

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования

«Белгородский государственный национальный  
исследовательский университет»

*На правах рукописи*

**Кулько Светлана Владимировна**

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
ГЕМОЦИТОВ МОЛЛЮСКОВ (Gastropoda, Bivalvia)  
В НОРМЕ И ПРИ ОСМОТИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ**

03.03.01 – физиология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель**

Кандидат биологических наук, доцент

**А.А. Присный**

**БЕЛГОРОД – 2015**

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	11
1.1. Общая характеристика иммунобиологических свойств представителей типа Mollusca .....	11
1.2. Организация амебоцит-продуцирующего органа у моллюсков .....	14
1.3. Классификация форменных элементов гемолимфы представителей типа Mollusca .....	16
1.4. Особенности иммунных реакций моллюсков .....	29
1.4.1. Клеточные реакции моллюсков .....	31
1.4.2. Гуморальные реакции моллюсков .....	38
1.5. Фагоцитоз и ликвидация чужеродных агентов .....	42
1.6. Иммунологическая память гемоцитов моллюсков .....	50
1.7. Исследования энергетического статуса гемоцитов моллюсков .....	52
ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	71
3.1. Оценка клеточных реакций, возникающих в результате действия осмотической нагрузки на гемоциты представителей класса Gastropoda .....	71
3.1.1. Типология клеточного состава гемолимфы представителей класса Gastropoda .....	71
3.1.2. Результаты исследования способности гемоцитов к фагоцитозу .....	85
3.1.3. Результаты изучения митохондриальной активности гемоцитов в условиях осмотической нагрузки .....	86
3.1.4. Влияние осмотической нагрузки на морфофункциональные свойства гемоцитов представителей класса Gastropoda .....	90
3.1.4.1. Динамика параметров гемоцитов в ответ на осмотическую нагрузку, регистрируемых методом световой микроскопии .....	90
3.1.4.2. Результаты исследования высоты и	

топографии поверхности клеток .....	97
3.1.4.3. Оценка клеточных реакций, возникающих в результате действия осмотической нагрузки на гемоциты представителей класса <i>Gastropoda</i> .....	116
3.1.4.4. Влияние осмотической нагрузки на упругость и адгезионные свойства плазмалеммы гемоцитов представителей класса <i>Gastropoda</i> .....	123
3.2. Оценка клеточных реакций, возникающих в результате действия осмотической нагрузки на гемоциты представителей класса <i>Bivalvia</i> .....	131
3.2.1. Типология клеточного состава гемолимфы представителей класса <i>Bivalvia</i> .....	131
3.2.2. Результаты исследования способности гемоцитов к фагоцитозу .....	136
3.2.3. Результаты изучения энергетического статуса гемоцитов и активности митохондрий в условиях осмотической нагрузки .....	136
3.2.4. Влияние осмотической нагрузки на морфофункциональные свойства гемоцитов представителей класса <i>Bivalvia</i> .....	138
3.2.4.1. Динамика параметров гемоцитов в ответ на осмотическую нагрузку, регистрируемых методом световой микроскопии .....	138
3.2.4.2. Результаты исследования высоты и топографии поверхности клеток .....	140
3.2.4.3. Оценка клеточных реакций, возникающих в результате действия осмотической нагрузки на гемоциты представителей класса <i>Bivalvia</i> .....	145
3.2.4.4. Влияние осмотической нагрузки на упругость и адгезионные свойства плазмалеммы гемоцитов представителей класса <i>Bivalvia</i> .....	148
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	151

4.1. Построение типологии клеточных элементов гемолимфы моллюсков .....	151
4.2. Анализ действия осмотической нагрузки на клеточные элементы гемолимфы моллюсков .....	154
4.2.1. Динамика морфометрических характеристик гемоцитов при действии осмотической нагрузки .....	154
4.2.2. Динамика функциональных свойств гемоцитов при действии осмотической нагрузки .....	155
4.2.3. Динамика митохондриальной активности гемоцитов при действии осмотической нагрузки .....	156
4.3. Анализ изменений упругости и адгезии плазмалеммы клеточных элементов гемолимфы моллюсков в условиях осмотической нагрузки .....	158
ВЫВОДЫ .....	161
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	163
Библиографический список .....	164

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Система циркуляции беспозвоночных до настоящего времени слабо изучена. В частности, в отношении клеточного состава и функционального статуса клеток циркулирующей жидкости моллюсков не сложилась единая точка зрения. Гемоциты моллюсков описывают как многофункциональные клеточные элементы. Они выполняют функцию переноса питательных веществ, а также иммунную функцию, функцию ранозаживления, перестройки тканей, восстановления поврежденных нервных волокон и, отчасти, выделительную функцию, вынося захваченные из гемолимфы инородные частицы за пределы тела (Галактионов В.Г., 1998). Однако вопросы, касающиеся конкретных функций разных типов клеток и влияния условий среды на функциональную активность гемоцитов, исследованы недостаточно подробно.

В современной литературе до сих пор нет единообразной типологии гемоцитов, основанной на общепринятых для классификации признаках. Известные классификации в основном исходят из постулата, что все гемоциты делятся на гранулоциты и гиалиновые клетки (Cheng T.C., 1981; Ratcliffe N.A., Söderhäll K., 1985). Согласно функциональной классификации выделяют стволовые клетки, фагоциты, гемостатически активные клетки, которые ответственны за поддержание гемостаза, и трофические клетки (Glinski Z., Jarosc J., 1997); а морфологически – круглые клетки и амебоциты (Sminia T., 1981; Hegaret H. et al., 2003). При этом функциональная классификация остается отдельным пластом знаний, который с морфологической типологией не связан. В целом, основные классификации базируются большей частью на морфологии и цитохимических особенностях, и, в меньшей степени, на изучении уникальных клеточных функций (Anderson R.S., 1987; Auffret M., 1988; Suresh K., Mohandas A., 1990; Söderhäll K., 2010).

Отсутствие критериев согласованной и единой классификации гемоцитов моллюсков затрудняет анализ и сравнение результатов работы разных исследовательских групп. Понимание классификации гемоцитов и соотнесение

их морфофункциональных типов с типами циркулирующих клеток более высокоорганизованных групп животных важно для накопления информации о становлении функционального статуса форменных элементов в процессе эволюции.

**Степень разработанности темы исследования.** Исследования отечественных и зарубежных авторов выявляют в гемолимфе моллюсков разное число клеточных типов – от двух до множества (Glinski Z., Jarosc J., 1997; Barracco M.A. et al., 1993; Adamowicz A., Wolaczek M., 2003; Ракочий В.К., Громик О.А., 2009).

Изучены строение и функции амебоцит-продуцирующего органа моллюсков (Sminia T., 1981; Lie K.J., Heyneman D., 1976; Галактионов В.Г., 1998), клеточные реакции на вторжение в организм моллюска инородных тел, в частности, на трематодную инвазию (Sminia T., 1981, Sullivan J.T., 1990; Sullivan J.T. et al, 1995, 2004), гуморальные реакции, опосредуемые гемоцитами (Галактионов В.Т., 1998; Xing J. et al, 2002), взаимодействие гемоцитов друг с другом (Foley D.A., 1974; Hine P.M., 1999), морфофункциональные особенности гемоцитов различных типов (Sminia T.A., 1981; Атаев Г.Л., Прохорова Е.Л., 2010).

К настоящему времени разработано несколько однотипных классификаций, основанных, преимущественно, на морфологических критериях (Wen C.H., 1994; Carballal M.J. et al., 1997; Glinski Z., Jarosc J., 1997; Hegaret H. et al., 2003). Несмотря на множество работ по изучению морфофизиологических свойств гемоцитов моллюсков (Zbikowska E., 1998; Wootton E.C., Pipe R.K., 2003; Adamowicz A., Wolaczek M., 2003; Хлус Л.М., 2003), проблема их функциональной классификации по-прежнему остаётся актуальной для сравнительной физиологии.

Исследование динамики морфофизиологических показателей гемоцитов моллюсков (размеры, функциональная активность клеток, свойства клеточной мембраны) при изменении осмотического давления окружающей среды позволяет оценить адаптивные возможности и резистентность различных

клеточных типов, таксономические отличия в реакциях клеточных элементов; получить новые данные об адаптивных механизмах системы циркуляции моллюсков.

С учетом вышесказанного была сформулирована цель исследования и поставлены основные задачи.

**Цель работы:** исследование функциональных и структурных характеристик гемоцитов отдельных представителей типа Mollusca в норме и при осмотической нагрузке.

**Задачи исследования:**

1. Разработать типологию гемоцитов представителей типа Mollusca.
2. Оценить фагоцитарную активность гемоцитов представителей типа Mollusca в условиях осмотической нагрузки.
3. Оценить митохондриальную активность гемоцитов представителей типа Mollusca в условиях осмотической нагрузки.
4. Проанализировать осморегуляторные реакции гемоцитов представителей типа Mollusca: изменение клеточного объема и упруго-эластических свойств мембраны, использование мембранного резерва.

**Научная новизна**

Впервые осуществлена типология форменных элементов гемолимфы у представителей типа Mollusca: *Helix pomatia*, *Stenomphalia ravergieri*, *Viviparus viviparus*, *Achatina fulica*, *Planorbarius corneus*, *Lymnaea stagnalis*, *Ampullaria australis*, *Anodonta cygnea* и *Dreissena polymorpha*, базирующаяся не только на морфологических критериях и учитывающая комплекс морфофункциональных признаков.

Впервые исследованы осморегуляторные реакции различных типов гемоцитов моллюсков. Изучены изменения морфометрических показателей, потенциальный мембранный резерв клеток, упругостные и адгезионные свойства мембран гемоцитов, осуществлена оценка изменений топографии поверхности гемоцитов и их энергетического статуса в физиологических условиях и при осмотической нагрузке.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные данные о функциональных и структурных свойствах гемоцитов моллюсков в различных осмотических условиях расширяют и углубляют существующие представления о клеточных механизмах осморезистентности у беспозвоночных животных, и дают более полное представление о становлении этих механизмов в сравнительно-физиологическом аспекте. Полученные данные о функциональных реакциях гемоцитов на осмотический стресс можно применять при борьбе с видами-вредителями, а также в целях обеспечения большей продуктивности культивируемых видов моллюсков.

Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедре экологии, физиологии и биологической эволюции НИУ «БелГУ» при написании учебных и методических пособий по дисциплинам: «Биофизика», «Физиология животных» для студентов направления подготовки 020400.62 (06.03.01) – Биология; «Эволюционная физиология» для магистрантов по направлению 020400.68 (06.04.01) – Биология, магистерская программа «Физиология человека и животных».

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Идентифицировано четыре функциональных типа клеточных элементов циркуляции изученных представителей типа Mollusca: большие амебоциты, малые амебоциты, гранулярные клетки, круглые клетки.
2. Гемоциты исследованных видов типа Mollusca в пределах предъявленной осмотической нагрузки сохраняют способность к выполнению защитных функций.
3. Для гемоцитов изученных видов типа Mollusca характерна прямая взаимосвязь интенсификации внутриклеточных энергетических процессов с функциональной активностью клеток и изменениями осмолярности инкубационной среды.
4. Осморегуляторные реакции гемоцитов изученных представителей типа Mollusca включают в себя регуляцию клеточного объема, в том числе за счет



использования мембранного резерва, и сопровождаются изменениями упруго-эластических свойств мембран клеточных элементов.

**Достоверность полученных результатов** подтверждается наличием репрезентативной выборки объектов, адекватной целям и задачам исследования, проведенного с помощью современных методик и сертифицированного высокоточного микроскопического оборудования (атомно-силовой микроскоп, система видеорегистрации и документирования изображений «ВидеоТест», конфокальный микроскоп), соответствующих компьютерных программ обработки и анализа изображений, большим объемом фактического материала, который обработан с использованием традиционных методов статистики, применяемых в биологических исследованиях, публикацией результатов работы в рецензируемых журналах.

**Личный вклад автора.** Основные результаты получены автором самостоятельно. Автор лично планировал эксперименты и обобщал полученные данные. Исследования с использованием световой, конфокальной и атомно-силовой микроскопии осуществлены самостоятельно. Выводы сделаны на основе собственных оригинальных данных.

#### **Апробация результатов работы**

Материалы, изложенные в диссертации, доложены и обсуждены на Всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми научного центра УО РАН «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике» (Сыктывкар, 2011, 2012), VII съезде казахского физиологического общества с международным участием «Современная физиология: от клеточно-молекулярной до интегративной – основа здоровья и долголетия», посвященного 100-летию академиков АН КАЗССР Н.У. Базановой и Ф.М. Мухамедгалиева. (Алматы, 2011), X Всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми научного центра УО РАН (Сыктывкар, 2011), III Съезде физиологов СНГ (Москва, 2011), XIV международном совещании и VII школе по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2011), Всероссийской научно-практической

конференции «Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2011, 2012), Съезде физиологов с международным участием «VII Сибирский съезд физиологов» (Красноярск, 2012), II Международной научно-практической конференции памяти д.б.н. профессора М.А. Козлова, (Чебоксары, 2012), XII Международной научно-практической экологической конференции «Структурно-функциональные изменения в популяциях и сообществах на территориях с разным уровнем антропогенной нагрузки» (Белгород, 2012), IV Съезде биофизиков России «Физико-химические основы функционирования биополимеров и клеток» (Нижний Новгород, 2012), VII Международной конференции «Микромеханизмы пластичности разрушения и сопутствующих явлений» (Тамбов, 2013), XXII съезде Физиологического общества имени И.П. Павлова (Волгоград, 2013).

#### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 27 научных работ общим объемом 11,3 п.л., авторский вклад – 7,3 п.л., в том числе 5 статей в журналах рекомендованных ВАК РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 186 страницах, содержит 47 таблиц и 84 рисунка. Список литературы включает 212 наименований, из которых 34 отечественных и 178 иностранных источников.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Общая характеристика иммунобиологических свойств представителей типа Mollusca

Представители типа Mollusca распространились и проникли в морскую, пресноводную и наземную среду обитания, и приспособились к различным типам питания – начиная от растительной и плотоядности, к эндопаразитизму, и даже симбионт-опосредованной хемоавтотрофии. Они научились бороться с различными патогенами, в том числе с несколькими сопутствующими специализированными линиями эукариотических паразитов (Söderhäll K., 2010).

Иммунобиология моллюсков до сих пор плохо изучена, отчасти потому, что большая часть исследований сосредоточена на нескольких наиболее распространенных видах-представителях класса Брюхоногих (Gastropoda). Большинство иммунологических исследований сосредоточены на взаимодействии между представителями класса Gastropoda и личиночными стадиями дигенетических трематод (сосальщиков), таких как шистосомы (*Shistosomatidae*). Сосальщики вызывают очевидные и адекватные защитные реакции у улиток, и все это дает представление, дополненное недавно появившимися знаниями о геноме *Shistosoma*, о том, как сосальщики этот иммунный ответ преодолевают (Berriman M. et al., 2009; Loker E., 2010).

Выживание трематод в теле улиток зависит, по крайней мере, частично, от их способности имитировать гликотопы хозяина, с целью избегания немедленной атаки активными формами кислорода и азота, которые производятся гемоцитами хозяина, и вызвать долговременное снижение иммунной функции хозяина. Gastropoda могут генерировать точечные ответы на различные категории патогенов, но в определенных обстоятельствах могут создавать эффективные усиленные вторичные ответы. Защитный ответ по крайней мере одного вида-представителя класса Gastropoda, *Biomphalaria glabrata* включает в себя также использование лектинов гемолимфы, которые

отвечают разнообразию процессов, включая и соматическую диверсификацию. Эти данные сыграли роль в пересмотре общей концепции иммунных ответов беспозвоночных с целью включить возможность более сложных и разнообразных, с учетом возможности ограниченных сценариев инвариантного образа распознавания молекул (Söderhäll K., 2010; Loker E., 2010).

Любая попытка создать иммунологический обзор моллюсков должна быть подкреплена изучением филогенеза этой группы животных. Представители класса *Gastropoda* сохранились почти в первозданном виде с верхнего кембрия (488-501 млн лет назад) и, возможно, еще раньше, с докембрия, более 542 млн лет назад. С тех пор их видовой состав сильно возрос в численности, с 40 000 до 150 000 видов, с варьированием размера от менее чем 1 мм до около метра в длину (Söderhäll K., 2010).

Всего один коралловый риф лагуны в Новой Каледонии может содержать более 2000 видов брюхоногих моллюсков, и в некоторых семействах – более 80% видовой разнообразия могут быть обнаружены там (Loker E., 2010).

*Gastropoda* является наиболее специализированным классом животных, приспособленных к жизни в морской среде, также колонизировавшим земные биотопы и вторично населившим пресноводные. Некоторые виды имеют продолжительность жизни, измеряющуюся десятилетиями, хотя большинство – однолетние или на протяжении жизни большую часть времени находятся в состоянии покоя. Большинство видов брюхоногих имеют раковину и ведут донный образ жизни, однако некоторые потеряли раковину, а часть из них приняла полностью пелагический образ жизни. Представители гастропод обитают в экстремальных условиях, таких, как гидротермальные источники или серные донные источники. Большинство брюхоногих являются растительноядными, хотя многие виды перешли к плотоядности, часть к клептопаразитизму, а другие стали почти неузнаваемыми, перейдя к эндопаразитизму у морских беспозвоночных. Хотя все брюхоногие моллюски, вероятно, в определенной степени зависят от симбионтов, у некоторых эта зависимость приобретает экстраординарные формы, когда брюхоногий хозяин

буквально устраивает для них «фермы», например, на жабрах, для дальнейшего их потребления, или же связка «брюхоногий моллюск/симбионт» вообще приближается к статусу хемоавтотрофного или фотосинтетического организма (Bachere E., 1991; Loker E., 2010).

Двустворчатые моллюски (*Bivalvia*) являются достаточно обширной группой, входящей в тип *Mollusca*. Класс *Bivalvia* насчитывает около 7500 видов и это второй самый разнообразный класс после *Gastropoda*. Многие виды-представители класса *Bivalvia* являются ценными морепродуктами или имеют значение как производители жемчуга, чем обосновано их промышленное значение. Кроме того, являясь сидячими фильтраторами, представители класса *Bivalvia* могут аккумулировать бактерии, вирусы, пестициды, промышленные отходы, токсичные металлы и нефтепродукты, что делает их важными маркерами для биомониторинга загрязнений в водных экосистемах и идеальным видом для исследования последствий экологических загрязнений (Song L. et al., 2010).

В ходе длительной эволюции, *Bivalvia* разработали множество эффективных стратегий защиты от атак различных патогенов и экологических стрессов. Интерес к иммунитету моллюсков класса *Bivalvia* постоянно растет в последние годы в связи с серьезными заболеваниями и проблемой смертности, угрожающих развитию и существованию их аквакультуры. Хотя информация о патологиях накапливается, исследования по иммунной системе *Bivalvia* и ее молекулярных механизмах до сих пор находятся на ранней стадии, причем в исследованиях задействовано лишь малое число наиболее распространенных видов (Bachere E., 1991; Song L. et al., 2010).

Представители класса *Bivalvia*, как беспозвоночные животные, полагаются исключительно на врожденную, нелимфоидную систему иммунных реакций (Cajaraville M.P., Pal S.G., 1995; Song L. et al., 2010).

Внутренняя защита представителей класса *Bivalvia* реализуется одновременно через клеточный и гуморальный компоненты. К первому относится фагоцитоз и инкапсуляция, с последующим уничтожением

возбудителя с помощью ферментативной активности и активных форм кислорода, а второй включает в себя различные реакции, опосредованные целым рядом молекул (Lopez. C. et al., 1997; Song L. et al., 2010).

## **1.2. Организация амебоцит-продуцирующего органа у моллюсков**

Впервые наличие гемопоэтической ткани или «органов» у моллюсков было отмечено Пэном (Pan C.T., 1958), который выделил три основных амебоцит-продуцирующих органа (АПО): мешковидная стенка почки, частично образующая стенку перикарда; синусы гемолимфы и участки рыхлой соединительной ткани, где происходит трансформация фибробластов в амебоциты.

В частности, этот орган был выявлен у *B. glabrata* и *Lymnaea stagnalis*. АПО *B. glabrata*, удаленный у особи, устойчивой к штамму *Schistosoma mansoni* и пересаженный особи, восприимчивой к данному штамму, передаст и устойчивость (Loker E., 2010).

Пути активации гемопоэза до сих пор плохо изучены, эти процессы могут происходить через прямую стимуляцию патогенами или косвенную стимуляцию через митогенные цитокины гемоцитов (Loker E., 2010).

Некоторые исследователи (Wagge L.E 1955; Sminia T., 1981) сомневались, что этот орган в одиночку может обеспечить достаточное количество форменных элементов крови в течение всей жизни моллюска, и утверждали, что продукция гемоцитов происходит также в периферических сосудах. У некоторых пульмонат как отдельные циркулирующие, так и проникающие в ткани гемоциты могут делиться, циркулирующие бластоподобные клетки *Littorina littorea* также способны к делению. У представителей семейства *Haliotidae* АПО до сих пор не локализован (Loker E., 2010).

Позднее для *B. glabrata* был выполнен специальный анализ функциональной морфологии АПО (Lie K.J. et al., 1975). При этом были изучены как незараженные особи, так и моллюски, зараженные трематодами *Echinostoma lindoense*, *Echinostoma paraensei* и *Echinostoma liei*. В этой работе

была подтверждена амебоцитопродуцирующая роль мешковидной части почки, где были обнаружены мелкие скопления амебоцитов, среди которых очень редко наблюдали делящиеся клетки. В качестве же основного АПО был признан участок между перикардом и эпителием мантийной полости.

У незараженных моллюсков АПО представляет собой небольшую структуру, состоящую из удлинённых клеток с базофильной цитоплазмой и ядрами овальной формы. Такие клетки образуют небольшие скопления – узелки. После заражения моллюсков узелки, быстро разрастаясь, начинают сливаться в единую клеточную массу. Экскреторные / секреторные продукты спороцист трематоды *E. paraensei* стимулируют разрастание АПО *B. glabrata*, а вытяжка из *S. mansoni* стимулирует увеличение митоза в выделенных АПО, что позволяет предположить наличие прямого митогенного или питающего эффекта, оказываемого паразитом на гематопоз (Lie K.J., Heyneman D., 1976; Галактионов В.Г., 1998).

АПО подвержен действию форболмиристатацетата (РМА), стимулятора протеинкиназы С (РКС), при этом показано увеличение митотической активности (Галактионов К.В., Добровольский А.А., 1998).

Следует подчеркнуть, что в большинстве случаев в качестве АПО авторами (Lie K.J. et al., 1975) ошибочно воспринимается участок перикарда – различные клетки, образующие переднюю или латеральные стенки перикарда. На самом деле клетки, составляющие стенки перикарда, не входят в состав амебоцит-продуцирующего органа (Галактионов К.В., Добровольский А.А., 1998).

В качестве модели для изучения устойчивости моллюсков к трематодной инвазии наиболее часто используются pulmonаты *B. glabrata*, проявляющие достоверно резистентные свойства на поселение ряда трематод: *E. lindoense*, *Paryphostomum segregatum*, *S. mansoni*, *E. paraensei*, *E. caproni* (Bayne C.J. et al., 1985). Но Салливаном (Sullivan J.T., 1990) были исследованы и другие моллюски: *Biomphalaria obstructa*, *Helisoma trivolvis* и *Physa virgata*. После заражения моллюсков мирацидиями *E. paraensei* последующая гистологическая

обработка выявила их устойчивость к этому паразиту (Sullivan J.T. et al., 1995; Sullivan J.T. et al., 2004).

Анализ митотической активности позволил в каждом из моллюсков выявить зоны гемопоэза, однако до сих пор остается не до конца изученным механизм продукции гемоцитов, сколько поколений они проходят до дифференциации, продолжительность их жизни, и насколько они функционально дифференцированы: эти параметры варьируют у разных поколений гастропод. Кроме этого, выяснилось, что передняя стенка перикарда *B. obstructa* гистологически и функционально аналогична «реноперикардальному» АПО, описанному для *B. glabrata*. У *H. trivolvis* АПО представлен группой «бластоподобных» клеток латеральной стенки перикарда. Характерной для АПО биомфаларий гиперплазии не наблюдалось. Это объясняется быстрым выбросом образовавшихся в результате деления гемоцитов в гемолимфу. У *P. virgata* структуры, аналогичной АПО, не обнаружено (Lie K.J. et al., 1975).

Для *L. stagnalis* был описан АПО, сходный с *B. glabrata* (Sminia T., 1981). Эти и другие исследования показали, таким образом, наличие органа пролиферации амебоцитов у большинства исследованных в этом направлении *Bivalvia* и *Gastropoda*, а степень их развития, локализация и эффективность функционирования различается даже у близких видов.

### **1.3. Классификация форменных элементов гемолимфы представителей типа Mollusca**

Информация, касающаяся функций клеток гемолимфы беспозвоночных, существенно дополнилась за последнее десятилетие, но классификация форменных элементов по сей день остается спорным вопросом. Это частично связано с разнородными критериями классификации, принятых для каждого вида отдельно. Основные составленные классификации базируются большей частью на морфологии и цитохимических особенностях, и, в меньшей степени, на изучении уникальных клеточных функций (Ruddell C.L., 1971; Renwranz L.



et al., 1979; Anderson R.S., 1987; Auffret M., 1988; Hose J.E. et al., 1990; Suresh K., Mohandas A., 1990; Söderhäll K., 2010).

Отсутствие критериев согласованной и единой классификации гемоцитов представителей типа Mollusca значительно осложняет формирование комплексных знаний об их защитных механизмах, из сведений, полученных разными исследовательскими группами. Выделение общих критериев классификации должно включить в себя стандартизованную методику разделения гемоцитов по подтипам, а также методику достоверного определения морфологических и функциональных особенностей клеток различных субпопуляций (Bachere E. et al., 1988; Wen C.H., 1994; Carballal M.J. et al., 1997). Гемоциты моллюсков очень разнообразны, их количество и внешний вид меняются в зависимости от условий окружающей среды и физиологического состояния животных, функционального состояния, этапа развития самих клеток. На основе изучения микрофотографий мазков вполне определенно можно выделить только один тип клеток, отличающийся постоянной формой. Многое в данном вопросе зависит и от применяемых методов: например, при использовании проточной цитометрии в исследованиях американской устрицы *Crassostrea virginica*, большое значение для идентификации клеточных субпопуляций имеет выбор методик и калибровок (Chang S.J. et al., 2005; Soto-Jimenez F.M. et al., 2001).

Гемоциты – циркулирующие иммунные клетки, населяют кровеносную систему моллюсков (ранее было распространено название «каледамебоциты»), и реализуют защитные функции в виде фагоцитоза или инкапсуляции. Эти клетки, как правило, находятся в кровеносном русле, но также способны проникать внутрь тканей. Кроме того, моллюски обладают фиксированными защитными клетками, которые можно найти вблизи или на поверхностях полостей, захватывающими, и/или фагоцитирующими отдельные частицы (Feng S.Y. 1965; Feng S.Y. et al., 1971; Cheng T.C. et al., 1980; Loker E.S., 2010).

В дополнение к их обычным ролям, гемоциты также участвуют в заживлении ран, репарации нервов, формировании и ремонте раковины,

перестройке тканей, (например, рассасывание половых желез после размножения), а также в обмене и переносе питательных веществ. Гемоциты брюхоногих также участвуют в диапедезе, переносе захваченных инородных частиц к наружному эпителию, эпителию кишки и эвакуации этих частиц за пределы организма (Галактионов В.Г., 1998).

Этот процесс, а также процесс излечения от заболеваний провоцирует продукцию новых гемоцитов и возможно увеличивает восприимчивость к новым, ранее неизвестным патогенам (Ford S.E. et al., 1994; Loker E.S., 2010).

Также в организмах моллюсков присутствуют рогоциты (известные как поровые клетки), которые вовлечены в синтез или переработку дыхательных протеинов, но участвуют в поглощении мелких инородных частиц. Относительный вклад фиксированных клеток в защитные функции до сих пор недостаточно изучен (Friebel B., Renwrantz L.R., 1995; Söderhäll K., 2010).

С функциональной точки зрения, из совокупности клеток можно выделить следующие типы: стволовые клетки, фагоциты, гемостатически активные клетки, которые ответственны за поддержание гемостаза, и трофические клетки (Glinski Z., Jarosc J., 1997). При использовании морфологического критерия выделяется два вида клеток: круглые клетки и амeboциты (Sminia T., 1981; Hegaret H. et al., 2003).

Круглые клетки, составляющие приблизительно 5% общей численности гемоцитов, имеют маленький размер, высокое соотношение ядро-цитоплазма. В эту классификацию также включены гемоциты *L. stagnalis* (Sminia T., 1981) и лимфоидные клетки морских улиток рода *Busycon* (George W.C., Ferguson J.H., 1950). Клетки этого типа не распластываются на искусственных поверхностях и называются также бластоподобными клетками.

Круглые бластоподобные клетки часто считаются ранней стадией онтогенеза гемоцитов, и у моллюска *L. littorea* в этих клетках обнаруживали наличие 5-бром- 2'- дезоксиуридина, что свидетельствует о недавнем клеточном делении, и считается, что они впоследствии дифференцируются в зрелые

эффektorные клетки (Hawkins W.E., 1982; Gorbushin A.M., Iakovleva N.V., 2006).

Другой тип клеток, составляющий приблизительно 95% общего числа гемоцитов, представлен полиморфными клетками с большим количеством псевдоподий, с полиморфными ядрами и многочисленными гранулами в цитоплазме. Эти клетки активно адгезируют к стеклу и распластываются, формируя при этом многочисленные и хорошо оформленные филоподии или ламеллоподии, и, очевидно, являются эффекторами фагоцитарного и инкапсуляторного ответов. Они хорошо изучены в гемолимфе *Helix aspersa* (Wagge L.E., 1955), к ним же относят и гранулированные макрофаги *sp. Bullia*. (Brown M., Brown R., 2002; Sminia T., 1981).

Эти два типа гемоцитов, вероятно, представляют собой лишь различные этапы развития одного, основного типа. Круглые клетки, вероятно, представляют собой молодые, бластные клетки, в то время как амебоциты представляют собой популяцию зрелых клеток (Barker G.M., 2001).

Некоторые авторы считают, что гемолимфа моллюсков содержит несколько типов гемоцитов, произошедших из различных клеток-предшественников (Ottaviani E., 1989; Cheng T.C., 1984). Большинство исследователей сравнивают гемоциты с клетками крови позвоночных и, соответственно, выделяют два класса: гиалиновые клетки и гранулоциты (Cheng T.C., 1981; Ratcliffe N.A., Söderhäll K., 1985). Разница в терминологии обусловлена наличием и числом гранул в клетках, однако этот параметр может варьировать в зависимости от видовой принадлежности и возраста гемоцитов (Furuta E., Yamaguchi K., 2001).

Округлые лимфоцитоподобные клетки, циркулирующие в гемолимфе, способны образовывать розетки с эритроцитами барана и напоминают Т-клетки человека (Russell-Pinto F. et al., 1994). Другая группа циркулирующих гиалиновых гемоцитов обладает способностью к распластыванию, активно фагоцитирует инертные частицы и отвечает кислородным взрывом на стимуляцию аналогично макрофагам позвоночных животных (Nakamura T. et

al., 1985). Последний тип клеток наиболее активно участвует в фагоцитозе бактерий и инкапсуляции паразитов (Abdul-Salam J.M., Michelson E.H., 1980; Cheng T.C., 1981; Cheng T.C., Downs J.C., 1988; Sminia T.A., 1981). Подобной активностью обладают и гранулоциты, хотя и в менее выраженной форме, гранулоциты гистогенетически связаны со своими предшественниками – ретикулярными клетками соединительной ткани (Галактионов В.Г., 2005). Основными клетками, образующими капсулу, по мнению многих исследователей, являются гранулоциты, хотя включаются и гиалиновые клетки и клетки соединительной ткани (Tripp M.R., 1961; Cheng T.C., 1981; Sminia T., 1981; Loker E.S. et al., 1982; Wayne C.J., 1983). Предполагается, что клетки, по морфологии напоминающие клетки соединительной ткани, могут быть так же трансформированными гемоцитами (Sminia T., 1981).

Гранулоциты представлены клетками размером 9-70  $\mu\text{m}$ , образующими многочисленные, длинные псевдоподии с осевой полоской. Клетки обладают способностью изменять размер и форму при контакте с субстратом, и таким образом передвигаться по нему. Гиалиноциты меньше гранулоцитов, имеют размер около 8  $\mu\text{m}$ , и хотя они не образуют псевдоподии, но также способны плотно прикрепляться к субстрату, при этом, не теряя, однако, свою сферическую форму (Галактионов В.Г., 1998).

Овальные клетки гемоцитов типа 2 встречаются в гемолимфе чаще, чем гемоциты 1 типа, способны закрепляться на субстрате, не распластываясь по нему. Они передвигаются по субстрату с помощью широких коротких лобоподий. Их крупные, овальные, центрально расположенные ядра показали восприимчивость к кислым красителям. На поверхности ядра гемоцитов этого типа часто наблюдаются от одной до трех сильно базофильных гранул. Ядра окружены тонким слоем слабо базофильной однородной цитоплазмы, в которой содержатся многочисленные мелкие сильно базофильные гранулы. Также отмечена сезонная вариация состава гемолимфы и размеров форменных элементов крови моллюсков (Furuta E., Yamaguchi K., 2001).

В гемолимфе *Helix aspersa* были определены два типа гемоцитов: I (Ia и Ib) и II. Гемоциты первого типа (примерно 93% от общего числа) имеют сферическую форму, обладают способностью распространяться по субстрату, образуя многочисленные псевдоподии. Подтипы Ia и Ib, скорее всего, являются разными этапами развития одного и того же типа клеток. Гемоциты второго типа – это овальные клетки, имеющие стабильную форму, редко формирующие псевдоподии. Состав гемолимфы подвержен широким индивидуальным различиям и значительным сезонным изменениям (Adamowicz A., Bolaczek M., 2003).

В исследованиях авторов (Adamowicz A., Bolaczek M., 2003) были выделены два основных типа клеток крови: тип I гемоцитов (I и I B) и тип II гемоцитов. Тип I гемоцитов – полиморфные клетки. Они шаровидные или овальные, способные образовывать многочисленные псевдоподии и распространение на субстрате. Псевдоподии зачастую предоставляют собой длинные филоподии, чаще всего равномерно распределенные по периферии ячейки. В естественных условиях в период инкубации они показали тенденцию к образованию скоплений, включающих около десяти клеток. На окрашенных мазках видны овальные или бобовидные ядра, эксцентрично расположенные в клетках – гемоцитах типа Ia, обнаруживающие сильное сродство к кислым красителям и интенсивно окрашенные в розовый цвет. Ядра гемоцитов типа Ib имеют сильно базофильную окраску, окрашены синим цветом. В однородной, слабо базофильной цитоплазме клеток типа I содержались многочисленные однородные гранулы, проявляющие сильное сродство к основным красителям (Adamowicz A., Bolaczek M., 2003).

Гемоциты I в гемолимфе *H. aspersa* морфологически соответствуют гранулоцитам, а гемоциты второй группы – гиалиноцитам, описанным у *B. glabrata* (Cheng T.C., 1975), *Certhidea californica* (Yoshino T.P., 1976) и *P. corneus* (Franceschi C. et al., 1991; Ottaviani E., 1989). Кроме того, гемоциты I типа, описанные у *H. aspersa* похожи на распластывающиеся амебоциты *L. stagnalis* (Sminia T., 1981) и гранулоциты *B. tenagophila* (Barracoo M.A. et al.,

1993). Филоподии гемоцитов 1 типа имеют «несущие конструкции», так называемые осевые полосы, которые были обнаружены также в псевдоподиях гемоцитов *Incilaria fruhstorferi*, *Incilaria bibineata* (Furuta E., Yamaguchi K., 2001) и *Crassostrea virginica* (Cheng T.C., Howland K.H., 1982).

Гемоциты 1 типа склонны к образованию агрегатов, состоящих из нескольких, или даже около десятка, клеток, которые, скорее всего, предназначены для предотвращения потери жидкости организмом, ранозаживления и связаны с реакциями клеточного иммунитета. Ультраструктурные исследования гранулоцитов *B. tenagophila* показали, что в их цитоплазме содержатся многочисленные митохондрии, обширный шероховатый ЭПР, фагосомы и лизосомы, что указывает на их фагоцитарную активность (Barracco M.A. et al., 1993). Тот факт, что эндогенные пероксидазы, обычно принимающие участие в процессах внутриклеточного пищеварения, были найдены в активной форме в гемоцитах *H. aspersa* (Adema C.M. et al., 1992), позволяет предположить, что этот тип клеток действительно участвует в фагоцитозе.

Второй тип гемоцитов представлен в крови *H. aspersa* другим видом клеток. Как гиалиноциты *B. tenagophila* (Barracco M.A. et al., 1993), они характеризуются высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, ограниченными возможностями к формированию псевдоподий и распластыванию на субстрате. Ультраструктурные исследования гиалиноцитов *B. enagophila* показали, что их цитоплазма богата свободными рибосомами и митохондриями, но в ней слабо развит шероховатый ЭПР и мало лизосом, что указывает на небольшой возраст клетки (Barker G.M., 2001).

Второй тип гемоцитов *H. aspersa* имеет стабильную форму и изредка может формировать короткие лобоподии. Однако, их размер, высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение и способность к распространению на субстрате говорит об их близости с гемоцитами 1 типа (Adamowicz A., Bolaczek M., 2003).

*H. aspersa* обладает двумя типами клеток в гемолимфе. Один из этих типов представлен фагоцитирующими амебоцитами. Другой тип клеток – не обладающие фагоцитарной активностью небольшие клетки, составляющие около 12-14% от общего объема гемоцитов в гемолимфе (Prowse R.H., Tait N.N., 1969). Амебоциты обладают большим, чаще почковидной или глобулярной формы ядром, с рассеянными блоками хроматина.

Сразу же после отбора гемолимфы из тела моллюска, эти клетки становятся адгезивными, и быстро начинают агрегироваться (Заварзин А.А., 1985). После агрегации, каждый амебоцит, входящий в агрегат, постепенно начинает расплываться по субстрату путем удлинения и расширения псевдоподий. Напротив, нефагоцитирующие круглые клетки не образуют псевдоподий, либо же образуют, но небольшие и слабозаметные. По сравнению с расплывающимися амебоцитами, круглые клетки имеют более выраженный шероховатый эндоплазматический ретикулум, большое количество свободных рибосом, и их цитоплазма менее прозрачна, что подтверждается наблюдениями с помощью электронной микроскопии (Sminia T., 1981). Wagge L.E. (1955) выделил два различных типа амебоцитов у *C. aspersus*. А-тип клеток небольшого размера, диаметр клетки от 10 до 20  $\mu\text{m}$ , в зависимости от интенсивности расплывания. В клетках присутствуют ядра, около 10  $\mu\text{m}$  в диаметре, и гиалиновая цитоплазма тесно прилегает к ядру. В-тип клеток имеет ядро 10  $\mu\text{m}$  в диаметре, длина клеток достигает 50  $\mu\text{m}$ . Оба типа клеток развиваются из мантийного эпителия.

Одной из ключевых проблем является номенклатура гемоцитов моллюсков. В гемолимфе моллюсков, по аналогии с клетками крови позвоночных, можно условно выделить следующие типы клеток: амебоциты (Prowse R.H., Tait N.N., 1969), лейкоциты (Sminia T., 1981), гранулоциты (Barracco M.A. et al., 1993), макрофаги (Rasmussen L.P.D. et al., 1985), лимфоциты (Kress A., 1968), фиброциты (Foley D.A., Cheng T.C., 1974) и гиалиновые клетки (George W.C., Ferguson J.H., 1950). Участки гемопоэза, тип пролиферации и наличие либо отсутствие клеток-предшественниц также имеют

значение в данной классификации. Многочисленные исследования показали, что гемопоэз у моллюсков происходит в следующих участках тела: у *H. aspersa* в эпителии мантии и в соединительной ткани (Wagge L.E., 1955), в соединительной ткани легочной полости у *L. stagnalis* (Sminia T., 1981), в стенках кровеносных пазух и в соединительной ткани в области почки у *B. glabrata* (Pan S.C., 1958; Sminia T., 1981), в соединительной ткани, окружающей сердечный комплекс у видов рода *Doto* (Kress A., 1968). В пределах данной классификации предполагается, что гемоциты происходят из клеток-предшественниц (эмбриональные клетки и амебобласты), зрелых амебоцитов или из фибробластов и эндотелиальных клеток (Sminia T., 1981). Вероятно, пролиферация клеток осуществляется путем трех механизмов деления: митотические деления, amitoz и фрагментацию цитоплазмы (Wagge L.E., 1951; Sminia T., 1981). Гемоциты брюхоногих принимают участие в клеточных защитных реакциях, таких как фагоцитоз (Tripp M.R., 1970; Fryer S.E., Bayne C.J., 1996; Matricon-Gondran M., Letocart M., 1999), инкапсуляция (Sminia T. et al., 1974; Harris K.R., Cheng T.C., 1975), образование узелков (Glinski Z., Jarosz J., 1997), паразитарные противодействия (Drozdowski A., Zbikowska E., 1994), а также в процессах свертывания крови, заживления ран (Sminia T., 1981) и отторжения трансплантатов (Cheng T.C., Galloway P.C., 1970).

Количество циркулирующих гемоцитов варьирует (Adema C.M. et al., 1992) в рамках вида и зависит от факторов окружающей среды. Число клеток зависит также от места забора гемолимфы – в образцах, полученных из ноги *B. glabrata* содержится в два раза меньше гемоцитов, чем в образцах, взятых из сердца (Noda S., Loker E.S., 1989). Кровь, взятая из сердца *H. aspersa maxima*, содержит в среднем в 4,76 раза меньше клеток, чем соответствующий объем крови, взятой в таком же порядке из *H. aspersa*, в 1,8-раза меньше клеток, чем в *Achatina fulica* и 4,38 раза меньше, чем в крови *Achatina achatina* (Adema C.M. et al., 1992).

Количество гемоцитов также варьирует в зависимости от возраста животного, температуры, инфекционных заболеваний (Noda S., Loker E.S.,



1989; Ottaviani E., 1989), паразитарной инвазии (Drozdowski A., Zbikowska E., 1994), травм (Sminia T.A., 1981), содержания воды в тканях (Zbikowska E., 1998), и общего состояния организма (Barracco M.A et al., 1993). Особи старшего возраста могут иметь в два раза большее количество клеток крови по сравнению с молодыми животными. Повышение температуры приводит к трехкратному увеличению количества гемоцитов у *B. tenagophila* (Barracco M.A et al., 1993). Исследования активных и зимующих *L. stagnalis* и *H. pomatia* продемонстрировали, что большая гидратированность тканей приводит к снижению количества гемоцитов. Низкое содержание воды в тканях, характерное для зимующих животных, обуславливает большую концентрацию клеток в гемолимфе, по сравнению с активными улитками (Zbikowska E., 1998).

Так, например, осенью число гемоцитов в *H. aspersa* был на 65% выше, поскольку организм снижает содержание воды в тканях и, таким образом повышается гемоконцентрация, как и у зимующих *H. pomatia* (Zbikowska E., 1998).

Если сравнивать с другими беспозвоночными, гемоциты небольшого числа представителей Gastropoda, изученных в данный момент, обладают некоторыми особенностями: в целом для них характерно отсутствие крупных хорошо различимых агрегатов гранул, пигментации, отсутствие жгутиков, и отсутствием очевидной склонности к лизису при извлечении из организма хозяина или презентации с антигенными стимулами. Для гемоцитов брюхоногих характерна адгезивность и высокая склонность к агрегации, причем эта тенденция проявляется с большей частотой у морских, нежели у пресноводных видов (Loker E., 2010).

Различными исследователями были произведены исследования клеточного состава гемолимфы ряда водных *Pulmonata* (Kress A., 1968; Stang-Voss T., 1970; Sminia T., 1972; Yoshino T.P., 1976; Dikkeboom A. et al., 1984). Однако морфологических и функциональных данных о клетках крови наземных брюхоногих пока еще недостаточно (Wagge L.E., 1955; Furuta E. et al., 1990). У брюхоногих моллюсков, как и у всех моллюсков, клетки крови играют важную

роль в организации защитных процессов. Хотя они не обладают иммуноглобулинами или системой комплемента, в большинстве случаев гемоциты наземных брюхоногих моллюсков способны поддерживать стерильность внутренних жидкостей тела. Гастроподы обладают, по меньшей мере, одним типом клеток крови, которые функционируют как фагоциты, что было выяснено в ходе добавления в гемолимфу самостоятельно не распадающихся агентов (Sminia T., 1972; 1981; Yoshino T.P., 1976; Adema C.M., et al., 1994; Furuta E. et al., 1990; Yamaguchi et al., 1988). Согласно данным исследований, гемолимфа филомицид *Incilaria fruhstorferi* и *Incilaria bilineata* содержит три типа клеток крови, а именно: тип I (макрофагов), тип II (лимфоцитоподобных) и типа III (фибробластоподобных). Когда капля гемолимфы попадает на стекло или пластиковую чашку, клетки в ней имеют сферическую или яйцевидную форму в течение первых нескольких секунд наблюдения. Таким образом, крайне трудно провести различие между типами клеток в свежем препарате. Тем не менее, если пробу оставить в покое на 60 минут, три типа клеток станут морфологически узнаваемыми. Клетки I типа изначально круглые с короткими псевдоподиями. Тем не менее, со временем, они как бы увеличиваются, расплываясь по всем направлениям на подложке, при помощи длинных псевдоподий (ламеллоподии) с осевым цилиндром. Эти клетки составляют примерно 20-30  $\mu\text{m}$  в диаметре, с почковидным или бобовидным ядром около 5  $\mu\text{m}$  в диаметре. Ядерно-цитоплазматическое соотношение высокое. В цитоплазме содержатся многочисленные митохондрии, шероховатый ЭПР, везикулы, аппарат Гольджи и гранулы гликогенподобного вещества (Furuta E. et al., 1990).

Как и клетки типа I, клетки II типа также закрепляются на субстрате, но при этом остаются сферическими и способны образовывать небольшие псевдоподии. Кроме того, клетки второго типа мельче клеток первого. Клетки II типа содержат в цитоплазме рассеянные свободные рибосомы и митохондрии, окружающие круглое ядро (Furuta E. et al., 1990).

Клетки III типа – фибробластоподобные, веретенообразные клетки размером примерно  $75 \times 15 \text{ }\mu\text{m}$ . Они содержат микрофибриллы (12-15 нм в диаметре), остаточные тельца в цитоплазме, и обладают коллагеноподобными волокнами, выходящими за пределы цитоплазматической мембраны (Furuta E. et al., 1990).

Кроме клеток крови, в гемолимфе *I. fruhstorferi* или *I. bilineata* присутствует также огромное количество тромбоцитоподобных структур. Большинство этих тромбоцитоподобных структур имеют круглую форму, или яйцевидную в поперечном сечении, диаметром от 1 до 5  $\mu\text{m}$ . Каждая покрыта мембраной, но не содержит ядра. Количество клеточных элементов в гемолимфе хелицид *Cantareus aspersus*, как правило, невелико. Однако, в течение примерно 15 мин после ранения, это количество существенно увеличивается (Haughton L., 1934).

Для некоторых представителей рода *Helix* получены следующие данные (Ракочий В.К., Громик О.А., 2009): с помощью световой микроскопии было выявлено пять основных типов клеток, классифицированных ранее как десмобласты (ДБ), базофильные гранулоциты (БГ), эозинофильные гранулоциты (ЭГ), микроциты базофильные (МЦб) и эозинофильные (МЦэ) (Хлус Л.М., 2003). Кроме указанных типов клеток, на отдельных мазках встречались многоядерные крупные образования базофильной либо эозинофильной природы – базофильные и эозинофильные плазмодии. Однако данные клеточные элементы встречаются настолько редко, что это позволяет не учитывать их при составлении гемограмм (Хлус Л.Н., Гриб А.К., 2007).

Анализ гемоцитарных формул исследованных видов моллюсков позволил выявить следующие закономерности. Основной фракцией гемоцитов у животных всех исследованных популяций являются ДБ, число которых всегда очень велико и колеблется в диапазоне 90-99 клеток у *H. pomatia* и 88-99 – у *H. lutescens* (в пересчете на 100 клеток мазка), а в отдельных случаях все гемоциты на мазке относятся к этому типу. Очевидно, что преобладание этих клеток связано с их наименьшей функциональной специфичностью. Считается, что ДБ

способны дифференцироваться, образуя, по мере необходимости, другие типы гемоцитов (Хлус Л.М., 2003; Ракочий В.К. с соавт., 2010; Ракочий В.К., Громик О.А., 2009).

Следующими по численности фракциями являются базофильные и эозинофильные гранулоциты, причем у большинства животных преобладают БГ и лишь в отдельных случаях – ЭГ. Число клеток этих типов обычно колеблется в пределах 0-10 для БГ и 0-5 для ЭГ, хотя на отдельных мазках они могут по численности преобладать над ДБ (Ракочий В.К., Громик О.А., 2009).

Как базофильные, так и эозинофильные микроциты относятся к минорным фракциям клеток гемолимфы обоих исследованных видов. Они встречаются на отдельных мазках, где их количество обычно не превышает 3-4 клеток в пересчете на 100 гемоцитов (Ракочий В.К. с соавт., 2010; Ракочий В.К., Громик О.А., 2009).

Недавние исследования выявили у *B. glabrata* потенциальные митоген-связывающие белки, в том числе TGF- $\beta$  рецепторы 1 типа и эпидермальный фактор роста (EGF)-связывающие белки, которые усиливают регуляцию на ранних стадиях трематодной инфекции и, следовательно, являются потенциальными гемопоэз-стимулирующими факторами (Loker E., 2010).

Двустворчатые моллюски имеют открытую систему кровообращения, в которой гемолимфа, выходя из открытых концов артерии, омывает все органы, прежде чем вернуться к сердцу, пройдя через дыхательные структуры (жабры). Гемоциты, циркулирующие клетки двустворчатых моллюсков, несут ответственность за защиту от патогенных микроорганизмов (Галактионов В.Г., 1998).

Типология гемоцитов двустворчатых была спорным вопросом в течение длительного времени. На основании результатов морфологических и гистохимических исследований мидий и других съедобных моллюсков, гемоциты двустворчатых, как правило, разделяются на гиалиноциты и гранулоциты, а последние могут быть далее подразделены на эозинофильные

гранулированные гемоциты и базофильные зернистые гемоциты (Song L. et al., 2010).

У некоторых видов существуют и другие типы гемоцитов. Например, тип эозинофилов «III», морулоподобные клетки и бластоподобные клетки были обнаружены в гемолимфе *Cerastoderma edule*, *Tridacna derasa* и *Scrobicularia plana* соответственно (Song L. et al, 2010).

Гемолимфа *M. galloprovincialis*, полученная из замыкающей мышцы, представляет смешанную популяцию распластывающихся клеток, отличающихся по размеру и морфологии. На основе измерений размеров клетки методом проточной цитометрии были выделены четыре субпопуляции клеток. Эти субпопуляции форменных элементов крови были обозначены R1-R4 (Carballal M.J. et al., 1997; García-García El. et al., 2008).

R1 представлена большими зернистыми клетками с высоким значением SSC, в пределах между 15 и 20  $\mu\text{m}$  в диаметре и обладающими сравнительно небольшим ядром, расположенным эксцентрично. R2 представлена крупными полугранулярными клетками с промежуточным значением SSC, колеблющимися между 15 и 20  $\mu\text{m}$  в диаметре, и имеющими большое ядро. R3 клетки – небольшие полугранулярные клетки с промежуточным SSC значением, имеющие небольшое ядро и несколько мембранных расширений. R4 клетки – малые агранулярные (гиалиновые) клетки, с низким SSC значением, и хорошо заметным ядром, которое занимает большую часть цитоплазмы. Гиалиновые клетки имеют от 10 до 15  $\mu\text{m}$  в диаметре (García-García El. et al 2008).

#### **1.4. Особенности иммунных реакций моллюсков**

У моллюсков закупорка раны так же, как и у кольчатых червей, осуществляется мышечным сокращением, образованием пробки из клеток крови. При этом коагуляции плазмы не происходит. У *L. stagnalis* на границе раны мигрировавшие клетки крови активно фагоцитируют микроорганизмы и поврежденные ткани (Nunez P.E., 1997). У гастропод и двустворчатых моллюсков прочность клеточной пробки усиливается образованием коллагена,

который секретируется гемоцитами или мышечными клетками. При изучении *in vitro* агрегации гемоцитов показано, что этот процесс зависит от ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (Галактионов В.Г., 2005).

Значительные вариации в количестве клеток, способных к фагоцитозу, зарегистрированы у моллюсков: хемотаксис гемоцитов устрицы *Crassostrea virginica* продемонстрирован по отношению к цистам метацеркарий и убитым церкариям нескольких видов морских трематод, а также по отношению к живым грамположительным и грамотрицательным бактериям. Установлено, что в качестве хемотаксического соединения у гемоцитов мидии *Mytilus edulis* выступают липополисахариды различных бактерий (Moore C.A., Lowe D.M., 1977). При этом отдельные составляющие данного соединения (полисахариды, липиды) лишены свойств аттрактантов (Галактионов В.Г., 2005; Glinski Z., Jarosz J., 1997; Lopez C. et al., 1997)

Случайно или в результате хемотаксиса происходит встреча чужеродных агентов, проникших в организм, с гемоцитами, которые вступают в контактные отношения с этими агентами (Стадниченко А.П., Стадниченко Ю.А., 1981). Прикрепление микробов или иных частиц к клетке осуществляется за счет рецепторов клеточной поверхности. Другой путь – это взаимодействие чужеродного агента с гуморальными факторами, такими, например, как агглютинины. Последние, в свою очередь, имеют рецепторы на поверхности соответствующих клеток. Способность очищенных агглютининов выступать в качестве распознающих структур продемонстрировано при работе с улиткой *H. pomatia*, мидией *M. edulis*, дальневосточной устрицей *Crassostrea gigas* (Weigent D.A., Blalock J.E., 1987; Галактионов В.Г., 2005; Mourton C. et al., 1992).

Ультраструктурные и биохимические исследования с несколькими видами моллюсков продемонстрировали процесс реутилизации продуктов внутриклеточного разрушения микроорганизмов. Поглощенные бактерии перевариваются кислыми гидролазами клетки. Накапливающиеся моносахариды, жирные кислоты (продукты разрушения бактерий)

диффундируют через фагосомальные мембраны в цитоплазму, где происходит синтез глюкозы с образованием гликогеновых гранул. Примером подобных событий могут служить опыты с американской устрицей, зараженной *Bacillus megaterium*, меченной  $C^{14}$ . Впервые метка обнаруживается в экстрактах гликогена, выделенного из гемоцитов и тканей тела устрицы (Bayne C.J. et al., 1979; Pipe R.K., 1990; Галактионов В.Г., 2005).

#### 1.4.1. Клеточные реакции моллюсков

За последние десятилетия, как в отечественной, так и в зарубежной литературе, накоплены данные о том, что некоторые линии моллюсков проявляют 100%-устойчивость к заражению определенными видами трематод. Детальное изучение клеточного иммунитета моллюсков по-прежнему остается в стороне. К настоящему времени накоплены данные о существовании клеточных реакций, их участии в подавлении развития паразитов, однако сведения о характере и динамике этих процессов отсутствуют (Blalock J.E., Smith E.M., 1985; Hine P.M., 1999; Hoffman J.A., 1999).

Фагоцитоз и инкапсуляция – два основных гемоцитарных механизма устранения чужеродных веществ и мертвых клеток.

В первых исследованиях защитных клеточных реакций у беспозвоночных фагоцитоз был признан сопутствующим в основном протозойным заболеваниям (Догель В.А., 1962). Относительно гемоцитарных реакций моллюсков на проникновение и развитие трематод конкретные сведения появились позднее. Полученные данные указывают, что в специфичных паразито-хозяйинных системах вокруг партенит формируется мантия, возникающая за счет амебоцитов, или наблюдается подавление защитных реакций моллюсков паразитом (Семенов О.Ю., 1977; 1991; Гинецинская Т.А., Добровольский А.А., 1983). Формирование мантии вокруг партенит – это, так называемый, «извращенный», вариант клеточных реакций моллюска в ответ на проникновение паразита. В этом случае капсула, образованная гемоцитами, выполняет защитную и трофическую функцию для самого паразита. Этот вариант широко используется трематодами подотряда *Plagiorchiata*.

Амебоциты, входящие в состав мантии, подвергаются глубоким изменениям – теряют способность к амебоидному движению, заметно меняется их ультраструктурная организация и обмен. В результате функционально они становятся частью организма паразита, а сама мантия – трофико-энергетическим аппаратом дочерних спороцист плагиорхид (Галактионов К.В., Добровольский А.А., 1998).

Такой тип взаимоотношений между хозяином и паразитом также наблюдается между некоторыми личинками нематод и отдельными видами наземных моллюсков (Трушин И.Н., 1980; Sun J.F., Wu X.Z., 2004). Защитная реакция моллюсков этой группы начинается с образования клеточной реактивной зоны вокруг личинок, что приводит к морфологическому обособлению личинки как инородного биологического агента. Данная клеточная зона вокруг личинок служит своеобразным биологическим барьером, выполняющим трофическую функцию. Происходит это благодаря фагоцитирующей способности клеток крови амебоцитов, которые обезвреживают продукты обмена веществ, выделяемыми личинками, особенно в фазе активного морфогенеза (Галактионов В.Т., 1998).

В отечественной литературе показаны отдельные случаи амебоцитной реакции, которая начинает протекать вокруг стареющих партенит; при этом мантия по мере «старения» партенит сама становится объектом инкапсуляции. Отмечается образование многослойной соединительно-тканной капсулы, которая плотным кольцом окружает спороцисту, изолируя ее от тканей моллюска (Sparks A.K., Pauley G.B., 1964; Галкин А.К., 1976).

В неспецифических паразито-хозяинных моделях защитные реакции моллюсков позволяют предотвратить их заражение трематодами; и в природе существует такая резистентность моллюсков к определенным дигенеям (Langand J. et al., 1998). Многочисленные исследования показали наличие генетической основы иммунобиологической чувствительности и резистентности у лабораторных линий моллюсков *B. glabrata* к заражению шистосомами, а также к заражению *E. caproni* (Langand J. et al., 1998; Coustau C.



et al., 1997; Ataev G.L., Coustau C., 1999). В связи с этим, моллюски двух линий – резистентной и восприимчивой к инвазии, являются удобной моделью, позволяющей в сравнении изучать клеточные реакции.

При активном проявлении защитной реакции наблюдается инкапсуляция и полное разрушение спороцист. Такие результаты были показаны при исследовании клеточного ответа у лабораторной линии моллюсков *B. glabrata*, проявляющих 100%-ую резистентность к заражению трематодами *E. caproni* (Ataev G.L., Coustau C., 1999).

Ярко выраженная гемоцитная реакция наблюдается на второй день после заражения. Огромные скопления гемоцитов обнаруживаются в области сердца, а отдельные клетки гемолимфы – на поверхности спороцисты. Клеточный ответ усиливается и на 3-й день после заражения приводит к инкапсуляции спороцисты. При этом внутренние слои гемоцитов, формирующие капсулу, находятся в контакте со спороцистой. Её тегумент разрушается, и гемоциты проникают в тело паразита. В некоторых случаях наблюдается свободное пространство между тегументом спороцисты и капсулой. На 4-й день после заражения наблюдается ярко выраженная деградация спороцист, а к 7-ому дню спороцисты становятся еле различимыми внутри капсулы (Аванесян А.В., 2002).

В отдельных случаях при заражении моллюсков наблюдается нейтральное отношение последних к внедрившемуся паразиту. При этом чужеродный объект не воспринимается моллюском как патоген. Это также показано для личинок нематод, адаптированных к определенным группам моллюсков (Трушин И.Н., 1980). В организме моллюсков личинки развиваются в самые короткие сроки, моллюски в этом случае являются наиболее восприимчивыми к заражению, и клеточная инфильтрация вокруг личинок выражена слабо.

Основным защитным процессом является плотная клеточная изоляция патогена гемоцитами моллюска, что подтверждается результатами

отечественных и зарубежных исследований. В связи с этим возникла необходимость изучения очагов гемопоэза, характера и работы этих структур.

Работа АПО и клеточные иммунные реакции выявлены в ходе изучения трансплантационного иммунитета моллюсков (Jourdane J., Cheng T.C., 1987). Пересадка чужеродных объектов наглядно показала роль амебоцитов в подавлении чужеродного агента. По определению, трансплантационный иммунитет является специфической реакцией организма на генетически отличающийся биологический материал, проявляющийся в отторжении неродственных структур и в создании иммунологической памяти от первичного контакта с чужеродным объектом. Констатация факта специфической реакции на трансплантационные антигены у моллюсков позволяет говорить о наличии у них специфической иммунной формы защиты (Аванесян А. В., 2002).

Одной из удобных техник для изучения гистосовместимости является пересадка фрагментов ткани. В качестве трансплантатов используются самые различные ткани: фрагменты и целые эмбриональные глаза, кусочки ноги, головы, пищеварительной железы, жабр, мантии и даже амебоцит-продуцирующий орган. Так, например, была показана способность моллюсков *B. glabrata* распознавать, как чужеродный биотический материал, так и аллотрансплантаты головы, ноги, пищеварительной железы и формировать вокруг них капсулы (Jourdane J., Cheng T.C., 1987). Описанная инкапсуляция всех этих объектов опровергает предположение о том, что инкапсуляция вызывается действием литических энзимов, выделяемых при разрушении клеток пищеварительной железы (Ratcliffe N.A., Söderhäll K., 1985). Серия экспериментов, проведенных на *B. glabrata*, позволили исследователям сделать вывод о том, что инкапсуляция чужеродного биотического материала представляет собой неоднородный процесс (Jourdane J., Cheng T.C., 1987). Выделено в процессе инкапсуляции две фазы:

1. Гранулоциты хемотаксично привлекаются трансплантатами и, уплощаясь, располагаются на их поверхности, что приводит к ее изменению;

2. В результате завершения первой фазы возникает какой-то сигнал от изменяющихся трансплантатов, который вызывает приток дополнительных клеток и стимулирует синтез межклеточного фиброзного материала. С появлением первичных фибрилл вокруг аллотрансплантатов начинают формироваться постоянные капсулы.

Jourdane и Cheng (1987) также подтвердили установленную ранее зависимость размеров капсулы от типа пересаживаемых аллогенных тканей (Lackie A.M., Lackie J.M., 1979; Lackie A.M. Nuxham I.M., 1988). Определено, что максимальное развитие капсулы вокруг фрагментов пищеварительной железы наступает через 24 часа, а вокруг имплантатов головы и ноги – через 72 часа после трансплантации. Следовательно, аллотрансплантаты пищеварительной железы вызывают более быструю клеточную реакцию хозяина, чем трансплантаты тканей головы и ноги. Однако вокруг последних образуются более мощные капсулы (толщиной 210,5-289,2  $\mu\text{m}$ ), чем вокруг фрагментов пищеварительной железы (165,2  $\mu\text{m}$ ).

Данная реакция на аллотрансплантаты, во многом, сходна, по мнению авторов, с процессом инкапсуляции спороцист *S. mansoni* в *B. glabrata* бразильской (резистентной к шистозомам) линии (Jourdanе J., 1982). Проведенные исследования с судьбой изотрансплантатов (Jourdanе J., Cheng T.C., 1987) позволили авторам заключить, что моллюски *B. glabrata* бразильской линии способны различать изо- и аллотрансплантаты.

Так, например, эксперименты по пересадке фрагментов передней стенки перикарда *B. glabrata* (которая является амебоцит-продуцирующим органом этого вида) дали следующие результаты (Sullivan J.T., 1990, Sullivan J.T., et al., 1995). Кроме очагов гемоцитов, участвующих на ранних стадиях в реакции инкапсуляции чужеродных объектов, других признаков отторжения отмечено не было. Более того, большинство имплантированных амебоцит-продуцирующих органов продемонстрировало признаки гемоцитной активности.

При заражении моллюсков *S. mansoni* у реципиентов АПО наблюдалась пониженная восприимчивость к этому паразиту, что также подтверждает роль АПО в устойчивости моллюсков перед трематодной инвазией. Эксперименты по имплантации у *L. stagnalis* выявили увеличение числа циркулирующих амебоцитов в 2-3 раза по сравнению с контролем. Однако не отмечено различий в числе клеток и интенсивности инкапсуляции у моллюсков, которым были введены различные комбинации ксеногенных или аллогенных имплантантов (Bayne C.J. et al., 1979).

В целом, можно сказать, что наличие трансплантационного иммунитета у моллюсков является важным доказательством целенаправленности работы АПО. Одной из задач дальнейшего исследования органа пролиферации амебоцитов становится изучение динамики работы АПО: начала активизации, периода максимальной деятельности и ее спада. К настоящему времени этот вопрос остается практически неизученным. Были попытки проследить изменения внешнего вида АПО при заражении моллюсков *B. glabrata* (Lie K.J., Neuneman D., 1975; 1976). Авторы отмечают, что в незараженных моллюсках амебоцит-продуцирующий орган остается крайне малым по размерам и распознается часто в виде мелких групп округлых или вытянутых клеток, расположенных вдоль задней мембраны мантийной полости. Митозы в этих клетках практически не наблюдались. На ранних стадиях заражения моллюсков партенитами *E. lindoense* АПО медленно расширяется, увеличиваются размеры узелков, в клетках наблюдаются митозы. Изучение ответа АПО моллюска *B. glabrata* на его заражение мирацидиями *E. caproni* уже другими авторами (Joku A. et al., 1985) показало, что продукция амебоцитов начиналась вскоре после внедрения мирацидия, достигала максимума на 3-4 день после заражения, а затем быстро уменьшалась на седьмой день.

Не менее важным является изучение связи работы АПО с процессом инкапсуляции паразита гемоцитами моллюска и оценка динамики этой связи. На данный момент существуют определенные результаты относительно динамики инкапсуляции материнских спорозист *E. caproni* гемоцитами

моллюска *B. glabrata* (Ataev G.L., Coustau C., 1999; Атаев Г.Л., Прохорова Е.Л., 2010). Однако эти данные требуют дальнейшего комплексного анализа динамики инкапсуляции, как с точки зрения блокирования паразита гемоцитами моллюска, так и со стороны работы АПО.

Как и все беспозвоночные, имеющие целомическую полость, моллюски способны распознавать и различать между собой свое и чужеродное, главным образом с помощью клеточных и гуморальных компонентов гемолимфы. Беспозвоночные, как и позвоночные, защищены от заражения микроорганизмами с помощью внутренних защитных механизмов. Некоторые функции связываются с клетками крови брюхоногих (Haughton L., 1934; Wagge L.E., 1955; Bayne C.J., 1983; Furuta E. et al., 1990; Adema C.M. et al., 1992), способными к выполнению таких важных защитных функций, как фагоцитоз (Prowse R.H., Tait N.N., 1969; Furuta E. et al., 1990), инкапсуляция и ранозаживление (Haughton L., 1934; Yamaguchi K. et al., 1999).

Однако, другие структуры, например, кожа и стенка тела, а также фагоцитирующие клетки, расположенные в различных тканях также принимают участие в защитных реакциях. У брюхоногих моллюсков *L. stagnalis* клетки с фагоцитарной активностью распределены в соединительной ткани (Sminia T., Varendsen L.H., 1980) и в органах, таких как пищеварительные железы. Эти клетки представляют собой фиксированные системы фагоцитов у *H. pomatia* (Reade P., 1968), в то время как у *P. corneus* они распределены по всей железе (Ottaviani E., 1989; Ottaviani E., Franceschi C., 1997). У *H. pomatia* фагоцитирующие клетки были описаны в крови синуса и почек (Renwrantz L.R. et al., 1981). Также известно, что в то время, как деградирующие частицы усваиваются иммунными клетками двустворчатых моллюсков *Crassostrea virginica* и *Mercenaria mercenaria* (Tripp M.R., 1958; 1960; 1992), переваренные частицы устраняются с помощью миграции фагоцитов через эпителиальные границы.

#### 1.4.2. Гуморальные реакции моллюсков

Гуморальными регуляторами механизма узнавания и инкапсуляции паразитов гемоцитами являются опсонины, агглютинины, цитокиноподобные молекулы (Wayne C.J. et al., 1985; Yoshino T.P., 1976; Loker E.S., Wayne C.J., 1986). Кроме того, в данных процессах могут быть задействованы также цитотоксические факторы (Wayne C.J. et al., 1985; Wayne C.J., Yoshino T.P., 1989). Есть предположение, что при отсутствии иммуноглобулинов распознающими факторами в моллюске, вероятно, являются лектины (Галактионов В.Т., 1998).

Гемоциты отвечают за синтез и высвобождение таких защитных факторов, как активные формы кислорода (ROS, АФК), лектинов, таких как фибриноген-связывающие белки (FREPs) и антимикробные пептиды (AMPS). Мембранно-связанные лектины гемоцитов вовлечены в процесс распознавания чужеродных агентов. Например, галектин присутствующий на поверхности ~60% гемоцитов *B. glabrata*, в рекомбинантной связывается с тегументом спороцист *S. mansoni* в углеводно-ингибируемой форме, и предполагается, что он является гемоцит-связанной распознающей молекулой (Ataev G.L., 1998; Balan D.S.L., 1993; Loker E., 2010).

Также предполагается, что у гемоцитов существуют «рецепторы-счетчики», в виде интегрин-подобных молекул, которые могут быть связаны с растворимой формой галектина таким образом, что галектин может осуществлять поперечное связывание гемоцитов с поверхностью паразита. Ключ к пониманию эффекторных функций гемоцитов – это внутриклеточные пути передачи сигнала, которые, очевидно, активируются при воздействии экзотических раздражителей на гемоциты (Coustau C., Yoshino T., 1994; Carballal M.J., 1997; Söderhäll K., 2010).

Стимуляция гемоцитов РМА, воздействующего на РКС, приводит к выработке  $H_2O_2$  у *B. glabrata*, супероксид-анионов в *L. littorina*, и NO у *L. stagnalis*. Активация РКС, вероятно, приводит к активации с помощью фосфорилирования митоген активированной протеинкиназы (МАРК), такой как

ERK или p38, поскольку ингибиторы MAPK также препятствуют распластыванию гемоцитов и продукции  $H_2O_2$  (Cheng T.C., Downs J.C.U., 1988; Söderhäll K., 2010).

Более натуральные стимулы, такие как ламинарин, также активируют PKC и продукцию  $H_2O_2$  в гемоцитах. Роль фосфатидилинозитол-3-киназы в управлении фагоцитарной активностью была показана у гемоцитов *L. stagnalis*, и G-протеин-связанные мембранные рецепторы были недавно выявлены у *L. littorea* (Söderhäll K., 2010).

Toll -подобные рецепторы (TLR) и связанные с ними компоненты Toll путей, таких как MyD88, обнаружены у головоногих и двустворчатых моллюсков. Гомологи TLR присутствует в геноме *Lottia*, REL-подобные NF- $\kappa$ B транскрипционные факторы были обнаружены у представителей семейства *Haliotidae*, а Dorsal-подобные и Rel-подобные транскрипционные факторы обнаружены у *B. glabrata* (Zhang S.M., Loker E.S., 2004), поэтому дополнительные гомологи Toll-пути, скорее всего, должны присутствовать у брюхоногих моллюсков, хотя их функциональное значение до сих пор неизвестно. Исполняющими обязанности перед Toll-сигнальными путями у других беспозвоночных являются молекулы узнавания, такие как PGRPs (peptidoglycan recognition protein) и GGBP (gram-negative binding protein или B-1-3 glycan recognition/ binding protein или LGBP) (Loker E., 2010).

Что касается *M. galloprovincialis*, для определения, какая из различных представленных субпопуляций гемоцитов способна производить активные формы кислорода (ROS), использовали зимозан. Большие гранулированные (R1), большие полугранулярные (R2) и малые полугранулярные гемоциты (R3) способны к продукции АФК в сопоставимых значениях. Малые гиалиновые (R4) гемоциты способны к высвобождению небольшого количества АФК, но это приращение статистически не отличается от уровня в контроле (от нестимулированных клеток) (Carballal M.J. et al., 1997, García-García El. et al., 2008).

Все субпопуляции форменных элементов крови в опыте были способны производить оксид азота (NO) в ответ на стимуляцию зимозаном. Большие гранулярные (R1), и большие полугранулярные гемоциты (R2) производили достаточно мало NO, но все же в два раза больше, чем нестимулированные клетки. Малые полугранулярные (R3) и малые гиалиновые (R4) гемоциты показали меньший уровень приращения производства NO, однако статистически достоверно отличающийся от интактного уровня (Wajdi N., 1966; Xing J. et al., 2002, García-García El. et al., 2008).

Недавние протеомные исследования показали, что 16 из 20 полипептидов, обнаруженных в жидкости яичной массы *B. glabrata* имеют защитную роль, и включают в себя ингибиторы протеаз, соединения с возможной фенолоксидазной активностью, Cu-Zn супероксид дисмутаза, лектины С-типа, GGBP, белки типа aplysianin/achacin и LBP/BPI или липополисахарид-связывающий белок / белок, увеличивающий проницаемость бактерий. Защитные соединения, выработанные белковой железой, вероятно, системно распределяются в плазме для защиты взрослой улитки (Plows L.D. et al., 2004; Loker E., 2010).

Особенностью иммунитета брюхоногих является ограниченная степень, в которой улитки могут полагаться на фенолоксидазы и ситуативная продукция меланина, чтобы истребить или ограждать от патогенных микроорганизмов, это присутствует у наиболее широко изученных брюхоногих (Wilson R.A. et al., 1971; Loker E., 2010).

Отличительной чертой моллюсков является способность производить упорядоченную компарментализированную структуру кристаллов арагонита, из которого состоит перламутровая оболочка, что также может быть использовано в качестве защитного механизма – изолируя макроскопические патогены, такие как метацеркарии трематод (Barker G.M., 2001).

В последних иммунологических исследованиях брюхоногих преобладают исследования с использованием в качестве объектов пресноводных легочных моллюсков, в особенности представителя семейства *B. glabrata* (Söderhäll K.,



2010). Это оправдано, учитывая, что этот вид служит промежуточными хозяевами трематод медицинского или ветеринарного значения, такими как *S. mansoni* (Medzhitov R., Janeway C.A., 2002; Loker E., 2010).

В ходе исследований взаимодействий в связке «трематода-улитка» было выявлено наличие устойчивых и чувствительных к заражению моллюсков. Невозможно до конца четко объяснить причину такого разделения, но исследования показывают, что гемоциты устойчивых к инфекции *S. mansoni* особей производят гораздо больше  $H_2O_2$ , чем гемоциты восприимчивых улиток (Hahn U.K. et al., 2001; Montes J.F. et al., 1995; Loker E., 2010).

Пероксид водорода является летальным фактором для спороцист *S. mansoni*, поскольку, ввиду своего образа жизни, они весьма уязвимы к высокому кислородному напряжению (Plows L.D. et al., 2004; Loker E., 2010).

Устойчивые к трематодному заражению моллюски обладают большим числом различных аллельных форм фермента Cu/Zn супероксиддисмутазы, участвующего в производстве перекиси водорода, чем восприимчивые особи, хотя неясно, каким именно образом регулируется эта регуляция на генетическом уровне, для достижения нужной конечной концентрации перекиси водорода. Со стороны паразита, протеомные исследования личиночных трансформационных белков (LTP) показали, что спороцисты обоих видов – *S. mansoni* и *E. paraensei* обладают молекулами, участвующими в нейтрализации активных форм кислорода (АФК), причем этот механизм настолько эффективен, что может спасти паразита от пероксидазной атаки гемоцитов хозяина. Также среди ЛТП найдены яд-подобные белки и гликоконъюгаты, многие из которых несут фукозные остатки и помогают маскировать оболочки паразита под оболочки клеток хозяина, также содержащие молекулы с фукозными остатками (Huffman J.E., Tripp M.R., 1982; Loker E., 2010).

Несмотря на то, что паразиты обладают такой беспрецедентной системой защиты и маскировки, организм *B. glabrata*, тем не менее, обычно распознает

присутствие *S. mansoni* или *E. paraensei* в течение нескольких часов после заражения (Granath W.O., Yoshino T., 1984; Hernroth B., 2003; Loker E., 2010).

Гемоциты зараженных трематодами моллюсков часто демонстрируют снижение способности к осаждению и распластыванию на поверхности, участию в фагоцитозе и инкапсуляции личинок трематод, все эти эффекты наблюдаются при экспозиции гемоцитов с личиночными трансформационными белками, выделенными из спороцист шистосом или редий (Degaffe G., Loker E.S., 1998; Chai L-Q. et al., 2008; Loker E., 2010).

После воздействия LTP или цельными спороцистами *S. mansoni* ERK [extracellular signal-regulated kinase]-зависимая сигнализация нарушалась в гемоцитах восприимчивых к заражению особей *B. glabrata*, в отличие от гемоцитов устойчивых к шистосомам улиток. Поскольку ERK осуществляет регуляцию важнейших эффекторных функций гемоцитов, было высказано предположение, что нарушение ERK сигнализации, возможно, происходит за счет углеводов, экспрессированных на поверхностях паразита или в LTP, что способствует выживанию спороцист *S. mansoni* в организме восприимчивых улиток (Balan D.S.L., 1993; Adema C.M. et al., 2000; Söderhäll K., 2010).

Также выяснено, что компоненты плазмы могут защищать гемоциты от подавляющего воздействия паразитов на их сигнальные пути, что объясняет, почему некоторые плазменные факторы, например FREP4, имеет повышенную активность у моллюсков, которые были успешно заражены сосальщиками (Adema C.M. et al., 1997; 1999; Mitta G. et al., 2000; Söderhäll K., 2010).

### **1.5. Фагоцитоз и ликвидация чужеродных агентов**

Исследования с участием видов *Incilaria bensoni* продемонстрировали, что клетки крови фагоцитируют различные типы инородных частиц, как биотические (красные клетки крови и клетки дрожжей), так и абиотические (тушь и шарики латекса различных размеров). Разные типы клеток крови дифференциально фагоцитируют инородные частицы, хотя, в среднем, меньшие частицы фагоцитируются легче, чем более крупные. Аналогичные

результаты были получены в опытах с *A. achatina*, *A. fulica*, *C. aspersus* и *H. pomatia* (Haughton L., 1934; Wagge L.E., 1955; Prowse R.H., Tait N.N., 1969; Bayne C.J., 1979; Renwranz L.R. et al., 1981; Adema A. et al., 1992), где амебоциты поглощали инородные частицы (кармин и зимозан) и клетки (бактерии, дрожжевые клетки, красные клетки крови овец и эритроциты человека) (Foley D.A., Cheng T.C., 1972; 1975; Russell-Pinto F. et al., 1994; Hine P. M., Wesney B., 1994; Cima F. et al., 2000).

Морфологический и ультраструктурный анализ показывает, что фагоцитоз инородных частиц макрофагоподобными клетками (амебоцитами или клетками типа 1 *Incilaria*) осуществляется путем обволакивания псевдоподиями данных частиц. При инвагинации клеточных мембран, инородный материал оказывается заключенным в фагосому. Фагосомы делятся на первичные и вторичные лизосомы, где изолированные инородные частицы подвергаются воздействию гидролитических ферментов. Подтверждением этому служит тот факт, что кислая фосфатаза и неспецифические эстеразы были найдены в гемолимфе *I. fruhstorferi* и у пресноводных легочных *L. stagnalis* (Sminia T., 1972; Furuta E. et al., 1990). Отсутствующие у *Incilaria* (Furuta E. et al., 1990), пероксидазы присутствуют в лизосомальной системе *L. stagnalis*, где выполняют бактерицидную, фунгицидную и противовирусную функцию, сходную с функциями лейкоцитов млекопитающих (Klebanoff S.J., Clark R.A., 1978; Sminia T., 1972).

Использование рентгеновского и гистологических методов с отслеживанием движения рентгено-контрастных меток диоксида тория, позволило исследовать пути ликвидации инородных не метаболизируемых частиц из тела *C. aspersus* после инъекции в ножной синус. Рентгено-контрастная двуокись тория создает интенсивные тени на рентгеновском снимке тела, с максимальной интенсивностью на четвертый или пятый день. На десятый день рентгено-контрастная метка становится практически невидимой, как едва различимая тень по тканям тела. Накапливающие ториевую метку амебоциты первоначально собирались в дистальных участках репродуктивных

органов, а на 10 или 11 день эти клеточные скопления исчезали (Barker G. M., 2001).

Некоторые исследователи поддерживают точку зрения, что амебоциты постепенно движутся в места скопления инородных частиц (Cheng T.C., Galloway P.C., 1970; Pauley G.B. et al., 1971), другие говорят в пользу системы фиксированных фагоцитов, которые поглощают инородные частицы из циркулирующей гемолимфы (Reade P., 1968; Stuart G.S., 1968; Bayne C.J., 1973; Renwantz L.R. et al., 1981). По Bayne (1973), бактерии, вводящиеся в гемолимфу *H. pomatia* ликвидируются в среднем в течение 1 ч. Бактериальные клетки не накапливаются в циркулирующих амебоцитах – они лизируются. Это говорит о том, что бактерии поглощаются из циркулирующей гемолимфы фагоцитами, которые находятся в фиксированных точках в полостях тела. Bayne (1973) считает, что пищеварительные железы – это основное место, где происходит очищение гемолимфы. У брюхоногих моллюсков отсутствуют классические молекулы распознавания, которые присутствуют у позвоночных, такие как иммуноглобулины, Т-клетки, главный комплекс гистосовместимости (МНС) или рецепторы антигенов. Однако эти животные обладают способностью различать не только «свое» и «чужое», а также отличать чужеродные материалы по химическим свойствам (Bayne C.J., 1983; Cooper G.S. et al., 1992).

Когда посторонние частицы попадают в тело животных, но являются слишком большими, чтобы быть фагоцитированными отдельными клетками, они инкапсулируются большим числом клеток крови. Информация об инкапсуляции паразитов стала доступна благодаря исследованиям на пресноводных брюхоногих моллюсках, но процессы инкапсуляции у наземных брюхоногих плохо изучены. В соответствии с исследованиями Sauerländer и Eckert (Sauerländer R., Eckert J., 1974), *A. fulica* экспериментально заражается личинками первой стадии нематод *Angiostrongylus cantonensis*, и организм реагирует появлением в гемолимфе и соединительной ткани большого количества амебоцитов. В течение 12 ч, паразиты инкапсулировались большим

числом амебоцитов, которые приобретали вытянутую форму во внешних областях капсулы. После 3 дней, ядра этих амебоцитов стали веретенообразной формы и капсулы вокруг паразитов образовались концентрическими слоями (фибробластный тип инкапсуляции). Также выявлено явление инкапсуляции паразитов фибробластоподобными клетками в *Lehmannia marginata* (Barker G.M., 2004). У пресноводных видов *L. stagnalis*, капсулы, формирующиеся вокруг биологически инертных имплантатов, обладают внутренним слоем уплощенных и плотно упакованных клеток. Первоначально плоские амебоциты из среднего слоя отделяются от внешних слоев, и межклеточные пространства заполняются волокнами соединительной ткани. Очевидно, что эти межклеточные вещества синтезируются амебоцитами, которые превращаются в фибробласты (Sminia T., 1981). В экспериментах с кожей *I. fruhstorferi*, аллотрансплантаты и аутоотрансплантаты первоначально были распознаны и атакованы многочисленными макрофагами реципиента. Аутоотрансплантат прижился в ткани реципиента, где произошел ранозаживляющий ответ (Yamaguchi K. et al., 1999). Тем не менее, аллотрансплантаты были отторжены макрофагами реципиентов, и клетки погибли по механизму апоптоза.

Было проведено несколько исследований, посвященных роли клеток крови в процессах заживления ран у брюхоногих моллюсков. Yamaguchi с соавт. (1988) обнаружили, что короткий разрез в коже *I. fruhstorferi*, сразу сжимается через сокращение мышц стенки тела. В течение первых 30 мин, область ранения была заполнена агрегированными тромбоцитоподобными структурами (PLSs) пришедшими из гемолимфы: PLSs по всей видимости, играют роль в гемолимфе роль свертывающих агентов (Furuta E. et al., 1990), это начальный этап заживления раны, необходимый для предотвращения дальнейшей потери гемолимфы. В течение 1 дня, макрофаги, которые присутствовали на месте повреждения, приобретали уплощенную форму и распластывались по поверхности, становясь зачатками регенерирующей раневой поверхности. В течение 4 дней начального повреждения тканей,

недифференцированные эпидермальные клетки начинали расти в рану (Yamaguchi K. et al., 1988).

Среди всех типов клеток представителей *Bivalvia*, гранулярные гемоциты являются наиболее многочисленным типом, в клетках много различных гидролитических ферментов, их основная функция – фагоцитоз (Cajaraville M.P., Pal S.G., 1995).

Гемоциты *Bivalvia* могут поглощать разнообразные частицы, включая бактерии, водоросли, дрожжи, чужеродные клетки крови и латексные шарики (Canesi L. et al., 2002).

Первым этапом фагоцитоза также является прикрепление фагоцита к целевой частице. Многочисленные исследования показали, что гемоциты многих видов двустворчатых моллюсков обладают хемотаксической, а также хемокинетической реакцией, тип которой зависит от природы чужеродных молекул.

У мидий *M. edulis*, липополисахариды (ЛПС) *S. marcescens* и *E. coli* стимулируют миграцию клеток. У европейских плоских устриц *Ostrea edulis*, после заражения *Bonamia ostreae* гемоциты мигрировали из кровеносной системы в соединительную ткань (Cochennec-Laureau N. et al., 2003).

Гемоциты *Mercenaria mercenaria* мигрировали в направлении не только пептидов или небольших белков выделяемых грамположительных и грамотрицательных бактерий. После хемотаксиса, фагоциты адгезируют к патогенам, с последующей модификацией цитоскелета, захватом и уничтожением захваченных объектов с помощью фагосом (Costa M.M. et al., 2009).

У *M. galloprovincialis*, гиалиноциты и гранулоциты могут выполнять функцию фагоцитоза за счет формирования мембранных пузырьков и немембранных эндоцитотических везикул, причем клетки различной морфологии показывают различные уровни фагоцитоза к зимозану, латексным шарикам и бактериям (Costa M.M. et al., 2009).

После захвата чужеродных агентов, фагосомы и лизосомы сливаются, и захваченная цель уничтожается в фагосомах с помощью лизосомальных ферментов, активных форм кислорода (АФК), оксида азота (NO), а также антимикробных факторов. В процессе фагоцитоза, высвобождение лизирующих ферментов для уничтожения инородных материалов осуществляется вместе с внезапным высвобождением активных форм кислорода внутри гемоцитов, которое называют респираторный взрыв (Hooper C. et al., 2007).

АФК выступают в качестве убивающих агентов, по отдельности или в сочетании с лизосомальными ферментами, и играют важную роль в фагоцитарно-опосредованном уничтожении микроорганизмов (Cheng T.C. et al., 2008).

Исследования устриц *Crassostrea ariakensis* показали, что гранулоциты были наиболее активны во время спонтанной продукции АФК. У моллюска *M. mercenaria*, гемоцитарный кислородный взрыв был активирован в ответ на стимуляцию зимозаном и продуктами жизнедеятельности бактерий, и дополнительно усилил продукцию АФК в форменных элементах крови (Prince J.S., 2003).

Втягивание различных мишеней фагоцитоза целей и продукция АФК и NO у *M. galloprovincialis* блокировались путем ингибирования фосфатидилинозитол-3-киназой, протеинкиназой C и внеклеточной SRK (signal-regulated kinase) (Cheng T.C. et al., 2008).

Кроме того, многие другие факторы гемолимфы также помогают фагоцитозу, в том числе агглютинины (например, лектины) и различные антимикробные пептиды (Van Horn D.J. et al., 2008).

Лектины двустворчатых имеют различные углевод-связывающие спецификации и участвуют в распознавании чужеродных агентов (Cheng T.C. et al., 2008).

Антимикробные пептиды также вовлечены в процесс уничтожения бактерий внутри фагоцитов, причем еще до выхода в гемолимфу в качестве участников системных ответов (Curtis L.A., 2007).

Другой механизм клеточного иммунного ответа беспозвоночных – инкапсуляция, представляющая собой защитную реакцию на вторжение чужеродных агентов, которые слишком велики, чтобы их фагоцитировать. В общих чертах, капсула из гемоцитов охватывает инородное тело (например, многоклеточного паразита) и гемоциты вырабатывают цитотоксические продукты (например, расщепляющие ферменты и свободные радикалы) с целью уничтожить вторгшийся организм. В инкапсуляторном ответе *Crassostrea gigas* против копепод *Myicola ostreae*, на поверхности жабр *C. gigas* рачки поглощались массивным скоплением гемоцитоподобных клеток, окруженным тонким слоем фибробластоподобных клеток. Моллюск *Dreissena polymorpha* также использует такой защитный механизм при инфицировании трематодами *Viscerhalus polymorphus* (Lockyer A.E. et al., 2004).

Исследования на *M. galloprovincialis* показали некоторую специфичность фагоцитоза по отношению к различным агентам: зимозан, латексные шарики, и бактерии *V. alginolyticus* эффективно поглощались крупными гранулированными (R1), большими полугранулярными (R2), и малыми полугранулярными (R3) гемоцитами, а бактерии кишечной палочки, не являющиеся патогенными для моллюсков, не были фагоцитированы. Малые гиалиновые гемоциты (R4) вообще не участвовали в процессе фагоцитоза. Большие гранулированные гемоциты популяции R1 были наиболее эффективны в фагоцитозе, на втором месте – крупные полугранулярные (R2) гемоциты, а затем малые полугранулярные (R3) гемоциты (García-García El. et al., 2008).

Зимозан фагоцитировали примерно 40% от общего количества больших гранулированных (R1) клеток, и примерно 25% общего числа больших полугранулярных (R2) или малых полугранулярных (R3) клеток. Латексные шарики были фагоцитированы около 40 процентами крупных зернистых (R1) клеток, примерно 30 процентами крупных полугранулярных (R2) клеток, и только около 10 процентами малых полугранулярных (R3) клеток (Humbert E., Coustau C., 2001; García-García El. et al., 2008).



Бактерии *V. alginolyticus* эффективно поглощались 60 процентами общего количества больших гранулярных (R1) клеток, примерно 45 процентами крупных полугранулярных (R2) клеток, и почти 30 процентами малых полугранулярных (R3) клеток. Эти результаты показали, что большие гранулированные (R1) и большие полугранулярные (R2) гемоциты мидий являются эффекторными фагоцитами (Nakayama K. et al., 1997; García-García El. et al., 2008).

Чтобы оценить потенциал фагоцитоза различных подтипов гемоцитов *M. galloprovincialis*, клетки смешивали с несколькими мечеными флуоресцеином мишенями, инкубировали с ними в среде до полного поглощения, а затем анализировали с помощью проточной цитометрии. Гемоциты в субпопуляции R1 (большие гранулярные гемоциты), R2 (большие полугранулярные гемоциты), и R3 (малые полугранулярные гемоциты) были способны к фагоцитозу, хотя в разной степени. Как и у фагоцитов млекопитающих, специализированные фагоциты *M. galloprovincialis* отличаются высокой фагоцитарной емкостью, и производят высокие уровни АФК и NO при активации. Малые полугранулярные гемоциты *M. galloprovincialis* (R3) играют незначительную роль в фагоцитозе и производстве АФК и NO, но не исключено, что они участвуют в других иммунных реакциях, таких как коагуляция, инкапсуляция, или защита от вирусов. Малые гиалиновые гемоциты (R4) *M. galloprovincialis* не показывают способности к фагоцитозу, и очень вероятно, что эти клетки специализированы для коагуляции или инкапсуляции, как было показано для гиалиноцитов других беспозвоночных (Moore C.A, 1977; García-García El. et al., 2008).

В соответствии с полученными результатами, можно судить, что большие гранулоциты и большие полугранулярные клетки *M. galloprovincialis* способны к активному и эффективному фагоцитозу, что соответствует данным, полученным на других беспозвоночных. Малые гиалиновые клетки *M. galloprovincialis* к фагоцитозу неспособны (Degaffe G., Loker E.S, 1998; García-García El. et al., 2008). В других источниках существует противоречивая

информация, касающаяся фагоцитарной емкости гиалиновых гемоцитов (García-García El. et al., 2008). В то время как одни отчеты указывают на отсутствие фагоцитарного потенциала в этих клетках, другие отчеты подтверждают наличие низкого фагоцитарного потенциала у гиалиноцитов. Также невозможно достоверно подтвердить или опровергнуть данные об иных функциях, выполняемых гиалиноцитами, в данный момент, исходя из достаточно противоречивых результатов экспериментов различных исследователей (Lopez C. et al., 1997; García-García El. et al., 2008).

### **1.6. Иммунологическая память гемоцитов моллюсков**

Стандартная парадигма утверждает, что у беспозвоночных изначально есть определенный базовый набор рецепторов для распознавания определенных возбудителей, и стандартный набор ответов на вторжение инородных агентов, таких как фагоцитоз, инкапсуляция или выработка активных защитных факторов (лектины, активные формы кислорода, аденозин-монофосфат). Однако беспозвоночные показывают куда более высокую сложность защитных реакций, чем предполагалось, что можно объяснить постоянно меняющимися факторами среды и эволюционированием патогенов (Barker G.M., 2001).

Многие беспозвоночные могут жить десятилетиями, и возбудители, которые способны приспособливаться к иммунным ответам хозяина, уничтожили бы хозяина, если бы он обладал фиксированным набором защитных реакций и не мог бы их варьировать (Кузьмович Л.Г., 1976). Моллюски могут вырабатывать молекулы с разными возможностями для распознавания, причем, даже паразиты, которые могут активно менять секретлируемые молекулы или молекулы поверхности, все равно будут обнаружены. Особенно важное значение для клеточного узнавания имеют лектины (Horak P. et al., 1997).

Vasta G.R. отмечает, что даже в отсутствии необычных генетических перестроек, значительная степень разнообразия типов распознавания может быть достигнута, за счёт того что лектины присутствуют в нескольких

семействах генов, могут участвовать в альтернативном сплайсинге, и углеводные домены распознавания лектинов обнаруживают значительную «пластичность» в своем взаимодействии с лигандами, и, поэтому, могут связывать различные патогены со слегка измененными углеводами поверхности (Vasta G.R. et al., 2007).

Соматическая диверсификация FREP3 обеспечивает потенциальный механизм для создания различий между различными типами гемоцитов и индивидуальными гемоцитами, и также опосредует тот факт, что не все гемоциты брюхоногих изначально функционально неравны. Это, в свою очередь также повышает специфичность иммунных ответов и расширяет возможности распознавания антигенов (Zhang S.M., 2004).

Одним из наиболее убедительных свидетельств, подтверждающим наличие возможной иммунологической памяти у гемоцитов, было исследование Lie (1975), в котором было показано, что столкнувшиеся с облученными мирацидиями эхиностом *B. glabrata*, впоследствии были устойчивыми по отношению к нормальным мирацидиям даже 10 дней спустя. Моллюски контрольной группы, подвергнутые экспозиции только с нормальными мирацидиями, заразились. Исследование также показало уровень специфичности такой памяти: улитки с приобретенной устойчивостью к одному виду эхиностом показали частичную резистентность к другим эхиноостомам, но были по-прежнему чувствительны к *S. mansoni*. В ходе исследования также была проведена повторная сенсibilизация с последующим заражением, результат показал сокращение времени уничтожения паразита путем запуска выработки гуморальных факторов, играющих важную роль в иммобилизации паразита и облегчении процесса его инкапсуляции. Таким образом, был сделан вывод, что механизм приобретенной устойчивости действует не за счет увеличения количества циркулирующих амебоцитов, а скорее во внутриклеточных изменениях, связанных с распознаванием паразита, и увеличением активности самих амебоцитов (Lie K.J. et al., 1987).

### 1.7. Исследования энергетического статуса гемоцитов моллюсков

Гемоциты, в особенности, клетки, способные к самостоятельному передвижению, несущие защитные функции в иммунной системе моллюсков, безусловно, имеют большие энергозатраты. Разумно предположить, что особенно высокие энергетические требования присущи фагоцитирующим клеткам, которые обладают способностью к амебоидному движению и поглощению чужеродных агентов.

Например, в исследованиях гемоцитов *B. glabrata* было выявлено, что большие клетки имеют максимальное число митохондрий и богаты микротрубочками, а также развитой эндоцитарной системой и скоплениями гликогеновых частиц; клетки среднего размера имеют гораздо меньше органелл и гликогена, а малые клетки признаются некоторыми исследователями как ювенильные клетки. Гемоциты имеют различные состояния, в связи с физиологическим статусом: в неактивированных гемоцитах клеточная стенка тонкая, однородная и органеллы разбросаны свободно по цитоплазме, большинство циркулирующих клеток имеют крупные псевдоподии и большие пиноцитозные вакуоли. У стрессированных клеток оболочка утолщается за счет полимеризации актина, и органеллы сосредотачиваются вокруг ядра и в центрах полимеризации. В целом, аналогичные результаты показаны для многих моллюсков, например, для *Pomacea canaliculata*. Многочисленные гранулоциты характеризуются развитой микротубулярной сетью с различными микропузырьками и многочисленными вакуолями. Гранулоциты чрезвычайно богаты митохондриями и имеют хорошо развитый шероховатый ЭПР и аппарат Гольджи. Деградирующие клетки показывают наличие уменьшенного ядра и набухших митохондрий. В здоровых клетках ядро обычно относительно большого размера и присутствует большое количество заметных митохондрий, что свидетельствует о клеточной активности. Кроме того, присутствуют шероховатый ЭПР, многочисленные рибосомы, пузырьки и трубочки, содержащие материал различной оптической плотности. Гиалиноциты не

отличаются большим числом митохондрий и не показывают наличие выраженного цитоскелета (Accorsi A. et al., 2013).

В исследованиях инфицированных *B. glabrata* было показано, что гемоциты имеют более плотную цитоплазму, в сравнении с интактными особями, причем кроме большего числа псевдоподий у них наблюдается повышение числа органелл. Причем, в гемоцитах инфицированных особей повышается не только число лизосом и фагосом, но также и митохондрий, повышается развитость гранулярного ЭПР. Число гликогеновых гранул также увеличивается в сравнении с нормальными особями (Borges C.M. et al., 2006).

## ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Объект исследования, организация эксперимента

Исследование проведено на базе кафедры анатомии и физиологии живых организмов Белгородского государственного национального исследовательского университета.

Для проведения исследования использовали половозрелых моллюсков класса **Gastropoda**: *Helix pomatia* (Linnaeus, 1758), *Stenomphalia ravergeri* (Férussac, 1855), *Lymnaea stagnalis* (Lamarck, 1799), *Viviparus viviparus* (Linnaeus, 1758), *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758), *Achatina fulica* (Férussac, 1821) и *Ampullaria australis* (Reeve, 1856); и **Bivalvia**: *Anodonta cygnea* (Lamarck, 1799), *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771). Видовую принадлежность объектов определяли при помощи различных источников (Кантор Ю.И., Сысоев А.В., 2005; Лихарев И.М., Раммельмейер Е.С., 1952; Присный А.В, Снегин Э.А., 1999, Шилейко А.А., 1978).

Исследования выполнены с соблюдением всех требований Хельсинкской декларации по гуманному обращению с животными (Хельсинкская декларация этических принципов, 2008) и директивами Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях.

Представителей вида *H. pomatia* содержали в стеклянных емкостях, объемом из расчета 1 литр на одну особь, со слоем грунта на дне 5-6 см. Особи *S. ravergeri* обитали в стеклянных емкостях из расчета 1 литр на 10-15 моллюсков, со слоем почвы на дне 2-3 см, и установленными веточками растений. Особей *A. fulica* содержали в стеклянных аквариумах объемом 50 л, по 5 моллюсков на аквариум. В качестве грунта использовали кокосовый субстрат для террариумов, слоем примерно 8-10 см толщиной.

Для поддержания влажности в емкостях с сухопутными моллюсками ставили чашки Петри с водой, и периодически обрызгивали стенки и крышки

емкостей при помощи пульверизатора. Емкости периодически проветривали, чтобы избежать заплесневения и чрезмерного обводнения грунта.

Особей *A. australis* содержали в аквариумах объемом 50 л, по 10 моллюсков в каждом. Для обеспечения дополнительной аэрации в аквариум были помещены водоросли *Ceratophyllum submersum*.

Представителей видов *D. polymorpha*, *A. cygnea* и *V. viviparus*, ввиду сложности с обеспечением достаточных условий для длительного содержания, отлавливали непосредственно перед проведением эксперимента, содержали в банках с речной водой в течение 1-2 суток, из расчета 3 литра воды на 5 особей. Более длительное содержание требует постоянного наличия проточной воды и грунта, в который эти моллюски обычно зарываются.

Моллюсков *L. stagnalis* и *P. corneus* отлавливали непосредственно перед экспериментом и содержали вместе, в емкостях объемом 5 л, наполненных речной водой из естественного местообитания, с изъятими водорослями *C. demersum*.

Для проведения серий эксперимента использовали гемолимфу 12 представителей каждого вида. Из системы циркуляции каждой особи отобрано и обработано не менее 100 клеток.

Гемолимфу моллюсков *A. fulica* и *H. pomatia* отбирали по стандартной методике (Присный А.А., 2013), просверливая браншей ножниц во втором завитке от устья раковины небольшое отверстие, затем аккуратно надавливали на тело моллюска, чтобы к проделанному отверстию подошла часть брюшины. Брюшину осторожно прокалывали стерильной иглой, выделяющуюся гемолимфу собирали в пробирки.

Гемолимфу *L. stagnalis*, *P. corneus*, *V. viviparus* и *A. australis* собирали тем же методом, с поправкой на необходимость тщательно очищать раковины моллюсков от налета водорослей с помощью марли, смоченной в солевом растворе, и не допускать их попадания в пробу гемолимфы, поскольку это загрязняет образец и затрудняет проведение исследований. Кроме того, перед отбором гемолимфы речных моллюсков необходимо промывать в проточной

воде, чтобы уменьшить риск попадания загрязненной воды из мантийной полости в пробы.

Гемолимфу моллюсков *S. ravergeri* собирали аналогичным методом, делая поправку на размер моллюска и небольшую прочность раковины: в проделанное отверстие вводили иглу вдоль стенки раковины, чтобы не повредить пищеварительный тракт. Последнее условие является обязательным, поскольку гемолимфа, в которую попадали пищеварительные секреты моллюска, становилась непригодной для изучения в силу лизиса форменных элементов.

Гемолимфу двустворчатых моллюсков отбирали модифицированным стандартным методом (Присный А.А., 2013), приоткрывая створки моллюсков на противоположной от сифона стороне, помещая в проем фрагмент резиновой трубки и отделяя иглой край мантии от раковины. Стандартный метод предполагает собой перерезание замыкающих мускулов, что вызывает гибель моллюска. Модифицированный метод позволяет моллюску выжить, по крайней мере, после однократного забора гемолимфы.

Полученную гемолимфу использовали в экспериментах, разделенных на четыре серии.

В первой серии экспериментов осуществляли исследование гемолимфы с помощью инвертированного оптического микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, пробоподготовка включала в себя следующие операции: гемолимфу помещали в пластиковые чашки Петри, по три пробы на особь. В пробы приливали растворы различной осмолярности из расчета 1:1, и оставляли для 30-минутной инкубации. В данном исследовании была изучена динамика следующих параметров: размеры клеток по длинной/короткой оси, способность клеток к образованию псевдоподий и описание характерных типов псевдоподий, образуемых клетками разных типов в условиях осмотической нагрузки, форма и относительный размер ядра, положение ядра в клетке, наличие/отсутствие и относительные размеры гранул. Также были изучены поведенческие особенности клеток, их активность, способность к закреплению на субстрате.



Определение линейных размеров по длинной и короткой оси клеток, а также оценку визуальных параметров производили с помощью инвертированного оптического микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E в режиме дифференцированного контраста, с фиксацией изображений. Полученные фотографии обрабатывали с помощью ПО ВидеоТест-Размер 5.0 (ООО «Микроскоп Сервис», г. Санкт-Петербург). Всего в первой серии исследовано 2400 клеток.

Во второй серии исследований изучали фагоцитарную активность гемоцитов моллюсков. Полученную гемолимфу делили на 3 части, помещали в пластиковые чашки Петри, по три пробы на особь, приливали супернатант культуры *Saccharomyces cerevisiae*, разведенной в растворах с различной осмолярностью, и оставляли для взаимодействия на 30 минут в режиме видеосъемки с помощью инвертированного оптического микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E и программы Nis-Elements (Nikon). Всего во второй серии исследовано 2600 клеток.

В третьей серии эксперимента проводили исследование энергетического статуса гемоцитов *in vitro*. Полученную из тела моллюсков гемолимфу распределяли в пластиковые чашки Петри, по 3 пробы на особь, приливали по 3 мкл растворов родамина (0,01 mM), приготовленных с использованием растворов NaCl различной осмолярности, и оставляли для взаимодействия и окрашивания, в темноте на 30 минут. Полученные образцы исследовали с помощью конфокального микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E с установленным лазерным модулем и программы C1 (Nikon). Обработку данных о флуоресценции производили одновременно с получением изображений. Интенсивность флуоресценции измеряли стандартными средствами программы C1 для десяти клеток каждого типа в каждой пробе. Всего в третьей серии исследовано 2300 клеток.

В четвертой серии экспериментов производили изучение осморезистентности гемоцитов. Для АСМ-исследований пробы гемолимфы наносили тонким слоем на предметные стекла (по 1 мкл на стекло), приливали

растворы различной осмотичности (из расчета 1:1) и оставляли на 30 минут для инкубации в закрытой камере с увлажненным сорбентом. Затем отбирали линзу жидкости (за прошедшее время гемциты оседают на подложке и вероятность их исключения из пробы с надосадочной жидкостью сводится к минимуму), исследовали в режиме полуконтактного сканирования. Мембраны клеток при этом сохраняют свои прижизненные свойства, что позволяет получать точные сведения о значении их параметров. Полученные данные были обработаны при помощи ПО Nova 1.0.26.1508 (NT-MDT SPM Software, Зеленоград) и IA P9 Image Analysis 3.5.0.2070 (NT-MDT, Зеленоград). Всего в четвертой серии исследовано 2300 клеток.

#### Обоснование методик исследования

В исследовании использован инвертированный оптический микроскоп Nikon Digital Eclipse Ti-E, работающий в режиме дифференциального интерференционного контраста. Данный метод приемлем для четкой визуализации границ между объектами, различающимися по толщине и/или коэффициенту преломления (Lacey A.J., 1989). В результате участки изображения с разной толщиной и показателями преломления окрашиваются в разные цвета с разной интенсивностью (Надеждин С.В. с соавт., 2011).

КЛСМ дает возможность получить послойное изображение исследуемого объекта с высоким разрешением и низки уровнем шумов за счет пошагового сканирования объекта сфокусированным пучком света от когерентного источника или столиком, с использованием специфических флуоресцентных зондов и специальных методов ограничения световых потоков (Штейн Г.И., 2005; Надеждин С.В. с соавт., 2011).

#### Исследование морфометрических параметров клеток

Изучение морфометрических параметров заключается в измерении линейных размеров и исследовании внешних признаков исследуемых объектов. В данном исследовании была изучена динамика следующих параметров: размеры клеток по длинной/короткой оси, способность клеток к образованию псевдоподий и описание характерных типов псевдоподий, образуемых

клетками разных типов при инкубации в средах с различной осмотичностью, форма и относительный размер ядра, положение ядра в клетке, наличие/отсутствие и относительные размеры гранул. Также были изучены поведенческие особенности клеток, их активность, способность к закреплению на субстрате. Определение линейных размеров по длинной и короткой оси клеток, а также оценку визуальных параметров производили с помощью инвертированного оптического микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E в режиме дифференцированного контраста, с фиксацией изображений. Полученные фотографии обрабатывали с помощью ПО ВидеоТест – размер 5.0 (ООО «Микроскоп Сервис», г. Санкт-Петербург) (рис. 1.).

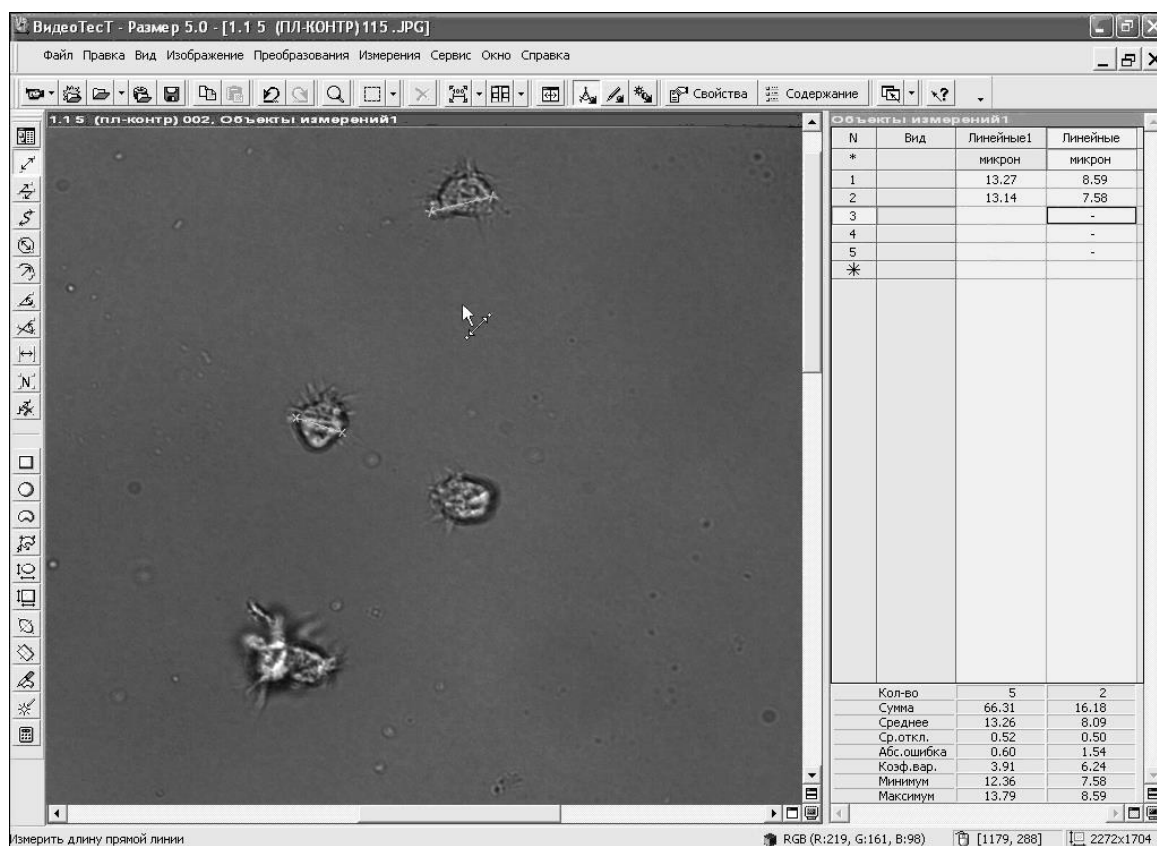


Рис. 1. Окно программы ВидеоТест – размер 5.0.

### Исследование фагоцитоза

В чистую пластиковую чашку Петри помещали каплю супернатанта дрожжей *S. cerevisiae* в физиологическом растворе. Сверху помещали каплю гемолимфы, только что взятой у моллюска. Свежая гемолимфа необходима потому, что амебоциты, обладающие выраженной фагоцитарной активностью,

достаточно быстро адгезируют к стеклу, и исключаются из процесса фагоцитоза, оставаясь в пробирке. Далее была произведена видеозапись процесса фагоцитоза в течение 30 минут для каждого представителя. На основе полученных данных были рассчитаны фагоцитарный индекс и фагоцитарное число по формуле:

$$\text{ФИ} = \frac{\text{число фагоцитировавших клеток}}{\text{общее число фагоцитов}}$$

Фагоцитарное число рассчитывали как среднее число нейтрализованных одним фагоцитом клеток *S. cerevisiae* (Нишева Е.С., Галустьян А.Н., 2011). Фагоцитарную активность гемоцитов изучали при помощи инвертированного микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E и ПО Nis-Elements в режиме видеозаписи.

#### Осмотические тесты *in vitro*

Осмотическую стойкость, осморегуляторные реакции гемоцитов моллюсков, а также использование ими мембранного резерва исследовали с помощью проб с осмотическими нагрузками. В качестве инкубационных сред со сниженной осмолярностью использовали растворы хлорида натрия – гипотонический (массовая доля NaCl в котором составляет 0,2%) и гипертонический (массовая доля NaCl в котором составляет 0,8%) (Присный А.А., 2013). Осмотические свойства растворов оценивали по величине их осмолярной концентрации (осмолярности), которая определяется количеством всех кинетически активных частиц, содержащихся в 1 л раствора (Литвинова Т.Н., 2009). После 30-минутной инкубации с растворами различной осмолярности пробу гемолимфы исследовали при помощи атомно-силового микроскопа с последующим определением значений упругости мембран гемоцитов, адгезии их к нанозонду, объема, площади и характера их поверхности. Об осморегуляторных реакциях клеток судили по показателю использования ими запасов мембранного резерва. Мембранный резерв представляет собой разницу между объемом клетки в гипотоническом растворе и объемом клетки в изотонической среде (Raucher D., Sheetz M., 1999; Groulx N. et al., 2006; Федорова М.З., Левин В.Н., 2001; Зубарева Е.В., 2011):

$$\Delta V = V (\text{СГ}) - V (\text{И}), (2)$$

где  $\Delta V$  – резерв плазматической мембраны клетки ( $\text{мкм}^3$ );  $V$  (СГ) – общий объем клетки, измеренный после инкубации клеток в сильно гипотоническом растворе ( $\text{мкм}^3$ );  $V$  (И) – объем клетки, измеренный после инкубации в изотоническом растворе ( $\text{мкм}^3$ ).

С целью сравнения использования мембранного резерва определяли относительный мембранный резерв по формуле (Зубарева Е.В., 2011):

$$\Delta V_{\text{отн}} = \Delta V / V(\text{И}) , (3)$$

где  $\Delta V_{\text{отн}}$  – относительный резерв плазматической мембраны (отн. ед.);  $\Delta V$  – резерв плазматической мембраны клетки ( $\text{мкм}^3$ );  $V(\text{И})$  – объем клетки в изотоническом растворе ( $\text{мкм}^3$ ).

Интенсивность использования относительного мембранного резерва клетками в гипотонической среде оценивали, вычисляя процент относительного мембранного резерва, используемого клеткой от абсолютного мембранного резерва, принимаемого за 100%.

#### Изучение топографии клеток и физических свойств мембраны

Для получения объемных реконструкций клеток и данных об упругости и адгезивности мембран использовали сканирующий зондовый микроскоп (АСМ). В основе работы атомно-силового микроскопа (АСМ) лежит силовое взаимодействие между зондом и поверхностью, для регистрации которого используются специальные зондовые датчики (рис. 2), представляющие собой упругую консоль с острым зондом на конце (рис. 3).

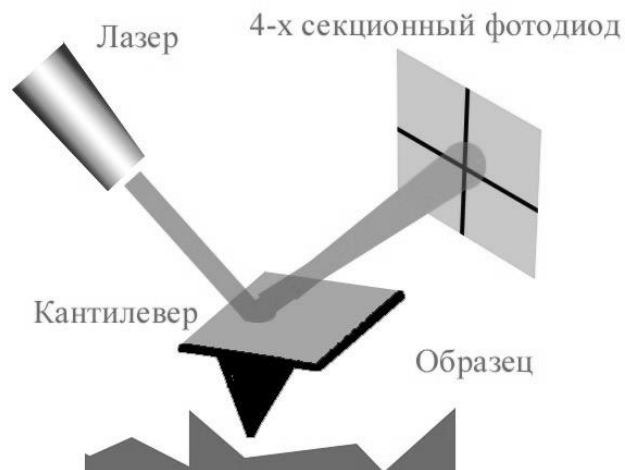


Рис. 2. Принципиальное устройство сканирующего зондового микроскопа (Меньшиков Е.А., 2009)

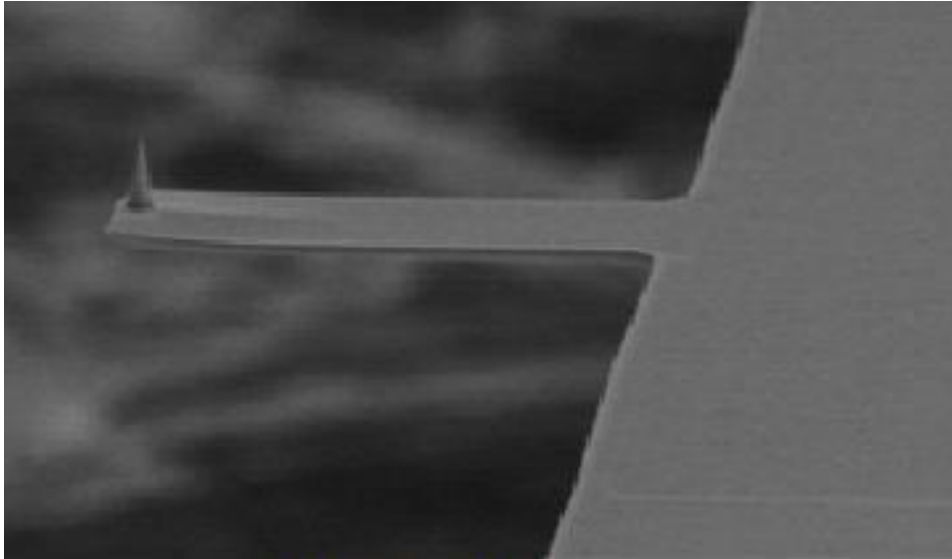


Рис. 3. Кантилевер под микроскопом

Для данного исследования были применены колебательные методики, основанные на регистрации параметров взаимодействия колеблющегося кантилевера с поверхностью. Были использованы контактный и полуконтактный методы работы АСМ, которые различаются в зависимости от расстояния зонд-образец (рис. 4).

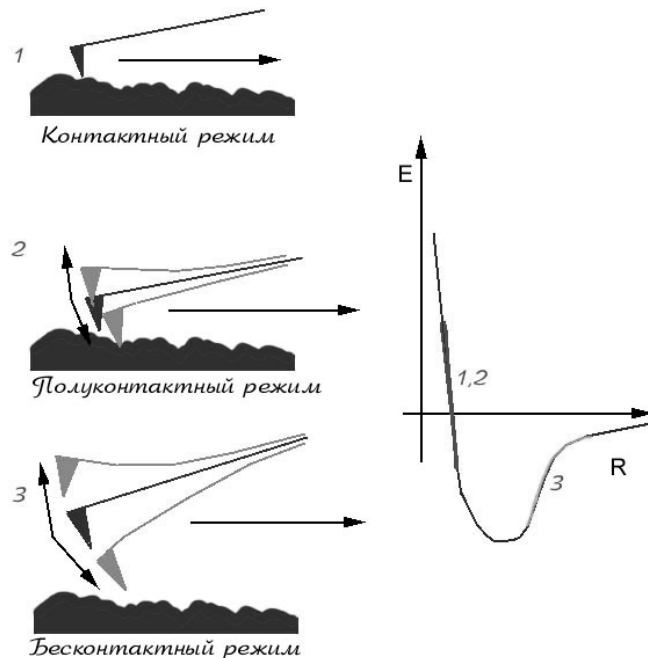


Рис. 4. Методы исследования при работе с сканирующим зондовым микроскопом

В контактом методе острие зонда непосредственно соприкасается с поверхностью образца в процессе сканирования. Полуконтактный метод

подразумевает частичный контакт – при котором колеблющееся острие слегка касается (стучит) по поверхности образца (Галлямов М.О., Яминский И.В., 1998; Миронов В.Л., 2005; Надеждин С.В. с соавт., 2011). В контактных методиках при удалении зонда от образца существенное воздействие на кантилевер оказывают силы адгезии. Значение силы адгезии можно вычислить, считая линейной зависимость силы от смещения зонда относительно поверхности образца по оси Z (Миронов В.Л., 2007).

В данном исследовании использованы микромеханические зонды модели NSG-03 со значением жесткости 1,4 Н/м, с радиусом закругления 10 нм, частотой развертки сканирования порядка 0,6-0,8 Hz. Сканирование образцов производили в полуконтактном режиме. Для получения цифровых данных использовано программное обеспечение Nova 1.0.26.1508 (NT-MDT SPM Software).

Встроенные измерительные модули ПО Nova 1.0.26.1508 (NT-MDT SPM Software) использовались для определения визуальных (рис. 5, 6) и морфологических параметров клетки: линейных размеров (рис. 7), объема (рис. 8) и рельефа поверхности гемоцитов (рис. 9).

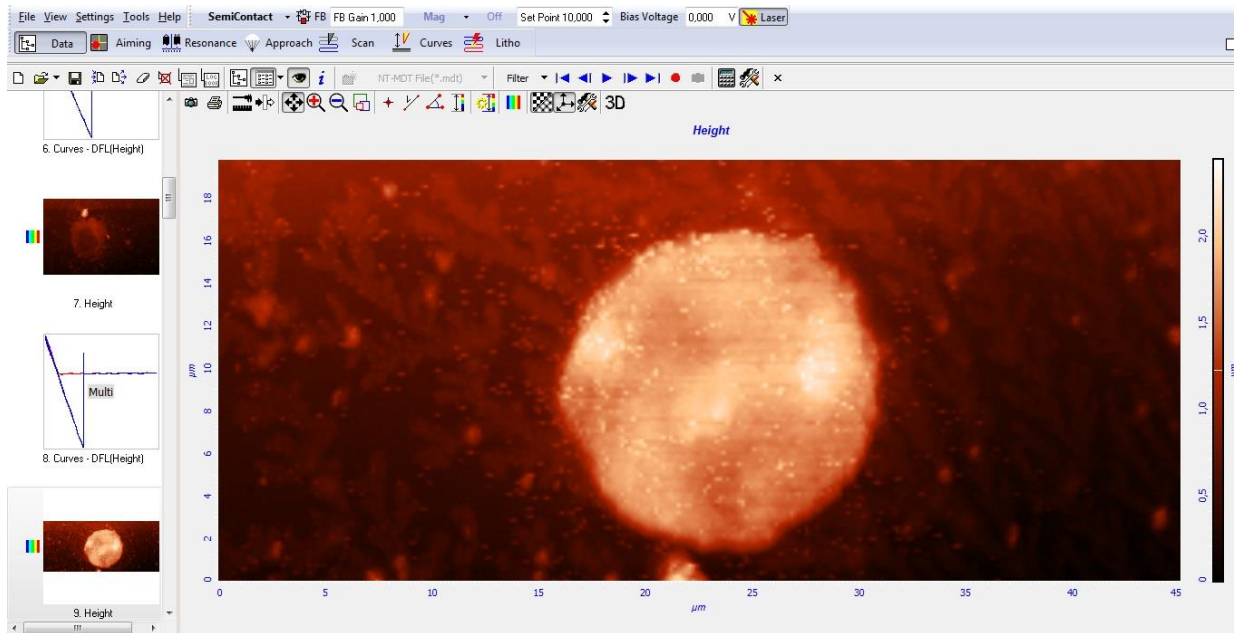


Рис. 5. Отображение 2D данных в окне программы Nova 1508, позволяющее оценивать визуальные параметры (наличие псевдоподий, форму и распластанность) отсканированных клеток

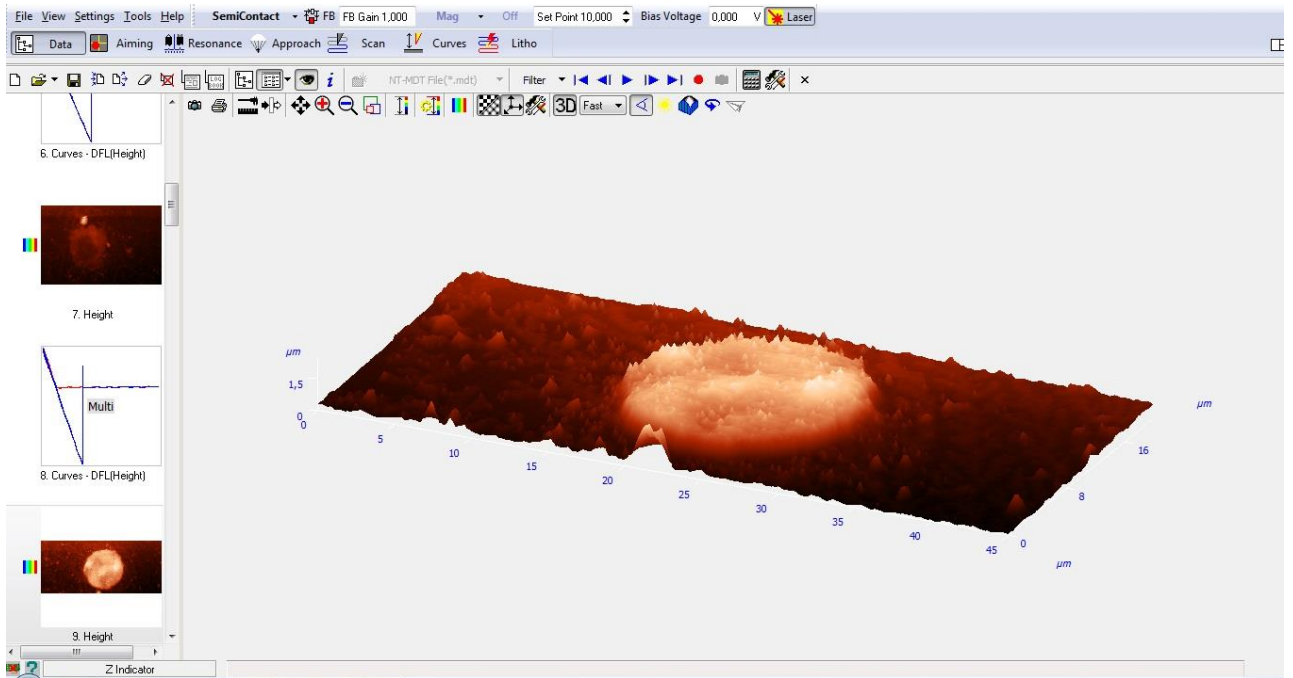


Рис. 6. Отображение 3D данных в окне программы Nova 1508, позволяющее оценить визуальные параметры (наличие псевдоподий, форму и расплыванность) отсканированных клеток

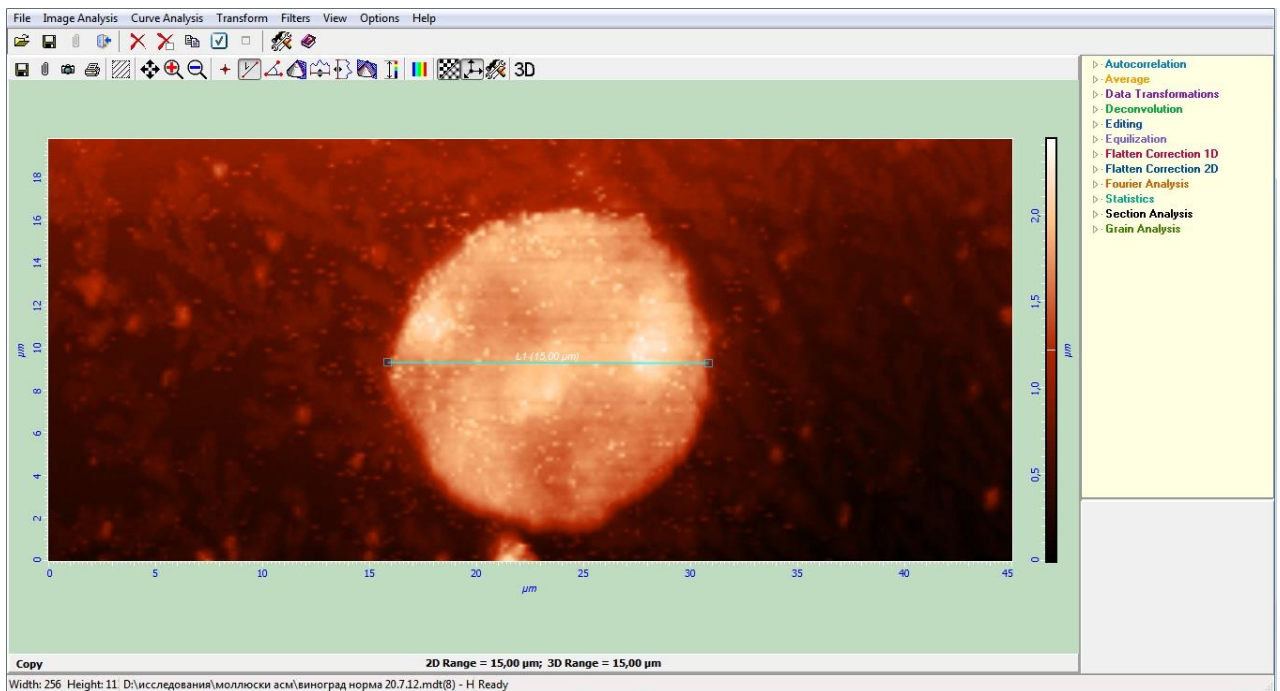


Рис. 7. Измерение линейных размеров исследуемых объектов в программе Nova 1508



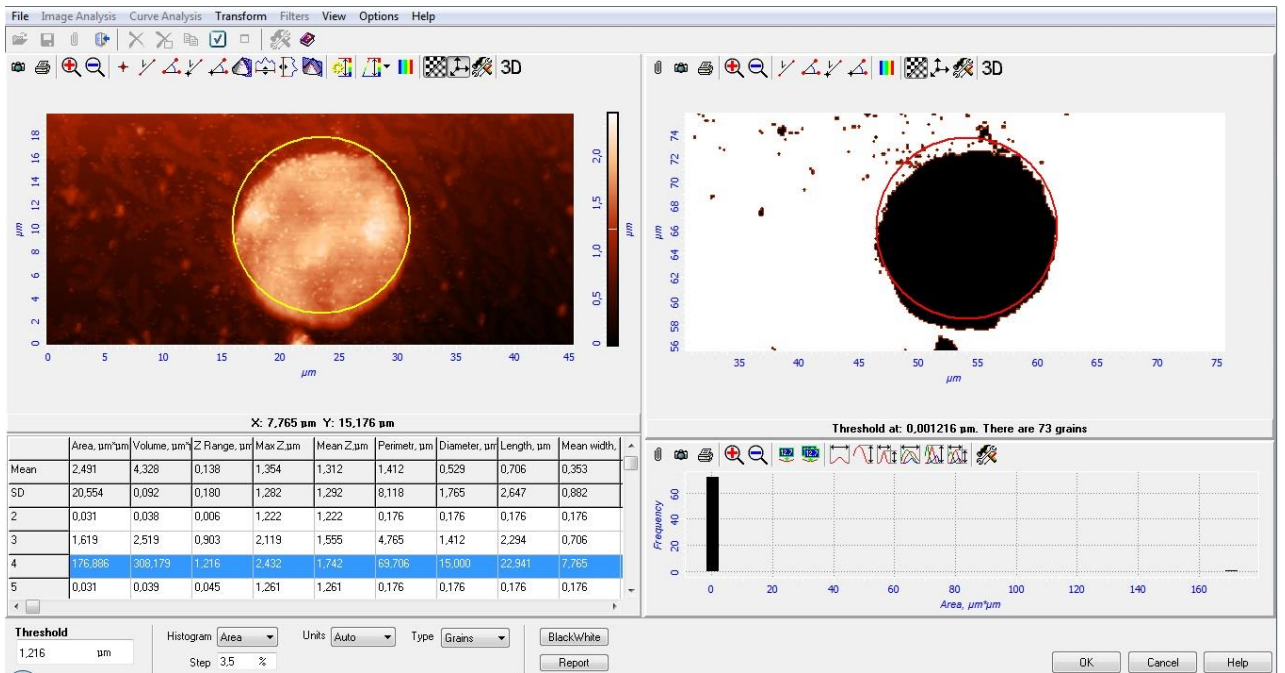


Рис. 8. Окно программы Nova 1508, инструмент grain analysis, позволяющий оценивать такие параметры, как объем и площадь исследуемого объекта

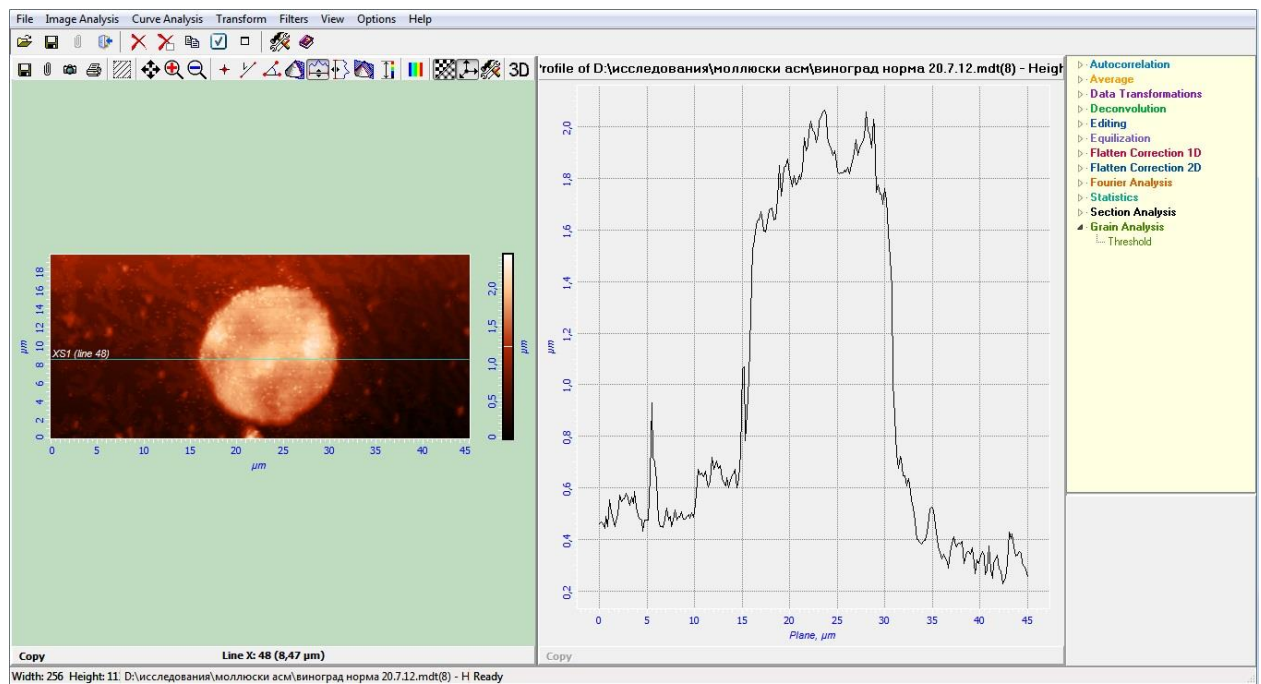


Рис. 9. Оценка рельефа поверхности исследуемого объекта в программе Nova 1508

Для определения сил адгезии нанозонда к образцу и упругостных характеристик мембран клеток использовали метод спектроскопии в контактном режиме (рис. 10).

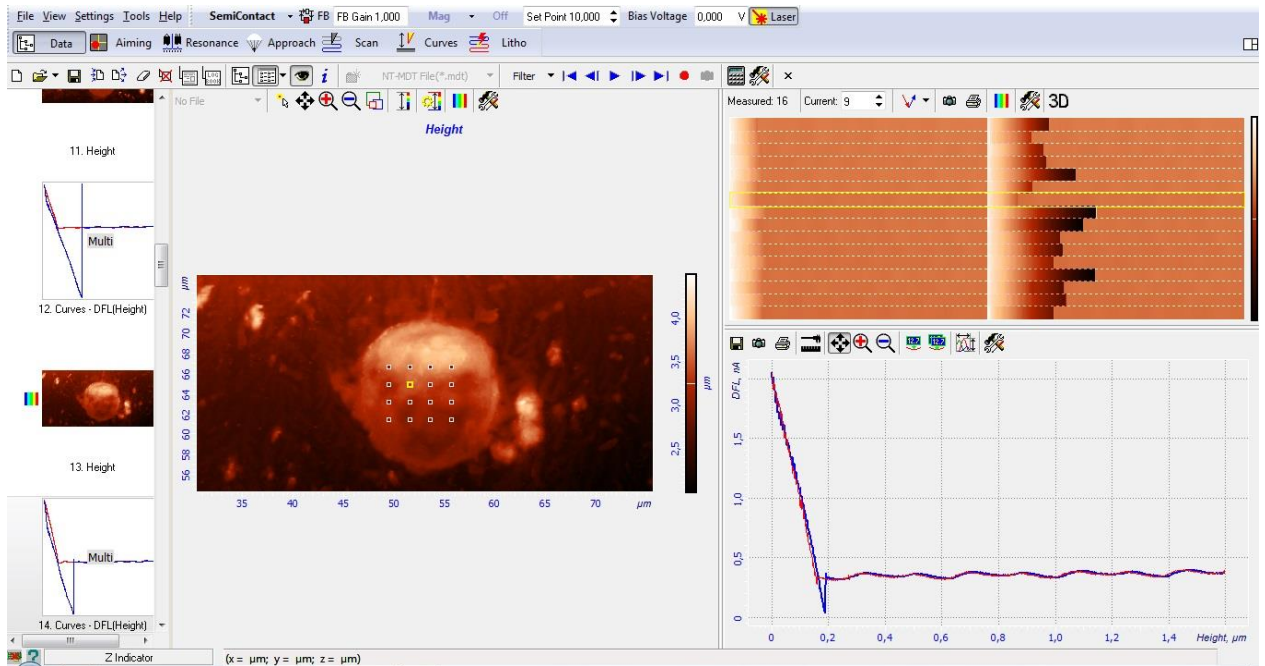


Рис. 10. Отображение результатов спектроскопии в окне программы Nova 1508, позволяющее работать с данными об упругости и адгезии клеточных мембран к нанозонду

Расчеты и оценку параметров упругости (рис. 11) и адгезии клеточных мембран к нанозонду (рис. 12) производили с помощью программного обеспечения Image Analysis P9 BUILD 3.5.0.2069 (NT-MDT), которое также обладает основным набором модулей, присутствующих в ПО Nova и несколькими усовершенствованными инструментами для обработки данных (рис. 13).

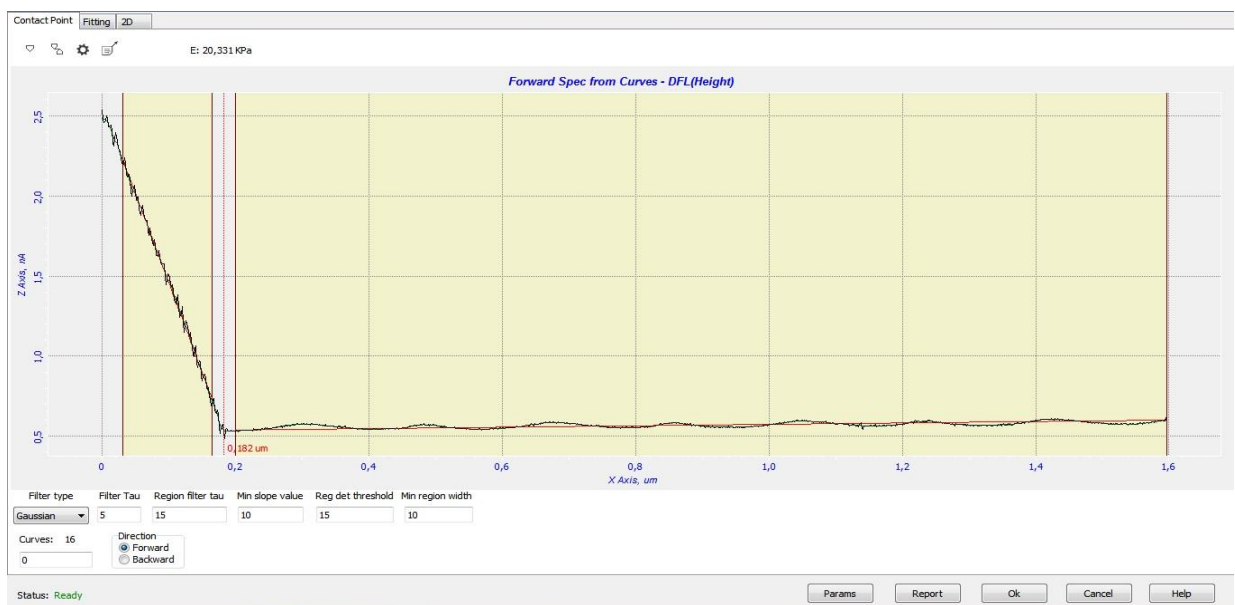


Рис. 11. Программное обеспечение Image Analysis\_P9\_BUILD\_3.5.0.2069, модуль вычисления упругости образца FCProcessor

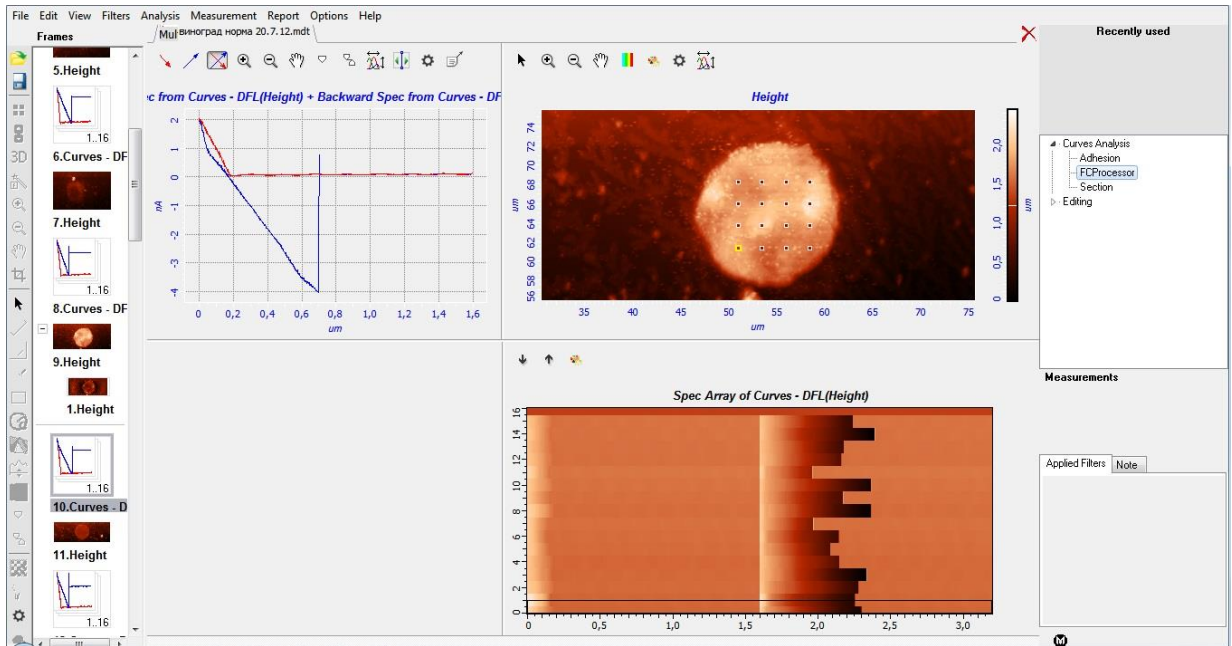


Рис. 12. Программное обеспечение Image Analysis\_P9\_BUILD\_3.5.0.2069, модуль вычисления адгезии образца к нанозонду

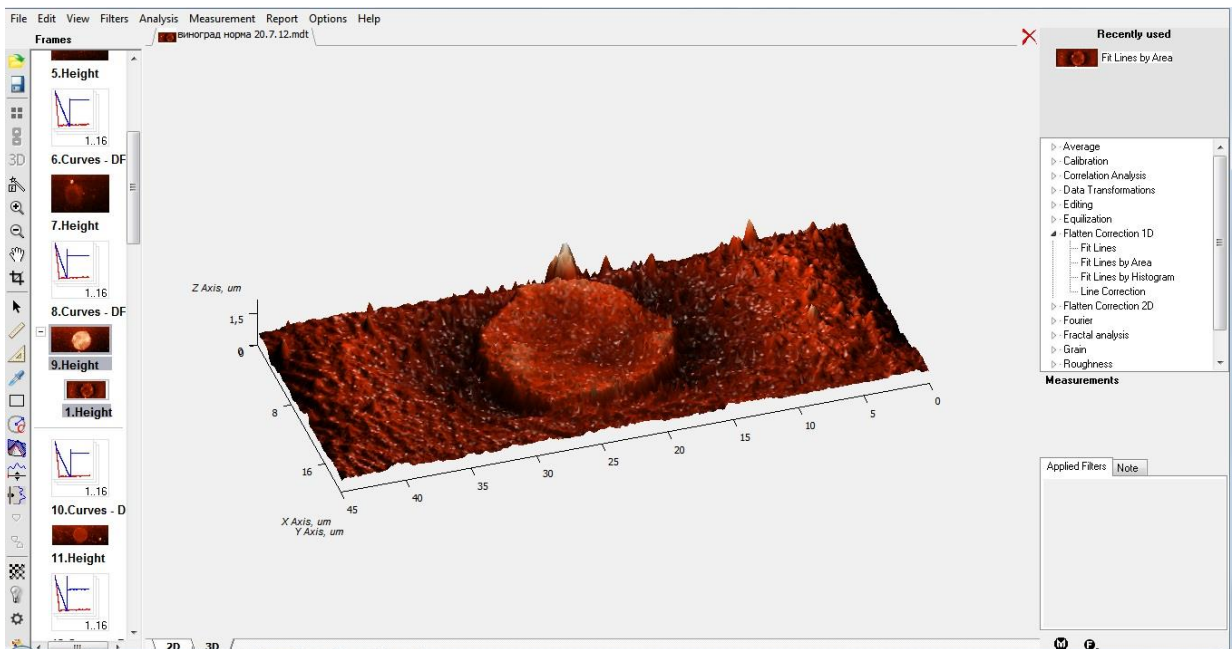


Рис. 13. Программное обеспечение Image Analysis\_P9\_BUILD\_3.5.0.2069 окно просмотра 2D/3D данных

Окончательные данные об адгезии клеточной мембраны к нанозонду были получены вычислением по формуле (Миронов В.Л., 2007):

$$F=k \cdot Dx \text{ (закон Гука),}$$

где  $k$  – значение жесткости кантилевера,

$Dx$  – вычисляемый параметр ( $=\Delta\text{Height}$ ).

### Исследование интенсивности энергетических процессов в гемоцитах

Для окраски гемоцитов использовали раствор родамина Б (0,01 mM). Маточный раствор готовили следующим образом: 200 мг сухого родамина растворяли в 319 мл раствора NaCl необходимой концентрации (соотв. в изотоническом растворе, 171 мосмоль/л, гипотоническом 63,37 мосмоль/л, и гипертоническом 342 мосмоль/л.) В дальнейшем, с использованием стандартных методик расчета концентрации из маточного раствора готовили рабочий 0,01 mM – раствор.

Родамин Б применяется для витальной окраски митохондрий. Родамин Б относится к медленным потенциал-зависимым красителям, которые предназначены для выявления изменений потенциалов мембраны невозбудимых клеток, вызванных изменениями дыхательной деятельности, проницаемости ионных каналов, фармакологическими воздействиями обязательным и другими факторами (Reungpatthanaphong P.L., et al., 2003; Smith S.N., Steer R.P., 2001).

Потенциал-зависимые красители позволяют исследователям выполнять измерения мембранного потенциала в органеллах и клетках, которые слишком малы для микроэлектродов. Кроме того, в сочетании с различными методами визуализации, эти красители могут быть использованы для картирования изменения мембранного потенциала в культурах возбудимых клеток, перфузируемых органах и срезах и даже целом мозге *in vivo* с таким пространственным разрешением и частотой дискретизации, которые не могут быть получены с помощью микроэлектродов (Митрошина Е.В., 2012).

Потенциал-чувствительные красители являются важным инструментом для изучения изменения трансмембранного потенциала, а также для визуализации митохондрий (которые обладают трансмембранным потенциалом около -150 мВ) (Митрошина Е.В., 2012).

Тем не менее, степень изменения интенсивности флуоресценции у таких красителей часто достаточно низкая; обычно изменение интенсивности составляет 2-10% от исходного уровня флуоресценции при изменении

трансмембранного потенциала на 100 мВ. Это накладывает определенные ограничения на их использование.

Действие медленных красителей (Slow-Response) (к ним относятся красители DiOC<sub>2</sub>, JC-1, JC-9, Oxonol V, Merocyanine 540 и др.) изменениях в их трансмембранном распределения при гипер- или деполяризации мембраны, которое сопровождаются изменением интенсивности флуоресценции. Величина их оптического ответа гораздо больше, чем у быстродействующих потенциал-зависимых красителей (как правило, интенсивность флуоресценции изменяется на 1% при изменении трансмембранного потенциала на 1 мВ) (Митрошина Е.В., 2012).

Пробы изучали при помощи КЛСМ Nikon Digital Eclipse Ti-E с установленным лазерным модулем и ПО Nikon C1 (рис. 14).

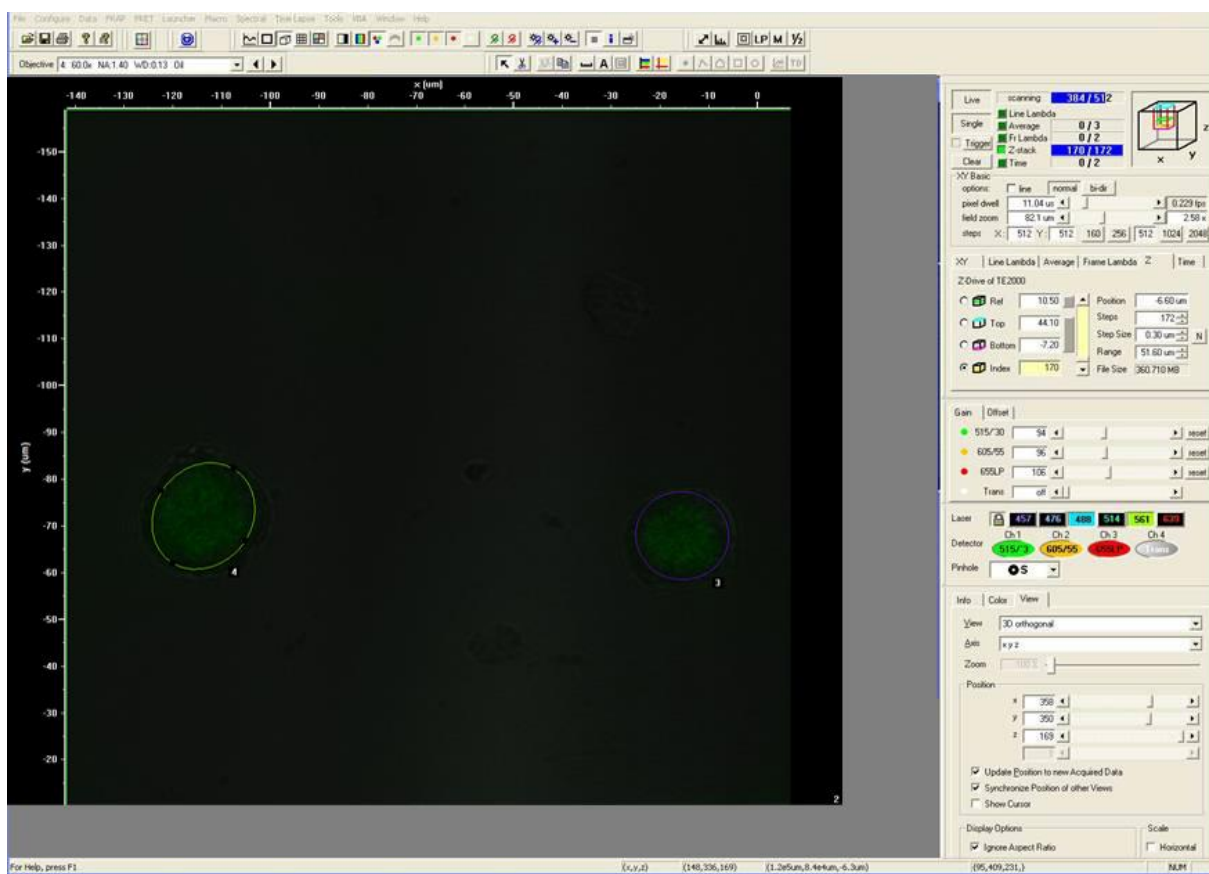


Рис. 14. Вид окна программы Nikon C1, позволяющий визуальную и количественную оценку флуоресценции клеток, окрашенных родамином Б

Пробы облучали лазером с длиной волны 560 nm. Родамин имеет волну возбуждения  $\lambda_{\max}(ex) = 554 \text{ nm}$ , и эмиссии –  $\lambda_{\max}(em) = 579 \text{ nm}$  (Terpetschnig

Е. et al., 2002). Интенсивность флуоресценции измеряли стандартными средствами программы С1 для десяти клеток каждого типа в каждой пробе.

#### Методы статистической обработки

Полученные данные обрабатывали с использованием ПО MS Excel 2003 и методов описательной статистики (количественное описание данных посредством основных статистических показателей) с вычислением среднего и стандартной ошибки среднего значения (Лакин Г.Ф, 1990).

Оценивали нормальность распределения количественных значений признака и с помощью непарного (двухвыборочного) t-критерия Стьюдента определяли достоверность различий между значениями признаков сравниваемых групп.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Оценка клеточных реакций, возникающих в результате действия осмотической нагрузки на гемоциты представителей класса *Gastropoda*

#### 3.1.1. Типология клеточного состава гемолимфы представителей класса *Gastropoda*

Анализ клеточного состава гемолимфы *H. pomatia* позволил разделить форменные элементы на 4 типа.

Большие амебоциты (БА) (рис. 15) представлены крупными клетками с многочисленными псевдоподиями по периферии, преобладающий тип псевдоподий – лобоподии. Цитоплазма содержит вакуоли различных размеров и мелкие гранулы. Гемоциты способны к распластыванию на субстрате и амебоидному передвижению по нему. Ядро крупное, овальной формы, чаще всего занимает периферическое положение, однако из-за нестабильной формы клетки может перемещаться относительно наблюдателя.

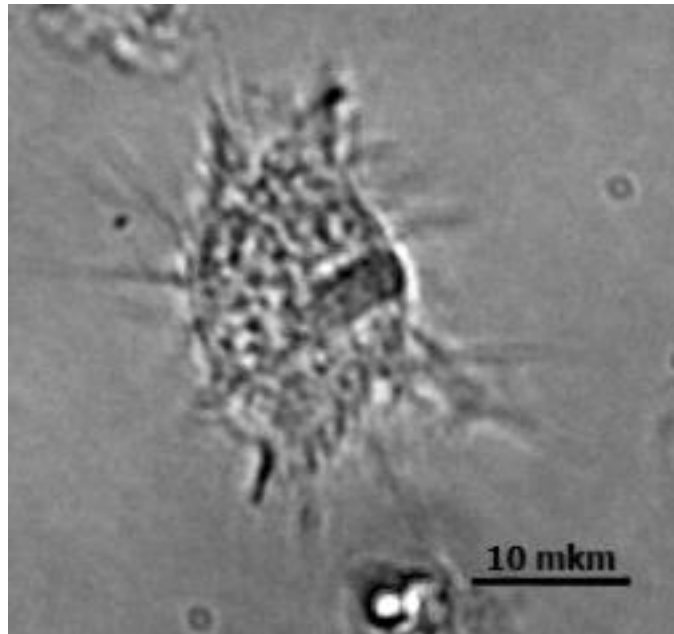


Рис. 15. Большой амебоцит *H. pomatia*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E , увеличение 60×

Малые амебоциты (МА) (рис. 16) представлены клетками среднего размера, аморфными, с многочисленными псевдоподиями, среди которых встречаются разветвленные лобоподии и филоподии. Ядро мелкое, занимает положение, близкое к центральному, на неокрашенных мазках не дифференцируется из-за высокого содержания гранул и вакуолей в цитоплазме клетки. Клетки способны к активному передвижению по субстрату.

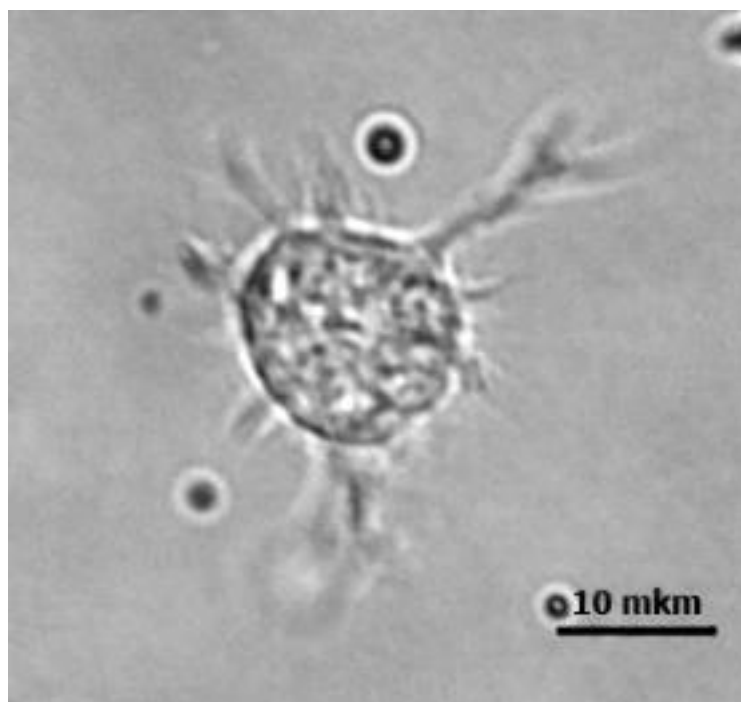


Рис. 16. Малый амебоцит *H. pomatia*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×

Гранулярные клетки (ГК) (рис. 17) с лобоподиями преимущественно на одном из полюсов клетки, на периферии псевдоподии представлены, в основном, филоподиями. Ядро мелкое, на неокрашенном препарате не дифференцируется, занимает периферическое положение. В цитоплазме встречаются мелкие гранулы. Клетки способны к ограниченному передвижению после закрепления на субстрате.

Круглые клетки (КК) (рис. 18) – стабильной формы, не образующие псевдоподии. Цитоплазма содержит мелкие везикулы и множество разнородных гранул. Ядро круглое, мелкое, занимает центральное положение. Ввиду отсутствия псевдоподий КК к самостоятельному передвижению неспособны.



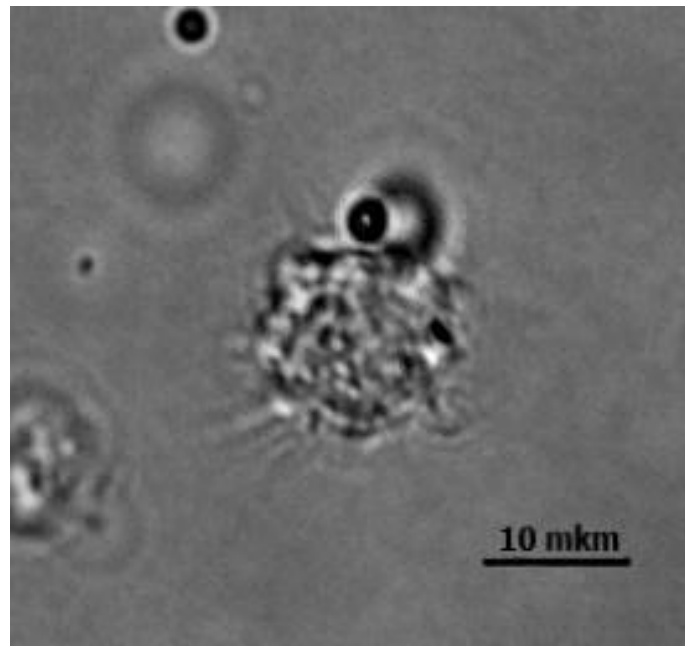


Рис. 17. Гранулярная клетка *H. pomatia*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E , увеличение 60×

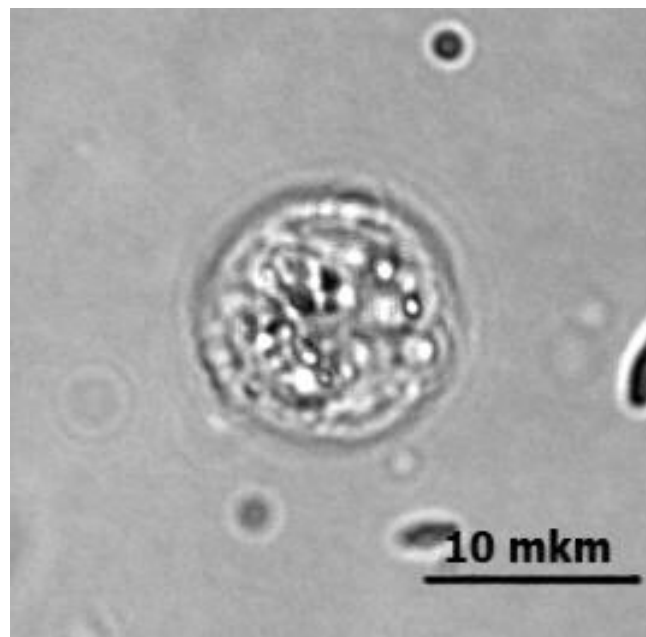


Рис. 18. Круглая клетка *H. pomatia*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E , увеличение 60×

Анализ клеточного состава гемолимфы *S. ravergeri* позволил разделить форменные элементы на 4 типа.

Большие амебоциты (БА) представлены относительно крупными клетками (рис. 19), с лобоподиями. Цитоплазма содержит крупные вакуоли и разнородные включения, среди которых встречаются мелкие гранулы.

Гемоциты способны к закреплению на субстрате и активному амебоидному передвижению. Ядро среднего размера, округлое, занимает центральное положение.

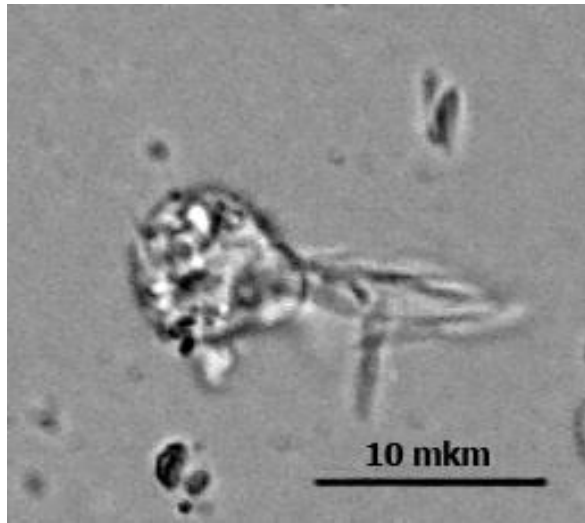


Рис. 19. Большой амебоцит *S. ravergeri*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E , увеличение 60×

Малые амебоциты (рис. 20) образуют множество филоподий и коротких лобоподий на периферии. Цитоплазма содержит вакуоли различного размера и мелкие гранулы. Ядро относительно мелкое, занимает центральное положение.

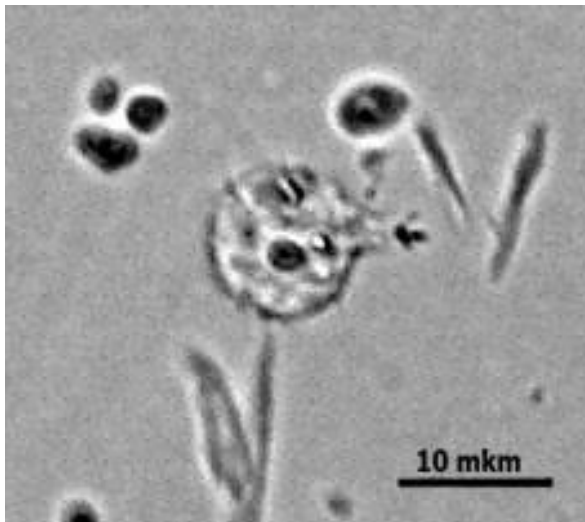


Рис. 20. Малый амебоцит *S. ravergeri*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E , увеличение 60×

Цитоплазма гранулярных клеток (рис. 21) не содержит вакуолей, но в ней присутствуют мелкие гранулы. Ядро мелкое, занимает периферическое положение. Псевдоподии представлены тонкими короткими филоподиями.

Клетки способны к расплыванию на субстрате и ограниченному передвижению. Могут сливаться в агрегаты с малыми амебоцитами.

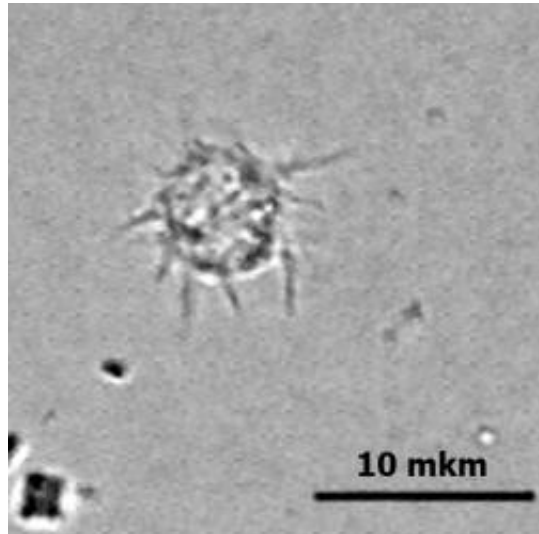


Рис. 21. Гранулярная клетка *S. ravigieri*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E , увеличение 60×

Круглые клетки (рис. 22) характеризуются стабильной формой, не имеют псевдоподий. Цитоплазма содержит небольшое количество вакуолей и гранул. Клетки не способны к активному передвижению и закреплению на субстрате. Ядро овальной формы, небольшое, занимает периферическое положение.

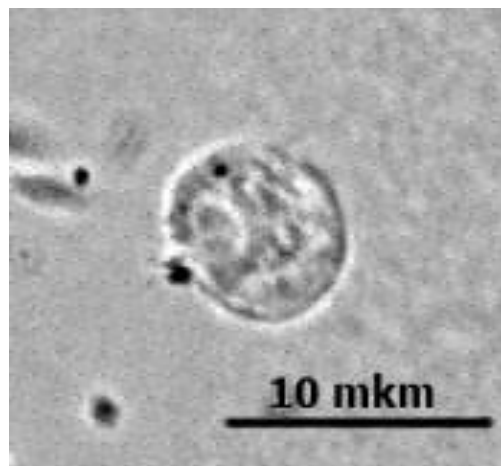


Рис. 22. Круглая клетка *S. ravigieri*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E , увеличение 60×

Анализ клеточного состава гемолимфы *V. viviparus* позволил разделить форменные элементы на 4 типа.

Большие амебоциты – аморфные клетки (рис. 23) с псевдоподиями, представленными филоподиями и лобоподиями, способны к активному передвижению и закреплению на субстрате. Цитоплазма содержит многочисленные гранулы и вакуоли. Ядро мелкое, округлое, занимает периферическое положение.

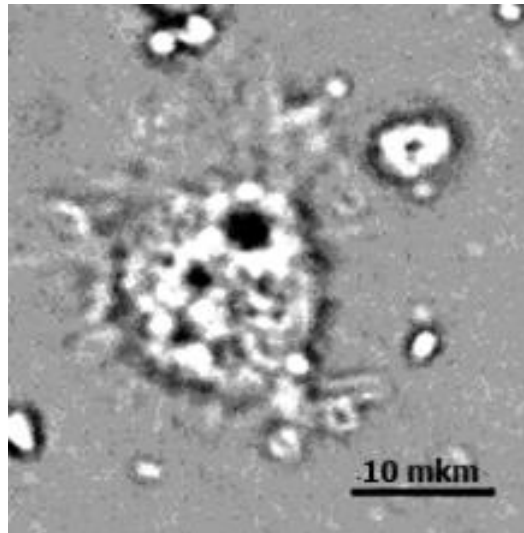


Рис. 23. Большой амебоцит *V. viviparus*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E , увеличение 60×

Малые амебоциты (рис. 24) – клетки нестабильной формы, с лобоподиями на периферии, в гемолимфе чаще всего присутствуют в виде функциональных агрегатов. В цитоплазме содержатся мелкие гранулы и одиночные вакуоли. Способны к закреплению на стекле и амебоидному передвижению.

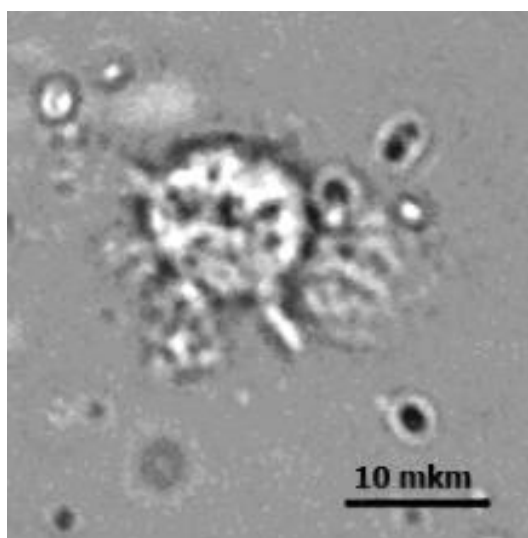


Рис. 24. Малый амебоцит *V. viviparus*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E , увеличение 60×

У гранулярных клеток (рис. 25) от периферии отходят широкие лобоподии и небольшие филоподии. Ядро относительно крупное, округлое, занимает центральную позицию. Клетки способны к активному передвижению по стеклу и к закреплению на нем с образованием характерной для всех ГК формы с каймой прозрачной цитоплазмы, окружающей ядерную часть клетки.

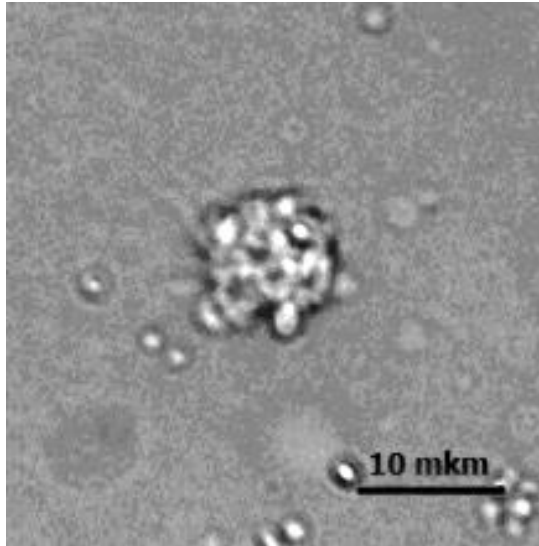


Рис. 25. Гранулярная клетка *V. viviparus*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E , увеличение 60×

Круглые клетки (рис. 26) – характеризуются стабильной формой, не способны к образованию псевдоподий и закреплению на субстрате. В гемолимфе встречаются в виде одиночных клеток, парящих с током жидкости. В цитоплазме находятся многочисленные мелкие гранулы. Ядро округлое, небольшое, занимает положение близкое к периферическому.



Рис. 26. Круглая клетка *V. viviparus*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E , увеличение 60×

Анализ клеточного состава гемолимфы *A. fulica* позволил разделить форменные элементы на 4 типа.

Большие амебоциты (рис. 27) – это аморфные клетки, выпускающие лобоподии, зачастую превосходящие размеры самих клеток. Гемоциты способны к закреплению, распластыванию по субстрату и амебоидному передвижению. Цитоплазма содержит большие вакуоли и разнородные гранулы. Ядро округлое, занимает периферическое положение.

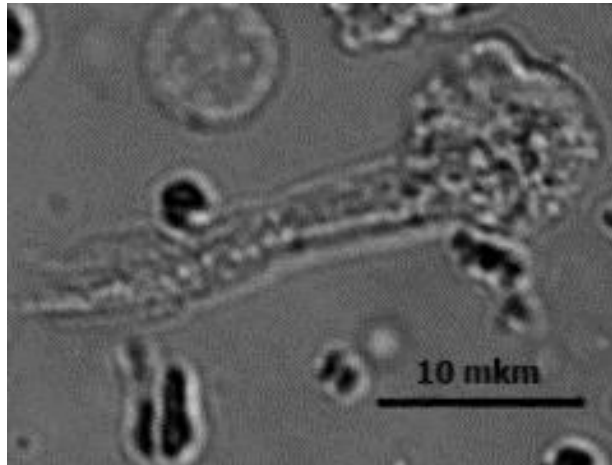


Рис. 27. Большой амебоцит *A. fulica*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×

Малые амебоциты (рис. 28) – клетки нестабильной формы, способные к образованию псевдоподий, преимущественно, лобоподий. Могут активно передвигаться по стеклу после закрепления на нем. В цитоплазме содержится множество мелких вакуолей и гранул. Ядро округлое, занимает центральное положение.

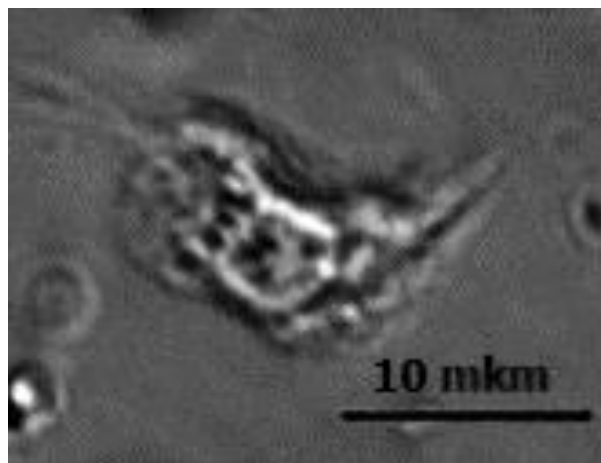


Рис. 28. Малый амебоцит *A. fulica*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×

Гранулярные клетки (рис. 29) – одиночные клетки, относительно редко встречающиеся в агрегатах с другими типами, способны к образованию коротких псевдоподий и закреплению на субстрате с потерей подвижности. В цитоплазме находится множество гранул различного размера. Ядро округлое, занимает периферическое положение.

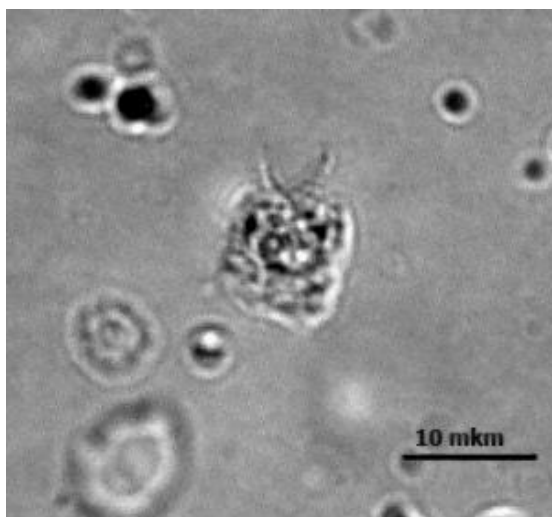


Рис. 29. Гранулярная клетка *A. fulica*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×

Круглые клетки (рис. 30) – клетки стабильной формы, не способные к образованию псевдоподий и закреплению на субстрате. Передвигаются пассивно с током жидкости. В цитоплазме присутствуют гранулы и мелкие вакуоли. Ядро овальное, мелкое, занимает центральное или слегка смещенное в сторону периферии положение.

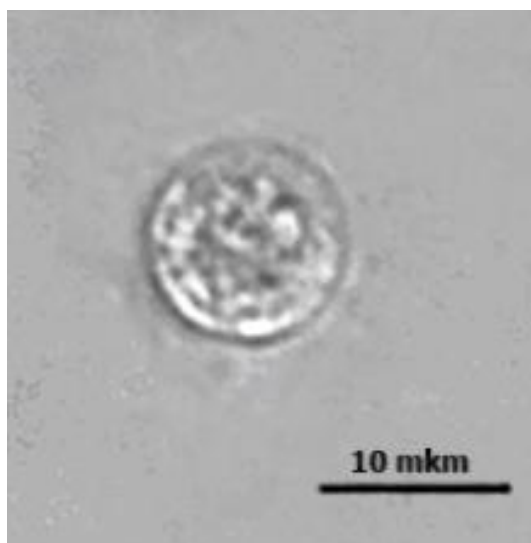


Рис. 30. Круглая клетка *A. fulica*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×

Анализ клеточного состава гемолимфы *P. corneus* позволил разделить форменные элементы на 4 типа.

Большие амебоциты (рис. 31) – клетки нестабильной формы, способные к образованию псевдоподий, среди которых преобладают лобоподии. Могут закрепляться на субстрате и активно передвигаться по нему. В цитоплазме находятся крупные вакуоли и небольшое количество гранул. Ядро мелкое, округлое, чаще всего занимает центральное положение.

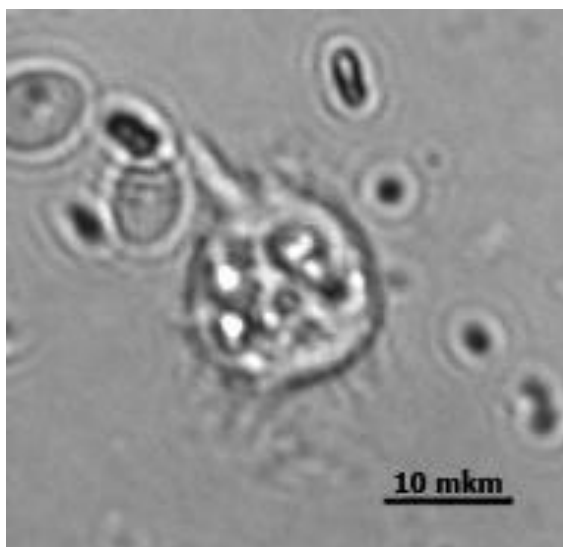


Рис. 31. Большой амебоцит *P. corneus*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×

Малые амебоциты (рис. 32) – клетки с множеством псевдоподий, среди которых встречаются филоподии, способные к закреплению на субстрате и активному передвижению. В гемолимфе часто встречаются в виде агрегатов. В цитоплазме клеток находятся мелкие гранулы и небольшое число вакуолей. Ядро округлое, мелкое, располагается центрально.

Гранулярные клетки (рис. 33) характеризуются непостоянной формой, обладают способностью к образованию псевдоподий и ограниченному активному передвижению после закрепления на субстрате. В цитоплазме находится большое число мелких гранул. Ядро мелкое, округлое, располагается ближе к центру.



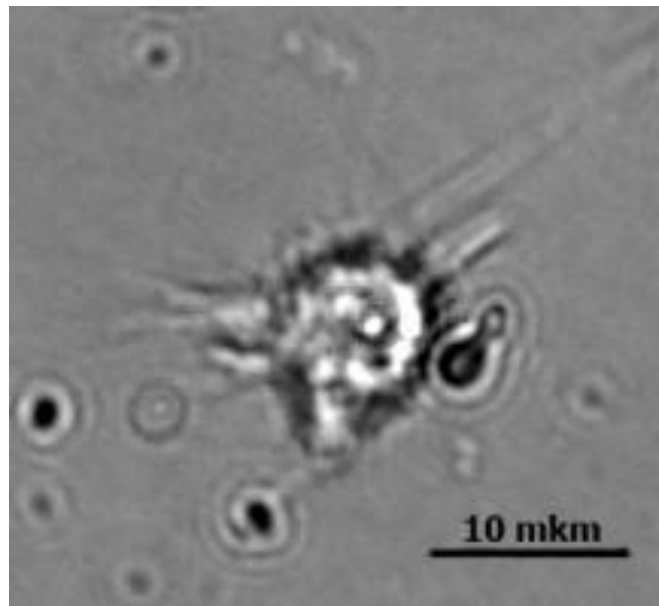


Рис. 32. Малый амебоцит *P. corneus*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E , увеличение 60×

Круглые клетки (рис. 34) имеют стабильную форму, не способны к активному передвижению и образованию псевдоподий. Переносятся пассивно с током жидкости.

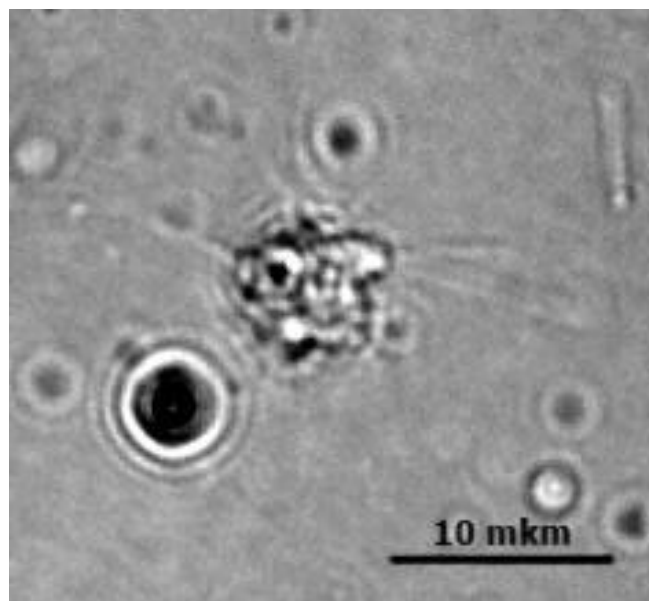


Рис. 33. Гранулярная клетка *P. corneus*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×

В цитоплазме содержится большое число мелких гранул. Ядро округлое, занимает центральное положение.

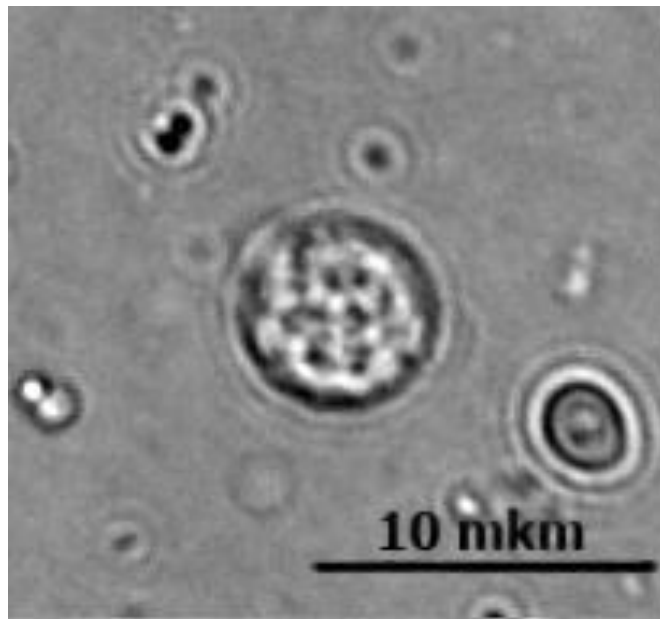


Рис. 34. Круглая клетка *P. corneus*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×

Анализ клеточного состава гемолимфы *L. stagnalis* позволил разделить форменные элементы на 3 типа.

Большие амебоциты (рис. 35) – аморфные клетки, обладающие способностью к образованию псевдоподий, закреплению на субстрате и активному амебоидному передвижению. В цитоплазме содержатся разнородные гранулы и множество крупных вакуолей. Ядро овальное, располагается периферически.

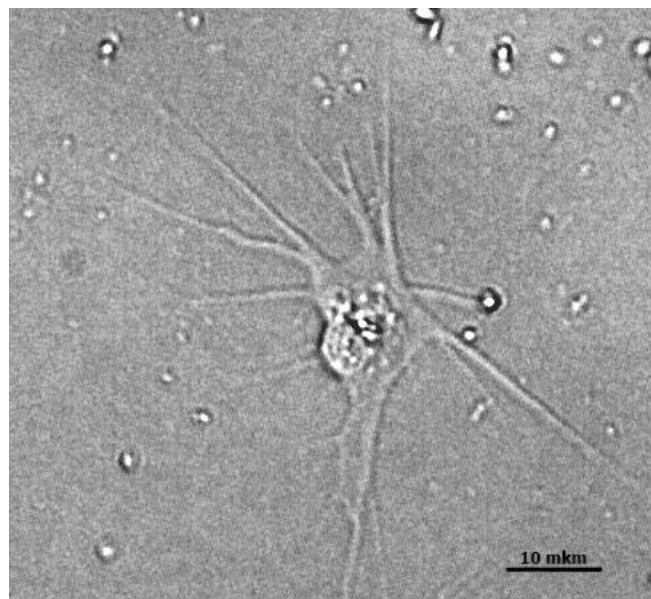


Рис. 35. Большой амебоцит *L. stagnalis*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×

Малые амебоциты (рис. 36) – аморфные клетки с большим количеством псевдоподий. Способны к закреплению на субстрате и активному амебоидному передвижению. В гемолимфе чаще всего встречаются в виде агрегатов. В цитоплазме находятся единичные крупные вакуоли и разнородные гранулы. Ядро округлое, мелкое, занимает периферическое положение.



Рис. 36. Малый амебоцит *L. stagnalis*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×

Круглые клетки (рис. 37) отличаются стабильной формой, не способны к образованию псевдоподий и активному передвижению. На субстрате не закрепляются, свободно перемещаясь с током жидкости. В цитоплазме содержится большое число мелких гранул. Ядро округлое, располагается периферически.

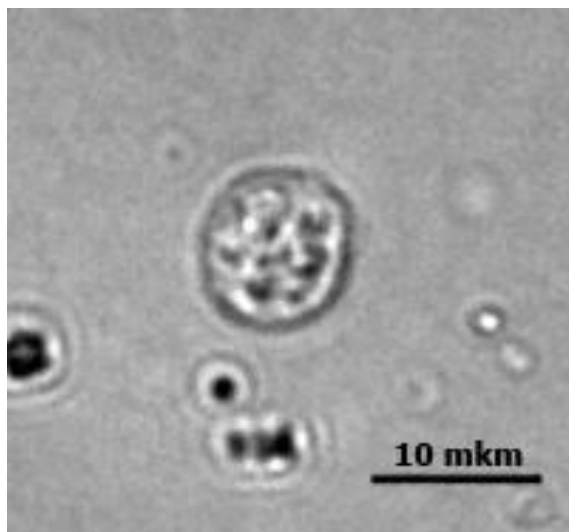


Рисунок 37 – Круглая клетка *L. stagnalis*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×

Анализ клеточного состава гемолимфы *A. australis* позволил разделить форменные элементы на 3 типа.

Большие амебоциты (рис. 38) – клетки аморфные, способные к образованию псевдоподий и закреплению на стекле. После закрепления клетки приобретают способность к амебоидному передвижению. В цитоплазме содержатся крупные вакуоли и разнообразные гранулы. Ядро мелкое, округлое, расположено периферически.

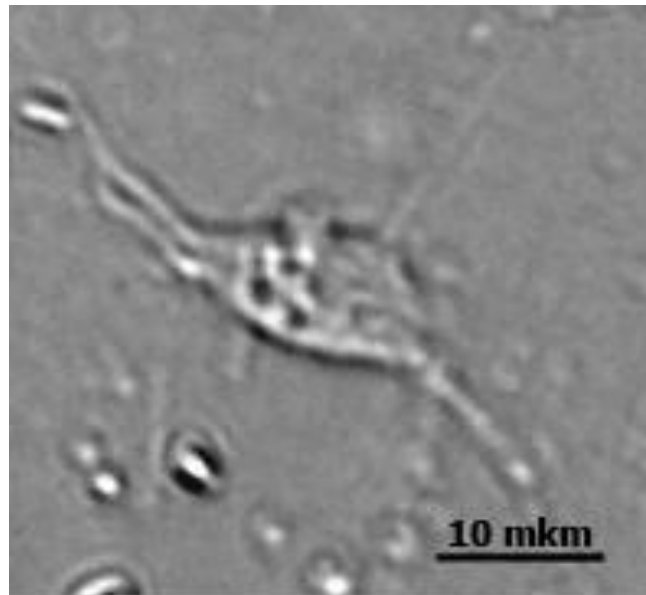


Рис. 38. Большой амебоцит *A. australis*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×

Малые амебоциты (рис. 39) способны изменять форму, распластываться на субстрате и передвигаться по амебоидному типу. В цитоплазме содержатся мелкие вакуоли и небольшое число гранул. Ядро мелкое, овальное, располагается чаще всего центрально. Псевдоподии представлены в основном лобоподиями, но могут присутствовать и филоподии.

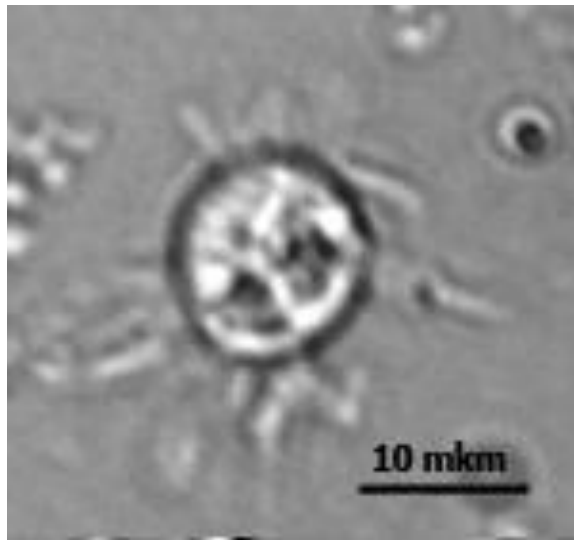


Рис. 39. Малый амебоцит *A. australis*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×

Круглые клетки (рис. 40) имеют стабильную форму, без псевдоподий, не способны к активному передвижению и закреплению на стекле.

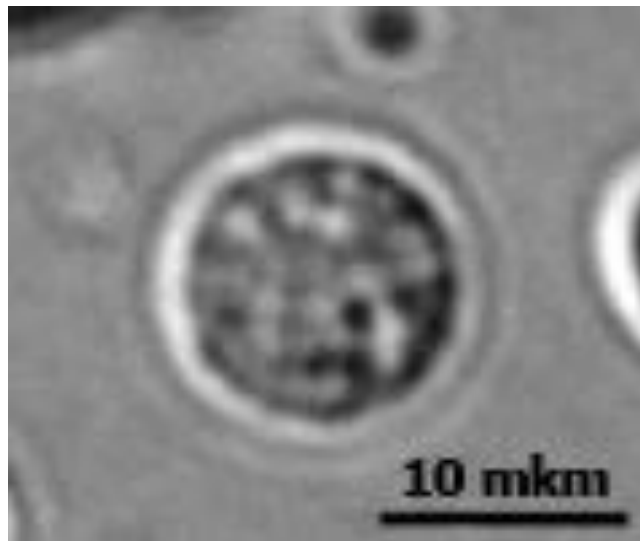


Рис. 40. Круглая клетка *A. australis*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×

### 3.1.2. Результаты исследования способности гемоцитов к фагоцитозу

В результате исследования получены данные о фагоцитарной активности изученных представителей класса Gastropoda.

Ввиду того, что малые амебоциты являются преимущественно эффекторами инкапсуляторного ответа, а гранулярные и круглые клетки в

процессе фагоцитоза не участвуют, фагоцитарный индекс и фагоцитарное число было рассчитано исключительно на основе данных о фагоцитарной активности больших амебоцитов (табл. 1).

Таблица 1

Значения фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа БА изученных представителей класса Gastropoda

Представитель	Фагоцитарный индекс	Фагоцитарное число
<i>H. pomatia</i>	0,89	4,42±1,76
<i>S. ravergieri</i>	0,29	1,20±0,41
<i>V. viviparus</i>	0,58	1,94±0,99
<i>A. fulica</i>	0,61	2,47±1,45
<i>P. corneus</i>	0,49	1,39±0,58
<i>L. stagnalis</i>	0,42	1,90±0,88
<i>A. australis</i>	0,44	1,47±0,68

Максимальными значениями фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа обладают моллюски *H. pomatia* и *A. fulica*. Число клеток, которые способны захватить гемоциты *H. pomatia*, варьирует от 1 до 8. Однако среднее значение колеблется в пределах инородных частиц на каждую клетку, вступившую в фагоцитоз. У моллюска *A. fulica* разброс менее очевиден, от 2 до 4 клеток. В среднем, на каждую фагоцитировавшую клетку приходится около трех инородных частиц.

Минимальными значениями обоих параметров обладают гемоциты моллюска *S. ravergieri*.

### 3.1.3. Результаты изучения митохондриальной активности гемоцитов в условиях осмотической нагрузки

В гемолимфе *H. pomatia* наибольшей митохондриальной активностью обладают большие амебоциты (табл. 2), и показатели резко возрастают в гипертонической среде, в то время как в гипотонической среде достоверных изменений не наблюдается.

Таблица 2

Интенсивность флуоресценции гемоцитов *H. pomatia*, инкубированных в средах с различной осмолярностью, у.е.

Среда/тип клеток	БА	МА	ГК	КК
гипотония	250,20±22,58	203,56±19,87	162,50±18,26	169,44±12,27
изотония	263,30±16,31	213,89±15,96	183,20±20,34	164,50±16,68
гипертония	367,89±16,04*	279,56±20,59*	202,00±19,52	162,75±26,92

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Малые амебоциты в целом ведут себя аналогичным образом, а гранулярные и круглые клетки слабо реагируют на изменение осмотичности среды.

В гемолимфе *S. ravergeri* наибольшей митохондриальной активностью обладают большие амебоциты (табл. 3), однако их энергетическое состояние в ответ на снижение осмотичности среды не претерпевает достоверных изменений, что характерно и для малых амебоцитов.

Таблица 3

Интенсивность флуоресценции гемоцитов *S. ravergeri*, инкубированных в средах с различной осмолярностью, у.е.

Среда/тип клеток	БА	МА	ГК	КК
гипотония	320,90±27,59	264,25±20,68	177,00±20,49*	138,20±11,37*
изотония	332,00±18,84	267,00±20,88	221,83±14,14	166,00±17,70
гипертония	362,80±19,26	260,29±14,59	206,60±29,07	144,90±14,91

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Гранулярные клетки и круглые клетки несколько снижают энергетическую активность при понижении осмотичности среды, а на повышение осмотичности достоверной реакции не проявляют.

В гемолимфе моллюска *V. viviparus* наибольшей митохондриальной активностью обладают большие амебоциты (табл. 4), причем они резко реагируют на понижение осмотичности среды снижением энергетических показателей. Малые амебоциты, гранулярные клетки и круглые клетки на

инкубацию в гипертоническом растворе отвечают повышением напряженности энергетических процессов, в то время как на снижение осмотичности среды достоверной реакции не показывают.

Таблица 4

Интенсивность флуоресценции гемоцитов *V. viviparus*, инкубированных в средах с различной осмолярностью, у.е.

Среда/тип клеток	БА	МА	ГК	КК
гипотония	160,40±18,60*	141,50±16,11	121,60±14,39	129,60±11,50
изотония	260,50±28,22	184,20±27,38	135,60±16,27	123,10±12,40
гипертония	298,80±23,39	292,10±14,78*	220,40±20,91*	195,70±22,29*

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

В гемолимфе *A. fulica* наибольшими значениями энергетических показателей (табл. 5) обладают большие амебоциты, эти показатели достаточно резко возрастают в гипоосмотической среде, а на повышение осмотичности клетки не проявляют достоверной реакции.

Таблица 5

Интенсивность флуоресценции гемоцитов *A. fulica*, инкубированных в средах с различной осмолярностью, у.е.

Среда/тип клеток	БА	МА	ГК	КК
гипотония	379,50±20,58*	270,30±12,46*	213,60±21,46	145,40±18,84
изотония	306,70±17,58	215,50±15,30	193,00±15,44	158,10±16,87
гипертония	323,30±22,87	213,90±16,56	172,40±12,54	128,20±19,40

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Наименьшими показателями обладают круглые клетки, их митохондриальная активность с изменением осмотичности среды не изменяется. Аналогичные реакции показывают и гранулярные клетки. Малые амебоциты отчетливо реагируют на снижение осмотичности, в то время как повышение осмотичности раствора практически не оказывает влияния на клетки данного типа.



В гемолимфе *P. corneus* наибольшими энергетическими показателями (табл. 6) обладают большие амёбоциты. На изменение осмотичности среды энергетические показатели клеток данного типа практически не реагируют.

Таблица 6  
Интенсивность флуоресценции гемоцитов *P. corneus*, инкубированных в средах с различной осмолярностью, у.е.

Среда/тип клеток	БА	МА	ГК	КК
гипотония	193,90±18,22	181,70±15,95	181,10±16,83	147,30±17,86
изотония	214,40±20,98	181,10±16,67	174,80±14,00	153,10±18,35
гипертония	212,00±22,64	221,70±12,19	157,00±18,46	150,20±12,03

*Примечание:* БА – Большие Амёбоциты; МА – Малые Амёбоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Наименьшими значениями показателя митохондриальной активности обладают круглые клетки, изменения в их энергетических процессах, связанные с инкубацией в растворах с различной осмотичностью также недостоверны. Малые амёбоциты и гранулярные клетки аналогично не проявляют очевидных реакций.

При изучении гемоцитов *L. stagnalis* выяснилось, что наибольшими показателями обладают большие амёбоциты (табл. 7), их митохондриальная активность не показывает достоверных изменений в ответ на изменения осмотичности среды. Малые амёбоциты показывают возрастание энергетических показателей в гипоосмотическом растворе. Круглые клетки не проявляют реакций на изменение концентрации солей в инкубационном растворе.

Таблица 7  
Интенсивность флуоресценции гемоцитов *L. stagnalis*, инкубированных в средах с различной осмолярностью, у.е.

Среда/тип клеток	БА	МА	КК
гипотония	367,70±23,66	307,20±17,18*	156,10±12,76
изотония	317,90±25,78	260,00±16,53	151,10±17,23
гипертония	345,70±18,33	237,60±14,49	157,40±17,12

*Примечание:* БА – Большие Амёбоциты; МА – Малые Амёбоциты; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

В гемолимфе *A. australis* наибольшими энергетическими показателями обладают большие амебоциты (табл. 8), и эти значения достоверно снижаются при инкубации в гиперосмотическом растворе. При инкубации в гипоосмотическом растворе клетки не проявляют выраженных реакций.

Таблица 8

Интенсивность флуоресценции гемоцитов *A. australis*, инкубированных в средах с различной осмолярностью, у.е.

Среда/тип клеток	БА	МА	КК
гипотония	256,50±15,69	163,20±12,20*	181,90±19,83
изотония	270,89±17,31	205,67±18,25	194,20±15,74
гипертония	153,40±18,71*	117,10±10,53*	101,00±7,09*

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Малые амебоциты отвечают снижением напряженности энергетических процессов на любое изменение осмотичности среды, круглые клетки отвечают снижением показателей на инкубацию в гиперосмотическом растворе, а инкубация их в гипоосмотической среде не вызывает достоверных изменений энергетического статуса.

### 3.1.4. Влияние осмотической нагрузки на морфофункциональные свойства гемоцитов представителей класса *Gastropoda*

#### 3.1.4.1. Динамика параметров гемоцитов в ответ на осмотическую нагрузку, регистрируемых методом световой микроскопии

При инкубации в гипоосмотическом растворе большие амебоциты *H. romatia* кратковременно увеличиваются в размере (табл 9), псевдоподии укорачиваются, активность клетки временно снижается. Однако с течением времени, очевидно, с включением механизмов осморегуляции, клетки восстанавливают прежнюю форму и функциональное состояние. В гипоосмотической среде клетки практически не меняют формы и размеров, однако псевдоподии образуются в меньшем числе, и частично снижается активность клетки.

В гипосмотическом растворе линейные размеры МА *H. pomatia* не претерпевают достоверных изменений, большая часть клеток сливается в агрегаты и закрепляется на стекле. В условиях гипертонии размер клеток уменьшается, среди псевдоподий начинают преобладать филоподии, активность клеток снижается.

Таблица 9

Динамика линейных размеров гемоцитов *H. pomatia* при инкубации в средах с различной осмотичностью

Тип клеток	Линейные размеры клеток по длинной оси, $\mu\text{m}$	Линейные размеры клеток по короткой оси, $\mu\text{m}$
гипотония		
БА	25,17 $\pm$ 1,51*	13,27 $\pm$ 1,84
МА	16,15 $\pm$ 0,34	12,32 $\pm$ 0,64
ГК	10,99 $\pm$ 0,34	9,74 $\pm$ 0,77
КК	13,09 $\pm$ 0,36*	12,65 $\pm$ 0,52
изотония		
БА	22,29 $\pm$ 0,80	12,24 $\pm$ 0,35
МА	15,02 $\pm$ 0,84	11,51 $\pm$ 1,08
ГК	10,87 $\pm$ 0,66	9,07 $\pm$ 0,64
КК	11,65 $\pm$ 0,80	11,34 $\pm$ 0,76
гипертония		
БА	21,89 $\pm$ 0,19	16,19 $\pm$ 0,96*
МА	12,92 $\pm$ 0,69*	11,19 $\pm$ 0,39
ГК	8,91 $\pm$ 0,32*	8,48 $\pm$ 1,08
КК	11,13 $\pm$ 0,49	10,84 $\pm$ 0,49

Примечание: БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

При понижении осмотического давления ГК *H. pomatia* практически не изменяют размеров, активность их снижается, клетки закрепляются и теряют подвижность. При инкубации в гиперосмотическом растворе гемоциты сжимаются, закрепления свободных гемоцитов на субстрате не происходит, клетки начинают выпускать мелкие филоподии. КК *H. pomatia* на осмотическую нагрузку изменением линейных размеров не реагируют.

В гипосмотической среде БА *S. ravergeri* увеличиваются в размере (табл. 10), псевдоподии укорачиваются, активность клеток снижается, через 5-7 минут клетки распластываются по субстрату и некоторое время не меняют формы, а затем восстанавливают исходную и начинают активно передвигаться. При повышении осмолярности среды размер клеток несколько уменьшается,

некоторое время клетки практически не выпускают псевдоподий, затем происходит восстановление функций, и клетки снова начинают активно передвигаться.

Таблица 10

Динамика линейных размеров гемоцитов *S. ravergeri* при инкубации в средах с различной осмотичностью

Тип клеток	Линейные размеры клеток по длинной оси, $\mu\text{m}$	Линейные размеры клеток по короткой оси, $\mu\text{m}$
гипотония		
БА	15,63 $\pm$ 1,09*	11,75 $\pm$ 1,55*
МА	10,63 $\pm$ 0,58*	8,17 $\pm$ 0,24*
ГК	7,73 $\pm$ 0,29*	5,98 $\pm$ 0,04
КК	9,71 $\pm$ 0,71*	9,50 $\pm$ 0,25*
изотония		
БА	10,49 $\pm$ 0,54	7,50 $\pm$ 0,76
МА	8,14 $\pm$ 0,18	6,85 $\pm$ 0,58
ГК	6,83 $\pm$ 0,50	5,54 $\pm$ 0,53
КК	6,43 $\pm$ 0,49	6,20 $\pm$ 0,52
гипертония		
БА	9,02 $\pm$ 0,19*	7,92 $\pm$ 0,49
МА	7,66 $\pm$ 0,31	5,51 $\pm$ 0,48*
ГК	5,96 $\pm$ 0,16	4,46 $\pm$ 0,78
КК	6,31 $\pm$ 0,12	5,89 $\pm$ 0,07

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

В гипотонических условиях МА *S. ravergeri* увеличиваются, псевдоподии укорачиваются, форма клетки приближается к округлой, клетки сливаются в агрегаты и выключаются из взаимодействий с антигенами. При инкубации в гипертоническом растворе достоверных функциональных и морфологических изменений клеток не происходит.

В условиях пониженного осмотического давления размеры ГК *S. ravergeri* несколько увеличиваются, псевдоподии укорачиваются и становятся реже. При повышении осмолярности раствора достоверных изменений размеров клеток не происходит, клетки теряют подвижность, распластываются и находятся в таком положении длительное время.

В условиях гипотонии круглые клетки *S. ravergeri* увеличиваются в размерах. В гиперосмотической среде достоверных изменений с клетками не происходит.

В гипотонической среде размер БА *V. viviparus*, морфологические признаки и функциональная активность не претерпевают достоверных изменений. При повышении осмолярности раствора клетки уменьшаются в размерах (табл. 11), втягивают псевдоподии и округляются.

Таблица 11

Динамика линейных размеров гемоцитов *V. viviparus* при инкубации в средах с различной осмотичностью

Тип клеток	Линейные размеры клеток по длинной оси, $\mu\text{m}$	Линейные размеры клеток по короткой оси, $\mu\text{m}$
гипотония		
БА	18,12 $\pm$ 0,88	13,16 $\pm$ 1,13
МА	12,51 $\pm$ 0,46	10,29 $\pm$ 0,46*
ГК	9,61 $\pm$ 0,51	8,35 $\pm$ 0,91
КК	9,96 $\pm$ 0,10	9,65 $\pm$ 0,37
изотония		
БА	19,41 $\pm$ 1,83	13,89 $\pm$ 2,55
МА	12,42 $\pm$ 1,02	8,61 $\pm$ 0,72
ГК	9,27 $\pm$ 0,48	7,62 $\pm$ 0,50
КК	10,74 $\pm$ 1,48	10,14 $\pm$ 1,39
гипертония		
БА	15,24 $\pm$ 1,89*	11,64 $\pm$ 1,90
МА	11,22 $\pm$ 0,29	9,53 $\pm$ 0,93
ГК	8,39 $\pm$ 0,52	7,56 $\pm$ 0,61
КК	8,46 $\pm$ 0,48*	8,19 $\pm$ 0,46*

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

В условиях сниженной концентрации солей в инкубационном растворе достоверных изменений с МА *V. viviparus* не происходит. В гипертонической среде клетки распластываются по субстрату и временно теряют способность к передвижению, через 5-7 минут активность восстанавливается.

В условиях пониженного осмотического давления достоверных изменений с ГК *V. viviparus* не происходит. В гиперосмотической среде клетки сливаются в агрегаты и закрепляются на стекле, теряя подвижность.

В условиях гипотонии с круглыми клетками *V. viviparus* не происходит достоверных изменений. В гипертоническом инкубационном растворе клетки несколько уменьшаются в размерах.

При снижении осмолярности раствора БА *A. fulica* увеличиваются в размерах, втягивают псевдоподии, затем распластываются на стекле и

сливаются в агрегаты с другими БА. В гиперосмотической среде клетки закрепляются на субстрате без достоверных изменений в активности и размерах (табл. 12).

Таблица 12

Динамика линейных размеров гемоцитов *A. fulica* при инкубации в средах с различной осмотичностью

Тип клеток	Линейные размеры клеток по длинной оси, $\mu\text{m}$	Линейные размеры клеток по короткой оси, $\mu\text{m}$
гипотония		
БА	23,22 $\pm$ 1,64*	14,66 $\pm$ 0,74*
МА	15,96 $\pm$ 0,60*	11,79 $\pm$ 0,87
ГК	13,68 $\pm$ 0,48*	8,89 $\pm$ 0,93
КК	12,78 $\pm$ 0,97*	12,32 $\pm$ 1,15*
изотония		
БА	18,58 $\pm$ 1,12	11,58 $\pm$ 0,53
МА	12,90 $\pm$ 1,03	10,19 $\pm$ 1,00
ГК	9,49 $\pm$ 0,39	8,12 $\pm$ 0,43
КК	9,56 $\pm$ 0,39	9,27 $\pm$ 0,43
гипертония		
БА	17,06 $\pm$ 1,40	11,93 $\pm$ 1,34
МА	13,13 $\pm$ 1,13	10,86 $\pm$ 1,86
ГК	8,95 $\pm$ 0,60	6,92 $\pm$ 0,33*
КК	9,74 $\pm$ 0,72	9,64 $\pm$ 0,81

Примечание: БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

При инкубации в гипоосмотическом растворе МА *A. fulica* сливаются в агрегаты, увеличиваясь в размерах, и распластываются по стеклу. В условиях повышенной осмолярности достоверных изменений с клетками не происходит.

В гипотоническом растворе ГК *A. fulica* вытягиваются, число и длина лобоподий уменьшается, клетки перестают закрепляться на субстрате. В условиях повышения осмотического давления достоверных изменений с клетками не происходит.

При увеличении осмолярности круглые клетки *A. fulica* увеличиваются в размерах. При повышении концентрации солей в инкубационном растворе достоверных изменений с клетками не происходит.

В условиях гипотонии БА *P. corneus* увеличиваются в размерах (табл. 13) и на некоторое время утрачивают способность к образованию псевдоподий.

При инкубации в гипертоническом растворе осажденные на субстрат клетки уменьшаются в размерах и передвигаются по стеклу, не распластываясь.

Таблица 13

Динамика линейных размеров гемоцитов *P. corneus* при инкубации в средах с различной осмотичностью

Тип клеток	Линейные размеры клеток по длинной оси, $\mu\text{m}$	Линейные размеры клеток по короткой оси, $\mu\text{m}$
гипотония		
БА	12,60 $\pm$ 0,62*	7,35 $\pm$ 0,53
МА	6,94 $\pm$ 0,29	5,70 $\pm$ 0,52
ГК	5,54 $\pm$ 0,19	4,79 $\pm$ 0,52
КК	5,27 $\pm$ 0,18	5,00 $\pm$ 0,21
изотония		
БА	14,33 $\pm$ 0,41	6,17 $\pm$ 0,93
МА	7,89 $\pm$ 0,41	5,41 $\pm$ 1,04
ГК	6,33 $\pm$ 0,35	4,91 $\pm$ 0,40
КК	5,42 $\pm$ 0,29	5,18 $\pm$ 0,40
гипертония		
БА	11,03 $\pm$ 0,53*	6,63 $\pm$ 0,43
МА	5,94 $\pm$ 0,30*	5,44 $\pm$ 0,42
ГК	5,27 $\pm$ 0,54	4,31 $\pm$ 0,59
КК	5,43 $\pm$ 0,11	4,83 $\pm$ 0,17

Примечание: БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

В гипотонических условиях МА *P. corneus* не демонстрируют достоверных изменений размеров, распластываются на стекле и, передвигаясь, сливаются с другими МА в агрегаты. При повышении осмотического давления уменьшаются в размерах, лобоподии втягиваются, клетки распластываются на стекле и теряют подвижность.

В гипоосмотическом растворе ГК *P. corneus* не претерпевают достоверных морфологических изменений, однако их активность снижается. При инкубации в гипертоническом растворе распластываются на стекле и теряют способность к активному передвижению.

При изменении осмотичности среды с круглыми клетками *P. corneus* не происходит достоверных изменений.

В гипотоническом инкубационном растворе БА *L. stagnalis* увеличиваются в размерах (табл. 14), втягивают псевдоподии и снижают активность. При повышении концентрации солей с клетками не происходит

достоверных изменений размеров, однако псевдоподии становятся одиночными и расстояние между ними увеличивается.

Таблица 14

Динамика линейных размеров гемоцитов *L. stagnalis* при инкубации в средах с различной осмотичностью

Тип клеток	Линейные размеры клеток по длинной оси, $\mu\text{m}$	Линейные размеры клеток по короткой оси, $\mu\text{m}$
гипотония		
БА	21,37 $\pm$ 0,48*	16,56 $\pm$ 1,81*
МА	14,28 $\pm$ 1,47*	11,68 $\pm$ 0,93*
КК	12,32 $\pm$ 1,21*	11,68 $\pm$ 1,13*
изотония		
БА	18,96 $\pm$ 0,80	12,64 $\pm$ 1,08
МА	11,71 $\pm$ 0,40	8,20 $\pm$ 0,60
КК	9,45 $\pm$ 0,25	9,16 $\pm$ 0,38
гипертония		
БА	17,01 $\pm$ 0,64	12,11 $\pm$ 1,08
МА	11,05 $\pm$ 0,62	10,16 $\pm$ 1,00
КК	10,14 $\pm$ 0,32	9,95 $\pm$ 0,31

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

В гипоосмотических условиях МА *L. stagnalis* увеличиваются в размерах и распластываются на стекле, количество псевдоподий уменьшается, активность клетки снижается. При повышении осмотического давления клетки сбиваются в агрегаты и закрепляются на стекле.

В условиях гипотонии круглые клетки *L. stagnalis* увеличиваются в размерах. В гиперосмотическом растворе с клетками не происходит достоверных изменений.

В гипотонических условиях БА *A. australis* вытягиваются, закрепляются на стекле и прекращают передвигаться. В растворе с повышенной осмолярностью клетки уменьшаются (табл. 15) и втягивают псевдоподии, их активность снижается.

При понижении осмотического давления МА *A. australis* раздуваются и втягивают псевдоподии. При инкубации в гипертоническом растворе гемоциты сбиваются в агрегаты и закрепляются на стекле, теряя при этом подвижность.



Динамика линейных размеров гемоцитов *A. australis* при инкубации в средах с различной осмотичностью

Тип клеток	Линейные размеры клеток по длинной оси, $\mu\text{m}$	Линейные размеры клеток по короткой оси, $\mu\text{m}$
гипотония		
БА	17,71 $\pm$ 1,01	13,60 $\pm$ 1,94*
МА	13,92 $\pm$ 0,53*	11,11 $\pm$ 0,48*
КК	10,28 $\pm$ 0,83*	9,96 $\pm$ 0,59
изотония		
БА	17,21 $\pm$ 0,46	9,52 $\pm$ 1,49
МА	11,70 $\pm$ 0,42	8,94 $\pm$ 1,18
КК	8,55 $\pm$ 0,24	8,15 $\pm$ 0,34
гипертония		
БА	14,49 $\pm$ 1,08*	12,15 $\pm$ 1,17*
МА	10,12 $\pm$ 0,37	8,98 $\pm$ 0,53
КК	8,65 $\pm$ 0,26	8,36 $\pm$ 0,47

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Круглые клетки *A. australis* на изменение осмолярности инкубационного раствора не реагируют.

### 3.1.4.2. Результаты исследования высоты и топографии поверхности клеток

Использование изображений, полученных при помощи атомно-силового микроскопа, позволило оценить характер изменения рельефа поверхности гемоцитов *N. rotaria* после инкубации в растворах различной концентрации.

Снижение осмотического давления вело к увеличению высоты больших амебоцитов (рис. 41-42) и частичному расправлению мембраны. В изотонических условиях на поверхности клеток наблюдаются многочисленные гребни, на периферии присутствуют складки ламеллоплазмы. На сканограммах отчетливо видно резкое возрастание высоты на графике.

Малые амебоциты в гипотонической среде не показывают достоверных изменений высоты, но их мембрана расправляется практически полностью, в то время как у нативных клеток на поверхности присутствуют небольшие складки мембраны.

Гранулярные клетки при повышении осмолярности раствора несколько увеличиваются в высоту, их поверхность остается умеренно складчатой. Для этого типа характерно преобладание ламеллоподий.

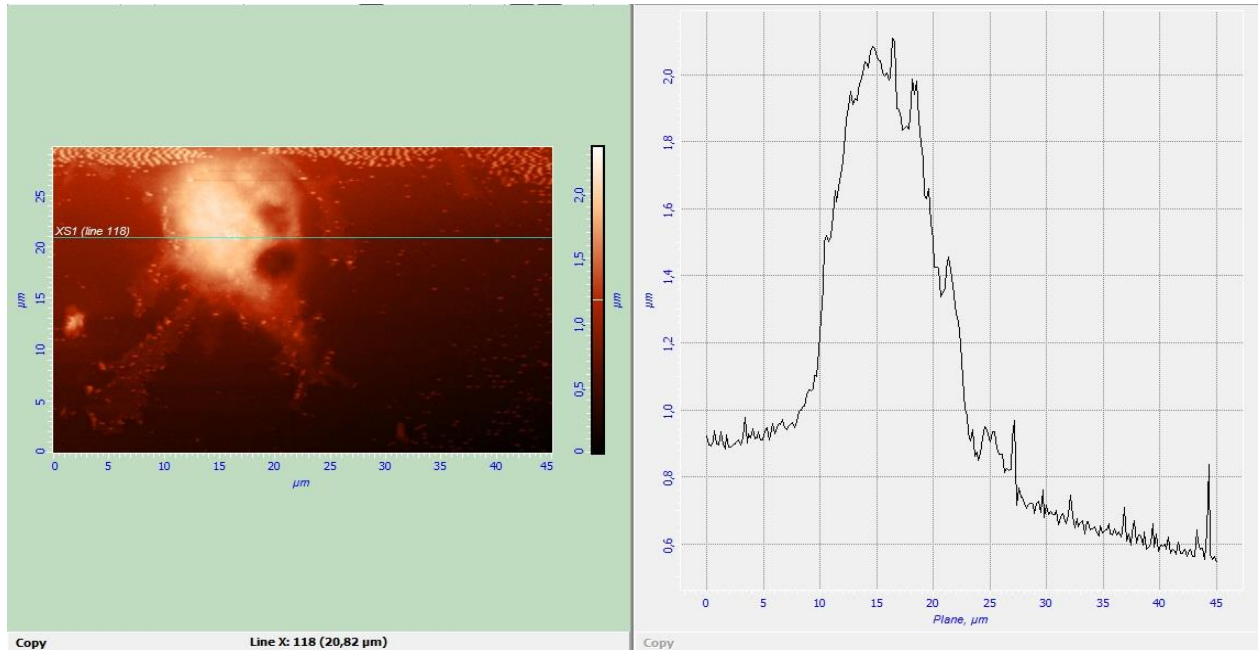


Рис. 41. Двухмерное изображение топографии поверхности БА *H. pomatia* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемocyта вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гипоосмотической нагрузки

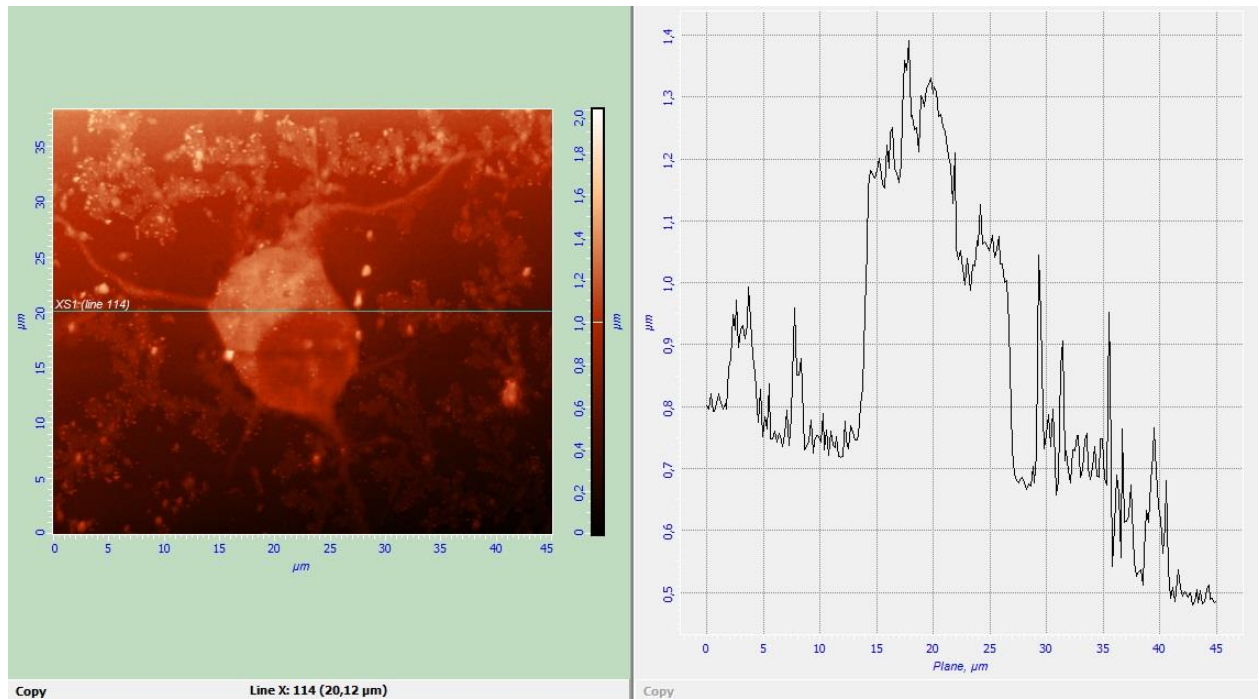


Рис. 42. Двухмерное изображение топографии поверхности БА *H. pomatia* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемocyта вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии

В условиях гипотонии высота круглых клеток (рис. 43-44) увеличивается, мембрана несколько расправляется, исчезают гребни. В гипертоническом растворе клетки не претерпевают достоверных изменений.

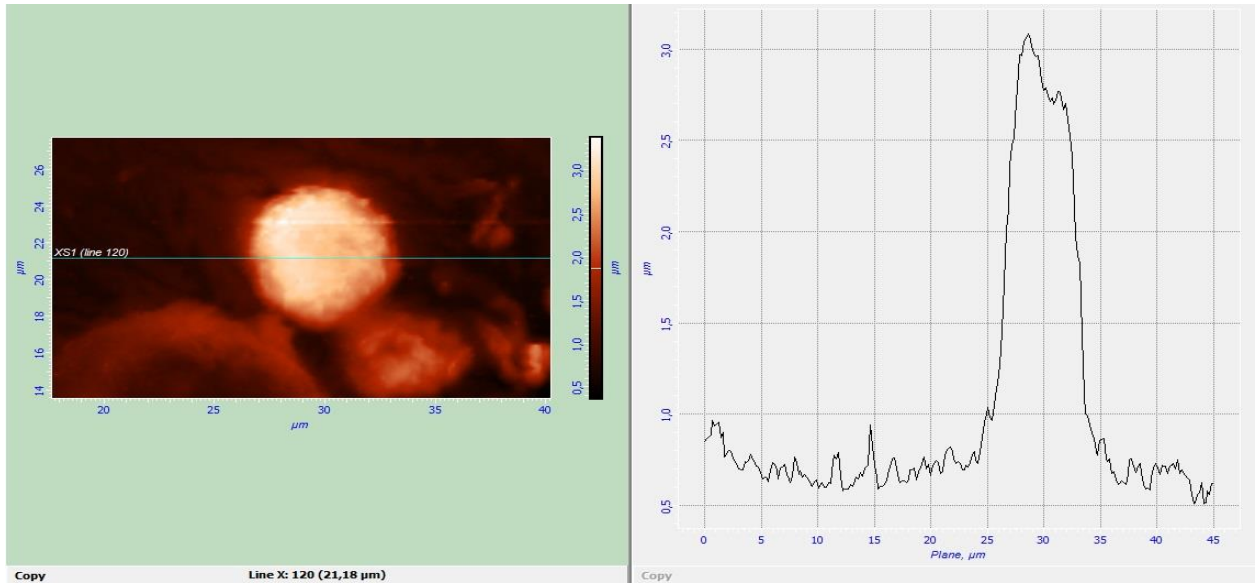


Рис. 43. Двухмерное изображение топографии поверхности КК *H. pomatia* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемócита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях гипотонии

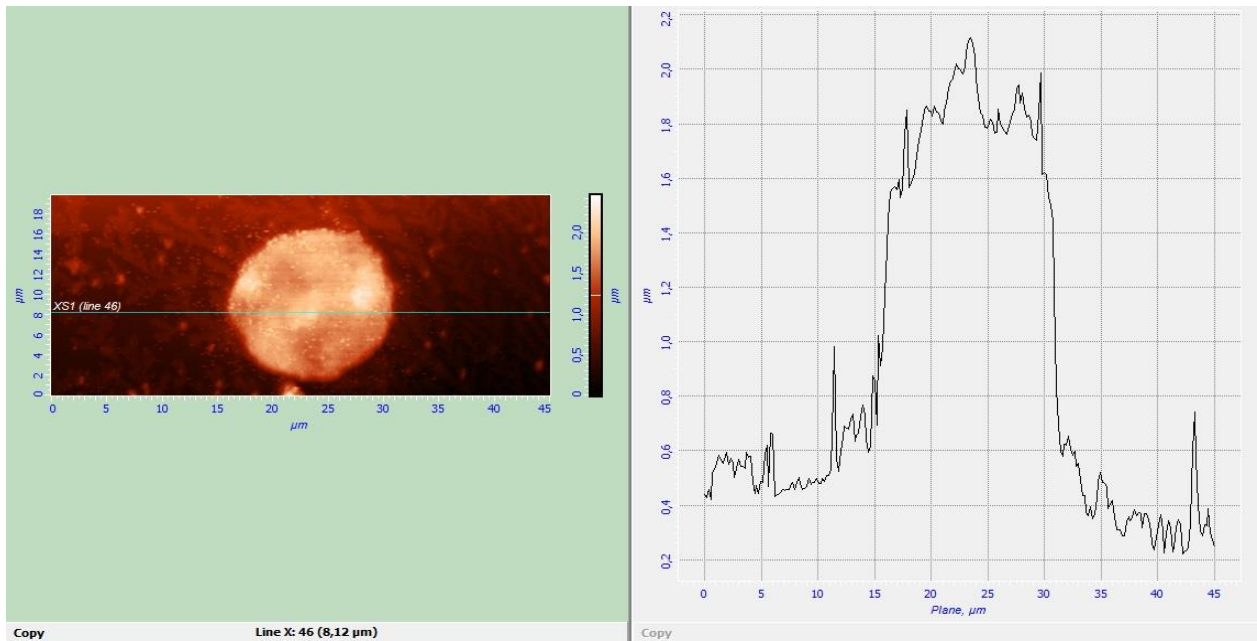


Рис. 44. Двухмерное изображение топографии поверхности КК *H. pomatia* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемócита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии

Использование метода атомно-силовой микроскопии и полученных в ходе сканирования изображений позволило оценить характер изменения рельефа поверхности гемоцитов *S. ravergeri* после инкубации в растворах различной концентрации.

При понижении осмотического давления большие амебоциты несколько увеличиваются в высоту. Ядерная область клетки начинает выступать, складки мембраны сглаживаются. Данные изменения, однако, не являются достоверными, поскольку не являются регулярными. При инкубации в гиперосмотическом растворе клетки не претерпевают достоверных изменений.

В гипотонических условиях высота малых амебоцитов (рис. 45-46) возрастает, складчатость мембраны становится менее выраженной. При повышении концентрации солей в растворе достоверных изменений с клетками не происходит.

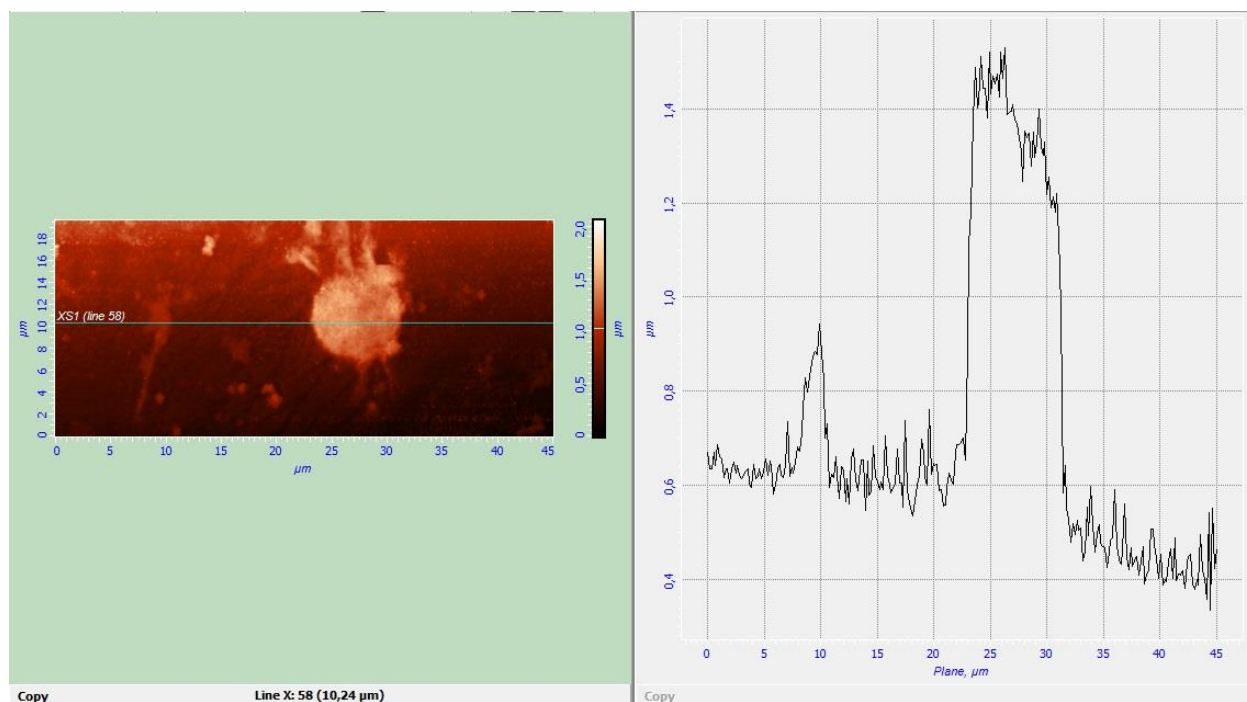


Рис. 45. Двухмерное изображение топографии поверхности МА *S. ravergeri* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях гипотонии

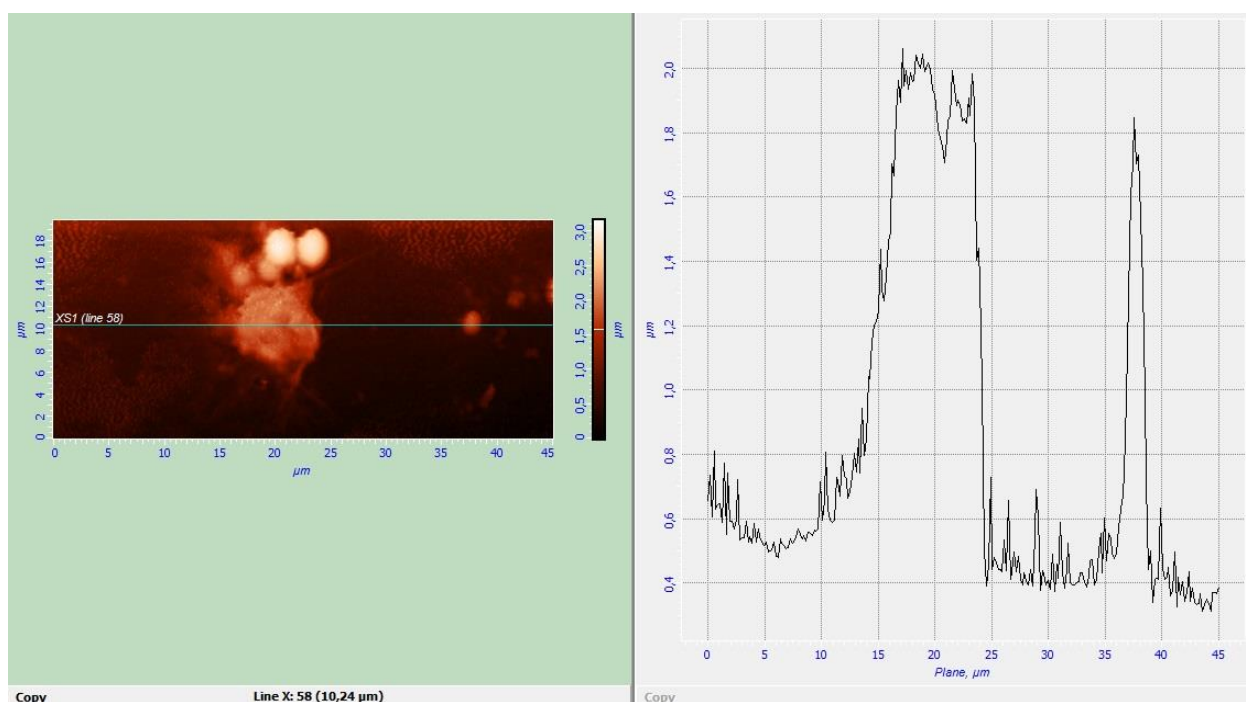


Рис. 46. Двухмерное изображение топографии поверхности МА *S. ravergeri* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии

При понижении осмолярности раствора гранулярные клетки (рис. 47-48) достоверно увеличиваются в высоту, мембрана становится более сглаженной. В условиях гипертонии достоверных изменений с клетками не происходит.

Высота и складчатость мембран круглых клеток как при повышении, так и при понижении осмотического давления инкубационного раствора достоверных изменений не претерпевает.

Использование метода атомно-силовой микроскопии и полученных в ходе сканирования изображений позволило оценить характер изменения рельефа поверхности гемоцитов *V. viviparus* после инкубации в растворах различной концентрации.

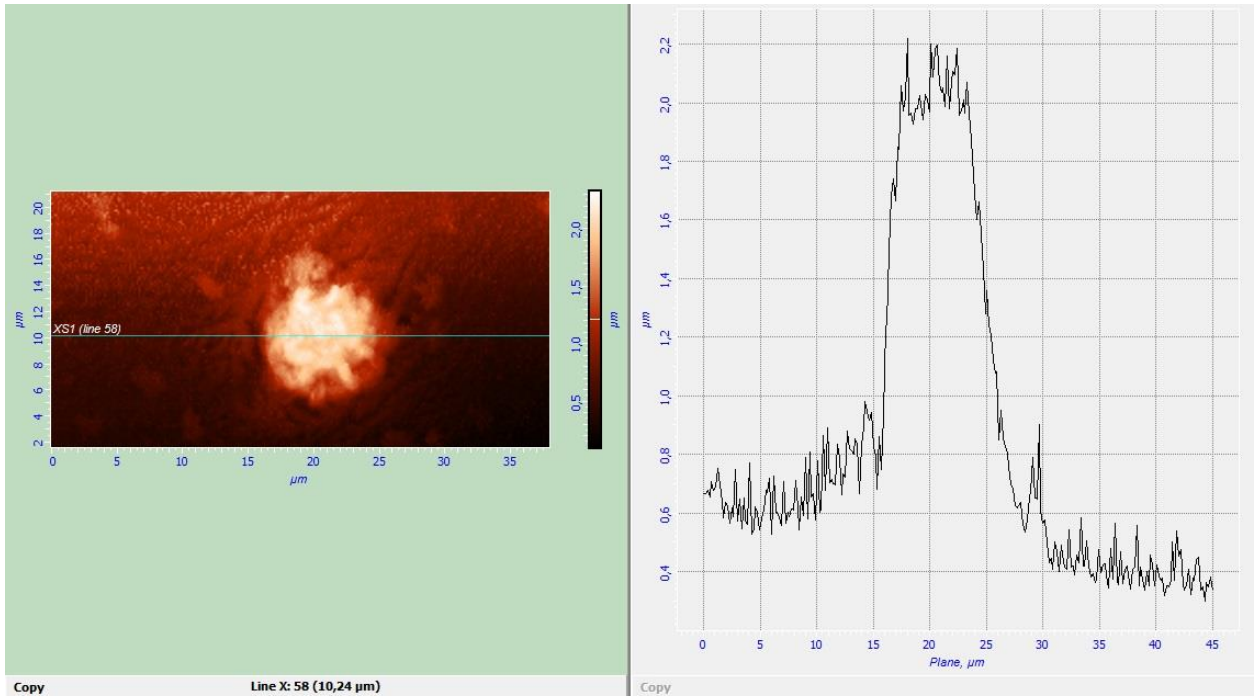


Рис. 47. Двухмерное изображение топографии поверхности ГК *S. ravergeri* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемócита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях гипотонии

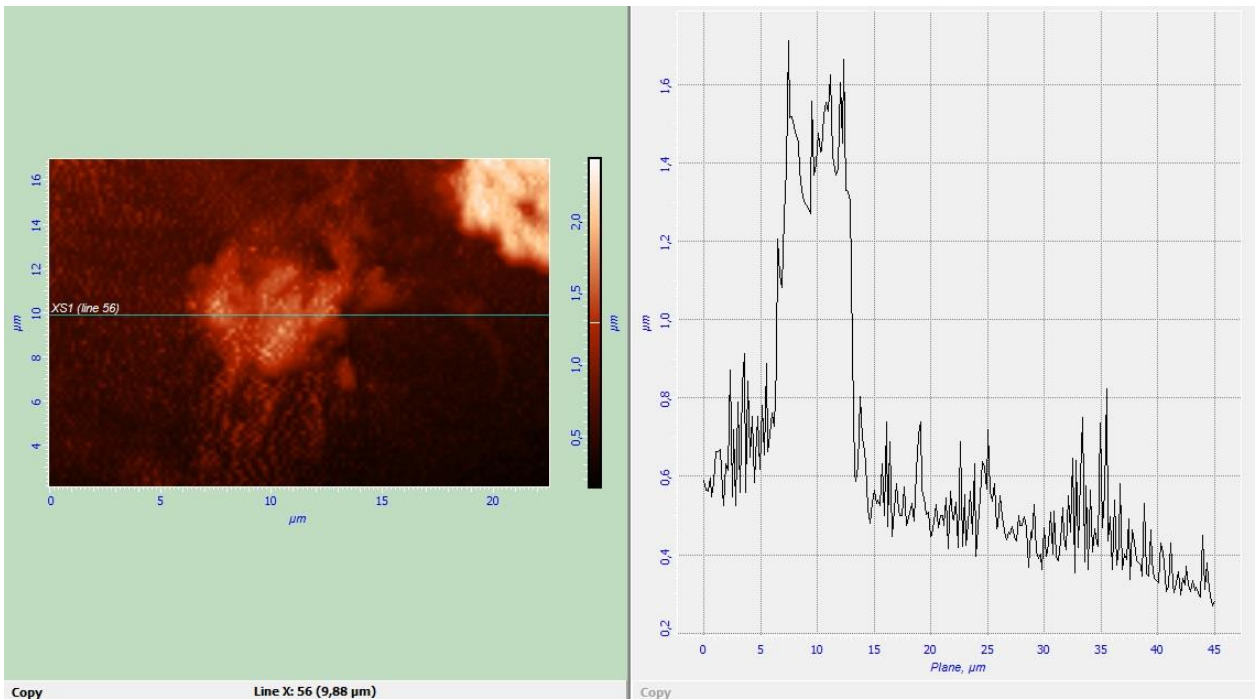


Рис. 48. Двухмерное изображение топографии поверхности МА *S. ravergeri* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемócита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии

В гипоосмотической среде высота больших амебоцитов достоверных изменений не претерпевает. При инкубации в гипертоническом растворе несколько возрастает складчатость мембраны, появляются гребневидные выросты, однако высота остается неизменной по сравнению с высотой нативных клеток.

При понижении осмотического давления малые амебоциты увеличиваются в высоту (рис. 49-50). Складчатость мембраны достоверных изменений не претерпевает. При увеличении концентрации солей в растворе достоверных изменений показателей клеток не происходит.

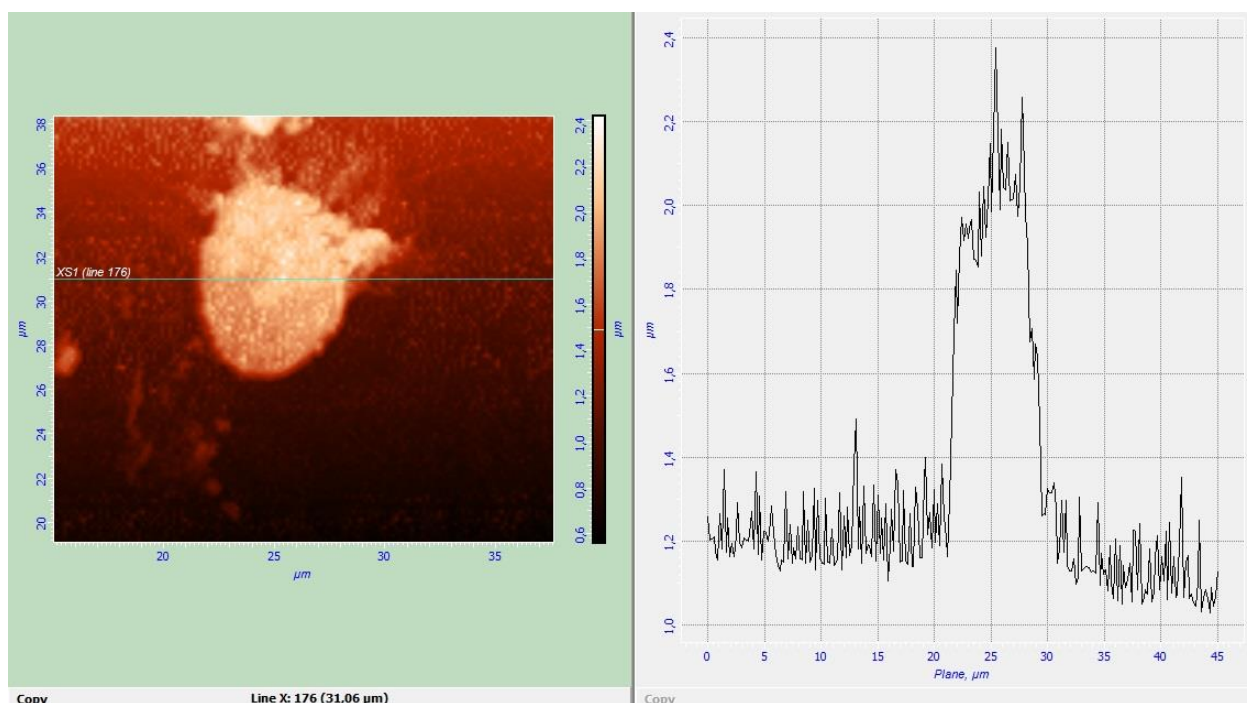


Рис. 49. Двухмерное изображение топографии поверхности МА *V. viviparus* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях гипотонии

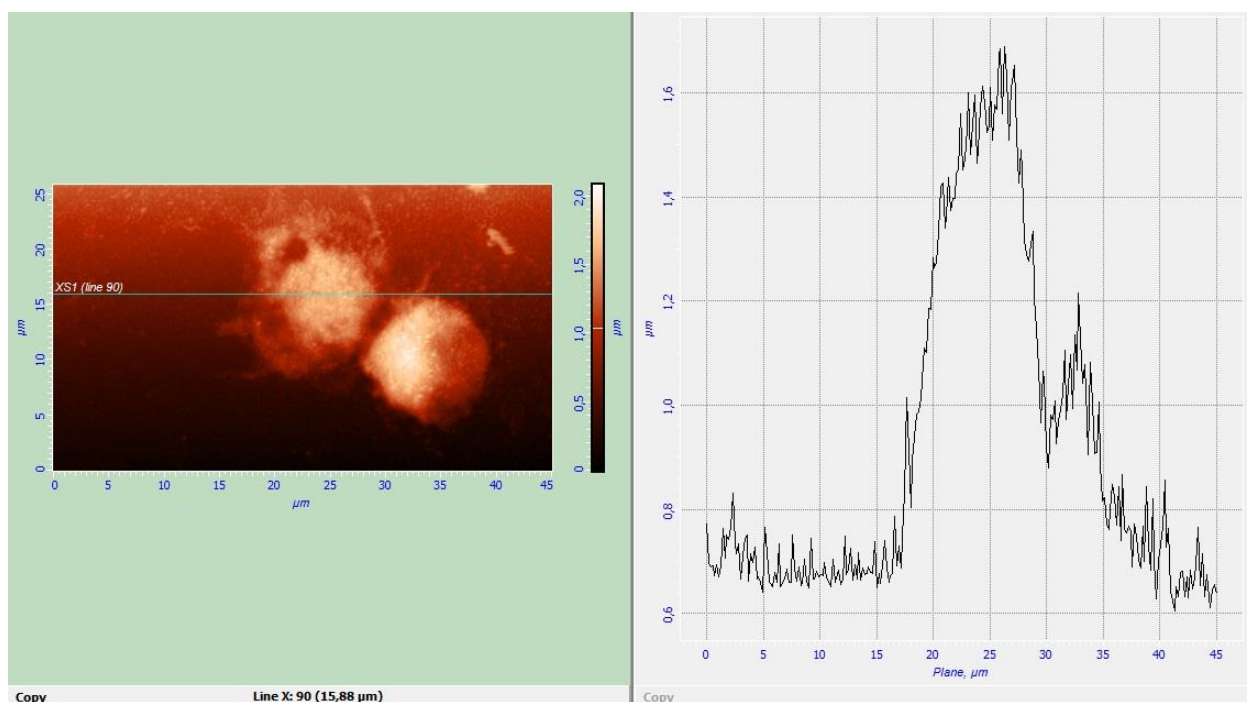


Рис. 50. Двухмерное изображение топографии поверхности МА *V. viviparus* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии

Гранулярные клетки (рис. 51-52) в условиях пониженной осмолярности растут в высоту. Мембрана остается складчатой, как и у нативных клеток, однако на сканограмме видно, что ядерная область клетки несколько «проседает». В гиперосмотической среде достоверных изменений клеточных показателей не происходит.

Высота и складчатость мембраны круглых клеток не претерпевает достоверных изменений в ответ на инкубацию клеток в растворах с различной осмотичностью.

Использование метода атомно-силовой микроскопии и полученных в ходе сканирования изображений позволило оценить характер изменения рельефа поверхности гемоцитов *A. fulica* после инкубации в растворах различной концентрации.



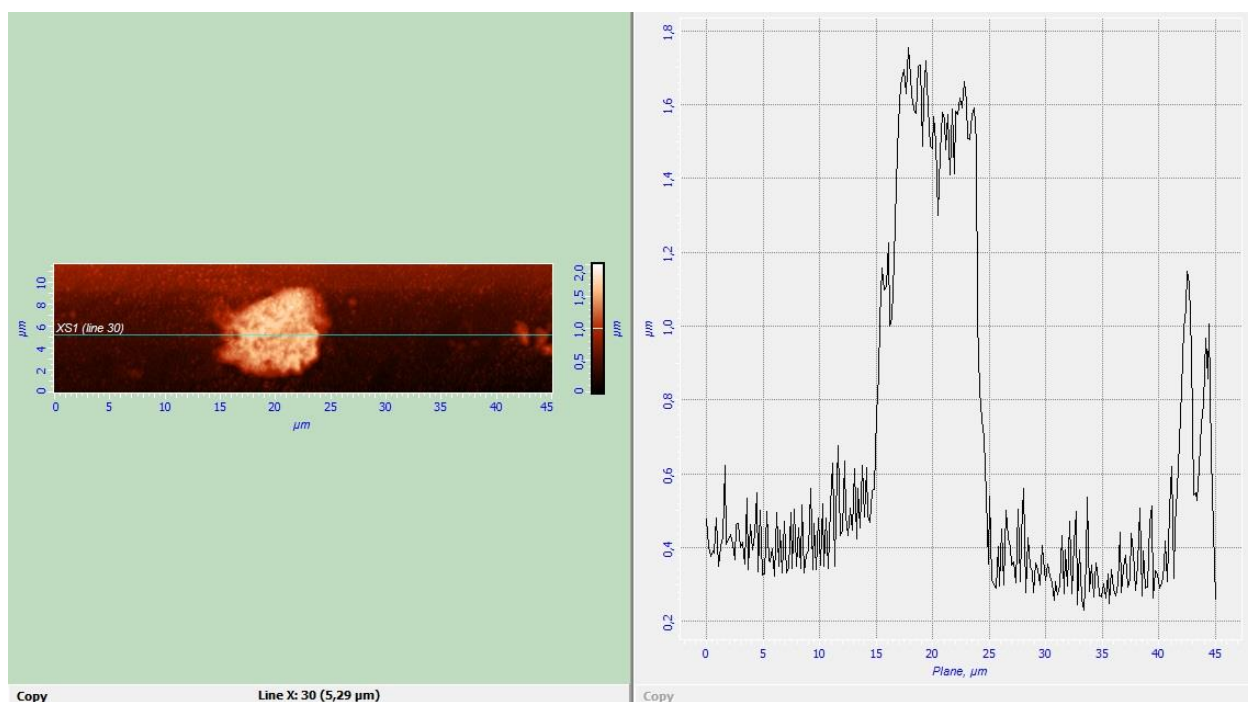


Рис. 51. Двухмерное изображение топографии поверхности ГК *V. viviparus* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемócита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях гипотонии

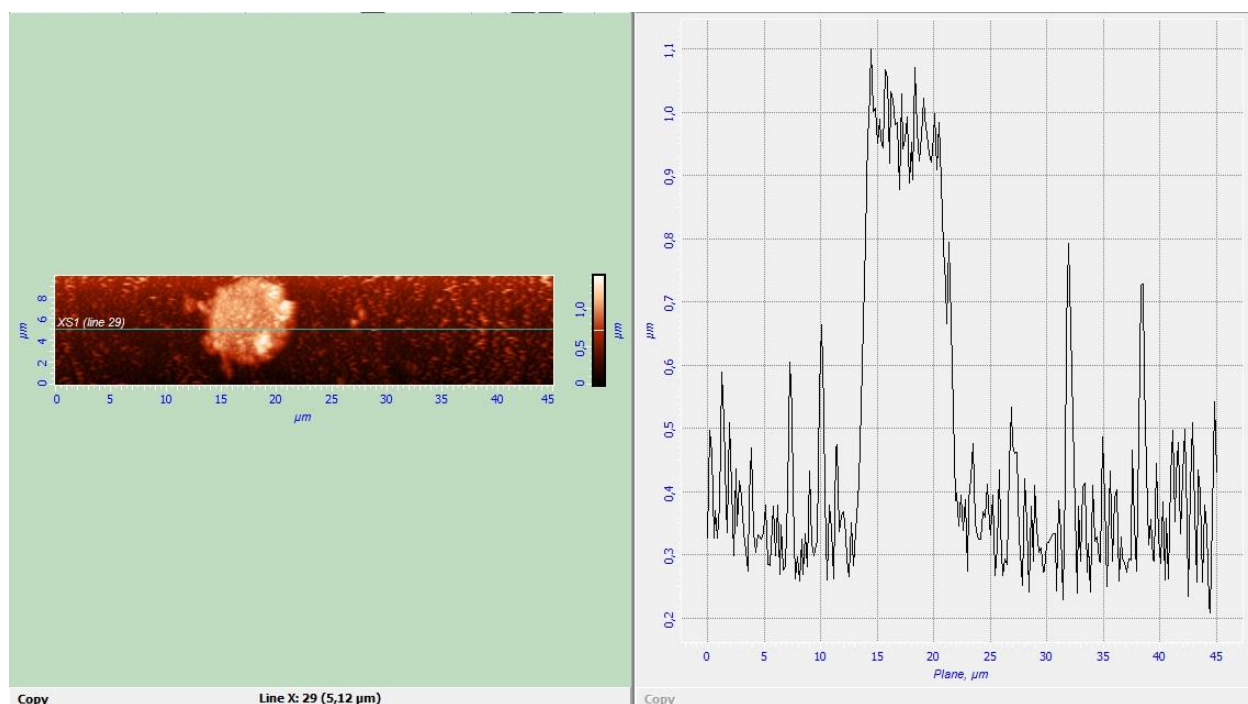


Рис. 52. – Двухмерное изображение топографии поверхности ГК *V. viviparus* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемócита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии

В гипосмотическом растворе возрастает высота больших амебоцитов (рис. 53-54). Мембрана становится более сглаженной. В условиях гипертонии увеличивается число гребней и складок мембраны.

При понижении осмотического давления малые амебоциты несколько увеличиваются в длину, но высота не изменяется. В гиперосмотической среде достоверных изменений высоты и складчатости мембран клеток не происходит.

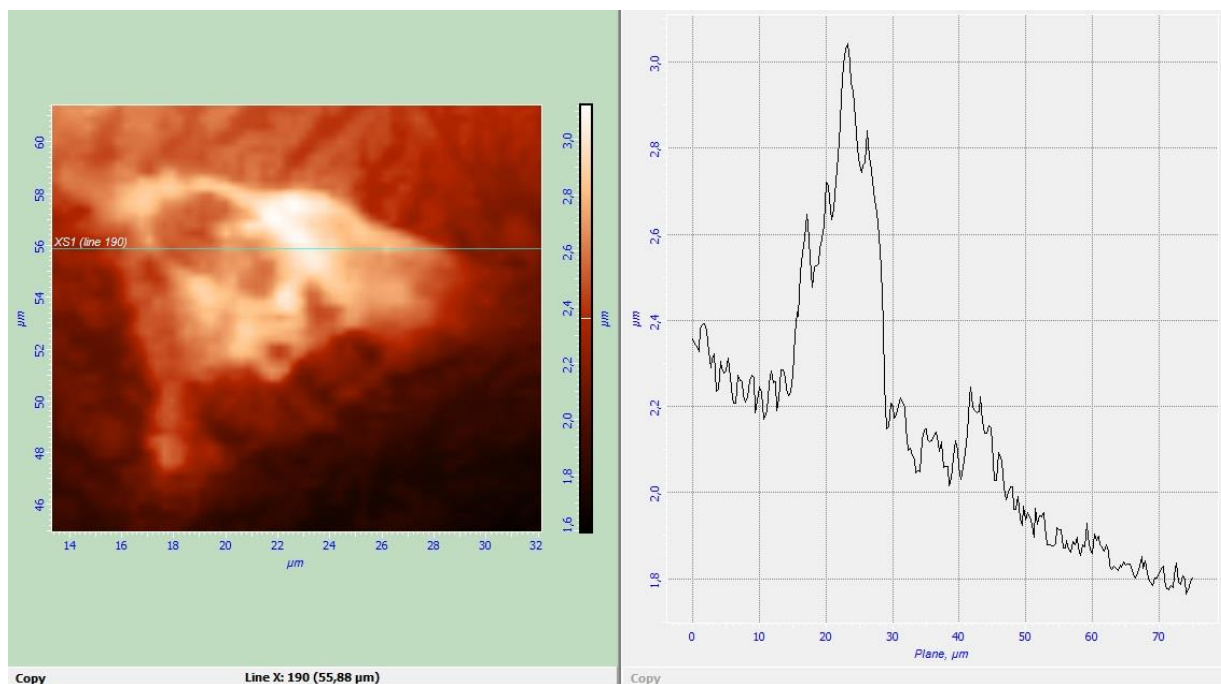


Рис. 53. Двухмерное изображение топографии поверхности БА *A. fulica* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях гипотонии

При снижении осмолярности среды мембрана гранулярных клеток несколько расправляется, (рис. 55-56) однако изменений высоты не происходит. При повышении концентрации солей в растворе складчатость мембран клеток возрастает, появляются гребни.

При понижении осмотического давления круглые клетки не показывают достоверных изменений высоты, но мембрана клеток становится более гладкой. В гипертонических условиях достоверных изменений высоты и складчатости мембраны не происходит.

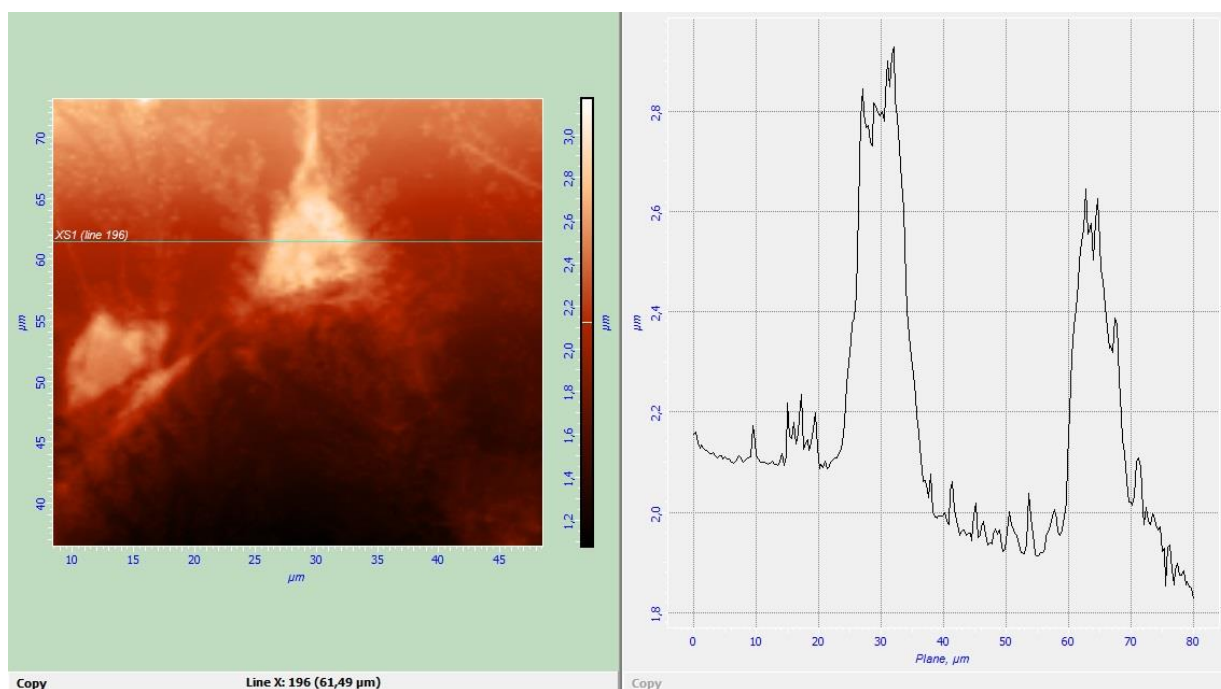


Рис. 54. Двухмерное изображение топографии поверхности БА *A. fulica* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемочита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии

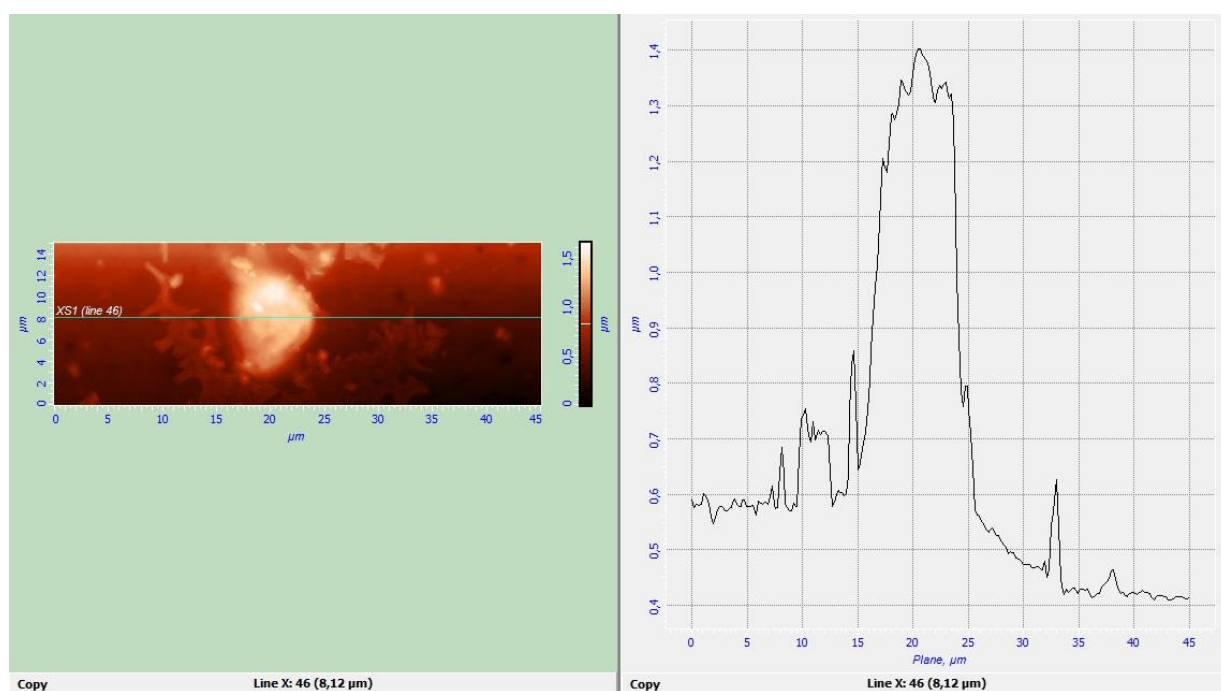


Рис. 55. Двухмерное изображение топографии поверхности ГК *A. fulica* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемочита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях гипотонии

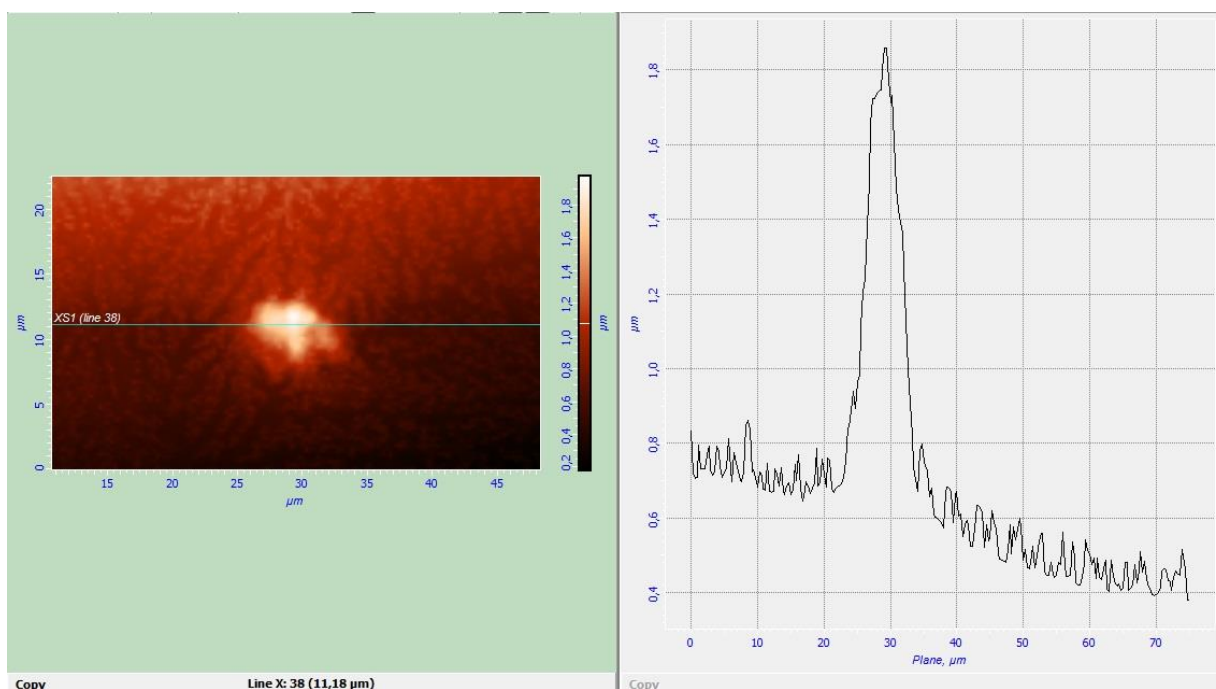


Рис. 56. Двухмерное изображение топографии поверхности ГК *A. fulica* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемocyта вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии

Использование метода атомно-силовой микроскопии и полученных в ходе сканирования изображений позволили оценить характер изменения рельефа поверхности гемocyтов *P. corneus* после инкубации в растворах различной концентрации.

При инкубации в гипосмотической среде высота больших амeбocyтов увеличивается (рис. 57-58), характер рельефа изменяется в сторону более сглаженного. В гипертоническом растворе складчатость мембраны увеличивается, образуются гребневидные выросты.

В условиях пониженного осмотического давления мембраны малых амeбocyтов клетки становятся более сглаженными, однако достоверных изменений высоты не происходит. При инкубации в гипертоническом растворе клетки также не претерпевают достоверных изменений.

При понижении концентрации солей в растворе высота гранулярных клеток увеличивается (рис. 59-60), мембрана становится более сглаженной. В условиях повышенной осмолярности с клетками не происходит достоверных

изменений, на мембране присутствует большое количество складок, клетки окружены ореолом ламеллоплазмы.

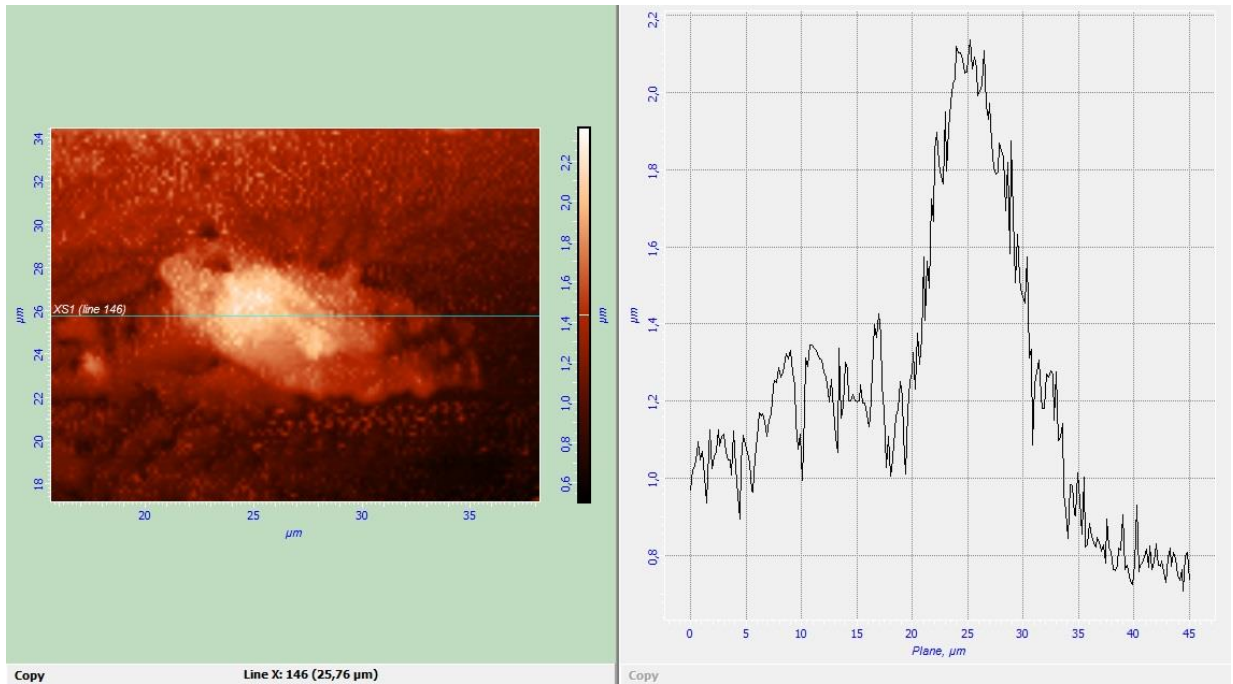


Рис. 57. Двухмерное изображение топографии поверхности БА *P. corneus* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях гипотонии

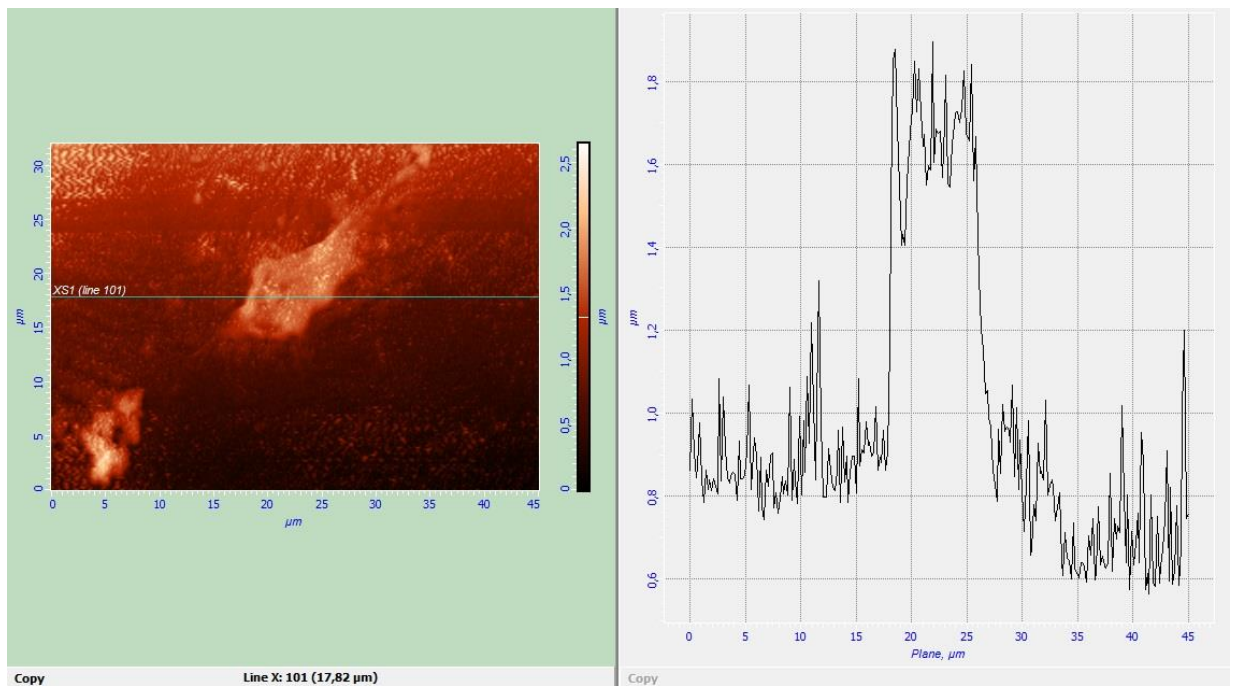


Рис. 58. Двухмерное изображение топографии поверхности БА *P. corneus* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии

Круглые клетки не показывают достоверных реакций на изменение осмотичности инкубационного раствора, за исключением повышения высоты в гипоосмотических условиях.

Использование метода атомно-силовой микроскопии и полученных в ходе сканирования изображений позволило оценить характер изменения рельефа поверхности гемоцитов *L. stagnalis* после инкубации в растворах различной концентрации.

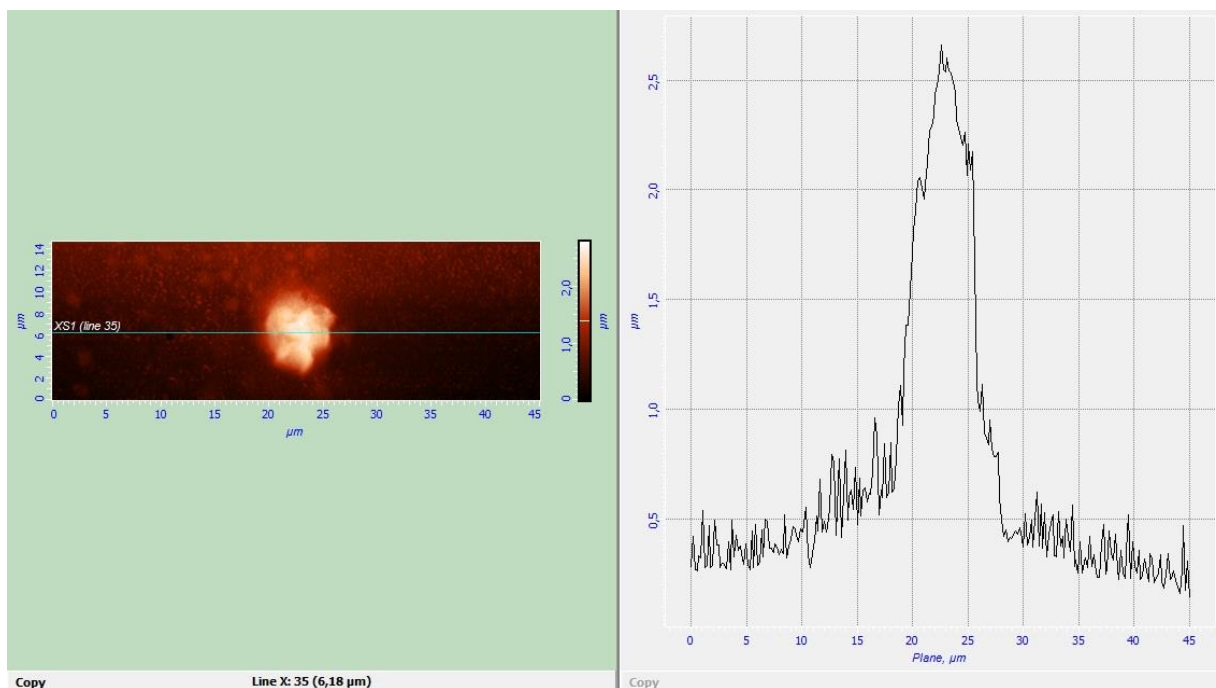


Рис. 59. Двухмерное изображение топографии поверхности ГК *P. corneus* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях гипотонии

В гипоосмотических условиях увеличивается высота больших амебоцитов (рис. 61-62), однако уровень складчатости не меняется, гребни и складки не расправляются. При инкубации в гипертоническом растворе с клетками не происходит достоверных изменений.

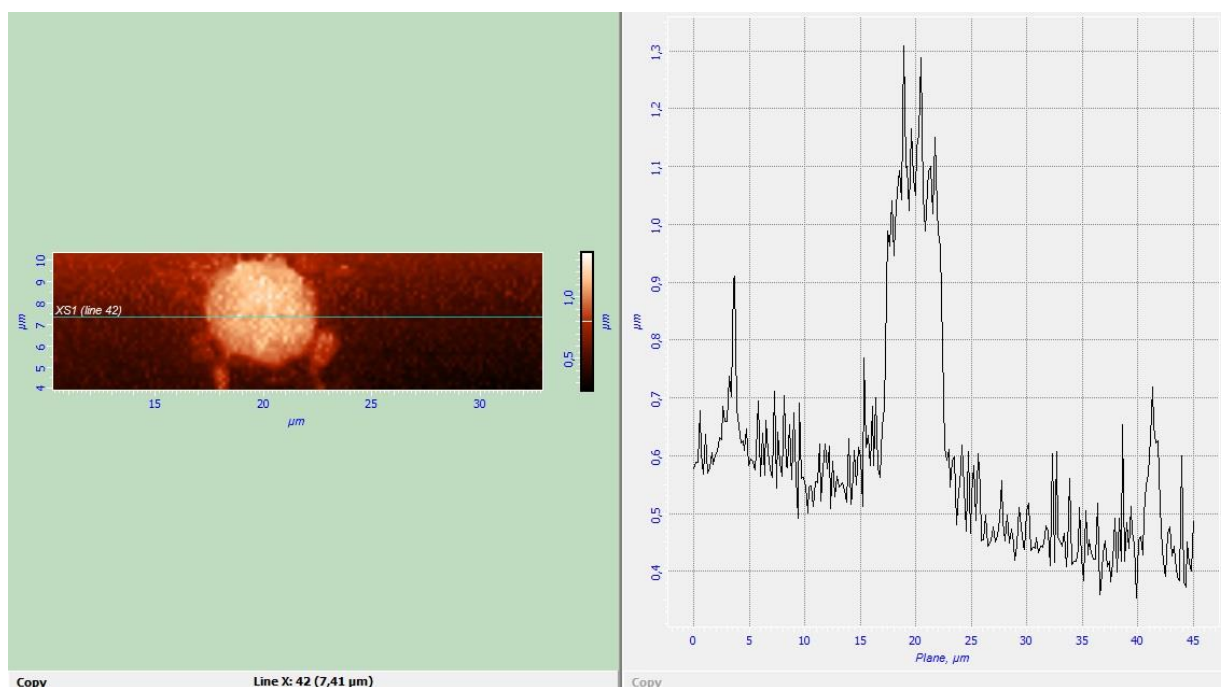


Рис. 60. Двухмерное изображение топографии поверхности ГК *P. corneus* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемокита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии

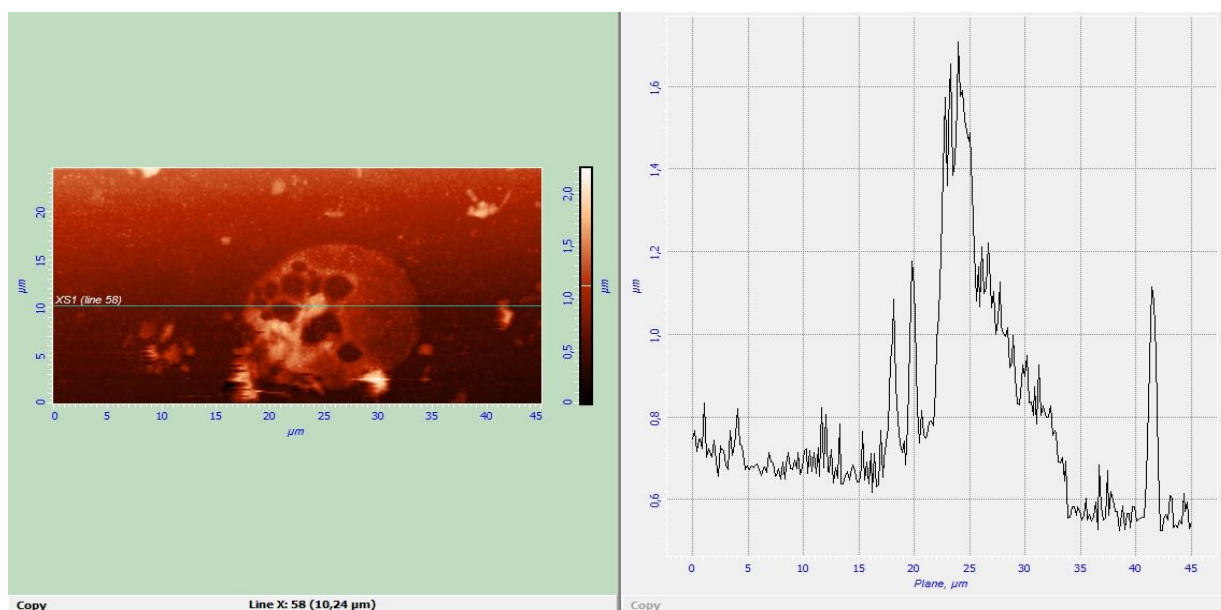


Рис. 61. Двухмерное изображение топографии поверхности БА *L. stagnalis* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемокита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях гипотонии

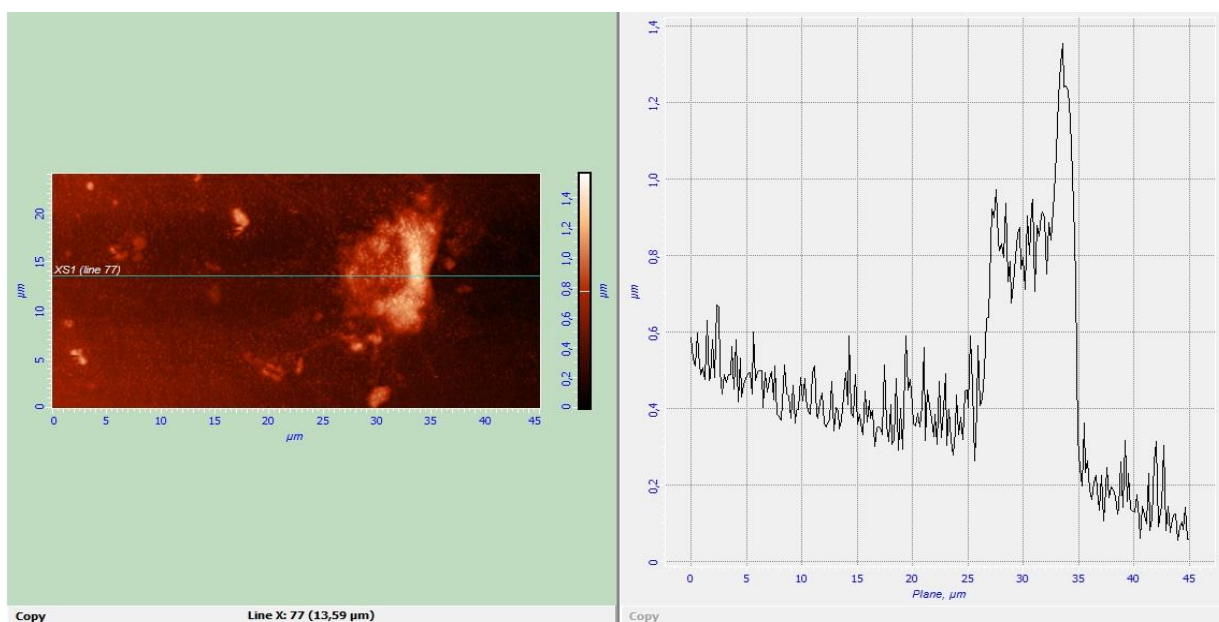


Рис. 62. Двухмерное изображение топографии поверхности БА *L. stagnalis* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гомоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии

При понижении осмолярности среды с малыми амебоцитами не происходит достоверных изменений высоты и складчатости мембран. В условиях гипертонии рельеф поверхности становится более шероховатым, появляются гребневидные выросты.

В растворе со сниженной концентрацией солей с круглыми клетками не происходит достоверных изменений складчатости мембраны (рис. 63-64), однако ядерная часть клетки выравнивается, и высота клеток несколько снижается. При повышении осмотического давления среды высота клеток уменьшается.

Использование метода атомно-силовой микроскопии и полученных в ходе сканирования изображений позволило оценить характер изменения рельефа поверхности гомоцитов *A. australis* после инкубации в растворах различной концентрации.



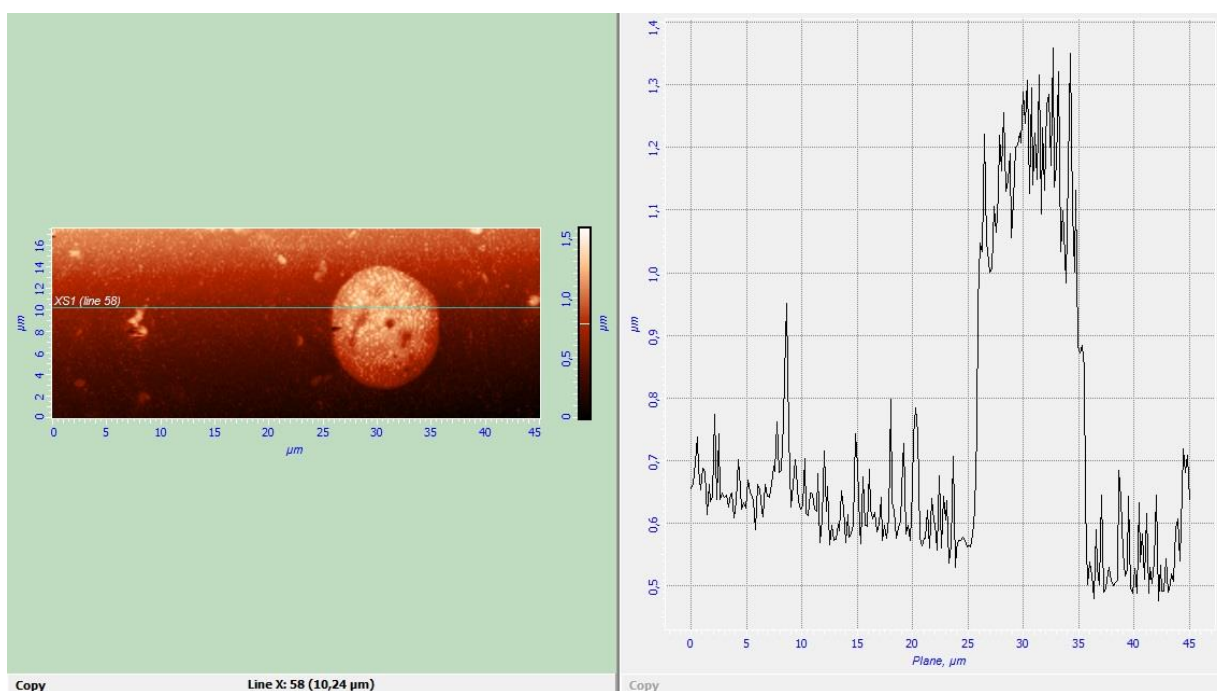


Рис. 63. Двухмерное изображение топографии поверхности КК *L. stagnalis* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях гипотонии

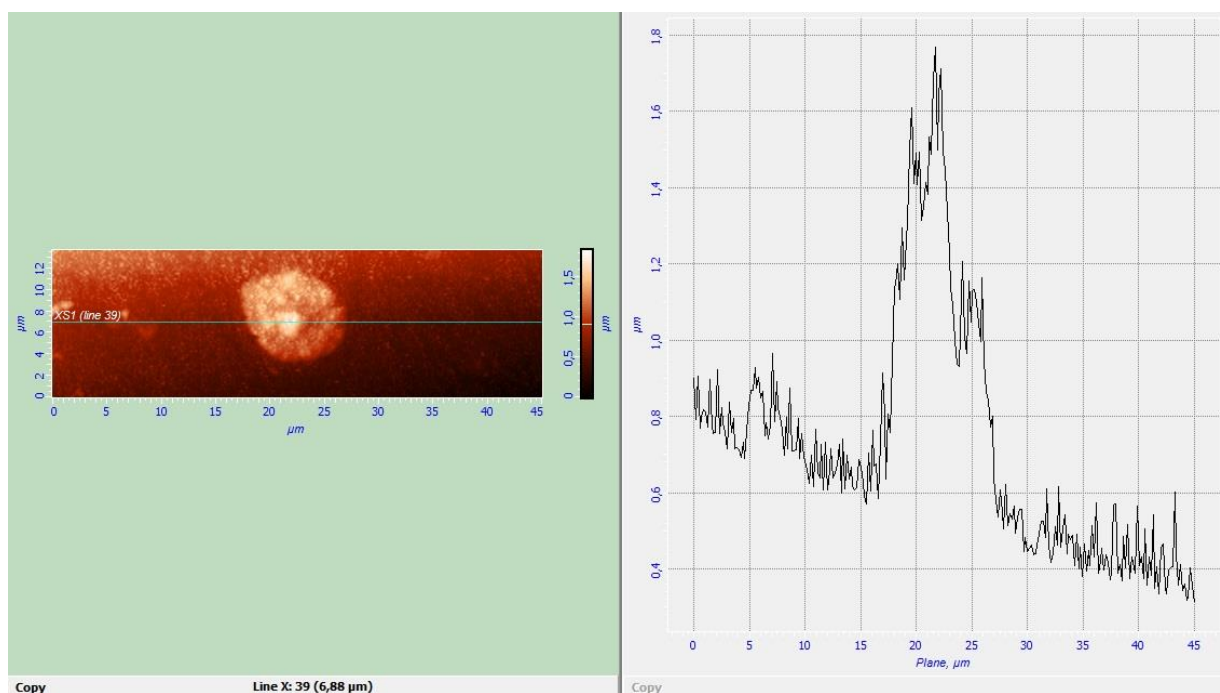


Рис. 64. Двухмерное изображение топографии поверхности КК *L. stagnalis* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии

В растворе с пониженной осмолярностью большие амебоциты не показывают достоверных изменений высоты и рельефа поверхности. При повышении осмотического давления складчатость мембран увеличивается.

При уменьшении концентрации солей в растворе высота малых амебоцитов увеличивается, топография мембраны не изменяется (присутствуют небольшие складки) (рис. 65-66). При инкубации в гипертонической среде высота клеток уменьшается.

Круглые клетки (рис. 67-68) в условиях гипотонии несколько увеличиваются в высоту, их мембрана становится более сглаженной. В условиях гипертонии высота клеток уменьшается.

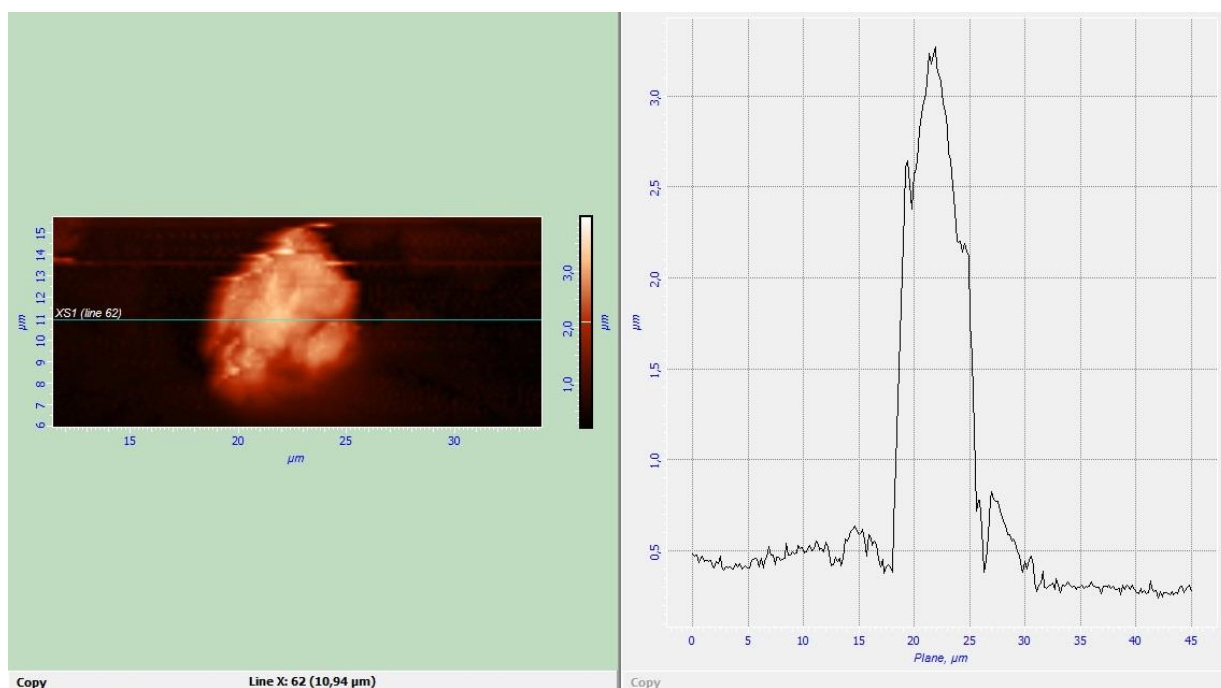


Рис. 65. Двухмерное изображение топографии поверхности МА *A. australis* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гомоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии

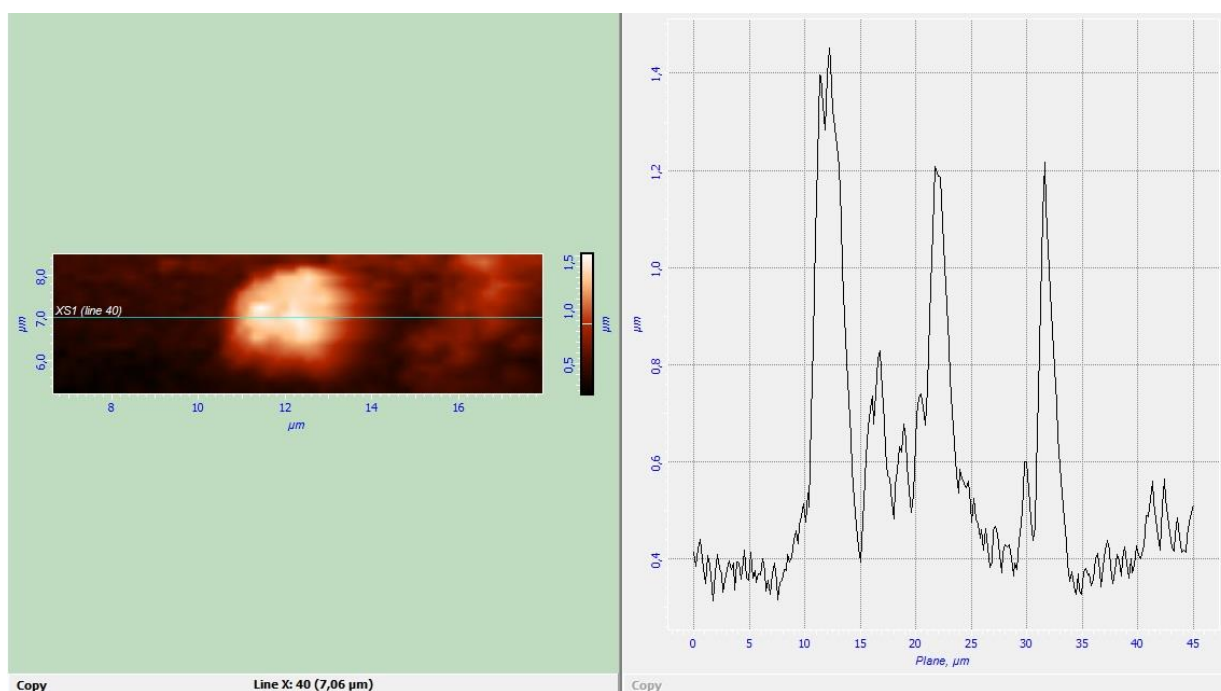


Рис. 66. Двухмерное изображение топографии поверхности МА *A. australis* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемócита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии

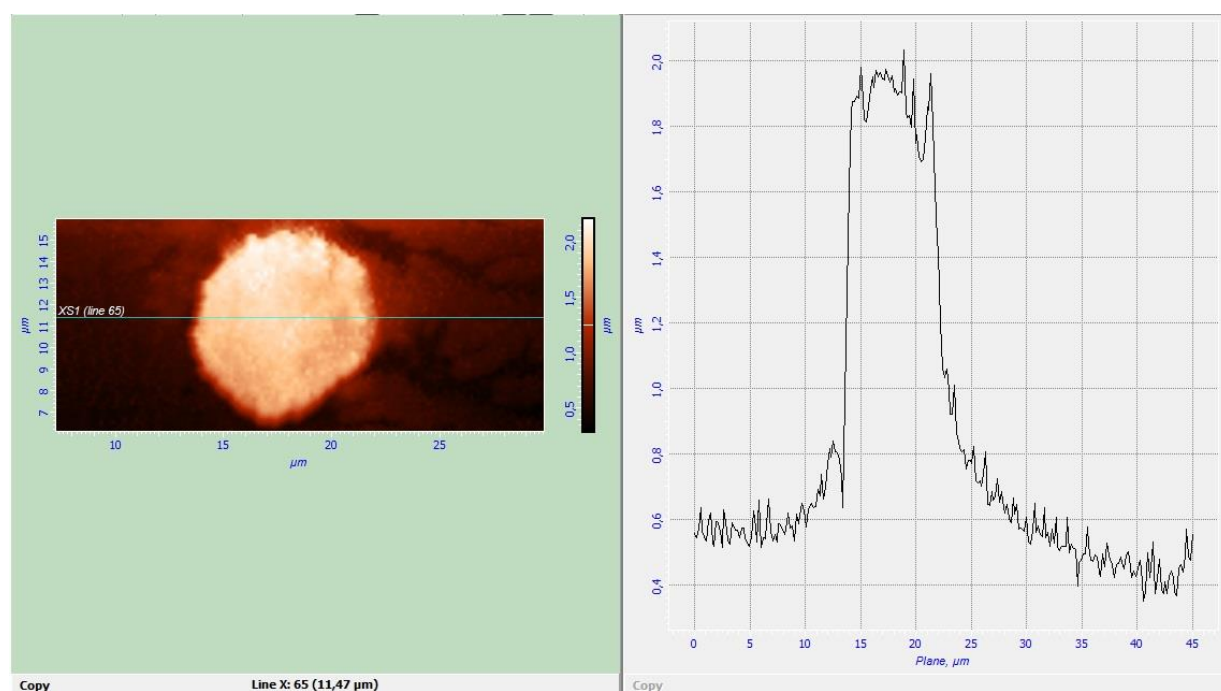


Рис. 67. Двухмерное изображение топографии поверхности КК *A. australis* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемócита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях гипотонии

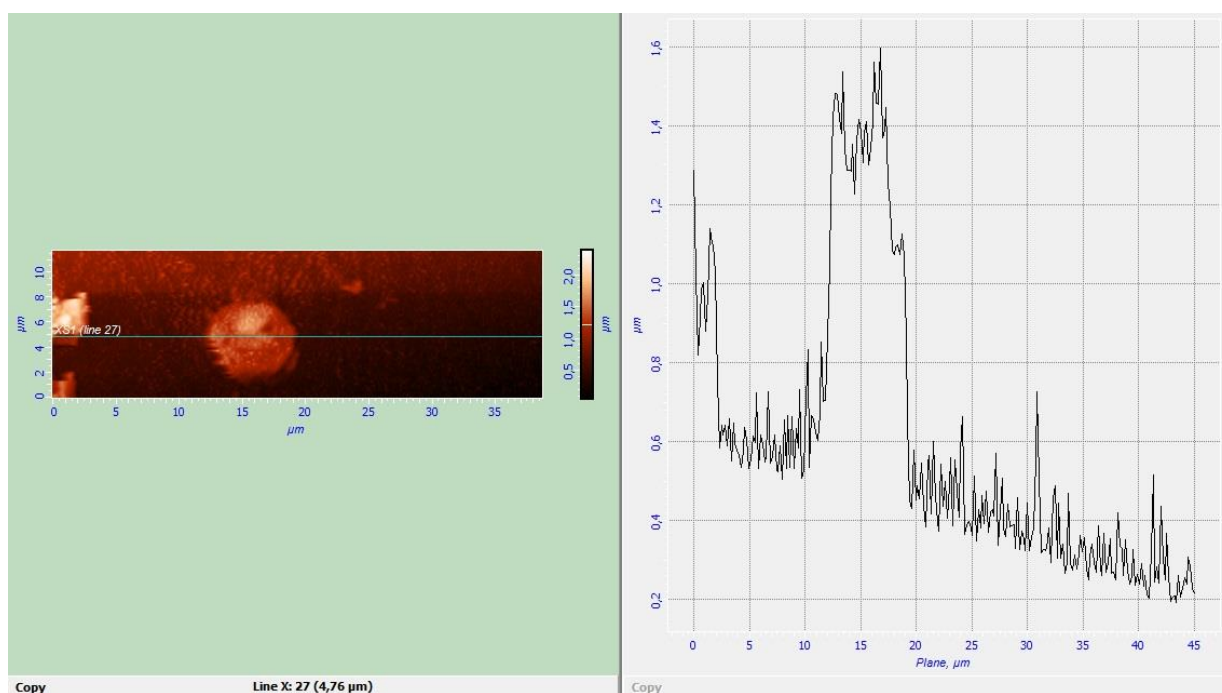


Рис. 68. Двухмерное изображение топографии поверхности КК *A. australis* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии

### 3.1.4.3. Оценка клеточных реакций, возникающих в результате действия осмотической нагрузки на гемоциты представителей класса Gastropoda

В результате проведенного исследования были получены данные об изменениях объема гемоцитов отдельных представителей класса Gastropoda, инкубированных в средах с различной осмолярностью.

Большие амебоциты *H. rotatia* в гипоосмотической среде не показывали достоверных изменений объема клеток (табл. 16). В условиях гипертонии их объем значительно уменьшался.

Таблица 16

Динамика объема гемоцитов *H. rotatia*, инкубированных в средах с различной осмотичностью,  $\mu\text{m}^3$

Среда/тип клеток	БА	МА	ГК	КК
Гипотония	33,06±7,92	46,06±5,87	15,37±4,10	28,08±3,73*
Изотония	42,13±3,01	55,66±9,11	14,43±3,34	52,08±4,79
Гипертония	32,70±2,00*	27,14±7,97*	25,90±2,03*	43,81±7,63

Примечание: БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Малые амебоциты и гранулярные клетки показывали аналогичные реакции на изменения осмолярности инкубационного раствора.

У круглых клеток, инкубированных в гипотонической среде, объем уменьшался, а в гипертонической достоверных изменений объема клеток не происходило.

Объем больших амебоцитов *S. ravergeri*, инкубированных в условиях сниженной осмолярности, возрастал по сравнению с объемами клеток, инкубированных в условиях изотонии. При повышении осмолярности с клетками не происходило достоверных изменений.

Малые амебоциты в гипотоническом растворе показывали достоверное возрастание клеточного объема, а в гиперосмотических условиях – уменьшение.

Гранулярные клетки отвечали увеличением объема клеток (табл. 17) на инкубацию в гипоосмотическом растворе, а на инкубацию в условиях повышенной осмолярности достоверных изменений не показывали.

Таблица 17

Динамика объема гемоцитов *S. ravergeri*, инкубированных в средах с различной осмолярностью,  $\mu\text{m}^3$

Среда/тип клеток	БА	МА	ГК	КК
Гипотония	36,38±4,27*	46,65±2,75*	27,91±4,60*	12,94±0,63
Изотония	23,12±1,22	15,64±1,88	3,58±0,61	13,15±1,24
Гипертония	22,06±1,29	8,65±0,70*	5,43±1,02	7,43±1,14*

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Круглые клетки, наоборот, показывали уменьшение объема клеток в гиперосмотических условиях, а на инкубацию в гипотонических условиях достоверных реакций не было зафиксировано.

Объем больших амебоцитов *V. viviparus* достоверно уменьшается при инкубации клеток в гиперосмотической среде (табл. 18). Аналогичная реакция показана для малых амебоцитов, гранулярных клеток и круглых клеток. При инкубации в гипоосмотическом растворе достоверных изменений объемов клеток показано не было.

Динамика объема гемоцитов *V. viviparus*, инкубированных в средах с различной осмотичностью,  $\mu\text{m}^3$

Среда/тип клеток	БА	МА	ГК	КК
Гипотония	21,69±1,39	13,42±2,84	6,03±0,77	14,42±1,07
Изотония	21,80±2,78	13,32±1,89	4,56±1,00	16,77±1,03
Гипертония	15,34±1,40*	7,63±0,60*	8,54±0,66*	35,36±2,36*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Большие амебоциты и гранулярные клетки *A. fulica* при понижении осмолярности среды не показывают достоверных изменений объема (табл. 19). При инкубации в гипертоническом растворе объем клеток увеличивается.

Динамика объема гемоцитов *A. fulica*, инкубированных в средах с различной осмотичностью,  $\mu\text{m}^3$

Среда/тип клеток	БА	МА	ГК	КК
Гипотония	14,43±3,03	10,70±0,40*	5,71±3,13	17,27±1,67*
Изотония	16,36±1,10	5,86±1,70	2,13±0,76	11,65±1,39
Гипертония	21,81±1,21*	18,94±0,59*	7,14±2,07*	21,48±3,56*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Малые амебоциты и круглые клетки отвечают увеличением объема как на повышение, так и на снижение осмолярности инкубационного раствора.

При повышении осмотического давления объем больших амебоцитов *P. corneus* не изменяется. При инкубации в гипоосмотическом растворе объем клеток достоверно уменьшается (табл. 20).

Малые амебоциты, гранулярные клетки и круглые клетки достоверных реакций на изменение осмолярности инкубационного раствора не показывали.

Объем больших амебоцитов *L. stagnalis* достоверно увеличивается при инкубации клеток в гипотонической среде (табл. 21). При повышении осмолярности достоверных изменений с клетками не происходит.

Динамика объема гемоцитов *P. corneus*, инкубированных в средах с различной осмотичностью,  $\mu\text{m}^3$

Среда/тип клеток	БА	МА	ГК	КК
Гипотония	10,24±1,02	5,29±1,27	5,17±1,11	12,98±1,63
Изотония	9,11±0,78	5,14±1,80	3,15±1,56	14,67±1,98
Гипертония	5,77±1,20*	5,42±0,38	2,87±0,45	11,25±0,56

Примечание: БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Малые амебоциты не проявляют достоверных реакций на снижение осмолярности раствора, а при инкубации в гиперосмотическом растворе их объем уменьшается.

Круглые клетки отвечают уменьшением объема на повышение осмолярности инкубационного раствора.

Динамика объема гемоцитов *L. stagnalis*, инкубированных в средах с различной осмотичностью,  $\mu\text{m}^3$

Среда/тип клеток	БА	МА	КК
Гипотония	42,67±2,43*	13,67±2,56	24,03±4,57
Изотония	18,31±3,47	16,01±2,74	17,46±2,60
Гипертония	15,62±0,65	10,57±1,44*	8,55±0,70*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Гемоциты всех трех типов, представленных в гемолимфе *A. australis*, показывают единообразие реакций (изменения объема клеток) в ответ на изменения осмолярности инкубационного раствора: при инкубации в гипотонии клетки не проявляют достоверных изменений объема, а в условиях гипертонии объем клеток уменьшается (табл. 22).

В результате проведенного исследования были получены данные об абсолютном мембранном резерве и доле используемого мембранного резерва гемоцитов отдельных представителей типа Mollusca.

Таблица 22

Динамика объема гемоцитов *A. australis*, инкубированных в средах с различной осмотичностью,  $\mu\text{m}^3$

Среда/тип клеток	БА	МА	КК
Гипотония	29,68±1,42	45,29±2,37	29,36±1,72
Изотония	31,81±1,66	40,65±2,54	28,19±2,74
Гипертония	21,65±1,83*	27,68±1,43*	19,53±1,08*

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Малые амебоциты и гранулярные клетки моллюска *H. pomatia* при помещении в гипотоническую среду задействуют мембранный резерв (табл. 23).

Большие амебоциты и круглые клетки в эксперименте мембранный резерв не использовали, не увеличивая поверхность при помещении в гипотоническую среду.

Таблица 23

Показатели мембранного резерва гемоцитов *H. pomatia*

Типы клеток	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, $\mu\text{m}^3$
БА	0	0
МА	22	38,49±1,35
ГК	15	14,96±3,01
КК	0	0

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки.

Все типы гемоцитов моллюска *S. ravergeri* (табл. 24) в ходе эксперимента задействовали мембранный резерв в различной степени.

Наибольшим мембранным резервом в относительном выражении обладают малые амебоциты и гранулярные клетки. Большие амебоциты увеличивали свою поверхность несколько слабее, круглые клетки – всего на 10% от площади клеток, инкубированных в изотонии.



Показатели мембранного резерва гемоцитов *S. ravergeri*

Типы клеток	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, $\mu\text{m}^3$
БА	40	38,35±1,64
МА	50	35,80±1,13
ГК	49	17,93±2,87
КК	10	6,57±1,68

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки.

У моллюска *V. viviparus* максимальным значением мембранного резерва обладают гранулярные клетки (табл. 25).

Показатели мембранного резерва гемоцитов *V. viviparus*

Типы клеток	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, $\mu\text{m}^3$
БА	16	20,60±2,11
МА	0	0
ГК	19	8,79±1,56
КК	0	0

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки.

Несколько слабее на инкубацию в гипотоническом растворе реагировали большие амебоциты. Малые амебоциты и круглые клетки мембранный резерв в ходе эксперимента не задействовали.

У моллюска *A. fulica* было выявлено следующее: наибольшей интенсивностью использования относительного мембранного резерва обладают гранулярные клетки и малые амебоциты (табл. 26).

Показатели мембранного резерва гемоцитов *A. fulica*

Типы клеток	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, $\mu\text{m}^3$
БА	15	12,97±3,52
МА	28	14,65±1,27
ГК	29	9,08±1,31
КК	-	-

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки.

Значение интенсивности использования относительного мембранного резерва у больших амебоцитов – всего 15% от показателей клеток, инкубированных в изотонической среде. Круглые клетки в эксперименте мембранный резерв не задействовали.

Все изученные типы гемоцитов *P. corneus* в эксперименте задействовали мембранный резерв (табл. 27).

Таблица 27

Показатели мембранного резерва гемоцитов *P. corneus*

Типы клеток	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, $\mu\text{m}^3$
БА	12	8,05±1,78
МА	5	1,53±0,47
ГК	19	4,01±1,68
КК	7	3,55±1,13

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки.

Максимальным значением использованного мембранного резерва обладают гранулярные клетки, минимальным – малые амебоциты.

У моллюска *L. stagnalis* малые амебоциты не демонстрировали осморегуляторных реакций при инкубации в гипотонической среде (табл. 28).

Таблица 28

Показатели мембранного резерва гемоцитов *L. stagnalis*

Типы клеток	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, $\mu\text{m}^3$
БА	35	35,13±4,82
МА	0	0
КК	36	29,27±3,54

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; КК – Круглые Клетки.

Большие амебоциты и круглые клетки в эксперименте задействуют мембранный резерв в значениях, составляющих около 40 % от показателей клеток, инкубированных в изотоническом растворе.

Все типы гемоцитов *A. australis* осуществляют осморегуляторные реакции путем использования мембранного резерва. Наибольшая интенсивность использования относительного мембранного резерва выявлена у

малых амебоцитов. Большие амебоциты и круглые клетки задействуют мембранный резерв в меньшей степени (табл. 29).

Таблица 29

Показатели мембранного резерва гемоцитов *A. australis*

Типы клеток	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, $\mu\text{m}^3$
БА	8	5,93±2,52
МА	17	12,51±4,83
КК	9	5,04±1,96

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; КК – Круглые Клетки.

#### 3.1.4.4. Влияние осмотической нагрузки на упругость и адгезионные свойства плазмалеммы гемоцитов представителей класса *Gastropoda*

Применение методов атомно-силовой микроскопии позволило оценить изменение упругостных показателей мембраны и адгезию гемоцитов *H. pomatia* к нанозонду под воздействием растворов различной концентрации.

При инкубации в гипоосмотической среде площадь больших амебоцитов *H. pomatia* уменьшается (табл. 30), упругость мембран повышается. Показатель адгезии мембран к нанозонду остается неизменным по сравнению с нативными клетками. В условиях повышенного осмотического давления площадь клеток уменьшается, показатели упругости и адгезии мембран не изменяются.

В условиях гипотонии площадь малых амебоцитов увеличивается, показатели адгезии и упругости мембран остаются неизменными по сравнению с клетками, инкубированными в изотонической среде. В гипертоническом растворе площадь клеток уменьшается.

При инкубации клеток в растворе со сниженной осмолярностью площадь гранулярных клеток увеличивается, адгезивность мембран клеток возрастает. В гиперосмотической среде площадь клеток уменьшается, упругость клеток возрастает. Адгезивность мембран по сравнению с мембранами нативных клеток не претерпевает изменений.

Параметры гемоцитов *N. rotatia*, полученные с применением СЗМ после инкубации в средах с различным осмотическим давлением

Тип клеток	Площадь клеток, $\mu\text{m}^2$	Адгезия мембран гемоцитов к нанозонду, nN	Модуль упругости мембран гемоцитов, kPa
гипотония			
БА	144,89±9,23*	6,42±1,99	39,03±4,01*
МА	187,03±10,47*	12,58±3,43	27,01±3,61
ГК	122,19±0,95*	5,68±1,01*	24,43±2,70
КК	137,96±1,06*	4,70±5,16*	33,34±2,54
изотония			
БА	209,57±2,53	7,33±1,72	22,93±3,45
МА	146,54±6,35	13,53±3,90	23,64±4,06
ГК	104,23±3,66	9,49±1,32	23,59±2,04
КК	164,90±5,86	10,95±1,42	25,21±4,77
гипертония			
БА	141,49±6,01*	7,12±1,99	31,16±4,00
МА	90,22±6,77*	16,69±3,86	29,83±2,79
ГК	76,31±0,63*	8,51±2,68	33,33±3,65*
КК	72,89±12,80*	7,90±2,81	28,77±5,15

Примечание: БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Площадь круглых клеток и показатель адгезии мембран к нанозонду при инкубации в гипоосмотическом растворе уменьшается. В условиях гипертонии площадь клеток уменьшается, остальные показатели остаются неизменными.

При понижении осмотического давления площадь больших амебоцитов *S. ravergeri* увеличивается, показатели упругости и адгезии мембран к нанозонду не претерпевают достоверных изменений по сравнению с показателями клеток, инкубированных в изотонической среде (табл. 31). При инкубации в гипертоническом растворе изученные параметры клеток не изменяются.

При изменении осмотичности среды (как при понижении, так и при повышении) площадь малых амебоцитов увеличивается; при снижении осмотичности этот эффект более выражен. Показатели упругости и адгезии мембран к нанозонду не изменяются.

Параметры гемоцитов *S. ravergeri*, полученные с применением СЗМ после инкубации в средах с различным осмотическим давлением

Тип клеток	Площадь клеток, $\mu\text{m}^2$	Адгезия мембран гемоцитов к нанозонду, nN	Модуль упругости мембран гемоцитов, kPa
гипотония			
БА	82,53±0,84*	10,12±5,73	28,24±5,71
МА	61,11±5,17*	10,14±2,84	29,38±4,84
ГК	40,13±2,53*	9,31±2,97	28,83±4,48*
КК	33,01±3,58	11,90±2,57	29,71±2,28
изотония			
БА	49,18±1,20	11,21±2,98	24,48±2,61
МА	30,31±0,59	13,78±0,82	23,77±3,34
ГК	20,20±0,11	12,39±1,41	19,44±2,62
КК	29,44±1,80	13,68±1,09	26,52±3,24
гипертония			
БА	52,27±2,05	14,39±1,41	24,37±2,67
МА	35,22±0,92*	10,16±1,97	22,09±2,88
ГК	21,38±1,15	11,63±2,38	23,09±2,95
КК	45,76±1,25*	14,85±1,55	21,12±2,68

Примечание: БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

В гипоосмотической среде площадь гранулярных клеток увеличивается, упругость плазмалеммы возрастает. При повышении концентрации солей в инкубационном растворе с клетками не происходит достоверных изменений изученных в ходе данного эксперимента параметров.

При понижении осмотического давления параметры площади, упругости и адгезии мембран круглых клеток к нанозонду не изменяются. В условиях гипертонии возрастает площадь клеток.

При инкубации в гипотоническом растворе увеличивается площадь клеточной поверхности больших амебоцитов *V. viviparus* (табл. 32). Показатели упругости и адгезии мембран к нанозонду остаются неизменными по сравнению с нативными клетками. В условиях повышенной осмолярности площадь клеточной поверхности уменьшается.

Параметры гемоцитов *V. viviparus*, полученные с применением СЗМ после инкубации в средах с различным осмотическим давлением

Тип клеток/ показатели	Площадь клеток, $\mu\text{m}^2$	Адгезия мембран гемоцитов к нанозонду, nN	Модуль упругости мембран гемоцитов, kPa
гипотония			
БА	135,14 $\pm$ 4,74*	8,11 $\pm$ 1,67	30,07 $\pm$ 3,47
МА	65,02 $\pm$ 4,04	8,30 $\pm$ 2,63	33,69 $\pm$ 4,17
ГК	41,34 $\pm$ 5,11	8,43 $\pm$ 1,91	37,94 $\pm$ 2,64
КК	72,68 $\pm$ 6,64*	13,20 $\pm$ 2,48	34,67 $\pm$ 3,11
изотония			
БА	114,14 $\pm$ 1,28	9,46 $\pm$ 1,87	30,06 $\pm$ 3,13
МА	69,46 $\pm$ 3,87	9,79 $\pm$ 2,72	28,55 $\pm$ 3,10
ГК	33,55 $\pm$ 2,17	10,12 $\pm$ 2,75	30,86 $\pm$ 2,76
КК	87,99 $\pm$ 2,88	9,95 $\pm$ 2,92	35,46 $\pm$ 4,77
гипертония			
БА	97,47 $\pm$ 1,19*	12,95 $\pm$ 1,03	24,45 $\pm$ 2,38
МА	33,31 $\pm$ 1,36*	8,79 $\pm$ 2,39	33,66 $\pm$ 2,30
ГК	19,74 $\pm$ 1,02*	11,65 $\pm$ 2,37	31,23 $\pm$ 3,48
КК	56,92 $\pm$ 1,41*	16,23 $\pm$ 3,60*	34,85 $\pm$ 3,88

Примечание: БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

В гипоосмотической среде с площадью малых амебоцитов не происходит достоверных изменений. В условиях гипертонии площадь клеточной поверхности малых амебоцитов уменьшается.

При снижении концентрации солей в инкубационном растворе с гранулярными клетками не происходит достоверных изменений. В гиперосмотической среде уменьшается площадь клеток.

В условиях пониженного осмотического давления площадь круглых клеток уменьшается, показатели упругости и адгезии клеточных мембран к нанозонду не претерпевают изменений. В гипертонической среде площадь поверхности клеток уменьшается, уровень мембранной адгезии растет.

В условиях гипотонии площадь клеточной поверхности больших амебоцитов *A. fulica* достоверно увеличивается (табл. 33). Показатели упругости и адгезии плазмалеммы к нанозонду не изменяются относительно данных, полученных на клетках, инкубированных в изотонической среде. При

повышении осмолярности параметры площади, упругости и адгезивности клеточной мембраны не претерпевают изменений.

Таблица 33

Параметры гемоцитов *A. fulica*, полученные с применением СЗМ после инкубации в средах с различным осмотическим давлением

Тип клеток/ показатели	Площадь клеток, $\mu\text{m}^2$	Адгезия мембран гемоцитов к нанозонду, nN	Модуль упругости мембран гемоцитов, kPa
гипотония			
БА	80,75±0,79*	13,36±2,55	26,28±4,80
МА	60,29±0,73*	12,64±3,69	23,61±3,90
ГК	30,48±4,60*	14,59±4,07	23,24±3,12
КК	47,19±2,25	10,11±3,02	22,05±5,32
изотония			
БА	68,58±3,86	13,47±1,25	28,58±3,18
МА	43,64±3,93	13,41±1,97	24,90±3,70
ГК	21,60±2,32	11,72±2,67	24,77±2,84
КК	49,00±5,73	9,04±1,09	21,31±4,10
гипертония			
БА	62,79±3,06	12,14±2,90	32,63±4,77
МА	56,35±2,02*	12,45±1,56	34,42±4,22*
ГК	31,05±2,71*	11,05±2,11	34,80±3,53*
КК	32,53±0,07*	11,14±1,86	31,79±3,06*

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

При понижении осмолярности инкубационного раствора малых амебоцитов увеличивается. При инкубации в гипертонической среде поверхности клеток увеличивается, упругость плазмалеммы возрастает.

В гипоосмотической среде изменяется только параметр площади клеточной поверхности гранулярных клеток, в сторону возрастания. При повышении осмолярности среды площадь клеток увеличивается, упругость клеточной мембраны повышается.

В условиях гипотонии с круглыми клетками не происходит достоверных изменений. При повышении осмотического давления среды площадь клеток уменьшается, упругость мембран возрастает.

При снижении осмолярности раствора площадь больших амебоцитов *P. corneus* увеличивается (табл. 34). Параметры упругости и адгезии плазмалеммы к нанозонду не изменяются по сравнению с данными, полученными на

нативных клетках. При инкубации в гиперосмотическом растворе с клетками не происходит достоверных изменений.

Таблица 34

Параметры гемоцитов *P. corneus*, полученные с применением СЗМ после инкубации в средах с различным осмотическим давлением

Тип клеток/ показатели	Площадь клеток, $\mu\text{m}^2$	Адгезия мембран гемоцитов к нанозонду, nN	Модуль упругости мембран гемоцитов, кПа
гипотония			
БА	64,15±1,29*	11,64±1,62	21,07±1,58
МА	40,28±2,15	8,34±1,09	20,15±1,10
ГК	15,55±1,31	7,32±2,03	19,57±2,84*
КК	47,54±1,05	14,54±1,27	30,29±1,11*
изотония			
БА	56,65±2,71	10,54±1,32	22,83±0,97
МА	42,11±1,37	7,29±1,58	21,04±2,86
ГК	12,51±1,09	8,02±1,11	25,17±1,32
КК	44,09±2,44	12,84±1,52	26,82±1,07
гипертония			
БА	51,14±2,31	11,69±1,85	24,81±0,71
МА	34,96±0,69*	8,58±1,38	25,34±0,36*
ГК	16,59±0,46*	8,14±0,99	27,23±0,96
КК	43,94±2,22	10,56±1,82	25,07±0,87

Примечание: БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

В условиях гипотонии малые амебоциты не претерпевают достоверных изменений. При инкубации в гипертоническом растворе площадь поверхности клеток уменьшается, упругость мембраны возрастает.

В гипоосмотическом растворе возрастает упругость клеточной мембраны гранулярных клеток. Площадь и показатель адгезии не претерпевают изменений. В условиях гипертонии увеличивается площадь клеток, а показатели упругости и адгезии мембран к нанозонду не изменяются.

При понижении концентрации солей в инкубационном растворе площадь круглых клеток не изменяется, но возрастает упругость мембраны. В условиях повышенного осмотического давления с клетками не происходит достоверных изменений.

При инкубации в гипотоническом растворе с клеточной мембраной больших амебоцитов *L. stagnalis* не происходит достоверных изменений (табл.



35). В гиперосмотических условиях площадь поверхности клеток увеличивается, параметры адгезии и упругости остаются неизменными по сравнению со значениями, полученными в ходе исследования нативных клеток.

Таблица 35

Параметры гемоцитов *L. stagnalis*, полученные с применением СЗМ после инкубации в средах с различным осмотическим давлением

Тип клеток/ показатели	Площадь клеток, $\mu\text{m}^2$	Адгезия мембран гемоцитов к нанозонду, nN	Модуль упругости мембран гемоцитов, kPa
гипотония			
БА	106,71±3,67*	8,38±1,38	18,92±0,60*
МА	45,39±4,19	11,88±2,86	22,83±3,24*
КК	87,29±10,31*	10,24±2,07*	25,95±4,42
изотония			
БА	69,58±3,34	8,82±2,42	30,90±1,36
МА	51,70±8,02	8,85±1,79	34,52±3,55
КК	56,02±1,10	5,83±1,11	29,28±1,45
гипертония			
БА	56,138±2,19*	8,07±2,60	29,99±1,18
МА	32,44±1,20*	7,31±2,06	28,31±1,55*
КК	47,47±0,84*	8,03±3,99	22,88±2,08

Примечание: БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

В условиях гипотонической среды упругость клеточной мембраны малых амебоцитов уменьшается. При повышении осмолярности среды уменьшается площадь клеточной поверхности и снижается упругость плазмалеммы.

При понижении осмотического давления площадь круглых клеток возрастает, также повышается адгезивность мембран. В условиях гипертонии несколько уменьшается площадь поверхности клеток.

В гипоосмотическом растворе увеличивается площадь клеточной поверхности больших амебоцитов *A. australis*, снижается ее упругость (табл. 36). Адгезия остается на уровне нативной клетки. В гипертонической среде площадь клетки уменьшается, упругость плазмалеммы снижается.

Параметры гемоцитов *A. australis*, полученные с применением СЗМ после инкубации в средах с различным осмотическим давлением

Тип клеток	Площадь клеток, $\mu\text{m}^2$	Адгезия мембран гемоцитов к нанозонду, nN	Модуль упругости мембран гемоцитов, kPa
гипотония			
БА	70,28±1,27*	16,52±0,28	41,25±4,31*
МА	62,68±1,53*	13,28±1,84	51,19±1,28*
КК	50,65±1,68*	12,80±2,52	42,18±2,31
изотония			
БА	64,25±1,28	15,92±0,32	50,82±0,63
МА	52,11±2,67	14,49±0,38	67,48±0,58
КК	45,81±1,05	15,69±0,66	39,90±0,81
гипертония			
БА	55,18±1,27*	11,63±2,86	39,56±1,56*
МА	47,32±1,09	10,68±1,37*	45,64±1,85*
КК	44,97±2,28	16,54±1,91	31,68±2,89*

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

При инкубации в гипоосмотическом растворе площадь поверхности малых амебоцитов увеличивается, упругость мембраны понижается. Показатель адгезии достоверных изменений не претерпевает. В гипертонической среде снижаются показатели упругости и адгезии мембран к нанозонду, площадь клеток не изменяется.

В условиях гипотонической среды увеличивается площадь поверхности круглых клеток. При повышении осмолярности раствора значения показателей площади и адгезии мембран к нанозонду не претерпевают достоверных изменений, упругость мембран понижается.

## 3.2. Оценка клеточных реакций, возникающих в результате действия осмотической нагрузки на гемоциты представителей класса *Bivalvia*

### 3.2.1. Типология клеточного состава гемолимфы представителей класса *Bivalvia*

Анализ клеточного состава гемолимфы *A. sygnea* позволил разделить форменные элементы на 4 типа.

Большие амебоциты (рис. 69) – аморфные клетки, с многочисленными псевдоподиями по периферии, среди которых преобладают разнообразные лобоподии, иногда встречаются и длинные филоподии. Клетки способны к закреплению на субстрате и амебоидному передвижению. В цитоплазме отчетливо выделяются крупные вакуоли и множество гранул. Ядро близкой к овальной формы, расположено периферически.

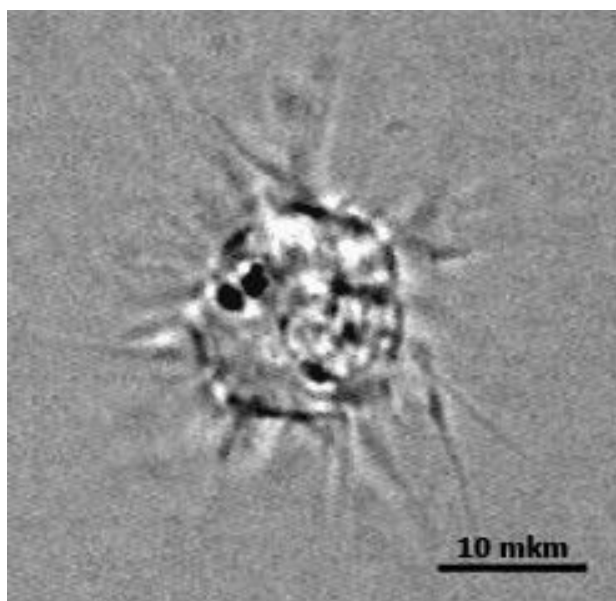


Рис. 69. Большой амебоцит *A. sygnea*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×

Малые амебоциты (рис. 70) – это меняющие форму клетки, с множеством мелких псевдоподий на периферии. Способны к активному передвижению даже после закрепления, однако чаще в гемолимфе встречаются в виде агрегатов из нескольких клеток. В цитоплазме содержатся мелкие вакуоли и гранулы. Ядро небольшое, округлое, располагается ближе к периферии.

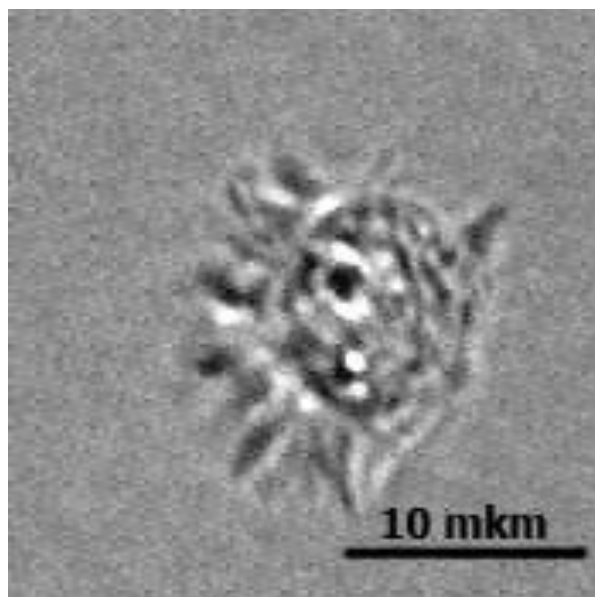


Рис. 70. Малый амeboцит *A. cugnea*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E , увеличение 60×

Гранулярные клетки (рис. 71) характеризуются нестабильной формой, способны к адгезии к субстрату, образованию лобоподий и амeboидному передвижению после закрепления на поверхности. Распластываясь, образуют характерную для всех ГК форму с каемкой прозрачной цитоплазмы, окружающей часть, содержащую ядро и многочисленные гранулы. Ядро мелкое, округлое, располагается ближе к периферии.

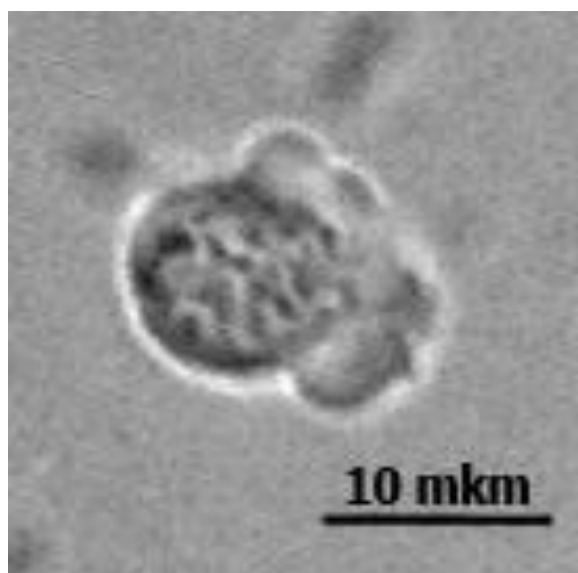


Рис. 71 – Гранулярная клетка *A. cugnea*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-e , увеличение 60×

Круглые клетки (рис. 72) отличаются стабильной формой, не способны к активному передвижению и образованию псевдоподий, свободно парят в толще

жидкости. Ядро небольшое, округлое, располагается центрально. В цитоплазме находятся разнородные гранулы и мелкие вакуоли.



Рис. 72. Круглая клетка *A. cygnea*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E , увеличение 60×

Анализ клеточного состава гемолимфы *D. polymorpha* позволил разделить форменные элементы на 4 типа.

Большие амебоциты (рис. 73) – это аморфные клетки, образующие псевдоподии, среди которых преобладают лобоподии, способны к активному амебоидному передвижению и закреплению на субстрате. В цитоплазме содержатся крупные вакуоли и мелкие гранулы. Ядро близкое к овальной формы, располагается периферически.

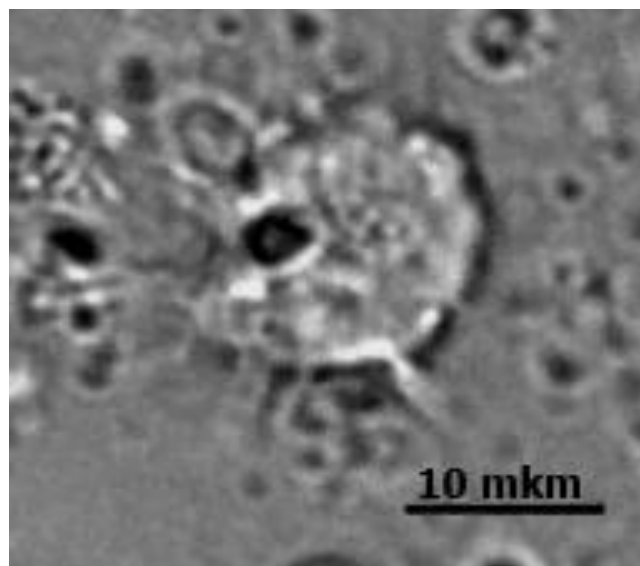


Рис. 73. Большой амебоцит *D. polymorpha*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E , увеличение 60×

Малые амебоциты (рис. 74) – округлые клетки, однако имеющие склонность к изменению формы, с разнородными псевдоподиями, способные к закреплению на стекле и ограниченному передвижению по нему. Чаще всего встречаются в виде агрегатов, что связано с их функциями. Ядро округлое, занимает центральное положение. В цитоплазме содержатся относительно крупные вакуоли и мелкие гранулы. При инкубации в гипотонической среде клетки увеличиваются в размерах и прекращают закрепление на субстрате.

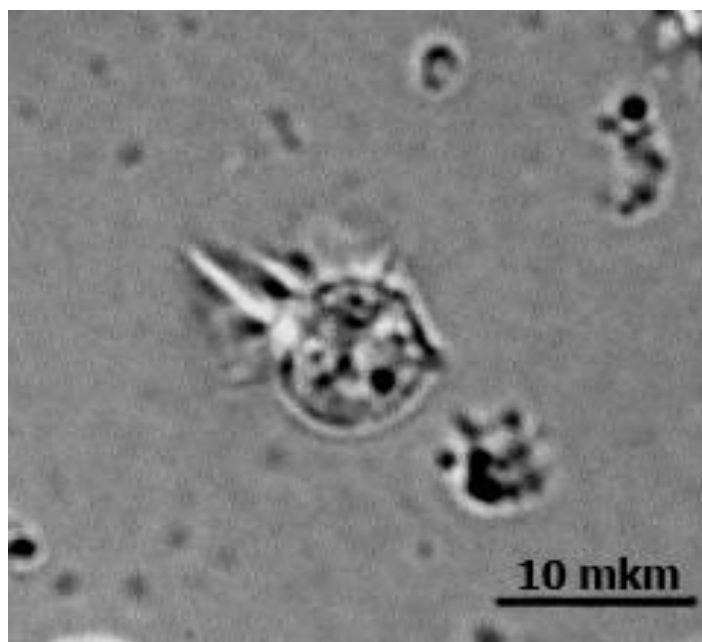


Рис. 74. Малый амебоцит *D. polymorpha*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E , увеличение 60×

Гранулярные клетки (рис. 75) часто имеют неправильную форму, с широкими лобоподиями и длинными тонкими филоподиями. Способны к активному передвижению и закреплению на субстрате. В цитоплазме содержится большое число мелких гранул. Ядро округлое, мелкое, занимает положение, близкое к центральному.

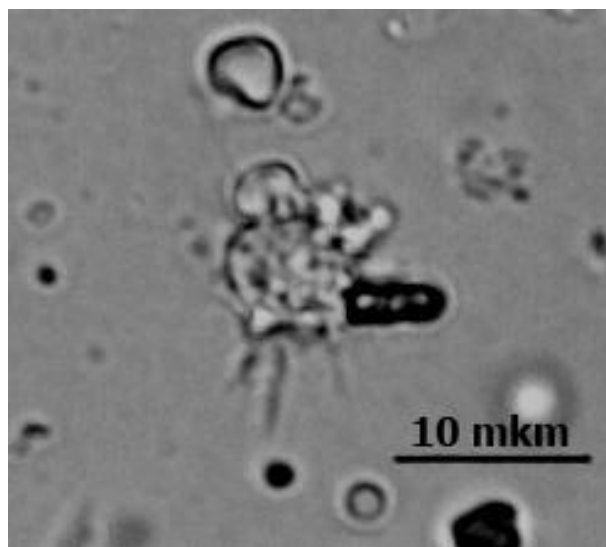


Рис. 75. Гранулярная клетка *D. polymorpha*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-e , увеличение 60×

Круглые клетки (рис. 76) имеют постоянную форму, неспособны к образованию псевдоподий и закреплению, а также активному передвижению по субстрату. В цитоплазме содержится большое количество гранул и единичные мелкие вакуоли. Ядро округлое, мелкое, располагается центрально.



Рис. 76. Круглая клетка *D. polymorpha*. Изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-e , увеличение 60×

### 3.2.2. Результаты исследования способности гемоцитов к фагоцитозу

В результате исследования были получены данные о фагоцитарной активности гемоцитов изученных представителей класса Bivalvia. Поскольку малые амебоциты являются инкапсуляторными клетками, а гранулярные и круглые клетки в процессе фагоцитоза не участвуют, расчет оценочных показателей был произведен на основе данных о фагоцитарной активности больших амебоцитов (табл. 37).

Таблица 37

Значения фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа БА характерные для исследованных представителей класса Bivalvia

Представитель	Фагоцитарный индекс	Фагоцитарное число
<i>A. cygnea</i>	0,33	2,58±0,97
<i>D. polymorpha</i>	0,48	1,76±0,72

Гемоциты *A. cygnea* в среднем захватывают большее число клеток, нежели гемоциты *D. polymorpha*, однако в фагоцитоз вступает несколько меньшее число амебоцитов. Несмотря на разницу в размерах клеток, в целом фагоцитоз проходит у обоих представителей примерно одинаково.

### 3.2.3. Результаты изучения митохондриальной активности гемоцитов в условиях осмотической нагрузки

Наибольшей потенциальной митохондриальной активностью у *A. cygnea* обладают большие амебоциты (табл. 38), малые амебоциты и гранулярные клетки обладают примерно равными показателями. Большие амебоциты и круглые клетки достоверно реагируют на изменения осмотичности среды причем круглые клетки увеличивают напряженность энергетических процессах при любом изменении, а большие амебоциты в гипоосмотической среде снижают значения энергетических показателей. Малые амебоциты показывают выраженную реакцию только при инкубации в гиперосмотическом растворе.



Таблица 38

Интенсивность флуоресценции гемоцитов *A. cygnea*, инкубированных в средах с различной осмолярностью, у.е.

Среда	БА	МА	ГК	КК
гипотония	297,6±16,42*	306,6±20,37	308,80±19,07	345,50±20,61*
изотония	417,30±22,45	315,80±33,70	312,3±17,91	276,80±19,08
гипертония	523,00±28,63*	410,70±25,87*	340,90±26,50	347,00±27,55*

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

В гемолимфе *D. polymorpha* наибольшей потенциальной митохондриальной активностью обладают большие и малые амебоциты (табл. 39), причем их показатели практически одинаковы. Большие амебоциты, гранулярные и круглые клетки реагируют на инкубацию в гиперосмотической среде ростом энергетических показателей.

Таблица 39

Интенсивность флуоресценции гемоцитов *D. polymorpha*, инкубированных в средах с различной осмолярностью, у.е.

Среда	БА	МА	ГК	КК
гипотония	196,50±11,79	174,00±17,50	192,40±11,36*	126.70±12.97
изотония	171,50±13,75	171,00±17,16	129,20±10,47	108.30±14.58
гипертония	205,20±16,93*	145,00±14,27	180,90±15,37*	159.90±19.05*

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Гранулярные клетки также реагируют и на снижение осмотичности среды, повышая напряженность энергетических процессов. Малые амебоциты на любое изменение концентрации солей в окружающем растворе очевидных реакций не проявляют.

### 3.2.4. Влияние осмотической нагрузки на морфофункциональные свойства гемоцитов представителей класса *Bivalvia*

#### 3.2.4.1. Динамика параметров гемоцитов в ответ на осмотическую нагрузку, регистрируемых методом световой микроскопии

В гипотоническом растворе БА *A. cygnea* не претерпевают достоверных изменений. В условиях гипертонии размер клеток уменьшается (табл. 40), среди псевдоподий начинают преобладать филоподии, через некоторое время клетки распластываются и теряют подвижность.

Таблица 40

Динамика линейных размеров гемоцитов *A. cygnea* при инкубации в средах с различной осмотичностью

Тип клеток	Линейные размеры клеток по длинной оси, $\mu\text{m}$	Линейные размеры клеток по короткой оси, $\mu\text{m}$
гипотония		
БА	15,93 $\pm$ 0,89	9,35 $\pm$ 0,92
МА	9,77 $\pm$ 1,00	7,45 $\pm$ 0,53
ГК	8,01 $\pm$ 0,50	6,35 $\pm$ 0,52
КК	5,85 $\pm$ 1,73	5,54 $\pm$ 1,47
изотония		
БА	16,68 $\pm$ 1,20	10,63 $\pm$ 1,63
МА	10,68 $\pm$ 1,00	8,66 $\pm$ 1,39
ГК	7,83 $\pm$ 0,45	6,49 $\pm$ 0,58
КК	5,74 $\pm$ 0,29	5,49 $\pm$ 0,21
гипертония		
БА	11,42 $\pm$ 1,40*	9,56 $\pm$ 0,67
МА	7,63 $\pm$ 0,48*	6,15 $\pm$ 0,82*
ГК	5,83 $\pm$ 0,26*	5,09 $\pm$ 0,32
КК	6,83 $\pm$ 0,22	6,70 $\pm$ 0,35*

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

При инкубации в гипоосмотической среде МА *A. cygnea* практически не закрепляются на субстрате. В условиях повышенной осмолярности гемоциты уменьшаются в размерах, распластываются по стеклу и сливаются с соседними клетками.

В условиях гипотонии ГК *A. cygnea* прекращают закрепляться на субстрате и двигаются с током жидкости. В гипертонической среде клетки

немного уменьшаются в размерах, затем распластываются на стекле и теряют подвижность.

В гипотонических условиях с круглыми клетками *A. cygnea* не происходит достоверных изменений. При инкубации в гипертоническом растворе клетки немного уменьшаются в размерах.

При понижении осмолярности раствора БА *D. polymorpha* увеличиваются в размерах (табл. 41), лобоподии становятся менее выраженными, подвижность клеток снижается. В условиях гипертонии клетки вытягиваются, закрепляются на субстрате и практически теряют подвижность.

Таблица 41

Динамика линейных размеров гемоцитов *D. polymorpha* при инкубации в средах с различной осмотичностью

Тип клеток	Линейные размеры клеток по длинной оси, $\mu\text{m}$	Линейные размеры клеток по короткой оси, $\mu\text{m}$
гипотония		
БА	18,77 $\pm$ 0,86*	14,66 $\pm$ 0,89*
МА	12,42 $\pm$ 0,31*	10,27 $\pm$ 0,97*
ГК	8,49 $\pm$ 0,50*	7,53 $\pm$ 0,41*
КК	10,82 $\pm$ 0,96*	10,43 $\pm$ 1,10*
изотония		
БА	14,19 $\pm$ 1,67	7,51 $\pm$ 0,69
МА	7,42 $\pm$ 0,10	5,83 $\pm$ 0,36
ГК	5,74 $\pm$ 0,12	4,56 $\pm$ 0,18
КК	8,41 $\pm$ 0,11	8,28 $\pm$ 0,15
гипертония		
БА	10,10 $\pm$ 0,37*	8,34 $\pm$ 0,78
МА	7,09 $\pm$ 0,21	6,24 $\pm$ 0,80
ГК	4,95 $\pm$ 0,21	4,16 $\pm$ 0,42
КК	6,78 $\pm$ 0,23*	6,52 $\pm$ 0,22*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

В условиях повышенного осмотического давления достоверных изменений размеров МА *D. polymorpha* не происходит, клетки распластываются по стеклу и часто изменяют свой вид.

В гипотонической среде ГК *D. polymorpha* оседают на субстрат и «расплываются» по нему. В условиях повышенной осмолярности достоверных изменений размеров клеток не происходит, гемоциты закрепляются на субстрате и теряют подвижность.

В гипотоническом растворе круглые клетки *D. polymorpha* увеличиваются в размерах, а в условиях гипертонии – уменьшаются.

### 3.2.4.2. Результаты исследования высоты и топографии поверхности клеток

В результате исследования были получены данные об изменении топографии гемоцитов *A. sугnea* в условиях осмотической нагрузки.

При сравнении изображений, полученных при сканировании больших амебоцитов, инкубированных в изотоническом растворе и клеток, инкубированных в гипотоническом растворе, можно заметить разность высот клеток (рис. 77-78). Кроме того, у клеток, инкубированных в гипоосмотической среде, несколько снижается складчатость мембраны.

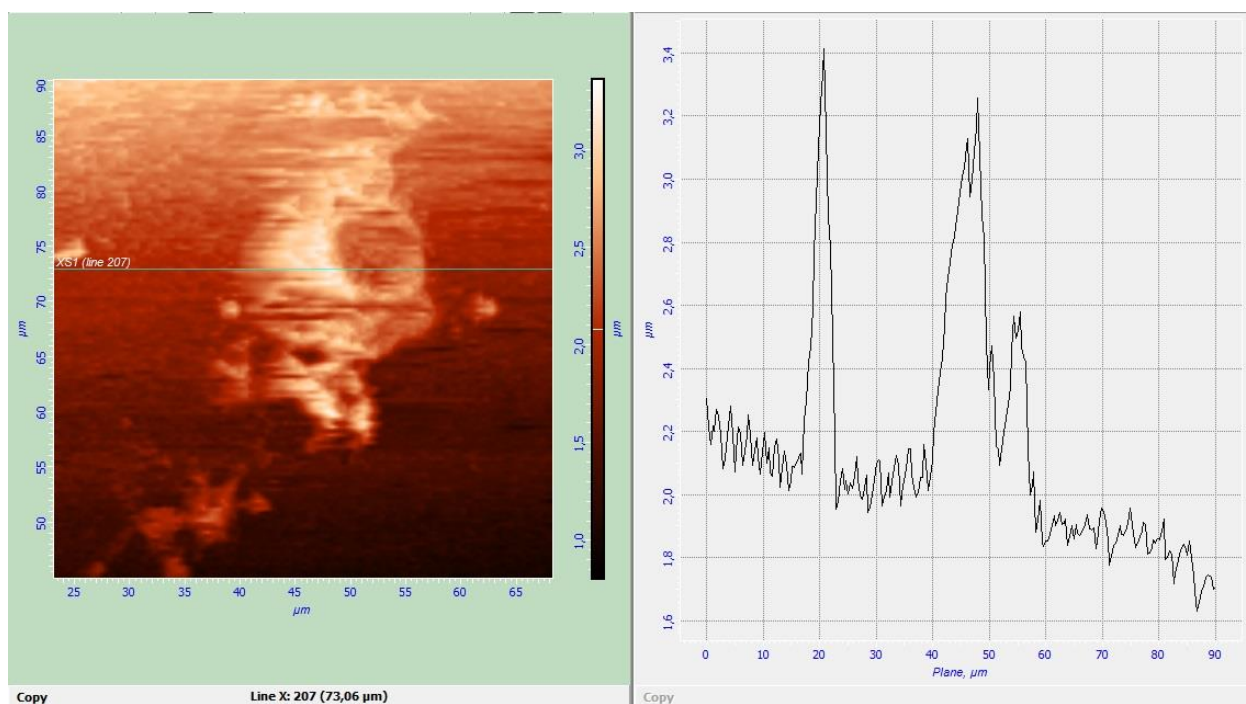


Рис. 77. Двухмерное изображение топографии поверхности БА *A. sугnea* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях гипотонии

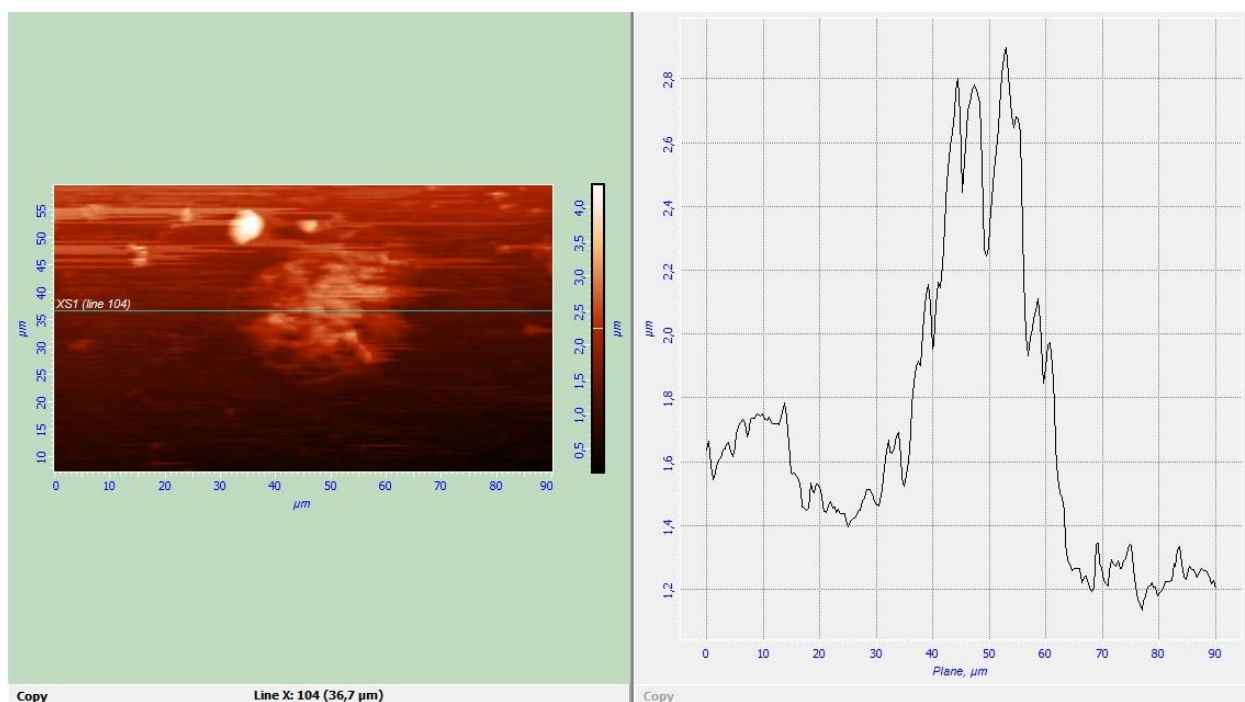


Рис. 78. Двухмерное изображение топографии поверхности БА *A. sугnea* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии

На сканограммах видно, что высота малых амебоцитов, инкубированных в гипотоническом растворе, превосходит высоту клеток, инкубированных в изотонической среде (рис. 79-80). Мембраны клеток становятся более сглаженными, исчезают небольшие складки ламеллоплазмы по краю клеток. В условиях гипертонии достоверных изменений высоты клеток не наблюдается.

Высота гранулоцитов, инкубированных в гипоосмотической среде, выше, чем клеток, инкубированных в условиях изотонии. При инкубации в гипертонической среде достоверных изменений высоты и складчатости мембран клеток не происходит.

При инкубации в средах с различной осмотичностью высота круглых клеток не изменялась. В условиях гипотонии мембрана гемоцитов несколько расправлялась, складки мембраны исчезали почти полностью.

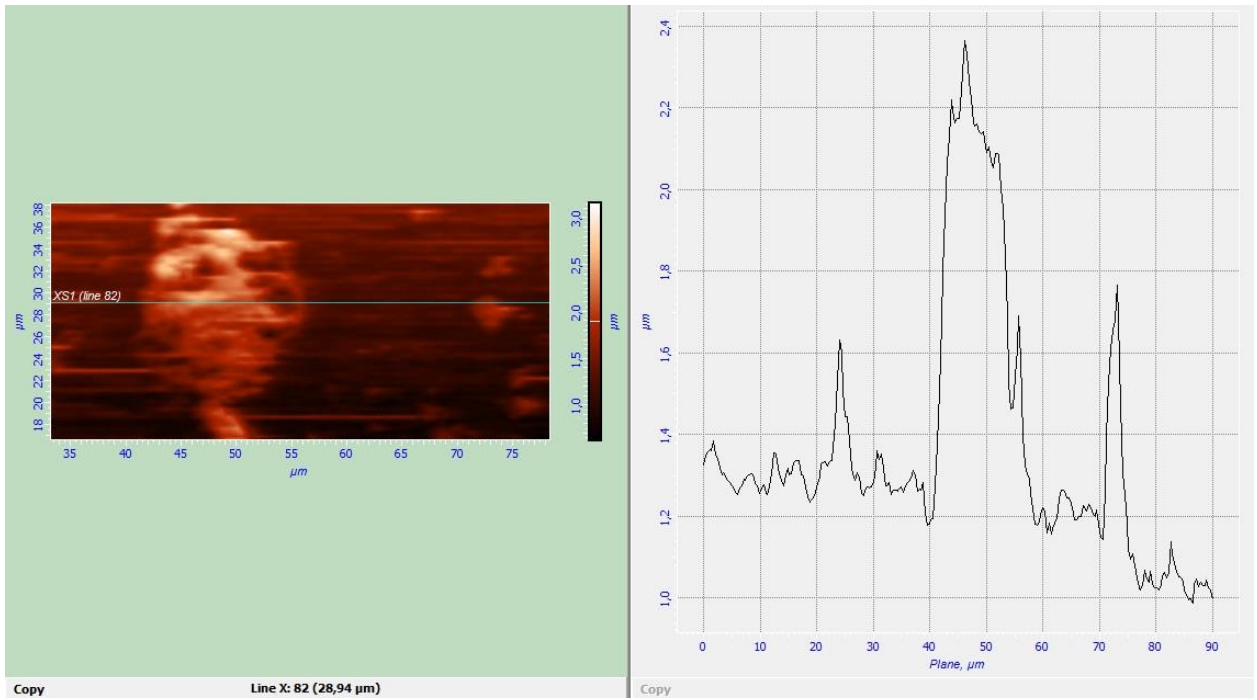


Рис. 79. Двухмерное изображение топографии поверхности МА *A. sугnea* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях гипотонии

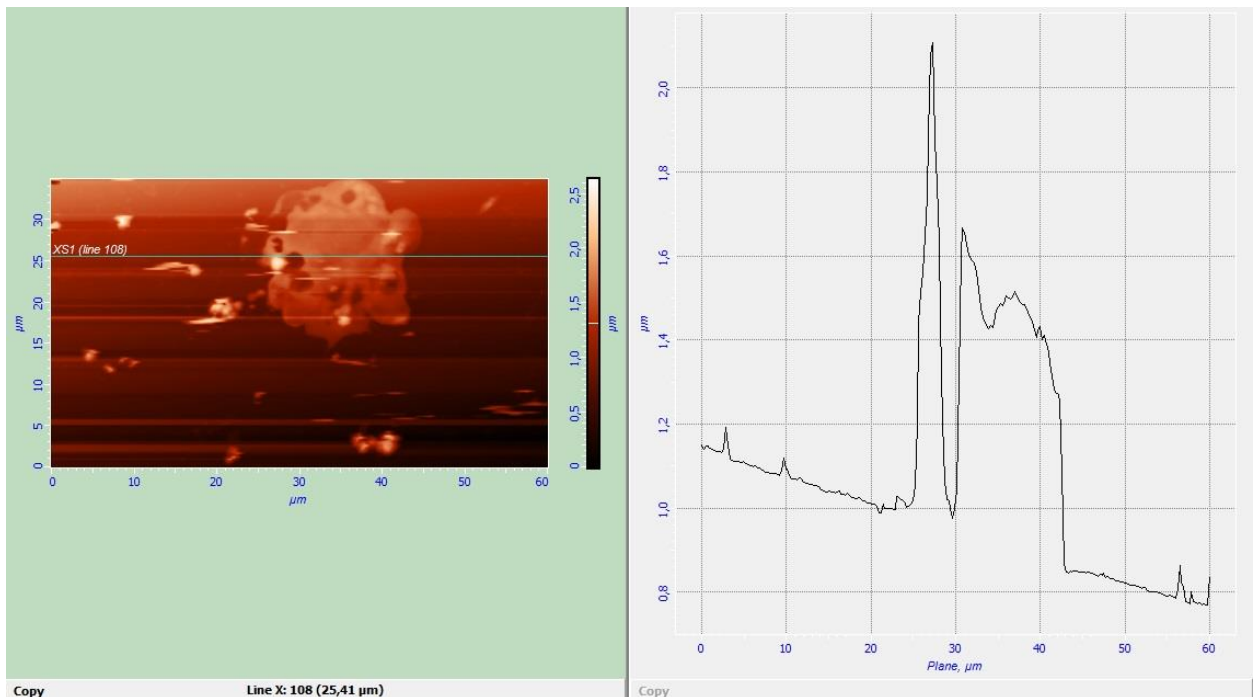


Рис. 80. Двухмерное изображение топографии поверхности МА *A. sугnea* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии

В результате исследования были получены данные об изменении топографии гемоцитов *D. polymorpha* в условиях осмотической нагрузки.

При инкубации в гипосмотическом растворе высота больших амебоцитов достоверно увеличивается (рис. 81-82). Складчатость мембраны не претерпевает достоверных изменений. В условиях повышенного осмотического давления клетки не проявляют достоверных реакций.

При понижении осмолярности раствора малые амебоциты увеличиваются в высоту (рис. 83-84), клетки окружены тяжами ламеллоплазмы. В условиях гипертонии с клетками не происходит достоверных изменений.

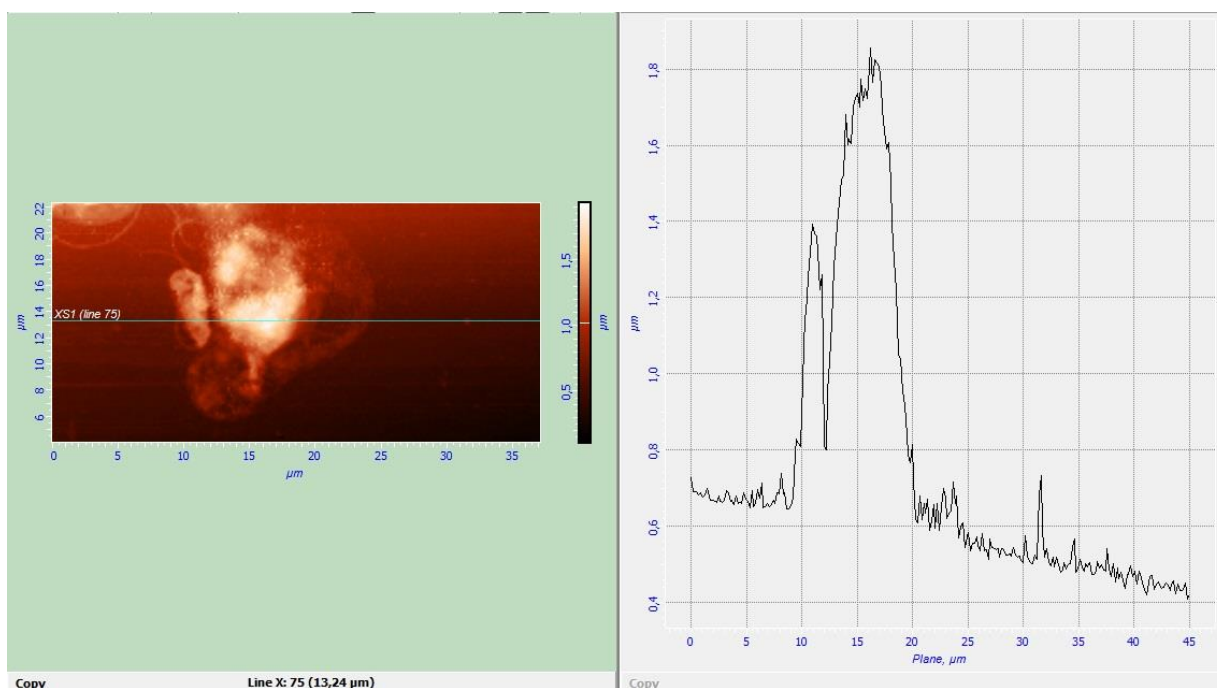


Рис. 81. Двухмерное изображение топографии поверхности БА *D. polymorpha* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях гипотонии

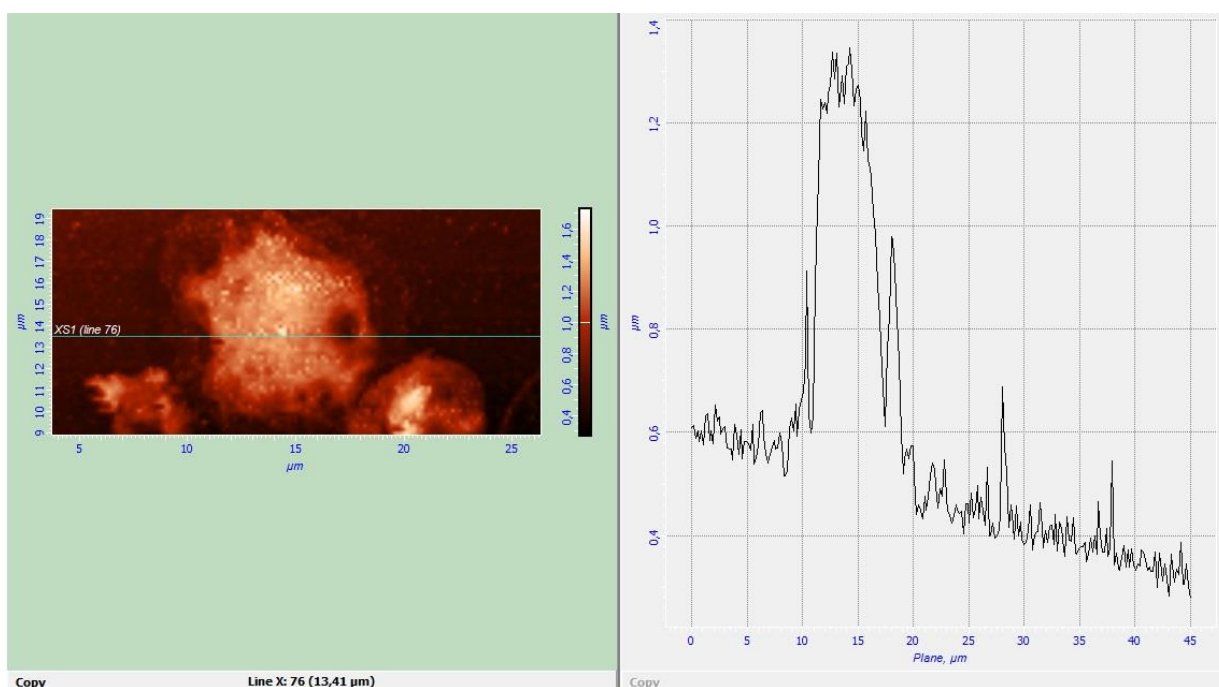


Рис. 82. Двухмерное изображение топографии поверхности БА *D. polymorpha* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемócита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии

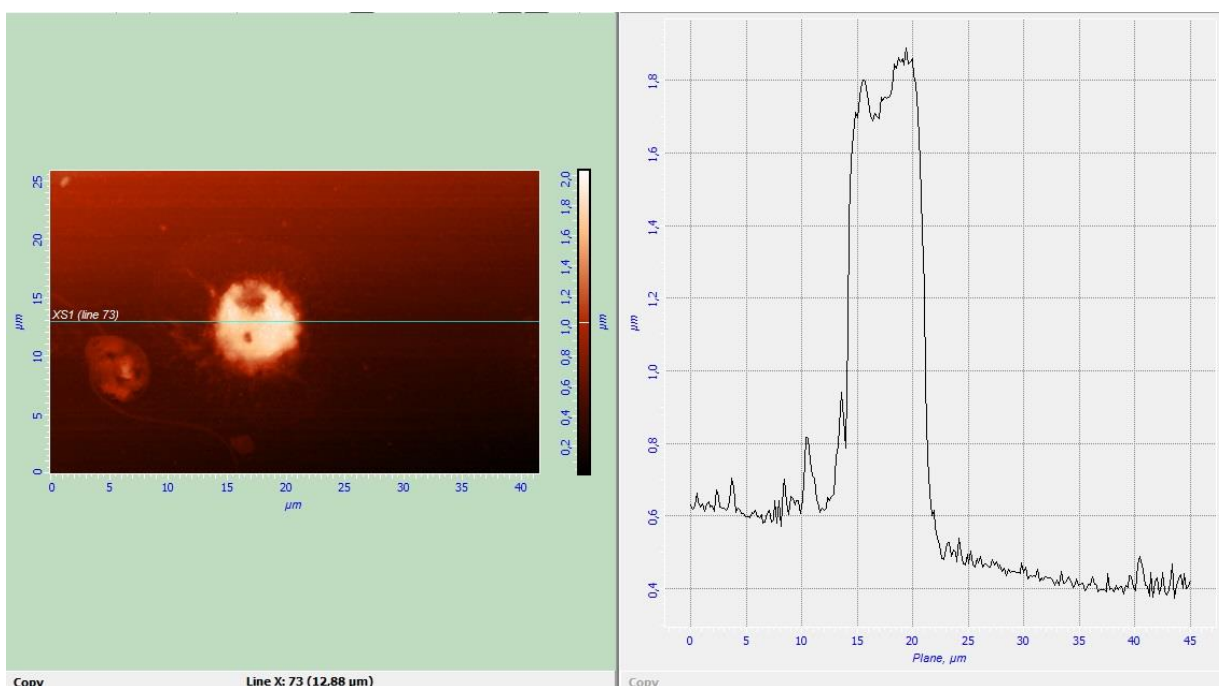


Рис. 83. Двухмерное изображение топографии поверхности МА *D. polymorpha* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемócита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии



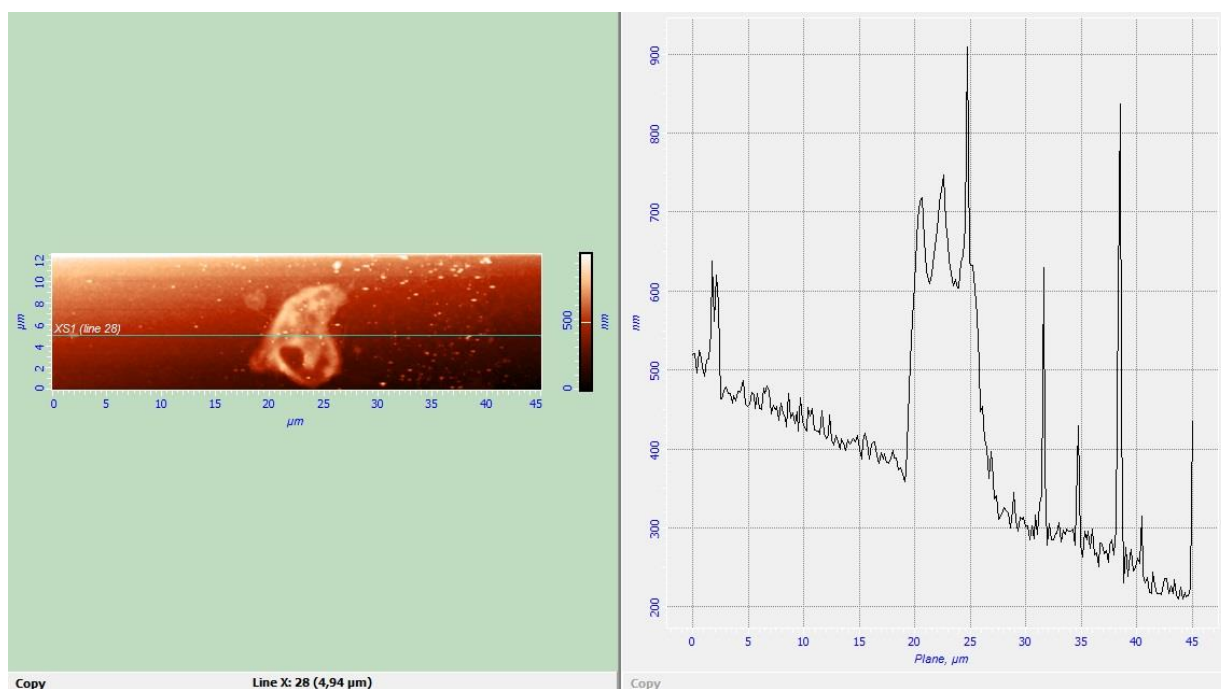


Рис. 84. Двухмерное изображение топографии поверхности МА *D. polymorpha* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДГ, Россия) и сечение гомоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova 1508) в условиях изотонии

В гипотоническом растворе гранулярные клетки несколько уменьшаются в высоту, на поверхности мембраны остаются немногочисленные складки. При инкубации в растворе с повышенным осмотическим давлением с клетками достоверных изменений не происходит.

В гипотонической среде с круглыми клетками не происходит достоверных изменений высоты и складчатости мембраны.

### 3.2.4.3. Оценка клеточных реакций, возникающих в результате действия осмотической нагрузки на гомоциты представителей класса *Bivalvia*

Объем больших амебоцитов *A. cygnea*, инкубированных в условии гипотонии, увеличивается по сравнению с клетками, инкубированными в изоосмотической среде (табл. 42).

Таблица 42

Динамика объема гемоцитов *A. cugnea*, инкубированных в средах с различной осмотичностью,  $\mu\text{m}^3$

Среда	БА	МА	ГК	КК
Гипотония	30,09±2,34*	13,01±0,16	6,73±1,25*	14,16±1,55*
Изотония	26,91±1,40	16,30±4,70	21,60±3,56	7,72±1,69
Гипертония	23,27±3,05	20,71±3,11	5,52±0,43*	11,84±0,24*

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

У малых амебоцитов, инкубированных в средах с различной осмолярностью, объем не претерпевает достоверных изменений.

При инкубации гранулоцитов в гипоосмотической среде их объем достоверно уменьшается.

У круглых клеток объем увеличивается как при инкубации в гипотоническом, так и при инкубации в гипертоническом растворах.

Объем больших амебоцитов *D. polymorpha* достоверно увеличивается в ответ на инкубацию в гиперосмотической среде. В условиях гипотонии показатель объема не претерпевает достоверных изменений.

Объем малых амебоцитов достоверно уменьшается при инкубации в гипоосмотической среде (табл. 43). Достоверных реакций на повышение осмолярности раствора не наблюдается.

Таблица 43

Динамика объема гемоцитов *D. polymorpha*, инкубированных в средах с различной осмотичностью,  $\mu\text{m}^3$

Среда	БА	МА	ГК	КК
Гипотония	14,92±5,44	4,99±1,05*	3,97±0,50	3,61±0,76
Изотония	13,65±1,24	12,38±4,39	4,57±1,56	5,65±1,46
Гипертония	21,97±6,21*	7,33±0,34	5,11±0,77	9,01±0,91*

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Гранулярные клетки не проявляют изменений на изменения осмолярности инкубационного раствора. Круглые клетки увеличиваются в объеме при инкубации в гиперосмотической среде.

У моллюска *A. cygnea* в ходе эксперимента мембранный резерв задействовали только малые амебоциты и гранулярные клетки (табл. 44).

Таблица 44

Показатели мембранного резерва гемоцитов *A. cygnea*

Тип клеток/Показатели мембранного резерва	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, $\mu\text{m}^3$
БА	0	0
МА	29	23,35±3,69
ГК	25	12,48±1,82
КК	0	0

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

При инкубации гемоцитов *D. polymorpha* в гипотонической среде было выявлено, что мембранный резерв задействует только два типа гемоцитов – большие амебоциты и, в меньшей степени, гранулярные клетки (табл. 45).

Таблица 45

Показатели мембранного резерва гемоцитов *D. polymorpha*

Тип клеток/Показатели мембранного резерва	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, $\mu\text{m}^3$
БА	15	11,78±2,26
МА	0	0
ГК	4	1,61±0,71
КК	0	0

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Малые амебоциты и круглые клетки мембранный резерв в ходе эксперимента не задействовали.

### 3.2.4.4. Влияние осмотической нагрузки на упругость и адгезионные свойства плазмалеммы гемоцитов представителей класса Bivalvia

В ходе эксперимента были получены данные о численных значениях параметров площади, упругости и адгезии мембран к нанозонду гемоцитов изученных представителей класса Bivalvia.

При инкубации в гипотонической среде большие амебоциты *A. cygnea* не претерпевают достоверных изменений по сравнению с нативными клетками (табл. 46). В условиях гипертонии клетки увеличивают свою площадь. Изменения упругости мембран и адгезии их к нанозонду не происходит.

Таблица 46  
Параметры гемоцитов *A. cygnea*, полученные с применением СЗМ после инкубации в средах с различным осмотическим давлением

Тип клеток/ показатели	Площадь клеток, $\mu\text{m}^2$	Адгезия мембран гемоцитов к нанозонду, nN	Модуль упругости мембран гемоцитов, кПа
гипотония			
БА	112,23±4,23	8,48±3,93	31,69±5,12
МА	74,54±3,24*	6,80±1,00*	29,29±1,97
ГК	45,30±3,93*	8,01±7,39	28,55±2,01
КК	53,81±5,46	9,25±1,00	33,38±3,69
изотония			
БА	112,64±1,54	8,80±1,53	29,36±4,49
МА	53,19±0,70	13,12±3,45	27,90±3,88
ГК	33,82±1,67	8,11±2,32	26,71±1,90
КК	60,71±2,18	10,61±1,38	25,41±2,88
гипертония			
БА	85,17±7,62*	10,12±2,03	31,46±3,32
МА	44,66±2,20*	11,48±2,56	25,72±4,04
ГК	24,93±2,79*	9,13±1,20	29,02±1,83
КК	32,77±1,95*	12,89±2,19	33,00±2,39*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

При инкубации в гипоосмотическом растворе возрастает площадь малых амебоцитов, снижается адгезивность мембран. В условиях гипертонии достоверные изменения претерпевает только параметр площади клеточной поверхности, в сторону уменьшения.

В гипоосмотической среде гранулярные клетки увеличивают свою площадь. При повышении осмотического давления площадь клеток уменьшается. Показатели упругости и адгезии мембран к нанозонду при изменении осмотичности среды не изменяются.

При снижении осмолярности инкубационной среды круглые клетки не претерпевают достоверных изменений параметров площади, упругости и адгезии мембран к нанозонду. В условиях гиперосмотической среды у клеток уменьшается площадь, и повышается упругость плазмалеммы.

В гипотоническом растворе БА *D. polymorpha* практически не изменяют площади поверхности; показатели адгезивности и упругости их мембран остаются неизменными. При повышении концентрации солей в инкубационном растворе (табл. 47) площадь клеток несколько уменьшается, уровень адгезивности возрастает в несколько раз.

Таблица 47

Параметры гемоцитов *D. polymorpha*, полученные с применением СЗМ после инкубации в средах с различным осмотическим давлением

Тип клеток/ показатели	Площадь клеток, $\mu\text{m}^2$	Адгезия мембран гемоцитов к нанозонду, nN	Модуль упругости мембран гемоцитов, кПа
гипотония			
БА	84,78±1,85	8,76±2,82	28,33±3,12
МА	25,41±2,95*	8,37±2,35*	30,92±2,02
ГК	29,39±1,61	5,83±3,83	28,16±3,39
КК	21,32±0,52	3,18±2,81	25,29±3,04
изотония			
БА	73,20±1,29	3,90±1,73	28,87±3,78
МА	45,56±4,18	16,45±2,39	30,32±5,63
ГК	28,18±0,89	6,53±4,03	28,01±4,13
КК	38,33±2,65	8,48±4,59	24,50±2,62
гипертония			
БА	66,89±3,88*	12,63±4,41*	29,79±1,18
МА	38,82±2,44	10,14±2,18	27,05±3,28
ГК	28,08±0,69	7,15±3,93	38,06±0,87*
КК	43,82±0,83*	7,45±2,04	29,28±3,30

*Примечание:* БА – Большие Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; ГК – Гранулярные клетки; КК – Круглые Клетки; \* – достоверность различий по сравнению с изотонией ( $p < 0,05$ ); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

В условиях гипотонии площадь МА уменьшается, адгезивность мембран возрастает, показатель упругости не изменяется. При повышении

осмотического давления клетки не показывают изменения площади поверхности, а также показателей упругости и адгезии мембран к нанозонду.

В гипосмотическом растворе показатели площади поверхности, упругости и адгезивности плазмалеммы ГК не претерпевают достоверных изменений. При повышении осмолярности возрастает упругость мембран клеток.

При снижении осмотического давления среды не происходит изменений представленных параметров круглых клеток. В гиперосмотической среде площадь клеток увеличивается.

## Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 4.1. Построение типологии клеточных элементов гемолимфы моллюсков

К настоящему времени известно множество классификаций форменных элементов гемолимфы представителей типа Mollusca.

В результате проведенного исследования нами было выделено 4 клеточных типа в гемолимфе моллюсков, с использованием анализа изученных групп параметров. Наиболее очевидными являются морфологические параметры, наблюдаемые визуально и измеряемые у нативных клеток. Размеры клеток могут сильно варьировать в зависимости от размеров тела животного, однако соотношение размеров между клеточными типами остается неизменным – большие амебоциты имеют максимальный размер у всех изученных моллюсков, что, очевидно, связано с их специфической функцией – быстрому захвату и уничтожению инородных объектов, попадающих в организм моллюска. Форма клеток различных типов также может несколько отличаться, однако существуют некоторые специфические черты, присущие исключительно данному типу и позволяющие отличить клетки одного типа от клеток остальных типов.

Большие амебоциты соответствуют амебоцитам, описанным в литературе (Wagge L.E., 1955; Sminia T., 1981; Brown M., Brown R., 2002). Обычно представляют собой клетки максимального для каждого представителя размера, с множеством псевдоподий на периферии, нестабильной формы. Ядро овальной или округлой формы, чаще всего располагается ближе к периферии. В цитоплазме располагается множество вакуолей разного размера и гранулы. Клетки отличаются высокой фагоцитарной активностью. Способны закрепляться на субстрате и после закрепления передвигаться в сторону инородных частиц, с последующим захватом. Большие амебоциты в литературе называют большими гранулоцитами (Sminia T., 1981). Эти клетки можно соотнести с гранулярными амебоцитами пиявок (по классификации Stein E.A.,

Cooper E.L., 1983), червей (Stein E. et al, 1977; Šíma P., 1994) и плазмочитами насекомых (Kanost M.R., Nardi J.B., 2010; Schmidt O. et al., 2010).

Однако у различных видов насекомых типы гемоцитов, выполняющих, к примеру, фагоцитарную функцию, могут быть различными. Так, например, согласно исследованиям Brehelin (Brehelin M. et al., 1975), гранулоциты не принимают участия в фагоцитозе у *Locusta migratoria* и *Melolontha melolontha*. Фагоцитарную функцию выполняют плазмочиты и элеоциты. Однако, согласно данным Ribeiro C. (Ribeiro C. et al., 1996), у *Mythimna unipuncta* основную роль в фагоцитозе выполняют именно гранулоциты, в то время как активность плазмочитов является сниженной. У пиявок и червей основную фагоцитарную функцию выполняют гранулярные амебоциты, но не обеих субпопуляций. Что касается кольчатых червей, то у них, очевидно, имеет место дивергенция иммунных клеток на два самостоятельных типа: макрофаги (нейтрофилы), обеспечивающие неспецифическую защиту, и лимфоцитоподобные амебоциты – участники специфических форм реагирования. (Галактионов В.Г., 2005). Детальные исследования Cameron (1932) показали, что гиалиновые амебоциты наиболее активны в фагоцитозе, гранулярные амебоциты – менее.

Малые амебоциты – это клетки среднего размера, аморфной формы. Обладают разнородными псевдоподиями по периферии, среди которых, однако, преобладают лобоподии. Способны к активному передвижению после закрепления на субстрате. Ядро чаще всего располагается ближе к периферии, в цитоплазме содержатся мелкие вакуоли и единичные гранулы. В большинстве случаев в гемолимфе встречаются в виде агрегатов, что отчасти объясняется их специфической функцией – в гемолимфе агрегаты МА окружают большие инородные частицы и изолируют их. Даже находясь в агрегированном состоянии, клетки не теряют способности к передвижению, и зачастую бывает сложно определить границы каждой отдельной клетки, входящей в состав функциональной единицы. Эти клетки в литературе именуется как гранулоциты. Большая часть авторов малые амебоциты как самостоятельный



клеточный тип не выделяют, относя их к одному типу с большими амебоцитами (Wagge L.E., 1955; Sminia T., 1981; Brown M., Brown R., 2002).

Гранулярные клетки обычно небольшого размера, формы, близкой к овальной, чаще с тонкими короткими лобоподиями. Ядерная часть клетки, как правило, окружена слоем прозрачной цитоплазмы. Ядро мелкое, округлое, занимает центральное положение. В цитоплазме содержится большое число гранул. Клетки данного типа не участвуют в фагоцитозе инородных частиц. При закреплении на поверхности принимают форму, характерную для всех клеток этого типа – наружный слой цитоплазмы «расплывается» и окружает внутреннюю часть клетки прозрачным ареолом. Закрепленные клетки теряют способность к передвижению, однако, они могут «собираться» и ограниченно перемещаться на небольшое расстояние, где снова произойдет закрепление. Соответствуют описанным в литературе гиалиноцитам (Tripp M.R., 1961; Cheng T.C., 1981; Sminia T., 1981; Loker E.S. et al., 1982; Bayne C.J., 1983). Эти клетки можно считать гомологами малых целомотов пиявок, сходных с ними по морфологии и выполняемым функциям (Lefebvre C. et al., 2008), гиалиновых амебоцитов червей (Šíma P., 1994) и гранулоцитов насекомых (Kanost M.R., Nardi J.B., 2010; Schmidt O. et al, 2010).

Круглые клетки, очевидно, аналогичны бластоподобным клеткам (Gorbushin A.M., Iakovleva N.V., 2006). Стабильной формы, могут сильно варьировать в размерах в зависимости от вида моллюска. Клетки неспособны к активному передвижению, перемещаются с током жидкости. В цитоплазме содержатся мелкие вакуоли и различные по размеру гранулы. Ядро округлое, средних размеров, чаще всего располагается ближе к центру. Вероятно, гомологичны сферическим клеткам насекомых (Schmidt O. et al., 2010).

## 4.2. Анализ действия осмотической нагрузки на клеточные элементы гемолимфы моллюсков

### 4.2.1. Динамика морфометрических характеристик гемоцитов при действии осмотической нагрузки

При изучении воздействия осмотической нагрузки на гемоциты выявлены закономерности, характерные для большинства изученных представителей.

В гипоосмотическом растворе большие амебоциты наиболее часто увеличиваются в размерах, активность их на некоторое время снижается, но спустя в среднем 5-7 минут подвижность клеток, количество выпускаемых псевдоподий и фагоцитарная активность восстанавливается.

В условиях гипертонии большие амебоциты снижают активность, число выпускаемых псевдоподий уменьшается, среди псевдоподий начинают преобладать филоподии, расстояние между которыми существенно увеличивается. Клетки закрепляются на субстрате и на некоторое время приостанавливают фагоцитарную активность. Большие амебоциты *A. fulica* при повышении осмотического давления сливаются в агрегаты и покрывают субстрат аморфной сетью, которая, однако, не теряет фагоцитарной активности. Гипотетически, ввиду чрезвычайно важности функции, выполняемой большими амебоцитами, их осморегуляторные способности должны быть на таком уровне, чтобы позволить клеткам выполнять свои функции даже в экстремальных условиях. В ходе проведенного исследования данная гипотеза подтверждается, поскольку амебоциты некоторых видов сохраняют способность к фагоцитозу даже после кратковременной обработки 96%-раствором спирта.

В гипотонической среде малые амебоциты, как правило, увеличиваются в размерах, агрегируются и закрепляются на субстрате, снижая активность и уменьшая количество выпускаемых псевдоподий. В условиях повышенной осмолярности клетки уменьшаются в размерах и выключаются из защитных реакций.

Гранулярные клетки при понижении концентрации солей в инкубационной среде могут увеличиваться в размерах, хотя подобный эффект был отмечен не у всех изученных представителей. Псевдоподии, как правило, становятся короче, активность клеток снижается, они закрепляются на субстрате и теряют способность к передвижению. В гипертоническом растворе клетки чаще всего не проявляют очевидных изменений размеров, однако нередки случаи, когда инкубированные в гиперосмотическом растворе клетки прекращают закрепляться на субстрате и перемещаются с током жидкости.

Круглые клетки при понижении осмотического давления, как правило, увеличиваются в размерах. В гиперосмотической среде наблюдается некоторое уменьшение линейных размеров клеток, однако чаще выраженных реакций клетки не проявляют.

Клеткам изученных представителей типа *Mollusca* присущи стереотипные реакции в ответ на изменение осмолярности инкубационного раствора. Так, например, при снижении осмотического давления среды у клеток большинства изученных моллюсков наблюдается сглаживание плазмалеммы и увеличение клеток в объеме. В то же время для некоторых представителей выявлено наличие атипичных реакций, когда увеличение линейных размеров гемоцитов и повышение упругости клеточных мембран является ответом на инкубацию в гипертонической среде.

#### *4.2.2. Динамика функциональных свойств гемоцитов при действии осмотической нагрузки*

Наибольшей фагоцитарной активностью у всех изученных представителей обладают большие амебоциты. Малые амебоциты также способны к фагоцитированию мелких частиц, хотя в абсолютном большинстве случаев, в эксперименте с *S. cerevisiae* проявляли исключительно инкапсуляторную активность.

Полученные данные согласуются с результатами исследований, проведенными отечественными и зарубежными учеными (Adema C.M. et al., 1992; Bayne C.J. et al., 1979; Cajaraville M.P., Pal S.G., 1995; Carballal M.J. et al., 1997; Cheng T.C., 1975; Cheng T.C., 1984; Cima F. et al., 2000; Nakayama K. et al., 1997; Sminia T. et al., 1974; Yamaguchi K. et al., 1988), в которых в основном гемоциты, обладающие защитными функциями в гемолимфе моллюсков, обозначаются как один тип – фагоциты.

В опытах с изменением осмолярности инкубационного раствора гемоциты всех исследованных моллюсков не проявляли достоверных изменений в фагоцитарной активности, поскольку БА, очевидно, обладают способностью к осморегуляции и преодолевают осмотическую нагрузку в интервал времени в среднем 5-7 минут. Клетки, претерпевавшие значительные изменения в результате изменения осмолярности окружающего раствора, в фагоцитозе не участвуют.

В целом, существенных изменений в функциональной активности гемоцитов в условиях осмотической нагрузки (как в гипоосмолярной, так и в гиперосмолярной средах) не выявлено, что свидетельствует о высоком уровне резистентности и способности к сохранению функционального гомеостаза в системе циркуляции моллюсков.

#### *4.2.3. Динамика энергетического статуса гемоцитов при действии осмотической нагрузки*

Учитывая, что использованный в эксперименте родамин Б является потенциал-зависимым красителем, интенсивность его флуоресценции в клетках позволяет судить об общем энергетическом статусе гемоцитов – относительное количество митохондрий, активных в данный момент (Reungpatthanaphong P.L. et al., 2003). В проведенном эксперименте не были использованы антигенные стимулы, что позволяет судить об энергетическом статусе гемоцитов в нативном состоянии.

Максимальный уровень флуоресценции был присущ большим амебоцитам всех изученных представителей; минимальный, у большинства представителей – круглым клеткам. Это представляется закономерным, исходя из их специфических функций – большие амебоциты имеют, вероятно, наибольшие энергетические запросы в связи со способностью к активному передвижению и фагоцитозу, который требует быстрого изменения формы клетки (Stang-Voss C., 1970; Yoshino T.P., 1976). Что касается круглых клеток, очевидно, их низкая энергопотребность объясняется пассивным передвижением и отсутствием способности к образованию псевдоподий, а также к поглощению чужеродных агентов.

Клетки разнородно реагируют на повышение/снижение осмолярности инкубационного раствора, однако, в среднем, можно проследить определенные закономерности. Наиболее чувствительными к изменению концентрации солей в окружающем растворе являются малые амебоциты, большие амебоциты и в несколько меньшей степени, круглые клетки. Гранулярные клетки на изменения осмолярности инкубационного раствора реагируют слабо. Чтобы объяснить эту закономерность, требуется дальнейшее изучение проблемы с расширением видового состава.

По уровню восприимчивости энергетических процессов гемоцитов к осмотической нагрузке можно разделить исследованных представителей типа *Mollusca* на следующие группы:

1. Низкая восприимчивость – *H. pomatia*, *P. corneus*. Клеточные элементы не проявляют достоверных реакций на снижение осмолярности инкубационного раствора.

2. Средний уровень восприимчивости – на гипоосмотическую нагрузку проявляют реакции 1 тип гемоцитов: *V. viviparus*, *L. stagnalis*, *A. australis*, *D. polymorpha*.

3. Высокий уровень восприимчивости – 2 и более клеточных типов отвечают достоверными изменениями на снижение осмолярности инкубационного раствора: *A. cygnea*, *A. fulica*.

Исследование митохондриальной активности демонстрирует высокую напряженность энергетических процессов в ответ на инкубацию гемоцитов в гиперосмотической среде, что говорит о задействовании механизмов осморегуляции.

#### **4.3. Анализ изменений упругости и адгезии плазмалеммы клеточных элементов гемолимфы моллюсков в условиях осмотической нагрузки**

Исследование упруго-эластических свойств гемоцитов моллюсков показало, что динамика показателей адгезии и упругости мембран в условиях осмотического стресса связана со специфическими функциями, выполняемыми гемоцитами в организме моллюсков.

Наибольшими значениями параметра адгезии у *H. pomatia* обладают малые амёбоциты, у *S. ravergeri* – малые амёбоциты и круглые клетки, у *V. viviparus* – гранулярные клетки, у *A. cygnea* – малые амёбоциты, у *D. polymorpha* – малые амёбоциты, у *A. fulica* – большие амёбоциты и малые амёбоциты, у *P. corneus* – круглые клетки, у *L. stagnalis* – большие амёбоциты и малые амёбоциты, у *A. australis* – большие амёбоциты и круглые клетки.

У большинства изученных видов максимальными значениями адгезии обладают малые амёбоциты, что связано с выполнением ими инкапсуляторной функции, которая требует объединения клеток в агрегаты для выполнения защитных функций.

Наибольшими значениями параметра упругости у *H. pomatia* обладают круглые клетки, у *S. ravergeri* – круглые клетки, у *V. viviparus* – круглые клетки, у *A. cygnea* – большие амёбоциты, у *D. polymorpha* – малые амёбоциты, у *A. fulica* – большие амёбоциты, у *P. corneus* – круглые клетки, у *L. stagnalis* – малые амёбоциты, у *A. australis* – малые амёбоциты.

У большинства изученных видов максимальное значение параметра упругости показывают круглые клетки, с чем, очевидно связан тот факт, что эти клетки не способны к изменению формы и образованию лобоподий.

Наименее восприимчивыми к изменениям осмолярности инкубационного раствора в рамках изучаемых параметров оказались большие амебоциты. У пяти из девяти изученных видов они не проявляли достоверных изменений показателей упругости и адгезии мембран к нанозонду, у двух представителей в ответ на изменение осмолярности среды менялись только значения показателя упругости мембран клеток (*L. stagnalis* и *H. pomatia*), у *D. polymorpha* в ответ на повышение осмотичности среды изменялся только уровень адгезии мембраны к нанозонду, у *A. australis* гемоциты оказались восприимчивы к любому изменению осмолярности инкубационного раствора.

Малые амебоциты не проявляют достоверных реакций на изменение осмолярности инкубационного раствора у 4 представителей. У *P. corneus*, *A. fulica* и *L. stagnalis* в ответ на изменение концентрации солей в растворе колеблется только показатель упругости мембран гемоцитов. У *D. polymorpha* в условиях гипотонии изменялся только показатель адгезии мембран к нанозонду. Гемоциты *A. australis* были восприимчивы к любому изменению осмолярности по обоим изученным параметрам.

Гранулярные клетки, не проявляют достоверных реакций на инкубацию в растворах с различной осмолярностью у двух из изученных представителей. У *A. australis* и *L. stagnalis* гранулярные клетки в гемолимфе не встречаются. У *A. fulica*, *P. corneus* и *S. ravergeri* в ответ на изменение осмолярности инкубационного раствора изменяется только параметр упругости. У *H. pomatia* в ответ на изменение осмолярности среды изменяются оба изученных в ходе данного эксперимента параметра.

Круглые клетки по уровню показателей упругости и адгезии плазмалеммы к нанозонду показали невосприимчивость к изменениям осмолярности среды у двух изученных представителей. У *H. pomatia*, *V. viviparus* и *L. stagnalis* в ответ на изменение осмотического давления инкубационного раствора изменялся только показатель адгезии, а у *A. fulica*, *P. corneus*, *A. australis* и *A. cygnea* – только параметр упругости клеточных мембран.

Таким образом, на основе данных АСМ-исследований можно выделить следующие группы моллюсков по уровню восприимчивости к осмотической нагрузке:

1. Минимальной восприимчивостью (0-1 клеточных типов проявляют достоверные реакции на снижение осмотичности раствора) обладают *S. ravergeri*, *A. fulica*, и *V. viviparus*.

2. Средним уровнем восприимчивости к осмотической нагрузке (2 клеточных типа проявляют достоверные реакции на снижение осмотичности раствора) обладают *A. cygnea*, *H. pomatia*, *P. corneus*, *D. polymorpha*.

3. *L. stagnalis* и *A. australis* обладают высоким уровнем восприимчивости к осмотической нагрузке (3-4 клеточных типа проявляют достоверные реакции на снижение осмотичности раствора).



## ВЫВОДЫ

1. Клеточный состав гемолимфы всех исследованных видов моллюсков типологически единообразен. По морфофункциональным характеристикам идентифицировано 4 типа клеток: большие амебоциты, малые амебоциты, гранулярные клетки и круглые клетки

2. Изменение осмолярности инкубационного раствора не влияет на фагоцитарную активность клеточных элементов изученных представителей типа Mollusca. В условиях осмотической нагрузки гемоциты моллюсков сохраняют способность к выполнению защитных функций.

3. Изменение осмотичности инкубационного раствора по-разному воздействует на интенсивность митохондриальной активности клеток гемолимфы разных типов. Если для больших амебоцитов отмечено возрастание митохондриальной активности при инкубации в условиях гипертонии, то круглые клетки нескольких представителей (*H. pomatia*, *S. ravergeri*, *A. fulica*, *P. corneus*, *L. stagnalis*) практически не показывают выраженных реакций по данному параметру в ответ на изменения осмолярности окружающего раствора.

4. Гемоциты исследованных видов класса Gastropoda в условиях осмотической нагрузки проявляют способность регулировать объем клетки. Диапазон изменений объема больших амебоцитов *V. viviparus* достигает 26% ( $p < 0,05$ ). Реакция на осмотическую нагрузку гемоцитов представителей класса Bivalvia.

5. Участие мембранного резерва в регуляции клеточного объема у фагоцитирующих клеток гемолимфы (больших и малых амебоцитов) приблизительно в 2 раза выше, чем у других клеточных элементов (гранулярных и круглых клеток). Показатели резерва гемоцитов разных видов моллюсков широко варьируют, их корреляции с таксономической принадлежностью и экологическими особенностями вида обнаружить не удалось.

6. Гемоциты большинства представителей типа Mollusca реагируют на снижение осмотического давления сглаживанием структуры микрорельефа и

увеличением высоты клеток. Исключение составляют *L. stagnalis* и *A. australis*, характер изменения сил упругости и адгезии мембран гемоцитов которых при снижении осмолярности раствора демонстрирует высокий уровень восприимчивости клеточных типов к осмотической нагрузке.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Комплексный подход, заключающийся в исследовании микрорельефа поверхности, объемной морфометрии, упругости и силы адгезии гемоцитов с использованием инструментария атомно-силовой микроскопии может быть рекомендован для исследования морфофункционального состояния клеток гемолимфы представителей видов культивируемых моллюсков.

### Библиографический список

1. Аванесян, А.В. Влияние защитных реакций моллюсков на развитие партенид трематод (на примере семейства *Echinostomatidae*): дисс. на соискание степени канд. биол. наук / Аванесян Алина Вачагановна. – Санкт-Петербург: РГПУ им. А.И. Герцена, 2002. – 140 с.
2. Атаев, Г.Л. Защитные реакции моллюсков семейства *Planorbidae* (Gastropoda, Pulmonata) на трематодную инвазию / Г.Л. Атаев, Е.Л. Прохорова // Известия Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена, 2010. – С. 122-126.
3. Галактионов, В.Г. Иммунология / В.Г. Галактионов. – Москва: Изд. МГУ, 1998. – 480 с.
4. Галактионов, В.Г. Эволюционная иммунология / В.Г. Галактионов. – Москва: Академкнига, 2005. – 408 с.
5. Галактионов, К.В. Происхождение и эволюция жизненных циклов трематод / К.В. Галактионов, А.А. Добровольский // – СПб.: Наука, 1998. – 404 с.
6. Галкин, А.К. Клеточные и тканевые защитные реакции моллюска *Ooeretus corneus* на поселение спороцист *Astiotrema trituri* / А.К. Галкин // Тез. докл. II Всесоюз. симпоз. по болезням и паразитам водных беспозвоночных. – Ленинград, 1976. – С. 14-15.
7. Галлямов, М.О. Сканирующая зондовая микроскопия: основные принципы, анализ искажающих эффектов / М.О. Галлямов, И.В. Яминский. – Москва: МГУ, 1998. – 79 с.
8. Гинецинская, Т.А. Жизненный цикл трематод как система адаптаций / Т.А. Гинецинская, А.А. Добровольский // Свободноживущие и паразитические беспозвоночные (морфология, биология, эволюция). – Л.: Тр. ВНИИ ЛГУ. – 1983. – № 34. – С. 112-157.
9. Догель, В.А. Общая протозоология / В.А. Догель, Ю.И. Полянский, Е.М. Хейсин. – Москва-Ленинград: Изд-во АН СССР, 1962. – 603 с.

10.Заварзин, А.А. Основы сравнительной гистологии / А.А. Заварзин. – Ленинград: Изд-во ЛГУ, 1985. – 400 с.

11.Зубарева, Е.В. Функциональные и микрореологические свойства лейкоцитов при экзогенном перегревании в опытах *in vivo* и *in vitro*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.03.01 / Зубарева Екатерина Владимировна. – Ярославль, 2011. – 18 с.

12.Кантор, Ю.И. Каталог моллюсков России и сопредельных стран. / Ю.И. Кантор, А.В.Сысоев. – Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2005. – 627 с.

13.Кузьмович, Л.Г. Выход церкарий из моллюсков, относящихся к разным экологическим группам / Л.Г. Кузьмович // Тез. докл. II Всесоюз. симп. по болезням и паразитам водных беспозвоночных. – Ленинград, 1976. – 36-37 с.

14.Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин – Москва: Высшая школа, 1990. – 352 с.

15.Лихарев, И.М. Наземные моллюски фауны СССР. Определители по фауне СССР, издаваемые Зоологическим институтом АН СССР / И.М. Лихарев, Е.С. Раммельмейер. – Москва-Ленинград: Изд-во АН СССР, 1952. – 512 с.

16.Литвинова, Т.Н. Учение о растворах. Протолитические и гетерогенные равновесия / Т.Н. Литвинова, Н.К. Выскубова, Л.В. Ненашеваю – Краснодар: ГОУ ВПО «КГМУ», 2009. – 162 с.

17.Миронов, В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии / В.Л. Миронов. – Москва: Техносфера, 2005. – 144 с.

18.Миронов, В.Л. Зондовая нанолаборатория ИНТЕГРА. Проведение измерений. АСМ и СТМ измерения, спектроскопия, многопроходные методы, литография. Руководство пользователя / В.Л. Миронов. – Москва: НТ-МДТ, 2007. – 353 с.

19.Митрошина, Е.В., Оптический имиджинг в приложении к исследованию нейробиологических систем мозга / Е.В. Митрошина. – Нижний Новгород: НГУ, 2012. – 40 с.

20.Надеждин, С.В. Теоретические основы современных методов микроскопии / С.В. Надеждин, М.З. Федорова, Т.А. Погребняк. – Белгород: Изд-во БелГУ, 2011. – 115 с.

21.Нишева, Е.С., Способ определения фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови живых организмов / Е.С. Нишева, А.Н. Галустян. – Патент РФ № 2242763, 2011.

22.Присный, А.А. Практикум по физиологии беспозвоночных животных / А.А. Присный. – Белгород: Изд-во БелГУ, 2013 – 116 с.

23.Присный, А.В. Таблицы для определения видов моллюсков. Практические работы школьников по экологии: Ч.2. Методические материалы к практическим работам (модельные методики и ключи для распознавания организмов)/ А.В. Присный, Э.А. Снегин – Белгород: Изд-во БелГУ, 1999. – 18 с.

24.Ракочий, В.К. Межпопуляционная изменчивость клеточного состава гемолимфы моллюсков рода *Helix L.* запада Украины / В.К. Ракочий, О.А. Громик // Экология, эволюция и систематика животных: Материалы Всероссийской конференции с международным участием – 2009. – С. 122-123.

25.Ракочий, В.К. Клітинні елементи гепатопанкреаса *H. pomatia L* / В.К. Ракочий, Л.М. Хлус, О.О. Малованюк // Доповіді Чернівецького Національного університету ім. Ю. Федьковича. – 2010. – С. 31-34.

26.Семенов, О.Ю. Экспериментальное изучение биологии мирацидия *Philophthalmus rhionica Tichomirov* / Семенов Олег Юрьевич // Автореф. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук. – Ленинград: ЛГУ, 1977. – 20 с.

27.Семенов, О.Ю. Мирацидии: строение, биология, взаимоотношения с моллюсками / О.Ю. Семенов.– Ленинград: ЛГУ, 1991. – 204 с.

28.Стадниченко, А.П. О воздействии личинок горчака на пластинчатожаберного моллюска *Unio rostratus gentilis Haas* / А.П. Стадниченко, Ю.А. Стадниченко // Гидробиологический журнал. – 1981. – № 17 (5). – С.57-61.

29.Трушин, И.Н. Защитная реакция наземных моллюсков на внедрение личинок *Muellerius capillaris* / И.Н. Трушин // Тр. Всесоюз. ин-та гельминт. им. К.И. Скрябина. – 1980. – № 25. – С. 130-139.

30.Федорова, М.З. Использование мембранного резерва лимфоцитами крови при деформации и в условиях гипотонии / М.З. Федорова, В.Н. Левин // Биологические мембраны.– 2001. - Т.18, № 14. – С. 306-311.

31.Хлус, Л.М. Цитологічна характеристика гемолімфи *Helix lutescens* Rssm та *Helix albescens* Rssm. у різних фізіологічних станах / Л.М. Хлус // Клінічна та експериментальна патологія. – 2003. – № 2 – т.1. – С. 89-92.

32.Хлус, Л.Н. Гемоцитарные формулы моллюсков надсемейства *Helicoidea*, Біорізноманіття та роль тварин в екосистемах / Л.Н. Хлус, А.К. Гриб // Матеріали IV Міжнародної наукової конференції. – 2007. – С. 220-221.

33.Шилейко, А.А. Наземные моллюски семейства *Helicoidea* / А.А. Шилейко. – Фауна СССР: Моллюски. – Ленинград: Наука, 1978. – 384 с.

34.Штейн Г.И. Конфокальная микроскопия: мифы и реальность / Г.И. Штейн // Школа-семинар «Конфокальная микроскопия в биологии и медицине». – Москва, Звенигород. – 2005. – С. 6.

35.Abdul-Salam, J.M. *B. glabrata* amoebocytes: effects of *S. mansoni* infection on in vitro phagocytosis / J.M. Abdul-Salam, E.H. Michelson // J. Invertebr. Pathol., 1980. – Vol. 35. – 241 p.

36.Accorsi, A. Comparative analysis of circulating hemocytes of the freshwater snail *Pomacea canaliculata* / A. Accorsi, L. Bucci, M. Eguileor, E. Ottaviani, D. Malagoli // Fish and shellfish immunology. – 2013. – Pp. 1-9.

37.Adamowicz, A. Blood cells morphology of the snail *Helix aspersa maxima* (*Helicidae*) / A. Adamowicz, M. Bolaczek // Zoologica Poloniae. – 2003. – Vol. 48. – P. 93-101.

38.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 // J. Inv. Path. – 1992. – Vol. 59. – Pp. 24-32.

39. 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, E.S. Loker // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1997. – Vol. 94. – Pp. 8691-8696.

40. Adema, C.M. Evidence from two planorbid snails of a complex and dedicated response to digenean (echinostome) infection / C.M. Adema, L.A. Hertel, E.S. Loker // J. Parasitology, 1999. – Vol. 119. – Pp. 395-404.

41. Adema, C.M. Immunobiology of the relationship of echinostomes with snail intermediate hosts / C.M. Adema, K.K. Sapp, L.A. Hertel, E.S. Loker // In: Fried, B. and Graczyk, T.K., eds. Echinostomes as experimental models for biological research. – Kluwer Academic Press, 2000. – Pp. 149-173.

42. Adema, C.M. Separation of *Lymnaea stagnalis* hemocytes by density gradient centrifugation / C.M. Adema, A.W. Mohandas, P.W. Van der Knaap, T. Sminia // Dev. Comp. Immunol. – 1994. – Vol. 18. – Pp. 25-31.

43. Anderson, R.S. Polykaryon formation by *Mercenaria mercenaria* hemocytes / R.S. Anderson // Biol. Bull, 1987. – Vol. 172. – Pp. 236-245.

44. Ataev, G.L. Comparison of *Echinostoma caproni* mother sporocysts development in vivo and in vitro using of *Biomphalaria glabrata* snails and a *B. glabrata* embryonic cell line / G.L. Ataev, A. Fournier, C. Coustau // Journal of Parasitology. – 1998. – Vol. 84. – Pp. 227-235.

45. 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. – Pp. 187-198.

46. Auffret, M. Bivalve haemocyte morphology / M. Auffret // in: W.S. Fisher, editor. Disease processes in marine bivalve mollusks. – American fisheries society special publication. – 1988. – Vol. 18 – Pp. 169-177.

47. Bayne, C.J. Molluscan internal defense mechanism: the fate of C14-labelled bacteria in the Land Snail *Helix pomatia* (L.) / C.J. Bayne // J. comp. Physiol. – 1973. – Vol. 86. – Pp. 17-25.



48. Bayne, C.J. Haemolymph functions in *Mytilus californianus*: the cytochemistry of hemocytes and their responses to foreign implants and haemolymph factors in phagocytosis / C.J. Bayne, M.N. Moore, T.H. Carefoot, R.J. Thompson // J. Invertebr. Pathol. – 1979. – Vol. 34. – Pp. 1-20.

49. Bayne, C.J. Molluscan immunology / C.J. Bayne // In “The Mollusca” K. Wilbur, Ed. – Orlando: Academic Press. – 1983. – Vol. 5. – Pp. 407-486.

50. Bayne, C.J. Plasma components which mediate cellular defences in gastropod mollusc *Biomphalaria glabrata* / C.J. Bayne, C.A. Boswell, E.S. Loker // Developmental and Comparative Immunology. – 1985. – Vol. 9. – Pp. 523-530.

51. Bayne, C.J. Determinants of compatibility in mollusc-trematode parasitism / C.J. Bayne, T.P. Yoshino // American Zoologist. – 1989. – Vol. 29(3). – Pp. 399-407.

52. Balan, D.S.L. Aspectos imunologicos e parasitologicos em *Biomphalaria tenagophila* infectadas por *Schistosoma mansoni* e outros Digenea / D.S.L. Balan, L.A. Magalhaes, A.E. Piedrabuena // Rev. saude puble. – 1993. – Vol. 27(6). – Pp. 421-429.

53. Bachere, E. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation / E. Bachere, D. Chagot, H. Grizel // Dev. Comp. Immunol. – 1988. – Vol. 12. – Pp. 549-559.

54. Bachere, E. Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* / E. Bachere, D. Hervio, E. Mialhe // Dis. Aquat. Org. – 1991. – Vol. 11. – Pp. 173-180.

55. Barker, G.M. (ed.) The Biology of terrestrial mollusks / G.M. Barker – CABI, 2001. – 558 p.

56. Barker, G.M. Natural Enemies of Terrestrial Molluscs / G.M. Barker – CABI, 2004. – 644 p.

57. Barracco, M.A. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila* / M.A. Barracco, A.A. Steil, R. Gargioni // Mem Inst Oswaldo Cruz. – 1993. – Vol. 88. – Pp. 73-83.

58. Berriman, M. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni* / M. Berriman, B.J. Haas, P.T. LoVerde // Nature. – 2009. – Vol. 460. – Pp. 352-358.

59. Blalock, J.E. A complete regulatory loop between the immune and neuroendocrine systems / J.E. Blalock, E.M. Smith. – Federation Proc., 1985. – 40 p.

60. Borges, C.M. A contribution to the pathobiology of *Biomphalaria glabrata* hemocytes / C.M. Borges, C.M. Azevedo, Z. Andrade // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. – 2006. – Vol. 101(1). – Pp. 193-198.

61. Brehelin, M. Encapsulation of implanted foreign bodies by hemocytes in *Locusta migratoria* and *Melolontha melolontha* / M. Brehelin, J.A. Hoffmann, G. Matz, A. Porte // Cell Tissue Res. – 1975. – Vol. 160. – Pp. 283-289.

62. Brown, M. The differential sensitivity of three invertebrates to copper assessed using biomarkers of exposure / M. Brown, R. Brown // Biochemical, Cellular and Molecular Background of Biomarkers, 2002. – Pp. 23-25.

63. Cajaraville, M.P. Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment. / M.P. Cajaraville, S.G. Pal // Cell Struct. Funct. – 1995. – Vol. 20. – Pp. 355-367.

64. Canesi, L.L. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves / L.L. Canesi, G. Gallo, M. Gavioli, C. Pruzzo // Microsc Res Tech. – 2002. – Vol. 57(6). – Pp. 469-476.

65. Carballal, M.J. In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes / M.J. Carballal, C. Lopez, C. Azevedo, A. Villalba // Fish Shellfish Immunol. – 1997. – Vol. 7. – Pp. 403-416.

66. Carballal, M.J. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis* / M.J. Carballal, C. Lopez, C. Azevedo, A. Villalba // J. Invertebr. Pathol. – 1997. – Vol. 70. – Pp. 96-105.

67. Carballal, M.J. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis* / M.J. Carballal, C. Lopez, C. Azevedo, A. Villalba // Dis. Aquat. Org. – 1997. – Vol. 29. – Pp. 127-135.

68. 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, J.X.

Wang, X.F. Zhao // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2008. – Vol. 32(1). – Pp. 71-83.

69.Chang, S.J. Morphological Characterization via Light and Electron Microscopy of the Hemocytes of two Cultured Bivalves: A Comparison Study between the Hard Clam (*Meretrix lusoria*) and Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) / Chang S.J., Tseng S.M., Chou H.Y. // *Zoological Studies*. – 2005. – Vol. 44. – Pp. 144-153.

70.Cheng, L. *Vibrio parahaemolyticus* associated with mass mortality of postlarval abalone, *haliotis diversicolor supertexta* (L.) / L. Cheng, J. Huang, C.Y. Shi // *China journal of the World aquaculture Society*. – 2008 – Vol. 39. – Pp. 746-757.

71.Cheng, T.C. Transplantation immunity in mollusks: The histoincompatibility of *Helisoma duryi* normale with allografts and xenografts / T.C.Cheng, P.C. Galloway // *J. invertebr. Pathol.* – 1970. – Vol. 15. – Pp. 150-152.

72.Cheng, T.C. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes / T.C. Cheng // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1975. – Vol. 266. – Pp. 343-379.

73.Cheng, T.C. Separation of oyster hemocytes by density gradient centrifugation and identification of their surface receptors / T.C. Cheng, J.W. Huang, H. Karadogan, L.R. Renwranz, T.P. Yoshino // *J. Invertebr. Pathol.* – 1980. – Vol. 36. – Pp. 35-40

74.Cheng, T.C. Bivalves / T.C. Cheng // In: Ratcliffe N.A., Rowley A.F., eds. *Invertebrate blood cells*. – London: Academic Press, 1981. – Pp. 233-300.

75.Cheng, T.C. Effects of colchicine and cytochalasin B on chemotaxis of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes / T.C. Cheng, K.H. Howland // *J. Invertebr. Pathol.* – 1982. – Pp. 150-152.

76.Cheng, T.C. A classification of molluscan hemocytes based on functional evidences / T.C. Cheng // *Comp. Path.* – 1984. – Vol. 6. – Pp. 111-146.

77.Cheng, T.C. Intracellular acid phosphatase and lysozyme levels in subpopulations of oyster *Crassostrea virginica* hemocytes / T.C. Cheng J.C.U. Downs // *J. Invertebr. Pathol.* – 1988. – Vol. 52. – Pp. 163-167.

78.Cima, F. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850): morphofunctional characterisation / F. Cima, V. Matozzo, M.G. Marin, L. Ballarin // Fish Shellfish Immunol. – 2000. – Vol. 10. – Pp. 677-693.

79.Cochennec-Laureau, N. Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae* / N. Cochennec-Laureau, M. Auffret, T. Renault // J Invertebr Pathol. – 2003. – Vol. 83. – P. 23-30.

80.Costa, M.M. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria / M.M. Costa, M. Prado-Alvarez, C. Gestal // Fish Shellfish Immunol. – 2009. – Vol. 26 – Pp. 515-523.

81.Coustau, C. Surface membrane polypeptides associated with hemocytes from *Schistosoma mansoni*-susceptible and -resistant strains of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) / C. Coustau, T. Yoshino // J. Exp. Parasitol. – 1994. – Vol. 63(1). – Pp. 82-89.

82.Coustau, C. *Schistosoma japonicum*: In vitro cultivation of miracidium to daughter sporocysts using *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line / C. Coustau, G.L. Ataev, J. Jourdane, T.P. Yoshino // Experimental Parasitology. – 1997. – Vol. 87. – Pp. 77-87.

83.Cooper, E.L. Invertebrate immunity: Another viewpoint / E.L. Cooper, G. Rinkevich, P. Valembois // Scand. J. Immunol. – 1992. – Vol. 35. – Pp. 247-266.

84.Curtis, L.A. Spatial heterogeneity in size and parasitism: how it arises in an estuarine snail population / L.A. Curtis // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. – 2007. – Vol. 352. – Pp. 317-330.

85.Degaffe, G. Susceptibility of *Biomphalaria glabrata* to infection with *Echinostoma paraensei*: correlation with the the effect of parasite secretory-excretory products on host hemocyte spreading / G. Degaffe, E.S. Loker // Exp. Parasitol. – 1998. – Vol. 71(1). – Pp. 64-72.

86.Dikkeboom, R. Differences between blood cells of juvenile and adult specimens of the pond snail *Lymnaea stagnalis* / R. Dikkeboom, W.P.W. Van der

Knapp, E.A. Meuleman, T. Sminia // Cell Tissue Res. – 1984. – Vol. 238. – Pp. 43-47.

87.Drozdowski, A. Wpływ pasozytniczych larw przywr na aktywnosc immunologiczna oślimaków / A. Drozdowski, E. Bikowska // Prz. Zool. – 1994. – Vol. 38(2). – Pp. 19-23.

88.Feng, S.Y. Heart rate and leucocyte circulation in *Crassostrea virginica* / S.Y. Feng // Biol. Bull. – 1965. – Vol. 128. – Pp. 198-210.

89.Feng, S.Y. Light and electron microscopy of the leucocytes of *Crassostrea virginica* (Mollusca: Pelecypoda) / S.Y. Feng, J.S. Feng, C.N. Burke, L.H. Khairallah // Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. – 1971. – Vol. 120. – Pp. 222-245.

90.Foley, D.A. Interaction of molluscs and foreign substances: the morphology and behavior of hemolymph cells in the American oyster, *Crassostrea virginica*, in vitro / D.A. Foley, T.C. Cheng // J. Invertebr. Pathol. – 1972. – Vol. 19. – Pp. 383-394.

91.Foley, D.A. Morphology, hematologic parameters, and behaviour of hemolymph cells of the quahaug clam, *Mercenaria mercenaria* / D.A. Foley, T.C. Cheng // Biol. Bull. – 1974. – Vol. 146. – Pp. 343-356.

92.Foley, D.A. A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria* / D.A. Foley, T.C. Cheng // J. Invertebr. Pathol. – 1975. – Vol. 25. – Pp. 189-197.

93.Ford, S.E. Comparative cytometric and microscopic analyses of oyster hemocytes / S.E. Ford, K.A. Ashton-Alcox, S.A. Kanaley // J. Invertebr. Pathol. – 1994. – Vol. 64. – Pp. 114-122.

94.Franceschi, C. Cytotoxicity and immunocyte markers in cells from the freshwater snail *Planorbis corneus* (L.) (Gastropoda Pulmonata): implications for the evolution of natural killer cells / C. Franceschi, A. Cossarizza, D. Monti, E. Ottaviani // Eur. J. Immunol. – 1991. – Vol. 21. – Pp. 489-493.

95.Friebel, B. Application of density gradient centrifugation for separation of eosinophilic and basophilic hemocytes from *Mytilus edulis* and characterisation of

both cell groups / B. Friebel, L.R. Renwrantz // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1995. – Vol. 112A. – Pp. 81-90.

96. Fryer, S.E. Phagocytosis of latex beads by *Biomphalaria glabrata* hemocytes is modulated in a strain – specific manner by adsorbed plasma components / S.E. Fryer, C.J. Bayne // *Dev. Comp. Immunol.* – 1996. – Vol. 20(1). – Pp. 23-37.

97. Furuta, E. Hemolymph cells and the platelet-like structures of the land slug, *Incilaria bilineata* (Gastropoda: Pulmonata) / E. Furuta, K. Yamaguchi, A. Shimozawa // *Anat. Anz.* – 1990. – Vol. 170. – Pp. 99-109.

98. Furuta, E. Haemolymph: blood cell morphology and function / E. Furuta, K. Yamaguchi // In *The biology of terrestrial molluscs* ed. by. Barker G.M., 2001. – Pp. 289-306.

99. García-García, E.L. Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families / E.L. García-García, M. Prado-Alvarez, B. Novoa, A. Figueras, C. Rosales // *Dev Comp Immunol.* – 2008 – 6 p.

100. George, W.C. The blood of gastropod molluscs / W.C. George, J.H. Ferguson // *J. Morphol.* – 1950. – № 86. – Pp. 315-324.

101. Glinski, Z. Molluscan immune defenses / Z. Glinski, J. Jarosz // In: *Zjawiska odporności przeciwzakaźnej u bezkręgowców.* – Wyd. UMC. – Lublin, 1997. – Pp. 90-100.

102. Gorbushin, A.M. Haemogram of *Littorina littorea* / A.M. Gorbushin, N.V. Iakovleva // *J. Mar Biological Association UK.* – 2006. – Vol. 86. – Pp. 1175-1181.

103. Granath, W.O. *Schistosoma mansoni*: Passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata* / W.O. Granath, T. Yoshino // *Exp. Parasitol.* – 1984. – Vol. 58. – Pp. 188-193.

104. Groulx, N. Membrane Reserves and Hypotonic Cell Swelling / N. Groulx, F. Boudreault, S.N. Orlov, R. Grygorczyk // *J. Membrane Biol.* – 2006. – Vol. 214. – Pp. 43-56.

105. 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 // J. Parasitology. – 2001. – Vol. 87(2). – Pp. 292-299.

106. Harris, K.R. The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the metastrongyloid *Angiostrongylus cantonensis*: light microscopy / K.R. Harris, T.C Cheng // Int. J. Parasitol. – 1975. – Vol. 5. – Pp. 521-528.

107. Haughton, L. Amebocytes and allied cells in *Invertebrata* / L. Haughton // J Roy Microscop. Soc. – 1934. – Vol. 54. – Pp. 246-462.

108. Hawkins, W.E. Ultrastructure of cardiac hemocytes and related cells in the oyster *Crassostrea virginica* / W.E. Hawkins, H.D. Howse // Trans. Am. Microsc. Soc. – 1982. – Vol. 101. – Pp. 241-252.

109. Hegaret, H. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation. Haemocyte types and morphology / H. Hegaret, G.H. Wikfors, P. Soudant // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. – 2003 – Vol. 293 – Pp. 237-248.

110. Hernroth, B. The influence of temperature and dose on antibacterial peptide response against lipopolysaccharide in the blue mussel, *Mytilus edulis* / B. Hernroth // Fish & Shellfish Immunology. – 2003. – Pp. 25-37.

111. Hine, P.M. The inter-relationships of bivalve haemocytes / P.M. Hine // Fish Shellfish Immunol. – 1999. – Vol. 9. – Pp. 367-385.

112. Hine, P.M. Interaction of phagocytosed *Bonamia* sp. (*Haplosporidia*) with haemocytes of oysters *Tiostrea chilensis* / P.M. Hine, B. Wesney // Dis. Aquat. Org. – 1994. – Vol. 20. – Pp. 219-229.

113. Hoffman, J.A. Phylogenetic perspectives in innate immunity / J.A. Hoffman // Science. – 1999. – Vol. 284. – Pp. 1313-1318.

114. Hooper, C. Ganglioneuritis causing high mortalities in farmed Australian abalone (*Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*) / C. Hooper, P. Hardy-Smith, J. Handler // Aust. Vet J. – 2007. – Vol. 85. – Pp. 188-193.

115. Horak, P. Lectins in snail-trematode immune interactions: a review / P. Horak, W.P.W. Van der Knaap // *Parasitologica*. – 1997. – Vol. 44. – Pp. 161-172.

116. Hose, J.E. A decapod classification scheme integrating morphology, cytochemistry and function / J.E. Hose, G.C. Martin, A.S. Gerard // *Biol. Bull.* – 1990. – Vol. 178. – Pp. 33-45.

117. Huffman, J.E. Cell types and hydrolytic enzymes of soft shell clam (*Mya arenaria*) hemocytes / J.E. Huffman, M.R. Tripp // *J. Invertebr. Pathol.* – 1982. – Vol. 40. – Pp. 68-74.

118. Humbert, E. Refractoriness of host haemocytes to parasite immunosuppressive factors as a putative resistance mechanism in the *Biomphalaria glabrata* – *Echinostoma caproni* system / E. Humbert, C. Coustau // *Parasitology*. – 2001. – Vol. 122. – Pp. 651-660.

119. Jourdane, J. Study of the mechanisms of rejection in incompatible mollusk-schistosome pairs from infestations by means of a natural route or by microsurgical transplantations of parasite stages / J. Jourdane // *Acta Tropica*. – 1982. – Vol. 39. – Pp. 325-335.

120. Jourdane, J. The two-phase recognition process of allografts in Brazilian strain of *Biomphalaria glabrata* / J. Jourdane, T.C. Cheng // *The Journal of Invertebrate Parasitology*. – 1987. – Vol. 49. – Pp. 145-158.

121. Kanost, M.R. Innate immune responses of *Manduca sexta* / M.R. Kanost, J.B. Nardi // In: Goldsmith M. and Marec F., eds. *Molecular Biology and Genetics of thelepidoptera*. – Boca Raton: CRC Press, 2010. – Pp. 271-291.

122. Klebanoff, S.J. The neutrophil: function and disorders / S.J. Klebanoff, R.A. Clark. – Amsterdam: Elsevier, 1978. – 810 p.

123. Kress, A. Untersuchungen zur Histologie, Autotomie und Regeneration dreier *Doto*-arten *Doto coronata*, *Doto pinnatifida*, *Doto fragilis* (Gastropoda, Opisthobranchiata) / A. Kress // *Rev. de Suisse Zool.* – 1968. – Vol. 75. – Pp. 35-303.

124. Lacey A.J. (Ed.) – *Light microscopy in biology. A practical approach.* / A.J. Lacey. – IRL Press at Oxford University Press, 1989. – 213 p.



125. Lackie, A.M. Evasion of the insect immune response by *Moniliformis dubius* (*Acanthocephala*): further observations on the origin of the envelope / A.M. Lackie, J.M. Lackie // *Parasitology*. – 1979. – Vol. 79. – Pp. 297-301.

126. Lackie, A.M. Behaviour in vitro of separated fractions of haemocytes of the locust *Schistocerca gregaria* / A.M. Lackie, I.M. Huxham // *Cell Tissue Res.* – 1988. – Vol. 251. – 677 p.

127. Langand, J. Cost of resistance, expressed as a delayed maturity, detected in the host-parasite system *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* / J. Langand, J. Jourdane, C. Coustau, B. Delay, S. Morand // *Heredity*, 1998. – 15 p.

128. Lefebvre, C. Cathepsin and cystatin B gene expression discriminates immune coelomic cells in the leech *Theromyzon tessulatum* / C. Lefebvre, F. Vandebulcke, B. Bocquet // *Dev. Comp. Immunol.* – 2008. – Vol. 32(7). – Pp. 795-807.

129. Lie, K.J. Molluscan host reactions to helminthic infection. Immune responses in *Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology, and Immunoprophylaxis* / K.J. Lie, K.H. Jeong, D. Heyneman // Boca raton crc Press. – 1987. – Pp. 211-270.

130. Lie, K.J. Studies on resistance in snails. Evidence of interference with the defense reaction in *Biomphalaria glabrata* by trematode larvae / K.J. Lie, D. Heyneman // *Journ. of Parasitol.* – 1976. – Vol. 62. – Pp. 608-615.

131. Lie, K.J. Studies on resistance in snails. Tissue reactions to *Echinostoma lindoense* sporocysts in sensitized and resensitized *Biomphalaria glabrata* / K.J. Lie, D. Heyneman // *Journ. of Parasitol.* – 1976. – Vol. 62. – Pp. 51-58.

132. Lie, K.J. Studies on resistance in snails. Tissue reactions to *Echinostoma lindoense* in naturally resistant *Biomphalaria glabrata* / K.J. Lie, D. Heyneman // *Journ. of Parasitol.* – 1976. – Vol. 62. – Pp. 292-297.

133. 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, H.K. Lim // *Int. J. Parasitol.* – 1975. – Vol. 5. – Pp. 627-631.

134. Lie, K.J. The origin of Amoebocytes in *Biomphalaria glabrata* /K.J. Lie, D. Heyneman, P. Yau // J. Parasitol. – 1975. – Vol. 63. – Pp. 574-576.
135. Lockyer, A.E. Trematodes and snails: an intimate association / A.E. Lockyer, C.S. Jones, L.R. Noble // Can. j. Zool. – 2004. – Vol. 82. – Pp. 251-269.
136. Loker, E.S. Gastropod immunobiology / E.S. Loker // In Soderhall K. (ed.) Invertebrate immunity. – Landes Bioscience and Springer Science Business Media, 2010. – Pp. 17-43.
137. Loker, E.S. Immunity to trematode larvae in the snail *Biomphalaria* / E.S. Loker, C.J. Bayne // Zoological society of London Symposia. Immune mechanisms in invertebrate vectors. – Oxford University Press, 1986. – Pp. 199-220.
138. Loker, E.S. Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of the juveniles of the R2 strain of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) /E.S. Loker, C.J. Bayne, P.M. Buckley, K.T. Kruse // J. Parasitology. – 1982. – Vol. 68. – Pp. 84-94.
139. Lopez, C. Enzyme characterisation of the circulating haemocytes of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia) / C.Lopez, M. J.Carballal, C. Azevedo, A. Villalba // Fish Shellfish Immunol. – 1997. – Vol. 7. – Pp. 595-608.
140. Lopez, C. Morphological characterization of hemocytes of the clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia) / C.Lopez, M.J.Carballal, C. Azevedo, A. Villalba // J. Invertebr. Pathol. – 1997. – Vol. 69. – Pp. 51-57.
141. Matricón-Gondran, M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. Characterization of hemocytes and fixed phagocytes. / M. Matricón-Gondran, M. Letocart // Exp. Parasitol. – 1999. – Vol. 74(3). – Pp. 224-234.
142. Medzhitov, R. Innate immune recognition / R.Medzhitov, C.A. Janeway // Annu. Rev.Immunol. – 2002. – 20 p.
143. Mitta, G. Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel / G. Mitta, F. Vandenbulcke, T. Noël, B. Romestand, J.C. Beauvillain, M. Salzet, P. Roch // Journal of cell science. – 2000. – Vol. 113(15). – Pp. 2759-2769.

144. Montes, J.F. Characterization and localization of an Mr 225 kDa polypeptide specifically involved in the defence mechanisms of the clam *Tapes semidecussatus* / J.F. Montes, M. Durfort, J. Garcia-Valero // Cell Tissue Res. – 1995. – Vol. 280. – Pp. 27-37.

145. Moore, C.A. Cytochemical aspects of *Mercenaria mercenaria* hemocytes / C.A. Moore, A.F. Eble // Biol. Bull. – 1977. – Vol. 152. – Pp. 105-119.

146. Moore, C.A. The cytology and cytochemistry of the haemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles / C.A. Moore, D.M. Lowe // J. Invertebr. Pathol. – 1977. – Vol. 29. – Pp. 18-30.

147. Mourton, C. Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): in vitro system establishment / C. Mourton, V. Boulo, D. Chagot, D. Hervio, E. Bachere, E. Mialhe, H. Grizel // J. Invertebr. Pathol. – 1992. – Vol. 59. – Pp. 235-240.

148. Nakamura, T. Immune spleen cell-mediated protein against fatal Hantaan virus infection in infant mice / T. Nakamura, R. Yanagihara, C.J. Gibbs, D.C. Gajdusek // Journal of Infectious Diseases. – 1985. – Vol. 151. – Pp. 691-697.

149. Nakayama, K. Morphological and functional characterization of hemocytes in the giant clam *Tridacna crocea* / K. Nakayama, A.M. Nomoto, M. Nishijima, T. Maruyama // J. Invertebr. Pathol. – 1997. – Vol. 69. – Pp. 105-111.

150. 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. – Pp. 35-40.

151. Nunez, P.E. Excretory-secretory products of *Trichobilharzia ocellata* and their modulating on the internal defence system of *Lymnaea stagnalis* / P.E. Nunez, M.J. Molenaar, W. Lageweg, K.W. Li, M. De Jong-Brink // Parasitology. – 1997. – Vol. 114. – Pp. 135-144.

152. Ottaviani, E. Selected decrease of haemocytes of the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata) after bacteria injection / E. Ottaviani // Experientia. – 1989. – Vol. 45. – Pp. 368-369.

153. Ottaviani, E. The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems /E. Ottaviani, C. Franceschi // Immunol. Today. – 1997. – 18 p.

154. Pan, C.T. The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus* / C.T. Pan // Bull Mus Comp Zool Harvard. – 1958. – Vol. 119. – Pp. 237-299.

155. Pauley, G.B. Bacterial clearance in the California sea hare, *Aplysia californica* / G.B. Pauley, S.M. Krassner, F.A. Chapman // J. Invert. Pathol. – 1971. – Vol. 18. – Pp. 227-239.

156. Pipe, R.K. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis* / R.K. Pipe // Histochem. – 1990. – № 22. – Pp. 595-603.

157. 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 // Biochim. Biophys. Acta. – 2004. – Vol. 1692. – Pp. 25-33.

158. Prince, J.S. Presumptive alphavirus in the gastropod mollusc, *Aplysia californica* / J.S. Prince // Bull. Mar. Sci. – 2003. – Vol. 73 – Pp. 673-677.

159. Prowse, R.H. In vitro phagocytosis by amebocytes from the haemolymph of *Helix aspersa* (Muller) / R.H. Prowse, N.N. Tait // Immunol. – 1969. – Vol. 17. – Pp. 437-443.

160. Rasmussen, L.P. An electron microscope study of the circulating leucocytes of the marine mussel, *Mytilus edulis* / L.P. Rasmussen, D.E. Hage, O. Karlog // J. Invertebr. Pathol. – 1985. – Vol. 45. – Pp. 158-167.

161. Ratcliffe, N.A. Studies of pro-phenoloxidase and protease of *Blaberus craniifer* haemocytes / N.A. Ratcliffe, K. Söderhäll // Insect Biochemistry. – 1985. – Vol. 15. – Pp. 803-810.

162. Raucher, D. Characteristic of a membrane reservoir buffering membrane tension / D. Raucher, M. Sheetz // Biophysical J. – 1999. – Vol. 77. – Pp. 1992-2002.

163. Reade, P.C. Phagocytosis in invertebrates / P.C. Reade // Australian. J. Exp. Biol Med. Sci. – 1968. – Vol. 46. – Pp. 219-229.

164. Renwrantz, L. Size determination of hemocytes from the American oyster, *Crassostrea virginica*, and the description of a phagocytosis mechanism / L. Renwrantz, T. Yoshino, T. Cheng, K. Auld // Zool. Jb. Physiol. – 1979. – Vol. 83. – Pp. 1-12.

165. Renwrantz, L.R. Discriminative ability and function of the immunobiological recognition system of the snail *Helix pomatia* / L.R. Renwrantz, W. Shancke, H. Harm, H. Erl, H. Leibsch, J. Gercken // J Comp Physiol. – 1981. – Vol. 141. – Pp. 477-488.

166. Reungpatthanaphong, P.L. Rhodamine B as a mitochondrial probe for measurement and monitoring of mitochondrial membrane potential in drug-sensitive and -resistant cells / P.L. Reungpatthanaphong, S. Dechsupa, J. Meesungnoen, C. Loetchutinat, S. Mankhetkorn // J. Biochem. Biophys. Methods. – 2003. – Vol. 57(1). – Pp. 1-16.

167. Ribeiro, C. Insect immunity: the haemocytes of the armyworm, *Mythimna unipuncta* (*Lepidoptera: Noctuidae*) and their role in defence reactions. In vivo and in vitro studies / C. Ribeiro, N. Simões, M. Brehélin // J. Insect Physiol. – 1996. – Vol. 42. – Pp. 815-822.

168. Ruddell, C.L. The fine structure of oyster agranular amebocytes from regenerating mantle wounds in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* / C.L. Ruddell // J. Invertebr. Pathol. – 1971. – Vol. 18. – Pp. 260-268.

169. Ruddell, C.L. The fine structure of the granular amebocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* / C.L. Ruddell // J. Invertebr. Pathol. – 1971. – Vol. 18. – Pp. 269-275.

170. Russell-Pinto, F. Haemocytes in *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia): distinct cell types engage in different responses to sheep erythrocytes / F. Russell-Pinto, R. Reimao, M. De Sousa // Fish Shellfish Immunol. – 1994. – Vol. 4 – Pp. 383-397.

171. Sauerländer, R. The African giant snail (*Achatina fulica*) as experimental intermediate host of *Angiostrongylus vasorum* (*Nematoda*) / R. Sauerländer, J. Eckert // Z. Parasitenkd. – 1974. – Vol. 44(1). – Pp. 59-72.

172. Šíma, P. Annelid coelomocytes and haemocytes: roles in cellular immune reactions / P. Šíma // In: Větvička V., Šíma P., Cooper E.L., Bilej M., Roch P., eds. Immunology of annelids. – Boca Raton, CRC Press. – 1994. – Pp. 115-165.

173. Schmidt, O. Role of adhesion in arthropod immune recognition / O. Schmidt, K. Söderhäll, U. Theopold // Annu. Rev. Entomol. – 2010. – Vol. 55. – Pp. 485-504.

174. 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 // Z. Zellforsch. – 1972. – Vol. 130. – Pp. 497-526.

175. Sminia, T. Gastropods. In: Invertebrate Blood Cells. / T. Sminia. – Academic Press, 1981. – Pp. 191-232.

176. Sminia, T. Encapsulation of foreign materials experimentally introduced into the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. An electron microscopic and autoradiographic study / T. Sminia, E. Borghart-Reiders, A.W. Van de Linde // Cell. Tiss. Res. – 1974. – Vol. 153. – 307 p.

177. Sminia, T. A comparative morphological and enzyme histochemical study on blood cells of the fresh water snails *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata* and *Bulinus runcatus* / T. Sminia, L.H. Barendsen // J. Morphol. – 1980. – Vol. 165. – Pp. 31-39.

178. Smith, S.N. The photophysics of Lissamine rhodamine-B sulphonyl chloride in aqueous solution: implications for fluorescent protein-dye conjugates / S.N. Smith, R.P. Steer // J. Photochemistry and photobiology. – A. Chemistry. – 2001. – Vol. 139. – Pp. 151-156.

179. Söderhäll, K. (ed.) Invertebrate immunity / K. Söderhäll. – Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, 2010. – 316 p.

180. Song, L. Bivalve immunity / L. Song, L. Wang, L. Qiu, H. Zhang // In Söderhäll K. (ed), Invertebrate immunity. – Landes Bioscience and Springer Science+Business Media. – 2010. – Pp. 44-60.

181. Soto-Jimenez, F.M. Selected trace metals in oysters (*Crassostrea iridiscens*) and sediments from the discharge zone of the estuarine sewage outfall in

Mazatlan Bay (south-east Gulf of California): chemical fractions and bioaccumulation factors / F.M. Soto-Jimenez, F. Paez-Osuna, F. Morales-Hernández // *Environ. Pollut.* – 2001. – Vol. 114. – Pp. 357-370.

182. Sparks, A.K. Studies of the normal postmortem changes in the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) / A.K. Sparks, G.B. Pauley // *J. Insect. Pathol.* – 1964. – Vol. 6 – Pp. 78-101.

183. Stang-Voss, C. Zur ultrastruktur der blutzellen wirbelloser tiere III. Ober die haemozyten der schnecke *Lymnaea stagnalis* L. (*pulmonata*). / C. Stang-Voss // *Z. Zellforsch.* – 1970. – Vol. 107. – Pp. 141-156.

184. Stein, E. The coelomocytes of the earthworm *lumbricus terrestris*: morphology and phagocytic properties / E. Stein, R.R. Avtalion, E.L. Cooper // *J. Morphol.* – 1977. – Vol. 153. – Pp. 467-477.

185. Stuart, A.E. The reticuloendothelial apparatus of the lesser octopus, *Eledone cirrosa* / A.E. Stuart // *J. Pathol Bacteriol.* – 1968. – Vol. 96. – Pp. 401-412.

186. Sun, J.F. Histology, ultrastructure and morphogenesis of a rickettsia – like organism causing diseases in the oyster, *Crassostrea ariakensis* Gould / J.F. Sun, X.Z. Wu // *J. Invertebr. Pathol.* – 2004. – Vol. 86. – Pp. 77-86.

187. Sullivan, J.T. Long-term survival of geterotopic allografts of the amoebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata* (Molluska: Pulmonata) / J.T. Sullivan // *Trans. Am. Microsc. Soc.* – 1990. – Vol. 109. – Pp. 52-60.

188. Sullivan, J.T. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts in *Biomphalaria glabrata* implanted with amoebocyte-producing organ allografts from resistant snails / J.T.Sullivan, J.V. Spence, J.K. Nunez // *J. Parasitol.* – 1995. – Vol. 81(5). – Pp. 829-833.

189. Sullivan, J.T. Mitotic responses to extracts of miracidia and cercariae of *Schistosoma mansoni* in the amebocyte-producing organ of the snail intermediate host *Biomphalaria glabrata* / J.T. Sullivan, S.S. Pikios, A.Q. Alonzo // *Parasitol.* – 2004. – Vol. 90. – Pp. 92-96.

190. Suresh, K. Number and types of hemocytes in *Sunetta scripta* and *Villoritu cyprinoides* var. *cochinensis* (Bivalvia), and leukocytosis subsequent to

bacterial challenge / K. Suresh, A. Mohandas // J. Invertebr. Pathol. – 1990. – Vol. 55. – Pp. 312-318.

191. Terpetschnig, E. Polarization Standards / E. Terpetschnig, Y. Povrozin, J. Eichorst. – ISS. Inc., 2002. – 120 p.

192. Tripp, M.R. Disposal by the oyster of intracardially injected red blood cells of vertebrates / M.R. Tripp // Proc. Nat. Shellfisheries Assoc., 1958. – Vol. 48. – Pp. 143-147.

193. Tripp, M.R. Mechanisms of removal of injected microorganisms from the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin) / M.R. Tripp // Biol. Bull Marine Biol Lab. – 1960. – Vol. 119. – Pp. 210-223.

194. Tripp, M.R. Phagocytosis by hemocytes of the hard clam, *Mercenaria mercenaria* / M.R. Tripp // J. Invertebr. Pathol. – 1992. – Vol. 59. – Pp. 222-227.

195. Tripp, M.R. The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail *Austalorbis glabratus* / M.R. Tripp // J. Parasitol. – 1961. – Vol. 47. – Pp. 745-751.

196. Tripp, M.R. Defense mechanisms of Mollusks / M.R. Tripp // J. Ret. Soc. – 1970. – Vol. 7. – Pp. 173-182.

197. Van Horn, D.J. Gut bacterial community composition in three planorbid snail species / D.J. Van Horn, J.R. Hall, E.S. Loker // J. Parasitol. – 2008. – Pp. 17-24.

198. Vasta, G.R. Biological roles of lectins in innate immunity: molecular and structural basis for diversity in self/non-self recognition / G.R. Vasta, H. Ahmed, S. Tasumi // Adv. Exp. Med. Biol. – 2007. – Vol. 598. – P. 389-406.

199. Wagge, L.E. The activity of amoebocytes and of alkaline phosphatases during the regeneration of the shell in the snail, *Helix aspersa* / L.E. Wagge // J. Microsc. Sci. – 1951. – Vol. 92(3). – Pp. 307-321.

200. Wagge, L.E. Amoebocytes / L.E. Wagge // Internat. Rev. Cytol. – 1955. – Vol. 4. – Pp. 31-78.

201. Wajdi, N. Penetration by the miracidia of *Schistosoma mansoni* into the snail host / Wajdi N. // J. Helminthol. – 1966. – Vol. 40. – Pp. 235-244.



202. Weigent, D.A. Interactions between the endocrine and immune systems: common hormones and receptors / D.A. Weigent, J.E. Blalock // *J. Immun. Rev.* – 1987. – Vol. 100. – Pp. 79-108.

203. Wilson, R.A. An investigation of the mechanism of infection by digenetic trematodes: the penetration of the miracidium of *Fasciola hepatica* into its snail host *Lymnaea truncatula* / R.A. Wilson, R. Pullin, J. Denison // *J. Parasitology.* – 1971. – Vol. 63. – Pp. 491-506.

204. Wen, C.H. Light and electron microscopy of hemocytes of the hard clam, *Meretrix lusuria* (Roding) / C.H. Wen, G.H. Kou, S.N. Chen // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1994. – Vol. 108. – Pp. 270-286.

205. Wootton, E.C. Structural and functional characterization of the blood cells of the bivalve mollusk, *Scrobicularia plana* / E.C. Wootton, R.K. Pipe // *Fish Shellfish Immunology.* – 2003. – Vol. 15. – Pp. 249-262.

206. Xing, J. Endoenzymes associated with haemocyte types in the scallop *Chlamys ferrerii* / J. Xing, W.B. Zhan, L. Zhou // *Fish Shellfish Immunol.* – 2002. – Vol. 13. – Pp. 271-278.

207. Yoshino, T.P. The ultrastructure of circulating hemolymph cells of the marine snail *Cerithidea californica* (Gastropoda: Prosobranchiata) / T.P. Yoshino // *J. Morphol.* – 1976. – Vol. 150. – Pp. 485-494.

208. Yamaguchi, K. Morphological and functional studies on hemolymph cells of land slug, *Incilaria bilineata*, in vitro and in vivo / K. Yamaguchi, E. Furuta, A. Shimozawa // In Kuroda Y, Kurstak E, Maramorosch K. (eds), *Invertebrate and Fish Tissue Culture.* – Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1988. – Pp. 247-250.

209. Yamaguchi, K. Chronic skin allograft rejection in terrestrial slugs / K. Yamaguchi, E. Furuta, H. Nakamura // *Zool. Sci.* – 1999. – Vol. 16. – Pp. 485-495.

210. Zbikowska, E. Comparative quantitative studies of hemocytes of the snails: *Helix pomatia* L. and *Lymnaea stagnalis* (L.) (Gastropoda: Pulmonata) / E. Zbikowska // *Biol. Bull. Poznań.* – 1998. – Vol. 35. – Pp. 25-32.

211. Zhang S.M. Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate / S.M. Zhang, C.M. Adema, T.B. Kepler // *Science.* – 2004. – Vol. 305. – Pp. 251-254.

212. Zhang S.M. Representation of an immune responsive gene family encoding fibrinogen-related proteins in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni* / S.M. Zhang, E.S. Loker // Gene. – 2004. – Pp. 255-266.