). Противоречивость полученных данных может быть обусловлена как разными условиями эксперимента, так и тем, что в эксперименте *in vivo* не дискриминировали опсонизировавших и поглотивших бактерий гемоцитов.

У *P. corneus* опсонизация бактерий осуществляется гемоцитами обоих типов с одинаковой эффективностью. При этом гранулоциты фагоцитируют опсонизированные бактерии активнее гиалиноцитов. Процесс опсонизации в системе врождённого иммунитета не является избирательным и обеспечивается как рецепторами на мембране гемоцитов, так и гуморальными факторами (например, лектинами), имеющимися в гемолимфе. Однако фагоцитоз может осуществляться и без предварительной опсонизации. В этом случае его эффективность зависит от наличия на мембране клетки врождённого иммунитета подходящих ПРР, молекул адгезии, активности фагоцита и присутствия в нем необходимых факторов цитотоксичности (Uribe-Querol, Rosales, 2020). Соответственно, способность клетки активно фагоцитировать определяется в том числе и стадией дифференцировки гемоцита.

У позвоночных животных, моноциты имеют более низкую фагоцитарную способность, чем нейтрофилы и макрофаги. Однако их фагоцитарная активность усиливается по мере дифференцировки (Newman, Tucci, 1990; Rabinovitch, 1995). Из этого следует, что разная фагоцитарная активность клеток врождённого иммунитета не свидетельствует об их принадлежности к разным клеточным линиям.

Гемоциты моллюска *Lymnaea stagnalis* активнее фагоцитируют стафилококка, чем кишечную палочку. При этом опсонизирующаая активность, наоборот, несколько ниже именно в отношении стафилококка. Получается, что опсонизированный гемоцитами *S. aureus* фагоцитируется чаще, а *E. coli* – реже. Соответственно, наблюдаются различия в фагоцитарной активности по отношению к бактериям у моллюсков разных видов.

На препаратах гемолимфы *Lymnaea stagnalis* с бактериями *E. coli* гемоциты часто формируют скопления вокруг них (рисунок 83). Эта часть гемоцитов, агглютинирующих вокруг бактерий, не учитывается при цитофлуориметрическом анализе (отсекается вместе с другими агрегатами), что может влиять на посчитанное соотношение фагоцитировавших клеток.

Тем не менее, и у прудовиков, и у роговых катушек именно гранулоциты проявляют себя как более активные фагоциты. У четырёх исследованных видов моллюсков гранулоциты демонстрируют более выраженную способность к продукции АФК, чем гиалиноциты (таблица 38).

АФК и АФА являются сильными окислителями, которые способны повреждать и разрушать компоненты патогенов (Lugrin et al., 2014). Их цитотоксичность хорошо изучена для клеток врожденного иммунитета позвоночных животных (см. Купер, 1980; Buchmann, 2014).

Продукция АФК ранее была показана для гемоцитов гастропод *Lymnaea stagnalis*, *Helix aspersa*, *Planorbarius corneus*, *Biomphalaria glabrata*, *Viviparus ater* (Dikkeboom et al., 1988; Conte, Ottaviani, 1995; Hahn et al., 2001; Прохорова, 2009; Mone et al., 2010; Vorontsova et al., 2014). Для моллюсков *L. stagnalis* показана роль пероксидазы в формировании АФК как в гранулоцитах, так и в гиалиноцитах (Vorontsova et al., 2014). Для моллюсков рода *Biomphararia* доказана зависимость степени резистентности к заражению трематодами от способности гемоцитов продуцировать АФК (Dikkeboom et al., 1988; Adema et al., 1994, 2001). Таким образом, способность продуцировать АФК обеспечивает реализацию цитотоксической функции гранулоцитами. Интересно, что у биомфалярий чувствительной линии гранулоциты характеризуются достоверно меньшим накоплением лизосомного красителя, что также свидетельствует о менее выраженной функциональной активности (таблица 37). При этом различий в составе гиалиноцитов между чувствительными и резистентными улитками нами не выявлено. Это также подтверждает роль именно гранулоцитов в формировании резистентного фенотипа, способного более эффективно реагировать на инвазию.

Меньшая цитотоксическая активность гиалиноцитов подтверждается тем, что они накапливают меньше лизосомного красителя (таблица 32). В то же время, среди них присутствуют клетки с высокой биосинтетической активностью. Такие характеристики присущи, в том числе, созревающим, дифференцирующимся клеткам.

Гранулоциты накапливают лизосомный краситель значительно эффективнее, чем гиалиноциты, что, по-видимому, обусловлено как повышенной гранулярностью, так и бóльшими размерами гранулоцитов. При этом по функциональным характеристикам гранулоциты очень гетерогенны. Так гранулоциты популяции B, имеющие крупные размеры и относительно небольшой разброс по степени гранулярности, представлены в основном субпопуляцией Bg (см. рисунки 62, 63). Клетки этой группы характеризуются наибольшей концентрацией лизосом и метаболической активностью. Такие характеристики – большие размеры, гранулярность, активный биосинтез и присутствие большого количества лизосом – свойственны активным фагоцитам, например макрофагам позвоночных животных (Varol et al., 2015).

Гранулоциты популяции C мельче гранулоцитов популяции B, но у моллюсков всех видов они наиболее неоднородны как по степени гранулярности, так и по уровню включения лизосомного и нуклеинового красителей (соответственно – по составу гранул). Несмотря на преобладание в этой популяции клеток субпопуляции Cf, здесь также заметно представлены и субпопуляции Ce и Cg. Это что свидетельствует о наличии в цитоплазме этих клеток гранул не только с кислым, но и с щелочным и нейтральным содержимым (Sminia; 1972; Cheng; 1975; Pierzynska-Mach et al., 2014).

Гранулоциты моллюска *Lymnaea stagnalis* накапливают меньшее количество лизосомного красителя, чем гранулоциты трёх исследованных видов планорбид. При этом относительная доля гранулоцитов популяции B у прудовиков выше. Также у них выше концентрация гемоцитов в циркуляции. Можно предположить, что меньшая цитотоксическая активность гранулоцитов может компенсироваться их большей концентрацией. Таким образом, как и морфологическое исследование, функциональный анализ выявил принципиальное сходство клеточного состава гемолимфы моллюсков исследованных видов, и одновременно – достоверные различия между моллюсками разных видов.

Таким образом, гиалиноциты и гранулоциты отличаются по основным морфологическим и функциональным характеристикам. Тем не менее, на сегодняшний день нет достоверных критериев, позволяющие отнести эти клеточные типы к отдельным линиям дифференцировки. У позвоночных животных для определения причастности клеток врождённого иммунитета к линиям и стадиям дифференцировки используют клеточные маркеры (Zola et al., 2003). Для лёгочных моллюсков попытки выявить маркеры разных типов гемоцитов или этапов их дифференцировки предпринимались неоднократно. Так в качестве маркера предлагалось использовать N-ацетилмурамовую кислоту, которая была обнаружена только на поверхности «распластывающихся клеток» (Ottaviani, Montagnani, 1989), лектин клещевины, который связывается только с поверхностью клеток, «которые имеют морфологию незрелых» (Dikkeboom et al., 1988), маркеры лейкоцитов позвоночных (Franceschi et al., 1991). В качестве функционального маркера рассматривалась способность клеток лизировать натуральные киллеры человека, которой обладают только «распластанные гемоциты» (Franceschi et al., 1991).

Для «распластывающихся на субстрате гранулоцитов» *Biomphalaria glabrata* удалось получить пять моноклональных антител, из которых два связываются со всеми клетками, два – с половиной, и ещё одно – только с некоторыми (Yoshino, Granath, 1983). Также было получено антитело, которое у моллюсков *Lymnaea stagnalis* связывается только с гемоцитами «с морфологией незрелых клеток» (Dikkeboom et al., 1988). Однако во всех упомянутых исследованиях использовались клетки, морфологические характеристики которых, по оценке авторов, уже позволяют отнести их к определённому клеточному типу. А клетки с промежуточными морфологическими признаками, которые сложно типировать, изучены не были. Также перечисленные маркеры не позволяют ответить на вопрос, относятся ли клетки гемолимфы к единой клеточной линии.

С использованием технологии секвенирования единичных клеток у *Biomphalaria glabrata* было выделено 7 популяций гемоцитов, отличающихся по набору транскриптов (Pichon et al., 2022). При этом около 74% гемоцитов имеют одинаковый набор транскриптов, и ни для одной из «транскриптомных популяций» не было выявлено специфических маркеров. Также

авторы отмечают, что «распределение транскриптов образует континуум», что не позволяет точно различать один или несколько типов клеток. В этом же исследовании был проведён протеомный анализ отдельных морфотипов гемоцитов, выделенных с помощью проточной цитометрии. Данные протеомного анализа и транскриптомного исследования свидетельствуют о большой пластичности выделяемых групп гемоцитов и «возможности задействовать разные пути активации». В результате отдельные транкрипционные и протеомные кластеры не могут быть связаны с определенными морфологическими типами гемоцитов.

Таким образом, гиалиноциты и гранулоциты представляют собой очень полиморфные клеточные типы, чёткая граница между которыми отсутствует. В тоже время, соотношение гранулоцитов и гиалиноцитов меняется в течение жизни моллюска и зависит от множества факторов, включая иммунизацию. Более того, одна и та же клетка значительно изменяет свои морфологические характеристики на протяжении наблюдения. Вероятно, наблюдаемые морфологические типы гемоцитов представляют собой варианты клеток единой клеточной линии. Можно предположить, что гиалиноциты являются первым этапом дифференцировки (специализации) циркулирующего гемоцита. А гранулоциты популяций B и C представляют разные направления функциональной специализации гемоцитов. Такое созревание клеток в циркуляции происходит у позвоночных животных ходе иммунного ответа. Моноциты в циркуляции и воспалительные макрофаги, в которые они дифференцируются в очаге воспаления, значительно отличаются как по морфологическим, так и по функциональным характеристикам (Varol et al., 2015). Можно предположить, что, как и у моноцитов, у гиалиноцитов при активации происходит синтез значительного количества РНК, а затем изменение внутренней структуры: накопление лизосом, гранул, усложнение системы внутренних мембран, увеличение размера. При этом направление функциональной специализации, которое отражается, например, на составе гранул, может зависеть от природы патогена.

III.2.4. Изучение гемопоэза

Для моллюсков модельных видов был выполнен поиск гемопоэтических структур на гистологических препаратах, а также была оценена возможность пролиферации циркулирующих клеток гемолимфы.

Гемопоэтические структуры. Схожие по расположению и строению гемопоэтические структуры были найдены у моллюсков четырёх модельных видов – *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria pfeifferi* и *Planorbarius corneus*. У этих представителей планорбид местом гемопоэза является амёбоцито-продуцирующий орган (АПО), расположенный вблизи почки и приуроченный к перикардиальному эпителию.

Как и у других пульмонат, у исследованных нами видов АПО состоит их групп округлых, овальных или вытянутых клеток – узелков. Размеры и форма узелков варьируют (рисунки 88–92). У всех моллюсков узелки АПО приурочены к микросинусам кровеносной системы. Подробное исследование локализации и размеров АПО было выполнено для моллюска *B. glabrata.*

У незаражённых моллюсков *B. glabrata* АПО обычно состоит из 3 узелков овальной формы. Клетки в составе узелков овальные, вытянутые. Количество клеток в узелках варьирует – от 28 до 63 рыхло расположенных клеток у моллюсков чувствительной линии (4–11 клеток на срез) до 65–105 (4–12 клеток на срез) клеток у моллюсков резистентной линии. Узелки расположены ближе к наружной стенке перикарда (рисунок 88). Расстояние между соседними узелками достигает до 50 мкм. Размеры узелков представлены в таблице 39.

У моллюсков *Planorbarius corneus Planorbis planorbis* и *Biomphalaria pfeifferi* АПО состоит из узелков неправильной формы. Часть узелков может располагаться в перикардиальном эпителии латеральнее района между эпителиями перикарда и мантии (рисунки 89, 90, 91). У *Planorbarius corneus* узелки могут располагаться не только в перикардиальном эпителии, но и в кровеносных синусах вблизи мантийного эпителия. Поэтому точное количество узелков посчитать затруднительно. Их число колеблется от 4 до 10 (рисунок 88).

Гемопоэтические структуры при иммунизации. Для анализа динамики работы АПО при иммунизации были использованы моллюски *Biomphalaria glabrata*, заражённые мирацидиями трематод *Echinostoma caproni.*

У моллюсков *Biomphalaria glabrata* чувствительной линии (n=5) активизация АПО наблюдается уже через 6 часов после заражения (п.з.). К этому времени увеличивается количество клеток в составе узелков: от 35 клеток в минимальных до 164 – в максимальных узелках. В результате узелки становятся более плотными. Средняя площадь среза (СПС) узелков также увеличивается и составляет 18500±521 мкм^2 для минимальных и 77000±95.2 мкм^2 для максимальных узелков (рисунок 92).

Через 1 день п.з. количество узелков увеличивается до шести, а расстояние между ними сокращается. Узелки вытягиваются вдоль стенки перикарда. Минимальные узелки состоят из 50 клеток, максимальные содержат 121±0.8 клеток. Их упаковка становится ещё более плотной, хотя СПС узелков почти не изменяется (рисунок 93).

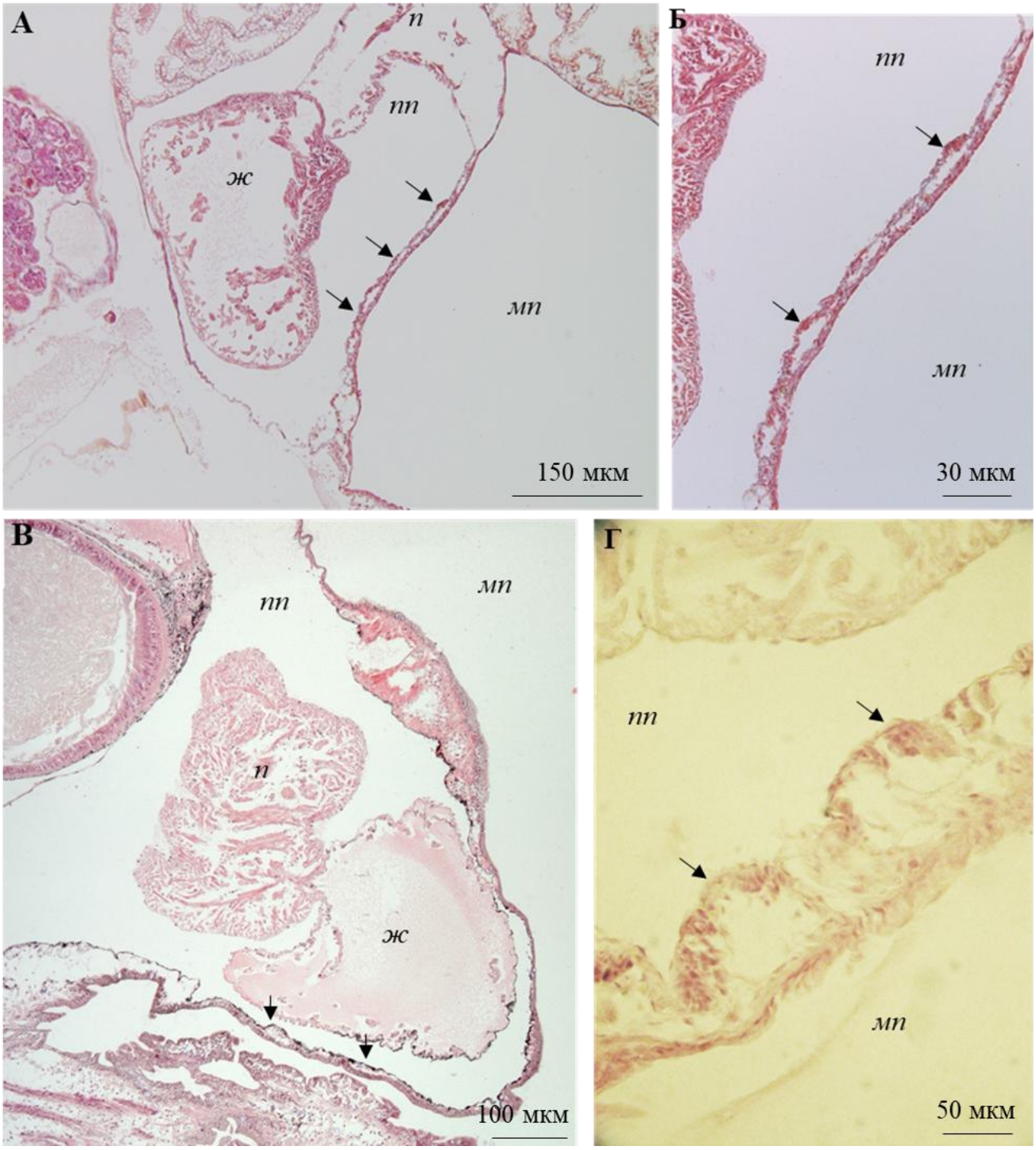


Рисунок 88. Гистологические срезы через сердце и АПО незараженных моллюсков *Biomphalaria glabrata*. А, Б – моллюск чувствительной линии; В, Г – моллюск резистентной линии. Условные обозначения: ж – желудочек сердца; п – предсердие; мп – мантийная полость, пп – перикардиальная полость. Стрелками обозначены узелки АПО.

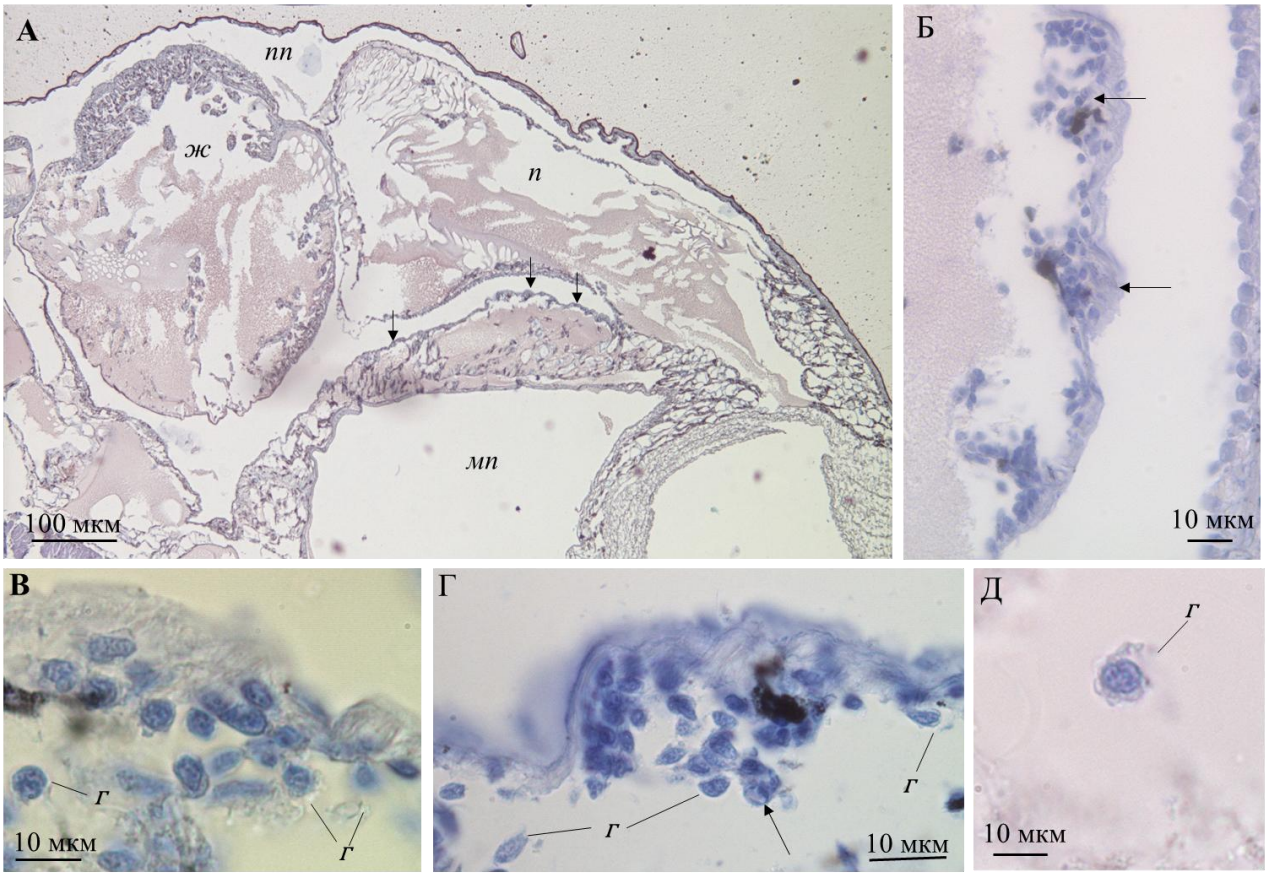


Рисунок 89. Гистологические срезы через сердце и АПО моллюска *Planorbarius corneus*. А – сердце и АПО; Б – узелки АПО; В, Г – клетки в составе АПО и гемоциты; Д – гемоцит вблизи АПО. Условные обозначения: см. рисунок 88.

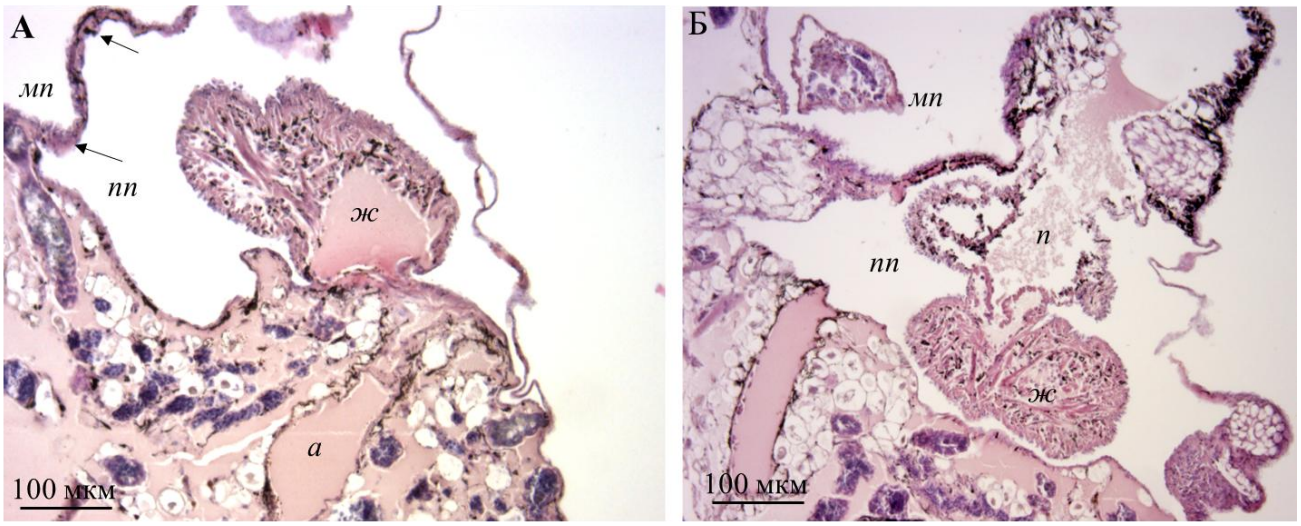


Рисунок 90. Гистологические срезы через сердце и АПО моллюсков *Planorbis planorbis.* Условные обозначения: ж – желудочек сердца; п – предсердие; пе – перикардиальная полость. мп – мантийная полость; пп – перикардиальная полость; а – аорта; г – гемоциты. Стрелками обозначены узелки АПО.

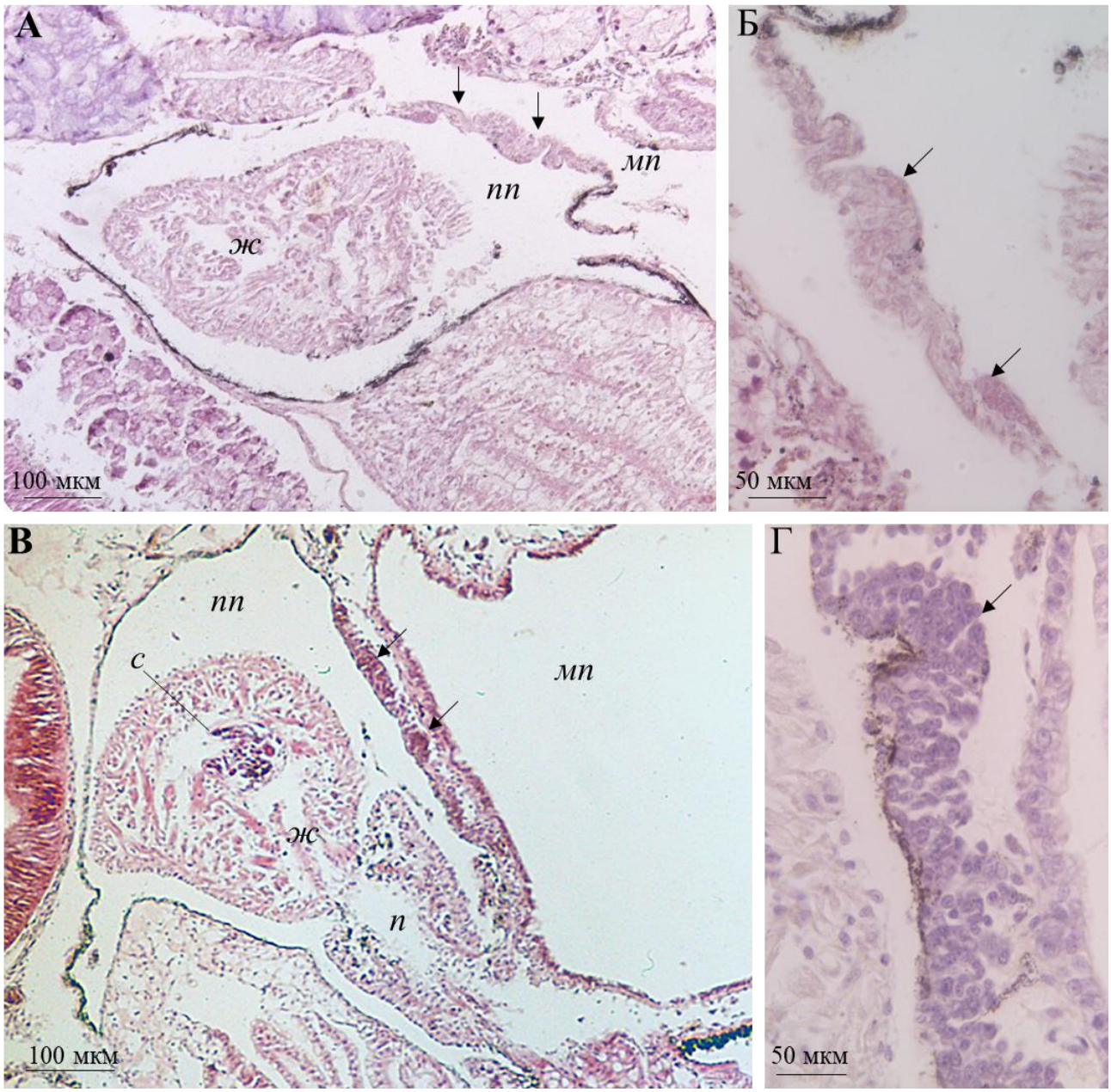


Рисунок 91. Гистологические срезы через сердце и АПО моллюсков *Biomphalaria pfeifferi.* А, Б – незаражённый моллюск; В, Г – моллюск, заражённый *Echinostoma caproni.* Условные обозначения: см. рисунок 88. Препараты предоставлены Г. Л. Атаевым

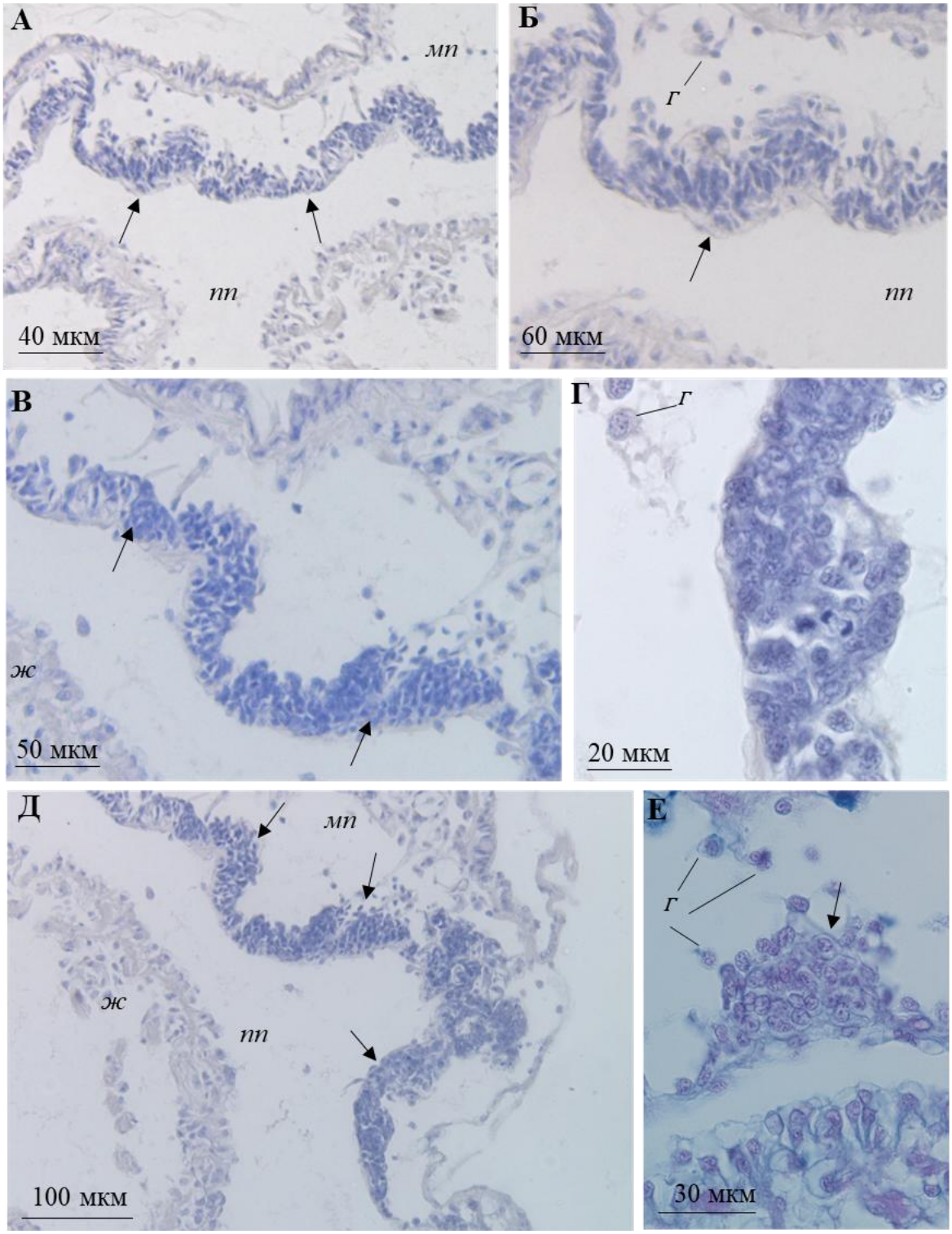


Рисунок 92. Гистологические срезы моллюсков *Biomphalaria glabrata*, зараженных трематодами *Echinostoma caproni* в районе АПО. А – АПО моллюсков чувствительной линии через 5 дней п. з.; Б – АПО моллюсков чувствительной линии через 7дней п. з.; В – АПО моллюсков резистентной линии через 3 дня п. з.; Д, Е – АПО моллюсков резистентной линии через 5 дней п. з. Г – узелок АПО с митозами. Условные обозначения: ж – желудочек сердца; п – предсердие; мп – мантийная полость; пп – перикардиальная полость; г – гемоциты. Стрелками обозначены узелки АПО.

Через 4 дня п.з наблюдается максимальное количество узелков (7–8). Размеры узелков составляют примерно 30×70 мкм (n=5). Минимальные узелки содержат 133.6±2.3 плотно упакованных клеток (на срезе до 19 клеток). При этом большинство узелков сливается, образуя единый клеточный тяж. Однако по размерам и степени разветвленности такое АПО меньше, чем АПО моллюсков резистентной линии.

Через 5 дней п.з. количество клеток в минимальных узелках сокращается до 70.4±1.8 клеток, а в максимальных – до 158±0.7 клеток (n=7). В то же время количество узелков не уменьшается, а их СПС даже увеличивается (рисунок 93).

Через 7 дней п.з. происходит заметное снижение активности АПО (n=5). В минимальных узелках насчитывается 84.0±1.0 клеток, а в максимальных – 95±0.5 плотно упакованных клеток (до 17 клеток на срезе) (рисунок 92). Количество узелков уменьшается до пяти.

Через 14 дней п.з. в минимальных узелках содержится 55.20±1.83 клеток (n=5) (рисунок 93). Плотность упаковки клеток в узелках до уровня незараженных моллюсков – 6–12 клеток на срезе.

У моллюсков *B. glabrata* резистентной линии первые признаки активизации АПО также заметны уже через 6 часов п.з. Количество узелков увеличивается до пяти. Часть узелков вытягивается вдоль стенки перикарда, а расстояние между ними сокращается до 30 мкм. Минимальные узелки на этом сроке содержат 91.2±1.6 клеток, а максимальные – 310±12.6 клеток (n=5). Упаковка клеток в узелках остаётся рыхлой.

Через 3 дня п.з. происходит повышение активности АПО (рисунок 93В). В клетках АПО наблюдаются многочисленные митозы (рисунок 93Г). Количество узелков достигает 9±0.5 (n=5), а размер в среднем составляет примерно 40×100 мкм. Увеличивается общее количество клеток как в минимальных, так и в максимальных узелках. Форма узелков становится разветвленной. Однако СПС узелков не изменяется (рисунок 94). Вероятно, это объясняется небольшим размером новых клеток и их плотной упаковкой (11–23 клетки на одном срезе минимального узелка). Происходит слияние некоторых узелков, образовавшиеся клеточные тяжи достигают 600–950 мкм в длину и 66–78 мкм в толщину.

Через 5 дней п.з. наблюдается максимальная для резистентных улиток активность АПО (рисунок 92Д). К этому времени в состав минимальных узелков входит 240.8±3.2 плотно упакованных клеток (14–29 клеток на срезе) (n=5), а в максимальных узелках содержится в среднем, 550±15.7 клеток (n=5). Также увеличивается СПС узелков (рисунок 93, таблица 39). При этом гемоциты скапливаются на поверхности желудочка сердца, а также формируют многочисленные скопления и сердечной полости и полости перикарда (рисунок 93).

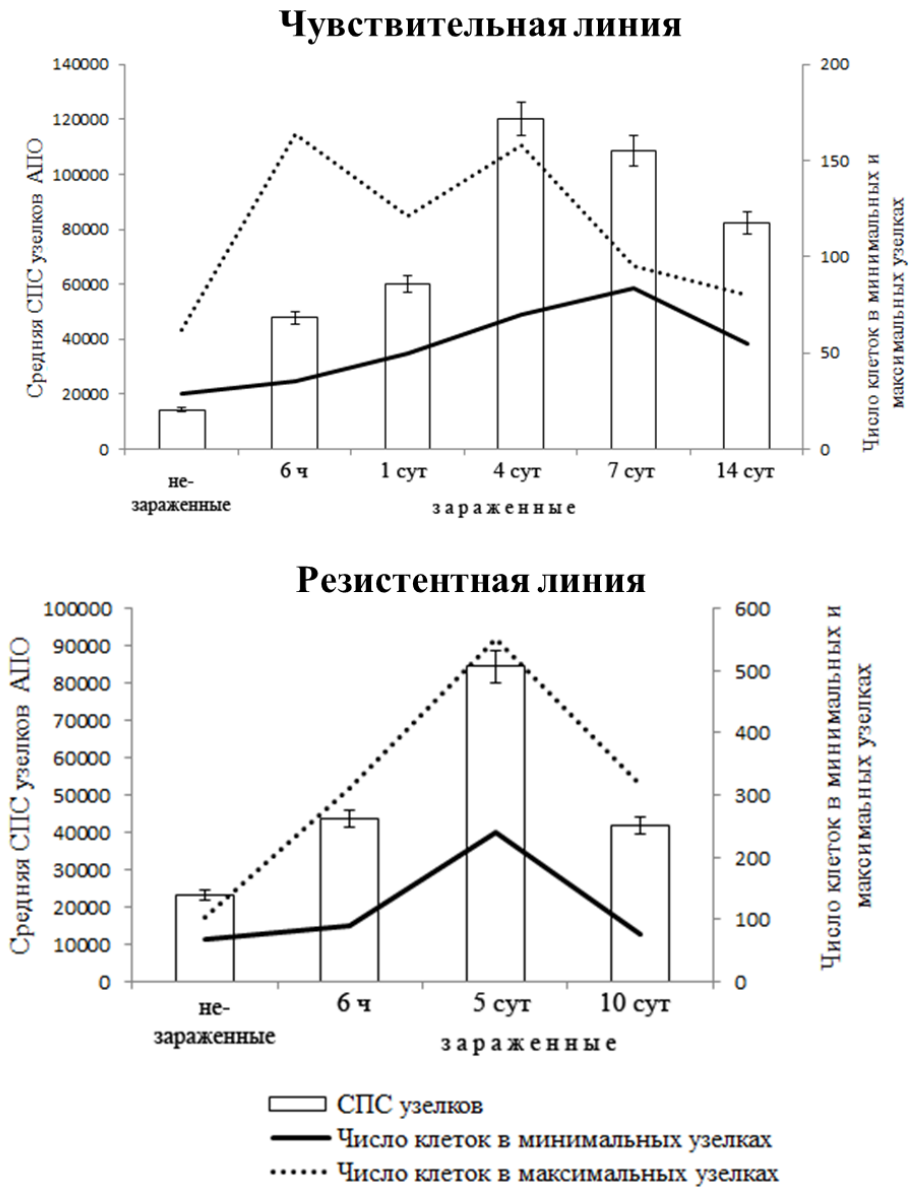


Рисунок 93. Динамика изменения АПО моллюсков *Biomphalaria glabrata* чувствительной и резистентной линий при заражении трематодами *Echinostoma caproni* (по: Атаев, Прохорова, 2013).

В дальнейшем наблюдается заметное снижение пролиферативной активности клеток АПО. Через 7 дней п.з. узелки содержат в среднем 100.07±1.17 клеток (n=15), а срезы узелков – 7–13 клеток.

Через 10 суток п.з. состояние АПО становится близким к состоянию у незаражённых особей. Число узелков уменьшается до 4–5. В минимальных из них содержится 76.80±1.96 клеток, а в максимальных – 315±1.5 (n=5) (рисунок 93).

У моллюсков *B. pfeifferi* заражение трематодами *Echinostoma caproni* также активизирует АПО. Уже через 1 день п.з. заметно увеличение АПО за счёт роста числа узелков и их размера. Их количество может достигать 6–8, а форма становится разветвлённой (рисунок 91В, Г).

Таблица 39. Характеристики АПО лёгочных моллюсков *Biomphalaria glabrata* чувствительной и резистентной линий

Вид / линия / заражённость	Форма узелков в составе АПО / количество узелков	Размеры узелков (мкм)	Количество клеток в узелках/ суммарная площадь срезов узелков (мкм^2)
B. glabrata чувствительной линии			
Незаражённые	овальная / 3	22 × 44	от 29.0±0.9 до 62±1.3 / от 17000±95.5 до 25900±55.4
Заражённые* / 4 дня п.з.	вытянутая, единый тяж / 7–8	30 × 70	от 133.6±2.3 / от 22100±52 до 195240±10.4
B. glabrata резистентной линии (n=5)			
Незаражённые	вытянутые / 6–8	25 × 50	от 7.5 ± 1.5 до 104±0.3 / от 11500±25.8 до 20400±55.3
Заражённые* / 5 дней п.з.)	вытянутая, разветвлённая, единый тяж/ более 9	66–78 × 600–950	от 240.8±3.2 до 550±5.7 / от 40650±450.5 до 128000±120.1

Условные обозначения: * – указаны характеристики, соответствующие максимально активированному АПО.

Поиск делящихся клеток в циркуляции. Для изучения пролиферативной активности циркулирующих клеток использовали незаражённых моллюсков средних размерных классов. Свежесобранную гемолимфу инкубировали с EdU. После инкубации осуществляли микроскопический и цитофлуориметрический анализ препаратов. Перед цитометрией в гемолимфу добавляли ДНК-связывающий краситель DAPI, который с используется для определения количества ДНК в клетке (Firsanov et al., 2017).

По результатам микроскопического анализа было выявлено накопление EdU в ядрах отдельных гемоцитов моллюсков у моллюсков всех исследованных видов: *Biomphalaria glabrata* (n=42), *Planorbarius corneus* (n=45), *Planorbis planorbis* (n=10), *Lymnaea stagnalis* (n=29) и *Succinea putris* (n=12) (рисунок 94). Клетки, накапливающие EdU, относятся к разным морфологическим типам – как гранулоцитам, так и гиалиноцитам. В то же время анализ клеточного цикла показал, что бóльшая часть клеток гемолимфы находится в фазе G0/G1 (таблица 40, рисунок 95).

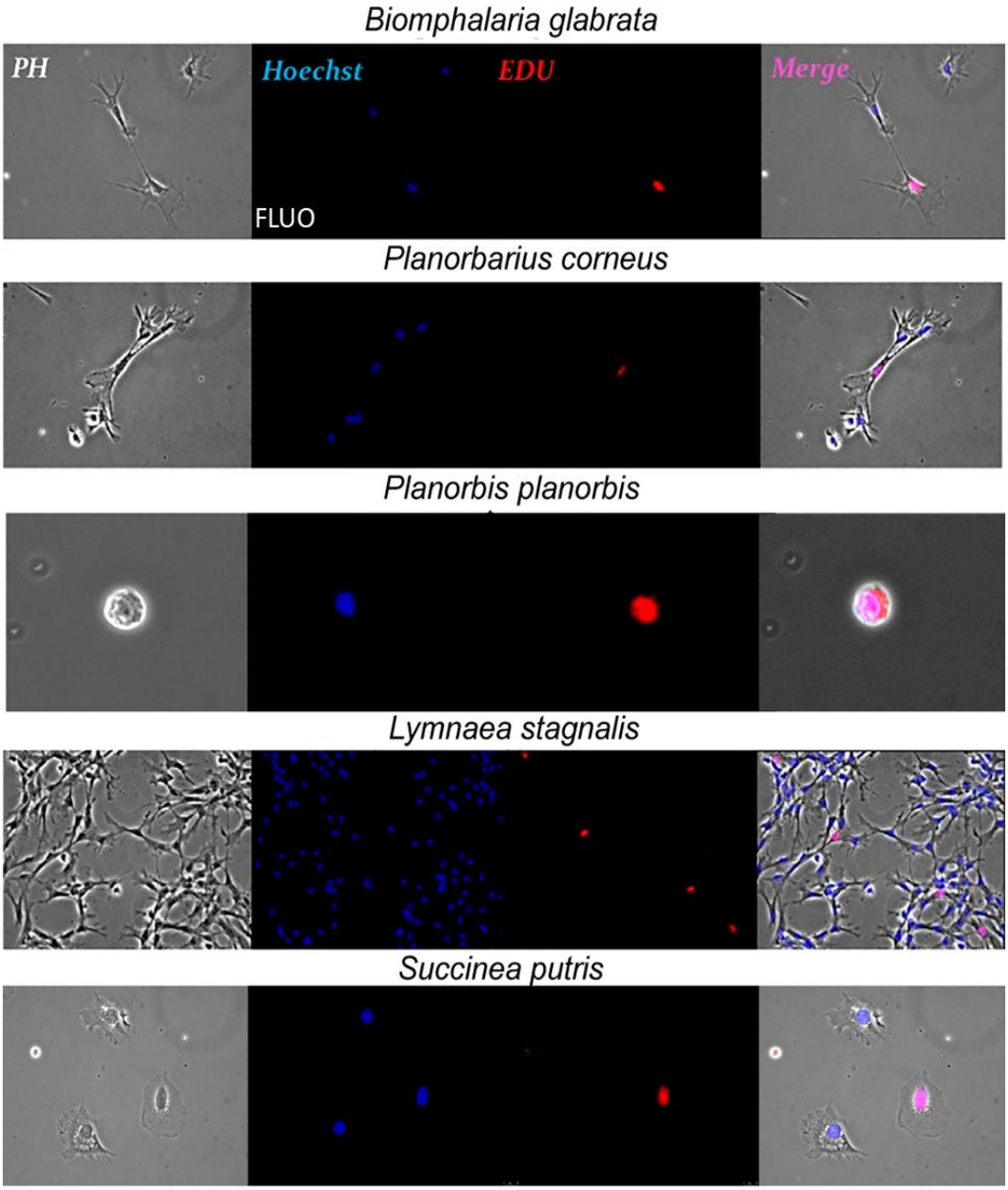


Рисунок 94. Включение EdU в ядра гемоцитов лёгочных моллюсков. Условные обозначения: PH – фотографирование в режиме фазового контраста; FLUO – фотографирование в режиме флуоресценции, окрашивание Hoechst (синий) и EdU (красный); Merge – наложение фотографий (по: Tokmakova, Serebryakova, Prokhorova, Ataev, 2020).

Цитометрический анализ включения EdU в ДНК гемоцитов показал, что большинство EdU-положительных клеток (рисунок 96А) располагаются в верхней правой части гистограммы, построенной по параметрам FS и SS (рисунок 96Б). Однако согласно данным соотношения пикового и интегрального сигнала флуоресценции красителя DAPI, большинство событий с EdU-положительными клетками находятся в области агрегатов и клеточного дебриса, содержащих пониженное количество ДНК (рисунок 96В).

Таблица 40. Доля гемоцитов, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, по данным накопления DAPI (Me (K1; K3))

Вид моллюска	Фаза клеточного цикла		
	G0/G1	S	G2/митоз
Planorbarius corneus	92.77 (92.00; 93.94)	1.37 (0.79; 2.45)	5.51 (4.33; 6.19)
Biomphalaria glabrata	91.82 (86.60; 94.01)	5.92 (4.93; 9.08)	1.31 (0.31; 4.12)
Lymnaea stagnalis	93.98 (92.92; 94.88)	1.55 (0.93; 2.51)	4.36 (3.65; 5.44)

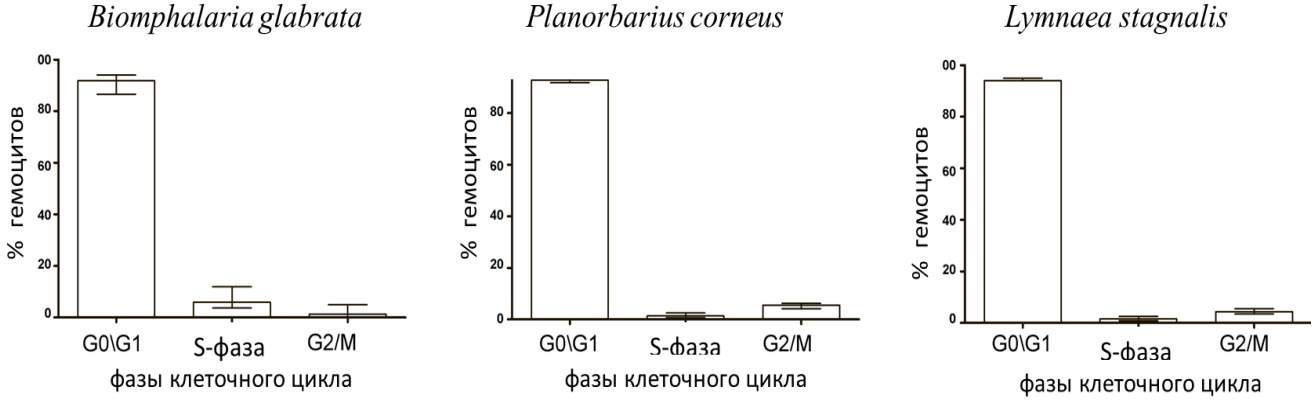


Рисунок 95. Распределение гемоцитов моллюсков по фазам клеточного цикла по данным цитофлуориметрического анализа гемолимфы, обработанной ДНК-связывающим красителем DAPI (по: Tokmakova, Serebryakova, Prokhorova, Ataev, 2020).

После исключения клеточных агрегатов и клеточного дебриса из зоны анализа, EdU-положительные гемоциты у *Biomphalaria glabrata* составили 5.8% (5.57; 6.21), а у *Planorbarius corneus* – 2.89% (1.59; 3.53) от общего числа единичных клеток (рисунок 97). Более половины из этих клеток по данным количества ДНК находятся в фазе G0/G1: у *Biomphalaria glabrata* – 4.02% (3.45; 4.94), у *Planorbarius corneus* – 2.03 % (0.78; 2.72) (рисунок 98). В гемолимфе моллюсков *Lymnaea stagnalis* количество окрашенных клеток в образцах с EdU не превышало значения для отрицательного контроля, что не позволяет сделать однозначных выводов о включении EDU в состав ДНК гемоцитов (рисунок 97).

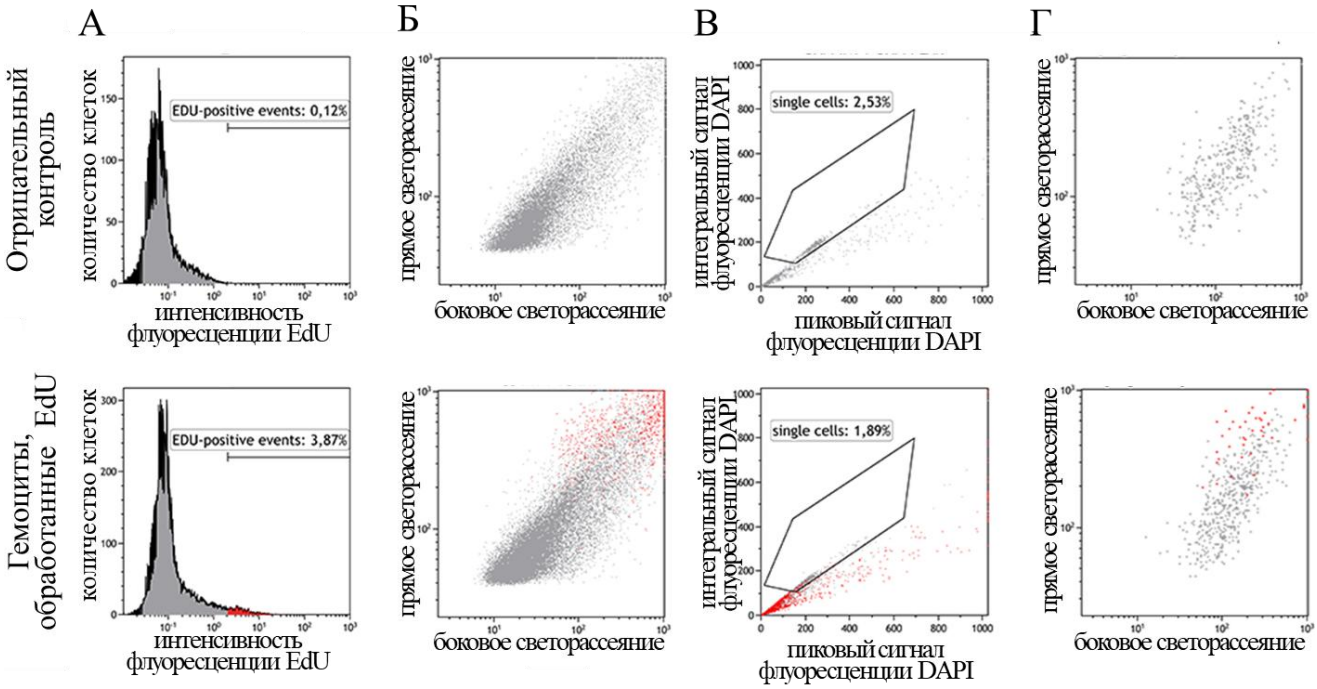


Рисунок 96. Цитофлуориметрический анализ включения EdU в гемоциты моллюсков *Biomphalaria glabrata*. А – определение EdU-положительных событий из всех событий образца; Б – локализация EdU-положительных объектов (красный) на гистограмме (приведены все зарегистрированные события); В – определение одиночных клеток на основании включения в их состав ДНК-связывающего красителя DAPI, отсечение агрегатов и дебриса (красным показаны EdU-положительные события); Г – расположение EdU-положительных событий (красный) (приведены только одиночные клетки) (по: Tokmakova, Serebryakova, Prokhorova, Ataev, 2020).

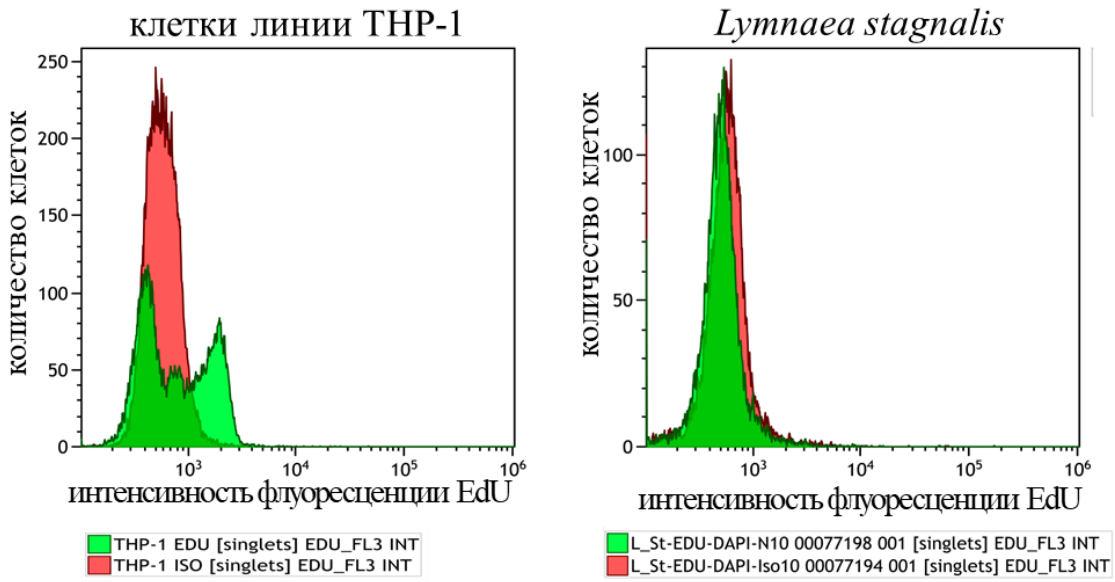


Рисунок 97. Гистограммы, демонстрирующие наложение сигналов флуоресценции клеток, инкубированных с EdU (зеленый) и отрицательного контроля – клеток без инкубации с EdU (красный) (по: Tokmakova, Serebryakova, Prokhorova, Ataev, 2020).

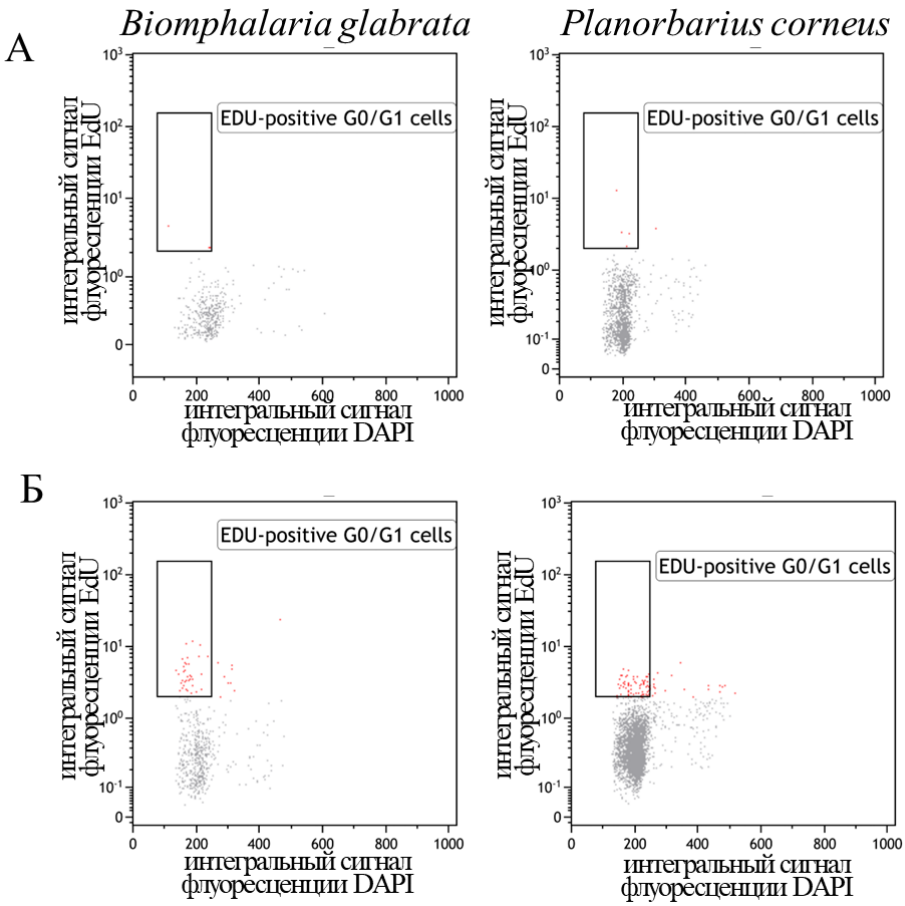


Рисунок 98. Цитофлуориметрический анализ распределения гемоцитов по фазам клеточного цикла с использованием ДНК-связывающих красителей DAPI и EdU. А – отрицательный контроль без инкубации с EdU; Б – эксперимент (по: Tokmakova, Serebryakova, Prokhorova, Ataev, 2020).

Обсуждение к разделу III.2.4.

В результате анализа гистологических препаратов незаражённых и заражённых трематодами моллюсков *Biomphalaria glabrata*, *B. pfeifferi*, *Planorbarius corneus* и *Planorbis planorbis,* было установлено, что у всех исследованных видов имеется гемопоэтическая структура, приуроченная к эпителию перикардиальной полости – АПО. При этом у представителей разных видов АПО может смещаться в сторону мантийного эпителия, а также близлежащих лакун кровеносной системы.

Во всех случаях заражение трематодами приводит к активации и увеличению размеров АПО. Ранее было показано, что изменение АПО при иммунизации происходит в соответствии с определённой временной динамикой и зависит от восприимчивости моллюска к заражению трематодами конкретных видов (Аванесян, Атаев, 2001; Аванесян, 2002; Аванесян, Атаев, 2004; Токмакова, 2018).

Заражение моллюсков *Biomphalaria glabrata* трематодами *Echinostoma caproni* приводит к активизации АПО у особей как резистентной, так и чувствительной линий. Динамика этого процесса сходна у представителей обеих линий. Количество узелков, их размеры и число составляющих их клеток увеличиваются уже через 6 часов п.з. Эти показатели достигают максимальных значений через 4 дня п.з. у улиток чувствительной линии и через 5 дней п.з. у представителей резистентной линии. Завершение активации АПО также происходит в близкие сроки. У моллюсков чувствительной линии АПО приближается к исходному состоянию через 14 дней п.з., у моллюсков резистентной линии – 10 дней п.з.

Однако по максимальным значениям анализируемых показателей АПО заражённых моллюсков *Biomphalaria glabrata* резистентной линии превосходит АПО моллюсков чувствительной линии. Вероятно, в резистентных улитках после инвазии пролиферация клеток в АПО протекает интенсивней, чем обеспечивается бóльшая численность циркулирующих гемоцитов по сравнению с чувствительными особями. Такая динамика может быть связана с тем, что у резистентных улиток более эффективно происходит распознавание чужеродного, а следовательно – быстрее развивается клеточная реакция (см. раздел III.4).

Деление клеток в составе АПО сопровождается выходом гемоцитов, которые оседают на поверхности желудочка. В сердечной и перикардиальной полостях образуются многочисленные агглютинации округлой и вытянутой формы (рисунок 92). Ранее было показано, что такие агглютинации могут достигать размера 96–360 мкм (см. Ataev, Coustau, 1999). Возможно, клетки временно депонируются в таких агглютинациях или даже проходят этапы дифференцировки перед выходом в кровоток.

Роль пролиферации клеток АПО в увеличении численности гемоцитов была показана в многочисленных исследованиях (Abdul-Salam, Michelson, 1980; Ataev, Coustau, 1999). Однако подсчет количества циркулирующих гемоцитов у заражённых моллюсков даёт лишь приблизительную оценку интенсивности работы АПО, так как большое число гемоцитов участвуют в формировании скоплений и инкапсуляции патогенов (Lie, Heyneman, 1975a; Jourdane, Cheng, 1987; Ataev, Coustau, 1999). У моллюсков резистентных линий такие скопления формируются не только в местах локализации патогена, но и в других участках кровеносной системы (Ataev, Coustau, 1999).

Ранее увеличение АПО при иммунизации было выявлено и у моллюсков *Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis* и *Biomphalaria pfeifferi* (Аванесян, Атаев, 2001; Аванесян, 2002; Токмакова, 2018). У заражённых моллюсков этих видов количество узелков в составе АПО достигает 8–10, а количество клеток в них превышает 100 (Аванесян, Атаев, 2001). При этом узелки также располагаются в лакунах кровеносной системы вблизи перикарда. В составе узелков заражённых моллюсков фиксируются митозы (Прохорова, 2009; Токмакова, 2018).

В последние годы появились доказательства не только топографической отграниченности АПО от окружающих его тканей, но и его функциональной и метаболической обособленности. В частности, под влиянием цитокинов и продуктов жизнедеятельности патогенов происходит рост митотического индекса в узелках АПО, но в окружающих его тканях количество митозов не увеличивается (Sullivan, 2007; Salamat, Sullivan, 2009; Sullivan et al., 2011; Sullian, Belloir, 2013). При пересадке моллюскам чувствительных линий АПО и участков мантии от резистентных особей, только у реципиентов АПО происходит усиление устойчивости к заражению (Vasquez, Sullivan, 2001; Barbosa et al., 2006).

В результате пролиферации в АПО образуются клетки одного типа (Lie et al., 1975; Matricon-Gondran, Letocart, 1999) – прогемоциты. Вероятно, они с током гемолимфы направляются в вену, а затем в сердце и разносятся по всему организму моллюска. Существование морфологически однородной популяции прогемоцитов подтверждают и результаты культивирования АПО (Barbosa et al., 2006).

Вероятно, находясь в кровотоке, прогемоциты дифференцируются в гемоциты – гиалиноциты и гранулоциты (Cheng, 1975; Ottaviani, Franchini, 1988; Adema et al., 2000; Connors, 2003). Часть из них агглютинирует в различных сосудах и синусах кровеносной системы, а многие попадают в почку и через нее в полость перикарда (см. Атаев, Полевщиков, 2004).

Следует отметить, что результаты нашего исследования лишь примерно отражают особенности гемопоэза лёгочных моллюсков. В работе рассматривались только изменения в АПО, расположенном между эпителиями мантийной и перикардиальной полостей («реноперикардиальный» АПО). В то же время, в литературе встречаются описания АПО другой локализации. Например, у моллюсков *Marisa cornuarietis* описан АПО в виде утолщенного участка эпителия на стенки лёгкого, а не перикарда (Yousif et al., 1980). Для моллюсков *Pomacea canaliculata* показано деление гемоцитов в полости перикарда (Accorsi et al., 2014). Считается, что новообразованные гемоциты накапливаются в ампуле – мешковидном органе, соединенном с передней частью аорты и неплотно прилегающем к сердцу. Предполагается, что ампула участвует в регуляции количества гемоцитов у *P. canaliculata* (Rodriguez et al., 2018). Повторные заборы гемолимфы приводят к «истощению гемоцитов а ампуле», но при этом митотической активности клеток в циркуляции не наблюдается (Accorsi et al., 2014).

Анализ профиля транскриптов в клетках АПО *B. glabrata* после иммунизации различными ПАМП, показал, повышение активности гена серин-треониновой кинзазы контрольной точки 1 (checkpoint kinase 1). Этот белок является ключевым регулятором митоза (Zhang et al., 2016) и потенциально может быть использован как маркер для выявления других возможных участков пролиферации прогемоцитов.

Существуют также гипотезы, допускающие у пульмонат образование гемоцитов из клеток соединительной ткани (Sminia, 1974; Sullivan 1990; Souza, Andrade 2006), либо пролиферацию самих циркулирующих клеток гемолимфы (Sminia et al. 1983; Monteil, Matricon-Gondran 1991; Portet et al. 2019). Последняя рассматривается также в качестве возможного механизма образования гемоцитов у прозобранхий, у которых пока не выявлено обособленных центров гемопоэза (Gorbushin, Iakovleva 2006).

Сходные варианты формирования циркулирующих элементов предполагаются и у двустворчатых моллюсков: дифференцировка в гемоциты клеток соединительной ткани (Smolowitz et al., 1989); пролиферация циркулирующих гемобластов – клеток-предшественников, которые обладают свойствами стволовых клеток (Matozzo et al., 2008); наличие специализированных участков гемопоэза, например, в стенках кровеносных сосудов (Tirapé et al., 2007) и участках жаберного эпителия (Jemaà et al. 2014). В последнем случае пролиферация дифференцированных гемоцитов происходит в специализированных участках жабер, например, у устрицы *Crassostrea gigas*. Показано, что при иммунизации устриц бактериями *Vibrio splendidus* происходит активация гемопоэза в канальцах жаберных нитей (Li et al., 2017).

Большинство предположений о возможности гемоцитов к пролиферации связаны с тем, что некоторые из гиалиноцитов имеют морфологию, напоминающую бластоподобные клетки (Lie et al., 1975; Sminia et al., 1983; Monteil et al., 1991). В то же время, само по себе высокое ЯЦО свидетельствует не о способности клетки к пролиферации, а скорее о её незрелости. Такие бластоподобные клетки очень похожи на гемоциты, окружающие АПО (см. рисунок 92E), а также выходящие из эксплантов АПО в культуре (Barbosa et al., 2006).

Однако с целью проверки гипотезы о возможности деления гемоцитов мы осуществили **поиск пролиферирующих клеток в циркуляции** у исследуемых видов. Для выявления делящихся клеток чаще всего используется широко используется 5-бромо-2'-дезоксиуридин (BrdU) (Gratzner, 1982; Dolbeare, 1995), являющийся аналогом тимидина. Однако для детекции его включения иммуногистохимическим путём необходимо денатурировать ДНК. Поэтому в своей работе мы использовали другой аналог тимидина – EdU (Buck et al., 2008; Cappella et al., 2008). Ранее этом метод применялся в основном для изучения клеток позвоночных животных (Salic et al., 2008; Lin et al., 2009; Chehrehasa et al., 2009; Zeng et al., 2010; Fabrice et al., 2015). Однако несколько лет назад он был впервые применен для изучения пролиферативной активности клеток гемолимфы моллюсков *Biomphalaria glabrata* (Portet et al., 2019). При этом было зафиксировано накопление EdU в ядрах 1.16–5.19% гемоцитов.

Полученные нами данные также показывают, что гемоциты моллюсков *Biomphalaria glabrata*, *Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis*, *Lymnaea stagnalis* и *Succinea putris* включают

EdU. Однако по данным микроскопического анализа невозможно определить точную долю таких клеток: в процессе подготовки препаратов часть клеток теряется. По данным цитометрического анализа у незараженных моллюсков *Biomphalaria glabrata* и *Planorbarius corneus* доля таких клеток варьирует, однако также не превышает нескольких процентов. Более того, изучение гемолимфы этих моллюсков с одновременным использованием EdU и нуклеин-связывающего красителя DAPI также выявило небольшой процент клеток в S и G2/M фазе. Однако именно EdU-положительные клетки оказались среди гемоцитов в G0/G1 фазы клеточного цикла. В то же время, попытки поиска митотических клеток среди гемоцитов пульмонат не подтверждают возможность деления гемоцитов в циркуляции (Прохорова, 2009; Accorsi et al., 2014).

Возможно, включение EdU в ядра циркулирующих клеток связано с процессом репарации ДНК в этих клетках. У позвоночных EdU используется в том числе для изучения процессов репарации (Kim et al., 2019; Wiley et al., 2019). Таким образом, факт включения в клетку EdU свидетельствует лишь о процессах синтеза ДНК, но не обязательно о процессах репликации. Более того, именно в фазе G0/G1 могут активно осуществляться процессы репарации (Sarkar et al., 2006; Williams et al., 2014). У иммунизированных моллюсков активированные гемоциты участвуют в выработке факторов цитотоксичности, которые способны повреждать в том числе и собственную ДНК гемоцитов. В таком случае количество клеток, нуждающихся в репарации, может увеличиваться. В упомянутом выше исследовании гемоцитов процент клеток *Biomphalaria glabrata*, включающих EdU был выше именно у заражённых трематодами улиток (Portet et al., 2019).

Другое возможное объяснение синтеза ДНК в циркулирующих гемоцитах может быть связано с пролиферацией клеток в тканях. У позвоночных животных центральным органом гемопоэза является костный мозг. Однако дифференцированные и крайне специализированные клетки – макрофаги – могут пролиферировать в тканях (Lin, Stewart, 1973; Luo et al., 2008; Robbins et al., 2013). Этот механизм наряду с притоком моноцитов, рассматривается как альтернативный способ пополнения тканевых макрофагов в поврежденных тканях в процессе воспаления (Mlcochova et al., 2017). Кроме того, у позвоночных животных происходит пролиферация лимфоцитов в процессе антиген-зависимой дифференцировки (Fox, Smith, 1986; Janeway, Medzhitov 2002; Zink et al., 2017). Таким образом, ограниченная пролиферация иммуноцитов на периферии не противоречит существованию центрального органа гемопоэза.

Возможно, аналогичный механизм существует и у пульмонат. Способность к делению, в таком случае, могут сохранять прогемоциты, покинувшие центр гемопоэза (АПО) до дифференциации в гемоциты. Мы также допускаем, что небольшой процент гемоцитов сохраняет способность к пролиферации при определенных условиях. Факторами,

стимулирующими локальную пролиферацию гемоцитов улиток, могут быть цитокины, выделяемые клетками поврежденных тканей, а также продукты жизнедеятельности патогенов.

Имеющиеся данные позволяют рассматривать гемоциты лёгочных моллюсков как универсальные клетки системы врождённого иммунитета. Морфологические варианты гемоцитов – гранулоциты и гиалиноциты обладают разной функциональной активностью. По всем характеристикам (продукция АФК, фагоцитарная активность, подвижность) гранулоциты являются более активными иммуноцитами. В гемолимфе присутствуют клетки, характеризующиеся промежуточными морфологическими признаками между гранулоцитами и гиалиноцитами. При иммунизации и инкубации гемолимфы с бактериями in vitro доля гранулоцитов увеличивается. Возможно, это является результатом перехода части гиалиноцитов в гранулоциты. Относительное количество гранулоцитов увеличивается по мере увеличения размера моллюска. Это позволяет предположить, что наблюдаемые морфологические типы гемоцитов представляют собой варианты клеток единой клеточной линии. В ходе онтогенеза, в том числе при иммунизации, увеличивается доля более функциональных клеток – гранулоцитов.

В качестве органа гемопоэза у лёгочных моллюсков функционирует АПО, который во всех случаях приурочен к перикарду, либо расположен на границе перикардиального и мантийного эпителиев. Активация АПО при иммунизации подтверждает его роль в пополнении пула циркулирующих гемоцитов, участвующих в иммунных реакциях. Однако существование центрального органа гемопоэза не противоречит возможности деления клеток гемолимфы на периферии по аналогии с клетками крови позвоночных.

III.3. Распознавание чужеродного в иммунном ответе лёгочных моллюсков

Распознавание чужеродного является одним из центральных событий иммунного ответа. В основе механизма распознавания в системе врождённого иммунитета лежит способность иммуноцитов узнавать так называемые образы патогенности (pathogen-associated molecular patterns, PAMP, ПАМП) и образы опасности (damage-associated molecular patterns, DAMP, ОАМП), содержащие молекулярные структуры, свидетельствующие о потенциальной опасности их носителя (Janeway, Medzhitov, 2002).

Рецепторы клеток врожденного иммунитета участвующие в распознавании ПАМП и ОАМП, относят к паттерн-распознающим рецепторам (pattern recognition receptors, PRR, ПРР). Набор ПРР является генотипически заданным. Этим распознавание в системе врождённого иммунитета принципиально отличается от распознавания системе адаптивного иммунитета, которая определяет чужеродное посредством антигенраспознающих рецепторов (АРР). Все АРР являются молекулами иммуноглобулинового суперсемейства. В ходе онтогенеза у каждой особи формируется уникальный набор АРР. В случае успешного распознавания патогена клетками иммунитета происходит их активация и запуск всего каскада реакций, необходимых для элиминации патогена. Таким образом, от эффективности распознавания зависит успешность иммунного ответа, а набор ПРР определяет особенности иммунного ответа организма на различные патогены.

III.3.1. Рецепторы врождённого иммунитета лёгочных моллюсков

Поиск транскриптов, кодирующих ПРР был осуществлен в транскриптоме гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus*. Для получения траскриптома были использованы гемоциты моллюсков, заражённых трематодами *Bilharziella polonica* (n=10), а также незараженные особи (n=10).

В результате анализа собранного транскриптома было предсказано 2687 закодированных молекул с доменами, гомологичными факторам врождённого иммунитета (Orlov et al., 2023). Среди них наиболее представленными оказались транскрипты кодирующие факторы цитотоксичности, регуляторы иммунного ответа (цитокины и молекулы внутриклеточной регуляции) и молекулы, участвующие в распознавании чужеродного (см. раздел III.2.3).

Всего в транскриптоме роговой катушки выявлено 1776 транскриптов, кодирующих ПРР, что составляет более половины всех выявленных иммуноассоциированных транскриптов. Среди них присутствуют транскрипты ПРР всех основных групп, ранее описанных при изучении врождённого иммунитета у животных разных таксонов (рисунок 99, таблица 33).

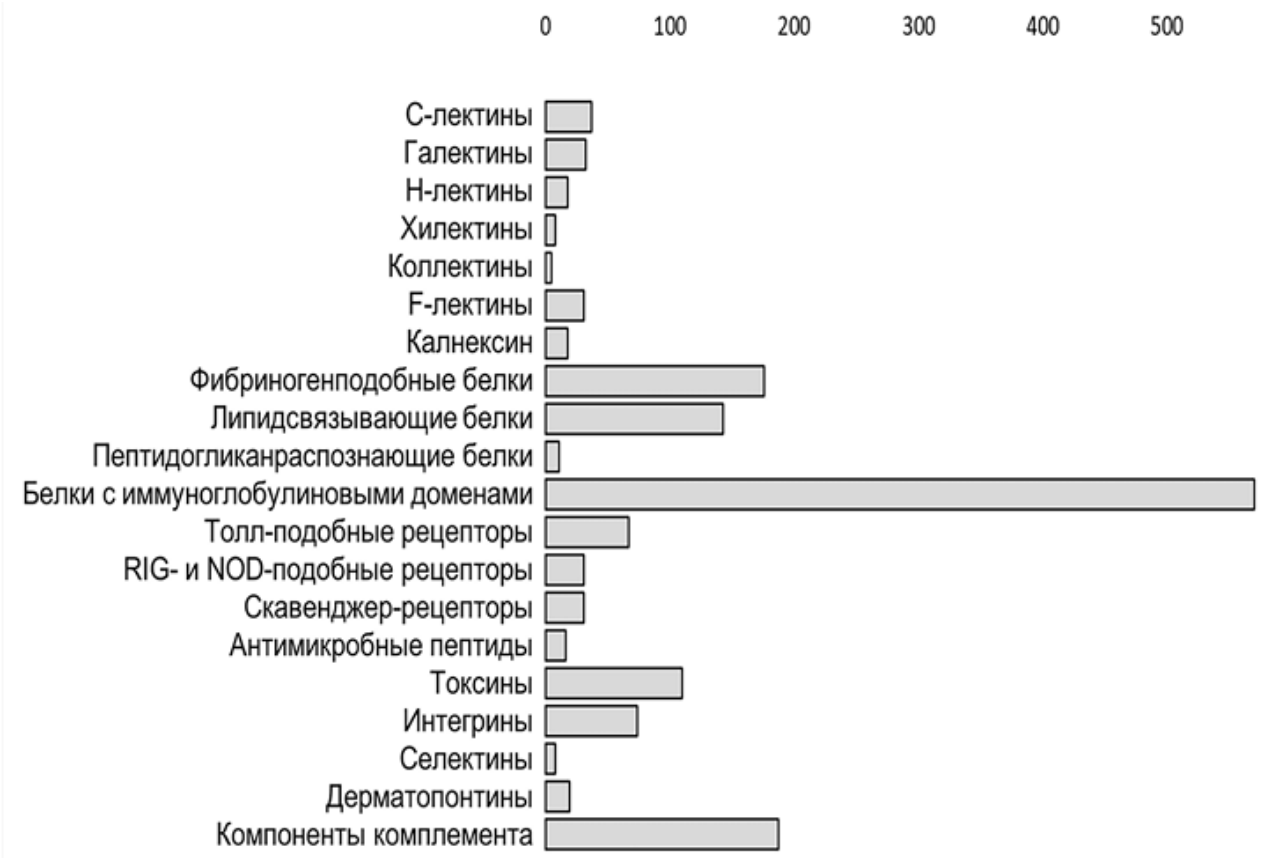


Рисунок 99. Число доменов патогенраспознающих молекул и молекул адгезии в гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus* по данным BlastP (базы данных NCBI NR, e-value<1e-5) (по: Прохорова и др., 2024).

Самыми представленными оказались транскрипты лектинов, членов иммуноглобулинового суперсемейства, молекул адгезии и толл-подобных рецепторов. На основе предсказанных аминокислотных последовательностей выявленных транскриптов была определена вероятная доменная структура кодируемых ими белков. Ниже рассмотрены особенности предсказанной доменной структуры основных ПРР, относящихся к основных выявленным группам.

Лектины. По составу доменов лектины оказались самой разнообразной группой ПРР. Все выявленные лектины *Planorbarius corneus* могут быть отнесены к нескольким группам согласно общепринятой классификации (Vasta, Ahmed, 2008).

Около половины транскриптов лектинов были отнесены к ***фибриногенподобным белкам*** (fibrinogen-related proteins, FREP, ФБ) (таблица 33). Молекулы этой группы наряду с углевод-связывающим участком содержат различное количество фибриногеновых доменов. Все ФБ гемоцитов *P. corneus* включают единственный фибриногеновый (FBG) домен, который в большинстве случаев ассоциирован с доменами фуколектина (рисунок 100А–2), доменами эпидермального фактора роста (epidermal growth factor, EGF, ЭФР) (рисунок 100А–3), интегриновыми доменами, доменами богатыми лейциновыми повторами (leucine rich repeats,

LRR) (рисунок 100А–6). Один из транскриптов наряду с FBG-доменом кодирует домен SCAN (рисунок 100А–7). Также предсказан вариант рецептора с PAN/Apple-подобным доменом (рисунок 100А–4). Вариантов ФБ классической структуры, для которой характерно сочетание FBG и иммуноглобулиновых (IG) доменов (Adema et al., 1997), выявлено не было.

Второй группой лектинов по количеству представленных транскриптов оказались ***галектины*** – молекулы, избирательно связывающие β-галактозиды (Vasta, Ahmed, 2008). Выявлены варианты транскриптов, кодирующие от одного до четырёх галектиновых доменов (рисунок 100В).

Лектины F-типа (фуколектины) представляют собой фукозо-связывающие белки. В транскриптоме гемоцитов *P. corneus* закодированы молекулы, содержащие от 1 до 3 фуколектиновых доменов. Примерно половина фуколектинов также содержат домены С-лектина и ЭФР (рисунок 100Б–2, 3, 5, 9). Также выявлена немембранная форма F-лектина, содержащая ML-домен (myeloid differentiation factor 2 (MD-2)-related lipid-recognition, MD) (рисунок 100Б–6). Этот домен имеет структуру, напоминающую бета-складки иммуноглобулинов, и участвует в распознавании липопротеинов низкой плотности (Inohara, Nuñez, 2002). Таким образом, эта предсказанная молекула включает одновременно углевод-связывающий и липид-связывающий домены.

С-лектины (C-type lectin–related proteins, CLECT) роговой катушки содержат от одного до четырёх (в одном из случаев – десять) углевод-связывающих доменов С-типа (рисунок 101). В части предсказанных С-лектинов этот домен сочетается с доменами ЭФР (рисунок 101А–10), агглютинина (рисунок 101А–14) и крингл-доменами (рисунок 101А–11). В одном из транскриптов, кодирующих мембранную форму С-лектина, также закодирован домен LINK (рисунок 101–12). Значительная часть С-лектинов содержат IG-домены (рисунок 102–4, 8, 9). Также выявлен один вариант транскрипта, кодирующего 11 С-лектиновых доменов (рисунок 101Б). Такая структура характерна для коллектинов, в частности – для маннозо-связывающего лектина (mannose-binding lectin, MBL, МСЛ) (Vasta et al., 1999).

I-лектины, содержащие IG-домены также представлены разнообразными вариантами (рисунок 102). Предсказаны мембранные формы, содержащие от 1 до 7 IG-доменов (рисунок 102). При этом часть доменов гомологичны константным доменам иммуноглобулинов, а другая часть – вариабельным. Во всех случаях константные домены представлены С2-доменами. Как и у других беспозвоночных, у моллюсков встречается только С2-вариант константного домена (Oreste et al., 2021). Один из вариантов I-лектинов моллюсков – лектины, связывающие сиаловую кислоту (sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins, Siglecs) (Varki et al., 2022). Они отличаются сочетанием V-доменов и С2 IG-доменов. У роговой катушки выявлен один

вариант такой молекулы. При этом одновременно с V- и C2-доменами в нём присутствуют домены C-лектина, FBG-домен и домен CUB (рисунок 102–7).

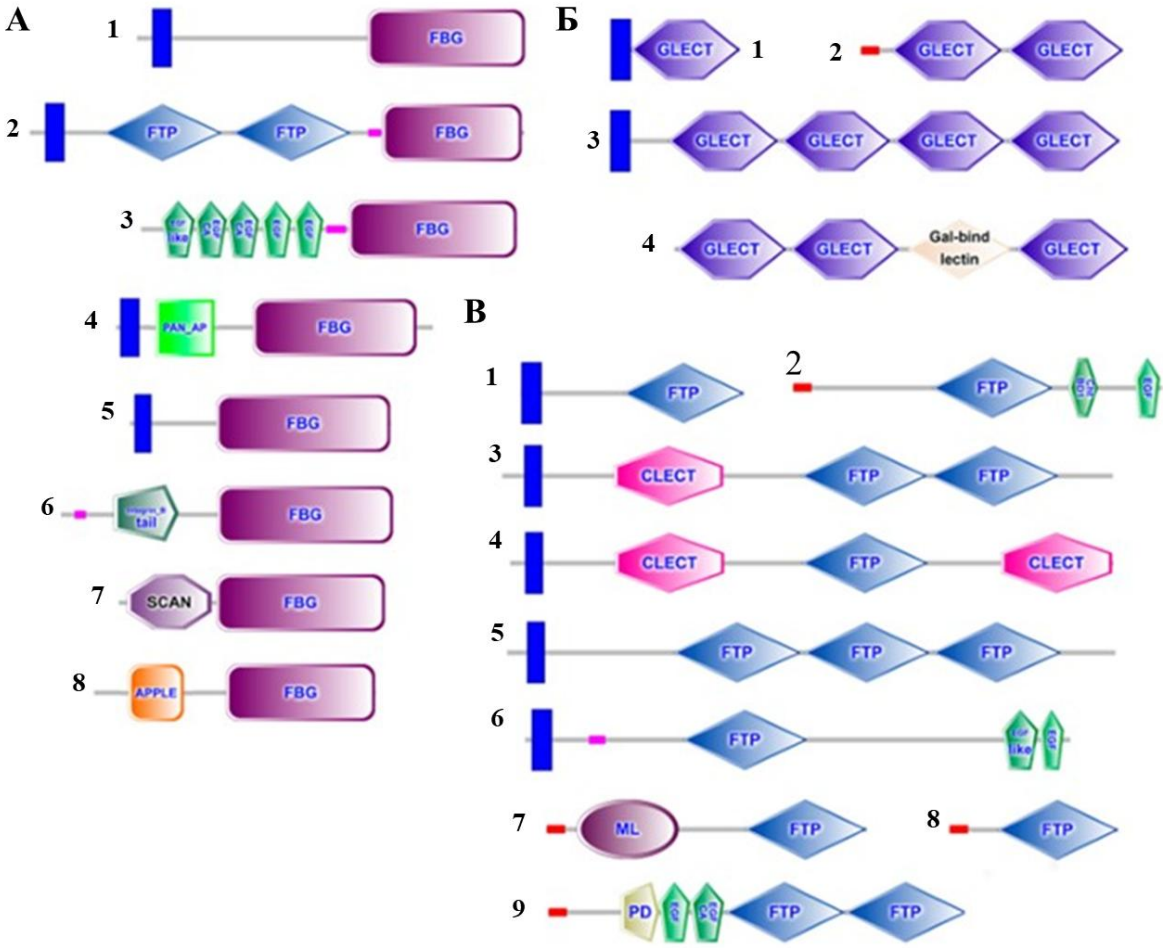


Рисунок 100. Варианты предсказанной доменной структуры патогенраспознающих молекул гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus*. А – фибриногенподобные белки; Б – F-лектины; В – галектины. Условные обозначения (здесь и далее): горизонтальные красные полоски – сигнальный пептид; горизонтальные розовые – область низкой сложности; вертикальные синие полоски – трансмембранная область; AAA – домен АТФ-азы; Agglutinin – домен агглютинина; CLECT – лектин С-типа; DEATH – домен смерти (апоптоза); DEXDc – домен DEAD-подобных хеликаз; DED – домен эффектора смерти (апоптоза); EGF – домен эпидермального фактора роста; EGF_CA – кальций-связывающий EGF-подобный домен; Filament – домен промежуточного филамента; FTP – домен фуколектина; Gal-bind – галактозид-связывающий лектин; GLECT – галактозо-связывающий лектин; HELICc – С-концевой семейства хеликаз; HOLI; IG – иммуноглобулиновый домен; IgC2 – иммуноглобулин С-2 типа; IG-like – иммуноглобулиноподобный домен; KR – кринг-домен; LDLa – домен рецептора липопротеинов низкой плотности класса А; LINK – связывающий гиалуронан домен; LRR – повтор, богатый лейцином; LRR CT – богатый лейцином С-концевой домен; LRR NT – богатый лейцином N-концевой домен; LRR TYP – богатый лейцином повтор с классической последовательностью аминокислот; ML – MD-2-подобный домен распознавания липидов; PAN_AP – APPLE-подобный домен; SCAN – область, богатая лейцином; SR – богатый цистеином домен скавенджер-рецептора; TIR – TIR-домен; TPK_B1 – пирофосфокиназа тиамина; TSP1 – повторы тромбоспондина типа 1; ZnF_C4 – домен цинковых пальцев (по: Прохорова и др., 2024).

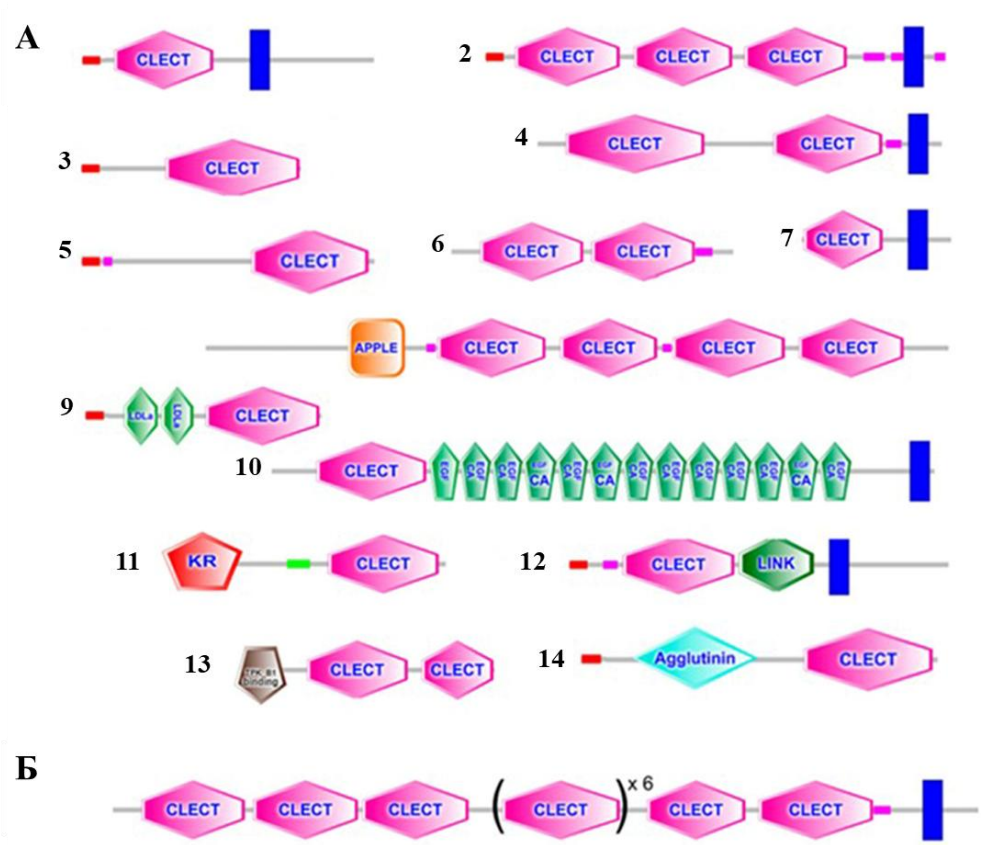


Рисунок 101. Варианты предсказанной доменной структуры патогенраспознающих молекул гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus*. А – С-лектины; В – лектин, связывающий маннозу. Условные обозначения: см. рисунок 100 (по: Прохорова и др., 2024, с изменениями).

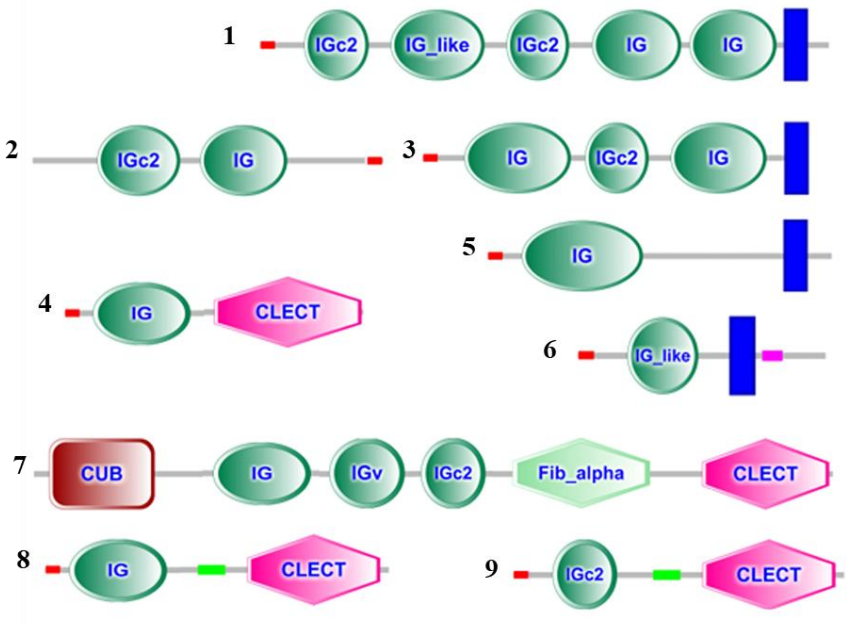


Рисунок 102. Варианты предсказанной доменной структуры лектинов с иммуноглобулиновыми доменами из гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus.* Условные обозначения: см. рисунок 100 (по: Прохорова и др., 2024).

Скавенджер-рецепторы (scavenger receptors, SR, CP), закодированные в транскриптоме *P. corneus* представлены четырьмя вариантами (рисунок 103). Наиболее простую структуру имеет рецептор с двумя SR-доменами (рисунок 103–4). Такой вариант соответствует классу I CP млекопитающих (Murphy et al., 2005). Другие варианты CP *P. corneus* имеют неканоничную структуру. В одном из предсказанных CP, присутствуют 10 богатых цистеинами SR-доменов и домен, гомологичный белкам промежуточных филаментов (рисунок 103–1). Другой вариант наряду с SR-доменами содержит домен C-лектина и домен, гомологичный трипсин-подобным сериновым протеазам (рисунок 103–2). Четвертый вариант – повторы тромбоспондин-подобных доменов и домены ЭФР (рисунок 103–3).

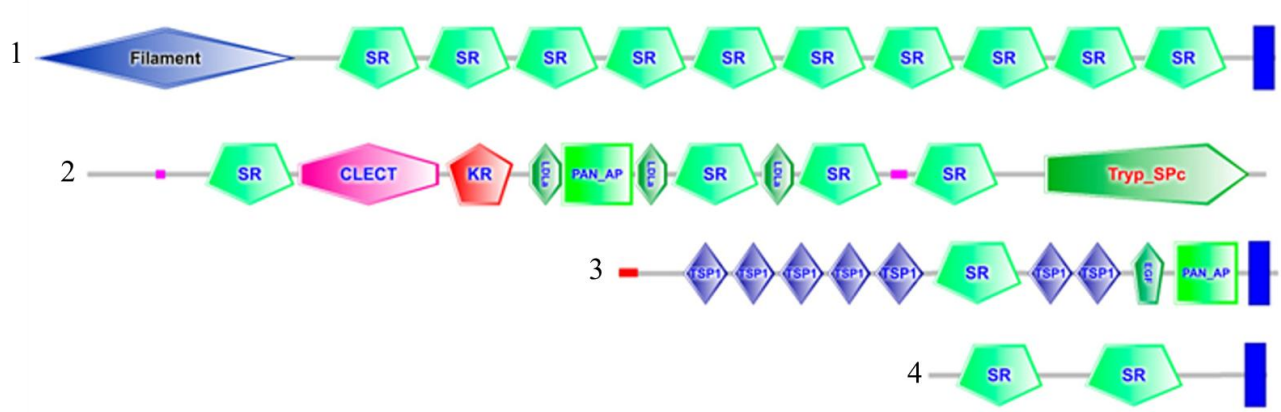


Рисунок 103. Варианты предсказанной доменной структуры скавенджер-рецепторов гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus.* Условные обозначения: см. рисунок 100 (по: Прохорова и др., 2024, с изменениями).

Толл-подобные рецепторы (toll-like receptors, TLR, ТПР) считаются универсальными рецепторами системы врождённого иммунитета (Lemaitre et al., 1996). В связи с этим они активно исследуются не только у позвоночных, но и у беспозвоночных животных (Kanzok et al., 2004). Это позволило нам проанализировать структуру ТПР роговой катушки более подробно, чем структуру ПРР других групп.

ТПР представляют собой трансмембранные белки, которые могут быть расположены как на поверхности клетки, так и на везикулах в цитоплазме. Внеклеточный домен ТПР содержит LRR, количество которых значительно варьирует. Этот домен отвечает за способность распознавать определённые ПАМП. Внутриклеточный домен TIR, в свою очередь, передаёт сигнал внутрь клетки через адаптерные белки (Bowie, O'neill, 2000). Домен TIR является наиболее консервативной частью молекулы, поэтому его последовательности чаще всего используют для классификации ТПР.

В транскриптоме гемоцитов моллюсков *P. corneus* было выявлено 369 транскриптов, содержащих LRR. Из этих транскриптов 139 содержали также TIR-домен. Из них только 40 были полноразмерными и кодировали трансмембранную область. Часть этих транскриптов представлена изоформами, различающимися однонуклеотидными заменами, не влияющими на аминокислотную последовательность. В результате было идентифицировано только 11 вариантов доменных структур ТПР роговой катушки.

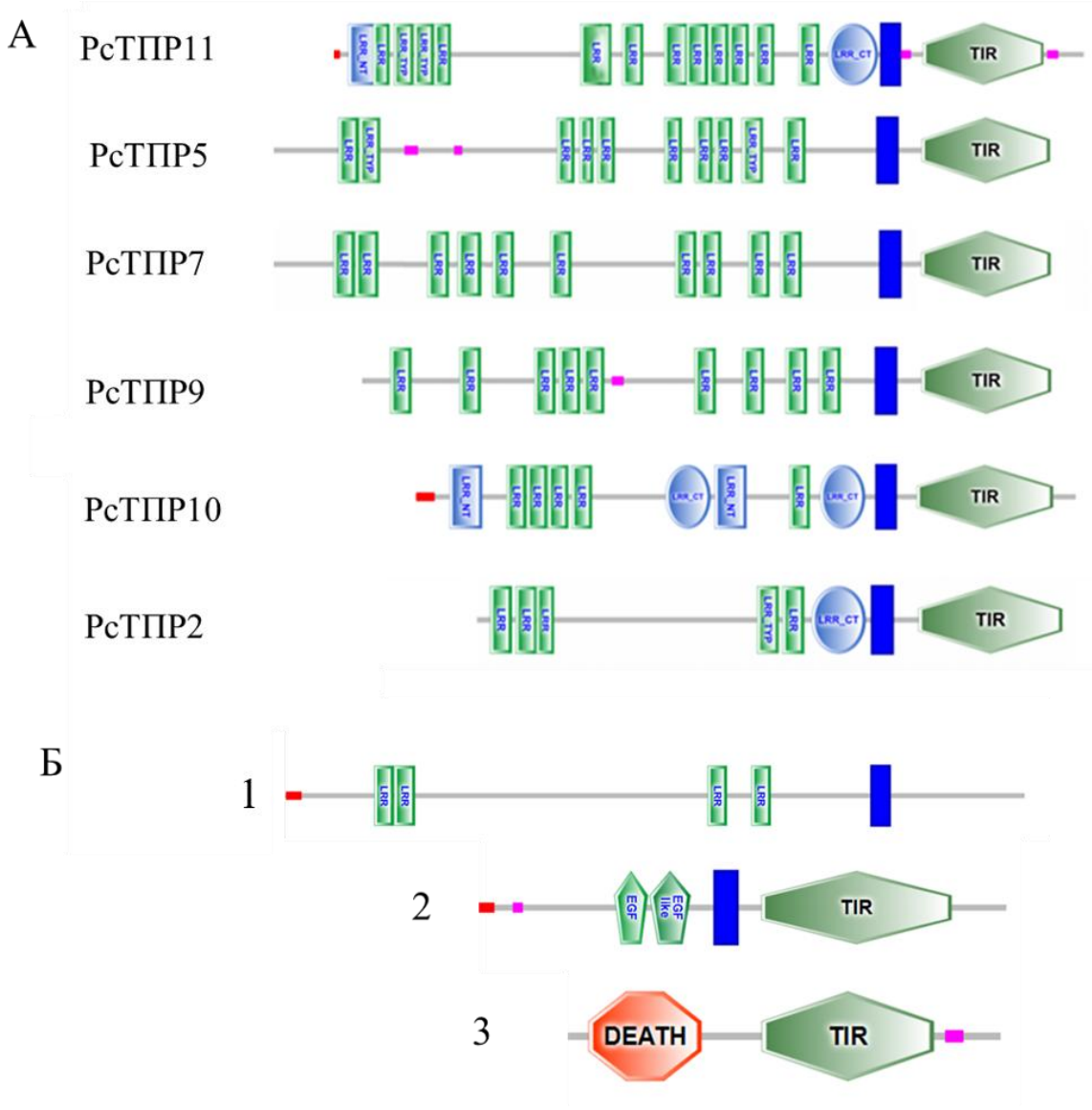


Рисунок 104. Варианты предсказанной доменной структуры толл-подобных рецепторов гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus*. А –доменной структуры толл-подобных рецепторов с каноничной структурой; Б – варианты структуры молекул, содержащие домены с лейциновыми повторами, либо TIR-домен. Условные обозначения: см. рисунок 100 (по: Бобровская, Орлов, Прохорова, 2024, с изменениями).

Длины последовательностей кДНК ТПР *P. corneus* (PcTПР, PcTLR) варьируют от 1180 до 2688 п.н., а длина кодируемых ими полипептидов – от 360 до 896 аминокислот.

Предсказанные TIR-домены включают от 137 до 191 аминокислот (таблица 41). Сходство между выявленными последовательностями ТПР составляет от 22 до 31% (в среднем 27%). Предсказанные полипептиды были обозначены как PcТПР 1–11. По структуре все PcТПР можно отнести к трём группам. Варианты предсказанной доменной структуры ТПР *P. corneus* представлены на рисунке 104. Помимо ТПР с каноничной структурой, предсказаны варианты молекул, кодирующие LRR-домены, либо TIR-домен (рисунок 104Б).

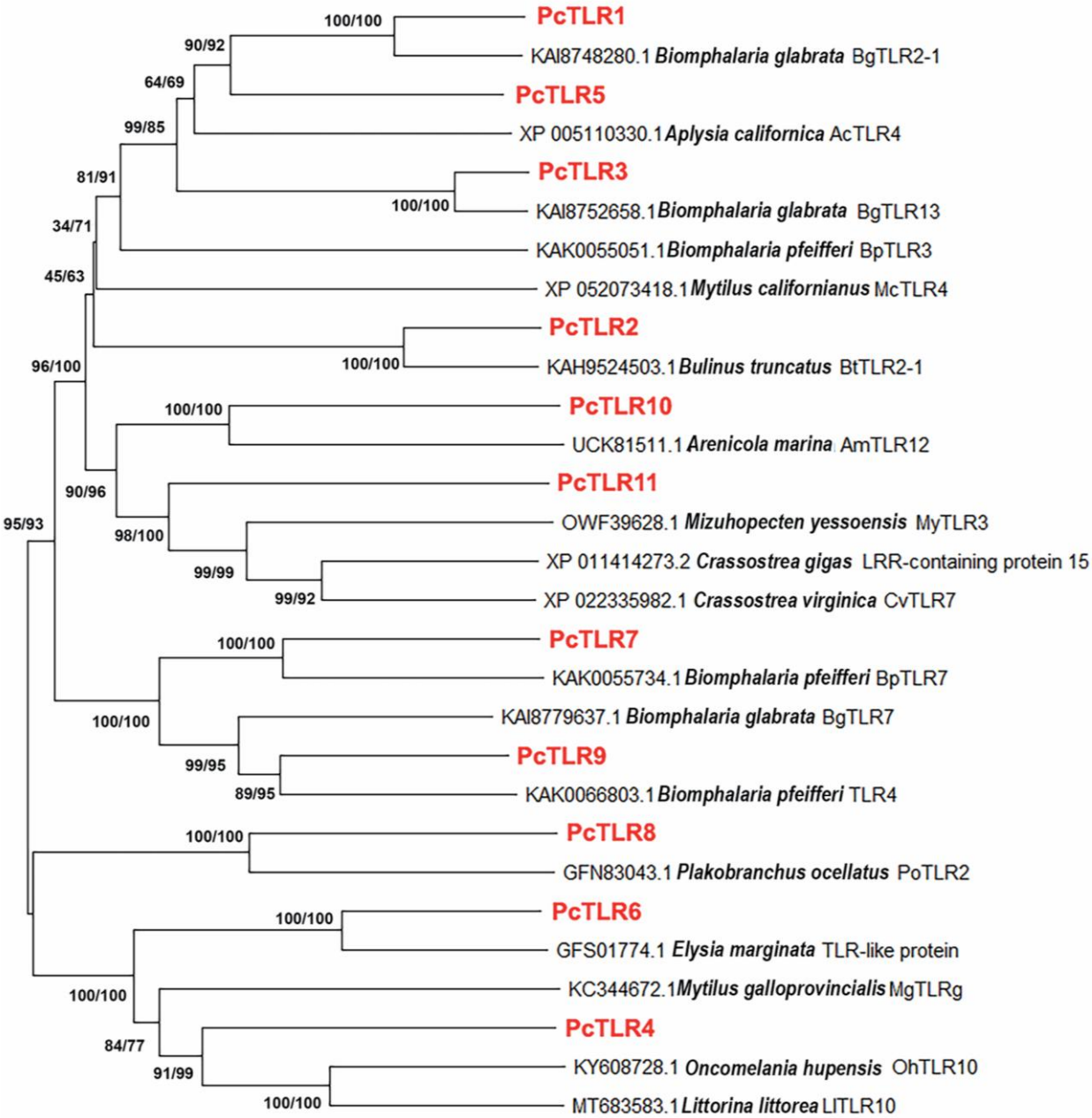


Рисунок 105. Филогенетическая реконструкция; выполненная с использованием аминокислотных последовательностей TIR-доменов толл-подобных рецепторов моллюсков *Planornarius corneus* (PcTLR). Обозначены бутстрепные поддержки для 1000 реплик для NJ/ML. Обозначены номера последовательностей в GenBank (приложение 17) (по: Бобровская, Орлов, Прохорова, 2024).

С использованием предсказанных аминокислотных последовательностей TIR-доменов роговой катушки была выполнена филогенетическая реконструкция (рисунок 105). Большинство последовательностей PcTПР формируют единые клады с последовательностями TIR-доменов других лёгочных моллюсков – *Biomphalaria glabrata*, *B. pfeifferi*, *Bulinus truncatus* и *Aplysia californica*. Идентичность аминокислотных последовательностей TIR-доменов моллюска *Planorbarius corneus* по отношению к TIR-доменам пульмонат других видов составляет от 49.27 до 70.03%. Часть последовательностей PcTПР оказалась ближе к ТПР прозобранхий, двустворчатых моллюсков и полихет. Идентичность последовательностей ТПР роговой катушки с последовательностями образцов из этих групп варьирует от 30.22 до 45.22%.

Таблица 41. Характеристика транскриптов толл-подобных рецепторов моллюсков *Planorbarius corneus*

Номер в Trinity	Тип TLR	Длина TIR-домена (амк)	Гомология по данным BlastP	Длина TIR-домена (амк)	% сходства TIR-домена
123979	PcTLR1	157	*Biomphalaria glabrata* (TLR2)	157	76.03
31321	PcTLR2	191	*Bulinus truncatus* (TLR2)	194	74.74
231876	PcTLR3	160	*Biomphalaria glabrata* (TLR13)	160	71.25
4720	PcTLR5	157	*Aplysia californica* (TLR4)	142	45.22
168161	PcTLR6	137	*Elysia marginata* (TLR-подобный белок)	134	56
611	PcTLR7	153	*Biomphalaria pfeifferi* (TLR7)	152	49.77
40385	PcTLR8	137	*Plakobranchus ocellatus* (TLR2)	147	46
45105	PcTLR9	153	*Biomphalaria pfeifferi* (TLR4)	153	49.27
46334	PcTLR4	151	*Oncomelania hupensis* (TLR10)	161	36.17
5341	PcTLR10	171	*Arenicola marina* (TLR12)	155	32.21
85615	PcTLR11	174	*Mizuhopecten yessoensis* (TLR3)	170	30.92
			Crassostrea virginica (TLR7)	174	30.27
			Crassostrea gigas (TLR15)	165	30.22

Рецепторы распознавания нуклеотидов. По данным транскриптома гемоцитов *Planorbarius corneus* предсказано 3 варианта молекул, которые могут участвовать в распознавании лигандов–нуклеиновых кислот (рисунок 106).

Два варианта предсказанных молекул имеют схожую структуру и могут быть отнесены к группе RIG-I-подобных рецепторов, которые специализируются на распознавании вирусов

(Zheng et al., 2023). В их составе присутствуют два типа доменов хеликаз – HELICc и DEXDc. Хеликазы меняют конформацию ДНК и РНК, разрывая водородные связи между нуклеотидами с использованием АТФ. Специфические хеликазы DEXDc распознают и плавят только вирусные РНК (Caruthers, McKay, 2002).

Второй характерный для этой группы рецепторов элемент – домен регуляции апоптоза (death domain, домен смерти, DD). Содержащие его белки участвует в запуске апоптоза и воспаления посредством активации каспаз и транскрипционного фактора NF-κB (Wajant, 2003). Также этот домен участвует в передаче сигналов через адаптерный белок MyD88, который является основным для ТПР (O'Neill et al., 2003).

Один из вариантов предсказанного рецептора (рисунок 91, 3) включает домен связывания ДНК, обозначаемый как HOLI (ligand binding domain of hormone receptors, лиганд-связывающий домен рецепторов гормонов). Этот домен входит в состав ядерных рецепторов, опосредующих регуляцию транскрипции (Xie et al., 2014). Домены HOLI взаимодействуют с широким спектром лигандов, включая цитокины и гормоны (Robinson-Rechavi et al., 2003; Tsuji, 2014). Второй домен ZnF_C4 (C4-type zinc finger modules, цинковые пальцы типа C4) также участвует в связывании ДНК и регуляции транскрипции (Claessens, Gewirth, 2004).

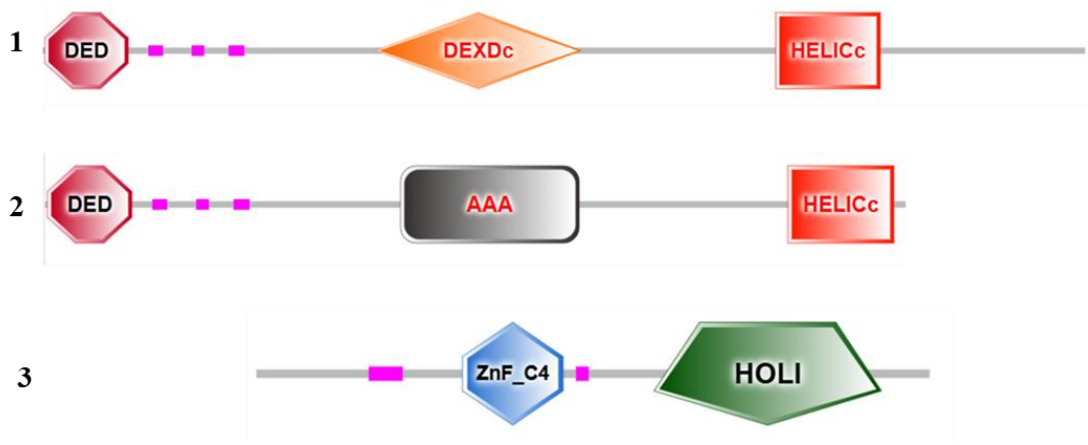


Рисунок 106. Варианты предсказанной доменной структуры рецепторов распознавания нуклеиновых кислот гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus*. 1, 2 – RIG-I-подобные рецепторы, 3 – рецептор, содержащий домены связывания ДНК (HOLI) и домен цинковых пальцев (ZnF_C4). Условные обозначения: см. рисунок 100.

Молекулы адгезии. Многие из лектинов проявляют свойства молекул адгезии, участвуя в процессах клеточной миграции, фагоцитоза и инкапсуляции. Однако отдельно нами были выделены транскрипты, кодирующие классические варианты специализированных молекул адгезии. К ним принято относить интегрины, селектины, а также другие молекулы семейства клеточной адгезии (cell adhesion molecules, CAM, МКА).

Предсказанные варианты интегринов (рисунок 107, 1–5), селектинов (рисунок 107–6, 7), МКА (рисунок 107–8, 9, 10, 11) разнообразны по структуре, но во всех случаях содержат стандартный набор доменов, характерный для молекул этих групп (Chothia, Jones, 1997).

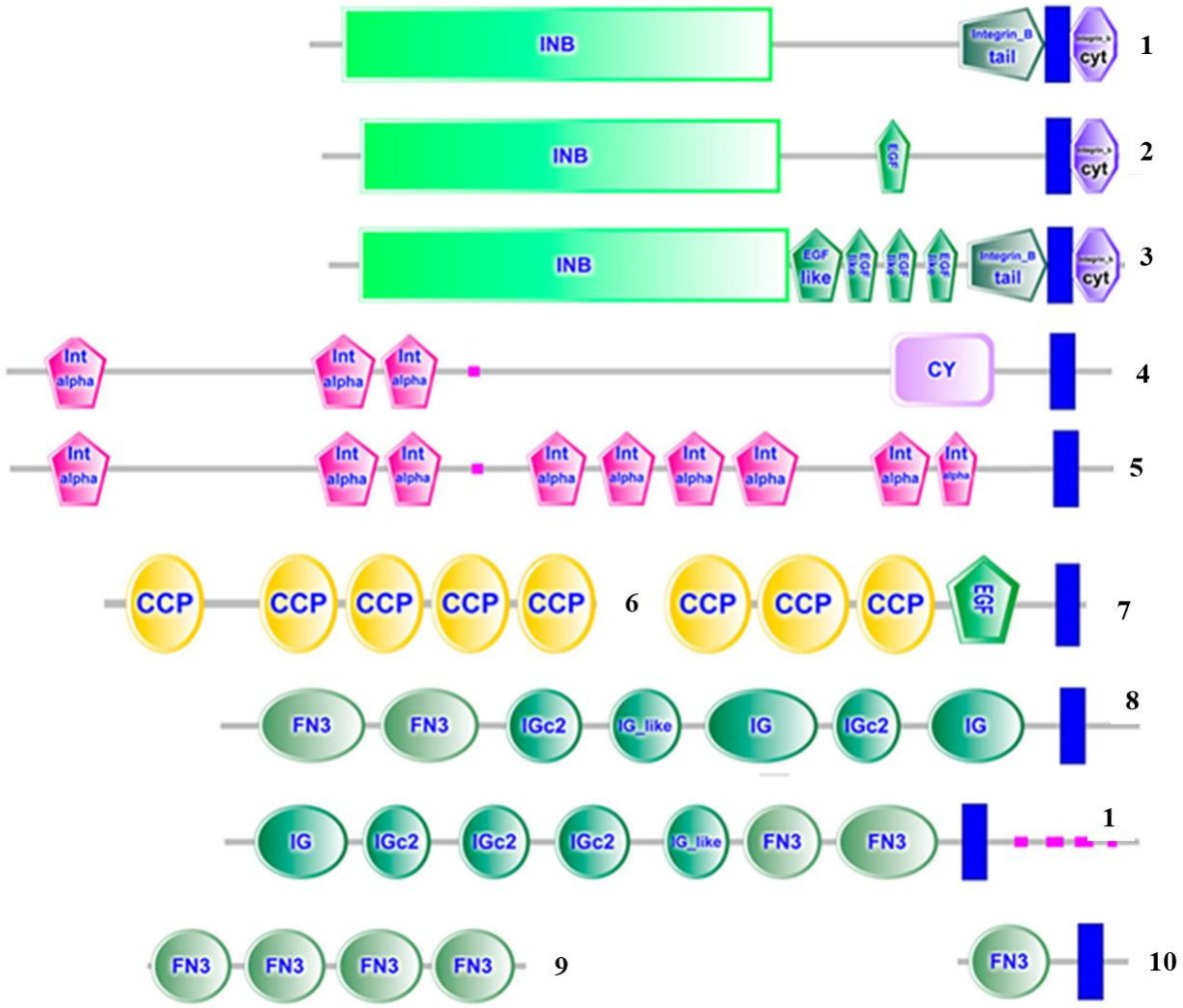


Рисунок 107. Варианты предсказанной доменной структуры молекул адгезии гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus.* Условные обозначения: горизонтальные красные полоски – сигнальный пептид; горизонтальные розовые – область низкой сложности; вертикальные синие полоски – трансмембранная область; 1–3 – β-интегрины; 4–5 – α-интегрины; 6–7 – селектины; 8–11 – молекулы семейства CAM (cell adhesiom molecues); INB – субъединицы β-интегрина; IntegrinBcyt – цитоплазматический домен β-интегрина; CY – цистатиноподобный домен; Int alpha – домен α-интегрина; FN3 – домен фибронектина типа 3; CCP – домен контроля комплемента.

Обсуждение к разделу III.3.1

ПРР относительно недавно были выделены в отдельную функциональную группу рецепторов. До формирования концепции ПАМП было общепризнано, что распознавание в системе врождённого иммунитета происходит исключительно неспецифически. Открытие различных вариантов ПРР, различающихся по набору распознаваемых лигандов, привело к

существенному пересмотру теории врождённого иммунитета (Janeway, Medzhitov, 2002). Было установлено, что ПРР клеток врождённого иммунитета позвоночных обладают избирательностью по отношению к различным лигандам. Кроме того, выяснилось, что распознавание патогена клетками врождённого иммунитета обеспечивает не только запуск реакций врождённого иммунитета, но и включение адаптивного иммунного ответа (Kumar et al., 2011).

Первый ПРР с подтверждённой функцией распознавания патогенов – ТПР4 млекопитающих – оказался продуктом гена, гомологичного гену *Toll* дрозофилы. У мух этот ген регулирует ранний эмбриогенез и устойчивость к грибковым инфекциям (Hashimoto et al., 1988; Lemaitre et al., 1996; Medzhitov et al., 1997). Открытие ТПР4 стимулировало активные исследования ПРР не только у млекопитающих, но и у представителей других таксономических групп, включая беспозвоночных. В настоящее время благодаря развитию технологий высокопроизводительного секвенирования и протеомного анализа ПРР выявлены в большинстве групп многоклеточных (Zhang et al., 2010).

Основным критерием для включения рецептора в группу ПРР является способность к активации клеток иммунитета после взаимодействия с лигандом (Kumar, et al., 2011). Поэтому ПРР представляют собой разнородную группу белков разной структуры и лигандной специфичности (рисунок 2). Среди ПРР есть как связанные с мембранами, так и растворимые молекулы. В настоящее время к ПРР относят: ТПР, лектины, антибактериальные белки, компоненты комплемента, СР, рецепторы распознавания нуклеиновых кислот (NOD-подробные рецепторы и RIG-подобные рецепторы) (Kumar et al., 2011; Лебедев, Понякина, 2017).

По данным анализа геномов и транскриптомов у моллюсков предсказаны рецепторы основных групп ПРР (Wang et al., 2018a; Атаев и др., 2024). Для некоторых ТПР, СР, компонентов комплемента, лектинов моллюсков подтверждена роль в запуске иммунного ответа (Wang et al., 2018a). На основе структурных особенностей доменов распознавания углеводов (carbohydrate recognition domain, CRD), а также функциональных характеристик выделяют несколько семейств лектинов (Кокряков, 2006). У моллюсков описаны представители семи групп лектинов: С-лектины, Р-лектины, F-лектины, I-лектины, галектины, фиколины и хитиназоподобные лектины (Wang et al., 2018b). Внутри каждой из групп выявлено большое разнообразие вариантов, содержащих разное количество CRD, которые также могут комбинироваться с другими иммунорелевантными доменами.

В транскриптоме гемоцитов *Planorbarius corneu*s выявлены транскрипты, кодирующие ПРР всех основных групп. Вместе с тем установлено, что доменный состав ряда предсказанных ПРР уникален и ранее не описывался у других животных. В то же время, некоторые из ТПР,

выявленные ранее у других лёгочных моллюсков, не закодированы в транскриптоме гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneu*s.

Одной из наиболее разнообразных групп ПРР моллюсков являются ***С-лектины***. Так, у роговой катушки выявлены уникальные варианты С-лектинов, содержащие домен LINK (рисунок 101–11, 12). Этот домен по структуре похож на С-лектиновый и способен связываться с остатками глюкозы, фукозы и с белковыми лигандами (Zelensky, Gready, 2005). Домен LINK содержится в так называемых лектиканах (lecticans) – молекулах группы С-лектинов, у которых также присутствуют IG-домены и домены ЭФР. Эти домены также встречаются в составе молекул адгезии – селектинов и интегринов. Лектиканы участвуют в процессах клеточной адгезии, миграции клеток и в сборке внеклеточного матрикса (Kohda et al., 1996). У роговой катушки домен LINK сочетается с С-лектиновым и, соответственно, можно предположить, что такая молекула тоже будет участвовать в распознавании углеводов и связанной с этим процессом клеточной адгезии.

Предсказанный в одном из С-лектинов домен CUB (рисунок рисунок 102–7) встречается в составе С-лектинов позвоночных животных, называемых аттрактинами (attractin). Молекулы этой группы экспрессируются гемопоэтическим клетками (Duke-Cohan et al., 1998). Точная функция аттрактинов остаётся невыясненной. Однако наличие в их структуре доменов ЭФР и интегриноподобных мотивов позволяет предположить, что их основная функция связана с участием в процессах клеточной адгезии. Ортологи генов аттрактинов, кодирующих домены CUB, ранее были описаны у нематод *Caenorhabditis elegans* (Duke-Cohan et al., 1998). Помимо лектинов домен CUB встречается в белках, регулирующих процессы фагоцитоза, гистогенеза, распознавания субстрата (Blanc et al., 2007). Вариант С-лектина, содержащего домен CUB, включает три IG-домена и один FBG-домен. Такой набор доменов встречается в составе молекул адгезии (Guerra-Espinosa et al., 2024).

Один из С-лектинов *Planorbarius corneus* содержит домены ЭФР (101A–10). Схожий набор доменов характерен для С-лектинов группы тромбомодулинов (thrombomodulin) (Weiler, Isermann, 2003). Тромбомодулины у млекопитающих экспрессируются клетками эндотелия сосудов, и помимо участия в процессах адгезии, обеспечивают сдерживание процесса свертывания крови через взаимодействие с тромбином. Тромбомодулины позвоночных наряду с С-лектиновым доменом содержат по 6 доменов ЭФР. В предсказанном лектине роговой катушки присутствует 13 доменов ЭФР.

Бóльшая часть данных о лигандной специфичности лектинов моллюсков получена на представителях группы двустворчатых моллюсков. С-лектины бивальвий проявляют высокое сродство к различным ПАМП на поверхности патогенов, таким как липополисахариды грамотрицательных бактерий, пептидогликаны грамположительных бактерий, глюкан и маннан

грибов и др. При этом С-лектины также проявляют избирательность по отношению к лигандам. Например, лектины rCRD3 и rCRD4 из бивальвии *Crassostrea farreri* могут связываться со всеми протестированными ПАМП, а лектины rCRD1 и rCRD2 – только с липополисахаридом и маннаном (Huang et al., 2017). Лектин AiCTL-9 из морского гребешка *Argopecten irradians* может связывать пептидогликаны, липополисахариды, глюкан и маннан (Wang et al., 2012).

С-лектины роговой катушки содержат разное количество CRD. У моллюсков других видов также описаны молекулы, содержащие от одного до девяти С-лектиновых доменов (Zhang et al., 2009; Wang et al., 2012; Yang et al., 2015). Исследование лигандной специфичности мультидоменных лектиновых молекул продемонстрировало, что отдельные CRD могут проявлять избирательность в отношении различных ПАМП. При этом отмечено существенное различие в аффинности связывания между доменами – одни демонстрируют высокое сродство к определённым ПАМП, другие взаимодействуют с ними слабее. Например, лектин CfLec-3 из двустворчатого моллюска *Chlamys farreri*, содержащий три CRD может связывать бóльший набор ПАМП, чем CfLec-1 и CfLec-2, содержащие по одному CRD (Zhang et al., 2009).

Избирательность по отношению к лигандам показана и для лектинов пульмонат *Biomphalaria glabrata*. Выделенные из гемолимфы биомфалярий секретируемые С-лектины преимущественно связываются с поверхностью бактерий и клеток дрожжей, но при этом не осаждаются на поверхности мирацидиев трематод (Tetreau et al., 2017). Это явление особенно примечательно, так как именно под лектины мимикрируют поверхностные гликаны трематод, обеспечивающие себе таким образом «молекулярную мимикрию» (Damian, 1989). В то же время, экспрессия всех С-лектинов моллюсков усиливается в ответ на стимуляцию бактериями (Wang et al., 2011a; Li et al., 2015; Jia et al., 2016). С-лектины, выделенные из плазмы гемолимфы двустворчатых моллюсков *Ruditapes philippinarum*, *Crasostrea farreri*, *C. gigas* и *Glycymeris yessoensis,* подавляют рост бактерий нескольких видов (Yang et al., 2010, 2011; Jia et al., 2016; Mizgina et al., 2024).

Таким образом, имеющиеся данные подтверждают не только разнообразие состава С-лектинов лёгочных моллюсков, но и свидетельствуют о разнообразии их функций. Помимо распознавания чужеродного, С-лектины гемоцитов моллюсков участвуют в процессах клеточной адгезии, фагоцитозе, регуляции инкапсуляции и проявляют бактерицидное действие. Классификация С-лектинов моллюсков затруднена разнообразием входящих в их состав доменов. Имеющиеся филогенетические исследования эволюции С-лектинов учитывают только изменения в структуре С-домена (Zelensky, Gready, 2005).

Другая группа лектинов моллюсков – ***галектины***, не демонстрирует такого структурного разнообразия как С-лектины. У всех изученных моллюсков, включая роговую катушку, они содержат от одного до четырёх β-галактозидан-связывающих доменов (Tasumi,

Vasta 2007; Wang et al., 2011b; Zhang et al., 2011). Также встречаются мембранная и растворимая формы (Kim et al., 2008, Прохорова и др., 2024). Установлено, что галектины двустворчатых и брюхоногих моллюсков произошли от одной предковой молекулы (Zhang et al., 2011).

Способность галектинов моллюсков связываться с патогенами различной природы подтверждена экспериментально. Галектины гемолимфы лёгочного моллюска *Biomphalaria glabrata* взаимодействуют с поверхностью спороцист *Schistosoma mansoni* (Yoshino et al., 2008). Галекин CvGal из двустворчатого моллюска *Crassostrea virginica* является основным ПРР для распознавания бактерий, одноклеточных водорослей и трофозоитов паразитических протистов *Perkinsus olseni* (Tasumi, Vasta, 2007; Kim et al., 2008). Также показано участие галектинов моллюсков в распознавании гликанов на поверхностях вирусов (Vasta et al., 2015).

Галектины проявляют большой спектр функциональных активностей. Помимо распознавания ПАМП, они участвуют в регуляции миграции клеток, процессах клеточной адгезии, активации фагоцитоза и иммунного ответа в целом (Hernandez, Baum, 2002; Vasta, Ahmed, 2008; Yoshino et al., 2008).

Лектины F-типа (фуколектины) пульмонат также характеризуются значительной структурной вариабельностью. У *Planorbarius corneus* выявлены варианты фуколектинов с разным количеством доменов, в том числе с чередованием фукозо-связывающих и С-лектиновых доменов. Кроме того, предсказан вариант молекулы с липид-связывающим доменом ML (рисунок 100Б–7). Для моллюсков других видов также описано по несколько вариантов фуколектинов с разным количеством (от 1 до 5) одинаковых тандемно повторяющихся фукозо-связывающих доменов (Gerdol et al., 2018; Бобровская, 2025).

Анализ разнообразия фуколектинов у устриц *Crassostrea gigas* показал, что их варианты могут формироваться в результате альтернативного сплайсинга транскриптов единственного гена (Springer et al., 2008). Для фуколектинов, участвующих у устриц в распознавании гамет – биндинов – показано формирование сотен различных вариантов последовательностей, кодирующих их транскриптов (Moy, Vacquier, 2008; Moy et al., 2008). У двустворчатых моллюсков доказана роль F-лектинов в распознавании гемоцитами бактерий и активации фагоцитоза (Odom, Vasta, 2006; Wang et al., 2011a). Установлено, что у жемчужницы *Pinctada martensi* иммунизация *Vibrio alginolyticus* приводит к повышению экспрессии F-лектинов в гемоцитах в 13 раз (Chen et al., 2011).

Одна из наиболее хорошо изученных групп лектинов лёгочных моллюсков – ***фибриногенподобные белки*** (ФБ). Первые ФБ были описаны у моллюска *Biomphalaria glabrata* (Adema et al., 1997). ФБ биомфалярий помимо FBG-доменов, содержат в своём составе IG-домены (рисунок 108). FBG-домен является консервативной частью молекул ФБ. Идентичность нуклеотидных последовательностей FBG-доменов ФБ, относящихся к разным группам,

составляет не менее 72% (Dheilly et al., 2015). И наоборот, IG-домены ФБ крайне вариабельны. В настоящее время на основании структуры доменов выделяют не менее 14 подсемейств ФБ моллюсков *B. glabrata* (Loker et al., 2004; Gordy et al., 2015; Galinier et al., 2017).

Гены ФБ биомфалярий кластеризованы и расположены близко от других ФБ-подобных последовательностей (Zhang et al., 2001; Gordy et al., 2015; Lu et al., 2020). Предполагается, что такая структура генетического кластера, кодирующего ФБ, сформировалась в результате многократных дупликаций. Между экзонами, кодирующими FBG-домен и IG-домены располагаются промежуточные участки (ICR, interceding region), обуславливающие возможность альтернативного сплайсинга (рисунок 108А). мРНК, кодирующая ФБ, может содержать 4 или 6 экзонов (Doolittle, 1992; Kurosava, Hashimoto, 1996; Adema et al., 1997) (рисунок 108).

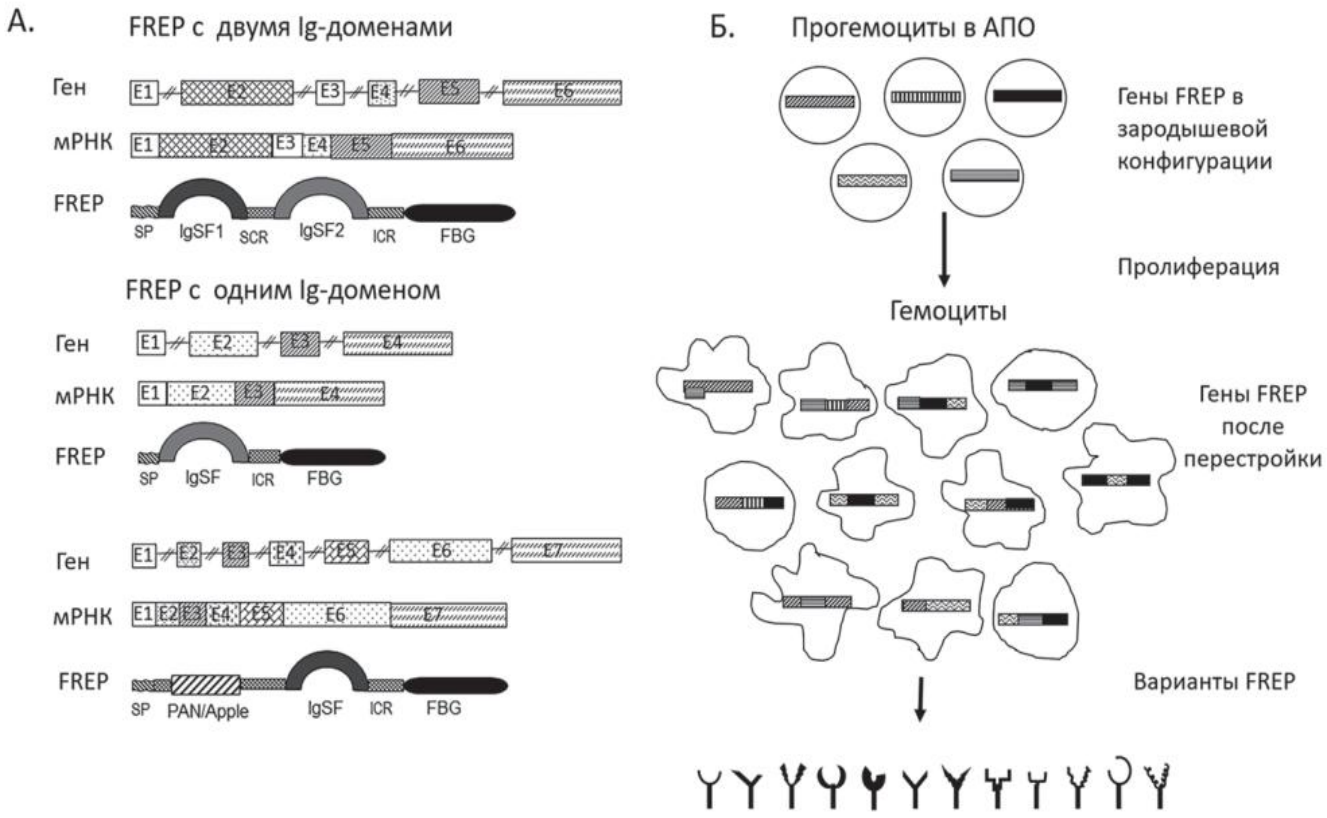


Рисунок 108. Организация генов, доменная организация и механизмы формирования разнообразия фибриногенподобных белков у моллюсков рода *Biomphalaria*. А – организация геномных локусов и доменная структура ФБ; Б – схема формирования разнообразия ФБ в онтогенезе моллюска. Для каждого ФБ показан один из возможных вариантов мРНК (пояснения в тексте). Условные обозначения: FREP – фибриногенподобные белки; E1–E6 – экзоны; SP – сигнальный белок; IgSF – домен иммуноглобулинового суперсемейства; FBG – фибриногеновый домен; ICR – промежуточный участок; PAN/Apple – PAN/Apple-подобный домен (Прохорова, Атаев, 2021).

Гены некоторых ФБ биомфалярий представлены несколькими аллельными вариантами. Показана зависимость степени восприимчивости моллюсков конкретных популяций (линий) к заражению трематодами от присутствия у них определённых комбинаций аллелей генов, кодирующих ФБ (Pila et al., 2017; Allan et al., 2019; Li et al., 2020). В частности, восприимчивость или резистентность *Biomphalaria glabrata* к трематодам *Schistosoma mansoni* зависит от набора аллелей генов, кодирующих ФБ2, ФБР3.1 и ФБ3.2 (Lu et al., 2020).

Существуют многочисленные доказательства того, что именно ФБ могут определять совместимость в паразито-хозяинной системе «трематоды-моллюски». Трематоды экспрессируют на своей поверхности разнообразные гликопротеины, набор которых меняется при превращении мирацидиев в спороцисты (Yoshino, Bayne, 1983; Yoshino et al., 1993; Mone et al., 2010). Разнообразие этих поверхностных (и секретируемых) молекул у *S. mansoni* отражено в их названии – «полиморфные муцины» (PoMucs, polymorphic mucins) (Mone et al., 2010). Считается, что именно полиморфные муцины во многом определяют совместимость или несовместимость трематоды с хозяином: только паразит, имеющий муцины, совместимые с иммунной системой хозяина, может успешно развиваться и размножаться в моллюске (Mitta et al., 2017).

При этом под совместимостью подразумевается неспособность гемоцитов моллюска распознать муцины, что и определяет отсутствие иммунного ответа (рисунок 108). Изменение репертуара муцинов, их мимикрия под собственные антигены моллюска, а также способность блокировать защитные факторы иммунной системы – необходимые условия успешной инвазии (см. Прохорова, Атаев, 2021). Со стороны моллюска такими молекулами, обеспечивающими взаимодействие с разнообразными антигенами паразита, являются ФБ. В комплексе с другими гуморальными факторами иммунной системы (например, тиоэфирсодержащими белками) последние участвуют в формировании резистентного или чувствительного к трематодной инвазии фенотипа (рисунок 109).

ФБ биомфалярий проявляют избирательность в отношении различных патогенов. С использованием специфических антител доказано, что разные варианты ФБ *Biomphalaria glabrata* связываются лигандами на поверхности трематод *Schistosoma mansoni*, *Echinostoma paraensei*, также дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Zhang et al., 2008; Moné et al., 2010).

Интересно, что даже в пределах рода *Biomphalaria* наблюдаются существенные различия в экспрессии ФБ между видами. У *B. pfeifferi* выявлено только 12 полноразмерных гомологов ФБ *B. glabrata* (Buddenborg et al., 2017). Заражение *B. pfeifferi* мирацидиями *Schistosoma mansoni* приводит к повышению экспрессии ФБ2, ФБ7 и ФБ 5. При этом уровень экспрессии ФБ3 практически не изменяется. У *Biomphalaria glabrata,* наоборот, заражение шистосомой

приводит к повышению экспрессии ФБ3 и снижению экспрессии ФБ5 (Buddenborg et al., 2017).

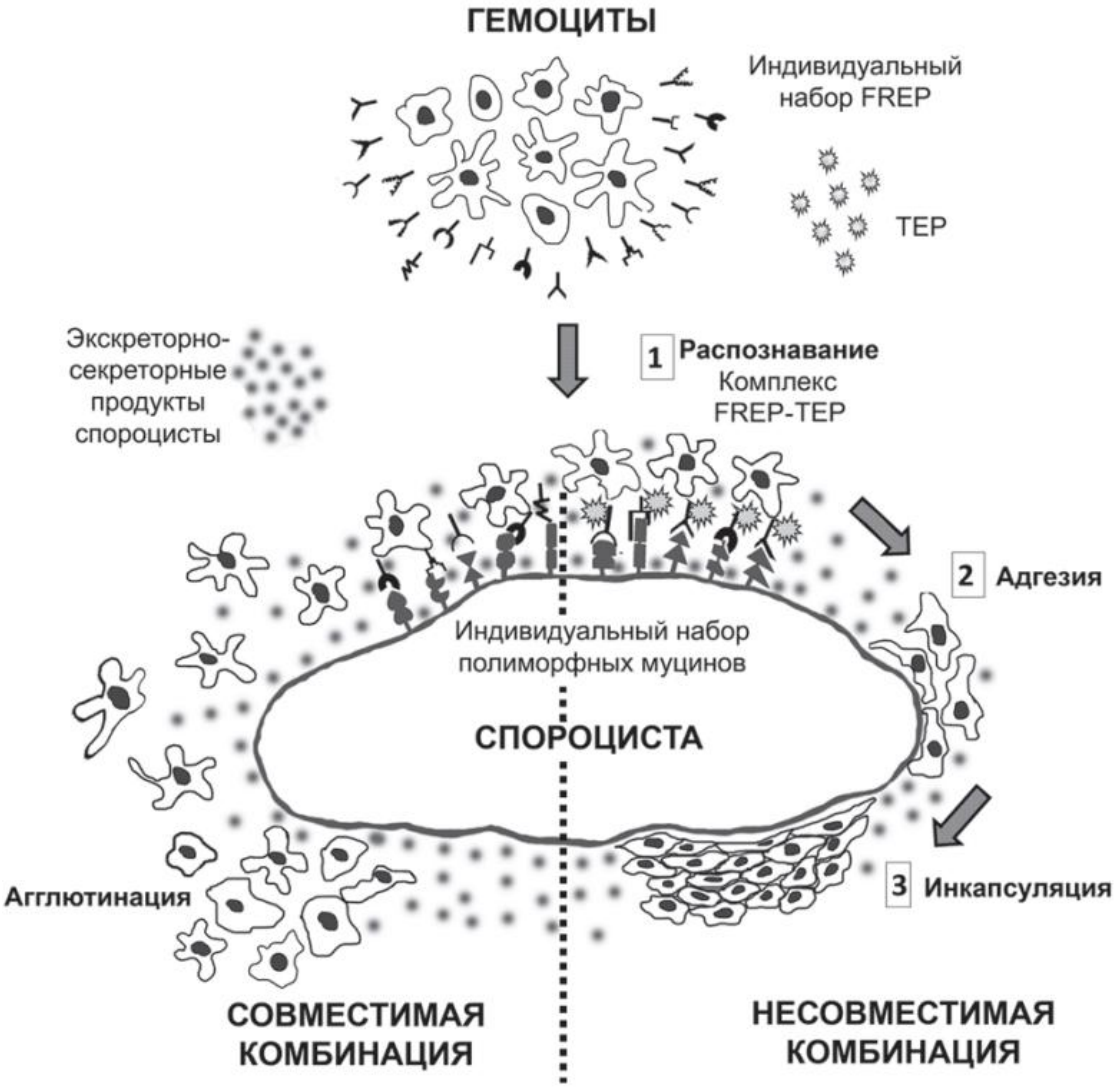


Рисунок 109. Схема участия фибриногенподобных белков в иммунных реакциях гастропод на трематодную инвазию. Распознавание патогена основано на взаимодействии комплексов молекул моллюска с совместимыми полиморфными муцинами паразита. Совместимая комбинация паразита и хозяина формируется в том случае, когда ФБ моллюска не способны взаимодействовать с полиморфными муцинами паразита. В таком случае гемоциты, привлеченные экскреторно-секреторными продуктами спороцист, скапливаются в месте инвазии (агглютинация), но не происходит их адгезии на поверхности спороцисты. В несовместимой комбинации ФБ моллюска подходят к полиморфным муцинам паразита как ключ к замку. Комплекс FREP–TEP (ФБ–ТСБ) облегчает адгезию гемоцитов на поверхности спороцисты, что приводит к ее инкапсуляции. Условные обозначения: FREP – фибриногенподобные белки; TEP – тиоэфирсодержащие белки (по: Прохорова, Атаев, 2021).

Было установлено, что фенотипическое разнообразие ФБ у биомфалярий превосходит количество заложенных в геноме вариантов (рисунок 108Б). У отдельных особей *B. glabrata* выявляется от 36 до 45 различных вариантов мРНК, кодирующих ФБ3 (Zhang et al., 2004), которые соответствуют 31 и 36 вариантам аминокислотных последовательностей. Набор ФБ

также меняется по мере роста моллюска и после заражения трематодами разных видов (Hanington et al., 2010a, 2010b, 2012; Gordy et al., 2015). Возможность соматической диверсификации (существования нескольких вариантов продуктов одного гена) была показана для ФБ, ФБ3, ФБ4 и ФБ12 *B. glabrata* (Zhang et al., 2004; Moné et al., 2010; Hanington et al., 2010b; Dheilly et al., 2015).

В качестве наиболее вероятного механизма формирования разнообразия ФБ рассматривается альтернативный сплайсинг. Это подтверждается результатами анализа структуры разных вариантов транскриптов одного и того же ФБ (Galinier et al., 2017). Однако само явление альтернативного сплайсинга для гастропод изучено слабо и показано только для нескольких генов, экспрессирующихся в клетках нервной системы (Price, Greenberg, 1994; Santama et al., 1996).

Предполагается, что в генах, кодирующих ФБ, могут возникать случайные соматические мутации. Это может происходить во время пролиферации клеток в гемопоэтических структурах (рисунок 108Б). В результате часть гемоцитов содержат гены ФБ не в зародышевой конфигурации, а включают уникальные последовательности (Hanington et al., 2010a, 2010b). Так как в онтогенезе улитки происходит обновление пула гемоцитов, то и набор ФБ, экспрессируемых в этих клетках, также меняется (рисунок 109Б). У *B. glabrata* транскрипты, полученные из пулов, включающих 20–40 гемоцитов, содержат различные наборы модифицированных последовательностей ФБ (Hanington et al., 2010a, 2010b). Стимуляция патогеном усиливает гемопоэз у *B. glabrata*, в результате чего усиливается процесс мутагенеза и разнообразие ФБ (Hanington et al., 2012; Adema, Loker, 2015).

Другой обсуждаемый механизм формирования разнообразного репертуара ФБ – ретротранспозиция. Наличие обратных последовательностей показано для ФБ12 (Zhang, Loker, 2004). Также у *B. glabrata* выявлены мобильные генетические элементы, подобные LINE1, которые фланкированы короткими повторами и содержат открытые рамки считывания (Raghavan et al., 2007).

Феномен соматической диверсификации стал основной для проведения аналогий между ФБ и антигенраспознающими молекулами адаптивного иммунитета позвоночных. Однако для того, чтобы рассматривать полиморфные ФБ в качестве универсальных ПРР лёгочных моллюсков, необходимо выяснить, есть ли они у моллюсков других видов.

В транскриптоме *Planorbarius corneus* не было выявлено транскриптов ФБ, содержащих IG-домены. При этом найдено более 150 вариантов транскриптов, кодирующих FBG-домены (таблица 33). В предсказанных последовательностях он сочетается с другими доменами (рисунок 100А). То есть ФБ в транскриптоме роговой катушки закодированы, но их структура отличается от таковой у биомфалярий.

Можно предположить, что такой результат связан тем, что транскрипты, кодирующие ФБ, присутствуют в гемоцитах *P. corneus* в очень малых количествах. Также можно предположить, что ФБ не участвуют в распознавании трематод *Bilharziella polonica* или экспрессируются в клетках других тканей. Установлено, что у *Biomphalaria glabrata* ФБ может экспрессироваться не только в гемоцитах, но и клетках гепатопанкреаса. Особенности изменения экспрессии генов ФБ также зависят от индивидуальных особенностей моллюска и вида паразита, которым он заражён (Zhang et al., 2008; Peterson et al., 2009; Mone et al., 2010).

Среди ФБ *Planorbarius corneus* предсказан вариант ФБ, содержащего PAN/Apple-подобный домен (рисунок 100А–4). Такие домены присутствуют в некоторых ФБ биомфалярий (Adema et al., 2017). PAN/Apple-подобные домены содержатся в белках организмов различных таксонов от бактерий до млекопитающих. Они опосредуют белок-белковые или белок-углеводные взаимодействия и участвуют в прикреплении молекул к клеточной поверхности (Gong et al., 2012). Предполагается, что у моллюсков молекулы с PAN/Apple-подобными доменами выполняют сходную функцию (Adema et al., 2017).

В ФБ гемоцитов *P. corneus* всегда присутствует единственный FBG-домен, который в большинстве случаев ассоциирован с лектиновыми доменами, доменами ЭФР или интегриновым доменом. Закодированный в одном из транскриптов ФБ домен SCAN (рисунок 100А–7) опосредует гомотипические и гетеротипические взаимодействия между белками (Schumacher et al., 2000). Такая структура также свидетельствует об участии ФБ в распознавании углеводных ПАМП и процессах адгезии.

В транскриптоме моллюсков *Succinea putris* также не было выявлено ФБ с IG-доменами (Bobrovskaya et al., 2026). Среди других пульмонат такие ФБ встречаются, но не так разнообразны, как у биомфалярий. У моллюсков *Lymnaea stagnalis*, найдено только два варианта ФБ (Seppälä et al., 2021). Установлено, что у прудовиков экспрессия ФБ повышается в ответ иммунизацию бактериями *Micrococcus lysodeikticus*, в то время как другие грамположительные и грамотрицательные бактерии, дрожжи, экстракты тканей заражённых моллюсков анестезия и голодание не влияют на экспрессию выявленных генов ФБ у прудовиков (Seppälä et al., 2021).

У пресноводного моллюска *Helisoma trivolvis* найден один белок, гомологичный ФБ3 биомфалярии (Zhang, Loker, 2004). Также гены, кодирующие ФБ, были выявлены у глубоководных гастропод *Gigantopelta aegis* (18 генов) и *Chrysomallon squamiferum* (14 генов), обитающих в термальных источниках. Интересно, что наиболее интенсивная экспрессия генов ФБ у этих улиток выявлена в барьерных структурах – ктенидиях и мантии (Lan et al., 2021). В геноме моллюска *Physella acuta* обнаружено четыре гена ФБ, которые по данным транскриптомного анализа не проявляют признаков соматической диверсификации. Заражение

физеллы трематодами *Echinostoma paraensei* и бактериями не приводит к усилению экспрессии генов ФБ. (Schultz et al., 2018, 2020).

ФБ описаны и у моллюсков других групп. Так геноме заднежаберного моллюска *Littorina littorea* выявлено пять генов ФБ (Gorbushin, Borisova, 2015), у переднежаберного моллюска *Aplysia californica* – два гена ФБ (Gorbushin, Iakovleva, 2010). Также гены ФБ найдены у двустворчатых моллюсков *Argopecten irradians*, *Xenostrobus securis Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* (Romero et al., 2011b, 2019; Yang et al., 2014; Tanguy et al., 2018; Saco et al., 2020). В геноме тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* было выявлено 193 гена ФБ, в которых закодированы многочисленные перекрывающиеся FBG-домены. Наиболее активная экспрессия ФБ у них наблюдается в жабрах, пищеварительных железах и гемоцитах (Huang et al., 2015).

Таким образом, ФБ распространены среди моллюсков. Но такого разнообразия как у *Biomphalaria glabrata*, не найдено ни у одного из изученных в этом отношении других видов моллюсков. Возможно, это связано с тем, что исследований геномов, протеомов и транскриптомов моллюсков других видов в сотни раз меньше, чем работ, посвящённых *B. glabrata.*

В то же время, помимо ФБ, другие лектины пульмонат также содержат домены ***иммуноглобулинового суперсемейства.*** У моллюска *Planorbarius corneus* было были выявлены транскрипты с разным количеством и сочетанием IG-доменов. Среди них есть транскрипты, кодирующие одновременно домен С-лектина и IG-домен (рисунок 102–4, 8, 9). Такие белки моллюсков относят к семейству лектинов CREP (C-type lectin-related protein). Установлено, что у биомфалярий IG-домены CREP гомологичны IG-доменам ФБ. У моллюсков эта группа белков и наряду с ФБ рассматривается в качестве возможного аналога иммуноглобулинов позвоночных животных (Dheilly et al., 2015). Однако специальных исследований их разнообразия не проводилось.

Несмотря на то, что наличие специфических иммуноглобулинов является признаком системы адаптивного иммунитета, само по себе присутствие IG-доменов в ПАМП ещё не свидетельствует о специфичности распознавания чужеродного. Критерием для включения молекулы в иммуноглобулиновое суперсемейство является наличие определённой аминокислотной последовательности, которая обуславливает формирование типичной для иммуноглобулинов β-складчатой структуры доменов. Известно, что молекулы иммуноглобулинового суперсемейства широко распространены у животных, начиная с губок (Oreste et al., 2021). Они экспрессируются клетками многих типов и участвуют в разных вариантах межклеточных взаимодействий: в процессах адгезии, тканевом распознавании, презентации антигенов и др. (Natarajan et al., 2015). Поэтому этим молекулам уделяется особое

внимание в поисках филогенетических предшественников системы адаптивного иммунитета позвоночных животных.

Скавенджер-рецепторы (СР) участвуют в поглощении собственных повреждённых клеток и продуктов их распада, а также различных патогенов (Berwin et al., 2003; Liu et al., 2011). СР позвоночных животных очень разнообразны по структуре, что затрудняет их классификацию. По набору доменов выделяют не менее 10 классов СР позвоночных (Murphy et al., 2005; PrabhuDas et al., 2017).

Выявленные СР моллюска *P. corneus* представлены четырьмя вариантами (рисунок 103) и только один из них имеет набор доменов, схожий со СР класса I млекопитающих (рисунок 103–4). Остальные содержат набор доменов, не описанный ранее. В одном из предсказанных СР роговой катушки закодировано 10 SR-доменов, богатых цистеинами и домен, гомологичный белкам промежуточных филаментов (рисунок 103–1). Такая структура отдалённо напоминает СР класса А млекопитающих, в которых есть домены, гомологичные другому фибриллярному белку – коллагену (Prabhudas et al., 2014). Другие варианты СР *P. corneus*, помимо СР-доменов включают С-лектиновый домен и домены, гомологичные трипсин-подобным сериновым протеазам (рисунок 103–2, 3).

Работы по СР моллюсков немногочисленны. У морского гребешка *Chlamys farreri* найдено 4 варианта СР (Liu et al., 2011), и только один их них по набору доменов соответствует одному из каноничных СР позвоночных. У головоногого моллюска *Octopus ocellatus* также присутствуют СР, напоминающие СР класса I млекопитающих и СР не описанной ранее структуры (Wei et al., 2018). Таким образом, вероятно, как и лектины, СР моллюсков очень разнообразны по структуре.

Толл-подобные рецепторы (ТПР) моллюска *Planorbarius corneus* закодированы в 11 вариантах транскриптов (рисунок 104). Полученные результаты показывают значительное разнообразие структуры ТПР гемоцитов *P. corneus*. В частности, количество и расположение LRR-доменов различаются в разных предсказанных вариантах ППР роговой катушки. При этом описываемые варианты ТПР являются результатами поиска рецепторов с каноничной структурой. В то же время, как указано выше, было выявлено большое количество транскриптов, которые идентифицировались по аннотации как ТПР, но не содержали одного из доменов (рисунок 105Б). Выполненная на основе аминокислотных последовательностей филогенетическая реконструкция также свидетельствует о разнообразии ТПР роговой катушки.

По литературным данным, у моллюсков других видов в геномах также закодированы нетипичные варианты ТПР (Kron, 2022). Например, у двустворчатых моллюсков *Crassostrea gigas* предсказано более 80 ТПР, из которых около 10 имеют типичную доменную структуру (Kanzok et al., 2004; Zhang et al., 2013; Wang et al., 2019b). У моллюсков *Aplysia californica* из 17

вариантов ТПР четыре имеют уникальную конфигурацию доменов (Kron, 2022). Также показано возможное участие в распознавании и иммунном ответе молекул с LRR-доменами, но не содержащих TIR домен (Zhao et al., 2018; Wang et al., 2019a). В частности, у морского гребешка *Chlamys farreri* выявлено шесть вариантов таких молекул с разным количеством LRR-доменов, для которых показана способность связываться с разными ПАМП, а также установлено дифференциальное изменение экспрессии на разные иммунизацию разными ПАМП (Wang et al., 2015a; Wang et al., 2017; Wang et al., 2019a).

У двустворчатого моллюска *Patinopecten yessoensis* описаны варианты ТПР с двумя трансмембранными областями (Xing et al., 2017). У лёгочного моллюска *Succinea putris* предсказан вариант ТПР без цитоплазматической области (Бобровская, 2024; Bobrovskaya et al., 2026). Вопрос о том, возможно ли включение молекул в неканоничной структурой в группу ТПР, остаётся открытым. Возможно, такие рецепторы моллюсков будут отнесены в отдельную группу ПРР.

У позвоночных идентифицировано 28 типов ТПР, у млекопитающих – всего 13 ТПР (Roach et al., 2005; Rebl et al., 2010). Таким образом, у моллюсков в целом и у лёгочных моллюсков в частности, количество описанных вариантов ТПР превышает таковое у позвоночных животных.

Сложность обобщения данных по ТПР моллюсков обусловлена недостаточностью данных. В основе классификации ТПР позвоночных лежит их лигандная специфичность (Kumar et al., 2011), которая определяется особенностями первичной, вторичной и третичной структуры LRR-доменов. Для подтверждения способности для конкретных ТПР реагировать на определённые лиганды проводились многочисленные исследования на мутантах по генам соответствующих ТПР (Omueti et al., 2007; Jin, Lee, 2008; Botos et al., 2011).

Работы, подтверждающие определенную лигандную специфичность ТПР у моллюсков единичны и противоречивы. Так установлено, что один из ТПР *Chlamys farreri* (CfTLR) может реагировать на множественные лиганды (глюкан, пептидогликан, полирибоинозиновую кислоту, динуклеотиды и др.), что по мнению авторов свидетельствует о бóльшей универсальности ТПР моллюсков по сравнению с млекопитающими (Wang et al., 2018c). У *Crassostrea gigas* также охарактеризован ТПР (CgTLR6), который проявляет аффинность к бактериям четырёх видов, одному виду грибов, липополисахаридам и пептидогликанам. Однако, его блокировка не приводит к снижению фагоцитарной активности гемоцитов (Wang et al., 2016). Авторы предполагают, что этот рецептор опосредует запуск выработки гемоцитами гуморальных факторов. В то же время, именно среди двустворчатых моллюсков описано наибольшее разнообразие вариантов ТПР, которое может свидетельствовать о специализации их функций (Saco et al., 2023).

В силу неполноты сведений о лигандной специфичности, варианты молекул ТПР моллюсков классифицируют на основе их гомологии ТПР позвоночных животных. Однако, LRR-домены встречаются также в составе ПРР других групп (Kumar et al., 2011; Behzadi et al., 2021). ТПР моллюсков классифицируют преимущественно на основе гомологии TIR-доменов, поскольку последние представляют собой наиболее консервативную и древнюю часть этих рецепторов. По данным филогенетического анализа единый предок ТПР животных включал только трансмембранный и цитоплазматический домены. Позже к ним присоединились внеклеточные мотивы с LRR (Leulier, Lemaitre, 2008; Brennan, 2018).

Для ТПР моллюсков показано участие в активации транскрипционного фактора NF-kB через сигнальную молекулу, гомологичную фактору дифференцировки клеток миелоидного ряда позвоночных MyD88 (Collins et al., 2012; Xin et al., 2016; Chen et al., 2022). В транскриптоме бивальвий найдены многие компоненты сигнального каскада запуска гена NF-kB (Wang et al., 2011c; Gerdol et al., 2018). Ключевые молекулы этого каскада также выявлены в транскриптоме моллюсков *Planorbarius corneus* и *Succinea putris* (Бобровская и др., 2025).

Рецепторы распознавания нуклеотидов включают молекулы как минимум трёх групп, которые отвечают преимущественно за распознавание вирусов (Zheng et al., 2023). К ним относятся RIG-подобные рецепторы (РПР). РПР способны распознавать широкий спектр вирусов. Долгое время считалось, что они есть только у позвоночных животных. Однако в настоящее время соответствующие им транскрипты и гены выявлены у моллюсков нескольких модельных видов (Gerdol et al., 2018; Kron, 2022). Для устриц *Crassostrea gigas* установлено участие РПР (CgRIG-I-1) в распознавании олигонуклеотидов (Zhang et al., 2014).

В транскриптоме гемоцитов *Planorbarius corneus* закодировано три варианта РПР (рисунок 106). Однако во всех отсутствует домен CARD, который всегда есть в РПР позвоночных животных (Zheng et al., 2023), но есть хеликазоподобный домен. Схожая структура РПР была предсказана для моллюсков *Aplysia californica* и *Biomphalaria glabrata* (Kron, 2022).

Мы не нашли у роговой катушки транскриптов, соответствующих другой большой группе нуклеотид-распознающих молекул – NOD-подобных рецепторов. В то же время, были предсказаны две молекулы, домены которых могут участвовать в распознавании вирусов – молекула с ДНК-связывающим доменом HOLLI (рисунок 106–3) и молекула, содержащая домен активации апоптоза (DEAD) (рисунок 106–1). Однако возможная патогенраспознающая функция рецептора такой структуры требует экспериментального подтверждения.

Напоминающий по структуре классический вариант NOD-подобных рецепторов, содержащий LRR-домены и домен NACHT (nucleotide-binding domain), предсказан у моллюска *Aplysia californica.* Кроме того, у аплизии предсказано 3 белка с доменом NACHT, но без LRR-

доменов (Kron, 2022). По некоторым данным в распознавании вирусов у моллюсков таже участвуют ТПР (Fleury, Huve, 2012; Green et al., 2015).

Таким образом, у моллюсков отсутствуют некоторые из описанных у позвоночных вариантов ПРР к вирусам. Можно предположить, что вследствие быстрых темпов эволюции вирусов изменение ПРР к ним происходит быстрее. В связи с этим ПРР к вирусным лигандам могут быть более разнообразными и несхожими в разных группах животных.

Отдельно стоит упомянуть выявленные у роговой катушки транскрипты ***C1q-подобного белка***. У позвоночных животных именно эта молекула участвует в запуске каскада комплемента по классическому пути. Долгое время существование комплемента у беспозвоночных оставалось спорным вопросом. В настоящее время у моллюсков и насекомых выявлены две основные молекулы системы комплемента – C1q и C3 (Sun et al., 2021).

Интересно, что C1q-подобный домен закодирован у роговой катушки в 49 вариантах транскриптов. Средняя идентичность соответствующих им аминокислотных последовательностей составляет 74%. Вариабельность транскриптов, кодирующих C1q описана и для других видов. Так у двустворчатых моллюсков *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* и *Mercenaria mercenaria* описано более 150 вариантов транскриптов C1q (Gestal et al., 2010; Gerdol et al., 2015; Farhat et al., 2022). При этом наибольшее их разнообразие наблюдается в гемоцитах (Gerdol et al., 2015). Предполагается, что разнообразие генов, кодирующих C1q у моллюсков, возникло вследствие их дупликации. Дупликация является одним из механизмов, обеспечивающих диверсификацию молекул, распознающих патогены. Также высказано предположение, что C1q-подобные молекулы моллюсков способны инициировать запуск каскада комплемента без участия иммунных комплексов антиген-антитело (Wang et al., 2018a).

Функциональная роль C1q у моллюсков подтверждена протеомными исследованиями. В частности, установлено, что белок-агглютинин MkC1qDC из плазмы гемолимфы двустворчатого моллюска *Modiolus kurilensis* проявляет антибактериальные свойства против грамотрицательных и грамположительных бактерий и способен связываться с углеводными лигандами Ca2+-зависимым образом (Grinchenko et al., 2021).

У моллюсков всех групп также выявлены гомологи молекулы C3 – тиоэфирсодержащего белка, являющегося ключевой молекулой каскада комплемента (Collins et al., 2012; Pinaud et al., 2019; Wang et al. 2021). Исследование белка C3 моллюска *Crassostrea gigas* (CgC3) показало, что он расщепляется на фрагменты после стимуляции бактериями *Vibrio splendidus*. Активированный белок CgC3 участвует в формировании литического комплекса, нарушающего целостность клеточных стенок бактерий (Sun et al., 2021). Расщепление C3 у устриц осуществляется в результате запуска каскада комплемента по лектиновому пути. При этом МСЛ моллюска взаимодействуют с ПАМП патогена, затем комплекс МСЛ–ПАМП активирует

ассоциированную с МСЛ сериновую протеазу (mannose-binding lectin-associated serine protease, сериновая протеаза, ассоциированная с маннозо-связывающим лектином, MASP). Активированная MASP расщепляет C3 (Li et al., 2015; Wang et al., 2018a).

У моллюсков *Biomphalaria glabrata* идентифицировано 11 уникальных TEP (Marquez et al., 2022). Для TEP1 *B. glabrata* доказана роль в иммунном ответе против трематод рода *Schistosoma* (Portet et al., 2018; Li et al., 2020; Castillo et al., 2020). В транскриптоме *Planorbarius corneus* выявлено 24 варианта транскриптов, кодирующих ТСБ. Около половины из них являются изоформами. Из них только три совпадают с описанными ранее ТСБ моллюска *Biomphalaria glabrata* (BgTEP1, BgTEP2, BgTEP4) (Castillo et al., 2020). У моллюска *Succinea putris* найдено 27 вариантов транскриптов, кодирующих ТСБ (Бобровская, Прохорова, 2025). Из них три соответствуют ТСБ биомфалярий (BgTEP1, BgTEP2, BgTEP5).

Пусковая молекула лектинового пути комплемента – МСЛ – выявлена у всех исследованных моллюсков (Wang et al., 2018b). По структуре углевод-распознающего домена она относится к С-лектинам (см. выше). Кроме того, у моллюсков разных групп, в том числе у пульмонат выявлены MASP (Li et al., 2015). Интересно, что MASP лёгочного моллюска *Succinea putris* по своей доменной структуре отличаются от описанных ранее у других моллюсков. Помимо домена сериновой протезы, ЭФР, CUB-домена они содержат IG-домены и LDLa-домены (low-density lipoprotein receptor domain class A, домены рецептора для липопротеинов низкой плотности) (Бобровская, Прохорова, 2025). Последние участвуют в распознавании липидсодержащих лигандов, в том числе при формировании синапсов (Daly et al., 1995; Guarino et al., 2020).

Таким образом, имеющиеся данные о структуре ПРР моллюсков, свидетельствуют об их большом разнообразии, которое, вероятно, превосходит разнообразие ПРР позвоночных животных. Как упомянуто выше, присутствие у моллюсков вариантов ПРР с неканоничной структурой и несовпадение наборов ПРР у моллюсков разных групп затрудняет их классификацию. В таблице 42 представлен вариант «перекрёстной классификации» на основе структуры ПРР. В ней представлены основные ПРР моллюсков, а также отмечена их принадлежность к разным группам по набору доменов. Прежде всего, обозначены домены, для которых подтверждена роль в реакциях врождённого иммунитета.

Перекрёстная классификация белков по доменам позволяет группировать белки не только по функциям или локализации, но и по наличию общих структурных и функциональных модулей (доменов). Такой вариант классификации может быть полезен для понимания эволюционных механизмов формирования разнообразия ПРР, а также прогнозирования возможных функций белков с новыми сочетаниями доменов.

Таблица 42. Варианты их доменного состава патогенраспознающих молекул моллюсков

№	Домены (ссылки)	Группа моллюсков
	Лектины	
1.	TM | CLECT x 1 / 2/ 3 / 4 / 8 / 11	G, B, C
2.	CLECT x 1 / 2/ 3 / 4	G, B
3.	TM | EGF x 13 | CLECT	G
4.	TM | CLECT | LINK	G
5.	CLECT | Agglutinin	G
6.	CLECT | KR	G, B
7.	CLECT | LDLa x 2	G
8.	CLECT x 2 | TPK-binding	G
9.	CLECT x 4 | Apple	G, B
10.	CLECT | PAN x 1 / 2	G
11.	CLECT | Sushi x 2	B
12.	CLECT | MAM	B
13.	CLECT | CUB	B
14.	TM | CLECT | CUB	B
15.	CLECT | Astacin | CUB	B
16.	CLECT | Ldl | CUB x 3 | Sushi x 4 | EGF x 4	B
17.	CLECT | CCP	G
18.	CLECT | CUB | KR | CCP x 2 | ShKT	G
19.	GLECT | F 5/8 | CLECT	B
20.	GLECT x 1 / 2 / 3 / 4	B
21.	GLECT x 3 | Gal-bind	G
22.	GLECT x 2 | Gal-bind x 2	G
23.	GLECT x 2 / 4	G, B
24.	GLECT | F 5/8 | CLECT	B
25.	TM | GLECT	G
26.	TM | GLECT x 4	G
27.	TM | FTP x 1 / 2 / 3	G
28.	TM | CLECT x 1/ 2 | FTP x 1 / 2	G
29.	TM | FTP | EGF x 2	G
30.	FTP | EGF x 2	G
31.	FTP | EGF x 2 | PD	G
32.	FTP | ML	G
33.	TM | FBG	G
34.	FBG	G, B
35.	TM | FBG | FTP x 2	G
36.	FBG | EGF x 5	G
37.	TM | FBG | PAN_AP	G
38.	FBG | APPLE	G
39.	FBG | SCAN	G
40.	FBG | Integrin B-tail	G
41.	RICIN | AEROLYSIN	B
42.	RICIN	B

Yamaura et al., 2008; Wang et al., 2013; Gerdol, Venier, 2015; Vasta et al., 2015; Schultz et al., 2018; Sun et al., 2021; Saco et al., 2023; Прохорова и др., 2024; Yang et al., 2024; Chen et al., 2025; Бобровская, 2025

Таблица 42 (продолжение)

Молекулы иммуноглобулинового суперсемейства								
1.	TM	IG x 1 / 2/ 3/ 5 / 6 / 7 / 8						G
2.	IG x 2 / 4							G, B
3.	CLECT	IG x 9						G
4.	GLECT	IG x 2						G
5.	TM	CLECT	IG x 9					G, B
6.	CLECT	Fib_alpha	IG x 3	CUB				G
7.	TM	FBG	IG					G
8.	TM	FBG	IG x 2					G
9.	TM	FBG	IG	PAN AP				G
10.	TM	IG	LRR x 6					G
Adema et al., 1997; Zhang; Loker, 2004; Zhang et al., 2001; Dheilly et al., 2015; Liu et al., 2016; Buddenborg et al., 2017; Galinier et al., 2017; Tanguy et al., 2018; Saco et al., 2020; Kron, 2022; Прохорова и др., 2024; Прохорова, Бобровская, 2024; Bobrovskaya et al., 2026								
Рецепторы распознавания олигонуклеотидов								
1.	DED	DEXDc	HELICc					G
2.	DED	AAA						G
3.	ZnF_C4	HOLI						G
4.	CARDx2	HELICc x3	CTD	REG				G
5.	DEXDc	HELICc	CTD					G, B
6.	CARD	NACT	LRR					B
7.	NACT	LRR						B
Kron, 2022; Sun et al., 2024; Прохорова и др., 2024; Bobrovskaya et al., 2026								
Толл-подобные рецепторы								
1.	LRR x n (2–26)	TM	TIR					G, B, C
2.	LRR x n (4–16)	TM						G, B
3.	LRR x n	TM x 2						G, B
4.	LRR x n	TIR						G
5.	TIR	EGF						G
6.	TIR	DEATH						G
Kanzok et al., 2004; Zhang et al., 2013; Ren et al., 2014; Xing et al., 2017; Priyathilaka et al., 2018; Liu et al., 2019; Wang et al., 2019b; Chen et al., 2022; Kron, 2022; Бобровская и др., 2024; Прохорова, Бобровская, 2024								
Скавенджер-рецепторы								
1.	TM	SR x 2 / 16						G, B, C
2.	SR x 1 / 2/ 6							B
3.	TM	SR						C
4.	TM	SR x 10	Filament					G
5.	SR x 4	CLECT	KR	LDLa	PAN_AP	Tryp_SPc		G
6.	TM	SR	TSP1 x n	EGF	PAN_AP			G
7.	SR	CLECT						G
8.	SR	PAN_AP	Tryp_SPc					G
9.	SR	FRI x 2	LDLa x 2					G
10.	SR	LDLa x 2						C

11.	SR x 2	ZP							G

Таблица 42 (продолжение)

12.	EGF x 13								G
13.	TM	SR	Collagen-like						B
14.	TM	SR	Collagen-like	α-helical					B
15.	TM	Mucin-like	Somatomedin B	MAM	CCP x 2				B
16.	SR	β-helix							B, C
17.	TM	SR x 6	UPAR	ShK					B
Wang et al., 2013; Liu et al, 2011; Wei et al., 2018; Прохорова и др., 2024; Прохорова, Бобровская, 2024									
Рецепторы запуска комплемента и другие ПРР									
1	MBL								G, B
2	C1q								G, B
3	C1q x 3–4								B
4	C1q	GLECT							B
5	PGRP								G, B
6	LPB								G, B
Gerdol, Venier; 2015; Wang et al., 2018a; Gerdol et al., 2015; Прохорова и др., 2024; Бобровская, Прохорова, 2025; Bobrovskaya et al., 2026									

Условные обозначения

Домены: APPLE – домен типа APPLE; ASTACIN – домен астацина; CARD – домен активации и рекрутирования каспаз; CCP – домен контроля комплемента; CLECT – лектиновый домен С-типа; COLLAGEN-LIKE – коллагеноподобный домен; CUB – домен CUB; CTD – С-концевой домен РНК-полимеразы; DEATH – домен смерти; DED – эффекторный домен смерти; DEXDC – домен хеликазы типа DEAD/DEAH; EGF – домен эпидермального фактора роста;– FBG – фибриногенподобный домен; FILAMENT – филаментный домен; FIB_ALPHA – домен фибронектина типа I; FRI – повтор, подобный фасциклину; FTP – лектиновый домен F-типа; GAL-BIND – галактозо-связывающий домен; GLECT – лектиновый домен G-типа; HELICC – С-концевой домен хеликазы; IG – иммуноглобулиновый домен; INTEGRIN B-TAIL – домен бета-субъединицы интегрина; KR – кринг-домен; LDLA – домен, гомологичный белку La; LDL – домен рецептора липопротеинов низкой плотности; LINK – линкерный домен; LRR – повтор, богатый лейцином; MAM – адгезивный домен, подобный метридину; MBL – маннозо-связывающий лектин; ML – макрофагальный лектин-подобный домен; MUCIN-LIKE – муцин-подобный домен; NACT – домен NACHT; PAN – домен PAN; PAN_AP – домен PAN-APPLE; PGRP – домен распознавания пептидогликана; PD – пролин-богатый домен; RICIN – домен типа рицина; SCAN – SCAN-домен; CCP – домен контроля комплемента SR – домен скавенджер-рецептора; SOMATOMEDIN B – домен соматомедина B; SUSHI – домен типа «суши» (CCP); TIR – TIR-домен; TM – трансмембранный домен; TSP1 – домен тромбоспондина типа 1; TRYP_SPC –домен трипсиноподобной сериновой протеазы; ZNF_C4 – домен типа цинковых пальцев; ZP – домен зоны пеллюциды.

Встречаемость сочетаний доменов:	
	варианты рецепторов, которые есть у позвоночных
	сочетания доменов, которые встречаются у позвоночных
	новые варианты рецепторов, которые описаны у моллюсков
G	брюхоногие моллюски
B	двустворчатые моллюски
C	головоногие моллюски

Группы ПРР:	
	С-лектины
	галектины
	F-лектины
	фибриноген-подобные белки
	молекулы с богатыми лейцином повторами
	факторы комплемента и его регуляции
	токсины
	молекулы адгезии
	ферменты

III.3.2. Экспрессия генов патогенраспознающих рецепторов и молекул адгезии при иммунизации

Для анализа относительной экспрессии генов, кодирующих ПРР были использованы данные транскриптома гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus*. Относительная представленность транскриптов в гемоцитах незаражённых и заражённых трематодами *Bilharziella polonica* моллюсков была посчитана на основе метрики TPM (см. раздел II.2). Метрика ТПМ даёт информацию о соотношении транскриптов разных групп внутри одной выборки. Анализ общей представленности транскриптов, кодирующих все группы ПРР не выявил достоверных различий между незаражёнными и заряжёнными улитками. В то же время, для других факторов такие различия нами обнаружены (Orlov et al., 2023; см. раздел III.4.3.1).

Анализ метрики ТПМ по группам рецепторов позволил выявить различия в экспрессии некоторых групп ПРР. У заражённых моллюсков выше относительная представленность хилектинов, H-лектинов и F-лектинов, чем у незаражённых. Также отмечено снижение экспрессия коллектинов у заражённых моллюсков, по сравнению с незаражёнными (рисунок 110).

Другая группа транскриптов, представленность которых отличается у заражённых *B. polonica* и незаражённых моллюсков *Planorbarius corneus* – транскрипты, кодирующие ТПР. Набор закодированных ТПР и общее количество транскриптов всех ТПР не отличается между заражёнными и незаражёнными особями. Однако транскрипты некоторых типов ТПР в разном количестве присутствуют у заражённых трематодами и незаражённых моллюсков. В частности, относительное число транскриптов PcТПР2 и PcТПР7 выше в гемоцитах незаражённых улиток, а PcТПР3, PcТПР10 и PcТПР11 – выше в гемоцитах заражённых моллюсков (рисунок 111).

С использованием нуклеотидных последовательностей полученного транскриптома были разработаны специфические праймеры на транскрипты PcТПР3, PcТПР7, C-лектина, β-интегрина и ФБ. Они были применены для анализа относительной экспрессии соответствующих генов в гемоцитах моллюсков *P. corneus,* заражённых трематодами разных видов, с использованием методов ПЦР в реальном времени и полуколичественной ПЦР. Количественные данные относительного уровня экспрессии генов ПРР представлены в приложениях 19 и 20.

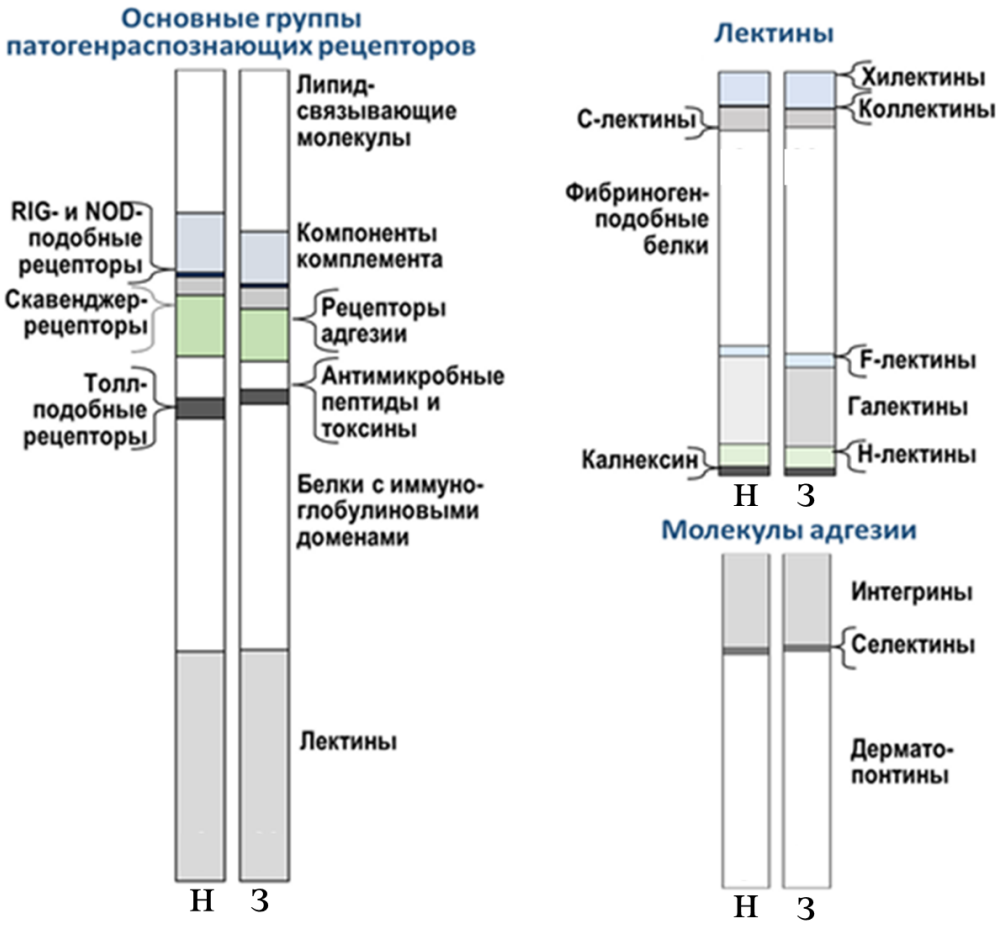


Рисунок 110. Относительная представленность транскриптов ПРР и молекул адгезии в гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus*. Условные обозначения: Н – незаражённые моллюски (n=10); З – моллюски, заражённые трематодами *Bilharziella polonica* (n=10) (по: Прохорова и др., 2024).

Анализ экспрессии гена, кодирующего PcTПР3 не показал достоверных различий между группой заражённых и незаражённых моллюсков (приложение 19, рисунок 112Б). Однако такие различия были выявлены при определении относительной экспрессии отдельно в группах, заражённых разными видами трематод и незаражённых моллюсков. В частности уровень экспрессии гена *PcTLR3* достоверно выше в гемоцитах моллюсков, заражённых трематодами *Bilharziella polonica, Cotylurus brevis* и *Plagiorchis multiglandularis,* по сравнению с группой незаражённых улиток. У заражённых этими видами трематод улиток уровень экспрессии гена *PcTLR3* также выше, чем в группах, заражённых *Notocotylus ephemera, Echinostoma spiniferum* и *Plagiorchis multiglandularis.* Кроме того, заражение *P. multiglandularis* приводит к снижению экспрессии гена *PcTLR3*, по сравнению незаражёнными улитками (приложение 19, рисунок 112).

А

ТПР	ТРМ	
	Н	З
1	0.1925	0.3945
2	0.8331	0.3937
3	0.4061	1.1721
4	0.3853	0.5786
5	1.5595	2.2372
6	0.4778	0.4907
7	2.2428	1.2166
8	0.2846	0.5676
9	0.5007	0.4575
10	1.0570	2.5097
11	0.4626	1.6360

Б

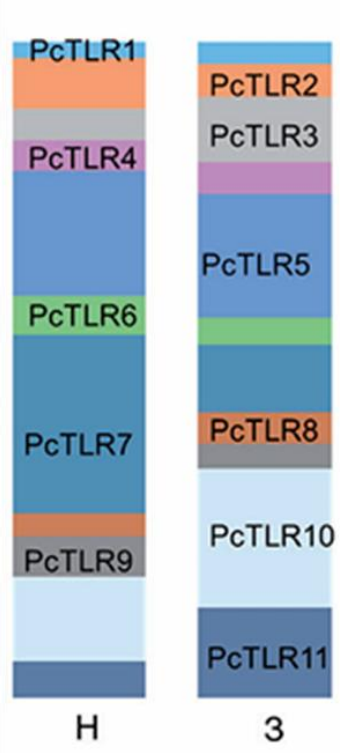


Рисунок 111. Относительная представленность транскриптов толл-подобных рецепторов разных типов в гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus.* А – значения метрик ТРМ; Б – диаграмма, иллюстрирующая соотношение транскриптов, кодирующих разные варианты ТПР. Условные обозначения: Н – незаражённые моллюски (n=10); З – моллюски, заражённые трематодами *Bilharziella polonica* (n=10) (по: Бобровская, Орлов, Прохорова, 2024, с изменениями).

Для гена *PcTLR7* также не выявлено достоверных различий между выборками незаражённых и заражённых трематодами моллюсков. Тем не менее, анализ относительного уровня экспрессии гена *PcTLR7* у заражённых разными видами трематод моллюсков позволил выявить снижение его экспрессии при заражении *Bilharziella polonica* и *Plagiorchis multiglandularis* (рисунок 112). Также в группах моллюсков, заражённых этими видами трематод уровень экспрессии гена *PcTLR7* достоверно ниже, чем у моллюсков, заражённых другими видами трематод. Кроме того, у роговых катушек, заражённых *P. multiglandularis* уровень экспрессии гена ниже, чем у заражённых *Bilharziella polonica* (рисунок 112).

Транскрипт, соответствующий С-лектиновому домену (*PcClect*) в бóльшем количестве присутствует у заражённых моллюсков, по сравнению с незаражёнными (рисунок 113, приложение 19).

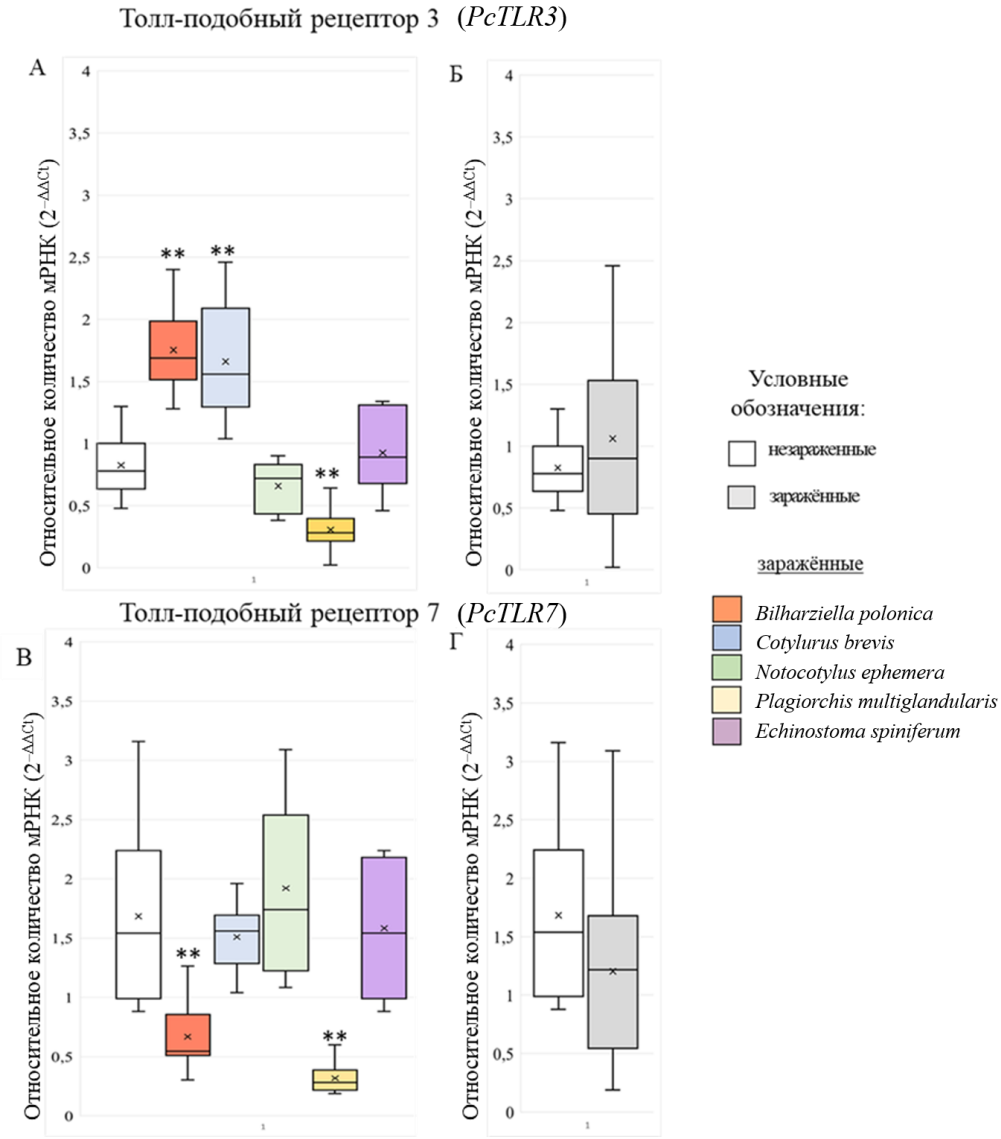


Рисунок 112. Относительный уровень экспрессии генов толл-подобных рецепторов у гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus.* А, В – у незаражённых и заражённых трематодами разных видов, Б, Г – у незаражённых и заражённых трематодами (вся выборка). Условные обозначения: группы моллюсков обозначены разными цветами (см. легенду); ось ординат – уровень экспрессии относительно генов β-актина и GAPDH ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, крест – среднее значение, горизонтальная черта – Me, верхняя и нижняя границы элементов диаграммы – границы K1 и K3, усы – максимальное и минимальное значения, точки – выбросы). Статистически значимые различия согласно U-критерию Манна-Уитни: ** – $p<0.01$.

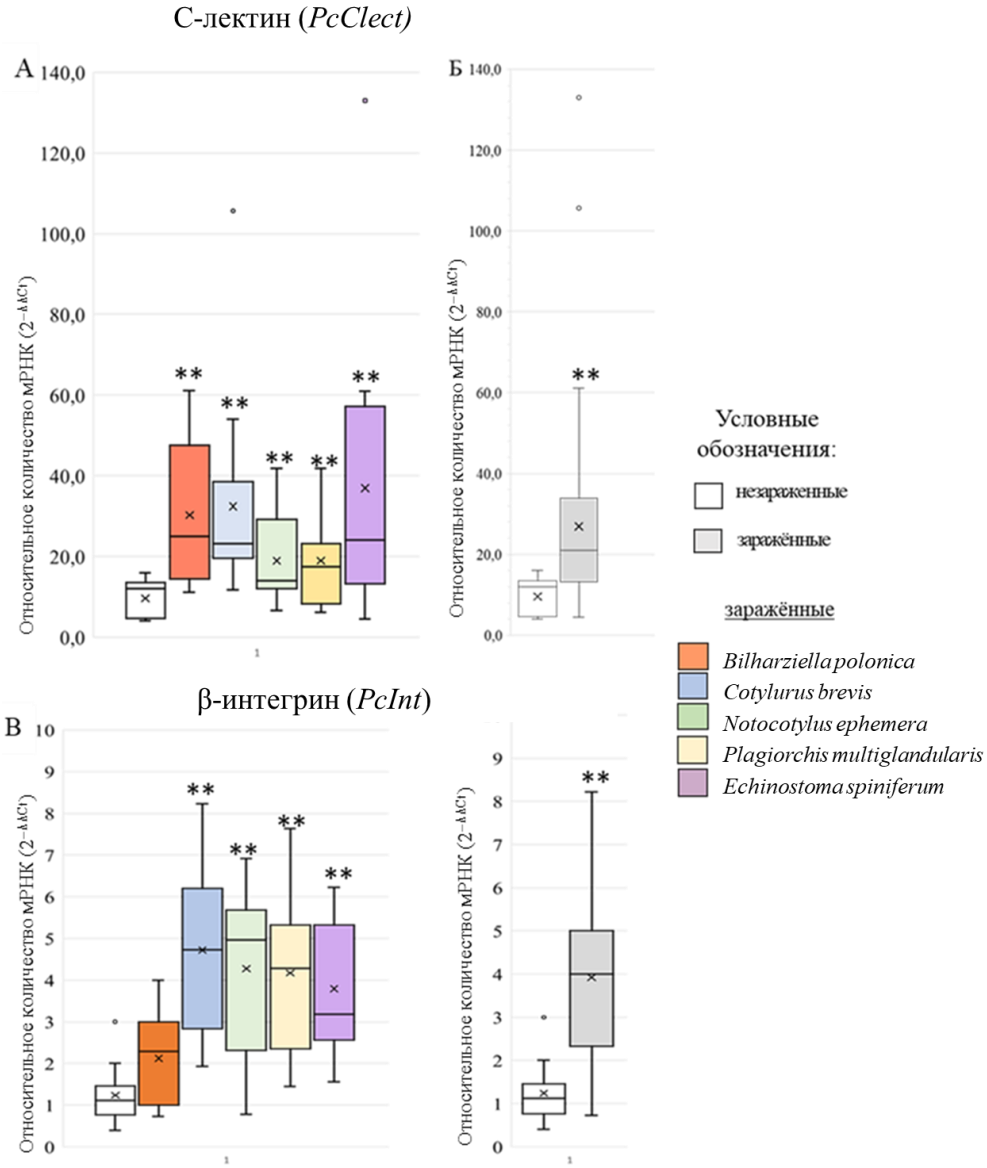


Рисунок 113. Относительный уровень экспрессии генов С-лектина и β-интегрина в гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus*. А, В – у незаражённых и заражённых трематодами разных видов, Б, Г – у незаражённых и заражённых трематодами (вся выборка). Условные обозначения: см. рисунок 112. Статистически значимые различия согласно U-критерию Манна-Уитни: * – $p<0.05$, ** – $p<0.01$, *** – $p<0.001$

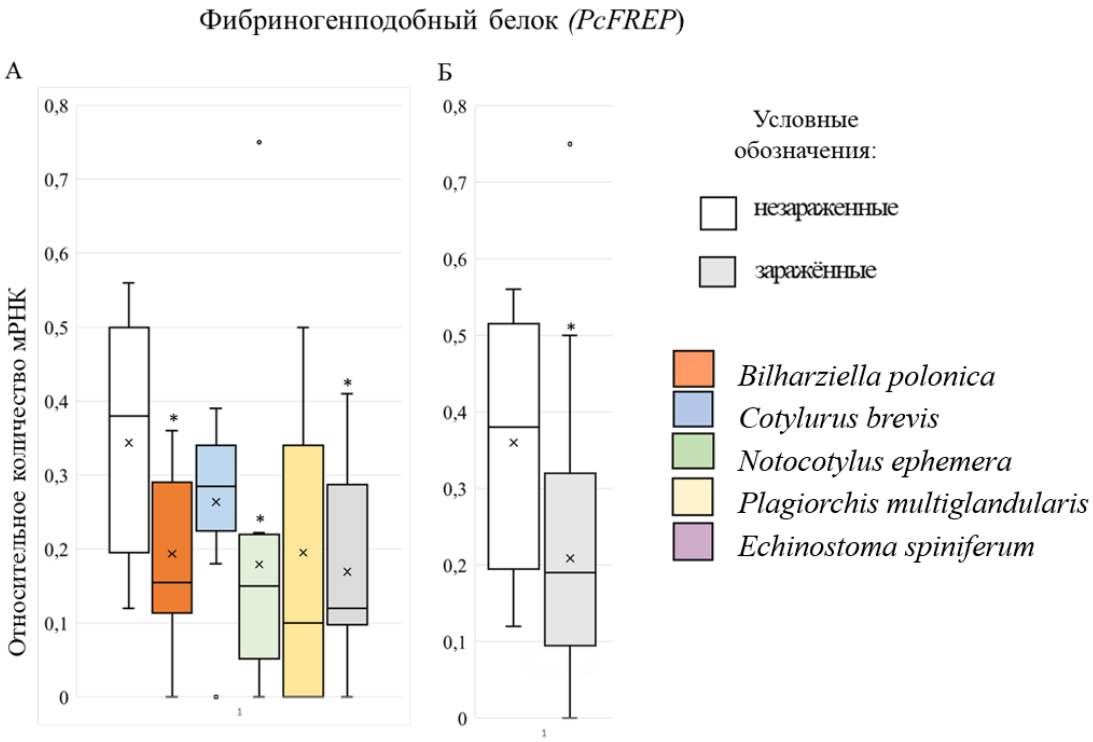


Рисунок 114. Относительный уровень экспрессии генов, кодирующих фибриногенподобные белки, в гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus.* А, В – у незаражённых и заражённых трематодами разных видов, Б, Г – у незаражённых и заражённых трематодами (вся выборка). Условные обозначения: группы моллюсков обозначены разными цветами (см. легенду); осьY – уровень экспрессии относительно гена β-актина (относительная концентрация ПЦР-продукта в конечной точке, крест – среднее значение, горизонтальная черта – Me, верхняя и нижняя границы элементов диаграммы – границы K1 и K3, усы – максимальное и минимальное значения, точки – выбросы). Статистически значимые различия согласно U-критерию Манна-Уитни: * – $p<0.05$, ** – $p<0.01$, *** – $p<0.001$.

Уровень экспрессии гена *β*-интегрина (*PcInt*) во всех группах заражённых моллюсков значительно выше, чем у незаражённых, кроме группы заражённых *Bilharziella polonica* улиток. Интересно, что во всех группах заражённых улиток разброс значений относительной экспрессии гена *PcInt* шире, чем в группе незаражённых (рисунок 113, приложение 19). Достоверных различий в относительной экспрессии генов *PcClect* и *PcInt* между группами моллюсков, заражённых трематодами разных видов, не выявлено.

Транскрипты генов фибриногенподобных белков (*PcFREP*) достоверно меньше представлены у зараженных улиток, по сравнению с незаражёнными (рисунок 114). В группах моллюсков, заражённых *Plagiorchis multiglandularis* и *Cotylurus brevis* средние значения относительной экспрессии гена *PcFREP* ниже, чем у незаражённых, но достоверно от них не отличаются. Для групп заражённых улиток достоверные различия выявлены только между заражёнными *C. brevis* и *Notocotylus ephemera* (рисунок 114, приложение 20). Отмечен большой

разброс значений уровня экспрессии *PcFREP* внутри групп. Кроме того, среди заражённых присутствуют моллюски, у которых соответствующая мРНК не выявлена (рисунок 114).

Обсуждение к разделу III.3.2.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что трематодная инвазия оказывает влияние на экспрессию генов, кодирующих молекулы адгезии и ПРР, в гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus.*

Одна из групп факторов, для которой были выявлены различия между заражёнными и незаражёнными моллюсками по данным анализа транскриптома гемоцитов – ТПР. Различия в количестве транскриптов между заражёнными *Bilharziella polonica* и незаражёнными моллюсками были выявлены для РсТПР2, РсТПР7, РсТПР3, РсТПР10 и РсТПР11. Для того, чтобы оценить избирательность влияния инвазии на экспрессию ТПР, был осуществлен анализ экспрессии генов *PcTLR3* и *PcTLR7* в гемоцитах моллюсков, заражённых трематодами разных видов. Установлено, что экспрессия гена *PcTLR3* повышается только при заражении *B. polonica* (что согласуется с результатами оценки по метрике ТПМ) и *Cotylurus brevis* (в среднем в 2 раза). При этом у моллюсков, заражённых *Plagiorchis multiglandularis,* она падает более, чем в 2 раза. Уровень экспрессии *PcTLR7* либо не изменяется в гемоцитах заражённых моллюсков, по сравнению с незаражёнными, либо снижается. Так, у моллюсков, заражённых *Bilharziella polonica,* экспрессия гена *PcTLR7* в среднем в 3 раза ниже, а у заражённых *Plagiorchis multiglandularis* более чем в 4 раза ниже, чем у незаражённых.

Получается, что у заражённых *P. multiglandularis* моллюсков понижается экспрессия генов обоих ТПР, у заражённых *Cotylurus brevis* – повышается экспрессия гена *PcTLR7*, у заражённых *Bilharziella polonica* повышается экспрессия гена *PcTLR3*, но снижается экспрессия PcTLR7. А при заражении *Echinostoma spiniferum* и *Notocotylus epehemera* достоверного изменения экспрессии исследуемых генов ТПР не происходит.

В литературе описано усиление экспрессии ТПР у моллюсков при трематодной инвазии, в том числе избирательное. В частности, у двустворчатых моллюсков *Crassostrea gigas* заражение бактериями *Vibrio* разных линий приводит к усилению экспрессии разных ТПР (Zhang et al., 2013). Также у устриц происходит усиление экспрессии гена *TLR6* (*CgTLR6*) в ответ на стимуляцию липополисахаридами и пептидогликаном (Wang et al., 2016). Для моллюсков *Biomphalaria glabrata* выявлены различия в уровне конститутивной экспрессии ТПР. У особей, относящихся к резистентным к заражению трематодами линиям, уровень экспрессии ТПР выше, чем у моллюсков из чувствительных линий (Pila et al., 2016a). Заражение трематодами *Schistosoma mansoni* приводит повышению экспрессии гена ТПР более чем в 20 раз у моллюсков из резистентных линий, при этом у моллюсков из чувствительных линий

экспрессия гена не усиливается (Pila et al., 2016a). Такие результаты могут свидетельствовать о роли данного ТПР в распознавании именно *S. mansoni.*

Интересные результаты были получены для моллюска *Oncomelania hupensis*. Анализ экспрессии ТПР 16 типов показал активацию всех соответствующих им генов через 6 часов после заражения *Schistosoma japonicum*. Но через 12–20 часов экспрессия всех генов ТПР ослабевает. Однако через 3–4 дня после заражения усиливается экспрессия только двух генов ТПР (*OhTLR1* и *OhTLR9*) (Zhao et al., 2018). У моллюска *Chlamys farreri* показана зависимость динамики экспрессии гена одного из ТПР (*CfToll-1*) от количества бактериальных липополисахаридов, использованных для иммунизации (Qiu et al., 2007).

Таким образом, экспрессия генов, кодирующих ТПР, может быть конститутивно различной (как у представителей биомфалярий разных линий), изменяться по-разному при заражении патогенами разных видов (как у роговых катушек и биомфалярий), иммунизации разным количеством ПАМП (как у морского гребешка), а также изменение экспрессии генов ТПР может иметь четкую временную динамику (как у онкомелании). Поэтому для выявления более точных механизмов изменения активности генов ТПР необходимо учитывать все эти факторы.

Согласно значениям метрики ТПМ, заражение трематодами *Bilharziella polonica* также влияет на экспрессию генов лектинов разных групп у моллюсков *Planorbarius corneus*. Наиболее заметные различия получены для H-лектинов и F-лектинов, экспрессия которых повышается у заражённых моллюсков. Также мы оценили общий уровень экспрессии C-лектинов, использовав специфические праймеры на домен C-лектина. Оказалось, что у заражённых моллюсков экспрессия C-лектинов в гемоцитах достоверно выше, чем у незаражённых. Однако относительный уровень экспрессии C-лектина значительно различается у моллюсков, заражённых трематодами разных видов. У заражённых трематодами *Bilharziella polonica* и *Cotylurus brevis* он выше в среднем в 1.5 раза выше, чем у заражённых *Echinostoma spiniferum* и *Notocotylus ephemera.* Также отмечена большая индивидуальная вариабельность экспрессии гена *PcClect*.

Выполненное нами ранее исследование по анализу экспрессии гена C-лектина полуколичественным методом также подтвердило повышение его экспрессии у заражённых моллюсков, по сравнению с незаражёнными. В частности, было установлено, что уровень экспрессии гена *PcClect* по сравнению с незаражёнными катушками, у особей, заражённых *Plagiorchis* sp., выше в 2 раза, у заражённых *Cotylurus* sp. – в 3.5 раза, а у зараженных *Notocotylus* sp. и *Bilharziella polonica* – почти в 5 раз (Прохорова и др., 2010). Похожие результаты были получены и при анализе экспрессии гена кальций-связывающего домена C-лектина. У заражённых трематодами улиток его экспрессия в среднем в 2 раза выше, чем у незаражённых

(рисунок 115, Прохорова и др., 2010). Поскольку С-лектины являются ПРР, а также участвуют в процессах адгезии, повышение их экспрессии может свидетельствовать об активации иммунных реакций при заражении.

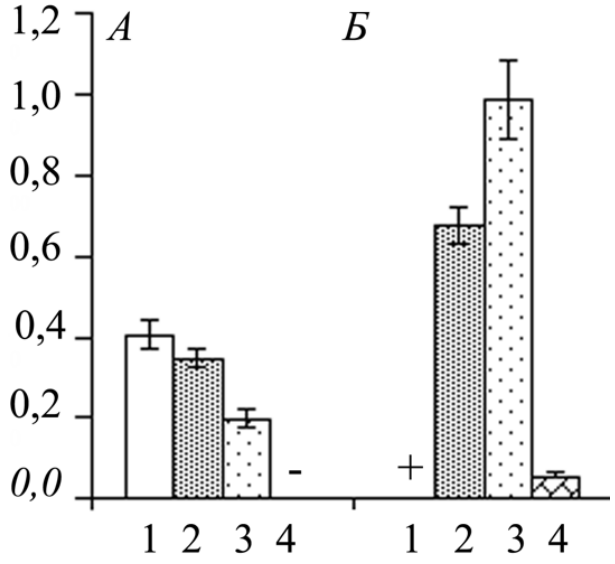


Рисунок 115. Экспрессия генов факторов защитных реакций в гепатопанкреасе и гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus* А – гемоциты незараженных; Б – гемоциты зараженных. Условные обозначения: по оси ординат – уровень экспрессии относительно β-актина; по оси абсцисс обозначены факторы защитных реакций: 1 – фибриногенподобный белок, 2 – С-лектин, 3 – кальций-связывающий белок, 4 – цистатинподобный белок (Прохорова и др., 2010).

Данные по экспрессии С-лектинов в гемоцитах у моллюсков *Biomphalaria glabrata*, не позволяют проследить общей тенденции. С одной стороны, заражение биомфалярий мирацидиями *Echinostoma caproni* приводит к усилению экспрессии у них С-лектина, (Guillou et al., 2007). Также описано повышение содержания С-лектинов в гемолимфе *B. glabrata* после иммунизации дрожжами и грамположительными бактериями (Guillou et al., 2004; Chai et al., 2008). С другой стороны, у моллюсков резистентной линии *B. glabrata* (BS-90) заражение мирацидиями к *S. mansoni* приводит к резкому снижению экспрессии С-лектинов уже через 5 часов после заражения (Raghavan et al., 2003). В другом исследовании, напротив, не установлено изменения экспрессии гена С-лектина в гемоцитах биомфалярий резистентной линии при заражении трематодами *S. mansoni*. Однако отмечено значительное повышение экспрессии гена С-лектина (в 15–90 раз) у моллюсков чувствительной линии через 5–48 часов после заражения. У моллюсков резистентных линий менее существенное повышение экспрессии гена С-лектина (в 5–20 раз) выявлено только в случае заражения мирацидиями, которых предварительно подвергали гамма-облучению (Ittiprasert et al., 2010).

Также установлено, что у моллюсков *Biomphalaria glabrata* экспрессия гена

кальций-связывающего белка зависит от резистентности. Так, конститутивная экспрессия выше у моллюсков чувствительных линий (Guillou et al., 2007). Однако при заражении трематодами у них наблюдается снижение экспрессии гена. При этом у моллюсков резистентных линий при иммунизации экспрессия гена усиливается (Vergote et al., 2005). Это указывает на возможную роль кальций-связывающих белков в механизмах устойчивости к паразитарной инвазии.

Для оценки экспрессии ФБ в работе были использованы праймеры, комплементарные наиболее консервативному участку FBG-домена, который расположен ближе к его С-концу. Такие праймеры позволяют анализировать суммарную экспрессию ФБ всех групп. Во всех группах заражённых моллюсков *Planorbarius corneus* средняя относительная экспрессия генов *PcFREP* ниже, чем у незаражённых. Для групп моллюсков, заражённых *Bilharziella polonica, Notocotylus ephemera* и *Echinostoma spiniferum* выявленные различия статистически значимы.

Полученные результаты согласуются с полученными ранее данными по экспрессии генов, кодирующих ФБ, у роговых катушек (Прохорова и др., 2010; рисунок 115). Было установлено, что средний уровень экспрессии ФБ у заражённых улиток ниже, чем у незаражённых. Можно предположить, что снижение экспрессии генов ФБ в гемоцитах связано с влиянием паразита.

Для моллюсков *Biomphalaria glabrata* показаны различия в экспрессии ФБ разных типов при заражении трематодами разных видов. Так, иммунизация мирацидиями *Echinostoma paraensei* увиливает экспрессию генов ФБ двух типов (*FREP2* и *FREP4*), но одновременно подавляет экспрессию гена, кодирующего ФБ8 (Mitta et al., 2005; Adema et al., 2010). При заражении мирацидиями *Schistosoma mansoni* у биомфалярий происходит долговременная активация генов *FREP2*, *FREP6* и *FREP11* (Hertel et al., 2005; Dinguirard et al., 2018).

Анализ экспрессии гена, кодирующего β-интегрин (*PcInt*), показал значительное усиление его экспрессии (в 2–5 раз) у моллюсков *Planorbarius corneus*, заражённых всеми исследованными видами трематод, кроме группы заражённых *Bilharziella polonica*. При этом заражение *B. polonica* также усиливает экспрессию гена *PcInt* у большинства заражённых особей, однако по всей выборке различия с незаражёнными не достоверны. В целом нами отмечена бóльшая вариабельность относительной экспрессии гена *PcInt* в гемоцитах заражённых моллюсков, по сравнению с незаражёнными.

Влияние заражённости на экспрессию генов молекул адгезии в гемоцитах оценивалось ранее для *Biomphalaria glabrata*. У моллюсков резистентных линий было выявлено резкое повышение экспрессии генов β-интегрина, α-интегрина и дерматопонтина примерно через сутки после заражения трематодами *Schistosoma mansoni*. Однако уровень экспрессии этих генов начал снижаться на пятые сутки после заражения. У моллюсков чувствительных линий повышение экспрессии генов молекул адгезии также происходит, но сохраняется на

протяжении наблюдения (Mitta et al., 2005). Также повышение экспрессии генов, кодирующих молекулы адгезии, было отмечено в гемоцитах *Biomphalaria glabrata* уже через 3 часа после заражения трематодами *Schistosoma mansoni* (Lockyer et al., 2012).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что трематодная инвазия чаще всего вызывает усиление экспрессии генов молекул адгезии в гемоцитах. Усиление адгезии является важным компонентом активации клетки врождённого иммунитета. В частности, оно обеспечивает повышение подвижности и фагоцитарной активности иммуноцитов (Dupuy, Caron, 2008). В то же время, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что иммунизация по-разному может влиять на работу генов молекул адгезии у представителей разных популяций одного вида, а также при заражении паразитами разных видов. Описанное Митта (Mitta et al., 2005) явление снижение экспрессии генов молекул адгезии у резистентных биомфалярий может быть связано с более эффективным подавлением инвазии, в том числе в результате более успешного распознавания паразита. Иммунная реакция быстрее реализуется и быстрее прекращается. В то же время, у чувствительных улиток паразит продолжает развиваться, повреждая ткани и выделяя продуты жизнедеятельности. Наличие активного патогена не позволяет прекратить иммунную реакцию. Гемоциты моллюска с развивающейся инвазией будут продолжать мигрировать в очаг воспаления и участвовать в очистке внутренней среды моллюска от последствий заражения.

Таким образом, активность экспрессии генов ПРР у лёгочных моллюсков зависит от нескольких факторов. Основной их них – генотипические (индивидуальные, популяционные и видовые) особенности моллюска, которые определяют набор ПРР. ПРР являются рецепторами врождённого иммунитета, которые конститутивно экспрессируются в гемоцитах. Поэтому набор и количество рецепторов каждого класса определяются типом клетки и этапом её дифференцировки и специализации. Изменение набора и интенсивности экспрессии отдельных ПРР может быть связано с дифференцировкой гемоцитов в ходе иммунного ответа, когда изменяется соотношение типов клеток, обладающих разной функциональной активностью (Adema, Loker, 2015; Serebryakova et al., 2022). При анализе общего набора транскриптов всех гемоцитов такие различия сложно зафиксировать. В настоящее время развиваются технологии секвенирования клеток отдельных пулов и даже единичных гемоцитов, которые, возможно, позволят выявить отличия между транскриптомами клеток на разных этапах специализации (Li et al., 2022).

Другой фактор, влияющий на экспрессию генов ПРР – иммунизация, которая положительно или отрицательно влияет на работу отдельных генов. Для исследованных моллюсков выявлено избирательное повышение экспрессии отдельных ПРР и молекул адгезии при иммунизации патогенами разных видов. Это подтверждает избирательность участия ПРР

и/или разную их эффективность при распознавании патогенов. Однако для многих ПРР показана способность реагировать на целый набор лигандов (Kumar, 2011). Кроме того, спектры лигандной специфичности ПРР разных групп перекрываются. Отсутствие строгой специфичности может «стирать» тенденции изменения экспрессии отдельных ПРР при иммунном ответе моллюсков на различные патогены.

В то же время, именно изменение набора ПРР в ходе иммунного ответа может лежать в основе такого явления как «тренированный иммунитет». Известно, что повторное заражение моллюсков трематодами часто приводит к более быстрому иммунному ответу и к более эффективной элиминации патогена (Атаев и др., 2020). В качестве одного из механизмов тренированного иммунитета рассматривается «врождённая гуморальная память», проявляющаяся в более интенсивной выработке факторов гуморального иммунитета, нейтрализующих патогены (Portela et al., 2013; Pinaud et al., 2016). Тем не менее, как и любой иммунный ответ, клеточная реакция при повторной иммунизации начинается с распознавания патогена. В гемоцитах, которые ранее сталкивались с патогенами, может происходить изменение набора или соотношения экспрессируемых ПРР. Это подтверждается данными анализа экспрессии соответствующих им генов у моллюсков со зрелым заражением. Такие гемоциты, обладающие эффективным в отношении конкретного патогена набором ПРР будут более эффективно его распознавать при повторной иммунизации. В результате иммунный ответ (клеточные и гуморальные реакции) также будет запускаться быстрее. Таким образом, специализированные в ходе первичного контакта с патогеном гемоциты могут обеспечивать запуск реакций тренированного иммунитета.

У лёгочных моллюсков присутствуют ПРР всех основных групп. Большинство описанных ПРР моллюсков могут быть отнесены к тем же классам, что и ПРР позвоночных. Но помимо вариантов рецепторов с каноничной структурой, у моллюсков встречаются варианты лектинов, скавенджер-рецепторов, молекул иммуноглобулинового суперсемейства с уникальными сочетаниями доменов. Такие варианты рецепторов моллюсков не всегда могут быть классифицированы согласно имеющейся классификации ПРР.

Разнообразие ПРР моллюсков превосходит разнообразие рецепторов врождённого иммунитета у позвоночных животных. Вероятно, при отсутствии специфических антигенраспознающих молекул расширение репертуара распознаваемых лигандов достигается за счёт увеличения количества вариантов ПРР. Весь набор рецепторов генотипически запрограммирован Каждый вид (или даже популяция) улиток сталкивается с определёнными видами патогенов. Взаимодействие с конкретным набором патогенов приводит к формированию уникального для данного вида набора ПРР.

Имеющиеся данные по оценке лигандной специфичности, изменению экспрессии ПРР моллюсков и их генов при иммунизации подтверждают их широкую лигандную специфичность. С другой стороны, профиль экспрессии ПРР при заражении паразитами разных видов изменяется, что свидетельствует об избирательности ПРР в распознавании лигандов, либо разной их эффективности по отношению в различным ПАМП. Вероятно, явление избирательности распознавания патогенов через ПРР у лёгочных моллюсков лежит в основе тренированного иммунитета.

III.4. Проявления иммунных реакций лёгочных моллюсков

III.4.1. Проявления клеточных реакций

Изучение проявлений клеточных реакций осуществлялось как на природнозаражённых моллюсках, так и на иммунизированных в лабораторных условиях модельных объектах. Для анализа клеточных реакций у природнозаражённых моллюсков были использованы особи со зрелым заражением трематодами, которое характеризуется присутствием развивающихся партенит (спороцист, редий), продуцирующих церкарийй. Также были изучены ткани моллюсков, заражённых метацеркариями.

В случае зрелых заражений моллюсков партенитами трематод не всегда наблюдается выраженная клеточная реакция. Так у моллюсков *Planorbarius corneus,* заражённых трематодами *Bilharziella polonica* в гепатопанкреасе присутствуют многочисленные спороцисты с развивающимися в них эмбрионами церкарий, вокруг которых нет заметных скоплений гемоцитов или капсул (рисунок 116). Отдельные гемоциты оседают на поверхность тегумента спороцист (рисунок 116Б). Схожая картина наблюдается и гепатопанкреасе моллюсков *Ampullaceana lagotis,* заражённых трематодами *Aptorchis* sp. В области локализации спороцист в тканях гепатопанкреаса видны лишь единичные гемоциты обычной морфологии (рисунок 117).

В то же время, своеобразный вариант клеточной реакции хорошо заметен у моллюсков *Planorbarius corneus,* заражённых трематодами *Plagiorchis multiglandularis.* Гемоциты оседают на поверхности спороцист, распластываются и уплощаются (рисунок 118). В таком виде они формируют однослойную «мантию» на поверхности паразита. При этом не наблюдается признаков их деструктивного влияния на тегумент паразита. Спороциста развивается и содержит зрелые живые эмбрионы церкарий.

Похожая гемоцитарная реакция развивается в моллюсках *Succinea putris,* заражённых трематодами *Leucochloridium paradoxum* (рисунок 119). Центральная часть спороцист трематод рода *Leucochloridium* представлена разветвленными столонами, от которых отходят трубчатые столоны, переходящие в отростки со зрелыми метацеркариями (рисунок 119А). Гемоциты оседают на тегумент спороцисты в центральной части столона, формируя однослойную мантию (рисунок 119Г, Д). При этом в окружающих тканях также нет значительных скоплений гемоцитов (рисунок 119В). На отростки спороцист гемоциты не оседают (рисунок 119Б). Таким образом, гемоциты покрывают только часть спороцисты.

В то же время, реакция гемоцитов на патогены хорошо заметна в условиях *in vitro*. Так, гемоциты *Lymnaea stagnalis* оседают на поверхности извлечённых из гепатопанкреаса спороцист трематод *Diplostomum pseudospathaceum*, образуя однослойную капсулу (рисунок

120). Гемоциты моллюсков *Biomphalaria glabrata* при инкубировании с метацеркариями *Echinostoma caproni* распластываются на их поверхности (рисунок 121А) и формируют с ними агглютинации (рисунок 121Б). При инкубации в гемолимфе *Planorbarius corneus* вибрисса кошки, гемоциты также оседают на него, формируя небольшие скопления на его поверхности (рисунок 127Д).

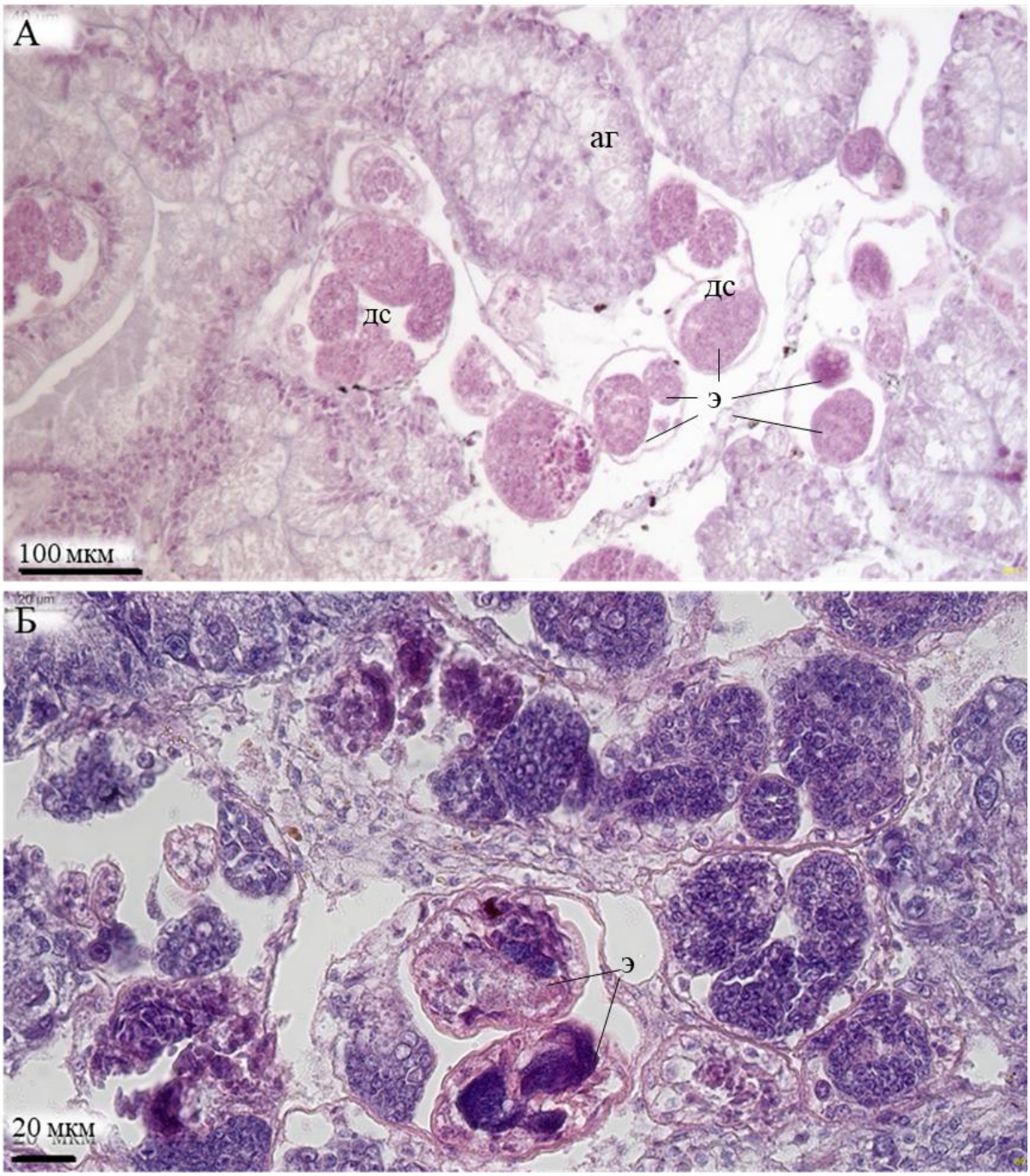


Рисунок 116. Спороцисты трематод *Bilharziella polonica* (сем. Schistosomatidae) в гепатопанкреасе моллюсков *Planorbarius corneus.* А – дочерние спороцисты с эмбрионами церкарий; Б – зрелые эмбрионы церкарий. Условные обозначения: аг – ацинус гепатопанкреаса; дс – дочерняя спороциста; э – эмбрион церкарии.

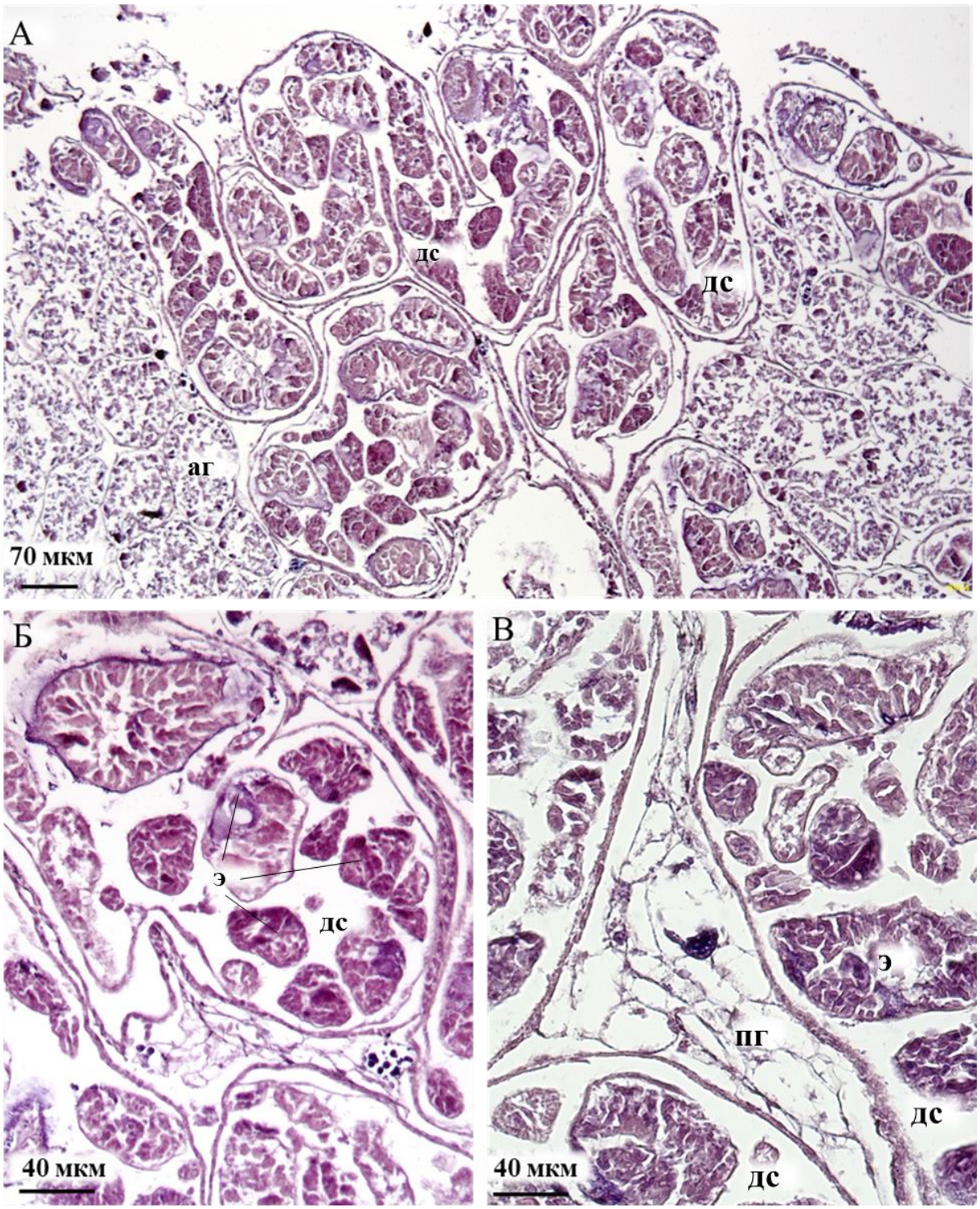


Рисунок 117. Спороцисты трематод *Aptorchis* sp. (сем. Plagiorchiidae) в гепатопанкреасе моллюска *Ampullaceana lagotis.* А – дочерние спороцисты с эмбрионами церкарий; Б – эмбрионы церкарий; В – дочерние спороцисты с эмбрионами церкарий и паренхима гепатопанкреаса. Условные обозначения: дс – дочерние спороцисты; э – эмбрионы церкарий; аг – ацинус гепатопанкреаса; пг – рыхлая соединительная ткань гепатопанкреаса.

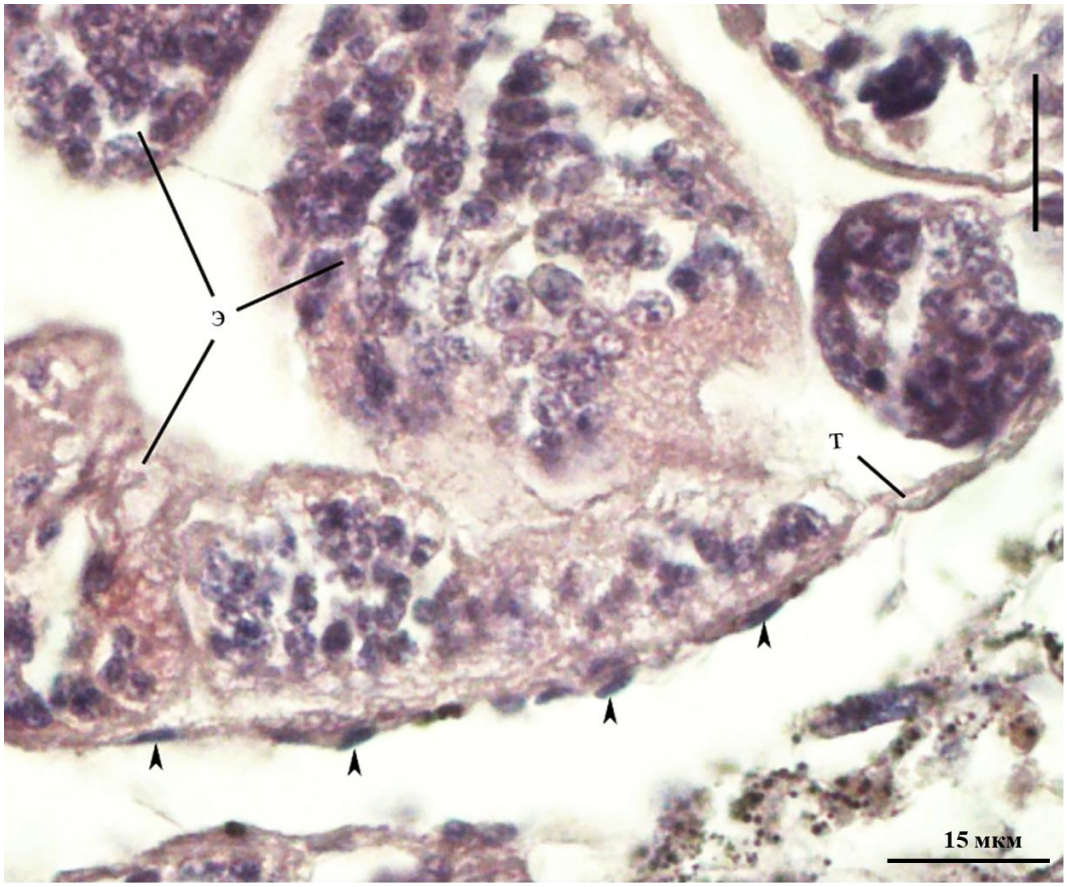


Рисунок 118**.** Гемоцитарная мантия на поверхности спороцисты трематоды *Plagiorchis multiglandularis* (сем. Plagiorchiidae) в моллюске *Planorbarius corneus*. Условные обозначения: э – эмбрионы церкарий; т – тегумент спороцисты; стрелками обозначены гемоциты.

Клеточная реакция на метацеркарий также выражена не всегда. На гистологических срезах моллюсков *Lymnaea stagnalis* вокруг метацеркарий трематод *Echinostoma revolutum* не выявлено клеточной реакции или заметных скоплений гемоцитов (рисунок 122). В моллюсках *Planorbarius corneus* вокруг метацеркарий *Echinostoma* sp. могут формироваться капсулы, состоящие из 3–7 слоёв гемоцитов (рисунок 123А, В). В некоторых случаях в составе таких капсул метацеркарии проявляют признаки деградации (рисунок 123В). Также выявлены «пустые» капсулы, не содержащие метацеркарий (рисунок 123Г). Однако в том же экземпляре моллюска одновременно с инкапсулированными метацеркариями могут присутствовать неинкапсулированные – как живые (рисунок 123Б), так и деградирующие (рисунок 123Д).

В моллюсках *Biomphalaria pfeifferi*, заражённых мирацидиями трематод *Echinostoma caproni*, через 37 дней п. з. обнаруживаются многочисленные метацеркарии (рисунок 124). На поверхности метацеркарий располагаются гемоциты. На разных участках цисты гемоциты оседают в 1–3 слоя, изолируя метацеркарий. Однако полноценной капсулы не формируется и окружённые клетками гемолимфы моллюска метацеркарии продолжают развиваться.

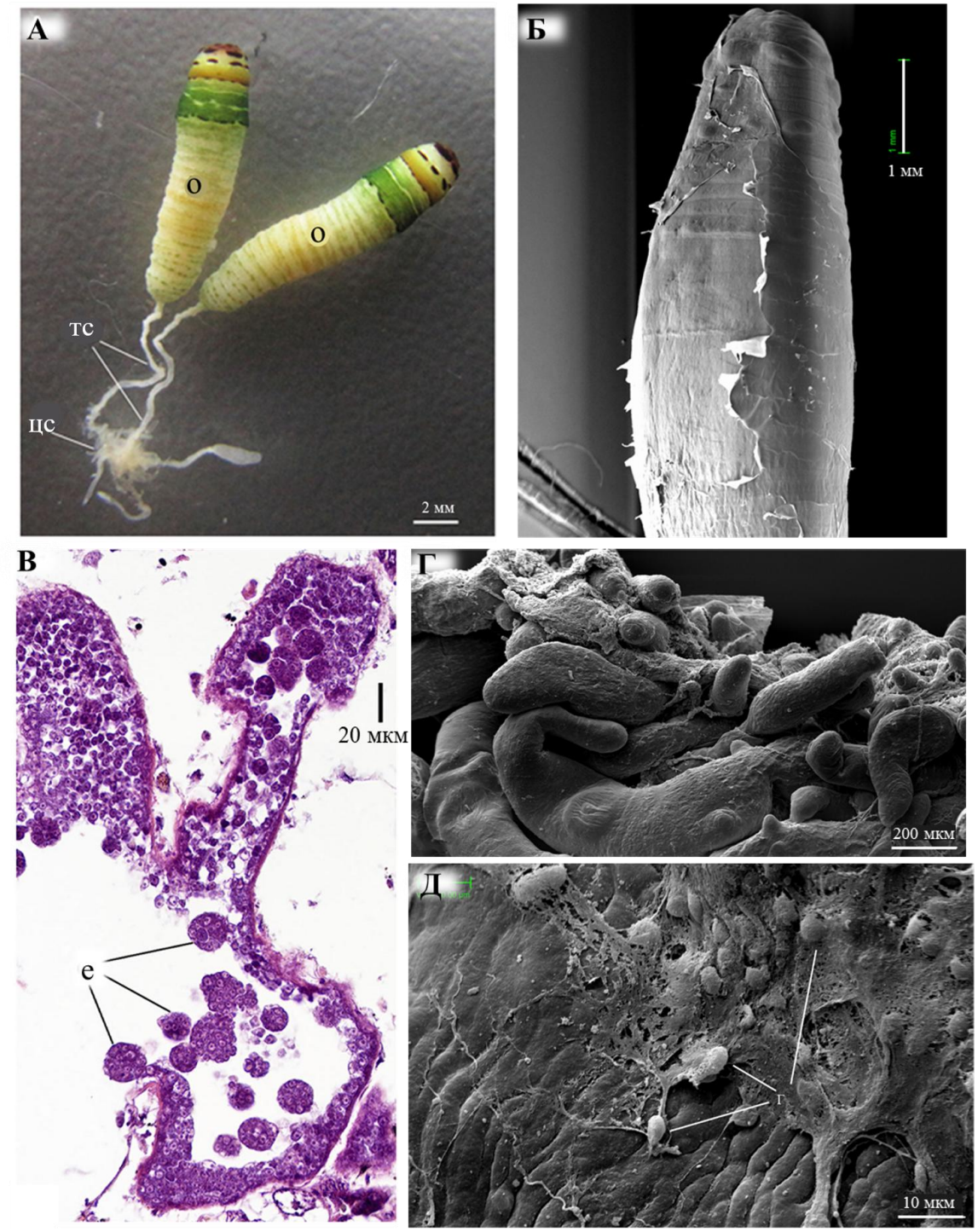


Рисунок 119**.** Клеточная реакция на спороцист трематод *Leucochloridium paradoxum* (сем. Leucochloridiidae) в моллюске *Succinea putris*. А – дочерняя спороциста; Б, Г, Д – микрофотографии спороциты со сканирующего электронного микроскопа; Б – отросток спороцисты; Г – столоны спороцисты; Д – гемоциты на поверхности столонов спороцисты; В – гистологический срез через столон спороцисты. Условные обозначения: г – гемоциты; е – эмбрионы метацеркарий; цс – центральная часть столона; тс – трубчатые столоны; о – отростки спороцисты (Ataev, Usmanova, Vinogradova, Prokhorova, Tokmakova, 2024, с дополнениями).

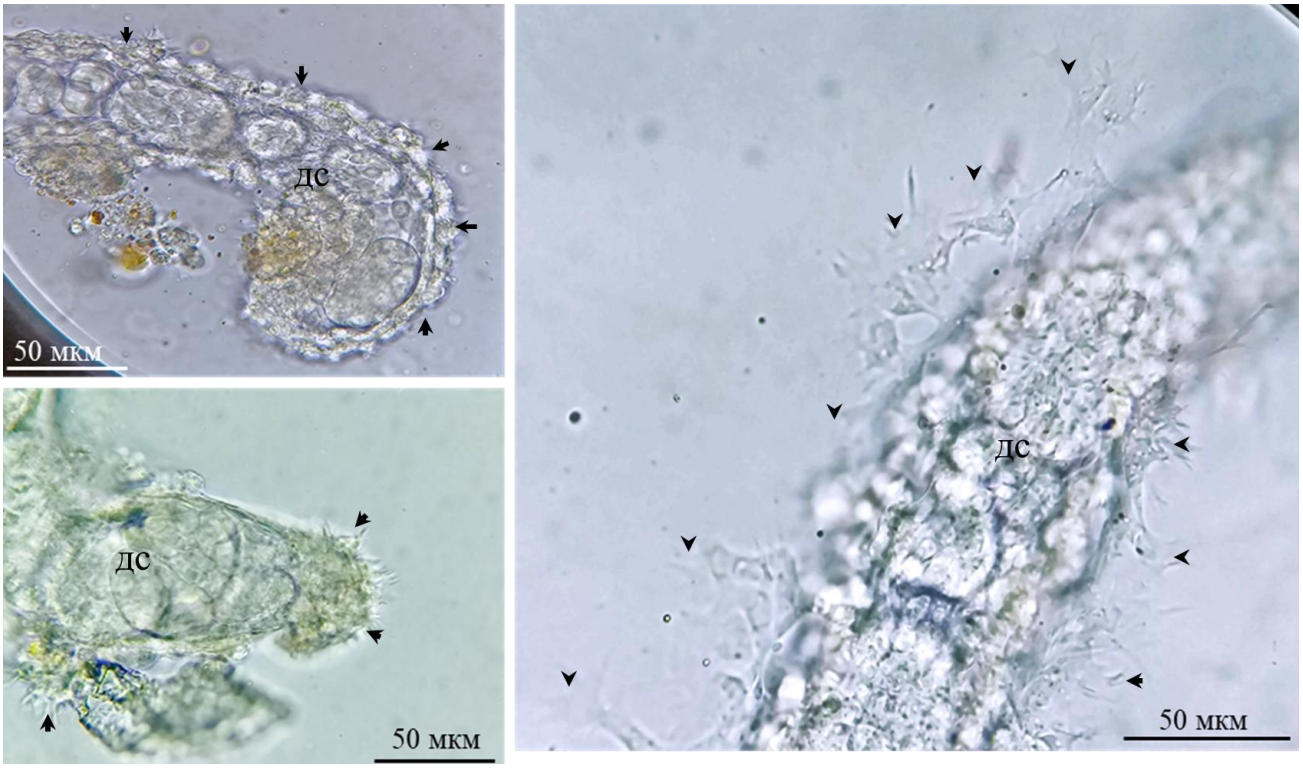


Рисунок 120. Гемоциты моллюска *Lymnaea stagnalis* на поверхности спороцисты трематоды *Diplostomum pseudospathaceum* (сем. Diplostomidae) в условиях *in vitro*. Условные обозначения: дс – дочерние спороцисты; стрелками обозначены гемоциты.

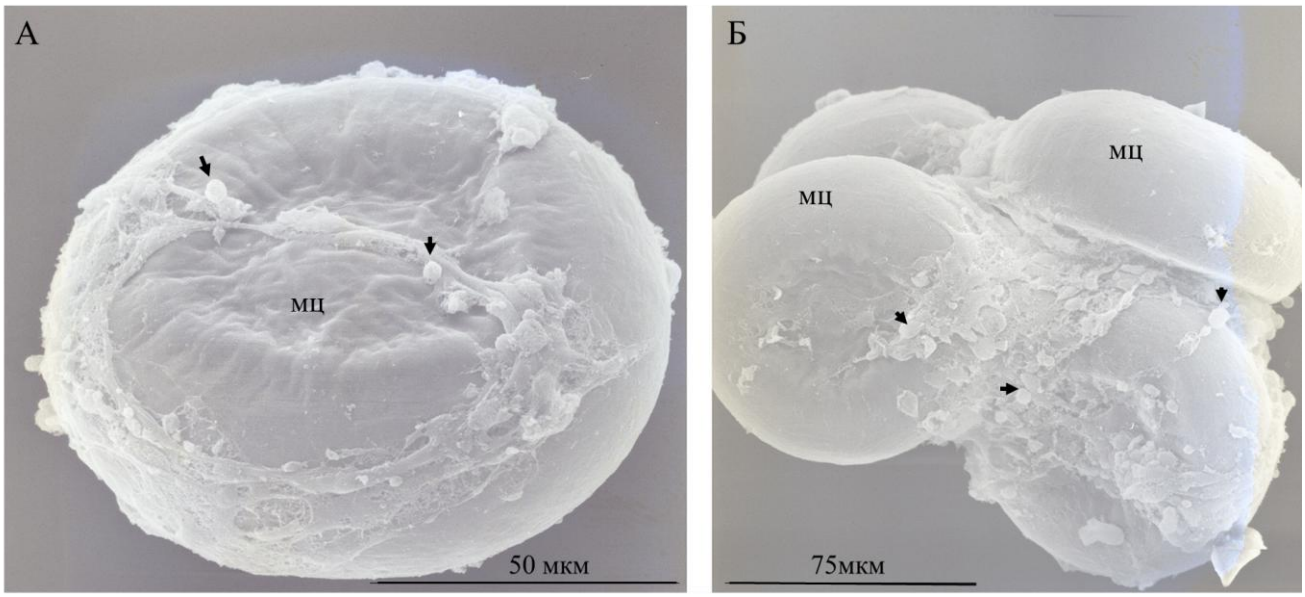


Рисунок 121. Гемоциты моллюска *Biomphalaria pfeifferi* на поверхности метацеркарий трематод *Echinostoma caproni* (сем. Echinostomatidae) в условиях *in vitro*. А – метацеркария; Б – агглютинация гемоцитами метацеркарий. Условные обозначения: мц – метацеркарии; стрелками обозначены гемоциты. Фотографии предоставлены Г. Л. Атаевым.

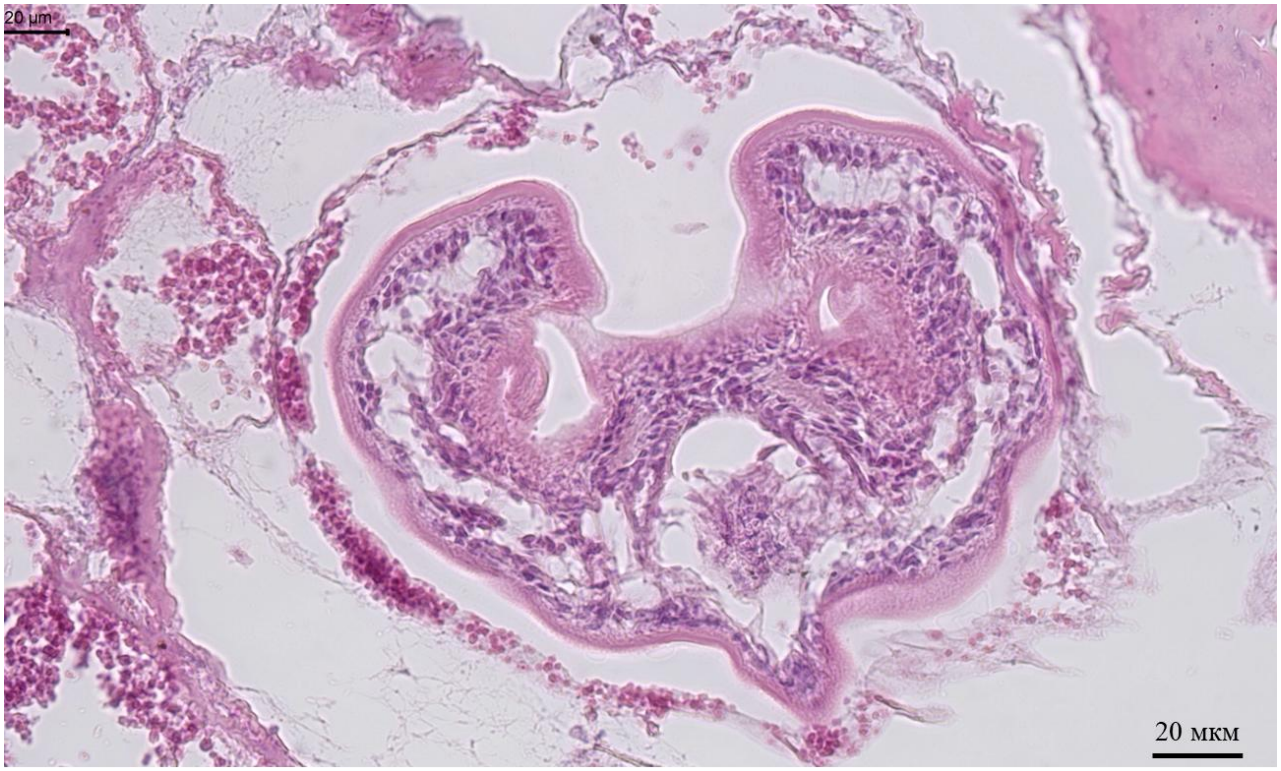


Рисунок 122. Метацеркария трематоды *Echinostoma revolutum* (сем. Echinostomatidae) в моллюске *Lymnaea stagnalis.*

В качестве одного из факторов иммунизации в работе были использованы ксенотрансплантаты – вибриссы домашней кошки. Фрагменты самостоятельно выпавших вибрисс длиной 1.5 мм и диаметром 160 мкм вводился в ткани моллюсков *Planorbarius corneus* лабораторной линии с помощью инъекционной иглы (наружный диаметр 450 мкм).

На гистологических срезах моллюсков, зафиксированных через 24 часа после введения ксенотрансплантата, наблюдается выраженная клеточная реакция (рисунки 125, 126, 127). Трансплантат находится в канале, образованном в ткани моллюска инъекционной иглой (рисунок 125). Вокруг раневого канала и трансплантата наблюдается хорошо заметное скопление гемоцитов (рисунок 125А, Б). Стенка раневого канала купирована гемоцитами, формирующими капсулу из нескольких слоев (от 5 до 15) клеток (рисунки 125А, 126). Гемоциты в составе капсулы имеют уплощенную форму. Максимальная толщина стенки капсулы составляет 48 мкм. На поверхности вибрисса в 1–2 слоя также располагаются распластанные гемоциты (рисунок 125В).

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

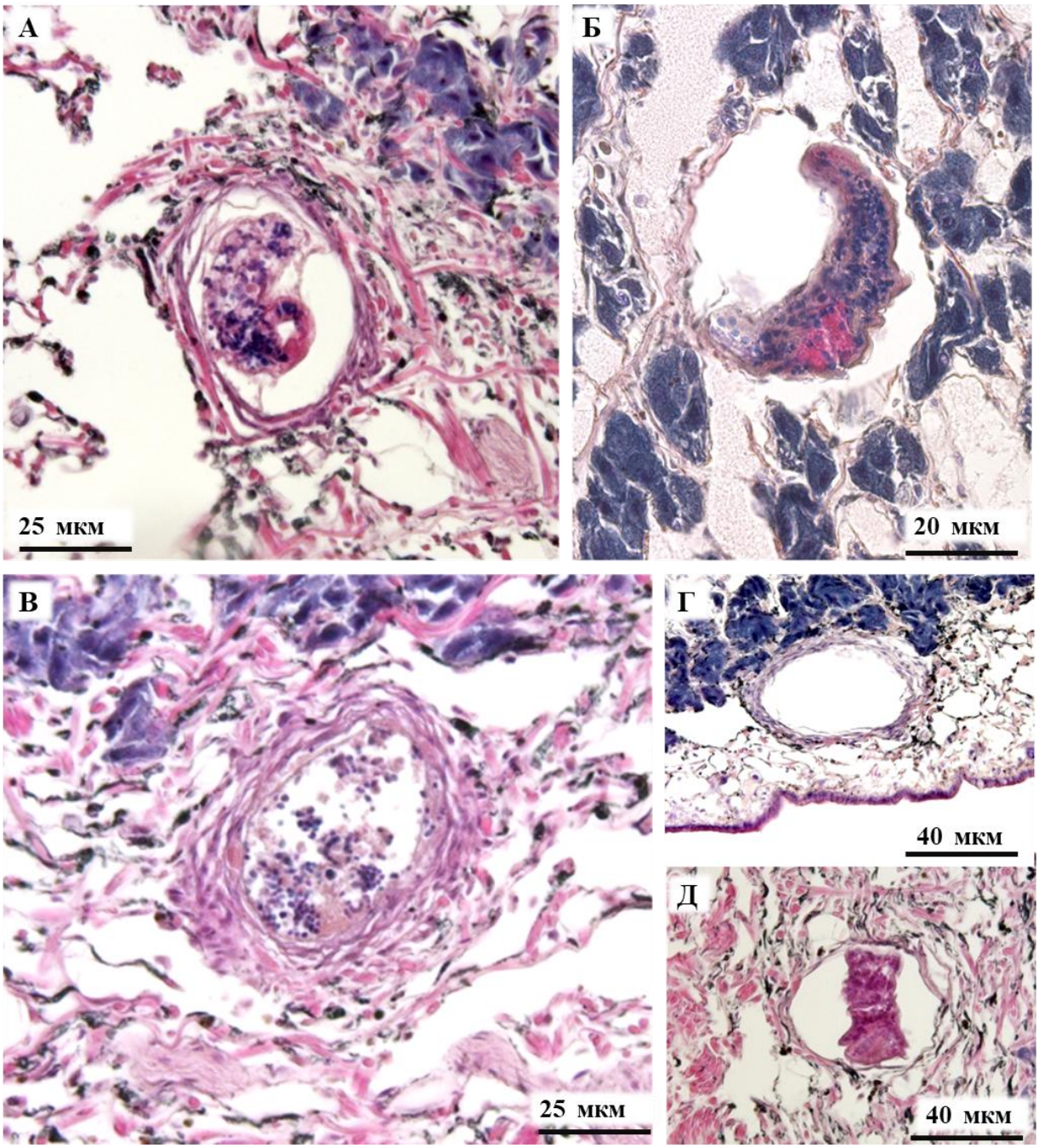


Рисунок 123. Клеточная реакция на метацеркарий трематод рода *Echinostoma* в моллюске *Planorbarius corneus.* А – инкапсулированная метацеркария; Б – неинкапсулированная метацеркария. В – деградирующая метацеркария внутри гемоцитарной капсулы; Г – гемоцитарная капсула без метацеркарии; Д – деградирующая метацеркария, не окружённая капсулой.

В то же время ближе к дистальному участку введенного трансплантата со стороны стенки раневого канала образуется скопление гемоцитов, достигающее поверхности волоска и окружающее его несколькими слоями (рисунок 125Б, В). Составляющие это скопление клетки имеют полигональную форму и хорошо заметные псевдоподии, что может свидетельствовать об их подвижности. Можно предположить, что в дальнейшем это скопление увеличилось бы в размерах и постепенно заполнило весь просвет раневого канала, надёжно инкапсулировав

ксенотрансплантат от окружающих тканей. Гемоциты, сходные по морфологическим признакам, локализуются в непосредственной близости от наружной поверхности капсулы раневого канала. (рисунок 126В).

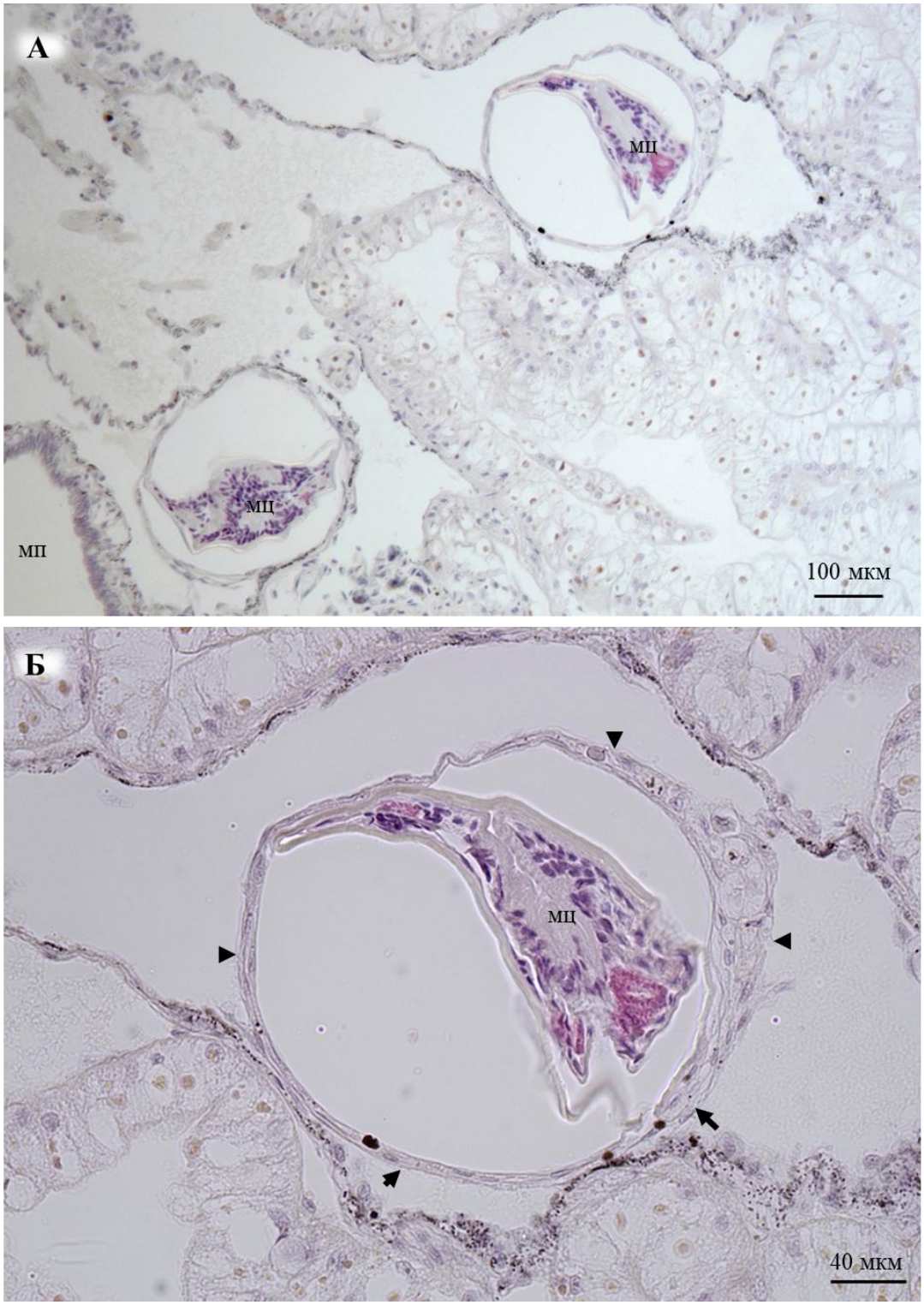


Рисунок 124. Клеточная реакция на метацеркарии *Echinostoma caproni* (сем. Echinostomatidae) в моллюске *Biomphalaria pfeifferi.* А – расположение цист с метацеркариями; Б – адгезия гемоцитов на поверхности метацеркарии. Условные обозначения: мц – метацеркарии; мп – мантийная полость; стрелками обозначена гемоцитарная капсула. Препараты предоставлены Г. Л. Атаевым.

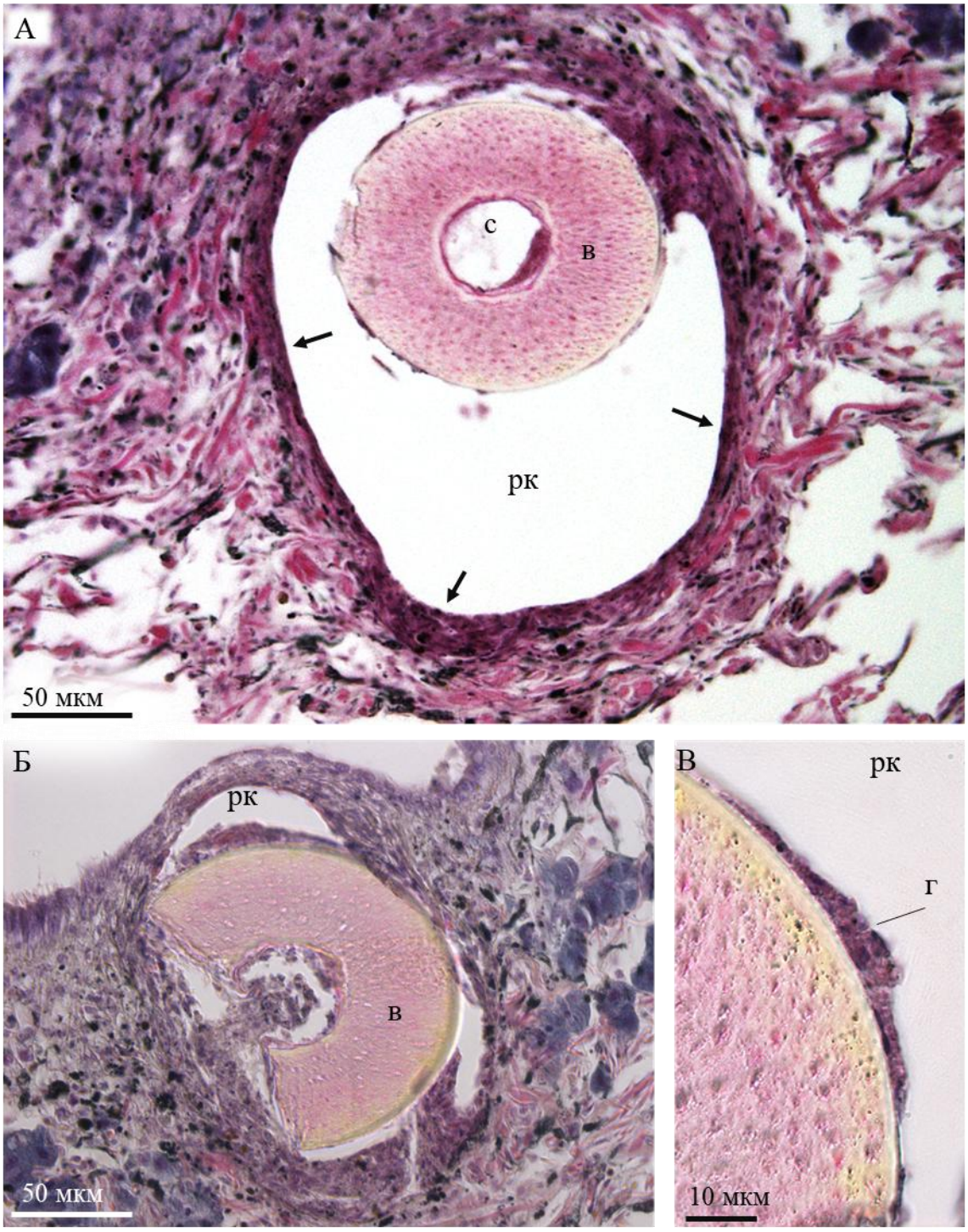


Рисунок 125. Клеточная реакция через 24 часа после введения ксенотрансплантата (вибрисса кошки) в ногу моллюска *Planorbarius corneus*. А – срез через середину трансплантата; Б – срез через проксимальную часть трансплантата (со стороны подошвы моллюска); В – распластывание гемоцитов на поверхности вибрисса. Условные обозначения: рк – раневой канал; в – вибрисс; г – гемоциты; с – сердцевина вибрисса; стрелками обозначена гемоцитарная капсула (по: Прохорова и др., 2015b, с изменениями)

Гемоциты также проникают в центральную часть вибрисса (рисунки 125А, 126Б, В, Г). Клетки в сердцевине вибрисса имеют гранулярную цитоплазму и псевдоподии, то есть по

морфологическим характеристикам соответствуют гранулоцитам (рисунок 127Г). Инкубирование вибрисса *in vitro* во влажной камере с гемолимфой также приводит к постепенному налипанию и распластыванию на его поверхности гранулоцитов (рисунок 126Д).

Дистальная часть раневого канала, в которой не располагается трансплантат, также изолирована капсулой из нескольких концентрических слов гемоцитов (рисунок 126А). Наиболее близкая к покровам моллюска часть канала заполнена гемоцитами, не формирующими капсулы (рисунок 127А). Такое скопление напоминает агглютинацию или лейкоцитарный тромб.

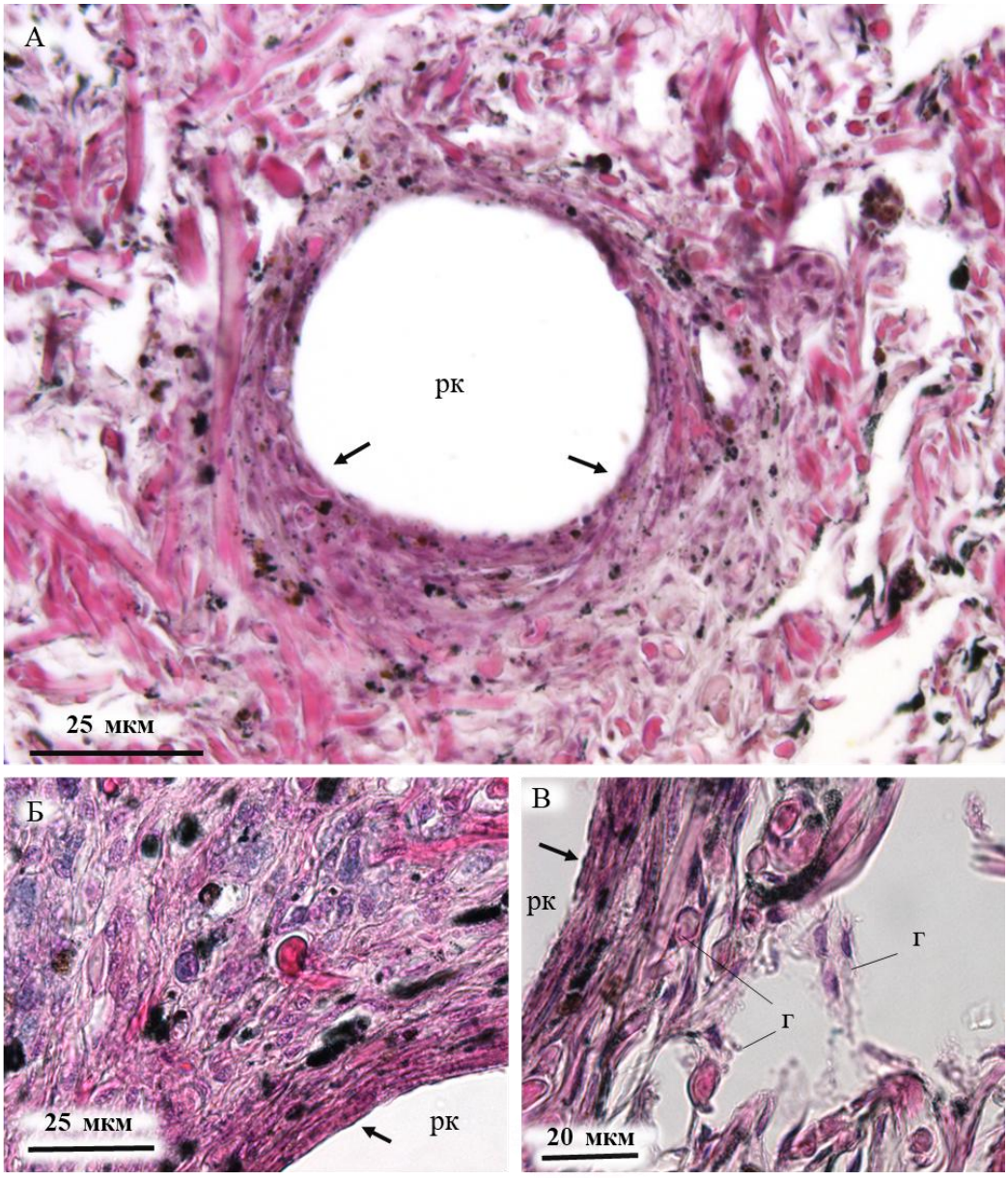


Рисунок 126. Клеточная реакция в раневом канале через 24 часа после введения ксенотрансплантата (вибрисса кошки) в ногу моллюска *Planorbarius corneus.* А – дистальная часть раневого канала; Б, В – срез через гемоцитарную капсулу в раневом канале. Условные обозначения: см. рисунок 125 (по: Прохорова и др., 2015b, с изменениями)

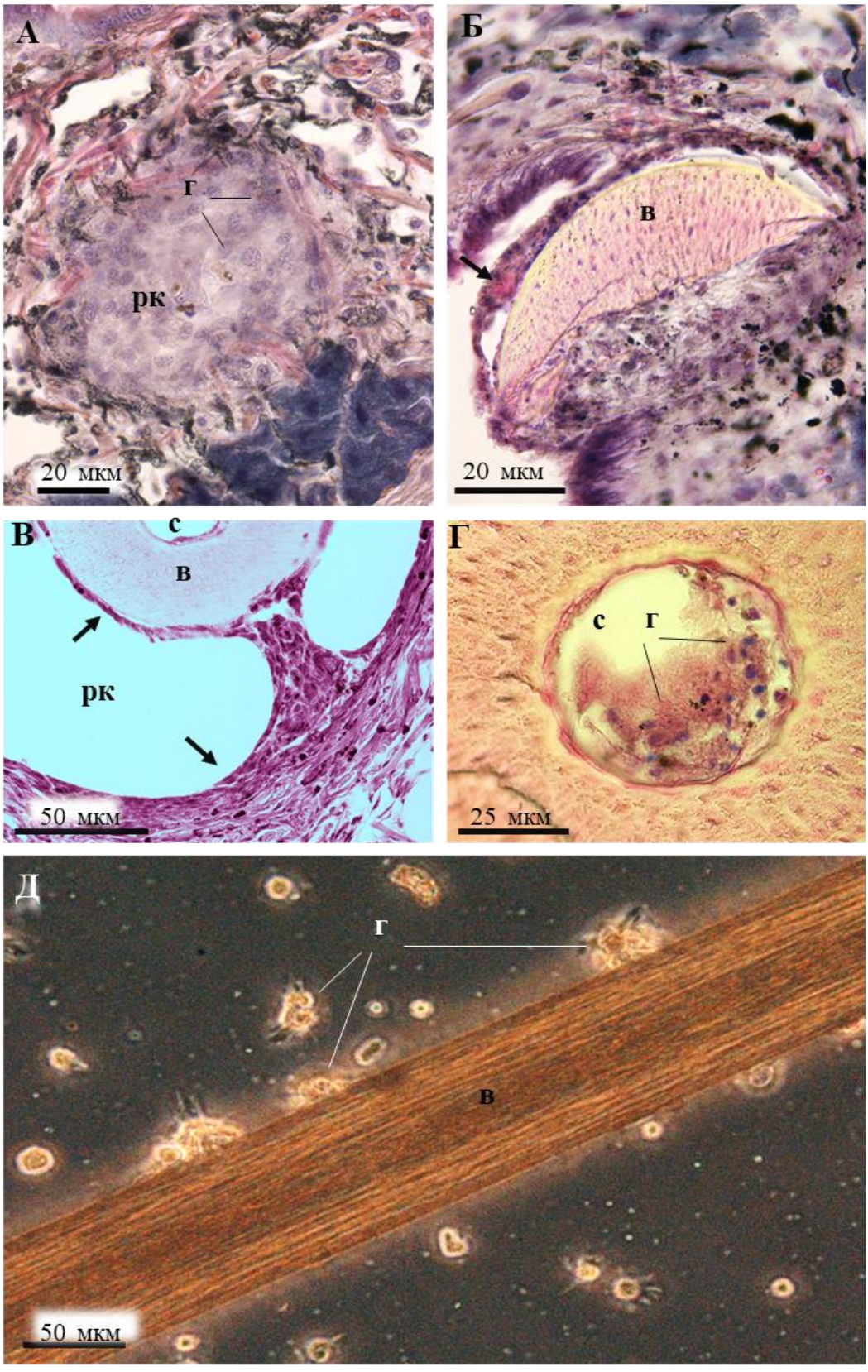


Рисунок 127. Клеточная реакция моллюска *Planorbarius corneus* на ксенотрансплантат (вибрисс кошки). А–Г – заполнение раневого канала и сердцевины ксенотрансплантата гемоцитами; Д – инкубирование вибрисса в гемолимфе. Гемоциты адгезируют на поверхности волоса. Условные обозначения: см. рисунок 125.

Обсуждение к разделу III.4.1.

Основными формами клеточного иммунного ответа в системе врождённого иммунитета являются фагоцитоз и инкапсуляция. У позвоночных животных за реализацию этих процессов отвечают лейкоциты гранулоцитарной и гранулоцитарной и моноцитарно-макрофагальной линии (Купер, 1980; Varol et al., 2015). У лёгочных моллюсков эти функции выполняют гемоциты.

Проявления фагоцитарной активности гемоцитов были рассмотрены в разделе III.2.3. Оба типа гемоцитов – гранулоциты и гиалиноциты – проявляют фагоцитарную активность. Однако по большинству функциональных характеристик, влияющих на способность к фагоцитозу (подвижность, способность к агглютинации, интенсивность выработки АФК, количество лизосом и др.) именно гранулоциты проявляют себя как более активные фагоциты (см. раздел III.2).

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 (Прохорова, 2009; Токмакова; 2018; Jourdane, Cheng 1987; Ataev, Coustau, 1999; Атаев и др., 2024а).

Первые признаки клеточной реакции на проникновение патогена проявляются уже через 6 часов после иммунизации (Атаев, Прохорова, 2013). При введении ксенотрансплантата в ткани ноги моллюска *Planorbarius corneus* через 24 часа наблюдаются сформированные гемоцитарные капсулы. Учитывая, что активация гемопоэза в АПО моллюсков начинается через сутки после иммунизации (Ataev, Coustau; 1999; Атаев, Прохорова, 2013; Токмакова, 2018), можно сделать вывод, что в формировании этих капсул в первую очередь участвуют гемоциты из окружающих тканей. Такая тканевая реакция предшествует активизации АПО и является неспецифической. Она направлена на изоляцию патогена от окружающих тканей моллюска.

Феномен миграции гемоцитов из циркуляции в ткани подробно описан у пульмонат как **первичная клеточная реакция** (Cheng, Jourdane 1987; Атаев, Полевщиков 2004; Токмакова 2018; Атаев и др., 2020). Неспецифичность первичной клеточной реакции проявляется в том, что во всех случаях вокруг патогена образуется скопление распластывающихся гемоцитов, пытающихся изолировать его от окружающих тканей. Вокруг патогенов различной природы формируются капсулы, схожие по строению. Как правило они являются многослойными. Гемоциты в составе внутренних слоёв капсул уплощены, гемоциты внешних слоёв по морфологии соответствуют гранулоцитам. Многими авторами описан просвет между

внутренней поверхностью капсулы и телом паразита (Connors, Yoshino, 1990; Connors et al., 1991; Ataev, Coustau, 1999; Adema et al., 2000). Принято считать, что в нём накапливаются цитотоксические факторы, обеспечивающие уничтожение патогена.

Результатом эффективной первичной реакции может стать гибель патогена или его долговременная изоляция внутри гемоцитарной капсулы. В случае локализации патогена вблизи покровов моллюска возможно его «выдавливание» во внешнюю среду и купирование повреждений в тканях, возникающих при его проникновении (Lie, Heyneman, 1976a). В зависимости от вида (или линии) моллюска и вида трематод, а также их локализации в хозяине первичная реакция выражена с разной интенсивностью. Во многих случаях она приводит не только к изоляции паразита, но и к его гибели (Атаев и др., 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. В участках гемопоэза активируются процессы пролиферации (см. раздел. III.2.4). Вновь образованные гемоциты завершают начатые предшественниками процессы клеточной реакции, либо ликвидируют их последствия (рисунок 128).

После ликвидации источника воспаления происходит разборка внешних слоев капсулы. При этом строение гемопоэтических структур и количественные характеристики клеточного состава гемолимфы возвращаются в исходное состояние. Аналогичные капсулы вокруг чужеродных объектов описаны для многих беспозвоночных и позвоночных животных (Галактионов, 2005). Более того, описанная двухэтапность клеточной защитной реакции пульмонат аналогична воспалительной реакции млекопитающих, у которых патоген вначале также вызывает воспалительный процесс, а позднее в реакцию вовлекаются форменные элементы, образованные в результате активации гемопоэтических структур (Купер, 1980).

Эффективность клеточной реакции зависит как от специфичности патогена конкретному виду моллюсков, так и от индивидуальных особенностей моллюска. В моллюсках *Biomphalaria glabrata* резистентных к заражению линий инкапсуляция спороцист трематод может приводить к их элиминации (Ataev, Coustau, 1999; Атаев, 2000). В таких моллюсках партениты могут быть инкапсулированы уже в начале заражения (в результате первичной клеточной реакции) – до начала миграции (Ataev, Coustau, 1999). Тем не менее, большинство спороцист покидают район начальной локализации и устремляются к сердцу. Именно здесь и происходит их инкапсуляция силами вторичной гемоцитарной реакции, вероятно, с участием клеток, сформировавшихся после активации гемопоэтических структур (Ataev, Coustau, 1999).

Также в районе локализации паразита могут образовываться агглютинации гемоцитов. Однако инкапсуляции не происходит, и паразиты продолжают нормально развиваться (Ataev, Coustau 1999). В дальнейшем подобные агглютинации разбираются, и внешних проявлений

клеточных реакций на трематодную инвазию не наблюдается. При этом в гемолимфе зараженного моллюска сохраняется повышенное количество гемоцитов по сравнению с интактными животными (Атаев и др., 2020).

Повторная иммунизация моллюсков *B. glabrata* мирацидиями *Echinostoma lindoense* приводит к более быстрой клеточной реакции и элиминации спороцист в поверхностных тканях моллюска (Lie, Heyneman, 1975a). В то же время, описаны случаи, кода при повторном заражении происходит деградация спороцист трематод без инкапсуляции (Pinaud et al., 2016, 2019). Предполагается, что в этом случае решающую роль в уничтожении патогена играют гуморальные факторы иммунитета.

Более быстрая элиминация патогенов при повторной иммунизации может свидетельствовать о наличии иммунной памяти у моллюсков. Установлено, что гемоциты молоди *Lymnaea stagnalis* проявляют повышенную продукцию АФК и пероксидазную активность, если родительское поколение было инфицировано трематодами. При этом реакция на заражение церкариями *Echinoparyphium aconiatum* различается в группах потомков заражённых и незаражённых родителей. У молоди от заражённых родителей активность продукции АФК не растёт, а пероксидазная активность снижается. Напротив, у потомства незаражённых родителей в гемолимфе наблюдается рост данных показателей (Vorontsova et al., 2019).

Во всех случаях мы не обнаружили выраженной клеточной реакции на зрелые инфрапопуляции партенит трематод. Ситуации, когда в моллюске успешно развиваются и размножаются дочерние генерации партенит, вероятно, являются результатом либо неэффективной первичной клеточной реакции, либо следствием её отсутствия. Такое возможно в случае восприимчивого к заражению конкретным видом трематод фенотипа / генотипа моллюска (Прохорова, Атаев, 2008).

Различные варианты проявления клеточного иммунного ответа наблюдаются и в ответ на заражение метацеркариями, которые используют моллюсков в качестве вторых промежуточных хозяев. В одном моллюске *Planorbarius corneus* выявлены как инкапсулированные метацеркарии (как живые, так и с признаками деградации), так и неинкапсулированные. В моллюсках *Biomphalaria pfeifferi* метацеркарии эхиностом изолированы осевшими на них гемоцитами, однако продолжают развиваться. Интенсивное заражение моллюсков метацеркариями является патологическим процессом, который может вызывать гибель моллюска (Атаев, 2010). Однако то, будет ли инкапсулирована матацеркария, зависит от многих факторов – способа проникновения в моллюска, локализации, размеров и физиологического состояния моллюска, динамики его заражения церкариями. Также описаны случаи выхода инцистированных метацеркарий из моллюсков (Ataev, 2023).

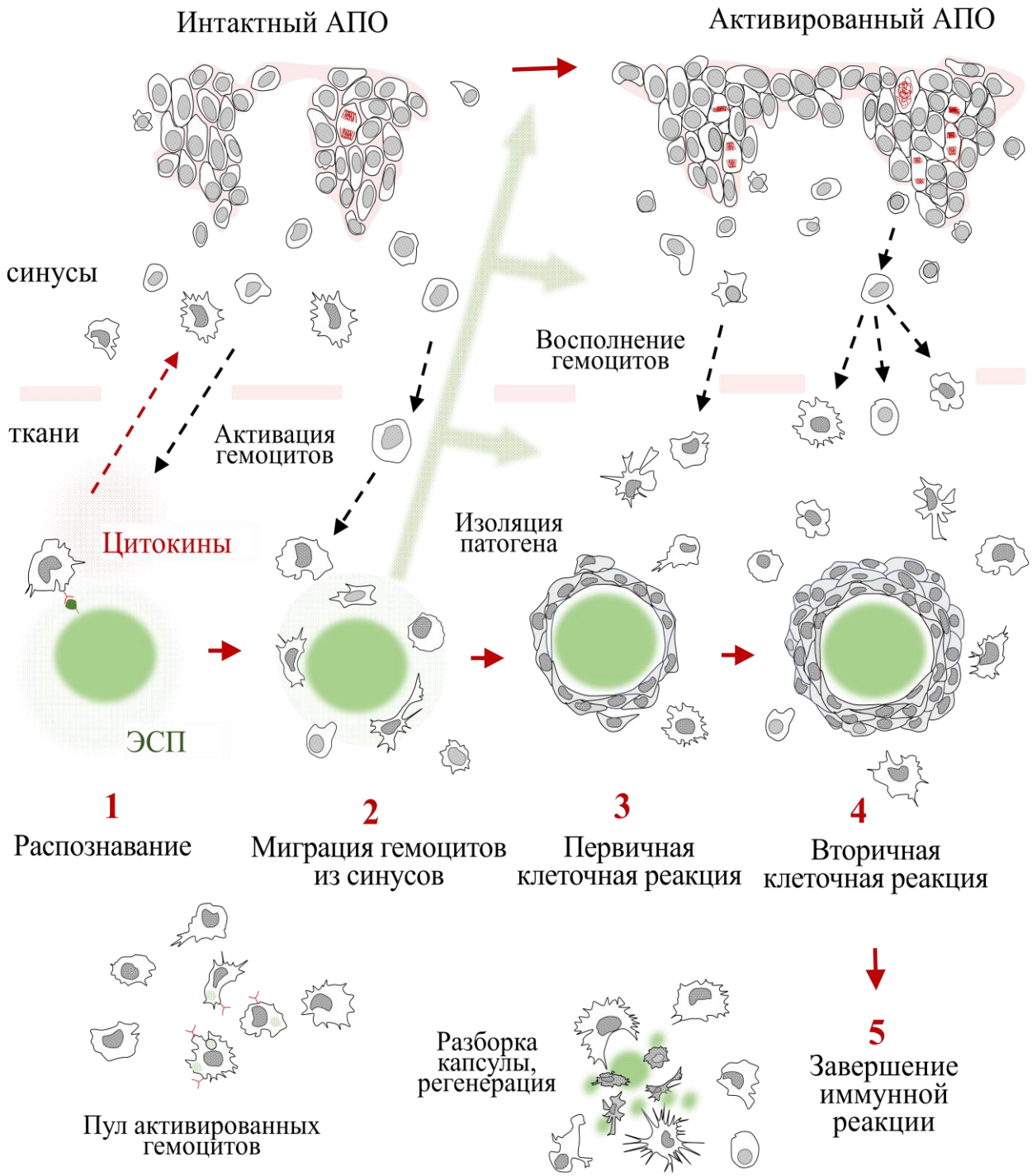


Рисунок 128. Схема иммунного ответа лёгочных моллюсков (пояснения в тексте).

Своеобразным вариантом клеточной реакции является формирование **гемоцитарной мантии** вокруг паразита. Такой тип клеточной реакции изначально был описан для моллюсков, заражённых трематодами из отряда Plagiorchiata (Schell, 1965; Добровольский, Райхель, 1973). Гемоциты заражённого моллюска оседают на поверхность тегумента спороцисты, формируя так называемую мантию («paletot»), которая изолирует паразита от окружающих тканей хозяина. В отличии от гемоцитов в составе капсул, гемоциты мантии не повреждают паразита.

Предполагается, что гемоциты мантии защищают паразита от действия факторов иммунитета моллюска и участвуют в его питании. Установлено, что в клетках мантии накапливается большое количество гликогена, а также высока активность ферментов цикла Кребса (Галактионов, Добровольский, 1998). При этом дегенерирующие спороцисты не способны поддерживать сохранность мантии. Они подвергаются инкапсуляции вместе с мантией (см. Атаев, Полевщиков, 2004). В настоящее время предлагается расширить применение термина «мантия» на все случаи гемоцитарной изоляции трематод, при которой паразит не только не погибает, но и способен завершить своё развитие.

Обычно мантия покрывает всё тело паразита. При этом у него сохраняется возможность использовать ресурсы хозяина. Однако она может и прерываться в определённых участках. Такой пример демонстрируют спороцисты рода *Leucochloridium*, у которых в центральная часть столона спороцисты покрыта крупноячеистой сетью из гемоцитов, а на отростках спороцист мантия отсутствует (рисунок 119).

Ш.4.2. Изменение гемоцитарного состава при иммунизации

Количество гемоцитов. Данные по изменению количества гемоцитов у моллюсков модельных видов при иммунизации бактериями и заражении трематодами представлены в разделе Ш.2.2. Ввиду того, что на численность гемоцитов и их соотношение оказывает влияние множество факторов, включая размеры (возраст) улиток (см. раздел Ш.2.2), для оценки влияния заражённости на численность гемоцитов были использованы только моллюски основных размерных групп (рисунки 67–70). У иммунизированных бактериями *E. coli* улиток забор гемолимфы производился через 24–48 часов после иммунизации. Анализ количества гемоцитов при заражении трематодами во всех случаях проводился у моллюсков со зрелым заражением.

Иммунизация бактериями приводит к росту численности гемоцитов. Так у моллюсков *Planorbarius corneus* с диаметром раковины 25–28 мм в гемолимфе содержится в среднем 320 клеток в 1 мкл гемолимфы, а у иммунизированных бактериями (n=48) – 466, что достоверно больше, чем у неиммунизированных ($p<0.01$) (рисунок 67). Иммунизация бактериями моллюсков *Biomphalaria glabrata* (n=14) также приводит к росту численности гемоцитов в циркуляции: в среднем с 73 до 160 клеток в 1 мкл ($p<0.005$) (рисунок 69). У иммунизированных бактериями моллюсков *Lymnaea stagnalis* (n=31), гемоцитов также больше, чем у неиммунизированных (682 и 561 в 1 мкл соответственно) (рисунок 70). У моллюсков *Planorbis planorbis,* иммунизированных бактериями (n=18), в 1 мкл гемолимфы содержится в среднем 503 гемоцита, что достоверно выше, чем у неиммунизированных моллюсков той же размерной группы (392 в 1 мкл) ($p<0.01$) (рисунок 68).

У заражённых трематодами улиток не всегда наблюдается выраженный рост количества гемоцитов. Так у заражённых трематодами моллюсков *Planorbarius corneus* с диаметром раковины 25–28 мм в гемолимфе содержится в среднем 346 клеток в 1 мкл гемолимфы, что немного больше, чем у незаражённых (n=229), однако, выявленные различия не являются достоверными (рисунок 67). Для моллюсков *Succinea putris*, заражённых трематодами рода *Leucochloridium* (n=28), также не было выявлено различий в концентрации гемоцитов по сравнению с незаражёнными особями (n=62) (146 и 153 гемоцитов в 1 мкл соответственно). У моллюсков *Planorbis planorbis,* заражённых трематодами (n=19), в 1 мкл гемолимфы содержится в среднем 579 гемоцитов, что несколько больше, чем у неиммунизированных моллюсков (n=23). Однако выявленные различия таже не являются значимыми. Для прудовиков *Lymnaea stagnalis* также не было выявлено достоверных различий в численности циркулирующих гемоцитов между заражёнными трематодами (n=17) и незаражёнными особями (n=81) (561 и 648 в 1 мкл гемолимфы соответственно).

Соотношение гемоцитов у заражённых трематодами моллюсков *Planorbarius corneus.* Анализ соотношения гемоцитов у моллюсков при заражении трематодами был выполнен с помощью проточной цитометрии.

Было установлено, что у моллюсков *P. corneus*, заражённых трематодами, соотношение гранулоцитов и гиалиноцитов может отличаться от незаражённых. Так у моллюсков, заражённых трематодами *Cotylurus brevis*, *Notocotylus ephemera* и *Echinostoma spiniferum* относительное количество гиалиноцитов достоверно меньше, чем у незаражённых моллюсков (таблица 43, рисунок 129).

Кроме того, выявлены различия в относительном количестве гранулоцитов и гиалиноцитов у моллюсков, заражённых трематодами разных видов. В частности, у *Planorbarius corneus,* заражённых *Cotylurus brevis* и *Notocotylus ephemera,* гранулоцитов достоверно больше, чем у моллюсков, заражённых *Echinostoma spiniferum.* В выборке моллюсков, заражённых *Plagiorchis multiglandularis,* гиалиноцитов больше, чем у улиток, заражённых трематодами других трёх видов. При этом гранулоцитов у них меньше, чем у заражённых *Cotylurus brevis u Notocotylus ephemera.* У заражённых эхиностомой моллюсков относительное количество гранулоцитов достоверно не отличается от незаражённых.

Как уже было отмечено в разделе III.2, первоначально цитометрический анализ гемолимфы моллюсков модельных видов осуществлялся на проточном цитометре Coulter Epics Altra с выделением популяции гиалиноцитов и одной популяции гранулоцитов. Позднее исследования проводились на цитометре BD Accuri™ C6 с разделением гранулоцитов на две популяции – B и C. Эти исследования также подтвердили влияние заражения трематодами на соотношение гранулоцитов и гиалиноцитов. У незаражённых моллюсков *Planorbarius corneus*

гранулоцитов достоверно больше, а гиалиноцитов значимо меньше, чем у заражённых (таблица 44). При этом изменения в относительном количестве гранулоцитов происходят в пределах популяции B. Относительное количество гранулоцитов популяции C не отличается у незаражённых и заражённых улиток.

Таблица 43. Соотношение типов гемоцитов в гемолимфе моллюсков *Planorbarius corneus* по данным анализа на проточном цитометре Coulter Epics Altra

Типы гемоциов	Группы моллюсков	Незаражён-ные (H) (n=31)	Заражённые *Cotylurus brevis* (Cb) (n=10)	Заражённые *Notocotylus ephemera* (Ne) (n=12)	Заражённые *Plagiorchis multiglandularis* (Pm) (n=14)	Заражённые *Echinostoma spiniferum* (Es) (n=10)
Процент клеток от общего количества гемоцитов (Me (K1; K3))						
A (гиалиноциты)	*p-value*	59.90 (52.05; 62.67)	**32.95 (25.37; 40.45)**	**32.10 (38.92; 29.62)**	**58.10 (52.4; 60.15)**	**41.31 (35.25; 47.70)**
	H	—	p<0.0001	p<0.0001	—	p<0.005
	Cb	p<0.0001	—	—	p<0.05	—
	Ne	p<0.0001	—	—	p<0.005	—
	Pm	—	p<0.05	p<0.005	—	p<0.001
	Es	p<0.005	—	—	p<0.001	—
B (гранулоциты)	*p-value*	35.10 (32.90; 44.10)	**58.30 (53.25; 62.47)**	**54.90 (61.45; 48.75)**	**31.30 (27.55; 36.55)**	40.00 (32.68; 42.00)
	H	—	p<0.001	p<0.0005	—	—
	Cb	p<0.001	—	—	p<0.01	p<0.05
	Ne	p<0.0005	—	p<0.001	p<0.001	p<0.05
	Pm	—	p<0.01	—	—	—
	Es	—	p<0.05	p<0.05	—	—

Условные обозначения: p-value - уровень значимости для достоверных различий; жирным выделены значения, достоверно отличающиеся в группах заражённых моллюсков от незаражённых.

Для более подробного анализа влияния зараженности трематодами на клеточный состав гемолимфы было выполнено отдельное исследование гемолимфы моллюсков *Planorbarius corneus*, заражённых трематодами *Plagiorchis multiglandularis.* Гемолимфу окрашивали специфическим лизосомным (LysoTracker), митохондриальным (MitoTracker) и нуклеиновыми красителями (SYTO62 и SYTO16). При анализе на цитометре фиксировали значения FS и SS, а также интенсивности флуоресценции красителей (таблица 36, приложения 21–23).

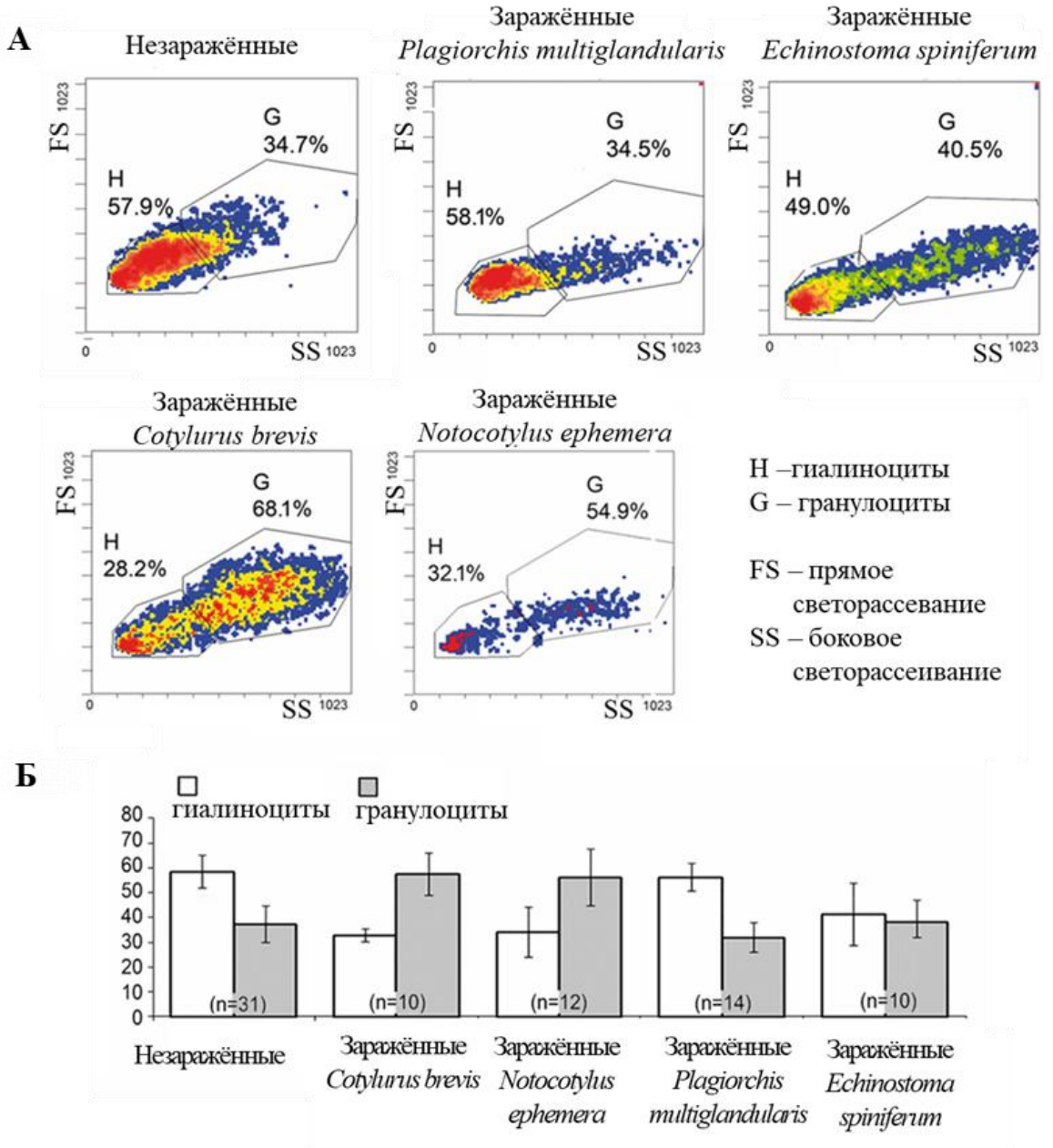


Рисунок 129. Цитофлуориметрический анализ гемолимфы у моллюсков *Planorbarius corneus*, заражённых трематодами разных видов. А – индивидуальные цитофлуорограммы гемолимфы моллюсков *P. corneus*, заражённых трематодами разных видов, а также незаражённой особи; Б – диаграмма соотношения гранулоцитов и гиалиноцитов у моллюсков *P. corneus* при заражении трематодами и у незаражённых особей (по: Ataev, Prokhorova et al., 2016, с изменениями).

Для каждой исследуемой популяции гемоцитов были определены пределы значений FS и SS (таблица 45). Установлено, что самый низкий показатель FS у клеток популяции С, а самый высокий – у популяции В. Соответственно, гранулоциты популяции В достоверно крупнее гиалиноцитов, которые в свою очередь, крупнее гранулоцитов популяции С (рисунок 130).

Показатель SS усиливается в ряду: гиалиноциты – гранулоциты популяции B – гранулоциты популяции C.

Было установлено, что у заражённых моллюсков медианная численность гиалиноцитов (популяция A) в 3 раза больше, чем у незаражённых (17.01% и 54.87% соответственно) (таблица 45). Численность гранулоцитов популяции B у заражённых моллюсков примерно в 2 раза выше, чем у незаражённых (65.99% и 32.35% по медиане соответственно). Относительное количество гранулоцитов популяции C существенно не отличается между заражёнными и незаражёнными особями.

Показатели FS и SS различаются у гиалиноцитов (популяция A) заражённых и незаражённых моллюсков. У заражённых они достоверно ниже, чем у незаражённых (таблица 45). Следовательно, клетки популяции A у заражённых особей мельче и имеют более простую структуру, чем у незаражённых. Показатели FS и SS гранулоцитов популяций B и C у заражённых улиток в достоверно не отличаются от незаражённых. Таким образом, заражение приводит к уменьшению размера гиалиноцитов, но не гранулоцитов.

Сравнение интенсивности флуоресценции красителей Syto62 и LysoTracker в гемоцитах популяций A, B и C не выявило достоверных различий между группами зараженных и незараженных моллюсков (приложение 21).

Таблица 44. Соотношение типов гемоцитов в гемолимфе моллюсков *Planorbarius corneus*, заражённых трематодами разных видов, а также незаражённых особей по данным анализа на проточном цитометре BD Accuri™ C6

Типы гемоцитов	Процент клеток от общего количества гемоцитов (Me (Q1; Q3))		p-value
	Незаражённые (n=52)	Заражённые *Cotylurus brevis, Notocotylus ephemera, Plagiorchis multiglandularis, Echinostoma spiniferum* (n=48)	
A (гиалиноциты)	58.07 (39.25; 71.44)	**20.42 (10.48; 35.33)**	p<0.0001
B (гранулоциты)	28.28 (21.42; 45.60)	**61.25 (50.89; 78.38)**	p<0.0001
C (гранулоциты)	9.55 (4.50; 15.09)	8.99 (5.94; 15.98)	—

Условные обозначения: p-value – уровень значимости для достоверных различий; жирным выделены значения, достоверно отличающиеся в группах заражённых моллюсков от незаражённых.

Таблица 45. Соотношение популяций гемоцитов и значения показателей прямого и бокового светорассеяния гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus*, заражённых трематодами *Plagiorchis multiglandularis,* а также незаражённых особей по данным анализа на проточном цитометре BD Accuri™ C6
(по: Serebryakova, Tokmakova, Prokhorova, Ataev, 2022, с изменениями)

Популяции гемоцитов	Процент клеток от общего количества		Значение прямого светорассеивания (FS)		Значение бокового светорассеивания (SS)	
	Незаражённые	Заражённые	Незаражённые	Заражённые	Незаражённые	Заражённые
A	**54.87 *** (42.91; 65.75)**	**17.01 *** (14.16; 3.16)**	**16.83×10^5 (16.01×10^5; 17.94×10^5) ***	**15.58×10^5 (15.17×10^5; 16.21×10^5) ***	**91.80×10^3 (80.21×10^3; 98.17×10^3)**	**76.49×10^3 (64.82×10^3; 90.05×10^3)**
B	**32.35 ** (22.40; 43.62)**	**65.99** (50.89; 5.79)**	26.99×10^5 (25.28×10^5; 28.20×10^5)	25.72×10^5 (23.48×10^5; 28.03×10^5)	216.13×10^3 (195.88×10^3; 225.32×10^3)	211.09×10^3 (188.60×10^3; 234.14×10^3)
C	11.15 (8.71; 15.51)	14.22 (10.65; 27.16)	12.75×10^5 (10.92×10^5; 13.11×10^5)	13.09×10^5 (11.41×10^5; 14.34×10^5)	249.71×10^3 (223.72×10^3; 273.44×10^3)	278.28×10^3 (254.62×10^3; 286.70×10^3)

Условные обозначения: для каждого значения приведены Me (K1; K3); звёздочками обозначены уровни значимости для достоверных различий: * – $p<0.05$, ** – $p<0.01$; *** – $p<0.001$; жирным выделены значения, достоверно отличающиеся в группах заражённых моллюсков от незаражённых.

Анализ накопления гемоцитами флуоресцентных красителей также позволил выявить различия между популяциями гемоцитов (рисунок 131). Максимальный уровень накопления лизосомного, митохондриального и нуклеинового красителя SYTO62 наблюдается в клетках популяции B (рисунок 132). Клетки популяции A в сравнении с клетками популяции C лучше накапливают LysoTracker, но хуже накапливают SYTO62. Окраска SYTO16 не выявила достоверных различий между клетками популяций A и B. Однако клетки популяции C демонстрируют минимальный уровень флуоресценции данного красителя среди клеток гемолимфы. Митохондриальный краситель лучше всего накапливается в гранулоцитах популяции B. При этом различий между гиалиноцитами и гранулоцитами популяции C по этому показателю выявлено не было (рисунок 132, приложение 21).

Так как для гиалиноцитов и гранулоцитов были выявлены различия по степени накопления лизосомного красителя и нуклеинового красителя SYTO62, именно эти флуорохромы были выбраны для дальнейшего типирования клеток. В результате удалось

разделить гемоциты *Planorbarius corneus* на четыре группы по накоплению красителей (рисунок 130Б).

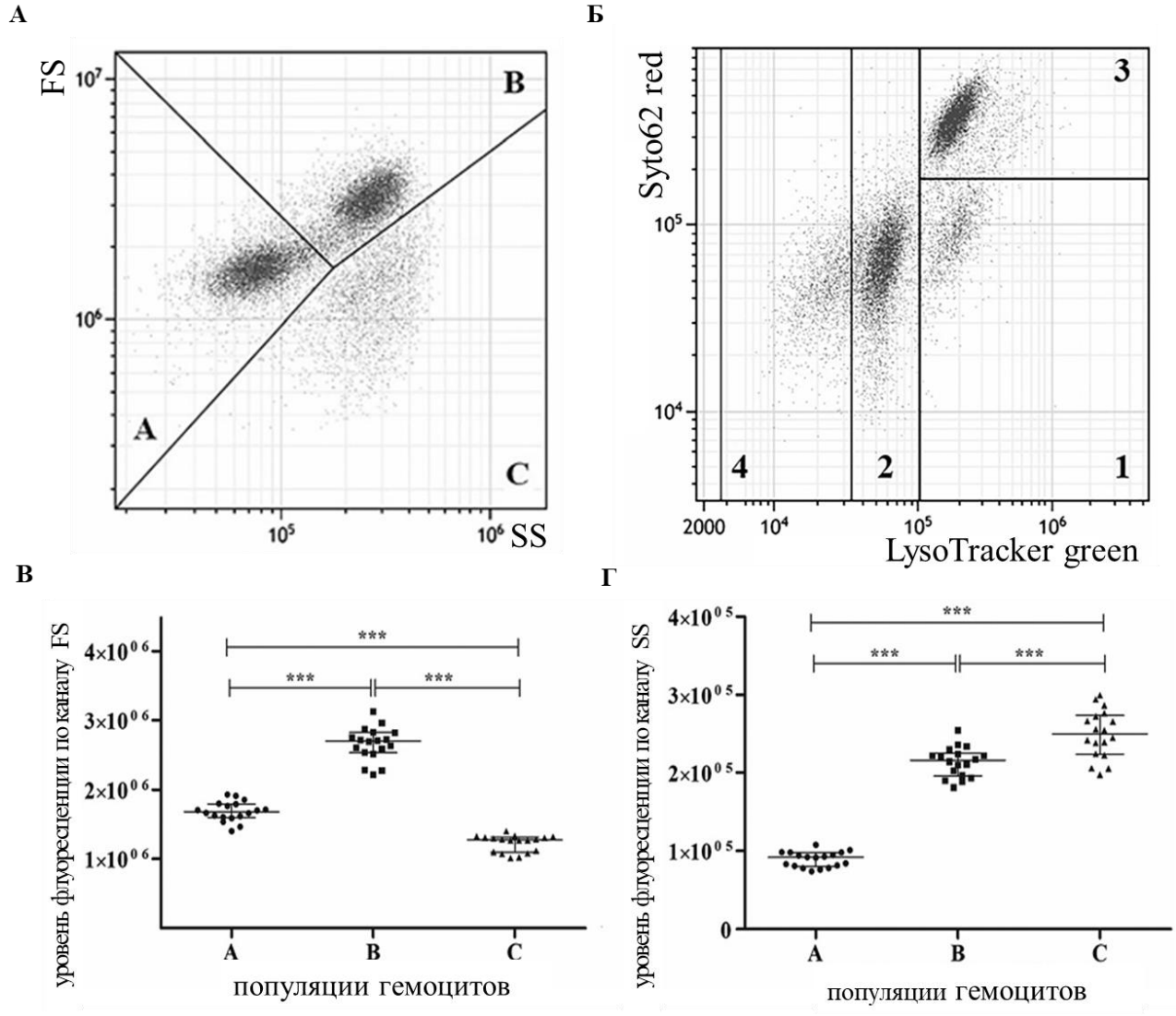


Рисунок 130. Разделение гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus* по параметрам прямого и бокового светорассеяния и интенсивности флуоресценции красителей LysoTracker и SYTO62. А – популяции гемоцитов, выделяемые по параметрам FS и SS; Б – популяции гемоцитов, выделяемые по интенсивности флуоресценции красителей LysoTracker и SYTO62; В – уровни FS популяций гемоцитов; В – уровни SS популяций гемоцитов. Условные обозначения: на рисунках А и Б обозначены границы, используемые для гейтирования; на рисунках В и Г горизонтальные линии показывают Me и интерквантильный размах (К1; К3) значений FS и SS; звёздочками обозначены уровни значимости для достоверных различий: *** – $p<0.001$ (по: Serebryakova, Tokmakova, Prokhorova, Ataev, 2022, с изменениями).

Клетки группы 1 расположены в правой нижней части цитофлуорограммы (рисунок 130Б, приложение 22). Для них характерен средний уровень FS и SS, а также средние показатели флуоресценции LysoTracker и минимальные значения накопления SYTO62. Следовательно, эта группа представлена относительно небольшими клетками со небольшим количеством гранул,

среди которых, вероятно, преобладают лизосомы. Слабое накопление SYTO62 может указывать на низкую биосинтетическую активность, в том числе вследствие преобладания в них гетерохроматина.

Клетки группы 2 расположены в средней части цитофлуорограммы (рисунок 130Б, приложение 22). Показатели FS, SS и накопления лизосомного красителя в них ниже, а накопление SYTO62 выше, чем в группе 1. Следовательно, клетки группы 2 мелкие, с небольшим количеством гранул с кислым содержимым и относительно большим количеством нуклеиновых кислот, доступных для связывания SYTO62. Значения FS и SS для клеток групп 1 и 2 близки к значениям этих показателей у гиалиноцитов (таблица 45, приложения 21, 22).

Клетки группы 3 находятся в правой верхней части гистограммы (рисунок 130Б, приложение 22). Они имеют высокие показатели FS и SS и хорошо накапливают оба красителя. Следовательно, группа 3 представлена крупными клетками со сложной структурой и большим количеством кислых гранул и нуклеиновых кислот. Значения FS и SS для клеток групп 3 практически совпадают с значениями этих показателей у гранулоцитов популяции B (таблица 45, приложения 22, 23).

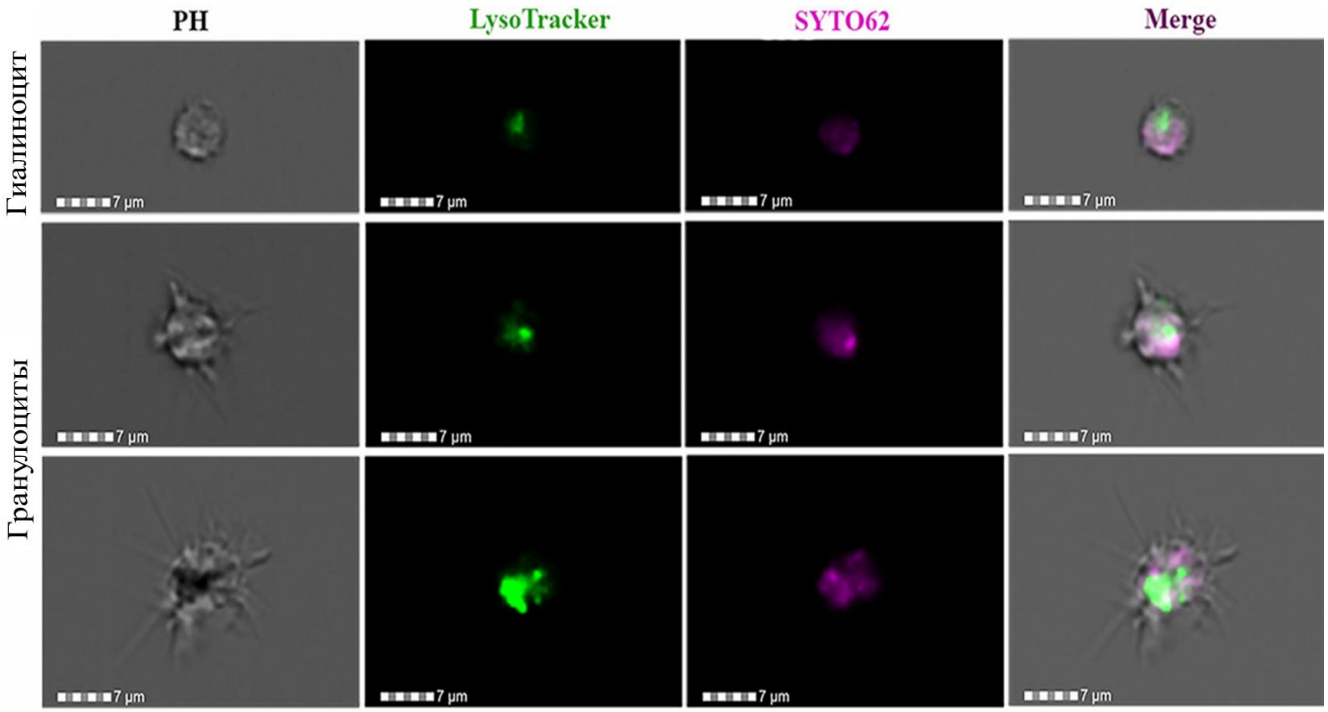


Рисунок 131. Изображения гемоцитов *Planorbarius corneus*, полученные на комбинированном проточном цитометре Amnis®ImageStream, иллюстрирующие морфологические особенности клеток. Условные обозначения: показано накопление в гемоцитах флуоресцентных красителей LysoTracker (зеленый) и SYTO62 (фиолетовый), а также совмещенное изображение (Merge) и изображение в режиме фазового контраста (PH). Шкала – 7 мкм (по: Serebryakova, Tokmakova, Prokhorova, Ataev, 2022).

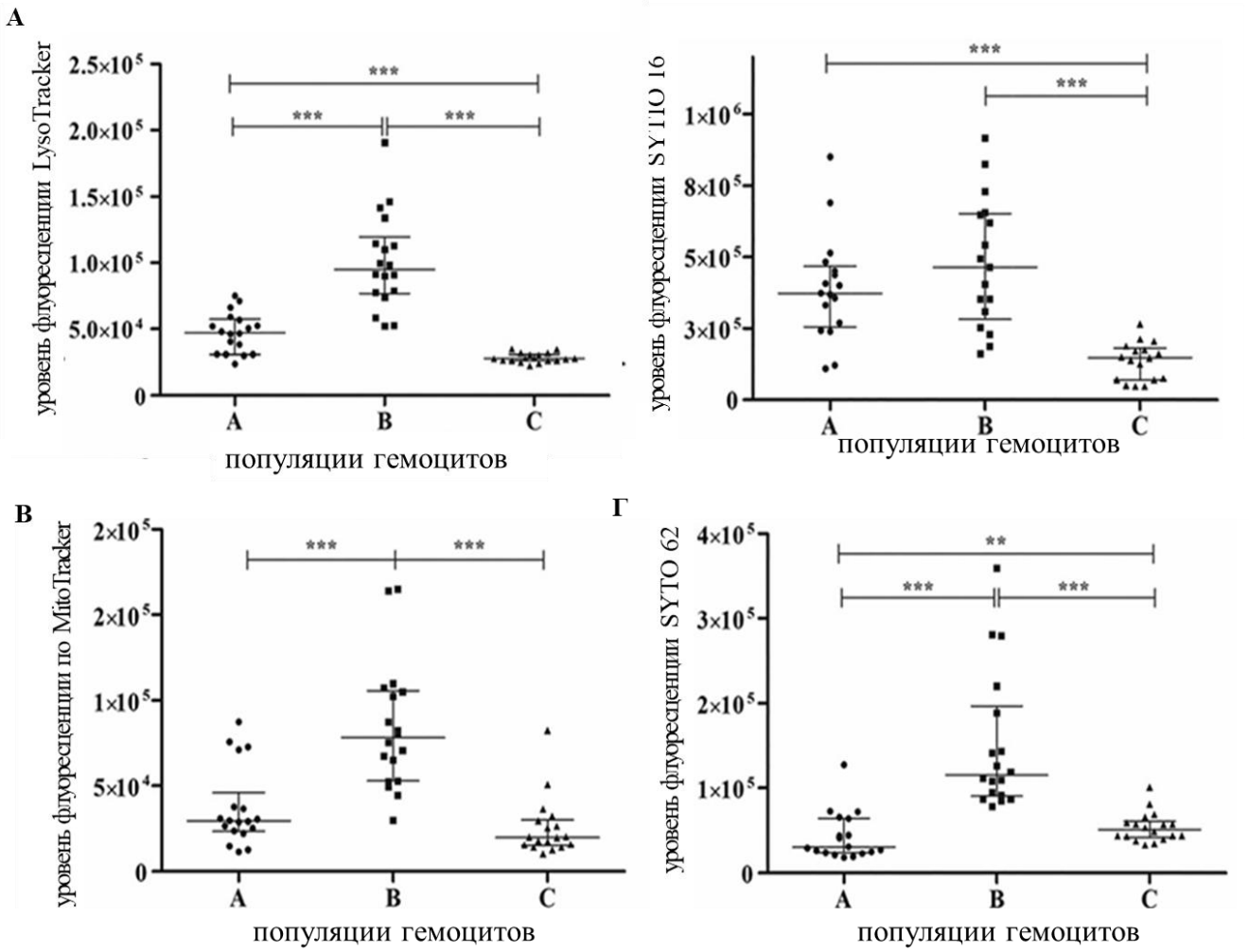


Рисунок 132. Уровни флуоресценции красителей в популяциях гемоцитов *Planorbarius corneus*. А – уровень флуоресценции LysoTracker; Б – уровень флуоресценции SYTO16; В – уровень флуоресценции MitoTracker; Г – уровень флуоресценции SYTO62. Условные обозначения: горизонтальные линии показывают Me и интерквантильный размах (К1; К3) значений флуоресценции; звёздочками обозначены уровни значимости для достоверных различий: ** – $p<0.01$; *** – $p<0.001$ (по: Serebryakova, Tokmakova, Prokhorova, Ataev, 2022, с изменениями).

Клетки группы 4 расположены в левой части гистограммы (рисунок 130Б, приложение 22). Они характеризуются низким FS, широким диапазоном значений SS, а также минимальной флуоресценцией LysoTracker. При этом для них характерна большая интенсивность флюоресценции SYTO62. Такие показатели (небольшие размеры, разное количество гранул и много свободных нуклеиновых кислот) характерны для клеток, находящихся в апоптозе.

Выделенные по накоплению красителей группы гемоцитов достоверно отличаются друг от друга по показателям FS и степени накопления красителей (рисунок 133). Но не выявлено достоверных различий в уровне SS между клетками 3 и 4 групп.

Проведенный анализ окраски клеток гемолимфы специфическими флуоресцентными красителями позволил предположить, что группы клеток 1 и 2 относятся к гиалиноцитам

(соответствуют популяции А), которые отличаются по размерам и структуре цитоплазматического компартмента. Возможно, популяция гиалиноцитов состоит из клеток, находящихся на разном уровне дифференцировки. Группа 3 более однородна и, вероятно, представлена гранулоцитами.

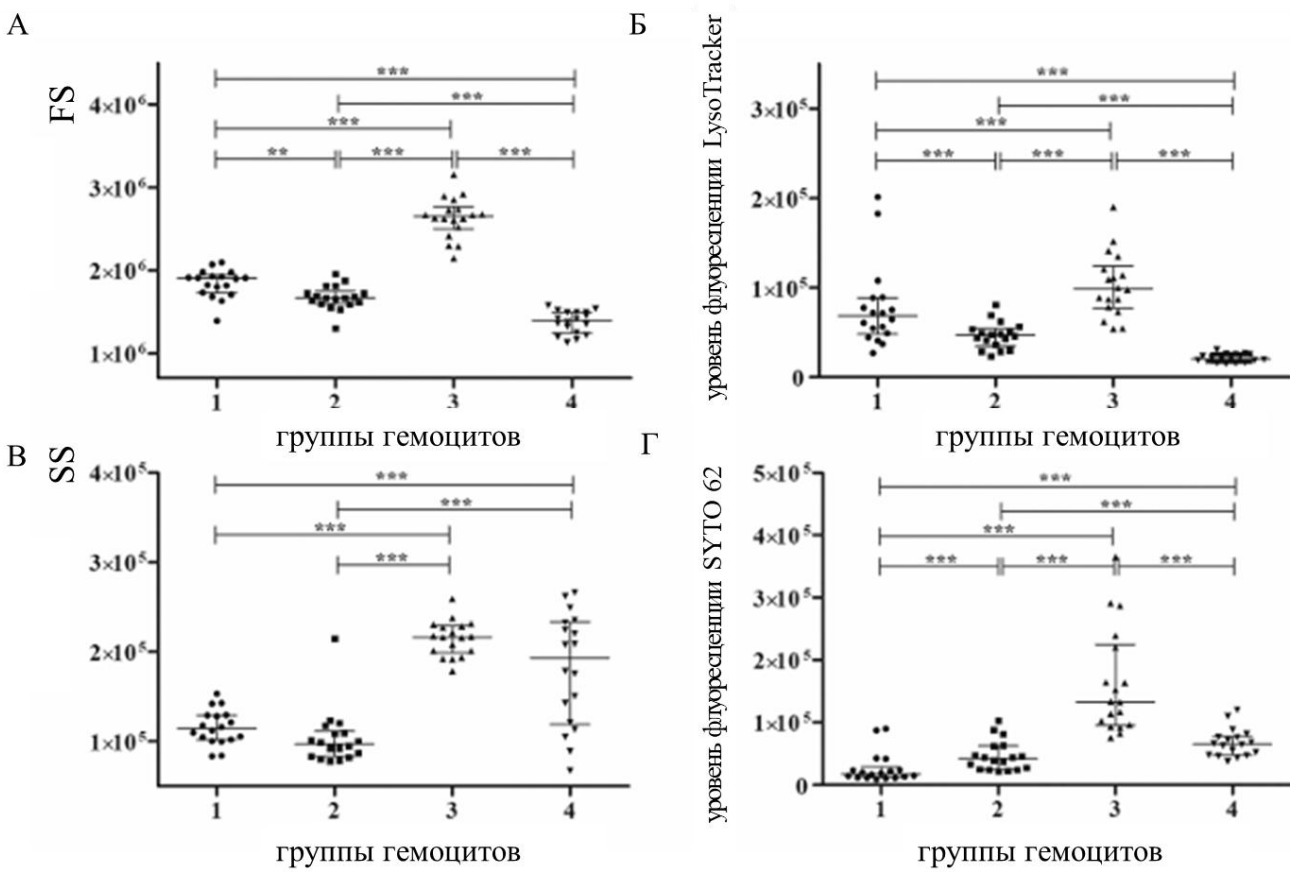


Рисунок 133. Уровни прямого и бокового светорассеяния и флуоресценции красителей LysoTracker и SYTO62 в группах гемоцитов *Planorbarius corneus*, выделяемых по накоплению красителей. А – уровень FS; Б –уровень флуоресценции LysoTracker; В – уровень SS; Г – уровень флуоресценции SYTO62. Условные обозначения: горизонтальные линии показывают Me и интерквантильный размах (К1; К3) значений флуоресценции; звёздочками обозначены уровни значимости для достоверных различий: ** – $p<0.01$; *** – $p<0.001$ (по: Serebryakova, Tokmakova, Prokhorova, Ataev, 2022, с изменениями).

Заражение трематодами *Plagiorchis multiglandularis* приводит к изменению соотношения групп гемоцитов, выделенных по интенсивности накопления красителей (рисунок 134). В частности, медианное значение относительного количества клеток 2 группы у незаражённых моллюсков составляет 37.51% (24.40–45.49%), а у заражённых в 2 раза меньше – 16.10% (13.98–22.03) ($p<0.005$). Клетки группы 3, наоборот, в бóльшем количестве представлены у заражённых моллюсков, по сравнению с незаражёнными: 59.22% (48.63–69.13%) и 32.51% (21.34–43.39%) соответственно. Доля клеток группы 4 у заражённых моллюсков (12.47%, 8.59–16.36%)

практически не отличается от их относительного количества у незаражённых моллюсков (11.32%, 8.45–20.25%). Для группы 1 также выявлены различия между незаражёнными и заражёнными моллюсками. Клетки этой группы составляют у них 12.41% (6.93, 24.44) и 7.64% (6.09, 9.79) гемоцитов соответственно. Однако эти различия не являются достоверными.

Также установлены достоверные различия между заражёнными и незаражёнными моллюсками по значениям сигналов FS и SS для групп гемоцитов 1 и 2. В частности, у заражённых моллюсков происходит снижение FS у клеток групп 1 и 2, по сравнению с незаражёнными улитками (приложение 22). В то же время, выявлено значительное усиление флуоресценции SYTO62 в клетках клеток группы 1 (приложение 22). Полученные данные свидетельствуют об уменьшении размеров клеток в группах 1 и 2 и увеличении количества окрашиваемых нуклеиновых кислот в группе 2.

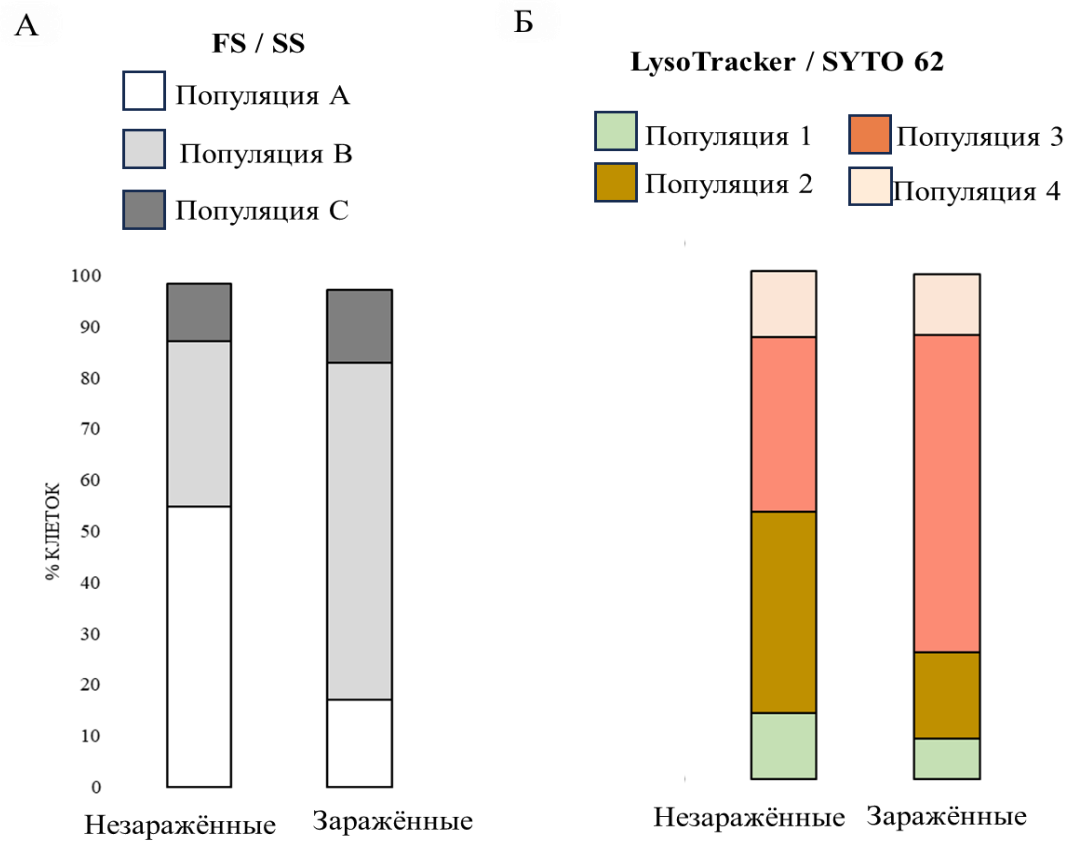


Рисунок 134. Гистограммы соотношения гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus*, заражённых трематодами *Plagiorchis multiglandularis*, а также у незаражённых особей. А – соотношение популяций клеток, идентифицированных по показателям прямого и бокового светорассеяния (FS/SS); Б – соотношение популяций клеток, идентифицированных по интенсивности накопления красителей LysoTracker и SYTO62 (по: Serebryakova; Tokmakova, Prokhorova, Ataev, 2022, с изменениями).

Выявленные различия позволили предположить, что у заражённых трематодами моллюсков уменьшается доля клеток, соответствующих гиалиноцитам относительно крупного размера (группа 2) и возрастает доля гранулоцитов (группа 3).

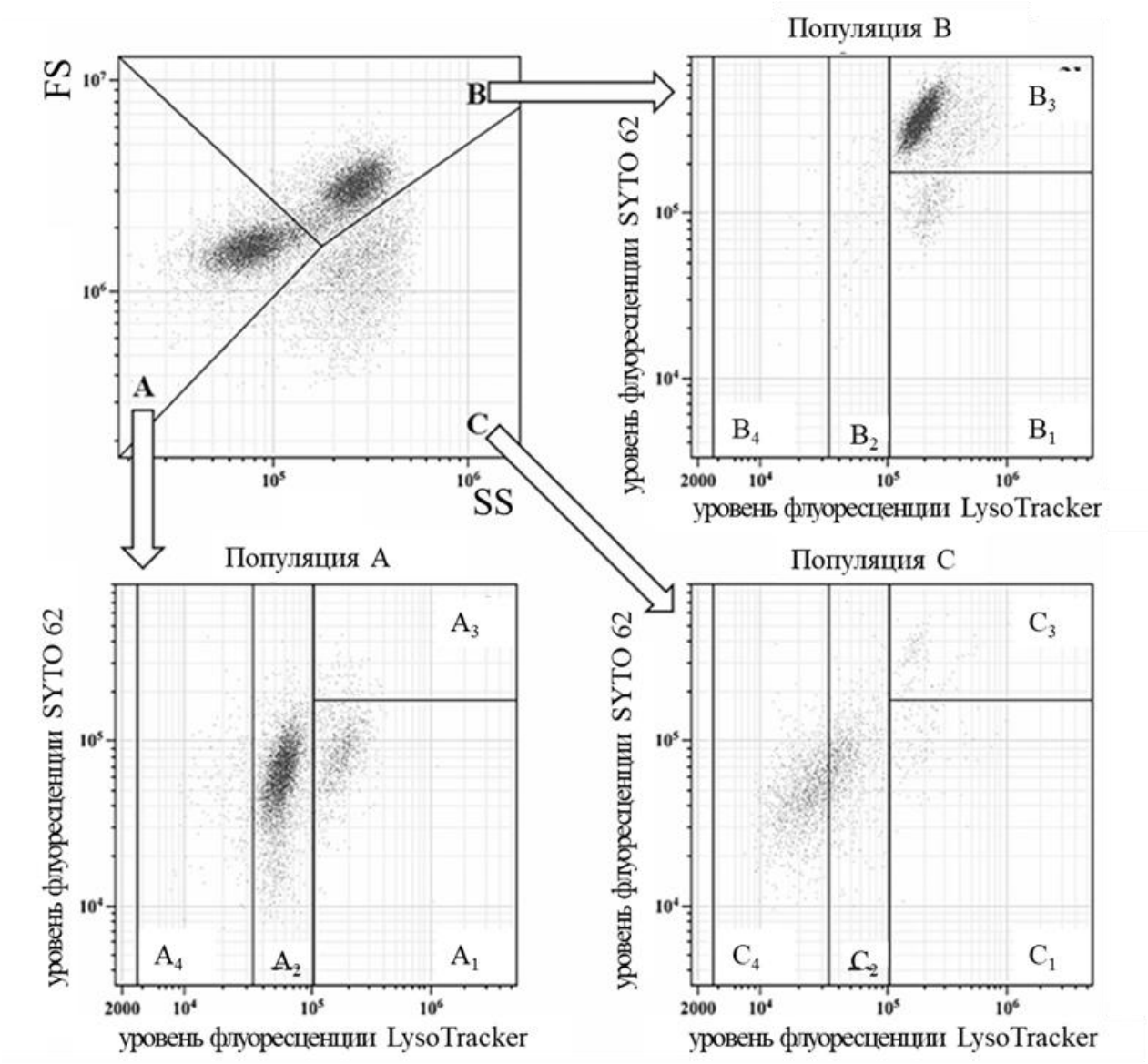


Рисунок 135. Распределение популяций гемоцитов *Planorbarius corneus* выделяемых по параметрам прямого и бокового светорассеивания (A, B и C) на субпопуляции по интенсивности окрашивания флуоресцентными красителями SYTO 62 и LysoTracker (по: Serebryakova, Tokmakova, Prokhorova, Ataev, 2022, с изменениями).

Для проверки этого предположения и подтверждения соответствия выделяемых популяций и групп гемоцитов было выполнено последовательное гейтирование. Клетки популяций A, B и C были распределены на группы в соответствии с уровнями флуоресценции красителей LysoTracker и SYTO62 (рисунок 135). Было установлено, что популяция A в основном состоит из субпопуляций A_1 и A_2. Популяция B на 80% представлена субпопуляцией

B_3. В популяции С около 57% клеток относятся к субпопуляции C_4, а 28% клеток – к субпопуляции C_2 (таблица 47). Таким образом, в группу клеток 3 попадают не только гиалиноциты, но и часть гранулоцитов популяции С.

Таблица 47. Соотношение субпопуляций гемоцитов в гемолимфе моллюсков *Planorbarius corneus* по данным последовательного гейтирования

Популяции гемоцитов, выделяемые по показателям прямого (FS) и бокового светорассеяния (SS)				
Гейтирование популяций, выделенных по FS/SS, по интенсивности поглощения Syto62/LysoTracker	FS/SS	Незаражённые	Заражённые	p-value
	A (гиалиноциты)			
	A_1	18.59 (11.65; 40.03)	16.08 (13.40; 22.79)	—
	A_2	53.87 (43.28; 73.65)	60.96 (30.15; 68.75)	—
	A_3	7.43 (2.96; 10.91)	6.48 (4.05; 17.79)	—
	A_4	6.45 (2.96; 16.71)	9.73 (8.23; 19.50)	—
	B (гранулоциты)			
	B_1	6.92 (3.29; 10.39)	6.01 (3.64; 6.72)	—
	B_2	**9.22 (4.29; 15.74)**	**2.89 (2.04; 5.55)**	$p<0.05$
	B_3	**77.43 (72.34; 86.31)**	**85.92 (83.44; 90.81)**	$p<0.05$
	B_4	3.09 (1.58; 7.06)	2.70 (1.98; 4.95)	—
	C (гранулоциты)			
	C_1	4.88 (3.19; 10.06)	5.56 (4.47; 7.43)	—
	C_2	28.82 (16.96; 41.71)	22.99 (15.10; 34.69	—
	C_3	8.49 (6.29; 17.45)	10.47 (5.67; 22.54)	—
	C_4	57.61 (33.93; 69.03)	60.01 (42.80; 68.77)	—

Условные обозначения: представлены значения в % от популяций А, В и С, для каждого значения приведены Me (К1; К3); p-value – уровень значимости для достоверных различий; жирным выделены значения, достоверно отличающиеся в группах заражённых моллюсков от незаражённых.

Сравнение количества клеток в субпопуляциях между заражёнными и незаражёнными моллюсками позволило установить, что у последних примерно в 2 раза снижено относительное количество клеток в субпопуляции B_2, но увеличена доля клеток субпопуляции B_3 (таблица 47). Таким образом, среди гранулоцитов популяции В уменьшается количество относительно небольших малогранулярных клеток и возрастает количество более крупных гранулярных,

метаболически активных клеток. Для субпопуляций гиалиноцитов и гранулоцитов популяции С достоверных различий между заражёнными и незаражёнными улитками выявлено не было.

При анализе доли субпопуляций гемоцитов относительно общего количество гемоцитов, также были выявлены различия между заражёнными и незаражёнными моллюсками (таблица 48, приложение 23). У заражённых улиток примерно в 3 раза снижено число клеток в субпопуляциях A_1, A_2 и A_3. Наряду с данными разделения клеток по морфологическим параметрам (рисунок 134, таблица 47), это также свидетельствует от том, что при заражении в гемолимфе роговых катушек происходит заметное снижение доли гиалиноцитов. Также у заражённых моллюсков происходит увеличение доли субпопуляции B_3 в общем пуле клеток. Это свидетельствует об увеличении среди гемоцитов числа зрелых и функционально активных гранулоцитов.

Таблица 48. Соотношение субпопуляций гемоцитов в гемолимфе брюхоногих моллюсков *Planorbarius corneus* по данным последовательного гейтирования относительно общего числа клеток

Популяции гемоцитов по показателям прямого (FS) и бокового светорассеяния (SS)				
Гейтирование популяций, выделенных по FS/SS, по интенсивности поглощения Syto62/LysoTracker	FS/SS	Незаражённые	Заражённые	p-value
	A (гиалиноциты)			
	A_1	**9.06 (3.44;19.01)**	**3.10 (1.78;3.88)**	p<0.05
	A_2	**29.78 (18.19;39.53)**	**10.51 (6.37;15.47)**	p<0.05
	A_3	**3 (1.62;5.17)**	**1.21 (0.61;3.03)**	p<0.05
	A_4	3.51 (1.42;6.01)	1.61 (1.28;3.79)	—
	B (гранулоциты)			
	B_1	1.97 (0.95;3.74)	3.55 (2.03;4.39)	—
	B_2	3.04 (1.70;5.50)	1.81 (1.60;2.82)	—
	B_3	**26.44 (16.28;37.82)**	**56.59 (42.46;67.34)**	p<0.005
	B_4	1.17 (0.43;1.94)	2.04 (1.18;2.75)	—
	C (гранулоциты)			
	C_1	0.55 (0.33;0.80)	0.9 (0.43;2.02)	—
	C_2	2.87 (1.79;4.06)	2.91 (1.91;4.74)	—
	C_3	1.02 (0.73;1.76)	1.54 (0.98;3.01)	—
	C_4	7.06 (2.63;10.09)	7.93 (2.73;14.15)	—

Условные обозначения: представлены значения в % от общего числа клеток, для каждого значения приведены Me (К1; К3); p-value - уровень значимости для достоверных различий; жирным выделены значения, достоверно отличающиеся в группах заражённых моллюсков от незаражённых.

Кроме того, у заражённых улиток значения FS в субпопуляциях гиалиноцитов A_1 и A_2, а также гранулоцитов B_2 достоверно ниже, чем у незаражённых (приложение 23). Такие изменения подтверждают уменьшение размеров у части гиалиноцитов и гранулоцитов. Показатели SS достоверно снижены только в субпопуляциях гиалиноцитов A_1, A_2 и A_3 (приложение 23). Также у заражённых моллюсков выше показатели флуоресценции SYTO62 в субпопуляциях гиалиноцитов A_1 и гранулоцитов B_1. Следовательно, в популяции гиалиноцитов заражённых улиток *P. corneus* уменьшается количество мелких клеток с небольшим числом гранул.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что при заражении моллюсков *Planorbarius corneus* трематодами *Plagiorchis multiglandularis* происходит уменьшение доли гиалиноцитов и рост относительного количество гранулоцитов в общем пуле гемоцитов. При этом часть гиалиноцитов становятся меньше размером, чем у незаражённых. И наоборот, часть гиалиноцитов и гранулоцитов приобретают характеристики более метаболически активных и гранулярных клеток. Такие данные свидетельствуют о вероятном переходе клеток из популяции A (гиалиноциты) в популяцию B (гранулоциты). Однако при этом не происходит изменения относительного количества клеток популяция C.

Соотношение гемоцитов у заражённых трематодами моллюсков *Lymnaea stagnalis.* Среди моллюсков *L. stagnalis*, у которых изучали состав гемоцитов на проточном цитометре (см. раздел III.2) были особи, заражённые трематодами. Это позволило сравнить относительное количество гемоцитов разных типов у незаражённых прудовиков (n=18) и моллюсков с заражением трематодами *Echinostoma revolutum* (n=14). Для данных подсчётов были выбраны особи с высотой раковины 36–43 мм.

У заражённых трематодами моллюсков *Lymnaea stagnalis* не происходит значимого изменения относительного количество гиалиноцитов, по сравнению с незаражёнными (таблица 49, рисунок 136). Но при этом изменяется соотношение популяций гранулоцитов B и C. В частности, гранулоцитов популяции B у заражённых моллюсков примерно в 1.5 раза меньше, чем у незаражённых, а гранулоцитов популяции C – больше в 8 раз.

Сравнение популяций гемоцитов, выделяемых по накоплению красителей Syto62 и LysoTracker, показало снижение популяции E (клетки, интенсивно накапливающие оба красителя) у заражённых моллюсков, однако эти различия не значимы. Также у заражённых улиток в среднем в 3 раза больше гемоцитов популяции F, слабо накапливающих оба красителя (таблица 49, рисунок 136).

С целью сравнения субпопуляционного состава для заражённых моллюсков было выполнено последовательное гейтирование по алгоритму, использованному ранее для незаражённых (см. раздел III.2.3, таблица 32). Полученные данные (таблица 50)

свидетельствуют о значимых изменениях состава гиалиноцитов (популяция A) и гранулоцитов популяции B (рисунок 137). Как и у незаражённых моллюсков, большая часть гиалиноцитов заражённых прудовиков представлена клетками субпопуляции Ae, которая характеризуется самым интенсивным накоплением обоих красителей, то есть включает наиболее активные клетки. Относительное количество гиалиноцитов этой субпопуляции у заражённых моллюсков примерно в 1.5 раза ниже. Также в группе заражённых моллюсков ниже относительная доля гиалиноцитов субпопуляции Ag, характеризующаяся максимальным накоплением лизосомного красителя. Однако в обоих случаях не подтверждена статистическая значимость этих изменений.

Таблица 49. Соотношение типов гемоцитов в гемолимфе моллюсков *Lymnaea stagnalis* на проточном цитометре BD Accuri™ C6

Популяции (типы) гемоцитов	Процент клеток от общего количества гемоцитов		p-value
	Незаражённые (n=39)	Зараженные *Echinostoma revolutum* (n=17)	
Популяции гемоцитов по показателям прямого и бокового светорассеяния			
A (гиалиноциты)	13.87 (7.32;27.24)	9.79 (5.74; 13.01)	—
B (гранулоциты)	**82.29 (56.07; 88.54)**	**53.18 (49.22; 57.60)**	p<0.003
C (гранулоциты)	**3.99 (2.17;7.13)**	**35.36 (29.58; 40.98)**	p<0.005
Популяции гемоцитов по накоплению красителей Syto62 и LysoTracker			
D	1.94 (1.16; 2.15)	2.7 (1.45; 3.48)	—
E	91.41 (74.64; 92.94)	82.07 (71.76; 89.63)	—
F	**1.85 (1.37; 4.04)**	**6.59 (3.06; 12.50)**	p<0.05
G	4.79 (3.04; 8.39)	5.88 (3.50; 7.17)	—

Условные обозначения: для каждого значения приведены Me (Q1; Q3); p-value - уровень значимости для достоверных различий; жирным выделены значения, достоверно отличающиеся в группах заражённых моллюсков от незаражённых.

Выявлено достоверное повышение (в 4 раза) численности гемоцитов субпопуляции Af у заражённых улиток, по сравнению с незаражёнными. Обратное гейтирование также подтверждает значительное увеличение численности гемоцитов субпопуляции Fa. Популяция Af (и Fa) характеризуется наименьшим накоплением лизосомного красителя и широким диапазоном накопления нуклеинового красителя. Соответственно, у заражённых моллюсков

среди гиалиноцитов возрастает доля клеток с меньшими количеством гранул, но с разным уровнем биосинтетической активности.

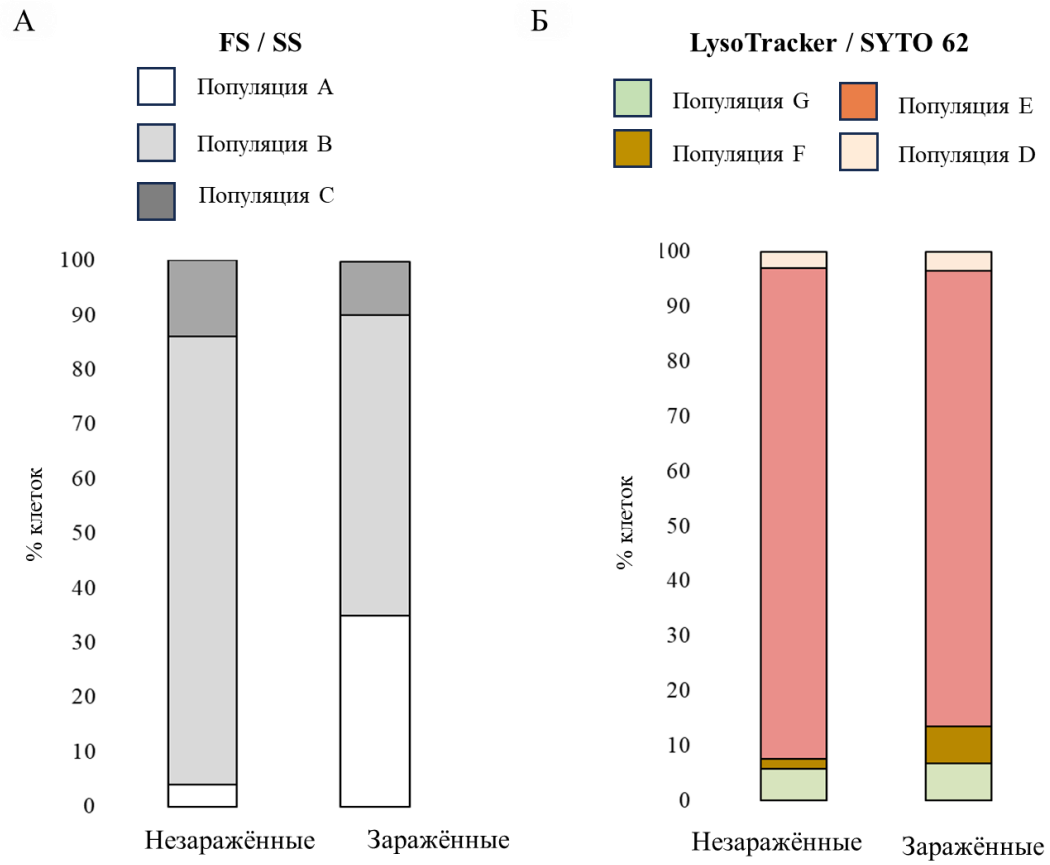


Рисунок 136. Гистограммы соотношения гемоцитов у моллюсков *Lymnaea stagnalis*, заражённых трематодами *Echinostoma revolutum,* а также у незаражённых особей. А – соотношение популяций клеток, идентифицированных по показателям прямого и бокового светорассеяния (FS/SS); Б – соотношение популяций клеток, идентифицированных по интенсивности накопления красителей LysoTracker и SYTO62.

У заражённых прудовиков среди гранулоцитов в 6 раз больше клеток субпопуляции Bf, которые также обладают относительно небольшим числом гранул. Общее количество этих клеток среди пула гранулоцитов популяции B невелико и составляет у заражённых моллюсков не более 7.66%. Других значимых различий в составе субпопуляций гемоцитов у заражённых моллюсков по сравнению с незаражёнными не выявлено.

Таким образом у моллюсков *L. stagnalis*, заражённых трематодами *Echinostoma revolutum,* гиалиноциты и часть гранулоцитов популяции B характеризуются меньшим показателями накопления функциональных маркеров, чем гемоциты незаражённых. Возможно, это связано с переходом небольшой части гиалиноцитов в гранулоциты, а также пополнением пула циркулирующих гиалиноцитов новыми клетками меньшей степени зрелости. Значительная часть гранулоцитов популяции B переходит в гранулоциты популяции C. Однако

субпопуляционный состав гранулоцитов популяциий B и C существенно не меняется. Возможно, такой переход клеток связан с уходом клеток в апоптоз как вследствие участия в реакциях против паразита, так и в результате влияния трематод на состояние моллюска.

Таблица 50. Соотношение субпопуляций гемоцитов в гемолимфе брюхоногих моллюсков *Lymnaea stagnalis*, заражённых трематодами *Echinostoma revolutum* по данным последовательного гейтирования

Популяции гемоцитов по показателям прямого и бокового светорассеяния				Популяции гемоцитов по накоплению красителей Syto62 и LysoTracker			
A (гиалиноциты)			p-value	**D**			p-value
Гейтирование популяций, выделенных по FS/SS, по интенсивности поглощения Syto62/LysoTracker	**Ad**	7.57 (4.63; 9.38)	—	Гейтирование популяций, выделенных по интенсивности поглощения Syto62/LysoTracker, по параметрам FS/SS	**Da**	22.03 (15.32; 45.25)	—
	Ae	36.28 (19.27; 45.74)	—		**Db**	42.55 (24.92; 48.24)	—
	Af	27.44 (10.91; 55.01)	p<0.05		**Dc**	34.56 (29.78; 36.02)	—
	Ag	14.99 (12.19; 32.88)	—		**E**		
B (гранулоциты)					**Ea**	3.21 (2.70; 6.12)	—
	Bd	2.63 (0.92; 2.83)	—		**Eb**	59.95 (52.10; 67.25)	—
	Be	90.49 (85.60; 94.42)	—		**Ec**	35.20 (25.56; 45.82)	—
	Bf	4.56 (1.34; 7.66)	p<0.05		**F**		
	Bg	2.24 (1.27; 2.77)	—		**Fa**	35.21 (21.39; 52.89)	p<0.05
C (гранулоциты)					**Fb**	17.77 (16.68; 20.31)	—
	Cd	2.13 (1.97; 3.36)	—		**Fc**	25.42 (17.00; 50.05)	p<0.005
	Ce	78.06 (63.09; 86.25)	—		**G**		
	Cf	4.89 (3.01; 15.15)	—		**Ga**	28.86 (19.89; 31.70)	—
	Cg	6.55 (5.67; 12.38)	—		**Gb**	17.77 (16.68; 20.31)	—
					Gc	51.95 (44.79; 70.23)	—

Условные обозначения: для каждого значения приведены Me (K1; K3); p-value - уровень значимости для достоверных различий с показателями у незаражённых моллюсков (данные по незаражённым моллюскам представлены в таблице 32 в разделе III.2.2).

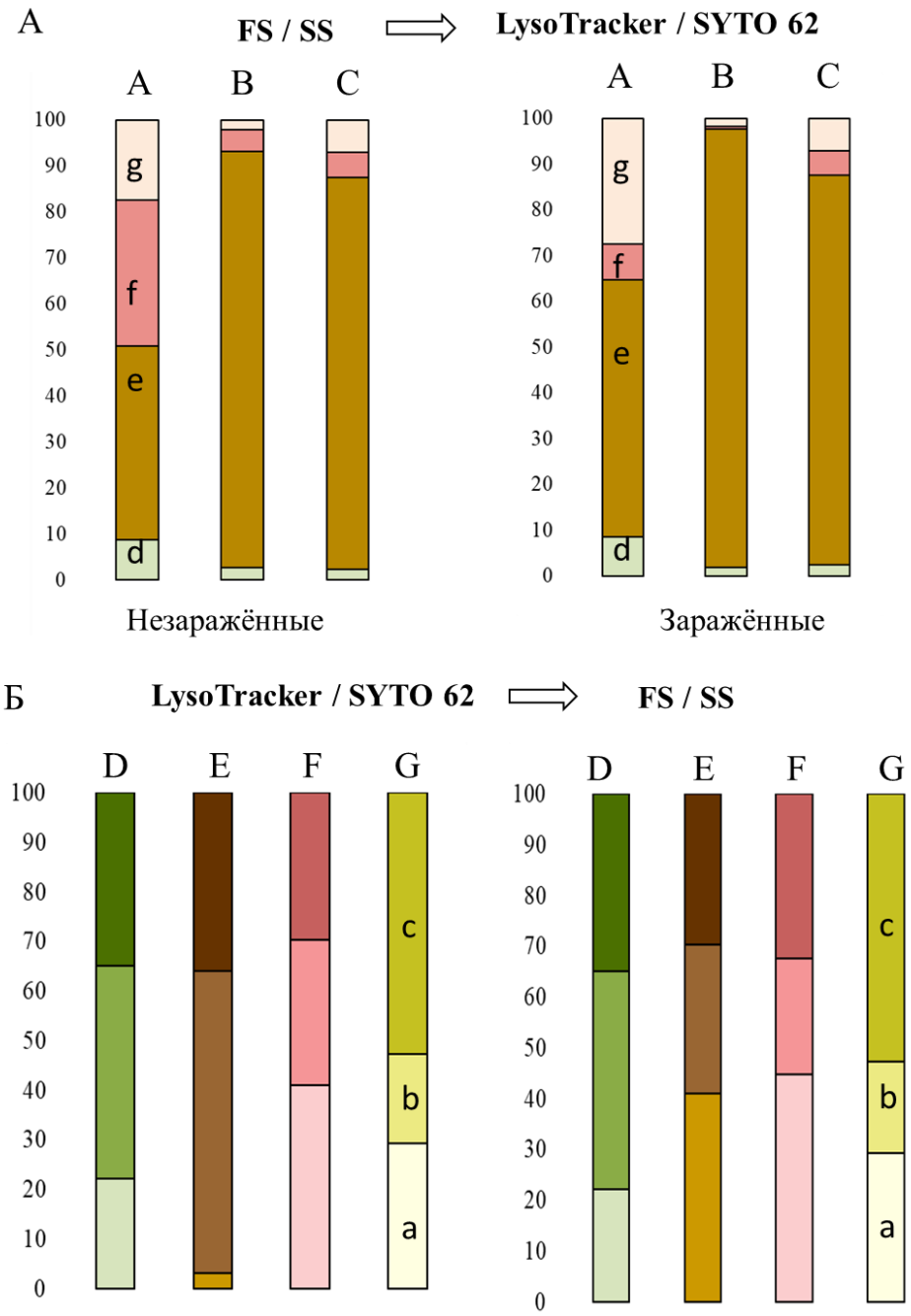


Рисунок 137. Гистограммы соотношения гемоцитов у моллюсков *Lymnaea stagnalis*, заражённых трематодами *Echinostoma revolutum,* а также у незаражённых особей. А – последовательное гейтирование по показателям прямого и бокового светорассеяния (FS/SS), а затем по интенсивности накопления красителей (LysoTracker/SYTO62); Б – последовательное гейтирование по интенсивности накопления красителей (LysoTracker/SYTO62), а затем по показателям прямого и бокового светорассеяния (FS/SS).

Соотношение гемоцитов у моллюсков *Biomphalaria glabrata*, иммунизированных бактериями. С целью анализа влияния иммунизации бактериями на клеточный состав гемолимфы моллюсков *B. glabrata* иммунизировали суспензию бактерий *E. coli* в ФСБ, а

контрольной группе вводили ФСБ. В обоих группах были выявлены отличия в соотношении популяций гемоцитов по сравнению с неиммунизированными улитками (рисунок 138, приложение 44).

У иммунизированных бактериями моллюсков уже через 1 час после инъекции снижается количество гиалиноцитов и увеличивается количество гранулоцитов популяции В. Через 6 часов после иммунизации гиалиноцитов становится меньше, а гранулоцитов больше в обоих группах иммунизированных моллюсков, по сравнению с неиммунизированными. При этом в группе, иммунизированной ФСБ, относительное количество гранулоцитов больше, а гиалиноцитов меньше, чем у улиток иммунизированных *E. coli.*

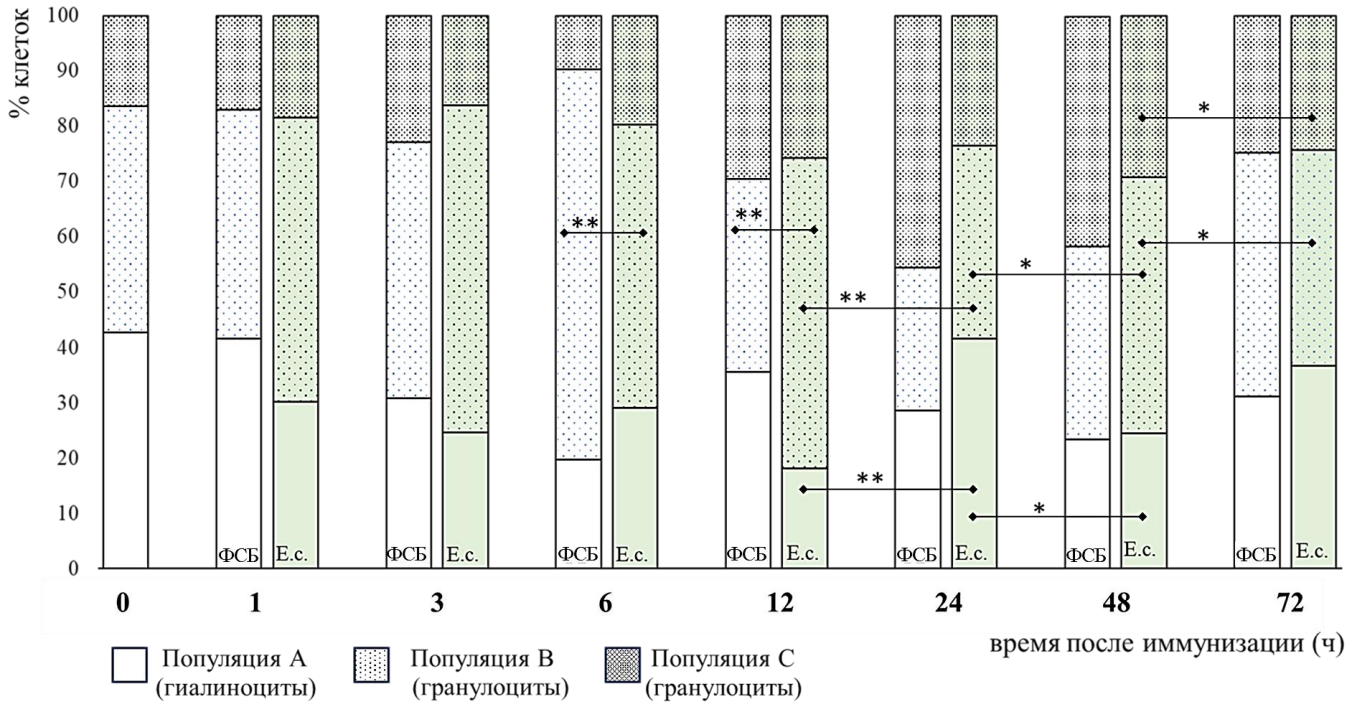


Рисунок 138. Соотношение популяций гемоцитов у моллюсков *Biomphalaria glabrata* до иммунизации и через 1–72 часа после иммунизации бактериями *E. coli.* Условные обозначения: E.c. – группа моллюсков, иммунизированных *E. coli*; ФСБ – группа моллюсков, инъецированных фосфатно-солевым буфером; звёздочками отмечен уровень значимости достоверных различий между группами моллюсков, иммунизированных *E. coli* и ФСБ: * – $p<0.05$, ** – $p<0.01$, *** – $p<0.005$.

Дальнейшие изменения соотношения гемоцитов разных типов сильнее выражены у моллюсков, иммунизированных бактериями. Через 24 часа после иммунизации у колотых бактериями моллюсков относительное количество гиалиноцитов примерно в 2 раза больше, чем через 12 часов ($p<0.01$). В этот же срок количество гранулоцитов популяции В в среднем в 1.5 раза меньше, чем через 12 часов ($p<0.01$). Через 48 часов количество гиалиноцитов опять уменьшается ($p<0.05$), а к 72 часам восстанавливается на уровне неиммунизованных особей.

При этом количество гранулоцитов популяции B увеличивается и к 72 часам после иммунизации также приближается к показателям у неиммунизированных улиток.

Относительное количество гранулоцитов популяции C после иммунизации постепенно увеличивается в обеих группах и достигает максимального значения через 24 часа (рисунок 138, приложение 24). Затем их количество падает и к 72 часам после иммунизации таже приближается к значениям у интактных особей.

Обсуждение к разделу III.4.2

Полученные данные свидетельствуют о том, что иммунизация влияет на клеточный состав гемолимфы моллюсков. В качестве одного их критериев, подтверждающих влияние иммунизации на гемоцитарный состав, является изменение количества гемоцитов в циркуляции вследствие их участия в клеточном иммунном ответе, активации гемопоэза или выхода из выхода из окружающих кровеносные синусы тканей (см. раздел III.2.4).

Для моллюсков модельных видов установлено повышение концентрации гемоцитов при иммунизации бактериями. При этом не выявлено достоверных различий в численности гемоцитов между зараженными трематодами и незаражёнными улитками. Учитывая, что клеточные реакции имеют определённую временную динамику, связанную в том числе с активацией гемопоэтических структур (см. раздел III.2.4), можно предположить, что в условиях зрелого заражения, численность клеток постепенно стабилизируется. В то же время, для групп заражённых трематодами моллюсков характерен меньший разброс значений численности гемоцитов, а группы незаражённых моллюсков характеризуются бóльшим диапазоном значений этого показателя. Это может быть связано с бóльшими выборками для незаражённых улиток, а также с влиянием таких факторов как заражения на раннем сроке, присутствие патогенов других групп, которые могут быть не учтены. Поэтому достоверные данные о влиянии заражённости на количество гемоцитов могут быть получены только для лабораторной культуры и / или экспериментального заражения.

Значительные колебания численности гемоцитов описаны у моллюсков *Biomphalaria glabrata* при иммунизации трематодами *Schistosoma mansoni*. Через 5 часов после инвазии происходит снижение количества клеток. Но на 1–3 сутки количество гемоцитов начинает увеличиваться, вплоть до 14 дней п.з. (Bezerra et al., 1997; Martins-Souza, 2003). Иммунизация биомфалярий мирацидиями *Echinostoma caproni* также приводит к резкому увеличению численности гемоцитов через 6–20 дней п.з. В дальнейшем, количество клеток постепенно снижается (Ataev, Coustau, 1999). Схожим образом у моллюсков *Biomphalaria glabrata* происходит увеличение численности гемоцитов при введении частиц латекса (Friani et al., 2022). Аналогичные данные ранее были получены и для двустворчатых моллюсков. Иммунизация

бактериями мидий и устриц приводит к увеличению у них количества циркулирующих гемоцитов (Hernroth, 2003; Terahara et al., 2006).

Результаты анализа изменения гемоцитарного состава у *B. glabrata* при иммунизации бактериями также подтверждают определённую временную динамику изменения клеточного состава гемолимфы. Первые изменения гемоцитарного состава проявляются уже через 1 час после иммунизации (рисунок 138). При этом они выражены также в контрольной группе моллюсков, которым вводили ФСБ. Вероятно, это связано с тем, что первичная клеточная реакция направлена в том числе на купирование повреждения, возникающего при инъекции с помощью шприца. Участие гемоцитов в процессах регенерации ранее неоднократно было описано у пульмонат (Sminia et al., 1973, Oliveira et al., 2010b).

К 12 часам после иммунизации происходит смещение соотношения гемоцитов в сторону гранулоцитов. Количество гиалиноцитов вновь увеличивается к 24 часам после иммунизации и вновь уменьшается к 48 часов после иммунизации. Вероятно, после активации, вызванной иммунизацией, часть гиалиноцитов переходят в гранулоциты, в результате чего их количество уменьшается. Возможность перехода гиалиноцитов в гранулоциты при стимуляции бактериями также подтверждается результатами анализа соотношения гемоцитов разных типов в гемолимфе роговой катушки, инкубированной с бактериями *in vitro* (см. раздел III.2.3).

В дальнейшем происходит пополнение пула гемоцитов в циркуляции именно за счёт «новых» гиалиноцитов, часть которых затем также переходит в гранулоциты, в результате чего восстанавливается соотношение гемоцитов близкое к исходному. Рост количества гранулоцитов популяции C через 24 часа после иммунизации связан с участием гранулоцитов и гиалиноцитов в клеточной реакции, в ходе которой часть клеток этих популяций дегранулируют. Исходное соотношение гемоцитов популяций A, B и C восстанавливается через 72 ч, что свидетельствует о завершении активного процесса клеточной реакции на относительно небольшое количество проникшего патогена.

Схожие данные по изменению гемоцитарного состава были получены для моллюсков *Biomphalaria tenagophila* и *B. glabrata*, иммунизированных трематодами *Schistosoma mansoni* (Martins-Souza, 2009). На ранних сроках заражения происходит снижение относительного количества гемоцитов большого и среднего размера, а затем увеличивается доля мелких гемоцитов. При этом количество гранулоцитов с большим количеством гранул уменьшается. Наиболее выраженной такая реакция была у моллюсков *B. tenagophila* резистентной линии.

Выявленная динамика изменения клеточного состава гемолимфы при иммунизации бактериями совпадает со сроками активизации гемопоэза у биомфалярий, после иммунизации трематодами (Прохорова, Атаев, 2013). Для *B. glabrata* также были получены данные об активации в гемопоэза в ответ на иммунизацию бактериями (Sullivan et al., 1984). У моллюсков,

которым вводили *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphilococcus aureus* через 24 часа зафиксировано повышение митотического индекса в АПО. Влияние бактериального заражения на соотношение гемоцитов разных типов также ранее было описано для головоногих моллюсков (см. Le Pabic et al., 2014; Gestal, Castellanos-Martínez, 2015).

Выявленная динамика изменения клеточного состава при иммунизации бактериями совпадает с временными интервалами развития первичной и вторичной клеточной реакции при заражении трематодами (Атаев и др., 2020).

Во всех случаях трематодная инвазия и иммунизация бактериями приводят к изменению соотношения типов в гемоцитов в циркуляции. Полученные данные свидетельствуют о том, что разные виды трематод по-разному влияют на соотношение гемоцитов у одного моллюска-хозяина. Так соотношение гемоцитов различно у моллюсков *Planorbarius corneus*, заражённых трематодами *Cotylurus brevis*, *Notocotylus ephemera* и *Plagiorchis multiglandularis* (рисунок 129). Интенсивность и механизмы иммунного ответа моллюсков зависят от особенностей развития, заражающих их трематод, а также совместимости паразито-хозяинной системы «трематоды-моллюск» (Bayne et al., 2001; Galaktionov, Dobrovolskij, 2003).

В то же время, в двух разных экспериментах, выполненных в разное время и на разных цитофлуориметрах нами были получены разные данные по соотношению гемоцитов у моллюсков *Planorbarius corneus*, заражённых трематодами *Plagiorchis multiglandularis* (таблицы 43, 45). В ходе дальнейших исследований всегда воспроизводились результаты, совпадающие с результатами второго эксперимента. Причина различий может заключаться не только в разных настройках приборов, но и во влиянии различных факторов – условий среды или физиологического состояния моллюсков. Поэтому при интерпретации результатов в цитофлуориметрических исследованиях надо учитывать все факторы и понимать диапазон значений, характерный для условно незаражённых особей (Серебрякова и др., 2015).

В большинстве случаев при иммунизации происходит увеличение доли гранулоцитов (Атаев и др., 2024а). Анализ гемоцитарного состава у заражённых трематодами моллюсков *Planorbarius corneus* и *Lymnaea stagnalis* с использованием функциональных маркеров также подтверждает возможность изменения соотношения типов гемоцитов за счёт перехода гиалиноцитов в гранулоциты. У заражённых трематодами роговых катушек наблюдается значимое снижение доли гиалиноцитов и рост относительного количества гранулоцитов (рисунок 129). При этом часть гиалиноцитов характеризуются меньшими размерами и снижением накопления функциональных маркеров, по сравнению с клетками незаражённых улиток. У прудовиков снижение доли гиалиноцитов не является значимым, однако они также характеризуются меньшим показателями накопления функциональных маркеров, чем гемоциты незаражённых. Такие результаты могут свидетельствовать о том, что у заражённых моллюсков

происходит пополнение пула циркулирующих гиалиноцитов новыми клетками меньшей степени зрелости.

При изучении клеточных реакций моллюсков *Biomphalaria glabrata* на заражение мирацидиями трематод *Echinostoma paraensei* также было выявлено повышение концентрации циркулирующих гемоцитов и одновременный рост относительного количество гранулоцитов и «мелких круглых клеток» (авторы рассматривают их как отдельный от гиалиноцитов клеточный тип) к 8 суткам п. з. Повышенное количество гранулоцитов сохранялось до 30 дней после иммунизации (Noda, Loker, 1989).

Кроме того, у части гранулоцитов и гиалиноцитов заражённых трематодами моллюсков *Planorbarius corneus* сильнее накапливаются маркеры, характерные для функционально активных клеток. Такое смещение также может свидетельствовать об активации клеток в ходе иммунного ответа. У заражённых прудовиков *Lymnaea stagnalis* происходит значительный рост гранулоцитов популяции С и уменьшение доли гранулоцитов популяции В. При этом среди последних достоверно больше клеток с меньшим накоплением функциональных маркеров. Такое смещение может свидетельствовать о переходе части гранулоцитов популяции В в популяцию С, в том числе в результате дегрануляции, а также о пополнении пула гранулоцитов новыми менее дифференцированными клетками.

В описанном в разделе III.2.4 эксперименте по фагоцитозу бактерий гемоцитами *L. stagnalis* i*n vitro* было выявлено снижение доли гранулоцитов популяции В (таблица 36). При этом в гемолифме прудовиков, заражённых трематодами *Echinostoma revolutum,* снижение доли гранулоцитов выражено сильнее, чем у незаражённых. Также у них сильнее выражено снижение доли гиалиноцитов. Получается, что гемоциты заражённых моллюсков активнее переходят в популяцию С при стимуляции бактериями. Это может быть связано с относительно бóльшим количеством активированных гемоцитов у заражённого моллюска. Это предположение подтверждается тем, что гемоциты заражённых моллюсков активнее фагоцитируют бактерий *E. coli*. Однако в отношении бактерий *S. aureus* более активного фагоцитоза не выявлено. Другое возможное объяснение – более высокая патогенная нагрузка на гемоциты, приводящая к их более быстрой дегрануляции и гибели.

Полученные данные согласуются с результатами анализа функциональной активности гемоцитов у моллюсков *L. stagnalis*. В группе моллюсков, заражённых трематодами *Plagiorchis mutationis* снижено количество распластывающихся клеток, по сравнению с незаражёнными (69.5% и 79.2% соответственно). Кроме того, гемоциты заражённых моллюсков проявляют меньшую фагоцитарную активность и сниженную способность к инкапсуляции церкарий трематод того же вида *in vitro* по сравнению с незаражёнными особями (Kryukova et

al., 2014). Таким образом, наблюдается подавление иммунного ответа по отношению к патогену того же вида.

Следует отметить, что длительное заражение может в значительной степени искажать картину клеточного иммунного ответа моллюсков. В частности, гемоцитарная мантия, формирующаяся вокруг спороцист *Plagiorchis multiglandularis* (см. раздел III.4.1, рисунок 118), задействует большое количество клеток гемолимфы. Клетки в составе мантии и других вариантов гемоцитарных образований вокруг патогенов по морфологическим характеристикам соответствуют гранулоцитам. В заражённом моллюске одновременно могут присутствовать сотни спороцист (Атаев, 2017). Их количество постоянно пополняется за счет размножения. В результате для участия в клеточной реакции требуется всё большее количество гранулоцитов. Кроме того, гранулоциты участвуют в фагоцитозе мёртвых спороцист и уничтожении всех форм гемоцитарной агглютинации. Таким образом, иммунный ответ на инвазию, по-видимому, связан с быстрой дифференцировкой гиалиноцитов и их трансформацией в гранулоциты. В результате происходит пополнение пула циркулирующих гранулоцитов. Однако большинство новообразованных гранулоцитов покидают кровеносное русло и попадают в ткани моллюска, образуя мантию на поверхности спороцист. Даже в случае отсутствия выраженной клеточной реакции против определённых видов трематод, возникающие в результате жизнедеятельности паразита повреждения тканей также купируются и зачищаются гранулоцитами.

Полученные данные, наряду с результатами анализа морфологического и функционального разнообразия гемоцитов подтверждают то, что гемоциты представлены единой клеточной линией. При этом морфологические и функциональные различия гемоцитов обусловлены их специализацией. Гемопоэтические стволовые клетки могут делиться, обеспечивая пролиферацию прогемоцитов. Последние дифференцируются в гиалиноциты, которые затем дифференцируются в гранулоциты.

Иммунные реакции моллюсков характеризуются различной динамикой и избирательностью и по отношению к разным факторам иммунизации. Наиболее универсальными формами клеточного ответа являются фагоцитоз, инкапсуляция и формирование агрегаций. При естественном заражении трематодами клеточная реакция может быть слабо выраженой или отсутствовать. Иммунизация приводит к изменению концентрации и соотношения типов гемоцитов в циркуляции. У зараженных моллюсков как правило происходит уменьшение доли гиалиноцитов и увеличение количества функционально активных гранулоцитов.

III.4.3. Экспрессия генов иммунного ответа при иммунизации

В качестве модели для сравнения экспрессии генов иммунного ответа у иммунизированных и неиммунизированных моллюсков были использованы роговые катушки *Planorbarius corneus*, заражённые трематодами.

Был получен и проанализирован транскриптом гемоцитов незаражённых и заражённых трематодами моллюсков. Результаты аннотации транскриптома и данные по представленности транскриптов патогенраспознающих молекул описаны в разделе III.3.4.1. Кроме того, был выполнен анализ экспрессии отдельных генов иммунного ответа у моллюсков *P. corneus*, заражённых трематодами разных видов. Исследование было проведено в два этапа. На первом этапе исследование осуществляли с использованием специфических праймеров, подобранных на консервативные участки генов, кодирующих факторы иммунного ответа у лёгочных моллюсков, представленные в GenBank. Для выделения РНК были использованы моллюски целиком (тело без раковины), а также гемоциты и ткани гепатопанкреаса. Уровень экспрессии определяли относительно гена ß-актина полуколичественным методом (см. раздел II.2.7).

На втором этапе исследование проводилось с использованием нуклеотидных последовательностей полученного транскриптома гемоцитов моллюсков *P. corneus* (см. раздел III.2.3). Для подбора специфических праймеров были выбраны консервативные участки последовательностей, представленных в гемоцитах транскриптов. Для работы брали гемоциты, фрагменты гепатопанкреаса, белковой железы, сердца с перикардом и ноги. Уровень экспрессии определяли относительно генов ß-актина и GAPDH методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001)

Для подтверждения соответствия анализируемых ПЦР-продуктов предполагаемым генам на обоих этапах работы было выполнено их секвенирование. Номера последовательностей в GenBank представлены в приложении 27.

III.4.3.1. Экспрессия генов иммунного ответа по данным анализа транскриптома

В результате сравнения транскриптомов заражённых *Bilharziella polonica* и незаражённых моллюсков *Planorbarius corneus* с помощью программного обеспечения EdgeR (Robinson et al., 2010), было выявлено 189 дифференциально экспрессируемых генов (differentially expressed genes, DEGs). Из них экспрессия 155 генов повышена, а 34 снижена в гемоцитах заражённых моллюсков. Для дальнейшего анализа были выбраны транскрипты, для которых была получена однозначная аннотация (60 и 11 транскриптов соответственно) (таблица 51, приложение 28). Следует отметить, что поскольку при анализе транскриптомов не было экспериментальных повторов, не был выполнен количественный анализ изменения экспрессии конкретных генов.

Таблица 51. Транскрипты с дифференциальной экспрессией из гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus*, заражённых трематодами *Bilharziella polonica* (относительно незаражённых). Представлены данные аннотации по данным BlastX. Показаны транскрипты с потенциальной иммунной функцией (по: Orlov, Ataev, Gourbal, Tokmakova, Bobrovskaya, Prokhorova, 2023, с изменениями)

Повышение экспрессии	Снижение экспрессии
– белок, ассоциированный с репликацией (replication-associated protein) – полипротеин, кодируемый двумя открытыми рамками считывания (orf1ab polyprotein) – катепсин B-подобный белок (cathepsin B-like) – белок теплового шока 70 (HSP70 family protein) – коллаген альфа-1(I)-подобный белок (collagen alpha-1(I) chain-like) – полиубиквитин-B (polyubiquitin-B) – митохондриальная изоформа альдегиддегидрогеназы (aldehyde dehydrogenase, mitochondrial) – фактор элонгации 1-альфа-1-подобный (elongation factor 1-alpha 1-like) – брорино-подобный белок, изоформа X3 (brorin-like isoform X3) – тяжёлая цепь миозина 6/7(myosin heavy chain 6/7) – тяжёлая цепь миозина типа II (myosin heavy chain type II) – тяжёлая цепь миозина (myosin heavy chain) – туррипептид-подобный белок (turripeptide OL11-like) – темптин-подобный белок (temptin-like) – аполипофорин-подобный белок (apolipophorins-like)	– эндонуклеаза-обратная транскриптаза (endonuclease-reverse transcriptase) – полипротеин ретротранспозона (polyprotein/retrotransposon- derived presenilin) – белок, ассоциированный с репликацией (replication-associated protein) – филаггрин-2-подобная изоформа X33 (filaggrin-2-like isoform X33) – белок с анкириновыми повторами 17 (ankyrin repeat domain-containing protein 17) – хитиндеацетилаза 8 (chitin deacetylase 8) – белок, участвующий в развитии краниофациальной области (craniofacial development protein 2)

В группах транскриптов с пониженной и с повышенной экспрессией присутствуют молекулы вирусного происхождения (таблица 51). Два транскрипта с пониженной регуляцией совпали с последовательностями ретротранспозонов, кодирующими эндонуклеазу – обратную транскриптазу и полипротеин pol. Еще два транскрипта (один – с повышенным содержанием,

другой – с пониженным содержанием) оказались гомологичны транскриптам белков, регулирующих репликацию одноцепочечной ДНК CRESS-вирусов моллюсков и насекомых. Также повышена экспрессия транскрипта, кодирующего полипротеин orf1ab нидовирусов (Gulyaeva, Gorbalenya, 2021).

Часть белков, количество транскриптов которых повышено у заражённых моллюсков, относятся к регуляторам матричных процессов. В частности, повышена экспрессия гена фактора элонгации трансляции 1α, полиубиквитина-B. Количество транскриптов белка хитиндеацетилазы, участвующего в метаболизме аминосахаров, и анкирин-подобного белка, участвующего в регуляции клеточного цикла, наоборот, снижено.

Среди активированных у заражённых моллюсков также есть транскрипты, соответствующие белкам, для которых ранее изучалось участие в иммунных реакциях. В частности, у заражённых моллюсков повышено содержание транскриптов коллагена α, катепсин B-подобного полипептида, белку теплового шока HSP70 и белка, гомологичного тяжёлой цепи миозина. Также в гемоцитах заражённых улиток повышена экспрессия фактора иммунного ответа аполипофорина, для которого раннее была показана липид-связывающая активность и участие в иммунном ответе у насекомых (Zhao et al., 2020).

Кроме того, в транскриптоме гемоцитов заражённых улиток выявлен белок, гомологичный нейротоксину туррипептиду. Этот транскрипт содержит домен типа kazal, который согласно данным IPS обладает активностью ингибитора сериновых протеаз.

Другой регуляторный белок, ген которого активнее экспрессируется у заражённых улиток – темптин. Темптин описан как регулятор процесса размножения у моллюска *Aplysia californica* (Cummins et al., 2004). Также у заражённых моллюсков выявлено повышение экспрессии гена, гомологичного гену белка брорина, участвующего в нейрогенезе (Koike et al., 2007).

III.4.3.2. Экспрессия генов иммунного ответа у моллюсков, зараженных трематодами разных видов

На основе анализа препаратов мРНК, выделенных из всего тела моллюсков, было установлено, что у заражённых моллюсков достоверно снижен общий уровень экспрессии генов фибриногенподобных белков (*PcFREP*), фибриногенподобного белка 7 (*PcFREP7*), при этом повышен уровень экспрессии гена C-лектина (*PcClect*), кальций-связывающего лектинового домена (*PcCaBP*), цистатинподобного белка (*PcCyst*) и фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (*PcMif*). Для гена фибриногенподобного белка 3 (*PcFREP3*) достоверных различий между всей выборкой заражённых и незаражённых моллюсков выявлено не было (рисунки 139–142, приложение 25). Однако анализ экспрессии исследованных генов в группах

моллюсков, заражённых трематодами разных видов, показал различия между ними. Для части генов выявлены различия в уровнях экспрессии в гемолимфе и гепатопанкреасе.

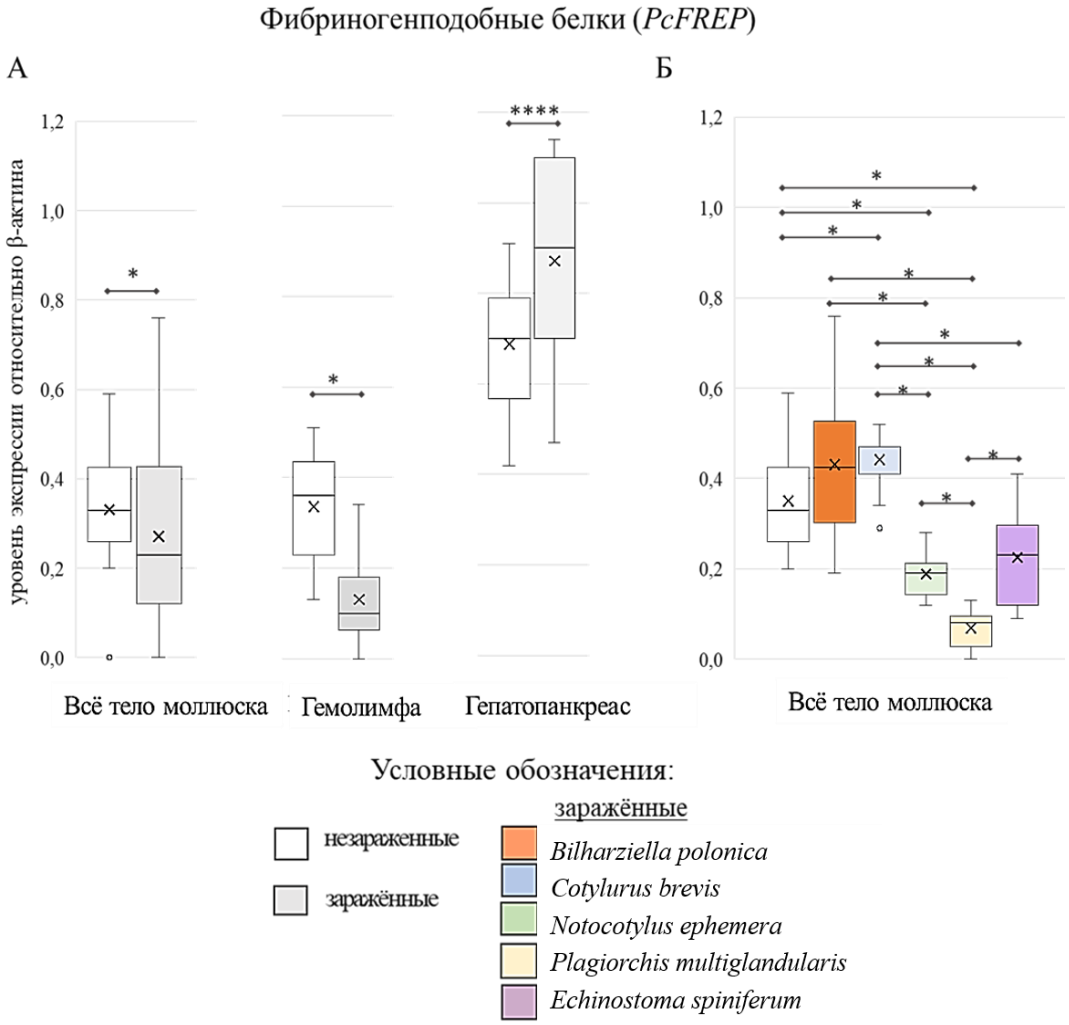


Рисунок 139. Относительный уровень экспрессии генов фибриногенподобных (*PcFREP*) белков у моллюсков *Planorbarius corneus*. А – у незаражённых и заражённых трематодами моллюсков (вся выборка), Б – у незаражённых и заражённых трематодами разных видов моллюсков. Условные обозначения: группы моллюсков обозначены разными цветами (см. легенду); ось ординат – уровень экспрессии относительно гена β-актина (относительная концентрация ПЦР-продукта в конечной точке, крест – среднее значение, горизонтальная черта – Me, верхняя и нижняя границы элементов диаграммы – границы K1 и K3, усы – максимальное и минимальное значения, точки – выбросы). Статистически значимые различия согласно U-критерию Манна-Уитни: * – $p<0.05$, ** – $p<0.01$, *** – $p<0.005$, **** – $p<0.0001$.

Несмотря на то, что уровень экспрессии гена ***PcFREP*** в среднем в 1.5 раза ниже у заражённых моллюсков, по сравнению с незаражёнными, только для трёх групп заражённых моллюсков показаны достоверные отличия от незаражённых. В группе заражённых трематодами *Plagiorchis multiglandularis* моллюсков уровень экспрессии гена *PcFREP* в среднем 4 раза ниже, а у заражённых *Notocotylus ephemera* – в среднем в 1.5 раза ниже, по

сравнению с незараженными. При этом у заражённых *Cotylurus brevis* моллюсков экспрессия гена в среднем в 1.5 раза выше, чем в группе незаражённых. У заражённых *Echinostoma spiniferum* наблюдается снижение, а у заражённых *Bilharziella polonica* – повышение экспрессии гена *PcFREP*, однако различия с незаражёнными моллюсками недостоверны (рисунок 139). Таким образом, заражение трематодами двух видов приводит усилению экспрессии гена *PcFREP*.

В группе моллюсков, заражённых трематодами *Plagiorchis multiglandularis,* относительная экспрессия гена *PcFREP* самая низкая, по сравнению с заражёнными другими видами трематод и достоверно от них отличается. Относительная экспрессия гена *PcFREP* в группе заражённых *Cotylurus brevis* моллюсков также достоверно выше, чем у заражённых *Plagiorchis multiglandularis, Notocotylus ephemera и Echinostoma spiniferum*, а у заражённых *Bilharziella polonica* достоверно выше, чем у заражённых *Cotylurus brevis* и *Notocotylus ephemera* (рисунок 139, приложение 25). Также установлено, что в гемолимфе заражённых моллюсков ген *PcFREP* экспрессируется слабее, чем у незаражённых, а в гепатопанкреасе наоборот – сильнее (рисунок 139, приложение 25).

Для гена ***PcFREP3*** не выявлено достоверных различий в количестве мРНК между выборками заражённых и незаражённых моллюсков. Однако установлено, что у заражённых трематодами *Cotylurus brevis* моллюсков ген экспрессируется в среднем в 3 раза интенсивнее, а у заражённых *Echinostoma spiniferum* – в среднем в 1.5 раза слабее, чем у незаражённых. Уровень экспрессии гена *PcFREP3* у заражённых *Cotylurus brevis* моллюсков достоверно выше, чем в группах моллюсков, заражённых другими видами трематод. Кроме того, у заражённых *Notocotylus ephemera* особей уровень экспрессии гена выше, чем у заражённых *Plagiorchis multiglandularis* и *Echinostoma spiniferum* улиток (рисунок 140, приложение 25).

Также выявлены достоверные различия в уровне экспрессии гена *PcFREP3* в гемолимфе (снижение) и гепатопанкреасе (повышение) у заражённых моллюсков, по сравнению с незаражёнными (рисунок 140).

Уровень экспрессии гена ***PcFREP7*** достоверно ниже в группе заражённых моллюсков, по сравнению с незаражёнными. При этом для группы моллюсков, заражённых трематодами *Bilharziella polonica* не выявлено значимых изменений его экспрессии, по сравнению с незаражёнными. Уровень экспрессии гена *PcFREP7* у заражённых *B. polonica* моллюсков достоверно выше, чем в группах заражённых другими видами трематод моллюсков. Кроме того, у заражённых *Echinostoma spiniferum* и *Cotylurus brevis* моллюсков ген экспрессируется интенсивнее, чем у заражённых *Plagiorchis multiglandularis* и *Notocotylus ephemera* (рисунок 140, приложение 25).

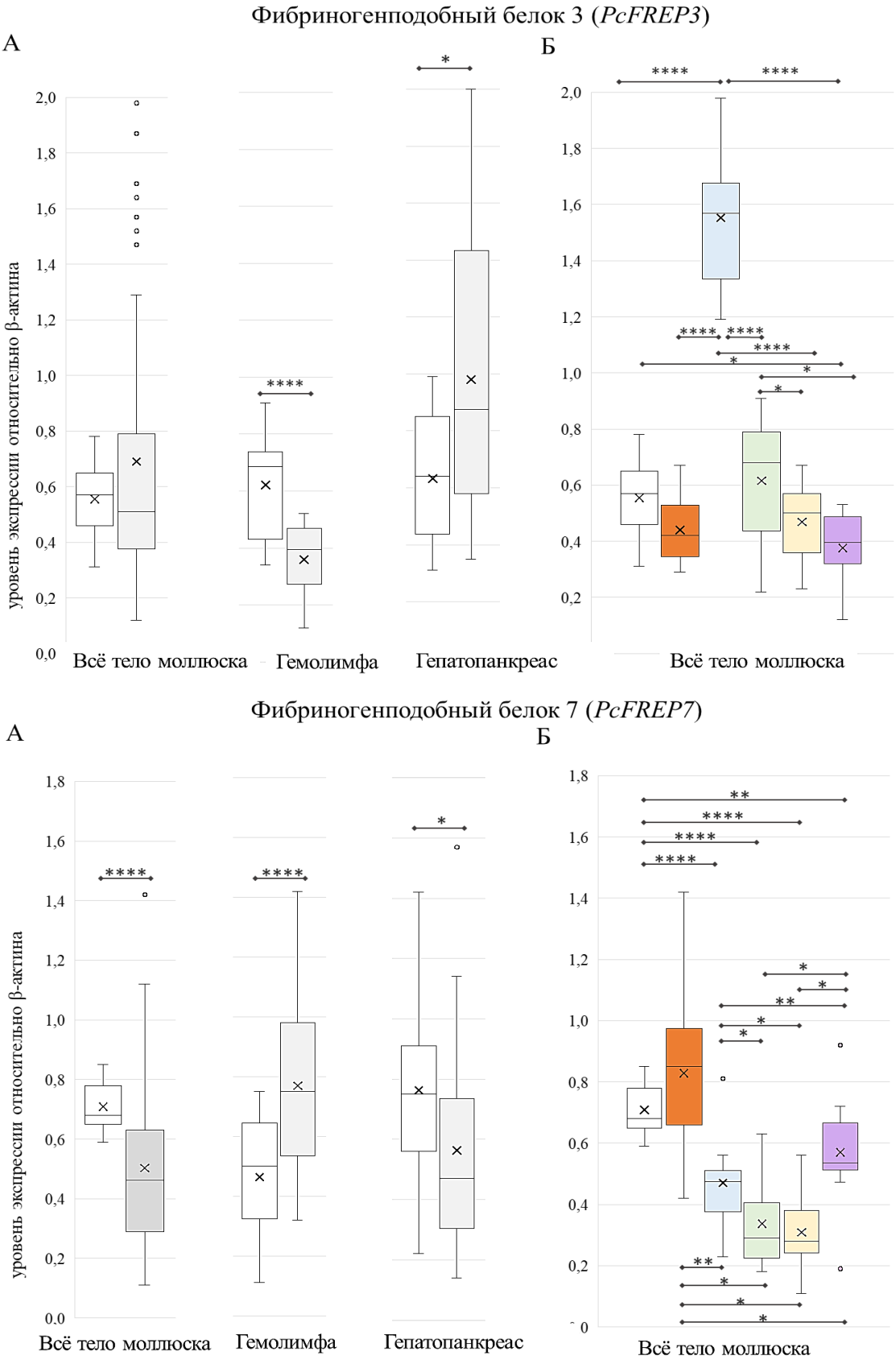


Рисунок 140. Относительный уровень экспрессии генов фибриногенподобных белков 3 (*PcFREP3*) и 7 (*PcFREP7*) у моллюсков *Planorbarius corneus*. А – у незаражённых и заражённых трематодами моллюсков (вся выборка), Б – у незаражённых и заражённых трематодами разных видов моллюсков. Условные обозначения: см. рисунок 139.

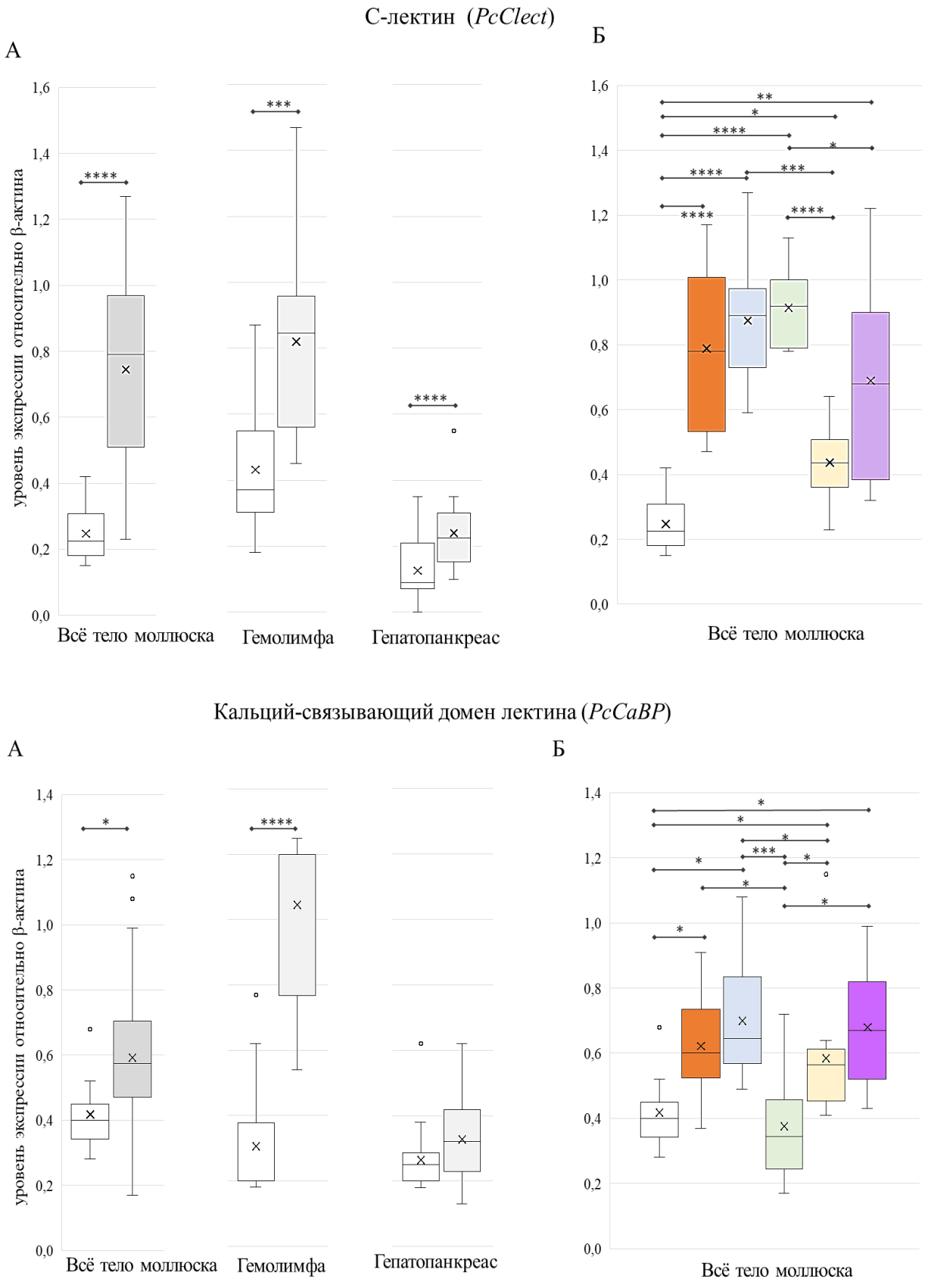


Рисунок 141. Относительный уровень экспрессии генов С-лектина (*PcClect*) и кальций-связывающего домена лектинов (*PcCaBP*) у моллюсков *Planorbarius corneus*. А – у незаражённых и заражённых трематодами моллюсков (вся выборка), Б – у незаражённых и заражённых трематодами разных видов моллюсков. Условные обозначения: см. рисунок 139.

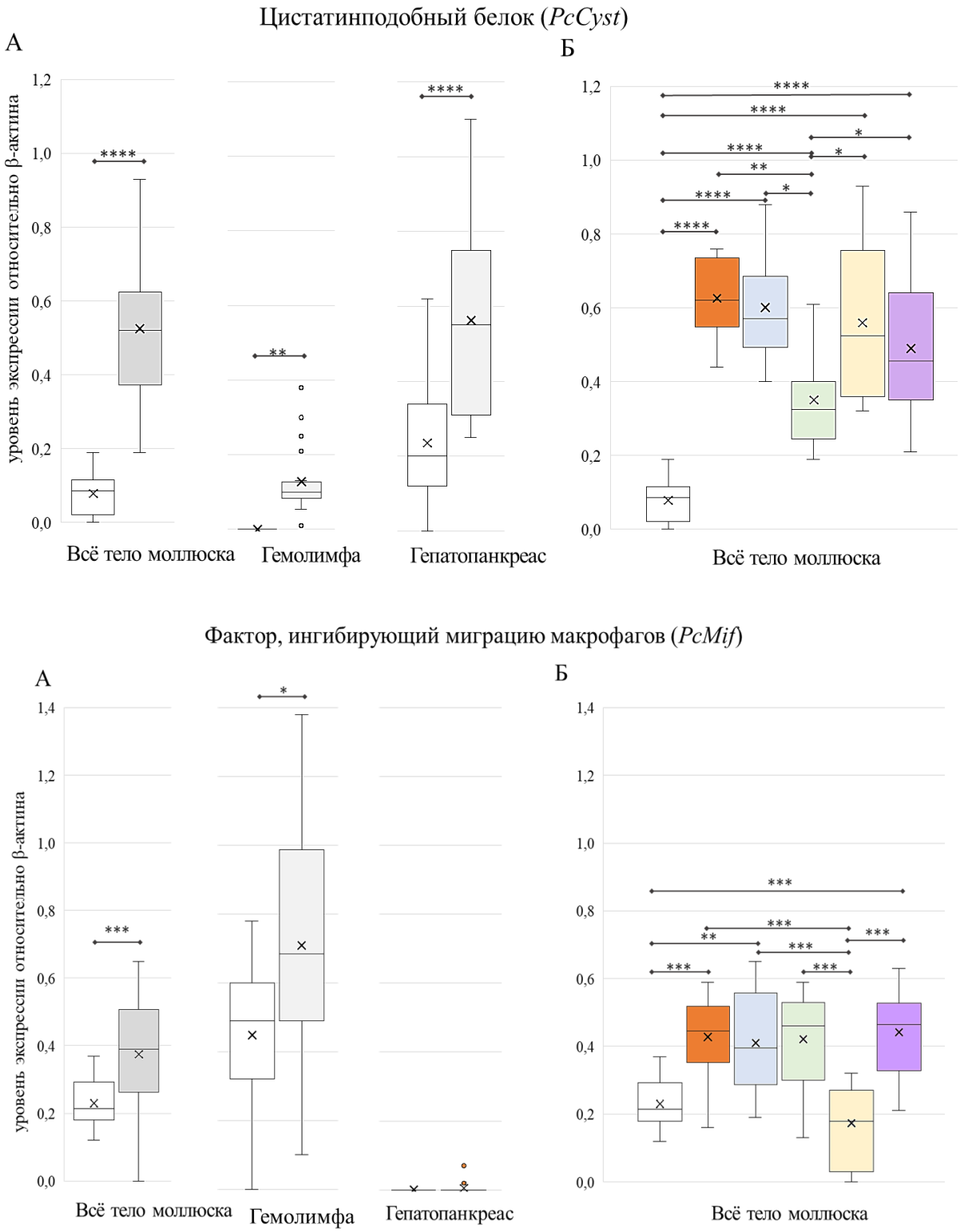


Рисунок 142. Относительный уровень экспрессии генов цистатинподобного белка (*PcCyst*) и фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (*PcMIF*) у моллюсков *Planorbarius corneus*. А – у незаражённых и заражённых трематодами моллюсков (вся выборка), Б – у незаражённых и заражённых трематодами разных видов моллюсков. Условные обозначения: см. рисунок 139.

В общей выборке заражённых особей экспрессия гена в гемолимфе достоверно выше, а в гепатопанкреасе ниже, чем у незаражённых моллюсков (рисунок 140, приложение 25).

Уровень экспрессии гена ***PcClect*** в среднем в 2.5 раза выше у заражённых моллюсков, по сравнению с незаражёнными. Также его экспрессия достоверно выше в гемолимфе (в 2 раза) и в гепатопанкреасе (в 2 раза) у заражённых моллюсков. Сильнее всего экспрессия гена *PcClect* повышена у моллюсков, заражённых трематодами *Cotylurus brevis* и *Notocotylus ephemera*. В этих группах уровень экспрессии гена достоверно выше, чем в группе моллюсков, заражённых *Plagiorchis multiglandularis* (рисунок 141, приложение 25).

Отдельно была проанализирована экспрессия гена ***PcCaBP.*** Установлено, что у заражённых моллюсков он экспрессируется интенсивнее, чем у незаражённых. Однако достоверное повышение экспрессии установлено только в гемолимфе (в среднем в 5 раз), но не в гепатопанкреасе (рисунок 141, приложение 25). Уровень экспрессии достоверно выше у всех групп заражённых моллюсков, кроме группы заражённых *Notocotylus ephemera.* В этой группе экспрессия гена *PcCaBP* достоверно ниже, чем в других группах заражённых моллюсков (рисунок 141, приложение 25).

Относительный уровень экспрессии гена ***PcCyst*** достоверно выше во всех группах заражённых моллюсков, по сравнению с незаражёнными. Повышение его экспрессии выявлено как в гемолимфе, так и в гепатопанкреасе (в среднем в 2.5 раза). В гемолимфе незаражённых улиток экспрессия гена не выявлена. У моллюсков с инвазией *Notocotylus ephemera* его экспрессия ниже, чем в остальных группах заражённых улиток (рисунок 142, приложение 25).

Ген цитокина ***PcMIF*** сильнее экспрессируется у заражённых моллюсков, по сравнению с незаражёнными. Аналогичный результат получен и для гемолимфы. В гепатопанкреасе экспрессия гена не выявлена. При этом в группе моллюсков, заражённых трематодами *Plagiorchis multiglandularis,* не выявлено усиления экспрессии гена *PcMIF*. В этой группе уровень экспрессии ниже, чем в остальных группах заражённых улиток (рисунок 142, приложение 25).

III.4.3.3. Экспрессия генов иммунного ответа в органах и тканях моллюсков, зараженных трематодами разных видов

Поскольку на первом этапе работы по анализу экспрессии генов иммунного ответа были выявлены достоверные различия в экспрессии генов *PcFREP7* и *PcClect* между заражёнными и незаражёнными моллюсками, эти гены были выбраны для исследования методом ПЦР в реальном времени. Кроме того, была проанализирована экспрессия генов, кодирующих другие факторы защитных реакций – толл-подобный рецептор 7 (*PcTLR7*), каталазу (*PcCat*), катепсин-подобную сериновую протеазу (*PcSP*), миелопероксидазу (*PcPerox*) и биомфализин (*PcBl*).

Для гена фибриногенподобного белка ***PcFREP7*** выявлено снижение экспрессии в гепатопанкреасе (в среднем в 4 раза), а также повышение экспрессии в тканях сердца и перикарда (более чем в 5 раз) (рисунок 143, приложение 26). Уровень экспрессии в гемолимфе выше, но различия не являются значимыми. Достоверное повышение экспрессии этого гена в гемолимфе происходит у моллюсков, заражённых трематодами *Echinostoma spiniferum* и *Bilharziella polonica*. В то же время достоверное снижение экспрессии гена *PcFREP7* выявлено в гепатопанкреасе у заражённых моллюсков всех групп, кроме заражённых *B. polonica* (рисунок 145).

Для гена С-лектина ***PcClect*** выявлено достоверное повышение экспрессии в гемолимфе (до 2 раз) и сердце (в 2–4 раза) у заражённых моллюсков всех групп (рисунок 143, приложение 26). Наибольшие значения относительного количества мРНК гена в гемолимфе характерны для моллюсков, заражённых трематодами *Echinostoma spiniferum* и *Bilharziella polonica*. Экспрессия в гепатопанкреасе у заражённых улиток в 2–3 раза выше, чем у незаражённых, – за исключением группы заражённых *Plagiorchis multiglandularis*. Также экспрессия гена *PcClect* повышена в тканях ноги моллюсков, заражённых трематодами *Notocotylus ephemera*, *Plagiorchis multiglandularis* и *Echinostoma spiniferum*. У моллюсков, заражённых *Plagiorchis multiglandularis,* уровень экспрессии гена достоверно ниже в гепатопанкреасе и ноге, по сравнению с моллюсками, заражёнными *Notocotylus ephemera* (рисунок 146).

Ген толл-подобного рецептора ***PcTLR7*** характеризуется относительной низким уровнем экспрессии во всех тканях, кроме гемолимфы (рисунок 143, приложение 26). В гепатопанкреасе незаражённых моллюсков транскриптов гена не выявлено, а у заражённых трематодами *Echinostoma spiniferum* и *Bilharziella polonica* экспрессия гена в гепатопанкреасе достоверно повышается. В гемолимфе выявлено снижение экспрессии гена у заражённых *B. polonica* (в среднем в 3 раза) и *Plagiorchis multiglandularis* (в среднем в 5 раз) моллюсков. Схожий результат был получен и для белковой железы – в обоих группах выявлено снижение экспрессии гена. Кроме того, выявлено повышение его экспрессии в белковой железе моллюсков, заражённых трематодами *Echinostoma spiniferum* (в среднем в 2 раза). При этом уровень экспрессии гена в белковой железе достоверно ниже в группах моллюсков, заражённых *Plagiorchis multiglandularis и Bilharziella polonica*, по сравнению с другими группами заражённых моллюсков.

В сердце и ноге заражённых *B. polonica* моллюсков также происходит достоверное снижение экспрессии гена *PcTLR7* по сравнению с незаражёнными улитками (в среднем в 3.5 и 3 раза соответственно). Кроме того, для этой группы характерен минимальный уровень экспрессии гена в сердце и ноге среди заражённых моллюсков. В сердце моллюсков, заражённых *Echinostoma spiniferum,* экспрессия достоверно выше, чем у незаражённых (в

среднем в 2 раза) и во всех группах заражённых моллюсков, кроме заражённых трематодами *Cotylurus brevis* (рисунок 147).

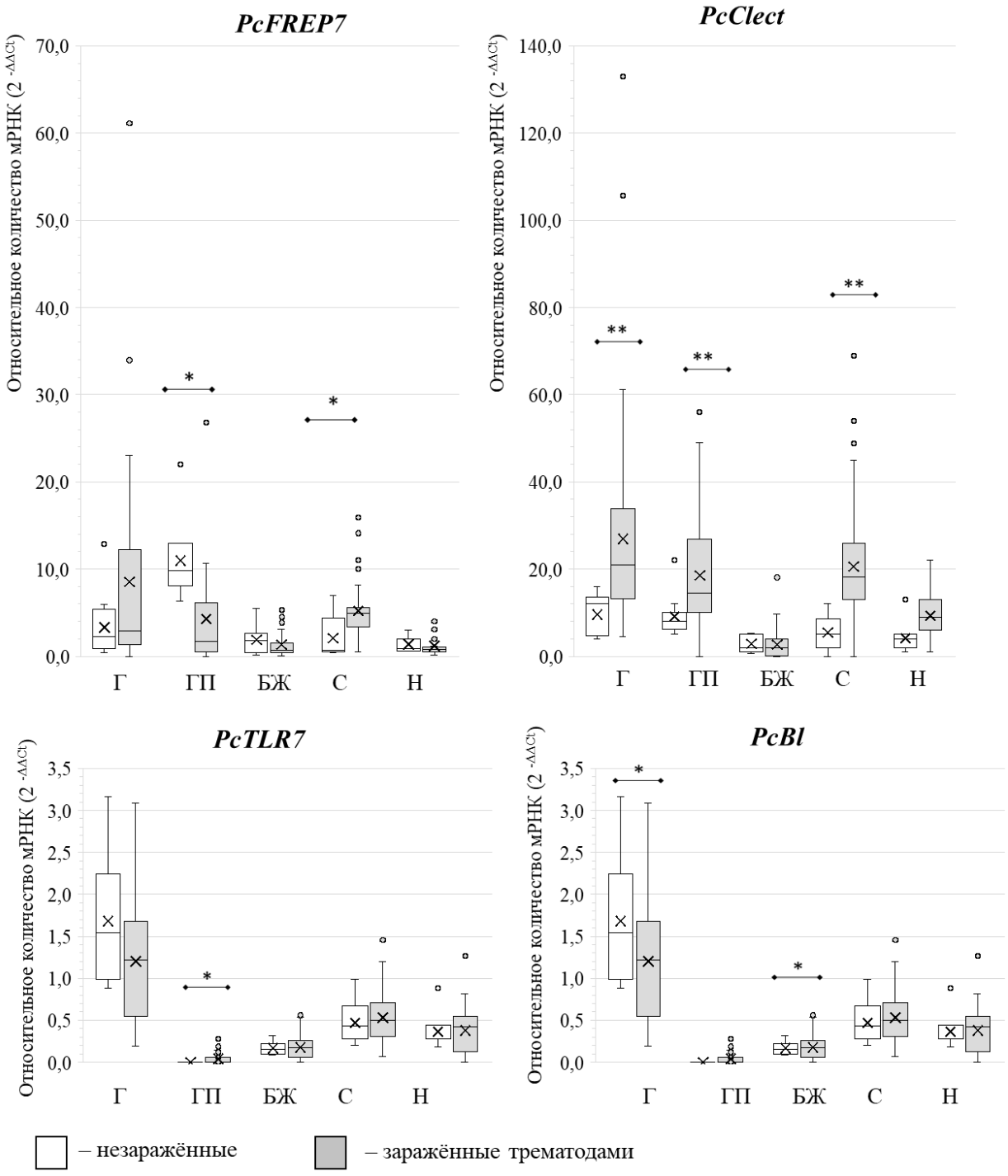


Рисунок 143. Относительный уровень экспрессии генов фибриногенподобного белка 7 (*PcFREP7*), С-лектина (*PcClect*), толл-подобного рецептора 7 (*PcTLR7*) и бимофализина (*PcBl*) в органах и тканях моллюсков *Planorbarius corneus*. Условные обозначения: группы моллюсков обозначены разными цветами (см. легенду); ось ординат – уровень экспрессии относительно гена β-актина (относительная концентрация ПЦР-продукта в конечной точке, крест – среднее значение, горизонтальная черта – Me, верхняя и нижняя границы элементов диаграммы – границы K1 и K3, усы – максимальное и минимальное значения, точки – выбросы). Статистически значимые различия согласно U-критерию Манна-Уитни: * – $p<0.05$, ** – $p<0.01$.

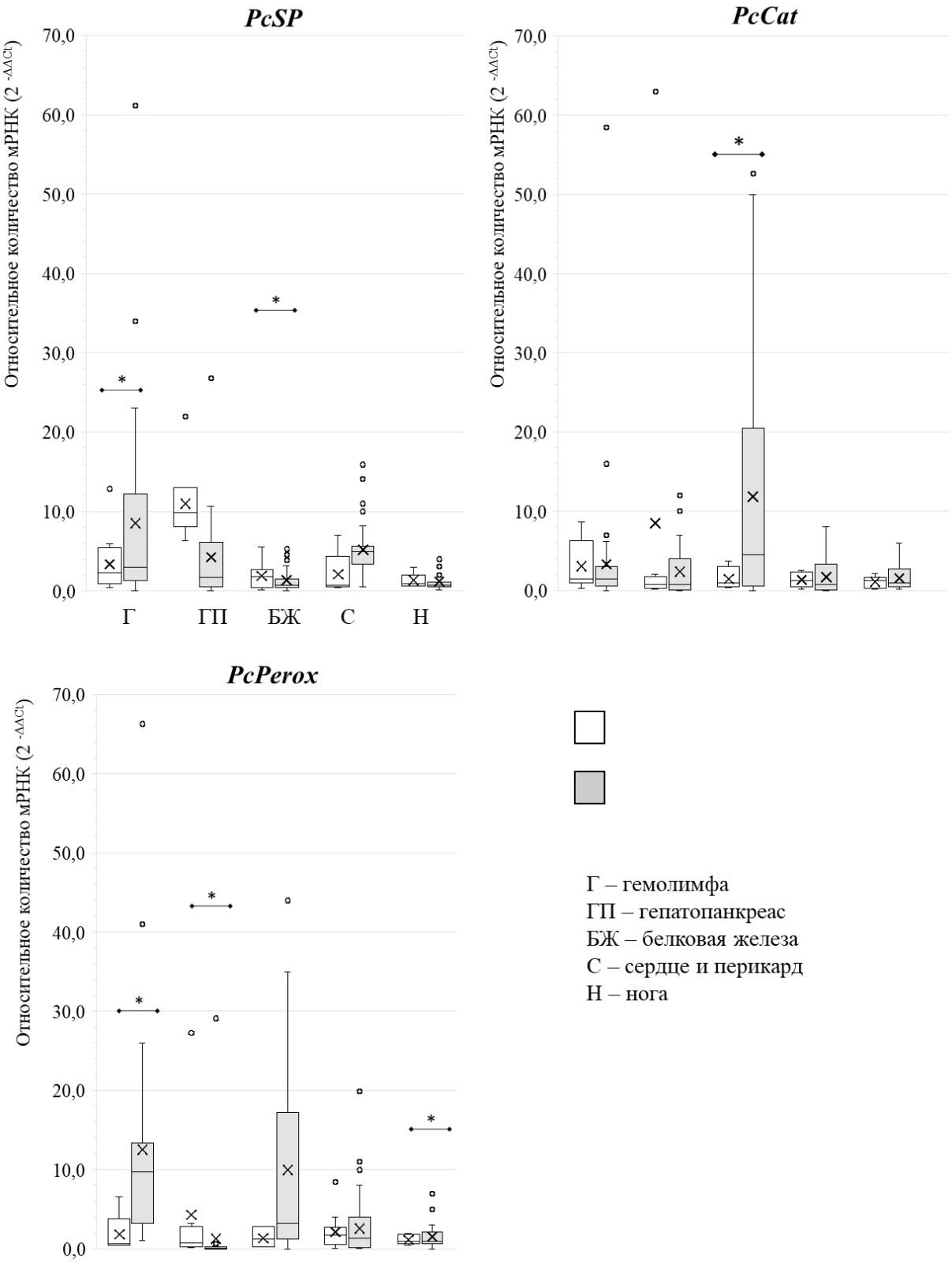


Рисунок 144. Относительный уровень экспрессии генов катепсин-подобной сериновой протеазы (*PcSP*), каталазы (*PcCat*) и миелопероксидазы (*PcPerox*) в органах и тканях моллюсков *Planorbarius corneus*. Условные обозначения: см. рисунок 143 и легенду в нижней правой части рисунка.

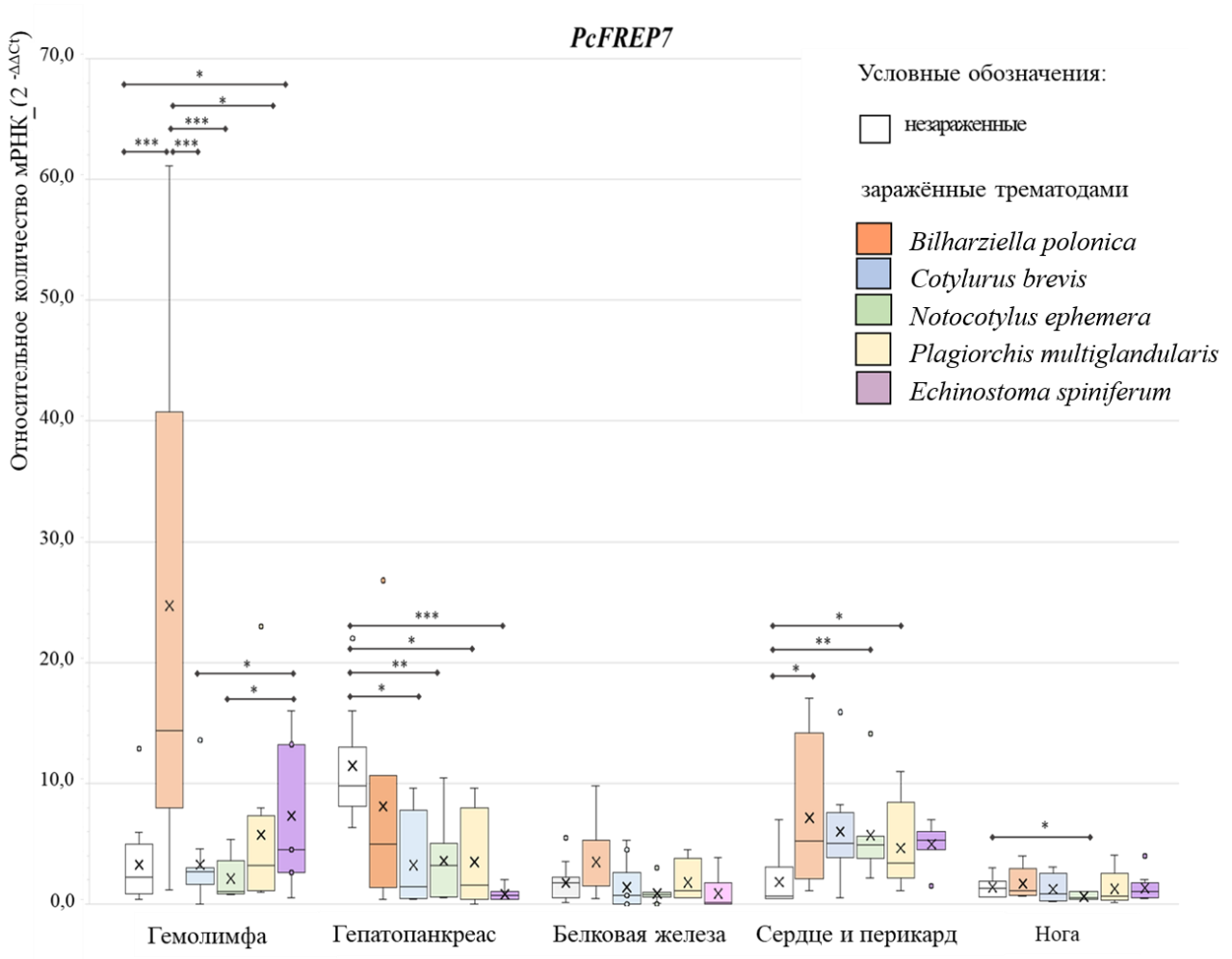


Рисунок 145. Относительный уровень экспрессии гена фибриногенподобного белка (*PcFREP7*) в органах и тканях моллюсков *Planorbarius corneus*. Условные обозначения: группы моллюсков обозначены разными цветами (см. легенду); осьY – уровень экспрессии относительно генов β-актина и GAPDH ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, крест – среднее значение, горизонтальная черта – Me, верхняя и нижняя границы элементов диаграммы – границы K1 и K3, усы – максимальное и минимальное значения, точки – выбросы). Статистически значимые различия согласно U-критерию Манна-Уитни: * – $p<0.05$, ** – $p<0.01$, *** – $p<0.005$, **** – $p<0.0001$.

Для гена каталазы ***PcCat*** выявлено повышение экспрессии в белковой железе у заражённых моллюсков (в среднем в 12 раз), по сравнению с незаражёнными (рисунок 144, приложение 26). В то же время, достоверное повышение экспрессии гена в белковой железе происходит только у заражённых *Bilharziella polonica* (в 36 раз) улиток. У моллюсков, заражённых *Cotylurus brevis,* экспрессия гена в белковой железе снижена (в среднем в 30 раз), по сравнению с незаражёнными. Также экспрессия гена *PcCat* повышена, по сравнению с незаражёнными, в тканях ноги моллюсков, заражённых *Bilharziella polonica* (в 2 раза) и сердце и гепатопанкреасе моллюсков, заражённых *Echinostoma spiniferum* (в среднем в 3 и 4 раза соответственно). В то же время, в тканях сердца заражённых *Bilharziella polonica* моллюсков экспрессия гена *PcCat* достоверно снижена (в среднем в 1.8 раз) (рисунок 148).

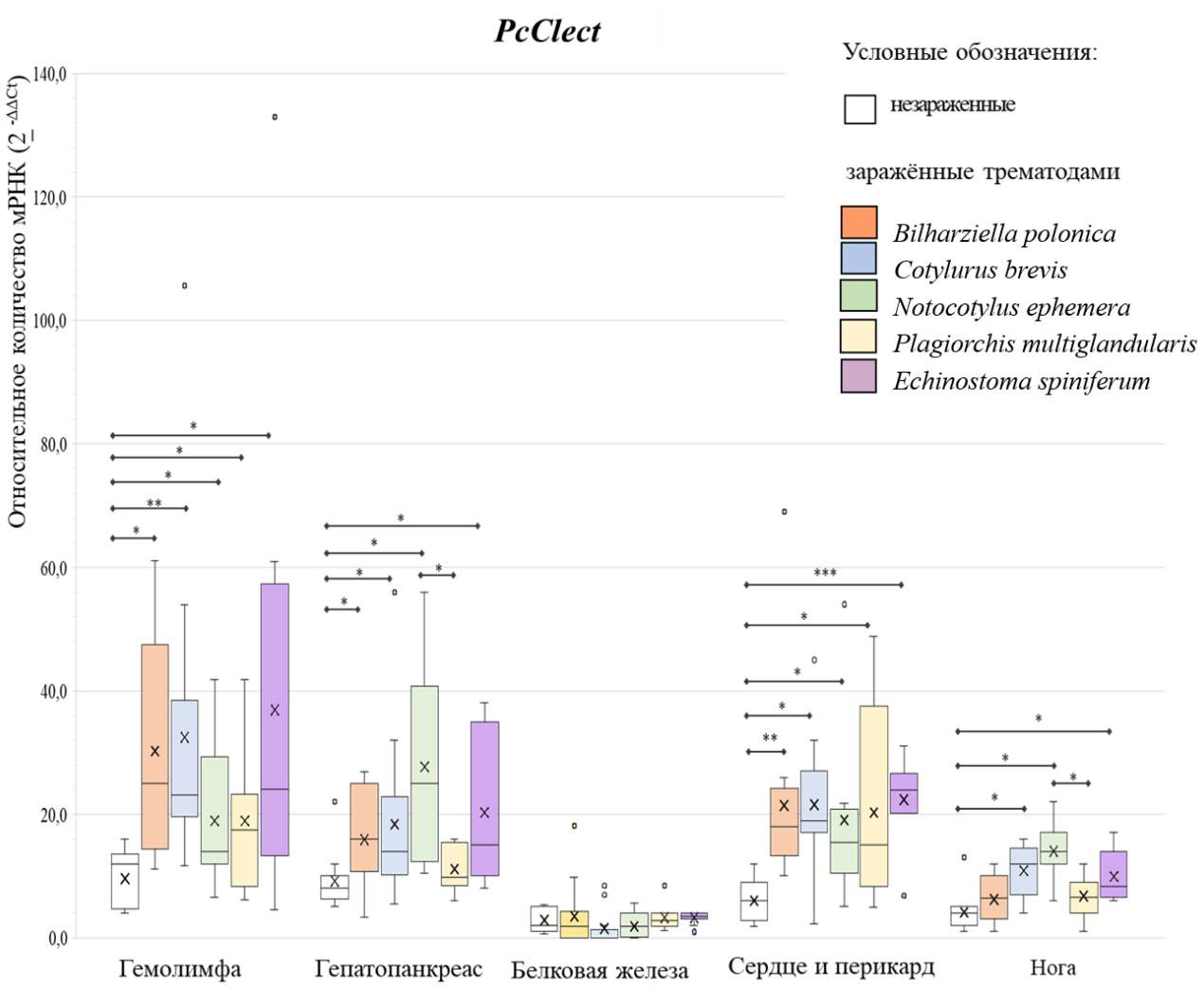


Рисунок 146. Относительный уровень экспрессии гена С-лектина (*PcClect)* в органах и тканях моллюсков *Planorbarius corneus*. Условные обозначения: см. рисунок 145 и легенду в правом верхнем углу рисунка.

Уровень экспрессии гена миелопероксидазы ***PcPerox*** выше в гемолимфе (в среднем в 1.5 раза), гепатопанкреасе (в среднем в 3.5 раза) и ноге заражённых моллюсков (в среднем в 1.3 раза), по сравнению с незаражёнными (рисунок 144, приложение 26). При этом достоверное повышение экспрессии гена в гемолимфе, по сравнению с незаражёнными, происходит только у моллюсков, заражённых *Echinostoma spiniferum* (в среднем в 2.5 раза). В гепатопанкреасе достоверное повышение экспрессии гена *PcPerox* происходит у моллюсков, заражённых *E. spiniferum* (в среднем в 8 раз), *Bilharziella polonica* (в среднем в 3 раза) и *Notocotylus ephemer*a (в среднем в 3 раза). В то же время, выявлено снижение экспрессии гена *PcPerox* в ноге моллюсков, заражённых трематодами *Plagiorchis multiglandularis* (в среднем в 4 раза) (рисунок 149).

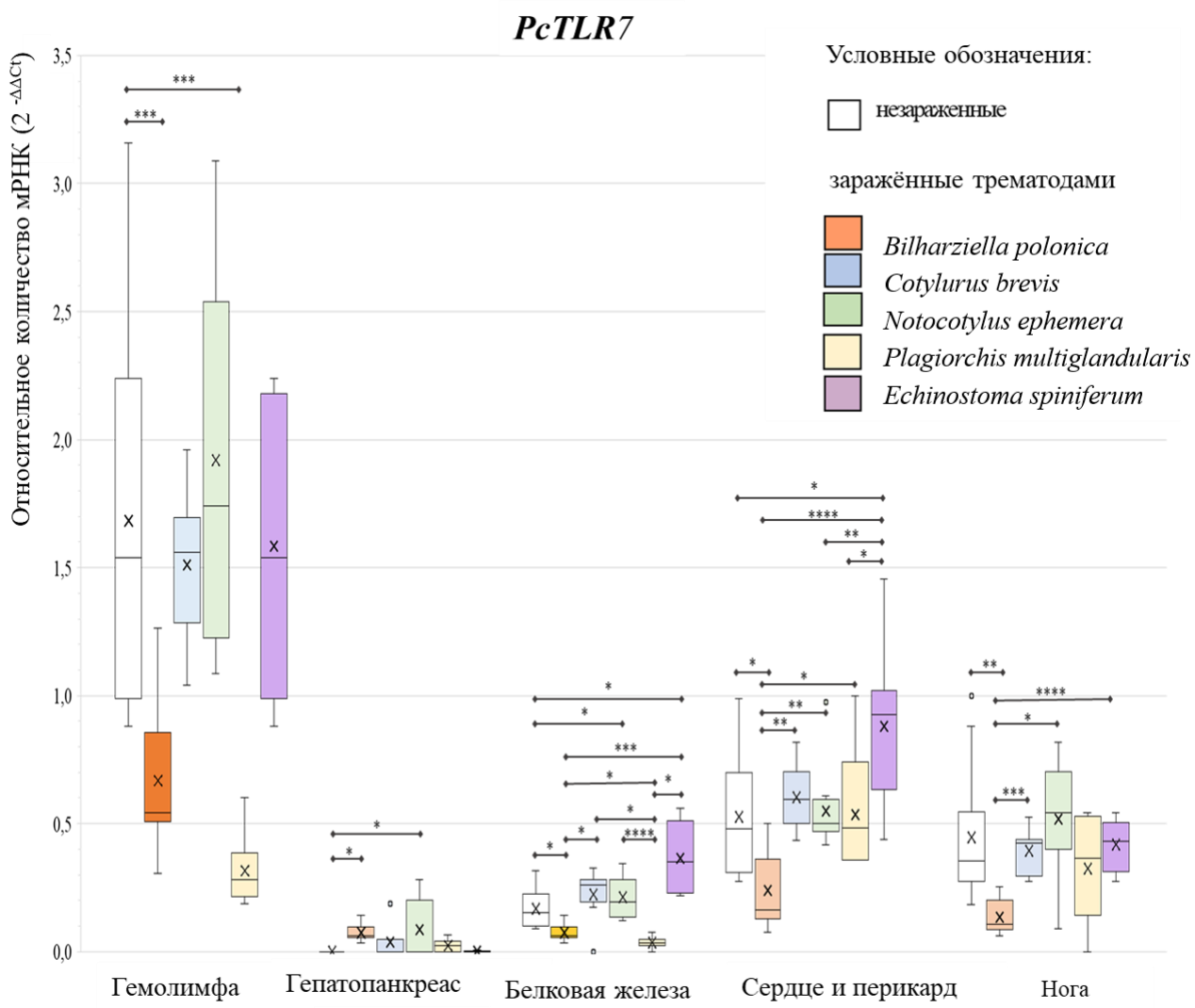


Рисунок 147. Относительный уровень экспрессии гена толл-подобного рецептора 7 (*PcTLR7*) в органах и тканях моллюсков *Planorbarius corneus*. Условные обозначения: см. рисунок 145 и легенду в правом верхнем углу рисунка.

Для гена катепсин-подобной сериновой протеазы ***PcSP*** выявлено повышение экспрессии в выборке заражённых моллюсков, по сравнению с незаражёнными в гемолимфе (в среднем в 13 раз) и в белковой железе (в среднем в 2.5 раза). Также установлено снижение экспрессии гена в гепатопанкреасе (в среднем в 19 раз) (рисунок 144, приложение 26). При этом в гемолимфе уровень экспрессии гена *PcSP* достоверно отличается от незаражённых в четырёх группах заражённых моллюсков. В белковой железе уровень экспрессии гена *PcSP* повышен только у заражённых *Echinostoma spiniferum* (в 2.5 раза) и *Bilharziella polonica* (в 23 раза) улиток. У последних он выше, чем в остальных группах заражённых моллюсков в несколько раз – и в гемолимфе, и в белковой железе. В гепатопанкреасе выявлено снижение экспрессии гена *PcSP*

во всех группах заражённых моллюсков, кроме заражённых *B. polonica.* В сердце и перикарде заражённых *Plagiorchis multiglandularis* моллюсков мРНК гена *PcSP* не выявлена. В группе моллюсков, заражённых *P. multiglandularis,* уровень экспрессии гена в тканях ноги минимальный среди всех групп моллюсков (рисунок 150).

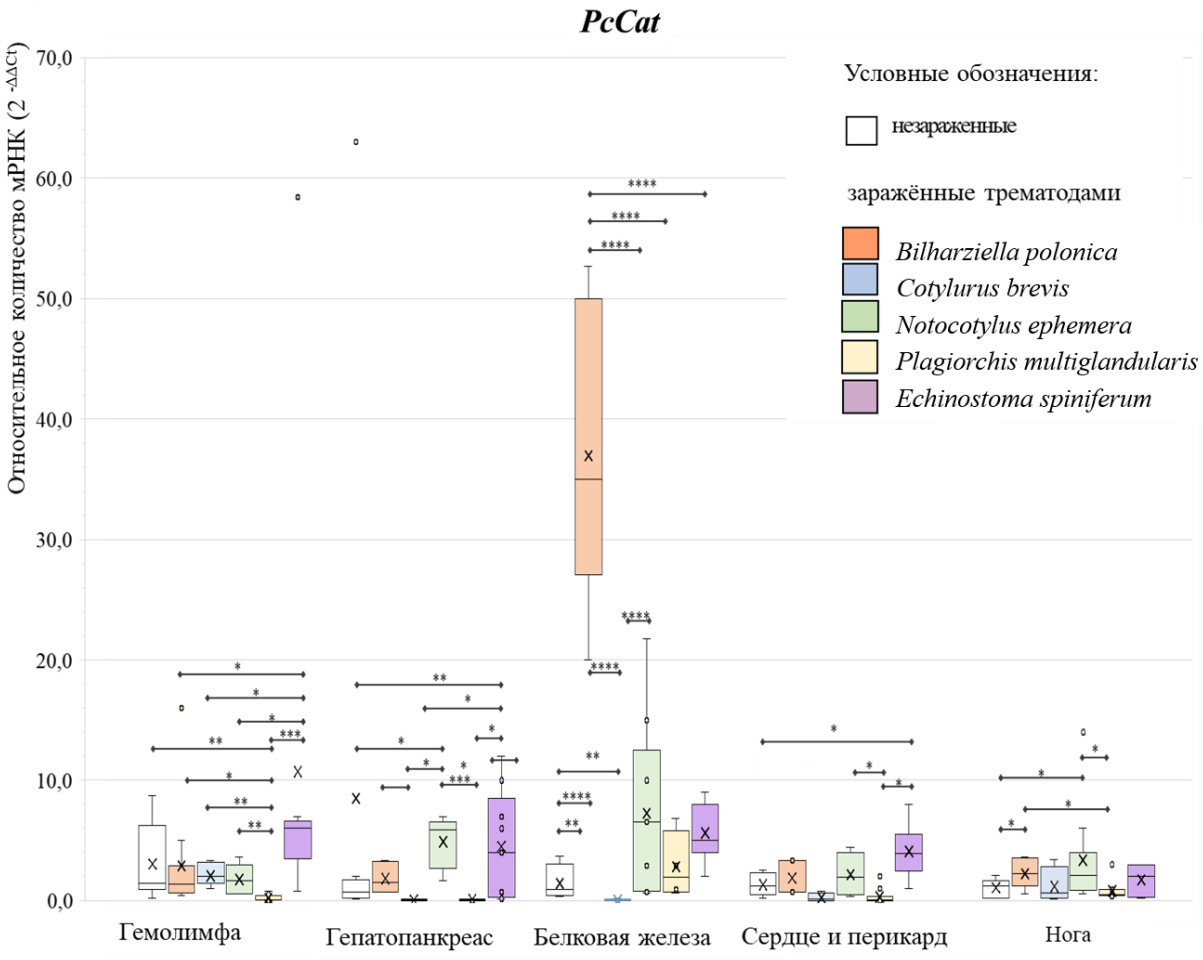


Рисунок 148. Относительный уровень экспрессии гена каталазы (*PcCat*) в органах и тканях моллюсков *Planorbarius corneus*. Условные обозначения: см. рисунок 145 и легенду в правом верхнем углу рисунка.

Экспрессия гена биомфализина ***PcBl*** у незаражённых роговых катушек выявлена только в гемолимфе, сердце и тканях ноги. У заражённых улиток уровень экспрессии гена достоверно выше, чем у незаражённых (в среднем в 2 раза) (рисунок 143, приложение 26). Во всех группах заражённых моллюсков, кроме заражённых *Plagiorchis multiglandularis,* выявлено повышение экспрессии гена *PcBl* в гемолимфе. У заражённых *P. multiglandularis* моллюсков уровень экспрессии гена достоверно ниже, чем в других группах заражённых моллюсков. В сердце экспрессия гена *PcBl* повышена в группе заражённых *Echinostoma spiniferum* моллюсков и

понижена у заражённых *Plagiorchis multiglandularis*. В гепатопанкреасе мРНК гена выявлена только у заражённых *Bilharziella polonica* моллюсков, а в белковой железе – только у моллюсков, заражённых трематодами *B. polonica* и *Echinostoma spiniferum* (рисунок 151).

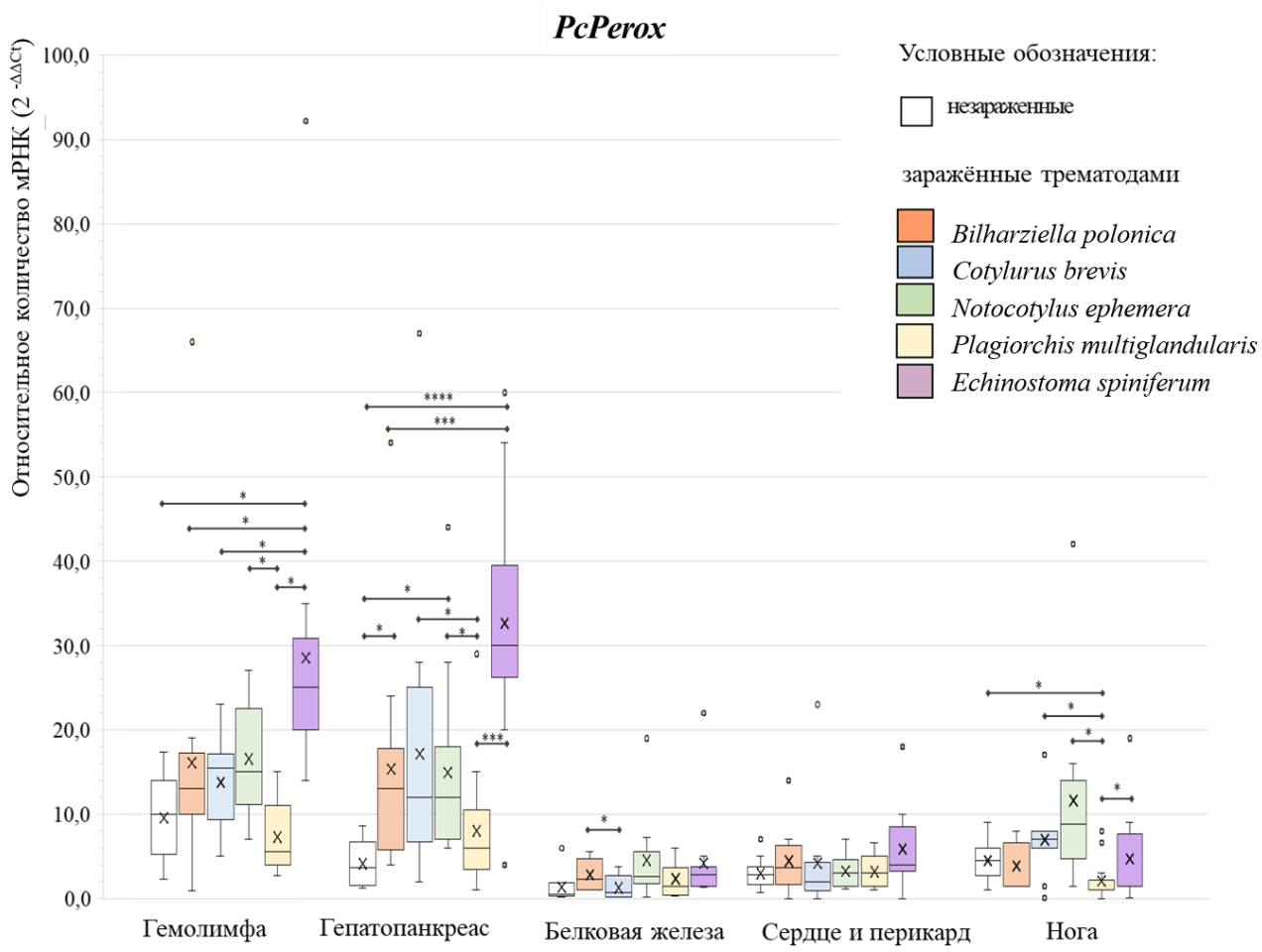


Рисунок 149. Относительный уровень экспрессии гена миелопероксидазы (*PcPero*x) в органах и тканях *Planorbarius corneus*. Условные обозначения: см. рисунок 145 и легенду в правом верхнем углу рисунка.

Обсуждение к разделу III.4.3

В иммунных реакциях моллюсков задействовано множество факторов, обеспечивающих цитотоксичность клеток гемолимфы, внеклеточные гуморальные реакции и регуляцию иммунного ответа. В настоящее время показана роль в иммунном ответе моллюсков факторов таких групп, как ПРР, протеазы, ингибиторы протеаз, антибактериальные белки, токсины, компоненты комплемента, белки острой фазы, активные кислородные метаболиты, антиоксидантные ферменты и др. (Olafsen, 1988; Song et al., 2010; Adema, Loker, 2015; Castillo et al., 2015; Dinguirard et al., 2018; Li et al., 2020). Одним из основных подходов, позволяющих выявлять молекулярные механизмы и генетические основы иммунных реакций, является анализ

экспрессии генов факторов иммунного ответа. Поэтому для изучения иммунного ответа у моллюсков модельного вида нами был выполнен анализ транскриптома, а также изучена экспрессия факторов иммунного ответа, относящихся к разным группам.

Результаты анализа транскриптомов гемоцитов заражённых и незаражённых моллюсков *Planorbarius corneus* и сравнительного анализа экспрессии отдельных генов иммунного ответа свидетельствуют о существенном влиянии заражённости трематодами на активность многих генов.

Выявленные **дифференциально экспрессирующиеся транскрипты** в гемоцитах заражённых *Bilharziella polonica* и незаражённых моллюсков *Planorbarius corneus* условно можно разделить на следующие группы: ПРР, факторы цитотоксичности, регуляторы клеточных процессов, цитокины, гомологичные вирусным последовательности.

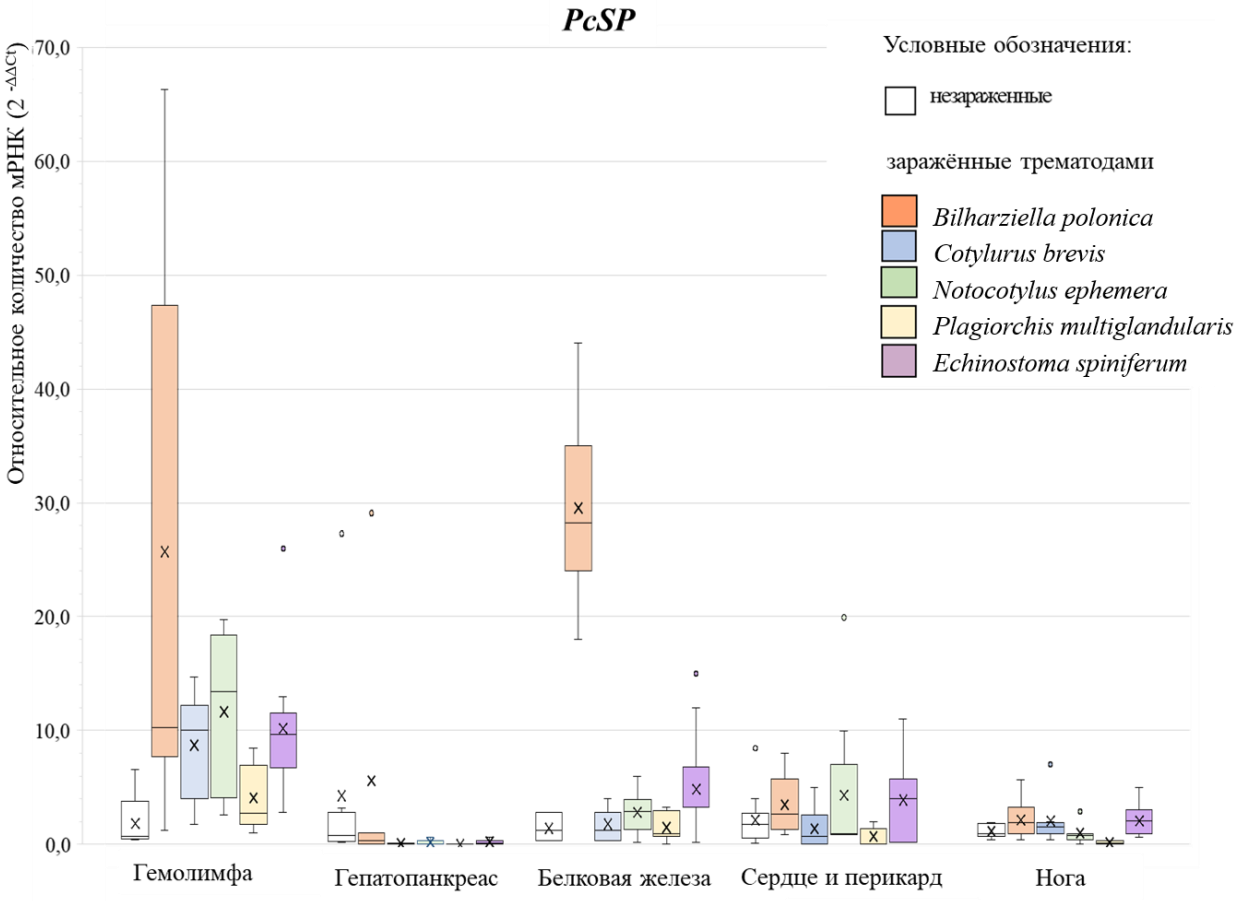


Рисунок 150. Относительный уровень экспрессии гена катепсин-подобной сериновой протеазы (*PcSP*) в органах и тканях моллюсков *Planorbarius corneus*. Условные обозначения: см. рисунок 145 и легенду в правом верхнем углу рисунка.

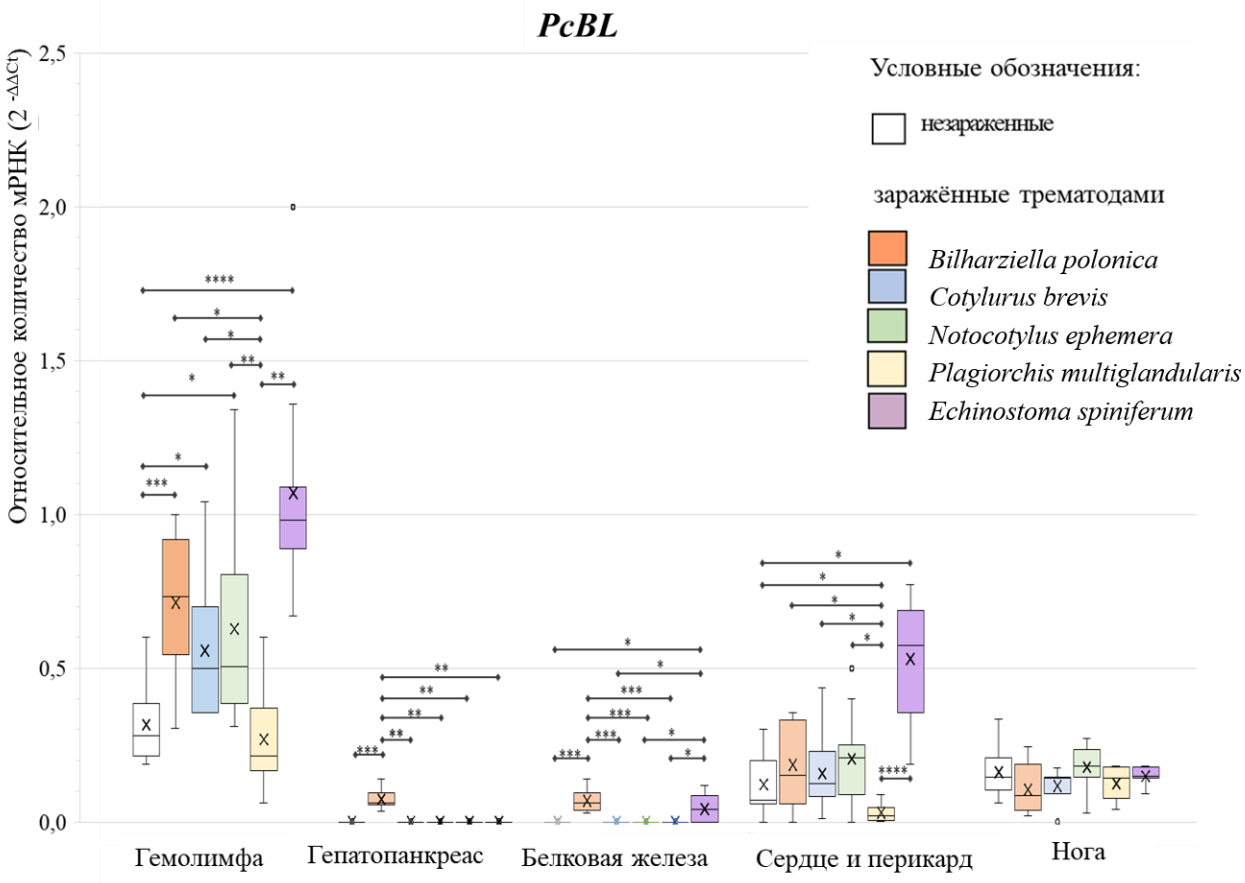


Рисунок 151. Относительный уровень экспрессии гена биомфализина 7 (*PcBL*) в органах и тканях моллюсков *Planorbarius corneus*. Условные обозначения: см. рисунок 145 и легенду в правом верхнем углу рисунка.

Полученные нами данные о повышении экспрессии у заражённых моллюсков некоторых последовательностей ретротранспозонов подтверждают точку зрения о том, что мобильные генетические элементы могут участвовать во взаимодействии трематод с моллюском-хозяином. В частности, высказывалось предположение о горизонтальном переносе генов между хозяином и паразитом и их решающей роли в успешности паразитарной инвазии (Smith et al., 2021).

Повышение активности генов, участвующих в регуляции белкового метаболизма (фактор элонгации и полиубиквитина-B), может и свидетельствовать о том, что в гемоцитах заражённых моллюсков более интенсивно протекают процессы биосинтеза и деградация белка. Ранее было показано, что экспрессия этого же фактора элонгации (elongation factor 1-alpha 1-like) повышается у моллюсков резистентной линии *Biomphalaria glabrata* при заражении трематодами *Schistosoma mansoni* (Lockyer et al., 2008). Эти данные также согласуются с результатами анализа на проточном цитометре – гемоциты заражённых улиток интенсивнее накапливают краситель SYTO62, связывающийся с нуклеиновыми кислотами (в том числе – с транскриптами) (см. раздел III.2.3).

В то же время, у заражённых моллюсков снижена экспрессия генов других регуляторных белков – хитиндеацетилазы и анкирин-подобного белка. О влиянии трематодной инвазии на работу гена белка хитиндеацетилазы сообщалось ранее в работе по изучению транскриптома моллюсков *Biomphalaria pfeifferi,* заражённых трематодами *Schistosoma mansoni* (Buddenborg et al., 2017). Молекулы хитин-связывающих белков и самого хитина выявлены в гемолимфе и других беспозвоночных, однако их функция не установлена (Heath-Heckman, McFall-Ngai, 2011). Снижение экспрессии анкирин-подобного белка, который у позвоночных регулирует клеточный цикл и участвует в антибактериальном иммунном ответе (Menning, Kufer, 2013), возможно, свидетельствует о подавлении иммунного ответа у заражённых моллюсков в результате длительной инвазии.

Неожиданной оказалась находка в гемоцитах белка темптина, который считается регулятором процесса размножения у гастропод. Однако изменение его экспрессии при иммунизации уже было описано у моллюсков других видов. В частности, экспрессия гена темптина повышалась у моллюсков *Biomphalaria pfeifferi* через 3 дня п.з. *Schistosoma mansoni* (Buddenborg et al., 2017; Moreira et al., 2020). Усиление работы гена темптина также происходит в гемоцитах мидий *Mytilus galloprovincialis* после стимуляции липополисахаридами (Lu et al., 2022). С одной стороны, такие результаты могут свидетельствовать о том, что активность белка темптина не ограничивается регуляцией размножения. Так у двустворчатых моллюсков *Hyriopsis cumingii* темптин влияет на процессы минерализации раковины (Peng et al., 2021). С другой стороны, изменение экспрессии гена темптина может быть связано с влиянием трематод на репродуктивную способность моллюсков. Известно, что трематоды могут вызывать так называемую «паразитарную кастрацию» своих хозяев (см. Галактионов, Добровольский, 1998). Пережившие заражение моллюски могут восстанавливать свою репродуктивную функцию. Таким образом, возможно, через темптин происходит регуляция восстановление гонады. Полученные данные свидетельствуют о выработке темптина гемоцитами, что может указывать на их роль регуляции физиологических процессов моллюска.

Другой белок, функция которого в иммунном ответе моллюсков пока не ясна – аполипофорин. У роговых катушек экспрессия его гена в гемоцитах повышается при заражении, а для моллюсков *Biomphalaria glabrata* из восприимчивой линии показано снижение экспрессии при заражении *Schistosoma mansoni* (Dinguirard et al., 2018). В то же время, роль аполипофоринов в иммунном ответе подтверждена для членистоногих. Различные представители этого семейства белков у насекомых участвуют в распознавании патогенных микроорганизмов, процессах нейтрализации токсинов, формировании липидного барьера кутикулы и антимикробной защите (Zhao et al., 2020).

В группе транскриптов с повышенной регуляцией в гемоцитах заражённых моллюсков также оказался транскрипт гена белка теплового шока Hsp70. Данные об экспрессии этого белка у моллюсков противоречивы. В некоторых работах сообщается о снижении экспрессии его гена при заражении трематодами как у резистентных, так и у восприимчивых моллюсков *Biomphalaria glabrata*. Амплитуда изменения экспрессии меньше у резистентных моллюсков (Zahoor et al., 2010). В то же время, более высокая активность гена была обнаружена у резистентных улиток, что свидетельствует о том, что Hsp70 проявляет защитные свойства (Lockyer et al., 2008). Предполагается, что Hsp70 влияет как на возможность заражения моллюска мирацидиями трематод, так и на течение инвазии (Ittiprasert, Knight, 2012).

Среди мРНК, для которых выявлено повышение экспрессии, есть транскрипты коллагена альфа и катепсин B-подобного белка (Lockyer et al., 2008; Myers et al., 2008; Tetreau et al., 2017). Первый участвует в коагуляции гемолимфы и инкапсуляции спороцист, а второй является эндосомальной цистеиновой протеазой, которая вовлечена в переработку содержимого лизосом.

Также у заражённых моллюсков повышена экспрессия генов, кодирующих белки, подобные тяжелой цепи миозина (II- и 6/7-подобный). В настоящее время общепризнано, что представители большого суперсемейства миозинов могут присутствовать практически в каждом компартменте различных клеток, опосредуя процессы клеточной адгезии, миграции, эндоцитоза, фагоцитоза, ремоделирования хроматина и другие (Vicente-Manzanares et al., 2009). Имеются данные о том, что у резистентных *Biomphalaria glabrata* белок с тяжелой цепью миозина II слабее экспрессирован в гемоцитах, входящих в составе капсул вокруг спороцист, по сравнению с клетками, не участвующими в инкапсуляции (Dinguirard et al., 2018). Однако при иммунизации мирацидиями трематод у резистентных моллюсков усиление экспрессии гена происходит интенсивнее, чем у чувствительных (Lockyer et al., 2012). Можно предположить, что в условиях длительного заражения моллюсков *Planorbarius corneus* трематодами *Bilharziella polonica* молекулы миозина задействованы в устранении тканевых повреждений, возникающих в результате роста и жизнедеятельности паразита.

Также можно предположить участие в процессах регенерации брорин-подобного белка, экспрессия гена которого повышена в гемоцитах заражённых моллюсков. Установлено, что брорин-подобный белок в большом количестве накапливается в целомической жидкости морской звезды *Asterias rubens* через несколько часов после индуцированной кровопотери (Shabelnikov et al., 2019). Таким образом, брорин-подобный белок может играть роль в восстановлении тканей, способствуя минимизации последствий продолжающегося заражения.

Полученные данные свидетельствуют об изменении экспрессии большого числа генов в результате инвазии моллюсков трематодами. Некоторые из этих генов могут участвовать в

регуляции физиологических процессов моллюсков – размножения и регенерации. Однако для понимания динамики иммунного ответа и подтверждения участия соответствующих генов в конкретных процессах, связанных с реализацией иммунного ответа, требуются дополнительные исследования. В том числе – анализ экспрессии генов иммунитета при экспериментальном заражении, а также анализ экспрессии отдельных генов иммунного ответа.

Для анализа **экспрессии отдельных генов** у моллюсков *Planorbarius corneus*, заражённых трематодами разных видов**,** были выбраны факторы, для которых ранее исследовалось участие в защитных реакциях моллюсков.

Первая группа генов – кодирующие **патогенраспознающие молекулы:** *PcFREP*, *PcFREP7*, *PcClect* и *PcTLR7*. Анализ экспрессии этих генов и их возможная роль в иммунном ответе рассмотрены в разделе, посвящённом патогенраспознающим рецепторам (раздел III.3.2). Однако полученные данные свидетельствуют о том, что эти ПРР экспрессируются не только гемоцитах, но и в клетках других тканей моллюска. В ряде случаев тенденция изменения экспрессии генов ПРР в гемолимфе совпадает с таковой в других тканях.

Для гена *PcFREP* выявлено снижение экспрессии у большинства заражённых моллюсков, по сравнению с незаражёнными. Это снижение также происходит в гемоцитах, но в гепатопанкреасе экспрессия у заражённых моллюсков в среднем выше. Так как праймеры для анализа экспрессии *PcFREP* подбирали на консервативную часть последовательности FBG-домена, полученные данные отражают общий уровень экспрессии ФБ у моллюсков. Тенденция изменения экспрессии в гемоцитах и во всём теле моллюсков одинаковая: при трематодной инвазии активность гена снижается (рисунки 139, 151). Поэтому можно предположить, что большая часть ФБ у моллюсков *P. corneus* экспрессируется именно в гемоцитах.

Ген *FREP7*, проявляет бóльшую активность в гемолимфе заражённых моллюсков, по сравнению с незаражёнными. Кроме того, экспрессия гена значительно повышена в сердце. При этом в гепатопанкреасе происходит снижение его экспрессии (рисунок 140). По данным анализу тотальных препаратов моллюсков, снижение экспрессии выявлено в четырёх из пяти групп заражённых особей (рисунок 152). Таким образом, можно предположить, что основная экспрессия гена происходит именно в гепатопанкреасе. И её снижение в ходе инвазии влияет на количество мРНК FREP7 в тотальных препаратах моллюсков. Подавление экспрессии гена в гепатопанкреасе может быть связано с повреждением его тканей в результате жизнедеятельности и / или влияния паразита. Кроме того, конститутивно низкий уровень экспрессии ФБ может свидетельствовать о бóльшей восприимчивости моллюсков к трематодной инвазии. Например, у биомфалярий резистентных к заражению трематодами линий гены ФБ работают активнее, чем у биомфалярий чувствительных линий (Hertel et al., 2005; Hanington et al., 2012). Отдельного внимания заслуживают данные о значительном

повышении экспрессия гена *FREP7* в сердце заражённых моллюсков всех групп. Активация гена происходит сильнее, чем в гемоцитах. В качестве возможных причин такого эффекта, можно предположить наличие скоплений активированных гемоцитов в районе сердца – в результате клеточной реакции или активации гемопоэза. Такие агглютинации описаны у заражённых трематодами биомфалярий (Ataev, Coustau 1999).

Для гена *PcFREP3* выявлено снижение экспрессии в гемолимфе и повышение экспрессии в гепатопанкреасе в выборке заражённых трематодами улиток (рисунок 152). Однако у части заражённых улиток экспрессия гена не отличается от незаражённых. У других она повышена или понижена. Интересно, что экспрессия резко повышена только у заражённых *Cotylurus brevis* моллюсков (см. рисунки 141, 152). Избирательное повышение экспрессии генов *FREP* на заражение паразитами разных видов ранее было описано моллюсков *Biomphalaria glabrata* (Hertel et al., 2005; Hanington et al., 2010a, см. раздел III.3) и *Lymnaea stagnalis* (Seppälä et al., 2021, см. раздел III.3).

Уровень экспрессии гена *PcTLR7* у заражённых моллюсков по всей выборке не отличается от незаражённых. Однако выявлено достоверное понижение его экспрессии у моллюсков, заражённых трематодами двух видов (см. рисунки 147, 153). При этом экспрессия повышена у большинства заражённых моллюсков в сердце, а у части моллюсков – в белковой железе. Кроме того, у незаражённых моллюсков не выявлены транскрипты гена *PcTLR7* в гепатопанкреасе, а у части заражённых экспрессия в этом органе выявляется (см. рисунок 147). Единственная группа моллюсков, у которой экспрессия гена понижена во всех тканях, кроме гепатопанкреаса – заражённые трематодой *Bilharziella polonica.* Снижение активности гена в этой группе моллюсков подтверждается и результатами анализа транскриптома (см. раздел III.2.3).

Ген *PcTLR3*, наоборот, активирован в гемоцитах зараженных *B. polonica* моллюсков (см. раздел III.3.2). У моллюсков, заражённых трематодами *Plagiorchis multiglandularis,* экспрессия генов *PcTLR3* и *PcTLR7* ослаблена (рисунок 153). Таким образом, можно предположить избирательное влияние трематод этих видов на работу генов *PcTLR3* и *PcTLR7.* Учитывая, что ТПР являются ПРР, такое избирательное влияние паразитов может быть следствием того, что именно эти рецепторы участвуют в их распознавании. В таком случае паразит может подавлять экспрессию соответствующих генов (Yoshino et al., 2013).

Интересно, что у моллюсков, заражённых трематодами *Echinostoma spiniferum,* экспрессия гена *PcTLR7* повышена сердце и белковой железе (рисунки 147, 153). При этом уровень экспрессии гена в гемоцитах соответствует таковому у незаражённых. Такой результат свидетельствует об относительно активной работе гена в клетках других тканей, помимо гемоцитов и избирательной его активации в них при заражении эхиностомами. У позвоночных

животных ТПР помимо лейкоцитов экспрессируются клетками эпителия кишечника, эндотелия сосудов, глиальных клетках, фибробластах печени, миоцитах сердца, нервной системе и др. (Тухватулин и др., 2010). Для тканевых ТПР человека доказана регуляторная роль в развитии процессов воспаления, тканевом гомеостазе, онкогенезе (McGettrick, O'Neill, 2010; Basith et al., 2011).

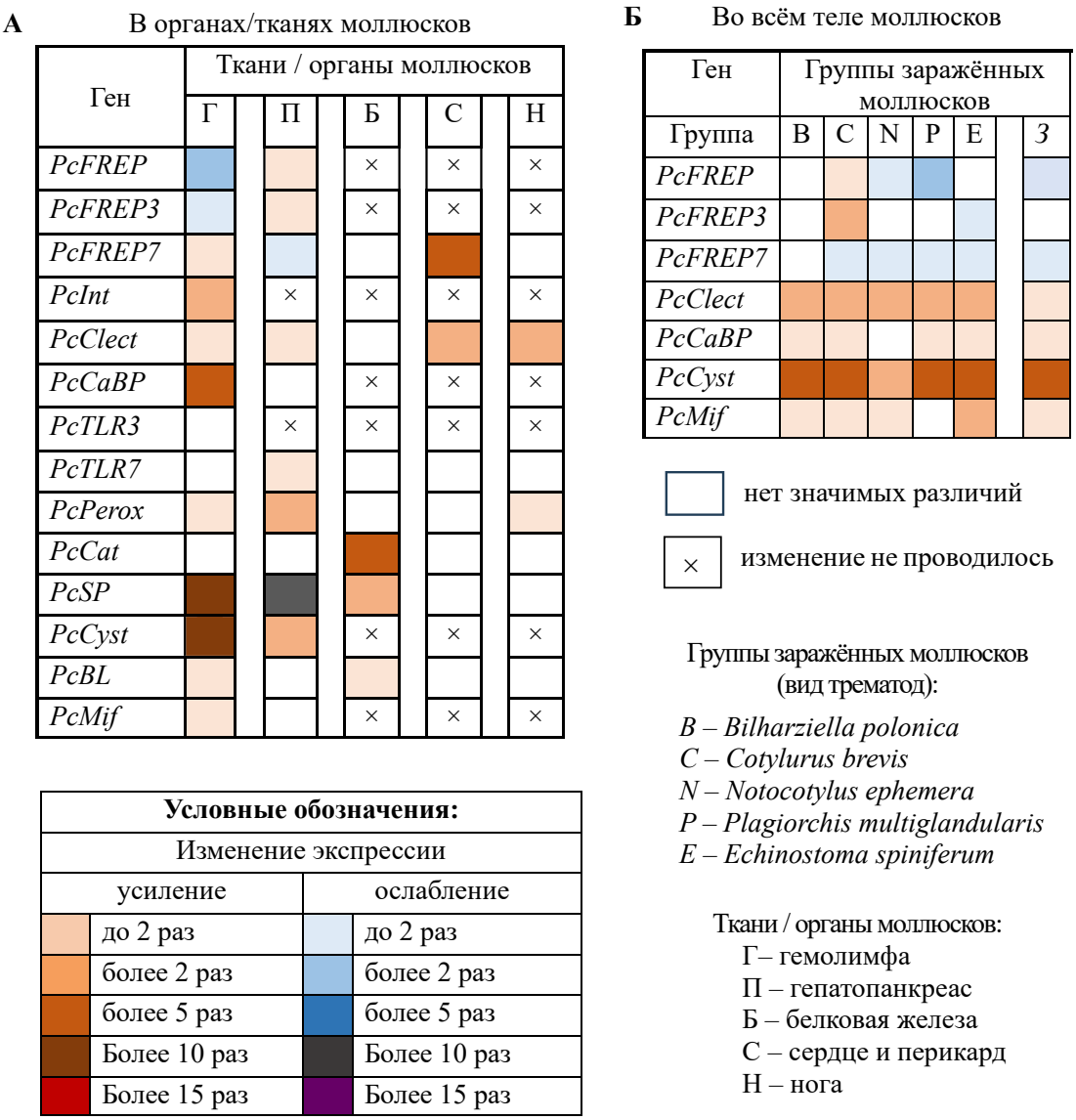


Рисунок 152. Цветовая карта изменения экспрессии генов иммунного ответа у моллюсков *Planorbarius corneus* при заражении трематодами. Данные представлены по всей выборке заражённых моллюсков.

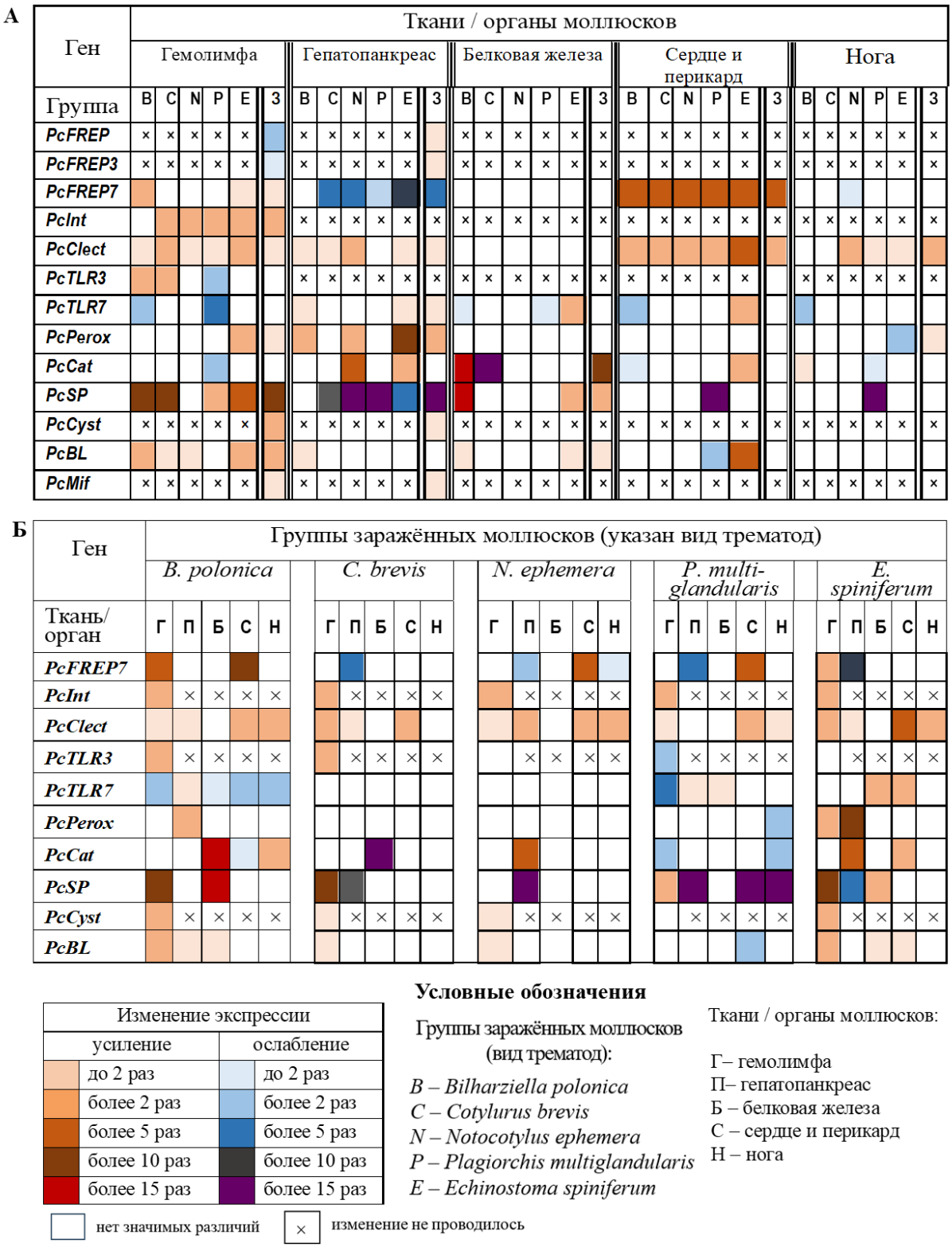


Рисунок 153. Цветовая карта изменения экспрессии генов иммунного ответа у моллюсков *Planorbarius corneus* при заражении трематодами. А – данные представлены по тканям/органам моллюсков; Б - данные представлены по группам заражённых моллюсков.

Другая группа факторов иммунного ответа – **факторы цитотоксичности,** которые вырабатываются клетками системы врождённого иммунитета с целью подавления жизнедеятельности патогенов. В нашей работе была изучена экспрессия генов фермента

лизосом – катепсин-подобной сериновой протеазы, антибактериального белка биомфализина и белков, участвующих в продукции активных метаболитов кислорода, их детоксикации – пероксидазы и каталазы.

В составе гемоцитов моллюсков описано большое количество протеолитических ферментов, набор которых во многом соответствует набору ферментов в гранулах макрофагов (Varol et al., 2015). В гемоцитах моллюсков найдены лизоцимы серпины, катепсины, эластазы, цинк-зависимые металлопротеазы, цистатины, серпины, хитиназы и др. (см. Атаев и др., 2024а).

У моллюсков выявлены лизоцимы всех трёх типов, описанных у животных (C, G, I) (Sathyan et al., 2012; Ertl et al., 2016). Аминокислотные последовательности лизоцима I-типа двустворчатых моллюсков гомологичны С-лизоцимам позвоночных, что может свидетельствовать об их общем происхождении (Bachali et al., 2002). У обитающих в термальных источниках мидий *Bathymodiolus azoricus* лизоцимы участвуют в антибактериальном иммунном ответе и в регуляции численности сообществ симбиотических микроорганизмов (Detree et al., 2016).

Выполненное нами исследование подтверждает роль катепсин-подобной сериновой протеазы в иммунном ответе моллюсков *Planorbarius corneus* на заражение трематодами. Экспрессия гена *PcSP* в гемолимфе у большинства заражённых моллюсков значительно выше, чем у незаражённых (рисунки 152, 153). Это подтверждает важную роль кодируемой геном протеазы в формировании фенотипа активированного гемоцита. Для части зараженных улиток выявлено повышение экспрессии гена в тканях ноги, белковой железы и сердца. Интересно, что экспрессия гена при этом значительно снижена в гепатопанкреасе. Вероятно, такой эффект связан с влиянием инвазии – зрелые инфрапопуляции партенит, развивающиеся в тканях гепатопанкреаса, нарушают целостность органа. Известно, что так называемые «экскреторно-секреторные продукты», выделяемые трематодами в процессе жизнедеятельности, могут подавлять иммунный ответ в месте локализации паразита (Bayne, Yoshino, 1989; Humbert, Costau, 2001). Кроме того, можно предположить, что повреждение тканей гепатопанкреаса приводит к необходимости активации процессов регенерации, в результате чего экспрессия генов, обеспечивающих иммунную защиту, уменьшается. Исключение составляет группа моллюсков, заражённых трематодами *Bilharziella polonica.* У них экспрессия гена в гепатопанкреасе повышена, по сравнению с незаражёнными моллюсками в несколько раз (рисунок 153).

Для моллюсков рода *Biomphalaria* также было показано усиление экспрессии генов катепсина B и эластазы при заражении трематодами (Myers et al., 2008; Ittiprasert et al., 2010; Lockyer et al., 2012). Установлено, что экспрессия этих факторов у биомфалярий возрастает в гемоцитах в составе капсул вокруг спороцист трематод *Echinostoma caproni* (Guillou et al., 2007).

Таким образом, полученные данные подтверждают универсальную роль внутриклеточных протеаз в антитрематодном иммунном ответе лёгочных моллюсков.

Одновременно с протеазами в клетках тканей заражённых моллюсков экспрессируются и ингибиторы протеаз. Они необходимы для защиты собственных клеток от цитотоксических факторов, которые вырабатываются как клетками иммунитета, так и развивающимися в тканях моллюска паразитами (Yoshino et al., 1993; Fryer et al., 1996; Armstrong, 2006; Feng et al., 2010; Gutiérrez-Rivera et al., 2015).

Одной из групп белков, которые у гастропод принимают участие в таких внеклеточных реакциях, являются цистатинподобные белки (Mitta et al., 2005). Они относятся к семейству ингибиторов цистеиновых протеаз и способны разрушать цистеиновые протеазы, секретируемые как клетками паразита, так и моллюска. Аналоги цистатинов найдены у животных всех исследованных групп. Показана их роль во внеклеточном противоинфекционном ответе и местной регуляции иммунного ответа (Abrahamson et al., 2003). Например, некоторые нематоды секретируют цистатины, ингибирующие иммунный ответ их хозяев (Hartmann, Lucius, 2003).

Ген *PcCyst* не экспрессируется в гемоцитах незаражённых моллюсков (см. рисунки 142, 152). При этом его мРНК выявлены в тотальных препаратах и тканях гепатопанкреаса незаражённых моллюсков. У заражённых трематодами моллюсков ген включается в гемоцитах, однако именно в гепатопанкреасе происходит более значительное усиление его экспрессии. Кроме того, в тотальных препаратах заражённых моллюсков, уровень экспрессии гена повышается в 3–6 раз по сравнению с незаражёнными. Это свидетельствует об усилении его экспрессии и в других тканях. Полученные данные позволяют заключить, что гемоциты не являются основным местом выработки цистатинподобного белка.

Для моллюсков *Biomphalaria glabrata* резистентной линии также было показано, что экспрессия белка цистатина значительно повышается при заражении трематодами *Echinostoma caproni* (Vergote et al., 2005). Высокий уровень экспрессии гена *PcCyst* в тканях подтверждают возможную роль цистатинподобного белка в защите тканей моллюска от последствий воздействия паразита и защитных реакций.

Помимо различных протеаз в разрушении патогенов системой врождённого иммунитета активное участие принимают **АФК** и **АФА**. Анализ продукции АФК гемоцитами моллюсков модельных видов был рассмотрен в разделе III.2.3.

Помимо того, что для гемоцитов многих пульмонат доказана способность продуцировать АФК и АФА, у моллюсков также выявлены основные ферменты, участвующие в их продукции – супероксиддисмутаза, NADPH-оксидазы, миелопероксидаза, фенолоксидаза и др. (Lockyer et al., 2007; Novas et al., 2007; Butt, Raftos, 2008; Humphries, Yoshino, 2008;

Dyachuk, 2016). В частности, ранее было показано присутствие пероксидазы и фенолоксидазы в гранулоцитах моллюсков *Planorbarius corneus* (Прохорова, 2009; Бабич и др., 2017), пероксидазы в гемоцитах *Lymnaea stagnalis* (Vorontsova et al., 2015). Установлено, что у моллюсков *Planorbarius corneus,* заражённых трематодами *Plagiorhis* sp., активность фенолоксидазы в гемолимфе выше, чем у незаражённых (Бабич и др., 2017).

Активность гена миелопероксидазы *PcPerox* повышена в гепатопанкреасе большинства заражённых трематодами моллюсков *Planorbarius corneus* (рисунки 149, 152). В гемолимфе экспрессия повышена только у заражённых *Echinostoma caproni* моллюсков. При этом только в группе улиток, заражённых трематодами *Plagiorchis multiglandularis,* происходит снижение экспрессии гена по сравнению с незаражёнными в тканях ноги.

Неоднократно было показано, что совместное культивирование спороцист трематод *Schistosoma mansoni* с гемоцитами *in vitro* приводит к активации продукции в них АФК. Обработка гемоцитов ингибиторами NADPH-оксидазы вызывает замедление элиминации спороцист трематод гемоцитами моллюсков *Lymnaea stagnalis* и *Biomphalaria glabrata* из устойчивых к инвазии линий (Adema et al., 1994, 2001; Dikkeboom et al., 1988). У заражённых моллюсков *Lymnaea stagnalis* в гемоцитарных капсулах вокруг спороцист трематод *Trichobilharzia ocellata* также накапливаются АФК – пероксидаза, радикалы супероксида и пероксида водорода (см. van der Knaap, Loker, 1990). Заражение *Lymnaea stagnalis* церкариями трематод приводит к повышению активности неспецифических эстераз, глутатион-S-трансфераз и антиоксидантных ферментов через 2 часа после инвазии. Впоследствии активность неспецифических эстераз и глутатион-S-трансфераз снижается, но при этом сохраняется долгосрочная активация супероксиддисмутазы (Vorontsova et al., 2010). В то же время, заражение прудовиков неспецифическим для него паразитом *Schistosoma mansoni* не приводит к усилению продукции гемоцитами АФК (Dikkeboom et al., 1988).

Трематоды *Plagiorchis multiglandularis* способны развиваться в окружении мантии из гемоцитов, которая не оказывает отрицательного влияния на паразита (см. рисунок 118, раздел III.2.1). Это согласуется с полученными данными об отсутствии усиления экспрессии гена *PcPerox* в гемолимфе моллюсков, заражённых *P. multiglandularis.* Такой результат может свидетельствовать о том, что при заражении этими трематодами в гемоцитах не происходит активация системы «кислородного взрыва». А снижение активности гена в тканях ноги, возможно, связано с ослаблением активности гемоцитов в тканях. Отсутствие ответа от гемоцитов, вероятно, является результатом подавления защитных реакций моллюска патогеном. Результаты согласуются с данными, полученными для паразит-хозяинной системы *Lymnaea stagnalis – Plagiorchis mutationis.* У прудовиков, заражённых *Plagiorchis mutationis,* происходит значительное подавление проявлений клеточного иммунитета – фагоцитарной

активности гемоцитов и их способности формировать капсулы вокруг патогенов (Kryukova et al., 2014).

Моллюски имеют защитные системы, препятствующие повреждению их собственных тканей АФК и АФА. В гемоцитах вырабатываются различные антиоксидантные ферменты (Zielinski, Pörtner, 2000). Одним из универсальных ферментов антиоксидантной защиты является каталаза, катализирующая разложение пероксида водорода (Chelikani et al., 2004).

Анализ экспрессии гена каталазы ***PcCat*** у моллюсков *Planorbarius corneus* показал значительное повышение его активности в белковой железе заражённых моллюсков (рисунок 148). Максимальное усиление экспрессии (более, чем в 30 раз) происходит только у моллюсков, заражённых трематодами *Bilharziella polonica* в белковой железе (рисунок 152). Для этой же группы установлено повышение экспрессии гена *PcCat* в тканях ноги. Другой вид трематод, заражение которым приводит к усилению экспрессии данного гена – *Echinostoma spiniferum*. В сердце и гепатопанкреасе моллюсков, заражённых паразитом этого вида, экспрессия значительно повышена. Таким образом, именно у заражённых этими трематодами моллюсков, активирована антиоксидантная защита в тканях.

Известно, что трематоды сем. Echinostomatidae имеют крупные подвижные редии, которые способны значительно нарушать целостность тканей моллюска (Галактионов и др., 2014). Кроме того, отрождающиеся церкарии эхиностом могут накапливаться в тканях. Это может быть причиной более сильной активации генов, отвечающих за цитотоксичность (*PvPerox*), детоксикацию метаболитов (*PcCat*), а также за процессы адгезии (*PcClect*).

На представителях рода *Biomphalaria* было показано, что бóльшая активность антиоксидантных ферментов характерна для моллюсков чувствительных к заражению линий. При заражении трематодами у них возрастает активность глутатион-пероксидазы, глюкоза-6-фосфат-дегидрогеназы и каталазы. У моллюсков резистентной линии усиления активности этих ферментов не происходит (Mahmoud, Rizk, 2004). Таким образом в условиях неэффективной иммунной реакции (у чувствительных моллюсков) активируется антиоксидантных система, которая предотвращает повреждение тканей АФК.

Рассматриваемые нами заражения являются успешными для трематод – в моллюсках развиваются зрелые инфрапопуляции. Поэтому, с одной стороны, природнозаражённых моллюсков можно рассматривать как близких к моллюскам чувствительных линий. Однако в условиях активного заражения и активации многих генов иммунного ответа у моллюсков исследуемых групп не происходит активация антиоксидантной системы в гемоцитах, и только у части заражённых улиток выявлены признаки активации гена каталазы в тканях. С другой стороны, причиной может быть большая индивидуальная вариабельность природных популяций, по сравнению с лабораторными линиями. Кроме того, нам не известен, точный срок

трематодой инвазии. А большинство исследований лабораторных линий рассматривают характеристики иммунного ответа на относительно ранних сроках заражения. Это может быть причиной существенных различий в результатах наших исследований и данных, полученных при изучении моллюсков лабораторных линий.

Антимикробные пептиды и белки (antimicrobal peptides / proteins, AP, АБ) являются одной из ключевых групп цитотоксических факторов в системе врождённого иммунитета. АБ способны нарушать целостность клеточных мембран, в том числе за счёт формирования пор, а также проникать в клетки и ингибировать процессы её метаболизма (Ganz, 2003). АБ содержатся в гранулах фагоцитов, но также могут участвовать в процессах внеклеточной цитотоксичности, выступая в качестве гуморальных компонентов иммунитета (Galinier et al., 2013; Tetreau et al., 2017; Li et al., 2020).

У лёгочных моллюсков описано несколько групп АБ – митамацины, перфорины, ахацины, аплиализины, теромацины, биомфализины, глабрализины и др. (см. Атаев и др., 2000; Атаев и др., 2024a). Белок митамацин (mytimacin), который вырабатывается клетками белковой железы, обладает противогрибковой, антибактериальной и антитрематодной активностью (Guillou et al., 2007; Baron et al., 2016; Adema et al., 2017). У моллюсков *Biomphalaria glabrata* его экспрессия увеличивается при заражении трематодами (Guillou et al., 2007; Hanington et al., 2010a). Другой АБ – макрофагальный перфорин (MPEG1, macrophage expressed gene-1) вырабатывается в гемоцитах резистентных моллюсков *B. glabrata* при заражении трематодами *Schistosoma mansoni* (Ittiprasert et al., 2010).

Относительно недавно был открыт белок биомфализин (biomphalysin), который в настоящее время рассматривается в качестве одного из факторов, определяющих резистентность к трематодам у лёгочных моллюсков (Galinier et al., 2013; Li et al., 2020). Биомфализин – аэролизинподобный белок, формирующий поры токсин, секретируемый в плазму. Предположительно биомфализин достался моллюскам от бактерий в результате горизонтального переноса генов (Galinier et al., 2013).

Биомфализины биомфалярий способны взаимодействовать с поверхностью спороцист *S. mansoni* (Galinier et al., 2013). Также показана их способность к взаимодействию с трематодами *Echinostoma caproni*, с бактериями и дрожжами (Tetreau et al., 2017). Кроме того, биомфализины формируют комплексы с ФБ и ТСБ (Li et al., 2020) (см. раздел III.3.1). Для гемоцитов биомфалярий характерна низкая конститутивная экспрессия биомфализинов (Galinier et al., 2013).

У моллюсков *Planorbarius corneus* также выявлен небольшой уровень экспрессии гена биомфализина *PcBl*, который повышается при заражении в гемоцитах у большинства моллюсков (см. рисунок 153). У части заражённых улиток отмечен рост экспрессии гена *PcBl*

в белковой железе и гепатопанкреасе. Это может свидетельствовать о вкладе этих органов в продукцию белка. Однако самый высокий уровень экспрессии гена *PcBl* зафиксирован в гемоцитах. Единственный вид трематод, заражение которым не приводит к росту экспрессии гена *PcBl* – *Plagiorchis multiglandularis*. Таким образом, полученные данные в общем подтверждают усиление экспрессии биомфализина в ответ на заражение трематодами, а также указывают на избирательность активации гена при заражении патогенами разных видов.

При анализе транскриптома роговой катушки был аннотирован 41 вариант транскриптов биомфализина. Часть этих транскриптов представлена изоформами, часть – имеет небольшие различия в 3–7 аминокислот. Примерно треть транскриптов различны в выборке заражённых трематодами и незаражённых улиток. Таким образом, наблюдается вариабельность набора транскриптов.

Явление вариабельности вариантов транскриптов биомфализина было описано также для моллюсков *Biomphalaria glabrata* (Pinaud et al., 2019). Предполагается, что выработка того или иного варианта зависит от особенностей патогена. При этом часть транскриптов перестает вырабатываться, выполнив свою задачу, а часть продолжает экспрессироваться.

У двустворчатых моллюсков также описано большое внутривидовое разнообразие АБ. Показано, что у *Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis* и *Ruditapes philippinarum* наборы транскриптов, кодирующих митимицины и дефенсины являются индивидуальными (Costa et al., 2009; Schmitt et al., 2010; Wang et al., 2015b).

Значительная вариабельность АБ моллюсков, как и вариабельность ПРР может рассматриваться в качестве одного из адаптационных механизмов к обитанию в средах с разным набором патогенов. Разнообразие антимикробных пептидов у позвоночных животных, а также их роль в регуляции иммунного ответа обусловливают их функцию посредников между системами врождённого и адаптивного иммунитета. Являясь мощными хемокинами, АБ привлекают дендритные клетки в очаги воспаления, что способствует запуску реакций адаптивного иммунитета (Yang et al., 2001). Поэтому у беспозвоночных, в частности у моллюсков, именно АБ рассматривают в качестве одного из возможных компонентов так называемой гуморальной иммунной памяти (Portela et al., 2013; Pinaud et al., 2016).

Ещё одна группа факторов иммунного ответа – **цитокины.** Цитокины участвуют в регуляции иммунного ответа и в поддержании тканевого гомеостаза (см. Атаев и др., 2020; Mitta et al., 2005; Garcia et al., 2010). У позвоночных животных в цитокиновую сеть входит огромное множество факторов (Balkwill, Burke, 1989). Однако у моллюсков (и беспозвоночных в целом) выявлены лишь единичные цитокины. Вероятнее всего это связано с тем, что регуляторы иммунитета у беспозвоночных в основном не гомологичны таковым у позвоночных. Регуляторные системы иммунитета, несмотря на схожие механизмы действия, в этих двух

группах формировались параллельно и независимо.

У моллюсков описаны такие универсальные цитокины как интерлейкины, фактор некроза опухолей (TNF-related protein), макрофагальный ингибирующий фактор, фактор трансплантации млекопитающих (Parisi et al., 2012; Martín-Gómez et al., 2014; Deininger et al., 2002). Показано влияние цитокинов позвоночных на подвижность, хемотаксис, фагоцитоз и цитотоксичность гемоцитов моллюсков (Ottaviani et al., 2004). У двустворчатых моллюсков выявлены интерлейкинподобные белки (IL-1 и IL-17) (Roberts et al., 2008; Li et al., 2014). Их выработка повышается в гемоцитах в ответ на бактериальное заражение и действие абиотических факторов (Wu et al., 2013; Moreira et al., 2014; Xin et al., 2015, 2016).

Одним их наиболее охарактеризованных цитокинов лёгочных моллюсков является фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (macrophage migration inhibitory factor, MIF, ФИММ) (Mitta et al., 2005). Этот цитокин экспрессируется в циркулирующих гемоцитах, а также присутствует в плазме гемолимфы (Mitta et al., 2005; Garcia et al., 2010). ФИММ влияет на подвижность гемоцитов и их способность к участию в процессах фагоцитоза и инкапсуляции (Li et al., 2013a). Консервативность гена *Mif* позволяет рассматривать его в качестве ортолога млекопитающих.

У моллюсков *Planorbarius corneus* экспрессия гена *PcMif* выявлена только в гемоцитах (рисунок 142). Заражение трематодами у большинства улиток приводит к усилению экспрессии гена (рисунок 152). Данные об изменении экспрессии гена *Mif* в ответ на иммунизацию трематодами у других моллюсков противоречивы. С одной стороны, заражение моллюсков *Biomphalaria glabrata* трематодами *Schistosoma mansoni* приводит к снижению экспрессии гена *Mif*. С другой стороны, нокдаун гена *Mif* приводит к нарушению инкапсуляции спороцист трематод в культуре эмбриональных клеток (Garcia et al., 2010).

Полученные результаты анализа экспрессии генов молекул адгезии, ПРР, факторов цитотоксичности и цитокинов свидетельствуют о том, что некоторые из этих генов (PcFREP7, PcClect, PcTLR7, PcCat, PcPerox) интенсивно работают не только в гемоцитах, но и в клетках других тканей – гепатопанкреаса, сердца и белковой железы. Часть генов – гены PcInt, PcClect, PcMif – сходно отвечают на заражение трематодами всех видов. При этом различия между группами моллюсков, заражённых разными трематодами, небольшие или отсутствуют. Это свидетельствует о неизбирательном повышении их экспрессии при трематодной инвазии. Для генов PcFREP7, PcTLR7, PcCat, PcPerox, PcBL выявлены существенные различия в экспрессии между моллюсками, заражёнными трематодами разных видов. Это может свидетельствовать об избирательной регуляции активности этих генов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Защитные реакции беспозвоночных животных длительное время рассматривались как «псевдоиммунные» по причине отсутствия у них компонентов системы адаптивного иммунитета – настоящих иммуноглобулинов, лимфоцитов, лимфомиелоидного комплекса и иммунологической памяти (Бернет, 1964; Галактионов, 1986). Система иммунитета без надстройки адаптивности считалась неизбирательной и малоэффективной, поскольку отсутствие истинных иммуноглобулинов рассматривалось как признак «ограниченной способности к распознаванию». При этом участвующие в защитных реакциях фагоциты беспозвоночных большинство исследователей описывали как «наиболее примитивные иммунные клетки» (Купер, 1980). Термин «иммункомпетентная клетка» использовался исключительно по отношению к позвоночным.

Произошедший на рубеже XX и XXI веков пересмотр концепции врождённого иммунитета потребовал переосмысления трактовок иммунных реакций беспозвоночных животных. Согласно современной концепции врождённого иммунитета, врождённая иммунная защита функционирует благодаря наличию специализированных иммуноцитов, которые способны распознавать патогены через ПРР и обеспечивать их элиминацию посредством разных форм клеточной цитотоксичности (Medzhitov, Janeway, 1997; Janeway, Medzhitov, 2002). Отсутствие настоящих антител компенсируется участием в гуморальных реакциях многочисленных лектинов, антибактериальных белков, цитокинов (Ottaviani et al., 2004; Галактионов, 2005; Zanker, 2010).

Накопленные данные о врождённых иммунных реакциях у представителей различных групп беспозвоночных убедительно свидетельствуют: их система врождённого иммунитета не является «более примитивной», чем 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 зрениях их эквивалентности таковым у позвоночных, но и с точки зрения их ***уникальных особенностей*** внутри каждой группы животных.

Одной из ключевых причин отсутствия целостной модели системы врождённого иммунитета лёгочных моллюсков является узкая выборка исследуемых видов и отсутствие стандартизированных подходов к изучению иммунных реакций у представителей этого таксона. Последнее обусловлено в том числе ограничениями, связанными с биологическим

особенностями ***модельных объектов***. Учитывая разнообразие пульмонат, только данные, полученные на достаточном количестве моделей с применением разных факторов иммунизации, могут быть интерпретированы как общие характеристики их иммунной защиты. Несмотря на возросший интерес к иммунитету пульмонат, бóльшая часть исследований по-прежнему выполняется на представителях лабораторных линий рода *Biomphalaria*, а новые модели, как правило, слабо охарактеризованы. В то же время видовая принадлежность моллюсков, среда обитания и набор патогенов оказывают значительное влияние на проявления защитных реакций.

В нашем исследовании были использованы моллюски девяти модельных видов, бóльшая часть которых представлена 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 *Planorbarius corneus, Planorbis planorbis, Lymnaea stagnalis, Succinea putris, Arianta arbustorum, Cochlicopa lubrica* показан небольшой генотипический полиморфизм по исследуемым маркерам (раздел III.1). Это позволяет рассматривать данные виды 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. По строению, функциональной активности, набору факторов цитотоксичности и рецепторов гемоциты моллюсков 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 (фагоцитарная активность, подвижность, формирование агглютинаций, продукция АФК) гранулоциты проявляют бóльшую активность. Таким образом, именно гранулоциты являются наиболее активной формой иммуноцита лёгочных моллюсков. В то же время, для гемоцитов, и особенно для гранулоцитов, характерен значительный морфологический полиморфизм. Встречаются клетки с морфологическими

признаками, промежуточными между гранулоцитами и гиалиноцитами, а также гемоциты, способные быстро изменять морфологические характеристики на протяжении 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. Миелоциты позвоночных дифференцируются в гемопоэтических органах (желточный мешок, печень плода, красный костный мозг), в циркуляции и в тканях. Циркулирующая форма мононуклеарных фагоцитов позвоночных представлена моноцитами. После попадания в ткани моноциты плода (а по последним данным, 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). В случае возникновения воспаления часть циркулирующих моноцитов организма также выходит в ткани, становясь воспалительными макрофагами, которые участвуют в фагоцитозе и выделении цитокинов в очаге воспаления. 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. При этом часть моноцитов представлена «неклассическими моноцитами», которые при миграции в ткани не дифференцируются в макрофаги, а активно продуцируют цитокины, обеспечивающие запуск воспалении и привлечение других миелоцитов (Teh et al., 2019). Такие моноциты также рассматриваются как специализированные клетки (Ельчанинов, Фатхудинов, 2023).

Другой пример удивительной пластичности клеток иммунной системы позвоночных животных – дендритные клетки – лейкоциты, специализирующиеся на презентации антигена. Они образуются из нескольких миелоидных и лимфоидных предшественников (Reis e Sousa, 2006; Цветков и др., 2014; Грищенко, 2015). Направление дифференцировки определяется микроокружением и, прежде всего, набором цитокинов (включая ростовые факторы). Важно отметить, что для клеток миелоидного ряда, несмотря на специализацию, наблюдается перекрывание активностей и функций: большинство из них являются фагоцитами, продуцентами цитокинов и способны к дегрануляции. Таким образом, функции системы врождённого иммунитета полностью реализуются, в том числе благодаря функциональной специализации клеток врождённого иммунитета.

Для лёгочных моллюсков не выявлено поверхностных маркеров, позволяющих надёжно отличать гранулоциты от гиалиноцитов. В силу незамкнутости кровеносной системы моллюсков, также невозможно точно разделить циркулирующую и тканевую формы. Однако данные анализа транскриптомов показывают, что пулы гемоцитов, выделяемые по морфологическим признакам, 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 мононуклеарные 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, также функционируют как своеобразная ретикулоэндотелиальная система. У слизня *Limax maximus* фибробластоподобные клетки на стенке аорты способны поглощать введённые в кровеносное русло улиток частички (Curtis, Cowden, 1978). Похожие «фиксированные фагоциты» описаны у моллюсков *Biomphalaria glabrata* (Matricon-Gondran, Letocart, 1999), *Helix aspe*rа (Prowse, Tait, 1969), хитона *Liolophura*, двустворчатого моллюска *Tridacna maxima* (Reade, Reade, 1972, по: 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 (раздел III.2.2). Иммунизация бактериями, трематодами, продуктами жизнедеятельности патогенов и их ПАМП тоже приводит к росту доли гранулоцитов (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 перикардиальному 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). Остается открытым вопрос о

природе рассматриваемого АПО – является ли он самостоятельной структурой или специализированным участком эпителия перикарда, мантии или почки. По нашему мнению, независимо от происхождения, АПО является самостоятельной структурой гемопоэза, расположенной в лакуне кровеносной системы между перикардом и мантийным эпителием (топографически приуроченном к перикардиальному эпителию). АПО, образующиеся в нём гемоциты, их циркулирующие и тканевые формы можно рассматривать ка компоненты лимфомиелоидного комплекса лёгочных моллюсков, который во всех случаях у многоклеточных образован клетками мезодермального происхождения (Галактионов, 1986).

Следует отметить, что 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). В то же время, использование методов цитогенетики, проточной цитометрии и гистохимии пока не позволило подтвердить присутствия в гемолимфе пульмонат значимого количества делящихся клеток. Кроме того, в отличии от позвоночных животных, у моллюсков процессы центрального гемопоэза и окончательной дифференцировки в циркуляции сложно разделить по времени и локализации из-за незамкнутости кровеносной системы. Гемолимфа изливается в лакуны и синусы, омывая внутренние органы улиток. 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.

Как и воспалительные макрофаги позвоночных, в очаге воспаления гемоциты моллюсков активируются и участвуют в фагоцитозе, формировании агрегаций, капсул вокруг проникших патогенов (раздел III.4.1). 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). Во всех случаях формируется скопление иммуноцитов, которые пытаются изолировать патоген от окружающих тканей. 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, его долговременная изоляция внутри гемоцитарной капсулы, в случае локализации патогена вблизи

покровов моллюска возможно его «выдавливание» во внешнюю среду и купирование тканевых последствий проникновения (Атаев и др., 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, реализуемой всегда зрелыми, функционально активными иммуноцитами. 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. Каждый вид и каждая популяция взаимодействует с уникальным набором патогенов, который должен быть нейтрализован иммунной системой. Для понимания того, какое влияние чужеродный фактор оказывает на систему врождённого иммунитета, необходимо знать, какие её параметры (например, концентрация, соотношение типов гемоцитов) являются стандартными для представителей исследуемого вида. Только в этом случае можно описать влияние фактора иммунизации на организм моллюска и оценить возможную избирательность иммунного ответа на патогены различной природы.

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. Развитие партенит в моллюске возможно только в том случае, когда иммунитет моллюска не способен распознать и элиминировать паразита (Théron, Coustau, 2005). 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.

Существует несколько гипотез, объясняющих возможные механизмы ***взаимодействия паразита с иммунной системой моллюска-хозяина***. Наиболее простой вариант, обеспечивающий эффективное проникновение и развитие трематод – отсутствие у моллюска ПРР, способных распознавать паразита. Различия в способности к распознаванию паразита показаны для линий моллюсков с разной степенью чувствительности к трематодной инвазии (Connors, 2003; Martins-Souza et al., 2006; Hanington et al., 2010b). Другая гипотеза заключается в возможном использовании паразитом «молекулярной мимикрии». В этом случае молекулы, экспрессируемые на поверхности паразита, распознаются внутренними защитными системами хозяина как «своё» (Damian, 1989). Согласно гипотезе «молекулярной маскировки», выживание паразита обеспечивается осаждением на его поверхности молекул гемолимфы хозяина (van der Knaap, Loker, 1990). Так на поверхности тегумента трематод *Schistosoma mansoni* присутствуют полиморфные муцины (polymorphic mucins, SmPoMuc), которые предотвращают их распознавание иммунной системой моллюсков (Gourbal et al., 2015). На сегодняшний день также подтверждена гипотеза «ингибирования процессов иммунного ответа хозяина» (van der Knaap, Loker, 1990). Экскреторно-секреторные продукты, выделяемые паразитом, подавляют активность гемоцитов. В частности, они способны блокировать рецепторы этих клеток, влиять на их подвижность, выживаемость и цитотоксичность (Loker et al., 1992; Lodes, Yoshino, 1989; Yoshino et al., 2013).

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. Leucochloriididae 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 *Bilharziella polonica* и *Plagiorchis multiglandularis* моллюсков *Planorbarius corneus* снижение экспрессии ряда генов, связанных с регуляцией клеточного цикла и реализацией иммунного ответа также, вероятно, связано с влиянием паразита на организм моллюска.

Развитие эффективного иммунного ответа зависит от успешного распознавания патогена. У представителей беспозвоночных животных резных групп выявлены ПРР всех групп, описанных ранее у позвоночных. В результате анализа транскриптов, геномов и протеомов лёгочных моллюсков также выявлено ***большое разнообразие ПРР*** (раздел III.4.1). 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, скаведжер-рецепторов, 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. Учитывая относительно небольшое количество исследованных в этом отношении видов моллюсков, с большой долей вероятности будут появляться данные о ПРР с новыми вариантами доменной структуры. Наиболее универсальной могла бы стать классификация ПРР по их лигандной специфичности относительно разных групп ПАМП, по аналогии с классификацией ПРР некоторых групп позвоночных. Однако только малая часть ПРР моллюсков охарактеризованы функционально. Большинство данных о доменной структуре ПРР – результат предсказания на основе данных транкриптомов. 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 (см. таблицу 41).

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.

Можно предположить, что разнообразие рецепторов у лёгочных моллюсков связано в том числе с тем, что развитие иммунитета гастропод происходило одновременно эволюцией паразито-хозяинных систем «трематоды–моллюски» (Атаев, Полевщиков, 2004; Loker et al., 2004; Adema, Loker, 2015). Как упомянуто выше, последние умеют успешно избегать распознавания иммунной системой хозяина различными способами. Соответственно, для их эффективного распознавания моллюску нужны разные варианты рецепторов, в том числе с новой лигандной специфичностью. В то же время, на сегодняшний день известно, что набор патогенов моллюсков не ограничен только трематодами, но включает паразитов разных групп – от протистов до членистоногих (Grewal et al., 2003; Fernández Robledo et al., 2014; Токмакова и др., 2025; Du et al., 2025).

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. Существенные различия в экспрессии между моллюсками, заражёнными разными видами трематод выявлены для генов ФБ и ТПР (раздел III.4.2). 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 система адаптивного иммунитета (Gourbal et al., 2018; Zhao et al., 2023). В качестве наиболее вероятного механизма этого явления рассматривается устойчивая длительная активацией 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***.

Таким образом, разнообразие ПРР лёгочных моллюсков позволяет иначе взглянуть на вопрос о специфичности и адаптивности врождённого иммунитета. Адаптивность за счёт

многочисленных ПРР, сформированных в определённых условиях развития вида, не требует сложных механизмов созревания рецепторов. Тем не менее, поиск механизмов распознавания, аналогичных таковым у позвоночных, также привел к открытию у моллюсков ФБ – молекул иммуноглобулинового суперсемейства, проявляющих соматическую диверсификацию и способность избирательно распознавать патогены (Adema et al., 1997). ФБ, уникальный набор которых формируется в онтогенезе моллюска рассматриваются как аналоги иммуноглобулинов позвоночных. Однако выяснилось, что они есть не у всех лёгочных моллюсков, по крайней мере, в том виде, в котором они присутствуют у биомфалярий. Пока они не выявлены у других представителей семейства Planorbidae (см. Прохорова, Атаев, 2021). В тоже время, они описаны у некоторых видов моллюсков других групп. Таким образом, на данные момент ФБ не могут рассматриваться как универсальные молекулы, обеспечивающие специфичной распознавание у пульмонат.

Интересно, что молекулы со схожими свойствами выявлены и у членистоногих. У плодовой мушки *Drosophila melanogaster* наборов сплайсированных вариантов молекул Dscam (down syndrome cell adhesion molecule) может быть представлен более чем 38000 изоформ. При этом у двукрылых выявлено всего около 150 генов, кодирующих молекулы с иммуноглобулиновыми доменами (Vogel et al., 2003; Watson et al., 2005). Гены *Dscam*, как и гены, кодирующие ФБ, включают кластеры экзонов, а варианты молекулы формируются путём альтернативного сплайсинга. Некоторые экзоны генов *Dscam* повторяются (14–38 раз), подобно сегментам, кодирующим вариабельные домены иммуноглобулинов (Graveley, 2005). Основной функцией молекулы Dscam считается участие в нейрогенезе, где она обеспечивает гомофильное взаимодействие между нейронами (Schmucker et al., 2000). Однако показано, что подавление активности гена *Dscam* путём РНК-интерференции приводит к снижению фагоцитарной активности гемоцитов мух по отношению к бактериям (Watson et al., 2005). У комаров *Anopheles gambiae* молекула также участвует в фагоцитозе бактерий, а подавление активности гена *AgDscam* снижает устойчивость к заражению плазмодием *Plasmodium berghe* и бактериями *S. aureus* и *E. coli.* При этом иммунизация разными патогенами приводит к появлению разных наборов сплайсированных вариантов AgDscam (Dong et al., 2006). Таким образом, у моллюсков и членистоногих присутствует ***признаки специфического распознавания*** и адаптивного реагирования системы иммунитета на патогены, реализуемые участием молекул иммуноглобулинового суперсемейства.

В то же время, специфичность и адаптивность иммунных реакций может быть связана не только с иммуноглобулинами. Относительно недавно было установлено, что у позвоночных животных механизм распознавания в системе адаптивного иммунитета может реализоваться без участия иммуноглобулинов. У бесчелюстных на лимфоцитах присутствуют вариабельные

лимфоцитарные рецепторы (VLR), которые специфически распознают антигены посредством доменов с лейциновыми повторами (Guo et al., 2009). Гены VLR круглоротых организованы кластерно и включают многочисленные участки, кодирующие лейциновые повторы. Разнообразие вариантов АРР круглоротых формируется по механизму генной конверсии с участием дезаминаз цитозина CDA1 и CDA2 (Cooper, Alder, 2006; Boehm et al., 2012). При этом популяции лимфоцитов бесчелюстных соответствуют таковым у челюстноротых. Соответственно, становление механизмов специфического распознавания происходило в двух ветвях позвоночных животных независимо друг от друга (Шилов, Купраш, 2016). В то же время, у беспозвоночных животных до сих пор практически не проводилось работ по поиску вариабельных АРР вне суперсемейства иммуноглобулинов. А возможность включения в группу АРР вариабельных вариантов ПРР разных групп (СР, ТПР, АБ) для моллюсков практически не обсуждается (см. раздел III.3.1).

Гуморальный компонент системы врождённого иммунитета представлен растворимыми компонентами внутренней среды организма, участвующими в реакциях нейтрализации патогенов, а также опосредующими клеточные реакции и регулирующими 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. Кроме того, многие ПРР могут функционировать как в мембранной, так и в растворимой форме. У позвоночных животных гуморальные компоненты адаптивного иммунитета – антитела – вырабатывается исключительно производными В-лимфоцитов – плазматическими клетками (Купер, 1980; Caligaris-Cappio, Ferrarini, 1997). При этом гуморальные факторы врождённого иммунитета, такие как компоненты комплемента, антимикробные белки, цитокины вырабатываются клетками эпителиев, железистых тканей, гепатоцитами печени (Горецкая, 2008; Кухаркина и др., 2020; Baker, Baker, 2005). Полученные нами данные также подтвердили, что гены факторов цитотоксичности (*PcCat, PcPerox, PcBL, PcCyst*), лектинов (*PcFREP7, PcClect)* активно экспрессируются не только в гемоцитах, но и в клетках других тканей – гепатопанкреаса, ноги, сердца и белковой железы (раздел III.4.3). На моллюсках нескольких модельных видов показано совместное участие клеточных и гуморальных факторов в элиминации патогенов (комплексы ФБ–ТСБ) (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, PcPerox, PcBL*) значительно различается у моллюсков *Planorbarius corneus* со зрелым заражением трематодами разных видов (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 реакция клеточная не развивается (раздел III.3). Проявлением избирательности иммунного ответа является также в разной степени выраженное изменение гемоцитарной формулы (раздел III.2).

Если избирательность изменения экспрессии ПРР, вероятно, свидетельствует об их участии в распознавании трематод конкретных видов, то дифференциальное изменение экспрессии генов цитотоксичности и разное протекание клеточной реакции могут быть обусловлены тремя факторами. Первый – разная восприимчивость моллюсков к заражению трематодами разных видов, вследствие конститутивно разного уровня экспрессии генов резистентности. Среди последних, решающую роль, вероятно, играют гены ПРР. Второй – активация разных путей элиминации различных патогенов. Третий – подавление иммунных реакций паразитом, приводящее к снижению экспрессии гена. В условиях природного заражения невозможно проверить вклад каждого из факторов. Однако для моллюсков резистентных и чувствительных лабораторных линий подтверждён как вклад конститутивного компонента, так и паразита на экспрессию отдельных генов (Mitta et al., 2005; Lockyer et al., 2012). В то же время, у позвоночных врождённый иммунитет считается неизбирательным, а специфические реакции реализуются за счёт развития его адаптивной надстройки (Pancer, Cooper, 2006).

Таким образом, полученные на сегодняшний день данные позволяют заключить, что лёгочные моллюски обладают полноценной системой врождённого иммунитета. Конститутивные компоненты врождённого иммунитета моллюсков не полностью эквивалентны факторам врождённого иммунитета позвоночных. По ряду характеристик, таких как разнообразие ПРР и их онтогенетическая вариативность, наличие тренированного иммунитета, избирательность по отношению к факторам иммунизации, врождённые иммунные реакции лёгочных моллюсков значительно отличаются от общепринятых представлений о системе врождённого иммунитета, основанных на изучении 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 бóльшей 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 гепатопанкреса, 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, Rubenstrema exasperatum, Leucochloridium paradoxum, Aptorchis* 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 СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ТЕКСТЕ

АПО – амёбоцит-продуцирующий орган

АРР – антигенраспознающие рецепторы

АФА – активные метаболиты азота

АФК – активные метаболиты кислорода

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

КДФДА – карбокси-2′,7′-дихлородигидро-флуоресцеин диацетат

ЛПС – липополисахариды

миРНК – малые интерферирующие РНК

Me (К1, К3) – медиана, первый и третий квартили в выборке

МС – материнская спороциста

МСЛ – маннозо-связывающий лектин

н. – нуклеотид

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция, сопряжённая с обратной транскрипцией

п.з. – после заражения

п.н. – пара нуклеотидов

ПААГ – полиакриламидный гель

ПАМП – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (образы патогенности)

ПРР – паттерн-распознающие (патогенраспознающие) рецепторы

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рДНК– гены, кодирующие рибосомную РНК и рибосомные белки

РПР – RIG-подобный рецептор

сем. – семейство

СПС – суммарная площадь среза

СР – скаведжер-рецептор

сут. – сутки

т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов

ТПР – толл-подобный рецептор

ТСБ – тиоэфирсодержащий белок

ФБ – фибриногенподобный белок

ФИММ – фактор, ингибирующий миграцию макрофагов

ФИТЦ – флуоресцеин-5-изотиоционат

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ЭФР – эпидермальный фактор роста

ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение

18S – ядерный ген, кодирующий 18S рРНК

28S – ядерный ген, кодирующий 28S рРНК

5.8S – ядерный ген, кодирующий 5.8S рРНК

BA – Байесовский анализ

Bge-клетки – культура эмбриональных клеток моллюска *Biompahalaria glabrata*

CaBP – кальций-связывающий белок

CDS – кодирующие последовательности

CLECT – С-лектин

CRD – домен распознавания углеводов

Cyst – цистатинподобный белок

EdU – 5-этинил-2-дезоксиуридин EdU

FBG – фибриногеновый домен белка

FS – прямое светорассеивание

SS – боковое светорассеивание

Hap – гаплотип

IG –домен иммуноглобулинового суперсемейства

ITS1, ITS2 – внутренние транскрибируемые спейсеры рДНК

LRR – богатые лейцином повторы в белке

MASP – сериновая протеаза, ассоциированная с маннозо-связывающим лектином

ML – метод максимального правдоподобия

ORF – открытая рамка считывания

PI – йодистый пропидий

cox1 – митохондриальный ген I субъединицы цитохром с-оксидазы

cytB – митохондриальный ген цитохрома b

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Агглютинация (от лат. «agglutinatio» – склеивание) – агрегация клеток или процесс формирования скопления клеток (например гемоцитов).

Адаптивный иммунитет – вид иммунитета, характеризующийся способностью иммунной системы распознавать и реагировать на индивидуальные антигены, а также наличием иммунологической памяти. У хордовых клетками адаптивного иммунитета являются лимфоциты, популяции которых имеют клональную структуру. Каждый из клонов лимфоцитов имеет неповторимый антигенраспознающий рецептор, формирующийся за счёт реарранжировки (перестройки) кодирующего его кластера генов. В результате адаптивного иммунного ответа на конкретный антиген в организме сохраняются клетки памяти, являющиеся потомками клона лимфоцитов со специфичным данному антигену рецептором.

Адгезия (от лат. «adhaesio» – прилипание) – способность клеток прилипать к поверхности субстрата, к внеклеточному матриксу или друг к другу.

Антиген – чужеродное для организма вещество, вызывающее иммунный ответ. В теории адаптивного иммунитета в качестве антигенов рассматриваются уникальные молекулярные мотивы, которые распознаются специфическими антигенраспознающими рецепторами.

Антигенраспознающие рецепторы – молекулы на поверхности лимфоцитов (иммунных клеток), которые распознают и связывают антигены. Играют ключевую роль в запуске адаптивного иммунного ответа. К антигенраспознающим рецепторам (АРР) относятся Т-клеточные и В-клеточные рецепторы. АРР являются молекулами иммуноглобулинового суперсемейства.

Антитело – секретируемая форма молекулы иммуноглобулина, обеспечивающая гуморальный иммунный ответ в адаптивном иммунном ответе. Участвуют в нейтрализации, опсонизации, агглютинации патогенов, запуске каскада комплемента и регуляции иммунного ответа. Вырабатываются плазматическими клетками, которые являются вариантом специализации В-лимфоцитов. Специфичность антител (идиотип) совпадает со специфичностью антигенраспознающих рецепторов клетки, в которой эти антитела вырабатываются.

Аффинность (лат. «affinitas» – родственность) – сила взаимодействия между отдельными участками взаимодействующих молекул (например, антигена и антитела).

Врождённый иммунитет – вид иммунитета, характеризующийся способностью иммунной системы обезвреживать чужеродные объекты (патогены), несущие на себе патоген-ассоциированные молекулярные паттерны. Распознавание последних происходит посредством патогенраспознающих рецепторов. Чаще всего реализуется за счёт неспецифических форм

иммунного ответа. Врождённый иммунный ответ является первой реакцией организма и необходим для активации адаптивного ответа (в случае наличия системы адаптивного иммунитета).

Вторичный иммунный ответ – это иммунная реакция повторный контакт с тем же чужеродным объектом.

Гаплотип – это совокупность аллелей (вариантов гена) в соседних локусах одной хромосомы, или вариант гена у конкретной особи.

Гемолимфа – жидкость, циркулирующая в сосудах, синусах и межклеточных полостях беспозвоночных животных с незамкнутой системой кровообращения.

Гемопоэз (гематопоэз) – процесс образования, развития и созревания клеток крови или гемолимфы.

Генная конверсия – процесс, при котором последовательность ДНК замещает гомологичную ей последовательность. Аллельная конверсия (замена аллеля гена) происходит в мейозе в результате гомологичной рекомбинации между идентичными локусами гомологичных хромосом. Неаллельная (эктопическая) конверсия происходит между паралогичными (возникшими в результате дупликации) последовательностями ДНК, расположенными в разных локусах генома

Гены иммунного ответа – это группа генов, контролирующих развитие, функционирование и регуляцию иммунного ответа. К ним относятся гены рецепторов распознавания чужеродного, факторов цитотоксичности, гуморальных факторов, цитокинов и др.

Гранулоциты – у позвоночных животных – зернистые лейкоциты – тип лейкоцитов, характеризующихся наличием крупного сегментированного ядра и специфических гранул (лизосом) в цитоплазме. У беспозвоночных – клетки гемолимфы, функционально и морфологически сходные с гранулоцитами, содержащие в цитоплазме гранулы.

Гранулёма – скопление лейкоцитов в очаге воспаления, в котором происходит трансформация (перерождение) фагоцитов в эпителиоидные или многоядерные клетки.

Гуморальный иммунитет – иммунные реакции, реализуемые растворимыми факторами, находящимися во внеклеточных жидкостях организма: крови, лимфе, секретах слизистых оболочек и межклеточной жидкости. В системе адаптивного иммунитета реализуется антителами. В системе врождённого иммунитета гуморальные реакции обеспечиваются лектинами, антибактериальными белками, компонентами комплемента и др.

Дендритные клетки – тип лейкоцитов позвоночных животных, основной функцией которых является процесс презентации антигена. Они связывают реакции врождённого и адаптивного иммунного ответа, играя ключевую роль в запуске адаптивного ответа.

Дефенсины (англ. «defense» – защита) – факторы врождённого гуморального иммунитета – катионные антимикробные белки, которые способны связываться с поверхностями патогенов, нарушая их целостность.

Домен – элемент третичной структуры белка, представляющий собой стабильную и относительно независимую подструктуру и выполняющий определённую биологическую функцию.

Соматическая диверсификация – явление, при котором один ген является матрицей для синтеза большого количества белков, различающихся по аминокислотной последовательности. Механизмы диверсификации – перестройка (реарранжировка) кодирующего кластера ДНК, альтернативный сплайсинг, редактирование ДНК, гипермутагенез.

Иммунизация – процесс стимуляции иммунного ответа в результате попадания в организм чужеродного объекта. Бывает естественной (природной) и искусственной (лабораторной, экспериментальной). У позвоночных животных иммунизацией называют процесс формирования иммунитета после попадания в организм антигена. К реакциям врождённого иммунитета термин применяют для обозначения попадания в организм любого чужеродного фактора, вызывающего иммунную реакцию.

Иммуноглобулиновое суперсемейство – большая группа белков, отличающихся наличием иммуноглобулинового домена с характерной укладкой полипептидной цепи в виде двух слоев с антипараллельной бета-складчатой структурой и дисульфидным мостиком между слоями. Суперсемейство включает белки клеточной поверхности и растворимые белки, которые участвуют в процессах распознавания, связывания или адгезии клеток.

Иммуноциты (иммунокомпетентные клетки) – клетки иммунной системы, обеспечивающие реализацию иммунного ответа.

Иммунологическая память – долговременное сохранение способности иммунной системы быстро и специфически распознавать антиген, с которым организм встречался ранее и запускать соответствующий иммунный ответ (часто более сильный, чем первичный).

Интегрины – группа молекул адгезии, трансмембранные клеточные рецепторы, обеспечивающие связь клетки с внеклеточным матриксом и участвующие в передаче межклеточных сигналов. Влияют на форму клетки, её подвижность и регулировку клеточного цикла.

Интерлейкины – группа цитокинов, которые вырабатываются преимущественно клетками иммунной системы (лимфоцитами, моноцитами, макрофагами и др.). Они регулируют иммунный ответ, воспаление, гемопоэз и восстановление тканей.

Интроны (англ. «intragenic region» – внутригенная область) – участки расположенные между экзонами (кодирующие участки) и не кодирующие аминокислотную последовательность. Удаляются из транскрипта в процессе сплайсинга.

Инфрапопуляция – совокупность особей паразита одного вида, населяющих одну особь хозяина.

Кислородный взрыв – образование активных форм кислорода клетками системы врождённого иммунитета (лейкоцитами, гемоцитами) при взаимодействии с патогенами. Ключевой механизм кислородзависимой бактерицидности иммунной системы.

Клетки памяти – популяции Т- и В-лимфоцитов позвоночных, хранящие информацию о ранее попадавших в организм антигенах (имеют специфические рецепторы к этим антигенам) и обеспечивающие запуск вторичного иммунного ответа, который развивается в более короткие сроки, чем первичный.

Клон лимфоцитов – группа лимфоцитов, произошедших от одной клетки-предшественника и обладающих идентичными антигенраспознающими рецепторами. Каждый клон специфичен к определённому антигену или группе структурно сходных антигенов.

Клональная экспансия – пролиферация клона лимфоцитов, обладающего специфическим к определенному антигену рецептором. Происходит в ходе адаптивного иммунного ответа после встречи лимфоцита с соответствующим его рецептору антигеном.

Комплемент (система комплемента) – комплекс белков, постоянно присутствующих в плазме крови (гемолимфы) и последовательно активирующихся по механизму протеолитического каскада, преимущественно при попадании в организм патогена. Конечным результатом каскада комплемента является опсонизация и лизис клеток патогенов, а также организация процесса воспаления за счет образующихся хемокинов. Каскад комплемента запускается при формировании комплексов «антиген-атитело» (классический путь), взаимодействии лектинов с углеводными детерминантами патогенов (лектиновый путь), либо спонтанно при взаимодействии компонентов комплемента с поверхностью патогенов (альтернативный путь).

Лейкоциты – белые кровяные тельца, клетки крови, основная функция которых – реализация иммунных реакций. Включают миелоидные (моноцитарно-макрофагальная и гранулоцитарная линии) и лимфоидные клетки.

Лиганд (лат. «ligare» **–** связывать) **–** молекула, которая комплементарно связывается с рецептором по принципу «ключ **–** замок».

Лизис – растворение клеток и их содержимого под влиянием различных агентов, в том числе факторов системы иммунитета.

Лимфомиелоидный комплекс – система органов и тканей, объединяющая кроветворную и лимфоидную системы. Основная функция – обеспечение гемопоэза, лимфопоэза, взаимодействие компонентов иммунной системы, в том числе в ходе иммунного ответа.

Лимфоциты – клетки системы иммунитета позвоночных животных, разновидность лейкоцитов, которая обеспечивает преимущественно адаптивный иммунный ответ. Характеризуются наличием специфических антигенраспознающих рецепторов. Основные типы лимфоцитов – В-лимфоциты, Т-лимфоциты, натуральные киллеры.

Малые интерферирующие РНК (миРНК / siRNA, small interfering RNA) **–** это короткие двухцепочечные молекулы РНК, которые участвуют в процессе РНК-интерференции. миРНК комплементарны нуклеотидным последовательностям мРНК. В результате взаимодействия миРНК с мРНК происходит подавление экспрессии соответствующего гена.

Мобильные генетические элементы – последовательности ДНК, которые могут перемещаться внутри генома. При перемещениях могут захватывать гены, что приводит к геномным перестройкам.

Моноцитарно-макрофагальная линия – линия миелоидных лейкоцитов позвоночных животных, которые на начальном этапе дифференцировки представлены моноцитами (циркулирующая форма), а затем – макрофагами (тканевая форма). Макрофаги являются основными участниками врождённых клеточных иммунных реакций, проявляют все формы цитотоксичности – фагоцитоз, дегрануляцию, формируют скопления и капсулы вокруг патогенов, участвуют в регуляции иммунного ответа.

Нейтрофилы (нейтрофильные гранулоциты) – наибольшая по численности в циркуляции группа миелоидных лейкоцитов позвоночных животных. Являются эффекторными клетками врождённого иммунитета, играют ключевую роль в защите от бактериальных и грибковых инфекций.

Опсонизация (греч. «opson» – пища) – процесс адсорбции опсонинов на поверхности патогенов, который стимулирует и облегчает фагоцитоз данных частиц. Опсонинами являются гуморальные компоненты, находящиеся в плазме – лектины, компоненты, комплемента, антитела (у позвоночных).

Патоген – чужеродный объект, вызывающий болезнь или повреждение организма. К патогенам относятся болезнетворные вирусы, бактерии, грибы, простейшие, гельминты и др.

Патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (образы патогенности) – консервативные молекулярные структуры, характерные для патогенов, которые распознаются патогенраспознающими рецепторами клеток врождённого иммунитета.

Паттерн-распознающие рецепторы (патогенраспознающие рецепторы, образраспознающие рецепторы) **–** рецепторы клеток врождённого иммунитета, обеспечивающие распознавание патоген-ассоциированных молекулярных паттернов и последующую активацию клеток врождённого иммунитета. По локализации бывают мембранными, цитоплазматическими или секретируемыми. Основные группы: толл-подобные рецепторы, лектины, скавенджер-рецепторы, рецепторы распознавания нуклеотидов, антимикробные белки.

Партениты трематод – партеногенетические поколения трематод (спороцисты, редии), размножающиеся в промежуточных хозяевах.

Полиморфные муцины – углеводы на поверхности тегумента трематод, которые характеризуются большой индивидуальной изменчивостью и определяют способность отдельного паразита маскироваться от распознавания иммунной системой моллюска или противостоять иммунным реакциям.

Протеазы (протеиназы) — протеолитические ферменты из класса гидролаз, которые расщепляют пептидную связь между аминокислотами в белках.

Презентация антигена – процесс, в ходе которого Т-лимфоцит распознаёт антиген, экспрессированный на поверхности антигенпрезентирующей клетки (АПК) в составе молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКГ). АПК распознают, поглощают и разрушают (в лизосомах, протеасомах) патогены, и затем процессируют их пептиды (эпитопы) в составе молекул ГКГ на своей поверхности. Такие процессированные антигены распознаются Т-лимфоцитами.

Проточная цитофлуориметрия – метод, используемый для измерения физических и химических характеристик популяции клеток или частиц в проточной системе, через которую проходит лазерный луч. По характеру рассеивания света определяются характеристики клеток. Для детального исследования характеристик клеток используют флуоресцентные маркеры.

Резистентность – генетически заданная устойчивость моллюска к заражению трематодами определённых видов (штаммов), связанная с характеристиками иммунной системы.

Репертуар антител – совокупность всех вариантов антител, которые могут вырабатываться В-лимфоцитами организма.

Селекция клонов – процесс отбора клонов лимфоцитов с рецепторами, специфичными к конкретному антигену. Осуществляется в ходе адаптивного иммунного ответа.

Соматический гипермутагенез – один из молекулярных механизмов, разнообразия антител у позвоночных. Реализуется во время пролиферации распознавших антиген В-лимфоцитов при участии фермента цитидиновой дезаминазы (превращает цитозин в урацил) и приводит возникновению множественных точечных мутаций. В результате увеличивается афинность (прочность) связывания с антигеном В-клеточных рецепторов и антител.

Соматическая рекомбинация – реарранжировка генов, кодирующих антигенрапознающие рецепторы (АРР). Механизм перестройки участков ДНК, кодирующих АРР в развивающихся лимфоцитах, обеспечивающий формирование уникальных антиген-распознающих участков АРР. Этот процесс обеспечивает формирование огромного разнообразия АРР.

Сплайсинг альтернативный – процесс образования нескольких альтернативных мРНК из одного первичного транскрипта, путём состыковки (сплайсинга) разных экзонов.

Транскриптом – совокупность всех транскриптов, синтезируемых одной клеткой или группой клеток.

Трансплантат – орган или кусочек ткани, пересаженный от одного организма (донора) другому (реципиенту). По степени родства донора и реципиента бывают: ксено- (принадлежат разным видам), алло- (принадлежат разным особям одного вида) и изо- (принадлежат генетически идентичным особям) трансплантаты.

Фагоцитоз – захват и внутриклеточное переваривание корпускулярного материала клеткой. Является основной формой клеточного иммунного ответа, реализуется иммуноцитами.

Хемокины – группа цитокинов, стимулирующих передвижение иммуноцитов и регулирующих их миграцию в ходе иммунного ответа. Реакция клетки на хемокины называется хемотаксисом.

Цитокины – небольшие белковые молекулы, являющиеся регуляторами жизнедеятельности клеток. Участвуют в контроле процессов гемопоэза, дифференцировки клеток иммунной системы, обеспечивают их активацию и взаимодействие в ходе иммунного ответа.

Цитотоксичность – способность вещества оказывать на клетку токсическое воздействие.

Чувствительность – генетически заданная восприимчивость моллюска к заражению трематодами определённых видов (штаммов), связанная с характеристиками иммунной системы.

Экзоны (англ. «ex(pressi)on» – выражение) – кодирующие участки гена, копии которых входят (в отличие от интронов) в состав зрелой РНК. Экзоны отделены друг от друга интронами. В процессе альтернативного сплайсинга (вырезания интронов) экзоны могут комбинироваться в разных сочетаниях, что обеспечивает формирование разных продуктов одного гена.

Экскреторно-секреторные продукты – вещества, выделяемые партенитами трематод в ходе развития, жизнедеятельности и размножения внутри хозяина, которые способны влиять на физиологические процессы хозяина, в том числе на иммунный ответ (подавлять или усиливать).

Экспрессия гена – процесс, в ходе которого наследственная информация, записанная в гене в виде последовательности нуклеотидов ДНК, преобразуется в функциональный продукт (РНК или белок). Экспрессирующийся ген – работающий (активный) ген.

Эпитоп – антигенная детерминанта, часть молекулы антигена, которая распознаётся антигенраспознающими рецепторами.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аванесян, А. В. Организация амебоцитопродуцирующего органа различных видов пульмонат / А. В. Аванесян, Г. Л. Атаев // XII Международное совещание и V школа по эволюционной физиологии. Посвящено памяти академика Л. А. Орбели: тезисы докладов. – 2001. – С. 4–5.

2. Аванесян, А. В. Влияние защитных реакций моллюсков на развитие партенит трематод: на примере семейства Echinostomatidae: дис. … канд. биол. наук: 03.00.08 / А. В. Аванесян. – СПб, 2002. – 140 с.

3. Аванесян, А. В. Гемопоэз у брюхоногих моллюсков / А. В. Аванесян, Г. Л. Атаев // Функциональная морфология, экология и жизненные циклы животных: сборник научных трудов / Российский государственный педагогический университет имени А. И. Герцена. – СПб, 2004. – С. 105–111.

4. Акрамовский, Н. Н. Фауна Армянской ССР: моллюски (Mollusca) / Н. Н. Акрамовский. – Ереван: Изд-во АН АрмССР, 1976. – 270 с.

5. Алексеев, В. А. Токсикологическая характеристика и симптомокомплекс острой фенольной интоксикации некоторых пресноводных ракообразных и моллюсков / В. А. Алексеев, Б. И. Антипин // Гидробиологический журнал. – 1976. – № 2. – С. 37.

6. Алякринская, И. О. Количественная характеристика гемолимфы и гемоглобина роговой катушки *Planorbis corneus* (Gastropoda, Pulmonata) / И. О. Алякринская // Зоологический журнал. – 1970. – Т. 69, № 3. – С. 349–353

7. Атаев, Г. Л. Развитие партенит трематод: дис. … д-ра биол. наук: 03.00.08, 03.00.19 / Г. Л. Атаев. — СПб, 2000. – 340 с.

8. Атаев, Г. Л. Защитные реакции брюхоногих моллюсков. 1. Клеточные реакции / Г. Л. Атаев, А. В. Полевщиков // Паразитология. – 2004. – Т. 38, № 4. – С. 342–351.

9. Атаев, Г. Л. Сравнительно иммунологический анализ защитных реакций брюхоногих моллюсков / Г. Л. Атаев, И. С. Дьячков, А. В. Полевщиков // Известия Российского государственного педагогического университета им. А. И. Герцена. – 2005a. – Т. 5, № 13. – С. 265–281.

10. Атаев, Г. Л. Защитные реакции брюхоногих моллюсков. Гуморальные реакции / Г. Л. Атаев, Е. Е. Еремина, А. В. Полевщиков // Паразитология. – 2005b. – Т. 39, № 1. – С. 3–15.

11. Атаев, Г. Л. Воздействие метацеркарий *Echinostoma caproni* (Trematoda) на выживаемость моллюсков рода *Biomphalaria* (Pulmonata) / Г. Л. Атаев // Паразитология. – 2010. – Т. 44, № 6. – С. 481–495.

12. 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.

13. Атаев, Г. Л. Изменения в амёбоцитопродуцирующем органе моллюсков *Biomphalaria glabrata* при заражении трематодами *Echinostoma caproni* / Г. Л. Атаев, Е. Е. Прохорова // Паразитология. – 2013. – Т. 47, № 6. – С. 472–479.

14. Атаев, Г. Л. Размножение партенит трематод: обзор основных теорий: монография / Г. Л. Атаев. – СПб.: Наука, 2017. – 85 с.

15. Атаев, Г. Л. Иммунитет брюхоногих и двустворчатых моллюсков / Г. Л. Атаев, Е. Е. Прохорова, А. С. Токмакова // Амурский зоологический журнал. – 2024a. – Т. XVI, № 3 (Приложение). – 74 с.

16. Атаев, Г. Л. Малакологическое изучение озёр плоскогорья Укок / Г. Л. Атаев, Р. Р. Усманова, Е. Е. Прохорова и др. // Амурский зоологический журнал. – 2024b. – Т. XVI, № 3. – С. 633–644.

17. Бабич, П. С. Изучение содержания меди в тканях моллюсков *Planorbarius corneus* и влияния трематодной инвазии на фенолоксидазную активность гемолимфы / П. С. Бабич, П. С. Кудрявцева, Ю. А. Орлов, Г. Л. Атаев // Паразитология. – 2017. – Т. 51, № 6. – С. 490–498.

18. Баскаков, А. В. Иммунологический анализ защитных реакций моллюсков : автореф. дис. … канд. биол. наук: 14.00.36, 03.00.25 / А. В. Баскаков; РАМН, НИИ эксперимент. медицины. – СПб., 2002. – 22 с.

19. Балашов, И. А. Фауна Украины. Том 29. Моллюски. Выпуск 5. Стебельчатоглазые / И. А. Балашов. – Киев: Наукова думка, 2016. – 592 с.

20. Беклемишев, В. Н. Основы сравнительной анатомии беспозвоночных. Т. 2: Органология / В. Н. Беклемишев. – М.: Наука, 1964. – 448 с.

21. Бернет, Ф. М. Целостность организма и иммунитет / Ф. М. Бернет; пер. с англ. А. М. Оловникова; под ред. и с предисл. В. Л. Рыжкова. – М.: Мир, 1964. – 184 с., ил.

22. Беэр, С. А. Биология возбудителей шистосомозов / С. А. Беэр, М. В. Воронин. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2011. – 200 с.

23. Бирюков, А. Ю. Видовой состав сухопутных моллюсков промежуточных хозяев *Dicrocoelium lanceatum* и их заражённость личинками трематоды в регионе / А. Ю. Бирюков, Н. С. Малышева, Н. А. Самофалова et al. // Учёные записки: электронный научный журнал Курского государственного университета. – 2011. – № 3 (19), – С. 18–21.

24. Бобровская, А. В. Анализ разнообразия транскриптов толл-подобных рецепторов в гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) / А. В. Бобровская // Студент–Исследователь–Учитель: тезисы докладов 26 й межвузовской студенческой научной конференции. – СПб., 2024. – С. 23–24.

25. Бобровская, А. В. Разнообразие лектинов у лёгочных моллюсков P*lanorbarius corneus* и *Succinea putris* / А. В. Бобровская // Студент–Исследователь–Учитель: тезисы докладов 27 й межвузовской студенческой научной конференции. – СПб., 2025. – С. 34–35.

26. 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.

27. Бобровская, А. В. Разнообразие лектинов у лёгочных моллюсков *Planorbarius corneus* и *Succinea putris* / А. В. Бобровская // Студент – Исследователь – Учитель: материалы докладов 28-й межвузовской научной конференции. – СПб, 2025. – С. 34–35.

28. Бобровская, А. В. Компоненты комплемента моллюсков *Planorbarius corneus* и *Succinea putris* / А. В. Бобровская, Е. Е. Прохорова // Актуальные проблемы биологии и медицинской паразитологии: материалы LI Межвузовской научно-практической конференции, посвящённой 141-летию со дня рождения академика Е. Н. Павловского. СПб, 2025. – С. 25–29

29. Боголюбов, А. С. Компьютерный определитель пресноводных беспозвоночных средней полосы России (на компакт-диске для PC) / А. С. Боголюбов, М. В. Кравченко. – М.: Экосистема, 2018.

30. Бондарева, О. В. Генетическая изменчивость древесной улитки *Arianta arbustorum* L. в Ленинградской области по данным анализа фрагмента последовательности митохондриального гена CO1 / О. В. Бондарева, М. И. Орлова, Н. И. Абрамсон // Экологическая генетика. – 2016. – Т. 16, № 2. – С. 19–27.

31. Быстрова, О. А. Морфофункциональные особенности сердца моллюсков: автореф. дис. … канд. биол. наук: 03.00.25 / О. А. Быстрова; Ин-т цитологии РАН. – СПб., 2001. – 20 с.

32. Быховская-Павловская, И. Е. Трематоды пролетных птиц Куршской косы / И. Е. Быховская-Павловская // Паразитологический сборник ЗИН АН СССР. – 1974. – Т. 26. – С. 39–80.

33. Васильева, Е. А. Кариотипирование моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) из водоёмов Ленинградской области / Е. А. Васильева // Биология — наука XXI века: 14-я Пущинская международная школа-конференция молодых учёных: сборник тезисов. – Пущино, 2010. – С. 110–111.

34. Винарский, М. В. Аналитический каталог пресноводных и солоноватоводных моллюсков России и сопредельных стран / М. В. Винарский, Ю. И. Кантор. – М.: Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН, 2016. – 543 с.

35. Винарский, М. В. О реальности локальных и экологических рас прудовиков (*Mollusca, Gastropoda, Lymnaeidae*) / М. В. Винарский // Зоологический журнал. – 2016. – Т. 95, № 3. – С. 267–282.

36. Галактионов, В. Г. Графические модели в иммунологии / В. Г. Галактионов. – М.: Медицина, 1986. – 239 с.

37. Галактионов, В. Г. Эволюционная иммунология. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2005. – 408 с.

38. Галактионов, К. В. Происхождение и эволюция жизненных циклов трематод / К. В. Галактионов, А. А. Добровольский; РАН. Зоол. ин-т, Кол. науч. центр РАН. Мурм. мор. биол. ин-т. – СПб: Наука: С.-Петерб. изд. фирма, 1998. – 401 с.

39. Галактионов, К. В. Эволюция морфофункциональной организации партеногенетических поколений трематод / К. В. Галактионов, А. А. Добровольский, И. М. Подвязная // Зоологический журнал. – 2014. – Т. 93, № 3. – С. 426.

40. Гарбар, Д. А. Кариологические особенности рода *Planorbarius* (Gastropoda, Pulmonata, Bulinidae) фауны Украины / Д. А. Гарбар, А. В. Гарбар // Цитология и генетика. – 2007. – Т. 41, № 2. – С. 49–55.

41. Гинецинская, Т. А. Трематоды, их жизненные циклы, биология и эволюция / Т. А. Гинецинская. – Л.: Наука, 1968. – 411 с.

42. Глупов, В. В. Основные механизмы конституционального иммунитета насекомых: дис. … д-ра биол. наук: 03.00.09 / В. В. Глупов; Рос. акад. наук, Сиб. Отд., Ин-т систематики и экологии животных. – Новосибирск, 2004. – 320 с.

43. Грицюк, С. Б. Изменчивость конхологических признаков Helix pomatia L. / С. Б. Грицюк, Л. Н. Хлус, К. Н. Хлус // Учёные записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология». – 2001. – Т. 14, № 2. – С. 54–57.

44. Грищенко Е. А. Дендритные клетки: основные представления / Е. А. Грищенко // Аллергология и иммунология в педиатрии. – 2015. – Вып. 2 (41). – С. 9–17.

45. Горецкая, М. В. Синтетическая функция печени и гуморальные факторы иммунитета / М. В. Горецкая // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2008. – № 2 (22). – С. 7–11.

46. Громова, Н. Н. Трематоды тетеревиных птиц Карелии / Н. Н. Громова // Сборник конференции «Биологические основы борьбы с трансмиссивными и паразитарными заболеваниями на Севере». – 1972. – № 1. – С. 79–86.

47. Дегтяренко, Е. В. Моллюски континентальных водоёмов северо-западного Приазовья: фаунистический обзор с замечаниями по распространению и экологии / Е. В. Дегтяренко, В. В. Анистратенко // Збірник праць Зоологічного музею. – 2011. – № 42. – С. 13–57.

48. Добровольский, А. А. Жизненный цикл *Haplometra cylindracea* Zeder 1800 (Trematoda, Plagiorchiidae) / А. А. Добровольский, А. С. Райхель // Вестник Ленинградского университета. – 1973. – Т. 3. – С. 5–13.

49. Ельчанинов, А. В. Макрофаги / А. В. Ельчанинов, Т. Х. Фатхудинов; ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова» Минздрава России [и др.]. – М.: ГЭОТАР Медиа, 2023. – 202 с.

50. Жадин, В. И. Моллюски пресных и солоноватых вод СССР / В. И. Жадин. – 1952. – 376 с.

51. Жукова, А. А. Генотипирование трематод рода *Leucochloridium*, обитающих на территории Ленинградской области / А. А. Жукова, Е. Е. Прохорова, Н. В. Цымбаленко и др. // Паразитология. – 2012. – Т. 46, № 5. – С. 414–419.

52. Заварзин, А. А. Основы сравнительной гистологии / А. А. Заварзин. – Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1985. – 400 с.

53. Зурочка, А. В. Проточная цитометрия в медицине и биологии / А. В. Зурочка, С. В. Хайдуков, И. В. Кудрявцев, В. А. Черешнев; отв. ред. А. В. Зурочка. – Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2014. – 574 с.

54. Зюмченко, Н. Е. Соматическая полиплоидия в слюнных железах брюхоногих моллюсков: дис. … канд. биол. наук: 03.00.25 / Н. Е. Зюмченко; Дальневосточный государственный университет. – Владивосток, 2002. – 195 с.

55. Иванов, А. В. Большой практикум по зоологии беспозвоночных: учеб. пособие для биол. специальностей ун-тов: в 3 ч. / А. В. Иванов, Ю. И. Полянский, А. А. Стрелков. – М.: Высшая школа, 1985. – Ч. 3: Типы: сипункулиды, моллюски, щупальцевые, иглокожие. – 390 с.

56. Иванов, А. В. Класс брюхоногих моллюсков / А. В. Иванов // Руководство по зоологии: учеб. пособие / сост. Б. В. Властов, В. А. Догель, Л. А. Зенкевич и др.; под ред. В. А. Догеля, Л. А. Зенкевича; Науч.-исслед. ин-т зоологии Моск. гос. ун-та им. М. В. Ломоносова. – 1940. – С. 323–431.

57. Иванова-Казас, О. М. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных: Трохофорные, щупальцевые, щетинкочелюстные, погонофоры / О. М. Иванова-Казас. – М.: Наука, Сиб. отд-ние, 1977–1979. – 312 с.

58. Канев, И. Инкапсулиране и инактивиране на спороцисти на *Echinostoma revolutum* (Fröelich, 1802) (Trematoda: Echinostomatidae) на тъканите и хемолимфата на охлюви *Lymnaea stagnalis* (L.) (Mollusca: Gastropoda) / И. Канев // Хельминтология. – София, 1987. – Т. 24. – С. 26–31.

59. Кантор, Ю. И. Каталог моллюсков России и сопредельных стран / Ю. И. Кантор, А. В. Сысоев. – М.: РАН, Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова, 2005. – 627 с.

60. Кокряков, В. Н. Очерки о врождённом иммунитете. – СПб.: Наука, 2006. – 261 с.

61. Конструктор карт Яндекса [Электронный ресурс] / Яндекс. — URL: https://yandex.ru/map-constructor (дата обращения: 06.06.2026).

62. Костюнин, В. М. К трематодофауне воробьиных птиц Астраханской области / В. М. Костюнин // В кн.: Фауна, систематика, биология и экология гельминтов и их промежуточных хозяев. – 1979. – С. 42–45.

63. Круглов, Н. Д. К морфологии и систематике европейских представителей подрода *Peregriana* / Н. Д. Круглов, Я. И. Старобогатов // Зоологический журнал. – 1983. – Т. 62, № 10. – С. 1462–1473.

64. Круглов, Н. Д. К систематике и распространению моллюсков рода *Lymnaea* в Европе / Н. Д. Круглов, Я. И. Старобогатов // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический. – 1985. – Т. 90, вып. 3. – С. 88–97.

65. Круглов, Н. Д. Моллюски рода *Lymnaea* (Gastropoda, Pulmonata) Европы и Северной Азии: филогения, морфология, систематика, экология: монография / Н. Д. Круглов. – Смоленск, 2005a. – 296 с.

66. Круглов, Н. Д. Моллюски семейства прудовиков Европы и северной Азии (особенности экологии и паразитологическое значение) / Н. Д. Круглов. – Смоленск: Изд-во СГПУ, 2005b. – 507 с.

67. Кудрявцев, И. В. Современные методы оценки функций фагоцитов в экспериментальной биологии / И. В. Кудрявцев, А. В. Зурочка, С. В. Хайдуков и др. // Российский иммунологический журнал. – 2012. – Т. 6(14), № 3(1). – С. 3–20.

68. Купер, Э. Сравнительная иммунология / Э. Купер. – М.: Мир, 1980. – 424 с.

69. Кухаркина, О. В. Современные представления о строении, функциях и иммунном ответе слизистых оболочек / О. В. Кухаркина, В. В. Дрыгин, О. А. Борисова, Т. В. Жбанова // Журнал фундаментальной медицины и биологии. – 2020. – № 3. – С. 4–15.

70. Лефковитс, И. Иммунологические методы исследований / И. Лефковитс, Б. Пернис, А. Т. Михайлов; пер. с англ. Г. А. Банникова и др. – М.: Мир, 1988. – 528 с.

71. Лебедев, К. А. Иммунология образраспознающих рецепторов: интегральная иммунология / К. А. Лебедев, И. Д. Понякина. – М.: URSS, 2017. – 254 с.

72. Лепнева, С. Г. Жизнь пресных вод СССР / С. Г. Лепнева, Е. Н. Павловский, В. И. Жадин (ред.). – М.–Л.: Изд-во АН СССР, 1950. – Т. 3. – С. 257–552.

73. Лилли, Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лилли. – М.: Мир, 1969. – 645 с.

74. Лихарев, И. М. Наземные моллюски фауны СССР: определитель по фауне СССР. Выпуск 43 / И. М. Лихарев, Е. С. Раммельмейер. – М.–Л.: Изд-во АН СССР, 1952. – 511 с.

75. Лихарев, И. М. Наземные моллюски фауны СССР / И. М. Лихарев // Фауна СССР. Моллюски. – Л.: Наука, 1968. – Т. 3. – С. 45–48.

76. Максимова, Т. И. Морфологический и генетический анализ моллюсков семейства *Bulinidae* (Gastropoda, Pulmonata) фауны России и сопредельных территорий: автореф. дис. … канд. биол. наук / Т. И. Максимова. – СПб: Изд-во Зоологического института РАН, 1995. – 28 с.

77. Меджитов, Р. Врождённый иммунитет / Р. Меджитов, Ч. Джаневей // Казанский медицинский журнал. – 2004. – № 3. – С. 161–167.

78. Межжерин, Д. А. Систематическая структура комплекса *Planorbarius corneus* S.L. (Gastropoda): анализ аллозимных маркеров и морфометрических признаков / Д. А. Межжерин, А. В. Гарбар и др. // Вестник зоологии. – 2005. – № 39 (6). – С. 11–17.

79. Мечников, И. И. Избранные труды. Вопросы иммунитета [1883] / И. И. Мечников. – М., 1951. – 734с.

80. Ноздрачев А. Д. Анатомия беспозвоночных: лабораторные животные: пиявка, прудовик, дрозофила, таракан, рак / А. Д. Ноздрачев, Е. Л. Поляков, В. П. Лаицкий и др. ; под ред. А. Д. Ноздрачева. – СПб: Лань, 1999. – 318 с.

81. Осипова, Е. М. Моллюски плейстоцена и голоцена Южноуральского региона: дис. … канд. геол.-минерал. наук: 25.00.02 / Е. М. Осипова; Институт геологии Уфимского научного центра РАН; науч. рук. Г. А. Данукалова. – Уфа, 2009. – 168 с.

82. Петренко, В. М. Эволюция и онтогенез лимфатической системы / В. М. Петренко. – СПб: ДЕАН, 2003. – 335 с.

83. Полевщиков, А. В. Лектины в защитных реакциях беспозвоночных / А. В. Полевщиков // Журнал общей биологии. – 1996. – Т. 57. – № 6. – С. 718—739.

84. Присный, А. А. Морфофункциональный статус гемоцитов моллюсков: сравнительно-физиологический анализ: монография / А. А. Присный, С. В. Кулько. – Белгород: Эпицентр, 2022. – 119 с.

85. Прохорова, Е. Е. Генетические основы резистентности гастропод / Е. Е. Прохорова, Г. Л. Атаев // Известия Российского государственного педагогического университета им. А. И. Герцена. – 2008. – № 64. – С. 86–96.

86. Прохорова, Е. Е. Защитные реакции пульмонат (Gastropoda): автореф. дис. … канд. биол. наук: 03.00.08, 03.00.25 / Е. Е. Прохорова; С.-Петерб. гос. ун-т. – СПб, 2009. – 18 с.

87. 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. – 2010. – Т. 44, № 4. – С. 310–325.

88. 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. – Вып. 168. – С. 153–162.

89. Прохорова, Е. Е. Анализ ITS1 и ITS2 рибосомной ДНК в популяциях моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda) в Ленинградской и Калининградской областях / Е. Е. Прохорова, Е. А. Жемчужникова, Г. Л. Атаев // Сибирский экологический журнал. – 2015a. – № 6. – С. 883–889.

90. 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.

91. 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.

92. Прохорова, Е. Е. Видовая идентификация спороцист *Leucochloridium paradoxum* (Trematoda) / Е. Е. Прохорова, А. А. Виноградова, А. С. Токмакова и др. // Паразитология. – 2018b. – Т. 52, № 6. – С. 442–448.

93. 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: материалы V Международной конференции. – Томск: Томский государственный университет, 2020. – С. 133–136.

94. Прохорова, Е. Е. Фибриногенподобные белки гастропод / Е. Е. Прохорова, Г. Л. Атаев // Паразитология. – 2021. – Т. 55, № 6. – С. 443–464.

95. 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.

96. Прохорова, Е. Е. Патогенраспознающие рецепторы гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) / Е. Е. Прохорова, А. В. Бобровская // Изучение водных и наземных экосистем: история и современность: материалы докладов III Международной научно-практической конференции. – Севастополь, 2024. – С. 188–189.

97. Рупперт, Э. Э. Зоология беспозвоночных: в 4 т. Т. 2: Низшие целомические животные / Э. Э. Рупперт, Р. С. Фокс, Р. Д. Барнс; под ред. А. А. Добровольского, А. И. Грановича; пер. с англ. – М.: Академия, 2008. – 448 с.

98. Сачкова, Ю. В. Наземные моллюски семейства янтарок (*Succineidae*) Среднего Поволжья / Ю. В. Сачкова, Е. Д. Левина // Биологические ресурсы и биологическое разнообразие Самарского Поволжья. – 2005. – Т. 1. – С. 160–165.

99. Сербина, Е. А. О способах определения возраста у брюхоногих моллюсков / Е. А. Сербина // Биологические науки Казахстана. – 2008. – № 1. – С. 43–52.

100. 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 др. // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9, № 2-1 (18). – С. 160–162.

101. Сокольникова, Ю. Н. Анализ клеточных защитных реакций в диагностике здоровья двустворчатых моллюсков *Modiolus kurilensis*: автореф. дис. … канд. биол. наук / Ю. Н. Сокольникова. – Владивосток: Дальневосточный федеральный университет, 2021. – 25 с.

102. Солдатенко, Е. В. Таксономический анализ моллюсков родов *Planorbis*, *Segmentina*, *Anisus* (Gastropoda, Pulmonata, Planorbidae) фауны Европейской части России и сопредельных территорий: дис. … канд. биол. наук: 03.00.08 / Е. В. Солдатенко; Зоологический институт. – СПб, 1997. – 354 с.

103. Стадниченко, А. П. Патоморфологические изменения клеточных элементов гемолимфы пресноводных лёгочных и переднежаберных моллюсков при инвазии их партенитами трематод / А. П. Стадниченко, Л. И. Ковальчук, Н. Д. Романенко, В. Н. Грищенко // Паразитология. – 1981. – Т. 15, № 5. – С. 407–413.

104. Стадниченко, А. П. Прудовикообразные (пузырчиковые, витушковые, катушковые) / А. П. Стадниченко // Фауна Украины. – Киев: Наукова думка, 1990. – № 29 (4). – 292 с.

105. Стадниченко, А. П. Прудовиковые и чашечковые (*Lymnaeidae*, *Acroloxidae*) Украины / А. П. Стадниченко. – Киев: Центр учебной литературы, 2004. – 327 с.

106. Становова, М. В. Клетки полости тела аннелид: морфология, цитогенез, функции / М. В. Становова // Зоология беспозвоночных. – 2019. – Т. 16, № 3. – С. 254–282.

107. Старобогатов, Я. И. Моллюски / Я. И. Старобогатов, Л. А. Прозорова, В. В. Богатов et al. // Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. – СПб: Наука, 2004. – Т. 6. – С. 9–491.

108. Токмакова, А. С. Клеточные реакции лёгочных моллюсков на трематодную инвазию: автореф. дис. … канд. биол. наук / А. С. Токмакова; Зоологический ин-т РАН. – СПб., 2018. – 22 с.

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

110. Тухватулин, А. И. Toll-подобные рецепторы и их адапторные молекулы / А. И. Тухватулин, Д. Ю. Логунов, Д. Н. Щербинин и др. // Биохимия. – 2010. – Т. 75, Вып. 9. – С. 1224–1243.

111. 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.

112. Усманова, Р. Р. Обнаружение в моллюске *Succinea putris* спороцисты рода *Leucochloridium* необычной окраски / Р. Р. Усманова, Е. Е. Прохорова // Паразитология. – 2022. – Т. 56, № 6. – С. 460–468.

113. Усманова, Р. Р. Размножение и развитие спороцист *Leucochloridium paradoxum* Carus, 1835 (Trematoda: Leucochloridiidae): дис. … канд. биол. наук: 1.5.12 / Р. Р. Усманова; – СПб, 2023. – 200 с.

114. Хаитов, Р. М. Иммунология: учеб. для студентов мед. вузов / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатьева, И. Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2000. – 429 с.

115. Хохуткин, И. М. Моллюски Урала и прилегающих территорий. Семейство *Lymnaeidae* (Gastropoda, Pulmonata, Lymnaeiformes) / И. М. Хохуткин, М. В. Винарский, М. Е. Гребенников. – Екатеринбург: Гощицкий, 2009. – 156 с.

116. Хохуткин, И. М. Моллюски Урала и прилегающих территорий. Семейства *Acroloxidae*, *Physidae*, *Planorbidae* (Gastropoda, Pulmonata, Lymnaeiformes). Ч. 2 / И. М. Хохуткин, М. В. Винарский; под ред. И. А. Васильевой. – Екатеринбург: Гощицкий, 2013. – 184 с.

117. Цалолихин, С. Я. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий / С. Я. Цалолихин (ред.). – СПб.: Наука, 2004. – Т. 6: Моллюски, Полихеты, Немертины. – 528 с.

118. Цветков, В. В. Биология дендритных клеток человека и их роль в инфекционной патологии / В. В. Цветков, Т. В. Сологуб, И. И. Токин // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2014. – Вып. 3. – С. 68–74.

119. Шабельников, С. В. Морфофункциональная характеристика гранулярных клеток предсердия брюхоногого моллюска *Achatina fulica*: автореф. дис. … канд. биол. наук: 03.00.25 / С. В. Шабельников; Ин-т цитологии РАН. – СПб., 2008. – 25 с.

120. Шиков, Е. В. *Arianta arbustorum* (Linnaeus, 1758) (Mollusca, Gastropoda) — агрессивный вселенец на Русскую равнину / Е. В. Шиков // Биоразнообразие: проблемы изучения и сохранения: материалы Международной научной конференции. – Тверь: Тверской государственный университет, 2012. – С. 380–381.

121. Шиков, Е. В. Изменения степени натурализации адвентивных видов наземных моллюсков в центре Русской равнины / Е. В. Шиков // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология. – 2022. – № 2. – С. 72–80.

122. Шилейко, А. А. Наземные моллюски (*Mollusca*, *Gastropoda*) Московской области / А. А. Шилейко // Почвенные беспозвоночные Московской области. – М.: Наука, 1982. – С. 144–169.

123. Шилейко, А. А. Наземные моллюски надсемейства *Helicoidea* фауны СССР / А. А. Шилейко. – Л.: Наука, 1978. – 384 с.

124. Шилейко, А. А. Фауна СССР. Наземные моллюски подотряда *Pupillina* фауны СССР (Gastropoda, Pulmonata, Geophila) / А. А. Шилейко; ред. И. М. Лихарев. – 1984. – 399 с.

125. Шилейко, А. А. Наземные моллюски семейства янтарок (*Succineidae*) фауны СССР / А. А. Шилейко, И. М. Лихарев // Сборник трудов Зоологического музея МГУ. – 1986. – Т. XXIV. – С. 198–238.

126. Шилов, Е. С. Генетические механизмы возникновения адаптивного иммунитета позвоночных / Е. С. Шилов, Д. В. Купраш // Генетика. – 2016. – Т. 52, № 7. – С. 1–13.

127. Щендрик, Т. В. Первые находки церкарий *Brachylaima* sp. (Digenea: Brachylaimidae) у наземных моллюсков на территории Беларуси / Т. В. Щендрик // Известия Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины. – 2024. – № 3 (144). – С. 68–73.

128. Ярилин, А. А. Иммунология: учебник / А. А. Ярилин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.

129. Abdel-Hamid, A. H. Identification of a genetic marker associated with the resistance to *Schistosoma mansoni* infection using RAPD analysis / A. H. Abdel Hamid, S. M. Rawi, A. F. Arafa // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. – 2006. – Vol. 101, № 8. – P. 863–868.

130. Abdel-Hamid, A. Z. Genetic variation between susceptible and non-susceptible snails to *Schistosoma* infection using random amplified polymorphic DNA analysis (RAPDs) / A. Z. Abdel Hamid, J. B. Molfetta, V. Fernandez et al. // Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. – 1999. – Vol. 41. – P. 291–295.

131. Abdul-Salam, J. M. *Biomphalaria glabrata* amoebocytes: assay of factors influencing in vitro phagocytosis / J. M. Abdul-Salam, E. H. Michelson // Journal of Invertebrate Pathology. – 1980. – Vol. 36. – P. 52–59.

132. Abrahamson, M. Cystatins / M. Abrahamson, M. Alvarez-Fernandez, C. M. Nathanson // Biochemical Society Symposium. – 2003. – Vol. 70. – P. 179–199.

133. Accorsi, A. Comparative analysis of circulating hemocytes of the freshwater snail *Pomacea canaliculata* / A. Accorsi, L. Bucci, M. de Eguileor et al. // Fish & Shellfish Immunology. – 2013. – Vol. 34, No. 5. – P. 1260–1268.

134. Accorsi, A. Effects of repeated hemolymph withdrawals on the hemocyte populations and hematopoiesis in *Pomacea canaliculata* / A. Accorsi, E. Ottaviani, D. Malagoli // Fish & Shellfish Immunology. – 2014. – Vol. 38, No. 1. – P. 56–64.

135. Adamowicz, A. Blood cells morphology of the snail *Helix aspersa maxima* (Helicidae) / A. Adamowicz, M. Bolaczek // Zoologica Poloniae. – 2003. – Vol. 48. – P. 93–101.

136. Adema, C. M. A comparative study of hemocytes from six different snails: morphology and functional aspects / C. M. Adema, R. A. Harris, E. C. van Deutekom Mulder // Journal of Invertebrate Pathology. – 1992. – Vol. 59, No. 1. – P. 24–32.

137. Adema, C. M. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection / C. M. Adema, L. A. Hertel, R. D. Miller et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1997. – Vol. 94, No. 16. – P. 8691–8696.

138. Adema, C. M. Comparative study of cytoplasmic actin DNA sequences from six species of Planorbidae (Gastropoda: Basommatophora) / C. M. Adema // Journal of Molluscan Studies. – 2002. – Vol. 68, No. 1. – P. 17–23.

139. Adema, C. M. Differential transcriptomic responses of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Mollusca) to bacteria and metazoan parasites, *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* (Digenea, Platyhelminthes) / C. M. Adema, P. C. Hanington, C. M. Lun et al. // Molecular Immunology. – 2010. – Vol. 47, No. 4. – P. 849–860.

140. Adema, C. M. Digenean gastropod host associations reveal foundations of specific immunity in snails / C. M. Adema, E. S. Loker // Developmental and Comparative Immunology. – 2015. – Vol. 48, Iss. 2. – P. 275–283.

141. Adema, C. M. Fibrinogen related proteins (FREPs) in mollusks / C. M. Adema // Results and Problems in Cell Differentiation. – 2015. – Vol. 57. – P. 111–129.

142. Adema, C. M. Immunobiology of the relationship of echinostomes with snail intermediate hosts / C. M. Adema, K. K. Sapp, L. A. Hertel et al. // In: B. Fried, T. K. Graczyk (eds.). Echinostomes as Experimental Models for Biological Research. – Dordrecht; Boston; London: Kluwer Academic Publishers, 2000. – P. 149–173.

143. Adema, C. M. Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* haemocytes: the role of oxygen radicals / C. M. Adema, E. C. van Deutekom Mulder, W. P. W. van der Knaap, T. Sminia // Parasitology. – 1994. – Vol. 109, No. 4. – P. 479–485.

144. Adema, C. M. Trematode parasites of *Planorbella trivolvis* snails in Albuquerque, NM / C. M. Adema. – 2021. – [Электронный ресурс] // GenBank: OL944440. – Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OL944440 (дата обращения: 06.02.2026).

145. Adema, C. M. Whole genome analysis of a schistosomiasis transmitting freshwater snail / C. M. Adema, L. W. Hillier, C. S. Jones et al. // Nature Communications. – 2017. – Vol. 8. – Art. 15451.

146. Agersborg, H. P. K. Studies on the effect of parasitism upon the tissues. I. With special reference to certain *gasteropod mollusks* / H. P. K. Agersborg // The Quarterly Journal of Microscopical Science. – 1924. – Vol. 68. – P. 361–401.

147. Ahmad, A. A. New perspectives for fascioliasis in Upper Egypt's new endemic region: Sociodemographic characteristics and phylogenetic analysis of *Fasciola* in humans, animals, and lymnaeid vectors / A. A. Ahmad, H. K. Ramadan, W. A. Hassan et al. // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2022. – Vol. 16, No. 12. – Art. e0011000.

148. Akinwale, O. P. Molecular characterization of *Bulinus snails* –I ntermediate hosts of schistosomes in Ogun State, South West Nigeria / O. P. Akinwale, O. G. Oso, O. T. Salawu et al. // Folia Malacologia. – 2015. – Vol. 23. – P. 1–11.

149. Aksenova, O. An overview of *Radix* species of the Kamchatka Peninsula (Gastropoda: Lymnaeidae) / O. Aksenova, M. Vinarski, I. Bolotov et al. // The Bulletin of the Russian Far East Malacological Society. – 2016. – Vol. 20. – P. 5–27.

150. Aksenova, O. Two *Radix* spp. (Gastropoda: Lymnaeidae) endemic to thermal springs around Lake Baikal represent ecotypes of the widespread *Radix auricularia* / O. Aksenova, M. Vinarski, I. Bolotov et al. // Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. – 2017. – Vol. 55. – P. 298–309.

151. Aksenova, O. V. Species richness, molecular taxonomy and biogeography of the radicine pond snails (Gastropoda: Lymnaeidae) in the Old World / O. V. Aksenova, I. N. Bolotov, M. Y. Gofarov et al. // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8, No. 1. – Art. 11199.

152. Aksenova, O. A new *Radix* species from Qinling Mountains, China (Gastropoda: Lymnaeidae) / O. Aksenova, M. Vinarski, A. Kondakov et al. // Ecologica Montenegrina. – 2019. – Vol. 26. – P. 137–146.

153. Aksenova, O.V. Phylogeny and Taxonomy of the Family Lymnaeidae / O.V. Aksenova, I.N. Bolotov, I.S. Khrebtova et al. // Zoological Monographs. – 2023. – Vol. 7. – P. 67–101.

154. Aksenova, O. Taxonomy and trans-Beringian biogeography of the pond snails (Gastropoda: Lymnaeidae) of East Asia: an integrative view / O. Aksenova, M. Vinarski, T. Itagaki et al. // Zoological Journal of the Linnean Society. – 2024. – Vol. 201.

155. Al-Asadi, S. A. M. Morphological and bioinformatics study for *Radix auricularia* snails in freshwater in Basrah Province, Iraq / S. A. M. Al Asadi // Iraqi Journal of Agricultural Sciences. – 2021. – Vol. 52, No. 1. – P. 146–154.

156. Al-Quraishy, S. A. Development of species specific primers for identification of *Biomphalaria arabica*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni* in Saudi Arabia / S. A. Al-Quraishy, S. M. Bin Dajem, O. M. Mostafa et al. // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2014. – Vol. 21, No. 1. – P. 65–70.

157. Albrecht, C. A molecular phylogeny of Planorboidea (Gastropoda, Pulmonata): Insights from enhanced taxon sampling / C. Albrecht, K. Kuhn, B. Streit // Zoologica Scripta. – 2006. – Vol. 36. – P. 27–39.

158. Allam, B. Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* sp. clams / B. Allam, K. A. Ashton Alcox, S. E. Ford // Developmental and Comparative Immunology. – 2001. – Vol. 25, No. 5–6. – P. 365–375.

159. Allam, B. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs / B. Allam, K. A. Ashton Alcox, S. E. Ford // Fish and Shellfish Immunology. – 2002. – Vol. 13, No. 2. – P. 141–158.

160. Allan, E. Allelic variation in a single genomic region alters the hemolymph proteome in the snail *Biomphalaria glabrata* / E. Allan, L. Yang, J. A. Tennessen, M. S. Blouin // Fish and Shellfish Immunology. – 2019. – Vol. 88. – P. 301–307.

161. Angers, B. The influence of demography, population structure and selection on molecular diversity in the selfing freshwater snail *Biomphalaria pfeifferi* / B. Angers, N. Charbonnel, N. Galtier, P. Jarne // Genetical Research. – 2003. – Vol. 81. – P. 193–204.

162. Armbruster, G. The land snail species of *Cochlicopa* (Gastropoda: Pulmonata: Cochlicopidae): presentation of taxon specific allozyme patterns, and evidence for a high level of self-fertilization / G. Armbruster, M. Schlegel // Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. – 1994. – Vol. 32. – P. 282–296.

163. Armbruster, G. F. J. Conserved sequence patterns in the non-coding ribosomal ITS 1 of distantly related snail taxa / G. F. J. Armbruster, C. H. M. van Moorsel, E. Gittenberger // Journal of Molluscan Studies. – 2000. – Vol. 66. – P. 570–573.

164. Armbruster, G. Taxonomic significance of ribosomal ITS-1 sequence markers in self-fertilizing land snails of *Cochlicopa* (Stylommatophora, Cochlicopidae) / G. Armbruster, D. Bernhard // Zoosystematics and Evolution. – 2008. – Vol. 76. – P. 11–18.

165. Armstrong, P. B. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction / P. B. Armstrong // Immunobiology. – 2006. – Vol. 211, No. 4. – P. 263–281.

166. Ataev, G. L. Comparison of *Echinostoma caproni* mother sporocyst development in vivo and in vitro using *Biomphalaria glabrata* snails and a *B. glabrata* embryonic cell line / G. L. Ataev, A. Fournier, C. Coustau // Journal of Parasitology. – 1998. – Vol. 84, No. 2. – P. 227–235.

167. Ataev, G. L. Cellular response to *Echinostoma caproni* infection in *Biomphalaria glabrata* strains selected for susceptibility/resistance / G. L. Ataev, C. Coustau // Developmental and Comparative Immunology. – 1999. – Vol. 23, No. 3. – P. 187–198.

168. Ataev, G. L. Multiple infection of amber snails *Succinea putris* with sporocysts of *Leucochloridium* spp. (Trematoda) / G. L. Ataev, A. A. Zhukova, A. S. Tokmakova et al. // Parasitology Research. – 2016a. – Vol. 115, No. 10. – P. 3845–3853.

169. Ataev, G. L. The influence of trematode infection on the hemocyte composition in *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) / G. L. Ataev, E. E. Prokhorova, I. V. Kudryavtsev, A. V. Polevshchikov // Invertebrate Survival Journal. – 2016b. – Vol. 13, No. 1. – P. 164–171.

170. Ataev, G. L. Experimental study of the effect of *Echinostoma caproni* metacercariae on the survival of *Biomphalaria pfeifferi* molluscs / G. L. Ataev // Amurian Zoological Journal. – 2023. – Vol. 15, No. 4. – P. 712–723.

171. 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. – 2024a. – Vol. 143, No. 4. – Art. e12443.

172. Ataev, G. L. A malacological study of the Ukok Plateau lakes / G. L. Ataev, R. R. Usmanova, E. E. Prokhorova et al. // Amurian Zoological Journal. – 2024b. – Vol. XVI, No. 3. – P. 633–644.

173. Au, M. F. F. Status quo and future perspectives of molecular and genomic studies on the genus *Biomphalaria*—the intermediate snail host of *Schistosoma mansoni* / M. F. F. Au, G. A. Williams, J. H. L. Hui // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24, No. 5. – Art. 4895.

174. Awati, P. R. A short account of the venous system in *Oncidium verraculatum* (Cuv.) / P. R. Awati // Journal of the University of Bombay. – 1932–1933. – Vol. 1. – P. 62–69.

175. Ayyagari, V. S. Molecular phylogeny and evolution of Pulmonata (Mollusca: Gastropoda) on the basis of mitochondrial (16S, COI) and nuclear markers (18S, 28S): an overview / V. S. Ayyagari, K. Sreerama // Journal of Genetics. – 2020. – Vol. 99, No. 1. – Art. 17.

176. Babiker, H. I. Molecular characterization of *Biomphalaria* spp. (the intermediate hosts of Schistosoma mansoni) in Sudan / H. I. Babiker, A. S. Mohammed, N. M. Gasmalsaeed et al. – 2017. – [Электронный ресурс] // GenBank: KY025444.1–KY025444.1. – Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY025444.1 (дата обращения: 06.02.2026).

177. Bachali, S. Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function / S. Bachali, M. Jager, A. Hassanin et al. // Journal of Molecular Evolution. – 2002. – Vol. 54, No. 5. – P. 652–664.

178. Badie, A. Infection of *Cochlicopa lubrica* Müller by *Dicrocoelium lanceolatum* Rudolphi: some histopathological observations / A. Badie, P. Hourdin, D. Rondelaud // Bulletin de la Société Française de Parasitologie. – 1992. – Vol. 10, No. 1. – P. 51–57.

179. Baecker, R. Die Mikromorphologie von *Helix pomatia* und einigen anderen Stylommatophoren / R. Baecker // Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte, Abteilung III. – 1932. – Vol. 29. – P. 449–585.

180. Baker, E. N. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin / E. N. Baker, H. M. Baker // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2005. – Vol. 62, № 22. – P. 2531–2539.

181. Balashov, I. On the identity of *Pupilla bigranata* populations from Germany and Ukraine (Gastropoda: Pupillidae) / I. Balashov, M. Neiber, K. Bogon, B. Hausdorf // Archiv für Molluskenkunde: International Journal of Malacology. – 2019. – Vol. 148. – P. 1–7.

182. Balkwill, F. R. The cytokine network / F. R. Balkwill, F. Burke // Immunology Today. – 1989. – Vol. 10, No. 9. – P. 299–304.

183. Barbosa, L. Primary culture of the region of the amoebocyte producing organ of the snail *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni* / L. Barbosa, L. M. Silva, P. M. Z. Coelho et al. // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. – 2006. – Vol. 101, No. 6. – P. 639–643.

184. Barcante, T. A. Analysis of circulating haemocytes from *Biomphalaria glabrata* following *Angiostrongylus vasorum* infection using flow cytometry / T. A. Barcante, J. P. Barcante, R. T. Fujiwara, W. S. Lima // Journal of Parasitology Research. – 2012. – Vol. 2012. – Art. 314723.

185. Barfurth, D. Der Kalk in der Leber der Helicinen und seine biologische Bedeutung / D. Barfurth // Zoologischer Anzeiger. – 1881. – Vol. 4. – P. 20–23.

186. Bargues, M. D. European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiases, based on nuclear ribosomal DNA ITS 2 sequences / M. D. Bargues, M. Vigo, P. Horak et al. // Infection, Genetics and Evolution. – 2001. – Vol. 1, No. 2. – P. 85–107.

187. Bargues, M. Ribosomal DNA ITS 1 sequence analysis of European Stagnicoline Lymnaeidae (Gastropoda) / M. Bargues, P. Artigas, M. Jackiewicz et al. // Heldia (Münchner Malakologische Mitteilungen). – 2005. – Vol. 6. – P. 29–40.

188. Bargues, M. D. A new baseline for fascioliasis in Venezuela: Lymnaeid vectors ascertained by DNA sequencing and analysis of their relationships with human and animal infection / M. D. Bargues, L. C. González, P. Artigas, S. Mas Coma // Parasites and Vectors. – 2011. – Vol. 4. – P. 200.

189. Barracco, M. A. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila* / M. A. Barracco, A. A. Steil, R. Garqioni // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. – 1993. – Vol. 88, No. 1. – P. 73–83.

190. Baron, O. L. The LBP/BPI multigenic family in invertebrates: evolutionary history and evidences of specialization in mollusks / O. L. Baron, E. Deleury, J.-M. Reichart, C. Coustau // Developmental and Comparative Immunology. – 2016. – Vol. 57. – P. 20–30.

191. Basch, P. F. Antagonist interaction between strigeid and schistosome sporocysts within a snail host / P. F. Basch, K. J. Lie, D. Heyneman // Journal of Parasitology. – 1969. – Vol. 55, No. 4. – P. 753–758.

192. Basch, P. F. The arterial system of *Biomphalaria glabrata* (Say) / P. F. Basch // Malacologia. – 1969. – Vol. 7, No. 2–3. – P. 169–181.

193. Basith, S. Toll-like receptor modulators: a patent review / S. Basith, B. Manavalan, G. Lee et al. // Expert Opinion on Therapeutic Patents. – 2011. – Vol. 21, No. 6. – P. 927–944.

194. Baur, B. Population structure, density, dispersal and neighbourhood size in *Arianta arbustorum* (Linnaeus, 1758) (Pulmonata: Helicidae) / B. Baur // Annalen des Naturhistorischen Museums Wien. – 1993. – Bd. 94/95B. – P. 307–321.

195. Bayer, F. A. Larval trematodes found in some fresh water snails: a suggested biological method of bilharzia control / F. A. Bayer // Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 1954. – Vol. 48, No. 5. – P. 414–418.

196. Bayne, C. J. In vitro cultivation of cells and a microsporidian parasite of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata: Basommatophora) / C. J. Bayne, A. Owczarzak, W. E. Noonan // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1975. – Vol. 266. – P. 513–527.

197. Bayne, C. J. Molluscan (*Biomphalaria*) cell line: serology, karyotype, behavioral, and enzyme electrophoretic characterization / C. J. Bayne, A. Owczarzak, J. R. Allen // Journal of Invertebrate Pathology. – 1978. – Vol. 32. – P. 35–39.

198. Bayne, C. J. Determinants of compatibility in mollusc–trematode parasitism / C. J. Bayne, T. P. Yoshino // American Zoologist. – 1989. – Vol. 29, No. 2. – P. 399–407.

199. Bayne, C. J. Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival / C. J. Bayne, U. K. Hahn, R. C. Bender // Parasitology. – 2001. – Vol. 123. – Suppl. S. – P. 159–167.

200. Beckage, N. E., ed. Insect immunology / N. E. Beckage. – San Diego, CA: Academic Press/Elsevier, 2008. – 351 p.

201. Beese, K. Bursa tract diverticulum in the hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum* (Stylommatophora: Helicidae): morphology, function, and evolutionary implications / K. Beese, K. Beier, B. Baur // Journal of Morphology. – 2006. – Vol. 267, No. 8. – P. 940–953.

202. Behzadi, P. Toll-Like Receptors: General Molecular and Structural Biology / P. Behzadi, H. A. García-Perdomo, T. M. Karpiński // Journal of Immunology Research. – 2021. – Art. 9914854.

203. Bekius, R. The circulatory system of *Lymnaea stagnalis* (L.) / R. Bekius // Netherlands Journal of Zoology. – 1972. – Vol. 22, No. 1. – P. 1–58.

204. Bender, R. C. Proteinase inhibitory activity in the plasma of a mollusc: evidence for the presence of α-macroglobulin in *Biomphalaria glabrata* / R. C. Bender, S. E. Fryer, C. J. Bayne // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. – 1992. – Vol. 102. – P. 821–824.

205. Berwin, B. Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells / B. Berwin, J. P. Hart, S. Rice et al. // The EMBO Journal. – 2003. – Vol. 22, No. 22. – P. 6127–6136.

206. Bezerra, F. S. M. Quantification of the number and phagocytary activity of hemocytes of resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni* / F. S. M. Bezerra, J. A. Nogueira-Machado, M. M. Chaves et al. // Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. – 1997. – Vol. 39. – P. 197–201.

207. Blanc, G. Insights into how CUB domains can exert specific functions while sharing a common fold: conserved and specific features of the CUB1 domain contribute to the molecular basis of procollagen C-proteinase enhancer-1 activity / G. Blanc, B. Font, D. Eichenberger et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2007. – Vol. 282. – P. 16924–16933.

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

209. Boehm, T. VLR based adaptive immunity / T. Boehm, N. McCurley, Y. Sutoh et al. // Annual Review of Immunology. – 2012. – № 30. – P. 203–220.

210. Boisseaux, P. Analysis of hemocytes in *Lymnaea stagnalis*: characterization and effects of repeated hemolymph collections / P. Boisseaux, M. L. Delignette Muller, K. Abbaci et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2016. – Vol. 57. – P. 116–126.

211. Bolotov, I. Origin of a divergent mtDNA lineage of a freshwater snail species, *Radix balthica*, in Iceland: Cryptic glacial refugia or a postglacial founder event? / I. Bolotov, O. Aksenova, Y. Bespalaya et al. // Hydrobiologia. – 2017. – Vol. 787. – P. 73–98.

212. Bondareva, O. Copse snail *Arianta arbustorum* (Linnaeus, 1758) (Gastropoda: Helicidae) in the Baltic Sea region: invasion or range extension? Insights from phylogeographic analysis and climate niche modeling / O. Bondareva, E. Genelt Yanovskiy, N. Abramson // Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. – 2020. – Vol. 58. – P. 221–229.

213. Botos, I. The structural biology of Toll-like receptors / I. Botos, D. M. Segal, D. R. Davies // Structure. – 2011. – Vol. 19, No. 4. – P. 447–459.

214. Bottke, W. Heterochromatin in a pulmonate snail, *Planorbarius corneus* L. / W. Bottke // Caryologia. – 1982. – Vol. 35. – P. 443–448.

215. Bouchut, A. Compatibility in the *Biomphalaria glabrata/Echinostoma caproni* model: potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach / A. Bouchut, P. E. Sautiere, C. Coustau, G. Mitta // Acta Tropica. – 2006. – Vol. 98. – P. 234–246.

216. Bouckaert, R. BEAST 2.5: an advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis / R. Bouckaert, T. G. Vaughan, J. Barido-Sottani et al.// PLoS Computational Biology. – 2019. – Vol. 15. – P. 1–28.

217. Bouchet, P. Revised Classification, Nomenclator and Typification of Gastropod and Monoplacophoran Families / P. Bouchet, J.-P. Rocroi, B. Hausdorf, A. Kaim, Y. Kano, A. Nützel, P. Parkhaev, M. Schrödl, E. E. Strong // Malacologia. – 2017. – Vol. 61, No. 1–2. – P. 1–526.

218. Bouchet, P. Classification and Nomenclator of Gastropod Families / P. Bouchet, J. P. Rocroi // Malacologia. – 2005. – Vol. 47, No. 1–2. – P. 1–397.

219. Bowell, E. W. On an abnormal specimen of *Cochlicopa lubrica* / E. W. Bowell // Proceedings of the Malacological Society of London. – 1917. – Vol. 12. – P. 312–314.

220. Bowie, A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products / A. Bowie, L. A. O'Neill // Journal of Leukocyte Biology. – 2000. – Vol. 67. – P. 508–514.

221. Bowles, J. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction based RFLP method / J. Bowles, D. P. McManus // Molecular and Biochemical Parasitology. – 1993. – Vol. 57. – P. 231–240.

222. Boyce, K. Identification of a new species of digenean *Notocotylus malhamensis* n. sp. (Digenea: Notocotylidae) from the bank vole (*Myodes glareolus*) and the field vole (*Microtus agrestis*) / K. Boyce, G. Hide, P. S. Craig et al. // Parasitology. – 2012. – Vol. 139. – P. 1630–1639.

223. Brennan, J. J. Evolutionary origins of toll-like receptor signaling / J. J. Brennan // Molecular Biology and Evolution. – 2018. – Vol. 35, No. 7. – P. 1576–1587.

224. Brown, D. S. Freshwater snails of Africa and their medical importance / D. S. Brown. – 2nd ed. – London: Taylor and Francis Ltd, 1994. – 608 p.

225. Brokordt, K. Reproduction immunity trade-off in a mollusk: Hemocyte energy metabolism underlies cellular and molecular immune responses / K. Brokordt, Y. Defranchi, I. Espósito et al. // Frontiers in Physiology. – 2019. – Vol. 10. – Art. 77.

226. Brown, R. Small scale to large scale and back: larval trematodes in *Lymnaea stagnalis* and *Planorbarius corneus* in Central Europe / R. Brown, M. Soldánová, J. Barrett et al. // Parasitology Research. – 2011. – Vol. 108, No. 1. – P. 137–150.

227. Bu, L. Compatibility between snails and schistosomes: insights from new genetic resources, comparative genomics, and genetic mapping / L. Bu, D. Zhong, L. Lu, E. S. an ecosystem engineer / L. X. Paggeot, M. B. DeBiasse, M. Escalona et al. // Communications Biology. – 2022. – Vol. 5, No. 1. – Art. 940.

228. Bu, L. A genome sequence for *Biomphalaria pfeifferi*, the major vector snail for the human-infecting parasite *Schistosoma mansoni* / L. Bu, L. Lu, M. R. Laidemett et al. // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2023. – Vol. 17, No. 3. – Art. e0011208.

229. Buchmann, K. Evolution of innate immunity: clues from invertebrates via fish to mammals / K. Buchmann // Frontiers in Immunology. – 2014. – Vol. 5. – Art. 656.

230. Buck, S. B. Detection of S phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2′-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2′-deoxyuridine antibodies / S. B. Buck, J. Bradford, K. R. Gee et al. // BioTechniques. – 2008. – Vol. 44. – P. 927–929.

231. Buddenborg, S. K. Transcriptomic responses of *Biomphalaria pfeifferi* to *Schistosoma mansoni*: investigation of a neglected African snail that supports more S. mansoni transmission than any other snail species / S. K. Buddenborg et al. // PLOS Neglected Tropical Diseases. – 2017. – Vol. 11, No. 10. – Art. e0005984.

232. Butt, D. Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections / D. Butt, D. Raftos // Developmental and Comparative Immunology. – 2008. – Vol. 32, No. 3. – P. 299–306.

233. Byrd, E. E. Intramolluscan stages of *Dasymetra conferta* Nicoll, 1911 (Trematoda: Plagiorchiidae) / E. E. Byrd, W. P. Maples // Journal of Parasitology. – 1969. – Vol. 55, No. 3. – P. 509–526.

234. Caligaris-Cappio, F. Human B Cell Populations (Chemical Immunology) / F. Caligaris-Cappio, M. Ferrarini. – 1997. – Vol. 67. – S. Karger AG (Switzerland). – P. 103–104.

235. Campbell, G. Molecular evidence supports an African affinity of the Neotropical freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, Say 1818, an intermediate host for *Schistosoma mansoni* / G. Campbell, C. S. Jones, A. E. Lockyeret al. // Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. – 2000. – Vol. 267. – P. 2351–2358.

236. Cappella, P. A novel method based on click chemistry, which overcomes limitations of cell cycle analysis by classical determination of BrdU incorporation, allowing multiplex antibody staining / P. Cappella, F. Gasparri, M. Pulici et al. // Cytometry. Part A. – 2008. – Vol. 73. – P. 626–636.

237. Carriker, M. R. Morphology of the alimentary system of the snail *Lymnaea stagnalis appressa* Say / M. R. Carriker // Transactions of the Wisconsin Academy of Sciences, Arts and Letters. – 1947. – Vol. 38. – P. 1–88.

238. Caruthers, J. M. Helicase structure and mechanism / J. M. Caruthers, D. B. McKay // Current Opinion in Structural Biology. – 2002. – Vol. 12, No. 1. – P. 123–133.

239. Carvalho, S. Genetic variability and molecular identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae) / S. Carvalho et al. // Parasitology. – 2001. – Suppl. – P. S197–S209.

240. Casey, S. P. Use of ITS rDNA for discrimination of European green and brown banded sporocysts within the genus *Leucochloridium* Carus, 1835 (Digenea: Leucochloriidae) / S. P. Casey, T. A. Bakke, P. D. Harris et al. // Systematic Parasitology. – 2003. – Vol. 56, No. 3. – P. 163–168.

241. Castillo, M. G. Surface membrane proteins of *Biomphalaria glabrata* embryonic cells bind fucosyl determinants on the tegumental surface of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts / M. G. Castillo, X. J. Wu, N. Dinguirard et al. // Journal of Parasitology. – 2007. – Vol. 93, No. 4. – P. 832–840.

242. Castillo, M. G. The immune response of cephalopods from head to foot / M. G. Castillo, K. A. Salazar, N. R. Joffe // Fish and Shellfish Immunology. – 2015. – Vol. 46, No. 1. – P. 145–160.

243. Castillo, M. G. *Biomphalaria glabrata* immunity: post genome advances / M. G. Castillo, J. E. Humphries, M. M. Mourao et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2020. – Vol. 104. – Art. 103557.

244. Cavalcanti, M. G. S. Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea* / M. G. S. Cavalcanti, F. C. Filho, A. M. B. Mendonça et al. // Micron. – 2012. – Vol. 43, No. 2–3. – P. 285–291.

245. Chabonnel, N. The influence of mating system, demography, parasites and colonisation on the population structure of *Biomphalaria pfeifferi* in Madagascar / N. Chabonnel, B. Angers, R. Rasatavonjizay et al. // Molecular Ecology. – 2002. – Vol. 11, No. 11. – P. 2213–2228.

246. Chai, L.-Q. Molecular cloning and characterization of a C-type lectin from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* / L.-Q. Chai, Y.-Y. Tian, D.-T. Yang et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2008. – Vol. 32, No. 1. – P. 71–83.

247. Chehrehasa, F. EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system / F. Chehrehasa, A. S. Mackay-Sim, G. A. Mackay // Journal of Neuroscience Methods. – 2009. – Vol. 177. – P. 122–130.

248. Chelikani, P. Diversity of structures and properties among catalases / P. Chelikani, I. Fita, P. C. Loewen // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2004. – Vol. 61, No. 2. – P. 192–208.

249. Chen, H. A novel toll-like receptor from *Crassostrea gigas* is involved in innate immune response to *Vibrio alginolyticus* / H. Chen, X. Cai, R. Li et al. // Infection, Genetics and Evolution. – 2022. – Vol. 97. – Art. 105159.

250. Chen, J. F-type lectin involved in defense against bacterial infection in the pearl oyster (*Pinctada martensii*) / J. Chen, S. Xiao, Z. Yu // Fish and Shellfish Immunology. – 2011. – Vol. 30, No. 2. – P. 750–754.

251. Chen, X. A c-type lectin HcLec1 with dual function of immunology and mineralization from the freshwater oyster (*Hyriopsis cumingii* Lea) / X. Chen, X. Shen, S. Liu et al. // Frontiers in Immunology. – 2025. – Vol. 15. – Art. 1530732.

252. Cheng, T. C. Transplantation immunity in mollusks: the histoincompatibility of *Helisoma duryi normale* with allografts and xenografts / T. C. Cheng, P. C. Galloway // Journal of Invertebrate Pathology. – 1970. – Vol. 15, No. 2. – P. 177–192.

253. Cheng, T. C. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes / T. C. Cheng // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1975. – Vol. 266. – P. 343–379.

254. Cheng, T. C. Hemocytes of *Bulinus truncatus rohlfsi* (Mollusca, Gastropoda) / T. C. Cheng, V. G. Guida // Journal of Invertebrate Pathology. – 1980. – Vol. 35. – P. 158–167.

255. Cheng, T. C. A classification of molluscan haemocytes based on functional evidence / T. C. Cheng // Comparative Pathobiology. – 1984. – Vol. 6. – P. 111–146.

256. Cheng, T. C. Hemocytes: forms and functions / T. C. Cheng // The Eastern Oyster: Factors in Marine Bivalves. – 1996. – Vol. 18. – P. 178–188.

257. Cheng, T. C. Transient cellular reaction in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) to heterotopic isografts / T. C. Cheng, J. Jourdane // Journal of Invertebrate Pathology. – 1987. – Vol. 49. – P. 273–278.

258. Chernin, E. Observations on hearts explanted in vitro from the snail *Australorbis glabratus* / E. Chernin // Journal of Parasitology. – 1963. – Vol. 49. – P. 353–364.

259. Chothia, C. The Molecular Structure of Cell Adhesion Molecules / C. Chothia, E. Y. Jones // Annual Review of Biochemistry. – 1997. – Vol. 66. – P. 823–862.

260. Claessens, F. DNA recognition by nuclear receptors / F. Claessens, D. T. Gewirth // Essays in Biochemistry. – 2004. – Vol. 40. – P. 59–72.

261. Colley, D. G. Human schistosomiasis / D. G. Colley, A. L. Bustinduy, W. E. Secor et al. // The Lancet. – 2014. – Vol. 383, No. 9936. – P. 2253–2264.

262. Collins, A. J. Understanding the role of host hemocytes in a squid/Vibrio symbiosis using transcriptomics and proteomics / A. J. Collins, T. R. Schleicher, B. A. Rader, S. V. Nyholm // Frontiers in Immunology. – 2012. – Vol. 3. – Art. 91.

263. Connors, V. A. In vitro effect of larval *Schistosoma mansoni* excretory–secretory products on phagocytosis stimulated superoxide production in hemocytes from *Biomphalaria glabrata* / V. A. Connors, T. P. Yoshino // Journal of Parasitology. – 1990. – Vol. 76, No. 6. – P. 895–902.

264. Connors, V. A. Identification of *Schistosoma mansoni* sporocyst excretory secretory antioxidant molecule and its effect on superoxide production by *Biomphalaria glabrata* hemocytes / V. A. Connors, M. J. Lodes, T. P. Yoshino // Journal of Invertebrate Pathology. – 1991. – Vol. 58, No. 3. – P. 387–395.

265. Connors, V. A. The schistosome–snail interaction: factors involved in host immunodefense activation and parasite killing in susceptible and resistant *Biomphalaria glabrata* / V. A. Connors // Taxonomy, Ecology and Evolution of Metazoan Parasites / eds. C. Combes, J. Jourdane. – Perpignan: Presses Universitaires de Perpignan, 2003. – P. 203–224.

266. Cooper, E.L. Earthworm immunity / E.L. Cooper // Invertebrate Immunology / eds B. Rincevich, W.E.G. Müller. – Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1996. – P. 10–45.

267. Cooper, M. D. The evolution of adaptive immune systems / M. D. Cooper, M. N. Alder // Cell. – 2006. – Vol. 124, № 4. – P. 815–822.

268. Conte, A. Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes / A. Conte, E. Ottaviani // FEBS Letters. – 1995. – Vol. 365, No. 2–3. – P. 120–124.

269. Correa, A. C. Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis / F. C. Correa, J. S. Escobar, P. Durand et al. // BMC Evolutionary Biology. – 2010. – Vol. 10. – Art. 381.

270. Correa, A. C. Morphological and molecular characterization of Neotropic Lymnaeidae (Gastropoda: Lymnaeoidea), vectors of fasciolosis / A. C. Correa, J. S. Escobar, O. Noya et al. // Infection, Genetics and Evolution. – 2011. – Vol. 11, No. 8. – P. 1978–1988.

271. Costa, M. M. Evidence of high individual diversity on myticin C in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) / M. M. Costa, S. Dios, J. Alonso-Gutierrez et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2009. – Vol. 33, No. 2. – P. 162–170.

272. Costil, K. Comparative life cycle and growth of two freshwater gastropod species, *Planorbarius corneus* (L.) and *Planorbis planorbis* (L.) / K. Costil, J. Daguzan // Malacologia. – 1995. – Vol. 37, No. 1. – P. 53–68.

273. Coustau, C. A novel mechanism of immune memory unveiled at the invertebrate-parasite interface / C. Coustau, J. Kurtz, Y. Moret // Trends in Parasitology. – 2016. – Vol. 32, № 5. – P. 353–355.

274. Coustau, C. Flukes without snails: advances in the in vitro cultivation of intramolluscan stages of trematodes / C. Coustau, T. P. Yoshino // Experimental Parasitology. – 2000. – Vol. 94. – P. 62–66.

275. Cribb, T. H. The digenea / T. H. Cribb, R. A. Bray, D. T. J. Littlewood et al. // Interrelationships of the Platyhelminthes / eds. D. T. J. Littlewood, R. A. Bray. – 1st ed. – London: Taylor and Francis, 2001. – P. 168–185.

276. Cueto, J. A. Multicellular spheroid formation and evolutionary conserved behaviors of apple snail hemocytes in culture / J. A. Cueto, I. A. Vega, A. Castro Vazquez // Fish and Shellfish Immunology. – 2013. – Vol. 34, No. 2. – P. 443–453.

277. Cueto, J. A. Immune defenses of the invasive apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae): phagocytic hemocytes in the circulation and the kidney / J. A. Cueto, C. Rodriguez, I. A. Vega, A. Castro Vazquez // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10, No. 4. – Art. e0123964.

278. Cummins, S. F. Characterization of *Aplysia* enticin and temptin, two novel water-borne protein pheromones that act in concert with attractin to stimulate mate attraction / S. F. Cummins, A. E. Nichols, A. Amare et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – Vol. 279, No. 24. – P. 25614–25622.

279. Curtis, S. K. Responsiveness of the slug (*Limax maximus*) to injections of fluorescein and rhodamine conjugated immunogens / S. K. Curtis, R. R. Cowden // Developmental and Comparative Immunology. – 1978. – Oct. – Vol. 2, № 4. – P. 727–733.

280. Curtis, S. K. Histochemical and ultrastructural features of the aorta of the slug (*Limax maximus*) / S. K. Curtis, R. R. Cowden // Journal of Morphology. – 1979. – Vol. 161, No. 1. – P. 1–21.

281. Cuvier G. Le Règne Animal distribué d'après son organisation… T. 2. Paris: Deterville, 1817. – 460 p. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.biodiversitylibrary.org/item/18030 (дата обращения: 06.02.2026).

282. Daly, N. L. Three-dimensional structure of a cysteine-rich repeat from the low-density lipoprotein receptor / N. L. Daly, M. J. Scanlon, J. T. Djordjevic et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 1995. – Vol. 92, No. 14. – P. 6334–6338.

283. Damian, R. T. Molecular mimicry: Parasite evasion and host defense / R. T. Damian // In: M. B. A. Oldstone (ed.). Molecular Mimicry. Current Topics in Microbiology and Immunology. – Berlin, Heidelberg: Springer, 1989. – Vol. 145. – P. 101–115.

284. Darriba, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing / D. Darriba, G. L. Taboada, R. Doallo et al. // Nature Methods. – 2012. – Vol. 9. – P. 772.

285. Davison, A. Formin Is Associated with Left Right Asymmetry in the Pond Snail and the Frog / A. Davison, G. S. McDowell, J. M. Holden et al. // Current Biology. – 2016. – Vol. 26, No. 5. – P. 654–660.

286. De Araújo, A. DNA barcoding as a valuable tool for delimiting mollusk species of the genus *Biomphalaria* Preston, 1910 (Gastropoda: Planorbidae) / A. de Araújo, O. Dos Carvalho, S. Gava, R. Caldeira // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2023. – Vol. 13. – P. 1167787.

287. De Kock, K. Distribution and habitats of *Biomphalaria pfeifferi*, snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*, in South Africa / K. De Kock, C. Wolmarans, M. Bornman // Water SA. – 2004. – Vol. 30. – P. 29–36.

288. Deininger, M. H. The allograft inflammatory factor-1 family of proteins / M. H. Deininger, R. Meyermann, H. J. Schluesener // FEBS Letters. – 2002. – Vol. 514, No. 2–3. – P. 115–121.

289. DeJong, R. J. Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human blood fluke, *Schistosoma mansoni* / R. J. DeJong, J. A. T. Morgan, W. L. Paraense et al. // Molecular Biology and Evolution. – 2001. – Vol. 18. – P. 2225–2239.

290. Dejong, R. J. Phylogeography of *Biomphalaria glabrata* and *B. pfeifferi*, important intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in the New and Old World tropics / R. J. Dejong, J. A. Morgan, W. D. Wilson et al. // Molecular Ecology. – 2003.– Vol. 12, No. 11. – P. 3041–3056.

291. DeJong, R. J. The mitochondrial genome of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Basommatophora), intermediate host of *Schistosoma mansoni* / R. J. DeJong, A. M. Emery, C. M. Adema // Journal of Parasitology. – 2004. – Vol. 90, No. 5. – P. 991–997.

292. De Jong-Brink, M. How schistosomes profit from the stress responses they elicit in their hosts / M. De Jong-Brink // Advances in Parasitology. – 1995. – Vol. 35. – P. 177–256.

293. Detree, C. Multiple I-type lysozymes in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* and their role in symbiotic plasticity / C. Detree, A. Chabenat, F. H. Lallier et al. // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11, No. 2. – Art. e0148988.

294. DeWaard, J. R. A reference library for Canadian invertebrates with 1.5 million barcodes, voucher specimens, and DNA samples / J. R. deWaard, S. Ratnasingham, E. V. Zakharov et al. // Scientific Data. – 2019. – Vol. 6, No. 1. – Art. 308.

295. Dheilly, N. M. A family of variable immunoglobulin and lectin domain containing molecules in the snail *Biomphalaria glabrata* / N. M. Dheilly, D. Duval, G. Mouahid et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2015. – Vol. 48, No. 1. – P. 234–243.

296. Dikkeboom, R. A comparative study on the internal defence system of juvenile and adult *Lymnaea stagnalis* / R. Dikkeboom, W. P. van der Knaap, E. A. Meuleman, T. Sminia // Immunology. – 1985. – Vol. 55, No. 3. – P. 547–553.

297. Dikkeboom, R. The production of toxic oxygen metabolites by hemocytes of different snail species / R. Dikkeboom, W. P. W. van der Knaap, W. van den Bovenkamp et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 1988. – Vol. 12, No. 3. – P. 509–520.

298. Dinguirard, N. Proteomic analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes during in vitro encapsulation of *Schistosoma mansoni* sporocysts / N. Dinguirard, M. G. S. Cavalcanti, X. J. Wu et al. // Frontiers in Immunology. – 2018. – Vol. 9. – Art. 2773.

299. Dolbeare, F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine. Part II: Oncology, chemotherapy and carcinogenesis / F. Dolbeare // The Histochemical Journal. – 1995. – Vol. 27. – P. 923–964.

300. Donaghy, L. First characterisation of the populations and immune related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the spiny top shell, *Turbo cornutus* / L. Donaghy, H. K. Hong, C. Lambert et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2010. – Vol. 28, No. 1. – P. 87–97.

301. Dong, Y. AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system / Y. Dong, H. E. Taylor, G. Dimopoulos // PLoS Biology. – 2006. – Vol. 4, No. 7. – Art. e229.

302. Doolittle, R. F. A detailed consideration of a principal domain of vertebrate fibrinogen and its relatives / R. F. Doolittle // Protein Science. – 1992. – Vol. 1, No. 12. – P. 1563–1577.

303. Du, X. Metazoan parasites associated with marine mollusks inhabiting the China Seas: a review / X. Du, J. Sun, H. Ju et al. // Frontiers in Marine Science. – 2025. – Vol. 12. – Art. 1488376.

304. Duclermortier, P. *Biomphalaria glabrata* embryonic cells express a protein with a domain homologous to the lectin domain of mammalian selectins / P. Duclermortier, V. Lardans, E. Serra, F. Trottein, C. Dissous // Parasitology Research. – 1999. – Vol. 85. – P. 481–486.

305. Duke-Cohan, J. S. Attractin (DPPT-L), a member of the CUB family of cell adhesion and guidance proteins, is secreted by activated human T lymphocytes and modulates immune cell interactions / J. S. Duke-Cohan, J. Gu, D. F. McLaughlin et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1998. – Vol. 95. – P. 11336–11341.

306. Dupuy, A. G. Integrin-dependent phagocytosis: spreading from microadhesion to new concepts / A. G. Dupuy, E. Caron // Journal of Cell Science. – 2008. – Vol. 121. – P. 1773–1783.

307. Duval, A. The arterial system of six species of terrestrial slug / A. Duval, N. W. Runham // Journal of Molluscan Studies. – 1981. – Vol. 47. – P. 43–52.

308. Dusabe, M. C. Environmental perturbations and anthropogenic disturbances determine mollusc biodiversity of Africa's explosive Lake Kivu / M. C. Dusabe, C. Kalinda, C. Clewing et al. // Journal of Great Lakes Research. – 2024. – Vol. 50. – Art. 102339.

309. Dyachuk, V. A. Hematopoiesis in bivalvia larvae: Cellular origin, differentiation of hemocytes, and neoplasia / V. A. Dyachuk // Developmental and Comparative Immunology. – 2016. – Vol. 65. – P. 253–257.

310. El-Sayed, K. A. A comparative study of haemocytes from resistant and susceptible *Lymnaea natalensis* snails exposed to *Fasciola gigantica* miracidia / K. A. El Sayed, A. H. S. El Din, R. M. Gad EL Karim // Journal of the Egyptian Society of Parasitology. – 2014. – Vol. 44, No. 3. – P. 653–660.

311. Elekes, K. Effect of Ca-free medium on the ultrastructure and excitability of the myocardial cells of the snail, *Helix pomatia* L. / K. Elekes, T. Kiss, K. S. Rózsa // Journal of Molecular and Cellular Cardiology. – 1973. – Vol. 5, No. 2. – P. 133–138.

312. Elston, R. A. Transmission of hemic neoplasia in the bay mussel, *Mytilus edulis*, using whole cells and cell homogenate / R. A. Elston, M. L. Kent, A. S. Drum // Developmental and Comparative Immunology. – 1988. – Vol. 12, No. 4. – P. 719–727.

313. Ertl, N. G. Transcriptome analysis of the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*: Insights into molluscan immunity / N. G. Ertl, W. A. O'Connor, A. Papanicolaou et al. // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, No. 6. – Art. e0156649.

314. Fabrice, A. A simple method to assess in vivo proliferation in lung vasculature with EdU: the case of MMC-induced PVOD in rat / A. Fabrice et al. // Analytical Cellular Pathology (Amsterdam). – 2015. – P. 1–6.

315. Fadilatou Foule, B. Mapping and phylogeny of Biomphalaria snail in the Adamawa Reg ion of Cameroon: A step towards vector control and schistosomiasis elimination / B. Fadilatou Foule, M. C. Tchami Mbagnia, R. I. Kamwa Ngassam et al. // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2025. – Vol. 19, № 6. – Art. e0013265.

316. Faltýnková, A. Larval trematodes (Digenea) of planorbid snails (Gastropoda: Pulmonata) in Central Europe: a survey of species and key to their identification / A. Faltýnková, V. Nasincová, L. Kablásková // Systematic Parasitology. – 2008. – Vol. 69. – P. 155–178.

317. Faltýnková, A. Biodiversity of trematodes in their intermediate mollusc and fish hosts in the freshwater ecosystems of Europe / A. Faltýnková, B. Sures, A. Kostadinova // Systematic Parasitology. – 2016. – Vol. 93, No. 3. – P. 283–293.

318. Farhat, S. Comparative analysis of the *Mercenaria mercenaria* genome provides insights into the diversity of transposable elements and immune molecules in bivalve mollusks / S. Farhat, E. Bonnivard, E. P. Espinosa et al. // BMC Genomics. – 2022. – Vol. 23, No. 1. – P. 1–23

319. Faust, E. C. Pathological changes in the gastropod liver produced by fluke infection / E. C. Faust // The Johns Hopkins Hospital Bulletin. – 1920. – Vol. XXXI, No. 340. – P. 1–16.

320. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap / J. Felsenstein // Evolution. – 1985. – Vol. 39. – P. 783–791.

321. Feng, B. Identification of immune genes of the Agamaki clam (*Sinonovacula constricta*) by sequencing and bioinformatic analysis of ESTs / B. Feng, L. Dong, D. Niu et al. // Marine Biotechnology. – 2010. – Vol. 12. – P. 282–291.

322. Fernandez, J. Nervous system of the snail *Helix aspersa*. II. Fine structure of vascular channels and amebocytes associated with the ganglionic sheath / J. Fernandez // Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie. – 1971. – Vol. 118, No. 4. – P. 512–524.

323. Fernández Robledo, J. A. Protozoan parasites of bivalve molluscs: Literature follows culture / J. A. Fernández Robledo, G. R. Vasta, N. R. Record // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9. – Art. e100872.

324. Ferté, H. Presence of *Trichobilharzia szidati* in *Lymnaea stagnalis* and *T. franki* in *Radix auricularia* in northeastern France: molecular evidence / H. Ferté, J. Depaquit, S. Carré et al. // Parasitology Research. – 2005. – Vol. 95, No. 2. – P. 150–154.

325. Files, V. S. A study of the vector parasite relationships in *Schistosoma mansoni* / V. S. Files // Parasitology. – 1951. – Vol. 41, No. 3–4. – P. 264–269.

326. Files, V. S. A study on the comparative susceptibility of snail vectors to strains of *Schistosoma mansoni* / V. S. Files, E. B. Cram // Journal of Parasitology. – 1949. – Vol. 35. – P. 555–560.

327. Firsanov, D. Rapid detection of γ-H2AX by flow cytometry in cultured mammalian cells / D. Firsanov, L. Solovjeva, O. Lublinskaya et al. // Methods in Molecular Biology. – 2017. – Vol. 1644. – P. 129–138.

328. Fleury, E. Microarray analysis highlights immune response of pacific oysters as a determinant of resistance to summer mortality / E. Fleury, A. Huvet // Marine Biotechnology (New York). – 2012. – Vol. 14. – P. 203–217.

329. Fodor, I. The unlimited potential of the great pond snail, *Lymnaea stagnalis* / I. Fodor et al. // eLife. – 2020. – Vol. 9. – Art. e56962.

330. Ford, C. E. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes / C. E. Ford, J. L. Hamerton // Stain Technology. – 1956. – Vol. 31, No. 6. – P. 247–251.

331. Ford, L. A. Host defense mechanisms of cephalopods / L. A. Ford // Annual Review of Fish Diseases. – 1992. – Vol. 2. – P. 25–41.

332. Fox, D. A. Evidence for oligoclonal B cell expansion in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis / D. A. Fox, B. R. Smith // Annals of the Rheumatic Diseases. – 1986. – Vol. 45. – P. 991–995.

333. Franceschi, C. Cytotoxicity and immunocyte markers in cells from the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda pulmonata): implications for the evolution of natural killer cells / C. Franceschi, A. Cossarizza, D. Monti, E. Ottaviani // European Journal of Immunology. – 1991. – Vol. 21, No. 2. – P. 489–493.

334. Franchini, A. Repair of molluscan tissue injury: role of PDGF and TGF β / A. Franchini, E. Ottaviani // Tissue and Cell. – 2000. – Vol. 32, No. 4. – P. 312–321.

335. Frandsen, F. Studies of the relationships between *Schistosoma* and their intermediate hosts. III. The genus *Biomphalaria* and *Schistosoma mansoni* from Egypt, Kenya, Sudan, Uganda, West Indies (St. Lucia) and Zaire (two different strains, Katanga and Kenshasa) / F. Frandsen // Journal of Helminthology. – 1979. – Vol. 35. – P. 321–348.

336. Friani, G. Destruction of *Schistosoma mansoni* sporocysts in *Biomphalaria glabrata* after phytochemical exposure / G. Friani, V. A. Costa, E. Mota et al. // Anais da Academia Brasileira de Ciências. – 2022. – Vol. 94, No. 2. – Art. e20190676.

337. Fryer, S. E. Inhibition of cysteine proteinase from *Schistosoma mansoni* larvae by alpha-macroglobulin from the plasma of *Biomphalaria glabrata* / S. E. Fryer, R. C. Bender, C. J. Bayne // Journal of Parasitology. – 1996. – Vol. 82, No. 2. – P. 343–347.

338. Fu, L. CD-HIT: accelerated for clustering the next generation sequencing data / L. Fu, B. Niu, Z. Zhu et al. // Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28, No. 23. – P. 3150–3152.

339. Furth, R. van. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells / R. van Furth, Z. A. Cohn, J. G. Hirsch et al. // Bulletin of the World Health Organization. – 1972. – Vol. 46, No. 6. – P. 845–852.

340. Furuta, E. Haemolymph: blood cell morphology and function / E. Furuta, K. Yamaguchi // The Biology of Terrestrial Molluscs / ed. G. M. Barker. – New York: CABI Publishing, 2001. – P. 289–306.

341. Gaitán-Espitia, J. D. The complete mitochondrial genome of the land snail *Cornu aspersum* (Helicidae: Mollusca): intra-specific divergence of protein coding genes and phylogenetic considerations within Euthyneura / J. D. Gaitán Espitia, R. F. Nespolo, J. C. Opazo // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, No. 6. – Art. e67299.

342. Galaktionov, K. V. The Biology and Evolution of Trematodes: An Essay on the Biology, Morphology, Life Cycles, Transmissions, and Evolution of Digenetic Trematodes / K. V. Galaktionov, A. A. Dobrovolskij. – Dordrecht (The Netherlands): Kluwer Academic Publishers, 2003. – 592 p.

343. Galinier, R. *Biomphalysin*, a new β pore forming toxin involved in *Biomphalaria glabrata* immune defense against *Schistosoma mansoni* / R. Galinier, J. Portela, Y. Moné et al. // PLoS Pathogens. – 2013. – Vol. 9, No. 3. – Art. e1003216.

344. Galinier, R. First characterization of viruses from freshwater snails of the genus *Biomphalaria*, the intermediate host of the parasite *Schistosoma mansoni* / R. Galinier, G. Tetreau, A. Portet et al. // Acta Tropica. – 2017. – Vol. 167. – P. 196–203.

345. Ganz, T. The role of antimicrobial peptides in innate immunity / T. Ganz // Integrative and Comparative Biology. – 2003. – Vol. 43, No. 2. – P. 300–304.

346. Garcia, A. B. Involvement of the cytokine MIF in the snail host immune response to the parasite *Schistosoma mansoni* / A. B. Garcia, R. J. Pierce, B. Gourbal et al. // PLoS Pathogens. – 2010. – Vol. 6, No. 9. – Art. e1001115.

347. Gerdol, M. An updated molecular basis for mussel immunity / M. Gerdol, P. Venier // Fish and Shellfish Immunology. – 2015. – Vol. 46, No. 1. – P. 17–38.

348. Gerdol, M. The genome of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* brings new insights on the massive expansion of the C1q gene family in Bivalvia / M. Gerdol, P. Venier, A. Pallavicini // Developmental and Comparative Immunology. – 2015. – Vol. 49, No. 1. – P. 59–71.

349. Gerdol, M. Immunity in molluscs: recognition and effector mechanisms, with a focus on Bivalvia / M. Gerdol, M. Gomez Chiarri, M. G. Castillo et al. // Advances in Comparative Immunology / ed. E. L. Cooper. – Cham: Springer, 2018. – P. 225–341.

350. Gestal, C. MgC1q, a novel C1q-domain-containing protein involved in the immune response of *Mytilus galloprovincialis* / C. Gestal, P. Venier et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2010. – Vol. 34, No. 9. – P. 926–934.

351. Gestal, C. Understanding the cephalopod immune system based on functional and molecular evidence / C. Gestal, S. Castellanos-Martínez // Fish and Shellfish Immunology. – 2015. – Vol. 46, No. 1. – P. 120–130.

352. Gittenberger, E. On Iberian Cochlicopidae and the genus *Cryptazeca* (Gastropoda, Pulmonata) / E. Gittenberger // Zoologische Mededelingen. – 1983. – Vol. 57, No. 23. – P. 301–320.

353. Gittenberger, E. The Pleistocene glaciations and the evolutionary history of the polytypic snail species *Arianta arbustorum* (Gastropoda, Pulmonata, Helicidae) / E. Gittenberger et al. // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2004. – Vol. 30, No. 1. – P. 64–73.

354. Glöer, P. The Freshwater Gastropods of the West Palaearctis. Volume I. Fresh and brackish waters except spring and subterranean snails: identification key, anatomy, ecology, distribution / P. Glöer. 2019. – 399 p.

355. Glöer, P. Tierwelt Deutschlands. Mollusca I – Die Süßwassergastropoden Nord- und Mitteleuropas / P. Glöer. – Bad Kreuznach: Conch Books, 2002. – 327 p.

356. Gong, H. A novel PAN/apple domain-containing protein from *Toxoplasma gondii*: characterization and receptor identification / H. Gong, K. Kobayashi, T. Sugi et al. // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, No. 1. – Art. e30169.

357. Gopalakrishnan, S. Immunomodulation in the marine gastropod *Haliotis diversicolor* exposed to benzo(a)pyrene / S. Gopalakrishnan, H. Thilagam, W. B. Huang, K. J. Wang // Chemosphere. – 2009. – Vol. 75, No. 3. – P. 389–397.

358. Gorbushin, A. A new gene family of single fibrinogen domain lectins in *Mytilus* / A. Gorbushin, N. V. Iakovleva // Fish and Shellfish Immunology. – 2010. – Vol. 30, No. 1. – P. 434–438.

359. Gorbushin, A. Lectin-like molecules in transcriptome of *Littorina littorea* hemocytes / A. Gorbushin, E. Borisova // Developmental and Comparative Immunology. – 2015. – Vol. 48. – P. 210–220.

360. Gorbushin, A. M. Haemogram of *Littorina littorea* / A. M. Gorbushin, N. V. Iakovleva // Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. – 2006. – Vol. 86, No. 5. – P. 1175–1181.

361. Gordy, M. A. The role of fibrinogen-related proteins in the gastropod immune response / M. A. Gordy, E. A. Pila, P. C. Hanington // Fish and Shellfish Immunology. – 2015. – Vol. 46, No. 1. – P. 39–49.

362. Gourbal, B. Polymorphic Mucin Like Proteins in Schistosoma mansoni, a Variable Antigen and a Key Component of the Compatibility Between the Schistosome and Its Snail Host / B. Gourbal, A. Théron, C. Grunau et al. // Results and Problems in Cell Differentiation. – 2015. – Vol. 57. – P. 91–108.

363. Gourbal, B. Innate immune memory: an evolutionary perspective / B. Gourbal, S. Pinaud, G. J. M. Beckers et al. // Immunological Reviews. – 2018. – Vol. 283, No. 1. – P. 21–40.

364. Goveia, C. O. First report of *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda/Planorbidae) in Pará State, Amazon region of Brazil / C. O. Goveia, R. L. Caldeira, R. R. Barata et al. // Experimental Parasitology. – 2023. – Vol. 247. – Art. 108482.

365. Grabherr, M. G. Full length transcriptome assembly from RNA seq data without a reference genome / M. G. Grabherr, B. J. Haas, M. Yassour et al. // Nature Biotechnology. – 2011. – Vol. 29. – P. 644–652.

366. Grandiosa, R. Multi strain probiotics enhance immune responsiveness and alters metabolic profiles in the New Zealand Black Footed Abalone (*Haliotis iris*) / R. Grandiosa, F. Mérien, T. Young et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2018. – Vol. 82. – P. 330–338.

367. Gratzner, H. G. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication / H. G. Gratzner // Science. – 1982. – Vol. 218, No. 4571. – P. 474–475.

368. Graveley, B. R. Mutually exclusive splicing of the insect Dscam pre mRNA directed by competing intronic RNA secondary structures / B. R. Graveley // Cell. – 2005. – Vol. 123. – P. 65–73.

369. Green, T. J. Antiviral immunity in marine molluscs / T. J. Green, D. Raftos, P. Speck, C. Montagnani // Journal of General Virology. – 2015. – Vol. 96, No. 9. – P. 2471–2482.

370. Grewal, P. Parasitism of Molluscs by Nematodes: Types of Associations and Evolutionary Trends / P. Grewal, S. Grewal, L. Tan, B. Adams // Journal of Nematology. – 2003. – Vol. 35. – P. 146–156.

371. Grinchenko, A. V. A novel C1q domain-containing protein isolated from the mollusk *Modiolus kurilensis* recognizing glycans enriched with acidic galactans and mannans / A. V. Grinchenko, A. von Kriegsheim, N. A. Shved et al. // Marine Drugs. – 2021. – Vol. 19, No. 12. – Art. 668.

372. Guarino, S. R. Dissecting the Extracellular Complexity of Neuromuscular Junction Organizers / S. R. Guarino, A. Canciani, F. Forneris // Frontiers in Molecular Biosciences. – 2020. – Vol. 6. – Art. 156.

373. Guerra-Espinosa, C. ICAMs in Immunity, Intercellular Adhesion and Communication / C. Guerra-Espinosa, M. Jiménez-Fernández, F. Sánchez-Madrid, J. M. Serrador // Cells. – 2024. – Vol. 13, No. 4. – Art. 339.

374. Guillou, F. Use of individual polymorphism to validate potential functional markers: Case of a candidate lectin (BgSel) differentially expressed in susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata* / F. Guillou, G. Mitta, C. Dissous et al. // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. – 2004. – Vol. 138, No. 2. – P. 175–181.

375. Guillou, F. Identification and expression of gene transcripts generated during an parasitic response in *Biomphalaria glabrata* / F. Guillou, G. Mitta, R. Galiniera, C. Coustau // Developmental and Comparative Immunology. – 2007. – Vol. 31. – P. 657–671.

376. Guo, P. Dual nature of the adaptive immune system in lampreys / P. Guo, M. Hirano, B. R. Herrin et al. // Nature. – 2009. – Vol. 459, № 7248. – P. 796–801.

377. Gulyaeva, A. A. A nidovirus perspective on SARS-CoV-2 / A. A. Gulyaeva, A. E. Gorbalenya // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2021. – Vol. 538. – P. 24–34.

378. Gust, M. Effects of short term exposure to environmentally relevant concentrations of different pharmaceutical mixtures on the immune response of the pond snail *Lymnaea stagnalis* / M. Gust, M. Fortier, J. Garric et al. // Science of the Total Environment. – 2013. – Vol. 445–446. – P. 210–218.

379. Gutiérrez-Rivera, J. N. Differential expression of serine protease inhibitors 1 and 2 in *Crassostrea corteziensis* and *C. virginica* infected with *Perkinsus marinus* / J. N. Gutiérrez-Rivera, G. F. Arcos-Ortega, A. Luna-González et al. // Diseases of Aquatic Organisms. – 2015. – Vol. 112, No. 3. – P. 185–197.

380. Hahn, U. K. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: Role of reactive oxygen species / U. K. Hahn, R. C. Bender, C. J. Bayne // The Journal of Parasitology. – 2001. – Vol. 87, No. 2. – P. 292–299.

381. Hall, T. A. BioEdit: A user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T. A. Hall // Nucleic Acids Symposium Series. – 1999. – Vol. 41. – P. 95–98.

382. Hambrook, J. R. Immune evasion strategies of schistosomes / J. R. Hambrook, P. C. Hanington // Frontiers in Immunology. – 2021. – Vol. 11. – Art. 624178.

383. Hanelt, B. Comparative ORESTES-sampling of transcriptomes of immune-challenged *Biomphalaria glabrata* snails / B. Hanelt, C. M. Lun, C. M. Adema // Journal of Invertebrate Pathology. – 2008.– Vol. 99, No. 2. – P. 192–203.

384. Hanington, P. C. A somatically diversifyed defense factor, FREP3, is a determinant of snail resistance to *Schistosome* infection / P. C. Hanington, M. A. Forys, E. S. Loker // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2012. – Vol. 6, No. 3. – Art. e1591.

385. Hanington, P. C. Role for a somatically diversified lectin in resistance of an invertebrate to parasite infection / P. C. Hanington, M. A. Forys, J. W. Dragoo et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010b. – Vol. 107, No. 49. – P. 21087–21092.

386. Hanington, P. C. Time series analysis of the transcriptional responses of *Biomphalaria glabrata* throughout the course of intramolluscan development of *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* / P. C. Hanington, C. M. Lun, C. M. Adema, E. S. Loker // International Journal for Parasitology. – 2010a. – Vol. 40, No. 7. – P. 819–831.

387. Hansen, E. L. A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata): establishment and characteristics / E. L. Hansen // Invertebrate Tissue Culture: Research Applications / ed. K. Maramorosch. – New York: Academic Press, 1976. – P. 75–99.

388. Harayashiki, C. A. Y. Multi- and transgenerational effects of environmental chemicals on mollusks: an underexplored experimental design in aquatic (eco)toxicological studies / C. A. Y. Harayashiki et al. // Environmental Pollution. – 2024. – Vol. 351. – Art. 124058.

389. Harris, K. R. The fine structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata* / K. R. Harris // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1975. – Vol. 266. – P. 446–464.

390. Hartmann, S. Modulation of host immune responses by nematode cystatins / S. Hartmann, R. Lucius // International Journal for Parasitology. – 2003. – Vol. 33, No. 11. – P. 1291–1302.

391. Hasegawa, M. Dating of the human ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA / M. Hasegawa, H. Kishino, T. Yano // Journal of Molecular Evolution. – 1985. – Vol. 22. – P. 160–174.

392. Hashimoto, C. The *Toll* gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein / C. Hashimoto, K. L. Hudson, K. V. Anderson // Cell. – 1988. – Vol. 52. – P. 269–279.

393. Heath-Heckman, E. A. C. The occurrence of chitin in the hemocytes of invertebrates / E. A. C. Heath-Heckman, M. J. McFall-Ngai // Zoology. – 2011. – Vol. 114, No. 4. – P. 191–198.

394. Helal, E. G. Analysis of circulating haemocytes from *Biomphalaria alexandrina* following *Schistosoma mansoni* infection using flow cytometry / E. G. Helal, S. M. El Dafrawy, A. H. Mohamed et al. // The Egyptian Journal of Hospital Medicine. – 2014. – Vol. 54. – P. 41–53.

395. Helfrich, P. TreeAnnotator: versatile visual annotation of hierarchical text relations / P. Helfrich, E. Rieb, G. Abrami et al. // Proceedings of the Eleventh International Conference on Language Resources and Evaluation (LREC 2018). – 2018. – P. 1958–1963.

396. Heredi-Szabo, K. Characterization of 5(6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein transport by MRP2 and utilization of this substrate as a fluorescent surrogate for LTC4 / K. Heredi Szabo, E. Kis, E. Molnar et al. // Journal of Biomolecular Screening. – 2008. – Vol. 13, No. 4. – P. 295–301.

397. Hermann, P. M. Epidermal growth factor–dependent enhancement of axonal regeneration in the pond snail *Lymnaea stagnalis*: role of phagocyte survival / P. M. Hermann, J. J. Nicol, G. T. Nagle et al. // Journal of Comparative Neurology. – 2005. – Vol. 492, No. 4. – P. 383–400.

398. Hermann, P. M. RGD dependent mechanisms in the endoneurial phagocyte response and axonal regeneration in the nervous system of the snail *Lymnaea stagnalis* / P. M. Hermann, J. J. Nicol, A. G. M. Bulloch et al. // Journal of Experimental Biology. – 2008. – Vol. 211, No. 4. – P. 491–501.

399. Hernandez, J. D. Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate / J. D. Hernandez, L. G. Baum // Glycobiology. – 2002. – Vol. 12, No. 10. – P. 127R–136R.

400. Hernroth, B. The influence of temperature and dose on antibacterial peptide response against lipopolysaccharide in the blue mussel, *Mytilus edulis* / B. Hernroth // Fish and Shellfish Immunology. – 2003. – Vol. 14. – P. 25–37.

401. Hertel, L. A. Differential expression of FREP genes in two strains of *Biomphalaria glabrata* following exposure to the digenetic trematodes *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* / L. A. Hertel, C. M. Adema, E. S. Loker // Developmental and Comparative Immunology. – 2005. – Vol. 29, No. 4. – P. 295–303.

402. Hildemann, W. H. Phylogeny of immune responsiveness: marine invertebrates / W. H. Hildemann, A. L. Reddy // Federation Proceedings. – 1973. – Vol. 32, No. 12. – P. 2188–2194.

403. Hill, R. B. Heart, circulation and blood cells / R. B. Hill, J. H. Welsh // Physiology of Mollusca / eds. K. M. Wilbur, C. M. Yonge. – New York: Academic Press, 1966. – Vol. II, No. 4. – P. 125–174.

404. Hill, R. B. Introduction: comparative physiology of cardiovascular control / R. B. Hill // Experientia. – 1987. – Vol. 43. – P. 953–956.

405. Holland, B. S. A geographic mosaic of passive dispersal: population structure in the endemic Hawaiian amber snail *Succinea caduca* (Mighels, 1845) / B. S. Holland, R. H. Cowie // Molecular Ecology. – 2007. – Vol. 16, No. 12. – P. 2422–2435.

406. Holmes, S. P. Phenotypic and genotypic population differentiation in the bivalve mollusc *Arctica islandica*: results from RAPD analysis / S. P. Holmes, R. Witbaard, J. van der Meer // Marine Ecology Progress Series. – 2003. – Vol. 254. – P. 163–176.

407. Horák, P. Lectins and saccharides in *Lymnaea stagnalis* hemocyte recognition / P. Horák, R. Deme // Comparative Haematology International. – 1998. – Vol. 8, No. 4. – P. 210–218.

408. Hotez, P. J. Female genital schistosomiasis and HIV/AIDS: reversing the neglect of girls and women / P. J. Hotez, W. Harrison, A. Fenwick et al. // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2019. – Vol. 13, No. 4. – Art. e0007025.

409. Huan, P. Identification of a tyrosinase gene potentially involved in early larval shell biogenesis of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* / P. Huan, G. Liu, H. Wang, B. Liu // Development Genes and Evolution. – 2013. – Vol. 223, No. 6. – P. 389–394.

410. Huang, B. Highly diverse fibrinogen-related proteins in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* / B. Huang, L. Zhang, L. Li et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2015. – Vol. 43, No. 2. – P. 485–490.

411. Huang, B. Characterization of the IRF2 proteins isolated from the deep-sea mussel *Bathymodiolus platifrons* and the shallow-water mussel *Modiolus modiolus* / B. Huang, J. Meng, M. Yang et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2017. – Vol. 71. – P. 82–87.

412. Hubendick, B. Recent *Lymnaeidae*: their variation, morphology, taxonomy, nomenclature, and distribution / B. Hubendick. – Kungl. Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar. – 1951. – Ser. 3. – 223 p.

413. Humbert, E. Refractoriness of host haemocytes to parasite immunosuppressive factors a s a putative resistance mechanism in the *Biomphalaria glabrata–Echinostoma caproni* system / E. Humbert, C. Coustau // Parasitology. – 2001. – Vol. 122. – P. 651–660.

414. Humphries, J. E. Regulation of hydrogen peroxide release in circulating hemocytes of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata* / J. E. Humphries, T. P. Yoshino // Developmental and Comparative Immunology. – 2008. – Vol. 32, No. 5. – P. 554–562.

415. Huňová, K. *Radix* spp.: Identification of trematode intermediate hosts in the Czech Republic / K. Huňová, M. Kašný, V. Hampl et al. // Acta Parasitologica. – 2012. – Vol. 57, No. 3. – P. 273–284.

416. iNaturalist: интернет-платформа для сбора данных о биоразнообразии [Электронный ресурс] / Global Biodiversity Information Facility (GBIF). — URL: https://www.inaturalist.org (дата обращения: 06.02.2026).

417. Inohara, N. ML – a conserved domain involved in innate immunity and lipid metabolism / N. Inohara, G. Nuñez // Trends in Biochemical Sciences. – 2002. – Vol. 27, No. 5. – P. 219–221.

418. Ittiprasert, W. Identification of immediate response genes dominantly expressed in juvenile resistant and susceptible *Biomphalaria glabrata* snails upon exposure to *Schistosoma mansoni* / W. Ittiprasert, A. Miller, J. Myers et al. // Molecular and Biochemical Parasitology. – 2010. – Vol. 169, No. 1. – P. 27–39.

419. Izrailskaia, A. V. Developmental stages of *Notocotylus magniovatus* Yamaguti, 1934, *Catatropis vietnamensis* n. sp., *Pseudocatatropis dvoryadkini* n. sp., and phylogenetic relationships of Notocotylidae Lühe, 1909 / A. V. Izrailskaia, V. V. Besprozvannykh, Y. V. Tatonova et al. // Parasitology Research. – 2019. – Vol. 118, No. 2. – P. 469–481.

420. Janeway, C. A. Jr. Innate immune recognition / C. A. Janeway Jr., R. Medzhitov // Annual Review of Immunology. – 2002. – Vol. 20. – P. 197–216.

421. Jannotti-Passos, L. K. Phylogenetic analysis of *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Mollusca: Gastropoda) / L. K. Jannotti-Passos, J. C. Ruiz, R. L. Caldeira et al. // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. – 2010. – Vol. 105, No. 4. – P. 504–511.

422. Jemaà, M. Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oysters / M. Jemaà, N. Morin, P. Cavelier et al. // Journal of Experimental Biology. – 2014. – Vol. 217, No. 17. – P. 3067–3077.

423. Jeong, K. H. Leukocytes of *Biomphalaria glabrata*: morphology and behavior of granulocytic cell in vitro / K. H. Jeong, D. Heyneman // Journal of Invertebrate Pathology. – 1976. – Vol. 28. – P. 357–362.

424. Jeong, K. H. The ultrastructure of the amebocyte producing organ in *Biomphalaria glabrata* / K. H. Jeong, K. J. Lie, D. Heyneman // Developmental and Comparative Immunology. – 1983. – Vol. 7, No. 2. – P. 217–228.

425. Jia, Z. Comparative study of two single CRD C-type lectins, CgCLec-4 and CgCLec-5, from Pacific oyster *Crassostrea gigas* / Z. Jia, H. Zhang, S. Jiang et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2016. – Vol. 59. – P. 220–232.

426. Jiang, J. Phenoloxidase from the sea cucumber *Apostichopus japonicus*: cDNA cloning, expression and substrate specificity analysis / J. Jiang, Z. Zhou, Y. Dong et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2014. – Vol. 36, No. 2. – P. 344–351.

427. Jiménez Vega, F. Characterisation of a serine proteinase from *Penaeus vannamei* haemocytes / F. Jiménez Vega, F. Vargas Albores, K. Söderhäll // Fish and Shellfish Immunology. – 2005. – Vol. 18, No. 2. – P. 101–108.

428. Jin, M. S. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes / M. S. Jin, J. O. Lee // Immunity. – 2008. – Vol. 29, No. 2. – P. 182–191.

429. Joky, A. Fine structural differences in the amoebocytes of *Biomphalaria glabrata* / A. Joky, M. Matricon Gondran, J. Benex // Developmental and Comparative Immunology. – 1983. – Vol. 7, No. 4. – P. 669–672.

430. Joky, A. Response to the amoebocyte producing organ of sensitized *Biomphalaria glabrata* after exposure to *Echinostoma caproni* miracidia / A. Joky, M. Matricon Gondran, J. Benex // Journal of Invertebrate Pathology. – 1985. – Vol. 45, No. 1. – P. 28–33.

431. Jones, H. The circulatory systems of gastropods and bivalves / H. Jones // The Mollusca. – 1983. – P. 189–238.

432. Jones, H. D. Circulatory pressures in *Helix pomatia* L. / H. D. Jones // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. – 1971. – Vol. 39. – P. 289–295.

433. Jones, P. InterProScan5: genome scale protein function classification / P. Jones, D. Binns, H. Y. Chang et al. // Bioinformatics. – 2014. – Vol. 30, No. 9. – P. 1236–1240.

434. Jørgensen, A. Phylogeny and biogeography of African *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae), with emphasis on endemic species of the great East African lakes / A. Jørgensen, T. H. Kristensen, J. Stothard // Zoological Journal of the Linnean Society. – 2007. – Vol. 151, No. 3. – P. 337–349.

435. Jourdane, J. The two phase recognition process of allografts in a Brazilian strain of *Biomphalaria glabrata* / J. Jourdane, T. C. Cheng // Journal of Invertebrate Pathology. – 1987. – Vol. 49, No. 2. – P. 145–158.

436. Kane, R. A. Molecular characterization of freshwater snails in the genus *Bulinus*: A role for barcodes? / R. A. Kane, J. R. Stothard, A. M. Emery, D. Rollinson // Parasites and Vectors. – 2008. – Vol. 1. – P. 15.

437. Kanzok, S. M. Origin of Toll-like receptor-mediated innate immunity / S. M. Kanzok, N. T. Hoa, M. Bonizzoni et al. // Journal of Molecular Evolution. – 2004. – Vol. 58. – P. 442–448.

438. Kapuscinski, J. DAPI: a DNA specific fluorescent probe / J. Kapuscinski // Biotechnic and Histochemistry. – 1995. – Vol. 70, No. 5. – P. 220–233.

439. Kasibhatla, S. Propidium Iodide (PI) Uptake Assay to Detect Apoptosis / S. Kasibhatla, G. Amarante Mendes, D. Finucane et al. // Cold Spring Harbor Protocols. – 2006.

440. Kerney, M. P. Die Landschnecken Nord- und Mitteleuropas: ein Bestimmungsbuch für Biologen und Naturfreunde / M. P. Kerney, R. A. D. Cameron, J.-H. Jungbluth. – Hamburg; Berlin: Paul Parey, 1983. – 384 p.

441. Kim, D. E. Deficiency in the DNA repair protein ERCC1 triggers a link between senescence and apoptosis in human fibroblasts and mouse skin / D. E. Kim et al. // Aging Cell. – 2019. – Art. e13072.

442. Kim, J. Y. Noble tandem-repeat galectin of Manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni* / J. Y. Kim, Y. M. Kim, S. K. Cho et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2008. – Vol. 32, No. 10. – P. 1131–1141.

443. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences / M. Kimura // Journal of Molecular Evolution. – 1980. – Vol. 16, No. 2. – P. 111–120.

444. Knudsen, B. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the sea-slug, *Aplysia californica*: conservation of the gene order in Euthyneura / B. Knudsen, A. B. Kohn, B. Nahir, C. S. McFadden, L. L. Moroz // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2006. – Vol. 38, No. 2. – P. 459–469.

445. Kodirov, S. A. The neuronal control of cardiac functions in molluscs / S. A. Kodirov // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology. – 2011. – Vol. 160, No. 2. – P. 102–116.

446. Koene, J. M. The genome of the simultaneously hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* reveals an evolutionary expansion of FMRFamide-like receptors / J. M. Koene, D. J. Jackson, Y. Nakadera et al. // Scientific Reports. – 2024. – Vol. 14, No. 1. – Art. 29213.

447. Koester, J. Innervation of the kidney of *Aplysia* by L10, the LUQ cells, and an identified peripheral motoneuron / J. Koester, A. Alevizos // Journal of Neuroscience. – 1989. – Vol. 9, No. 11. – P. 4078–4088.

448. Kohda, D. Solution structure of the link module: a hyaluronan-binding domain involved in extracellular matrix stability and cell migration / D. Kohda, C. J. Morton, A. A. Parkar et al. // Cell. – 1996. – Vol. 86, No. 5. – P. 767–775.

449. Koike, N. Brorin, a novel secreted bone morphogenetic protein antagonist, promotes neurogenesis in mouse neural precursor cells / N. Koike, Y. Kassai, Y. Kouta et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2007. – Vol. 282, No. 21. – P. 15843–15850.

450. Krijgsman, B. J. Contractile and pacemaker mechanisms of the heart of molluscs / B. J. Krijgsman, G. A. Divaris // Biological Reviews. – 1955. – Vol. 30. – P. 1–39.

451. Kristensen, T. K. Molecular characterization of *Biomphalaria* species in Egypt / T. K. Kristensen, F. Yousif, P. Raahauge // Journal of Molluscan Studies. – 1999. – Vol. 65. – P. 133–136.

452. Kron, N. S. In search of the *Aplysia* immunome: an in silico study / N. S. Kron // BMC Genomics. – 2022. – Vol. 23, No. 1. – Art. 543.

453. Kryukova, N. A. The influence of *Plagiorchis mutationis* larval infection on the cellular immune response of the snail host *Lymnaea stagnalis* / N. A. Kryukova, N. I. Yurlova, N. M. Rastyagenko, E. V. Antonova, V. V. Glupov // Journal of Parasitology. – 2014. – Vol. 100, No. 3. – P. 284–287.

454. Kudlai, O. Diversity of *Plagiorchis* (Trematoda: Digenea) in high latitudes: Species composition and snail host spectrum revealed by integrative taxonomy / O. Kudlai, C. Pantoja, K. O'Dwyer et al. // Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. – 2021. – Vol. 59. – Art. 10.1111/jzs.12469.

455. Kumar, H. Pathogen recognition by the innate immune system / H. Kumar, T. Kawai, S. Akira // International Reviews of Immunology. – 2011. – Vol. 30, No. 1. – P. 16–34.

456. Kumar, S. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li et al. // Molecular Biology and Evolution. – 2018. – Vol. 35. – P. 1547–1549.

457. Kurosawa, Y. The immunoglobulin superfamily: Where do invertebrates fit in? / Y. Kurosawa, K. Hashimoto // Invertebrate immune responses. Advances in comparative and environmental physiology / ed. E. L. Cooper. – Berlin; Heidelberg: Springer, 1996. – Vol. 23. – P. 151–184.

458. Lackie, A. M. Invertebrate immunity / A. M. Lackie // Parasitology. – 1980. – Vol. 80. – P. 393–412.

459. Laidemitt, M. R. *Schistosoma mansoni* Vector Snails in Antigua and Montserrat, with Snail-Related Considerations Pertinent to a Declaration of Elimination of Human Schistosomiasis / M. R. Laidemitt, S. K. Buddenborg, L. L. Lewis et al. // The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. – 2020. – Vol. 103, No. 6. – P. 2268–2277.

460. Lan, Y. Hologenome analysis reveals dual symbiosis in the deep-sea hydrothermal vent snail *Gigantopelta aegis* / Y. Lan, J. Sun, C. Chen et al. // Nature Communications. – 2021. – Vol. 12, No. 1. – Art. 1165.

461. Latire, T. Responses of primary cultured haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata* under 10-day exposure to cadmium chloride / T. Latire, C. Le Pabic, E. Mottin et al. // Aquatic Toxicology. – 2012. – Vol. 109. – P. 213–221.

462. Laursen, J. R. *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell line supports in vitro miracidial transformation and early larval development of the deer liver fluke, *Fascioloides magna* / J. R. Laursen, T. P. Yoshino // Parasitology. – 1999. – Vol. 118, Pt. 2. – P. 187–194.

463. Le Pabic, C. Hemocyte morphology and phagocytic activity in the common cuttlefish (*Sepia officinalis*) / C. Le Pabic, D. Goux, M. Guillamin et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2014. – Vol. 40, No. 2. – P. 362–373.

464. Le, S. Q. An improved general amino acid replacement matrix / S. Q. Le, O. Gascuel // Molecular Biology and Evolution. – 2008. – Vol. 25, No. 7. – P. 1307–1320.

465. Leerhoei, F. *Planorbarius corneus* isolate DM683 mitochondrion, partial genome / F. Leerhoei. – 2020. – [Электронный ресурс] // GenBank: MT862415.1. – Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT862415.1 (дата обращения: 06.02.2026).

466. Leigh, J. W. PopART: full feature software for haplotype network construction / J. W. Leigh, D. Bryant // Methods in Ecology and Evolution. – 2015. – Vol. 6. – P. 1110–1116.

467. Lemaitre, B. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults / B. Lemaitre, E. Nicolas, L. Michaut et al. // Cell. – 1996. – Vol. 86. – P. 973–983.

468. Lemmi, C. A. An approach to studying evolution of cellular immunity / C. A. Lemmi, E. L. Cooper, T. C. Moore // Contemporary Topics in Immunobiology / eds. M. G. Hanna, E. L. Cooper. – Boston, MA: Springer, 1974. – P. 109–119.

469. Letunic, I. SMART: recent updates, new developments and status in 2020 / I. Letunic, S. Khedkar, P. Bork // Nucleic Acids Research. – 2021. – Vol. 49, No. 1. – P. 458–460.

470. Leulier, F. Toll-like receptors — taking an evolutionary approach / F. Leulier, B. Lemaitre // Nature Reviews Genetics. – 2008. – Vol. 9, No. 3. – P. 165–178.

471. Levan, A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes / A. Levan, K. Fredga, A. A. Sandberg // Hereditas. – 1964. – Vol. 52. – P. 201–220.

472. Lewis, F. A. The relationship between *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*: genetic and molecular approaches / F. A. Lewis, C. S. Liendo, M. J. Ramirez-Prieto et al. // Parasitology. – 2001. – Vol. 123. – P. 169–179.

473. Le Pabic, C. Hemocyte morphology and phagocytic activity in the common cuttlefish (*Sepia officinalis*) / C. Le Pabic, D. Goux, M. Guillamin et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2014. – Vol. 40, No. 2. – P. 362–373.

474. Li, H. A single-CRD C-type lectin from oyster *Crassostrea gigas* mediates immune recognition and pathogen elimination with a potential role in the activation of complement system / H. Li, H. Zhang, S. Jiang et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2015. – Vol. 44, No. 2. – P. 566–575.

475. Li, H. Coordination of humoral immune factors dictates compatibility between *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata* / H. Li, J. R. Hambrook, E. A. Pila et al. // eLife. – 2020. – Vol. 9. – Art. e51708.

476. Li, H. Single-cell RNA-seq profiling of individual *Biomphalaria glabrata* immune cells with a focus on immunologically relevant transcripts / H. Li, A. A. Gharamah, J. R. Hambrook et al. // Immunogenetics. – 2022. – Vol. 74. – P. 77–98.

477. Li, J. Expression of allograft inflammatory factor 1 (AIF 1) in response to bacterial challenge and tissue injury in the pearl oyster, *Pinctada martensii* / J. Li, J. Chen, Y. Zhang, Z. Yu // Fish and Shellfish Immunology. – 2013. – Vol. 34. No. 1. – P. 365–371.

478. Li, J. Genomic characterization and expression analysis of five novel IL-17 genes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* / J. Li, Y. Zhang, Y. Zhang et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2014. – Vol. 40. – P. 455–465.

479. Li, Y. The hematopoiesis in gill and its role in the immune response of Pacific oyster *Crassostrea gigas* against secondary challenge with *Vibrio splendidus* / Y. Li, X. Song, W. Wang et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2017. – Vol. 71. – P. 59–69.

480. Lie, K. J. The origin of amebocytes in *Biomphalaria glabrata* / K. J. Lie, D. Heyneman, P. Yau // Journal of Parasitology. – 1975. – Vol. 61, No. 3. – P. 574–576.

481. Lie, K. J. Studies on resistance in snails: a specific tissue reaction to *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails / K. J. Lie, D. Heyneman // International Journal for Parasitology. – 1975a. – Vol. 5. – P. 621–625.

482. Lie, K. J. Studies on resistance in snails: specific resistance induced by irradiated miracidia of *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails / K. J. Lie, D. Heyneman // International Journal for Parasitology. – 1975b. – Vol. 5. – P. 627–631.

483. Lie, K. J. Studies on resistance in snails. 3. Tissue reaction to *Echinostoma lindoense* sporocysts in sensitized and resensitized *Biomphalaria glabrata* / K. J. Lie, D. Heyneman // The Journal of Parasitology. – 1976a – Vol. 62, No. 1. – P. 51–58.

484. Lie, K. J. Studies on resistance in snails. 6. Escape of *Echinostoma lindoense* sporocysts from encapsulation in the snail heart and subsequent loss of the host's ability to resist by the same parasite / K. J. Lie, D. Heyneman // The Journal of Parasitology. – 1976b. – Vol. 62, No. 2. – P. 298–302.

485. Lie, K. J. Studies on resistance in snails. 4. Induction of ventricular capsules and changes in the amoebocyte producing organ during sensitization of *Biomphalaria glabrata* snails / K. J. Lie, D. Heyneman, K. H. Jeong // Journal of Parasitology. – 1976. – Vol. 62, No. 2. – P. 286–291.

486. Lin, G. Labeling and tracking of mesenchymal stem cells / G. Lin, Y. Zhang, M. Wang, S. Chen, L. Liu // Cytotherapy. – 2009. – Vol. 11. – P. 864–873.

487. Lin, H. Colony formation by mouse peritoneal exudate cells in vitro / H. Lin, C. C. Stewart // Nature New Biology. – 1973. – Vol. 243. – P. 176–177.

488. Liu, H. Molecular insights of a novel cephalopod toll-like receptor homologue in *Sepiella japonica*, revealing its function under the stress of aquatic pathogenic bacteria / H. Liu, L. Huo, Q. Yu et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2019. – Vol. 90. – P. 297–307.

489. Liu, L. A novel scavenger receptor-cysteine-rich (SRCR) domain containing scavenger receptor identified from mollusk mediated PAMP recognition and binding / L. Liu, J. Yang, L. Qiu et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2011. – Vol. 35, No. 2. – P. 227–239.

490. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // Methods. – 2001. – Vol. 25, No. 4. – P. 402–408.

491. Lockyer, A. E. Trematodes and snails: an intimate association / A. E. Lockyer, C. S. Jones, L. R. Noble, D. Rollinson // Canadian Journal of Zoology. – 2004. – Vol. 82, No. 2. – P. 251–269.

492. Lockyer, A. E. *Biomphalaria glabrata* transcriptome: identification of cell signalling, transcriptional control and immune related genes from open reading frame expressed sequence tags (ORESTES) / A. E. Lockyer, J. N. Spinks, A. J. Walker et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2007. – Vol. 31. – P. 763–782.

493. Lockyer, A. E. *Biomphalaria glabrata* transcriptome: cDNA microarray profiling identifies resistant- and susceptible-specific gene expression in haemocytes from snail strains exposed to *Schistosoma mansoni* / A. E. Lockyer, J. Spinks, R. A. Kane et al. // BMC Genomics. – 2008.– Vol. 9. – P. 634.

494. Lockyer, A. E. Early differential gene expression in haemocytes from resistant and susceptible *Biomphalaria glabrata* strains in response to *Schistosoma mansoni* / A. E. Lockyer, A. M. Emery, R. A. Kane et al. // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, No. 12. – Art. e51102.

495. Lodes, M. J. Characterization of excretory secretory proteins synthesized in vitro by *Schistosoma mansoni* primary sporocysts / M. J. Lodes, T. P. Yoshino // The Journal of Parasitology. – 1989. – Vol. 75, No. 6. – P. 853–862.

496. Lodes, M. J. The effect of schistosome excretory secretory products on *Biomphalaria glabrata* haemocyte motility / M. J. Lodes, T. P. Yoshino // Journal of Invertebrate Pathology. – 1990. – Vol. 56, No. 1. – P. 75–85.

497. Lodes, M. J. Polypeptides synthesized in vitro by *Biomphalaria glabrata* hemocytes bind to *Schistosoma mansoni* primary sporocysts / M. J. Lodes, T. P. Yoshino // Journal of Invertebrate Pathology. – 1994. – Vol. 71, No. 1. – P. 62–72.

498. Loker, E. S. *Echinostoma paraensei*: hemocytes of *Biomphalaria glabrata* as targets of echinostome mediated interference with host resistance to *Schistosoma mansoni* / E. S. Loker, C. J. Bayne, M. A. Yui // Experimental Parasitology. – 1986. – Vol. 62, No. 1. – P. 149–154.

499. Loker, E. S. Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of juveniles of the 10 R2 strain of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) / E. S. Loker, C. J. Bayne, P. M. Buckley, K. T. Kruse // The Journal of Parasitology. – 1982. – Vol. 68, No. 1. – P. 84–94.

500. Loker, E. S. The effect of size of M line *Biomphalaria glabrata* on the course of development of *Echinostoma paraensei* / E. S. Loker, D. F. Cimino, G. A. Stryker et al. // The Journal of Parasitology. – 1987. – Vol. 73, No. 6. – P. 1090–1098.

501. Loker, E. S. Excretory secretory products of *Echinostoma paraensei* sporocysts mediate interference with *Biomphalaria glabrata* hemocyte functions / E. S. Loker, D. F. Cimino, L. A. Hertel // The Journal of Parasitology. – 1992. – Vol. 78, No. 1. – P. 104–115.

502. Loker, E. S. Invertebrate immune systems — not homogeneous, not simple, not well understood / E. S. Loker, C. M. Adema, S.-M. Zhang, T. Kepler // Immunological Reviews. – 2004. – Vol. 198. – P. 10–24.

503. Loker, E. S. Gastropod immunobiology / E. S. Loker // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2010. – Vol. 708. – P. 17–43.

504. Lu, L. Genomic and transcriptional analysis of genes containing fibrinogen and IgSF domains in the schistosome vector *Biomphalaria glabrata*, with emphasis on the differential responses of snails susceptible or resistant to *Schistosoma mansoni* / L. Lu, E. S. Loker, C. M. Adema et al. // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2020. – Vol. 14, No. 10. – Art. e0008780.

505. Lugrin, J. The role of oxidative stress during inflammatory processes / J. Lugrin, N. Rosenblatt-Velin, R. Parapanov, L. Liaudet // Biological Chemistry. – 2014. – Vol. 395, No. 2. – P. 203–230.

506. Luna-Acosta, A. Differential tissue distribution and specificity of phenoloxidases from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* / A. Luna Acosta, H. Thomas Guyon, M. Amari et al. // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. – 2011. – Vol. 159, No. 4. – P. 220–226.

507. Luna-González, A. Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain / A. Luna González, A. N. Maeda Martínez, J. C. Sainz, F. Ascencio Valle // Diseases of Aquatic Organisms. – 2002. – Vol. 49, No. 3. – P. 221–226.

508. Luo, Y. The outcome of phagocytic cell division with infectious cargo depends on single phagosome formation / Y. Luo et al. // PLoS One. – 2008. – Vol. 3. – Art. e3219.

509. Ma, R. Complete mitochondrial genome of Succinea erythrophana / R. Ma, W.-H. Zhang. – 2023. – [Электронный ресурс] // BioProject, GenBank: PRJNA927338. – Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA927338 (дата обращения: 06.02.2026).

510. MacIntyre, A. C. The potential role of lysosomes in tissue distribution of weak bases / A. C. MacIntyre, D. J. Culter // Biopharmaceutics and Drug Disposition. – 1988. – Vol. 9, No. 6. – P. 513–526.

511. Maeda, T. Chloroplast acquisition without the gene transfer in kleptoplastic sea slugs, *Plakobranchus ocellatus* / T. Maeda, S. Takahashi, T. Yoshida et al. // eLife. – 2021. – Vol. 10. – Art. e60176.

512. Mahilini, H. M. Categorization of hemocytes of three gastropod species *Trachea vittata* (Müller), *Pila globosa* (Swainson) and *Indoplanorbis exustus* (Dehays) / H. M. Mahilini, A. Rajendran // Journal of Invertebrate Pathology. – 2008. – Vol. 97, No. 1. – P. 20–26.

513. Mahmoud, A. H. Free radical scavengers in susceptible/resistant *Biomphalaria alexandrina* snails before and after infection / A. H. Mahmoud, M. Z. Rizk // Comparative Biochemistry and Physiology. – 2004. – Vol. 138. – P. 523–553.

514. Malek, E. A. Snail hosts of schistosomiasis and other snail transmitted diseases in tropical America: a manual / E. A. Malek. – World Health Organization Scientific Publications, No. 478. – 1985. – 325 p.

515. Mandujano-Tinoco, E. A. Evolution of Cellular Immunity Effector Cells: Perspective on Cytotoxic and Phagocytic Cellular Lineages / E. A. Mandujano-Tinoco, E. Sultan, A. Ottolenghi, O. Gershoni-Yahalom, B. Rosental // Cells. – 2021. – Vol. 10, № 8. – P. 1853.

516. Marcel, M. Cutadapt removes adapter sequences from high throughput sequencing reads / M. Marcel // EMBnet Journal. – 2011. – Vol. 17. – P. 10–12.

517. Martin, A. W. Some invertebrate myogenic hearts: the hearts of worms and molluscs / A. W. Martin // Heart and Heart like Organs. Vol. 1: Comparative Anatomy and Development / ed. G. H. Borne. – New York: Academic Press, 1980. – P. 1–40.

518. Martin, G. G. Structure and function of haemocytes in two marine gastropods, *Megathura crenulata* and *Aplysia californica* / G. G. Martin, C. T. Oakes, H. R. Tousignant et al. // Journal of Molluscan Studies. – 2007. – Vol. 73. – P. 355–365.

519. Martin, S. K. Phylogeny of *Biomphalaria* / S. K. Martin, D. Rollinson. – 1999. – [Электронный ресурс] // GenBank: AF199106.1–AF199110.1. – Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF199106.1 (дата обращения: 06.02.2026).

520. Martín-Gómez, L. Molecular characterisation of TNF, AIF, dermatopontin and VAMP genes of the flat oyster *Ostrea edulis* and analysis of their modulation by diseases / L. Martín-Gómez, A. Villalba, M. J. Carballal, E. Abollo // Gene. – 2014. – Vol. 533. – P. 208–217.

521. Martins-Souza, R. L. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain / R. L. Martins-Souza, C. A. Pereira, P. M. Z. Coelho, D. Negrão-Corrêa // Parasitology Research. – 2003. – Vol. 91. – P. 500–507.

522. Martins-Souza, R. Differential lectin labelling of circulating hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* resistant or susceptible to *Schistosoma mansoni* infection / R. Martins Souza, C. Pereira, O. M. Filho et al. // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. – 2006. – Vol. 101. – P. 185–192.

523. Martins-Souza, R. L. Flow cytometry analysis of the circulating haemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* following *Schistosoma mansoni* infection / R. L. Martins-Souza, C. A. J. Pereira, P. M. Z. Coelho et al. // Parasitology. – 2009. – Vol. 136, No. 1. – P. 67–76.

524. Matozzo, V. First evidence of cell division in circulating haemocytes from the Manila clam *Tapes philippinarum* / V. Matozzo, M. G. Marin, F. Cima et al. // Cell Biology International. – 2008. – Vol. 32, No. 7. – P. 865–868.

525. Matricon Gondran, M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*: I. Characterization of hemocytes and fixed phagocytes / M. Matricon Gondran, M. Letocart // Journal of Invertebrate Pathology. – 1999. – Vol. 74, No. 3. – P. 224–234.

526. Matzke, M. Über die Trockenheitsresistenz bei *Planorbis planorbis* / M. Matzke // Archiv für Molluskenkunde. – 1959. – Bd. 88. – S. 183.

527. Mažuran, N. Growth and Reproduction of *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758) in Laboratory Conditions / N. Mažuran, G. Kovačević // Croatian Journal of Fisheries. – 2021. – Vol. 79. – P. 111–119.

528. McFall-Ngai, M. The role of the immune system in the initiation and persistence of the *Euprymna scolopes–Vibrio fischeri* symbiosis / M. McFall-Ngai, S. V. Nyholm, M. G. Castillo // Seminars in Immunology. – 2010. – Vol. 22, No. 1. – P. 48–53.

529. McGettrick, A. F. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation / A. F. McGettrick, L. A. O'Neill // Current Opinion in Immunology. – 2010. – Vol. 22, No. 1. – P. 20–27.

530. Medzhitov, R. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition / R. Medzhitov, C. A. Janeway Jr. // Cell. – 1997. – Vol. 91, No. 3. – P. 295–298.

531. Melillo, D. Innate immune memory in invertebrate metazoans: A critical appraisal / D. Melillo, R. Marino, P. Italiani, D. Boraschi // Frontiers in Immunology. – 2018. – Vol. 9. – Art. 1915.

532. Menabit, S. Mitochondrion Planorbarius corneus / S. Menabit. – 2022. – [Электронный ресурс] // GenBank: MW600083.1. – Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW600083.1 (дата обращения: 06.02.2026).

533. Menning, M. A role for the Ankyrin repeat containing protein Ankrd17 in Nod1- and Nod2-mediated inflammatory responses / M. Menning, T. A. Kufer // FEBS Letters. – 2013. – Vol. 587. – P. 2137–2142.

534. Mezhzherin, S. V. The analysis of morphological and genetic variation of the snail, *Lymnaea stagnalis* s. l. (Gastropoda, Lymnaeidae), in Ukraine / S. V. Mezhzherin et al. // Vestnik Zoologii. – 2008. – Vol. 42, No. 4. – P. 339–345.

535. Mitta, G. Mussels defensins are synthesized and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge / G. Mitta, F. Vandenbulcke, F. Hubert, P. Roch // Journal of Cell Science. – 1999. – Vol. 112. – P. 4233–4242.

536. Mitta, G. Gene discovery and expression analysis of immune relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes / G. Mitta, R. Galinier, P. Tisseyre et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2005. – Vol. 29, No. 5. – P. 393–407.

537. Mitta, G. Compatibility polymorphism in snail/schistosome interactions: from field to theory to molecular mechanisms / G. Mitta, C. M. Adema, B. Gourbal et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2012. – Vol. 37, No. 1. – P. 1–8.

538. Mitta, G. The compatibility between *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni*: An increasingly complex puzzle / G. Mitta, B. Gourbal, C. Grunau et al. // Advances in Parasitology. – 2017. – Vol. 97. – P. 111–145.

539. Mizgina, T. O. New L-rhamnose-binding lectin from the bivalve *Glycymeris yessoensis*: Purification, partial structural characterization and antibacterial activity / T. O. Mizgina, I. V. Chikalovets, T. A. Bulanova et al. // Marine Drugs. – 2024. – Vol. 22, No. 1. – Art. 27.

540. Mlcochova, P. A G1-like state allows HIV-1 to bypass SAMHD1 restriction in macrophages / P. Mlcochova, K. A. Sutherland, S. A. Watters et al. // The EMBO Journal. – 2017. – Vol. 36. – P. 604–616.

541. Moné, Y. A large repertoire of parasite epitopes matched by a large repertoire of host immune receptors in an invertebrate host/parasite model / Y. Moné, B. Gourbal, D. Duval et al. // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2010. – Vol. 4, No. 9. – Art. e813.

542. Monteil, J. F. Hemocyte production in trematode infected *Lymnaea truncatula* / J. F. Monteil, M. Matricon-Gondran // Parasitology Research. – 1991. – Vol. 77, No. 6. – P. 491–497.

543. Monteiro, L. B. Using flow cytometry for mitochondrial assays / L. B. Monteiro, G. G. Davanzo, C. F. de Aguiar, P. M. M. Moraes Vieira // MethodsX. – 2020. – Vol. 7. – Art. 100938.

544. Moreira, R. Gene expression profile analysis of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) hemocytes after a *Vibrio alginolyticus* challenge using an immune-enriched oligo-microarray / R. Moreira, M. Milan, P. Balseiro et al. // BMC Genomics. – 2014. – Vol. 15. – Art. 267.

545. Moreira, R. Transcriptomics of in vitro immune stimulated hemocytes from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* using high throughput sequencing / R. Moreira, P. Balseiro, J. V. Planas et al. // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, No. 4. – Art. e35009.

546. Moreira, R. Stimulation of *Mytilus galloprovincialis* hemocytes with different immune challenges induces differential transcriptomic, miRNomic, and functional responses / R. Moreira, A. Romero, M. Rey-Campos et al. // Frontiers in Immunology. – 2020. – Vol. 11. – Art. 606102.

547. Morgan, J. A. A phylogeny of planorbid snails, with implications for the evolution of Schistosoma parasites / J. A. Morgan, R. J. DeJong, Y. Jung et al. // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2002. – Vol. 25, No. 3. – P. 477–488.

548. Mount, A. S. Hemocyte mediated shell mineralization in the Eastern oyster / A. S. Mount, A. P. Wheeler, R. P. Paradkar et al. // Science. – 2004. – Vol. 304, No. 5668. – P. 297–300.

549. Moy, G. W. Bindin genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* / G. W. Moy, V. D. Vacquier // Gene. – 2008. – Vol. 423, No. 2. – P. 215–220.

550. Moy, G. W. Extraordinary intraspecific diversity in oyster sperm bindin / G. W. Moy, S. A. Springer, S. L. Adams et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – Vol. 105, No. 6. – P. 1993–1998.

551. Mrowicki, R. The genome sequence of the Pacific oyster, *Magallana gigas* (Thunberg, 1793) / R. Mrowicki, R. Uhl // Wellcome Open Research. – 2025. – Vol. 9. – P. 284.

552. Murphy, J. E. Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors / J. E. Murphy, P. R. Tedbury, S. Homer-Vanniasinkam et al. // Atherosclerosis. – 2005. – Vol. 182, No. 1. – P. 1–15.

553. Myers, J. Differences in cysteine protease activity in *Schistosoma mansoni* resistant and susceptible *Biomphalaria glabrata* and characterization of the hepatopancreas cathepsin B full length cDNA / J. Myers, W. Ittiprasert, N. Raghavan et al. // The Journal of Parasitology. – 2008. – Vol. 94, No. 3. – P. 659–668.

554. Nakao, M. Distribution records of three species of *Leucochloridium* (Trematoda: Leucochloridiidae) in Japan, with comments on their microtaxonomy and ecology / M. Nakao, M. Sasaki, T. Waki et al. // Parasitology International. – 2019. – Vol. 72. – P. 101936.

555. Natarajan, K. Immunoglobulin superfamily / K. Natarajan, M. G. Mage, D. H. Margulies // Encyclopedia of Life Sciences. – Chichester: Wiley, 2015. – P. 1–7.

556. Nei, M. Molecular evolution and phylogenetics / M. Nei, S. Kumar. – Oxford: Oxford University Press, 2000. – 333 p.

557. Neiber, M. Increasing the number of molecular markers resolves the phylogenetic relationship of *Cepaea vindobonensis* (Pfeiffer 1828) with *Caucasotachea* Boettger 1909 (Gastropoda: Pulmonata: Helicidae) / M. Neiber, C. Sagorny, B. Hausdorf // Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. – 2016. – Vol. 54. No. 1. – P. 40–45.

558. Neiber, M. T. Molecular phylogeny reveals the polyphyly of the snail genus *Cepaea* (Gastropoda: Helicidae) / M. T. Neiber, B. Hausdorf // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2015. – Vol. 93. – P. 143–149.

559. Nekola, J. C. Species assignment in *Pupilla* (Gastropoda: Pulmonata: Pupillidae): Integration of DNA-sequence data and conchology / J. C. Nekola, B. F. Coles, M. Horsák // Journal of Molluscan Studies. – 2015. – Vol. 81. – P. 196–216.

560. Nelson, J. R. Osmoregulated chloride channels in hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*: electrophysiological study / J. R. Nelson, A. B. Smith, C. L. Johnson et al. // PLOS ONE. – 2016. – Vol. 11, No. 8. – Art. e0160678.

561. Netea, M. G. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease / M. G. Netea, L. A. B. Joosten, E. Latz et al. // Science. – 2016. – Vol. 352, No. 6284. – P. aaf1098.

562. Newton, W. L. The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni* / W. L. Newton // The Journal of Parasitology. – 1952. – Vol. 38. – P. 362–366.

563. Newman, P. J. Monocyte phagocytic function during differentiation / P. J. Newman, M. A. Tucci // Journal of Leukocyte Biology. – 1990. – Vol. 48, No. 3. – P. 215–222.

564. Newton, W. L. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus* / W. L. Newton // Experimental Parasitology. – 1953. – Vol. 2. – P. 242–257.

565. Newton, W. L. Albinism in *Australorbis glabratus* / W. L. Newton // Proceedings of the Helminthological Society of Washington. – 1954. – Vol. 21. – P. 72–74.

566. Newton, W. L. The establishment of a strain of *Australorbis glabratus* which combines albinism and high susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* / W. L. Newton // Journal of Parasitology. – 1955. – Vol. 29. – P. 539–544.

567. Noda, S. Effects of infection with *Echinostoma paraensei* on the circulating haemocyte population of the host snail *Biomphalaria glabrata* / S. Noda, E. S. Loker // Parasitology. – 1989. – Vol. 98, Pt 1. – P. 35–41.

568. Nold, R. Die Histologie des Blutgefäßsystems und des Herzens von *Helix pomatia* / R. Nold // Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie. – 1924. – Bd. 123. – S. 373–430.

569. Nong, W. Genome of the ramshorn snail Biomphalaria straminea – an obligate intermediate host of schistosomiasis / W. Nong, Y. Yu, M. E. Aase-Remedios et al. // GigaScience. – 2022. – Vol. 11. – Art. giac037.

570. North, R. J. The fine structure of the myofibers in the heart of the snail *Helix aspersa* / R. J. North // Journal of Ultrastructure Research. – 1963. – Vol. 8. – P. 206–218.

571. Novas, A. Nitric oxide production by haemocytes from *Mytilus galloprovincialis* shows seasonal variations / A. Novas, R. Barcia, J. I. Ramos-Martínez // Fish and Shellfish Immunology. – 2007. – Vol. 23, No. 4. – P. 886–891.

572. Novoa, B. Cellular immunological parameters of the octopus, *Octopus vulgaris* / B. Novoa, C. Tafalla, A. Guerra, A. Figueras // Journal of Shellfish Research. – 2002. – Vol. 21, No. 1. – P. 243–248.

573. O'Ferrall, A. M. Freshwater snail faecal metagenomes reveal environmental reservoirs of antimicrobial resistance genes across two continents / A. M. O'Ferrall, A. Juhász, S. Jones et al. // Microbial Genomics. – 2025. – Vol. 11, No. 8. – Art. 001480.

574. O'Neill, L. A. Mal and MyD88: adapter proteins involved in signal transduction by Toll-like receptors / L. A. O'Neill, A. Dunne, M. Edjeback et al. // Journal of Endotoxin Research. – 2003. – Vol. 9, No. 1. – P. 55–59.

575. Odom, E. W. Characterization of a binary tandem domain F-type lectin from striped bass (*Morone saxatilis*) / E. W. Odom, G. R. Vasta // Journal of Biological Chemistry. – 2006. – Vol. 281, No. 3. – P. 1698–1713.

576. Olafsen, J. A. Roles of lectins in invertebrate humoral defense / J. A. Olafsen // Disease processes of marine bivalve molluscs / ed. W. S. Fisher. – Bethesda: American Fisheries Society, 1988. – (American Fisheries Society Special Publication; Iss. 18). – P. 189–205.

577. Oliveira, A. L. D. Genetic differences between strains of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae) that are susceptible and unsusceptible to schistosomiasis / A. L. D. Oliveira, D. Da Silva, B. C. Manzano et al. // Genetics and Molecular Research. – 2010a. – Vol. 9, no. 3. – P. 1450–1459.

578. Oliveira, A. L. D. Differences in the number of hemocytes in the snail host *Biomphalaria glabrata*, resistant and susceptible to *Schistosoma mansoni* infection / A. L. D. Oliveira, P. M. Levada, E. M. Zanotti Magalhaes et al. // Genetics and Molecular Research. – 2010b. – Vol. 9, No. 4. – P. 2436–2445.

579. Omueti, K. O. The polymorphism P315L of human toll-like receptor 1 impairs innate immune sensing of microbial cell wall components / K. O. Omueti, D. J. Mazur, K. S. Thompson et al. // Journal of Immunology. – 2007. – Vol. 178. – P. 6387–6394.

580. Opiyo, S. Characterization of immunogenic soluble crude proteins from *Biomphalaria pfeifferi* against *Schistosoma mansoni* / S. Opiyo // Journal of Natural Sciences Research. – 2020. – Vol. 10, No. 12. – P. 28–34.

581. Oreste, U. On Origin and Evolution of the Antibody Molecule / U. Oreste, A. Ametrano, M. R. Coscia // Biology (Basel). – 2021. – Vol. 10, No. 2. – Art. 140.

582. 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.

583. Osman, A. Comparative Mitochondrial Genome Analysis of the Intestinal Schistosomiasis Snail Host *Biomphalaria pfeifferi* from Multiple Populations in Gezira State, Sudan / A. Osman, P. S. Andrus, X. Zhu et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Vol. 26, No. 10. – Art. 4756.

584. Ottaviani, E. The blood cells of the freshwater snail *Planorbis corneus* (Gastropoda, Pulmonata) / E. Ottaviani // Developmental and Comparative Immunology. – 1983. – Vol. 7. – P. 209–216.

585. Ottaviani, E. Ultrastructural study of haemocytes of the freshwater snail *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) / E. Ottaviani, A. Franchini // Acta Zoologica. – 1988. – Vol. 69, No. 3. – P. 157–162.

586. Ottaviani, E. Immunodetection of haemocyte subpopulations by N-acetylmuramic acid antibody in *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata) / E. Ottaviani, G. Montagnani // The Histochemical Journal. – 1989. – Vol. 21, No. 11. – P. 675–678.

587. Ottaviani, E. Immunocytochemical evidence of vertebrate bioactive peptide-like molecules in the immuno cell types of the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata) / E. Ottaviani, A. Cossarizza // Elsevier Science Publishers. – 1990. – Vol. 267. – P. 250–252.

588. Ottaviani, E. ACTH-like molecules in gastropod molluscs: a possible role in ancestral immune response and stress / E. Ottaviani, A. Cossarizza, C. Ortolani et al. // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. – 1991. – Vol. 245, No. 1314. – P. 215–218.

589. Ottaviani, E. The immune system of invertebrates: the haemocytes of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* / E. Ottaviani, M. Malagoli, A. Franchini // Developmental and Comparative Immunology. – 1993. – Vol. 17, No. 4. – P. 297–302.

590. Ottaviani, E. Invertebrate humoral factors: cytokines as mediators of cell survival / E. Ottaviani, D. Malagoli, A. Franchini // Progress in Molecular and Subcellular Biology. – 2004. – Vol. 34. – P. 1–25.

591. Ottaviani, E. Immunocyte: The invertebrate counterpart of the vertebrate macrophage / E. Ottaviani // Invertebrate Survival Journal. – 2011. – Vol. 8. – P. 1–4.

592. Outeiro, A. On *Cochlicopa lubrica* (Muller, 1774) and *Cochlicopa lubricella* (Porro, 1837) (Gastropoda: Pulmonata: Cochlicopidae) in the Sierra de O Courel (Lugo, NW Spain) / A. Outeiro, S. Mato, I. Riballo et al. // Veliger. – 1990. – Vol. 33, No. 4. – P. 408–415.

593. Paggeot, L. X. Reference genome for the California ribbed mussel, *Mytilus californianus*, an ecosystem engineer / L. X. Paggeot, M. B. DeBiasse, M. Escalona et al. // Journal of Heredity. – 2022. – Vol. 113, No. 6. – P. 681–688.

594. Palasio, R. Molecular and morphological identification of *Biomphalaria* species from the state of São Paulo, Brazil / R. Palasio, M. Guimarães, F. Ohlweiler, R. Tuan // ZooKeys. – 2017. – No. 668. – P. 11–32.

595. Palasio, R. Diversity of *Biomphalaria* spp. freshwater snails and associated mollusks in areas with schistosomiasis risk, using molecular and spatial analysis tools / R. Palasio, I. Rosa-Xavier, F. Chiaravalloti-Neto, R. Tuan // Biota Neotropica. – 2019. – Vol. 19. – Art. e20190746.

596. Paltser, I. S. First record of Siberian limneid snail *Radix zazurnensis* Mozley, 1934 in the Northern European Russia / I. S. Paltser, O. Aksenova, J. V. Bespalaya et al. – 2014. – [Электронный ресурс] // GenBank: KF918625.1. – Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF918625.1 (дата обращения: 06.02.2026).

597. Pan, C. T. The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus* / C. T. Pan // Bulletin of the Museum of Comparative Zoology, Harvard University. – 1958. – Vol. 119. – P. 237–299.

598. Pan, C. T. The arterial system of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata* / C. T. Pan // Transactions of the American Microscopical Society. – 1971. – Vol. 90, No. 4. – P. 434–440.

599. Pancer, Z. The evolution of adaptive immunity / Z. Pancer, M. D. Cooper // Annual Review of Immunology. – 2006. – Vol. 24. – P. 497–518.

600. Pantoja, C. Diversity of echinostomes (Digenea: Echinostomatidae) in their snail hosts at high latitudes / C. Pantoja, A. Faltýnková, K. O'Dwyer et al. // Parasite. – 2021. – Vol. 28. – Art. 59.

601. Paraense, W. Variations in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni* / W. Paraense, L. Correa // Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. – 1963. – Vol. 5. – P. 15–22.

602. Parisi, M. G. MIF from mussel: coding sequence, phylogeny, polymorphism, 3D model and regulation of expression / M. G. Parisi, M. Toubiana, V. Mangano et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2012. – Vol. 36, No. 4. – P. 688–696.

603. Parmakelis, A. Inference of a radiation in *Mastus* (Gastropoda, Pulmonata, Enidae) on the island of Crete / A. Parmakelis, M. Pfenninger, L. Spanos et al. // Evolution. – 2005. – Vol. 59, No. 5. – P. 991–1005.

604. Parolini, M. Cytotoxicity assessment of four pharmaceutical compounds on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) haemocytes, gill and digestive gland primary cell cultures / M. Parolini, B. Quinn, A. Binelli, A. Provini // Chemosphere. – 2011. – Vol. 84, No. 1. – P. 91–100.

605. Patro, R. Salmon provides fast and bias aware quantification of transcript expression / R. Patro, G. Duggal, M. I. Love et al. // Nature Methods. – 2017. – Vol. 14. – P. 417–419.

606. Peng, M. The temptin gene of the clade Lophotrochozoa is involved in formation of the prismatic layer during biomineralization in molluscs / M. Peng, Z. Liu, Z. Li et al. // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Vol. 188. – P. 800–810.

607. Pereira, C. A. Effect of *Angiostrongylus vasorum* infection on *Biomphalaria tenagophila* susceptibility to *Schistosoma mansoni* / C. A. Pereira, R. L. Martins Souza, P. M. Coelho et al. // Acta Tropica. – 2006. – Vol. 98, No. 3. – P. 224–233.

608. Pereira, C. A. J. The participation of cell free hemolymph of *Biomphalaria tenagophila* in the defense mechanism against *Schistosoma mansoni* sporocysts / C. A. J. Pereira, R. L. Martins Souza, M. C. Santos et al. // Parasite Immunology. – 2008. – Vol. 30. – P. 610–619.

609. Peterson, N. A. Glycotope analysis in miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*: differential expression during the miracidium-to-sporocyst transformation / N. A. Peterson, C. H. Hokke, A. M. Deelder, T. P. Yoshino // International Journal for Parasitology. – 2009. – Vol. 39. – P. 1331–1344.

610. Pfenninger, M. Ecological and morphological differentiation among cryptic evolutionary lineages in freshwater limpets of the nominal form-group *Ancylus fluviatilis* (O. F. Müller, 1774) / M. Pfenninger, S. Staubach, C. Albrecht et al. // Molecular Ecology. – 2003. – Vol. 12, No. 10. – P. 2731–2745.

611. Pichon, R. Single cell RNA sequencing reveals hemocyte heterogeneity in Biomphalaria glabrata: Plasticity over diversity / R. Pichon, S. Pinaud, E. Vignal et al. // Frontiers in Immunology. – 2022. – Vol. 13. – Art. 956871.

612. Picquet, M. The epidemiology of human schistosomiasis in the Senegal river basin / M. Picquet et al. // Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 1996. – Vol. 90, No. 4. – P. 340–346.

613. Pierzynska-Mach, A. Evaluation of Acridine Orange, LysoTracker Red, and Quinacrine as Fluorescent Probes for Long-Term Tracking of Acidic Vesicles / A. Pierzynska-Mach, P. A. Janowski, J. W. Dobrucki // Cytometry. – 2014. – Vol. 85, No. 8. – P. 729–738.

614. Pila, E. A. Haematopoiesis in molluscs: a review of haemocyte development and function in gastropods, cephalopods and bivalves / E. A. Pila, J. T. Sullivan, X. Z. Wu et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2016a. – Vol. 58. – P. 119–128.

615. Pila, E. A. A novel Toll-Like Receptor (TLR) influences compatibility between the gastropod *Biomphalaria glabrata* and the digenean trematode *Schistosoma mansoni* / E. A. Pila, M. Tarrabain, A. L. Kabore, P. C. Hanington // PLoS Pathogens. – 2016b. – Vol. 12, No. 3. – P. 1–23.

616. Pila, E. A. Schistosomiasis from a snail's perspective: advances in snail immunity / E. A. Pila, H. Li, J. R. Hambrook et al. // Trends in Parasitology. – 2017. – Vol. 33, No. 11. – P. 845–857.

617. Pinaud, S. A shift from cellular to humoral responses contributes to innate immune memory in the vector snail *Biomphalaria glabrata* / S. Pinaud, J. Portela, D. Duval et al. // PLoS Pathogens. – 2016. – Vol. 12, No. 1. – Art. e1005361.

618. Pinaud, S. Molecular characterization of immunological memory following homologous or heterologous challenges in the schistosomiasis vector snail, *Biomphalaria glabrata* / S. Pinaud, A. Portet, J. F. Allienne et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2019. – Vol. 92. – P. 238–252.

619. Plam, M. Sympatric *Biomphalaria* species (Gastropoda: Planorbidae) in Lake Albert, Uganda, show homoplasies in shell morphology / M. Plam, A. Jørgensen, T. K. Kristensen, H. Madsen // African Zoology. – 2008. – Vol. 43, No. 1. – P. 34–44.

620. Plows, L. D. Activation of extracellular signal regulated kinase is required for phagocytosis by *Lymnaea stagnalis* haemocytes / L. D. Plows, R. T. Cook, A. J. Davies, A. J. Walker // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Molecular Cell Research. – 2004. – Vol. 1692, No. 1. – P. 25–33.

621. Pogue, A. I. Metal sulfate induced generation of ROS in human brain cells: detection using an isomeric mixture of 5- and 6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (carboxy DCFDA) as a cell permeant tracer / A. I. Pogue, B. M. Jones, S. Bhattacharjee et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2012. – Vol. 13, No. 8. – P. 9615–9626.

622. Pointier, J. P. Biological invasions: the case of planorbid snails / J. P. Pointier, P. David, P. Jarne // Journal of Helminthology. – 2005. – Vol. 79, No. 3. – P. 249–256.

623. Portela, J. Evidence for specific genotype-dependent immune priming in the Lophotrochozoan *Biomphalaria glabrata* snail / J. Portela, D. Duval, A. Rognon et al. // Journal of Innate Immunity. – 2013. – Vol. 5, No. 3. – P. 261–276.

624. Portet, A. BgTEP: an antiprotease involved in innate immune sensing in *Biomphalaria glabrata* / A. Portet, R. Galinier, S. Pinaud et al. // Frontiers in Immunology. – 2018. – Vol. 9. – Art. 1206.

625. Portet, A. Sympatric versus allopatric evolutionary contexts shape differential immune response in *Biomphalaria*/*Schistosoma* interaction / A. Portet, S. Pinaud, C. Chaparro et al. // PLoS Pathogens. – 2019. – Vol. 15, No. 3. – Art. e1007647.

626. Prabhudas, M. Standardizing scavenger receptor nomenclature / M. Prabhudas, D. Bowdish, K. Drickamer et al. // The Journal of Immunology. – 2014. – Vol. 192, No. 5. – P. 1997–2006.

627. PrabhuDas, M. R. A consensus definitive classification of scavenger receptors and their roles in health and disease / M. R. PrabhuDas, C. L. Baldwin, P. L. Bollyky et al. // Journal of Immunology. – 2017 May 15. – Vol. 198, No. 10. – P. 3775–3789.

628. Price, D. A. Comparative aspects of FMRF-amide gene organization in mollusks / D. A. Price, M. I. Greenberg // Netherlands Journal of Zoology. – 1994. – Vol. 44, No. 3–4. – P. 421–431.

629. Priyathilaka, T. T. Transcriptome-wide identification, functional characterization, and expression analysis of two novel invertebrate-type Toll-like receptors from disk abalone (*Haliotis discus discus*) / T. T. Priyathilaka, S. D. N. K. Bathige, S. Lee et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2019. – Vol. 84. – P. 802–815.

630. 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.

631. Prokhorova, E. E. Hemocytes of mollusc *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Pulmonata) / E. E. Prokhorova, M. K. Serebryakova, A. S. Tokmakova, G. L. Ataev // Invertebrate Survival Journal. – 2018. – Vol. 15, No. 1. – P. 346–351.

632. Prokhorova, E. E. RAPD markers for species identification of trematodes from the genus *Leucochloridium* / E. E. Prokhorova, A. A. Zhukova, N. V. Tsymbalenko et al. // Parazitologiya. – 2017. – Vol. 51, No. 4. – P. 339–344.

633. Prowse, R. H. In vitro phagocytosis by amoebocytes from the haemolymph of *Helix aspersa* (Muller). I. Evidence for opsonic factor(s) in serum / R. H. Prowse, N. N. Tait // Immunology. – 1969. – Vol. 17. – P. 437–443.

634. Qiu, L. Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from Zhikong scallop, *Chlamys farreri* / L. Qiu, L. Song, W. Xu et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2007. – Vol. 22, No. 5. – P. 451–466.

635. Rabinovitch, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction / M. Rabinovitch // Trends in Cell Biology. – 1995. – Vol. 5, No. 3. – P. 85–87.

636. Rae, R. Shell encapsulation of parasitic nematodes by *Arianta arbustorum* (Linnaeus, 1758) in the laboratory and in field collections / R. Rae // Journal of Molluscan Studies. – 2017. – Vol. 84. – P. 1–4.

637. Raghavan, N. Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes pre- and post-exposure to miracidia of *Schistosoma mansoni* / N. Raghavan, A. N. Miller, M. Gardner et al. // Molecular and Biochemical Parasitology. – 2003. – Vol. 126, No. 2. – P. 181–191.

638. Raghavan, N. Nimbus (BgI): an active non-LTR retrotransposon of the *Schistosoma mansoni* snail host *Biomphalaria glabrata* / N. Raghavan, H. Tettelin, A. Miller et al. // International Journal for Parasitology. – 2007. – Vol. 37, No. 12. – P. 1307–1318.

639. Ratcliffe, N. A. Invertebrate immunity – a primer for the non specialist / N. A. Ratcliffe // Immunology Letters. – 1985. – Vol. 10, No. 5. – P. 253–270.

640. Ray, M. A comparative analyses of morphological variations, phagocytosis and generation of cytotoxic agents in flow cytometrically isolated hemocytes of Indian molluscs / M. Ray, N. S. Bhunia, A. S. Bhunia et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2013. – Vol. 34, No. 1. – P. 244–253.

641. Razkin, O. Molecular phylogeny of the western Palaearctic Helicoidea (Gastropoda, Stylommatophora) / O. Razkin, B. J. Gómez-Moliner, C. E. Prieto et al. // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2015. – Vol. 83. – P. 99–117.

642. Rebl, A. Toll-like receptor signaling in bony fish / A. Rebl, T. Goldammer, H.-M. Seyfert // Veterinary Immunology and Immunopathology. – 2010. – Vol. 134, No. 3–4. – P. 139–150.

643. Reis e Sousa, C. Dendritic cells in a mature age / C. Reis e Sousa // Nature Reviews Immunology. – 2006. – June. – Vol. 6, № 6. – P. 476–483.

644. Remigio, E. A. Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships / E. A. Remigio, P. D. Hebert // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2003. – Vol. 29, No. 3. – P. 641–647.

645. Rempel, E. M. The complete mitochondrial genome of the file ramshorn snail *Planorbella pilsbryi* (Mollusca: Gastropoda: Hygrophila: Planorbidae) / E. M. Rempel, J. M. Marcus, J. T. Detwiler // Mitochondrial DNA Part B: Resources. – 2021. – Vol. 6, No. 11. – P. 3181–3183.

646. Ren, Q. A novel Toll-like receptor with two TIR domains (HcToll-2) is involved in regulation of antimicrobial peptide gene expression of *Hyriopsis cumingii* / Q. Ren, J. F. Lan, X. Zhong et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2014. – Vol. 45, No. 1. – P. 198–208.

647. Richards, C. S. Genetics of a molluscan vector of schistosomiasis / C. S. Richards // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 806–810.

648. Richards, C. S. Genetic studies on amebocytic accumulations in *Biomphalaria glabrata* / C. S. Richards // Journal of Invertebrate Pathology. – 1980. – Vol. 35. – P. 49–52.

649. Richards, C. S. Influence of snail age on genetic variations in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for infection with *Schistosoma mansoni* / C. S. Richards // Malacologia. – 1984. – Vol. 25. – P. 493–502.

650. Richards, C. S. The genetic variation of compatibility in *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* / C. S. Richards, P. C. Shade // Journal of Parasitology. – 1987. – Vol. 73. – P. 1146–1151.

651. Rivi, V. Quercetin, the new stress buster: investigating the transcriptional and behavioral effects of this flavonoid on multiple stressors using *Lymnaea stagnalis* / V. Rivi et al. // Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology. – 2025. – Vol. 287. – Art. 110053.

652. Roach, J. C. The evolution of vertebrate Toll-like receptors / J. C. Roach, G. Glusman, L. Rowen et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2005. – Vol. 102, No. 27. – P. 9577–9582.

653. Robbins, C. S. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis / C. S. Robbins, I. Hilgendorf, G. F. Weber et al. // Nature Medicine. – 2013. – Vol. 19, No. 9. – P. 1166–1172.

654. Roberts, S. Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure / S. Roberts, Y. Gueguen, J. De Lorgeril, F. Goetz // Developmental and Comparative Immunology. – 2008. – Vol. 32, No. 9. – P. 1099–1104.

655. Robinson, M. D. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data / M. D. Robinson, D. J. McCarthy, G. K. Smyth // Bioinformatics. – 2010. – Vol. 26. – P. 139–140.

656. Rodriguez, C. Assessment of the kidney and lung as immune barriers and hematopoietic sites in the invasive apple snail *Pomacea canaliculata* / C. Rodriguez, G. I. Prieto, I. A. Vega, A. Castro-Vazquez // PeerJ. – 2018. – Vol. 6. – Art. e5789.

657. Robinson-Rechavi, M. The nuclear receptor superfamily / M. Robinson-Rechavi, H. Escriva Garcia, V. Laudet // Journal of Cell Science. – 2003. – Vol. 116, Pt 4. – P. 585–586.

658. Romero, A. Individual sequence variability and functional activities of fibrinogen-related proteins (FREPs) in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) suggest ancient and complex immune recognition models in invertebrates / A. Romero, S. Dios, L. Poisa-Beiro et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2011. – Vol. 35, No. 3. – P. 334–344.

659. Romero, A. Integrated transcriptomic and functional immunological approach for assessing the invasiveness of bivalve alien species / A. Romero, R. Aranguren, R. Moreira et al. // Scientific Reports. – 2019a. – Vol. 9, No. 1. – Art. 19879.

660. Romero, M. R. RNA-seq coupled to proteomic analysis reveals high sperm proteome variation between two closely related marine mussel species / M. R. Romero, A. Pérez Figueroa, M. Carrera et al. // Journal of Proteomics. – 2019b. – Vol. 192. – P. 169–187.

661. Rondelaud, D. Description and characteristics of an amebocytic reaction in *Lymnaea truncatula* Müller infested by *Fasciola hepatica* L. / D. Rondelaud, D. Barthe // Zeitschrift für Parasitenkunde. – 1980. – Vol. 61, No. 2. – P. 187–196.

662. Rondelaud, D. The development of the amoebocyte producing organ in *Lymnaea truncatula* Müller infected by *Fasciola hepatica* L. / D. Rondelaud, D. Barthe // Zeitschrift für Parasitenkunde. – 1981. – Vol. 65, No. 3. – P. 331–341.

663. Rosales, C. Cellular and Molecular Mechanisms of Insect Immunity / C. Rosales // Insect Physiology and Ecology. – 2017. – P. 179–212.

664. Rossaint, J. Role of Platelets in Leukocyte Recruitment and Resolution of Inflammation / J. Rossaint, A. Margraf, A. Zarbock // Frontiers in Immunology. – 2018. – Vol. 9. – Art. 2712.

665. Roth-Walter, F. Principles and Comparative Aspects of Adaptive Immunity / F. Roth-Walter, E. Jensen-Jarolim, H. Stockinger // Comparative Medicine: Anatomy and Physiology / ed. by E. Jensen-Jarolim. – 2013. – Ch. 13.2 – P. 243–263.

666. Rozas, J. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets / J. Rozas, A. Ferrer-Mata, J. C. Sánchez-DelBarrio et al. // Molecular Biology and Evolution. – 2017. – Vol. 34, No. 12. – P. 3299–3302.

667. Rundell, R. J. Molecular phylogeny and biogeography of the endemic Hawaiian Succineidae (Gastropoda: Pulmonata) / R. J. Rundell, B. S. Holland, R. H. Cowie // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2004. – Vol. 31, No. 1. – P. 246–255.

668. Ruta, K. The genome sequence of the pond mud snail, *Omphiscola glabra* (O. F. Müller, 1774) / K. Ruta, H. Taylor // Wellcome Open Research. – 2025. – Vol. 10. – P. 261.

669. Saadi, A. J. Molecular phylogeny of freshwater snails and limpets (Panpulmonata: Hygrophila) / A. J. Saadi, A. Davison, C. M. Wade // Zoological Journal of the Linnean Society. – 2020. – Vol. 190. – P. 518–531.

670. Saadi, A. J. Resolving the basal divisions in the stylommatophoran land snails and slugs with special emphasis on the position of the Scolodontidae / A. J. Saadi, C. M. Wade // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2019. – Vol. 139. – Art. 106529.

671. Saco, A. Transcriptomic response of mussel gills after a *Vibrio splendidus* infection demonstrates their role in the immune response / A. Saco, M. Rey-Campos, B. Novoa, A. Figueras // Frontiers in Immunology. – 2020. – Vol. 11. – Art. 615580.

672. Saco, A. Bivalves present the largest and most diversified repertoire of Toll-like receptors in the animal kingdom, suggesting broad-spectrum pathogen recognition in marine waters / A. Saco, B. Novoa, S. Greco et al. // Molecular Biology and Evolution. – 2023. – Vol. 40, No. 6. – Art. msad133.

673. Saito, T. A comprehensive phylogeography of the widespread pond snail genus *Radix* revealed restricted colonization due to niche conservatism / T. Saito, T. Hirano, B. Ye et al. // Ecology and Evolution. – 2021. – Vol. 11, No. 24. – P. 18446–18459.

674. Salamat, Z. In vitro mitotic responses of the amebocyte producing organ of *Biomphalaria glabrata* to extracts of *Schistosoma mansoni* / Z. Salamat, J. T. Sullivan // Journal of Parasitology. – 2008. – Vol. 94, No. 5. – P. 1170–1173.

675. Salamat, Z. Involvement of protein kinase C signalling and mitogen activated protein kinase in the amebocyte producing organ of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) / Z. Salamat, J. Sullivan // Developmental and Comparative Immunology. – 2009. – Vol. 33, No. 6. – P. 725–727.

676. Salic, A. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo / A. Salic, T. J. Mitchison // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2008. – Vol. 105. – P. 2415–2420.

677. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. – Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 479 p.

678. Santama, N. Post-translational processing of the alternative neuropeptide precursor encoded by the FMRFamide gene in the pulmonate snail *Lymnaea stagnalis* / N. Santama, K. W. Li, W. P. M. Geraerts et al. // European Journal of Neuroscience. – 1996. – Vol. 8, No. 5. – P. 968–977.

679. Sarkar, S. DNA interstrand crosslink repair during G1 involves nucleotide excision repair and DNA polymerase zeta / S. Sarkar, A. A. Davies, H. D. Ulrich et al. // The EMBO Journal. – 2006. – Vol. 25, No. 6. – P. 1285–1294.

680. Sasaki, Y. Comparative studies on the internal defense system of schistosome resistant and susceptible amphibious snail *Oncomelania nosophora*: 1. Comparative morphological and functional studies on hemocytes from both snails / Y. Sasaki, E. Furuta, M. Kirinoki et al. // Zoological Science. – 2003. – Vol. 20, No. 10. – P. 1215–1222.

681. Sathyan, N. Identification and molecular characterization of molluskin, a histone H2A-derived antimicrobial peptide from molluscs / N. Sathyan, R. Philip, E. R. Chaithanaya et al. // ISRN Molecular Biology. – 2012. – Art. 219656.

682. Schell, S. C. The life history of *Haematoloechus breviplexus* Stafford, 1902 (Trematoda: Haplometridae McMullen, 1937) with emphasis on the development of the sporocysts / S. C. Schell // Journal of Parasitology. – 1965. – Vol. 51, No. 4. – P. 587–593.

683. Schrödl, M. A review on deep molluscan phylogeny: old markers, integrative approaches, persistent problems / M. Schrödl, I. Stöger // Journal of Natural History. – 2014. – Vol. 48, no. 45–48. – P. 2773–2804.

684. Schileyko, A. A. Family *Helicidae* excluding *Helicinae* (Gastropoda Pulmonata): morphology, taxonomy, and a catalogue of taxa / A. A. Schileyko // Ruthenica. – 2013. – Vol. 23, No. 2. – P. 127–162.

685. Schipp, R. General morphological and functional characteristics of the cephalopod circulatory system. An introduction / R. Schipp // Experientia. – 1987. – Vol. 43. – P. 474–477.

686. Schmitt, P. Molecular diversity of antimicrobial effectors in the oyster *Crassostrea gigas* / P. Schmitt, Y. Gueguen, E. Desmarais et al. // BMC Evolutionary Biology. – 2010. – Vol. 10. – Art. 23.

687. Schmucker, D. Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity / D. Schmucker, J. C. Clemens, H. Shu et al. // Cell. – 2000. – Vol. 101. – P. 671–684.

688. Schniebs, K. A molecular genetic evidence of the occurrence of the freshwater snail *Radix lagotis* (Schrank, 1803) (Gastropoda: Lymnaeidae) in Bulgaria / K. Schniebs, D. Georgiev, P. Glöer et al. // Ecologica Montenegrina. – 2015. – Vol. 3. – P. 29–39.

689. Schniebs, K. Intraspecific morphological and genetic variability in the Palearctic freshwater snail *Radix ampla* (Hartmann, 1821) (Gastropoda: Basommatophora: Lymnaeidae) / K. Schniebs, P. Glöer, M. Vinarski, A. Hundsdoerfer // Journal of Conchology. – 2019. – Vol. 43. – P. 245–267.

690. Schols, R. Expanding the swimmer's itch pool of the Benelux: a first record of the neurotropic *Trichobilharzia regenti* and potential link to human infection / R. Schols, N. Smitz, A. Vanderheyden, T. Huyse // Parasites and Vectors. – 2024. – Vol. 17, No. 1. – P. 126.

691. Schreiber, F. G. Experimental infections of the snail *Australorbis glabratus* with the trematode *Schistosoma mansoni* and the production of cercaria / F. G. Schreiber, M. Schubert // Journal of Parasitology. – 1949. – Vol. 35. – P. 91–100.

692. Schultz, J. A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota / J. Schultz et al. // RNA. – 2005. – Vol. 11, No. 4. – P. 361–364.

693. Schultz, J. H. Comparative immunogenomics of molluscs / J. H. Schultz, C. M. Adema // Developmental and Comparative Immunology. – 2017a. – Vol. 75. – P. 3–15.

694. Schultz, J. H. Parasites associated with freshwater snails collected in Albuquerque / J. H. Schultz, C. M. Adema. – 2017b. – [Электронный ресурс] // GenBank: KY319368.1. – Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY319368.1 (дата обращения: 06.02.2026).

695. Schultz, J. H. Comparative immunological study of the snail *Physella acuta* (Hygrophila, Pulmonata) reveals shared and unique aspects of gastropod immunobiology / J. H. Schultz, L. Bu, C. M. Adema // Molecular Immunology. – 2018. – Vol. 101. – P. 108–119.

696. Schultz, J. H. RNA-seq: the early response of the snail *Physella acuta* to the digenetic trematode *Echinostoma paraensei* / J. H. Schultz, L. Bu, B. Kamel, C. M. Adema // Journal of Parasitology. – 2020. – Vol. 106. – P. 490–505.

697. Schumacher, C. The SCAN domain mediates selective oligomerization / C. Schumacher, H. Wang, C. Honer et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – Vol. 275, No. 22. – P. 17173–17179.

698. Schüpbach, H. U. Parasitic mites influence fitness components of their host, the land snail *Arianta arbustorum* / H. U. Schüpbach, B. Baur // Invertebrate Biology. – 2008. – Vol. 127. – P. 350–356.

699. Schüpbach, H. U. Within- and among family variation in parasite load and parasite induced mortality in the land snail *Arianta arbustorum*, a host of parasitic mites / H. U. Schüpbach, B. Baur // Journal of Parasitology. – 2010. – Vol. 96, No. 4. – P. 830–832.

700. Seppälä, O. Activation of the immune defence of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* by different immune elicitors / O. Seppälä, K. Leicht // Journal of Experimental Biology. – 2013. – Vol. 216. – P. 2902–2907.

701. Seppälä, O. Transcriptome profiling of *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda) for ecoimmunological research / O. Seppälä, J. C. Walser, T. Cereghetti et al. // BMC Genomics. – 2021. – Vol. 22, No. 1. – Art. 144.

702. Seppey, M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness / M. Seppey, M. Manni, E. M. Zdobnov // Methods in Molecular Biology. – 2019. – P. 227–245.

703. 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.

704. Shabelnikov, S. V. Injury affects coelomic fluid proteome of the common starfish, *Asterias rubens* / S. V. Shabelnikov, D. E. Bobkov, N. S. Sharlaimova, O. A. Petukhova // Journal of Experimental Biology. – 2019. – Vol. 222. – Art. jeb198556.

705. Siju, S. J. Direct Submission: mitochondrion Radix auricularia / S. J. Siju, S. Sudhagar, P. P. Sengupta et al. – 2019. – [Электронный ресурс] // GenBank: MK779205.1. – Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MK779205.1 (дата обращения: 06.02.2026).

706. Skála, V. Influence of *Trichobilharzia regenti* (Digenea: Schistosomatidae) on the defence activity of *Radix lagotis* (Lymnaeidae) haemocytes / V. Skála et al. // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, No. 11. – Art. e111696.

707. Skorping, A. Density dependent effects in a parasitic nematode, Elaphostrongylus rangiferi, in the snail intermediate host / A. Skorping // Oecologia. – 1984. – Vol. 64. – P. 34–40.

708. Slapcinsky, J. Myanmar Terrestrial Invertebrates / J. Slapcinsky, D. Mulcahy. – 2017. – [Электронный ресурс] // GenBank: PRJNA400166. – Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA400166 (дата обращения: 06.02.2026).

709. Sleem, S. H. Application of RAPD PCR in taxonomy of certain freshwater bivalves of genus *Caelatura* / S. H. Sleem, T. G. Ali // Global Journal of Molecular Sciences. – 2008. – Vol. 3, № 1. – P. 27–31.

710. Sminia, T. Structure and function of blood and connective tissue cells of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry / T. Sminia // Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie. – 1972. – Vol. 130, No. 4. – P. 497–526.

711. Sminia, T. Histological and ultrastructural observations on wound healing in the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* / T. Sminia, K. Pietersma, J. E. Scheerboom // Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie. – 1973. – Vol. 141, No. 4. – P. 562–573.

712. Sminia, T. A comparative morphological and enzyme histochemical study on blood cells of the freshwater snails *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata*, and *Bulinus truncatus* / T. Sminia, L. Barendsen // Journal of Morphology. – 1980a. – Vol. 165, No. 1. – P. 31–39.

713. Sminia, T. The immune response of the snail *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection / T. Sminia, R. Barendsen // Developmental and Comparative Immunology. – 1980b. – Vol. 4, no. 3. – P. 467–476.

714. Sminia, T. Haematopoiesis in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and autoradiography / T. Sminia // Cell and Tissue Research. – 1974. – Vol. 150, No. 4. – P. 443–454.

715. Sminia, T. Gastropods / T. Sminia // Invertebrate blood cells / eds. N. A. Ratcliffe, A. F. Rowley. – London: Academic Press, 1981. – Vol. 1. – P. 191–232.

716. Sminia, T. Blood cell types and blood cell formation in gastropod molluscs / T. Sminia, W. P. W. van der Knaap, L. A. van Asselt // Developmental and Comparative Immunology. – 1983. – Vol. 7, No. 4. – P. 665–668.

717. Smith, M. PIWI silencing mechanism involving the retrotransposon nimbus orchestrates resistance to infection with *Schistosoma mansoni* in the snail vector, *Biomphalaria glabrata* / M. Smith, S. Yadav, O. G. Fagunloye et al. // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2021. – Vol. 15. – Art. e0009094.

718. Smith, P. J. S. Molluscan circulation: haemodynamics and the heart / P. J. S. Smith // Circulation, respiration, and metabolism: proceedings in life sciences / ed. R. Gilles. – Berlin, Heidelberg: Springer, 1985. – P. 273–286.

719. Smith-Unna, R. TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies / R. Smith-Unna, C. Boursnell, R. Patro et al. // Genome Research. – 2016. – Vol. 26, No. 8. – P. 1134–1144.

720. Smolowitz, R. M. Ontogeny of leukemic cells of the soft shell clam / R. M. Smolowitz, D. Miosky, C. L. Reinisch // Journal of Invertebrate Pathology. – 1989. – Vol. 53, No. 1. – P. 41–51.

721. Söderhäll, K. (ed.). Invertebrate immunity / K. Söderhäll. – Berlin: Springer Verlag, 2010. – 234 p.

722. Sokolow, S. H. Global assessment of schistosomiasis control over the past century shows targeting the snail intermediate host works best / S. H. Sokolow, C. L. Wood, I. J. Jones et al. // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2016. – Vol. 10, No. 7. – Art. e0004794.

723. Soneson, C. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences / C. Soneson, M. I. Love, M. D. Robinson // F1000Research. – 2015. – Vol. 4. – P. 1521.

724. Song, L. Bivalve immunity / L. Song, L. Wang, L. Qiu, H. Zhang // Invertebrate immunity / ed. K. Söderhäll. – New York: Springer, 2010. – P. 44–65.

725. Souza, S. S. On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes / S. S. Souza, Z. A. Andrade // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. – 2006. – Vol. 101, Suppl. 1. – P. 213–218.

726. Spada, R. G. M. Genetic markers between *Biomphalaria glabrata* snails susceptible and resistant to *Schistosoma mansoni* infection / R. G. M. Spada, D. da Silva, A Z. Abdel Hamid, M. M. et al. // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. – 2002. – Vol. 97, № 1. – P. 53–58.

727. Springer, S. A. Oyster sperm bindin is a combinatorial fucose lectin with remarkable intra-species diversity / S. A. Springer, G. W. Moy, D. S. Friend et al. // International Journal of Developmental Biology. – 2008. – Vol. 52, No. 5–6. – P. 759–768.

728. Standley, C. J. Epidemiology and control of intestinal schistosomiasis on the Sesse Islands, Uganda: integrating malacology and parasitology to tailor local treatment recommendations / C. J. Standley, M. Adriko, M. Arinaitwe et al. // Parasites & Vectors. – 2010. – Vol. 3, No. 1. – P. 64.

729. Standley, C. J. Confirmed infection with intestinal schistosomiasis in semi-captive wild-born chimpanzees on Ngamba Island, Uganda / C. J. Standley, L. Mugisha, J. J. Verweij et al. // Vector-Borne and Zoonotic Diseases. – 2011. – Vol. 11, No. 2. – P. 169–176.

730. Standley, C. J. Molecular characterization of cryptic and sympatric lymnaeid species from the Galba/Fossaria group in Mendoza Province, Northern Patagonia, Argentina / C. J. Standley, L. Prepelitchi, S. M. Pietrokovsky et al. // Parasites and Vectors. – 2013. – Vol. 6, No. 1. – P. 304.

731. Steinbach, P. Granular cells in the connective tissue of *Helix pomatia* L. (Gastropoda, Pulmonata) / P. Steinbach // Cell and Tissue Research. – 1977. – Vol. 181. – P. 91–103.

732. Stumpf, J. L. Hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: factors affecting variability / J. L. Stumpf, D. E. Gilbertson // Journal of Invertebrate Pathology. – 1978. – Vol. 32, No. 2. – P. 177–181.

733. Sullivan, J. T. Mitotic responses of the anterior pericardial wall of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) subjected to challenge / J. T. Sullivan, T. C. Cheng, K. H. Howland // Journal of Invertebrate Pathology. – 1984. – Vol. 44. – P. 114–116.

734. Sullivan, J. T. Hematopoiesis in three species of gastropods following infection with *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae) / J. T. Sullivan // Transactions of the American Microscopical Society. – 1988. – Vol. 107, No. 4. – P. 335–361.

735. Sullivan, J. T. Long term survival of heterotopic allografts of the amoebocyte producing organ in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) / J. T. Sullivan // Transactions of the American Microscopical Society. – 1990. – Vol. 109, No. 1. – P. 52–60.

736. Sullivan, J. T. Transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* by allografts of amoebocyte producing organ / J. T. Sullivan, J. V. Spence // The Journal of Parasitology. – 1994. – Vol. 80, No. 3. – P. 449–453.

737. Sullivan, J. T. Fate of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria obstructa* / J. T. Sullivan, P. C. Hu // The Journal of Parasitology. – 1996. – Vol. 82, No. 2. – P. 743–747.

738. Sullivan, J. T. Factors affecting adoptive transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Biomphalaria glabrata* / J. T. Sullivan, J. V. Spence // The Journal of Parasitology. – 1999. – Vol. 85, No. 6. – P. 1065–1071.

739. Sullivan, J. T. Mitotic responses to injected extracts of larval and adult *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*: effects of dose and colchicine treatment / J. T. Sullivan // The Journal of Parasitology. – 2007. – Vol. 93, No. 1. – P. 213–215.

740. Sullivan, J. T. Effect of crude lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O127:B8 on the amebocyte producing organ of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) / J. T. Sullivan, C. A. Bulman, Z. Salamat // Developmental and Comparative Immunology. – 2011. – Vol. 35, No. 11. – P. 1182–1185.

741. Sullivan, J. T. Activation of an innate immune response in the schistosome transmitting snail *Biomphalaria glabrata* by specific bacterial PAMPs / J. T. Sullivan, J. A. Belloir // Developmental and Comparative Immunology. – 2013. – Vol. 42, No. 2. – P. 256–260.

742. Sun, J. A novel C-type lectin activates the complement cascade in the primitive oyster *Crassostrea gigas* / J. Sun, L. Wang, W. Yang et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2021. – Vol. 297, No. 6. – Art. 101352.

743. Sun, J. The evolution of NLR inflammasome and its mediated pyroptosis in Metazoa / J. Sun, J. Leng, L. Song // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25, No. 20. – Art. 11167.

744. Sunday, O. Distribution pattern of human urinary schistosomiasis in Kwara State, Nigeria / O. Sunday, A. Babamale, U. Ugbomoiko // American Journal of Infectious Diseases. – 2018. – Vol. 13, No. 4. – P. 38–44.

745. Tanguy, M. The immune response of *Mytilus edulis* hemocytes exposed to *Vibrio splendidus* LGP32 strain: a transcriptomic attempt at identifying molecular actors / M. Tanguy, S. Gauthier-Clerc, J. Pellerin et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2018. – Vol. 74. – P. 268–280.

746. Tasumi, S. A galectin of unique domain organization from hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus* / S. Tasumi, G. R. Vasta // The Journal of Immunology. – 2007. – Vol. 179, No. 5. – P. 3086–3098.

747. Teh, Y. C. Capturing the fantastic voyage of monocytes through time and space / Y. C. Teh, J. L. Ding, L. G. Ng, S. Z. Chong // Frontiers in Immunology. – 2019. – Vol. 10. – Art. 834.

748. Telfer, A. Biodiversity inventories in high gear: DNA barcoding facilitates a rapid biotic survey of a temperate nature reserve / A. Telfer, M. Young, J. Quinn et al. // Biodiversity Data Journal. – 2015. – Vol. 3. – Art. 6313.

749. Tennessen, J. A. Hyperdiverse gene cluster in snail host conveys resistance to human schistosome parasites / J. A. Tennessen, M. S. Blouin, C. M. Adema et al. // PLoS Genetics. – 2015. – Vol. 11. – Art. e1005067.

750. Terahara, K. Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* / K. Terahara, K. G. Takahashi, A. Nakamura et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2006. – Vol. 30. – P. 667–683.

751. Tetreau, G. Specific pathogen recognition by multiple innate immune sensors in an invertebrate / G. Tetreau, N. M. Dheilly, D. Duval et al. // Frontiers in Immunology. – 2017. – Vol. 8. – Art. 1249.

752. Théron, A. Are Biomphalaria snails resistant to Schistosoma mansoni? / A. Théron, C. Coustau // Journal of Helminthology. – 2005. – Vol. 79, № 3. – P. 187–191.

753. Tian-Bi, Y. N. T. Contrasting the distribution of phenotypic and molecular variation in the freshwater snail *Biomphalaria pfeifferi*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni* / Y. N. T. Tian Bi, P. Jarne, J. N. K. Konan et al. // Heredity. – 2013. – Vol. 110. – P. 466–474.

754. Tirapé, A. Expression of immune related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis / A. Tirapé, C. Bacque, R. Brizard et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2007. – Vol. 31, No. 9. – P. 859–873.

755. Tokmakova, A. S., Serebryakova, M. V., Prokhorova, E. E., Ataev, G. L. Study of the proliferative activity of hemolymph cells in pulmonate molluscs / A. S. Tokmakova, M. V. Serebryakova, E. E. Prokhorova, G. L. Ataev // Invertebrate Survival Journal. – 2020. – Vol. 17, No. 1. – P. 63–74.

756. Tompa, A. S. Calcified arteries in a gastropod / A. S. Tompa, N. Watabe // Calcified Tissue Research. – 1976. – Vol. 22, No. 2. – P. 159–172.

757. Tonegawa, S. Somatic generation of antibody diversity / S. Tonegawa // Nature. – 1983. – Vol. 302. – P. 575–581.

758. Travers, M. A. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection / M. A. Travers, P. Haffner, N. Cochenec-Laureau, R. Robert et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2008. – Vol. 25, No. 6. – P. 800–808.

759. Tsuji, M. Local motifs involved in the canonical structure of the ligand-binding domain in the nuclear receptor superfamily / M. Tsuji // Journal of Structural Biology. – 2014. – Vol. 185, No. 3. – P. 355–365.

760. Uit De Weerd, D. Re-evaluating *Carinigera*: molecular data overturn the current classification within the clausiliid subfamily Alopiinae (Gastropoda, Pulmonata) / D. Uit De Weerd // Journal of Molluscan Studies. – 2004. – Vol. 70, No. 4. – P. 305–318.

761. Uit de Weerd, D. R. Widespread polyphyly among Alopiinae snail genera: when phylogeny mirrors biogeography more closely than morphology / D. R. Uit de Weerd, W. H. Piel, E. Gittenberger // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2004. – Vol. 33, No. 3. – P. 533–548.

762. Uribe-Querol, E. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process / E. Uribe Querol, C. Rosales // Frontiers in Immunology. – 2020. – Vol. 11. – Art. 1066.

763. 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. – P. 997–1007.

764. Van der Knaap, W. P. Cytophilic receptor for foreignness and some factors which influence phagocytosis by invertebrate leucocytes: in vitro phagocytosis by amoebocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* / W. P. van der Knaap, T. Sminia, F. Brouns, C. T. De Bakker // Immunology. – 1983. – Vol. 48, No. 2. – P. 377–383.

765. Van der Knaap, W. P. W. Immune mechanisms in trematode–snail interactions / W. P. W. Van der Knaap, E. S. Loker // Parasitology Today. – 1990. – Vol. 6, No. 6. – P. 175–182.

766. Van der Knaap, W. P. W. Invertebrate blood cells: morphological and functional aspects of the haemocytes in the pond snail *Lymnaea stagnalis* / W. P. W. van der Knaap, C. M. Adema, T. Sminia // Comparative Haematology International. – 1993. – Vol. 3. – P. 20–26.

767. Van Furth, R. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells / R. van Furth, Z. A. Cohn, J. G. Hirsch et al. // Bulletin of the World Health Organization. – 1972. – Vol. 46, No. 6. – P. 845–852.

768. Varki, A. Essentials of Glycobiology / A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko et al.; eds. – Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press [Электронный ресурс]. –2022. – URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310274.

769. Varol, C. Macrophages: Development and Tissue Specialization / C. Varol, A. Mildner, S. Jung // Annual Review of Immunology. – 2015. – Vol. 33. – P. 643–675.

770. Vasquez, R. E. Hematopoietic tissue allografts in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) induce humoral immunity to *Schistosoma mansoni* / R. E. Vasquez, J. T. Sullivan // Developmental and Comparative Immunology. – 2001. – Vol. 25, No. 7. – P. 561–564.

771. Vasta, G. R. C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway / G. R. Vasta, M. Quesenberry et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 1999. – Vol. 23, No. 4–5. – P. 401–420.

772. Vasta, G. R. Animal lectins. A functional view / G. R. Vasta, H. Ahmed; eds. – Boca Raton: CRC Press, 2008. – 596 p.

773. Vasta, G. R. Structural, functional, and evolutionary aspects of galectins in aquatic mollusks: from a sweet tooth to the Trojan horse / G. R. Vasta, C. Feng, M. A. Bianchet et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2015 Sep. – Vol. 46, No. 1. – P. 94–106.

774. Vergote, D. Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni* / D. Vergote, A. Bouchut, P. E. Sautiere et al. // International Journal for Parasitology. – 2005. – Vol. 35. – P. 215–224.

775. Vicente-Manzanares, M. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration / M. Vicente-Manzanares, X. Ma, R. S. Adelstein, A. R. Horwitz // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2009. – Vol. 10. – P. 778–790.

776. Vidigal, T. H. D. A. *Biomphalaria glabrata*: extensive genetic variation in Brazilian isolates revealed by random amplified polymorphic DNA analysis / T. H. Vidigal, E. Dias Neto, O. dos S. Carvalho, A. J. Simpson // Experimental Parasitology. – 1994. – Vol. 79, no. 2. – P. 187–194.

777. Vidigal, T. H. D. A. Analysis of the first and second internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in *Biomphalaria tenagophila* complex (Mollusca: Planorbidae) / T. H. D. A. Vidigal, L. Spatz, J. C. Kissinger // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. – 2004. – Vol. 99, No. 2. – P. 153–158.

778. Vidigal, T. H. D. A. Integrative taxonomy of the neotropical genus *Omalonyx* (Elasmognatha: Succineidae) / T. H. D. A. Vidigal, D. Coscarelli, H. Paixão et al. // Zoologica Scripta. – 2018. – Vol. 47. – Art. zsc12271.

779. Vilmos, P. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system / P. Vilmos, É. Kurucz // Immunology Letters. – 1998. – Vol. 62, No. 2. – P. 59–66.

780. Vinarski, M. V. The taxonomic status and phylogenetic relationships of the genus *Aenigmomphiscola* Kruglov and Starobogatov, 1981 (Gastropoda: Pulmonata: Lymnaeidae) / M. V. Vinarski, K. Schniebs, P. Glöer et al. // Journal of Natural History. – 2011. – Vol. 45, No. 33–34. – P. 2049–2068.

781. Vinarski, M. V. A comparative study of shell variation in two morphotypes of *Lymnaea stagnalis* (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata) / M. V. Vinarski // Zoological Studies. – 2014. – Vol. 53. – Art. 69.

782. Vinarski, M. Conceptual shifts in animal systematics as reflected in the taxonomic history of a common aquatic snail species (*Lymnaea stagnalis*) / M. Vinarski // Zoosystematics and Evolution. – 2015. – Vol. 91. – P. 91–103.

783. Vinarski, M. V. *Radix dolgini*: The integrative taxonomic approach supports the species status of a Siberian endemic snail (Mollusca, Gastropoda, Lymnaeidae) / M. V. Vinarski, O. V. Aksenova, Y. V. Bespalaya et al. // Comptes Rendus Biologies. – 2016. – Vol. 339, No. 1. – P. 24–36.

784. Vinarski, M. V. Endemics or strangers? The integrative re-appraisal of taxonomy and phylogeny of the Greenland Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda) / M. V. Vinarski, I. N. Bolotov, K. Schniebs et al. // Comptes Rendus Biologies. – 2017. – Vol. 340, No. 11–12. – P. 541–557.

785. Vinarski, M. *Racesina*, a new generic name for a group of Asian lymnaeid snails (Gastropoda: Hygrophila: Lymnaeidae) / M. Vinarski, I. Bolotov // Zoosystematica Rossica. – 2018. – Vol. 27. – P. 328–333.

786. Vinarski, M. V. Taxonomic assessment of genetically delineated species of radicine snails (Mollusca, Gastropoda, Lymnaeidae) / M. V. Vinarski // Zoosystematics and Evolution. – 2020. – Vol. 96, No. 2. – P. 577–608.

787. Vinarski, M. A new alien snail *Ampullaceana balthica* for the Canadian fauna, with an overview of Transatlantic malacofaunal exchange in the Anthropocene / M. Vinarski, O. Aksenova, I. Bolotov et al. // Aquatic Invasions. – 2022. – Vol. 17, No. 1. – P. 21–35.

788. Vinarski, M. Nomenclator of species group taxa of the Recent *Lymnaeidae* (Gastropoda: Hygrophila) / M. Vinarski // Ruthenica: Russian Malacological Journal. – 2024. – Vol. 34, No. 5. – P. 191–324.

789. Vogel, C. The immunoglobulin superfamily in *Drosophila melanogaster* and Caenorhabditis elegans and the evolution of complexity / C. Vogel, S. A. Teichmann, C. Chothia // Development. – 2003. – Vol. 130. – P. 6317–6328.

790. Von Brand, T. Studies on the anaerobic metabolism and the aerobic carbohydrate consumption of some fresh water snails / T. Von Brand, H. D. Baernstein, B. Mehlman // The Biological Bulletin. – 1950. – Vol. 98, No. 3. – P. 266–276.

791. Vorontsova, I. L. Activity of detoxifying and antioxidant enzymes in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda: Pulmonata) during invasion by trematode cercariae / I. L. Vorontsova, N. I. Yurlova, S. N. Vodyanitskaya, V. V. Glupov // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2010. – Vol. 46, No. 1. – P. 24–29.

792. Vorontsova, Y. L. Do snails *Lymnaea stagnalis* have phenoloxidase activity in hemolymph? / Y. L. Vorontsova, I. A. Slepneva, N. I. Yurlova, V. V. Glupov // Invertebrate Survival Journal. – 2015. – Vol. 12. – P. 5–12.

793. Vorontsova, Y. L. The effect of trematode infection on the markers of oxidative stress in the offspring of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* / Y. L. Vorontsova, I. A. Slepneva, N. I. Yurlova, N. M. Ponomareva, V. V. Glupov // Parasitology Research. – 2019. – Vol. 118, No. 12. – P. 3561–3564.

794. Vosswinkel, R. Das Blutgefäßsystem von *Helix pomatia* L. (Gastropoda, Pulmonata) II: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der verschiedenen Anteile des Systems / R. Vosswinkel. – 1982. – Vol. 108. – P. 341–374.

795. Vyhlídalová, T. Species-specific patterns in cercarial emergence of *Diplostomum* spp. from snails *Radix lagotis* / T. Vyhlídalová, M. Soldánová // International Journal for Parasitology. – 2020. – Vol. 50, No. 14. – P. 1177–1188.

796. Wade, C. M. A phylogeny of the land snails (Gastropoda: Pulmonata) / C. M. Wade, P. B. Mordan, B. Clarke // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2001. – Vol. 268, No. 1465. – P. 413–422.

797. Wade, M. C. Evolutionary relationships among the pulmonate land snails and slugs (Pulmonata, Stylommatophora) / M. C. Wade, B. F. Mordan, F. Naggs // Biological Journal of the Linnean Society. – 2006. – Vol. 87, No. 4. – P. 593–610.

798. Wajant, H. Death receptors / H. Wajant // Essays in Biochemistry. – 2003. – Vol. 39. – P. 53–71

799. Walker, C. Mass culture and characterization of tumor cells from a naturally occurring invertebrate cancer model: applications for human and animal disease and environmental health / C. Walker, K. Metzger, L. Smith et al. // The Biological Bulletin. – 2009. – Vol. 216, No. 1. – P. 23–39.

800. Wan, C. P. A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay / C. P. Wan, C. S. Park, B. H. S. Lau // Journal of Immunological Methods. – 1993. – Vol. 162. – P. 1–7/

801. Wang, L. The immune role of C-type lectins in molluscs / L. Wang, L. Wang, M. Huang, H. Zhang // Invertebrate Survival Journal. – 2011a. – Vol. 8. – P. 241–246.

802. Wang, Z. A tandem-repeat galectin involved in innate immune response of the pearl oyster *Pinctada fucata* / Z. Wang, J. Jian, Y. Lu et al. // Marine Genomics. – 2011b. – Vol. 4. – P. 229–236.

803. Wang, M. A primitive Toll-like receptor signaling pathway in mollusk Zhikong scallop *Chlamys farreri* / M. Wang, J. Yang, Z. Zhou et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2011c. – Vol. 35, No. 4. – P. 511–520.

804. Wang, L. A multi-CRD C-type lectin with broad recognition spectrum and cellular adhesion from *Argopecten irradians* / L. Wang, L. Wang, J. Yang et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2012. – Vol. 36. – P. 591–601.

805. Wang, L. Research progress on the mollusc immunity in China / L. Wang, L. Qiu, Z. Zhou, L. Song // Developmental and Comparative Immunology. – 2013. – Vol. 39, No. 1–2. – P. 2–10.

806. Wang, M. The broad pattern recognition spectrum of the Toll-like receptor in mollusk Zhikong scallop *Chlamys farreri* / M. Wang, L. Wang, Y. Guo et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2015a. – Vol. 52, No. 2. – P. 192–201.

807. Wang, Q. Molecular diversity and evolution of defensins in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* / Q. Wang, L. Zhang, D. Yang et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2015b. – Vol. 47, No. 1. – P. 302–312.

808. Wang, W. A new non-phagocytic TLR6 with broad recognition ligands from Pacific oyster *Crassostrea gigas* / W. Wang, T. Zhang, L. Wang et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2016. – Vol. 65. – P. 182–190.

809. Wang, M. The versatile functions of LRR-only proteins in mollusk *Chlamys farreri* / M. Wang, L. Wang, Z. Jia et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2017. – Vol. 77. – P. 188–199.

810. Wang, L. The oyster immunity / L. Wang, X. Song, L. Song // Developmental and Comparative Immunology. – 2018a. – Vol. 80. – P. 99–118.

811. Wang, W. Pathogen-derived carbohydrate recognition in molluscs immune defense / W. Wang, X. Song, L. Wang, L. Song // International Journal of Molecular Sciences. – 2018b. – Vol. 19. – Art. 721. – P. 1–20.

812. Wang, M. The various components implied the diversified Toll-like receptor (TLR) signaling pathway in mollusk *Chlamys farreri* / M. Wang, L. Wang, Z. Jia, Q. Yi, L. Song // Fish and Shellfish Immunology. – 2018c. – Vol. 74. – P. 205–212.

813. Wang, M. A novel LRR-only protein mediates bacterial proliferation in hemolymph through regulating expression of antimicrobial peptides in mollusk *Chlamys farreri* / M. Wang, B. Wang, M. Liu et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2019a. – Vol. 92. – P. 223–229.

814. Wang, P. A novel invertebrate toll-like receptor with broad recognition spectrum from thick shell mussel *Mytilus coruscus* / P. Wang, Z. Zhang, Z. Xu et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2019b. – Vol. 89. – P. 132–140.

815. Wang, Z. Molecular characterization of complement component 3 (C3) in the pearl oyster *Pinctada fucata* improves our understanding of the primitive complement system in bivalve / Z. Wang, Y. Li, X. Zhang, H. Chen et al. // Frontiers in Immunology. – 2021. – Vol. 12. – Art. 652805.

816. Watson, F. L. Extensive diversity of Ig superfamily proteins in the immune system of insects / F. L. Watson, R. Puttmann Holgado, F. Thomas et al. // Science. – 2005. – Vol. 309. – P. 1874–1878.

817. Webster, J. P. Coevolution and compatibility in the snail trematode system / J. P. Webster, C. M. Davies // Parasitology. – 2001. – Vol. 123. – P. 41–56.

818. Wei, X. Role of scavenger receptor from *Octopus ocellatus* as a co-receptor of Toll-like receptor in initiation of TLR-NF-κB signaling during bacterial response / X. Wei, T. Zhao, K. Ai et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2018. – Vol. 84. – P. 14–27.

819. Weiler, H. Thrombomodulin / H. Weiler, B. H. Isermann // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2003. – Vol. 1. – P. 1515–1524.

820. Wendelaar Bonga, S. E. Ultrastructure of the reno pericardial system in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.) / S. E. Wendelaar Bonga, H. H. Boer // Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie. – 1969. – Vol. 94, No. 4. – P. 513–529.

821. Wheeler, N. J. Sequence and structural variation in the genome of the *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell line / N. J. Wheeler, N. Dinguirard, J. Marquez et al. // Parasites and Vectors. – 2018. – Vol. 11, No. 1. – Art. 496.

822. White, T. R. Ten new complete mitochondrial genomes of pulmonates (Mollusca: Gastropoda) and their impact on phylogenetic relationships / T. R. White, M. M. Conrad, R. Tseng // BMC Ecology and Evolution. – 2011. – Vol. 11, No. 295. – P. 1–15.

823. WHO. Schistosomiasis and soil transmitted helminthiases: progress report, 2022 / WHO // Weekly Epidemiological Record. – 2023. – Vol. 51. – P. 667–675.

824. Wiley, C. D. Secretion of leukotrienes by senescent lung fibroblasts promotes pulmonary fibrosis / C. D. Wiley, A. N. Brumwell, S. S. Davis et al. // JCI Insight. – 2019. – Art. 130056.

825. Williams, A. J. Susceptibility of the giant African snail (*Achatina fulica*) exposed to the gastropod parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* / A. J. Williams, R. Rae // Journal of Invertebrate Pathology. – 2015. – Vol. 127. – P. 122–126.

826. Williams, G. J. Structural insights into NHEJ: building up an integrated picture of the dynamic DSB repair super complex, one component and interaction at a time / G. J. Williams, M. Hammel, S. K. Radhakrishnan et al. // DNA Repair (Amsterdam). – 2014. – Vol. 17. – P. 110–120.

827. Wlodkowic, D. Dynamic analysis of apoptosis using cyanine SYTO probes: from classical to microfluidic cytometry / D. Wlodkowic, J. Skommer, S. Faley et al. // Experimental Cell Research. – 2009. – Vol. 315, No. 10. – P. 1706–1714.

828. Wood, D. E. Improved metagenomic analysis with Kraken 2 / D. E. Wood, J. Lu, B. Langmead // Genome Biology. – 2019. – Vol. 20. – Art. 257.

829. Wu, S.-Z. Interleukin-17 in pearl oyster (*Pinctada fucata*): molecular cloning and functional characterization / S.-Z. Wu, X.-D. Huang, Q. Li, M.-X. He // Fish and Shellfish Immunology. – 2013. – Vol. 34, No. 5. – P. 1050–1056.

830. Wu, X. J. Proteomic analysis of *Biomphalaria glabrata* plasma proteins with binding affinity to those expressed by early developing larval *Schistosoma mansoni* / X. J. Wu, N. Dinguirard, G. Sabat et al. // PLoS Pathogens. – 2017. – Vol. 13. – Art. e1006081.

831. Xie, P. Molecular cloning and tissue distribution of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARα) and gamma (PPARγ) in the pigeon (*Columba livia domestica*) / P. Xie, C. Yuan, C. Wang et al. // British Poultry Science. – 2014. – Vol. 55, No. 2. – P. 136–142.

832. Xin, L. CgIL17–5, an ancient inflammatory cytokine in *Crassostrea gigas* exhibiting the heterogeneity functions compared with vertebrate interleukin-17 molecules / L. Xin, H. Zhang, R. Zhang et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2015. – Vol. 53, No. 2. – P. 339–348.

833. Xin, L. The categorization and mutual modulation of expanded MyD88s in *Crassostrea gigas* / L. Xin, M. Wang, H. Zhang et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2016. – Vol. 54. – P. 118–127.

834. Xing, Q. Genome-wide identification, characterization and expression analyses of TLRs in Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) provide insight into the disparity of responses to acidifying exposure in bivalves / Q. Xing, H. Liao, X. Xun et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2017. – Vol. 68. – P. 280–288.

835. Yamaguchi, K. Morphological and functional studies on hemolymph cells of land slug, *Incilaria bilineata*, *in vivo* and *in vitro* / K. Yamaguchi, E. Furuta, A. Shimozawa // Invertebrate and fish tissue culture: proceedings of the 7th international conference on invertebrate and fish tissue culture / eds. Y. Kuroda, E. Kurstak, K. Maramorosch. – Berlin, Heidelberg: Springer, 1988. – P. 247–250.

836. Yamaura, K. Identification and tissue expression analysis of C-type lectin and galectin in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* / K. Yamaura, K. G. Takahashi, T. Suzuki // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. – 2008. – Vol. 149. – P. 168–175.

837. Yang, C. A new fibrinogen-related protein from *Argopecten irradians* (AiFREP-2) with broad recognition spectrum and bacteria agglutination activity / C. Yang, L. Wang, H. Zhang et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2014. – Vol. 38, No. 1. – P. 221–229.

838. Yang, D. The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity / D. Yang, O. Chertov, J. J. Oppenheim // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2001. – Vol. 58. – P. 978–989.

839. Yang, J. An ancient C-type lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-2) that mediate pathogen recognition and cellular adhesion / J. Yang, L. Qiu, X. Wei et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2010. – Vol. 34, No. 12. – P. 1274–1282.

840. Yang, J. C-type lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-1) mediating immune recognition and opsonization / J. Yang, L. Wang, H. Zhang et al. // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6, No. 2. – Art. e17089.

841. Yang, J. CfLec-3 from scallop: An entrance to non-self recognition mechanism of invertebrate C-type lectin / J. Yang, M. Huang, H. Zhang et al. // Scientific Reports. – 2015. – Vol. 5. – Art. 10068.

842. Yang, W. A novel lectin with a distinct Gal_Lectin and CUB domain mediates haemocyte phagocytosis in oyster *Crassostrea gigas* / W. Yang, J. Sun, J. Leng et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2024. – Vol. 159. – Art. 105222.

843. Yao, H. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals / H. Yao et al. // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5, No. 10. – Art. e13102.

844. Yoffey, J. M. Lymphomyeloid complex / J. M. Yoffey // Lymphology. – 1985. – Vol. 18. – P. 5–21.

845. Yoshino, T. P. Identification of antigenically distinct hemocyte subpopulations in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) using monoclonal antibodies to surface membrane markers / T. P. Yoshino, W. O. Granath // Cell and Tissue Research. – 1983. – Vol. 232. – P. 553–564.

846. Yoshino, T. P. Mimicry of snail host antigens by miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni* / T. P. Yoshino, C. J. Bayne // Parasite Immunology. – 1983. – Vol. 5, No. 3. – P. 317–328.

847. Yoshino, T. P. Surface antigens of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) hemocytes: Functional heterogeneity in cell subpopulations recognized by a monoclonal antibody / T. P. Yoshino, W. O. Granath // Journal of Invertebrate Pathology. – 1985. – Vol. 45. – P. 174–186.

848. Yoshino, T. P. Proteinase activity in miracidia, transformation excretory-secretory products, and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni* / T. P. Yoshino, M. J. Lodes, A. A. Rege, C. L. Chappell // Journal of Parasitology. – 1993. – Vol. 79, No. 1. – P. 23–31.

849. Yoshino, T. P. Production of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts from mother sporocysts maintained in synxenic culture with *Biomphalaria glabrata* embryonic (BGE) cells / T. P. Yoshino, J. R. Laursen // The Journal of Parasitology. – 1995. – Vol. 81. – P. 714–722.

850. Yoshino, T. P. Molecular and functional characterization of a tandem-repeat galectin from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of the human blood fluke *Schistosoma mansoni* / T. P. Yoshino, N. Dinguirard, J. Kunert, C. H. Hokke // Gene. – 2008. – Vol. 411, No. 1–2. – P. 46–58.

851. Yoshino, T. P. Immunobiology of *Biomphalaria*–trematode interactions / T. P. Yoshino, C. Coustau // Biomphalaria snails and larval trematodes / eds. R. Toledo, B. Fried. – New York: Springer, 2011. – P. 159–189.

852. Yoshino, T. P. Molluscan cells in culture: primary cell cultures and cell lines / T. P. Yoshino, C. M. Adema, S. M. Becker et al. // Canadian Journal of Zoology. – 2013a. – Vol. 91, No. 6. – Art. 10.

853. Yoshino, T. P. Circulating *Biomphalaria glabrata* hemocyte subpopulations possess shared schistosome glycans and receptors capable of binding larval glycoconjugates / T. P. Yoshino,

X.-J. Wu, L. A. Gonzalez, C. H. Hokke // Experimental Parasitology. – 2013b. – Vol. 133, No. 1. – P. 28–36.

854. Young, N. D. Nuclear genome of *Bulinus truncatus*, an intermediate host of the carcinogenic human blood fluke *Schistosoma haematobium* / N. D. Young, A. J. Stroehlein, T. Wang et al. // Nature Communications. – 2022. – Vol. 13. – Art. 977.

855. Yousif, F. The cellular responses in *Marisa cornuarietis* experimentally infected with *Angiostrongylus cantonensis* / F. Yousif, S. Blähser, G. Lämmler // Zeitschrift für Parasitenkunde. – 1980. – Vol. 62. – P. 179–190.

856. Yousif, F. Invasion of the Nile Valley in Egypt by a hybrid of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria alexandrina*, snail vectors of *Schistosoma mansoni* / F. Yousif, A. Ibrahim, A. Abdel Kader et al. // Journal of the Egyptian Society of Parasitology. – 1998. – Vol. 28. – P. 569–582.

857. Yssel, E. Factors influencing the leukocyte concentration of the freshwater snail *Bulinus africanus* / E. Yssel, C. T. Wolmarans // Journal of Invertebrate Pathology. – 1989. – Vol. 53, No. 2. – P. 269–271.

858. Yu, X. Molecular cloning and differential expression in tissues of a tyrosinase gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* / X. Yu, H. Yu, L. Kong et al. // Molecular Biology Reports. – 2014. – Vol. 41, No. 8. – P. 5403–5411.

859. Zahoor, Z. Larval excretory-secretory products from the parasite *Schistosoma mansoni* modulate HSP70 protein expression in defence cells of its snail host, *Biomphalaria glabrata* / Z. Zahoor, A. J. Davies, R. S. Kirk et al. // Cell Stress Chaperones. – 2010. – Vol. 15. – P. 639–650.

860. Zannella, C. Microbial Diseases of Bivalve Mollusks: Infections, Immunology and Antimicrobial Defense / C. Zannella, F. Mosca, F. Mariani et al. // Marine Drugs. – 2017. – Vol. 15, No. 6. – Art. 182.

861. Zanker, K. S. Immunology of Invertebrates: Humoral / K. S. Zanker // Encyclopedia of Life Sciences (ELS). – Chichester: John Wiley and Sons, Ltd, 2010. 10 p. [Электронный ресурс].

862. Żbikowska, E. Thermal preferences of bird schistosome snail hosts increase the risk of swimmer's itch / E. Żbikowska, A. Marszewska // Journal of Thermal Biology. – 2018. – Vol. 78. – P. 22–26.

863. Zelensky, A. N. The C-type lectin-like domain superfamily / A. N. Zelensky, J. E. Gready // FEBS Journal. – 2005. – Vol. 272. – P. 6179–6217.

864. Zeng, C. Evaluation of 5-ethynyl-2′-deoxyuridine staining as a sensitive and reliable method for studying cell proliferation in the adult nervous system / C. Zeng, F. Pan, L. A. Jones et al. // Brain Research. – 2010. – Vol. 1319. – P. 21–32.

865. Zeng, X. Distribution and current infection status of *Biomphalaria straminea* in Hong Kong / X. Zeng, W. C. Yiu, K. H. Cheung et al. // Parasites & Vectors. – 2017. – Vol. 10, No. 1. – Art. 351.

866. Zhang, D. A multidomain galectin involved in innate immune response of pearl oyster *Pinctada fucata* / D. Zhang, S. Jiang, Y. Hu et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2011. – Vol. 35, No. 1. – P. 1–6.

867. Zhang, G. Phylogenetic insights into the terrestrial snails *Helicoidei* (Gastropoda: Stylommatophora) with special emphasis on the Camaenidae / G. Zhang, F. Naggs, P. Andrus, C. Wade // Zoological Journal of the Linnean Society. – 2024. – Vol. 203. – Art. ZLAE027.

868. Zhang, H. Cflec-4, a multidomain C-type lectin involved in immune defense of Zhikong scallop *Chlamys farreri* / H. Zhang, H. Wang, L. Wang et al. // Developmental and Comparative Immunology. – 2009. – Vol. 33, No. 6. – P. 780–788.

869. Zhang, L. Transcriptome analysis reveals a rich gene set related to innate immunity in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) / L. Zhang, L. Li, Y. Zhu et al. // Marine Biotechnology (New York, NY). – 2014. – Vol. 16, No. 1. – P. 17–33.

870. Zhang, Q. Domain architecture evolution of pattern-recognition receptors / Q. Zhang, C. M. Zmasek, A. Godzik // Immunogenetics. – 2010. – Vol. 62. – P. 263–272.

871. Zhang, S. M. Parasite responsive IgSF members in the snail *Biomphalaria glabrata*: characterization of novel genes with tandemly arranged IgSF domains and a fibrinogen domain / S. M. Zhang, P. M. Léonard, C. M. Adema et al. // Immunogenetics. – 2001. – Vol. 53, No. 8. – P. 684–694.

872. Zhang, S. M. Representation of an immune responsive gene family encoding fibrinogen-related proteins in the freshwater mollusc *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni* / S. M. Zhang, E. S. Loker // Gene. – 2004. – Vol. 341. – P. 255–266.

873. Zhang, S.-M. Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate / S.-M. Zhang, C. M. Adema, T. B. Kepler, E. S. Loker // Science. – 2004. – Vol. 305, No. 5681. – P. 251–254.

874. Zhang, S.-M. Expression profiling and binding properties of fibrinogen-related proteins (FREPs), plasma proteins from the schistosome snail host *Biomphalaria glabrata* / S.-M. Zhang, Y. Zang, E. S. Loker // Innate Immunity. – 2008. – Vol. 14, No. 3. – P. 175–189.

875. Zhang, S.-M. Pathogen-associated molecular patterns activate expression of genes involved in cell proliferation, immunity and detoxification in the amebocyte-producing organ of the snail *Biomphalaria glabrata* / S.-M. Zhang, E. S. Loker, J. T. Sullivan // Developmental and Comparative Immunology. – 2016. – Vol. 56. – P. 25–36.

876. Zhang, S. M. Complete mitochondrial and rDNA complex sequences of important vector species of *Biomphalaria*, obligatory hosts of the human-infecting blood fluke, *Schistosoma mansoni* / S. M. Zhang, L. Bu, M. R. Laidemitt et al. // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8, No. 1. – Art. 7341.

877. Zhang, Y. Characteristic and Functional Analysis of Toll-like Receptors (TLRs) in the lophotrocozoan, *Crassostrea gigas*, Reveals Ancient Origin of TLR-Mediated Innate Immunity / Y. Zhang, X. He, F. Yu et al. // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8, No. 10. – Art. e76464.

878. Zhang, Y. Isolated and combined exposure to ammonia and nitrite in giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): effects on the oxidative stress, antioxidant enzymatic activities and apoptosis in haemocytes / Y. Zhang, C. Ye, A. Wang et al. // Ecotoxicology. – 2015. – Vol. 24, No. 7–8. – P. 1601–1610.

879. Zhang, Y. Morphology and activities of cell populations of haemocytes in *Oncomelania hupensis* following *Schistosoma japonicum* infection / Y. Zhang, S. Xu, N. Jiang et al. // Journal of Invertebrate Pathology. – 2021. – Vol. 181. – Art. 107590.

880. Zhao, Q. P. Identification of Toll-like receptor family members in *Oncomelania hupensis* and their role in defense against *Schistosoma japonicum* / Q. P. Zhao, Q. Gao, Y. Zhang et al. // Acta Tropica. – 2018. – Vol. 181. – P. 69–78.

881. Zhao, Y. Apolipophorin II/I contributes to cuticular hydrocarbon transport and cuticle barrier construction in *Locusta migratoria* / Y. Zhao, W. Liu, X. Zhao et al. // Frontiers in Physiology. – 2020. – Vol. 11. – Art. 790.

882. Zhao, M. The mechanisms and factors that induce trained immunity in arthropods and mollusks / M. Zhao, Z. Lin, Z. Zheng et al. // Frontiers in Immunology. – 2023. – Vol. 14. – Art. 1241934.

883. Zheng, J. RIG-I-like receptors: Molecular mechanism of activation and signaling / J. Zheng, W. Shi, Z. Yang et al. // Advances in Immunology. – 2023. – Vol. 158. – P. 1–74.

884. Zhou, Y. The complete mitochondrial genome of invasive species *Biomphalaria straminea* (Planorbidae: Biomphalaria) and phylogenetic analysis / Y. Zhou, X. Liu, R. Wu et al. // Mitochondrial DNA Part B: Resources. – 2019. – Vol. 4. – P. 937–938.

885. Zhou, Z. The phenoloxidase activity and antibacterial function of a tyrosinase from scallop *Chlamys farreri* / Z. Zhou, D. Ni, M. Wang, L. et al. // Fish and Shellfish Immunology. – 2012. – Vol. 33, No. 2. – P. 375–381.

886. Zhukova, A. A. Identification of species *Leucochloridium paradoxum* and *L. perturbatum* (Trematoda) based on rDNA sequences / A. A. Zhukova, E. E. Prokhorova, A. S. Tokmakova et al. // Parazitologiya. – 2014. – Vol. 48, No. 3. – P. 185–192.

887. Zhuravlev, V. The chronoinotropic effects of new regulatory input to the heart of land pulmonates / V. Zhuravlev, V. Bugaj, T. Safonova et al. // Acta Biologica Hungarica. – 1999. – Vol. 50, No. 1–3. – P. 309–318.

888. Zink, F. Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly / F. Zink, S. N. Stacey, G. L. Norddahl et al. // Blood. – 2017. – Vol. 130. – P. 742–752.

889. Zola, H. Human Leucocyte Differentiation Antigen nomenclature: update on CD nomenclature / H. Zola, B. Swart, L. Boumsell, D. Y. Mason // Journal of Immunological Methods. – 2003. – Vol. 275. – P. 1–8.

890. Zotin, A. A. Individual Growth of *Planorbarius corneus* (Planorbidae, Gastropoda) in Postlarval Ontogenesis / A. A. Zotin // Russian Journal of Developmental Biology. – 2018. – Vol. 49, No. 6. – P. 381–387.

Приложение 1

Нуклеотидные последовательности моллюсков *Planorbarius corneus*, использованные для анализа генетического полиморфизма

Регион сбора или линия	Номера последовательностей в базе данных GenBank (указан ген)			Обозначение популяции
	рДНК	*cytB*	*cox1*	
Россия, Ленинградская обл., Гатчинский район, пос. Вырица	PP908702.1, PP908703.1, PP908704.1, PP908705.1, OQ101723.1, OQ101726.1, KU729740.1, KU729743.1	PV059202.1, PV059198.1, PV059197.1, PV059200.1, PV059220.1, PV059201.1	PP922543.1, PP922542.1, PP922559.1, PP922562.1, PP922563.1, PP922560.1,	Вырица
Россия, Ленинградская обл., Всеволожский район, пос. Кузьмолово	PP908706.1, KU729741.1, OQ101727.1, OQ418078.1	PV059218.1	PP922557.1, PP922558.1	Кузьмолово
Россия, Ленинградская обл., Всеволожский район, пос. Оселки	PP908715.1, PP908716.1 PP908717.1, OQ101721.1, OQ101722.1	PV059207.1, PV059205.1, PV059203.1, PV059206.1,	PP922553.1, PP922554.1, PP922561.1 PP922555.1, PP922556.1	Оселки
Россия, Калининградская обл.	PP908709.1, OQ101724.1, PP908708.1, OQ101725.1, KU729745.1, PP908707.1, KU729742.1	PV059213.1, PV059215.1, PV059217.1	PP922544.1, PP922545.1, PP922546.1, PP922547.1, PP922548.1	Калининград
Белоруссия, Витебская обл.	PP908711.1, PP908712.1, PP908713.1	PV059208.1, PV059209.1, PV059210.1, PV059211.1, PV059212.1	PP922549.1, PP922550.1, PP922552.1, PP922551.1, PP922564.1	Витебск
Бельгия	—	—	PP203070.1, PP203068.1, PP203069.1, OQ954057.1	Бельгия (Schols et al., 2024)
Германия	FR797831.1, FR797830.1, MT893484.1	FR797880.1	FR797857.1, FR797858.1, AY350524.1, AY282590.1, PP203067.1	Германия (Vinarski et al., 2011; Gauffre-Autelin et al., 2021)
Дания	—	MT862415.1	MT862415.1	Дания (Leerhoei, 2020)
Румыния	—	—	MW600083.1	Румыния (Menabit, 2021)

Приложение 2

Нуклеотидные последовательности моллюсков *Succinea putris*, использованные для анализа генетического полиморфизма

Регион сбора или линия	Номера последовательностей в базе данных GenBank (указан ген)			Обозначение популяции (ссылка)
	рДНК	*cytB*	*cox1*	
Россия, Ленинградская обл.	MF148319.1, MF148320.1	MH352224.1, MK344421.1, MK344409	MK344408.1, MH352219.1, MH352215.1, MK344409.1	Leningrad
Россия, Московская обл.	MF148317.1, MF148318.1	MH352221.1, MK344417.1, MK344418.1	MN017771.1, MK344414.1, MK344415.1	Moskow
Россия, Калининградская обл.	MF148314.1, MF148315.1	MH352223.1, MK344422.1, MN223675	MH352218.1, MK344410.1, MN017769.1	Kaliningrad
Россия, Кировская обл.	MF148313.1, MF148312.	MH352222.1, MK344419.1, MN017768	MH352217.1, MN223674.1, MN017772.1	Kirov
Белоруссия, Гомельская обл.	MF148310.1, MF148311.1	MH352220.1, MK344427.1, MK344426.1	MH352216.1, MK344413.1, MK344412.1	Gomel
Белоруссия, Витебская обл.	MF148321.1, MF148322.1	MK344425.1, MK344428.1, MK344424.1, MK344423.1	MN017770.1, MK344411.1, MK344416.1	Vitebsk
Франция	—	JN627206.1 (CASIZ 180491)	JN627206.1 (CASIZ 180491)	France (White et al., 2011)
Канада, Онтарио, Национальный городской парк Руж	—	—	MF544756.1, MF545157.1, MF545158.1, MF544758.1, MF544159.1, MF544405.1, MF544506.1, MF544818.1, MF544210.1, MF544231.1, MF544653.1, MF544490.1, MF544322.1, MF544587.1, MF544418.1, MF544382.1, MF544228.1, MF544873.1, MF544897.1, MF544973.1, MF545126.1, MF544742.1, MF544686.1	Can_O_RNUP (deWaard et al., 2019)
Канада, Нью-Брансуик	—	—	MG421566.1, MG421590.1, MG421662.1, MG422354.1	Can_NB (deWaard et al., 2019)
Канада, Онтарио, Клейревилл	—	—	MG422810.1 MG423393.1 MG421240.1 MG422360.1	Can_O_Nash (deWaard et al., 2019)

Приложение 2 (продолжение)

Регион сбора или линия	Номера последовательностей в базе данных GenBank (указан ген)			Обозначение популяции
	рДНК	*cytB*	*cox1*	
Канада, Онтарио, Кембридж	—	—	MG421557.1, MG423488.1, MG422613.1, MG421340.1, MG422589.1, MG422586.1, MG422578.1, MG422577.1, MG422570.1, MG422428.1, KT708385.1, MG422385.1, MG421915.1, MG422108.1, MG422553.1, KT706849.1, MG422232.1, KT705530.1, KT706619.1, MG422821.1, MG422340.1, MG422176.1, MG423161.1, KT708412.1, MG422717.1, KT706446.1, KT708055.1, MG423402.1, MG421524.1, MG421235.1	Can_O_Cam (deWaard et al., 2019)
Канада, Онтарио, Нэшвилл	—	—	MG423177.1	Can_O_Nash (deWaard et al., 2019)
Ontario, Kortright	—	—	MG421924.1, MG422206.1, MG421473.1, MG422512.1	Can_O_Kor (deWaard et al., 2019)
Канада, Онтарио, Сенека	—	—	MG421460.1, MG422624.1, MG421869.1, MG422800.1	Can_O_Sen (deWaard et al., 2019)
Канада, Онтарио, Спидривертрейл	—	—	MG422544.1, MG421653.1	Can_O_Srt (deWaard et al., 2019)
Канада, Онтарио, Макмайкл	—	—	MG422616.1	Can_O_MM (deWaard et al., 2019)
Канада, Онтарио	—	-—	MG421231.1	Can_O (deWaard et al., 2019)
Канада, Остров Принца Эдуарда	—	—	MF544242.1	Can_PEI (deWaard et al., 2019)

Приложение 3

Нуклеотидные последовательности моллюсков *Lymnaea stagnalis*, использованные для вычисления генетических дистанций

Регион сбора	Номера последовательностей в базе данных GenBank (рДНК)	Обозначение популяции (ссылки)
Россия, Ленинградская обл.	PP866295.1, PP866294.1, PV739293.1, PV739294.1, PV739295.1, PV739296.1, PV739297	Leningrad
Германия	FR797834.1, FR797837.1, HG931959.1, HG931996.1, AJ319614.1, HG932112.1, HG932114.1, HG932064.1, HG932118.1	Germany (Vinarski et al., 2011; Vinarski et al., 2017)
Франция	AJ319616.1, HG931985.1, AY795575.1, HQ283268.1	France (Bargues et al., 2001; Ferté et al., 2005; Correa et al., 2010; Vinarski et al., 2017)
Великобритания	MN644814.1	United Kingdom (Saadi eta al., 2020)
Швейцария	MT864602.1, MT864603.1	Switzerland (Seppala et al., 2021)

Приложение 4

Нуклеотидные последовательности моллюсков *Arianta arbustorum*, использованные для вычисления генетических дистанций и филогенетических реконструкций

Регион сбора	Номера последовательностей в базе данных GenBank (рДНК)	Обозначение популяции (ссылки)
Россия, Ленинградская обл.	PV133783.1, PV133784.1, PV133782.1	Leningrad
Испания	KJ458584.1	Spain (Razkin et al., 2015)
Германия	KR705059.1	Germany (Neiber, Hausdorf, 2015)
Великобритания	PP069327.1, AY014136.1	United Kingdom (Wade et al., 2001; Zhang et al., 2024)
Нидерланды	AF124053.1, AF124052.1	Netherlands (Armbruster et al., 2000)

Приложение 5

Номера нуклеотидных последовательностей моллюсков *Ampullaceana lagotis*, использованных для вычисления генетических дистанций и филогенетических реконструкций

Регион сбора	Номера последовательностей в базе данных GenBank (указан ген)		Обозначение популяции (ссылки)
	рДНК	*cox1*	
Россия, плато Укок, озеро Укок	OR600215.1, OR600216.1, OR600217.1, OR600218.1, OR600226.1, OR600227.1, OR600228.1, OR600229.1	OR722466.1	UO
Россия, плато Укок, озеро Кальджин-Коль	OR600208.1, OR600209.1, OR600210.1, OR600211.1, OR600212.1, OR600213.1, OR600214.1, OR600219.1, OR600220.1, OR600221.1, OR600222.1, OR600223.1, OR600224.1, OR600225.1	OR593313.1	U
Россия, Республика Коми, Горный хребет Чернышева	KT852376.1	—	Komi (Aksenova et al., 2017)
Россия, Иркутская обл, река Иркут	—	KF918625.1	Irkut (Paltser et al., 2014)
Россия, Ямало-Ненецкий автономный округ	—	MH189995.1	Yamal (Aksenova et al., 2018)
Чешская республика	MT708678.1, GU574224.1	—	Czech Republic (Huňová et al., 2012; Vyhlídalová, Soldánová, 2020)
Австрия	AJ319639.1		Austria (Bargues et al., 2001)
Таджикистан	—	MH189939.1	Tadjikistan (Aksenova et al., 2018)

Приложение 6

Нуклеотидные последовательности моллюсков рода *Cochlicopa*, использованные для вычисления генетических дистанций и филогенетических реконструкций

Регион сбора	Номера последовательностей в базе данных GenBank (рДНК)	Обозначение популяции (ссылки)
Cochlicopa lubrica		
Россия, Ленинградская обл.	PP853613.1, PP853614.1, PP853615.1, PP853616.1, PP853617.1, PP853618.1, PP853619.1, PP853620.1, PP853621.1, PP853622.1, PP853624.1, PP853623.1	Leningrad
Испания	Y16762.1	Spain (Armbruster, Bernhard, 2008)
Германия	Y16761.1	Germany (Armbruster, Bernhard, 2008)
Великобритания	AY014019.1, KU341313.1	United Kindom (Wade et al., 2001; Davison et al., 2016)
Cochlicopa lubricella		
Германия	Y16758.1, Y16757.1, Y16759.1, Y16756.1	Germany (Armbruster, Bernhard, 2008)
Украина	Y16760.1	Ukraine (Armbruster, Bernhard, 2008)
Cochlicopa nitens		
Чешская республика	Y16765.1	Czech Republic (Armbruster, Bernhard, 2008)
Германия	Y16764.1	Germany (Armbruster, Bernhard, 2008)

Приложение 7

Нуклеотидные последовательности, использованные в качестве внешних групп для филогенетических реконструкций на основе нуклеотидных последовательностей рДНК

Номер в GenBank	Вид	Ссылки
FR797831.1	*Planorbarius corneus*	Vinarski et al., 2011
AY030374.1 AY030375.1 AY030376.1 AY030377.1	*Biomphalaria glabrata*	DeJong et al., 2001
AY030387.1 AY030388.1	*Biomphalaria tenagophila*	DeJong et al., 2001
AY030362.1 AY030361.1	*Biomphalaria pfeifferi*	DeJong et al., 2001
MT753115.1	*Biomphalaria glabrata*	Laidemitt et al., 2020
MG461588.1	*Biomphalaria pfeifferi*	Zhang et al., 2018
MG461589.1	*Biomphalaria sudanica*	Zhang et al., 2018
MG461590.1	*Biomphalaria choanomphala*	
MG461591.1 MG461592.1	*Biomphalaria glabrata*	
MT017568.1 MT017569.1 MT017570.1	*Biomphalaria tenagophila*	Goveia et al., 2023
MN644826.1	*Bathyomphalus contortus*	Saadi et al., 2020
MN644828.1	*Gyraulus parvus*	
MN644833.1	*Menetus callioglyptus*	
MN644835.1	*Planorbella subcrenata*	
MN644836.1	*Planorbula campestris*	
MN644837.1	*Promenetus exacuous*	
MN644830.1	*Planorbis planorbis*	
MN644832.1	*Biomphalaria glabrata*	
MN644314.1	*Lymnaea stagnalis*	
MN644821.1	*Peregriana* sp.	
AF435672.1	*Planorbis planorbis*	Morgan et al., 2002
MW883067.1	*Planorbella pilsbryi*	Rempel et al., 2021
AY841295.1	*Succinea striata*	Wade et al., 2006

Приложение 7 (продолжение)

Номер в GenBank	Вид	Ссылки
MH361757.1	*Bulinus truncatus*	Sunday et al., 2018
KF989350.1	*Bulinus globosus*	Akinwale et al., 2015
AM921989.1 AM921988.1	*Bulinus nasutus*	Kane et al., 2008
AF124052.1 AF124053.1	*Arianta arbustorum*	Armbruster et al., 2000
KR705138.1	*Helix pomatia*	Neiber et al., 2016
JN614469.1	*Lymnaea stagnalis*	Correa et al., 2011
HQ283268.1	*Lymnaea stagnalis*	Correa et al., 2010
HG931996.1 HG931959.1 HG931985.1 HG932114.1 HG932112.1 HG932064.1 HG932118.1	*Lymnaea stagnalis*	Vinarski et al., 2017
AY795575.1	*Lymnaea stagnalis*	Ferté et al., 2005
FR797834.1 FR797837.1	*Lymnaea stagnalis*	Vinarski et al., 2011
AJ319614.1 AJ319616.1	*Lymnaea stagnalis*	Bargues et al., 2011
AJ319618.1	*Lymnaea turricola*	
AJ319620.1	*Lymnaea palustris*	
AJ319621.1 AJ319622.1	*Lymnaea fuscus*	
AJ319625.1	*Lymnaea corvus*	
JF922878.1	*Radix auricularia*	
JX193589.1	*Radix auricularia*	
AJ626855.1	*Lymnaea fuscus*	Bargues et al., 2005
KX060749.2	*Radix acuminata*	Ayyagari et al., 2020
MT864602.1 MT864603.1	*Lymnaea stagnalis*	Seppälä et al., 2021
HQ283252.1	*Lymnaea* sp.	Correa et al., 2010
HQ283255.1	*Lymnaea cousini*	
HQ283256.1	*Lymnaea diaphana*	
HQ283254.1	*Lymnaea viatrix*	

Приложение 7 (продолжение)

Номер в GenBank	Вид	Ссылки
OZ024810.1	*Omphiscola glabra*	Ruta, Taylor, 2025
JX536269.1	*Galba viatrix*	Standley et al., 2013
HG932024.1	*Radix (Ampullaceana) ampla*	Vinarski et al., 2017
HG932031.1	*Radix (Ampullaceana) balthica*	
JN614442.1 HQ283258.1	*Radix peregra*	Correa et al., 2011
MW248575.1	*Radix natalensis*	Ahmad et al., 2022
MW248569.1	*Radix aurucularia*	
GU574224.1	*Radix (Ampullaceana) lagotis*	Huňová et al., 2012
MT708678.1	*Ampullaceana lagotis*	Vyhlídalová, Soldánová, 2020
AJ319639.1	*Radix lagotis*	Bargues et al., 2001
LS974249.1	*Radix ampla*	Schniebs et al., 2019
MZ400505.1	*Ampullaceana balthica*	Pantoja et al., 2021
MW709280.1	*Ampullaceana balthica*	Kudlai et al., 2021
KT030050.1	*Peregriana dolgini*	Vinarski et al., 2016
KX056263.1	*Radix labiata*	Aksenova et al., 2016
LC659117.1	*Radix rufescens*	Saito et al., 2021
LC659107.1	*Radix rubiginosa*	
LC659114.1	*Radix alticola*	
LC659144.1	*Radix cf. plicatula*	
HQ283270.1	*Radix natalensis*	Correa et al., 2010
OP174292.1	*Radix auricularia*	Al-Asadi, 2021
AY841295.1	*Succinea striata*	Wade et al., 2006
Y16756.1 Y16757.1 Y16758.1 Y16759.1 Y16760.1	*Cochlicopa lubricella*	Armbruster, Bernhard, 2008
Y16762.1 Y16761.1	*Cochlicopa lubrica*	
AY382150.1	*Strigilodelima conspersa*	Uit De Weerd, 2004

Приложение 7 (продолжение)

Номер в GenBank	Вид	Ссылки
AH013590.2	*Isabellaria clandestina*	Uit de Weerd et al., 2004
KU341313.1	*Cochlicopa lubrica*	Davison et al., 2016
AY014020.1	*Cochlicopa lubricella*	Wade et al., 2001
AY014136.1	*Arianta arbustorum*	
AY014019.1	*Cochlicopa lubrica*	
KM518373.1	*Pupilla syngenes*	Nekola et al., 2015
KM518332.1	*Pupilla hebes*	
KM518377.1	*Pupilla triplicata*	
MK256271.1	*Pupilla muscorum*	Balashov et al., 2019
AY494129.1	*Mastus* sp.	Parmakelis et al., 2005
PP069327.1	*Arianta arbustorum*	Zhang et al., 2024
PP069349.1	*Helicodonta obvoluta*	
KR705059.1	*Arianta arbustorum*	Neiber, Hausdorf, 2015
KJ458584.1	*Arianta arbustorum*	Razkin et al., 2015
KJ458588.1	*Alabastrina atlasica*	
KJ458628.1	*Otala punctata*	
KJ458582.1	*Alabastrina alabastrites*	
MN022677.1	*Monadenia fidelis*	Saadi, Wade, 2019

Приложение 8

Нуклеотидные последовательности, использованные в качестве внешних групп для филогенетических реконструкций на основе нуклеотидных последовательностей гена *cox1*

Номер в GenBank	Вид	Ссылки
MT862415.1	*Planorbarius corneus*	Leerhoei, 2020
FR797858.1 FR797857.1	*Planorbarius corneus*	Vinarski et al., 2011
AY282590.1	*Planorbarius corneus*	Albrecht et al., 2006
AY350524.1	*Planorbarius corneus*	Pfenninger et al., 2003
PP203070.1 PP203069.1 PP203067.1	*Planorbarius corneus*	Schols et al., 2024
MW600083.1	*Planorbarius corneus*	Menabit, 2021
AY227370.1	*Planorbarius* sp.	Remigio, Hebert, 2003
OQ954057.1	*Planorbarius corneus*	Schols et al., 2024
DQ084837.1	*Biomphalaria stanleyi*	Jørgensen et al., 2007
DQ084839.1 DQ084843.1 DQ084844.1	*Biomphalaria sudanica*	
DQ084823.1 DQ084824.1	*Biomphalaria glabrata*	
MZ778967.1	*Biomphalaria tenagophila*	de Araújo et al., 2023
HM768935.1	*Biomphalaria choanomphala*	Standley et al., 2011
MG431963.1	*Biomphalaria sudanica*	Zhang et al., 2018
MK396044.1 MK395898.1	*Biomphalaria glabrata*	Palasio et al., 2019
KF926182.1	*Biomphalaria glabrata*	Palasio et al., 2017
MF544894.1	*Planorbella trivolvis*	deWaard et al., 2019
MF545158.1 MF545157.1 MF544159.1	*Succinea putris*	
KY319368.1	*Planorbella trivolvis*	Schultz, Adema, 2017b
OL944440.1	*Planorbella trivolvis*	Adema, 2021
KT705384.1	*Succinea* sp.	Telfer et al., 2015
JN627206.1	*Succinea putris*	White et al., 2011
AY150082.1	*Succinea newcombiana*	Rundell et al., 2004

Приложение 8 (продолжение)

Номер в GenBank	Вид	Ссылки
KY904740.1	*Succinea* sp.	Vidigal et al., 2018
MF983685.1	*Succinea* sp.	Slapcinsky, Mulcahy, 2017
AY150073.1	*Succinea lumbalis*	Rundell et al., 2004
AY150072.1	*Succinea* sp.	
AY150078.1	*Succinea lutulenta*	
AY148573.1	*Succinea rubella*	
AY148572.1	*Succinea canella*	
AY148575.1	*Succinea modesta*	
AY150088.1	*Succinea manuana*	
JQ417194.1	*Helix aspersa*	Gaitán-Espitia et al., 2013
KF918625.1	*Radix zazurnensis*	Paltser et al., 2014
MH189995.1 MH189939.1	*Ampullaceana lagotis*	Aksenova et al., 2018
MH189853.1	*Ampullaceana fontinalis*	
MH189979.1	*Peregriana dolgini*	
MH189854.1	*Ampullaceana dipkunensis*	
MH189866.1	*Radix euphratica*	
MW675330.1	*Ampullaceana balthica*	Vinarski et al., 2022
HG932229.1	*Radix ampla*	Schniebs et al., 2019
KX056253.1	*Peregriana labiata*	Aksenova et al., 2016
MK779205.1	*Radix auricularia*	Siju et al., 2019
MN737037.1	*Radix natalensis*	Aksenova et al., 2019
KM067685.1	*Radix rubiginosa*	Bolotov et al., 2017
NC069953.1	*Succinea erythrophana*	Ma, Zhang, 2023

Приложение 9

Нуклеотидные последовательности, использованные в качестве внешних групп для филогенетических реконструкций на основе нуклеотидных последовательностей гена *cytb*

Номер в GenBank	Вид	Ссылки
MT862415.1	*Planorbarius corneus*	Leerhoei, 2020
FR797880.1 FR797881.1	*Planorbarius corneus*	Vinarski et al., 2011
MG431966.1 MG431965.1	*Biomphalaria glabrata*	Zhang et al., 2018
MG431962.1	*Biomphalaria pfeifferi*	
MG431963.1	*Biomphalaria sudanica*	
MG431964.1	*Biomphalaria choanomphala*	
AY380567.1	*Biomphalaria glabrata*	DeJong et al., 2004
OX365791.1	*Biomphalaria glabrata*	Wheeler et al., 2018
AY380531.1	*Biomphalaria glabrata*	DeJong et al., 2004
PV213447.1 PV213448.1	*Biomphalaria pfeifferi*	Osman et al., 2025
NC010220.1	*Biomphalaria tenagophila*	Jannotti-Passos et al., 2010
OZ182237.1	*Anisus vorticulus*	O'Ferrall et al., 2025
MW221941.1	*Lymnaea stagnalis*	Koene et al., 2024
JN627206.1	*Succinea putris*	White et al., 2011
JQ417194.1	*Helix aspersa*	Gaitán-Espiti et al., 2013

Приложение 10

Нуклеотидные последовательности моллюсков рода *Biomphalaria,* использованные для анализа внутривидового и межвидового генетического полиморфизма

Вид	Номер последовательности в базе данных GenBank (указан ген)			Ссылки
	рДНК	*cytB*	*cox1*	
B. glabrata	AY030374.1–AY030377.1, MG461591.1, MG461592.1, MT753115.1, AY197848.1–AY197899.1	AY380531.1, AY380567.1, MG431965.1, MG431966.1, FC857678.1, FC858795.1, NC005439.1, EW996954.1, CO635919.1, CN549147.1, EW997298.1 EW997320.1, ES746914.1	DQ084823.1, DQ084824.1, KF926182.1, KF926183.1, MK395961.1, MK395897.1, MK395896.1, MK395898.1, MK395903.1, MK395907.1, MK395961.1, MK395962.1, MK396044.1	DeJong et al., 2001; Dejong et al., 2003; DeJong et al., 2004; Jørgensen et al., 2007; Hanelt et al., 2008; Lockyer et al., 2008; Palasioet al., 2017; Zhang et al., 2018; Laidemitt et al., 2020
B. choanomphala	—	MG431964.1	HM768935.1, HM768932.1	Standley et al., 2011; Zhang et al., 2018
B. stanleyi	—	—	DQ084837.1, DQ084879.1, EU141215.1–EU141221.1, EU141154.1, EU141160.1	Jørgensen et al., 2007; Plam et al., 2008
B. sudanica	EU141208.1, EU141210.1, DQ084900.1–DQ084904.1, AJ278440.1, AY030368.1, AY030369.1, AY126598.1, MG461589.1	MG431963.1	DQ084838.1–DQ084844.1, DQ084886.1, EU141227.1–EU141171.1, MG431963.1, HM768903.1, OL423117.1, AF199087.1, AF199088.1, AF199106.1, AF199109.1	Martin, Rollinson, 1999; Campbell et al., 2000; DeJong et al., 2001; Angers et al., 2003; Jørgensen et al., 2007; Plam et al., 2008; Standley et al., 2010; Zhang et al., 2018; Laidemitt et al., 2020
B. tenagophila	MT017568.1, MT017569.1	MT017568.1, MT017569.1	MZ778967.1, MZ778968.1, KF926151.1–KF926194.1, MK395809.1–MK395877.1, MF380482.1	Palasio et al., 2017; Palasio et al., 2019; Goveia et al., 2023; Araújo et al., 2023

Приложение 10 (продолжение)

B. pfeifferi	AY030361.1–AY030364.1, AY126589.1, AY126596.1, AY197930.1–AY197976.1, DQ084893.1–DQ084902.1, KX644865.1–KX644872.1, KY025433.1–KY025444.1, MG461588.1, MN064846.1–MN064848.1, PQ783664.1, PQ783665.1	PV213442.1–PV213448.1, MG431962.1	PP510666.1, PP510669.1, DQ084829.1–DQ084842.1, OL423116.1, MG431962.1, PV213442.1–PV213448.1	DeJong et al., 2001; Jørgensen et al., 2007; Babiker et al., 2017; Zhang et al., 2018; Laidemitt et al., 2020; Okeke et al., 2020; Tchami Mbagnia et al., 2020; Dusabe et al., 2024; Fadilatou Foule et al., 2025; Osman et al., 2025
B. straminea	AY030381.1	MF480756.1, NC036993.1	KF926184.1–KF926188.1, KY697200.1–KY697248.1, MK396032.1, MK396058.1, MF179807.1, MF179844.1, MF179847.1, MK396017.1, MK396022.1	DeJong et al., 2001; Palasio et al., 2017; Zeng, 2017; Palasio et al., 2019; Zhou et al., 2019
B. alexandrina	AY030372.1	—	DQ084825.1, DQ084868.1, KF412766.1	DeJong et al., 2001; Jørgensen et al., 2007
B. amazonica	AY030385.1	—	—	DeJong et al., 2001

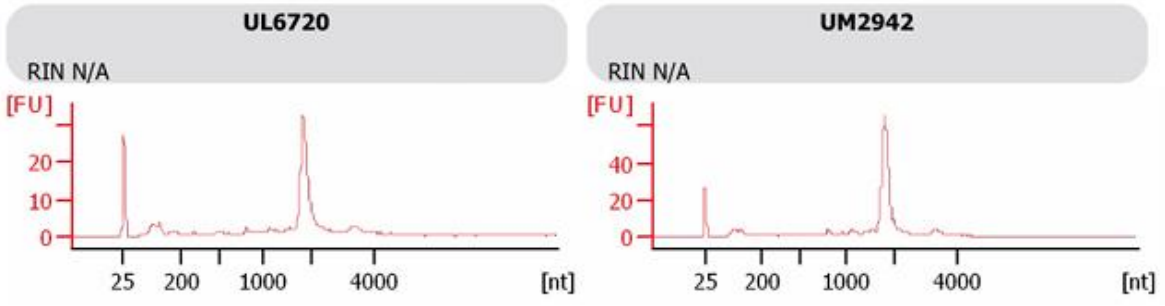
Приложение 11

Номера нуклеотидных последовательностей генотипированных трематод

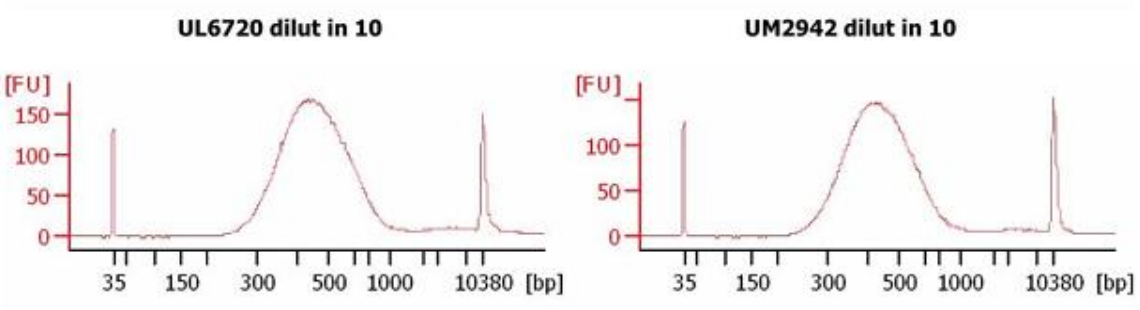
Вид	Номер последовательности в базе данных GenBank (указаны участки генома)	Регион сбора
Leucochloridium paradoxum	***cox 1***: MZ676715.1, MZ676716.1, MZ676717.1, ON526785.1, ON526786.1 MZ676718.1, MZ676719.1, MZ676720.1, MZ676721.1, ON526787.1, MZ676722.1, MZ676723.1, MZ676724.1, MZ676725.1, MZ676726.1, MZ676727.1, MZ676728.1, MZ676729.1, MZ676730.1, MZ676731.1, ON526791.1, ON526792.1, ON526793.1, ON526794.1, ON526795.1, ON626796.1, ON626797.1, ON626798.1, ON626799.1, ON526800.1, MZ676732.1 **рДНК**: KP938187.1, MH101511.1, MK377352.1, JN639012.1 **RAPD**: KY512570.1, KY512573.1	Россия, Ленинградская область
	cox 1: MZ676735.1, MZ676736.1, ON526788.1, ON526789.1, ON526790.1	Россия, Ярославская область
	cox 1: MZ676733.1, MZ676734.1, ON526801.1, ON526802.1	Белоруссия, Витебская обл.
Leucochloridium perturbatum	**рДНК**: KP938186.1, JN639011.1, MK377349.1, MK377351.1 **RAPD**: KY512571.1, KY512574.1	Россия, Ленинградская область
Leucochloridium vogtianum	**рДНК**: KU351661.1 **RAPD**: KY512572.1	Россия, Ленинградская область
Cotylurus brevis	**рДНК**: PZ166581	Россия, Ленинградская область
Echinostoma spiniferum	**рДНК**: PZ166666	Россия, Ленинградская область
Notocotylus ephemera	**рДНК**: OP981949.1, OQ418075.1, OP981950.1, OQ418076.1, OP981951.1, OQ418077.1, OP981952.1, OQ418079.1	Россия, г. Санкт-Петербург
Plagiorchis multiglandularis	***cox 1***: PV563782.1	Россия, Ленинградская область
Bilharziella polonica	***cox 1***: MK264353, OP981953, OQ418080.1, OQ418074.1, OP981948.1	Россия, Ленинградская область
Aptorchis sp.	**рДНК**: PZ122806	Россия, республика Алтай, плоскогорье Укок

Приложение 12

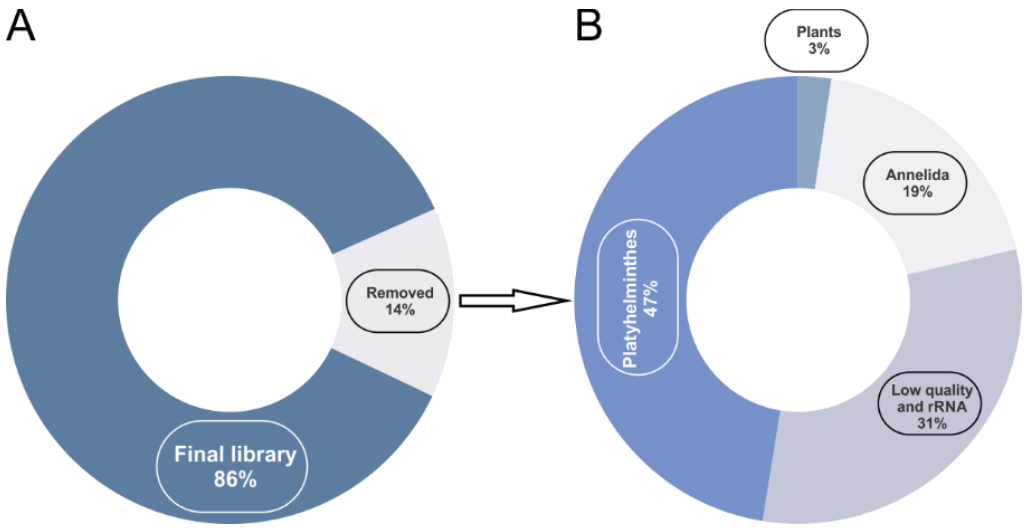
Характеристики препаратов РНК, кДНК и состав данных, использованных для аннотации транскриптома гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus*



12–1. Хроматограммы образцов тотальной РНК из гемоцитов



12–2. Хроматограммы готовых библиотек кДНК, полученных на РНК гемоцитов



12–3. Состав окончательных данных, использованных для аннотации транскриптома *Planorbarius corneus*. A – Доля удаленных последовательностей в исходных данных; B – Причины отбрасывания последовательностей и доли прочтений, удаленных по определенной причине от общего числа пропущенных прочтений.

Приложение 13

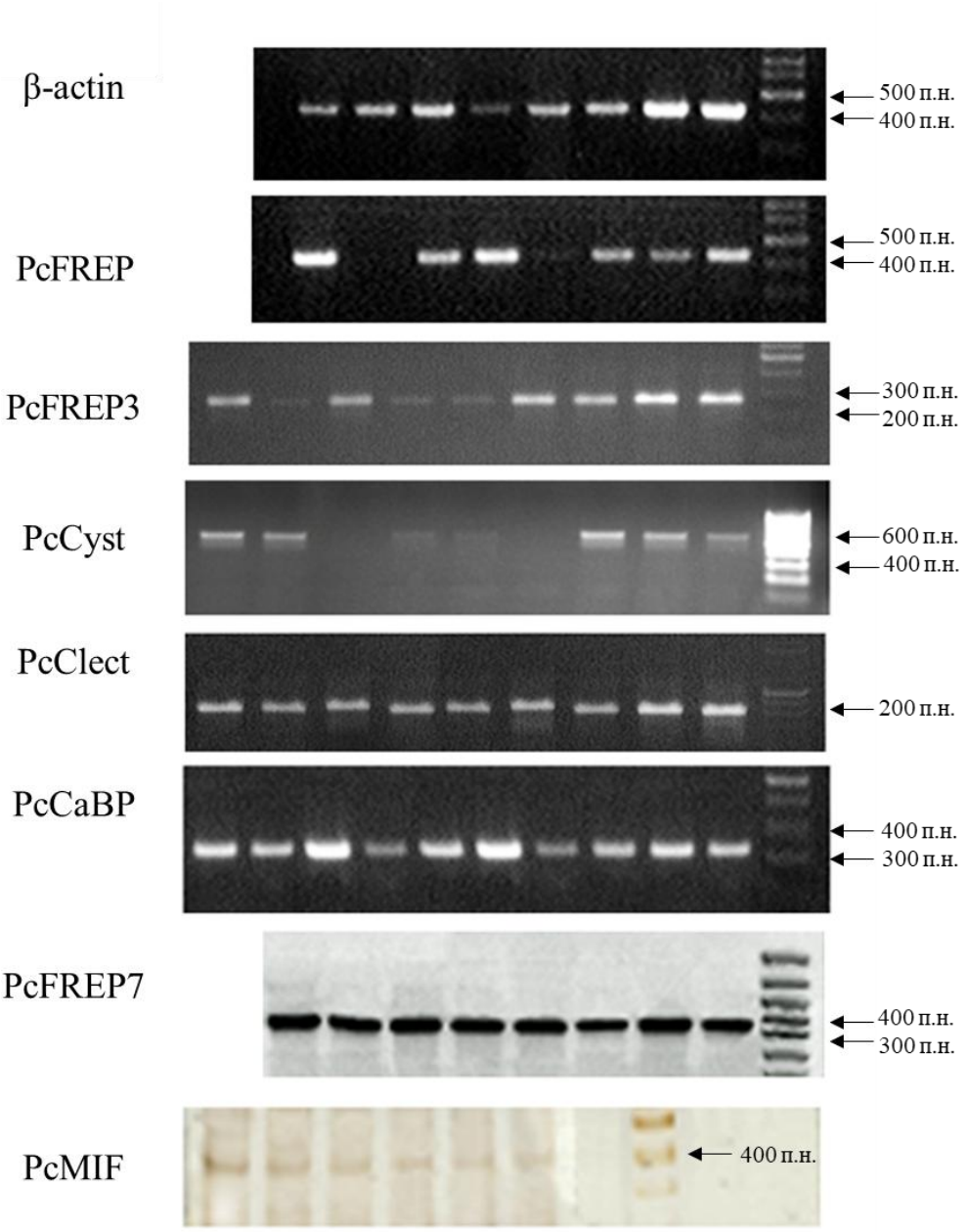
Температурный профиль для проведения классической ПЦР с праймерами на транскрипты, кодирующие факторы иммунных реакций

1. 95°C, 3 минуты – инициирующая денатурация.
2. 95°C, 40 секунд – денатурация.
3. $T_{отжига}$ °C (указано ниже), 1 минута – отжиг праймеров.
4. 72°C, 1 минута – элонгация
5. Повтор этапов 2–4 в течение 45 циклов.
6. 72°C, 7 минут – дополнительная элонгация.
7. 4.0°C, ∞ – хранение

Температуры отжига праймеров и длины ПЦР-продуктов		
Праймеры	T°C	Длина продукта ПЦР, п.н.
β-actin	59	432
PcFREP	63	433
PcFREP3	60.2	281
PcFREP7	54	354
PcClect	63	221
PcCaBP	60	308
PcCyst	53	597
PcMIF	62	400

Приложение 14

Электрофорез ПЦР-продуктов, полученных методом ОТ-ПЦР с праймерами на транскрипты, кодирующие факторы защитных реакций*



* слева указаны названия соответствующих праймеров, справа указаны длины зон маркеров молекулярного веса (последняя дорожка)

Приложение 15

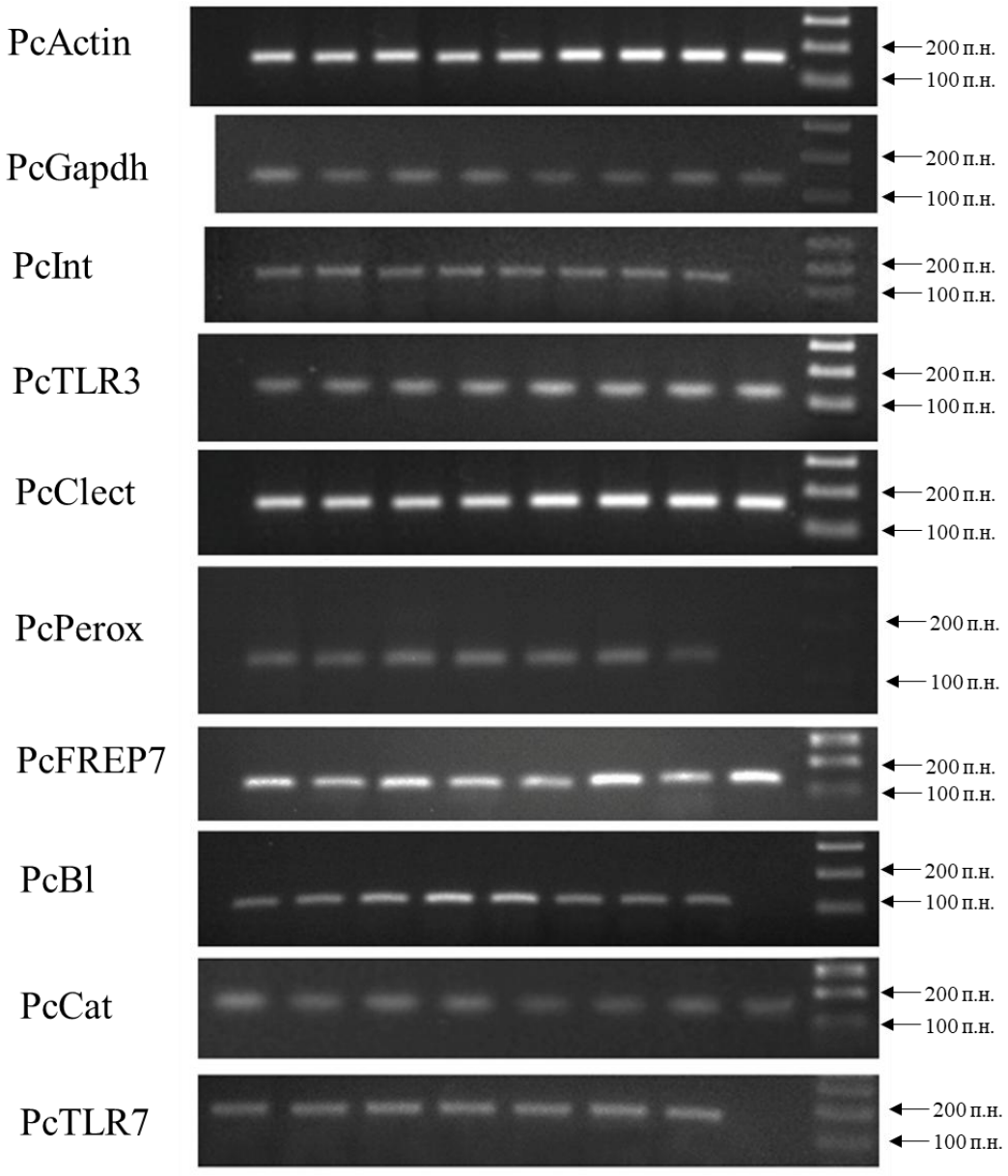
Температурный профиль для проведения ПЦР в реальном времени праймерами на транскрипты, кодирующие факторы иммунных реакций

1. 95°C, 5 минут – инициирующая денатурация.
2. 95°C, 15 секунд – денатурация.
3. $T_{отжига}$ °C (указано ниже), 20 секунд – отжиг праймеров, считывание флуоресцентного сигнала.
4. 72°C, 20 секунд – элонгация.
5. Повтор этапов 2–4 в течение 45 циклов.
6. 65–95°C (шаг 0.5°C) 5 секунд – считывание флуоресцентного сигнала, построение кривой плавления.
7. 4.0°C, ∞ – хранение

Температуры отжига праймеров и длины ПЦР-продуктов		
Праймеры	T°C	Длина продукта ПЦР, п.н.
PcGapdh	59.5	161
PcActin	61	156
PcPerox	60	172
PcSP	61	165
PcClect	56	170
PcTLR3	60	166
PcTLR7	59.5	202
PcInt	59.5	180
PcFREP7	60.3	174
PcCat	60	170
PcBl	60	147

Приложение 16

Гель-электрофорезы ПЦР-продуктов, полученных со специфическими праймерами на транскрипты, кодирующие факторы иммунных реакций, которые были использованы для ПЦР в реальном времени *



* слева указаны названия соответствующих праймеров, справа указаны длины зон маркеров молекулярного веса (последняя дорожка)

Приложение 17

Нуклеотидные последовательности, использованные для филогенетической реконструкции на основе аминокислотных последовательностей толл-подобных рецепторов в качестве внешних групп

Номер в GenBank	Вид	Ссылка
KAI8779637.1	*Biomphalaria glabrata*	Bu et al., 2022
KAI8752658.1		
KAI8748280.1		
KAK0066803.1	*Biomphalaria pfeifferi*	Bu et al., 2023
KAK0055051.1		
KAK0055734.1		
KAH9524503.1	*Bulinus truncatus*	Young et al., 2022
KY608728.1	*Oncomelania hupensis*	Zhao et al., 2018
XP005110330.1	*Aplysia californica*	Knudsen et al., 2006
MT683583.1	*Littorina littorea*	Gorbushin, 2020
GFS01774.1	*Elysia marginata*	Maeda et al., 2021
GFN83043.1	*Plakobranchus ocellatus*	
XP011414273.2	*Crassostrea gigas*	Mrowicki et al., 2025
XP022335982.1	*Crassostrea virginica*	Gómez-Chiarri et al.., 2015
XP052073418.1	*Mytilus californianus*	Paggeot et al., 2015
KC344672.1	*Mytilus galloprovincialis*	Toubiana et al., 2013
UCK81511.1	*Arenicola marina*	Stanovova et al., 2022

Приложение 18

Список доменов, закодированных в транскриптоме гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus* и гомологичных доменам факторов иммунитета

Домены (указаны функциональные группы молекул иммунитета, в которых они встречаются)	Количество совпадений для доменов	
	IPS	BlastP
Адгезия и распознавание патогенов		
Домены иммуноглобулинового суперсемейства	643	71
Фибриногеновые домены	176	152
Домены, богатые лейциновыми повторами	314	316
Домены толл-подобных рецепторов	76	139
Домены скавенджер-рецепторов	31	29
Домены связывания с углеводами	72	2
Домены макрофагального маннозо-связывающего рецептора	5	32
Домены распознавания пептидогликанов	11	12
Липополисахарид-связывающие домены	18	30
Домен, связывающийся с грамотрицательными микроорганизмами	5	1
Домены связывания с глюканом		9
Домены RIG-рецепторов	31	69
Домены лектинов	567	330
Домены лектинов С-типа	241	140
Домены лектинов F-типа	32	28
Домены фиколина		146
Домены конкавалина	35	12
Домены галектинов	32	27
Домены селектинов	9	11
Домены интегринов	74	77
домены дерматопонтина	19	17
Домены межклеточной адгезии	—	1
Домены PAN/Apple	—	46
Передача сигнала в клетку, регуляция активности клеток иммунитета		
Домены ITIM	4	3
Сериновые протеазы и ингибиторы	374	112

Приложение 18 (продолжение)

Домены (указаны функциональные группы молекул иммунитета, в которых они встречаются)	Количество совпадений для доменов	
	IPS	BlastP
Домены серпина	19	22
Домены дезаминазы цитидина	44	5
Домены белков теплового шока	300	166
Мобильные генетические элементы LINE	143	209
Система комплемента и антимикробные белки		
Домены компонентов комплемента	160	82
Домены тиоэфор-содержащих белков		24
Домены C1q	43	18
Домены антимикробных белков	16	
Домены мацина		1
Токсины и факторы цитотоксичности		
Домены биомфализина	41	42
Домены ахацина	—	10
Домены аплизианина	—	12
Домены супероксиддисмутазы	16	19
Домены глутатионпероксидазы	9	10
Домены глутатионредуктаз	4	2
Домены глутатион-S-трансфераз	74	28
Домены синтазы оксида азота	9	6
Домены пероксиредоксина	20	19
Домены церулоплазмина	22	15
Домены тиоредоксина	257	67
Домены каталаз	22	8
Домены тирозиназ	13	18
Домены фенолоксидазы	2	
Домены металлопротеиназ их ингибиторов	196	35
Домены лакказы	3	6
Домены лизоцима	11	7

Приложение 18 (продолжение)

Домены (указаны функциональные группы молекул иммунитета, в которых они встречаются)	Количество совпадений для доменов	
	IPS	BlastP
Регуляция клеточного цикла		
Домены белка, связывающегося с митоген-автивируемыми протеин-киназами	44	54
Домены Х-сцепленного ингибитора белка апоптоза	15	77
Домены циклинов	140	141
Домены циклин-зависимых киназ	65	102
Домены фактора, индуцирующего апоптоз	6	8
Домены регуляции апоптоза	58	48
Домены регулятора аппоптоза	39	29
Домены каспаз	171	52
Домен CD-109	8	—
Домен ингибитора апоптозного антигена	—	4
Регуляция иммунного ответа		
Домены интерлейкинов	137	84
Домены фактора, ингибирующего миграцию макрофагов	47	13
Домены фактора некроза опухолей	155	88
Домены рецептора к фактору некроза опухолей	52	35
Домены гранулина	3	3
Домены цистатина	16	8
Домены альфа-2-макроглобулина	21	36
Всего доменов	5385	3404
Уникальных белков	4405	2687

Приложение 19

Относительный уровень экспрессии генов рецепторов распознавания патогенов и адгезии в гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus* *

Группы	Незараженные (H) (n=15)	Все заражённые (З)	*Bilharziella polonica (Bp)* (n=10)	*Cotylurus brevis (Cb)* (n=10)	*Notocotylus ephemera (Ne)* (n=10)	*Plagiorchis multiglandularis (Pm)* (n=10)	*Echinostoma spiniferum (Es)* (n=10)
Толл-подобный рецептор 3 (*PcTLR3*)							
p-value	0.78 (0.69; 0.96)	0.9 (0.48; 1.52)	**1.69 (1.52; 1.97)**	**1.56 (1.41; 1.90)**	0.72 (0.51; 0.80)	**0.28 (0.23; 0.37)**	0.89 (0.68; 1.22)
H	—	—	*p< 0.01*	*p< 0.01*	—	*p< 0.001*	—
Bp	*p< 0.01*	—	—	—	*p< 0.01*	*p< 0.01*	*p< 0.01*
Cb	*p< 0.01*	—	—	—	*p< 0.01*	*p< 0.01*	*p< 0.01*
Ne	—	—	*p< 0.01*	*p< 0.01*	—	*p< 0.01*	
Pm	*p< 0.001*	—	*p< 0.01*	*p< 0.01*	—	—	*p< 0.001*
Es	—	—	*p< 0.05*	*p< 0.05*	—	—	—
Толл-подобный рецептор 7 (*PcTLR7*)							
p-value	1.54 (1.09; 2.16)	1.21 (0.54; 1.68)	**0.54 (0.54; 0.69)**	1.56 (1.29; 1.68)	1.74 (1.32; 2.53)	**0.28 (0.22; 0.35)**	1.55 (1.12; 2.10)
H	—	—	*p< 0.001*	—	—	*p< 0.001*	—
Bp	*p< 0.001*	—	—	*p< 0.001*	*p< 0.001*	*p< 0.01*	*p< 0.01*
Cb	—	—	*p< 0.001*	—	—	*p< 0.001*	—
Ne	—	—	*p< 0.001*	—	—	*p< 0.001*	—
Pm	*p< 0.001*	—	*p< 0.01*	*p< 0.001*	*p< 0.001*	—	*p< 0.001*
Es	—	—	*p< 0.01*	—	—	*p< 0.001*	
С-лектин (*PcClect*)							
p-value	12.12 (5.23; 3.00)	**20.98 (13.23; 3.95)**	**25.03 (14.37; 4.11)**	**23.10 (20.97; 5.92)**	**14.09 (12.00; 3.75)**	**17.51 (8.33; 3.07)**	**24.04 (13.22; 8.75)**
H	—	p<0.05	p<0.001	p<0.01	—	p<0.01	—
Bp	*p< 0.001*	—	—	—	—	—	—
Cb	*p< 0.01*	—	—	—	—	*p< 0.001*	*p< 0.05*
Ne	—	—	—	—	—	*p< 0.001*	*p< 0.05*
β-интегрин (*PcInt*)							
p-value	1.12 (0.78; 1.44)	**3.64 (2.27; 5.15)**	2.28 (1.00; 2.98)	**4.73 (3.28; 6.03)**	**4.96 (3.41; 5.29)**	**4.69 (3.08; 5.29)**	**3.18 (2.70; 5.22)**
H	—	*p< 0.01*	—	*p< 0.01*	*p< 0.001*	*p< 0.001*	*p< 0.001*
Bp	—	—	—	*p< 0.05*	*p< 0.05*	*p< 0.05*	*p< 0.05*
Cb	*p< 0.01*	—	*p< 0.05*	—	—	—	—
Ne	*p< 0.001*	—	*p< 0.05*	—	—	—	—
Pm	*p< 0.001*	—	*p< 0.05*	—	—	—	—
Es	*p< 0.001*	—	*p< 0.05*	—	—	—	—

* представлены значения $2^{-\Delta\Delta Ct}$, относительное генов β-актина и GAPDH (Me (К1; К3)); p-value – уровень статистической значимости различий.

Приложение 20

Относительный уровень экспрессии гена фибриноген-подобных белков в гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus* *

Группы	Незараженные (Н)	Все заражённые (З)	*Bilharziella polonica (Bp)*	*Cotylurus brevis (Cb)*	*Notocotylus ephemera (Ne)*	*Plagiorchis multiglandularis (Pm)*	*Echinostoma spiniferum (Es)*
Фибриногенподобные белки (*PcFREP)*							
p-value	0.38 (0.22; 0.48)	**0.18 (0.09; 0.32)**	**0.12 (0.11; 0.29)**	0.28 (0.24; 0.33)	**0.16 (0.07; 0.21**)	0.20 (0; 0.33)	**0.12 (0.11; 0.28)**
Н	—	*p< 0.05*	*p< 0.05*	—	*p< 0.05*	—	*p< 0.05*
Bp	*p< 0.05*	—	—	—	—	—	—
Cb	—	—	—	—	*p< 0.05*	—	—
Ne	*p< 0.05*	—	—	*p< 0.05*	—	—	—

* уровень экспрессии относительно гена β-актина (Me (K1; K3)); p-value – уровень статистической значимости различий.

Приложение 21

Интенсивность флуоресценции красителей LysoTracker, MitoTracker, SYTO16 и SYTO62 в популяциях гемоцитов заражённых *Plagiorchis multiglandularis* и незаражённых моллюсков *Planorbarius corneus** (по: Serebryakova, Tokmakova, Prokhorova, Ataev, 2022, с изменениями)

Популяции гемоцитов	**LysoTracker**		**MitoTracker**	
	Незаражённые	Заражённые	Незаражённые	Заражённые
A	47.27×10^3 (31.02×10^3; 57.32×10^3)	42.73×10^3 (39.85×10^3; 56.29×10^3)	29.34×10^3 (23.28×10^3; 45.95×10^3)	29.39×10^3 (22.80×10^3; 40.44×10^3)
B	94.95×103 (76.84×103; 119.48×103)	104.01×10^3 (101.34×10^3; 142.05×10^3)	78.25×10^3 (52.89×10^3; 105.68×10^3)	68.13×10^3 (47.09×10^3; 106.45×10^3)
C	27.93×10^3 (26.27×10^3; 30.84×10^3)	27.76×10^3 (24.44×10^3; 35.42×10^3)	19.91×10^3 (15.30×10^3; 30.16×10^3)	25.48×10^3 (13.74×10^3; 41.20×10^3)
Популяции гемоцитов	**SYTO16**		**SYTO62**	
	Незаражённые	Заражённые	Незаражённые	Заражённые
A	372.41×10^3 (254.93×10^3;4 67.08×10^3)	378.82×10^3 (296.09×10^3; 600.19×10^3)	30.40×10^3 (23.84×10^3; 64.23×10^3)	35.86×10^3 (30.61×10^3; 52.14×10^3)
B	463.49×10^3 (281.40×10^3; 652.47×10^3)	375.31×10^3 (260.99×10^3; 995.57×10^3)	115.29×10^3 (90.60×10^3; 196.68×10^3)	180.76×10^3 (109.83×10^3; 264.98×10^3)
C	146.36×10^3 (70.45×10^3; 180.73×10^3)	88.56×10^3 (76.21×10^3; 180.15×10^3)	50.76×10^3 (42.24×10^3; 60.64×10^3)	54.76×10^3 (45.35×10^3; $61.99\times\times10^3$)

***** для каждого значения приведены медиана и интерквантильный размах (Me (K1; K3)).

Приложение 22

Морфологические характеристики и уровни флуоресценции красителей LysoTracker и SYTO62 в популяциях клеток гемолимфы заражённых *Plagiorchis multiglandularis* и незаражённых моллюсков *Planorbarius corneus**
(по: Serebryakova, Tokmakova, Prokhorova, Ataev, 2022, с изменениями)

Популяции гемоцитов	**FS**		**SS**	
	Незаражённые	Заражённые	Незаражённые	Заражённые
1	**19.02×10^5 * (17.23×10^5; 19.39×10^5)**	**17.92×10^5 * (16.03×10^5; 18.28×10^5)**	113.88×10^3 (101.29×10^3; 128.93×10^3)	127.37×10^3 (107.28×10^3; 154.92×10^3)
2	**16.67×10^5** (15.96×10^5; 17.46×10^5)**	**15.12×10^5** (13.88×10^5; 15.68×10^5)**	96.53×10^3 (83.22×10^3; 111.18×10^3)	93.22×10^3 (75.50×10^3; 152.47×10^3)
3	26.49×10^5 (24.99×10^5; 27.68×10^5)	26.14×10^5 (23.65×10^5; 28.05×10^5)	216.53×10^3 (199.03×10^3; 229.13×10^3)	210.45×10^3 (194.85×10^3; 241.28×10^3)
4	13.91×10^5 (12.38×10^5; 14.93×10^5)	12.97×10^5 (12.66×10^5; 15.05×10^5)	193.12×10^3 (118.99×10^3; 233.43×10^3)	227.74×10^3 (193.59×10^3; 252.13×10^3)

Популяции гемоцитов	**LysoTracker**		**SYTO62**	
	Незаражённые	Заражённые	Незаражённые	Заражённые
1	**67.99×10^3* (47.78×103; 88.71×10^3)**	**87.54×10^3* (68.26×10^3; 119.30×10^3)**	17.75×10^3 (12.11×10^3; 28.83×10^3)	42.62×10^3 (22.10×10^3; 53.10×10^3)
2	46.74×10^3 (34.59×10^3; 54.22×10^3)	40.66×10^3 (33.10×10^3; 55.70×10^3)	42.10×10^3 (25.37×10^3; 62.42×10^3)	35.96×10^3 (33.10×10^3; 50.78×10^3)
3	98.50×103 (76.75×10^3; 124.11×10^3)	114.22×10^3 (104.97×10^3; 145.88×10^3)	132.87×10^3 (95.16×10^3; 225.21×10^3)	208.90×10^3 (107.09×10^3;2 75.81×10^3)
4	20.46×10^3 (17.40×10^3; 25.63×10^3)	23.68×10^3 (19.44×10^3; 25.86×10^3)	65.00×10^3 ($48.02\times10^3$3; 77.80×10^3)	60.91×10^3 (49.10×10^3; 71.07×10^3)

***** для каждого значения приведены медиана и интерквантильный размах (Me (К1; К3)); уровень статистической значимости различий: *p<0.05, **p<0.01; выделены значения, достоверно различающиеся в группах зараженных и незаражённых моллюсков.

Приложение 23

Морфологические характеристики и уровни флуоресценции красителей LysoTracker и SYTO62 в популяциях клеток гемолимфы заражённых *Plagiorchis multiglandularis* и незаражённых моллюсков *Planorbarius corneus** (по: Serebryakova, Tokmakova, Prokhorova, Ataev, 2022, с изменениями)

Популяции гемоцитов		**FS**		**SS**	
		Незаражённые	Заражённые	Незаражённые	Заражённые
A	A_1	**18.14×10^5 (16.89×10^5; 18.87×10^5)***	**16.19×10^5 (15.85×10^5; 16.89×10^5)***	**9.96×10^4 (9.01×10^4; 11×10^4) ***	**8.53×10^4 (6.59×10^4; 9.68×10^4) ***
	A_2	**16.59×10^5 (15.97×10^5; 17.46×10^5)***	**15.34×10^5 (14.18×10^5; 15.68×10^5)***	**8.57×10^4 (7.79×10^4; 9.38×10^4) ***	**7.33×10^4 (6.44×10^4; 8.26×10^4) ***
	A_3	21.75×10^5 (20.00×10^5; 23.51×10^5)	20.41×10^5 (19.20×10^5; 21.81×10^5)	**12.58×10^4 (11.63×10^4; 13.47×10^4) ***	**10.13×10^4 (8.68×10^4; 12.72×10^4) ***
	A_4	15.22×10^5 (14.07×10^5; 15.94×10^5)	14.46×10^5 (13.04×10^5; 15.47×10^5)	8.02×10^4 (7.15×10^4; 8.93×10^4)	7.15×10^4 (6.21×10^4; 8.68×10^4)
Популяции гемоцитов		**LysoTracker**		**SYTO62**	
		Незаражённые	Заражённые	Незаражённые	Заражённые
A	A_1	62.65×10^3 (45.24×10^3; 74.40×10^3)	86.84×10^3 (58.39×10^3; 99.96×10^3)	**15.93×10^3 ($11.71*10^3$; $24.91*10^3$) ***	**28.26×10^3 (18.93×10^3; 47.89×10^3) ***
	A_2	46.82×10^3 (34.08×10^3; 53.16×10^3)	41.74×10^3 (32.78×10^3; 53.19×10^3)	40.26×10^3 (24.66×10^3; 56.06×10^3)	32.05×10^3 (28.21×10^3; 47.29×10^3)
	A_3	78.15×10^3 (56.41×10^3; 99.25×10^3)	80.93×10^3 (70.61×10^3; 113.51×10^3)	108.42×10^3 (67.49×10^3; 174.32×10^3)	142.02×10^3 (78.36×10^3; 172.39×10^3)
	A_4	22.47×10^3 (16.07×10^3; 27.32×10^3)	23.24×10^3 (20.63×10^3; 27.52×10^3)	68.21×10^3 (51.55×10^3; 89.43×10^3)	71.00×10^3 (59.65×10^3; 84.81×10^3)

***** для каждого значения приведены медиана и интерквантильный размах (Me (K1; K3)); уровень статистической значимости различий: *p<0.05, **p<0.01; выделены значения, достоверно различающиеся в группах зараженных и незаражённых моллюсков.

Приложение 23 (продолжение)*

Популяции гемоцитов		**FS**		**SS**	
		Незаражённые	Заражённые	Незаражённые	Заражённые
B	B_1	**24.64×10^5 (21.67×10^5; 26.01×10^5)***	**19.82×10^5 (19.30×10^5; 21.71×10^5)***	17.68×10^4 (16.78×10^4; 19.34×10^4)	15.65×10^4 (14.25×10^4; 18.36×10^4)
	B_2	**22.77×10^5 (21.60×10^5; 23.98×10^5)***	**19.62×10^5 (18.35×10^5; 21.81×10^5)***	17.91×10^4 (16.77×10^4; 18.76×10^4)	16.73×10^4 (12.81×10^4; 18.08×10^4)
	B_3	27.66×10^5 (25.88×10^5; 28.62×10^5)	23.51×10^5 (22.89×10^5; 24.43×10^5)	22.70×10^4 (20.59×10^4; 23.71×10^4)	21.87×10^4 (19.47×10^4; 24.08×10^4)
	B_4	26.32×10^5 (24.20×10^5; 28.48×10^5)	22.01×10^5 (19.94×10^5; 22.47×10^5)	21.04×10^4 (20.38×10^4; 22.15×10^4)	19.35×10^4 (18.12×10^4; 21.43×10^4)
Популяции гемоцитов		**LysoTracker**		**SYTO62**	
		Незаражённые	Заражённые	Незаражённые	Заражённые
B	B_1	92.91×10^3 (59.76×10^3; 137.46×10^3)	122.86×10^3 (86.30×10^3; 132.96×10^3)	**27.58×10^3 (17.77×10^3; 48.16×10^3) ***	**52.35×10^3 ($33.04*10^3$; $67.51*10^3$) ***
	B_2	69.38×10^3 (51.83×10^3; 81.35×10^3)	59.56×10^3 (54.01×10^3; 78.91×10^3)	66.60×10^3 (40.71×10^3; 96.14×10^3)	81.51×10^3 (44.06×10^3; 89.21×10^3)
	B_3	102.84×10^3 (81.34×10^3; 124.80×10^3)	114.69×10^3 (105.54×10^3; 145.98×10^3)	140.84×10^3 (105.67×10^3; 228.88×10^3)	150.87×10^3 (105.99×10^3;175.76×10^3)
	B_4	40.99×10^3 (33.07×10^3; 46.48×10^3)	38.31×10^3 (31.29×10^3; 45.91×10^3)	216.58×10^3 (109.72×10^3; 276.69×10^3)	126.00×10^3 (98.24×10^3; 161.42×10^3)

***** для каждого значения приведены медиана и интерквантильный размах (Me (K1; K3)); уровень статистической значимости различий: *p<0.05, **p<0.01; выделены значения, достоверно различающиеся в группах зараженных и незаражённых моллюсков.

Приложение 23 (продолжение)*

Популяции гемоцитов		FS		SS	
		Незаражённые	Заражённые	Незаражённые	Заражённые
C	C_1	13.82×10^5 (12.49×10^5; 14.67×10^5)	13.28×10^5 (12.47×10^5; 15.47×10^5)	21.13×10^4 (18.52×10^4; 23.59×10^4)	23.96×10^4 (19.95×10^4; 27.81×10^4)
	C_2	11.64×10^5 (10.48×10^5; 13.36×10^5)	11.85×10^5 (10.39×10^5; 13.69×10^5)	23.85×10^4 (19.97×10^4; 26.50×10^4)	27.71×10^4 (21.04×10^4; 29.74×10^4)
	C_3	19.03×10^5 (16.82×10^5; 20.01×10^5)	18.25×10^5 (16.05×10^5; 20.45×10^5)	30.70×10^4 (28.63×10^4; 32.36×10^4)	31.57×10^4 (28.09×10^4; 33.28×10^4)
	C_4	11.85×10^5 (10.58×10^5; 12.5910^5)	11.43×10^5 (10.73×10^5; 13.33×10^5)	24.84×10^4 (22.56×10^4; 27.09×10^4)	26.00×10^4 (24.64×10^4; 27.72×10^4)
Популяции гемоцитов		LysoTracker		SYTO62	
		Незаражённые	Заражённые	Незаражённые	Заражённые
C	C_1	84.35×10^3 (59.73×10^3; 107.91×10^3)	82.61×10^3 (73.53×10^3; 119.47×10^3)	26.35×10^3 (17.88×10^3; 38.66×10^3)	43.51×10^3 (26.47×10^3; 56.43×10^3)
	C_2	38.99×10^3 (29.10×10^3; 46.22×10^3)	36.08×10^3 (31.29×10^3; 48.03×10^3)	42.66×10^3 (26.99×10^3; 55.51×10^3)	40.15×10^3 (31.23×10^3; 53.07×10^3)
	C_3	91.67×10^3 (59.52×10^3; 114.64×10^3)	104.26×10^3 (96.07×10^3; 130.11×10^3)	114.38×10^3 (87.74×10^3; 183.28×10^3)	192.79×10^3 (93.56×10^3; 213.17×10^3)
	C_4	19.72×10^3 (17.00×10^3; 23.02×10^3)	20.54×10^3 (17.90×10^3; 22.46×10^3)	58.05×10^3 (42.65×10^3; 68.94×10^3)	53.38×10^3 (42.89×10^3; 55.37×10^3)

***** для каждого значения приведены медиана и интерквантильный размах (Me (K1; K3)); уровень статистической значимости различий: *$p<0.05$, **$p<0.01$; выделены значения, достоверно различающиеся в группах зараженных и незаражённых моллюсков.

Приложение 24

Соотношение популяций гемоцитов у моллюсков *Biomphalaria glabrata* до и через 1–72 часа после иммунизации бактериями *Escherichia coli* (*E. coli*) и фосфатно-солевым буфером (ФСБ) *

Срок после иммунизации/ выборка	Популяции (типы) гемоцитов					
	A (гиалиноциты)		**B (гранулоциты)**		**C (гранулоциты)**	
	ФСБ	*E. coli*	ФСБ	*E. coli*	ФСБ	*E. coli*
0 (n=18)	41.97 (36.66; 50.83)		42.17 (35.49; 46.67)		16.86 (12.07; 20.47)	
1 (n=8 / n=9)	40.77 (31.00; 50.83)	**30.6* (19.95; 34.58)**	40.23 (35.19; 48.57)	49.05 (47.28; 56.49)	13.35 (9.44; 17.61)	14.51 (11.46; 21.65)
3 (n=5 / n=6)	20.00 (19.84; 38.66)	24.89 (14.95; 30.15)	32.85 (29.33; 66.98)	58.98 (41.00; 77.55)	15.51 (13.17; 28.49)	10.26 (7.93; 25.91)
6 (n=5 / n=7)	**17.94** (13.39; 21.14)**	**33.95** (24.26; 35.52)**	**73.98*** (71.49; 74.76)**	**48.03** (47.21; 57.56)**	10.58 (7.65; 11.85)	17.93 (11.40; 28.63)
12 (n=6 / n=6)	27.28 (13.93; 56.34)	**17.24** (11.56; 21.65**)	31.73 (26.60; 44.87)	**55.23** (44.10; 66.46)**	28.71 (10.18; 42.53)	22.95 (18.19; 34.02)
24 (n=6 / n=6)	21.78 (14.84; 28.21)	39.90 (35.66; 43.62)	24.98 (19.63; 32.77)	34.99 (31.37; 36.39)	**45.06*** (25.88; 62.28)**	**26.08** (23.33; 28.97)**
48 (n=5 / n=5)	**21.39*** (20.57; 25.47)**	**19.50** (19.39; 26.99)**	29.93 (27.53; 33.80)	50.87 (43.92; 58.56)	**39.84** (35.20; 49.50)**	22.05 (16.84; 36.28)
72 (n=6 / n=6)	26.50 (19.84; 42.87)	39.10 (23.59; 44.77)	37.67 (27.94; 62.55)	38.24 (31.71; 41.46)	21.37 (17.58; 27.96)	18.89 (15.88; 30.85)

***** для каждого значения приведены медиана и интерквантильный размах (Me (K1; K3)); уровень статистической значимости различий: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005; выделены значения, достоверно различающиеся в группах неиммунизированных и иммунизированных моллюсков.

Приложение 25

Относительный уровень экспрессии генов, кодирующих факторы защитных реакций у моллюсков *Planorbarius corneus,* заражённых трематодами разных видов *

Орган / ткань	Незаражённые (n=15)	Заражённые (n=21)	Заражённые трематодами разных видов				
			Bilharziella polonica (n=12)	*Cotylurus brevis* (n=9)	*Notocotylus ephemera* (n=10)	*Plagiorchis multiglandularis* (n=10)	*Echinostoma spiniferum* (n=8)
Фибриногенподобные белки (*PcFREP*)							
Все тело моллюска	0.32 (0.28; 0.38)	**0,23 (0.12; 0.42)**	0.43 (0.32; 0.46)	**0.47 (0.45; 0.47)**	**0.19 (0.17; 0.20)**	**0.08 (0.06; 0.09)**	0.23 (0.12; 0.25)
Гемолимфа	0.36 (0.24; 0.43)	**0.10 (0.07; 0.17)**	—	—	—	—	—
Гепатопанкреас	0.70 (0.59; 0.79)	**0.91 (0.72; 1.07)**	—	—	—	—	—
Фибриногенподобный белок 3 (*PcFREP3*)							
Все тело моллюска	0.57 (0.48; 0.65)	0.51 (0.38; 0.79)	0.42 (0.28; 0.38)	**1.57 (1.42; 1.65)**	0.68 (0.47; 0.79)	0.50 (0.38; 0.55)	**0.39 (0.32; 0.44)**
Гемолимфа	0.68 (0.46; 0.71)	**0.39 (0.30; 0.47)**	—	—	—	—	—
Гепатопанкреас	0.64 (0.47; 0.81)	**0.87 (0.58; 1.29)**	—	—	—	—	—
Фибриногенподобный белок 7 (*PcFREP7*)							
Все тело моллюска	0.68 (0.66; 0.76)	**0.46 (0.29; 0.63)**	0.85 (0.66; 0.94)	**0.47 (0.38; 0.51)**	**0.29 (0.23; 0.39)**	**0.28 (0.25; 0.36)**	**0.53 (0.52; 0.63)**
Гемолимфа	0.50 (0.35; 0.64)	**0.71 (0.64; 0.97)**	—	—	—	—	—
Гепатопанкреас	0.75 (0.50; 0.90)	**0.47 (0.31; 0.72)**	—	—	—	—	—
С-лектин (*PcClect*)							
Все тело моллюска	0.23 (0.18; 0.30)	**0.79 (0.51; 0.95)**	**0.78 (0.56; 1.00)**	**0.89 (0.77; 0.91)**	**0.92 (0.79; 1.07)**	**0.43 (0.38; 0.50)**	**0.68 (0.40; 0.88)**
Гемолимфа	0.37 (0.31; 0.51)	**0.85 (0.58; 0.93)**	—	—	—	—	—
Гепатопанкреас	0.09 (0.07; 0.13)	**0.23 (0.16; 0.29)**	—	—	—	—	—

* уровень экспрессии относительно гена β-актина (Me (К1; К3выделены значения, достоверно различающиеся у заражённых трематодами моллюсков, по сравнению с незаражёнными.

Приложение 25 (продолжение) *

Орган / ткань	Незаражённые (n=15)	Заражённые (n=21)	Заражённые трематодами разных видов				
			Bilharziella polonica (n=12)	*Cotylurus brevis* (n=9)	*Notocotylus ephemera* (n=10)	*Plagiorchis multiglandularis* (n=10)	*Echinostoma spiniferum* (n=8)
Кальций-связывающий домен лектина (*PcCaBP*)							
Все тело моллюска	0.39 (0.18; 0.30)	**0.40 (0.37; 0.45)**	**0.60 (0.53; 0.70)**	**0.64 (0.58; 0.80**)	0.34 (0.27; 0.43)	**0.56 (0.49; 0.59)**	**0.67 (0.52; 0.82)**
Гемолимфа	0.20 (0.19; 0.37)	**1.20 (0.80; 1.18)**	—	—	—	—	—
Гепатопанкреас	0.25 (0.20; 0.26)	0.32 (0.23; 0.39)	—	—	—	—	—
Цистатинподобный белок (*PcCyst*)							
Все тело моллюска	0.09 (0.04; 0.10)	**0.52 (0.38; 0.61)**	**0.62 (0.56; 0.72)**	**0.57 (0.49; 0.63)**	**0.33 (0.27; 0.38)**	**0.52 (0.38; 0.64)**	**0.46 (0.37; 0.58)**
Гемолимфа	0	**0.10 (0.08; 0.12)**	—	—	—	—	—
Гепатопанкреас	0.20 (0.16; 0.32)	**0.52 (0.33; 0.75)**	—	—	—	—	—
Фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (*PcMIF*)							
Все тело моллюска	0.22 (0.18; 0.28)	**0.39 (0.27; 0.50)**	**0.44 (0.38; 0.51)**	**0.39 (0.30; 0.55)**	**0.46 (0.34; 0.51)**	0.18 (0.09; 0.27)	**0.46 (0.34; 0.52)**
Гемолимфа	0.49 (0.34; 0.60)	**0.69 (0.47; 0.96)**	—	—	—	—	—
Гепатопанкреас	0	0	—	—	—	—	—

* уровень экспрессии относительно гена β-актина (Me (K1; K3); выделены значения, достоверно различающиеся у заражённых трематодами моллюсков, по сравнению с незаражёнными.

Приложение 26

Относительный уровень экспрессии генов, кодирующих факторы защитных реакций в тканях моллюсков *Planorbarius corneus,* заражённых трематодами разных видов *

Орган / ткань	Незаражённые (n=10)	Заражённые	Заражённые трематодами разных видов				
			Bilharziella polonica (n=12)	*Cotylurus brevis* (n=10)	*Notocotylus ephemera* (n=10)	*Plagiorchis multiglandularis* (n=10)	*Echinostoma spiniferum* (n=12)
Фибриноген-подобный белок 7 (*PcFREP7*)							
Гемолимфа	2.25 (0.86; 4.02)	**2.97 (1.50; 10.38)**	**14.37 (8.77; 3.95)**	2.70 (1.84; 2.96)	1.07 (0.88; 2.70)	3.18 (1.16; 6.02)	**4.49 (2.63; 3.22)**
Гепатопанкреас	9.81 (8.55; 13.00)	**2.00 (0.55; 5.53)**	**4.96 (1.34; 10.66)**	**1.43 (0.65; 4.01)**	**3.18 (0.61; 3.22)**	**1.56 (0.38; 7.25)**	**0.75 (0.34; 0.89)**
Белковая железа	1.78 (0.64; 1.65)	0.71 (0.49; 1.53)	1.53 (1.49; 5 .27)	0.71 (0.07; 0.70)	0.80 (0.61; 0.99)	0.81 (0.54; 1.39)	0.13 (0.02; 1.22)
Сердце и перикард	0.64 (0.48; 1.51)	**4.91 (3.55; 5.61)**	**5.26 (3.96; 8.46)**	**5.05 (4.02; 6.26)**	**4.91 (3.95; 5.40)**	**3.39 (2.37; 5.36)**	**5.27 (4.76; 5.69)**
Нога	0.85 (0.60; 1.76)	0.80 (0.53; 1.08)	1.13 (0.79;1.94)	0.83 (0.49; 1.58)	**0.53 (0.46; 0.78)**	0.65 (0.52; 1.04)	1.04 (0.54; 1.28)
С-лектин (*PcClect*)							
Гемолимфа	12.12 (5.23; 3.00)	**20.98 (13.23; 3.95)**	**25.03 (14.37; 4.11)**	**23.10 (20.97; 5.92)**	**14.09 (12.00; 3.75)**	**17.51 (8.33; 3.07)**	**24.04 (13.22; 8.75)**
Гепатопанкреас	8.05 (6.73; 9.81)	**15.00 (10.00; 26.81)**	**16.00 (10.66; 2.04)**	**14.13 (10.47; 9.02)**	**25.13 (14.25; 6.50)**	9.81 (9.22; 14.51)	**15.08 (10.14; 3.03)**
Белковая железа	2.01 (0.98; 4.77)	1.93 (0.08; 3.97)	1.84 (0.00; 2.83)	0.01 (0.00; 1.31)	1.84 (0.06; 2.93)	2.83 (1.83; 3.50)	3.52 (3.09; 4.00)
Сердце и перикард	6.00 (3.45; 8.00)	**18.16 (14.00; 25.47)**	**18.00 (13.75; 0.75)**	**19.00 (17.50; 5.00)**	**15.48 (12.17; 9.06)**	**15.05 (8.77; 3.82)**	**23.88 (21.16; 6.32)**
Нога	4.00 (2.00; 5.12)	**9.00 (6.00; 13.00)**	6.40 (3.00; 9.50)	12.00 (9.00; 4.00)	**14.00 (12.50; 5.50)**	**6.54 (5.13; 8.66)**	**8.33 (6.54; 12.50)**
Толл-подобный рецептор 7 (PcTLR7)							
Гемолимфа	1.54 (1.09; 2.16)	1.22 (0.54; 1.68)	**0.54 (0.54; 0.69)**	1.56 (1.29; 1.68)	1.74 (1.32; 2.53)	**0.28 (0.22; 0.35)**	1.55 (1.12; 2.10)
Гепатопанкреас	0.00 (0.00; 0.00)	**0.00 (0.00; 0.06)**	**0.06 (0.06; 0.08)**	0.00 (0.00; 0.00)	0.00 (0.00; 0.16)	**0.03 (0.00; 0.04)**	0.00 (0.00; 0.00)
Белковая железа	0.15 (0.11; 0.22)	0.17 (0.06; 0.26)	**0.06 (0.06; 0.08)**	0.26 (0.21; 0.28)	0.18 (0.15; 0.28)	**0.04 (0.03; 0.05)**	**0.35 (0.24; 0.48)**
Сердце и перикард	0.43 (0.29; 0.63)	0.50 (0.31; 0.70)	**0.16 (0.14; 0.31)**	0.54 (0.51; 0.69)	0.49 (0.47; 0.57)	0.48 (0.36; 0.50)	**0.95 (0.73; 1.01)**
Нога	0.36 (0.28; 0.44)	0.43 (0.12; 0.54)	**0.11 (0.11; 0.15)**	0.43 (0.33; 0.44)	0.54 (0.45; 0.66)	0.36 (0.21;0.50)	0.44 (0.39; 0.46)

*представлены значения $2^{-\Delta\Delta Ct}$, относительно генов β-актина и GAPDH (Me (K1; K3)). Выделены значения, достоверно различающиеся у заражённых трематодами моллюсков, по сравнению с незаражёнными.

Приложение 26 (продолжение)*

Орган / ткань	Незаражённые (n=10)	Заражённые	Заражённые трематодами разных видов				
			Bilharziella polonica (n=12)	*Cotylurus brevis* (n=10)	*Notocotylus ephemera* (n=10)	*Plagiorchis multiglandularis* (n=10)	*Echinostoma spiniferum* (n=12)
Каталаза (*PcCat*)							
Гемолимфа	3.05 (1.16; 5.25)	3.29 (0.56; 3.00)	1.36 (0.74; 2.80)	2.00 (1.48; 2.64)	1.64 (0.78; 2.50)	**0.08 (0.07; 0.24)**	6.00 (4.00; 6.17)
Гепатопанкреас	0.71 (0.37; 1.17	2.40 (0.05; 4.00)	1.50 (0.71; 3.08)	0.04 (0.03; 0.07)	**5.88 (3.01; 6.27**	0.05 (0.03; 0.12	**4.00 (0.33;7.00)**
Белковая железа	0.90 (0.70; 1.66)	**11.86 (0.61; 18.75)**	**35.00 (28.05; 7.00)**	**0.03 (0.02; 0.08)**	**6.56 (0.94; 10.00)**	1.93 (0.86; 3.90)	**5.00 (4.00; 7.50**)
Сердце и перикард	1.24 (0.73; 2.06)	1.68 (0.07; 3.32)	0.71 (0.71; 3.32)	0.10 (0.03; 0.32)	1.93 (0.95; 3.13)	0.04 (0.01; 0.09)	**3.95 (3.46; 4.50)**
Нога	1.21 (0.30; 1.48)	1.55 (0.50; 2.50)	**2.25 (1.23; 3.38**	0.61 (0.21; 1.59)	2.09 (1.04; 3.09)	**0.50 (0.46; 0.90)**	2.00 (0.43; 3.01)
Катепсин-подобная сериновая протеаза (*PcSP*)							
Гемолимфа	0.70 (0.54; 0.97)	**9.73 (3.75; 13.39)**	**10.25 (9.82; 41.00)**	**10.00 (4.50; 12.25)**	13.39 (4.62; 17.89)	**2.75 (1.85; 6.33)**	**9.64 (8.00; 11.00)**
Гепатопанкреас	0.77 (0.43; 1.89)	**0.04 (0.00; 0.22)**	0.33 (0.13; 1.01)	**0.07 (0.05; 0.08)**	**0.04 (0.03; 0.22)**	**0.00 (0.00; 0.00)**	**0.13 (0.03; 0.25)**
Белковая железа	1.20 (0.65; 2.02)	**3.26 (1.20; 15.75)**	**28.21 (24.00; 5.00)**	1.20 (0.75; 2.84)	2.88 (1.91; 3.26)	0.91 (0.91; 2.37)	**3.24 (3.26; 4.45)**
Сердце и перикард	1.74 (0.60; 2.31)	1.32 (0.17; 3.99)	2.66 (1.32; 5.25)	0.73 (0.05; 1.81)	0.86 (0.86; 4.00)	**0.05 (0.04; 1.41)**	3.99 (0.17; 3.99)
Нога	0.91 (0.76; 1.80)	0.95 (0.68; 2.09)	1.89 (1.04; 1.94)	1.55 (1.18; 1.81)	0.79 (0.56; 0.91)	**0.08 (0.07; 0.19)**	2.09 (1.00; 2.77)
Миелопероксидаза (*PcPerox*)							
Гемолимфа	10.00 (6.25; 13.50)	**15.00 (9.80; 20.00)**	13.00 (10.00; 5.75)	15.48 (0.00;16.43)	15.00 (13.70; 9.50)	5.51 (4.12; 9.12)	**25.00 (20.00; 0.43)**
Гепатопанкреас	3.62 (1.87; 6.25)	**14.00 (7.00; 28.00)**	**13.00 (5.92; 17.25)**	12.00 (7.25; 2.00)	**12.00 (7.25;16.00)**	6.00 (3.90; 9.00)	**30.00 (28.75; 38.50)**
Белковая железа	0.49 (0.41; 1.85)	2.09 (1.00; 3.41)	2.25 (1.00; 4.25)	0.73 (0.45; 1.85)	2.64 (2.05; 4.58)	1.46 (0.47; 3.41)	2.83 (1.58; 3.25)
Сердце и перикард	2.76 (1.81; 3.50)	3.00 (1.42; 5.00)	3.66 (2.41; 5.76)	2.00 (1.00; 3.75)	3.00 (1.77; 4.18)	3.00 (1.42; 4.50)	3.97 (3.95; 7.50)
Нога	4.50 (3.25; 5.75)	**6.00 (3.42; 8.00)**	1.42 (1.35; 6.63)	7.00 (6.32; 8.00)	8.82 (5.97; 14.00)	**1.00 (1.00; 1.42)**	1.42 (1.42; 6.97)

*представлены значения $2^{-\Delta\Delta Ct}$, относительно генов β-актина и GAPDH (Me (К1; К3)). Выделены значения, достоверно различающиеся у заражённых трематодами моллюсков, по сравнению с незаражёнными.

Приложение 26 (продолжение)*

Орган / ткань	Незаражённые (n=10)	Заражённые	Заражённые трематодами разных видов				
			Bilharziella polonica (n=12)	*Cotylurus brevis* (n=10)	*Notocotylus ephemera* (n=10)	*Plagiorchis multiglandularis* (n=10)	*Echinostoma spiniferum* (n=12)
Биомфализин (*PcBl*)							
Гемолимфа	0.28 (0.23; 0.36)	**0.59 (0.36; 0.89)**	**0.73 (0.55; 0.87)**	**0.50 (0.36; 0.70)**	**0.51 (0.40; 0.65**	0.22 (0.19; 0.35)	**0.98 (0.90; 1.00)**
Гепатопанкреас	0.00 (0.00; 0.00)	0.00 (0.00; 0.00)	**0.06 (0.06; 0.08)**	0.00 (0.00; 0.00)	0.00 (0.00; 0.00	0.00 (0.00; 0.00)	0.00 (0.00; 0.00)
Белковая железа	0.00 (0.00; 0.00)	**0.00 (0.00; 0.04)**	**0.06 (0.04; 0.08)**	0.00 (0.00; 0.00)	0.00 (0.00; 0.00	0.00 (0.00; 0.00)	**0.04 (0.00; 0.06)**
Сердце и перикард	0.07 (0.06; 0.20)	0.12 (0.04; 0.26)	0.15 (0.09; 0.30)	0.12 (0.09; 0.23)	0.21 (0.11; 0.25)	**0.02 (0.01; 0.04)**	**0.58 (0.45; 0.65)**
Нога	0.15 (0.13; 0.17)	0.15 (0.10; 0.18)	0.08 (0.04; 0.18)	0.14 (0.09; 0.15)	0.18 (0.16; 0.23)	0.14 (0.09; 0.18)	0.15 (0.14; 0.18)

*представлены значения $2^{-\Delta\Delta Ct}$, относительно генов β-актина и GAPDH (Me (K1; K3)). Выделены значения, достоверно различающиеся у заражённых трематодами моллюсков, по сравнению с незаражёнными.

Приложение 27

Нуклеотидные последовательности транскриптов факторов защитных реакций моллюсков *Planorbarius corneus* и последовательности транскриптов генов, использованные в качестве референсных

Название	Ген	Номер последовательности в GenBank
β-актин	*Pcactin*	PZ136601
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	*PcGAPDH*	PZ136602
Фибриногенподобный белок	*PcFREP*	PZ173207
Фибриногенподобный белок 3	*PcFREP3*	PZ173211
Фибриногенподобный белок 7	*PcFREP7*	PZ173210
С-лектин	*PcClect*	PZ136603
Кальций-связывающий белок	*PcCaBP*	PZ173209
Цистатинподпобный белок	*PcCyst*	PZ173206
Фактор, ингибирующий миграцию макрофагов	*PcMIF*	PZ173208
Пероксидаза	*PcPerox*	PZ136608
Катепсин-подобная сериновая протеаза	*PcSP*	PZ136607
Толл-подобный рецептор 3	*PcTLR3*	PZ136605
Толл-подобный рецептор 7	*PcTLR7*	PZ136606
Интегрин	*PcInt*	PZ173205
Каталаза	*PcCat*	PZ173204
Биомфализин	*PcBl*	PZ136604

Приложение 28

Аннотация по данным BlastX (значение e<1e-5) для транскриптов с дифференциальной экспрессией в гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus*, заражённых трематодами *Bilharziella polonica*

№	Повышение экспрессии	Снижение экспрессии
1	myosin heavy chain 6/7	ankyrin repeat domain-containing protein 17
2	myosin heavy chain type II	chitin deacetylase 8
3	apolipophorins-like	craniofacial development protein 2
4	myosin heavy chain	endonuclease-reverse transcriptase
5	brorin-like isoform X3	filaggrin-2-like isoform X33
6	collagen alpha-1(I) chain-like	G patch domain-containing protein 1-like
7	collagen alpha-1(I) chain-like	KHDC3-like protein
8	neurogenic locus notch homolog protein 1-like isoform X2	pG1 protein
9	turripeptide OL11-like	presenilin/pol polyprotein
10	tyramine beta-hydroxylase-like/temptin-like	replication-associated protein
11	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	small proline-rich protein 3-like
12	cathepsin B-like	
13	elongation factor 1-alpha 1-like	
14	heat shock cognate 71 kDa protein-like	
15	Hsp70 family protein	
16	polyubiquitin-B	
17	heat shock protein 70	
18	orf1ab polyprotein	
19	40S ribosomal protein S6	
20	ATP synthase F0 subunit 6	
21	CD63 antigen	
22	cytochrome c oxidase subunit III	
23	disulfide isomerase	
24	E3 ubiquitin-protein ligase RNF12-B	
25	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	
26	histone H1-delta	
27	major egg antigen (p40)	
28	NADH dehydrogenase subunit 1	
29	NADH dehydrogenase subunit 4	
30	NADH dehydrogenase subunit 5	
31	ribonuclease T2-like isoform 1	

Приложение 28 (продолжение)

32	ribosomal protein L3	
33	ribosomal protein S4, X-linked	
34	RNA-directed DNA polymerase	
35	translationally-controlled tumor protein homolog	
36	tubulin alpha-1 chain	
37	replication-associated protein	
38	dehydration responsive protein	
39	metal transporter Nramp5	
40	putative senescence-associated protein	
41	putative serine acetyltransferase	
42	regulator of rDNA transcription protein 15	
43	transcript antisense to ribosomal rna protein	
44	F0F1 ATP synthase subunit alpha	
45	senescence-associated protein, putative	
46	30S ribosomal protein S1	
47	60S ribosomal protein L3	
48	60S ribosomal protein L5	
49	cell wall-associated hydrolase	
50	elongation factor 2	
51	ORF16-lacZ fusion protein	
52	permease	
53	tetratricopeptide repeat protein	
54	30S ribosomal protein S12, chloroplastic	
55	actin	
56	alpha-tubulin	
57	cytosol-type hsp70	
58	tubulin beta chain	
59	v-type proton atpase proteolipid subunit	
60	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	