

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СРАВНИТЕЛЬНОЙ ОЦЕНКЕ КЛЕТОЧНЫХ РЕАКЦИЙ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У МОЛЛЮСКОВ *POMACEA SP.* (*CAENOCASTROPODA, AMPULLARIIDAE*) ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АСЕПТИЧЕСКОМ ВОСПАЛЕНИИ

Хрущёв К.А.¹, Шилов С.Ю.^{2,3}, Барков С.Ю.^{2,3}, Шилов Ю.И.^{1,2,3}

¹ ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

² Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

³ ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Резюме. Одной из существенных методических проблем, возникающих при исследовании клеток врожденного иммунитета беспозвоночных животных, является непригодность культуральных сред и даже солевых растворов, предназначенных для млекопитающих и человека. Другой важный методический момент – значительно выраженные реакции коагуляции, играющие важнейшую защитную роль у всех беспозвоночных животных, но проявляющиеся *in vitro* в клеточных суспензиях, приготовленных даже на оптимальных для данного животного солевых растворах. Для решения этой проблемы современные исследователи широко используют даже в функциональных тестах антикоагуляционный буфер с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). С позиций традиционных подходов иммунологии млекопитающих использование ЭДТА возможно только для исследования морфологии клеток, но не их функций. Цель работы – адаптация методических подходов к сравнительной оценке клеточных реакций врожденного иммунитета у моллюсков *Pomacea sp.* при экспериментальном асептическом воспалении. Для оценки функций фагоцитирующих клеток у моллюсков *Pomacea sp.* мы использовали полный солевой раствор (ПСР) с оптимальными концентрациями глюкозы, ионов кальция, магния с обязательным добавлением для предотвращения коагуляции, клеточной агрегации и дегрануляции вместо ЭДТА натриевой соли гепарина в концентрации 100 ЕД/мл (ПСР-геп). В специально проведенном эксперименте показано, что при инкубации клеток гемолимфы в этом растворе сохраняется их жизнеспособность, оцениваемая методом проточной лазерной цитометрии при инкубации с аннексином V-PE (PE Annexin V) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD), а также в тесте

Адрес для переписки:

Шилов Станислав Юрьевич
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (902) 794-12-90.
E-mail: jshilov@mail.ru

Address for correspondence:

Stanislav Yu. Shilov
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
13 Golev St
Perm
614081 Russian Federation
Phone: +7 (902) 794-12-90.
E-mail: jshilov@mail.ru

Образец цитирования:

К.А. Хрущёв, С.Ю. Шилов, С.Ю. Барков, Ю.И. Шилов
«Методические подходы к сравнительной оценке
клеточных реакций врожденного иммунитета у
моллюсков *Pomacea sp.* (*Caenogastropoda, Ampullariidae*)
при экспериментальном асептическом воспалении»
// Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27,
№ 4. С. 749–756.
doi: 10.46235/1028-7221-16939-MAT

© Хрущёв К.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

K.A. Khrushchev, S.Yu. Shilov, S.Yu. Barkov, Yu.I. Shilov
“Methodological approaches to the comparative assessment
of cellular reactions of innate immunity in mollusk *Pomacea*
sp. (*Caenogastropoda, Ampullariidae*) in experimental aseptic
inflammation”, *Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy*
Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 4, pp. 749–756.
doi: 10.46235/1028-7221-16939-MAT

© Khrushchev K.A. et al., 2024

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16939-MAT

с трипановым синим. Показана возможность исследования с использованием ПСР-геп поглотительной активности и ацидификации фагосом лейкоцитов гемолимфы, органа кроветворения (почки) и очага воспаления, индуцированного внутримышечным введением стерильной суспензии зимозана. В отличие от моллюсков *Limnaea stagnalis* и *Biomphalaria glabrata*, у которых хорошо документирована продукция активных форм кислорода фагоцитами в реакции люминолзависимой хемилюминисценции, мы не смогли индуцировать эту реакцию у моллюсков *Pomacea* sp. В специально проведенном эксперименте мы не выявили влияния натриевой соли гепарина в концентрации 100 ЕД/мл на продукцию активных форм кислорода фагоцитами крыс.

Ключевые слова: моллюски, *Pomacea* sp., *Caenogastropoda*, *Ampullariidae*, врожденный иммунитет, фагоцитоз, *pHrodo*TM, люминолзависимая хемилюминисценция, воспаление, сравнительная иммунология

METHODOLOGICAL APPROACHES TO THE COMPARATIVE ASSESSMENT OF CELLULAR REACTIONS OF INNATE IMMUNITY IN MOLLUSK *POMACEA* SP. (*CAENOGASTROPODA*, *AMPULLARIIDAE*) IN EXPERIMENTAL ASEPTIC INFLAMMATION

Khrushchev K.A.^a, Shilov S.Yu.^{b,c}, Barkov S.Yu.^{b,c}, Shilov Yu.I.^{a,b,c}

^a Perm State University, Perm, Russian Federation

^b Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

^c E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Abstract. One of the significant methodological problems that arise in the study of cells of the innate immunity of invertebrates is the unsuitability of culture media and even salt solutions intended for mammals and humans. Another important methodological point is the significantly pronounced reactions of coagulation, which play an important protective role in all invertebrates, but manifest themselves *in vitro* in cellular suspensions prepared even with optimal saline solutions for this animal. To solve this problem, researchers widely use an anticoagulation buffer with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) even in functional tests. From the standpoint of traditional approaches of mammalian immunology, the use of EDTA is possible only for the study of cell morphology, but not their functions. The aim of the work is to adapt methodological approaches to the comparative assessment of cellular reactions of innate immunity in *Pomacea* sp mollusks in experimental aseptic inflammation. To evaluate the functions of phagocytic cells in mollusk *Pomacea* sp., we used a complete salt solution (CSS) with optimal concentrations of glucose, calcium ions, magnesium with addition to prevent coagulation, cellular aggregation and degranulation instead of EDTA sodium salt of heparin at a concentration of 100 IU/mL (CSS-hep). As a result of a specially conducted experiment, it was shown that during incubation of hemolymph cells in this solution, their viability is preserved, evaluated by flow laser cytometry during incubation with annexin V-PE (PE Annexin V) and 7-aminoactinomycin D (7-AAD), as well as in a test with trypan blue. The possibility of studying the phagocytic activity and a phagosome acidification of leukocytes from hemolymph, hematopoiesis organ (kidney) and the focus of inflammation induced by intramuscular injection of sterile suspension of zymosan using CSS-hep is shown. Unlike the *Limnaea stagnalis* and *Biomphalaria glabrata* mollusks, in which the production of reactive oxygen species by phagocytes in the luminol-dependent chemiluminescence reaction is well documented, we were unable to induce this reaction in *Pomacea* sp. mollusks. In a specially conducted experiment, we did not reveal the effect of the sodium salt of heparin at a concentration of 100 IU/mL on the production of reactive oxygen species by rat phagocytes.

Keywords: mollusks, *Pomacea* sp., *Caenogastropoda*, *Ampullariidae*, innate immunity, phagocytosis, *pHrodo*TM, luminol-dependent chemiluminescence, inflammation, comparative immunology

Исследования проводились в рамках государственного задания «ИЭГМ УрО РАН» по теме: «Изучение механизмов регуляции клеток иммунной системы и разработка методов их оценки в норме и патологии», номер 124020500027-7.

Введение

Несмотря на то, что с открытия И.И. Мечниковым явления фагоцитоза в 1882 г. в эксперименте на личинках морской звезды и формулировки им основных положений сравнительной патологии воспаления в 1892 г. [2] прошло много лет, проблемам сравнительной патологии уделяется недостаточно много внимания. В первой своей лекции И.И. Мечников писал: «Должна возникнуть отрасль общей зоологии, т. е. сравнительная патология животных, которая будет во многих отношениях отличаться от ныне существующей сравнительной патологии. В то время как эта последняя, основанная, главным образом, ветеринарами, применяется исключительно к высшим животным, а именно к позвоночным, настоящая сравнительная патология должна обнимать весь животный мир в его целом и изучать его с самой общей биологической точки зрения» (цит. по [2], С. 3). В связи с открытием в 1995–1998 гг. сходных по структуре распознающего домена сигнальных паттернраспознающих рецепторов (англ. Pattern Recognition Receptors, PRRs) у растений [15], беспозвоночных [11] и позвоночных [12, 13] животных и присуждением в 2011 г. за это открытие Нобелевской и других престижных премий, интерес к сравнительному исследованию реакций врожденного иммунитета значительно повысился. Наиболее важные исторические вехи в развитии сравнительной иммунологии и ключевые работы в этой области выделены одним из ее современных основоположников Эдвином Л. Купером [5]. Одна из существенных методических проблем, возникающих при исследовании клеток врожденного иммунитета беспозвоночных животных, — непригодность культуральных сред и даже солевых растворов, предназначенных для млекопитающих и человека, так как даже для близких представителей беспозвоночных растворы, идентичные циркулирующей жидкости, имеют разный состав. Другой важный методический момент — значительно выраженные реакции коагуляции (аналог системы коагуляционного гемостаза млекопитающих), клеточной агрегации и дегрануляции, играющие важнейшую защитную роль у всех беспозвоночных животных [10], но проявляющиеся *in vitro* в клеточных суспензиях,

приготовленных даже на оптимальных для данного животного солевых растворах. Для решения этой проблемы современные исследователи широко используют даже при исследовании фагоцитоза антикоагуляционный буфер с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) [6, 7, 14]. С позиций традиционных подходов иммунологии млекопитающих использование ЭДТА возможно только для исследования морфологии клеток, но не их функций. Учитывая важную роль внутриклеточного кальция в сигнальных активационных путях, не удивительно, что ЭДТА угнетает функции фагоцитирующих клеток, в частности — продукцию ими активных форм кислорода [9]. В последние годы увеличивается число экспериментальных иммунологических, фармакологических, физиологических исследований, выполняемых на нетрадиционных экзотических животных, к которым в частности относятся водные позвоночные и беспозвоночные животные, хорошо культивируемые в аквариуме в лабораторных условиях [8].

Цель работы — адаптация методических подходов к сравнительной оценке клеточных реакций врожденного иммунитета у моллюсков *Pomacea* sp. (*Caenogastropoda*, *Ampullariidae*) при экспериментальном асептическом воспалении.

Материалы и методы

Моллюсков *Pomacea* sp. (*Caenogastropoda*, *Ampullariidae*) содержали в аквариуме объемом 100 л при температуре 24–26 °С со световым режимом 12 ч света и 12 ч темноты. Их кормили 1 раз в сутки в начале светового дня сбалансированным кормом Tetra ReptoMin (Tetra GmbH, Германия).

В качестве объекта для сравнительного исследования использовали неинбедных белых крыс 2–6 месячного возраста, которых содержали в условиях вивария на стандартной диете (со свободным доступом к пище и воде) и стандартном освещении (12 ч света и 12 ч темноты). Все исследования одобрены на соответствие нормам биомедицинской этики этическим комитетом при «ИЭГМ УрО РАН», протокол № 3 от 30.11.2015 г.

С учетом особенностей беспозвоночных животных всю работу проводили с использованием изотонического для клеток гемолимфы моллюсков *Pomacea* sp. полного солевого раствора (ПСР) следующего состава: 43 мМ NaCl, 1,8 мМ KCl, 4,25 мМ CaCl₂, 1,87 мМ MgCl₂, 5,5 мМ глюкоза, 10 мМ HEPES, pH = 7,6. Состав ПСР мы выбрали на основании опубликованных работ по биохимическому составу и физико-химиче-

ским свойствам гемолимфы моллюсков *Pomacea canaliculata* [6]. Для предотвращения коагуляции и агрегации клеток во всех исследованиях *in vitro* к ПСР *ex tempore* добавляли гепарина натриевую соль в концентрации 100 ЕД/мл (далее сокр. — ПСР-геп). В предварительном эксперименте проводили оценку возможного влияния гепарина на продукцию активных форм кислорода фагоцитирующими клетками костного мозга крыс в реакции люминолзависимой хемилюминисценции. Для остановки фагоцитоза помимо помещения суспензий на лед использовали антикоагуляционный буферный раствор следующего состава: 43 мМ NaCl, 1,8 мМ KCl, 10 мМ HEPES, 30 мМ ЭДТА; рН 7,6 (далее сокр. — АКБ-ЭДТА) [7, 14].

В отдельном эксперименте оценивали жизнеспособность и апоптоз клеток гемолимфы в условиях их инкубации при температуре 28 °С (опыт) и 4 °С (контроль) в течение 60 и 180 мин в ПСР-геп. или в АКБ-ЭДТА. Для оценки апоптоза клеток гемолимфы методом проточной лазерной цитометрии использовали набор реактивов BD PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™). В 96-луночном планшете к 10 мкл клеток в концентрации 10⁶/мл добавляли 0,5 мкл аннексина V-PE (PE Annexin V) и 0,5 мкл 7-аминоактиномицина D (7-AAD) в рабочих концентрациях, инкубировали 20 мин в темноте при комнатной температуре, добавляли по 180 мкл АКБ-ЭДТА в каждую лунку, перемешивали и сразу же анализировали результаты на проточном лазерном цитометре. Анализ проводили в модулях Guava Nexin Assay и Guava ExpressPro Assay программного обеспечения Millipore CytoSoft 5.3 для проточного цитометра Guava EasyCyte (Millipore) по инструкции производителя. Параллельно оценивали целостность наружных клеточных мембран с помощью теста с трипановым синим и аппарата клеточного анализа Cellometer™ Auto T4 Cell Counter (Nexcelom Bioscience LLC). Клеточную суспензию разводили 1/10 холодным АКБ-ЭДТА и к 3 частям полученной суспензии добавляли на холоду 1 часть 0,4% изотонического раствора трипанового синего, приготовленного на АКБ-ЭДТА. Число жизнеспособных (неокрашенных) и погибших (окрашенных) клеток просчитывали с помощью программного обеспечения к прибору.

Для индукции асептического воспаления моллюскам проводили анестезию по методу [7] и вводили стерильную суспензию зимозана А (Zymosan A from *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma, Z4250) внутримышечно в подошвенную область ноги в дозе 0,5 мг/10 г массы тела [3]. Животных выводили

из эксперимента через 12 ч после инъекции флогогена. Контролем служили животные, которым вместо зимозана вводили эквивалентное количество ПСР. После анестезии и обездвиживания моллюска по методу [7] с помощью шприца забирала гемолимфу в пробирку эппендорф с гепарином (100 ЕД/мл), извлекали орган кроветворения (почка) и ткани в области инъекции флогогена, которые помещали в пробирки, содержащие ПСР-геп. Суспензию клеток из выделенных органов получали общепринятым методом гомогенизации в пробирках эппендорф в ПСР-геп в объеме до 1,0 мл с помощью стерильного полипропиленового пестика (Tissue Grinder, Axygen®). После подсчета исходного числа ядросодержащих клеток (ЯСК) в камере Нейбауэра (AC1000 Improved Neubauer, Hawksley, Великобритания) их отмывали центрифугированием и доводили их концентрацию до 25 × 10⁶ ЯСК/мл. Показатели лейкоформулы оценивали традиционным микроскопическим методом с комбинированной окраской препаратов по Романовскому—Гимзе с докрасиванием эозином-метилтиленовым синим по Лейшману при рН 7,4. Для оценки фагоцитарной активности лейкоцитов и ацидификации фагосом использовали частицы зимозана, меченого рН-сенситивным флуорохромом зеленым pHrodo™ (pHrodo™ Green Zymosan Bioparticles™ Conjugate for Phagocytosis, Thermo Fisher Scientific, P35365). В микропробирках эппендорф объемом 0,2 мл смешивали 4 мкл частиц (100 × 10⁶ частиц/мл) и 4 мкл аутоплазмы гемолимфы, после инкубации смеси при 28 °С в течение 30 мин для опсонизации добавляли 4 мкл суспензии лейкоцитов (25 × 10⁶ клеток/мл) и 88 мкл ПСР-геп. После инкубации в течение 120 мин при 28 °С пробирки помещали на лед и их содержимое количественно переносили в плоскодонные 96-луночные планшеты (АО «Медполимер», Россия), используя для отмывания и увеличения объема каждой пробы по 100 мкл охлажденного до 4 °С АКБ-ЭДТА с рН = 7,6. Общий объем каждой пробы был равен 200 мкл, что необходимо для просчета на цитометре абсолютного числа клеток и событий. Анализ интенсивности флуоресценции проводили с помощью планшетного проточного лазерного цитофлуориметра Guava EasyCyte (Hayward, CA, США), который позволяет непосредственно оценить абсолютное количество клеток на микролитр без использования эталонных частиц, благодаря применению стандартизированного микрокапилляра и высокоточного микронасоса (The Lee Company, США). Далее данные анализировали в программе Guava

CytoSoft 5.3, где в модулях Guava ExpressPlus и Guava Express PRO проводили последовательное гейтирование гистограмм, полученных с датчика переднего светорассеяния (Forward Scatter) по количеству флуоресцентных событий по датчику Green Fluorescence. При этом все отгетированные клетки объективно отражают уровень ацидификации фагосом, так как при физиологических значениях pH вне клетки green pHrodo™ не флуоресцирует, и интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна снижению pH до 4,0–4,5 при ацидификации фагосом. Результаты выражали в виде числа флуоресцирующих событий, которое отражает общее число клеток с ацидифицированными фагосомами. Параллельно проводили оценку фагоцитоза немеченых частиц зимозана традиционным микроскопическим методом, при этом время инкубации клеток с объектами фагоцитоза составляло 30 мин при 28 °С.

Кислородзависимую микробицидность фагоцитирующих клеток оценивали методом люминолзависимой хемилюминесценции. В стимулированном варианте в лунке планшета (3912 Corning® 96-well White Flat Bottom Polystyrene Microplate, Corning Inc. Costar) смешивали 70 мкл ПСР-геп., 10 мкл натриевой соли люминола (Luminol sodium salt, Sigma, США, A4686-1G) на ПСР-геп. (конечная концентрация 2×10^{-4} М), 10 мкл лейкоцитов (25×10^6 /мл) и 10 мкл опсонизированного или неопсонизированного зимозана (конечные концентрации 15, 150 и 1500 мкг/мл). В спонтанном варианте смешивали те же компоненты, но вместо зимозана вносили 10 мкл ПСР-геп. Измерение проводили на люминометре Luminoskan Ascent® Thermo Labsystems (тип измерения – kinetic, integration time – 1000 ms, интервал – 3 мин, meas. count – 60) в течение 180 мин. Для статистического анализа использовали интегральный показатель хемилюминесценции за весь период измерения (integral, RLU).

Для сравнительного исследования использовали модель 12-часового зимозанового перитонита у крыс, индуцированного внутрибрюшинным введением стерильной суспензии зимозана в дозе 50 мг/кг по ранее детально описанным методам [3].

Статистический анализ проводили с помощью методов описательной статистики. Результаты представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$).

Результаты и обсуждение

Установлено, что после инкубации при 28 °С в течение 60 и 180 мин число жизнеспособных, т. е.

PE Annexin V-7-AAD⁻ не отличается от контроля без преинкубации и с инкубацией клеток при 4 °С и составляет в среднем 97,2%. Относительное число клеток с неповрежденной клеточной мембраной и не окрашивающихся трипановым синим составляет после самой длительной инкубации 98,1%. Таким образом, при использовании ПСР с добавлением 100 ЕД/мл натриевой соли гепарина жизнеспособность клеток сохраняется высокой.

Исследование влияния натриевой соли гепарина в концентрации 100 ЕД/мл на кислородзависимую микробицидность фагоцитирующих клеток в реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) провели с клетками костного мозга самцов крыс. Контролем служили пробы с добавлением вместо гепарина раствора Хенкса. Гепарин вносили в момент постановки реакции ЛЗХЛ. Установлено, что гепарин в исследованной концентрации статистически значимо не влияет на интегральные показатели хемилюминесценции (Integral RLU) при оценке различий по *t*-критерию Стьюдента для парных данных. Показатели Integral RLU для проб с гепарином и без него соответственно составили: в лунках без зимозана $35,793 \pm 13,906$ и $24,390 \pm 1,352$; в пробах с добавлением 15 мкг/мл опсонизированного зимозана $1415,000 \pm 266,856$ и $1569,333 \pm 273,271$; при концентрации опсонизированного зимозана 150 мкг/мл $2707,667 \pm 172,853$ и $4207,000 \pm 952,392$; при концентрации опсонизированного зимозана 1500 мкг/мл $4724,333 \pm 1465,999$ и $6198,333 \pm 2195,182$. Таким образом, натриевая соль гепарина в концентрации 100 ЕД/мл не влияет на показатели реакции люминолзависимой хемилюминесценции и поэтому использование гепарина в качестве антикоагулянта, предотвращающего коагуляцию, агрегацию и дегрануляцию клеток предпочтительнее, чем использование ЭДТА, так как последний оказывает выраженный угнетающий эффект на функции фагоцитирующих клеток [9].

С использованием ПСР-геп мы исследовали поглотительную активность и ацидификацию фагосом лейкоцитов гемолимфы, органа кровотока (почки) и очага воспаления, индуцированного внутримышечным введением стерильной суспензии зимозана. Как видно из рисунка 1, в очаге воспаления увеличивается ацидификация фагосом, сопровождающаяся вследствие снижения pH увеличением числа флуоресцирующих зеленым цветом клеток, поглотивших меченые pHrodo™ объекты фагоцитоза.

В отличие от моллюсков *Lymnaea stagnalis* и *Biomphalaria glabrata*, у которых давно хорошо до-

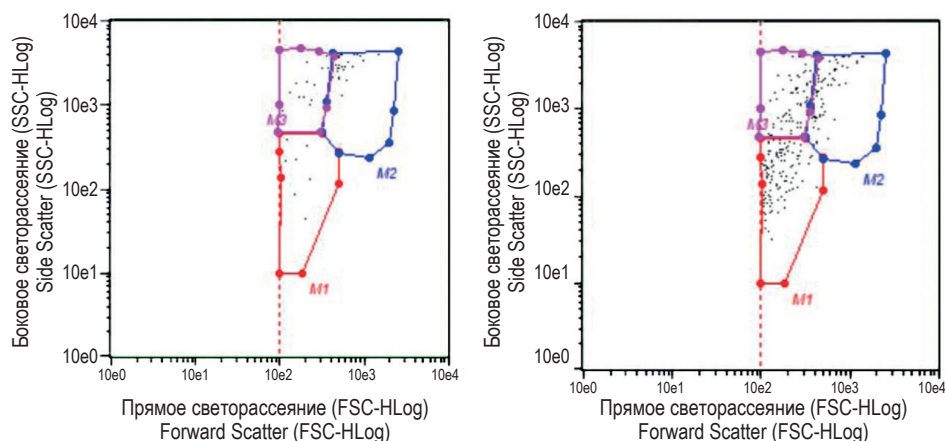


Рисунок 1. Распределение флуоресцирующих событий по боковому (SSC) и прямому (FSC) светорассеянию после гейтирования по интенсивности зеленой флуоресценции при исследовании клеток очага воспаления
Примечание. Слева – моллюск контрольной группы. Справа – моллюск опытной группы с воспалением.

Figure 1. Distribution of fluorescent events by side (SSC) and forward (FSC) scatter after gating according to the intensity of green fluorescence in the study of cells from inflammatory focus

Note. On the left is a mollusk of the control group. On the right is a mollusk of the experimental group with inflammation.

кументирована продукция активных форм кислорода фагоцитами в реакции люминолзависимой хемилюминисценции [4], мы не смогли индуцировать эту реакцию у моллюсков *Potamocera* sp. даже в условиях увеличения концентрации люминола и числа лейкоцитов в сравнении со стандартными условиями проведения реакции. Уровень люминисценции статистически значимо не отличался от показателей фона. Отсутствие люминисценции может быть связано с отсутствием у моллюсков компонентов НАДФН-оксидазного комплекса. Отсутствие реакции ЛЗХЛ отмечено и у насекомых [1], и для детекции активных метаболитов кислорода авторы предлагают использовать более чувствительный чем ЛЗХЛ метод

спиновых ловушек. Этим методом авторы установили, что активные формы кислорода могут быть образованы в незначительном количестве в течение фенолоксидазного каскада реакций, конечным итогом которого является образование меланина и меланизация гемолимфы насекомых.

Заключение

Таким образом, результаты проведенной работы подтверждают существование у беспозвоночных животных многообразия вариантов эффекторных механизмов клеточных реакций врожденного иммунитета даже на примере брюхоногих моллюсков, что нуждается в дальнейших исследованиях.

Список литературы / References

1. Глупов В.В., Слепнева И.А. Механизмы цитотоксичности // Патогены насекомых: Структурные и функциональные аспекты / Под ред. В.В. Глупова. М.: Круглый год, 2001. С. 501-513. [Glupov V.V., Slepneva I.A. Mechanisms of cytotoxicity. In: Insect pathogens: Structural and functional aspects. Ed. by V.V. Glupov]. Moscow: Kruglyy god, 2001, pp. 501-513.
2. Мечников И.И. Лекции о сравнительной патологии воспаления, читанные в апреле и мае 1891 г. в Пастеровском Институте. СПб.: К.Л. Риккера, 1892. 162 с.; Мечников И.И. Лекции о сравнительной патологии воспаления. – 2-е изд. – М., Птг.: Гос. изд-во, 1923. 173 с. [Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation: faites à l'Institut Pasteur en avril et mai 1891 / par Élie Metchnikoff, Chef de Service and l'Institut Pasteur. Paris: G. Masson. 1892; Lectures on the comparative pathology of inflammation delivered at the Pasteur Institute in 1891 / by Elie Metchnikoff; translated from the French by F.A. Starling and E.H. Starling. Metchnikoff, Elie, 1845-1916. Date: 1893.

3. Шилов Ю.И., Шилов С.Ю., Барков С.Ю., Туляев Я.А., Котегов В.П., Баева Т.А., Шилова Н.А. Нейроэндокринная и фармакологическая регуляция функций фагоцитирующих клеток при экспериментальном зимозановом перитоните // Вестник Пермского федерального исследовательского центра, 2021. № 2. С. 15-26. [Shilov Ju.I., Shilov S.Ju., Barkov S.Ju., Tulyaev Ya.A., Kotegov V.P. Baeva T.A., Shilova N.A. Neuroendocrine and pharmacological regulation of functions of phagocytic cells under experimental zymosan-induced peritonitis. *Vestnik Permskogo federalnogo issledovatel'skogo tsentra = Perm Federal Research Center Journal*, 2021, no. 2, pp. 15-26. (In Russ.)]
4. Adema C.M., van Deutekom-Mulder E.C., van der Knaap W.P.W., Sminia T. Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* haemocytes: the role of oxygen radicals. *Parasitology*, 1994, Vol. 109, Pt 4, pp. 479-485.
5. Cooper E.L. Advances in comparative immunology. Introduction. In: Advances in Comparative Immunology. Ed. by Edwin L. Cooper. Publisher: Springer International Publishing, 2018, pp. XIII-XVIII.
6. Cueto J.A., Giraud-Billoud M., Vega I.A., Castro-Vazquez A. Haemolymph plasma constituents of the invasive snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Architaenioglossa, Ampullariidae). *Molluscan Res.*, 2011, Vol. 31, pp. 57-60.
7. Cueto J.A., Rodriguez C., Vega I.A., Castro-Vazquez A. Immune defenses of the invasive apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae): Phagocytic hemocytes in the circulation and the kidney. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 4, e0123964. doi: 10.1371/journal.pone.0123964.
8. Exotic animal laboratory diagnosis. Ed. by J. Jill Heatley, Karen Russell. Description: Hoboken N.J.: Wiley Blackwell, 2020. 630 p.
9. Ginsburg I., Misgav R., Gibbs D.F., Varani J., Kohen R. Chemiluminescence in activated human neutrophils: role of buffers and scavengers. *Inflammation*, 1993, Vol. 17, no. 3, pp. 227-243.
10. Jiravanichpaisal P., Lee B.L., Söderhäll K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 2006, Vol. 211, no. 4, pp. 213-236.
11. Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 1996, Vol. 86, no. 6, pp. 973-983.
12. Medzhitov R., Janeway C.A. Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 1997, Vol. 91, no. 3, pp. 295-298.
13. Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science*, 1998, Vol. 282, no. 5396, pp. 2085-2088.
14. Rodriguez C., Simon V., Conget P., Vega I.A. Both quiescent and proliferating cells circulate in the blood of the invasive apple snail *Pomacea canaliculata*. *Fish Shellfish Immunol.*, 2020, Vol. 107, Pt A, pp. 95-103.
15. Song W.Y., Wang G.L., Chen L.L., Kim H.S., Pi L.Y., Holsten T., Gardner J., Wang B., Zhai W.X., Zhu L.H., Fauquet C., Ronald P. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, 1995, Vol. 270, no. 5243, pp. 1804-1806.

Авторы:

Хрущёв К.А. — студент 4-го курса биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Шилов С.Ю. — к.м.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; доцент кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Authors:

Khrushchev K.A., 4th year Student, Biological Faculty, Perm State University, Perm, Russian Federation

Shilov S.Yu., PhD (Medicine), Junior Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Department of Normal Physiology, E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Барков С.Ю. — очный аспирант лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; старший лаборант кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Шилов Ю.И. — к.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ; доцент кафедры микробиологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

Barkov S. Yu., Postgraduate Student, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Shilov Yu. I., PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Department of Immunology, E. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation; Associate Professor, Department of Microbiology and Immunology, Perm State University, Perm, Russian Federation

Поступила 09.04.2024

Отправлена на доработку 09.04.2024

Принята к печати 24.04.2024

Received 09.04.2024

Revision received 09.04.2024

Accepted 24.04.2024