Е. Е. Прохорова, Г. Л. Атаев

ЗАЩИТНЫЕ РЕАКЦИИ МОЛЛЮСКОВ СЕМЕЙСТВА PLANORBIDAE (GASTROPODA, PULMONATA) НА ТРЕМАТОДНУЮ ИНВАЗИЮ

(Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 05-04-48520, гранта Министерства образования 2.1.1/5290, стипендии Фонда им. В. И. Вернадского и стипендии Правительства Санкт-Петербурга)

Проведен анализ клеточных и гуморальных реакций у легочных моллюсков Planorbarius corneus при заражении партенитами трематод. Показано наличие в гемолимфе изученных пульмонат двух популяций гемоцитов — гранулоцитов и гиалиноцитов. Показано, что их соотношение меняется в зависимости от размера моллюсков и их зараженности. Выявлена разная интенсивность экспрессии генов факторов защитных реакций в гемолимфе и гепатопанкреасе зараженных разными видами трематод и незараженных моллюсков.

Ключевые слова: защитные реакции, моллюски, партениты трематод, иммунные реакции, клеточные реакции, гуморальные реакции, гемоциты.

E. Prokhorova, G. Ataev

ANTY-TREMATODE DEFENSE REACTIONS OF PLANORBIDAE SNAILS (GASTROPODA, PULMONATA)

The detection of the resistance genetic mechanisms is one of the urgent problems of the comparative immunology. Multitude genes encoding different factors of snails defense reactions operate the whole immune system. For the resistance genetic basis studying classical and modern molecular methods are used. The classical identification of the resistance inheritance is based on the comparison of the susceptibility level in parasite-host systems and crossings-selection methods, in which different snail lines are used.

Keywords: defense reactions, snails, trematoda parthenites, immune reactions, cell reactions, humoral relations, haemocytes.

Сведения о функционировании системы иммунитета у организмов разных таксонов составляют основу сравнительно-иммунологических построений, раскрывающих пути её становления. Легочные брюхоногие моллюски (Pulmonata)

в этом отношении являются одной из наиболее интенсивно изучаемых моделей среди беспозвоночных. Многие из них являются промежуточными хозяевами трематод — возбудителей опасных заболеваний человека и животных.

Основными эффекторными элементами защитной системы пульмонат являются циркулирующие клетки гемолимфы — гемоциты [3; 7]. Гемоциты обеспечивают распознавание, изоляцию и элиминацию чужеродных факторов, а также восстановление внутренней среды от последствий защитных реакций [15]. Они проявляют свойства, характерные для фагоцитов, вовлеченных в реакции врожденного иммунитета: способны к хемотаксису, адгезии, фагоцитозу, генерации активных форм кислорода [3; 17].

Гуморальные компоненты гемолимфы также участвуют в реализации всех этапов защитных реакций пульмонат [10]. У моллюсков с разным уровнем резистентности к трематодам выявлены различия в интенсивности экспрессии факторов защитных реакций [27; 19]. Однако остаются невыясненными механизмы регуляции клеточного и гуморального ответов, пути взаимодействия гуморальных и клеточных компонентов.

Поэтому несмотря на большой интерес к данному вопросу сведения о защитных реакциях легочных моллюсков остаются во многом фрагментарными. Для выяснения механизмов формирования защитных реакций пульмонат необходим комплексный анализ клеточных и гуморальных компонентов этой системы, а также расширение количества изучаемых моделей.

В рамках данной работы был проведен анализ клеточных и гуморальных защитных реакций лёгочных моллюсков *Planorbarius corneus* (сем. Planorbidae) на заражение трематодами.

Объектом исследования послужили моллюски *Planorbarius corneus*, собранные в водоёмах Ленинградской области, часть которых была заражена трематодами *Cotylurus* sp. (сем. Strigeidae), *Notocotylus* sp. (сем. Notocotylidae), *Plagiorchis* sp. (сем. Plagiorchiidae), *Bilharziella polonica* (сем. Schistosomatidae), представителем сем. Echinostomatidae. Первоначально зараженность определяли по эмиссии церкарий, а позднее — уточняли в ходе вскрытия улиток.

Гемолимфу для анализа забирали с помощью пастеровской пипетки из кровеносного синуса в головном отделе моллюсков. ***Анализ клеток гемолимфы проводили*** в капле на предметном стекле с лунками, для длительного наблюдения (4–8 часов) гемолимфу инкубировали во влажной камере. Подсчет числа клеток осуществляли в камере Горяева. Препараты фотографировали в режимах светлого поля и фазового контраста (микроскоп Leica-DM 5000). ***Цитофлуориметрический анализ*** использовали для изучения особенностей клеточного состава гемолимфы *Planorbarius corneus*, зараженных разными видами трематод, для определения соотношения различных типов гемоцитов у моллюсков разных размеров, а также для оценки фагоцитарной активности гемоцитов. В последнем случае моллюскам предварительно инъецировали суспензии бактерий *Escherichia coli* и *Staphilococcus aureus*, меченных флуоресцеин-5-изотиоционатом (ФИТЦ). Контрольной группе вводили физиологический раствор. Гемолимфу забирали непосредственно перед анализом на проточном цитометре (Beckman Coulter). ***Для выявления пероксидазы*** в гемоцитах был адаптирован метод Амитэджа для мазков крови [5].

Экспрессию генов, кодирующих факторы защитных реакций, изучали на уровне транскрипции. Тотальную РНК изолировали с использованием реактива «TRIzol Reagent» в соответствии с инструкцией производителя. По данным электрофореза (в 1%-ном агарозном геле) полученные препараты РНК (A260/280 = 1,9) не содержали примесей ДНК и продуктов деградации РНК. Концентрацию РНК выравнивали по содержанию 28S рРНК. Синтез кДНК в реакции обратной транскрипции проводили на тотальной РНК со случайными праймерами или олиго(dT)-затравкой. ***Полимеразную цепную реакцию*** (ПЦР) на полученной кДНК проводили со специфическими праймерами для амплификации предположительно транскрибируемого участка. ***Гель-электрофорез*** ПЦР-продуктов проводили в 1,4%-ной агарозе или в 8%-ном ПААГ, гели окрашивали соответственно бромистым этидием или $AgNO_3$ [30]. В качестве маркеров использовали ДНК-маркеры молекулярных весов («Сибэнзим», Новосибирск).

Компьютерные программы. Для фотографирования препаратов клеток и тканей, для оценки размеров и площадей клеток была использована программа «Image Scope». Для работы с нуклеотидными последовательностями использовали открытые базы данных «GenBank» на сервере NCBI, программы «BLAST», «CLUSTAL W». Для подбора праймеров и расчета условий амплификации использовали программу «Gene Runner 3,0», для оценки интенсивности зон электрофореза — программу «Scion Image 4».

Клеточные реакции

Гемоциты Planorbarius corneus представлены двумя основными типами — гранулоцитами и гиалиноцитами. Гранулоциты — хорошо распластывающиеся на субстрате клетки размером 9,5±5,94 × 12,95±7,89 мкм, формирующие при этом филоподии и лобоподии. Они имеют овальные ядра размером 4,08±2,76 × 5,26±2,18 мкм. Среднее ядерно-цитоплазматическое отношение — 0,12 (рис. 1, *а, б, в*). Внутренняя часть цитоплазмы этих клеток содержит многочисленные гранулы и везикулы. Гиалиноциты — округлые клетки размером 6,12±1,24 × 8,13±,54 мкм. Они имеют округлые или овальные ядра размером 2,56±1 × 3,32±1,35 мкм. Среднее ядерно-цитоплазматическое отношение — 0,25. Гиалиноциты способны формировать лобоподии (рис. 1, *г, д*).

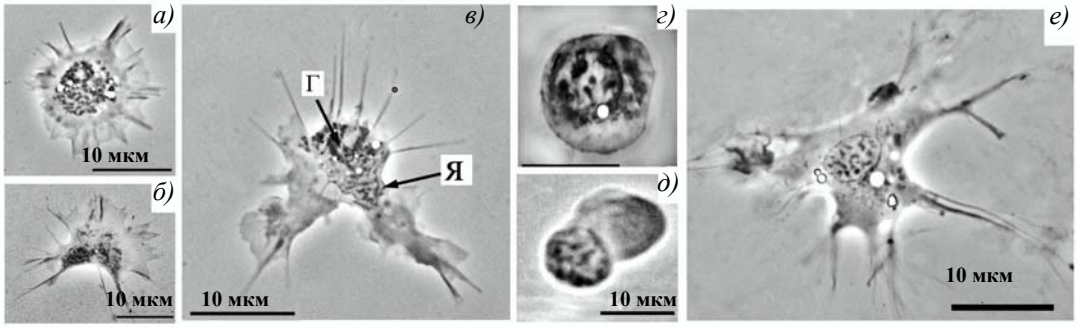


Рис. 1. Клеточные элементы гемолимфы моллюска *Planorbarius corneus*:
а, б, в — гранулоциты, *г, д* — гиалиноциты, *е* — крупные гранулоциты

Установлено, что гемоциты *Planorbarius corneus* сохраняют жизнеспособность во влажной камере на протяжении 4–8 ч (в зависимости от объема пробы и физиологического состояния моллюска). В дальнейшем происходит гибель клеток гемолимфы. Инкубирование с суспензиями бактерий значительно ускоряет этот процесс.

При инкубировании во влажной камере более 5 ч среди гранулоцитов преобладают крупные клетки с ядрами, содержащими крупные глыбки гетерохроматина (рис. 1, *е*). Морфологически похожие клетки были описаны ранее в составе капсул вокруг дегенерирующих спороцист и трансплантатов тканей [23]. Высказано предположение, что такие гранулоциты более устойчивы к патологическим изменениям, происходящим в организме зараженного моллюска [20]. Они же оказываются наиболее жизнеспособными при инкубировании, в условиях накопления продуктов обмена веществ. Можно предположить, что крупные гранулоциты являются специализированной группой гемоцитов, участвующих в процессах инкапсуляции. Гранулоциты также часто формируют скопления, включающие от 2 до 10 клеток (рис. 2).

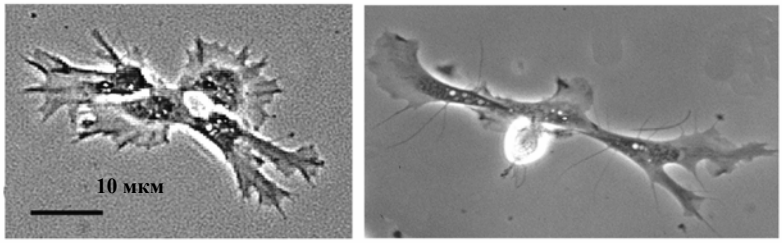


Рис. 2. Агрегации гранулоцитов *Planorbarius corneus.*
Фотографирование — в режиме PH. Объектив — 100^x.

Гранулоциты за время наблюдения распластываются на субстрате, изменяя форму и перемещаясь относительно первоначального места прикрепления. Гиалиноциты медленнее закрепляются на субстрате и в течение времени наблюдения практически не меняют свою форму (рис. 3).

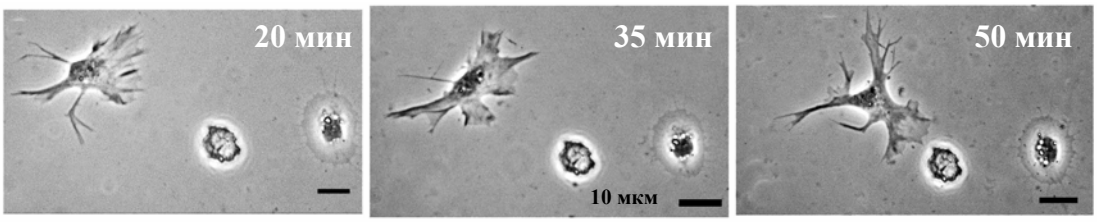
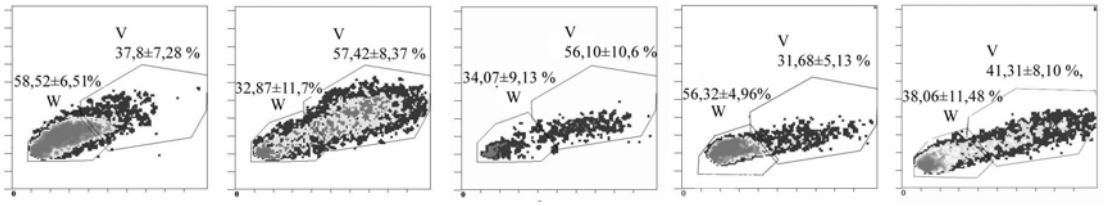


Рис. 3. Серия последовательных фотографий, иллюстрирующих характер изменения гемоцитов *Planorbarius corneus* при инкубировании.
Указано время инкубирования. Справа — гранулоцит, слева — гиалиноцит.
Фотографирование — в режиме *PH*. Объектив — 100^x

Способность гранулоцитов к распластыванию на субстрате, адгезии к другим клеткам подтверждает их основную роль в процессах инкапсуляции чужеродных объектов [33]. Гранулоциты различной формы были описаны ранее в составе капсул вокруг трансплантатов и паразитов [24; 12]. Неоднократно предпринимались попытки классифицировать различные морфотипы гранулоцитов [2].

При изучении гемоцитов *in vitro* нами отмечена большая вариабельность не только размеров, но и формы гранулоцитов: на протяжении нескольких часов клетки могут менять форму, размер и количество псевдоподий. На наш взгляд, это подтверждает принадлежность описанных ранее морфотипов гранулоцитов к одному клеточному типу, хотя и весьма полиморфному.

На основе цитофлуориметрического анализа в гемолимфе зараженных и незараженных моллюсков *Planorbarius corneus* выявлены две популяции гемоцитов: мелкие клетки с небольшим числом гранул и крупные, более гранулярные клетки. По относительным размерам и гранулярности данные популяции гемоцитов соответствуют описанным выше гранулоцитам и гиалиноцитам (рис. 4).



Незараженный | Зараженный *Cotylurus* sp. | Зараженный *Plagiorchis* sp. | Зараженный *Notocotylus* sp. | Зараженный *Notocotylus* sp.

Рис. 4. Цитофлуорограмма гемолимфы моллюсков *Planorbarius corneus*. Регион W — гиалиноциты, регион V — гранулоциты. Ось абсцисс — прямое светорассеивание (пропорционально диаметру гемоцитов), ось ординат — боковое светорассеивание (характеризует структуру и гранулярность гемоцитов)

У незараженных моллюсков гиалиноциты составляют 58,52±6,51%, а гранулоциты — 37,08±7,28% от всех гемоцитов, при этом не выявлено четкой границы между выделенными популяциями. У моллюсков, зараженных трематодами *Cotylurus* sp., четко выделяются две популяции клеток. Гиалиноциты составляют 32,87±11,7%, а гранулоциты — 57,42±8,37% от всех клеток гемолимфы. У моллюсков, зараженных партенитами *Notocotylus* sp., наблюдается схожая картина: гранулоциты и гиалиноциты составляют соответственно 34,07±9,13% и 56,10±10,6% от всех гемоцитов. У моллюсков, зараженных трематодами *Plagiorchis* sp., соотношение популяций клеток оказывается близким к таковому у незараженных особей: у гранулоцитов — 31,68±5,13%, у гиалиноцитов — 56,32±4,96%. Однако в этом случае отмечена более четкая граница между гранулоцитами и гиалиноцитами. У катушек, зараженных партенитами сем. Echinostomatidae, гранулоциты составляют в среднем 41,31±8,10%, а гиалиноциты — 38,06±11,48% от всех гемоцитов.

Таким образом, заражение различными видами трематод по-разному влияет на соотношение популяций гемоцитов в гемолимфе моллюсков (рис. 5). Похожие результаты были получены при изучении гемоцитов двустворчатых моллюсков: инъецирование мидиям бактерий *Salmonella typimurium* приводит к изменению соотношения типов клеток в гемолимфе [21]. Можно предположить, что заражение приводит к специализации гемоцитов, принимающих участие в клеточном ответе.

Различный клеточный ответ может быть связан с разными стратегиями развития трематод в моллюске [4; 13]. Одним из факторов, способных влиять на соотношение циркулирующих гемоцитов, может быть формирование гемоци-

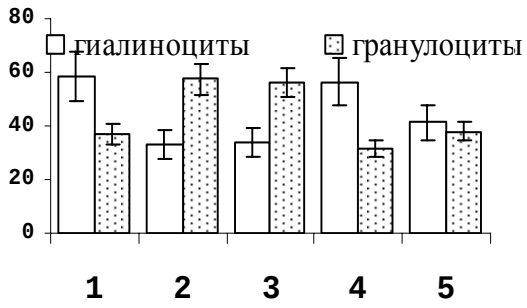


Рис. 5. Соотношение клеточных типов в гемолимфе моллюсков *Planorbarius corneus* по данным цитофлуориметрического анализа. *По оси абсцисс: 1* — незараженные особи, *2–5* — особи, зараженные трематодами (*2* — *Cotylurus* sp., *3* — *Notocotylus* sp., *4* — *Plagiorchis* sp., *5* — сем. Echinostomatidae). *По оси ординат*: процент клеток от общего числа в циркуляции

тарной мантии вокруг паразита [6]. В результате извращения клеточной реакции и оседания значительного числа гемоцитов на тегумент спороцисты может изменяться соотношение клеточных типов в циркуляции. Кроме того, метаболизм гемоцитов в составе мантии значительно изменяется под действием паразита [3]. Следовательно, посредством гуморальных факторов паразит направляет специализацию гемоцитов в составе мантии. Такой процесс, направляемый паразитом и затрагивающий всю циркуляцию гемолимфы, не может не отразиться на соотношении типов гемоцитов. Вероятно, формирование многослойных гемоцитарных капсул вокруг паразитов также влияет на соотношение циркулирующих гемоцитов [1].

В настоящее время все больше подтверждается точка зрения, что сложившиеся в ходе длительного развития взаимоотношения внутри паразитохозяинной системы «трематоды—моллюск» являются специфичными. В литературе имеются сведения примерно о трех десятках изученных в этом отношении видов моллюсков [32]. Для большинства из них известен определенный круг специфичных паразитов. По некоторым данным, трематоды различаются по способности к взаимодействию с внутренними защитными системами моллюска [15; 31]. Соответственно и механизмы защитных реакций, участвующих в подавлении трематодной инвазии, могут быть различными. А это предполагает, в том числе, и различное соотношение гуморальных и клеточных реакций в подавлении заражения.

Следует отметить, что в рамках данной работы мы исследовали моллюсков со «зрелыми» заражениями, то есть особей эмитирующих церкарий. Кроме того, использование природно-зараженного материала не позволяет оценить временнóй динамики клеточной реакции.

Дополнительно был выполнен анализ корреляции между размерами моллюска и соотношением гиалиноцитов и гранулоцитов в циркуляции. Установлено наличие достоверной отрицательной корреляции между этими параметрами ($r = -0{,}93$; $m_r = 0{,}076$; при $n = 31$). У мелких моллюсков гранулоцитов меньше, а гиалиноцитов больше, чем у более крупных особей (рис. 6).

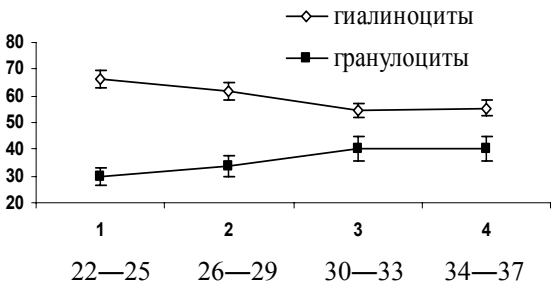


Рис. 6. Соотношение гранулоцитов и гиалиноцитов у моллюсков *Planorbarius corneus* с разным диаметром раковины. По оси абсцисс: классы с разным диаметром раковины, мм. По оси ординат: процент клеток от общего числа в циркуляции

С возрастом моллюски подвергаются влиянию большего количества антигенов, что может вызывать возрастание числа функционально активных клеток. Этот факт также подтверждает основную роль гранулоцитов в клеточных реакциях пульмонат.

Для исследования ***фагоцитарной активности*** гемоцитов моллюскам вводили суспензии бактерий *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, меченных ФИТЦ. Цитофлуориметрический анализ показал, что наибольшая интенсивность флуоресценции гемоцитов наблюдается через 3 ч после инъекции (рис. 7). Кишечную палочку фагоцитируют 49,31±12,39%, а стафилококка — 78,5±7,14% гемоцитов. При этом кишечную палочку интенсивнее фагоцитируют гиалиноциты, а стафилококка — гранулоциты. Через 6–12 ч происходит снижение флуоресценции, что может указывать на переваривание бактерий.

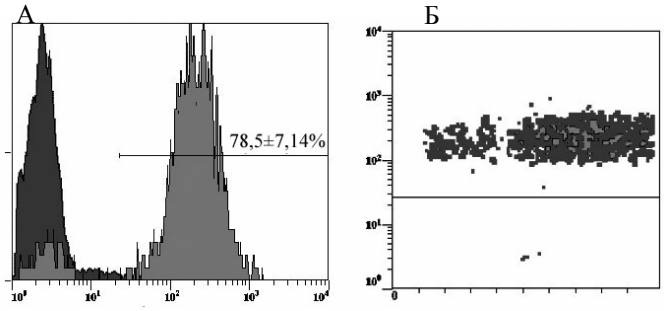


Рис. 7. Поглощение меченых ФИТЦ бактерий *Staphylococcus aureus* гемоцитами *Planorbarius corneus*. *А. Гистограмма.* Б. Цитофлуорограмма. *По оси абсцисс:* боковое светорассеивание. *По оси ординат*: интенсивность флуоресценции ФИТЦ

Ранее было показано, что введение мидиям патогенных грамотрицательных бактерий рода *Vibrio* приводит к резкому снижению количества гемоцитов в циркуляции для двустворчатых моллюсков [11; 26]. Но при этом относительное число гиалиноцитов возрастает, что, по мнению исследователей, является доказательством участия этих клеток в элиминации бактерий [29]. Наши результаты также подтверждают способность гиалиноцитов фагоцитировать именно грамотрицительные бактерии, к которым относится кишечная палочка.

Бактерицидная активность гранулоцитов подтверждается результатами анализа экспрессии антимикробных пептидов (дефенсинов и митицинов) у двустворчатых моллюсков, иммунизированных бактериями [28]. Показано, что эти вещества скапливаются в особых гранулах в цитоплазме гранулоцитов, а после фагоцитоза они оказываются в фаголизосомах вместе с поглощенными бактериями [28].

Гемоциты моллюсков, зараженных трематодами, менее интенсивно фагоцитируют бактерий. Только 50,13±5,30% гемоцитов улиток, зараженных партенитами *Cotylurus* sp., поглощают меченных ФИТЦ *Staphylococcus aureus*. Это подтверждает предположение, что продукты жизнедеятельности спороцист способны подавлять активность гемоцитов [16]. Ранее показано, что экскреторно-секреторные продукты партенит трематод влияют на синтез белка в гемоцитах, на их цитотоксическую и фагоцитарную активности [22; 16].

Для выявления пероксидазной активности гемоциты инкубировали с 0,02% раствором диаминобензидина. При этом обнаружено окрашивание части гранулоцитов, что может указывать на наличие пероксидаз, которые являются индикатором фагоцитарной активности клеток.

Таким образом, результаты нашего исследования подтверждают точку зрения, что эффекторными элементами защитных реакций пульмонат являются циркулирующие клетки гемолимфы — гемоциты. Это подтверждается как изменением клеточного состава гемолимфы, так и изменением функциональной активности гемоцитов при воздействии чужеродных объектов, в частности, трематод и бактерий. Кроме того, клеточный ответ пульмонат видоспецифичен — соотношение клеток в гемолимфе изменяется в зависимости от вида паразита, кроме того, разные типы гемоцитов принимают участие в элиминации разных антигенов.

Гуморальные реакции

Для исследования были выбраны гуморальные факторы, которые по последним данным принимают участие в защитных реакциях пульмонат при заражении партенитами трематод: фибриногенподобный белок (FREP), кальций-связывающий белок (CaBP), С-подобный лектин (CLECT), цистатинподобный белок (Cyst) [19].

В настоящее время в публикациях и электронных базах данных отсутствуют сведения по нуклеотидным последовательностям, соответствующим факторам защитных реакций *Planorbarius corneus.* В связи с этим специфические праймеры для изучения экспрессии генов факторов защитных реакций подбирали по консервативным участкам известных нуклеотидных последовательностей других пульмонат (см. табл.).

Специфические праймеры,
использованные для обнаружения зрелых транскриптов генов ß-актина
и факторов защитных реакций гастропод у моллюсков *Planorbarius corneus*

мРНК	Номер в «Gene-Bank»*	Нуклеотидные последовательности прямого (F) и обратного (R) праймеров	Расчетная длина продуктов ПЦР, п. н.	*t* отжига, °С
actin	AF329436	**F** 5' ATTATGAGGTTAGATTTGGCTGGTC 3' **R** 5' CTGTGATTTCTTTCTGCATTCTGTC 3'	432	59
FREP 7.1	AY028462	**F** 5' TATAGAGGCTGGCAGGAGTATCGTG 3' **R** 5' GACATGTGCAGTTTGAAGTAGCGTG 3'	433	63
CLECT	EB 709537	**F** 5’ ACCAATGGAGGAGGCTAC 3’ **R** 5’ TCAATGCAATCTTCGTTTC 3’	221	63
CaBP	EB 709539	**F** 5’ CTTGCTATTATTGCTGTTG 3’ **R** 3’ AAGAGATGGAAGATGTGTG 3’	308	60
Cyst	EB 709538	**F** 5’ GGATCCCGTCTGTAACTC 3’ **R** 5’ ACAATGAAAGGCAATGG 3’	597	50,5

Условные обозначения: FREP 7.1 — фибриногенподобный белок; CLECT — С-лектин; CaBP — кальций-связывающий белок; Cyst — цистатинподобный белок, * — указан номер нуклеотидных последовательностей в базе данных «GeneBank», по которым осуществлялся подбор праймеров.

Исследования проводили на препаратах тотальной РНК, которую выделяли из всего тела моллюсков *Planorbarius corneus*, а также на препаратах РНК, выделенных из гепатопанкреаса и гемолимфы катушек. Выделенные препараты РНК являлись матрицей в реакции обратной транскрипции для получения

кДНК соответствующих генов. Их исследовали методом полимеразной цепной реакции со специфическими для каждого изучаемого фактора праймерами. Полученные амплификаты анализировали в электрофоретически. Концентрацию амплификатов оценивали по плотности зон электрофореза полуколичественным методом в компьютерной программе «ScionImage». Уровень экспрессии генов факторов защитных реакций у *Planorbarius corneus* оценивали по отношению к активности гена, кодирующего β-актин.

Фибриногенподобные белки (FREP) являются лектинами и участвуют в связывании и нейтрализации паразитов [16]. В настоящее время в базе данных «GeneBank» имеется несколько десятков последовательностей различных доменов FREP. Наиболее консервативным участком гена FREP является регион, соответствующий фибриногеновому домену. Так, нуклеотидная последовательность, соответствующая фибриногеновому домену FREP 7.1 *Biomphalaria glabrata*, на 67–91% гомологична таковым у других видов биомфалярий. В свою очередь, разные семейства FREP различаются по структуре более вариабельного иммуноглобулинподобного домена [35]. Поэтому именно нуклеотидная последовательность гена фибриногенового домена FREP 7.1. *B. glabrata* была использована при подборе специфических праймеров для изучения экспрессии FREP *Planorbarius corneus* (см. табл.).

Экспрессия гена, кодирующего FREP, выявлена во всех исследуемых образцах. Результаты ОТ-ПЦР анализа показывают присутствие во всех образцах амплификата длиной 560–570 п. н. (рис. 8).

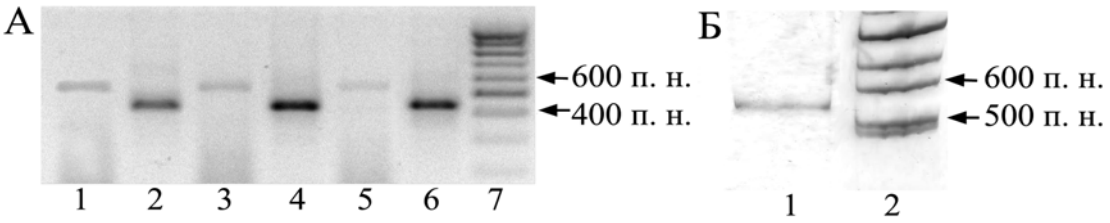


Рис. 8. Анализ амплификатов, получаемых на кДНК *Planorbarius corneus* с помощью специфических праймеров на последовательности, кодирующие FREP и β-актин у гастропод:
А. Электрофорез в 1,4% агарозном геле. *1, 3, 5* — FREP, *2, 4, 6* — β-актин, *7* — ДНК-маркер молекулярных весов 100–1000 п. н. *1, 2* — заражение *Cotylurus* sp.; *3, 4* — заражение *Bilharziella polonica*; 5, 6 — незараженный моллюск.
Б. Электрофорез в 8% ПААГ. *1* — амплификат FREP из гемолимфы зараженных моллюсков, *2* — ДНК-маркер молекулярных весов 100–1000 п. н.

Установлено, что уровень экспрессии гена FREP повышается у моллюсков, зараженных трематодами *Cotylurus* sp. и *Bilharziella polonica*. Однако он значительно снижается у особей, зараженных *Plagiorchis* sp. и *Notocotylus* sp. (см. рис. 12).

Согласно литературным данным, на интенсивность экспрессии генов, кодирующих разные группы FREP, влияет как уровень резистентности моллюска, так и срок заражения трематодами. Показано, что у моллюсков *Biomphalaria glabrata*, зараженных эхиностомами, уровень экспрессии FREP 2 и FREP 4 повышается уже через сутки после заражения (п. з.). При этом интенсивность

экспрессии FREP 4 постепенно снижается к 16-му дню п. з., а уровень экспрессии FREP 2 остается повышенным и через 21 день п. з. В дальнейшем он остается на том же уровне.

В нашей работе были использованы моллюски со зрелым заражением. Можно предположить, что к моменту взятия проб уровень экспрессии генов FREP у моллюсков стабилизировался в соответствии со спецификой ответа на заражение паразитом того или иного вида. Хотя в этом случае остается неясным, каким образом влияет на активность генов выход новых генераций партенит.

Лектины С-типа (CLECT) у многих моллюсков участвуют в распознавании и опсонизации чужеродных объектов [14]. В базе данных «GeneBank» представлено около 200 нуклеотидных последовательностей, относящихся к CLECT моллюсков. Большинство из выявленных последовательностей принадлежат двустворчатым: *Mytilus galloprovincialis, M. trossulus, M. edulis, Crassostrea gigas* и др. Недавно выяснилось, что гомолог CLECT есть и у гастропод. Для подбора праймеров, соответствующих этому фактору, мы использовали последовательность ДНК, которая соответствует мРНК углеводсвязывающего участка CLECT *Biomphalaria glabrata* (EB709537) (см. табл.).

Специфические праймеры, позволяющие амплифицировать выбранный нами участок гена CLECT, на разных кДНК выявляли продукты разной длины: приблизительно 510 и 290 п. н. (рис. 9, *а*).

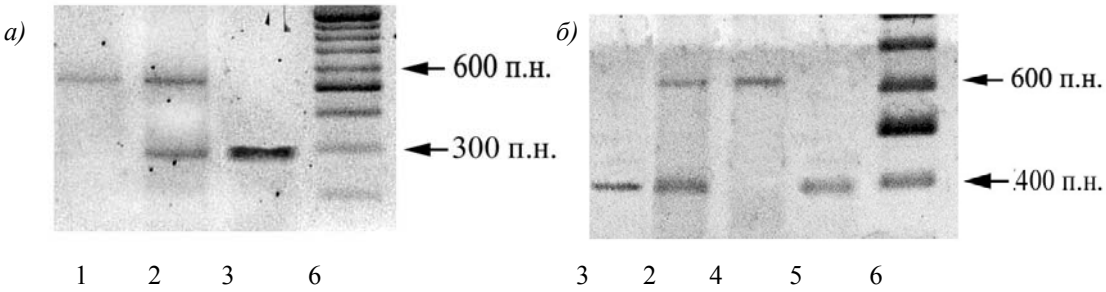


Рис. 9. Анализ амплификатов, получаемых на кДНК *Planorbarius corneus,* с помощью специфических праймеров на последовательности, кодирующие CLECT (*а*) и CaBP (*б*) у гастропод. Электрофорез в 1,4% агарозном геле. *1* — моллюск, зараженный *Plagiorchis* sp.*; 2* — моллюск, зараженный *Bilharziella polonica*; *3* — незараженный моллюск; *4* — гепатопанкреас незараженного моллюска; *5* — моллюск, зараженный *Cotylurus* sp.*; 6* — ДНК-маркер молекулярных весов 100–1000 п. н.

Для измерения уровня экспрессии гена CLECT были использованы образцы, в которых представлен продукт длиной примерно 290 п. н. Установлено, что уровень экспрессии гена значительно повышается при заражении моллюсков партенитами трематод (см. рис. 11).

Ранее было показано повышение уровня экспрессии гена CLECT у моллюсков *Biomphalaria glabrata,* зараженных *Echinostoma caproni* [19]. Кроме того, содержание лектинов С-типа повышается в гемолимфе *Biomphalaria glabrata,* иммунизированных грамположительными бактериями и дрожжами [18; 14]. Наши результаты согласуются с этими данными и подтверждают роль CLECT в защитных реакциях пульмонат на заражение трематодами: внедрение

чужеродных факторов активизирует гены, кодирующие белки, принимающие участие в процессах распознавания чужеродного и клеточной адгезии.

Группа ***кальцийсвязывающих белков*** (CaBP) принимает участие в регуляции активности и подвижности клеток, вовлеченных в защитные реакции моллюсков [34]. В настоящее время известны неполные нуклеотидные последовательности мРНК, соответствующие CaBP нескольких видов бивальвий и гастропод *Biomphalaria glabrata* (EB709539). Последнюю мы и использовали для подбора специфических праймеров (см. табл.).

С использованием праймеров, специфичных выбранному участку гена CaBP, выявляются два продукта — длиной около 390 и 600 п. н. (рис. 9, *б*). Из результатов, представленных на рис. 12, видно, что уровень экспрессии гена CaBP у моллюсков, зараженных *Cotylurus* sp. и *Bilharziella polonica*, выше, а *Notocotylus* sp. и *Plagiorchis* sp. — ниже, чем у незараженных. Согласно литературным данным, активность транскрипции генов CaBP значительно увеличивается у зараженных моллюсков резистентных линий [19].

Цистатинподобные белки (Cyst) гастропод принимают участие во внеклеточных реакциях, обеспечивая регуляцию противоинфекционного ответа и элиминацию паразитов [26]. В базе данных «GeneBank» представлены нуклеотидные последовательности мРНК Cyst только двух видов брюхоногих моллюсков — *Crassostrea gigas* и *Biomphalaria glabrata*, которую мы и использовали для подбора специфических праймеров.

С использованием праймеров, соответствующих гену Cyst, на разных к ДНК были получены продукты размером около 250, 400, 450 и 700 п. н. (рис. 10). На тотальных препаратах мРНК незараженных моллюсков соответствующий Cyst продукт не выявляется. Таким образом, ген Cyst экспрессируется в идентифицируемых количествах только у зараженных трематодами моллюсков.

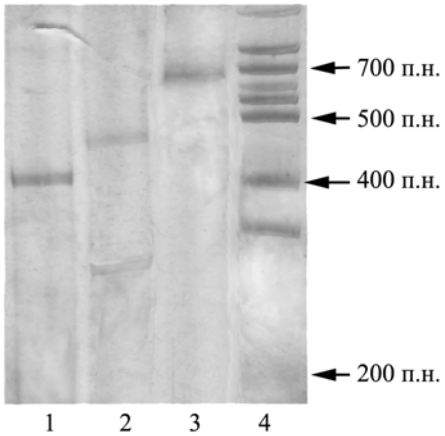


Рис. 10. Анализ амплификатов, получаемых на кДНК *Planorbarius corneus* с помощью специфических праймеров на последовательности, кодирующие Cyst.
1 — моллюск, зараженный *Cotylurus* sp.;
2 — моллюск, зараженный *Bilharziella polonica*;
3 — моллюск, зараженный *Plagiorchis* sp.;
4 — ДНК-маркер молекулярных весов 100–1000 п. н.

Сравнение уровня экспрессии гена у моллюсков, имеющих продукт 400 п. н., показало, что он значительно выше у моллюсков, зараженных партенитами *Plagiorchis* sp. и *Bilharziella polonica*, чем у незараженных особей (рис. 11).

Cyst относится к семейству ингибиторов цистеиновых протеаз, которые представлены в основном однодоменными белками. Они ингибируют цистеиновые протеазы, секретируемые как клетками паразита, так и моллюска, защи-

щая от их разрушительного действия ткани хозяина. В настоящее время показана их роль во внеклеточном противоинфекционном ответе, регуляции эндогенного иммунного ответа. Установлено, что активность транскрипции гена, кодирующего Cyst при заражении трематодами, намного выше у резистентных моллюсков *Biomphalaria glabrata* по сравнению с незараженными особями [34].

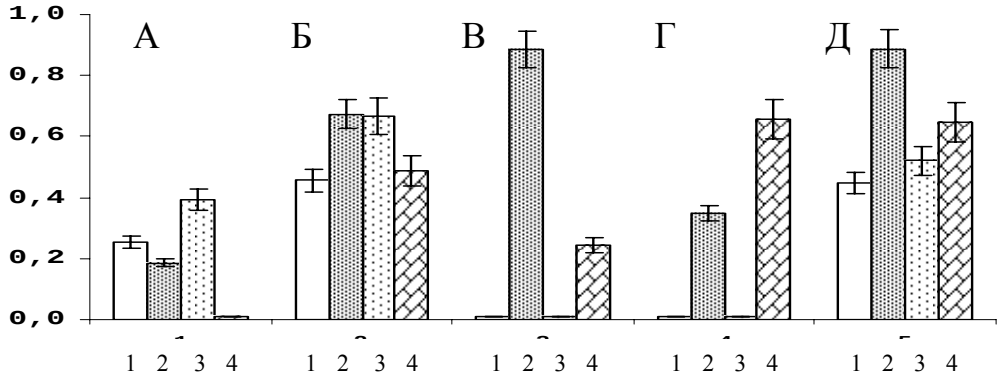


Рис. 11. Экспрессия генов факторов защитных реакций у моллюсков *Planorbarius corneus,* зараженных разными видами трематод. *А* — незараженные моллюски, *Б — Д* — зараженные трематодами моллюски: *Б — Cotylurus* sp., *В — Notocotylus* sp., *Г — Plagiorchis* sp., *Д — Bilharziella polonica. По оси ординат:* уровень экспрессии гена относительно β-актина. По оси абсцисс: *1* — FREP, *2* — CLECT, *3* — CaBP, *4* — Cyst

Учитывая роль Cyst в ингибировании протеаз паразита, можно предположить, что повышение интенсивности экспрессии Cyst при заражении обеспечивает защиту организма моллюска от последствий воздействия паразита и защитных реакций. У чувствительных особей высокий конститутивный уровень Cyst позволяет смягчать действие проникающего паразита, однако под действием паразита уровень экспрессии снижается.

Таким образом, у моллюсков, зараженных партенитами *Cotylurus* sp. и *Bilharziella polonica*, повышается уровень экспрессии генов всех рассматриваемых факторов, а при заражении *Notocotylus* sp. и *Plagiorchis* sp. — только С-лектина и цистатинподобного белка. Полученные результаты подтверждают видоспецифичность и гуморальных реакций пульмонат.

Полученный с помощью специфических праймеров набор амплификатов вместо ожидаемого одного можно объяснить тем, что для подбора праймеров использовались нуклеотидные последовательности другого вида моллюсков. Секвенирование полученных ПЦР-продуктов показало их гомологию с нуклеотидными последовательностями гастропод, по которым проводился подбор специфических праймеров: с ß-actin — 90%, с FREP 7.1 — 79%, с CLECT — 64,7%, с CaBP — 65,5% [7].

Результаты молекулярно-генетического анализа также подтверждают ***роль гемоцитов и клеток гепатопанкреаса в продукции гуморальных факторов защитных реакций.*** У моллюсков, зараженных партенитами трематод, уровень экспрессии генов С-лектина и кальцийсвязывающего белка, значительно повышается в гемоцитах, а генов фибриногенподобного и цистатинподобного белков — в гепатопанкреасе (рис. 12).

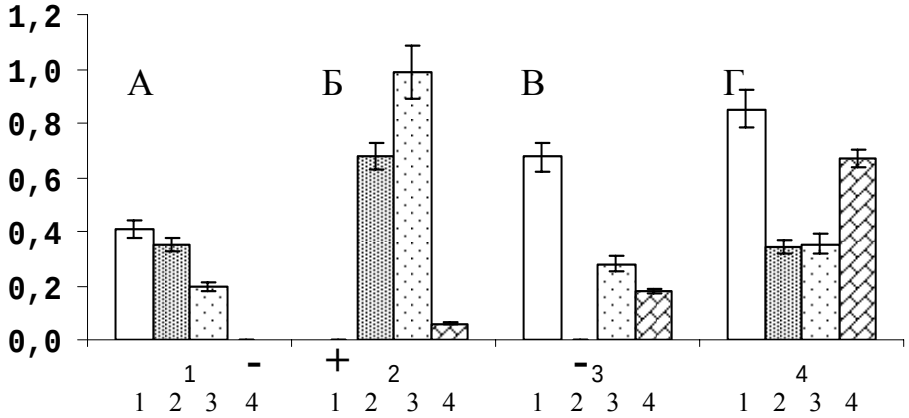


Рис. 12. Экспрессия генов факторов защитных реакций в гепатопанкреасе и гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus*. *А* — гемоциты незараженных, *Б* — гемоциты зараженных, *В* — гепатопанкреас зараженных, *Г* — гепатопанкреас незараженных. *По оси ординат:* уровень экспрессии относительно β-актина. По оси абсцисс: *1* — FREP, *2* — CLECT, *3* — CaBP, *4* — Cyst

Считается, что фибриногеновый домен **FREP** облегчает кальций-зависимое связывание с углеводами, участвуя в процессах распознавания чужеродного и в межклеточных взаимодействиях [8]. В то же время FREP, вероятно, играют важную роль в формировании капсул вокруг паразитов [9]. А гепатопанкреас является основным местом паразитирования партенит трематод. Резкое снижение экспрессии гена FREP в гемолимфе может быть связано с подавлением иммунного ответа моллюска паразитом [31].

Ранее было показано, что **CLECT** принимает участие в антимикробном ответе гемоцитов *Biomphalaria glabrata* [19]. В гепатопанкреасе незараженных катушек мы вообще не обнаружили мРНК CLECT. Вероятно, именно заражение приводит к «включению» гена. Известно, что лектины С-типа участвуют в процессах распознавания чужеродных объектов и клеточной адгезии. Следовательно, они участвуют во взаимодействиях гемоцитов между собой и с чужеродными объектами [14]. Наши результаты свидетельствуют о роли не только гемоцитов, но и клеток гепатопанкреаса в продукции CLECT (рис. 12).

Уровень экспрессии **CaBP** у моллюсков *Planorbarius corneus,* зараженных трематодами, повышается в гемоцитах в пять раз по сравнению с незараженными катушками (рис. 12). Согласно литературным данным, CaBP участвуют в регуляции подвижности клеток и в процессах распознавания гемоцитами патогена [25]. Гемоциты являются основными эффекторными элементами клеточных реакций пульмонат. Соответственно повышение уровня экспрессии гена CaBP именно в гемоцитах подтверждает предположение о том, что разная резистентность моллюсков обусловлена, прежде всего, разной способностью гемоцитов к адгезии и к распознаванию своего—чужого [10].

По нашим данным уровень экспрессии гена **Cyst** выше в гепатопанкреасе, чем в гемолимфе зараженных особей (см. рис. 6). Высокая активность экспрессии гена ранее была отмечена в скоплениях гемоцитов вокруг спороцист и в клетках гепатопанкреаса [19].

Различный уровень экспрессии факторов защитных реакций в гемолимфе и гепатопанкреасе, вероятно, указывает на их разную роль в защитных реакциях

пульмонат. Кроме того, уровень экспрессии исследованных генов различен у моллюсков, зараженных разными видами трематод, что подтверждает видоспецифичность гуморального ответа пульмонат.

Выражаем глубокую благодарность Н. В. Цымбаленко, А. А. Добровольскому и А. В. Полевщикову за практические консультации и помощь в подготовке работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Атаев Г. Л.* Развитие партенит трематод: Автореф. дис. … д-ра биол. наук. СПб.: СПбГУ, 2000. 34 с.

2. *Атаев Г. Л., Дьячков И. С., Полевщиков А. В.* Сравнительно-иммунологический анализ защитных реакций брюхоногих моллюсков // Известия РГПУ им. А. И. Герцена. 2006. № 39 (1). С. 265–281.

3. *Атаев Г. Л., Полевщиков А. В.* Защитные реакции брюхоногих моллюсков: 1. Клеточные реакции // Паразитология. 2004. № 38 (4). С. 342–351.

4. *Галактионов К. В., Добровольский А. А.* Происхождение и эволюция жизненных циклов трематод. СПб.: Наука, 1998. 402 с.

5. *Глик Д.* Методика гисто- и цитохимии. М.: Изд-во иностр. литературы, 1950. 516 с.

6. *Добровольский А. А., Галактионов К. В., Мухамедов Г. К., Синха Б. К., Тихомирова И. А.* Партеногенетические поколения трематод // Труды Ленинградского общества естествоиспытателей. 1983. № 82 (4). 108 с.

7. *Прохорова Е. Е.* Защитные реакции пульмонат (Gastropoda): Автореф. дис. … канд. биол. наук. СПб., 2009. 18 с.

8. *Adema C. M., Hertel L. A., Loker E. S.* Evidence from two planorbid snails of a complex and dedicated response to digenean (echinostome) infection // Parasitology. 1999. 119. 395–404.

9. *Adema C. M., Hertel L. A., Miller R. D., Loker E. S.* A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection // Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1997. 94. 8691–8696.

10. *Adema C. M., Sapp K. K., Hertel L. A., Loker E. S.* Immunobiology of the relationships of the echinostomes with snail intermediate hosts // Echinostomes as experimental models for biological research. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London, 2000. 149–173.

11. *Allam B., Ashton-Alcox K. A., Ford S. E.* Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* sp. Clams // Developmental and comparative immunology. 2001. 25 (5-6). 365–375.

12. *Ataev G. L., Coustau C.* Cellular response to *Echinostoma caproni* infection in *Biomphalaria glabrata* strains selected for susceptibility/ resistance // Developmental and comparative immunology. 1999. 23. 187–198.

13. *Bayne C. J., Yoshino T. P.* Determinants of compatibility in mollusc-trematode parasitism // American Zoologyst. 1989. 29. 399–407.

14. *Chai L-Q., Tian Y-Y., Yang D-T., Wang J-X., Zhao X-F.* Molecular cloning and characterization of a C-type lectin from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* // Developmental and Comparative Immunology. 2008. 32 (1). 71–83.

15. *Connors V. A.* The schistosome-snail interaction: factors involved in host immunodefense activation and parasite killing in susceptible and resistant *Biomphalaria glabrata*. // Taxonomy, ecology and evolution of metazoan parasites. 2003. T. I. 203–224.

16. *Connors V. A., Yoshino T. P.* In vitro effect of larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products on phagocytosis-stimulated superoxide production in hemocytes from *Biomphalaria glabrata* // Journal of Parasitology. 1990. 76 (6). 895–902.

17. *Davids B. J., Wu X. J., Yoshino T. P.* Cloning of a beta-integrin subunit cDNA from an embryonic cell line derived from the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata*. Gene. 1999. 228. 213–223.

18. *Guillou F., Mitta G., Dissous C., Pierce R., Coustau C.* Use of individual polymorphism to validate potential functional markers: case of a candidate lectin (BgSel) differentially expressed in susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata* // Comparative Biochemistry and Physiology. 2004. 138. 175–181.

19. *Hahn U. K., Bender R. C., Bayne C. J.* Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species // Journal of Parasitology. 2001. 87 (2). 292–299.

20. *Hernroth B*. The influence of temperature and dose on antibacterial peptide response against lipopolysaccharide in the blue mussel, *Mytilus edulis* // Fish & Shellfish Immunology. 2003. 14 (1). 25–37.

21. *Humbert E., Coustau C.* Refractoriness of host haemocytes to parasite immunosuppressive factors as a putative resistance in the *Biomphalaria glabrata — Echinostoma caproni* system. // Journal of Parasitology. 2001. 122. 651–660.

22. *Jourdane J., Cheng T. C.* The two-phase recognition process of allografts in Brazilian strain of *Biomphalaria glabrata* // The Journal of Invertebrate Parasitology. 1987. 49. 145–158.

23. *Lie K. J., Heyneman* D. Studies on resistance in snails. 3. Tissue reaction to *Echinostoma lindoense* sporocysts in sensitized and resensitized *Biomphalaria glabrata* // The Journal of Parasitology. 1976. 62 (1). 51–58.

24. *McGreal E. P., Martinez-Pomares L., Gordon S.* Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system // Molecular immunology. 2004. 41(11). 1109–1121.

25. *Mitta G., Galiniera R., Tisseyreb P., Alliennea J.-F., Girerd-Chambazc Y., Guilloua F., Bouchuta A., Coustaua C.* Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes // Developmental and Comparative Immunology. 2005. 29. 393–407.

26. *Mitta G., Vandenbulcke F., Hubert F., Roch P*. Mussels defensins are synthesized and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge // Journal of Cell Science. 1999. 112. 4233–4242.

27. *Mitta G., Vandenbulcke F., Noël T., Romestand B., Beauvillain J. C., Salzet M., Roch P.* Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel // Journal of cell science. 2000a. 113 (15). 2759–2769.

28. *Parisi M.-G., Lia H., Jouvetc L. B. P., Dyryndac E. A., Parrinellob N., Cammaratab M., Rocha P.* Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria // Fish & Shellfish Immunology. 2008. 25 (6). 834–840.

29. *Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T*. Molecular cloning: a laboratory manual // New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition. 1989. T. 1–3.

30. *Sire C., Rognon A., Theron A.* Failure of *Schistosoma mansoni* to reinfect *Biomphalaria glabrata* snails: acquired humoral resistance or intra — specific larval antagonism? // Parasitology. 1998. 117. 117–122.

31. *Sorensen R. E., Minchella D. J.* Snail-trematode life history interactions: past trends and future directions // Parasitology. 2001. 123. 3–18.

32. *Van der Knaap W. P., Sminia T., Schutte R., Boerrigter-Barendsen L. H.* Cytophilic receptor for foreignness and some factors which influence phagocytosis by invertebrate leucocytes: in vitro phagocytosis by amoebocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* // Immunology. 1983. 48 (2). 377–383.

33. *Vergote D., Bouchut A., Sautiere P. E., Roger E., Galinier R., Rognon A., Coustau C., Salzet M., Mitta G.* Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni* // International Journal for Parasitology. 2005. 35. 215–224.

34. *Zhang S. M., Loker E. S.* Representation of an immune responsive gene family encoding fibrinogen-related proteins in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni* // Gene. 2004. 341. 255–266.

REFERENCES

1. *Ataev G. L.* Razvitie partenit trematod: Avtoref. dis. … d-ra biol. nauk. SPb.: SPbGU, 2000. 34 s.

2. *Ataev G. L., D'jachkov I. S., Polevwikov A. V.* Sravnitel'no-immunologicheskij analiz zaschitnyh reakcij brjuhonogih molljuskov // Izvestija RGPU im. A. I. Gercena. 2006. № 39 (1). S. 265–281.

3. *Ataev G. L., Polevwikov A. V.* Zaschitnye reakcii brjuhonogih molljuskov: 1. Kletochnye reakcii // Parazitologija. 2004. № 38 (4). S. 342–351.

4. *Galaktionov K. V., Dobrovol'skij A. A.* Proishozhdenie i evoljucija zhiznennyh ciklov trematod. SPb.: Nauka, 1998. 402 s.

5. *Glik D.* Metodika Gisto- i citohimii. M.: Izd-vo inostr. literatury, 1950. 516 s.

6. *Dobrovol'skij A. A., Galaktionov K. V., Muhamedov G. K., Sinha B. K., Tihomirova I. A.* Partenogeneticheskie pokolenija trematod // Trudy Leningradskogo obschestva estestvoispytatelej. 1983. № 82 (4). 108 s.

7. *Prohorova E. E.* Zaschitnye reakcii pul'monat (Gastropoda): Avtoref. dis. … kand. biol. nauk. SPb., 2009. 18 s.

8. *Adema C. M., Hertel L. A., Loker E. S.* Evidence from two planorbid snails of a com-plex and dedicated response to digenean (echinostome) infection // Parasitology. 1999. 119. 395–404.

9. *Adema C. M., Hertel L. A., Miller R. D., Loker E. S.* A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection // Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1997. 94. 8691–8696.

10. *Adema C. M., Sapp K. K., Hertel L. A., Loker E. S.* Immunobiology of the relationships of the echinostomes with snail intermediate hosts // Echinostomes as experimental models for biological research. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London, 2000. 149–173.

11. *Allam B., Ashton-Alcox K. A., Ford S. E.* Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in Ruditapes sp. Clams // Developmental and comparative immunology. 2001. 25 (5-6). 365–375.

12. *Ataev G. L., Coustau C.* Cellular response to Echinostoma caproni infection in Biomphalaria glabrata strains selected for susceptibility/ resistance // Developmental and comparative immunology. 1999. 23. 187–198.

13. *Bayne C. J., Yoshino T. P.* Determinants of compatibility in mollusc-trematode parasitism // American Zoologyst. 1989. 29. 399–407.

14. *Chai L-Q., Tian Y-Y., Yang D-T., Wang J-X., Zhao X-F.* Molecular cloning and characterization of a C-type lectin from the cotton bollworm, Helicoverpa armigera // Developmental and Comparative Immunology. 2008. 32 (1). 71–83.

15. *Connors V. A.* The schistosome-snail interaction: factors involved in host immunodefense activation and parasite killing in susceptible and resistant Biomphalaria glabrata. // Taxonomy, ecology and evolution of metazoan parasites. 2003. T. I. 203–224.

16. *Connors V. A., Yoshino T. P.* In vitro effect of larval Schistosoma mansoni excretory-secretory products on phagocytosis-stimulated superoxide production in hemocytes from Biomphalaria glabrata // Journal of Parasitology. 1990. 76 (6). 895–902.

17. *Davids B. J., Wu X. J., Yoshino T. P.* Cloning of a beta-integrin subunit cDNA from an embryonic cell line derived from the freshwater mollusk Biomphalaria glabrata. Gene. 1999. 228. 213–223.

18. *Guillou F., Mitta G., Dissous C., Pierce R., Coustau C.* Use of individual polymorphism to validate potential functional markers: case of a candidate lectin (BgSel) differentially expressed in susceptible and resistant strains of Biomphalaria glabrata // Comparative Biochemistry and Physiology. 2004. 138. 175–181.

19. *Hahn U. K., Bender R. C., Bayne C. J.* Killing of Schistosoma mansoni sporocysts by hemocytes from resistant Biomphalaria glabrata: role of reactive oxygen species // Journal of Parasitology. 2001. 87 (2). 292–299.

20. *Hernroth B*. The influence of temperature and dose on antibacterial peptide response against lipopolysaccharide in the blue mussel, Mytilus edulis // Fish & Shellfish Immunology. 2003. 14 (1). 25–37.

21. *Humbert E., Coustau C*. Refractoriness of host haemocytes to parasite immunosuppressive factors as a putative resistance in the Biomphalaria glabrata — Echinostoma caproni system // Journal of Parasitology. 2001. 122. 651–660.

22. *Jourdane J., Cheng T. C*. The two-phase recognition process of allografts in Brazilian strain of Biomphalaria glabrata // The Journal of Invertebrate Parasitology. 1987. 49. 145–158.

23. *Lie K. J., Heyneman D.* Studies on resistance in snails. 3. Tissue reaction to Echinostoma lindoense sporocysts in sensitized and resensitized Biomphalaria glabrata // The Journal of Parasitology. 1976. 62 (1). 51–58.

24. *McGreal E. P., Martinez-Pomares L., Gordon S*. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system // Molecular immunology. 2004. 41(11). 1109–1121.

25. *Mitta G., Galiniera R., Tisseyreb P., Alliennea J.-F., Girerd-Chambazc Y., Guilloua F., Bouchuta A., Coustaua C*. Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from Biomphalaria glabrata hemocytes // Developmental and Comparative Immunology. 2005. 29. 393–407.

26. *Mitta G., Vandenbulcke F., Hubert F., Roch P*. Mussels defensins are synthesized and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge // Journal of Cell Science. 1999. 112. 4233–4242.

27. *Mitta G., Vandenbulcke F., Noël T., Romestand B., Beauvillain J. C., Salzet M., Roch P.* Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel // Journal of cell science. 2000a. 113 (15). 2759–2769.

28. *Parisi M.-G., Lia H., Jouvetc L. B. P., Dyryndac E. A., Parrinellob N., Cammaratab M., Rocha P.* Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacte-ria // Fish & Shellfish Immunology. 2008. 25 (6). 834–840.

29. *Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T*. Molecular cloning: a laboratory manual // New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition. 1989. T. 1–3.

30. *Sire C., Rognon A., Theron A.* Failure of Schistosoma mansoni to reinfect Biomphalaria glabrata snails: acquired humoral resistance or intra — specific larval antagonism? // Parasitology. 1998. 117. 117–122.

31. *Sorensen R. E., Minchella D. J.* Snail-trematode life history interactions: past trends and future directions // Parasitology. 2001. 123. 3–18.

32. *Van der Knaap W. P., Sminia T., Schutte R., Boerrigter-Barendsen L. H*. Cytophilic receptor for foreignness and some factors which influence phagocytosis by invertebrate leuco-cytes: in vitro phagocytosis by amoebocytes of the snail Lymnaea stagnalis // Immunology. 1983. 48 (2). 377–383.

33. *Vergote D., Bouchut A., Sautiere P. E., Roger E., Galinier R., Rognon A., Coustau C., Salzet M., Mitta G.* Characterisation of proteins differentially present in the plasma of Biomphalaria glabrata susceptible or resistant to Echinostoma caproni // International Journal for Parasitology. 2005. 35. 215–224.

34. *Zhang S. M., Loker E. S*. Representation of an immune responsive gene family encoding fibrinogen-related proteins in the freshwater mollusk Biomphalaria glabrata, an intermediate host for Schistosoma mansoni // Gene. 2004. 341. 255–266.