

**Российский государственный педагогический университет
имени А. И. Герцена**

На правах рукописи

**АВАНЕСЯН
Алина Вачагановна**

**ВЛИЯНИЕ ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЙ МОЛЛЮСКОВ
НА РАЗВИТИЕ ПАРТЕНИТ ТРЕМАТОД
(НА ПРИМЕРЕ СЕМЕЙСТВА ECHINOSTOMATIDAE)**

03.00.08 – зоология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Г.Л. Атаев

Санкт-Петербург
2002

СОДЕРЖАНИЕ

Список условных обозначений

ВВЕДЕНИЕ

Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

I.1. Развитие партеногенетических поколений трематод

I.1.1. Проникновение мирацидия в моллюска

I.1.2. Развитие паразитической фазы материнской спороцисты

I.1.3. Организация герминального материала мирацидиев

I.2. Защитные реакции моллюсков в ответ на поселение партенит трематод

I.2.1. Защитные барьеры моллюсков

I.2.2. Гемоцитарные клетки моллюсков

I.2.3. Гемоцитарные клетки других беспозвоночных

I.2.4. Гуморальные реакции моллюсков

I.2.5. Клеточные реакции моллюсков

I.2.6. Организация амебоцито-продуцирующего органа у моллюсков

I.2.7. Исследования трансплантационного иммунитета моллюсков

I.3. Влияние температуры на развитие различных фаз жизненного цикла трематод

Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ

III.1. Развитие партенит трематод семейства Echinostomatidae

III.1.1. Мирацидии *Echinostoma caproni* и *E. paraensei*

III.1.2. Развитие материнских спороцист на паразитической фазе

III.2. Защитные реакции моллюсков на трематодную инвазию

III.2.1. Клеточные реакции моллюсков *Biomphalaria glabrata* на поселение материнских спороцист *Echinostoma caproni*

III.2.1.1. Клеточная реакция моллюсков *Biomphalaria glabrata* в периферических тканях

III.2.1.2. Клеточная реакция моллюсков *Biomphalaria glabrata* в области сердца

III.2.2. Клеточная реакция моллюсков *Biomphalaria glabrata* резистентной линии на заражение метацеркариями *Echinostoma caproni*

III.2.3. Гемопоз у моллюсков *Biomphalaria glabrata*

III.2.3.1. Организация и работа АПО моллюсков *Biomphalaria glabrata*

III.2.3.2. Циркуляция гемоцитов

III.2.4. Изучение клеточных реакций других видов моллюсков

III.2.4.1. Организация и динамика работы АПО у моллюсков *Biomphalaria pfeifferi*, зараженных МС *Echinostoma caproni*

III.2.4.2. Клеточная реакция моллюсков *Succinea putris*, *Planorbis planorbis* и *Planorbarius corneus*

III.2.4.3. Клеточная реакция моллюсков *Bithynia tentaculata* и *Melanopsis praemorsa*

Глава IV. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

IV.1. Развитие партенит трематод семейства Echinostomatidae

IV.1.1. Развитие материнских спороцист *Echinostoma caproni*

IV.1.2. Организация герминального материала мирацидиев

IV.2. Защитные реакции моллюсков на трематодную инвазию

ВЫВОДЫ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Список сокращений, принятых в тексте:

АПО – амебоцито-продуцирующий орган; **ГК** – генеративные клетки; **МС** – материнская спороциста; **НК** – недифференцированные клетки; **п. з.** – после заражения; **с.** – страница; **СЭМ** – сканирующая электронная микроскопия.

Список условных обозначений к иллюстрациям:

А– аорта; **АГ** – агглютинация гемоцитов; **АЖ** – апикальная железа; **АМ** – амебоцит; **АП** – апикальная папилла; **АПО** – амебоцито-продуцирующий орган; **В** – вена; **ГК** – генеративные клетки; **ГП** – гепатопанкреас; **Ж** – желудочек сердца; **ЗШ** – зародышевый шар; **К** – кишка; **КП** – капсула; **МК** – мерцательная клетка; **МП** – мантийная полость; **МР** – материнская редия; **МС** – материнская спороциста; **МЦ** – метацеркария; **НМ** – нервная масса; **НК** – недифференцированная клетка; **П** – предсердие; **ПК** – полость перикардия; **СК** – секреторная клетка; **СС** – стенка сосуда; **СТ** – стенка тела; **СХ** – схизоцель; **Т** – тегумент; **Э** – эмбрион; **ЭМ** – эпителий моллюска; **ЭП** – эпителиальные пластинки; **ЭР** – эргастоплазма.

ВВЕДЕНИЕ

Трематоды, с их уникальным жизненным циклом, на протяжении более ста лет остаются одним из интенсивно изучаемых зоологических объектов. Однако до недавнего времени внимание исследователей было привлечено к гермафродитной части цикла – маритам и их личинкам. Такая ситуация обусловлена, прежде всего, тем, что именно паразитирование последних приводит к различным заболеваниям человека и позвоночных животных.

Постепенно возрастающий интерес к партеногенетическим поколениям – спороцистам и редиям, привел к появлению множества работ, посвященных изучению этих фаз жизненного цикла трематод. За последние десятилетия накоплен большой материал, касающийся морфологии и биологии партенит различных видов трематод. Однако, несмотря на то, что теперь актуальность изучения всего жизненного цикла общепризнанна (в том числе и для проведения контроля над распространением опасных гельминтозов), наши знания о развитии партеногенетических поколений трематод – спороцист и редий, остаются фрагментарными и, во многом, противоречивыми. Кроме этого, достаточно большой фактический материал остается необобщенным. Это касается, прежде всего, вопросов, связанных с размножением и развитием партенит. В основном, в работах отмечается лишь примерное расположение генеративных элементов, без детального их описания и динамики развития. Имеются лишь отдельные исследования, специально посвященные анализу закономерностей размножения редий и спороцист различных видов дигеней (Галактионов, Добровольский, 1998; Добровольский и др., 2000; Атаев, 2000).

Одними из наиболее сложных являются вопросы о развитии материнских генераций партенит, а также факторах, его регулирующих. Среди последних лучше изучена роль абиотических факторов (например, температуры). Однако значение биотических факторов, и особенно механизмы их воздействия на развитие партенит, остаются неясными.

Это в полной мере относится и к защитным реакциям моллюсков на поселение материнских спороцист (МС). В последние годы многие исследовательские группы интенсивно изучают гуморальные аспекты иммунитета моллюсков (Locker, Bayne, 1986; Bayne, Yoshino, 1989 и др.). В то же время наши знания о клеточных защитных реакциях, в основном, базируются на работах, выполненных несколько десятилетий назад (Lie et al., 1975; Locker et al., 1982 и др.). В отечественной же литературе практически отсутствуют сведения о процессах инкапсуляции и разрушения спороцист гемоцитами моллюска. При этом остаются во многом неясными не только динамика инкапсуляции паразита гемоцитами моллюска, но также место и характер процесса гемопоэза.

Кроме этого, система «партениты-моллюск» служит удобным объектом для решения ряда общепаразитологических проблем, касающихся исследования адаптаций спороцист и редий, а также изучения разных аспектов паразито-хозяйинных отношений.

Долгое время проведение подобных работ было крайне затруднено из-за отсутствия подхода к оценке развития и динамики размножения партенит трематод,

но после публикации в последние годы крупных обзоров, посвященных природе партенит (Галактионов, Добровольский, 1998; Атаев, 2000), появились новые оценочные критерии для описания этих процессов.

Цели и задачи исследования. *Основной целью* данной работы явилось изучение развития партенит материнского поколения и влияния защитных реакций моллюсков на основные этапы развития материнских спороцист. Соответственно были определены следующие *задачи* исследования.

1. Изучение развития МС семейства Echinostomatidae на примере двух видов эхиностом – *Echinostoma caproni* и *E. paraensei*:

– изучение развития паразитической фазы МС *E. caproni* в моллюсках *Biomphalaria glabrata*;

– исследование состава герминального материала в мирацидиях и его изменения в ходе трансформации личинок в спороцисту в течение паразитической фазы развития МС.

2. Исследование защитных реакций моллюсков на трематодную инвазию:

– динамика инкапсуляции МС *Echinostoma caproni* в резистентных моллюсках *Biomphalaria glabrata*;

– организация и изменение амебоцито-продуцирующего органа (АПО) в ходе развития трематодной инвазии в моллюсках *B. glabrata*;

– организация АПО и клеточная реакция различных видов моллюсков на поселение партенит трематод.

ГЛАВА II. Материалы и методы

II.1. Объекты исследования

Виды трематод – *Echinostoma caproni* (Richard, 1964), *Echinostoma paraensei* (Lie, Bash, 1967) (Echinostomatidae);

Pleurogenoides medians (Olsson, 1876), *Cercaria helvetica XII* Dubois, 1928 (Plagiorhiidae);

Holostephanus volgensis (Sudarikov, 1962) Vojtkova (1966) (Cyathocotylidae);

Sphaeriodiotrema globulus (Rudolphi, 1819), *Psilotrema tuberculata* (Fil. 1857), Muhling, 1898 (Psilostomidae);

Notocotylus imbricatus (Loos, 1893) Szidat, 1935, *Notocotylus sp.* (Notocotylidae);

Philophthalmus rhionica Olenev, Tichomirov, 1976 (Philophthalmidae);

Leucochloridium paradoxum (Brachylaemidae);

Cotylurus sp., *Apatemon sp.* (Strigeidae).

Виды моллюсков – *Biomphalaria glabrata*, *B. pfeifferi*, *Planorbis planorbis*, *Planorbarius corneus* (Planorbidae);

Succinea putris (Succineidae);

Bithynia tentaculata (Hydrobiidae);

Melanopsis praemorsa (Melaniidae).

II.2. Методы исследования

II. 2.1. Сбор материала в природе, вскрытие моллюсков

Моллюски *Bithynia tentaculata*, *Planorbis planorbis*, *Planorbarius corneus* собирались в природных водоемах Санкт-Петербурга и области. Моллюски *Succinea putris* собраны в Лужском районе ленинградской области. Моллюски *Melanopsis praemorsa* были собраны в Западной Грузии.

Собранных в природе моллюсков в лаборатории рассаживали по стаканчикам (объемом от 15 до 50 мл в зависимости от размеров объекта) и в течение нескольких дней выявляли эмитирующих особей. В дальнейшем, под бинокляром проводилось вскрытие моллюсков. Заключение о видовой принадлежности паразитов делалось на основе изучения строения и локализации партенит и, в основном, морфологии отрождаемых ими церкарий.

II. 2. 2. Заражение моллюсков партенитами трематод

Источником материала послужили культуры *Echinostoma caproni* и животных-хозяев, поддерживаемые в лаборатории биологии животных Перпеньянского университета (Франция). Культура *E. paraensei* предоставлена лабораторией отдела биологии университета Нью-Мехико (США). Мирацидии обоих видов были получены из зрелых яиц, источником которых служили экспериментально зараженные лабораторные мыши. Часть личинок была использована для заражения моллюсков-хозяев, часть же зафиксирована для гистологических и электронно-микроскопических исследований.

Для получения паразитической фазы развития МС *E. caproni* мирацидиями этого вида были заражены моллюски *Biomphalaria glabrata* и *B. pfeifferi*. Заражению подвергались моллюски 2-месячного возраста. Средняя доза заражения составила 9 мирацидиев на одного моллюска. Инвазированных моллюсков содержали в аквариумах при 26⁰. Корм состоял из высушенных кленовых листьев, резаной моркови и элодеи. Световой режим – 12:12 ч. Вскрытия моллюсков проводились каждые 3 ч в течение первых суток, затем ежедневно на протяжении первых 7 дней, а в дальнейшем, через каждые 2 суток вплоть до 21-го дня с момента заражения.

II.2.3. Приготовление и окраска гистологических срезов

Для приготовления гистологических препаратов объекты исследования фиксировали в свежеприготовленном растворе Буэна. Затем материал промывали в 2-3-х сменах 70⁰ этанола и после последующего обезвоживания заливали в парафин согласно стандартной методике. Приготовленные на микротоме (МПС; LKB) срезы толщиной 4-6 мкм окрашивали гематоксилином Майера с подкраской 0,1% раствором эозина, по Маллори.

Для индивидуального гистологического изучения мирацидиев и партенит применяли несколько модифицированную технику заливки в желатин-парафин Годфрина (Godfrin, 1889, цит. по Langeron, 1949). Зафиксированные в жидкости Буэна объекты промывали в 70⁰ этаноле, а затем в дистиллированной воде. В дальнейшем, их помещали на предметное стекло, покрытое тонким (1-2 мм) слоем желатина, подкрашенным нейтральным красным (0,9%). После отсасывания с помощью микропипетки и фильтровальной бумаги излишков жидкости, стекла сушили в

течение 2-3 минут в термостате (45⁰С), а затем покрывались вторым слоем желатина. После 3-5 минут повторной сушки вырезались двухслойные желатиновые блоки с заключенными в них животными, хорошо заметными благодаря повторной окраске нейтральным красным. В дальнейшем блоки обезживали в спиртах и заливали в парафин. Толщина срезов из такого материала обычно не превышала 3-4 мкм.

II.2.4. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Отобранные объекты обычно окрашивали лихтергрюном, что делало их более заметными. Перед фиксацией для СЭМ отобранный материал промывался в растворе Чернина (CBSS, Chernin, 1963). Кроме этого, часто использовалась очистка с помощью ультразвукового воздействия в аппарат Bransonic-321 ЕН в течение ≤ 5 мин (45 кГц).

В качестве фиксатора применялся 3% глутаральдегид на 0,1 М фосфатном буфере (4⁰С; рН 7,4). Зафиксированный материал помещали в специальные пористые капсулы цилиндрической формы (диаметр пор – 20 мкм). Все последующие операции по обезживанию (в этаноле) и высушиванию объектов проводили, не раскрывая капсул. Препараты изучали на микроскопе «ISI super III-A» (Япония).

II.2.5. Анализ гемолимфы моллюсков

Для оценки динамики изменения количества циркулирующих гемоцитов в гемолимфе моллюсков была использована методика, предложенная К. Кусто и Т. Йошино (Coustau, Yoshino, 1994). Гемолимфу отбирали с помощью микропипетки в области ноги / головы моллюсков и помещали на 2 мин в пластиковую чашку Петри (диаметр 3 см) для осаждения осколков раковины и слизи. 1 мкл гемолимфы каждого моллюска микропипеткой переносили в одну из ячеек (диаметр 5 мм) камеры – многоячейстого стекла с тефлоновым покрытием (Cel-Line Associates). После заполнения камеру помещали во влажный бокс (температура 22⁰С). Через 30 минут стекло располагали на столике инвертированного микроскопа (Leica DMIL). Количество адгезированных и неадгезированных гемоцитов в 1 мкл гемолимфы подсчитывали одновременно для каждой пробы. Для выявления различий между моллюсками разных линий по количеству циркулирующих гемоцитов применяли Манн-Уитни тест для непараметрических данных.

II.2.6. Обработка данных

Для светооптических исследований были использованы микроскопы Jenoval, Loboval и Биомед. Измерения объектов проводили традиционным способом с использованием объективов ×25, ×40 и ×60. Из-за неправильной формы клеток и ядер определение их площади на срезах осуществляли с помощью окулярной сетки с известной длиной стороны квадрата: подсчитывали количество квадратов, полностью или частично перекрываемых измеряемой структурой.

Фотоработы были выполнены на оптических системах Polyvar и Nikon. Для компьютерной обработки материала использовали следующие программы: Word 2000, Excel, PSI-Plot (Version 5), Mathcad 2000.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

I.1. Развитие партеногенетических поколений трематод

За последние десятилетия появилось множество работ, посвященных морфологии и биологии мирацидиев различных видов трематод, а также партеногенетическим поколениям – спороцистам и редиям. Тем не менее, сведения об ультратонком строении, физиологии и развитии партенит носят фрагментарный и, во многом, противоречивый характер и, следовательно, данные аспекты требуют подробного изучения. Предметом острейших дискуссий является и вопрос о размножении партенит, в частности, о природе их генеративных клеток. Кроме этого, несмотря на большое количество исследований тех или иных особенностей партеногенетических поколений, в настоящее время существует относительно мало обобщений этих материалов – обзоров, посвященных развитию партенит (Семенов, 1991; Галактионов, 1993; Галактионов, Добровольский, 1998; Атаев, 2000; Добровольский и др. 2000).

В связи с этим, задачей данного раздела является анализ литературных данных, касающихся размножения и развития партенит, и, в первую очередь, материнских спороцист. Этому поколению партенит в нашей работе будет уделено особое внимание вследствие слабой изученности паразитической фазы МС, а также ограниченности данных о ее клеточном строении и динамике размножения.

В самом общем виде онтогенез МС включает несколько сменяющих друг друга этапов. Первым этапом является эмбриональное развитие, протекающее внутри яйца. Процессы эмбрио- и морфогенеза завершаются формированием мирацидия – расселительной личинки, основная задача которой в жизненном цикле трематод связана с заражением первого промежуточного хозяина (в большинстве случаев, брюхоногого моллюска), где и протекает развитие партеногенетических поколений. У одних видов эмбриональное развитие целиком осуществляется во внешней среде (сем. Echinostomatidae, отряд Strigeidida и др.), у других – в организме дефинитивного хозяина – позвоночного животного (сем. Schistosomatidae) или непосредственно в матке мариты (отряды Plagiorchiida, Heterophyida и др.) (Добровольский и др., 2000).

I.1.1. Проникновение мирацидия в моллюска

Заражение моллюска представляет собой сложный процесс, включающий несколько последовательно сменяющих этапов: пребывание во внешней среде, контакт с хозяином и, наконец, проникновение внутрь его тела хозяина. Особенности реализации этих этапов очень различаются у разных сосальщиков, что позволяет разделить их на две группы. Первую группу составляют трематоды с активно заражающими мирацидиями, а вторую – трематоды с пассивно заражающими мирацидиями.

Для мирацидиев первой группы (семейства Fasciolidae, Echinostomatidae, Philophthalmidae, Cyclocoelidae, Strigeidae, Diplostomatidae и др.) характерна активная локомоция со сложным комплексом поведенческих реакций, которые направлены на распознавание хозяина и установление контакта с ним. На завершающем этапе

свободной жизни мирацидий внедряется в покровы хозяина-моллюска, используя при этом как химические, так и механические способы разрушения тканей.

Барьер, который мирацидий должен преодолеть для успешного заражения моллюска, можно условно разделить на 3 слоя (Wilson et al., 1971). Самый наружный представлен слизью, покрывающей все тело моллюска, и многочисленными микроворсинками эпителиальных клеток. С этим слоем происходит первый контакт мирацидия, и, вероятно, здесь сосредоточены химические вещества, стимулирующие личинку на осуществление устойчивого прикрепления к моллюску. Следующий слой состоит из столбчатых эпителиальных клеток, богатых белками и нуклеиновыми кислотами. И, наконец, нижний слой представлен мускульными волокнами, железами и соединительной тканью.

Обычно мирацидий внедряется в своего хозяина не сразу, а через определенное время после контакта с ним. В течение этого времени мирацидий исследует покровы моллюска, а затем приступает к внедрению, при котором важное значение играет секрет желез проникновения. Не исключено, что хеморецепторная система личинки работает по принципу накопления раздражителя, и лишь при достижении какого-то определенного порога включаются механизмы, ответственные за внедрение (Семенов, 1991).

Обычным местом внедрения активно заражающих личинок служат покровы мантии, ноги, щупалец. Некоторые данные о способе и месте внедрения мирацидиев, накопленные в литературе, будут приведены ниже.

Например, мирацидии *Echinostoma miyagawai* способны внедряться в любом месте тела моллюска, но большинство из них прикрепляется к мантийному воротничку и передней части головы (Косупко, 1971). Мирацидий *E. caproni* также проникает в различные части тела моллюска – в мантийный воротничок, в ногу (чаще со стороны подошвы) и в голову (велум и щупальца). Частым местом проникновения является также и выстилка мантийной полости (Атаев et al., 1997).

Мирацидии *Fascioloides magna* предпочитают внедряться в дорсальную часть ноги и заднюю область головы (Coil, 1981). Личинки Paramphistomatidae сначала попадают через легочное отверстие в мантийную полость и, пройдя стенку легкого, проникают внутрь тела моллюсков (Lengy, 1960).

Процесс внедрения мирацидия в моллюска-хозяина отличается у представителей различных групп трематод. Можно выделить три типа проникновения (Семенов, 1991). Первый характеризуется тем, что в процессе внедрения мирацидий сбрасывает эпителиальные пластинки, и в ткани хозяина проникает молодая материнская спороциста (Fasciolidae, Echinostomatidae, Paragonimidae, Paramphistomatidae). Например, исследование личинок *Fasciola hepatica* (Southgate, 1970; Wilson et al., 1971 и др.) показало, что их прикрепление к поверхности тела моллюска происходит при помощи хоботка. После этого наблюдается последовательное отделение эпителиальных пластинок с первого ряда до последнего.

У некоторых трематод (семейства Schistosomatidae, Spirorchidae, Paramphistomatidae) процесс сбрасывания ресничных клеток происходит

непосредственно в тканях хозяина. Их отделение начинается с четвертого ряда и заканчивается первым (Wajdi, 1966).

И, наконец, третий тип свойственен педогенетическим мирацидиям (Cyclocoelidae, Philophthalmidae). При заражении промежуточного хозяина мирацидий лишь закрепляется в покровах моллюска, а внедряется в его ткани содержащаяся в задней трети тела личинки материнская редия (Тихомиров, 1980; Атаев, 1990 и др.).

Пассивно заражающие мирацидии, характерные для семейств Notocotylidae, Dicrocoelidae и др., также обладают рядом крайне специфических особенностей. Развитие этих личинок всегда осуществляется в матке марины вплоть до достижения ими инвазионного состояния (Галактионов, Добровольский, 1998). Так что оказавшиеся во внешней среде яйца сразу могут стать источником заражения моллюсков. Поступление яиц, содержащих инвазионных мирацидиев, в организм хозяина, осуществляется пассивно – при заглатывании их вместе с основной пищей, и соответственно во многом определяется активностью пищевого поведения самого хозяина.

1.1.2. Развитие паразитической фазы материнской спороцисты

При любом способе внедрения мирацидия момент заражения знаменует собой переход к следующей – паразитической фазе материнской спороцисты. Развитие последней в хозяине начинается с метаморфоза, имеющего отчетливо выраженный регрессивный характер, сопровождающегося потерей целого ряда органов (Гинецинская, 1968; Добровольский и др., 1983; Галактионов, Добровольский, 1998; Добровольский и др., 2000). Кроме отторжения эпителиальных пластинок расходуется секрет желез с последующей их дегенерацией, редуцируются хоботок, мозговой ганглий, глаза (если они имелись), часть сенсилл.

В зависимости от места, способа проникновения в организм моллюска и от биологических особенностей данного вида трематод судьба проникшей личинки оказывается различной.

Так, результаты исследования путей проникновения и стратегии инвазии мирацидия *Schistosoma japonicum* в моллюсков *Oncomelania hupensis* показали, что, по меньшей мере, 57% мирацидиев попадают в моллюск через наружные отверстия (легочная полость, рот, прямая кишка) (Xia, Jourdane, 1991). При этом 34% личинок оказываются в легочной полости и жабрах; желудка достигают 15,7%; 8% личинок проникают через прямую кишку; 13,7% – оказываются в эпителиальных тканях головы и ноги. Оставшееся большое количество личинок (28,6%), находясь в глубоких отделах тела хозяина, проникли в сердце, почку, пищеварительную железу, полости синуса. После инвазии личинки наблюдаются во всех тканях и органах за исключением половой железы. Миграция спороцист по направлению к таким внутренним органам, как почка, сердце и синусы (которые являются обычным местом поселения МС *Schistosoma japonicum*) происходит по циркуляторной системе.

МС *Echinostoma caproni* на 1-й день после заражения наблюдаются в области ректальных и половых гребней, вблизи слюнных желез и синуса кровеносной системы. МС еще не достигают окончательного места поселения (желудочек сердца и проксимальная часть аорты), это происходит на 2-ой день. Они обладают еще такими

чертами мирацидия, как нейральная масса, глазные пятна и апикальная железа. На 2-ой день п. з. некоторые внутренние структуры мирацидия дегенерируют, а в некоторых МС наблюдается дробление 1-2 первичных зародышевых клеток (Атаев et al., 1998). Сравнительное изучение развития МС *E. caproni* и двух представителей рода *Schistosoma*: *S. mansoni* (Yoshino, Loursen, 1995) и *S. japonicum* (Coustau et al., 1997), показало, что МС обоих видов шистозом развиваются в различных тканях моллюска, в то время как материнские спороцисты *Echinostoma caproni* развиваются только в желудочке сердца и аорте. МС *E. caproni*, случайно поселившиеся в таких органах, как буккальная масса или мускул, претерпевают ненормальное развитие, ведущее к гибели (Атаев et al., 1997).

Через некоторое время после заражения моллюска начинается размножение МС. В результате этого процесса образуются особи следующего, также партеногенетического, поколения, которые могут быть представлены у различных видов трематод двумя морфологическими формами: редиями и спороцистами, отличающимися друг от друга не только особенностями строения, но и биологией.

Материнские редии продуцируют только дочерних редий, которые, в свою очередь, могут отрождать не только редий, но и церкарий. Редии обычно свойственны более архаичным трематодам (Fasciolidae, Echinostomatidae, Paramphistomatidae, Psilostomatidae, Philophthalmidae, Lepocreadiidae и др.), но встречаются и у ряда специализированных групп (Heterophyidae, Opisthorchiidae и др.).

У остальных групп трематод МС дают начало дочерним спороцистам, организация которых отличается значительной простотой и, еще в большей степени, чем у редий, подчинена реализации репродуктивной функции. Дочерние спороцисты характерны для более специализированных групп трематод, в основном, для представителей отрядов Strigeiida и Plagiorchiida.

Следует отметить, что чрезмерного значения наличию в жизненном цикле редий или спороцист придавать не следует (Гинецинская, 1968; Pearson, 1992; Галактионов, Добровольский, 1998; Атаев, 2000). В эволюции трематод редии не менее трех раз превращались в спороцист (у Plagiorchiata, Strigeata, Schistosomata).

Важной характеристикой партенит является динамика размножения партенит и структура формируемых ими в моллюске локальных группировок. Согласно мнению большинства исследователей, материнское поколение партенит трематод является наиболее древним (Гинецинская, 1968; Gibson, 1987; Атаев, 2000 и др.) и представляет собой своеобразный «осколок» протрематод, которые еще в палеозое начинали осваивать моллюсков как древнейших животных-хозяев, но на каком-то этапе длительность их пребывания здесь увеличивалась и наметилась тенденция перехода на партеногенетический способ размножения (Атаев, 2000). Это обстоятельство придает изучению МС исключительно важное значение. Особое внимание при этом должно быть уделено проблеме размножения МС, изучение одного из аспектов которой – организация и развитие герминального материала, является задачей нашего исследования.

1.1.3. Организация герминального материала мирацидиев

Размножение партенит трематод связано с функционированием герминального материала, содержащегося в задней части тела мирацидия. Литературные данные по этому вопросу также весьма немногочисленны. Тем не менее, имеющиеся сведения позволяют выделить два основных типа организации герминального материала мирацидиев (Галактионов, Добровольский, 1998; Атаев, 2000).

Первый характерен для личинок, обладающих зрелыми генеративными клетками и эмбрионами, находящимися на ранних стадиях дробления (*Fasciolidae*, *Allocreadidae*, *Paramphistomatidae* и др.). Образование генеративных клеток происходит при формировании мирацидия, а на паразитической фазе идет лишь подращивание эмбрионов дочерних партенит. Плодовитость материнской спороцисты у этой группы трематод ограничивается числом генеративных клеток или образовавшихся в результате их дробления зародышевых шаров, которые содержались в мирацидии. При этом число особей следующего партеногенетического поколения, как правило, не превышает 10, разве что у *Paramphistomum microbothrium* достигает 18-20 (Dinnik, 1961), а у *Fasciola hepatica* (Czapski, 1978), *Prototransversotrema steeri* (Cribb, 1988) и некоторых других видов в материнских спороцистах формируется единственная редия, несмотря на наличие у мирацидия нескольких генеративных клеток.

Таким образом, основным направлением такой стратегии размножения МС становится сокращение числа формируемых генеративных клеток и начало дробления части из них еще во время эмбриогенеза. Углубление этой тенденции приводит к появлению педогенетических мирацидиев *Philophthalmidae*, *Cyclocoelidae* и др., содержащих уже сформированную особь дочернего поколения – материнскую редию (Семенов, 1977; Тихомиров, 1980; Атаев, 1988; Атаев, Добровольский, 1990) и к выпадению паразитической фазы МС.

Другая стратегия, представляет собой отказ МС от формирования зрелых генеративных клеток (тем более их дробления) до момента заражения моллюска. В рамках этой стратегии, в свою очередь, можно выделить две группы трематод.

Первую составляют представители семейства *Echinostomatidae*, детальное описание организации герминального материала мирацидиев которых будет приведено в результатах нашего исследования. Для них характерно образование генеративных клеток при формировании мирацидия и частичный перенос размножения на паразитическую фазу МС.

А среди второй группы доминируют представители «высших» трематод, реализующие генеративную функцию почти исключительно на паразитической фазе развития материнской спороцисты. При этом мирацидии представителей отрядов *Strigeidida* и *Schistosomatida* характеризуются достаточно многочисленными слабо дифференцированными генеративными и недифференцированными клетками. Так, единичные исследования показали, что у мирацидия *Neodiplostomum intermedium* количество генеративных клеток достигает 12 (Pearson, 1961), а у *Schistosoma mansoni* их почти 20 (Pan, 1980). У мирацидиев представителей отряда *Plagiorchiida* состояние герминального материала иное: 1-2 зрелые генеративные клетки и 2-3

недифференцированные клетки (Добровольский и др., 1983; Семенов, 1991). Сходный состав генеративных элементов характерен и для представителей отряда Heterophyida (Добровольский и др., 2000). Мирацидии семейства Paramphistomatidae содержат одиночные крупные зародышевые клетки с очень большим ядром и гомогенной цитоплазмой. Зародышевые клетки обычно собраны в группы: часть из них могут находиться на переднем или заднем конце тела, а большинство заключено в слабо оформленную массу и расположено в центре личинки между петлями экскреторных сосудов. Всего подобных клеток имеется 20-36 (Катков, 1970).

У второй группы трематод МС обладают способностью к умножению клеток генеративного ряда. Так, например, в МС стригеат образуется клеточный тяж, распадающийся на несколько герминальных масс (Pearson, 1961), которые продуцируют основную массу зародышей дочернего партеногенетического поколения. При этом количество последних может измеряться сотнями и тысячами.

Экспериментальное изучение *Microphallus piriformes* показало отсутствие МС как таковой (Галактионов, 1980). При попадании в кишечник моллюска-хозяина мирацидий выходит из яйца, внедряется в стенки этого органа и продвигается по направлению к базальной мембране. У основания клеток эпителия кишечника он останавливается и округляется. В это время происходит полная дегенерация сомы и от материнской спороцисты остается лишь зачаток герминальной массы (1-2 генеративные и несколько недифференцированных клеток). Недифференцированные клетки начинают делиться, в результате чего зачаток разрастается и приобретает форму столона. Основную массу клеток составляют недифференцированные клетки. Часть из них специализируется в опорные, формирующие сложную мембрано-подобную структуру, поддерживающую целостность столона. И лишь очень немногие клетки дифференцируются на этом этапе в генеративные.

На 15-20 сутки при разрастании столон в гемоцеле от них обособляются небольшие участки – отдельные недифференцированные и генеративные клетки. В дальнейшем, за счет клеточной дифференцировки и превращения недифференцированных клеток в генеративные образуются самостоятельные герминальные массы. В них всегда имеется определенное количество недифференцированных, пролиферирующих клеток, то есть параллельно идут процессы образования новых генеративных клеток, их дробление и рост эмбрионов партеногенетических генераций.

Организация герминального материала характеризуется формированием у мирацидиев, в том или ином виде, органа размножения материнской спороцисты – герминальной массы. Впервые герминальные массы были детально описаны Кортон (Cort, 1944; Cort et al., 1954). Дальнейшие исследования (Добровольский и др., 1983; Герасев, Добровольский, 1977; Галактионов, 1993; Галактионов, Добровольский, 1998) показали, что в большинстве случаев герминальная масса представляет собой мультифункциональный орган, совмещающий функции гонады (яичника) и своеобразной выводковой камеры, в которой протекают ранние этапы развития эмбрионов особей следующего поколения.

Обычно в герминальной массе имеется центр пролиферации недифференцированных клеток, которые дают начало структурным клеткам, постепенно преобразующимся в так называемые «звездчатые клетки» с тонкими пластинчатыми отростками, и клеткам половой линии, превращающимся в «генеративные клетки». Эти данные позволили выделить в герминальных массах партенит три морфофункциональные зоны: зону пролиферации, зону созревания генеративных клеток и зону дробления (Добровольский и др., 2000).

Необходимо признать, что генеративно зрелые мирацидии, выполняющие только расселительные функции, ближе к исходному типу, так как они свойственны более архаичным трематодам. И только у некоторых высших трематод – прежде всего плагиорхиат – мирацидии являются настоящими личинками. Перенос мультпликации на паразитическую фазу развития материнской спороцисты сопровождается увеличением ее общей плодовитости, а зачастую и сокращением количества генераций партенит.

В результате можно выделить две стратегии паразитизма современных партенит (Галактионов, Добровольский, 1998; Атаев, 2000).

В одном случае формируются микрогемипопуляции пролонгированного типа, когда длительность существования паразито-хозяйинной системы компенсирует относительно малую плодовитость партенит. Этот тип широко представлен у архаичных трематод (*Fasciolidae*, *Paramphistomidae*, *Echinostomatidae*, *Psilostomatidae* и др.), а также в отрядах *Schistosomatida* и *Strigeidida*. Главной особенностью дочерних партенит этих сосальщиков является переопределение типа отрождаемого потомства: наряду с церкариями, в большинстве случаев покидающими моллюска, они могут производить себе подобных. Такая способность обеспечивает самовосполнение зрелой микрогемипопуляции. Однако существование этой группировки фактически ограничено сроками жизни моллюска-хозяина (Галактионов, Добровольский, 1998).

Во втором формируется микрогемипопуляция лимитированного типа, в которой количество поколений партенит строго детерминировано и не превышает двух: на смену материнской спороцисте приходит лишь одна генерация дочерних спороцист. Такой тип характерен для плагиорхиат и некоторых других трематод. Стратегия развития партенит сводится к формированию сотен дочерних спороцист, в которых развивается большое количество церкарий. Количество дочерних спороцист достигает максимума к концу размножения МС, а после прекращения этого процесса оно может только уменьшаться в результате гибели отдельных особей.

Обе стратегии паразитизма имеют свои преимущества и недостатки, но только устойчивость конкретных жизненных циклов в природе может говорить об их эффективности (Атаев, 2000).

Следует отметить, что приведенные в данном разделе схемы развития партенит разных видов трематод достаточно консервативны. Однако различные факторы могут изменять скорость процесса развития, а также сказываться на интенсивности размножения, размерах эмбрионов и т.п. Характер формируемого потомства определяется стратегией размножения, но также подвержен влиянию как биотических (см. раздел I.2), так и абиотических факторов (см. раздел I.3).

I.2. Защитные реакции моллюсков в ответ на поселение партенит трематод

Время существования трематод и, соответственно, их взаимоотношений с моллюсками, насчитывает 200-400 миллионов лет (Gibson, 1987). Результатом такого продолжительного совместного существования является развитие у моллюсков защитных механизмов в ответ на заражение трематодами и, в частности, эхиностомами. Первым признаком того, что моллюски активно реагируют на поселение паразитов, служит тот факт, что эхиностомы весьма избирательны в выборе моллюсков-хозяев. Так, например, *Echinostoma caproni* может развиваться в моллюсках *Biomphalaria pfeifferi* и *B. glabrata* (Ataev et al., 1997, 1998). Хозяевами *Echinostoma paraensei* могут служить моллюски *Biomphalaria glabrata* и *Physa rivalis*, а экспериментальное заражение *Biomphalaria straminea*, *B. obstructa*, *Helisoma trivolvis* и *Physa virgata* этим видом трематод оказалось безуспешным (Lie, Basch, 1967; Sullivan, 1988). Факторами, ограничивающими развитие трематод в их промежуточном хозяине, могут являться неблагоприятные физиологические условия (рН гемолимфы, концентрация питательных веществ). Однако даже при благоприятной для паразитов среде внутренние защитные механизмы моллюска могут предотвратить их развитие (van der Knaap, Loker, 1990).

I.2.1. Защитные барьеры моллюсков

Моллюски обладают определенными защитными системами, которые ограничивают проникновение чужеродных объектов. Такими барьерами служат раковина, наружный эпителий моллюсков, а также физиологические механизмы. Эффективным физико-химическим барьером на пути патогенного фактора служит кальцинированная раковина, присущая большинству двустворчатых и брюхоногих моллюсков и обладающая у переднежаберных еще и крышечкой. Незащищенные раковиной отделы туловища моллюсков имеют довольно плотные покровы – в этом случае барьерная функция переходит к наружному эпителию, создавая дополнительные препятствия к поиску участка для проникновения мирацидиев трематод в моллюска-хозяина.

Как отмечалось выше, для нормального развития партенит в организме хозяина необходимы определенные условия, определяемые уровнем содержания кислорода, плотностью тканей и пр. При их отсутствии наблюдается замедленное развитие спороцист, их дегенерация или гибель. Однако микробиотопы организма моллюска отличаются разными условиями, необходимыми для развития партенит данного вида трематод.

Так, например, исследования миграции и развития МС *Echinostoma caproni* в организме моллюска *Biomphalaria pfeifferi* (Ataev et al., 1997) показывают, что спороцисты, не достигшие места окончательного поселения – сердца, претерпевают различные морфологические и функциональные изменения. Спороцисты многих видов трематод демонстрируют узкую специфичность в выборе места окончательного поселения.

Однако перечисленные выше барьеры часто оказываются недостаточно эффективными для предотвращения трематодной инвазии. И в этом случае включаются уже внутренние защитные механизмы моллюска. В ответ на

проникновение паразитов у моллюсков формируется большое число гемоцитов, участвующих в подавлении развития партенит трематод.

1.2.2. Гемоцитарные клетки моллюсков

В настоящее время у моллюсков описаны разные типы гемоцитарных клеток. Большинство исследователей сравнивают их с клетками крови позвоночных и, соответственно, выделяют два класса: гиалиновые клетки и гранулоциты (Cheng, 1981; Ratcliffe et al., 1985). Округлые лимфоцитоподобные клетки, циркулирующие в гемолимфе, напоминают Т-клетки человека. Другая группа циркулирующих гиалиновых гемоцитов обладает способностью к распластыванию, активно фагоцитирует инертные частицы и отвечает кислородным взрывом на стимуляцию аналогично макрофагам позвоночных животных (Nakamura et al., 1985; Dikkenboom et al., 1988).

Последний тип клеток наиболее активно участвует в фагоцитозе бактерий и инкапсуляции паразитов (Abdul-Salam, Michelson, 1980; Cheng, 1981; Sminia, 1981). Основными клетками, образующими капсулу, по мнению многих исследователей, являются гранулоциты, хотя включаются и гиалиновые клетки и клетки соединительной ткани (Tripp, 1961; Cheng, 1981; Sminia, 1981; Locker et al., 1982; Wayne, 1983). Предполагается, что клетки, по морфологии напоминающие клетки соединительной ткани, могут быть так же трансформированными гемоцитами (Sminia, 1981).

1.2.3. Гемоцитарные клетки других беспозвоночных

Изучение других беспозвоночных также показало наличие защитных клеточных элементов. Так, например, у кишечнорастных таковыми являются блуждающие амебоциты, принимающие участие в трансплантационном отторжении. Другими клетками, претендующими на роль защитных клеточных элементов, являются подвижные интерстициальные клетки эктодермы (Галактионов, 1995).

У кольчатых червей процесс фагоцитоза, инкапсуляции, распознавания чужого, трансплантационного отторжения и адаптивного переноса обеспечивается в основном амебоцитами гиалинового типа: лимфоцитоподобными амебоцитами первого и второго типов (базофилами), а также нейтрофилами, характеризующимися способностью к активному фагоцитозу (Галактионов, 1995).

У хорошо изученного класса насекомых идентифицировано шесть типов гемоцитов с той или иной формой иммунологической активности (Ratcliffe et al., 1985). Так, например, прогемоциты являются столовыми элементами для клеток гемолимфы. Плазматоциты способны реагировать на антигенные агрегаты, образуя вокруг чужеродного материала меланизированные капсулы. Гранулярные клетки активны в реакциях неспецифической защиты – заживление ран, коагуляция гемолимфы. Оеоциты также вносят свой вклад в процесс инкапсуляции паразитов.

1.2.4. Гуморальные 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. При этом основное внимание в этих исследованиях уделяется гуморальным реакциям. В качестве

гуморальных регуляторов механизма узнавания и инкапсуляции партенит гемоцитами называются опсонины, агглютинины, цитокиноподобные молекулы (Bayne et al., 1985; Bayne, Yoshino, 1989; Locker, Bayne, 1986). Кроме того, в данных процессах могут быть задействованы также цитотоксические факторы (Bayne et al., 1980). Есть предположение, что при отсутствии иммуноглобулинов распознающими факторами в моллюске, вероятно, являются лектины (Галактионов, 1995; Полевщиков, 1996; Баскаков, 2002).

1.2.5. Клеточные реакции моллюсков

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.

В первых исследованиях защитных клеточных реакций у беспозвоночных фагоцитоз был признан сопутствующим в основном протозойным заболеваниям (Догель, 1962). Относительно гемоцитных 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 (Добровольский и др., 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 (Добровольский, Галактионов, 1998).

Такой тип взаимоотношений между хозяином и паразитом также наблюдается между некоторыми личинками нематод и отдельными видами наземных моллюсков (Трушин, 1980). 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.

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 (Галкин, 1976).

В неспецифических паразито-хозяинных моделях защитные реакции моллюсков позволяют предотвратить их заражение трематодами; и в природе существует такая резистентность моллюсков к определенным дигенейм (Langand et al., 1998). Многочисленные исследования показали наличие генетической основы иммунобиологической чувствительности и резистентности у лабораторных линий моллюсков *Biomphalaria glabrata* к заражению шистозомами, а также к заражению *Echinostoma caproni* (Langand et al., 1998; Ataev, Coustau, 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 *Biomphalaria glabrata*, проявляющих 100%-ую резистентность к заражению трематодами *Echinostoma caproni* (Ataev, Coustau, 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. Ее 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.

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, 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.

Таким образом, 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.

1.2.6. Организация амебоцито-продуцирующего органа у моллюсков

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

Позднее для *Biomphalaria glabrata* был выполнен специальный анализ функциональной морфологии АПО (Lie et al., 1975). При этом изучались как

незараженные, так и моллюски, зараженные трематодами *Echinostoma lindoense*, *E. paraensei* и *E. liei*. В этой работе была подтверждена амебоцитопродуцирующая роль мешковидной части почки, где обнаружались мелкие скопления амебоцитов, среди которых очень редко наблюдались 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 удлиненных 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.

Следует подчеркнуть, что в большинстве случаев в качестве АПО различными авторами ошибочно воспринимается участок перикарда – различные клетки, образующие переднюю или латеральные стенки перикарда. На самом деле клетки, составляющие стенки перикарда, не входят в состав АПО (см. раздел IV.2).

В качестве модели для изучения устойчивости моллюсков к трематодной инвазии наиболее часто используются пульмонаты *Biomphalaria glabrata*, проявляющие достоверно резистентные свойства на поселение ряда трематод: *Echinostoma lindoense*, *Paryphostomum segregatum*, *Schistosoma mansoni*, *Echinostoma paraensei*, *Echinostoma caproni* (Locker et al., 1986). Но Сулливаном (Sullivan, 1988) были исследованы и другие моллюски: *Biomphalaria obstructa*, *Helisoma trivolvis* и *Physa virgata*. После заражения моллюсков мирацидиями *Echinostoma paraensei* последующая гистологическая обработка выявила их устойчивость к этому паразиту. Анализ митотической активности позволил в каждом из моллюсков выявить зоны гемопоза. Кроме этого, выяснилось, что передняя стенка перикарда *Biomphalaria obstructa* гистологически и функционально аналогична «реноперикардиальному» АПО, описанному для *B. glabrata*. В *Helisoma trivolvis* АПО представлен группой «бластоподобных» клеток латеральной стенки перикарда. Характерной для АПО биомфаларий гиперплазии не наблюдалось. Автор объясняет это быстрым выбросом образовавшихся в результате деления гемоцитов в гемолимфу. В *Physa virgata* структуры, аналогичной АПО, не обнаружено.

Для *Limnaea stagnalis* был описан АПО, сходный с *Biomphalaria glabrata* (Smina, 1974).

Эти и другие исследования показали, таким образом, наличие органа пролиферации амебоцитов у большинства исследованных в этом направлении бивальвий и гастропод, а степень их развития, локализация и эффективность функционирования различается даже у близких видов.

1.2.7. Исследования трансплантационного иммунитета моллюсков

Непосредственно работу АПО продемонстрировало изучение трансплантационного иммунитета моллюсков (Nojima et al., 1982; Jourdane, Cheng, 1987; Yousif et al., 1989 и др.). 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

не родственных 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.

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 АПО. Так, например, была показана способность моллюсков *Biomphalaria glabrata* распознавать как чужеродный биотический материал, так и аллотрансплантаты головы, ноги, пищеварительной железы и формировать вокруг них капсулы (Jourdane, Cheng, 1987). Описанная инкапсуляция всех этих объектов опровергает предположение Ратклиффа о том, что инкапсуляция вызывается действием литических энзимов, выделяемых при разрушении клеток пищеварительной железы (Ratcliffe et al., 1985). Серия экспериментов, проведенных на *B. glabrata*, позволили исследователям сделать вывод о том, что инкапсуляция чужеродного биотического материала представляет собой неоднородный процесс (Jourdane, Cheng, 1987). Авторы выделили в процессе инкапсуляции две фазы:

1. Гранулоциты хемотоксично 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.

Журдан и Ченг в данной работе также подтвердили установленную ранее зависимость размеров капсулы от типа пересаживаемых аллогенных тканей (Lackie, 1979; 1981). Они определили, 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 мкм), чем вокруг фрагментов пищеварительной железы (165,2 мкм).

Данная реакция на аллотрансплантаты, во многом, сходна, по мнению авторов, с процессом инкапсуляции спорозист *Schistosoma mansoni* в *Biomphalaria glabrata* бразильской (резистентной к шистозомам) линии (Jourdane, 1982). Проведенные исследования с судьбой изотрансплантатов (Cheng, Jourdane, 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 АПО этого вида) дали следующие результаты (Sullivan, 1990, 1995). Кроме очагов гемоцитов, участвующих на ранних стадиях в

реакции инкапсуляции чужеродных объектов, других признаков отторжения отмечено не было. Более того, большинство имплантированных АПО продемонстрировало признаки гемоцитной активности.

При заражении моллюсков *Schistosoma 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 *Lymnaea 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 (Wayne et al., 1980).

В заключении, 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 *Biomphalaria glabrata* (Lie, Heuneman, 1975, 1976). Авторы отмечают, что в незараженных моллюсках АПО 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 *Echinostoma lindoense* АПО медленно расширяется, увеличиваются размеры узелков, в клетках наблюдаются митозы. Изучение ответа АПО моллюска *Biomphalaria glabrata* на его заражение мирацидиями *Echinostoma caproni* уже другими авторами (Joky 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 7^{ой} день. Однако наглядного подтверждения данных результатов (цифровые и иллюстративные) авторами не представлены. Кроме того, необходимо, на наш взгляд, расширение знаний об АПО при изучении других, как близких, так и не родственных, видов моллюсков, представляющих собой известные паразитохозяинные модели.

Не менее важным является изучение связи работы АПО с процессом инкапсуляции паразита гемоцитами моллюска и оценка динамики этой связи. На данный момент мы располагаем некоторыми результатами относительно динамики инкапсуляции материнских спороцист *E. caproni* гемоцитами моллюска *Biomphalaria glabrata* (Ataev, Coustau, 1999; Ataev, 2000). Однако эти данные требуют дальнейшего комплексного анализа динамики инкапсуляции, как с точки зрения блокирования паразита гемоцитами моллюска, так и со стороны работы АПО.

1.4. Цели и задачи исследования.

Основной целью данной работы явилось изучение динамики становления паразито-хозяинной модели, а именно, сопоставление основных этапов развития партенит трематод и защитных реакций моллюсков. Соответственно были определены следующие **задачи** исследования.

1. Изучение развития партенит трематод семейства Echinostomatidae:
 - исследование генеративных элементов и их развития в мирацидиях двух видов эхиностом – *Echinostoma caproni* и *Echinostoma paraensei*;
 - изучение развития паразитической фазы материнских спороцист *E. caproni* в моллюсках *Biomphalaria glabrata*, восприимчивых к трематодной инвазии.
2. Исследование защитных реакций моллюсков в ответ на поселение партенит трематод.

Основное внимание при изучении клеточных реакций моллюсков мы уделили:

- динамике инкапсуляции МС *Echinostoma caproni* в резистентных моллюсках *Biomphalaria glabrata*;
- организации АПО у *B. glabrata* и других видов моллюсков;
- изменению АПО в ходе развития трематодной инвазии.

Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ

III. 1. Развитие партенит трематод семейства Echinostomatidae

III.1.1. Мирацидии *Echinostoma caproni* и *E. paraensei*

Данный раздел посвящен исследованию состава генеративных элементов мирацидиев двух видов эхиностом – *Echinostoma caproni* и *E. paraensei*. Важно отметить, что выбор этой стадии жизненных циклов обусловлен постоянством клеточного состава мирацидиев на протяжении всей свободной жизни (фаза морфофизиологического покоя), что повышает достоверность результатов исследований.

В задней половине тела мирацидиев расположены крупные клетки. Среди них значительными размерами (площадь среза ядер – около 24 мкм²) выделяются клетки, которые мы вслед за другими авторами (Атаев et al., 1997, 1998; Атаев, 2000 и др.) относим к секреторным, не имеющим отношения к размножению партенит. Собственно генеративные элементы мирацидиев *E. caproni* представлены недифференцированными клетками (НК) и генеративными клетками (ГК) (описание см. ниже). Для обозначения последних мы использовали термин «первичные» ГК (Атаев, 2000). ГК обладают крупными пузырьковидными ядрами и базофильной цитоплазмой. НК отличаются от генеративных меньшими размерами и менее выраженной базофилией цитоплазмы. Структура их ядра сходна с таковой ГК, однако характеризуется большей конденсацией ядерного хроматина. Деление НК приурочено к паразитической фазе развития МС, во время которой за счет специализации части НК образуются новые («вторичные») ГК.

Ш.1.1.а. Организация герминального материала в мирацидиях *Echinostoma caproni*. Полученные результаты, в целом, подтвердили данные других авторов об общем строении мирацидиев *Echinostoma caproni* (Fried, Huffman, 1996).

В то же время новые данные были получены нами относительно организации герминального материала личинок.

Длина тела вышедших из яиц мирацидиев *E. caproni* составляет 120-128 мкм, ширина – 35-36 мкм (Рис. 1, 2а). Общее количество клеток достигает $46,5 \pm 0,6$ (n=40). ГК представляют собой крупные клетки (Рис. 2а,б). Площадь их среза составляет, в среднем, $27,0 \pm 0,8$ мкм² (n=19). Они обладают крупными пузырьковидными ядрами с центрально расположенным крупным ядрышком, окруженными базофильной цитоплазмой. Количество ГК, как правило, равно шести. Наиболее крупными размерами (площадь среза до 36 мкм²) отличаются две ГК, расположенные ближе к середине тела мирацидия. Самые мелкие ГК клетки (площадь среза 23 мкм²) находятся в каудальной части личинки.

Здесь же располагаются 2-3 недифференцированные клетки (Рис. 2а). Эти клетки имеют относительно небольшие размеры (площадь среза $17,6 \pm 0,5$ мкм²) (Табл. 9). Структура их ядер сходна с ядрами ГК, однако характеризуется меньшей конденсацией ядерного хроматина. Кроме этого, для недифференцированных клеток отмечается менее выраженная базофилия цитоплазмы.

Ш.1.1.б. Организация герминального материала в мирацидиях *Echinostoma paraensei*. Размеры мирацидиев *Echinostoma paraensei* соответствуют размерам личинок *E. caproni* (длина тела 100-120 мкм, ширина – 50-60 мкм). (Рис. 3)

Герминальный материал мирацидиев *E. paraensei*, как правило, представлен ГК и НК (Рис. 3а). Из 23 просмотренных мирацидиев в трех личинках было отмечено дробление одной из ГК. Во всех случаях это был единственный эмбрион, состоящий примерно из 20-25 бластомеров, покрытых зародышевой мембраной (Рис. 3б,в,г); что свидетельствует о достижении эмбрионом стадии «зародышевого шара» (Cheng, 1961).

Общее количество клеток в мирацидиях *E. paraensei* достигает $67,4 \pm 1,5$ (n=20), а в особях, содержащих эмбрионы, увеличивается до 90. Количество секреторных клеток составляет $11,3 \pm 0,5$ (n=22). Они несколько крупнее, чем у *E. caproni* (площадь среза их ядер $32,3 \pm 1,0$ мкм² (n=20)). Количество ГК здесь заметно выше, чем у *E. caproni*. Если у *E. caproni* число таких клеток равно шести, то в мирацидиях *E. paraensei* оно составляет, в среднем, $11,6 \pm 0,2$ (n=20): минимум 10, максимум 14 (данные для мирацидиев, не содержащих эмбрионы). При этом ГК мирацидиев *E. paraensei* заметно крупнее. Площадь их среза, в среднем, составляет $36,6 \pm 1,2$ мкм² (n=28). Достоверной зависимости между размером ГК и наличием в мирацидии эмбриона не установлено. Однако отмечена зависимость между количеством ГК и наличием эмбриона. В личинках, содержащих эмбрионы, насчитывается не более 6-8 ГК.

Мирацидии *E. paraensei* содержат 2-3 недифференцированные клетки. Однако здесь они крупнее чем в *E. caproni* – площадь их среза, в среднем, составляет $19,6 \pm 0,4$ мкм² (n=30) (Табл. 9). Расположены они также в каудальной части тела личинки.

Табл. 9. Мирацидии *Echinostoma caproni* и *E. paraensei*: общее количество клеток; количественные и размерные характеристики секреторных, генеративных и недифференцированных клеток.

исследуемые параметры (средние величины)	Echinostoma caproni	Echinostoma paraensei	
		<i>с эмбрионом</i>	<i>без эмбриона</i>
количество недифференцированных клеток	2,45±0,17	2	2,25±0,2
площадь недифференцированных клеток	17,55±0,55	19,3±0,45	
количество генеративных клеток	6	7,5±1,45	11,65±0,24
площадь генеративных клеток	26,55±0,8	30,5±1,25	36,6±1,2
количество секреторных клеток	6,8±0,25	8,5±1,2	11,25±0,47
площадь среза ядер секреторных клеток	23,87±0,55	32,25±0,9	
общее количество клеток	44,75±0,76	83,25±1,67	67,4±1,45
количество бластомеров	–	21,45±0,3	–

III.1.2. Развитие материнских спорцист на паразитической фазе

В качестве объектов исследования мы использовали три линии моллюсков *Biomphalaria glabrata*: «Бразильскую», устойчивую в природе к заражению трематодами на 60-70% (Langand et al., 1998) и две лабораторные линии – чувствительную к заражению трематодами на 100% (индивидуальная доза заражения – 8-10 мирацидиев) и резистентную, демонстрирующую 100%-ую устойчивость к заражению (см. раздел III.2). При исследовании защитных реакций резистентных моллюсков было изучено развитие МС *E. caproni* в моллюсках чувствительной линии, используемых в качестве контроля.

К началу работы мы располагали некоторыми данными относительно развития МС *E. caproni* (Атаев et al., 1997,1998; Атаев, 2000). Результаты изучения контроля (моллюски чувствительной линии), в целом, подтвердили эти данные. Следует отметить, что развитие партенит мы изучали в условиях, указанных в этих работах.

Эксперименты проводились при температуре 26⁰С. При исследовании МС *E. caproni* за основу были взяты периоды развития спороцист, предложенные этими авторами. Развитие МС *E. caproni* изучалось в двух видах pulmonat - *Biomphalaria pfeifferi* и *B. glabrata*. Установлено принципиальное сходство схем миграции и развития спороцист в обоих моллюсках.

III.1.2.a. Развитие материнских спороцист *Echinostoma caproni* в моллюсках *Biomphalaria pfeifferi*. Местом проникновения мигрирующей личинки могут быть различные участки тела моллюска, незащищенные раковинной оболочкой: поверхность головы, ноги (включая подошву), а в ряде случаев личинки внедряются непосредственно из мантийной или ротовой полости.

Миграция МС начинается сразу после «периода покоя», занимающего около 3-х часов (Рис. 4). В течение этого времени происходит подготовка к миграции, и, прежде всего, формирование дефинитивных покровов.

Местом окончательного поселения МС является желудочек сердца и проксимальная часть главной аорты. Следует отметить, что успех миграции зависит от места проникновения мигрирующей личинки в моллюска и, соответственно, величины пути и характера тканей, преодолеваемых спороцистами (Рис. 5, 6а). Так, щупальца моллюска пронизаны различными кровеносными сосудами – центральная артерия, периферические синусы. Соответственно, спороциста по одному из синусов беспрепятственно достигает висцеральной части головы. Сюда же устремляются спороцисты, сформированные под покровами головы, ноги и в стенках ротовой полости. Но партенитам, мигрирующим через толщу ноги приходится преодолевать довольно плотные ткани, поэтому скорость их миграции ниже. После достижения висцеральной части головы миграция осуществляется по лакунам гемоцеля, либо под покровами различных органов. По мере достижения области перикарда МС поднимаются к мантийной полости и далее под ее покровами продвигаются к сердцу. Спороцисты, сформированные в мантийном воротничке и под мантийным эпителием, не уходят вглубь тканей, а продвигаются по одной из вен, либо под базальной пластинкой к легочной вене.

Завершается миграция, как правило, через сутки п.з. После прикрепления к стенкам желудочка или аорты, МС не меняют своей локализации до самой гибели. При этом участок прикрепления обрастает фиброзным материалом, что делает соединение более надежным (Рис. 6б, в).

В «период роста» МС наблюдаются увеличение их размеров и «активизация» всех типов клеток, в том числе НК и ГК. В результате образуются новые ГК, и формируются эмбрионы.

Следует заметить, что нормальное развитие наблюдается только у спороцист, достигших желудочка сердца или аорты. Однако, не все МС

способны завершить миграцию в сердце моллюска. Так, например, зарегистрированы случаи развития МС в мускульной части буккальной массы (Рис. 7). Такие спороцисты проходят только начальные этапы развития и через 7 дней п. з. представляют собой организм, находящийся на последней стадии дегенерации.

Другой пример – развитие семидневной спороцисты в буккальной артерии (Рис. 8). В этом случае в спороцисте отмечены несколько эмбрионов, в двух из которых даже заметны морфогенетические преобразования. Тем не менее, МС заметно отстают по размерам и уровню развития герминального материала от МС, развивающихся в сердце. Размножения у таких МС не зарегистрировано.

Таким образом, полноценное развитие спороцист возможно только в сердце моллюска, достижение которого должно произойти в течение первых суток п. з. Иначе МС поселяются в других частях тела моллюска, что приводит к невозможности формирования ими полноценного потомства.

У спороцист, развивающихся в сердце, период размножения характеризуется интенсивным развитием и отрождением редиоидных зародышей.

Через сутки п. з. количество клеток спороцисты увеличивается до 100-150. Происходит дробление первых ГК, в результате чего образуется 1-2 редиоидных эмбриона, состоящих из 2-4 бластомеров.

Через 2 дня п. з. наиболее развитые эмбрионы состоят из 5-10 бластомеров. Приступили к дроблению и остальные первичные ГК. В этот же период начинается пролиферация недифференцированных клеток. При этом вновь образующиеся клетки частично дифференцируются во «вторичные» ГК, что приводит к росту общего числа генеративных элементов, а частично – в структурные клетки.

Через 3 дня п. з. часть эмбрионов достигает стадии 25-30 бластомеров. На их поверхности формируется зародышевая мембрана.

В теле 7-дневной спороцисты первые зародыши практически завершают свой морфогенез – у них уже хорошо различимы основные органы, присущие материнским редиам, и появляются первые эмбрионы следующего партеногенетического поколения. Отрождение первых материнских реди зарегистрировано через 8 дней п.з. При небольшой интенсивности инвазии они обычно остаются рядом со спороцистами. И лишь после заполнения полости желудочка и (или) аорты все большая часть реди покидает ее и расселяется по телу хозяина. В течение последующих 2-3 суток большинство эмбрионов покидает спороцисту. В ней остается не более двух эмбрионов, образованных первичными ГК. Но спороциста уже содержит от шести до десяти зародышевых шаров, сформированных из вторичных ГК. Через 2 недели п.з. процесс отрождения материнских реди завершается.

Через 3 нед. п.з. отмечается начало эмиссии первых церкарий (Рис. 9).

Заключительный этап в онтогенезе МС – это период дегенерации: наблюдается сокращение размеров спороцист, новые эмбрионы не образуются (Рис. 10). Более того, не все из ранее сформированных зародышей успевают закончить свое развитие, так как нарастающие процессы дегенерации приводят к разрушению эмбрионов. Средняя продолжительность МС от момента проникновения в моллюска составляет 20-23 дня. Погибающая спороциста открепляется от тканей и выносится током гемолимфы за пределы центральной кровеносной системы.

III.1.2.б. Развитие материнских спороцист *Echinostoma caproni* в моллюсках *Biomphalaria glabrata* восприимчивой линии. В настоящем разделе приведена общая характеристика развития МС *Echinostoma caproni* в моллюсках *Biomphalaria glabrata*. Более подробно оно будет рассмотрено ниже – при описании судьбы спороцист в *B. glabrata* резистентной линии и сравнении ее с данными контрольной серии, состоящей из чувствительных моллюсков (см. раздел III.2.1).

«Период покоя» МС *Echinostoma caproni* длится около 6 часов (Рис. 11). При сохранении общей схемы миграции она занимает в моллюсках *Biomphalaria glabrata* больше времени, чем в *B. pfeifferi*. Это объясняется, прежде всего, более плотными покровами и значительно более крупными размерами *B. glabrata*. Массовое завершение миграции МС происходит на вторые сутки п. з.

Только после этого наблюдается активизация митотических процессов соматических и генеративных клеток (Рис. 12). Таким образом, на начальном этапе паразитирования МС в *B. glabrata* происходит некоторая задержка их развития. Однако в дальнейшем, спороцисты развиваются достаточно интенсивно, чтобы приступить к отрождению первых материнских редий, как и в *B. pfeifferi*, на восьмой день п. з. Сохраняется и последовательность развития герминального материала. Вначале из «первичных» ГК формируется около шести редиоидных эмбрионов, 1-2 из которых опережают в развитии остальные. И только после их отрождения заканчивают свое развитие зародыши, берущие свое начало от «вторичных» ГК. По предварительным данным, количество таких эмбрионов в спороцистах из *B. glabrata* может достигать 15 (в МС *B. pfeifferi* оно не превышало 10).

III.1.2.с. Развитие материнских спороцист *Echinostoma paraensei* в моллюсках *Biomphalaria glabrata*, восприимчивых к инвазии. «Период покоя» МС *Echinostoma paraensei* так же, как и у *E. caproni*, составляет, в среднем, 6 часов. В дальнейшем, МС мигрируют в аорту или желудочек сердца, где приступают к размножению. Завершение миграции МС также происходит на вторые сутки п. з. Изучение развития МС *E. paraensei* в моллюсках *Biomphalaria glabrata* показало, что размножение МС начинается уже на 6-ой день п.з. (см. раздел IV.1). Наши результаты подтвердили данные авторов, указывающих, что первая материнская редия, отрождаемая *E. paraensei*, по своим размерам примерно в 2 раза превосходит редий, сформированных позднее. (Saar, Meyer, Loker, 1998). Очевидно, формирование эмбриона уже во время эмбриогенеза мирацидия *Echinostoma paraensei* ускоряет размножение МС на несколько дней по сравнению с МС *E. caproni*, у которых первые эмбрионы достигают стадии зародышевого шара лишь на 3-й день п. з.

III.2. Защитные реакции моллюсков на поселение партенит трематод

III.2.1. Клеточные реакции моллюсков *Biomphalaria glabrata* на поселение материнских спороцист *Echinostoma caproni*

III.2.1.1. Клеточная реакция моллюсков *Biomphalaria glabrata* в периферических тканях

III.2.1.1.а. Моллюски *Biomphalaria glabrata*, восприимчивые к инвазии. Как отмечалось выше, «период покоя» МС *Echinostoma caproni* в моллюсках *Biomphalaria*

glabrata длится 5-9 часов (в среднем, около 6 часов) (см. раздел III.1.2.б). В течение этого времени уже наблюдается миграция гемоцитов к месту расположения спороцисты. Такие скопления, окружающие МС, зарегистрированы в 50-ти процентах случаев как через 6 часов, так и через сутки п.з. в области подошвы, щупальцах; их размеры на срезе составляют 60-120×84-240 мкм (Рис. 13, 14).

Ярко выраженной инкапсуляции спороцист не наблюдается, и они успешно завершают свою миграцию к сердцу моллюска.

III.2.1.1.б. Моллюски *Biomphalaria glabrata* резистентной линии. Клеточная реакция моллюсков также наблюдается в течение «периода покоя» МС, но не препятствует миграции спороцист к месту окончательного поселения. Тем не менее, через 2 дня п. з. отмечен случай инкапсуляции спороцисты, не успевшей завершить свою миграцию (Рис. 15). Данная капсула с остатками МС зарегистрирована в области подошвы моллюска, ее размеры на срезе составляют, в среднем, 89×189 мкм. Из 10 моллюсков, исследованных через 6 часов п.з. и через 2 дня п.з. периферическая клеточная реакция обнаружена только у 1 моллюска (через 2 дня п. з.).

III.2.1.2. Клеточная реакция моллюсков *Biomphalaria glabrata* в области сердца

III.2.1.2.а. Клеточная реакция моллюсков *Biomphalaria glabrata*, восприимчивых к инвазии. Ранее отмечалось, что местом окончательного поселения МС *Echinostoma caproni* в моллюсках *Biomphalaria glabrata* является желудочек сердца и аорта (см. раздел III.1.2.а). Клеточная реакция моллюсков *B. glabrata* чувствительной линии, в целом, значительно ослаблена, по сравнению с резистентными, и заключается в формировании многочисленных скоплений гемоцитов недалеко от места развития спороцист. Такие агглютинации зарегистрированы в желудочке сердца, аорте и перикардиальной полости. Так, например, через 6 дней п.з. в области перикарда наблюдаются крупные агглютинации гемоцитов, размер которых на срезе составляет, в среднем 250×350 мкм (Рис. 12). Они часто достигают значительных размеров (до 360×780 мкм), сопоставимых с размерами капсул, окружающих партенит в резистентных моллюсках. В некоторых случаях агглютинации располагаются в непосредственной близости от МС, а довольно тонкие слои гемоцитов (толщиной 10-15 мкм) окружают спороцисты. Однако инкапсуляция последних не зарегистрирована.

III.2.1.2.б. Клеточная реакция моллюсков *Biomphalaria glabrata* резистентной линии. Динамика инкапсуляции материнских спороцист *Echinostoma caproni*. Как отмечалось выше, клеточная реакция проявляется вскоре после проникновения мирацидия в моллюска; однако она не препятствует завершению миграции спороцист. Как правило, в резистентных моллюсках, спороцисты успевают приступить к миграции раньше, чем вокруг них сформируются настоящие капсулы.

В большинстве случаев процесс инкапсуляции приурочен к месту окончательного поселения спороцист – желудочку сердца и проксимальной части главной аорты. В первые часы после завершения миграции вокруг спороцист начинают формироваться скопления гемоцитов (Рис. 16а–в). На этом начальном этапе инкапсуляции гемоциты направляются в сторону МС, но не оседают на ее тегументе. Приток новых гемоцитов

продолжается, а между поверхностью МС и стенкой формирующейся капсулы остается небольшой просвет (Рис. 16д). Капсула, таким образом, нарастает с «периферии». Хорошо заметна сильная инфильтрация сердечной ткани по сравнению с сердцем незараженных моллюсков.

В зависимости от локализации МС процесс инкапсуляции на начальных этапах выглядит по-разному. В желудочке сердца слои гемоцитов плотно окружают МС со всех сторон, и капсула характеризуется сферической формой. Если она располагается в центре желудочка, то МС находится в середине, а слои гемоцитов практически одинаковой толщины равномерно окружают ее со всех сторон (Рис. 17, 21а). В большинстве случаев капсулы приурочены к стенкам желудочка; МС находится в непосредственной близости от стенки желудочка, а основная часть капсулы располагается над МС (Рис. 18).

В аорте, капсулы характеризуются трубчатой формой. Направляясь к спороцисте, гемоциты оседают на стенках аорты, по мере прибывания новых клеток толщина слоев гемоцитов увеличивается, и расстояние между ними и спороцистой сокращается. Однако слои гемоцитов окружают МС только со стороны стенок аорты и не смыкаются на входе и выходе из аорты – между ними и МС остается просвет, в котором циркулируют гемоциты (Рис. 19). Полная изоляция спороцист слоями гемоцитов наблюдается на последних этапах формирования капсулы.

Размеры капсул, обнаруженных через 2 дня п.з., в среднем, составляют 255×147 мкм, а максимальная толщина их стенок – 180 мкм (Рис. 20). На поверхности спороцист наблюдаются лишь отдельные амебоциты; достоверных нарушений тегумента МС не выявлено. Клеточный состав спороцист не претерпевает изменений, и, в целом, соответствует клеточному составу мирацидию. Выражена дезинтеграция клеток. Отмечены делящиеся генеративные клетки (ГК), эмбрионы найдены не были.

Через 3 дня п.з. развитие клеточной реакции приводит к более или менее выраженной изоляции большинства спороцист, поселившихся в желудочке и аорте. На начальном этапе разрушения спороцисты между поверхностью МС и стенкой формирующейся капсулы оставался небольшой просвет. В дальнейшем, просвет исчезает, и происходит полное разрушение спороцисты. Покровы МС разрушаются, некоторые амебоциты проникают внутрь ее тела, где наблюдается сильная дезинтеграция и уплощение клеток (Рис. 16г, д). Кроме этого, отмечены делящиеся ГК и 1-2 эмбриона с 5-6 бластомерами. Размеры капсул, обнаруженных через 3 дня п.з., в среднем, составляют 432×237 мкм с максимальной толщиной стенки 258 мкм.

Через 4 дня п.з. в резистентных моллюсках продолжается интенсивный процесс инкапсуляции и разрушения спороцист. Следует отметить, что инфильтрация сердечной ткани становится менее выраженной, а капсулы к этому времени достигают максимальных размеров – 504×396 мкм с толщиной стенки 252 мкм (Рис. 21а). Размеры самих спороцист составляют 35×49 мкм (в моллюсках, восприимчивых к трематодной инвазии, средние размеры МС к этому сроку составляют 80×230 мкм). Среди клеток, расположенных в центре капсулы и контактирующих с поверхностью МС, наблюдается некроз. Таким образом, в сформированной капсуле четко выделяются 2 зоны: в центре –

зона дегенерирующих и мертвых клеток, окружающих дезинтегрированные останки спороцисты; а снаружи – зона молодых клеток.

Через 7 дней п.з. процесс разрушения МС практически завершился. Размеры капсул к этому времени, в среднем, составляют 306×480 мкм (Рис. 23). В отдельных случаях капсулы достигают значительных размеров, занимая большую часть желудка (Рис. 22). Хорошо выражена зональность капсул (Рис. 21д).

Следует отметить, что кроме капсул, формирующихся вокруг МС, зарегистрированы агглютинации, которые не приурочены к местам расположения спороцист. В агглютинациях также отсутствует зональность – молодые, дегенерирующие и мертвые клетки встречаются примерно в одинаковом соотношении по всему объему этих скоплений. Минимальные и максимальные размеры агглютинаций (через 3-5 дней п.з.) на срезе составляют 120–156 и 264–360 мкм соответственно (Рис. 21б–г).

Через 7 дней п.з. в перикардиальной полости еще присутствуют различные скопления гемоцитов размером 144×360 мкм, сохранившиеся и на 10-й день п.з. (Рис. 21е). В дальнейшем, наблюдается интенсивное их разрушение, а на 13-15-й день п.з. данных образований обнаружить уже не удастся.

Отмечены также случаи поселения спороцист в области перикарда. Такие МС зарегистрированы через 3 и 5 дней п.з. (Рис. 16е, 21г). В спороцистах хорошо заметны дегенерационные процессы, проявляющиеся в пикнотизации ядер практически всех типов клеток (в том числе генеративных), с последующим разрушением клеток и увеличением межклеточных пространств. Несмотря на наличие клеточной реакции (в желудочке сердца отмечались крупные агглютинации), инкапсуляции МС в этих случаях не наблюдалось.

III.2.2. Клеточная реакция моллюсков *Biomphalaria glabrata* резистентной линии на заражение метацеркариями *Echinostoma caproni*

Вопрос о патогенности метацеркарий для самих биомфаларий находился в центре внимания некоторых исследований (Kuris, Warren, 1980; Атаев, 2000). В результате были получены доказательства их высокой патогенности при высокой интенсивности заражения. Однако возможность развития метацеркарий *Echinostoma caproni* в моллюсках *Biomphalaria glabrata* резистентной линии ранее не изучалась. С целью получения ответа на него был проведен небольшой эксперимент. В три аквариума (объемом 5 литров) были помещены по 20 улиток *B. glabrata* чувствительной линии, зараженных партенитами *Echinostoma caproni* (30 дней п.з.) и по 20 улиток *Biomphalaria glabrata* резистентной линии (диаметр раковины 9-10 мм).

В дальнейшем, выходящие из чувствительных моллюсков церкарии заражали, как эмитирующих их улиток, так и резистентных биомфаларий примерно в одинаковом соотношении. Такая экспозиция церкариями продолжалась в течение двух недель. За это время моллюски обеих линий “на копили”, в среднем, по 100-150 метацеркарий. Важно отметить выраженную клеточную реакцию со стороны моллюсков на поселение последних (Рис. 24, 25). Затем резистентные моллюски, зараженные метацеркариями, были помещены в отдельный аквариум, и содержались там в течение двух недель - до созревания метацеркарий. После этого было вскрыто 30 моллюсков и собранными метацеркариями было заражено 11 лабораторных мышей: 5 самцов и 6 самок. Доза индивидуального заражения составила

10-15 цист. Через три недели после этого выжившие животные (4 самца и 5 самок) были помещены в бокс для получения яиц. Полученные яйца были стандартно обработаны и помещены в инкубатор для завершения развития мирацидиев (температура 26°C). Для контроля зараженные мыши были вскрыты: во всех были обнаружено от 4 до 7 половозрелых марит.

После созревания яйца были отмыты и помещены под лампой для активизации вылупления мирацидиев. Вышедшими личинками были инвазированы 50 улиток *B. glabrata* чувствительной линии (доза заражения составила 9-11 мирацидиев на одного моллюска). Экстенсивность инвазии составила около 75%, что укладывается в норму.

Таким образом, устойчивость биомфаларий резистентной линии по отношению к партенитам *Echinostoma caproni* не проявилась по отношению к метацеркариям этого вида. Несмотря на ярко выраженную реакцию, личинки в этих моллюсках завершают свое развитие и становятся инвазионными для дефинитивного хозяина.

III.2.3. Гемопоз у моллюсков *Biomphalaria glabrata*

Как указывалось выше (см. раздел I.2.6), изучение клеточных реакций моллюсков показало наличие у них очагов гемопоза, которые были обозначены как единый «амебоцито-продуцирующий орган» (АПО) (Pan, 1958; Tripp, 1961; Lie et al., 1975; Jourdan, 1982; Sullivan, 1990; Sullivan et al., 1995, 1998). Однако эти работы содержат противоречивые сведения, касающиеся структуры, локализации и работы АПО. Так, в большинстве случаев в качестве АПО различными авторами ошибочно воспринимается участок

перикарда (см. раздел IV.2). Несмотря на попытки ряда авторов проследить изменения внешнего вида АПО при заражении моллюсков *Biomphalaria glabrata* партенитами трематод (Lie, Neupman, 1976 и др.), динамика работы АПО к настоящему времени остается практически неизученной. Для выяснения этих вопросов нами детально была изучена организация, место расположения АПО и динамика его изменения в ходе развития трематодной инвазии.

III.2.3.1. Организация и работа АПО у моллюсков *Biomphalaria glabrata*

III.2.3.1.а. АПО незараженных моллюсков *Biomphalaria glabrata*. АПО

расположен между передней стенкой перикарда и мантийным эпителием (ближе к перикарду) и представляет собой небольшую структуру, состоящую из нескольких скоплений клеток – узелков. Узелки находятся вблизи наружной стороны перикарда и приурочены к лакунам кровеносной системы. Они как бы выстилают лакуны по краям, обращенным к перикарду. Вблизи мантийного эпителия узелки не обнаружены. Форма узелков варьирует от овальной, вытянутой до разветвленной, амебоподобной. Узелки образованы удлинёнными клетками, расположенными довольно близко друг к другу – расстояние между клетками не превышает диаметр самих клеток. Клетки характеризуются базофильной цитоплазмой и ядрами овальной формы.

У незараженных моллюсков количество узелков не превышает 5, а их размер – 25×50 мкм. Узелки имеют овальную форму и расположены на некотором расстоянии друг от друга.

Для оценки степени активности АПО были выбраны узелки средних размеров (22×44 мкм) и подсчитано количество клеток, которые они содержат (по числу ядер на

каждом срезе). Толщина узелков была определена по количеству срезов и варьировала в зависимости от линии и срока заражения моллюсков.

У незараженных моллюсков *B. glabrata*, восприимчивых к инвазии, толщина узелков едва достигает 30-36 мкм. Узелки обладают овальной формой и находятся на значительном расстоянии друг от друга (до 50 мкм) (Рис. 26а). Количество клеток в узелках, в среднем, составляет 29.00 ± 0.90 ($n=9$), упаковка клеток в узелках рыхлая – от 4 до 11 клеток на одном срезе узелка.

У незараженных резистентных моллюсков количество клеток в узелках, толщиной 45-55 мкм, в среднем, составляет $67.50 \pm 1,5$ ($n=5$). Клетки в узелке упакованы рыхло: каждый гистологический срез одного узелка содержит 4-12 клеток (Рис. 26б).

Интересные результаты получены при изучении состояния АПО у моллюсков *B. glabrata*, резистентных в природе к заражению *Echinostoma caproni* (Рис. 27). У незараженных моллюсков этой линии узелки содержат $85,4 \pm 0,25$ ($n=10$) клеток, что значительно превышает данные для лабораторной резистентной линии моллюсков этого вида.

III.2.3.1.б. Динамика работы АПО зараженных моллюсков *Biomphalaria glabrata*, восприимчивых к инвазии. В моллюсках *Biomphalaria glabrata*, зараженных *Echinostoma caproni*, активизация АПО наблюдается уже через 6 часов п.з. Узелки к этому времени содержат 35.33 ± 0.76 ($n=6$) клеток. Через сутки п.з. количество узелков увеличивается до 6-7, они вытягиваются вдоль перикарда, расстояние между ними сокращается (Рис. 4). Количество клеток в узелках через сутки п.з. составляет 49.40 ± 1.94 ($n=5$), их упаковка становится более плотной (Рис. 28а). В дальнейшем, отмечается постепенное повышение активности АПО. Через 2 дня п.з. узелки содержат 56.30 ± 1.28 ($n=10$) клеток. Заметно увеличивается и толщина узелков – до 42-48 мкм.

Через 4 дня п.з. отмечается максимальная активность АПО. Узелки содержат уже 133.60 ± 2.29 ($n=5$) плотно упакованных клеток – до 19 клеток на одном срезе. Узелки приобретают разветвленную форму, их количество увеличивается до 7-8, а размеры – до 30×70 мкм. Большинство из узелков сливаются, образуя единую клеточную массу, которая, однако, уступает по размерам и степени разветвленности АПО резистентных моллюсков.

Далее наблюдается резкое снижение активности АПО. Количество клеток в узелках через 5 дней п.з. составляет 70.43 ± 1.81 ($n=7$); через 7 дней п. з. – 84.00 ± 0.95 ($n=5$). При этом клетки в узелках упакованы довольно плотно (для моллюсков, восприимчивых к инвазии) – до 17 клеток на каждом срезе (Рис. 28б, 29).

В дальнейшем, активность АПО постепенно снижается, и через 14 дней п.з. узелки содержат уже 55.20 ± 1.83 ($n=5$) клеток (Рис. 36б). Уменьшается толщина узелков, их количество (до 3-4); а упаковка клеток в узелках становится почти сходной с упаковкой клеток в узелках незараженных моллюсков – 6-12 клеток на каждом срезе.

В моллюсках *Biomphalaria glabrata*, зараженных партенитами *Echinostoma paraensei*, также изучены изменения клеточного состава АПО в ходе развития инвазии. Так, через 6 часов п.з. наблюдается повышение активности АПО: узелки к этому времени вытягиваются вдоль перикарда,

достигая в размере 35×60 мкм. Количество клеток в них составляет 51±0,25 (n=5).

Через 6 дней п.з. число узелков не превышает 3-4, они содержат 39,8±1,4 (n=5) клеток. В дальнейшем активность АПО продолжает находиться на низком уровне, а через 10 дней п.з. количество клеток в узелках составляет 32,3±0,8 (n=5), их упаковка становится более рыхлой (Рис. 30а,б). Узелки размером 25×50 мкм располагаются вдоль перикарда на значительном расстоянии друг от друга. А через 15 дней п.з. состояние АПО возвращается к исходному.

III.2.3.1.в. Динамика работы АПО моллюсков *Biomphalaria glabrata* резистентной линии. Повышение активности АПО наблюдается через 6 часов п.з. Многие узелки вытягиваются вдоль перикарда, достигая в размере 35×60 мкм, а расстояние между ними заметно сокращается. Узелки содержат 91.20±1,62 (n=5) клеток. Упаковка клеток в узелках продолжает оставаться рыхлой (Рис. 31).

Через 2 дня п.з. количество клеток в узелках, в среднем, составляет 109.27±1.78 (n=11). Заметное повышение активности АПО зарегистрировано через 3 дня п.з. (Рис. 32). Форма узелков характеризуется большой разветвленностью, их число достигает 8-10, а размер – 40×100 мкм. В узелках уже насчитывается 186.15±3.42 (n=20) клеток, которые располагаются довольно близко друг к другу – их количество на одном срезе достигает 11-23. В клетках наблюдаются митозы (Рис. 33, Табл.10). Кроме этого, происходит слияние некоторых узелков; образовавшиеся клеточные тяжи достигают 600-950 мкм в длину и 66-78 мкм в толщину.

Через 4 дня п.з. узелки содержат 215.60±1.01 (n=10) клеток (Рис. 34). А максимальная активность АПО отмечается через 5 дней п.з. Количество клеток в узелках к этому времени составляет 240.83±3.18 (n=6), клетки упакованы в них очень плотно – от 14 до 29 клеток на одном срезе узелка (Рис. 35б). Мультипликация клеток АПО приводит к тому, что поверхность желудочка покрывается гемоцитами, а в сердечной и перикардиальной полости образуются многочисленные агглютинации округлой и вытянутой формы. Их минимальные и максимальные размеры на срезе составляют 96-120 и 180-360 мкм соответственно.

В дальнейшем, наблюдается заметное снижение пролиферативной активности клеток АПО. Через 7 дней п.з. узелки уже содержат 100.07±1.17 (n=15) клеток, а срезы узелков – 7-13 клеток (Рис. 35а). А состояние АПО через 10-й день п.з. возвращается к исходному: число узелков едва достигает 4-5, их толщина не превышает 60 мкм; а количество клеток в узелках, в среднем, составляет 76.80±1.96 (n=5) (Рис. 36а).

Табл.10. Среднее количество митозов в клетках на гистологическом срезе (n=5) АПО резистентных и чувствительных моллюсков *Biomphalaria glabrata*, зараженных партенитами *Echinostoma caproni*.

дни п.з.	среднее количество митозов	
	резистентные моллюски	чувствительные моллюски

2	3,5±0,2	2,5±0,5
3	5,2±1.3	–
4	–	4,5±0,1
5	6,5±0,8	3,1±0,2
7	5,8±0,5	3,5±0,5

III.2.3.2. Циркуляция гемоцитов

Пролиферативная активность АПО приводит к изменению в количестве гемоцитов, циркулирующих в организме моллюска.

Анализ гемолимфы незараженных моллюсков *B. glabrata* чувствительной и резистентной линий (Атаев, Coustau, 1999; Атаев, 2000) показал отсутствие достоверного отличия между количеством циркулирующих гемоцитов. При изучении 1мкл гемолимфы чувствительных моллюсков адгезия наблюдается у 76 ± 29 (n=10), не наблюдается у 42 ± 15 (n=10) клеток в просмотренном объеме. Для резистентных моллюсков это соотношение соответственно составило: 66 ± 19 (n=12) и 34 ± 17 (n=12).

Через 2-3 часа после заражения моллюсков обеих линий мирацидиями *Echinostoma caproni* наблюдается быстрый рост числа циркулирующих гемоцитов.

У моллюсков, восприимчивых к инвазии, рост числа циркулирующих неадгезирующих гемоцитов зарегистрирован с 2,5 часов до 21 дня п.з., адгезирующих гемоцитов – с 2,5 часов до 7-го дня п.з. и достигает максимума (700 клеток в 1 мкл) на 8-й день п.з. (Рис. 37а). Возможно, это повышение является реакцией моллюска на появление первых материнских редий.

У резистентных моллюсков рост числа циркулирующих неадгезирующих гемоцитов наблюдается с 1-го по 17-й день п.з., а адгезирующих – с 3-го по 17-й день п.з. (Рис. 37б). Количество клеток в 1 мкл гемолимфы в обоих случаях не превышает 200-210. Выявленного максимума в росте числа гемоцитов у резистентных моллюсков не отмечено. Повышение количества циркулирующих гемоцитов в зараженных резистентных моллюсках приводит к сильной инфильтрации различных тканей и, прежде всего желудочка сердца и аорты. Уже на ранних этапах заражения (через 6 часов п. з.) замечено проявление клеточной реакции, которая представляет собой слабую инфильтрацию мелких лакун гемоцеля отдельными гемоцитами. А через 2 дня п. з. ярко выражена вентрикулярная гипертрофия и гиперплазия – в основном, в области локализации паразитов. Интенсивное разрастание образований приводит к сокращению просвета желудочка и аорты. Такая сильная инфильтрация сердечной ткани является начальным этапом процесса инкапсуляции материнских спороцист.

III.2.4. Изучение клеточных реакций других видов моллюсков

III.2.4.1. Организация и динамика работы АПО у моллюсков

Biomphalaria pfeifferi, зараженных МС *Echinostoma caproni*

Место расположения АПО в моллюсках *Biomphalaria pfeifferi* аналогично таковому у *B. glabrata*. У незараженных моллюсков *B. pfeifferi*

АПО так же отличается небольшими размерами: 3-4 узелка овальной формы расположены вдоль наружной стороны передней стенки перикарда (Рис. 38а). Их размеры не превышают $25 \times 50 \times 30$ мкм. Количество клеток в узелках, в среднем, составляет 37 ± 2.7 ($n=5$), а их упаковка остается рыхлой – на одном срезе узелка находятся 6-9 клеток.

Уже через 3 часа п.з. моллюска трематодой *Echinostoma caproni* в состоянии АПО зарегистрированы некоторые изменения. К этому времени форма узелков становится более вытянутой, а количество клеток в них достигает 69.18 ± 0.91 ($n=11$) и в течение следующих нескольких часов остается на этом же уровне.

Заметное повышение пролиферативной активности клеток АПО наблюдается через 18 часов п.з. (Рис. 38б). Через 18 часов п.з. узелки содержат 84.50 ± 1.8 ($n=6$) клеток, а через 1 день п.з. – 112.4 ± 3.68 ($n=5$). При этом клетки в узелках упакованы довольно плотно – до 16 клеток на каждом срезе. Форма узелков становится более разветвленной, их количество достигает 6-8. Такая активность АПО наблюдается и через 2 дня п.з.

В дальнейшем, отмечается тенденция к ее ослаблению. Количество клеток в узелках через 3-7 дней п.з. варьирует в пределах 48.5-71.2, а толщина узелков составляет 36-42 мкм. Через 10 дней п.з. мультипликация клеток АПО вновь увеличивается, а через 13 дней п.з. достигает второго максимума. В узелках к этому времени насчитывается 84.8 ± 2.72 ($n=5$) клеток, срезы узелков содержат до 15-17 клеток, а толщина самих узелков составляет 48-60 мкм.

В дальнейшем, активность АПО постепенно снижается (Рис. 39а,б). Через 21 день п.з. количество клеток в узелках составляет 49.42 ± 2.03 ($n=7$), а через 30 дней п.з. – уже 37.8 ± 1.59 ($n=5$). Через 37 дней п.з. узелки содержат 23 ± 0.65 ($n=5$) клеток, что несколько ниже количества клеток в узелках у незараженных моллюсков (Рис. 40). Упаковка клеток в узелках становится более рыхлой – от 4 до 8 клеток на одном срезе, а толщина узелков составляет, в среднем, 27 мкм.

III.2.4.2 Клеточная реакция моллюсков *Succinea putris*, *Planorbis planorbis* и *Planorbarius corneus*

Кроме моллюсков рода *Biomphalaria* на предмет изучения организации АПО были исследованы некоторые другие представители легочных моллюсков.

У моллюсков *Succinea putris* (зараженных *Leucochloridium paradoxum*), так же как и у *Biomphalaria* АПО расположен вблизи передней стенки перикарда. Однако узелки отличаются крайне рыхлой упаковкой клеток (Рис. 41). Узелки имеют овальную форму, расположены на значительном расстоянии друг от друга, их размеры на срезе не превышают 35×70 мкм, толщина – 15 мкм, а количество – 3-4.

У моллюсков *Planorbis planorbis* (зараженных трематодами *Notocotylus sp.*, *Cotylurus sp.*, *Apatemon sp.*) АПО в районе передней стенки перикарда не обнаружен. Митотически активные зоны отмечены вблизи латеральной стенки, где наблюдаются группы бластоподобных клеток, расположенных вдоль перикарда (Рис. 42). Клеточная реакция моллюска проявляется

в скоплении гемоцитов вокруг паразитов (как правило, вокруг метацеркарий), такие случаи зарегистрированы в желудочке сердца, в районе почки, под мантийным эпителием. Кроме этого, в перикардиальной полости отмечены многочисленные агглютинации овальной и

вытянутой формы, минимальные и максимальные размеры которых на срезе составляют 150-220 и 250-380 мкм соответственно (Рис. 43).

У моллюсков *Planorbarius corneus* (зараженных трематодами семейства Plagiorchiidae) АПО обнаружен между передней стенкой перикарда и мантийным эпителием. Организация АПО, во многом, напоминает организацию АПО у моллюсков *Biomphalaria glabrata* – ярко выраженные узелки с достаточно плотной упаковкой клеток. Однако (как отмечено выше – см. п. III.2.3.1.в.) у моллюсков рода *Biomphalaria* узелки приурочены к кровеносным синусам вблизи перикарда. У моллюсков *Planorbarius corneus* узелки выстилают лакуны кровеносной системы как вблизи перикарда, так и со стороны мантийного эпителия (Рис. 44а,б). Узелки характеризуются овальной формой, некоторые из них вытянуты вдоль края лакун. Количество узелков достигает 8-10, размеры – 25×85 мкм, а толщина – 24 мкм. Многочисленные скопления гемоцитов вокруг паразитов наблюдаются в районе почки.

III.2.4.3. Клеточная реакция моллюсков *Bithynia tentaculata* и *Melanopsis praemorsa*

Анализ литературных источников показал, что к настоящему времени отсутствует достоверное описание АПО у представителей жаберных моллюсков. При исследовании моллюсков *Bithynia tentaculata* и *Melanopsis praemorsa* нам также не удалось обнаружить ярко выраженных очагов гемопоэза. Однако у моллюсков *M. praemorsa* в сердечной области обнаружены различные агглютинации, размеры которых на срезе составляют 120×230 мкм, что свидетельствует о наличии пролиферативной активности (Рис. 45).

Глава IV. ОБСУЖДЕНИЕ

IV.1. Развитие партенит трематод семейства Echinostomatidae

IV.1.1. Развитие материнских спороцист *Echinostoma caproni*

Миграция материнских спороцист *Echinostoma caproni* от места проникновения к области сердца моллюска составляет особый период в их жизни. Как правило, и в чувствительных, и в резистентных моллюсках *Biomphalaria glabrata* спороцисты успевают завершить свою миграцию на вторые сутки п. з. Неспособность МС завершить миграцию связана с необходимостью преодоления плотных тканей и лимитом времени, отпущенным на ее существование. МС *Echinostoma caproni* способны к активному продвижению только в течение первых суток п. з. Если спороцисты не успевают за это время достичь сердца моллюска, то завершить развитие в других отделах тела хозяина им уже не удастся. В этой связи следует подчеркнуть, что полученные нами данные не подтвердили широкой специфичности *E. caproni* в выборе места окончательного обитания, допускаемой другими авторами (Jeyarasasingam et al., 1972). Как отмечалось ранее (см. раздел I.2.1), для нормального развития МС в организме моллюска-хозяина необходимы определенные условия, определяемые уровнем содержания кислорода, плотностью тканей и пр.

В чувствительных моллюсках случаи окончательного поселения спороцист вне полости желудочка сердца и главной аорты немногочисленны. К тому же, через несколько дней п.з. такие МС либо погибают, либо заметно отстают в развитии от остальных спороцист (см. раздел III.1.2).

В моллюсках резистентной линии спороцисты, которые не успели по каким-то причинам завершить миграцию, подвергаются инкапсуляции гемоцитами хозяина. Очевидно, в ответ на заражение происходит активизация АПО, в результате чего резко увеличивается

пролиферация гемоцитов. Клеточная реакция, таким образом, носит специфический характер: и в сердце, и в периферических тканях моллюска (см. раздел III.2.1).

Следует отметить, что изучение партенит долгое время проводилось без учета влияния основных абиотических факторов, в том числе температуры. В результате разными авторами были получены довольно противоречивые сведения (см. раздел I.3). Несмотря на то, что первые данные о воздействии температурного фактора на развитие отдельных фаз жизненного цикла появились давно (Leuckart, 1879; Thomas, 1883), только в настоящее время температура стала основным параметром экспериментальных исследований.

Детальное изучение МС трематод *Echinostoma caproni* показало, что в сходных условиях при постоянстве основных абиотических факторов, прежде всего температуры, в разных видах биомфаларий сохраняются такие параметры, как длительность «периода покоя», скорость и направление миграции партенит к месту окончательного поселения - сердцу моллюска, динамика их роста и размножения, продолжительность жизни и пр. Выявленные отличия в разных видах обусловлены различными размерами моллюсков: могут увеличиваться «период покоя», миграция, различаться сроки размножения и размеры партенит. Соответственно, это сказывается на общей динамике численности формирующейся микрогемипопуляции партенит (Ataev et al., 1998).

Таким образом, при относительном постоянстве основных факторов-регуляторов развитие партенит на всех этапах характеризуется высокой степенью стабильности, которая наблюдается также и на уровне мирацидия (феномен морфофизиологического покоя).

Все сказанное выше позволяет использовать данную паразито-хозяйинную модель для определения роли и механизмов воздействия различных факторов на развитие партенит трематод. В нашей работе особое внимание было уделено одному из важнейших биотических факторов - влиянию защитных реакций. В связи с этим, развитие МС *Echinostoma caproni* в чувствительных моллюсках *Biomphalaria glabrata* послужило для нас контролем при изучении развития партенит в моллюсках резистентной линии (см. раздел IV.2).

IV.1.2. Организация герминального материала мирацидиев

В задачу данной работы не входило детальное изучение строения всего мирацидия. Нас, прежде всего, интересовали данные о составе и локализации генеративных элементов, так как именно эти особенности определяют характер дальнейшего развития и основные черты организации паразитической фазы развития МС. Как уже отмечено выше, выбор этой стадии жизненного цикла обусловлен постоянством клеточного состава мирацидиев на протяжении всей свободной жизни (фаза морфофизиологического покоя). Активизация клеточного состава наблюдается только на паразитической фазе развития материнской спороцисты.

До начала работы мы располагали некоторой информацией о составе герминального материала нескольких видов эхиностоматид. В большинстве работ он определялся как группа ГК, занимающая заднюю половину тела мирацидия (Cort, 1954; Idris, Fried, 1996; Fried, Sraczyk, 2000 и др.). Действительно, здесь находится несколько крупных клеток, заметных даже на временных препаратах. Однако при изучении парафиновых, а особенно полутонких и ультратонких срезов выяснилось, что эти клетки не представляют собой

единой группы и отличаются друг от друга по размерам и деталям строения. Прежде всего, выяснилось, что 4-5 наиболее крупных клеток имеют секреторную природу и не относятся к генеративным элементам.

Объектами исследования состава генеративных элементов в нашей работе явились мирацидии двух видов эхиностом – *Echinostoma caproni* и *E. paraensei*.

Герминальный материал в мирацидиях этих видов представлен сходными элементами: генеративными и недифференцированными клетками, являющимися источником для мультипликации генеративных элементов на паразитической фазе развития МС. Во всех рассмотренных случаях в мирацидиях *E. caproni* насчитывалось только 6 ГК. В мирацидиях *E. paraensei* число ГК заметно варьирует, но, как правило, почти в два раза превышает их количество в *E. caproni*. Для мирацидиев *E. caproni* показано, что к дроблению, в первую очередь, приступают 1-2 ГК, отличающиеся среди прочих более крупными размерами. Учитывая, что ГК *E. paraensei* заметнее крупнее, можно предположить, что они более зрелые, чем у *E. caproni*. Кроме этого, иногда в мирацидиях *E. paraensei* кроме нескольких типичных ГК присутствует еще и эмбрион, состоящий из нескольких бластомеров. Способность к формированию эмбрионов уже в процессе «созревания» мирацидиев *E. paraensei*, представляющая собой проявление «педогенеза», является, вероятно, вторичной и вызвана ускорением начала размножения спороцист на несколько дней. Ведь в *E. caproni* стадии зародышевого шара первые из эмбрионов достигают лишь на 3-й день после заражения (Ataev et al., 1997). Такое предположение подтверждается данными Lie, Basch (1967), отмечающих при температуре примерно 26°C начало размножения МС *E. paraensei* на 6-й день после заражения. При такой же температуре МС *E. caproni* начинают отрождать первых редий не ранее 8-го дня после заражения. К тому же первые из отрождаемых материнской спороцистой *E. paraensei* редий значительно крупнее последующих (Saar et al., 1998). Вероятно, это те самые редии, начало развития зародышей которых приурочено к эмбриогенезу мирацидия в яйце.

Объективно оценить, какой из данных видов эхиностом по составу герминального материала ближе к исходному типу, достаточно сложно. С одной стороны, стабильность герминального материала мирацидиев *E. caproni* свидетельствует о его первичности по отношению к *E. paraensei*. С другой стороны, дробление части ГК в мирацидиях *E. paraensei* можно рассматривать как некий «атавизм». Для окончательного вывода необходима информация о большем числе видов Echinostomatidae. В любом случае не вызывает сомнения, что мирацидии *E. paraensei* демонстрируют неустойчивый, переходный вариант.

IV.2. Защитные реакции моллюсков на трематодную инвазию

В связи с отмеченным выше сходством основных параметров развития эхиностом, мы в дальнейшем уделили основное внимание изучению защитных реакций со стороны моллюска – хозяина. Основной моделью для данного исследования явились моллюски рода *Biomphalaria*. Особый интерес представляли моллюски *Biomphalaria glabrata*, зараженные партенитами *Echinostoma caproni*, в связи с существованием у них резистентной линии. При этом моллюски чувствительной линии составляли не только контрольную группу, но также, для сравнения с резистентными, являлись объектами исследования защитных реакций.

Первые признаки проявления защитной реакции со стороны моллюсков *Biomphalaria glabrata*, как чувствительной, так и резистентной линии, могут наблюдаться уже на

начальном этапе заражения – через 3-6 часов после проникновения мирацидиев *Echinostoma caproni*. Проявляется она в повышенной концентрации гемоцитов в непосредственной близости от МС, зарегистрированных в подошве, в синусах кровеносной системы моллюсков. Как правило, первичная клеточная реакция не приводит к инкапсуляции МС и не препятствует их миграции к месту окончательного поселения – желудочку сердца и аорте.

Тем не менее, через 2 дня п. з. отмечен единственный случай инкапсуляции спороцисты в резистентном моллюске, которая, вероятно, остановилась в своем продвижении и приступила к развитию вне сердца. Учитывая, что пролиферация гемоцитов приурочена только к определенным структурам – АПО, можно заключить, что данные скопления составляют клетки, мигрирующие из близлежащих тканей. Активизация АПО – достаточно долгий процесс и реально количество циркулирующих гемоцитов увеличивается к концу первых суток п.з. (см. раздел III.2.3.2).

Соответственно, в первые часы мы можем наблюдать «локальный очаг», сравнимый, очевидно, с реакцией моллюска на любое раневое повреждение поверхностного эпителия. Важно подчеркнуть, что подобные скопления гемоцитов вблизи МС в течение «периода покоя» отмечены и в чувствительных моллюсках. Это свидетельствует о неспецифичности клеточной реакции на данном этапе. Случаев скопления гемоцитов вблизи мигрирующих МС *E. caproni* нами не зарегистрировано (см. раздел III.2.1.1). Очевидно, этому препятствует достаточно высокая скорость их передвижения; поскольку за ограниченное время (менее суток) МС должны преодолеть значительный путь от места проникновения мирацидия до сердца моллюска.

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

Мы косвенно подтвердили действие только первого из описанных механизмов, блокирующих развитие МС на самых ранних стадиях их пребывания в моллюске.

Основным этапом проявления клеточной реакции является образование скоплений гемоцитов вблизи МС, завершивших миграцию в желудочек сердца или главную аорту. Вероятно, проникновение мирацидиев запускает механизм мультипликации клеток в АПО. Соответственно, их количество к моменту достижения спороцистами сердца моллюска становится достаточным для начала инкапсуляции партенит. Это подтверждается данными подсчета циркулирующих клеток. Видно, что их количество начинает возрастать уже через несколько часов с начала заражения, однако реально их концентрация в гемолимфе повышается только через сутки п.з. (см. раздел III.2.3.2).

Уже через 2 дня п. з. вокруг МС формируется мощная капсула. Важно подчеркнуть, что между поверхностью МС и стенкой капсулы наблюдается просвет, который смыкается лишь на последних этапах инкапсуляции. Интересно, что процесс инкапсуляции может происходить и в аорте, несмотря на высокую скорость тока гемолимфы в этой области. Однако здесь образуются капсулы другой (трубчатой) формы, в отличие от округлых капсул (сферической формы) в желудочке сердца. Полученные результаты показали, что процесс

инкапсуляции достигает максимума и приводит к разрушению партенит на 3-4-е сутки п.з. Именно в это время интенсивность пролиферации клеток в АПО *Biomphalaria glabrata* становится максимальной.

Интересно, что организм моллюска надежно изолирован от отравления продуктами распада останков МС и погибших гемоцитов слоем окружающих их молодых гемоцитов. Сформированные капсулы характеризуются такой зональностью клеток. Приток новых гемоцитов обеспечивается, очевидно, продолжением пролиферации клеток в АПО, интенсивность которой сохраняется на высоком уровне даже после инкапсуляции паразитов.

Механизмы разрушения МС к настоящему времени до конца не выяснены. Многие авторы предполагают, что различия в клеточных реакциях у резистентных и чувствительных моллюсков *B. glabrata* на поселение партенит трематод могут быть изначально связаны с различной экспрессией гемоцитами поверхностных полипептидов или с различной модуляцией специфических поверхностных детерминант. По мнению исследователей, эти полипептиды могут участвовать в деятельности гемоцитов, связанной с определением места нахождения паразита и его изоляцией (Coustau, Yoshino, 1994; Adema, Loker, 1997; Degaffe, Loker, 1998; Adema et al., 1999; Adema et al., 2000).

Распознавание чужеродных тел в моллюсках происходит, вероятно, с участием лектинов, продуцируемых гемоцитами и выделяемых в плазму (Van der Кнаар, Loker, 1990; Галактионов, 1995; Полевщиков, 1996). Во многих исследованиях предполагается, что в резистентных моллюсках во внутренние защитные механизмы включены гуморальные факторы, которые, возможно, усиливают гемоцитную токсичность (Bayne et al., 1980; Granath, Yoshino, 1984 и др.). Тем не менее, в некоторых случаях (эксперименты, проведенные *in vitro*) показано, что гемоциты способны разрушать спороцист и при отсутствии гуморальных факторов (Bayne et al., 1980).

Среди прочих нам представляется наиболее интересным предположение, что непосредственное разрушение тегумента МС происходит под воздействием пероксида водорода, синтезированного с участием кислорода, поставляемого гемоцитами (Nakamura et al., 1985; Dikkenboom et al., 1988; Connors, Yoshino, 1990; Connors et al., 1991; Hahn et al., 2001; Humbert, Coustau, 2001).

Такая гипотеза хорошо подтверждается нашими данными. На первых этапах формирования капсулы, между нею и МС сохраняется просвет. Когда покровы спороцисты разрушаются, многочисленные гемоциты устремляются внутрь погибающей спороцисты. На третьем этапе происходит ликвидация останков партенит и мертвых гемоцитов, а также последующая «разборка» капсулы. Наблюдаемые нами картины инкапсуляции и разрушения МС, на наш взгляд, подтверждают точку зрения А. В. Полевщикова (отдел иммунологии, НИИ экспериментальной медицины РАМН, – личное сообщение) относительно механизмов разрушения спороцист: именно на первом этапе формирования капсулы пероксид водорода концентрируется в просвете между стенкой капсулы и спороцистой, и в это время происходит активный лизис тегумента МС.

Следует отметить, что кроме капсул, формирующихся вокруг МС, зарегистрированы агглютинации гемоцитов, которые в отличие от капсул не приурочены к местам расположения спороцист. В них отсутствует отмеченная для капсул зональность - молодые,

дегенерирующие и мертвые клетки встречаются примерно в одинаковом соотношении по всему объему этих скоплений (см. раздел III.2.1.2.б).

Процесс инкапсуляции завершается на 7-е сутки п. з. В течение последующей недели моллюск полностью очищается от всех форм гемоцитных скоплений, и через 13-15 дней п.з. их обнаружить уже не удастся. Полученные результаты свидетельствуют о том, что резистентные моллюски способны полностью восстановиться от последствий бурной фагоцитарной реакции.

В чувствительных моллюсках *B. glabrata* попыток инкапсуляции гемоцитами спороцист не отмечено, несмотря на то, что мы наблюдали агрегацию гемоцитов вблизи МС на протяжении всей ее жизни. Иногда агглютинации были сопоставимы по своим размерам с капсулами, изолирующими паразитов в резистентных моллюсках. Тем не менее, составляющие их клетки сохраняли нейтральность по отношению к спороцистам.

В моллюсках *B. pfeifferi* не отмечено не только инкапсуляция МС, но также практически не наблюдалась и агрегация гемоцитов вблизи спороцист. В единичных случаях зарегистрированы агглютинации недалеко от партенит дочернего поколения.

В литературе имеются спорные сведения о структуре, расположении и природе АПО, которые по-разному трактуются в работах различных авторов. В одних случаях, авторы отмечают митотически активные зоны с диффузным расположением клеток, как правило, в области соединительной ткани почки (Tripp, 1961; Rondelaud, Barthe, 1981; Sullivan, 1990, 1995 и др.). В других случаях, обнаружены ярко выраженные группы клеток вблизи перикарда (Lie, Heyneman, 1976; Joky et al., 1985; Sullivan, 1988; Yoshino, Vasta, 1996; Vasquez, Sullivan, 2001 и др.). Наиболее часто АПО трактуется в этих работах как часть передней стенки перикарда.

Согласно полученным нами данным, локализация АПО моллюсков *B. glabrata* приурочена к лакунам кровеносной системы, расположенным между перикардом и мантийным эпителием. Очевидно, образующиеся в результате пролиферации в АПО клетки попадают в ближайшие лакуны, откуда с током гемолимфы направляются в вену, а затем в сердце и разносятся по всему организму. Часть из них агглютинирует в различных сосудах и синусах кровеносной системы, а многие попадают в почку и через нее в полость перикарда.

Среди современных зоологов нет единого мнения относительно количества исходных типов клеток гемолимфы моллюсков. Мы поддерживаем точку зрения некоторых исследователей (Matricon-Gondran, Letocart, 1999), полагающих, что в АПО образуется один тип клеток, которые позднее дифференцируются в зависимости от выполняемых функций. Их внешний полиморфизм отражает различные стадии дифференцировки.

В ответ на заражение наблюдается активизация клеток АПО, в результате чего резко увеличивается количество циркулирующих гемоцитов. Размер и динамика работы АПО коррелирует с устойчивостью биомфаларий к заражению *Echinostoma caproni*. Так, активность АПО у резистентных моллюсков *Biomphalaria glabrata* значительно выше, чем у чувствительных.

При изучении моллюсков рода *Biomphalaria* наши результаты подтвердили данные других исследователей (Sminia, 1974; Lie, Heyneman, 1976; Sullivan, 1988 и др.) относительно наличия АПО. Так, например, к числу исследованных в этом отношении pulmonat относятся моллюски: *B. obstructa*, *Lymnaea stagnalis*, *Helisoma trivolvis* и *Physa virgata*. У первых

двух видов обнаружен АПО, аналогичный таковому в моллюсках рода *Biomphalaria*; относительно остальных видов моллюсков нет описания хорошо выраженного АПО, однако отмечены клетки с митотической активностью в области перикарда. У изученных нами некоторых других видов pulmonat (*Succinea putris*, *Planorbis planorbis*, *Planorbarius corneus*), сведения об очагах гемопоэза которых в литературе практически отсутствуют, АПО также приурочен к внешней стороне перикарда. Это позволяет рассматривать АПО как универсальный центр гемопоэза легочных моллюсков.

В настоящее время в литературе преобладает мнение, что у жаберных моллюсков отсутствует оформленный АПО. При исследовании некоторых видов прозобранхий (*Bithynia tentaculata*, *Melanopsis praemorsa*) нам также не удалось обнаружить АПО. Тем не менее, в области сердца данных моллюсков отмечены крупные скопления гемоцитов, что свидетельствуют о клеточной реакции со стороны хозяина. В связи с этим, мы допускаем наличие АПО в других областях; но для выяснения этого вопроса, безусловно, необходимы дополнительные исследования.

Вопрос о патогенности метацеркарий для самих биомфаларий находился в центре внимания некоторых исследований (Kuris, Warren, 1980; Атаев, 2000). В результате были получены доказательства их высокой патогенности при высокой интенсивности заражения. Однако возможность развития метацеркарий *E. caproni* в моллюсках *Biomphalaria glabrata* резистентной линии ранее не изучалась.

Результаты нашей работы также показали, что биомфаларии резистентной линии не проявляют устойчивости к метацеркариям *Echinostoma caproni*. Несмотря на выраженную клеточную реакцию, личинки завершают свое развитие и становятся инвазионными для дефинитивного хозяина.

Таким образом, специфичность защитных реакций моллюсков может по-разному проявляться в отношении трематод одного вида, находящихся на разных фазах жизненного цикла. С одной стороны, резистентные моллюски блокируют развитие партенит материнского поколения: разрушение спороцист может происходить в разное время после инвазии, но всегда до начала их размножения. С другой стороны моллюски этой же линии оказываются не способными подавлять развитие метацеркарий.

В заключении следует отметить, что защитные реакции моллюсков представляют собой достаточно сложный феномен, требующий изучения как клеточных, так и гуморальных механизмов. Подтверждением этого является то, что на фоне выраженной инкапсуляции паразитов в сердце моллюсков резистентной линии, мы наблюдали полное ее отсутствие в отношении партенит, расположенных в полости перикарда (см. раздел III.2.1.2.б.). В то же время такие спороцисты также оказывались неспособными нормально развиваться – на 5-й день п. з. они соответствовали трехдневным МС из чувствительных моллюсков.

Безусловно, гуморальные и клеточные реакции взаимодополняют друг друга, препятствуя развитию паразитов в моллюске-хозяине. И только комплексное исследование защитных реакций позволит объективно разобраться в таком уникальном биологическом явлении, как специфичность паразито-хозяинной системы трематоды-моллюск.

ВЫВОДЫ

1. Герминальный материал материнских спорозист может быть представлен в мирацидиях «первичными» генеративными клетками, дробление которых приводит к образованию эмбрионов следующей генерации партенит, а также недифференцированными клетками, в результате деления которых могут возникать «вторичные» генеративные клетки, развитие которых приурочено к паразитической фазе МС. При этом, если число зародышей, развивающихся из первичных ГК ограничено и, в целом, видоспецифично, то процесс мультипликации вторичных ГК строгих количественных рамок не имеет.
2. По стратегии размножения МС всех трематод можно разделить на две группы:
Первую группу составляют дигенеи, завершающие мультипликацию генеративных элементов – ГК и (или) эмбрионов – во время эмбриогенеза мирацидия. Соответственно, на паразитической фазе развития МС у этих дигеней наблюдается развитие только того герминального материала, который был сформирован к моменту вылупления мирацидиев. В эту группу входят в основном представители архаичных семейств.
Вторую группу составляют виды, для которых характерен перенос размножения на паразитическую фазу. У одних представителей герминальный материал в мирацидии представлен недифференцированными и генеративными клетками (часть последних может приступить к дроблению). В других случаях герминальный материал в мирацидиях представлен только НК – здесь размножение МС целиком приурочено к паразитической фазе. Эту группу составляют высшие трематоды.
3. Заражение моллюска партенитами может вызывать очаговую клеточную реакцию в области проникновения мирацидия. В некоторых случаях это позволяет моллюску заблокировать дальнейшее развитие партенит, однако чаще в его подавление принимают участие гемоциты, образованные в активированном в результате заражения АПО.
4. Процесс инкапсуляции материнских спорозист гемоцитами моллюска приурочен к области сердца – желудочку и аорте. Спорозисты, поселившиеся в перикардиальной полости, не подвергаются инкапсуляции, однако они не развиваются и быстро дегенерируют.
5. АПО представляет собой структуру, связанную с системой синусов и лакун кровеносной системы, а не производное образование стенки перикарда. В перикардиальную полость гемоциты попадают после циркуляции по кругу кровообращения, а не непосредственно из АПО.
6. Экспериментально подтверждена зависимость работы АПО от трематодной инвазии – трематодная инвазия активизирует работу АПО.
7. Клеточная реакция резистентных моллюсков значительно выше, чем у моллюсков, восприимчивых к инвазии.

Список литературы.

1. Атаев Г. Л. Развитие партенит трематод. Автореф. на соиск. уч. степ. докт. биол. наук. - СПбГУ, 2000. - 34 с.
2. Атаев Г. Л. Развитие микрогемипопуляций партенит трематод *Philophthalmus rhionica*. Автореф. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук. – М., МГУ, 1988. - 15 с.
3. Атаев Г. Л. Влияние температуры на развитие и биологию редий и церкарий *Philophthalmus rhionica* (Trematoda). //Паразитология. - 1991. – Т. 25. - С. 349-359.
4. Атаев Г. Л. Влияние температуры и освещенности на биологию мирацидиев *Philophthalmus rhionica* (Trematoda). //Паразитология. - 1993. – Т.27. - С. 134-139.
5. Атаев Г. Л., Добровольский А. А. Развитие микрогемипопуляции партенит трематод *Philophthalmus rhionica*.//Паразитология. - 1990. - Т.24. - С. 499-507.
6. Атаев Г. Л., Добровольский А. А., Озерский П. В. Влияние освещенности на эмиссию церкарий *Philophthalmus rhionica* (Trematoda). //Вильнюс: Биология, 1993. – С. 41-42.
7. Белякова Ю. В., Жальцанова Д. С. Суточный ритм эмиссии и биология церкарий *Plagiorchis multiglandularis* Semenov, 1927. //Изв. АН КазССР. - 1987. - Сер. биол. 4. – С. 89-90.
8. Галактионов К. В. Парьеногенетические поколения трематод семейства Microphallidae Travassos, 1920 (Развитие, размножение, экология). Автореф. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук. - М., 1980. - 24 с.
9. Галактионов К. В., Добровольский А. А. Происхождение и эволюция жизненных циклов трематод. – СПб: Наука. - 1998. - 404 с.
10. Галкин А.К. Клеточные и тканевые защитные реакции моллюска *Ooretus corneus* на поселение спороцист *Astiotrema trituri*. //II Всесоюз. симпоз. по болезням и паразитам водных беспозвоночных: Тез. докл. - Л., 1976. - С. 14-15.
11. Герасев П.И., Добровольский А.А. Развитие гермафродитного поколения *Astiotrema trituri* (Trematoda, Plagiorchiidae).// Паразитол. сб. ЗИН АН СССР. – 1977. - № 27. – С. 89-111.
12. Гинецинская Т. А. Трематоды, их жизненные циклы, биология и эволюция. - Л.: "Наука", 1968. – 411 с.
13. Гинецинская Т. А., Добровольский А. А. Жизненный цикл трематод как система адаптаций. //В сб.: Свободноживущие и паразитические беспозвоночные. - Л.: ЛГУ, 1983. - Труды БИНИИ, 34. - с. 112-157.
14. Гинецинская Т. А., Добровольский А. А. Жизненный цикл трематод как система адаптаций.// Свободноживущие и паразитические беспозвоночные. - Л.: ЛГУ - 1983. - Труды БИНИИ, 34. - С. 112-157.
15. Добровольский А. А., Галактионов К. В., Мухамедов Г. К., Синха Б. К., Тихомиров И. А. Партеногенетические поколения трематод. - Труды ЛОЕ. - 1983. - 82, 4. - 108 с.
16. Добровольский А. А., Галактионов К. В., Атаев Г. Л. Особенности организации генеративного материала и динамика размножения материнских спороцист трематод. //Паразитология - 2000. -Т.34. - 1. - С. 14-22.
17. Калабеков А.Л. Цикл развития *Haplometra brevicæca* Timon David 1962 (Trematoda: Plagiorchiidae).// Сб. зоол. работ.- 1973. – С. 35-46.

18. Карманова Е.М. О жизненном цикле трематод *Echinochasmus (Episthmium) bursicola* (Creplin, 1837) (Echinostomatidae). // Тр. гельминт. лаб. – 1973. – Т. 23. – С. 71-76.
19. Карманова Е.М. К познанию жизненного цикла трематод *Echinochasmus coaxatus* и *E. beleocephalus* (Creplin, 1837) (Echinostomatidae). // Тр. гельминт. лаб. – 1974. – Т. 24. – С. 46-52.
20. Катков М.В. К вопросу морфологии личинок (мирацидиев и церкарий *Liorchis scotiae* (Willmott, 1950) Velichko, 1966 (Trematoda: Paramphistomidae).// Тр. всесоюз. ин-та гельминт. – 1970. – Т. 16. – С. 97-102.
21. Катков М.В. Морфология мирацидия *Paramphistomum Ichikawai* Fukui, 1922 (Trematoda: Paramphistomidae).// Тр. всесоюз. ин-та гельминт. – 1971. – Т. 18. – С. 111-114.
22. Ключкова Е.А. Морфология и биология церкарии *Hysteromorpha triloba* (Trematoda: Diplostomatidae). // Тр. Всесоюз. ин-та гельминт. им. К.И. Скрябина. – 1982. – Т. 31. – С. 17-23.
23. Косупко Г.А. Онтогенез *Echinostoma miyagawai*, Ishii 1932 (Trematoda: Echinostomatidae) в первом промежуточном хозяине. //Тр. Всесоюз. ин-та гельминт. им. К.И. Скрябина. - 1971. - т. XVIII. - С.159-166.
24. Кузьмович Л.Г. Выход церкарий из моллюсков, относящихся к разным экологическим группам.//II Всесоюз. симп. по болезням и паразитам водных беспозвоночных./Тез. докл. – Л., 1976. – С. 36-37.
25. Семенов О. Ю. Экспериментальное изучение биологии мирацидия *Philophthalmus rhionica* Tichomirov. Автореф. на соискую уч. степ. канд. биол. наук. -Л.: ЛГУ, 1977. - 20 с.
26. Семенов О. Ю. Мирацидии: строение, биология, взаимоотношения с моллюсками. - Л., ЛГУ, 1991. - 204 с.
27. Тихомиров И. А. Жизненный цикл *Philophthalmus rhionica* sp. nov. (Trematoda: Philophthalmidae). Дисс...канд. биол. наук. - Л., ЛГУ, 1980. - 219 с.
28. Трушин И.Н. защитная реакция наземных моллюсков на внедрение личинок *Muellerius capillaris*. //Тр. Всесоюз. ин-та гельминт. им. К.И. Скрябина. - 1980. - т. 25. - С.130-139.
29. Усинене Б. Суточная динамика выхода гимноцефальных церкарий. //Acta parasitologica Lituanica. - 1974. – V.12. – P. 131-136.
30. 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. – V.119. - P. 395-404.
31. Adema C.M., Sapp K.K., Hertel L.A., Loker E.S. Immunobiology of the relationship of echinostomes with snail intermediate hosts. // Echinostomes as experimental models for biological research. /Fried, B. and Graczyk, T.K., eds. - KluwerAcademic Press, 2000. - P. 149-173.
32. Ataev G. L., Coustau C. Cellular response to *Echinostoma caproni* infection in *Biomphalaria glabrata* strains selected for susceptibility/resistance. //Developmental and Comparative Immunology. - 1999. - V.23. - P. 187-198.

33. Ataev G. L., Dobrovolskij A., Fournier A., Jourdane J. Migration and development of mother sporocysts of *Echinostoma caproni* (Digenea: Echinostomatidae). //Journal of Parasitology. - 1997. –V.83. - P. 444-453.
34. Ataev G. L., Fournier A., Coustau C. Comparison of *Echinostoma caproni* mother sporocysts development *in vivo* and *in vitro* using of *Biomphalaria glabrata* snails and a *B. glabrata* embryonic cell line. //Journal of Parasitology. - 1998. – V.84. - P. 227-235.
35. Bayne C.J. Molluscan immunology.// In “The Mollusca” (K. Wilbur, Ed.). - Academic Press, Orlando, 1983. - FL. 5. - P.407-486.
36. Bayne C.J., Boswell C.A., Locker E.S., et al. Plasma components which mediate cellular defences in gastropod mollusc *Biomphalaria glabrata*. //Developmental and Comparative Immunology. - 1985. - V. 9. - P.523-530.
37. Bayne C.J., Yoshino T.P. Determinants of compatibility in mollusc-trematode parasitism. //American Zoologist. - 1989. - V.29, №3.- P.399-407.
38. Behrens A. C., Nollen P. M. Hatching of *Echinostoma caproni* miracidia from eggs derived from adults grown in hamsters and mice. //Parasitology Research. - 1993. – V.79. - P. 28-32.
39. Balan D.S.L., Magalhaes L.A., Piedrabuena A.E. Aspectos imunologicos e parasitologicos em *Biomphalaria tenagophila* infectadas por *Schistosoma mansoni* e outros Digenea.// Rev. saude puble. - 1993.- V.27, № 6.- P.421-429.
40. Christensen N., Fried B., Kanev I. Taxonomy of 37-collar spined *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae) in studies on the population regulation in experimental rodent hosts.// Angewandt Parasitologie. - 1990.- V. 31. - P. 127-130.
41. Coil W.H. Miracidial penetration in *Fasciolides magna* (Trematoda).// Z. Parasitenk. – 1981. – Bd. 65. – S. 299-307.
42. Cort W.W., Ameel D.J., Oliver L. An experimental study of the development of *Schistosomatium douthitti* (Cort, 1915) in its intermediate host. //Journ. of Parasitol. – 1944. - V.30. - P. 1- 17.
43. Cort W.W., Ameel D. J., Van der Woude A. Germinal development in the sporocysts and rediae of the digenetic trematodes// Experimental Parasitology.-1954a.-V.3.- P. 185-225.
44. Cort W.W., Ameel D. J., Van der Woude A. Germinal development in the sporocysts of the blood flukes of Turtles// Proc. Helm. Soc. Wash.-1954b.- V.21.-P.85-96.
45. Cort W.W., Ameel D. J., Van der Woude A. Futher studies on the germinal development in the sporocysts of bird schistosome, *Trichobilharzia stagnicolae* (Talbot, 1936)// Proc. Helm. Soc. Wash.-1954c.- V.21.-P.97-106.
46. Coustau C., Ataev G. L., Jourdane J., Yoshino T. P. *Schistosoma japonicum*: *In vitro* cultivation of miracidium to daughter sporocysts using *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line. //Experimental Parasitology. - 1997. – V.87. - P. 77-87.
47. Coustau C., Yoshino T. Surface membrane polypeptides associated with hemocytes from *Schistosoma mansoni*- susceptible and –resistant straines of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). //Exp. Parasitol. - 1994. - V. 63, № 1. - P. 82-89.
48. Cribb T.H. The life cycle and biology of *Prototransversotrema steeri* Angel, 1969 (Digenea: Transversotrematidae).// Australian Journ. Zool. - 1988.- V. 36, № 1. - P. 111-129.
49. Christensen N. O., Frandsen, F., Roushdy M. Z. The influence of environmental conditions and parasite-intermediate host-related factors on the transmission of *Echinostoma liei*. //Zeitschrift fur Parasitenkunde. - 1980. – V.63. - P. 47-63.

50. Czapsky Z. New observations on the life cycle of *Fasciola hepatica* L. in *Calba truncatula* O.F. Muller, *Calba occulata* Jack. and *Calba turricola* Held. // Forth Intern. Cong. Parasitol. Short Communications. Sec. A. - 1978. - P. 10.
51. Degaffe G., Loker E.S. Susceptibility of *Biomphalaria glabrata* to infection with *Echinostoma paraensei*: correlation with the the effect of parasite secretory-excretory products on host hemocute spreading. //Exp. Parasitol. - 1998. - V. 71, № 1. - P. 64-72.
52. Fried B. Maintenance of *Echinostoma revolutum* (Trematoda) in the laboratory. //Proceeding of the Pennsylvania Academy of Science. - 1985. - V.59. - P. 27-28.
53. Fried B., Huffman J. The biology of the intestinal trematode *Echinostoma caproni*. //Advances in Parasitology. - 1996. -V.38. - P. 311-368.
54. Fried B., Weaver L. J. Effects of temperature on the development and hatching of eegs of the trematode *Echinostoma revolutum*. //Transactions of the American Microscopical Society. - 1969. - V.88. - P. 253-257.
55. Gibson D.I. Questions in digenean systematics and evolution. // Parasitology. - 1987. - V. 95. - P.429-460.
56. Granath W.O., Yoshino T. *Schistosoma mansoni*: Passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata*. //Exp. Parasitol. - 1984. - V.58. - P. 188-193.
57. 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. //J. Parasitology. - 2001. - V.87, № 2. - P. 292-299.
58. Humbert E., Coustau C. Refractoriness of host haemocytes to parasite immunosuppressive factors as a putative resistance mechanism in the *Biomphalaria glabrata*-*Echinostoma caproni* system. //Parasitology. - 2001. - V.122. - P. 651-660.
59. Idris N., Fried B. Development, hatching, and infectivity of *Echinostoma caproni* (Trematoda) eggs, and histologic and histochemical observations on the miracidia. //Parasitol. Res. - 1996. - V.82. - P. 136-142.
60. Jeyarasasingam U., Heyneman D., Lim H.-K. & Mansour N. Life cycle of new echinostome from Egupt, *Echinostoma liei* sp. nov. (Tematoda: Echinostomatidae). //Parazitology. - 1972. - V.65. - P. 203-22.
61. 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. //Acta Tropica. - 1982. - V.39. - P. 325-335.
62. Kostadinova, A. and Gibson, D.I. The systematics of echinostomes. // Echinostomes as experimental models for biological research. /Fried, B. and Graczyk, T.K., eds. - KluwerAcademic Press, 2000. - P.31-57.
63. Kostova T.V., Chipev N.H. A model of the dynamics of intromolluscan trematode populations: some problems concerning oscillatory behavior.// Computers Math. Applic. - 1991. - V.21. - 15 p.
64. Lengy J. Studies on the *Paramphistomum microbotrium* a rumen parasite of cattle in Israel. I. Larval stages from egg to cercaria. //Bull. Res. Consil. - Israel, 1960.- V.9. -P. 71-130.
65. Leuckart R. Allgemeine Naturgeschichte der Parasiten. Leipzig u. Heidelberg. -1879. - 216 s.
66. Lie K. J., Basch. The life history of *Echinostoma paraensei* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). //Journal of Parasitology. - 1967. - V.53. - P. 1192-1199.

67. Lie K.J., Heyneman D., Yau P. The origin of Amoebocytes in *Biomphalaria glabrata*.// J. Parasitol. - 1975. - V. 63. - P. 574-576.
68. Lie K.J., Heyneman D. Studies on resistance in snails. 3. Tissue reactions to *Echinostoma lindoense* sporocysts in sensitized and resensitized *Biomphalaria glabrata*.// Journ. of Parasitol. – 1976a. - V.62. - P. 51- 58.
69. Lie K.J., Heyneman D. Studies on resistance in snails. 5. Tissue reactions to *Echinostoma lindoense* in naturally resistant *Biomphalaria glabrata*.// Journ. of Parasitol. – 1976b. - V.62. - P. 292-297.
70. Lie K.J., Heyneman D. Studies on resistance in snails. 7. Evidence of interference with the defense reaction in *Biomphalaria glabrata* by trematode larvae.// Journ. of Parasitol. – 1976c. - V.62. - P. 608-615.
71. Lo C.-T. Lee K.-M. Pattern of Emergence and the effects of Temperature and Light on the emergence and survival of Heterophyid cercariae (*Centrocestus formosanus* and *Haplorchis pumilio*).// Journal of Parasitology. – 1996. –V. 82, № 2. - P. 347-350.
72. Loker E. C., Coustau C., Ataev G. L., Jourdane J. *In vitro* culture of rediae of *Echinostoma caproni*. // Parasite. -1999. – V.6. - P. 169-174.
73. Locker E.S., Bayne C.J. Immunity to trematode larvae in the snail *Biomphalaria*. //Zoological society of London Symposia 56 : Immune mechanisms in invertebrate vectors. - Oxford: Oxford University Press, 1986. - P. 199-220.
74. Loker E.S., Bayne C.J., Buckley P.M., Kruse K.T. Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of the juveniles of the 10-R2 strain of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda). //J. Parasitology. - 1982. - V.68. - P. 84-94.
75. Madhavi R. Miracidium of *Allocreadium fasciatusi* Kakaji, 1969 (Trematoda: Allocreadiidae) // J. Parasitol. - 1976. -Vol. 62 - P. 410-412.
76. Madhavi R. Life history of *Genarchopsis goppo* Ozaki, 1925 (Trematoda: Hemiuridae) from the freshwater fish *Channa punctata*. // J. Helminthol. - 1978. -Vol. 52. - P. 251-259.
77. Madhavi R. Life history of *Allocreadium handiai* Pande, 1937 (Trematoda: Allocreadiidae) from the freshwater fish *Channa punctata* Bloch. // Z. Parasitenk. - 1980. - Bd 63. - S. 89-97.
78. Matricon-Gondran M., Letocart M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. 1. Characterization of hemocytes and fixed phagocytes. //Exp. Parasitol. - 1999. - V. 74, № 3. - P. 224-234.
79. Nollen P.M. Escape of rediae from miracidia of *Philophthalmus megalurus* and *Philophthalmus gralli* during in vitro culture. // Journal of parasitology. - 1990b. – V.76. - P. 725-729.
80. Nunez P.E., Molenaar M.J., Lageweg W., Li K.W., De Jong-Brink M. excretory-secretory products of *Trichobilharzia ocellata* and their modulating on the internal defence system of *Lymnaea stagnalis*.// Parasitology. - 1997. – V.114. - P. 135-144.
81. Oliver J. H., Schort R. B. Longevity of miracidia of *Schistosomatium douthitti*. //Experimental Parasitology. - 1956. – V.3. - P. 238-249.
82. Pan C.T. The general gistology and topographic microanatomy of *Austalorbis glabratus*.// Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Garvard college. - 1958. - V. 119. - P. 237-299.

83. Pan S.C. the fine structure of the miracidium of *Schistosoma mansoni*.// J. Invertebr. Pathol. – 1980. –V. 36. – P. 307-372.
84. Pearson J.C. On the position of the digenea family Heronimidaee: an inquiry into a cladistic classification of the Digenea . // Syst. Parasitol. - 1992. – V.21. - P.81-166 .
85. Peters L.E., La Bonte R.P. Comparative morphology of four species of allocreadiid miracidia (Trematoda). // J. Parasitol. - 1965. - Vol. 51. - P. 583-586.
86. Sapp K.K., Meyer K.A., Loker E.S. Intramolluskan development of the digenean *Echinostoma paraensei*: rapid production of a unique mother redia that adversely affects development of conspecific parasites. // Invertebrate Biology. - 1998. – V.117, № 1. - P. 20-28.
87. Sloss B., Meece J., Romano M., Nollen P. The genetic relationships between *Echinostoma caproni*, *Echinostoma paraensei*, *Echinostoma trivolvis* as determined by electrophoresis.// Journal of Helminthology.
88. Southgate V.R. Observations on the epidermis of the miracidium and on the formation of the tegument of the sporocyst of *Fasciola hepatica*. //Parasitology. - 1970. – V.61. - P. 177-190.
89. Stauber L.A. The fate of India ink injected intracardially into the oyster, *Ostrea virginica*.// Gmelin. Biol. Bull.- 1950.- V.98.-P.227-241.
90. Stirewalt M. A. Effect of snail maintenance temperatures on development of *Schistosoma mansoni*. //Experimental Parasitology. - 1954. – V.3, № 6. - P. 504-516.
91. Sullivan J.T. Long-term survival of geterotopic allografts of the amoebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata* (Molluska: Pulmonata). //Trans. Am. Microsc. Soc. - 1990. - V. 109. - P. 52-60.
92. Sullivan J.T., Spence J.V., Nunez J.K. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts in *Biomphalaria glabrata* implanted with amoebocyte-producing organ allografts from resistant snails. //J. Parasitol. - 1995. - V. 81, № 5. - P.829-833.
93. Szidat L. Zur Entwicklungsgeschichte der cyclocoeliden. Der Lebenscyclus von *Tracheophilus sisowi*. // Zool. Anz. - 1932. – V.100 - P. 205-213.
94. Thomas A. P. The life history of the liver fluke. //Quart Journ. Micr. Sci. - 1883. – V.23. - P. 90-133.
95. Tripp M.R. The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail *Austalorbis glabratus*.// J. Parasitol.- 1961.- V. 47.-P. 745-751.
96. Wajdi N. Penetration by the miracidia of *Schistosoma mansoni* into the snail host.// J. Helminthol. – 1966. – V. 40. – P. 235-244.
97. Wilson, R.A., R. Pullin, and J. Denison. An investigation of the mechanism of infection by digenetic trematodes: the penetration of the miracidium of *Fasciola hepatica* into its snail host *Lymnae truncatula*. //Parasitology. - 1971. – V.63. - P. 491-506.