

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**Становова Мария Владиславовна**

**«Целомоциты пескожила *Arenicola marina* (Annelida,  
Polychaeta): морфология и иммунные функции»**

Специальность 1.5.12 – зоология

ДИССЕРТАЦИЯ  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доцент, к.б.н. Косевич Игорь Арнольдович

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

## СОДЕРЖАНИЕ

1.	ВВЕДЕНИЕ.....	4
1.1.	Актуальность и степень разработанности темы исследования .....	4
1.2.	Цель и задачи исследования.....	5
1.3.	Объект и предмет исследования .....	6
1.4.	Научная новизна исследования.....	6
1.5.	Теоретическая и практическая значимость исследования .....	6
1.6.	Методология диссертационного исследования.....	7
1.7.	Положения, выносимые на защиту.....	7
1.8.	Личный вклад автора .....	8
1.9.	Степень достоверности и апробация результатов исследования .....	8
1.10.	Структура и объем диссертации .....	11
2.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
2.1.	Общие сведения об иммунных системах беспозвоночных животных.....	12
2.2.	Морфология, цитогенез и функции целомоцитов аннелид.....	16
2.2.1.	Oligochaeta.....	17
2.2.2.	Polychaeta .....	24
2.2.3.	Hirudinea .....	31
2.2.4.	Общие для разных групп аннелид типы целомоцитов .....	33
2.3.	Иммунно-ассоциированные молекулы аннелид и других беспозвоночных животных .....	34
2.3.1.	Система прото-комплемента .....	35
2.3.2.	Лектин-подобные молекулы .....	36
2.3.3.	Toll-like рецепторы.....	38
2.3.4.	Агглютинирующие, лизирующие и антимикробные молекулы .....	38
2.3.5.	Кислород-зависимые и фенолоксидазные эффекторные механизмы .....	41
2.3.6.	Белковый гомеостаз иммунных клеток .....	43
3.	МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ .....	46
3.1.	Объект исследования .....	46
3.2.	Морфология целомоцитов <i>Arenicola marina</i> .....	47
3.3.	Участие целомоцитов <i>Arenicola marina</i> в защитных реакциях.....	49
3.4.	Анализ транскриптома целомоцитов <i>Arenicola marina</i> .....	51
3.5.	Протеасомный комплекс целомоцитов <i>Arenicola marina</i> .....	53
4.	РЕЗУЛЬТАТЫ.....	54
4.1.	Морфология и ультраструктура целомоцитов <i>Arenicola marina</i> .....	54
4.2.	Участие целомоцитов <i>Arenicola marina</i> в защитных реакциях.....	60
4.3.	Анализ транскриптома целомоцитов <i>Arenicola marina</i> .....	62
4.4.	Протеасомный комплекс целомоцитов <i>Arenicola marina</i> .....	66
5.	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	68

5.1. Морфология целомочитов <i>Arenicola marina</i> .....	68
5.2. Участие целомочитов <i>Arenicola marina</i> в защитных реакциях.....	71
5.3. Анализ транскриптома целомочитов <i>Arenicola marina</i> .....	76
5.4. Протеасомный комплекс целомочитов <i>Arenicola marina</i> .....	78
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	81
ВЫВОДЫ .....	83
Благодарности.....	83
7. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	85
Список используемых сокращений и обозначений .....	94
ПРИЛОЖЕНИЕ I. ТАБЛИЦЫ .....	96
ПРИЛОЖЕНИЕ II. ИЛЛЮСТРАЦИИ .....	108

# 1. ВВЕДЕНИЕ

## 1.1. Актуальность и степень разработанности темы исследования

Одним из наименее изученных вопросов в области биологии и физиологии беспозвоночных является организация и функционирование иммунной, или защитной, системы. Тем не менее, именно эта система является ключевой в обеспечении жизни любого многоклеточного организма в потенциально опасной внешней среде.

Защитным системам беспозвоночных животных уделяли внимание достаточно обрывочно, и на данный момент сложно делать какие-то обобщения даже в рамках небольшой группы. Однако именно изучение иммунного реагирования разных групп классов беспозвоночных животных представляет большой интерес с эволюционной точки зрения. Традиционно было принято считать, что беспозвоночные животные, в отличие от позвоночных, обладают только примитивными неспецифическими формами реагирования. Пересмотр этой парадигмы произошел в 60-е годы XX века. Накопление данных о функционировании различных «простых» иммунных систем привело к постепенному изменению представлений о разнообразии иммунных систем в целом.

В свете этого изучение закономерностей иммунного реагирования у представителей разных групп беспозвоночных представляет большой интерес.

Аннелиды (*Annelida*) – одна из крупных групп беспозвоночных животных, освоившая все возможные местообитания, кроме воздушной среды. Отличительные черты строения аннелид, включающие метамерное строение тела, хорошо развитые целом и кровеносную систему, позволили аннелидам развить эффективные стратегии выживания и обеспечили значительное разнообразие форм. Тем не менее, с иммунологической точки зрения эта группа изучена весьма слабо, особенно по сравнению с другими первичноротыми животными – в первую очередь представителями *Arthropoda* и *Mollusca*.

Принято считать, что ключевым компонентом иммунной системы аннелид являются свободные клетки целомической жидкости – целомоциты. Они обеспечивают распознавание чужеродного материала, его последующую элиминацию или изоляцию. Целомоциты также продуцируют гуморальные факторы, участвующие в иммунном ответе (Галактионов, 2005; Sima, 1994). Непосредственная роль этих клеток в осуществлении иммунных реакций неоднократно показана (см., например, Bilej, 1994; Cooper, 1996; Vetricka, Sima, 2009). В ранних исследованиях высказывалась точка зрения о том, что целомоциты аннелид являются так называемым «эволюционным аналогом» специализированных иммунных клеток крови высших позвоночных.



Функции целомоцитов во многом связаны с функциями самого целома. Помимо защитных реакций, эти клетки могут выполнять транспортную (например, перенос кислорода), трофическую (в частности, осуществляя питание созревающих гамет), и, вероятно, выделительную функцию.

На данный момент не существует единой системы классификации целомоцитов аннелид. Основным критерием для типирования этих клеток была и остается их морфология, что не дает представления о функциональности разных типов целомоцитов. Разные подходы и методы, использованные исследователями в прошлом, не дают возможности ни для обобщения, ни, тем более, для экстраполяции имеющихся данных об этих специализированных клетках. Кроме того, в пределах разнообразной группы аннелид роль амебоцитов в защитной системе изучена совсем для немногих видов. Имеющиеся данные получены с использованием различных подходов и часто сложно сопоставимы друг с другом. Многие существующие описания относятся к началу XX века и с тех пор не были подтверждены.

Для наиболее полного понимания значения целомоцитов в жизнедеятельности целого организма аннелид и других беспозвоночных животных необходимо иметь представление не только о морфологии и структуре клеточной популяции, но и непосредственно о функциональности этих клеток, в частности, их роли в иммунных реакциях. Сравнение этих параметров у представителей разных видов имеет значение для понимания путей эволюции клеточных защитных механизмов в пределах группы аннелид и беспозвоночных животных в целом.

Таким образом, проведение комплексного сравнительного анализа клеточной популяции целомоцитов у представителей разных таксономических групп аннелид представляется крайне важным. Использование современных методов и комплексный подход к анализу результатов позволят получить более полное представление о функционировании иммунной системы аннелид.

## **1.2. Цель и задачи исследования**

Основной целью исследования являлся комплексный анализ состава и функций популяции целомоцитов у морского пескожила *Arenicola marina* (Linnaeus, 1758) с использованием современных микроскопических, биохимических и молекулярно-генетических методов и сравнение полученных данных с информацией по другим видам.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Обобщение имеющихся в литературных источниках данных об организации и функционировании иммунных систем аннелид.

2. Описание морфологии и классификация популяции целомоцитов *A. marina* с использованием методов оптической, электронной и конфокальной микроскопии.
3. Изучение клеточных защитных реакций целомоцитов *A. marina*.
4. Изучение реакции целомоцитов *A. marina* на химическую индукцию иммунного ответа.
5. Секвенирование и сборка транскриптома целомоцитов *A. marina*, анализ ключевых групп иммуно-ассоциированных молекул.
6. Описание протеасомного комплекса целомоцитов *A. marina*.

### **1.3. Объект и предмет исследования**

Объектом исследования является популяция свободных клеток целомической жидкости – целомоцитов морской полихеты *Arenicola marina*. Предмет исследования – организация иммунной системы представителя группы аннелид. В работе уделяется внимание морфологии и функциям целомоцитов как клеточного компонента иммунной системы.

### **1.4. Научная новизна исследования**

Впервые проведен комплексный анализ состава клеточной популяции целомоцитов *Arenicola marina* с использованием современных микроскопических, биохимических и молекулярно-генетических методов. Проведены эксперименты, подтверждающие избирательную иммунную реактивность разных типов целомоцитов. Впервые для представителя группы аннелид получен транскриптом целомоцитов. Описан состав протеасомного комплекса целомоцитов и его реакция на экспериментальную индукцию иммунного ответа.

### **1.5. Теоретическая и практическая значимость исследования**

Результатом работы являются данные об организации и функционировании клеточного компартмента иммунной системы представителя морских аннелид. Отработанные методики работы с целомоцитами могут быть применены для изучения других видов и дальнейших сравнительно-морфологических исследований, которые позволят расширить знания в данной области науки. Полученный в ходе работы транскриптом целомоцитов является первым общедоступным тканеспецифичным транскриптомом представителя аннелид. Это значимый вклад в дальнейшее изучение молекулярных основ функционирования и эволюции иммунных систем, так как доступные молекулярно-генетические данные для аннелид до сих пор очень ограничены.

Информация об иммунных системах аннелид, обобщенная в литературном обзоре, может быть использована в качестве методического пособия при проведении курсов лекций и практик для студентов кафедр зоологии беспозвоночных и цитологии.

### **1.6. Методология диссертационного исследования**

Методологической основой исследования является комплексный подход к анализу морфологических, биохимических и молекулярно-генетических данных. Для изучения клеточных защитных реакций использовалась индукция иммунного ответа: клеточная стенка дрожжей (зимозан) в качестве корпускулярного индуктора, липополисахариды клеточной стенки бактерий (LPS) в качестве химического индуктора. Для изучения реакции инкапсуляции в целомическую полость червей внедрялись инородные тела разной природы. Процесс инкапсуляции изучался с использованием световой и электронной микроскопии. Транскриптом целомоцитов был получен с помощью глубокого секвенирования образцов кДНК, полученных путем обратной транскрипции с РНК, выделенной из индуцированных целомоцитов.

### **1.7. Положения, выносимые на защиту**

1. На основании анализа собственных результатов и литературных данных в популяции целомоцитов *Arenicola marina* выделено пять морфологически отличных типов амебоцитов: ювенильные, мелкие амебоциты (гранулоциты) с псевдоподиями, шнуровидные амебоциты, распластывающиеся веретеновидные амебоциты, распластывающиеся вакуолизированные амебоциты округлой формы. Эти типы выделяются как в живом, так и в фиксированном материале. При этом общее количество целомоцитов и относительное содержание разных клеточных типов не зависит от пола и размера особей, сезона наблюдений и отражает в первую очередь физиологическое состояние конкретного организма.
2. Экспериментально показана разная роль типов целомоцитов в клеточных защитных реакциях. Два типа распластывающихся амебоцитов (веретеновидные и вакуолизированные) инициируют агрегацию других типов клеток в процессе фагоцитоза инородных частиц и осуществляют распознавание микробных паттернов. Мелкие гранулоциты и частично шнуровидные амебоциты активно фагоцитируют и осуществляют реакцию инкапсуляции.
3. Впервые получен транскриптом целомоцитов представителя аннелид. На молекулярном уровне пескожил имеет сложную многофакторную иммунную систему. В транскриптоме целомоцитов присутствуют группы иммунно-ассоциированных молекул, как характерные для других беспозвоночных животных, так и таксон-специфические.

Иммунная система пескожила включает высококонсервативные и быстро эволюционирующие группы генов. На основе анализа транскриптома выявлены группы молекул, представляющие интерес в качестве объекта дальнейших исследований системного иммунного ответа.

4. Описан протеасомный комплекс целомоцитов *Arenicola marina*. Отмечен функциональный сдвиг протеасомной системы в сторону гидролиза неубиквитинированных белков. Индукция воспаления вызывает полную элиминацию регуляторных частиц комплекса, синтез новых форм шаперонов и повышение химотипсин-подобной активности протеасом.

### **1.8. Личный вклад автора**

Автором диссертации совместно с научным руководителем разработан план исследования и проведен анализ полученных результатов. Автором диссертации получена большая часть данных, представленных в работе. Автором выполнен анализ литературных источников. Автор осуществлял планирование и проведение экспериментов, сбор, подготовку и обработку материала. Исследования морфологии целомоцитов и клеточных защитных реакций проведены автором. Результаты разделов «Протеасомный комплекс целомоцитов *A. marina*» и «Транскриптомный анализ иммунно-ассоциированных молекул в целомоцитах *A. marina*» получены в соавторстве. Вклад автора в изучение протеасомного комплекса: постановка экспериментов, сбор материала, конфокальная микроскопия. Обработка материала, анализ данных и подготовка публикации – совместно с Люпиной Ю.В. и коллегами. Вклад автора в транскриптомный анализ: постановка эксперимента, сбор проб РНК. Соавторами осуществлено секвенирование (Газизова Г.Р.) и сборка транскриптома (Горбушин А.М.). Анализ транскриптома и подготовка публикации – совместно с Горбушиным А.М. При подготовке публикаций автором была проведена значительная работа над текстом статей, подготовка иллюстраций, а также переписка с редакторами и рецензентами.

### **1.9. Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Достоверность результатов, полученных в диссертационной работе, обеспечивается корректным использованием современных методов исследования. При проведении сравнительных экспериментов с морфологией клеток настройки микроскопов были выставлены одинаково для контрольных и экспериментальных образцов. Используемые методы фиксации и окраски при работе с целомоцитами разрабатывались в соответствии с используемыми в мировой практике, а также с учетом собственных результатов. Фотоизображения и микрофотографии, полученные в ходе исследований, подвергались

незначительной корректировке яркости и контрастности, затрагивающей все пиксели изображений. Качество сборки транскриптома было проверено с помощью компьютерных методик, широко используемых в подобных исследованиях.

Результаты исследования были представлены на всероссийских и международных конференциях:

1. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016», МГУ им. М.В. Ломоносова (Москва, Россия, 11-15 апреля 2016);
2. V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России (Сочи, Россия, 4-8 октября 2016);
3. Society for Experimental Biology/SEB Annual Main Meeting (Гетеборг, Швеция, 3-6 июля 2017);
4. 4th International Congress on Invertebrate Morphology (ICIM4)/IV Международный конгресс по морфологии беспозвоночных (Москва, Россия, 18-23 августа 2017);
5. XIII Всероссийская конференция «Изучение, рациональное использование и охрана природных ресурсов Белого моря» (Санкт-Петербург, Россия, 17-20 октября 2017);
6. Юбилейная конференция в честь 160-летия кафедры зоологии беспозвоночных «ЗООЛОГИЯ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ – НОВЫЙ ВЕК» (Москва, Россия, 19-21 декабря 2018).

По результатам исследования опубликовано 3 статьи в научных журналах, индексируемых в международных базах данных Scopus, Web of Science, RSCI WoS, а также 6 тезисов докладов конференций в сборниках, входящих в списки цитирования.

#### *Статьи*

1. **Stanovova M.V.**, Erokhov P.A., Gornostaev N.G., Mikhailov V.S., Lyupina Yu. V. Role of proteasomes in non-specific immune response of marine annelids // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – Pleiades Publishing, 2016. – Vol. 471. – №. 1. – P. 428-430.
2. **Stanovova M.V.** Morphology, cytogenesis and functions of Annelida coelomocytes // *Invertebrate Zoology*. – 2019. – Vol.16 – №3. – P. 254-282. [in Russian, with English summary]
3. **Stanovova M.V.**, Gazizova G.R., Gorbushin A.M. Transcriptomic profiling of immune-associated molecules in the coelomocytes of lugworm *Arenicola marina* (Linnaeus, 1758) // *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 2022.

Подготовка к публикации полученных результатов в научных трудах [1, 3] проводилась совместно с соавторами. Вклад автора в научных трудах [1] составляет 1/2; в научных трудах [3] составляет 1/3. В научных трудах [2] вклад автора определяющий.

*Материалы конференций*

1. **Становова М.В.**, Ерохов П.А., Косевич И.А., Михайлов В.С., Люпина Ю.В. Роль протеасом в развитии воспаления у *Arenicola marina* (Annelida, Polychaeta) // Acta Naturae (русскаяязычная версия). — 2016. — Т. 1, № Спецвыпуск. — С. 210–210.
2. Люпина Ю.В., Лавров А.И., **Становова М.В.**, Абатурова С.Б., Ерохов П.А., Косевич И.А., Шарова Н.П., Михайлов В.С. Роль протеасом в молекулярных механизмах адаптации у холодноводных морских беспозвоночных // Материалы Международной научно-практической конференции «Современные проблемы естествознания в науке и образовательном процессе». — Изд.полигр. центр Белорусского пед. университета им. Танка, Минск. — Т. 12. — С. 31-31
3. Люпина Ю.В., Лавров А.И., **Становова М.В.**, Кравчук О.И., Абатурова С.Б., Ерохов П.А., Косевич И.А., Шарова Н.П., Михайлов В.С. Пластичность протеасом: молекулярный механизм адаптаций у холодноводных морских беспозвоночных // VII Российский симпозиум "Белки и пептиды". — Новосибирск, 2015. — С. 186-186.
4. **Stanovova M. V.**, Kosevich I. A., Lyupina Y. V. Invertebrate immunity: *Arenicola marina* (Annelida, Polychaeta) as an experimental object // Abstract book, SEB Annual Main Meeting, Gothenburg, 3-6 July 2017. — Vol. 1. — 2017. — P. 267.
5. **Stanovova M. V.**, Kosevich I. A. Coelomocytes of *Arenicola marina* (Annelida, Polychaeta): morphology and functions // The 4th International Congress on Invertebrate Morphology (ICIM4). — Издательство "Перо" Москва, 2017. — P. 247.
6. **Становова М. В.**, Косевич И. А. Изучение целоцитов морских аннелид с точки зрения иммунных функций (на примере пескожила *Arenicola marina*) // Зоология беспозвоночных – Новый Век: материалы конференции, посвященной 160-летию кафедры зоологии беспозвоночных Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (19-21 декабря 2018 г.) / Под ред. И. И. Гордеев. — Москва, 2018. — С. 116.

### **1.10. Структура и объем диссертации**

Текст работы изложен на 145 страницах и состоит из введения, четырех глав: обзор литературы, материал и методы, результаты, обсуждение результатов, — заключения, списка литературы и приложений. Приложение I включает 5 таблиц, Приложение II содержит 66 иллюстраций. Список литературы включает 167 источников, из которых 14 представлены русскоязычными источниками, а 153 — на иностранном языке.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1. Общие сведения об иммунных системах беспозвоночных животных

Перед любым организмом стоят сложные проблемы поддержания собственной целостности и внутреннего гомеостаза. Окружающая среда потенциально агрессивна и опасна, и на протяжении жизни организм подвергается самым разным внешним воздействиям. Следовательно, должны существовать системы и механизмы, позволяющие защитить организм от внешней опасности.

К защитным системам, обеспечивающим поддержание внутреннего гомеостаза организма, у многоклеточных животных относят иммунную систему в широком понимании. Способ защиты организма от чужеродных объектов и веществ, направленный на поддержание генетической целостности организма, называется иммунитетом (Галактионов, 2005). Соответственно, иммунная система – это совокупность всех органов и тканей, обеспечивающих необходимые реакции для поддержания целостности (в первую очередь генетической) организма. Традиционно термин «иммунная система» используется по отношению к позвоночным животным (Ройт, 1991). В данной работе мы будем использовать этот термин как синоним термина «защитная система».

Основная функция иммунной, или защитной, системы – защитить организм от потенциально опасного проникновения в него чужеродных объектов. Кроме того, существует вероятность возникновения в самом организме потенциально вредных мутаций. Для клеток, которые постоянно делятся, эта вероятность особенно высока, что могло бы привести к накоплению мутаций в многоклеточном организме. Поэтому помимо защиты от различных инфекций и других внешних воздействий иммунная система выполняет контрольную функцию: создание заслона от вообще любых проявлений чужеродности. В первую очередь это именно подвергшиеся мутациям собственные клетки. Таким образом, иммунитет является важнейшим фактором стабильности онтогенеза. Некоторые авторы придают этой функции даже большее значение, чем защите от проникновения чужеродных объектов (Галактионов, 2005).

Исходя из этого, можно предположить, что чем сложнее организация многоклеточного организма, тем совершеннее должна быть его защитная система. Защитные реакции организма обеспечивает работа двух подразделов иммунной системы: врожденного и приобретенного иммунитета. Врожденный иммунитет также называется неспецифическим в силу того, что его активность не зависит от предварительного контакта с антигеном. Врожденный иммунитет в той или иной форме имеется у всех



многоклеточных животных. Его характеристики определяются видовой принадлежностью организма.

Приобретенный, или специфический, иммунитет определяет восприимчивость конкретного организма (особи) к определенным типам патогенов. Для этого подраздела иммунной системы характерна в первую очередь специфичность в распознавании конкретного антигена и последующее формирование так называемой иммунной памяти (Ройт, 1991).

До недавнего времени считалось, что иммунная реактивность позвоночных и беспозвоночных животных принципиально различается. Специфический иммунитет присущ исключительно позвоночным животным (начиная с круглоротых), а у беспозвоночных животных присутствуют только неспецифические защитные реакции.

Долгое время такое различие связывали с тем, что у беспозвоночных отсутствует тимус – структура, обеспечивающая работу специфического иммунитета у позвоночных животных. Предполагалось, что беспозвоночным, с их относительно короткой продолжительностью жизни и высоким потенциалом к воспроизведению, для успешного выживания должно хватать неспецифических форм защиты, которые у них достаточно хорошо выражены (Галактионов, 2005).

Однако проведенные в 60-х годах исследования показали, что устоявшаяся точка зрения не совсем верна. У некоторых видов семейства Lumbricidae была обнаружена иммунологическая память. Эти эксперименты (Cooper, 1968; 1969) показали способность дождевых червей к отторжению аллогенных трансплантатов. Аллогенным называется материал, принадлежащий данному биологическому виду, но имеющий генетические отличия от организма конкретного животного. За счет имбридинга популяции дождевых червей имеют определенную генетическую мозаичность, поэтому наиболее острые реакции отторжения наблюдались при использовании в качестве трансплантационных пар червей из разных географических зон. Сам факт отторжения аллотрансплантата говорит о наличии определенной специфичности иммунного реагирования.

Позднее было установлено, что специфическое аллоиммунное отторжение свойственно даже таким низкоорганизованным беспозвоночным, как кишечнополостные и губки (Hildemann, 1974). Следующим этапом развития этого направления в иммунобиологии стал поиск систем гистосовместимости не только у позвоночных, но и у беспозвоночных животных. Полученные разными исследователями данные дают возможность предположить, что первые преадаптационные проявления специфического иммунного реагирования в эволюции появились давно – вероятно, еще при появлении первых многоклеточных животных (Cooper, 1996; Галактионов, 2005).

Как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных любые защитные реакции обеспечиваются двумя основными функциональными компонентами – клеточным и гуморальным. В клеточный компонент включаются как исключительно защитные клетки, так и те клетки, для которых защитная функция не является основной, но которые так или иначе задействованы в обеспечении иммунного ответа. Как правило, защитные клетки участвуют в изоляции и уничтожении чужеродного материала. Защитные функции свободных клеток целомической жидкости беспозвоночных животных изучались еще И.И. Мечниковым и стали основанием для его теории фагоцитарного иммунитета (Metchnikoff, 1893).

Гуморальный компонент представлен различными химическими агентами (преимущественно белковой природы), которые обеспечивают распознавание чужеродного материала и во многом регулируют деятельность защитных клеток. У большинства беспозвоночных животных обнаруживаются несколько основных групп распознающих и эффекторных гуморальных факторов. Высоким разнообразием обладают различные паттерн-распознающие рецепторы, в том числе, например, Toll-like рецепторы и различные лектины. Среди эффекторных молекул хорошо известны лизины, обладающие литической активностью, агглютинины, обладающие опсонизирующим действием, а также индуцибельные антимикробные пептиды. В последнее время у беспозвоночных также обнаруживают антителоподобные факторы и молекулы, выполняющие функцию системы комплемента (Gorbushin, 2019). Такое разнообразие химических иммунных факторов подтверждает точку зрения, что иммунные системы у беспозвоночных животных устроены не менее сложно, чем таковые у позвоночных.

Любая защитная реакция состоит из трех основных этапов: распознавание чужеродного объекта, подготовка реакции и эффекторное действие (Горышина, Чага, 1990). На разных стадиях процесса вовлеченность клеточного и гуморального компонентов неравнозначна, но, так или иначе, эффективный иммунный ответ осуществляется кооперативным действием разных факторов. Доказательствами сопряженности этих двух форм защиты могут служить по меньшей мере три группы фактов.

Во-первых, гуморальные факторы играют роль распознающих структур, выявляющих присутствие антигенов. Они могут связываться с защитными клетками и стимулировать начало фагоцитоза. Во-вторых, защитные клетки постоянно продуцируют множество гуморальных факторов, как, например, антимикробные факторы плазмы гемолимфы или крови. В-третьих, некоторые патогены способны избегать прямого контакта с фагоцитами – то есть, постоянно циркулируют в плазме или находятся в

«недоступных» для фагоцитов местах. За их прямое уничтожение ответственны гуморальные факторы гемолимфы или крови, обладающие литической активностью (Галактионов, 2005).

Таким образом, совместная деятельность клеточного и гуморального компонентов иммунной системы обеспечивает эффективную защиту организма.

Иммунные системы беспозвоночных животных разнообразны и описываются обычно в связи с органами и тканями, несущими иммунную функцию у представителей определенного таксона. У животных с развитой циркуляторной системой (кольчатые черви, моллюски, членистоногие) средоточием иммунных функций являются так называемые ткани внутренней среды – целомическая жидкость, гемолимфа (Горышина, Чага, 1990). Клеточные элементы и гуморальные факторы плазмы этих жидкостей наиболее активно участвуют в защитных реакциях (Галактионов, 2005; Dhainaut, Scaps, 2001).

За время изучения иммунной реактивности различных групп беспозвоночных животных получены значительные объемы информации. Обобщить предыдущие и ныне существующие концепции, касающиеся иммунитета беспозвоночных вообще и в пределах конкретных таксонов, не представляется возможным в рамках одного обзора. Развитию иммунологии беспозвоночных, а точнее – самого представления об эволюционной иммунологии, посвящено множество книг и монографий (см., например: Ratcliffe et al., 1985; Галактионов, 2005; Söderhäll, 2010; Cooper, 2018). Это направление представляется перспективным не только с точки зрения фундаментальных исследований, но и с точки зрения возможного применения знаний о многообразии иммунных систем в самых разных областях деятельности человека.

Аннелиды – одна из ключевых групп первичноротых беспозвоночных животных. Заполняющая целомическую полость тела аннелид жидкость выполняет множество важных функций: опорную, транспортную, половую, защитную (иммунную). В целомической жидкости большинства аннелид присутствуют специализированные популяции свободных клеток. Наиболее общее название форменных элементов целомической жидкости – целомоциты. Это клетки разного размера и в целом очень разнообразной морфологии.

Функции целомоцитов во многом связаны с функциями самого целома. Эти клетки могут выполнять транспортную функцию (например, перенос кислорода), трофическую (в частности, осуществляя питание созревающих гамет), и, вероятно, выделительную и накопительную функции (хлорогеновые клетки). Также целомоциты являются ключевым

компонентом иммунной системы аннелид. Они обеспечивают распознавание чужеродного материала, его последующую элиминацию или изоляцию.

Целомоциты разных типов могут продуцировать гуморальные факторы, участвующие в иммунном ответе (Галактионов, 2005; Sima, 1994). Активные факторы плазмы целомической жидкости – различные лектины, белки иммуноглобулинового семейства, белки системы «протокомплемента» – осуществляют распознавание чужеродного материала, опсонизацию, агглютинацию, активацию фагоцитоза и весь сигналинг, необходимый для иммунного ответа на уровне всего организма.

Целомоциты реагируют на множество внешних факторов и способны к быстрой адаптации в случае возникновения необходимости иммунного ответа. В условиях стресса и активации защитных реакций, а также в условиях активного синтеза гуморальных факторов в целомоцитах происходит изменение гомеостаза клеточного протеома. Основные системы контроля состояния клеточного протеома у эукариот – это убиквитин-протеасомная система и комплекс шаперонов. Функционирование протеасом и сопряженных молекулярных комплексов в условиях иммунной активации подробно изучено у млекопитающих, однако некоторые данные имеются и для представителей разных таксонов беспозвоночных животных.

Исследования, посвященные систематике аннелид (Struck et al., 2011), показали, что таксоны Polychaeta и Oligochaeta не являются монофилетичными. Поскольку данное исследование практически не касается вопросов внутренней систематики аннелид, под термином Polychaeta мы понимаем морских аннелид *sensu lato*, так как большинство рассматриваемых в литературном обзоре исследований основаны на предыдущей классификации, подразделяющей тип аннелид на три класса – Polychaeta, Oligochaeta и Hirudinea.

## **2.2. Морфология, цитогенез и функции целомоцитов аннелид**

Единой классификации целомоцитов до сих пор не существует даже в рамках разных групп аннелид. В первую очередь это связано с тем, что основным критерием для деления этих клеток на группы были и остаются морфологические признаки. Интерпретация морфологических данных зависит от выбранных методик наблюдения, фиксации и окраски. Часто у близких видов выделяют разное число типов целомоцитов. Формирование универсальной классификации целомоцитов также осложняется естественными факторами – полиморфизмом признаков от особи к особи, а также присутствием в целомической жидкости клеток разной степени зрелости и с разным функциональным статусом. Кроме того, за все время изучения этого вопроса по

отношению к клеткам полости тела кольчатых червей исследователи употребляли самые разные термины. К примеру, в ранних работах (Romieu, 1923; Thomas, 1930) встречается термин «лейкоциты», так как при описании этих клеток авторы проводили прямую аналогию с клетками крови позвоночных животных. Отсутствие единой номенклатуры затрудняет сопоставление разных систем классификации друг с другом. Наконец, для многих изученных с этой точки зрения видов кольчатых червей существуют только описания, сделанные в конце XIX – начале XX столетия, и с тех пор эта информация не обновлялась и не подтверждалась современными методами.

Согласно одной из самых общих из предложенных классификаций, среди целомоцитов аннелид в целом можно выделить три основных типа: амебоциты, элеоциты и эритроциты (Vetvicka, Sima, 2009). Открытым остается вопрос взаимосвязи и взаимоотношениях популяции целомоцитов с популяцией клеток крови. Существует предположение, что у некоторых видов может происходить миграция клеточных элементов между целомической полостью и кровеносной системой (Lunetta-D'Ancona, Russo, 1982; Vetvicka, Sima, 2009). Это создает дополнительные сложности для корректной классификации как целомоцитов, так и клеток крови (гемоцитов).

### 2.2.1. *Oligochaeta*

Представители олигохет являются популярными моделями для изучения иммунной реактивности беспозвоночных животных (Bilej, 1994; Cooper, Roch, 2003; Bilej et al., 2010). На представителях семейства Lumbricidae было показано наличие у аннелид механизмов, сходных с иммунной памятью. Эксперименты показали способность дождевых червей к отторжению аллогенных трансплантантов (Cooper, 1968; 1969). Изучение реакции на трансплантанты у разных групп беспозвоночных животных началось именно с экспериментов Купера. Подробнее с развитием этого направления можно ознакомиться в специализированном обзоре (Cooper, Roch, 1994).

С одной стороны, благодаря интересу исследователей к изучению клеточных элементов целомической жидкости, олигохеты являются наиболее полно изученной группой аннелид. С другой стороны, большая часть информации получена в ходе исследований модельных объектов – преимущественно представителей семейства Lumbricidae (в первую очередь, родов *Lumbricus* и *Eisenia*).

Разнообразие типов целомоцитов значительно различается у представителей разных семейств и даже внутри одного семейства. Показано, что численность и состав популяции целомоцитов олигохет является видоспецифичной характеристикой (Kurek et

al., 2007). Кроме того, качественно-количественное соотношение разных типов клеток зависит от индивидуальных черт (например, возраста) и физиологического состояния конкретной особи, а также в значительной степени от внешних условий, в том числе, времени года и степени загрязненности местообитания (Jamieson, 1992; Cooper, 1996; Kurek, Plytycz, 2003; Kurek et al., 2007).

Среди целоцитов олигохет можно выделить два основных типа: амебоциты и элеоциты (Vetvicka, Sima, 2009). Внутри этих типов клеток возможна более полная и детальная морфофункциональная дифференциация.

### **Амебоциты**

В общем случае амебоциты – это подвижные клетки, образующие псевдоподии и, как правило, способные к фагоцитозу. На основании цитоморфометрических и цитохимических признаков у *Lumbricus terrestris* Linnaeus, 1758, типичного представителя семейства Lumbricidae, было выделено четыре основных типа амебоцитов: базофильные, ацидофильные, нейтрофильные и гранулоциты (Stein et al., 1977; Cooper, 1996) (Рис. 1) (здесь и далее: таблицы – Приложение I, рисунки – Приложение II).

Базофильные амебоциты в целомической жидкости этих червей самые многочисленные. Их размер варьирует от 5 до 100 мкм, в среднем – около 30 мкм. Клетки могут иметь небольшие базофильные гранулы и/или слабо выраженные пучки филаментов. Живые базофильные клетки образуют псевдоподии различной формы. В более крупных базофильных целоцитах есть небольшие, но различимые на светооптическом уровне вакуоли. Хроматин в ядрах этих клеток обычно находится в конденсированном состоянии.

Ацидофильные клетки обычно имеют гранулы, и у *L. terrestris* могут быть подразделены на два типа в зависимости от размера гранул. В среднем размеры клеток составляют 10-30 мкм. В клетках I типа много мелких гранул, ядро смещено от центра к периферии; цитоплазма клеток II типа содержит более крупные ацидофильные гранулы или везикулы, ядро расположено ближе к центру клетки.

Нейтрофилы имеют очень разные размеры – от 12 до 40-50 мкм. В этих клетках могут наблюдаться маленькие вакуоли и/или небольшие гранулы, неотличимые по окраске от цвета цитоплазмы. Ядро часто сравнительно крупное.

Гранулоциты были выделены авторами в отдельный тип благодаря тому, что их гранулы хорошо видны без предварительной окраски. Это гранулы разного размера и окрашиваются по-разному; характерной особенностью является наличие в одной клетке и базофильных, и ацидофильных гранул.

Кроме перечисленных типов, авторы отметили у *L. terrestris* наличие клеток, которые сочетали в себе черты двух или более типов. Их численность составила примерно 2% от общей популяции амебоцитов (Stein et al., 1977).

На основании ультраструктурных данных у этого же вида земляных червей были выделены другие, не аналогичные предыдущей классификации, три типа амебоцитов: гиалиновые амебоциты, или лейкоциты (на гистологических препаратах имеющие базофильную окраску), гранулярные амебоциты (нейтрофильные и базофильные) и амебоциты с включениями (ацидофильные) (Linthicum et al., 1977; Cooper, 1996).

Позднее обе предложенные классификации применяли к целомоцитам других видов люмбрицид (Табл. 1). У *Eisenia foetida* были выделены базофильные и ацидофильные лейкоциты, нейтрофильные амебоциты и гранулоциты (Calisi et al., 2009). У *Dendrobaena veneta* обнаружены амебоциты (аналогичные в этой классификации гиалиновым амебоцитам, лейкоцитам) и гранулоциты (Adamowicz, 2005). При этом на основании данных сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии амебоциты были подразделены на два типа. Гиалиновые и гранулярные амебоциты также были выделены у *Allolobophora chlorotica* (Kurek et al., 2007).

По всей видимости, выделение двух основных типов амебоцитов (гиалиновые амебоциты (лейкоциты) и гранулярные амебоциты) на основании морфологических и ультраструктурных характеристик является более универсальным и вполне применимо к разным видам люмбрицид.

Информация о целомоцитах представителей других семейств олигохет более фрагментарна и иногда противоречива. Отдельные типы амебоцитов часто были описаны под специфическими названиями. Попытки создать общую классификацию целомоцитов предпринимались для представителей Enchytraeidae. У представителей родов *Analycus*, *Achaeta*, *Henlea*, *Bryodrilus* и *Grania* был описан всего один тип амебоцитов (Brinkhurst, Jamieson, 1971). У *Enchytraeus fragmentosus* на основании ультраструктурных данных были выделены два типа: фагоциты (амебоциты) и мукоциты, в ранних исследованиях описанные как «лимфоциты» (Hess, 1970). Позднее «гранулярный мукоцит» был описан как основной тип целомоцитов у *Lumbricillus mirabilis*, *L. reynoldsoni* и *L. rivalis*. Клетки этого типа содержат гранулы, включающие большое количество мукополисахаридных и протеиновых комплексов с очень низким содержанием липидных компонентов. Эти гранулы образуются в аппарате Гольджи и имеют разную структуру в зависимости от степени «зрелости». Амебоциты представителей рода *Lumbricillus* подразделены на два типа, различающихся в первую очередь числом и формой псевдоподий (Richards, 1980).

Мукоциты также описаны как основной из типов целомоцитов для *Pontodrilus bermudensis* Beddard, 1891 (сем. Megascolecidae) (Jamieson et al. 1981, Wampler, Jamieson, 1986). Согласно этому описанию, мукоциты представляют собой стадию дифференциации другого клеточного типа – «линоцитов».

Клетки, сходные по морфологии с мукоцитами энхитреид и мегасколецид, описаны для представителей семейства Tubificidae (Envall et al., 2008). На основании морфологических признаков авторы выделили только один тип целомоцитов у изученных восьми видов: пяти представителей подсемейства Naidinae и трех представителей подсемейства Rhyacodrilinae. Это клетки без псевдоподий, с окруженными мембраной гранулами, выраженным шероховатым ЭПР и большим количеством рибосом. По мнению авторов, эти клетки являются отдельным, ранее не отмеченным, типом, но из всех описанных типов целомоцитов к ним ближе всего именно мукоциты.

По всей видимости, в общем случае пул амебоцитов берет начало в преобразованных участках целомиического эпителия в разных частях организма олигохет (Рис. 2, 3). Описанные сайты пролиферации, как правило, являются специализированными участками целотелия (Fischer, 1993; Sima, Slipka, 1995). Одним из возможных источников амебоцитов являются отдельные пролиферативные участки выстилки диссепиментов (Burke, 1974). Специальные органы, т. н. «лимфоидные железы» (или «кровяные железы», «кровяные фолликулы»), были описаны для некоторых представителей родов *Lumbricillus*, *Sparganophilus*, *Maoridrilus*, *Pheretima* и *Pontodrilus* (Sima, 1994). Эти органы представляют собой видоизмененный на определенных участках эпителий выстилки сосудов. Непосредственно популяция амебоцитов у лямбрицид в большей степени связана с участками париетального целотелия и выстилкой диссепиментов (Stein, Cooper, 1983; Noma et al., 2008) (Рис. 3 А, В).

Для некоторых видов показано повышение пролиферативной активности в конкретных участках целотелия в ответ на различные виды стресса. Так, у некоторых земных червей в качестве защитной реакции происходит выбрасывание части целомиической жидкости через дорсальные поры. У *Dendrobaena veneta* при восстановлении пула целомоцитов после подобной реакции наблюдается активная пролиферация в участках целотелия вокруг метанефридиев и тифлозоля (Olchawa et al., 2006; Noma et al., 2008). Для *Eisenia foetida* показана активация пролиферации клеток-предшественников на участках париетального эпителия в ответ на стимуляцию конкретными антигенами (Bilej et al., 1992). Все целомоциты лямбрицид имеют доказанное мезодермальное происхождение (Engelmann et al., 2002, 2005).



Амебоциты олигохет принимают частичное участие в транспорте и накоплении питательных веществ (Valembois, Cazaux, 1970). Однако их основной функцией, по всей видимости, является участие в защитных реакциях. Амебоциты вовлечены в процесс распознавания чужеродного материала и его последующей элиминации на всех стадиях иммунного ответа (Sima, 1994).

Первичная защита от патогенных микроорганизмов и других инородных частиц, попавших в организм червя – это их фагоцитоз иммунно-активными клетками, в первую очередь целомоцитами. Этот очень древний защитный процесс протекает практически одинаковым образом у разных групп многоклеточных животных. Стадии хемотаксиса и адгезии требуют присутствия определенных гуморальных факторов, осуществляющих распознавание чужеродных частиц. У кольчатых червей описаны несколько групп таких факторов – лектины, агглютинины и др. Судя по всему, амебоциты кольчатых червей, как и других беспозвоночных, продуцируют эти факторы самостоятельно. На терминальных стадиях фагоцитоза в амебоцитах вырабатываются активные формы кислорода, что является эффективным механизмом уничтожения поглощенных микроорганизмов (Dhainaut, Scaps, 2001; Галактионов, 2005; Söderhäll, 2010). С подробным описанием известных гуморальных факторов олигохет можно ознакомиться в специализированных обзорах (Engelmann et al., 2002, 2005; Gupta, Yadav, 2016).

Процесс фагоцитоза изучался на клетках дождевых червей как на модельном объекте, еще начиная с первых исследований Мечникова (Metchnikoff, 1893). Фагоцитарной активности целомоцитов олигохет посвящено достаточно много работ (Stein, Cooper, 1981; Shalev et al., 1981; Roch et al., 1983; Bilej et al., 1990; Dales, Kalaç, 1992; Cooper, 1996; Adamowicz, Wojtaszek, 2001), однако большинство исследований носит морфологический или описательный характер. Изучение конкретных физиологических механизмов осуществления фагоцитоза у олигохет велось не так активно. На данный момент известно, что у *L. terrestris* распознавание антигенов осуществляет субпопуляция негранулярных амебоцитов (то есть, «лейкоциты» или гиалиновые амебоциты). Эти клетки экспрессируют поверхностные маркеры Thy-1 (CD90) и бета-2-микроглобулин – оба типа молекул принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов.

Земляные черви используются в качестве видов-индикаторов при оценке состояния окружающей среды, поэтому часть исследований их физиологии сосредоточена на изучении реакции этих животных на различные загрязнения и токсины (Fugère et al., 1996; Galloway, Depledge, 2001; Cooper, Roch, 2003; Calisi et al. 2013). Объектом интереса этих исследований является общая реакция на разные виды стресса, и с этой точки зрения

фагоцитарная активность амебоцитов выступает только как один из биомаркеров. Конкретным механизмам этого процесса в таких исследованиях внимания уделяется немного.

Инородные тела, размер которых превышает размер фагоцитирующих клеток, подвергаются процессу инкапсуляции. Инкапсуляция — принципиально важный защитный механизм. Этот процесс позволяет быстро изолировать крупные инородные тела, которые животное не может удалить из организма или разрушить, и ограничить их контакт с собственными тканями животного (Галактионов, 2005). В естественных условиях процесс инкапсуляции особенно актуален при заражении животных паразитами.

Формирование капсулы заключается в агрегации целомоцитов вокруг чужеродных частиц. Это могут быть клетки бактерий, цисты или взрослые формы паразитов, а также поврежденные структуры самого организма — щетинки, мышечные фибриллы. За счет агрегации большего числа целомоцитов эти капсулы быстро увеличиваются в размере; в какой-то момент самый внешний слой клеток уплощается и перестает прикреплять новые целомоциты. В этот момент в клетках капсулы происходит накопление пигмента, и капсула приобретает более темный оттенок — поэтому некоторые исследователи называли такие капсулы «коричневыми тельцами» (Valembois et al., 1992, 1994; Stein, Cooper, 1983). По всей видимости, в капсулах происходит процесс катаболизма окисленных органических субстратов, в котором участвует метаболический каскад фенолоксидазы — фермента, ответственного за синтез меланиновых пигментов (Gupta, Yadav, 2016). Активность фенолоксидазы при меланогенезе у беспозвоночных связана с выделением свободных радикалов, в частности, активных форм кислорода (Nappi, Ottaviani, 2000; Cerenius, Söderhäll, 2004; Nappi, Christensen, 2005), и формированием амилоидных фибрилл (Falabella et al., 2012; Grimaldi et al., 2012, 2014).

Формирование капсул вокруг паразитических нематод у *L. terrestris* описано Мечниковым (Metchnikoff, 1893). Капсулы вокруг нематод были исследованы на ультраструктурном уровне (Poinar, Hess, 1977). В них были выделены два слоя: внутренний неклеточный и внешний клеточный, содержащий как минимум четыре типа целомоцитов, в том числе гранулярные и негранулярные амебоциты. Кэмерон (Cameron, 1932) наблюдал формирование капсул вокруг хлопковых нитей, экспериментально внедренных в полость тела люмбрицид. Согласно этому описанию, экспериментальные капсулы частично кальцинировались на седьмой день после начала инкапсуляции.

Обычные для *L. terrestris* паразиты — споровики рода *Monocystis*. Экспериментально показано, что контакт инцистированных стадий паразита с целомоцитами *in vitro* вызывает реакцию инкапсуляции. Происходит дегрануляция цитоплазмы целомоцитов, при этом в

клетках отмечается повышение концентрации ферментов, в первую очередь, кислых фосфатаз. При этом взрослые трофозоиты способны избегать иммунного ответа хозяина. На паразитов родов *Giardia* и *Cryptosporidium*, которые в естественных условиях не встречаются у этого вида червей, реакция целомоцитов в эксперименте оказалась гораздо менее выраженной (Reinhart, Dollahon, 2003).

### Элеоциты

Элеоциты олигохет также представляют собой гетерогенную группу клеток. Роса (Rosa, 1896) ввел термин «элеоцит» для описания клеток, содержащих в цитоплазме крупные липидные капли. В более поздних работах для описания этого типа клеток также использовали термины «хлорагоциты» (или хлорагогенные клетки), «эргастопластические хлорагоциты». Вполне вероятно, что эти термины употребляли по отношению к разным стадиям дифференциации одной клеточной линии. Некоторые авторы называли хлорагогенными клетками элеоциты, прикрепленные к целомической выстилке кишечника, которые после открепляются и становятся свободными элеоцитами (Jamieson, 1981; Jamieson, 1992; Affar et al., 1998; Vetvicka, Sima, 2009).

Морфология элеоцитов может варьировать от овальных до округлых или продолговатых клеток с диаметром в диапазоне от 10 до 60 мкм. Большинство элеоцитов имеют в цитоплазме сферические гранулы и хлорагосомы – вакуоли, накапливающие различные вещества, в том числе липиды и полисахариды. Эти клетки отмечены у всех видов олигохет, изученных с этой точки зрения. В литературе практически не встречается расхождений при определении элеоцитов как отдельного типа целомоцитов. Разделение элеоцитов на подтипы обычно основано на размерных характеристиках и составе включений.

Элеоциты олигохет, как и амебоциты, дифференцируются из специализированных участков целомического эпителия (Jamieson, 1992; Affar et al., 1998). Для люмбрицид показано, что источником элеоцитов в первую очередь являются целомическая выстилка вокруг кишечника (т. н. хлорагогенная ткань) и выстилка крупных кровеносных сосудов (Рис. 3В), тогда как пул амебоцитов берет начало в участках целотелия стенки тела (париетального целотелия) и диссепиментов (Stein, Cooper, 1983).

Элеоциты играют роль в питании, выделении и поддержании осмотического баланса организма. Они участвуют в поддержании нормального уровня рН и баланса ионов в целомической жидкости (Prento, 1979; Affar et al., 1998). Элеоциты синтезируют внеклеточные дыхательные пигменты (Needham, 1966; Roots, Johnston, 1966; Fischer,

1977), накапливают вещества эндогенного происхождения, такие, как липиды, гликоген и в некоторых случаях мукополисахариды (Spicer, 1960; Roots, Johnston, 1966; Ireland, Richards 1977), и экзогенные вещества, в частности, металлы и токсины (Needham, 1966; Roots, Johnston, 1966; Prento, 1979).

Защитная роль элоцитов изучена слабо, и, по всей видимости, является весьма ограниченной. Эти клетки часто остаются неактивными в присутствии бактерий или других инородных частиц (Dales, Kalaç, 1992). Однако их поведение различается у разных видов: у представителей рода *Eisenia* они проявляют фагоцитарную активность, а у *Lumbricus* – нет. Основная роль элоцитов в иммунных реакциях заключается в синтезе некоторых антимикробных факторов (Valembois et al., 1982; Ville et al., 1995; Milochau et al., 1997), а также частичном участии в процессе инкапсуляции (Stein, Cooper, 1983; Valembois et al., 1992; Valembois et al., 1994). Кроме того, элоциты осуществляют детоксикацию организма, работая как «почки накопления» и изолируя токсичные вещества от остального организма (Cholewa et al., 2006; Lionetto et al., 2012).

### 2.2.2. *Polychaeta*

Среди целомоцитов полихет также можно выделить два основных типа: амeboциты и элоциты (Vetvicka, Sima, 2009). В целом изучение этой группы велось гораздо менее интенсивно.

#### **Амебоциты**

Амебоциты представляют самую большую и разнообразную субпопуляцию целомоцитов полихет. Судя по всему, этот тип клеток присутствует у всех видов полихет, изученных с этой точки зрения. У большей части видов они составляют основную часть популяции целомоцитов, а у некоторых видов их количество относительно невелико. Из всех изученных видов только у *Sabellaria spinulosa* амебоциты вообще не были отмечены (Dehorne, 1930). В одном из первых масштабных обзоров (Dales, Dixon, 1981) тип амебоцитов описывается как «относительно небольшие, слабо дифференцированные потенциально фагоцитирующие клетки». Однако морфологические черты этого типа клеток сильно различаются у представителей разных семейств полихет.

Так, обычным типом амебоцитов являются веретеновидные клетки с центрально расположенным овальным ядром и с пучками филаментов в цитоплазме. Веретеновидные амебоциты, содержащие небольшие пучки фибрилл, также встречаются в ранних описаниях целомоцитов *Perinereis cultifera* (Romieu, 1921). Дэрн (Dehorne, 1925)

описывал наличие фибрилл вокруг ядра у *Glycera convoluta* и *Nephtys* sp. и называл это явление «линомом», а сами клетки – «линоцитами».

Разными авторами начала XX столетия неоднократно описывались амебоциты разного размера и формы у представителей различных семейств полихет: у терребелиды *Eupolytnia nebulosa*, цирратулиды *Dodecaceria concharum*, nereиды *Perinereis marioni* и афродитиды *Aphrodite aculeata*. Эти амебоциты, как правило, имеют относительно небольшой размер (5-20 мкм), образуют псевдоподии и частично способны к фагоцитозу, например, как у *Perinereis macropus*, *Amphitrite johnstoni*, *Neoamphitrite figulus* (Dales, 1964) и *Hermodice carunculata* (Marsden, 1966). Цитоплазма этих клеток по данным авторов может быть эозинофильной с базофильными гранулами, гиалиновой, нейтрально окрашивающейся и т. д.

Для представителей семейства Nereidae амебоциты были описаны как «гранулоциты» из-за наличия в цитоплазме оптически плотных гранул (Baskin, 1974). Позднее термин «гранулоциты» стали употреблять и по отношению к целомоцитам представителей других семейств.

По предложенной для nereид классификации можно выделить пять подтипов гранулоцитов (амебоцитов). Они различаются такими морфологическими признаками, как форма клетки, наличие вакуолей и филаментов, размер гранул (Табл. 2; Рис. 4). Для представителей других семейств таких классификаций не существует. У одних и тех же видов полихет разными авторами выделялись разные типы амебоцитов. Поскольку в этих описаниях использованы различные методики и подходы к классификации клеток, произвести обобщение на уровне семейства не представляется возможным. Таким образом, единственной относительно общей классификацией амебоцитов полихет остается предложенная для nereид. Однако даже в рамках этой классификации отмечаются клетки «переходных» или «смешанных» форм, сочетающие в своей морфологии черты двух или более типов.

Некоторыми авторами был отмечен процесс быстрого перехода одного морфологического типа клеток в другой, например, в случае экспериментальной иммунизации животного – из неактивного веретенovidного состояния в активную амебоидную форму. У *Clymenella torquata* и *Euclymene oerstedii* этот процесс начинается с появления базофильных гранул вдоль фибрилл в веретенovidных клетках (Pilgrim, 1965).

Для некоторых видов полихет как отдельный тип описаны негранулярные амебоциты. Для *Nicolea zostericola* описано два типа амебоцитов, в которых на ультраструктурном уровне не выявляются гранулы (Eckelbarger, 1976).

Вопрос о взаимоотношениях выделенных на основе морфологии типов целомоцитов полихет остается открытым.

По всей видимости, так же, как и в случае олигохет, пул амебоцитов (гранулоцитов) берет начало в видоизмененных участках целомического эпителия в разных частях организма полихет (Рис. 3).

Для представителей Sabellidae как предположительный источник пула гранулоцитов описаны вытянутые отростки нефридиев (Sima, 1994). У представителей рода *Aphrodita* описаны «лимфоидные железы» – разрастания целомической выстилки сосудов (Fordham, 1925). У *Glycera* sp. в качестве участков, продуцирующих гранулоциты, описаны отдельные участки целомического эпителия стенки тела (париетального целома) (Sima, 1994). В аггломератах мезенхимальной ткани вокруг сосудов и нефридиев у nereid также предположительно происходит пролиферация амебоцитов или их предшественников (Dehorne, 1922). На гистологическом уровне процесс пролиферации амебоцитов из целомического эпителия стенки тела показан для *N. zostericola* (Eckelbarger, 1976), в остальных случаях о происхождении этих клеток только высказываются предположения.

Гранулоциты (амебоциты) полихет принимают наиболее активное участие в клеточных защитных реакциях. Они осуществляют фагоцитоз, инкапсуляцию, а также участвуют в устранении повреждений тканей (Vetvicka, Sima, 2009).

В литературных данных нет однозначного ответа на вопрос, все ли типы инородных тел у полихет подвергаются инкапсуляции. Ксеногенные объекты биологической природы, как правило, подвергаются инкапсуляции и разрушаются. С помощью экспериментов на представителях рода *Nereis* показано, что инкапсуляции подвергаются биологические мишени, в том числе собственные поврежденные ооциты и щетинки (Thomas, 1930). Деградировавшие ткани достаточно быстро разрушаются на более мелкие частицы и в итоге полностью лизируются. Искусственно внедренные в ходе эксперимента инородные мишени абиотической природы не всегда оказываются инкапсулированными. Так, используемые в качестве абиотического трансплантата латексные шарики у *Nereis diversicolor* подвергаются инкапсуляции, как любой органический материал. В то же время, пластиковые шарики, видимо, в силу своей инертной природы, у этого вида полихет не вызывают выраженной защитной реакции (Porchet-Henneré et al., 1987). Для других представителей полихет таких данных не существует.

Также для *N. diversicolor* в эксперименте показано, что в присутствии инородного тела у окружающих его клеток в вакуолях и аппарате Гольджи наблюдается активность феноксидазы. Отмечено, что в цитоплазме только одного типа клеток (гранулоциты типа II по классификации Baskin, 1974) содержится предшественник этого фермента (Porchet-Henneré, Vernet, 1992). Процесс инкапсуляции для *N. diversicolor* описан также на уровне ультраструктуры (Porchet-Henneré et al., 1987). Кроме того, с помощью моноклональных антител показано, что у этого вида гранулоциты III типа выполняют функцию распознавания чужеродного материала, а гранулоциты I и II типов формируют капсулу (Porchet-Henneré, 1990).

Процесс инкапсуляции паразитов у полихет различается в зависимости от типа паразита и видовой принадлежности хозяина. Исследования реакции организма полихет на многоклеточных паразитов немногочисленны. Факт инкапсуляции церкарий трематод отмечен у представителей рода *Poecilochaetus* (Dales, Dixon, 1981) и у *N. diversicolor* (Vivier, Henneré, 1964). Для *Serpula penicillus* и *Sabella spallanzanii* описан факт инкапсуляции паразитических копепод (Dales, Dixon, 1981).

Для полихет обычными полостными паразитами являются простейшие – грегарины и кокцидии. В ранних работах встречаются указания на способность таких паразитов сопротивляться иммунному ответу хозяина. Согласно этим описаниям, живые трофозоиты и зрелые цисты кокцидий и грегаринов (неуточненной видовой принадлежности) не подвергаются инкапсуляции (Caullery, Mesnil, 1898; Siedlecki, 1903).

Для паразитирующей в *N. diversicolor* кокцидии *Coelotropha durchoni* показано, что спорозоиты внутри спороцисты остаются живыми, если спороциста подвергается инкапсуляции (Vivier, Henneré, 1964; Porchet-Henneré, Berri, 1987).

Вышедшие из спороцисты спорозоиты проникают в клетки хозяина (элеоциты, мышечные клетки, эпителиальные клетки). После внутриклеточного периода роста клетки хозяина разрываются, и в полость целома выходят вегетативные стадии кокцидии. На этом этапе клетки *C. durchoni* становятся крупнее окружающих целомоцитов и могут быть подвержены реакции инкапсуляции. Механизм защиты от иммунного ответа хозяина заключается в формировании вокруг паразита плотной оболочки, состоящей из двух слоев внеклеточного вещества различного состава. Внутри этой оболочки паразит достигает половой зрелости. Оболочка вокруг зрелых гамонтов разрушается, они выходят в целом и после оплодотворения инцистируются. Если женский гамонт остался неоплодотворенным, он окружается гранулоцитами и подвергается инкапсуляции.

Судя по всему, защитная оболочка вокруг вегетативных стадий паразита синтезируется клетками хозяина и поэтому не распознается его иммунной системой как

чужеродный объект. Авторы предполагают, что на внутриклеточной стадии развития паразит адсорбирует определенные белки, принадлежащие хозяину. При выходе в целом эти маркеры привлекают окружающие целоциты и инициируют образование ими оболочки, при этом не вызывая реакции инкапсуляции (Porchet-Henneré, Dugimont, 1992).

Принцип этого защитного механизма, вероятно, сходен с описанным для многоклеточных паразитов беспозвоночных животных. В частности, для трематод из группы Plagiorchiida, паразитирующих в моллюсках, известно явление формирования протективной «мантии», состоящей из клеток хозяина, и защищающей паразита от иммунных атак (Galaktionov, Dobrovolskij, 2013).

### Элеоциты

Элеоциты – вторая по значимости популяция клеток в целоме полихет. Впервые элеоциты были описаны для олигохет (Rosa, 1896), позднее этот термин стал использоваться и для полихет. Хотя элеоциты описаны у представителей двух подклассов полихет – Errantia и Sedentaria, они не обнаружены у представителей семейств Arenicolidae, Glyceridae, Nephtyidae и Syllidae (Sima, 1994; Vetvicka, Sima, 2009). У представителей других изученных семейств (Nereidae, Terebellidae, Aphroditidae, Phyllodocidae и др.) элеоциты – самый часто встречаемый тип клеток в целомической жидкости. Это хорошо различимые, относительно крупные (около 40 мкм в диаметре) клетки неопределенной формы. Они содержат одну или несколько крупных вакуолей и запас липидов и гликогена. В литературе они часто описываются как негранулярные лимфоциты или трефоциты (Sima, 1994).

Относительно цитогенеза элеоцитов существует несколько точек зрения. Некоторые авторы предполагают, что они развиваются из амeboцитов после того, как последние активно фагоцитируют какой-то материал (Romieu, 1923; Dales, Dixon, 1981). У представителей семейства Terebellidae источником элеоцитов, возможно, служит соматический париетальный эпителий целома грудных и абдоминальных сегментов (Eckelbarger, 1976). Для Nereidae показано происхождение элеоцитов из целомического эпителия, покрывающего кровеносные сосуды в параподиях (Dhainaut, 1966). У *Perinereis cultrifera* описаны скопления элеоцитов вокруг кровеносных сосудов, которым авторы дали название «гемопозитической ткани» (Lunetta-D'Ancona, Russo, 1983). Авторы высказали предположение, что целомическая полость может обмениваться клетками с кровеносной системой. Это предположение имеет право на существование до тех пор, пока не ясна физиологическая роль разных типов клеток целомической жидкости.

Функции элеоцитов полихет изучены менее подробно, чем функции элеоцитов



олигохет. По всей видимости, роль элеоцитов в основном трофическая, а не защитная. Элеоциты часто бывают ассоциированы с созревающими ооцитами – видимо, они участвуют в обеспечении растущих яйцеклеток питательными веществами. У некоторых nereid во время полового созревания элеоциты самок претерпевают морфофункциональную трансформацию, накапливая запасные вещества (Sima, 1994). Поскольку у мужских особей этого не происходит, можно предположить, что элеоциты могут быть вовлечены в процесс вителлогенеза. Для *N. diversicolor* с помощью моноклональных антител к вителлогенину (предшественнику белков, составляющих желток ооцитов) показано, что вителлогенин содержится только в элеоцитах и ни в каких других типах целомоцитов (Bonnier et al., 1991). Синтез вителлогенина в элеоцитах показан также для *Nereis virens* (Garcia-Alonso et al., 2005).

Вакуоли элеоцитов nereid иногда содержат мышечные фибриллы, находящиеся на разных стадиях переваривания (Dhainaut, 1966; Schroeder, 1967). Существует предположение, что эти клетки вовлечены в фагоцитоз свободных фибрилл — сарколитов, которые в норме присутствуют в целомической жидкости. Видимо, сарколиты отделяются от мускулатуры стенки тела, которая подвергается гистолизу в течение поздних стадий репродуктивного созревания гамет (Defretin, 1949). Накопленные запасные вещества элеоцитов в последствии также используются ооцитами (Dhainaut, 1966). Таким образом, устранение остатков поврежденной ткани в данном случае является не столько защитной, сколько трофической опцией (Dhainaut, Porchet-Henneré, 1988). Интересно, что элеоциты действуют как макрофаги и избирательно поглощают только отдельные сарколиты, не трогая другие клетки. Скорее всего, их иммунная функция сильно ограничена.

### **Эритроциты**

Третий клеточный тип составляют гемоглобин-содержащие клетки, названные эритроцитами. Они найдены у представителей семейств Capitellidae, Cirratulidae, Glyceridae и Opheliidae и обнаруживаются исключительно в целомической полости (Goodrich, 1898). Показано, что эритроциты представителей этих семейств способны к активному фагоцитозу. В отличие от элеоцитов, они фагоцитируют в основном чужеродный материал и делают это не избирательно. Но защитная функция, судя по всему, для них тоже не является основной. Цитогенез этих клеток неизвестен и с большой вероятностью значительно различается у разных видов полихет (Vetvicka, Sima, 2009).

Для представителей семейств Sabellidae, Terebillidae и Arenicolidae показано, что клетки целомической выстилки сосудов синтезируют и накапливают гемоглобин,

который после проникает через базальную пластинку в полость сосуда (Dales, Pell, 1970). Однако эти клетки не выходят в целомическую полость и связаны непосредственно с кровеносной системой. Клеточные элементы крови в описанных случаях не связаны с синтезом гемоглобина, и их функция неясна.

В существующих описаниях эритроцитов присутствует некоторая терминологическая неопределенность: гемоглобин-содержащие клетки могут называться гемоцитами, красными целомоцитами, клетками крови. Остается неясным, имеют ли отношение эти описанные типы клеток к кровеносной системе или к целому. Кроме того, термин «гемопоз» часто употребляется в значении «цитогенез гемоцитов (клеток крови)», но в некоторых случаях авторы описывают этим термином непосредственно функцию синтеза гемоглобина определенными клетками (Dales, Dixon, 1981; Lunetta-D'Ancona, Russo, 1983).

Выделение эритроцитов в качестве отдельного типа целомоцитов полихет при существующей отрывочности данных и отсутствии четко определенных терминов представляется спорным.

Таким образом, в пределах группы полихет морфология и функциональная нагрузка целомоцитов одного типа может значительно различаться у представителей разных семейств. Вопрос о взаимоотношениях разных клеточных линий в пределах популяции целомоцитов до сих пор не решен, как и вопрос цитогенеза и дифференцировки этих линий. Важно отметить, что факт отличия состава клеток крови от целомоцитов все еще вызывает сомнения (Dales, Dixon, 1981; Vetricka, Sima, 2009).

Элециты не описаны для представителей семейства Arenicolidae. Для пескожила *A. marina* Дейлс и Диксон (Dales, Dixon, 1981) выделили пять типов амебоцитов: ювенильные, гранулярные, вакуолизированные, «веретенovidные» и «шнуровидные». Ювенильные клетки – мелкие недифференцированные клетки с большим ядром. Гранулоцитами авторы назвали мелкие амебоциты с гранулами в цитоплазме, образующие псевдоподии. Наличие гранул было обнаружено авторами при анализе данных трансмиссионной микроскопии, а не с помощью гистологических окрашиваний. Клетки с длинными отростками Дейлс и Диксон обозначили как «шнуровидные», а «веретенovidные» клетки в их описании сходны с вытянутыми клетками с прозрачной цитоплазмой. При этом на ультраструктурном уровне в веретенovidных амебоцитах было отмечено скопление микрофиламентов вокруг ядер, что косвенно подтверждает связь этого типа клеток с клетками с длинными отростками («шнуровидными»).

Согласно другой классификации (Персинина, Чага, 1994), целоמוциты пескожила делятся на шесть типов: ювенильные клетки, молодые, средние и зрелые амебоциты (веретеновидные клетки), эозинофилы и гранулоциты. Эта классификация основана в первую очередь на гистологических окрашиваниях. Выделение молодых, средних и зрелых веретеновидных амебоцитов описывает в основном размерные характеристики клеток. При этом авторы отмечают, что в цитоплазме веретеновидных клеток, независимо от их размера, встречаются вакуоли, фагосомы и мелкие гранулы, часть которых окрашивается акридиновым оранжевым, что указывает на их лизосомальную природу.

Отдельно авторы описывают эозинофильные клетки, которые могут иметь округлую или веретеновидную форму. Их цитоплазма интенсивно окрашивается эозином и акридиновым оранжевым. Ядра этих клеток палочковидные, кроме того, попадаются двудерные формы с плотно упакованным хроматином. Эозинофилы составляют не более 2% клеточной популяции и, по утверждению авторов, представляют собой деградирующие клетки, вставшие на путь апоптоза. Гранулоциты в этой классификации – это клетки диаметром до 20 мкм с резко эозинофильными гранулами в цитоплазме. Хроматин в ядрах этих клеток деконденсирован. Гранулоциты встречаются относительно редко и не попадают на постоянных препаратах. Дейлс и Диксон этот тип клеток не отмечали.

В ранних исследованиях отмечался переход целоמוцитов пескожила из одной формы в другую при изменении физиологического статуса (Faure-Fremiet, 1925). Согласно этим данным, при индукции фагоцитоза веретеновидные целоמוциты могут переходить в округлую форму и распластываться на субстрате. При этом их цитоскелет частично разрушается, а в цитоплазме появляются гранулы. Персинина с соавторами (1998) провели специальное исследование цитоскелета веретеновидных клеток и сделали вывод, что в этих клетках в особой форме запасается фибриллярный актин, что позволяет быстрые перестройки цитоскелета и переход к амебоидному движению.

### 2.2.3. *Hirudinea*

Несмотря на то, что пиявки в целом сохраняют общий план строения всех кольчатых червей, приобретенные вследствие особенностей образа жизни модификации значительным образом отличают их от других представителей аннелид. Сложная связь различных систем органов затрудняет определение принадлежности некоторых клеточных компонентов к той или иной системе. Цитология пиявок долгое время не привлекала внимания исследователей, поэтому сведения о происхождении и функциях свободных

клеток их полости тела на данный момент фрагментарны. С этой точки зрения изучено всего несколько видов пиявок.

Свободные клетки гемоцеля подразделяются, как правило, на амебоциты (также у пиявок их называют лейкоцитами или лимфоцитами) и хлорогенные клетки (Vetvicka, Sima, 2009). Амебоциты пиявок обычно имеют относительно однородную морфологию и схожие размеры (Sawyer, Fitzgerald, 1981). Амебоциты могут находиться в полостной жидкости в свободном состоянии или могут быть прикреплены к стенке тела. Гипотезы происхождения амебоцитов пиявок, как правило, спекулятивные. Есть вероятность, что у некоторых видов *Glossiphoniidae* в продукции свободных целомических клеток играет роль ботридиальная ткань, выстилающая лакуны и сосуды (de Eguileor et al., 2001).

Для пиявок показано активное участие амебоцитов в заживлении ран (de Eguileor et al., 1999). У *Glossiphonia complanata* (Linnaeus, 1758) с помощью человеческих моноклональных антител выделили три функциональные субпопуляции амебоцитов – макрофаг-подобные, НК-подобные (natural killer cells) и гранулоциты (de Eguileor et al., 2000). Они отличались морфологией и поведением в ответ на экспериментальные индукторы иммунного ответа. Макрофаг-подобные клетки подвижны и активно фагоцитировали бактерии, а также участвовали в процессе инкапсуляции и меланизации капсулы. НК-подобные клетки показывали литическую активность при плотном контакте мембраны с чужеродным материалом. Гранулоциты типа I, с мелкими гранулами округлой формы, в эксперименте реагировали на массовое заражение бактериями. При переходе в функциональное состояние у этих клеток происходила дегрануляция. По всей видимости, эти гранулы являются местом накопления антибактериальных факторов. В отличие от других аннелид, у пиявок нет обширной целомической полости, поэтому накопление активных веществ внутриклеточно более эффективно, чем накопление в плазме целомической жидкости. Гранулоциты типа II, с плотными гранулами неправильной формы, реагировали на присутствие крупных инородных тел. При попадании в полость тела пиявки паразитов (видов плоских червей, которые паразитируют в пиявках в естественных условиях) эти клетки реагировали дегрануляцией и окружали паразита плотным слоем.

Иммуноцитохимические и ультраструктурные методы продемонстрировали наличие трех основных типов целомоцитов у *Theromyzon tessulatum* (O.F. Müller, 1774): хлороцитов, гранулярных и негранулярных амебоцитов (Lefebvre et al., 2008).

Хлорогенные клетки пиявок имеют различный размер. Их морфологические признаки сходны с таковыми элоцитов олигохет. По всей видимости, источником этого

типа клеток являются определенные участки гемоцеломического эпителия (Ока, 1894). Также предположительным сайтом пролиферации хлороцитов могут быть участки целотелия, связанного с нефридиями (Abeloos, 1925). Определенных данных о функциональности этих клеток нет.

Для *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 описан отдельный тип клеток, встречающийся только в крови, но не в целомической жидкости. Эти клетки морфологически сходны с гиалиновыми амебоцитами олигохет. Они оказались иммуноактивны и участвовали в защитных реакциях: фагоцитировали бактерии, осуществляли синтез меланинового пигмента в присутствии инородных тел, продуцировали три типа антимикробных пептидов. Кроме того, клетки крови пиявки принимали активное участие в восстановлении поврежденных нервных волокон и регулировали процесс заживления с помощью синтеза нейротрофических факторов (Boidin-Wichlacz et al., 2012). Судя по всему, у разных видов пиявок свободные клетки могут иметь отношение к разным тканям (Vetvicka, Sima, 2009).

#### 2.2.4. Общие для разных групп аннелид типы целомоцитов

Информация о составе и функциях популяции целомоцитов представителей разных групп аннелид неоднородна. Число выделяемых разными авторами типов целомоцитов значительно варьирует даже в пределах одного семейства. Описания состава популяции целомоцитов того или иного вида часто фрагментарны. Многие данные требуют обновления или подтверждения с помощью современных методов. В частности, данные о разнообразии гемоцитов, их функциональности и возможной связи с целомом отрывочны и практически не обновлялись с прошлого века.

На основании имеющейся информации можно выделить только два общих для разных представителей таксона аннелид морфофункциональных типа целомоцитов: «амебоциты» и «элециты». Судя по всему, эти два термина являются наиболее универсальными из всех предложенных и могут быть употреблены при описании множества форм целомоцитов в пределах разных групп аннелид (Табл. 3).

Амебоциты представляют самую разнообразную группу клеток, внутри которой возможна максимально дифференцированная классификация на основании морфологических признаков. При этом вопрос взаимоотношений между выделенными типами амебоцитов остается открытым даже для отдельных видов.

Основная функция амебоцитов – участие в защитных реакциях: заживлении ран, фагоцитозе и инкапсуляции чужеродных объектов. У наиболее подробно изученных с этой точки зрения видов аннелид наблюдается тенденция разделения функциональной нагрузки между разными типами амебоцитов, однако у большинства видов связь функций и морфологии этих клеток недостаточно изучена.

Элециты разных представителей аннелид морфологически более сходны между собой. Скорее всего, внутренняя неоднородность этого типа клеток связана с присутствием в целомической жидкости разных стадий дифференциации одной клеточной линии.

Основными функциями элецитов являются трофическая, транспортная, накопительная. Судя по всему, защитная функция этих клеток ограничена и заключается в частичном участии в процессе инкапсуляции и синтезе некоторых антимикробных факторов.

Цитогенез обоих типов целоцитов связан, по всей видимости, со специализированными участками целомического эпителия. Интересно, что помимо общих для олигохет и полихет сайтов пролиферации целоцитов (Рис. 3) исследователи отмечали и различные (Табл. 4). Так, гистологическая общность элецитов с хлорогенной тканью представляется очевидной для олигохет, но не для полихет. В то же время предположение о дифференциации элецитов из фагоцитирующих амебоцитов высказывалось только в отношении полихет.

Целоциты пиявок описываются по аналогии с целоцитами представителей других групп аннелид. Отмеченные у пиявок амебоциты и элециты (хлороциты) морфологически схожи с аналогичными типами клеток олигохет. Однако информации о сходстве или различии в функциональности целоцитов пиявок и олигохет, очевидно, недостаточно. Сложная связь различных систем органов пиявок также затрудняет определение принадлежности некоторых клеточных компонентов к той или иной системе. В целом пиявки остаются наименее изученной в этом отношении группой аннелид.

### **2.3. Иммуно-ассоциированные молекулы аннелид и других беспозвоночных животных**

В современных исследованиях все чаще появляются сведения о молекулярной природе тех или иных механизмов иммунного ответа. Группа аннелид рассматривается в контексте эволюционно-физиологического подхода как одна из ключевых групп лоботрохозойных животных.

Известные для беспозвоночных животных гуморальные факторы в целом делятся на две функциональные группы: факторы распознавания антигенов (рецепторы) и эффекторные иммунные факторы (лизирующие, агглютинирующие и т.д.). В пределах группы аннелид наиболее изученными остаются модельные объекты – виды семейства Lumbricidae. Для них описан ряд как рецепторных, так и эффекторных факторов иммунитета. В целом, информация о молекулярных основах иммунитета беспозвоночных обрывочна, поэтому при изучении немодельных объектов современные исследователи опираются на сведения о группах белков, описанных для разных таксонов беспозвоночных, но имеющих подтвержденную функциональность, связанную с иммунными реакциями.

### *2.3.1. Система прото-комплемента*

Вопрос «специфичности» реагирования беспозвоночных животных активно дискутируется в последние годы. До появления доказательств наличия у беспозвоночных разнообразных молекулярных механизмов иммунитета было принято считать их иммунное реагирование «неспецифическим», то есть, принципиально отличающимся от реагирования позвоночных животных. Адаптивная иммунная система высших позвоночных функционирует за счет вариабельности рецепторов распознавания главного комплекса гистосовместимости, с одной стороны, и огромного разнообразия функциональных антител с другой. Специфичность иммунного реагирования сопряжена с механизмом формирования иммунной памяти, позволяющим реагировать эффективнее на повторную встречу с антигеном. Оказывается, иммунные системы беспозвоночных имеют не менее разнообразный набор как распознающих рецепторов, так и эффекторов. Разнообразие этих молекул может достигаться как за счет вариативности кодирующих генов, так и за счет трансляционных и пост-трансляционных процессов. Регуляция белков уже после их синтеза может обеспечивать наличие гораздо большего разнообразия форм, чем обеспечивает вариабельность кодирующих генов (Schulenburg et al., 2007). В частности, у беспозвоночных разных групп обнаруживают молекулярные механизмы, действующие как аналог системы комплемента позвоночных. Эти механизмы получили название «системы прото-комплемента» и активно изучаются (Gorbushin, 2018).

Комплемент-подобные системы беспозвоночных животных основаны на членах семейства тиоэфир-содержащих белков (Thioester-Containing Proteins, TEP). При активации структурный тиоэфирный мотив TE связывается с ближайшими доступными гидроксильными и аминогруппами, которые присутствуют на всех биологических поверхностях, включая патогены (Dodds, Ren et al. 1996, Shokal, Eleftherianos, 2017). Гипотетическая первичная система прото-комплемента содержит минимальный набор

ТЕР-ассоциированных молекул, необходимых для амплификации ТЕР, опсонизации антигенов-мишеней и их фагоцитоза. Основные участники системы прото-комплемента присутствуют у книдарий: это член семейства ТЕР белок С3, сериновая протеаза С2/фактор В (Bf) и рецепторы комплемента (CR) (Gorbushin, 2018). Вероятно, возникновение этого молекулярного каскада связано с внутриклеточным пищеварением, подразумевающим захват частиц пищи с помощью фагоцитоза. В гастродерме у Cnidaria подавляющее большинство клеток является активными фагоцитами (Hartenstein, Martinez, 2019). Гипотетически, дальнейшее развитие мезодермы и целомической полости у Protostomia и Deuterostomia позволило сделать следующий шаг в эволюции системы прото-комплемента. Возникновение целомической жидкости с многочисленными подвижными целомоцитами вызвало появление специфического комплекса секреторных распознающих молекул. Первыми из таких молекул, по всей видимости, были члены семейства C1qL и/или C1qDC, составляющие «древний» иммунный комплекс, связанный с функционированием ТЕР. После этого комплекс развивался независимо в разных эволюционных линиях; расширялся специфический репертуар этих распознающих молекул и приобретались новые эффекторные механизмы (Gorbushin, 2019). У аннелид состав системы прото-комплемента остается неизученным, большая часть имеющихся данных получена на моллюсках и насекомых.

### *2.3.2. Лектин-подобные молекулы*

Распознавание патогенных микроорганизмов у аннелид, как и у других животных, происходит за счет набора специализированных паттерн-распознающих рецепторов (pattern recognition receptors, PRRs). Эти рецепторы распознают консервативные молекулярные паттерны, свойственные большим группам микроорганизмов. Далее распознающие рецепторы запускают консервативные пути сигналинга, контролирующие экспрессию иммунно-ассоциированных генов (Bilej et al., 2018).

У беспозвоночных животных в качестве PRR часто выступают лектины – крайне разнообразные белки, специфически реагирующие с углеводными лигандами (Locker, 2010). Наличие ряда характерных доменов в первичной структуре белков позволяет отнести их к иммунно-ассоциированным лектинам.

Отличительной чертой домена C1q является его способность связывать разнообразные лиганды, включая углеводные остатки (Kishore, Gaboriaud et al. 2004, Gaboriaud, Frachet et al. 2011). Недавно было показано, что C1qL-архитектура широко распространена у лофотрохозой, таких как моллюски, брахиоподы, немертины и аннелиды, и была выдвинута гипотеза, что эти белки являются частью античного каскада



комплемента (Gorbushin, 2019). Лектин-подобные свойства белков C1qDC были описаны у брюхоногих (Gerlach, Schlott et al. 2004) и двустворчатых моллюсков (Zhang, Song et al. 2008, Gestal et al. 2010, He, Zhang et al. 2011, Li, Yu. et al.2011, Wang, Kong et al.2012, Xu, Xie et al.2012, Yang, Wei et al.2012, Allam et al.2014, Liu, Xiang et al.2014, Gerdol et al. al.2015). У двустворчатых моллюсков семейство генов C1qDC представлено очень широко: количество кодирующих такие белки генов в их геномах и транскриптомах достигает нескольких сотен (Gerdol et al., 2019).

Лектины С-типа представляют собой гетерогенную группу белков, характеризующихся наличием домена CLECT, часто соединенного с другими консервативными структурными мотивами (Zelensky, Gready 2005). Одним из хорошо описанных CLECT является секреторный коллагеновый лектин (MBL), связывающий маннозу – элемент распознавания лектинового пути системы комплемента человека. У лофотрохозойных животных не обнаруживается ортологов MBL, но у них широко распространены два гомологичных структурных мотива CTLDC1 и CTLDC2 (Gerdol et al. 2018, Gorbushin 2019). У двустворчатых моллюсков лектины С-типа действуют как PRR. Было показано, что у *Chlamys farreri* экспрессия CTLDC-содержащего белка CfLec-1 увеличивается после экспериментального заражения бактерией *Vibrio anguillarum* (Wang, Song et al., 2007). Четыре белка из группы CTLDC2 в гемоцитах *Crassostrea gigas* также демонстрировали повышенную экспрессию в течение дня после экспериментальной стимуляции липополисахаридом (LPS) *E. coli* (Wang, Zhang et al., 2017).

Галектины – члены суперсемейства белков, несущих углевод-распознающий домен GLECT. Галектины специфически связываются с остатками β-галактозидов и обладают металл-ион-независимой функциональностью (Leffler, Carlsson et al. 2002). Информация о функционировании галектинов у лофотрохозойных животных ограничена: несколько исследований было выполнено на моллюсках *Crassostrea virginica* (Tasumi and Vasta 2007) и *Biomphalaria glabrata* (Yoshino, Dinguirard et al. 2008 г.). Имеющаяся информация о характере связывания патогенов позволяет предположить, что галектины моллюсков действуют как PRR.

Один из известных для аннелид PRR был описан для *Eisenia andrei* под названием «целомический цитолитический фактор (CCF)» (Beschlin et al. 1998). Этот рецептор распознает микробные паттерны широкого спектра, в частности, О-антиген липополисахаридов (LPS) Грам-отрицательных бактерий, мураминовый дипептид клеточной стенки Грам-положительных бактерий и глюканы дрожжей. Связывание CCF с патогенными паттернами запускает активацию каскада профенолоксидазы, что приводит

к образованию цитотоксических и антимикробных соединений. Активнее всего этот фактор экспрессируется в целоמוцитах и тканях кишечника (Bilej et al., 2018). CCF агглютинирует как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии, участвует в клеточно-опосредованных цитотоксических реакциях и активирует литическую активность целомиической жидкости против эритроцитов различных видов позвоночных (Bilej et al. 1995, Beschin et al., 1998, Bilej et al. 2010).

Единственный экспериментально охарактеризованный в целоמוцитах и целомиической жидкости *A. marina* лектин – AML-1, относящийся к семейству хитин-связывающих лектинов (Vitashenkova et al., 2012). AML-1 представляет собой PRR, специфично реагирующий на ацетильные группы. Он вызывает агглютинацию эритроцитов кролика, которая может подавляться N-ацетилированными сахарами, LPS из *Salmonella minnesota* и некоторыми штаммами *E. coli*.

### 2.3.3. Toll-like рецепторы

Toll-like рецепторы (TLR) давно известны как иммуно-ассоциированные PRR, которые могут распознавать бактерии, грибы и экзогенные нуклеиновые кислоты (Akira et al., 2006; Kawai, Akira 2007). По своей архитектуре они разделяются на V-TLR («vertebrate-like») и P-TLR («protostome-like»).

Первый TLR, описанный для олигохет *Eisenia andrei*, EaTLR, показывает самую высокую конститутивную экспрессию в пищеварительном тракте червя. При этом экспрессия гена EaTLR в целоמוцитах значительно увеличивается после заражения грамположительными бактериями (Škanta et al. 2013).

Исследование генов Toll-like рецепторов в геномах полихеты *Capitella capitata* и пиявки *Helobdella robusta* выявило 105 TLR-связанных генов у *Capitella* и 16 у *Helobdella* (Davidson et al. 2008). При этом кодирующие последовательности *C. capitata* имеют характерное для V-TLR строение и сходны между собой. Рецепторы *H. robusta* P-типа и сильно отличаются друг от друга по строению.

Судя по всему, не все гены TLR экспрессируются в иммунных клетках. Например, из 83 TLR, идентифицированных в геноме двустворчатых моллюсков *C. gigas*, только 78 экспрессировались в гемоцитах и только 19 показывали дифференцированную экспрессию в ответ на иммунизацию патогенами (Zhang et al., 2015).

### 2.3.4. Агглютинирующие, лизирующие и антимикробные молекулы

Эффекторные иммунные факторы обнаруживаются как в плазме целомиической жидкости аннелид, так и в целоמוцитах, а иногда и в других тканях и органах. Описаны агглютинирующие, лизирующие и антимикробные факторы. При проведении

экспериментов с гуморальными факторами аннелид и других беспозвоночных в качестве антигена часто используют эритроциты млекопитающих, поэтому в литературе выделяют отдельные типы гемагглютининов и гемолизинов, регистрируемых в таких экспериментах.

Агглютинины принимают участие в реакциях фагоцитоза, маркируя патогены и иницируя таким образом клеточную защитную реакцию. Агглютинины могут иметь лектиновую природу и одновременно выполнять функцию PRR, а также могут быть индуцибельными эффекторными молекулами, синтез которых запускается после контакта с патогеном.

У *L. terrestris* целомическая жидкость в норме содержит агглютинины, реагирующие на эритроциты и на некоторые бактериальные штаммы. При введении антигенов в целомическую полость концентрация агглютининов значительно повышается в течение 24 часов. У *E. fetida* показано, что при контакте с антигеном хлорагоциты высвобождают хлорагосомы, которые имеют агглютинирующую активность (Dhainaut, Scaps, 2001).

Среди полихет агглютинины обнаружены у *Nereis virens* (Russel et al. 1983; Lai et al. 1989). Были выделены три типа гемагглютининов: чувствительные к температуре гликопротеины, нечувствительные липидные агглютинины и протеогликаны большой массы, нечувствительные к двухвалентным катионам.

Цитолитические порообразующие белки - мощные противомикробные и противопаразитарные молекулы. Ярким примером являются перфорины, секретируемые цитолитическими лимфоцитами у млекопитающих, которые токсичны как для микроорганизмов, так и для аберрантных клеток организма-хозяина, таких как раковые или инфицированные вирусом клетки (Hadders et al. 2007, Rosado et al. 2007). Порообразующие молекулы также могут играть роль в атрофии провизорных органов и сезонной резорбции гонад у долгоживущих беспозвоночных.

Среди представителей Lophotrochozoa широко распространены белки, содержащие домен аэролизина (Pinaud et al., 2021) и белки, содержащие домен MACPF (Gorbushin, 2016): обе эти группы белков являются активно цитолитическими. Кроме того, к известным порообразующим токсинам (PFT) относятся колицины, актинопорины, колупорины и некоторые другие группы молекул (Peraro and van der Goot, 2016).

Гемолизины зарегистрированы как у олигохет, так и у полихет. Целомическая жидкость олигохет содержит кальций-магний-независимые гемолизины. Для олигохет *Eisenia fetida* описаны специфичные порообразующие антимикробные белки, имеющие

гемолитическую активность: фетидин (Procházková, Silerová et al. 2006, Dvořák, Mančíková et al. 2013) и лизенины (Shogomori and Kobayashi 2008, Sukumwang and Umezawa 2013). У *E. fetida* гемолитическая активность плазмы не ингибируется ЭДТА (Roch et al. 1981). Кроме того, у люмбрицид лектин CCF также обладает литической активностью.

В то же время, у восьми видов полихет из разных семейств (*Nainereis laevigata*, *Orbinia cuvieri*, *Cirriiformia tentaculata*, *Notomastus latericeus*, *Arenicola claparedii*, *Petaloproctus terricola*, *Marphysa sanguinea*, *Nereis* sp.) гемолизины термолабильны и зависимы от двухвалентных катионов (Roch et al., 1990).

Антимикробные пептиды (AMP) аннелид – разнообразная группа молекул, выполняющих бактериостатическую или антибактериально-литическую функцию. Такие пептиды обнаружены у *E. fetida*, *Lumbricus rubellus* (Bilej et al., 2010).

Антибактериальным действием также обладает лизоцим – бактериолитический фермент, специфическим образом гидролизующий клеточную стенку Грам-положительных бактерий. У люмбрицид он обнаруживается как в целомоцитах, так и в плазме целомической жидкости (Bilej et al., 2010). У полихеты *Nereis diversicolor* лизоцим в норме обнаруживается только в гранулоцитах, но появляется в целомической жидкости в течение 24 часов после введения в целомическую полость бактерий (Lassalle et al. 1988). Лизоцимная активность также отмечена в тканях пиявок: *Herpobdella octoculata*, *Hemopsis sanguisuga* и *Hirudo medicinalis* (Dhainaut, Scaps 2001).

Для *Arenicola marina* описаны антимикробные пептиды – ареницины (Maltseva et al., 2014; 2016). Ареницины представляют собой небольшие (21 аминокислотный остаток) AMP, впервые выделенные из целомоцитов *A. marina* и охарактеризованные почти два десятилетия назад (Ovchinnikova et al., 2004, Lee, Kang et al. 2007, Ovchinnikova et al., 2007, Sandvang et al., 2008, Maltseva et al., 2014, Berlov, Maltseva 2016). Подобно другим известным AMP полихет, таким, как альвинеллацин, никомицины и недавно описанный капителлацин (Panteleev et al., 2020), ареницины производятся из более крупной молекулы-предшественника, содержащей сигнальный пептид. Ареницины имеют описанную антибактериальную активность, в первую очередь против Грам-отрицательных бактерий (Elliott et al., 2020).

С распознаванием и иммунным ответом против бактерий также связано семейство белков LBP/BPI (LPS-binding proteins/bacterial permeability increasing proteins), которые могут действовать как AMP (Krasity, Troll et al. 2011). Это паралогичные секреторные белки, вовлеченные во врожденный иммунный ответ. Цитотоксичность BPI ограничивается Грам-отрицательными бактериями, что отражает их высокое сродство к

бактериальному LPS. Связывание BPI с живыми бактериями через LPS вызывает немедленную остановку их роста. После происходит повреждение внутренней мембраны бактериальной клетки (Elsbach, 1998). LBP вовлечен в работу каскада Toll-like рецепторов. У *Eisenia andrei* экспрессия гена LBP/BPI активируется в ответ на бактериальную стимуляцию, достигая максимума через 8-16 часов после стимуляции (Škanta et al., 2016).

#### 2.3.5. Кислород-зависимые и фенолоксидазные эффекторные механизмы

Активные формы кислорода (ROS), реактивные промежуточные соединения кислорода (ROI) и реактивные промежуточные соединения азота (RNI) продуцируются иммунными клетками в ответ на заражение бактериями и грибами (Bogdan, 2001; Nathan, Ding, 2010). Так называемый «респираторный взрыв» – продукция ROS и ROI в ходе иммунного ответа – осуществляется работой разнообразного семейства NADPH-оксидаз (NOX) и цитохрома b, которые имеют различное тканевое распределение и механизмы активации (Panday et al., 2015). Это сложная и филогенетически консервативная система молекулярных каскадов. Результат ее функционирования может заключаться в непосредственном повреждении клеток патогенов, а также в некоторых случаях в индукции апоптоза собственных клеток-фагоцитов, захвативших чужеродный материал. При активации респираторного взрыва также активируются защитные антиоксидантные механизмы, которые позволяют ограничить действие сильных токсичных радикалов и защитить окружающие ткани от собственного иммунного ответа. В исследованиях иммунитета беспозвоночных внимание часто уделяется ряду таких молекул: каталаза служит для защиты клеток от токсического воздействия перекиси водорода; супероксиддисмутаза защищают внеклеточное пространство от токсического действия ROI путем преобразования супероксидных радикалов в перекись водорода и кислород; пероксидазы обладают функцией расщепления перекиси водорода (Fattman et al., 2003) (Takeuchi et al., 1995). Оксид азота (NO), который считается одним из наиболее важных RNI, вырабатывается окислительным механизмом, включающим катаболизм L-аргинина (Bogdan, 2001). Синтаза оксида азота (NOS) – фермент, который отвечает за продукцию NO, присутствует у большинства беспозвоночных животных в виде только одного гена (Andreakis et al., 2010).

Фенолоксидазный (PO) каскад часто фигурирует в обсуждении иммунных механизмов беспозвоночных. Меланизация с использованием фенолоксидазного каскада является ключевым иммунным механизмом у членистоногих. У насекомых эта реакция происходит очень быстро и является одной из первых форм ответа на повреждение покровов и инвазию патогенов. Данные о наличии PO каскада у других групп

беспозвоночных иногда носят противоречивый характер. У моллюсков наблюдается процесс меланизации в качестве иммунной реакции, но он происходит на порядки медленнее, чем у членистоногих. Наличие «коричневых телец», которые формируются в целомической полости кольчатых червей после инкапсуляции или активного бактериального заражения, часто связывали именно с меланизацией, однако конкретных подтверждений химической природы коричневого пигмента в этих образованиях практически не имеется. Активность фенолоксидазы у кольчатых червей была идентифицирована биохимически для полихеты *Nereis diversicolor* (Porchet-Henneré, Vernet, 1992) и дождевого червя *Eisenia fetida* (Procházková et al., 2006). В частности, активация РО-каскада была описана у дождевых червей как часть иммунного ответа на апикомплексных паразитов (Prochazkova et al., 2019). Однако биохимически активные ферменты РО не были обнаружены у полихет *A. marina* и *Aphrodite aculeata* (Smith, Söderhäll, 1991).

Ферменты РО являются последним компонентом реакционного каскада, который запускается при распознавании патогенов. Предшественники РО – проРО-ферменты подвергаются действию сериновых протеаз для перехода в активную форму. Затем активные РО превращают фенольные или аминовые соединения в дофахром и меланин. Короткоживущие промежуточные продукты этих реакций токсичны для клеток патогенов, а получающийся в итоге меланин физически инкапсулирует их. Кроме того, промежуточные продукты реакции меланинового пути участвуют в процессе заживления ран путем образования ковалентных связей в поврежденных тканях, что приводит к склеротизации (Le Clech et al., 2016).

РО – это медьсодержащие ферменты (Kim, Uyama, 2005), которые разделяются на три группы в зависимости от их структурной и субстратной специфичности: тирозиназы катализируют гидроксирование монофенолов и окисление о-дифенолов, катехолазы окисляют о-дифенолы и лакказы окисляют о-дифенолы, р-дифенол и р-диамины (Walker, Ferrar 1998, Le Clec'h, Anderson et al. 2016). Использование в ранних работах неспецифических субстратов, которые могут быть использованы не только этими ферментами, частично объясняет противоречивость полученных данных. Кроме того, известно, что РО-подобная тирозиназная активность может быть обеспечена структурно близкими гемоцианинами – медьсодержащими дыхательными пигментами некоторых моллюсков и членистоногих (Cerenius et al., 2008; Coates, Decker, 2017).

### 2.3.6. Белковый гомеостаз иммунных клеток

Для поддержания гомеостаза клеточных белков, или протеостаза, в клетках прокариот и эукариот существует комплексная и адаптивная система, контролирующая весь жизненный цикл белка: синтез, сворачивание, поддержание его правильной конформации, необходимого количества, субклеточную локализацию, а также деградацию.

Убиквитин-протеасомная система (УПС) на данный момент позиционируется как один из основных протеолитических путей в клетке. Считается, что УПС ответственна за приблизительно 80–90% клеточного протеолиза, в зависимости от физиологических состояний и типа клеток (Hershko, Ciechanover, 1998; Kwon, Ciechanover, 2017).

Убиквитин-протеасомная система является основным механизмом деградации короткоживущих, неправильно свернутых, поврежденных, а также завершивших свою функцию белков. УПС активно участвует в клеточной передаче сигналов, транскрипции, а также в других клеточных функциях, таких как продвижение по клеточному циклу, пролиферация, апоптоз (Bard et al, 2018).

Протеасома является эволюционно древним протеолитическим комплексом, который в разных формах присутствует у бактерий, архей, животных и растений. Базовая, или коровая, 20S протеасома прокариот и эукариот состоит из 28 субъединиц. У прокариот протеасома содержит 14 копий идентичных  $\alpha$ -субъединиц и 14 копий идентичных  $\beta$ -субъединиц. Протеасома эукариот содержит по 2 копии 7 разных  $\alpha$ -субъединиц и по 2 копии 7 разных  $\beta$ -субъединиц.

Комплекс коровой протеасомы с одной или двумя регуляторными частицами PA700 образует 26S протеасому (Рис. 5). Помимо этого, в клетках эукариот присутствуют комплексы 20S протеасом с другими активаторами – PA200 и PA28. Гетерогенность регуляторных частиц и число комбинаций, в которых они могут присоединяться к 20S протеасоме, дают целый набор протеасом с разными функциями. Содержание регуляторных субчастиц в клетке и, соответственно, функции протеасом могут сильно меняться (Сорокин, 2009). Множественные шапероны обеспечивают сборку протеасом, регулируют их стабильность, связывание с субстратом, утилизацию убиквитина и другие процессы (Díaz-Villanueva et al., 2015; Vanoli et al., 2015).

Протеасомы 26S осуществляют гидролиз убиквитинированных белков. Сигналом протеасомной деградации является цепь из молекул убиквитина, ковалентно связанная с белком-мишенью. Специфичность сигнала определяется длиной и структурой полиубиквитиновых цепей, которые распознаются рецепторами в составе регуляторных субчастиц протеасомы.

Для гидролиза на 20S протеасомах модификация белков убиквитином не требуется. В случае убиквитин-независимой деградации сигналом для протеолиза является либо последовательность внутри самого белка, либо некоторая вспомогательная молекула.

В центральной полости эукариотического 20S протеасомного комплекса расположено шесть каталитических центров, образованных двумя  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ - и  $\beta 5$ -субъединицами. Каждая субъединица обладает специфичностью к субстрату. Таким образом, 20S протеасома обладает тремя основными типами каталитической активности: она способна расщеплять белки со специфичностью по типу трипсина (расщепление после положительно заряженных аминокислотных остатков), по типу химотрипсина (после ароматических аминокислотных остатков) и по типу каспазы (после отрицательно заряженных остатков) (Кудряева, Белогуров, 2019).

Основные сведения о структуре протеасом получены в работах на дрожжах и млекопитающих (Groll, 1997; Unno, 2002). У млекопитающих помимо базовой протеасомы существует иммунопротеасома, сборка которой в клетке начинается после стимуляции ее  $\gamma$ -интерфероном. Этот цитокин запускает синтез трех дополнительных протеасомных субъединиц  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  и  $\beta 5i$ , которые во время сборки протеасомы встраиваются вместо конститутивно синтезируемых субъединиц  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5$ . Считается, что в отличие от конститутивной, иммунопротеасома генерирует пептиды, которые в последующем используются в презентации антигена (Kloetzel, 2001). Таким образом, протеасомный комплекс участвует в формировании адаптивного иммунитета. Логично предположить, что и в клетках других эукариот, выполняющих иммунную функцию и постоянно адаптирующихся под воздействие различных стрессовых факторов, система контролируемой деградации белков должна в том или ином виде присутствовать.

Изучение протеасомных комплексов беспозвоночных животных ограничено модельными объектами. Показано, что протеасомы участвуют в формировании дорзовентральной оси тела *Drosophila melanogaster* (Klein, 1990) и переднезадней оси тела у нематоды *Caenorhabditis elegans* (Bowerman, Kurz, 2006). Подробных исследований состава и функционирования протеасом у морских беспозвоночных не проводилось.

В публичных базах данных можно найти аминокислотные последовательности субъединиц протеасом, относящихся к организмам из разных таксонов. Эти белки очень консервативны и имеют сходную структуру у представителей филогенетически далеких групп. По всей видимости, протеасомы являются обязательным компонентом регуляторной системы гомеостаза клеток эукариот в целом.



## **Заключение**

На данный момент данные о составе и функционировании иммунных систем аннелид неравномерны и часто обрывочны. Пожалуй, единственными представителями группы, изученными с этой точки зрения с использованием разных подходов, включая молекулярно-генетические методы, остаются олигохеты семейства Lumbricidae. Морским аннелидам уделялось меньше внимания. Отсутствие соответствующих данных и высокая изменчивость представителей разных семейств полихет затрудняют попытки обобщенного моделирования их иммунной системы. Тем не менее, даже на основании имеющихся данных можно заключить, что целомоциты полихет существенно отличаются от таковых олигохет как морфологически, так и функционально, что свидетельствует о существовании таксон-специфических защитных механизмов в пределах группы аннелид. Изучение вариативности этих механизмов на разных уровнях организации внесет существенный вклад в понимание путей эволюции иммунных систем и возможностей их функционирования.

Изучение различных представителей морских аннелид с иммунологической точки зрения с использованием комплексного подхода и сочетания различных методов представляет большой сравнительный, эволюционно-физиологический и практический интерес.

### 3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

#### 3.1. Объект исследования

*Arenicola marina* (Linnaeus, 1758), морской пескожил – вид седентарных полихет (морских аннелид) из семейства Arenicolidae (Рис. 6). Распространен в бореальных районах северной Атлантики, прилегающих районах Северного Ледовитого океана (Жирков, 2001).

В Белом море это массовый, легко доступный вид. Этот вид адаптирован к широкому диапазону условий температуры и солености, но избегает берегов с сильным волновым воздействием и течениями. В Белом море *A. marina* обилиен на литоральных участках с илистыми, песчаными или частично каменистыми отложениями. Взрослые черви зарываются в грунт на глубину 20-30 см и питаются разлагающимися органическими веществами и микроорганизмами в отложениях. Средняя продолжительность жизни пескожила в Белом море составляет 2–3 года, предположительный максимум – 6 лет. Размножение происходит один раз в год, в конце июня - начале июля, оседание личинок происходит в конце августа. В течение первого года роста черви проходят половую дифференциацию, но не производят зрелых гамет до момента массового нереста, поэтому участвуют в воспроизводстве только на втором году жизни. Часть плодовитого населения погибает после нереста. В оптимальных условиях *A. marina* формирует стабильные популяции, в которых присутствуют все возрастные группы одновременно. Холодный сезон (ноябрь-апрель) черви проводят под ледяным покровом в состоянии значительно сниженного обмена веществ (Калякина, 1976, Калякина, 1980).

Пескожил является удобным объектом для исследования строения и функционирования иммунной системы аннелид. Это достаточно крупный (до 10-12 см в длину) вид с большой целомической полостью, заполненной жидкостью. В торакальном отделе полость не разделена диссепиментами, что обеспечивает свободную циркуляцию жидкости по телу и облегчает препаровку. Среднее количество свободных целоцитов у этого вида достаточно велико, что важно для многих биохимических и молекулярных исследований. В местообитаниях пескожила очень разнообразна потенциально опасная бактериофауна, что говорит о необходимости наличия у этого вида развитой защитной системы. Еще одним косвенным подтверждением эффективности иммунной системы пескожила является тот факт, что в отличие от многих видов полихет, с пескожилом не связаны жизненные циклы многоклеточных паразитов.

Морфология целоцитов этого вида изучалась ранее, однако две предложенные классификации этих клеток не совпадают друг с другом (Dales, Dixon, 1981; Персинина,

Чага, 1994). Об участии целомоцитов в иммунном ответе имеется только общая информация – целомоциты активно фагоцитируют чужеродный материал (Fitzgerald, Ratcliffe, 1989). Из синтезируемых целомоцитами специфических белков для пескожила описаны антимикробные пептиды (Maltzeva et al., 2014; 2016), однако неизвестно, какие типы целомоцитов синтезируют эти пептиды.

В данной работе этот вид использован в качестве модельного объекта для комплексного исследования с целью уточнения и обобщения информации о составе и функционировании его иммунной системы.

Работа выполнена на взрослых особях, собранных в летние сезоны 2014-2018 гг. в окрестностях Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова МГУ (залив Великая Салма). Всего в работе было использовано 150 особей пескожила.

Во время проведения экспериментов червей содержали в проточном аквариуме с естественной морской водой при температуре около 8°C.

### **3.2. Морфология целомоцитов *Arenicola marina***

Образцы целомиической жидкости отбирали из торакального отдела червей с помощью шприца. Живые клетки помещали на стекла и изучали их морфологию и поведение под световым микроскопом. Клетки целомиической жидкости в норме склонны к очень быстрому образованию агрегатов. Эффективность агрегации в значительной степени зависит от концентрации двухвалентных катионов в среде (целомиической жидкости). Поэтому для наблюдения отдельных клеток при заборе образца целомиическую жидкость разбавляли в два-четыре раза с помощью стерильной морской воды (FSW) или безкальциевой-безмагниевой искусственной морской воды (CMFSW). Для этого в шприц сначала набирали воду, а потом отбирали им целомиическую жидкость. Для стерилизации морскую воду фильтровали через мембранный лабораторный фильтр (Миллипор, размер пор 0,45 мкм).

Для приготовления безкальциевой-безмагниевой воды на 100 мл дистиллированной воды брали: 0,1 г Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,24 г Tris, 0,75 г KCl; 3,16 г NaCl; 0,0024 г NaHCO<sub>3</sub>; 0,37 г ЭДТА. pH довели до 8 с помощью NaOH.

Для разведения фиксаторов использовали FSW или фосфатный буфер (PBS, pH=7,4). В качестве фиксаторов использовали следующие растворы: 2,5% глутаральдегид, 2-6% параформальдегид, 70% этиловый спирт, жидкость Буэна.

Для изучения морфологии клеток, максимально приближенной к их естественному состоянию (суправитальные препараты), целомиическую жидкость быстро забирали в шприц с фиксатором.

При подготовке препаратов использовали обычные стекла и стекла, покрытые полилизинном. Для приготовления препаратов использовали разные подходы:

- из отобранных образцов целомической жидкости делали мазки на стеклах по стандартной методике для приготовления мазков крови. Мазки высушивали на воздухе и фиксировали;
- забирали образцы в шприц с фиксатором, помещали на стекло и высушивали на воздухе;
- образец целомической жидкости помещали на стекло и оставляли оседать на промежутки времени от 10 до 40 минут, затем фиксировали.

Фиксацию проводили в течение 20-30 минут (максимум – в течение часа). Готовые препараты отмывали буфером, на котором был разведен фиксатор, и окрашивали гистологическими красителями (гематоксилин по Караччи, азур-эозин по Гимза-Романовскому, трехцветный азан (по Helm et al., 2018)). Окрашенные препараты заключали в среду (Mowiol/глицерин 75% на PBS) и изучали на микроскопе Leica DM5000 В.

Для изучения ультратонкого строения клеток образцы целомической жидкости, зафиксированные 2,5% глутаральдегидом на фосфатном буфере, изотоничном морской воде (pH=7,4) (Millonig, 1964), центрифугировали на микроцентрифуге Eppendorf 5418 MiniSpin со скоростью не более 100g. Сформированные осадки клеток обрабатывали следующим образом:

1. Постфиксировали 1% OsO<sub>4</sub> (на фосфатном буфере Millonig) в течение одного часа в темноте при комнатной температуре.
2. Отмывали в трёхкратной смене этого же буфера по 15 мин.
3. Дегидратировали образцы в серии этанола восходящей концентрации (30%, 50%, 70%, 82%, 96%). В каждой концентрации материал выдерживался две смены по 10 минут.
4. Продолжали дегидратацию в серии ацетона восходящей концентрации в следующих соотношениях (96% спирт:ацетон): 1:2; 1:3; чистый ацетон. В каждом случае материал выдерживали около 5-7 мин, чистый ацетон сменялся 2-3 раза. Весь процесс дегидратации производили при комнатной температуре.
5. Выдерживали образцы по 12 ч при комнатной температуре в смесях ацетона и смолы (смесь эпона и аралдита (Electron Microscopy Sciences)) в следующем порядке: 2 (ацетон):1 (смола); 1:2; 1:3.
6. Выдерживали образцы в чистой смоле при комнатной температуре 8-12 ч.

7. Заливали образцы в формочки для блоков и помещали в термостат на 24 ч при 37°C.

8. Перемещали формочки в термостат на 60°C и выдерживали 48 ч для окончательной полимеризации заливочной среды.

Ультратонкие срезы делали на микротоме Leica EM UC7. Срезы на блендах с подложкой из формвара контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по стандартной методике (Миронов, 1994) и изучали на микроскопах JEM 1011 и 100B (Japan).

Мы провели ряд экспериментов с меткой EdU (5-этинил-2'-деоксиуридин), которая встраивается в молекулы ДНК в процессе ее активного синтеза, чтобы выяснить, присутствуют ли среди целомоцитов пролиферирующие клетки. Для этого предшественник метки разводили в морской воде до рабочей концентрации в соответствии с рекомендациями производителя и вводили в целомическую полость червей. Через определенный срок инкубации (6, 12, 24 часа) отбирали образцы целомической жидкости в шприц с фиксатором (4% PFA на FSW), осаждали образцы на стекло и высушивали. После отмывали стекла фосфатным буфером и инкубировали в реакционной смеси Click-It EdU (Thermofisher Scientific, кат. номер набора C10640) в соответствии с протоколом набора. Остальные ядра визуализировали DAPI. Образцы исследовали на конфокальном микроскопе Nikon A1.

Для нескольких особей были проведены эксперименты с предварительным отбором части целомической жидкости, чтобы определить, возрастает ли количество потенциально делящихся клеток после искусственного уменьшения их общей концентрации. После отбора жидкости червей оставляли на сутки в аквариуме, потом вводили предшественник метки и инкубировали в течение 12 или 24 часов.

### **3.3. Участие целомоцитов *Arenicola marina* в защитных реакциях**

Для подтверждения участия целомоцитов в иммунном ответе и определения функциональности разных клеточных типов был проведен ряд экспериментов.

#### *Фагоцитоз*

Для активации фагоцитоза в эксперименте использовали частицы клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Zymozan A, Sigma-Aldrich). Суспензию зимозана в FSW (в расчете до 10 частиц на клетку) вводили в целомическую полость червей с помощью шприца. После отбирали образцы целомической жидкости через промежутки времени от 10 минут до 2 часов.

Также суспензию добавляли к осажденным на стекло целоμοцитам (в расчетной концентрации до 10 частиц на клетку) на промежутки времени от 10 минут до 2 часов, оставляя стекла во влажной камере при температуре 10-12°C и после фиксировали 4% PFA на FSW. Для экспериментов с клеточными защитными реакциями использовали неразбавленные образцы целомиической жидкости.

### *Инкапсуляция*

Поскольку у разных видов полихет была отмечена разная реакция на внедрение инородных тел биотической и абиотической природы, в нашем эксперименте использовались два типа инородных тел. Было предположено, что на внедрение органического инородного тела последует более яркая реакция. Для индуцирования реакции инкапсуляции в целомиическую полость с помощью шприца с очищенной морской водой вводились стеклянные шарики диаметром 300 мкм (в качестве инородных тел абиотической природы) и отрезки собачьей шерсти длиной 2-5 мм и диаметром 0,5-1 мм (в качестве инородных тел биотической природы).

Инфицированных таким образом особей инкубировали от двух суток до двух недель в аквариуме с проточной морской водой.

После достижения нужного срока инкубации червей препарировали, инородные тела извлекали и фиксировали. В дальнейшем образцы подготавливали для электронной, конфокальной и световой микроскопии.

Для гистологических исследований материал фиксировали 2,5% глутаральдегидом на фосфатном буфере (по Millonig, 1964) и далее заключали в смолу по методике, описанной выше.

Серийные полутонкие срезы делали на микротоме LKB III. Срезы окрашивали смесью толлуидинового синего и метиленового синего (Миронов и др., 1994). Изучение и фотографирование срезов проводили на микроскопе Leica DM5000 B. Ультратонкие срезы делали на микротоме Leica EM UC7. Срезы на блендах с подложкой из формвара контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по стандартной методике и изучали на микроскопах JEM 1011 и 100B (Japan).

Для сканирующей микроскопии фиксированные образцы обезвоживали в серии спиртов и ацетоне (как описано выше) и подвергали высушиванию в критической точке с помощью прибора HCP-2 Critical Point Dryer (Hitachi). Высушенные образцы монтировали на столики, напыляли сплавом золота с палладием и исследовали на микроскопе SCAN JSM 63 LA (Japan).

Для конфокальной микроскопии отпрепарированные капсулы фиксировали 4% PFA на PBS в течение часа, после отмывали в нескольких сменах фосфатного буфера и окрашивали в течение 15 минут флуоресцентным ядерным красителем DAPI и фаллоидином, конъюгированным с FITC, разведенными на PBS до рабочей концентрации. Окрашенные образцы исследовали с помощью конфокального микроскопа Nikon A1.

#### *Связывание липополисахарида*

Для изучения реакции целоцитов на химическую индукцию воспаления использовали липополисахарид клеточной стенки *Escherichia coli* (LPS, штамм O111:B4, Sigma-Aldrich), конъюгированный с FITC. Разведенный в FSW LPS вводили в целомическую полость с помощью шприца в расчетной концентрации 50 нанограмм LPS на миллилитр жидкости. Образцы отбирали и фиксировали в суспензии 4% PFA на PBS через 15 и 30 минут и через час, отмывали фосфатным буфером, визуализировали ядра DAPI. Окрашенные образцы исследовали с помощью конфокального микроскопа Nikon A1. Всю подготовку препаратов проводили в темноте. Настройки интенсивности и яркости лазера, а также параметр фонового шума устанавливали на контрольных препаратах, не индуцированных LPS.

### **3.4. Анализ транскриптома целоцитов *Arenicola marina***

Для секвенирования транскриптома целоцитов использовали образцы целомической жидкости 5 особей. Образцы целомической жидкости объемом 500-700 мкл отбирали с помощью шприца, помещали в стерильные пробирки и подвергали иммунной индукции, добавляя LPS и зимозан в расчетных концентрациях 50 нг/мл и до 10 частиц на клетку. Оставляли образцы на 1 час при температуре 10-12°C, осаждали образцы центрифугированием и фиксировали с использованием TRI Reagent (Thermo Fisher Scientific), далее выделяли тотальную РНК по стандартному протоколу.

мРНК выделяли из 800 нг тотальной РНК приемлемого качества с использованием набора NEBNext® Poly (A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs, UK) в соответствии с протоколом производителя. Были приготовлены пять отдельных библиотек кДНК с помощью набора для подготовки библиотеки направленной РНК NEBNext® Ultra™ II для Illumina® (New England Biolabs). Секвенировали на Illumina HiSeq 2500 в режиме рапид рана с чтением с двух концов. Объем полученных парноконцевых ридов составил 30 млн. на образец и 150 млн. суммарно.

Качество данных оценивали с помощью программного обеспечения FastQC (v0.11.9). Остаточные адаптеры и низкокачественные основания (оценка Phred ниже 30) были удалены из пула ридов с помощью Trimmomatic (v0.38) (Bolger, Lohse et al. 2014).

Полученные парные чтения из пяти библиотек, 73-93 М каждая, были объединены вместе (407 М) и использованы в сборке *de novo* транскриптома с помощью программного обеспечения Trinity-v2.8.6 (Haas et al., 2013). Оценка обилия транскриптов выполняли с помощью инструмента Bowtie2 (v2.3.5.1) (Langmead, Salzberg 2012) и метода количественной оценки RSEM для получения значений экспрессии генов: TPM (транскриптов на миллион) и TMM (нормализованный TPM между образцами). Сборку дополнительно уменьшили путем удаления транскриптов с низкой экспрессией (TMM <1) и ксеногенных транскриптов. Для поиска потенциальных ксеногенных контаминаций использовали база данных рРНК SILVA (Quast et al., 2012). Качество сборки оценивали с использованием набора BUSCO (v4.1.4; metazoan-odb10), позволяющего оценить наличие и состояние однокопийных генов-ортологов, характерных для Metazoa, в сборке (Simao et al., 2015). В качестве представителей каждого гена выбирали самые длинные белки.

Идентификация кодирующих областей в последовательностях транскриптов выполнялась с помощью инструмента TransDecoder с использованием совпадений BLASTp (Swissprot; пороговое значение 1E-5) или PFAM в качестве критерия. Предполагаемые белки были аннотированы с помощью инструмента Trinotate с идентификацией белковых доменов HMMER/PFAM, сигнальных пептидов (v4.1), TMHMM (v2.0c) и BLASTp анализа (пороговое значение 1E-15) против базы данных UniProt/SwissProt. Референсные белки были локально проанализированы tBLASTn против транскриптома *A. marina* с пороговым значением 1E-5. В качестве потенциальных гомологов рассматривались транскрипты со значением ниже порогового. Все последовательности белков-кандидатов были проверены на наличие консервативных аминокислотных мотивов, составляющих домены датабаз Pfam (Finn, Bateman et al. 2014) и SMART (Letunic et al., 2012). Анализ доменной архитектуры белков проводили с помощью инструмента InterProScan (Geneious R10). Белки, состав и порядок доменов в которых были идентичны соответствующим прототипам, считались гомологичными. Третья версия базы данных антимикробных пептидов (APD3) (Wang et al., 2015) использовалась для поиска антимикробных пептидов (BLASTp) с сохраняемым порогом 100% идентичности.

Филогенетический анализ полученных последовательностей осуществляли с использованием программного обеспечения BLAST+ для поиска гомологов. Эволюционный анализ проводился в пакете программ MEGA X (Kumar et al., 2018). Эволюционную историю реконструировали с помощью метода максимального правдоподобия и модели JTT w/freq. (Jones et al., 1992) для оценки попарных расстояний. Исходные деревья были автоматически получены путем применения алгоритмов



Neighbor-Join и BioNJ к матрице JTT. Из исходных деревьев выбирали топологию с высшим значением логарифмического правдоподобия. Для моделирования различий в скорости эволюции между сайтами использовали дискретное гамма-распределение (5 категорий (+G)) с оценкой части сайтов как эволюционно неизменных ([+I]). Использовали опцию частичной делеции: все позиции с покрытием менее 95% были исключены.

### **3.5. Протеасомный комплекс целомоцитов *Arenicola marina***

Для изучения протеасомного комплекса целомоцитов и его реакции на экспериментальную иммунную индукцию использовали сравнение целомоцитов трех групп животных: нативные (неинфицированные), контрольные и инфицированные LPS. Для индукции воспаления червям вводили в целомическую полость LPS на FSW в расчетной дозе 50 мкг/мл. Для контрольных экспериментов использовали FSW. Через 1 час после инъекции у червей отбирали целомическую жидкость.

Для иммуноцитохимической окраски целомоциты фиксировали на стеклах 4% PFA на FSW, отмывали фосфатным буфером и окрашивали мышинными моноклональными антителами к субъединицам протеасом и белкам теплового шока. Окрашенные образцы исследовали с помощью конфокального микроскопа Nikon A1.

Для получения осветленных гомогенатов целомоциты осаждали мягким центрифугированием, гомогенизировали осадки механическим способом (с помощью ультразвуковой установки), затем центрифугировали в течение часа при 10 000g и 4°C. В осветлённых гомогенатах полученных образцов определяли химотрипсинподобную (ХПА) активность протеасом по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc LLVY AMC (Sigma) в концентрации 30 мкМ. Специфичность реакции определяли в опытах с ингибитором протеасом MG-132 (Sigma). Содержание субъединиц  $\alpha$  1,2,3,5,6,7 и протеолитической субъединицы  $\beta$ 5 протеасом, а также регуляторов протеасом и белков теплового шока оценивали с помощью Вестерн-блоттинга. Нативную структуру протеасомных комплексов исследовали методом нативного электрофореза, модифицированного для неочищенных фракций протеасом (Степанова и др., 2016).

Обработка всех изображений и подготовка иллюстраций выполнена в программах Adobe Photoshop, Adobe Illustrator, ImageJ. Фотоизображения и микрофотографии, полученные в ходе исследований, подвергались незначительной корректировке яркости и контрастности, затрагивающей все пиксели изображений.

## 4. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 4.1. Морфология и ультраструктура целомочитов *Arenicola marina*

В отобранных образцах целомической жидкости *Arenicola marina* можно обнаружить большое количество свободных клеток – целомочитов и гамет. Концентрация гамет на разных стадиях созревания максимальна в период массового нереста (середина июня – начало июля) и снижается к августу. Общая численность целомочитов без учета гамет составляет от 2 до 17 миллионов на миллилитр жидкости, в среднем – 5-7 миллионов. Корреляции общей численности целомочитов с размером и полом животных, а также с сезоном наблюдений, при этом не наблюдается (Рис. 7).

Живые целомочиты различаются по форме, размерам и поведению. Некоторые клетки распластываются на стекле и образуют псевдоподии различной формы и размеров, другие сохраняют четкую форму при наблюдении в течение часа. Идентифицировать отдельные клетки можно в разбавленных в 2-4 раза образцах целомической жидкости, осаженных на стекло.

В норме при заборе целомической жидкости и помещении образцов на стекло целомочиты образуют агрегаты (Рис. 8). Целомочиты в неразбавленных образцах целомической жидкости собираются в агрегаты в течение получаса после помещения на стекло. При разбавлении образцов стерильной морской водой (FSW) или бескальций-безмагниевым буфером процесс агрегации значительно замедляется. Целомочиты в разбавленных образцах целомической жидкости в течение получаса формируют на стекле монослои (Рис. 9). При формировании монослоев часть целомочитов значительно меняет внешний вид. Близость других клеток, по всей видимости, стимулирует распластывание у части целомочитов.

При изучении фиксированных клеток разнообразие морфологических форм целомочитов зависит от использованных методов фиксации и окраски. Соотнести внешний вид живых и зафиксированных клеток не всегда удается, что осложняет классификацию целомочитов по морфологическим признакам.

При заборе целомической жидкости в шприц с фиксатором в полученной суспензии также наблюдаются клеточные агрегаты. При этом после отмывки таких образцов FSW с использованием мягкого центрифугирования (не более 100g) в образцах хорошо различимы клетки разной формы. Значительных различий в морфологии целомочитов, зафиксированных в суспензии, при использовании разных фиксаторов (глутаральдегида, параформальдегида, этилового спирта, жидкости Буэна) нами не

отмечено, однако выбор фиксатора определяет качество окраски гистологическими красителями.

При фиксации разбавленных образцов целомической жидкости на стекле не все клетки успевают осесть и прикрепиться к субстрату в течение 20 минут. При фиксации через 40 минут часть клеток оказывается разрушенной. Если использовать стекло с адгезивной поверхностью (покрытое полилизинном), в течение 20 минут большая часть целоцитов успевает осесть, но при этом почти все клетки распластываются по стеклу, и даже в разбавленных образцах сильно ускоряется процесс агрегации клеток, затрудняющий их идентификацию. В результате экспериментов осаждение на обычное стекло в течение 25-30 минут с быстрой последующей фиксацией было признано оптимальным для идентификации отдельных клеток.

При фиксации образцов целомической жидкости на стекле глутаральдегидом и жидкостью Буэна оседает большое количество белка, содержащегося в целомической жидкости. Этот белок также окрашивается и снижает внешнее качество препаратов. При фиксации параформальдегидом клетки сохраняют более близкую к живому состоянию морфологию, но при этом препараты плохо окрашиваются рядом красителей.

Окраска простыми однокомпонентными красителями (гематоксилин, метиленовый синий) оказывается достаточно информативной и позволяет хорошо различить основные морфологические признаки клеток: размер и форму, размер и положение ядра, однородность или гетерогенность цитоплазмы. Использование дифференцированного окрашивания сопряжено с некоторыми сложностями, особенно применительно к экспериментально индуцированным клеткам (см. далее).

В целом, среди целоцитов пескожила можно отметить три основных морфологических типа, которые регистрируются всеми использованными методами. Более дробная классификация внутри этих типов возможна для зафиксированных на стекле целоцитов, однако интерпретация микроскопических данных зависит от использованных методов фиксации и окраски.

#### *Веретеновидные целоциты*

Первый тип клеток имеет веретенообразную форму, с более или менее выраженными подвижными боковыми отростками (Рис. 10). Это клетки разного размера: от 20 до 50-60 мкм, отростки самых длинных клеток могут достигать длины более 30 мкм. В цитоплазме этих клеток встречается небольшое количество гранул. Форма веретеновидных клеток варьирует: чем больше клетка, тем более вытянуты отростки, при

этом клетки средних размеров (20-30 мкм) имеют овальную форму и склонны к распластыванию на стекле (Рис. 10 Д, Е).

При фиксации в суспензии среди клеток этого типа хорошо отличимы три разновидности: мелкие (Рис. 11 А, Б, Д, Е), с длинными отростками (Рис. 11 В, Г) и клетки средних размеров, более широкие и без выраженных отростков (Рис. 11 Ж-К). Последние, по всей видимости, в живом виде склонны к распластыванию.

Те же разновидности веретеновидных целоцитов отмечаются на окрашенных постоянных препаратах (Рис. 12, 13). При этом в средних веретеновидных клетках заметны прозрачные вакуоли и окрашенные включения – возможно, фагосомы.

Эти же клетки хорошо распознаются на ультратонких срезах (Рис. 14). Отличительными характеристиками их ультраструктуры является система прозрачных вакуолей в поверхностном слое цитоплазмы и выраженные пучки микрофиламентов в цитоплазме, которые концентрируются как вокруг ядра, так и на периферии. В цитоплазме также встречается небольшое количество электронно-плотных гранул.

#### *Округлые целоциты с псевдоподиями*

Второй основной тип целоцитов – небольшие (~10 мкм в диаметре) целоциты различной формы, часто близкой к округлой или овальной (Рис. 15). Эти клетки образуют одну или несколько хорошо выраженных отдельных псевдоподий. В их цитоплазме могут присутствовать оптически плотные включения. При фиксации в суспензии эти клетки сохраняют округлую форму, в некоторых случаях при использовании ДИК заметны крупные ядра (Рис. 16). Судя по всему, этот тип клеток обладает низкой адгезивностью, поскольку он редко встречается в образцах целомической жидкости, зафиксированных в суспензии. На стеклах после оседания эти клетки имеют равномерно плотно окрашенную цитоплазму, палочковидные, бобовидные или округлые ядра, смещенные к краю клетки. Отдельные псевдоподии формируются из прозрачной цитоплазмы (Рис. 17).

На ультратонких срезах цитоплазма этих клеток оказывается заполнена электронно-плотными гранулами разного размера и формы. Клетки с большим количеством гранул формируют псевдоподии из цитоплазмы без включений, несут пучки шероховатого ЭПР и развитый аппарат Гольджи (Рис. 18). На световом оптическом уровне эти гранулы не выявляются гистологическими красителями.

### *Распластывающиеся целомоциты*

Третий основной тип целомоцитов представлен клетками различного размера и формы, которые в живом виде активно распластываются на стекле, образуя ламеллоподии из цитоплазмы, в которой нет включений (Рис. 19). Среди таких клеток большая часть имеет округлую или овальную форму, цитоплазма заполнена большим количеством вакуолей и включений, одна ламеллоподия окружает всю клетку. Диаметр таких клеток без ламеллоподий составляет от 7-10 до 20 мкм, а с ламеллоподиями обычно превышает 30 мкм и достигает 60 мкм. При использовании ДИК часть включений в живых клетках оказывается ярко окрашенной; по всей видимости, такие включения являются фагосомами. В частности, по этому признаку, а также по размерным характеристикам, можно отличить фиксированные клетки этого типа, в суспензии сохраняющие округлую форму (Рис. 20).

При фиксации на стекле в распластывающихся целомоцитах заметны относительно крупные овальные ядра, фагосомы и ярко окрашиваемые включения (Рис. 21). Целомоциты меньших размеров, формирующие одну округлую ламеллоподию, иногда не имеют включений в цитоплазме. В общем случае участок цитоплазмы в центре распластывающихся целомоцитов прокрашивается слабо, а ламеллоподии образованы прозрачной цитоплазмой.

На электронно-микроскопическом уровне в таких клетках заметна неоднородность включений, часто заполняющих клетку сплошной массой (Рис. 22). Помимо хорошо отличимых фагосом в таких клетках можно отметить прозрачные или заполненные разнородным электронно-плотным материалом вакуоли и электронно-плотные включения неопределенной формы, вокруг которых иногда невозможно различить отдельную мембрану.

### *Прочие типы целомоцитов*

В образцах целомической жидкости также можно выделить клетки смешанной или переходной морфологии, а также редко встречающиеся морфотипы. Некоторые дополнительные типы клеток присутствуют не у каждого животного.

Среди живых целомоцитов отмечаются клетки, не формирующие псевдоподий, и сохраняющие четкую форму в течение часа наблюдений (Рис. 21). В цитоплазме таких клеток заметны гранулы, иногда отдельные вакуоли и окрашенные фагосомы. Эти клетки в среднем крупнее целомоцитов с псевдоподиями, их диаметр достигает 20-30 мкм. Достоверно отличить эти клетки в фиксированных образцах не удастся.

Отдельно выделяются распластывающиеся клетки неправильной вытянутой формы, иногда близкой к треугольной. В цитоплазме присутствуют гранулы и единичные вакуоли, а лишняя включений цитоплазма образует две или три отдельные широкие псевдоподии на концах клеток. Размер таких клеток варьирует от 15 до 30 мкм (Рис. 24). Клетки подобной формы отмечаются при оседании на стекла неразбавленных образцов целомической жидкости (см. далее).

Также на постоянных препаратах отмечаются мелкие целомциты, сходные по размерным характеристикам с гранулярными целомцитами, но не образующие псевдоподий и со слабо окрашиваемой цитоплазмой (Рис. 25). У части таких клеток отмечаются фагосомы и единичные гранулы (Рис. 26).

Кроме того, как в живых, так и в фиксированных образцах можно выделить самые мелкие целомциты диаметром менее 10 мкм с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением (Рис. 27). Клетки таких размерных характеристик попадают на ультратонких срезах и несут несколько крупных митохондрий. По всей видимости, эти клетки являются «ювенильными» и выполняют функцию стволовых. Косвенно это подтверждается экспериментами с мечением EdU.

Чтобы выяснить, присутствуют ли в целомической жидкости клетки на стадии деления, мы использовали метку EdU, которая встраивается в молекулы ДНК в процессе ее активного синтеза. При инкубации с предшественником в течение 6 часов меченые клетки отмечали единично. После инкубации в течение 12 часов концентрация меченых клеток варьировала у разных особей в пределах 0,6-4% от общего числа клеток. При таком сроке инкубации метка аккумулируется в первую очередь в мелких клетках с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением – по всей видимости, ювенильных (Рис. 28, А, Б). Также отмечали только что поделившиеся клетки, сохраняющие высокую концентрацию метки. После инкубации в течение 24 часов на препаратах встречаются клетки, сохраняющие остаточную метку, но приобретающие отличную от ювенильной морфологию (Рис. 28, В). Мы не отметили значительного повышения численности меченых клеток в экспериментах с предварительным отбором части целомической жидкости. В течение 36 часов после отбора жидкости концентрация меченых клеток остается в тех же пределах, что у контрольных особей. Эти результаты косвенно указывают на относительно медленный клеточный цикл целомцитов пескожила.

### *Соотношение клеточных типов*

Как и общая концентрация клеток, соотношение клеточных типов, судя по всему, является индивидуальной характеристикой конкретного животного. Процентное соотношение типов клеток очень сильно варьирует между особями. Как правило, в живых образцах целомической жидкости, осаженных на стекло, заметно преобладает один из трех основных типов целомоцитов. Более 50% клеток в отдельных образцах представлены либо веретенновидными целомоцитами, либо мелкими целомоцитами с псевдоподиями, либо расплывающимися целомоцитами. У некоторых животных до 80% численности составляют веретенновидные целомоциты средних размеров, до 5% – крупные веретенновидные целомоциты и расплывающиеся целомоциты с включениями и около 10% - мелкие целомоциты с псевдоподиями. У других животных около 70% целомоцитов представлено мелкими клетками с псевдоподиями, 15% – расплывающимися клетками и только около 10% представлено веретенновидными клетками разных размеров. При этом, как и в случае с общей численностью клеток, не отмечается явной корреляции этого параметра с полом и размером животных (Рис. 29). Также не наблюдается прямой связи с сезоном и активностью размножения: в период после массового нереста соотношение клеточных типов как у самцов, так и у самок не меняется определенным образом, а сохраняет тенденцию индивидуальной изменчивости. Соотношение клеточных типов в образцах целомической жидкости может варьировать в широких пределах и, по всей видимости, не отражает конкретных закономерностей распределения этих клеток внутри популяции червей, а определяется индивидуальными характеристиками и физиологическим статусом конкретной особи.

При оседании клеток на стекла изменяются их морфологические характеристики, что осложняет идентификацию разных типов и определение их количественного соотношения. Использование дифференцированных красителей показывает неоднозначные результаты: отобранные у одной особи целомоциты могут окрашиваться очень различно при фиксации в суспензии и на стекле после оседания (Рис. 30). Использование одного и того же фиксатора и одинаковых условий окраски не гарантирует сопоставимость результатов. Корректная интерпретация результатов таких окрашиваний оказывается затруднена.

В целом можно заключить, что использование разных способов окраски позволяет достоверно различить типы целомоцитов с плотно или слабо прокрашиваемой цитоплазмой. Эта разница сохраняется при использовании разных способов фиксации и

окраски. Выделить в цитоплазме конкретных клеток отдельные гранулы, дающие в разных условиях одинаковую реакцию на окраску, нам не удалось.

#### **4.2. Участие целомоцитов *Arenicola marina* в защитных реакциях**

##### *Фагоцитоз*

При помещении образцов целомоцитов на стекло в обычных условиях часть клеток разрушается. При этом высвобождаются включения и гранулы, содержимое вакуолей. Этот процесс описан для разных животных как «дегрануляция» и связан непосредственно с извлечением клеток из естественной среды. У пескожила в первую очередь разрушается часть распластывающихся целомоцитов с включениями. В неразбавленных образцах целомиической жидкости на стекле этот процесс привлекает окружающие клетки, которые начинают активно фагоцитировать высвобожденное содержимое разрушенных клеток, и впоследствии формируют плотные агрегаты (Рис. 31).

При смешивании образцов целомиической жидкости с суспензией зимозана на стекле также образуются агрегаты (Рис. 32). Процесс агрегации *in vitro* происходит в следующем порядке: в первую очередь частицы зимозана захватываются распластывающимися целомоцитами с включениями (Рис. 32, А) и распластывающимися целомоцитами вытянутой формы (Рис. 32, Б). Формирование монослоя происходит примерно так же, как в случае неразбавленных образцов целомиической жидкости, однако вытянутые клетки стремятся связаться с максимальным числом соседних клеток. Следующими вокруг образованной сети из распластанных целомоцитов концентрируются округлые клетки с псевдоподиями и плотно прокрашиваемой цитоплазмой (Рис. 32, В). В течение часа препараты приобретают характерный вид: плотные агрегаты из клеток с уже неразличимой морфологией оказываются связаны друг с другом распластанными веретеновидными и шнуровидными целомоцитами, отдельные округлые и вытянутые целомоциты мигрируют между агрегатами, в какой-то момент присоединяясь к ним. Распластанные округлые клетки с включениями служат центрами агрегации, и на препаратах, зафиксированных через 30 и более минут после смешивания образцов с суспензией зимозана, отдельно не различимы (Рис. 32, Д). Судя по всему, веретеновидные целомоциты могут формировать цитоплазматические мостики с соседними клетками и передавать им фагоцитированные частицы (Рис. 33).

При отборе целомиической жидкости через 30 минут после инъекции суспензии зимозана в целомиическую полость червей сформированные агрегаты сохраняются даже при сильном (в 6 раз) разбавлении образцов водой или буфером (Рис. 34). После 1 часа с



момента инъекции отобранные образцы целомической жидкости состоят в основном из плотных клеточных агрегатов. Морфология отдельных клеток в таких агрегатах утрачивает характерные черты, клетки теряют псевдоподии и отростки, округляются, включения некоторых клеток становятся выражено пигментированными без дополнительной окраски (Рис. 34, Б). Пигментированные плотные агрегаты отмечаются в целомической жидкости инъецированных червей как минимум в течение суток после инъекции.

### *Инкапсуляция*

Инкапсуляция инородных тел у *A. marina* происходит относительно быстро. Уже через сутки введенные в целомическую полость стеклянные шарики и отрезки собачьей шерсти оказываются полностью покрыты клетками червя (Рис. 35).

Можно отметить, что в случае со стеклянными шариками процесс инкапсуляции проходит не столь интенсивно, как в случае с шерстью. При изучении шариков через 2 суток после внедрения в целомическую полость на сканирующем электронном микроскопе видны отдельные клетки, расплывающиеся по поверхности шарика (Рис. 36, А). Однако большая часть поверхности шарика оказывается покрыта внеклеточным матриксом, а не клетками (Рис. 36, Б). Клетки недостаточно плотно прикрепляются к шарикам, и при фиксации и последующей подготовке к электронной микроскопии образцов легко отваливаются. Формирования плотных многоклеточных капсул при фиксации образцов через 2 и более суток отмечено не было.

Инкапсуляция отрезков шерсти происходит более активно. На поперечных гистологических срезах капсул, окружающих отрезки шерсти, хорошо заметно, что клетки вокруг инородного тела располагаются последовательными концентрическими слоями и отличаются друг от друга по форме в зависимости от расстояния, на котором они находятся от поверхности чужеродного объекта. Строение капсул и морфология клеток в них различается в зависимости от времени инкубации.

Капсула возраста 2 суток имеет более плотный внутренний слой и внешний слой, состоящий из клеток, с отростками. Капсулы одного возраста могут сильно различаться по строению (Рис. 37, А, Б). К тому же инкапсуляция одного отрезка может быть неравномерной, как на рис. 37, Б. На некоторых участках таких капсул можно увидеть начальную стадию инкапсуляции: амебоциты начинают разрушаться на поверхности инородного тела (Рис. 38).

На более поздних стадиях инкапсуляции (Рис. 39, 40) в капсулах можно выделить уже три слоя. Во внутреннем слое, который ближе всего к чужеродному объекту, клетки

плотно упакованы, имеют несколько деформированные ядра и непрозрачную цитоплазму. В среднем слое и клетки, и ядра вытянуты. Во внешнем слое между клетками остаются свободные промежутки, видны переплетающиеся отростки клеток и отдельные амебоциты, пока не соединенные с самой капсулой (Рис. 39, Б, Г). На ультратонких срезах таких капсул хорошо видно, что внешний слой представлен подвижными клетками: они образуют многочисленные отростки, между которыми могут быть крупные промежутки (Рис. 40, Г, Д). В отростках этих клеток хорошо видны пучки микрофиламентов (Рис. 40, Е).

Капсулы после длительного срока инкубации – 10-12 дней – имеют неопределенную форму, внутри них можно наблюдать участки с плотным скоплением клеток, заполненных гранулами, и не заполненные клетками пустые участки (Рис. 41).

На снимках поверхности капсул с помощью сканирующего электронного микроскопа видно, что большая часть участвующих в инкапсуляции клеток имеет вытянутые отростки (Рис. 42). Поверхностный слой капсулы рыхлый, клетки в нем явно сохраняют активную подвижность. Поверхностный слой капсулы образован веретеновидными клетками и отдельными округлыми клетками.

#### *Связывание липополисахарида*

Целомоциты показывают неодинаковую реакцию на инъекцию LPS. Первыми реагируют амебоциты с включениями и частично веретеновидные амебоциты. Через 15 минут после инъекции наблюдается накапливание метки LPS на клеточных мембранах (Рис. 43). Через 30 минут после инъекции метка становится менее выраженной, но вокруг связывающих LPS клеток образуются агрегаты, которые не разрушаются в суспензии (Рис. 44). Через час связавшие антиген клетки отмечаются только в составе агрегатов, и окраска становится менее выражена (Рис. 45). При фиксации более чем через час после инъекции окраска уже не проявляется.

### **4.3. Анализ транскриптома целомоцитов *Arenicola marina***

В транскриптоме целомоцитов мы идентифицировали 28693 «генов» (открытых рамок считывания, ORF), кодирующих белки длиной более 100 аминокислотных остатков (а.о.). Используя набор высококонсервативных однокопийных ортологичных последовательностей (BUSCO, «Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs») (Simao, Waterhouse et al. 2015), мы обнаружили, что из 954 ортологичных генов многоклеточных животных в референсной сборке транскриптома целомоцитов *A. marina* ~98% были полными, тогда как только 0,5% присутствовали, но во фрагментированном виде, и 1,9%

отсутствовали (Рис. 46, Б). Отсутствующие в сборке ортологи могут представлять собой гетерозиготные аллели, не сколлапсировавшие в процессе сборки. Распределение длины всех предполагаемых белков показано на рисунке 46, Г. Поиск по базе данных Uniprot с использованием алгоритма BlastP выявил 10994 совпадений ниже порога сходства (E-value: 1E-25).

Для приблизительной оценки доли экспрессируемых в целомочитах генов от всех генов, прогнозируемых в геноме, мы провели поиск по двум существующим наборам геномных данных кольчатых червей: полихеты *Capitella teleta* (<http://genome.jgi-psf.org/Carpa1/Carpa1.home.html>) и пиявки *Helobdella robusta* (<http://genome.jgi-psf.org/Helro1/Helro1.home.html>), используя BlastP поиск с порогом E-value 1E-25. Только около трети всех белков, предсказанных в геномах *C. teleta* и *H. robusta*, имеют сходство с белками, экспрессируемыми в целомочитах *A. marina*: 38,1 и 37,7% соответственно (Рис. 46, В).

Количество (обилие экспрессии) транскриптов было рассчитано *in silico* как среднее значение TPM (транскриптов на миллион) для «гена» trinity в пяти отдельных образцах. Оно варьировало от 1,0 TPM (порог фильтрации) до 44400 TPM для некодирующей транскрибируемой последовательности РНК. Значения экспрессии 10 первых и 10 последних по обилию белков, гомологичных известным (Uniprot), показаны на рисунке 46, Е. Экспрессия глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), которая часто используется в экспериментах по дифференциальной экспрессии в качестве маркера, составила 782,5 TPM.

Мы можем заключить, что эта сборка основана на результатах секвенирования РНК нескольких типов целомочитов и представляет собой репрезентативную и подробную выборку генов, экспрессируемых в иммунных клетках пескожила. Экспериментальная иммунная индукция клеток (LPS в качестве растворимого и зимозана в качестве корпускулярного индуктора) позволила обогатить транскриптом иммунно-ассоциированными транскриптами. На основе имеющихся данных о молекулярных основах иммунитета других животных мы провели анализ транскриптома и выявили набор белков, потенциально участвующих в системном иммунном ответе у *A. marina*. Список этих белков с описаниями и номерами доступа в базе GenBank представлен в таблице 5 приложения. Ниже приводится краткое описание групп молекул, представляющих наибольший интерес для дальнейших функциональных и эволюционных исследований.

Модель эволюции *прото-комплемента* предполагает, что целомоциты *A. marina* должны экспрессировать набор ТЕР. Мы идентифицировали шесть ТЕР – членов группы А2М (подсемейство ингибитора протеаз  $\alpha$ -2-макроглобулина) (Рис. 47). Филогенетические взаимоотношения этих белков с другими представителями подсемейства показаны на рисунке 47, Б. Вопреки ожиданиям, мы не обнаружили в транскриптом членов группы С3-подобных факторов комплемента, широко представленных у других таксонов беспозвоночных животных.

*Лектин-подобные молекулы* представлены в транскриптом целомоцитов очень разнообразно. Помимо описанных групп лектинов, для которых подтверждено участие в иммунном ответе, мы обнаружили несколько новых групп лектин-подобных белков с потенциальной активностью в качестве PRR (рис. 48-53). Характерной чертой транскриптома целомоцитов является низкое разнообразие лектинов групп C1qL и FReDC (Рис. 48). При этом мы отмечаем 15 генов, кодирующих лектины С-типа (CLECT), как секретируемых, так и связанных с мембраной клетки. Характерная для части этих лектинов архитектура не описана функционально для беспозвоночных животных, поэтому конкретная роль этих белков остается неясной. Также мы обнаружили новое разнообразное подсемейство галектин-подобных белков, AmGal-BDC, с характерной доменной архитектурой, которая встречается только у нескольких видов – представителей групп Mollusca, Brachiopoda и Chelicerata, но, по всей видимости, отсутствует у представителей Mandibulata и Deuterostomia (Рис. 49, 50). В транскриптом обнаружено 7 белков, содержащих ригин-домен, имеющих потенциальную агглютинирующую активность (Рис. 51). Мы отнесли их к новому семейству «митилектинов», описанных впервые для мидий *Mytilus* spp.) (Fujii, Dohmae et al. 2012, Hasan, Gerdol et al. 2016). Также несколько генов кодируют хитиназа-подобные лектины (Рис. 52), содержащие домен того же суперсемейства, что и CCF олигохет. Гомолог CCF в целомоцитах пескожила представлен двумя изоформами. Мы отмечаем новые формы описанного ранее для пескожила лектина AML-1 (Рис. 53).

*Пороформирующие молекулы* в транскриптом целомоцитов имеют неожиданно ограниченный репертуар. Не выявлено белков, содержащих домен аэролизина или MACPF, а также гомологов колицинов, актинопоринов, колупоринов, и других известных порообразующих токсинов (PFT). Кроме того, в транскриптом не обнаружено гомологов порообразующих антимикробных белков, известных для олигохет – фетидинов и лизенинов. В качестве молекул с литической активностью может выступать белок AmTOLIP-DC, содержащий домен Toxin\_TOLIP, несущий домен, обычно обнаруживаемый в ядовитых нейротоксинах и цитотоксинах змей, но также и в

структурно схожих (не змеиных) токсиноподобных белках (TOLIP). Также вероятную литическую функцию несет предшественник сапозинов, просапозин (AmpSAP).

Антимикробные пептиды в транскриптом представлены апеницинами, для которых мы обнаружили новые изоформы (Рис. 54, Г), а также потенциально митохондриальными и гистон-производными AMP.

Целомоциты *A. marina* экспрессируют ортологи генов млекопитающих LBP и BPI (Рис. 55). Хотя их парная идентичность низкая (24,2%), эти белки имеют одинаковый состав доменов и обладают характерными N- и C-концевыми доменами белка-переносчика сложного эфира холестерина (СЕТР). Примечательно, что AmLBP экспрессируется в четырех изоформах (AmLBP1-4), различающихся несколькими несинонимичными заменами, вероятно, отражающими индивидуальный полиморфизм.

Целомоциты *A. marina* экспрессируют 18 TLR, последовательности которых отличаются друг от друга более чем на 15%. Это 10 рецепторов V-типа и 8 рецепторов P-типа. Сопоставление с каноническим сигнальным путем TLR человека (KEGG: map04620; 59 белков) (Рис. 56) выявило 33 предполагаемых ортолога, участвующих в сигнальном пути TLR. В транскриптом целомоцитов обнаружены ортологи всех компонентов эволюционно консервативного MyD88-зависимого пути активации Toll-каскада. Также возможна MyD88-независимая активация сигнального каскада, которая обеспечивается двумя комплексами факторов: (PI3K)-Akt и MAPK.

Все компоненты филогенетически консервативной антиоксидантной системы присутствуют в транскриптом *A. marina*. Отдельно следует отметить каталазу, AmCAT, три супероксиддисмутазы, AmSOD1-3, а также пять пероксидаз, AmPXD1-5 (Рис. 57). Синтаза оксида азота AmNOS представлена единственной формой и имеет достаточно низкую экспрессию; гораздо активнее экспрессируется структурно подобный белок NADPH - цитохром P450 редуктаза (AmCPR), который не имеет N-концевого NO-синтазного домена, характерного для NOS.

Из имеющих фенолоксидазную активность ферментов в целомоцитах *A. marina* мы обнаружили только лакказы, экспрессируемые двумя разными генами, кодирующими белки AmLAC1 и AmLAC2 со сходной доменной архитектурой (Рис. 58) и идентичностью 37,1%. Мы не обнаружили структурных гомологов катехолоксидаз, тирозиназ или гемоцианинов.

В отсутствие гемоцианинов целомоциты *A. marina* экспрессируют семь глобиновых цепей многомерного внеклеточного гемоглобина (Hb), типичных для кольчатых червей, которые обратимо связывают кислород и другие газообразные лиганды. В дополнение к четырем цепям HBL-Hb, описанным ранее для пескожила (Chabasse et al., 2006), мы

идентифицировали три новых, AmA3, -4 и -5 (Рис. 58). У них аналогичная доменная архитектура с сигнальным пептидом и глобиновым доменом Pfam. Попарная идентичность их аминокислотных последовательностей более чем на 20% отличается от уже известных.

#### **4.4. Протеасомный комплекс целоцитов *Arenicola marina***

При изучении протеасомного комплекса целоцитов пескожила мы обнаружили, что в норме в целоцитах содержание 26S-протеасом ниже, чем это характерно для клеток млекопитающих. При этом достаточно высоко содержание субъединиц протеасом типа  $\alpha$ 1, 2, 3, 5, 6, 7 (Рис. 59, Б, 1), наблюдается небольшая концентрация протеолитической субъединицы  $\beta$ 5, а также отмечается субъединица Rpt6, входящая в состав регуляторной частицы PA700.

Протеасомный комплекс целоцитов реагирует на экспериментальную иммунную индукцию. Через 1 ч после индукции воспаления введением LPS в целоцитах наблюдается повышение химотрипсин-подобной активности (ХПА) протеасом (Рис. 59, А). В целоцитах контрольных животных (инъекция FSW) активность протеасом не изменяется. Однако стресс, вызванный введением FWS, приводит к индукции шаперонов Hsp70 и к некоторому увеличению относительного содержания в целоцитах субъединиц протеасом: структурных типа  $\alpha$ , протеолитической  $\beta$ 5 и регуляторной Rpt6, входящей в состав регулятора PA700 (Рис. 59, Б, В, проба 2). Стресс, вызванный введением LPS, вызывает существенно более выраженные изменения в протеоме целоцитов (Рис. 59, Б, В, пробы 3). Появилась новая индуцибельная форма Hsp70, значительно увеличилось содержание протеасомных субъединиц типов  $\alpha$  и  $\beta$ 5, тогда как субъединица Rpt6 регуляторного комплекса элиминировалась.

Полученные данные также подтверждаются иммуноцитохимическим окрашиванием (Рис. 60). При введении FSW повышается концентрация субъединиц типов  $\alpha$  и  $\beta$ 5, появляется Hsp70. При индукции воспаления LPS такая реакция выражается сильнее.

Следует отметить, что использование нескольких разноплановых методов при изучении протеасом беспозвоночных необходимо, поскольку все стандартные подходы для таких исследований разработаны на клетках млекопитающих. В случае применения неадаптированных методов к клеткам животных из других групп возможно возникновения ряда искажений данных. В частности, использование моноклональных антител, разработанных для клеток млекопитающих, на клетках беспозвоночных часто ведет к неспецифическому окрашиванию структур. Поэтому для подтверждения данных,

полученных биохимическими и иммуноцитохимическими методами, следует включать в набор методов филогенетический анализ первичных последовательностей таргетных белков.

При анализе транскриптома целомацитов были обнаружены последовательности, кодирующие комплекс протеасомных белков. В комплекс входят 7 субъединиц типа  $\alpha$ , 7 субъединиц типа  $\beta$ , 15 белков, входящих в состав регуляторных частиц PA200 и PA700, а также ряд белков, которые имеют высокую идентичность с зарегистрированными в глобальных базах данных как участвующие в сборке и регуляции активности протеасом.

Используя полученные для *A. marina* последовательности, а также последовательности протеасомных субъединиц других видов, взятых из базы NCBI GenBank, мы произвели анализ сходства субъединиц коровой протеасомы и регуляторных частиц (Рис. 61-64). Последовательности *A. marina* объединяются в клады с последовательностями других представителей группы Lophotrochozoa.

## 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 5.1. Морфология целомоцитов *Arenicola marina*

Согласно полученным нами данным, в популяции свободных клеток целомической жидкости пескожила постоянно присутствуют несколько морфологических типов. При этом возможная классификация живых целомоцитов не соотносится или соотносится не полностью с классификацией фиксированных клеток. Такая ситуация достаточно обычна при изучении целомоцитов и других клеточных элементов полостных жидкостей. Это связано с неизбежной деформацией и частичным разрушением клеток при фиксации, избежать которых полностью невозможно. Разные типы клеток также обладают разной способностью к адгезии, что влияет на эффективность их прикрепления к субстрату и, соответственно, встречаемость на постоянных препаратах.

Согласно самой общей классификации, все целомоциты пескожила относятся к амебоцитам. Элеоциты не были описаны для представителей семейства Arenicolidae как отдельный клеточный тип, что подтверждается нашими данными. Все целомоциты в той или иной степени способны к амебоидному движению. На основании анализа наших данных можно выделить три типа целомоцитов, которые регистрируются всеми использованными методами. Это веретеновидные амебоциты (с отростками и распластывающиеся на стекле), крупные амебоциты неопределенной формы с включениями, распластывающиеся на стекле, и мелкие амебоциты, образующие псевдоподии.

Самые мелкие амебоциты с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (Рис. 27) практически не отличаются от обычных мелких амебоцитов в живом виде и в суспензии без окраски, однако их отличие на фиксированных препаратах достаточно очевидно. С большой вероятностью эти клетки являются ювенильными (стволовыми). Ювенильные целомоциты описаны как отдельный тип целомоцитов пескожила в литературе (Dales, Dixon, 1981, Персинина, Чага, 1994).

Разные формы распластывающихся амебоцитов сохраняют общие морфологические черты на окрашенных препаратах: относительно крупные ядра, слабо окрашиваемая цитоплазма центральной части клетки и практически прозрачная цитоплазма, формирующая ламеллоподии (Рис. 21). Округлая форма вакуолизированных клеток может быть результатом накопления фагосом в веретеновидных клетках. Однако на препаратах встречаются распластывающиеся округлые целомоциты меньшего размера и без большого количества включений. Часть мелких целомоцитов, не образующая



выраженных псевдоподий, при окрашивании сходна внешне с такими клетками (Рис. 25). Кроме того, попадающиеся на препаратах мелкие целоמוциты с фагосомами и без псевдоподий имеют такие же ядра и так же окрашиваются (Рис. 26). Возможно, распластывающиеся веретенovidные и распластывающиеся округлые целоמוциты не являются последовательными стадиями развития одной клеточной линии, но скорее всего имеют одного предшественника. Мелкие амебоциты с псевдоподиями, возможно, являются отдельной клеточной линией.

Неясно, являются ли отдельным типом шарообразные целоמוциты с включениями (Рис. 23). В живом виде эти клетки достаточно долго сохраняют четкую форму и не распластываются по стеклу. При этом в образцах, зафиксированных в суспензии, клетки такого размера и с такими включениями не отмечаются. Выделяемые округлые клетки с включениями (Рис. 20) в среднем крупнее и по внешнему виду включений и их неоднородности больше похожи на распластывающиеся амебоциты, в суспензии сохраняющие четкую форму. Возможно, шарообразные целомоциты не переживают фиксацию, имеют плохую адгезивную способность, или являются такими же распластывающимися целомоцитами, по какой-то причине не осевшими в течение наблюдений. Например, на рисунке 23 Г, скорее всего, представлен распластывающийся целомоцит, не упевший осесть, поскольку в его цитоплазме есть крупные вакуоли и оптически плотные включения.

Распластывающиеся амебоциты не были ранее описаны. Это связано с тем, что обе упомянутые классификации (Dales, Dixon, 1981, Персинина, Чага, 1994) основаны на изучении целомоцитов, зафиксированных в суспензии. Наблюдений за поведением живых клеток авторы не проводили.

При этом классификация Дейлса и Диксона сопоставима с нашей. Клетки с длинными отростками Дейлс и Диксон обозначили как «шнуровидные», а распластывающиеся амебоциты с включениями – как вакуолизированные амебоциты. Описание «веретенovidных» клеток соответствует распластывающимся (средним) веретенovidным амебоцитам в нашей классификации. На уровне ультраструктуры в веретенovidных амебоцитах было отмечено скопление микрофиламентов вокруг ядер, что косвенно подтверждает связь этого типа клеток с клетками с длинными отростками («шнуровидными»), и также подтверждается нашими данными (Рис. 14).

Персинина и Чага (1994) выделили типы амебоцитов, которые не выделяем мы. Отдельно авторы описывают эозинофильные клетки, которые могут иметь округлую или веретенovidную форму. Их цитоплазма интенсивно окрашивается эозином и

акридиновым оранжевым. Ядра этих клеток палочковидные, кроме того, попадаются двуйдерные формы с плотно упакованным хроматином. Эозинофилы составляют не более 2% клеточной популяции и, по утверждению авторов, представляют собой деградирующие клетки, вставшие на путь апоптоза. Описания и иллюстрации авторов сходны с тем, что мы отмечали среди веретенновидных целомоцитов, которые распластываются на стекле; однако мы не можем заключить, что гранулы в их цитоплазме резко эозинофильны. При окрашивании эозином в нашей работе интенсивно окрашивалась цитоплазма всех клеток, гранулы сохраняли достаточно равномерную окраску, не различаясь между типами клеток. Также авторы описали гранулоциты как клетки диаметром до 20 мкм с резко эозинофильными гранулами в цитоплазме. По всей видимости, это описание соответствует тому типу клеток, который мы обнаруживали среди живых целомоцитов (Рис. 23, А) и только единично обнаруживали на фиксированных на стекле препаратах. У этих клеток действительно выделяются базофильные гранулы, четко отличные от остальной цитоплазмы, однако их окрашивание происходит неравномерно в разных условиях. Дейлс и Диксон этот тип клеток не отмечали. В описании Персининой и Чаги отмечены клетки с «полихромными гранулами», которые, судя по всему, соответствуют распластывающимся округлым целомоцитам с включениями. Авторы отметили, что такие клетки характерны только для самцов в период активного гаметогенеза. Однако, по нашим данным, они встречаются не только у самцов, но и у самок.

Вопрос гистогенетических взаимоотношений разных морфотипов целомоцитов пескожила также остается открытым. Персинина и Чага (1994, 1995) предположили, что клеточная линия веретенновидных амeboцитов (молодые – средние – зрелые) является последовательными стадиями дифференцировки одного и того же типа клеток, который берет начало из пула ювенильных клеток. Проведенные нами предварительные эксперименты с меткой EdU косвенно свидетельствуют о наличии делящихся клеток (вероятно, ювенильных) в целомической жидкости, однако сам факт наличия способных к пролиферации клеток не является прямым доказательством наличия линии дифференциации. Доля «ювенильных» целомоцитов в общей популяции невелика и составляет не более 4-6%. С большой вероятностью, обновление популяции целомоцитов как минимум частично обеспечивается неким внешним источником. По аналогии с другими представителями аннелид, таким источником могут являться специализированные участки целотелия – выстилки стенки тела, диссепиментов, сосудов.

Помимо возникающей в классификации целомоцитов даже в пределах одного вида терминологической путаницы, определение клеточных морфотипов осложняется наличием в клеточной популяции клеток переходных форм. То, что мы не можем в полной мере сопоставить наши данные с проведенными ранее исследованиями, отражает общую методологическую сложность при работе с клетками полостных жидкостей беспозвоночных беспозвоночных. Даже при использовании общепринятых методов на одном и том же объекте результаты могут сильно различаться, что делает практически невозможным корректное сравнение полученных данных. В связи с этим использования только морфологических признаков для классификации целомоцитов недостаточно.

## 5.2. Участие целомоцитов *Arenicola marina* в защитных реакциях

### Фагоцитоз

Фагоцитарная активность целомоцитов пескожила отмечена в литературе. При инъекции в целомическую полость бактерий в концентрации  $1,80 \cdot 10^7$  клеток на миллилитр жидкости 60-75% бактерий оказывались поглощены целомоцитами в течение первых десяти минут, 90% - в течение первого часа после инъекции (Fitzgerald, Ratcliffe, 1989). При этом в целомической жидкости активно образовывались клеточные агрегаты, которые накапливали пигмент и превращались в «коричневые тельца». Кроме того, авторы отметили, что отдельные фагоцитирующие клетки мигрировали из целомической полости в окружающие ткани. Также отмечено, что целомоциты пескожила способны фагоцитировать оставшиеся после нереста гаметы (Персинина, Чага, 1994).

По всей видимости, к фагоцитозу в той или иной степени способны все типы целомоцитов. Наши результаты показывают, что амебоциты с включениями и «веретенновидные» амебоциты начинают фагоцитировать в первую очередь, привлекая окружающие клетки для формирования агрегатов. При этом распластанные клетки, вероятно, могут передавать фагосомы другим клеткам. Мелкие гранулоциты после осуществления фагоцитоза сливаются с агрегатами, тогда как распластанные клетки могут формировать «мостики» между соседними агрегатами.

Интерпретацию результатов экспериментов с фагоцитарной активностью целомоцитов в условиях *in vitro* осложняет несколько факторов. Во-первых, часть клеток может не успеть осесть и в итоге не может быть отмечена на постоянных окрашенных препаратах. Во-вторых, процесс оседания и адгезии к поверхности сам по себе является формой иммунного реагирования, которая ведет к изменению естественного физиологического состояния и, вероятно, поведения клеток. Мы предполагаем, что этот фактор частично влияет на специфичность некоторых реакций клеток, в частности, на

ферментативную активность в клетках. На оптическом уровне исследования может быть невозможно определить, сформировалась ли фагосома или клеточная мембрана адгезировала частицу зимозана. Используемые в подобных экспериментах методики обычно определяют наличие активности кислых фосфатаз в фагосомах, а такие окраски в нашем случае часто дают неспецифичные результаты.

Тем не менее, наши данные показывают, что наличие способности как к амебоидному движению, так и к фагоцитозу, являются именно чертой функциональности целомицитов. В пользу наличия фагоцитарной активности говорят прижизненные наблюдения за клетками, а также процесс подготовки постоянных препаратов экспериментальных образцов, при котором препараты несколько раз отмываются от фиксатора, что должно удалить частицы индуктора, находящиеся снаружи клеток. Кроме того, образование плотных агрегатов, соединенных друг с другом распластывающимися клетками, приводит к разрушению клеток и пигментации образованного агрегата, чего не происходит с клетками без иммунной индукции.

Наконец, невозможно избежать разрушения и гибели части клеток в процессе эксперимента. Контрольные эксперименты с окраской йодистым пропидием (PI) показывают, что в среднем при помещении на стекло образцов целомической жидкости доля погибших клеток составляет около 7-10%. При этом четкой корреляции с морфологией клеток не отмечается, среди погибших клеток встречаются все морфологические типы. При длительных наблюдениях этот показатель несколько увеличивается. Однако в случае экспериментальной индукции с помощью частиц зимозана в течение часа численность погибших клеток возрастает в среднем до 12-13%. Конечно, в некоторых образцах смертность клеток может составлять до 50%, но такие случаи возможны и в контрольных образцах. Катастрофического повышения процента смертности клеток при экспериментальной индукции иммунного ответа мы не отметили.

### *Инкапсуляция*

У *A. marina* инкапсуляции подвергаются инородные тела как абиотической, так и биотической природы: стеклянные шарики и отрезки собачьей шерсти соответственно. Вместе с тем существуют данные, что у некоторых видов полихет – например, у *Nereis diversicolor* (Porchet-Hennere, Berri, 1987) – абиотические (возможно, инертные с иммунологической точки зрения) объекты не вызывают защитной реакции при попадании в целомическую полость червя. Наши данные показывают, что у *A. marina* реакция на стеклянные имплантанты все же выражена, хоть и в меньшей степени, чем реакция на органический имплантант. Можно говорить о том, что в случае инертных (стеклянных)

имплантантов процесс инкапсуляции оказывается менее интенсивным и происходит медленнее по сравнению с инкапсуляцией биотического материала. Тем не менее, стеклянные шарики также воспринимаются организмом червя как инородный материал, что вызывает защитную реакцию.

В процесс инкапсуляции у пескожила вовлечены целомоциты разных типов. Мы предполагаем, что функцию распознавания инородного тела выполняют вакуолизированные распластывающиеся амебоциты, дегранулирующие на поверхности ИТ и привлекающие другие типы клеток. В итоге содержимое вакуолей и остатки разрушенных клеток формируют неклеточный внутренний слой капсулы. Средний слой сформирован, в первую очередь, мелкими гранулоцитами. Шнуровидные амебоциты образуют внешние слои капсулы. Веретеновидные амебоциты могут также принимать участие в формировании капсулы, но на основании только морфологических данных этого нельзя утверждать. Помимо неизбежно присутствующих артефактов фиксации и резки морфология целомоцитов претерпевает изменения по сравнению с исходным состоянием в связи с непосредственно инкапсуляцией: клетки активно меняют форму, некоторые дегранулируют, другие, наоборот, начинают накапливать гранулы.

Для *N. diversicolor* показано, что функцию распознавания чужеродного материала выполняют гранулоциты III типа (Porchet-Henneré, 1990). У пескожила описанию этих клеток соответствуют мелкие гранулярные амебоциты, однако достоверно отличить их на срезах во внутреннем слое капсулы не удастся. Пигментация капсулы у нерейса обеспечивается гранулоциты типа II, в цитоплазме которых содержится предшественник феноксидазы (Porchet-Henneré, Vernet, 1992). Скорее всего, аналогичным типом клеток у пескожила являются распластывающиеся веретеновидные амебоциты. У зрелых капсул возрастом более 6 суток гранулы в некоторых клетках имеют хорошо выраженную коричневую окраску. По аналогии с данными для нерейса и других видов аннелид можно предположить, что в таких клетках происходит меланизация (Рис. 41). Вполне возможно, что пигментация капсул и клеточных агрегатов является одной из специфических функций этого типа клеток, но в наших данных четких доказательств этому нет.

Скорость формирования капсул сопоставима у разных видов полихет. У *N. diversicolor* лизис целомоцитов на поверхности имплантанта наблюдается практически сразу после введения его в целом. Через несколько часов имплантант оказывается окружен многочисленными клетками, а через сутки капсула уже сформирована полностью (Porchet-Hennere et al., 1987). Похожая скорость процесса наблюдается у другого изученного нами вида – *Lepidonotus squamatus* (Linnaeus, 1758) из семейства Polynoidae (Становова, 2014, курсовая работа). У *A. marina* распознавание инородного тела и лизис

целомоцитов на его поверхности также наблюдается в первые часы, однако в силу неоднородности строения капсул даже возраста 14 суток сложно сказать, до какого момента продолжается процесс прикрепления к капсуле новых клеток.

При сравнении строения капсул *A. marina* и *L. squamatus* можно сделать вывод, что у *A. marina* инкапсуляция выглядит как менее четкий процесс. Видимо, есть сильные индивидуальные различия в иммунной реактивности клеток разных особей *A. marina*, что можно заметить на капсулах одного возраста. У *L. squamatus* на вторые сутки инкапсуляции капсула имеет достаточно четкую структуру, в которой можно выделить три слоя, образованных клетками с разной морфологией (Рис. 65, А). У *A. marina* такой четкой структуры не наблюдается и на более поздних сроках. Кроме того, клетки со схожей морфологией у пескожила встречаются как в ранних, так и в более поздних слоях капсулы. Клетки поверхностного слоя капсулы остаются подвижными в течение продолжительного времени – 8-12 суток. Можно предположить, что это связано с размерами червя. У *L. squamatus* свободная целомическая полость имеет небольшой объем, и количество свободных клеток у него на несколько порядков меньше, чем у *A. marina*. Поэтому оказавшиеся в полости инородные тела, с одной стороны, остаются в одном месте, а с другой стороны, подвергаются воздействию не очень большого числа клеток. Поэтому инкапсуляция идет эффективно, но не очень быстро. У *A. marina* большая полость тела, и в торакальной части отсутствуют диссепименты, что позволяет целомической жидкости свободно перемешиваться. Поэтому оказавшиеся в целоме инородные тела двигаются вместе с жидкостью и все время оказываются под воздействием многих клеток. Возможно, поэтому капсула постоянно окружается новыми подвижными клетками и долго не приобретает плотной структуры.

На электронно-микроскопическом уровне капсулы *L. squamatus* имеют более плотную структуру, клетки в среднем слое тесно переплетаются между собой, а последние слои клеток у поверхности капсулы постепенно приобретают черты эпителизированных клеток (Рис. 65, В, Г). У *A. marina* не наблюдается ничего похожего. Напротив, у этого вида клетки разных типов как будто беспорядочно разбросаны по разным слоям капсулы, а у поверхности капсулы происходит постоянное передвижение амебоцитов (Рис. 42). Возможно, процесс инкапсуляции активно продолжается до момента выведения инородных тел из организма или же их полного разрушения.

### Связывание липополисахарида

Липополисахариды (LPS) – характерный компонент клеточной стенки Грам-отрицательных бактерий (Mayer et al., 1985). Выделенные и очищенные LPS активно используются в экспериментальной иммунологии в качестве антигена, стимулирующего антибактериальный иммунный ответ. В частности, экспериментальная индукция воспаления с помощью LPS использовалась при изучении иммунных систем беспозвоночных животных: иглокожих (Nair et al., 2005; Dong et al., 2014), моллюсков (Conte, Ottaviani, 1995; Sullivan, 2011), пиявок (de Eguileor et al., 2000) и других.

Связывание молекул LPS мембранами клеток говорит о наличии на них определенных паттерн-распознающих рецепторов, обеспечивающих узнавание чужеродного материала. Согласно нашим результатам, в популяции целомоцитов *A. marina* распознавание и связывание LPS осуществляют определенные типы клеток: вакуолизированные и веретеновидные амебоциты. Такая специфичность реакции позволяет предполагать, что разные типы целомоцитов *A. marina* имеют разный набор мембранных рецепторов, что говорит о принципиальном различии в их функциональности. В более ранних исследованиях (Fitzerald, Rattcliff, 1983) отмечено дифференцированное реагирование субпопуляций целомоцитов *A. marina* на Грам+ и Грам-бактерии. Авторы отмечали, что клетки, соответствующие в нашем описании расплывающимся вакуолизированным целомоцитам, активнее фагоцитируют Грам-бактерии, что согласуется с нашими экспериментами.

Следует, однако, отметить, что полученные нами с помощью конфокальной микроскопии данные могут быть не совсем объективны. Для целомоцитов пескожила, особенно тех, которые имеют в цитоплазме включения, характерна достаточно сильная автофлуоресценция в зеленом спектре. Чтобы снизить возможное влияние этого фактора, мы настраивали параметры лазера относительно неокрашенных клеток, снижая уровень фонового шума до параметра, при котором нативные клетки не выдавали флуоресцентного сигнала. Полученные иллюстрации (Рис. 43-45) показывают специфичное окрашивание при низкой интенсивности и яркости свечения лазера и высоком значении фонового шума. Тем не менее, для полной уверенности в специфичности связывания LPS необходимы дополнительные подтверждения наших результатов.

В ранних исследованиях отмечали переход целомоцитов пескожила из одной формы в другую при изменении физиологического статуса (Faure-Fremiet, 1925). Согласно этим данным, при индукции фагоцитоза веретеновидные целомоциты могут переходить в

округлую форму и распластываться на субстрате. При этом их цитоскелет частично разрушается, а в цитоплазме появляются гранулы. Персинина и соавторы (1998) провели специальное исследование цитоскелета веретеновидных клеток и сделали вывод, что в этих клетках в особой форме запасается фибриллярный актин, что может обеспечивать быстрые перестройки цитоскелета и переход к амебоидному движению. По всей видимости, именно по этой причине на постоянных препаратах осевших целомоцитов отличить крупные веретеновидные клетки с отростками («шнуровидные») удается редко.

Возможность быстрого перехода целомоцитов из одной формы в другую отражается также на информативности гистологических окрашиваний. Так, большинство красителей реагирует на рН цитоплазмы и вакуолей в клетках. Судя по нашим наблюдениям, этот показатель в клетках пескожила, особенно в условиях защитной реакции, может меняться достаточно быстро, в результате чего использование одного и того же метода окраски может давать принципиально разные результаты, что осложняет сравнение контрольных и экспериментальных образцов.

Обобщая полученные нами данные по морфологии целомоцитов, их поведению и участию в клеточных защитных реакциях, а также данные литературных источников, можно выделить следующие **морфофункциональные** типы целомоцитов: ювенильные, мелкие амебоциты (гранулоциты) с псевдоподиями, шнуровидные амебоциты, распластывающиеся веретеновидные амебоциты, распластывающиеся вакуолизированные амебоциты округлой формы. Последние два типа не были ранее описаны.

Возможная схема цитогенетических взаимосвязи клеточных типов, основанная на морфологических и функциональных признаках, представлена на рисунке 66, однако этот вопрос требует дальнейшего изучения.

### **5.3. Анализ транскриптома целомоцитов *Arenicola marina***

Имеющаяся молекулярно-генетическая информация о представителях группы аннелид обрывочна. Среди всего разнообразия видов только два представителя группы – полихета *Capitella capitata* и пиявка *Helobdella robusta* – стали объектами полногеномных исследований. Для некоторых видов люмбрицид были секвенированы транскриптомы, доступные в публичных базах данных. Однако попытки секвенировать транскриптом конкретно популяции целомоцитов на представителях аннелид не предпринимались. Транскриптомы, полученные для других тканей, обычно оказываются неинформативны с точки зрения идентификации иммунно-ассоциированных генов, поскольку уровень



экспрессии таких генов в неспециализированных тканях, как правило, низок. В этом свете представляется важным наличие транскриптома целомоцитов пескожила как модельного объекта изучения иммунных систем аннелид.

Анализ сборки транскриптома позволяет считать, что эта сборка основана на глубоком чтении РНК пула целомоцитов и является подробной и информативной выборкой экспрессируемых в целомоцитах генов. Подготовленная нами база аннотированных белковых последовательностей представляет необходимый фундамент для точечного поиска и изучения конкретных белков, их структуры и функциональности, а также для проведения сравнительных анализов с последовательностями других организмов.

Анализ сборки транскриптома показывает, что пескожил имеет сложную молекулярную основу иммунного реагирования, представленную как консервативными, так и быстро эволюционирующими группами генов. Некоторые черты из представленных в транскриптом характерны для других представителей лопфотрохозойных животных, однако в транскриптом целомоцитов пескожила наблюдается выраженная таксон-специфичность.

Наши результаты предполагают, что AmTEP выполняют двойную эволюционно консервативную функцию как ингибиторы протеаз и опсоины. Вместе с рецепторами комплемента AmCRL, AmTEP могут участвовать в иммунном ответе через систему протокомплемента. В транскриптом целомоцитов обнаружен набор Toll-like рецепторов, потенциально участвующих в эволюционно консервативном сигнальном каскаде через MyD88. Также возможны MyD88-независимые пути сигналинга.

Мы обнаружили более 75 белков, предположительно действующих как полиморфные лектин-подобные PRR. Это разнообразие можно объяснить результатом работы трех механизмов: 1) дубликацией в геноме, 2) экспансией из-за высокой активности транспозонов и связанных с ретровирусами мобильных элементов и 3) индивидуальным полиморфизмом. Биологическое значение новых полиморфных мультигенных групп молекул AmCTLDCr и AmGal-BDC, которые были обнаружены в нашем исследовании, еще предстоит установить экспериментально. На настоящий момент для аннелид не были описаны функциональные PRR на поверхности целомоцитов, и белки групп AmCTLDCr и AmGal-BDC могут быть кандидатами на эту роль. С другой стороны, мы отмечаем ограниченный репертуар лектинов C1qDC и FreDC в транскриптом *A. marina*, хотя эти группы полиморфных лектиновых PRR широко представлены у других Lophotrochozoa.

Другой особенностью транскриптома пескожила является ограниченный арсенал порообразующих белков у *A. marina* по сравнению с другими видами беспозвоночных. В транскриптом отсутствуют перфорины, содержащие МАСРФ- и аэролизин-домены. Для сравнения, у моллюсков широко представлены перфорины обоих семейств. Экспрессия AmTOLIP-DC и AmpSAP (Рис. 54 А, Б) в целомочитах относительно высока, что может объяснять отсутствие более «классических» пороформирующих молекул. Мы также отмечаем различия в репертуаре антимикробных пептидов у пескожила и дождевых червей *Eisenia*: эти пептиды специфичны для таксонов и не перекрываются. Более того, репертуар AMP, по-видимому, различен у представителей близкородственных семейств полихет, Nereididae и Arenicolidae. Такое разнообразие внутри одной группы можно объяснить быстрой эволюцией генов иммунитета под воздействием биотопических эффектов.

Мы описали репертуар консервативных белков, метаболизирующих активные формы кислорода (ROS) и оксид азота (NO), которые вырабатываются целомочитами *A. marina* для осуществления клеточно-опосредованной цитотоксичности в отношении патогенов. При этом фенолоксидазная (PO) активность в целомочитах осуществляется только лакказой, выявление которой требует высокой специфичности субстрата, что объясняет неудачные попытки показать фенолоксидазную активность у пескожила биохимическими методами.

#### **5.4. Протеасомный комплекс целомочитов *Arenicola marina***

Протеасомный комплекс играет ключевую роль в поддержании белкового гомеостаза в клетках эукариот. У млекопитающих выделены специализированные иммунные субъединицы протеасом, характерные для выполняющих иммунную функцию клеток. У беспозвоночных животных состав протеасом и их участие в иммунном ответе в принципе плохо изучены.

В рамках нашего исследования впервые изучен протеасомный комплекс целомочитов вида морских аннелид в норме и при развитии экспериментальной иммунной реакции. Характерной особенностью протеасом целомочитов оказалось низкое содержание формы 26S по сравнению со стандартным паттерном протеасом клеток млекопитающих с превалирующей формой 26S и протеасомой 20S в комплексе с другими активаторами PA (Рис. 59, Г, дорожка М). Это свидетельствует о том, что в состоянии физиологической нормы протеасомная система целомочитов пескожила специализируется преимущественно на гидролизе неубиквитинированных белков.

Полученные результаты свидетельствуют о неодинаковой защитной реакции целомоцитов пескожила на разные виды стрессового воздействия. Слабый стресс (введение FWS) вызывает незначительную индукцию шаперонов и субъединиц протеасом, при этом протеасомная активность может не меняться. Инфицирование (введение ЛПС) приводит к существенно более выраженной индукции шаперонов и субъединиц 20S протеасом в целомоцитах. Элиминация регуляторной субъединицы Rpt6 в условиях сильного стресса указывает на сдвиг протеолитической активности с системы 26S протеасом на систему 20S протеасом. Инфицирование приводит к полной диссоциации высокомолекулярных регуляторов PA700 и PA200, что сопровождается увеличением подвижности протеасом 20S в геле при электрофорезе (Рис. 59, Г, дорожка 3). Функциональный сдвиг протеасомной системы целомоцитов при сильном стрессе приводит к протеолизу в «чистых» 20S протеасомах и хорошо согласуется с представлениями о том, что именно коровая форма 20S осуществляет гидролиз денатурированных, поврежденных и окисленных белков при стрессах разной природы у многоклеточных животных (Livnat-Levanon et al., 2014).

Скорость качественного изменения протеасомного комплекса в течение иммунной реакции (час после инъекции), вероятно, свидетельствует о том, что изменение протеасомного комплекса не связано с синтезом новых белков, а обеспечивается за счет пост-трансляционных перестроек комплекса, что требует наличия активной системы регуляции состава протеасом.

Обнаруженные в базе транскриптома целомоцитов последовательности, с высокой вероятностью связанные с протеасомным комплексом, представлены 43 наименованиями. Помимо основных субъединиц коровой протеасомы и субъединиц активаторов PA200 и PA700 в транскриптом обнаруживаются последовательности, относящиеся к системе регуляции протеасомных комплексов. Филогенетическое сравнение последовательностей коровых субъединиц протеасом *A. marina* и других видов животных дает информативный результат даже на небольшой выборке. Максимальная схожесть последовательностей  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц протеасом пескожила наблюдается с таковыми представителей других групп первичноротых животных. Представители вторичноротых также объединяются в кладу. Это говорит о высокой консервативности данных последовательностей.

Наличие на построенных деревьях политомии (неразрешенных филогенетических отношений) объясняется, с одной стороны, недостаточностью выборки, с другой – высокой консервативностью используемых для анализа последовательностей.

В силу своей консервативности протеасомы являются удобной моделью для отработки биохимических методов работы с клетками немодельных организмов. При использовании отработанных для млекопитающих методик на беспозвоночных животных велика вероятность неспецифических реакций, например, при окраске антителами. Высокая степень идентичности первичных последовательностей протеасом у разных животных позволяет подтвердить степень достоверности используемых методов. Так, контроль иммуноцитохимического окрашивания с использованием молекулярных данных позволяет говорить об определенной степени точности результатов. Идентичность (identity) первичной структуры коровых субъединиц протеасом *A. marina* и *Mus musculus* варьирует в пределах 73-84%, при этом значение схожести (similarity) у отдельных белков достигает 98%. Это позволяет предположить, что окраска клеток пескожила мышинными антителами будет давать относительно достоверный результат. Подобное сочетание подходов необходимо при работе с немодельными объектами.

## 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение целомоцитов – ключевого компонента иммунных систем кольчатых червей – в целом велось непоследовательно. Несмотря на ключевое филогенетическое положение и несомненную экологическую значимость этой группы, только несколько видов аннелид изучено с точки зрения морфологии и функционирования иммунных клеток. Отсутствие универсальной классификации и общепринятого подхода к изучению связи морфологии и функций целомоцитов не позволяет делать сравнительных выводов на основании имеющейся на данный момент информации.

Представители морских аннелид (полихет) являются потенциально удобными объектами для изучения адаптивных возможностей «простых» иммунных систем, в том числе на молекулярном уровне.

В нашей работе мы исследовали целомоциты распространенного вида аннелид – *Arenicola marina*, морского пескожила. На основании собственных данных, обобщенных с литературными, мы провели ревизию классификации этих клеток по морфологическим признакам. Результаты экспериментальных исследований позволили нам частично связать морфологию типов целомоцитов с их ролью в защитных реакциях разного характера. Так, распластывающиеся амебоциты разных форм выполняют в первую очередь распознающую и сигнальную функции. Мелкие гранулоциты и являются клетками-эффекторами, осуществляющими фагоцитоз и инкапсуляцию. Шнуровидные амебоциты, по всей видимости, занимают промежуточное положение с точки зрения функциональности.

Получение любых молекулярно-генетических данных о целомоцитах аннелид на данный момент остается актуальным в связи с низкой степенью изученности группы в целом. Полученный нами транскриптом целомоцитов позволит оценивать участие отдельных белков, экспрессируемых в разных типах целомоцитов, в организации иммунного ответа. Наш первичный анализ значительно расширяет представления о составе молекулярных факторов иммунитета у морских аннелид. Описанный нами набор белков, потенциально задействованных в системном иммунном ответе, является необходимой базой для дальнейших функциональных и сравнительных исследований.

Показанное нами отличие функционирования протеасомного комплекса целомоцитов от такового клеток млекопитающих является интересным подтверждением тому, что процессы адаптации к стрессу на молекулярном уровне у морских беспозвоночных могут в корне отличаться от таковых у позвоночных животных.

Сравнение разных видов аннелид с точки зрения состава и функционирования иммунных систем на данный момент остается невозможным даже в пределах одного семейства. Это обусловлено как в целом недостаточной изученностью группы, так и, так и объективной морфологической гетерогенностью целоцитов разных представителей группы. Дальнейшее изучение целоцитов других видов морских аннелид с применением подобного комплексного подхода позволит значительно расширить представления об иммунных системах аннелид и беспозвоночных животных вообще.

## ВЫВОДЫ

1. На основании анализа полученных в данной работе результатов и литературных данных в целомической жидкости *Arenicola marina* выделено пять морфологически отличных типов амебоцитов: (1) ювенильные, (2) мелкие амебоциты (гранулоциты) с псевдоподиями, (3) шнуровидные амебоциты, (4) распластывающиеся веретеновидные амебоциты, (5) распластывающиеся вакуолизированные амебоциты округлой формы. Распластывающиеся амебоциты не были ранее описаны для этого вида.
2. При изучении закономерностей реагирования целомоцитов на экспериментальную индукцию иммунного ответа выявлен различный вклад типов целомоцитов в осуществление фагоцитоза и инкапсуляции инородных тел. Два типа распластывающихся амебоцитов (веретеновидные и вакуолизированные) инициируют агрегацию других типов клеток в процессе фагоцитоза инородных частиц и осуществляют распознавание микробных паттернов. Мелкие гранулоциты амебоциты активно фагоцитируют и осуществляют реакцию инкапсуляции. Шнуровидные амебоциты также участвуют в процессе инкапсуляции.
3. В связывании липополисахарида *E. coli* активное участие принимают вакуолизированные и частично веретеновидные распластывающиеся амебоциты.
4. Впервые отсеквенирован и частично аннотирован транскриптом целомоцитов представителя аннелид. Анализ транскриптома показывает, что иммунная система пескожила на молекулярном уровне включает как высококонсервативные, так и быстро эволюционирующие группы генов. Полученные данные и проведенный анализ выявляют группы молекул, потенциально участвующих в системном иммунном ответе. Описанные группы молекул относятся как к рецепторным, так и к эффекторным факторам.
5. Описан протеасомный комплекс целомоцитов *Arenicola marina*, состоящий из 43 белков, включая субъединицы протеасом и комплекс шаперонов. Обнаружен функциональный сдвиг протеасомной системы в сторону гидролиза неубиквитинированных белков. Индукция воспаления вызывает полную элиминацию регуляторных частиц комплекса, синтез новых форм шаперонов и повышение химотипсин-подобной активности протеасом.

**Благодарности.** Автор выражает свою самую искреннюю благодарность научному руководителю – Игорю Арнольдовичу Косевичу, за всестороннюю поддержку и понимание. Своим соавторам за сотрудничество и помощь в овладении новыми методами. Александру Михайловичу Горбушину за возможность осуществить сложный масштабный проект и бесценную помощь советом. Автор благодарит к.б.н. Е.И.

Шагимарданову и к.б.н. О.А. Гусева за поддержку исследования. Автор благодарит заведующего межкафедральной лабораторией электронной микроскопии Биологического факультета МГУ Г.Н. Давидовича, ведущего инженера А.Г. Богданова и инженеров МЛЭМ и сотрудников Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова за предоставление возможности работы на трансмиссионном и сканирующем электронных микроскопах и конфокальном лазерном сканирующем микроскопе. Выражаю благодарность всем моим друзьям и коллегам за поддержку и помощь.



## 7. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Галактионов В.Г. Эволюционная иммунология. – М.: Академкнига, 2005. – 256 с.
2. Горышина Е.Н., Чага О.Ю. Сравнительная гистология тканей внутренней среды с основами иммунологии: Учебное пособие: Для биологических специальных вузов. – ЛГУ, 1990. – 320 с.
3. Жирков И.А. Полихеты Северного ледовитого океана. – М.: Янус-К. – 2001. 632 с.
4. Кудряева А.А., Белогуров А.А. Протеасома: наномашинерия созидательного разрушения //Успехи биологической химии. – 2019. – Т. 59. С. 323–392.
5. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. – СПб.: Наука, 1994. – 400 с.
6. Персинина М., Чага О. Обновление и дифференцировка клеток целомической жидкости у полихеты *Arenicola marina*. I. Морфология и классификация целомоцитов //Цитология. – 1994. – Т.36. – С. 261-267.
7. Персинина М., Чага О. Обновление и дифференцировка клеток целомической жидкости у полихеты *Arenicola marina*. II. Клетки с полихромными гранулами //Цитология. – 1994. – Т.35. – С. 268-274.
8. Персинина М., Чага О. Обновление и дифференцировка клеток целомической жидкости у полихеты *Arenicola marina*. III. Авторадиографический анализ //Цитология. – 1995. – Т.37. – С. 101-112.
9. Персинина М.С., Подгорная О.И., Дьяконова М.Ю., Чага О.Ю., Михайлова Н.А. Исследование цитоскелета целомоцитов у полихеты *Arenicola marina*. I. Реаранжировка цитоскелета при дифференцировке целомоцитов// Цитология. – 1998. – Т.40. – С. 206-209.
10. Ройт А. Основы иммунологии. Пер. с англ. – М.: Мир, 1990. – 328 с.
11. Сорокин А. В., Ким Е. Р., Овчинников Л. П. Протеасомная система деградации и процессинга белков //Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 3-76.
12. Становова М.В. Изучение реакции инкапсуляции у полихеты *Lepidonotus squamatus*. – 2014. – Москва. – Курсовая работа. – 38 с.
13. Степанова А.А., Люпина Ю.В., Шарова Н.П., Ерохов П.А. //Нативная структура иммунных протеасом печени крысы //Доклады Академии Наук. – 2016. – Т. 468. – №. 3. – С. 339.
14. Abeloos M. Recherches histochemique et physiologiques sur le parenchyme et les nephridies des Huridinees Rhynchobdelles //Bulletin biologique de la France et de la Belgique. – 1925. – Vol.59. – P. 436-456.
15. Adamowicz A. Morphology and ultrastructure of the earthworm *Dendrobaena veneta* (Lumbricidae) coelomocytes // Tissue and Cell. – 2005. – Vol.37. – No.2. – P.125–133.
16. Adamowicz A., Wojtaszek J. Morphology and phagocytotic activity of coelomocytes in *Dendrobaena veneta* (Lumbricidae) // Zoologica Poloniae. – 2001. – Vol.1. – No.46. – P. 1–4.
17. Affar E.B., Dufour M., Poirier G.G., Nadeau D. Isolation, purification and partial characterization of chloragocytes from the earthworm species *Lumbricus terrestris* // Molecular and Cellular Biochemistry. – 1998. – Vol.185. – P.123–133.
18. Bard J. A. M., Goodall E. A., Greene E. R., Jonsson E., Dong K. C., Martin A. Structure and function of the 26S proteasome //Annual review of biochemistry. – 2018. – Vol.87. – P. 697-724.
19. Baskin D. G. The coelomocytes of nereid polychaetes // Contemporary Topics in Immunobiology. Springer US. – 1974. – P.55–64.
20. Beschin A, Bilej M, Hanssens F, Raymakers J, Van Dyck E, Revets H, Brys L, Gomez J, De Baetselier P, Timmermans. Identification and Cloning of a Glucan-and Lipopolysaccharide-binding Protein from *Eisenia foetida* Earthworm Involved in the Activation of Prophenoloxidase Cascade //Journal of Biological Chemistry. – 1998. – Vol.273. – №. 38. – P. 24948-24954.
21. (Beschinn, Bilej et al. 1998) Bilej M. Procházková P., Roubalová R., Škanta F., Dvořák J. Annelida: Recognition of Nonself in Earthworms //Advances in Comparative Immunology. – Springer, Cham, 2018. – P. 161-172.

22. Bilej M., Procházková P., Šilerová M., Josková R. Earthworm immunity // Söderhäll K. (ed.). Invertebrate immunity. – Boston, MA: Springer. – 2010. – P.66–79.
23. Bilej M., Síma P., Slipka J. Repeated antigenic challenge induces earthworm coelomocyte proliferation // Immunology Letters. – 1992. – Vol.32. – No.2. – P.181–184.
24. Boidin-Wichlacz C., Vergote D., Slomianny C., Jouy N., Salzet M., Tasiemski A. Morphological and functional characterization of leech circulating blood cells: role in immunity and neural repair // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2012. – Vol.69. – No.10. – P.1717–1731.
25. Bonnier P., Porchet-Henneré E., Baert J.L. Identification of the eleocytes as the vitellogenin producing cells in nereids // Biology of the Cell. – 1991. – Vol.73. – No.2-3. – P.179–181.
26. Bowerman B., Kurz T. Degrade to create: developmental requirements for ubiquitin-mediated proteolysis during early *C. elegans* embryogenesis // Development. – 2006. – Vol.133. – No. 5. – P. 773-784.
27. Brinkhurst R.O., Jamieson B.G.M. Aquatic Oligochaeta of the World. – University of Toronto Press. – 1971. – 860 p.
28. Burke J.M. An ultrastructural analysis of the cuticle, epidermis and esophageal epithelium of *Eisenia foetida* (Oligochaeta) // Journal of Morphology. – 1974. – Vol.142. – No.3. – P.301–319.
29. Calisi A., Lionetto M.G., Schettino T. Pollutant-induced alterations of granulocyte morphology in the earthworm *Eisenia foetida* // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2009. – Vol.72. – No.5. P. – 1369–1377.
30. Calisi A., Zaccarelli N., Lionetto M.G., Schettino T. Integrated biomarker analysis in the earthworm *Lumbricus terrestris*: application to the monitoring of soil heavy metal pollution // Chemosphere. – 2013. – Vol.90. – No.11. – P.2637–2644.
31. Cameron G.R. Inflammation in earthworms // The Journal of Pathology & Bacteriology. – 1932. – Vol.35. – No.6. – P.933–972.
32. Caullery M., Mesnil F.E.P. Les formes épitoques et l'évolution des cirratulien // J. B. Baillière. – 1898. – No.39. – P.1–200.
33. Cholewa J., Feeney G.P., O'Reilly M., StÄzrzenbaum S.R., Morgan A.J., Płytycz B. Autofluorescence in eleocytes of some earthworm species // Folia Histochemica et Cytobiologica. – 2006. – Vol.44. – No.1. – P.65–71.
34. Conte A., Ottaviani E. Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes // FEBS letters. – 1995. – Vol.365. – No. 2-3. – P. 120-124.
35. Cooper E.L. (ed.). 2018. Advances in Comparative Immunology. Springer. 1048 p.
36. Cooper E.L. Earthworm immunity /Rincevich B., Müller W.E.G. (eds.) //Invertebrate Immunology. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag. – 1996. – P.10–45.
37. Cooper E.L. Specific tissue graft rejection in earthworms // Science. – 1969. – Vol.166. – P.1414–1415.
38. Cooper E.L. Transplantation immunity in annelids. I. Rejection of xenografts exchanged between *Lumbricus terrestris* and *Eisenia foetida* // Transplantation. – 1968. – Vol.6. – P.322–337.
39. Cooper E.L., Kauschke E., Cossarizza A. Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff // BioEssays. – 2002. – Vol.24. – No.4. – P.319–333.
40. Cooper E.L., Roch P. Earthworm immunity: a model of immune competence // Pedobiologia. – 2003. – Vol.47. – P.676–688.
41. Cooper E.L., Roch P. Immunological profile of annelids: transplantation immunity /Vetvicka V., Síma P., Cooper E.L., Bilej M., Roch P. (eds) //Immunology of Annelids. Boca Raton: CRC Press. – 1994. – P.201–243.
42. Dales R.P. The coelomocytes of the terebellid polychaete *Amphitrite johnstoni* // Journal of Cell Science. – 1964. – Vol.3. – No.70. – P.263–279.
43. Dales R.P., Dixon L.R.J. Polychaetes / Ratcliffe N.A., Rowley A.F. (eds) //Invertebrate blood cells. – London: Academic Press. – 1981. – P.35–74.

44. Dales R.P., Kalaç Y. Phagocytic defence by the earthworm *Eisenia foetida* against certain pathogenic bacteria // *Comparative Biochemistry & Physiology*. – 1992. – Vol.101. – No.3. – P.487–490.
45. Dales R.P., Pell J.S. Cytological aspects of haemoglobin and chlorocruorin synthesis in polychaete annelids // *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. – 1970. – Bd.109. – No.1. – P.20–32.
46. Davidson C. R., Best N. M., Francis J. W., Cooper E. L., Wood T. C. Toll-like receptor genes (TLRs) from *Capitella capitata* and *Helobdella robusta* (Annelida) // *Developmental & Comparative Immunology*. – 2008. – Vol.32. – №. 6. – P. 608-612
47. de Eguileor M., Grimaldi A., Tettamanti G., Congiu T., Protasoni M., Reguzzoni M., Lanzavecchia G. Ultrastructure and functional versatility of hirudinean botryoidal tissue // *Tissue and Cell*. – 2001. – Vol.33. – No.4. – P.332–341.
48. de Eguileor M., Grimaldi A., Tettamanti G., Valvassori R., Cooper E. L., Lanzavecchia G. Lipopolysaccharide-dependent induction of leech leukocytes that cross-react with vertebrate cellular differentiation markers // *Tissue and Cell*. – 2000. – Vol.32. – №. 5. – P. 437-445.
49. de Eguileor M., Grimaldi A., Tettamanti G., Valvassori R., Cooper E.L., Lanzavecchia G. Different types of response to foreign antigens by leech leukocytes // *Tissue & Cell*. – 2000. – Vol.32. – No.1. – P.40–48.
50. de Eguileor M., Tettamanti G., Grimaldi A., Boselli A., Scari G., Valvassori R., Cooper E.L., Lanzavecchia G. Histopathological Changes after Induced Injury in Leeches // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1999. – Vol.74. – No.1. – P.14–28.
51. Defretin R. Recherches sur la musculature des Nénidiens au cours de l'épitoquie, sur les glandes parapodiales et sur la spermiogenèse // *Annales de l'Institut océanographique*. – 1949. – V.24. – P.117–257.
52. Dehorne A. Histolyse et phagocytose musculaire dans le coelome des Néréidiens à maturité sexuelle // *Comptes rendus de l'Académie des Sciences (Paris)*. – 1922. – V.164. – P.1043–1063.
53. Dehorne A. La formation plasmodiale et les kystes à mérozoïtes de *Sabellaria spinulosa* Leuck // *Comptes rendus des séances de la Société de biologie (Paris)*. – 1930. – V.104. – P.647–50.
54. Dehorne A. Leucocytes et linome // *Comptes rendus des séances de la Société de biologie (Paris)*. – 1925. – V.93.
55. Dehorne A. Multiplication asexuée chez *Dodecaceria* du Portel par émiettement métamérique ou processus de cténodrilisation // *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*. – 1924. – V.178. – P.123–129.
56. Dhainaut A. Etude ultra structurale de l'évolution des leucocytes chez *Nereis pelagica* L. (Annelide Polychete) à l'approche de la maturité sexuelle // *Comptes rendus de l'Académie des Sciences (Paris)*. – 1966. – Ser.262. – P.2740–2743.
57. Dhainaut A., Porchet-Henneré E. Haemocytes and coelomocytes // *The Ultrastructure of Polychaeta* // *Microfauna Marina*. – 1988. – Vol.4. – P.215–230.
58. Dhainaut A., Scaps P. Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida // *Canadian Journal of Zoology*. – 2001. – Vol.79. – No.2. – P.233–253.
59. Díaz-Villanueva J., Díaz-Molina R., García-González V. Protein folding and mechanisms of proteostasis // *International journal of molecular sciences*. – 2015. – Vol.16. – №. 8. – P. 17193-17230.
60. Dong Y., Sun H., Zhou Z., Yang A., Chen Z., Guan X., Jiang J. Expression analysis of immune related genes identified from the coelomocytes of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in response to LPS challenge // *International journal of molecular sciences*. – 2014. – Vol.15. – №. 11. – P. 19472-19486.
61. Eckelbarger K.L. Origin and development of amoebocytes of *Nicolea zostericola* (Polychaeta: Terebellidae) with a discussion of their possible role in oogenesis // *Marine Biology*. 1976. – Vol.36. – No.2. – P.169–182.
62. Engelmann P., Cooper E.L., Nemeth P. Anticipating innate immunity without a Toll // *Molecular Immunology*. – 2005. – Vol.42. – No.8. – P.931–942.

63. Engelmann P., Pal J., Berki T., Cooper E.L., Németh P. Earthworm leukocytes react with different mammalian antigen specific monoclonal antibodies // *Zoology*. – 2002. – Vol.105. – P.257–265.
64. Envall I., Erséus C., Gustavsson L.M. Ultrastructural investigation of coelomocytes in representatives of Naidinae and Rhyacodrilinae (Annelida, Clitellata, Tubificidae) // *Journal of Morphology*. – 2008. – Vol.269. – No.9. – P.1157–1167.
65. Fauré-Fremiet E. La cinétique du développement multiplication cellulaire et croissance // *Les Presses Universitaires de France, Paris*. – 1925. – V.20. – P. 226-232.
66. Fischer E. The function of chloragosomes, the specific age-pigment granule of Annelids: a review // *Experimental Gerontology*. – 1977. – V.12. – P.69–74.
67. Fischer E. The myelo-erytroid nature of the chloragogenous-like tissues of the annelids // *Comparative Biochemistry & Physiology*. – 1993. – Vol.106. – P.449–453.
68. Fitzgerald S.W., Ratcliffe N.A. In vivo cellular reactions and clearance of bacteria from the coelomic fluid of the marine annelid, *Arenicola marina* L. (polychaeta) // *Journal of Experimental Zoology*. – 1989. – Vol.3. – P. 249-256.
69. Flajnik M.F., Du Pasquier L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? // *Trends in immunology*. – 2004. – Vol.25. – No.12. – P.640–644.
70. Fordham M.G.C. *Aphrodite aculeata* // *University Press of Liverpool*. – 1925. – No.27.
71. Fugère N., Brousseau P., Krzystyniak K., Coderre D., Fournier M. Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different in vitro sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta) // *Toxicology*. – 1996. – Vol.109. – No.2–3. – P.157–166.
72. Galaktionov K.V., Dobrovolskij A.A. The biology and evolution of trematodes: an essay on the biology, morphology, life cycles, transmission, and evolution of digenetic trematodes. – *Boston: Kluwer Academic Publishers*. – 2013. – 592 p.
73. Galloway T.S., Depledge M.H. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance // *Ecotoxicology*. – 2001. – Vol.10. – No.1. – P.5–23.
74. Garcia-Alonso J., Hoeger U., Rebscher N. Regulation of vitellogenesis in *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta): effect of estradiol-17 $\beta$  on eleocytes // *Comparative Biochemistry & Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology*. – 2006. – Vol.143. – No.1. – P.55–61.
75. Goodrich E.S. Memoirs: On the Nephridia of the Polychæta: Part II. *Glycera* and *Goniada* // *Journal of Cell Science*. – 1898. – Vol.2. – No.163. – P.439–457.
76. Gorbushin A.M. Immune repertoire in the transcriptome of *Littorina littorea* reveals new trends in lophotrochozoan proto-complement evolution // *Developmental & Comparative Immunology*. – 2018. – Vol.84. – P.250–263.
77. Groll M., Ditzel L., Loewe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H.D., Huber R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution // *Nature*. – 1997. – Vol.386. – №. 6624. – P. 463.
78. Gupta S., Yadav S. Immuno-defense strategy in earthworms: a review article // *International Journal of Current Microbiology & Applied Sciences*. – 2016. – Vol.5. – No.4. – P.1022–1035.
79. Haas B.J., Papanicolaou A., Yassour M., Grabherr M., Blood P.D., Bowden J., Couger M.B., Eccles D., Li B., Lieber M., MacManes M.D., Ott M., Orvis J., Pochet N., Strozzi F., Weeks N., Westerman R., William T., Dewey C.N., Henschel R., LeDuc R.D., Friedman N., Regev A. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis // *Nature protocols*. – 2013. – Vol.8. – №. 8. – P. 1494-1512.
80. Helm C., Beckers P., Bartolomæus T., Drukewitz S. H., Kourtesis I., Weigert A., ... & Bleidorn C. Breaking the ladder: Evolution of the ventral nerve cord in Annelida // *BioRxiv*. – 2018. – P. 378661.
81. Herpin R. Sur l'origine et le rôle des cellules à réserves de la cavité générale chez *Perinereis cultrifera* et *Perinereis marioni* (Aud. et Edw.) et sur la différenciation précoce de leurs oeufs // *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences (Paris)*. – 1921. – V.173. – P.249–252.
82. Hess R.T. The fine structure of coelomocytes in the annelid *Enchytraeus fragmentosus* // *Journal of Morphology*. – 1970. – Vol.132. – No.3. – P.335–351.

83. Hildemann W. H. Some new concepts in immunological phylogeny // *Nature*. – 1974. – Vol.250. – P. 116-120.
84. Homa J., Bzowska M., Klimek M., Plytycz B. Flow cytometric quantification of proliferating coelomocytes non-invasively retrieved from earthworm, *Dendrobaena veneta* // *Developmental & Comparative Immunology*. – 2008. – Vol.32. – P.9–14.
85. Ireland M.P., Richards K.S. The occurrence and localization of heavy metals and glycogen in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Dendrobaena rubida* from a heavy metal site // *Histochemistry*. – 1977. – Vol.51. – P.153–166.
86. Jamieson B.G.M., Wampler J.E., Shultz M.C. Preliminary ultrastructural description of coelomocytes of the luminescent oligochaete, *Pontodrilus bermudensis* (Annelida) /De Luca M., McElroy W.D. (eds.) // *Bioluminescence and Chemoluminescence*. New York: Academic Press. – 1981. – P.543–560.
87. Jamieson B.M.G. Oligochaeta // Harrison F.W., Gardiner S.L. (eds.). *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. – 1992. – Vol.7. – P. 217–322.
88. Kauschke E., Mohrig W., Cooper E. L. Coelomic fluid proteins as basic components of innate immunity in earthworms // *European Journal of Soil Biology*. – 2007. – Vol.43. – P. S110-S115.
89. Kauschke E., Mohrig W., Cooper E.L. Coelomic fluid proteins as basic components of innate immunity in earthworms // *European Journal of Soil Biology*. – 2007. – Vol.43. – P.110–115.
90. Klein U., Gernold M., Kloetzel P. M. Cell-specific accumulation of Drosophila proteasomes (MCP) during early development // *The Journal of cell biology*. – 1990. – V. 111. – №. 6. – P. 2275-2282.
91. Kloetzel P. M. Ubiquitin and proteasomes: Antigen processing by the proteasome // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2001. – Vol.2. – №. 3. – P. 179.
92. Kloetzel P. M. Ubiquitin and proteasomes: Antigen processing by the proteasome // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2001. – Vol.2. – №. 3. – P. 179.
93. Kurek A., Homa J., Kauschke E., Plytycz B. Characteristics of coelomocytes of the stubby earthworm, *Allolobophora chlorotica* // *European Journal of Soil Biology*. – 2007. – Vol.43. – P.121–126.
94. Kurek A., Plytycz B. Annual changes in coelomocytes of four earthworm species // *Pedobiologia*. – 2003. – Vol.47. – P.689–701.
95. Lai P. S., So L. P., Russell C. S. A lipid-associated sulfated proteoglycan from *Nereis* coelomic fluid is a hemagglutinin // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. – 1989. – Vol.93. – №. 4. – P. 859-865.
96. Lassalle F., Lassegues M., Roch P. Protein analysis of earthworm coelomic fluid IV. Evidence, activity induction and purification of *Eisenia fetida andrei* lysozyme (Annelidae) // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. – 1988. – Vol.91. – №. 1. – P. 187-192.
97. Lefebvre C., Vandenbulcke F., Bocquet B., Tasiemski A., Desmons A., Verstraete M., Salzet M., Cocquerelle C. Cathepsin L and cytochrome B gene expression discriminates immune coelomic cells in the leech *Theromyzon tessulatum* // *Developmental & Comparative Immunology*. – 2008. – Vol.32. – P.795–807.
98. Linthicum D.S., Stein E.A., Marks D.H., Cooper E.L. Electron-microscopic observations of normal coelomocytes from the earthworm, *Lumbricus terrestris* // *Cell & Tissue Research*. – 1977. – Vol.185. – No.3. – P.315–330.
99. Lionetto M.G., Calisi A., Schettino T. Earthworm biomarkers as tools for soil pollution assessment // *Soil health and land use management*. – IntechOpen. – 2012. – P.305–332.
100. Little T.J., Hultmark D., Read A.F. Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology // *Nature Immunology*. – 2005. – Vol.6. – No.7. – P.651–654.
101. Livnat-Levanon N. et al. Reversible 26S proteasome disassembly upon mitochondrial stress // *Cell reports*. – 2014. – VOL.. 7. – №. 5. – P. 1371-1380.

102. Lunetta-D'Ancona G., Russo S. Haemopoietic tissue in *Perinereis cultrifera* Grube: cytological identification and observations after treatment with lead // *Basic & Applied Histochemistry*. – 1982. – Vol.27. – No.4. – P.303–309.
103. Maltseva A.L., Kotenko O.N., Kokryakov V.N., Starunov V.V., Krasnodembskaya A.D. Expression pattern of arenicins – the antimicrobial peptides of polychaete *Arenicola marina* // *Frontiers in Physiology*. – 2014. – Vol.5. – Article No.497.
104. Maltseva A.L., Starunov V.V., Zykin P.A. Application of MALDI–MSI for detection of antimicrobial peptides in tissues of the marine invertebrate *Arenicola marina* // *Invertebrate Survival Journal*. – 2016. – Vol.13. – No.1. – P.205–209.
105. Marsden J. R. The coelomocytes of *Hermodice carunculata* (Polychaeta: Amphinomidae) in relation to digestion and excretion // *Canadian Journal of Zoology*. – 1966. – Vol.44. – No.3. – P.377–389.
106. Mayer H., Tharanathan R. N., Weckesser J. 6 Analysis of Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria // *Methods in microbiology*. – Academic Press, 1985. – Vol.18. – P. 157–207.
107. McHugh D. Molecular phylogeny of the Annelida // *Canadian Journal of Zoology*. – 2000. – Vol.78. – No.11. – P. 1873–1884.
108. Metchnikoff E. 1893. Lectures on the comparative pathology of inflammation. – New York: Dover Press. – 128 p.
109. Metchnikoff E. Lectures on the comparative pathology of inflammation. – New York: Dover Press. – 1893. – 128 p.
110. Millonig G. Study on the factors which influence preservation of fine structure // *Symposium on electron microscopy*. – Rome: Consiglio Nazionale delle Ricerche, 1964. – P. 347.
111. Milochau A., Lassegues M., Valembois P. Purification, characterization and activities of two hemolytic and antibacterial proteins from coelomic fluid of the annelid *Eisenia foetida andrei* // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1997. – V.1337. – P.123–132.
112. Nair S. V., Del Valle H., Gross P. S., Terwilliger D. P., Smith L. C. Macroarray analysis of coelomocyte gene expression in response to LPS in the sea urchin. Identification of unexpected immune diversity in an invertebrate // *Physiological Genomics*. – 2005. – Vol.22. – №. 1. – P. 33–47.
113. Needham A.E. The chloragogen-pigment of earthworm // *Life Science*. – 1966. – Vol.5. – P.33–39.
114. Oka A. Beitrage zur Anatomie der Clepsine // *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*. – 1894. – Bd.58. – P.79–98.
115. Olchawa E., Swiatkiewicz I., Homa J., Bzowska M., Plytycz B. Restoration of coelomocytes in *Dendrobaena veneta* after experimental extrusion // *The eighth international symposium on earthworm ecology*. – 4–9th September 2006. – Krakow, Poland. – P.106.
116. Picton L.J. Memoirs: On the Heart-body and Coelomic Fluid of certain Polychæta // *Journal of Cell Science*. – 1898. – V.2. – No.162. – P.263–302.
117. Pilgrim M. The functional anatomy and histology of the alimentary canal of the maldanid polychaetes *Clymenella torquata* and *Euclymene oerstedii* // *Proceedings of the Zoological Society of London*. Blackwell Publishing Ltd. – 1965. – V.147. – No.4. – P.387–405.
118. Poinar G.O.Jr., Hess R.A. Immune responses in the earthworm, *Aporreclodea trapezoides* (Annelida), against *Rhabditis pellio* (Nematoda) / Bulla L.A.Jr., Cheng T.C. (eds.) // *Comparative Pathobiology*. – 1977. – Vol.3. – P. 69–84.
119. Porchet-Henneré E. Cooperation between different coelomocyte populations during the encapsulation response of *Nereis diversicolor* demonstrated by using monoclonal antibodies // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1990. – Vol.56. No.3. – P.353–361.
120. Porchet-Henneré E., Berri M.M. Cellular reactions of the polychaete annelid *Nereis diversicolor* against coelomic parasites // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1987. – Vol.50. – No.1. – P.58–66.

121. Porchet-Henneré E., Berri M.M., Dhainaut A., Porchet M. Ultrastructural study of the encapsulation response of the polychaete annelid *Nereis diversicolor* // Cell & Tissue Research. – 1987. – Vol.248. – No.2. – P.463–471.
122. Porchet-Henneré E., Dugimont T. Adaptability of the coccidian *Coelotropha* to parasitism. Developmental & Comparative Immunology. – 1992. – Vol.16. No.4. – P.263–274.
123. Porchet-Henneré E., Vernet G. Cellular immunity in an annelid (*Nereis diversicolor*, Polychaeta): production of melanin by a subpopulation of granulocytes // Cell & Tissue Research. – 1992. – Vol.269. – No.1. – P.167–174.
124. Prento P. Metals and phosphate in the chloragosomes of *Lumbricus terrestris* and their possible physiological significance // Cell & Tissue Research. – 1979. – Vol.196. – P.123–134.
125. Ratcliffe N.A., Rowley A.F., Fitzgerald S.W., Rhodes C.P. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances // International Review of Cytology. – 1985. – Vol.97. – P.183–350.
126. Reinhart M., Dollahon N. Responses of coelomocytes from *Lumbricus terrestris* to native and non-native eukaryotic parasites // Pedobiologia. – 2003. – Vol.47. – No.5. – P.710–716.
127. Richards K.S. The histochemistry and ultrastructure of the coelomocytes of species of *Lumbricillus*, and observations on certain other enchytraeid genera (Oligochaeta: Annelida) // Journal of Zoology. – 1980. – Vol.191. – P.557–577.
128. Roch P., Cooper E.L., Eskinazi D.P. Serological evidences for a membrane structure related to human beta 2-microglobulin expressed by certain earthworm leukocytes // European Journal of Immunology. – 1983. – Vol.13. – P.1037–1042.
129. Romieu M. Les inclusions cristallines des éléocytes de *Nereis* et leurs relations avec la granulation éosinophile // Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences (Paris). – 1921. – V.168. – P.367–369.
130. Romieu M. Recherches histophysiologiques sur le sang et le corps cardiaque des Annélides, Polychètes. Contribution à l'histologie comparée du sang. – Paris: Doin. – 1923. – 336 p.
131. Roots B.I., Johnston P.V. The lipids and pigments of the chloragosomes of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. // Comparative Biochemistry & Physiology. – 1966. – Vol.17. – P.285–288.
132. Rosa D. Les lymphocytes des Oligochaetes // Archives Italiennes de Biologie. – 1896. – Vol.25. – P.455–475.
133. Rousset V., Pleijel F., Rouse G.W., Erséus C., Siddall M.E. A molecular phylogeny of annelids // Cladistics. – 2007. – Vol.23. – No.1. – P.41–63.
134. Russell C. S., Rodriguez J., Lai P. S. Hemagglutinin activity in *Nereis* coelomic fluid // Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology. – 1983. – Vol.75. – No. 1. – P. 57-64.
135. Salzet M., Tasiemski A., Cooper E. Innate immunity in lophotrochozoans: the annelids // Current Pharmaceutical Design. – 2006. – Vol.12. – No.24. – P.3043–3050.
136. Sawyer R.T., Fitzgerald S.W. Hirudineans /Ratcliffe N.A., Rowley A.F. (eds.) // Invertebrate Blood Cells. London: Academic Press. – 1981. – P.141–159.
137. Schroeder P.C. Eleocyte nucleolus formation in relation to development of female nereid polychaetes // American Zoologist. – 1967. – Vol.7. – No.4. – P.724–1313.
138. Schulenburg H., Boehnisch C., Michiels N. K. How do invertebrates generate a highly specific innate immune response? // Molecular immunology. – 2007. – Vol.44. – No. 13. – P. 3338-3344.
139. Schulenburg H., Boehnisch C., Michiels N.K. How do invertebrates generate a highly specific innate immune response? // Molecular Immunology. – 2007. – Vol.44. – No.13. – P.3338–3344.
140. Shalev A., Greenberg A.H., Logdberg L., Bjorck L. Beta 2-microglobulin-like molecules in low vertebrates and invertebrates // Journal of Immunology. – 1981. – Vol.127. – P.1186–1191.
141. Sichel G. Cellule a funzione istiocitaria negli Invertebrati // Italian Journal of Zoology. – 1964. – Vol.31. – No.2. – P.447–453.
142. Siedlecki M. Quelques observations sur le role des amibocytes dans le coelome d'un Annelide // Annales de l'Institut Pasteur. Immunologie. – 1903. – V.17. – P. 449–462.

143. Sima P. Annelid coelomocytes and hemocytes: Role in cellular immune reactions /Vetvicka V., Sima P., Cooper E.L., Bilej M., Roch P. (eds.) //Immunology of Annelids. Boca Raton: CRC Press. – 1994. – P.115–165.
144. Sima P., Slipka J. The spleen and its coelomic and enteric history // Advances in Mucosal Immunology. – Boston, MA: Springer. – 1995.– P.331–334.
145. Škanta F., Procházková P., Roubalová R., Dvořák J., Bilej M. LBP/BPI homologue in *Eisenia andrei* earthworms //Developmental & Comparative Immunology. – 2016. – Vol.54. – №. 1. – P. 1-6.
146. Söderhäll K. (Ed.). Invertebrate immunity // Series: Advances in experimental medicine and biology. –New York: Springer Science & Business Media. – 2010. – Vol.708. – P.65–2598.
147. Spicer S.S. A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides // Journal of Histochemistry & Cytochemistry. – 1960. – Vol.8. – No.1. – P.18-35.
148. Stanovova M.V. Morphology, cytogenesis and functions of Annelida coelomocytes // Invertebrate Zoology. – 2019. – Vol.16 – №3. – P. 254-282. [in Russian, with English summary].
149. Stanovova M.V., Erokhov P.A., Gornostaev N.G., Mikhailov V.S., Lyupina Yu. V. Role of proteasomes in non-specific immune response of marine annelids // Doklady Biochemistry and Biophysics. – Pleiades Publishing, 2016. – Vol. 471. – №. 1. – P. 428-430.
150. Stanovova M.V., Gazizova G.R., Gorbushin A.M. Transcriptomic profiling of immune-associated molecules in the coelomocytes of lugworm *Arenicola marina* (Linnaeus, 1758) // Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution. 2022.
151. Stein E., Avtalion R.R., Cooper E.L. The coelomocytes of the earthworm *Lumbricus terrestris*: morphology and phagocytic properties // Journal of Morphology. – 1977. – Vol.153. – No.3. – P.467–477.
152. Stein E., Cooper E. The role of opsonins in phagocytosis by coelomocytes of the earthworms, *Lumbricus terrestris* // Developmental & Comparative Immunology. – 1981. – Vol.5. – P.415–425.
153. Stein E., Cooper E.L. Inflammatory responses in annelids // American Zoologist. – 1983. – Vol.23. – No.1. – P.145–156.
154. Stephenson J. The Oligochaeta. – Oxford: Clarendon Press. – 1930. – 978 pp.
155. Struck T.H., Paul C., Hill N., Hartmann S., Hosel C., Kube M., Lieb B., Meyer A., Tiedemann R., Purschke G., Bleidorn C. Phylogenomic analyses unravel annelid evolution // Nature. – 2011. – Vol.471. – No.7336. – P.95–98.
156. Sullivan J. T., Bulman C. A., Salamat Z. Effect of crude lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O127: B8 on the amebocyte-producing organ of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) //Developmental & Comparative Immunology. – 2011. – Vol.35. – №. 11. – P. 1182-1185.
157. Thomas J.A. Etude d'un processus neoplasique chez *Nereis diversicolor* O.F.M. du a la degenerescence des ovocytes et quelquefois des soies // Archive of Anatomy and Microscopic Morphology. – 1930. – Exp.26. – P.251–333.
158. Unno M., Mizushima. T., Morimoto Y., Tomisugi Y., Tanaka K., Yasuoka N., Tsukihara T. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution //Structure. – 2002. – Vol.10. – №. 5. – P. 609-618.
159. Valembois P., Cazaux M. Etude autoradiographique du role trophiques des cellules chloragogenes des vers de terre // Comptes rendus des séances de la Société de biologie (Paris). – 1970. – Vol.164. – P.1015–1021.
160. Valembois P., Lassègues M., Roch P. Formation of brown bodies in the coelomic cavity of the earthworm *Eisenia fetida andrei* and attendant changes in shape and adhesive capacity of constitutive cells // Developmental & Comparative Immunology. – 1992.– Vol.16. – No.2–3. – P.95–101.
161. Valembois P., Roch P., Lassegues M., Davant N. Bacteriostatic activity of a chloragogen cell secretion //Pedobiologia. – 1982. – Vol.24. – P.191–195.



162. Valembois P., Seymour J., Lassegues M. Evidence of lipofuscin and melanin in the brown body of the earthworm *Eisenia fetida andrei* // Cell & Tissue Research. – 1994. – Vol.277. – P.183–188.
163. Vanoli A., Necchi V., Barozzi S., Manca R., Pecci A., Solcia E. Chaperone molecules concentrate together with the ubiquitin–proteasome system inside particulate cytoplasmic structures: possible role in metabolism of misfolded proteins // Histochemistry and cell biology. – 2015. – Vol.144. – №. 2. – P. 179-184.
164. Vetvicka V., Sima P. Origins and functions of annelide immune cells: the concise survey // Invertebrate Survival Journal. – 2009. – Vol.6. – P.138–143.
165. Ville P., Roch P., Cooper E., Masson P., Narbonne J. PCBs increase molecular-related activities (lysosyme, antibacterial, hemolysis, proteases) but inhibit macrophage-related functions (phagocytosis, wound healing) in earthworms // Journal of Invertebrate Pathology. – 1995. – Vol.65. – P.217–224.
166. Vivier E., Henneré E. Cytologie, cycle et affinités de la Coccidie *Coelotropha durchoni* nomen novum (= *Eucoccidium durchoni* Vivier), parasite de *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide, Polychète) // Bulletin biologique de la France et de la Belgique. – 1964. – V.1. – P.154–206.
167. Wampler J.E., Jamieson B.G.M. Cell bound luminescence from *Pontodrilus bermudensis* and its similarities to other earthworm bioluminescence // Comparative Biochemistry & Physiology. – 1986. – Vol.84. – P.81–87.

## Список используемых сокращений и обозначений

**ДИК** – дифференциальный интерференционный контраст

**ЛПС (LPS)** – липополисахариды клеточной стенки бактерий

**УПС** – убиквитин-протеасомная система

**ХПС** – химотипсин-подобная активность протеасом

**AMP** (antimicrobial peptides) – антимикробные пептиды

**C1qDC** (complement component 1, q subcomponent domain containing) – семейство белков, содержащих домен компонента комплемента 1, субкомпонента q

**CCF** (coelomic cytolytic factor) – целомический цитолитический фактор

**CLECT** (C-type lectin domain) – домен лектинов типа C

**CMFSW** – безкальциевая- безмагниева искусственная морская вода

**CR** (complement receptors) – рецепторы комплемента

**CTLDC1** (C-type lectin domain containing-like) – семейство лектинов типа C

**FSW** – стерильная морская вода

**GLECT** (galectin) – домен галектинов

**LBP/BPI** (LPS-binding proteins/bacterial permeability increasing proteins) – ЛПС-связывающие белки/белки, повышающие проницаемость бактерий

**MACPF** (membrane attack complex/perforin domain) – домен перфорины/мембран-атакующего комплекса

**MAPK** (mitogen-activated protein kinase) – митоген-активируемая протеинкиназа

**MYD88** (myeloid differentiation primary response 88) – белок первичного ответа на миелоидную дифференцировку 88

**NO** (nitric oxide) – оксид азота

**NOS** (nitric oxide syntase) – синтаза оксида азота ( )

**NOX** (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase) – NADPH-оксидазы

**PBS** – фосфатный буфер

**PFT** (pore-forming toxins) – порообразующие токсины

**PI3K** (phosphoinositide 3-kinases) – фосфоинозитид-3-киназа

**PKB** (protein kinase B) – протеинкиназа B (общее название для трех серин/треонин-специфических протеинкиназ)

**PO** – фенолоксидаза

**PRR** (pattern recognition receptor) – паттерн-распознающий рецептор

**ROI** (reactive oxygen intermediate) – реактивные промежуточные соединения кислорода

**RNI** (reactive nitrogen intermediate) – реактивные промежуточные соединения азота

**ROS** (reactive oxygen species) – активные формы кислорода

**TEP** (thioester-containing proteins) – тиоэфир-содержащие белки

**TLR** (Toll-like receptors) – Толл-подобные рецепторы

**TOLIP** (toxin-like proteins) – домен токсиноподобных белков

**TPM** (transcripts per million) – транскриптов на миллион, оценка уровня экспрессии

В списке представлены наиболее общие названия белковых доменов из используемых сокращений. Также в тексте упоминаются конкретные названия белков, описанных для определенных видов животных (например, EaTLR – Toll-like рецепторы *Eisenia andrei*). Информацию о них можно найти по указанным ссылкам.

## ПРИЛОЖЕНИЕ I. ТАБЛИЦЫ

**Таблица 1.** Типы целомоцитов, описанные для некоторых видов олигохет (из Stanovova, 2019).

Тип целомоцитов	Морфологические признаки	Другие названия	Вид олигохет	Источник
Базофильный амебоцит	Небольшие базофильные гранулы и/или слабо выраженные пучки филаментов, небольшие вакуоли		<i>Lumbricus terrestris</i>  <i>Eisenia foetida</i>	Stein et al., 1977  Calisi et al., 2009
Ацидофильный амебоцит	Ацидофильные гранулы			
Нейтрофильный амебоцит	Маленькие вакуоли и/или небольшие гранулы, неотличимые по окраске от цвета цитоплазмы, часто крупное ядро			
Гранулоцит	Множество гранул, заметных без окраски; часто наличие в одной клетке и базофильных, и ацидофильных гранул			
Элеоцит	Относительно крупные округлые/овальные клетки, есть сферические гранулы и вакуоли, запас липидов и гликогена	Хлорагоцит, эргастопластический хлорагоцит	Все виды люмбрицид, описаны для представителей других семейств	Jamieson, 1981  Jamieson, 1992  Affar et al., 1998  Vetvicka, Sima, 2009  Cooper, 1996
Гиалиновый амебоцит	Окраска базофильная; образуют псевдоподии, в цитоплазме множество мелких вакуолей и лизосом; ядро расположено в центре	Лейкоцит	<i>Lumbricus terrestris</i>  <i>Dendrobaena veneta</i>  <i>Allolobophora chlorotica</i>	Linthicum et al., 1977  Cooper, 1996  Adamowicz, 2004  Kurek et al.,

Гранулярный амебоцит	Окраска ацидофильная или нейтрофильная; цитоплазма разделяется на эктоплазму без органелл и эндоплазму; ядро часто смещено к периферии			2007
Мукоцит	Гранулы с большим количеством мукополисахаридных и протеиновых комплексов	Лимфоцит, гранулярный мукоцит	<i>Enchytraeus fragmentosus</i>  <i>Lumbricillus mirabilis</i> , <i>L. reynoldsoni</i> и <i>L. rivalis</i> (Enchytraeidae)  <i>Pontodrilus bermudensis</i> (Megascolecidae)	Richards, 1980  Jamieson et al., 1981
«Мукоцито–подобная» клетка	Клетки без псевдоподий, окруженными мембраной гранулами, выраженным шероховатым ЭПР и большим количеством рибосом		Сем. Tubificidae	Envall et al., 2008

**Таблица 2.** Классификация целомоцитов полихет (по Dhainaut, Porchet-Henneré, 1988. Из Stanovova, 2019)

Тип клеток	Морфологические признаки	Встречается у представителей семейств
Амебоцит (гранулоцит) типа I	Клетки веретеновидной формы с большим количеством гранул и пучками микрофиламентов в цитоплазме	Arenicolidae, Ophelidae, Glyceridae, Nephtyidae, Nereidae
Амебоцит (гранулоцит) типа II	Клетки вытянутой формы, в цитоплазме есть гранулы и вакуоли, но нет пучков филаментов	Arenicolidae, Nereidae, Terebellidae, Capitellidae
Амебоцит (гранулоцит) типа III	Клетки маленького размера, с крупным ядром и небольшим количеством гранул	Во многих семействах. Возможно, клетка–предшественник
Амебоцит (гранулоцит) типа IV	Типичный макрофаг	Описан для Nereidae, встречается у иммунизированных особей
Амебоцит (гранулоцит) типа V	В цитоплазме имеются крупные включения и стопки шероховатого ЭПР	Во многих семействах
Элеоцит	Содержат одну или несколько крупных вакуолей и запас липидов и гликогена	Не обнаружены у представителей Arenicolidae, Glyceridae, Nephtyidae и Syllidae

**Таблица 3.** Универсальные для разных групп аннелид типы целомоцитов (из Stanovova, 2019).

Универсальный тип целомоцитов	Группа аннелид	Названия возможных форм	Морфологические признаки	Описанные функции	Известен у представителей семейств
«Амебоцит»	Oligochaeta	Гранулоцит, гиалиновый амебоцит, лимфоцит, лейкоцит, ацидофильный/базофильный/нейтрофильный амебоцит	Как правило, образуют псевдоподии; прочие признаки крайне вариативны (размер и форма клетки/ядра, наличие/отсутствие гранул, филаментов, вакуолей; окрашивание гистологическими красителями и т. д.)	Заживление ран, фагоцитоз, инкапсуляция, частичное участие в транспорте и накоплении питательных веществ	Lumbricidae Enchytraeidae
	Polychaeta	Гранулоцит, негранулярный амебоцит; название часто отражает форму клетки (веретеновидные, звездчатые амебоциты и т. д.)	Самая большая и разнообразная группа целомоцитов полихет, морфология варьирует в широких пределах. В общем случае образуют псевдоподии, но описаны и неподвижные формы	Заживление ран, фагоцитоз, инкапсуляция	У всех изученных с этой точки зрения представителей разных семейств
	Hirudinea	Лейкоцит, лимфоцит	Относительно однородная группа клеток, сходных по морфологии с гиалиновыми амебоцитами олигохет	Заживление ран, фагоцитоз, инкапсуляция, накопление антимикробных факторов (возможно)	Hirudinidae Glossiphoniidae
«Элеоцит»	Oligochaeta	Хлорогоцит (хлорогенная клетка), эргастопластический хлорогоцит	Овальные/округлые клетки диаметром 10–60 мкм, в цитоплазме имеются сферические гранулы, хлорогосомы, липидные капли	Участие в выделении и поддержании осмотического баланса; синтез внеклеточных дыхательных пигментов; накопление липидов, гликогена, экзогенных веществ; синтез некоторых	У всех изученных с этой точки зрения представителей разных семейств

				антимикробных факторов, частичное участие в процессе инкапсуляции	
	Polychaeta	Негранулярный лимфоцит, трефоцит	Относительно крупные (до 40 мкм в диаметре) клетки неопределенной формы, содержат вакуоли, липидные капли, запасы гликогена	Накопление липидов и гликогена; участие в процессе вителлогенеза и питания созревающих гамет; избирательный фагоцитоз	Nereidae, Terebellidae, Aphroditidae, Phyllodocidae и др.
	Hirudinea	Хлорогенная клетка	Сходны по морфологии элоцитами олигохет	Не описаны (но, по всей видимости, сходны с таковыми у других групп)	Glossiphoniidae



**Таблица 4.** Возможные сайты пролиферации универсальных типов целомоцитов (из Stanovova, 2019).

Универсальный тип целомоцитов	Сайт пролиферации	Oligochaeta	Polychaeta	Hirudinea
«Амебоцит»	Париетальный эпителий (рис. 3А)	Lumbricidae (Stein, Cooper, 1983; Bilej et al., 1992; Homa et al., 2008)	<i>Nicolea zostericola</i> (Eckelbarger, 1976) <i>Glycera</i> sp. (Sima, 1994)	–
	Участки целотелия, окружающего кровеносные сосуды («лимфоидные железы») (рис. 3В)	<i>Lumbricillus</i> , <i>Sparganophilus</i> , <i>Maoridrilus</i> , <i>Pheretima</i> , <i>Pontodrilus</i> (Sima, 1994)	Nereidae (Dehorne, 1922)	–
	Участки целотелия диссипиментов (рис. 3С)	<i>Eisenia foetida</i> другие Lumbricidae (Burke, 1974; Stein, Cooper, 1983; Bilej et al., 1992; Homa et al., 2008)	–	–
	Участки целотелия вокруг нефридиев (рис. 3D)	<i>Dendrobaena veneta</i> (Olchawa et al., 2006; Homa et al., 2008)	Nereidae (Dehorne, 1922)	–
	Участки целотелия вокруг кишечника (хлорогагенная ткань)	<i>Dendrobaena veneta</i> (Olchawa et al., 2006; Homa et al., 2008)	–	–
	Ботридиальная ткань	–	–	Glossiphoniidae (de Equileor et al., 2001)
	«Элеоцит»	Париетальный эпителий (рис. 3А)	–	Terebellidae (Eckelbarger, 1976)

Участки целотелия, окружающего кровеносные сосуды («лимфоидные железы») (рис. 3B)	–	Nereidae (Dhainaut, 1966)	Предположительно (Ока, 1894)
Участки целотелия вокруг нефридиев (рис. 3D)	Lumbricidae (Stein, 1983; 1992; 1998)	Cooper, Jamieson, Affar et al., Sabellidae (Sima, 1994)	Предположительно (Abeloos, 1925)
Участки целотелия вокруг кишечника (хлорагогенная ткань)	Lumbricidae (Stein, 1983; 1992; 1998)	Cooper, Jamieson, Affar et al., –	–
Метаморфоз амебоцитов после активного фагоцитоза	–	Предположительно возможен (Romieu, 1923; Dales, Dixon, 1981)	–

**Таблица 5.** Белки целоцитов *Arenicola marina*, участвующие в системном иммунном ответе, выявленные с помощью анализа транскриптома (из Stanovova, Gazizova, Gorbushin, 2022).

<i>Название</i>	<i>Описание</i>	<i>GenBank IDs</i>
AmhbA2	haemoglobin A2 chain	MZ593238
AmhbA2b	haemoglobin A2b chain	MZ593239
AmhbA3	haemoglobin A3 chain	MZ593240
AmhbA4	haemoglobin A4 chain	MZ593241
AmhbA5	haemoglobin A5 chain	MZ593242
AmhbB1	haemoglobin B1 chain	MZ593243
AmhbB2	haemoglobin B2 chain	MZ593244
AmCTLDC1-1	C-type lectin domain-containing type 1 protein 1	MZ593245
AmCTLDC1-2	C-type lectin domain-containing type 1 protein 2	MZ593246
AmCTLDC1-3	C-type lectin domain-containing type 1 protein 3	MZ593247
AmCTLDC1-4	C-type lectin domain-containing type 1 protein 4	MZ593248
AmCTLDC1-5	C-type lectin domain-containing type 1 protein 5	MZ593249
AmCTLDC1-6	C-type lectin domain-containing type 1 protein 6	MZ593250
AmCTLDC2-1	C-type lectin domain-containing type 2 protein 1	MZ593251
AmCTLDCr-1	C-type lectin domain-containing receptor 1	MZ593252
AmCTLDCr-2	C-type lectin domain-containing receptor 2	MZ593253
AmCTLDCr-3	C-type lectin domain-containing receptor 3	MZ593254
AmCTLDCr-4	C-type lectin domain-containing receptor 4	MZ593255
AmCTLDCr-5	C-type lectin domain-containing receptor 5	MZ593256
AmCTLDCr-6	C-type lectin domain-containing receptor 6	MZ593257
AmCTLDCr-7	C-type lectin domain-containing receptor 7	MZ593258
AmCTLDCr-8	C-type lectin domain-containing receptor 8	MZ593259
AmC1qL	C1q-like protein	MZ593260
AmFReDC1-1	fibrinogen domain-containing type 1 protein 1	MZ593261
AmFReDC2-1	fibrinogen domain-containing type 2 protein 1	MZ593262
AmFReDC2-2	fibrinogen domain-containing type 2 protein 2	MZ593263
AmA2M	alpha-2-macroglobulin-like protein	MZ593264
AmCD109	CD109 antigen-like protein	MZ593265
AmCPAMD8	C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein	MZ593266
AmMCR1	macroglobulin-complement related protein-like 1	MZ593267
AmMCR2	macroglobulin-complement related protein-like 2	MZ593268
AmMCR3	macroglobulin-complement related protein-like 3	MZ593269
AmMReM2	MASP-related molecule 2-like	MZ593270
AmCRL	complement receptor-like	MZ593271
AmCLP1	chitinase-like protein 1	MZ593272
AmCLP2	chitinase-like protein 2	MZ593273
AmCLP3-1	chitinase-like protein 3-1	MZ593274
AmCLP3-2	chitinase-like protein 3-2	MZ593275
AmCLP3-3	chitinase-like protein 3-3	MZ593276
AmCLP4	chitinase-like protein 4	MZ593277
AmCCF-1	coelomic cytolytic factor-1	MZ593278
AmCCF-2	coelomic cytolytic factor-2	MZ593279

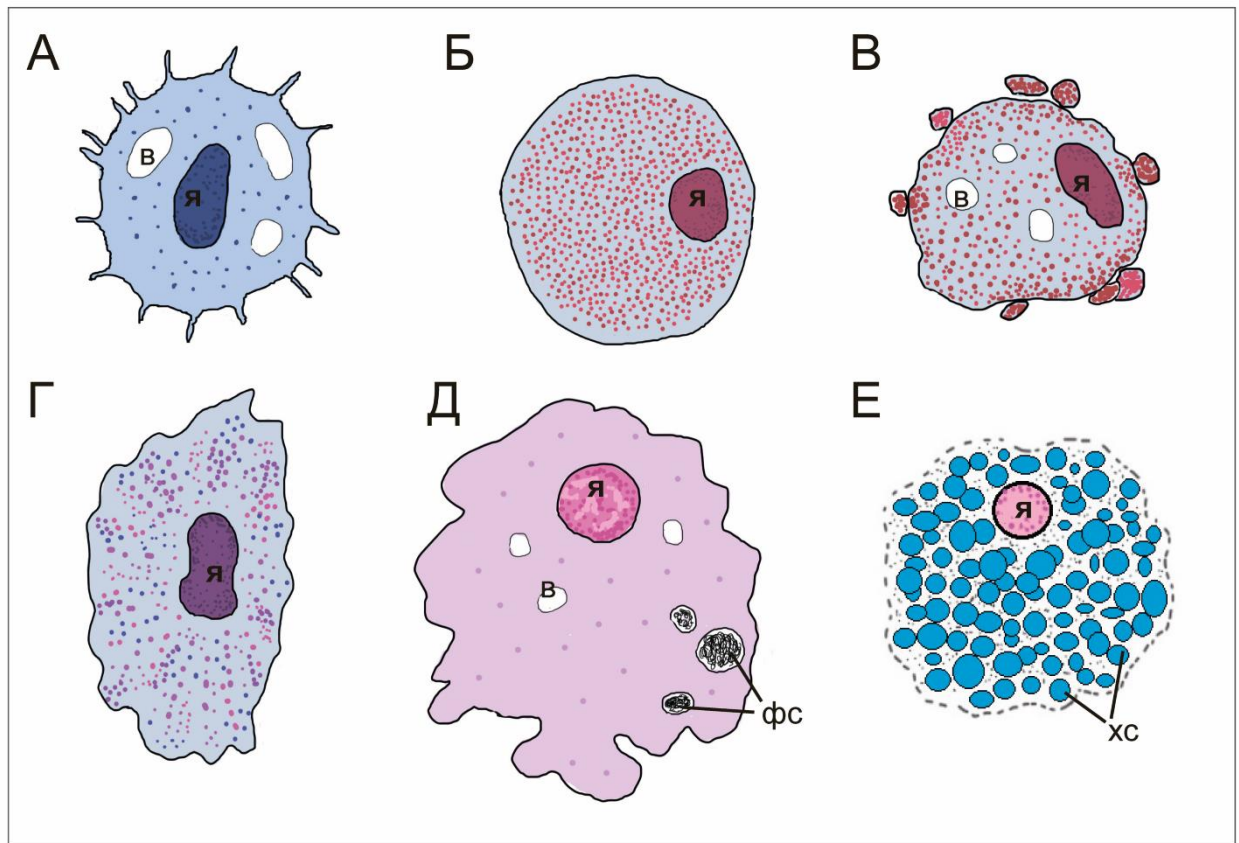
AmRIDC1	ricin lectin domain-containing protein 1	MZ593280
AmRIDC2	ricin lectin domain-containing protein 2	MZ593281
AmRIDC3	ricin lectin domain-containing protein 3	MZ593282
AmRIDC4	ricin lectin domain-containing protein 4	MZ593283
AmRIDC5	ricin lectin domain-containing protein 5	MZ593284
AmRIDC6	ricin lectin domain-containing protein 6	MZ593285
AmRIDC7	ricin lectin domain-containing protein 7	MZ593286
AmRIDC8	ricin lectin domain-containing protein 8	MZ593287
AmTLR-1	Toll-like receptor 1	MZ593288
AmTLR-2	Toll-like receptor 2	MZ593289
AmTLR-3	Toll-like receptor 3	MZ593290
AmTLR-4	Toll-like receptor 4	MZ593291
AmTLR-5	Toll-like receptor 5	MZ593292
AmTLR-6	Toll-like receptor 6	MZ593293
AmTLR-7	Toll-like receptor 7	MZ593294
AmTLR-8	Toll-like receptor 8	MZ593295
AmTLR-9	Toll-like receptor 9	MZ593296
AmTLR-10	Toll-like receptor 10	MZ593297
AmTLR-11	Toll-like receptor 11	MZ593298
AmTLR-12	Toll-like receptor 12	MZ593299
AmTLR-13	Toll-like receptor 13	MZ593300
AmTLR-14	Toll-like receptor 14	MZ593301
AmTLR-15	Toll-like receptor 15	MZ593302
AmTLR-16	Toll-like receptor 16	MZ593303
AmTLR-17	Toll-like receptor 17	MZ593304
AmTLR-18	Toll-like receptor 18	MZ593305
AmAKT1	RAC serine/threonine-protein kinase	MZ593306
AmCASP8	caspase-8-like	MZ593307
AmCHUK	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha	MZ593308
AmCTSK	cathepsin K	MZ593309
AmFADD	FAS-associated death domain protein-like	MZ593310
AmFOS	proto-oncogene c-Fos-like	MZ593311
AmIKBKG	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit gamma-like	MZ593312
AmIRAK1	interleukin-1 receptor-associated kinase 1	MZ593313
AmIRAK4	interleukin-1 receptor-associated kinase 4	MZ593314
AmIRF3	interferon regulatory factor-like	MZ593315
AmMAP2K1	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1	MZ593316
AmMAP2K3	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3	MZ593317
AmMAP2K7	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 7	MZ593318
AmMAP3K7	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	MZ593319
AmMAP3K8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8-like	MZ593320
AmMAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	MZ593321
AmMAPK8	mitogen-activated protein kinase 8	MZ593322
AmMYD88	myeloid differentiation primary response protein MyD88	MZ593323
AmNFKB1	nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit	MZ593324
AmNFKBIA	NF-kappa-B inhibitor alpha-like	MZ593325

AmMAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	MZ593326
AmPIK3CA	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform	MZ593327
AmRAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	MZ593328
AmSGPP1	sphingosine-1-phosphate phosphatase 1	MZ593329
AmSTAT1	signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta-like	MZ593330
AmTAB1	TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 1	MZ593331
AmTAB2	TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 2-like	MZ593332
AmTBK1	serine/threonine-protein kinase TBK1	MZ593333
AmTOLLIP	Toll-interacting protein	MZ593334
AmTRAF3	TNF receptor-associated factor 3	MZ593335
AmTRAF6	TNF receptor-associated factor 6-like	MZ593336
AmBPI	bactericidal permeability-increasing protein	MZ593337
AmLBP1	lipopolysaccharide-binding protein 1	MZ593338
AmLBP2	lipopolysaccharide-binding protein 2	MZ593339
AmLBP3	lipopolysaccharide-binding protein 3	MZ593340
AmLBP4	lipopolysaccharide-binding protein 4	MZ593341
AmAML-1C	lectin 1C	MZ593342
AmAML-2-1	lectin 2-1	MZ593343
AmAML-3-1	lectin 3-1	MZ593344
AmAML-4-1	lectin 4-1	MZ593345
AmAML-2-2	lectin 2-2	MZ593346
AmAML-2-3	lectin 2-3	MZ593347
AmAML-2-4	lectin 2-4	MZ593348
AmAML-3-2	lectin 3-2	MZ593349
AmANN1.1	preproarenicin-1.1	MZ593350
AmANN4	preproarenicin-4	MZ593351
AmIMP1	integral membrane protein 1	MZ593352
AmIMP2	integral membrane protein 2	MZ593353
AmATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	MZ593354
AmACADM	medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	MZ593355
AmHistone-H3	histone H3-like	MZ593356
AmHistone-H2A	histone H2A	MZ593357
AmGal-BDCr18	Gal-binding and CUB domains containing receptor 18	MZ593358
AmGal-BDCr10	Gal-binding and CUB domains containing receptor 10	MZ593359
AmGal-BDCr8	Gal-binding and CUB domains containing receptor 8	MZ593360
AmGal-BDCr4	Gal-binding and CUB domains containing receptor 4	MZ593361
AmGal-BDCr9	Gal-binding and CUB domains containing receptor 9	MZ593362
AmGal-BDCr6	Gal-binding and CUB domains containing receptor 6	MZ593363
AmGal-BDCr5	Gal-binding and CUB domains containing receptor 5	MZ593364
AmGal-BDCr2	Gal-binding and CUB domains containing receptor 2	MZ593365
AmGal-BDCr15	Gal-binding and CUB domains containing receptor 15	MZ593366
AmGal-BDCr12	Gal-binding and CUB domains containing receptor 12	MZ593367
AmGal-BDCr11	Gal-binding and CUB domains containing receptor 11	MZ593368
AmGal-BDCr14	Gal-binding and CUB domains containing receptor 14	MZ593369
AmGal-BDCr13	Gal-binding and CUB domains containing receptor 13	MZ593370
AmGal-BDCr17	Gal-binding and CUB domains containing receptor 17	MZ593371

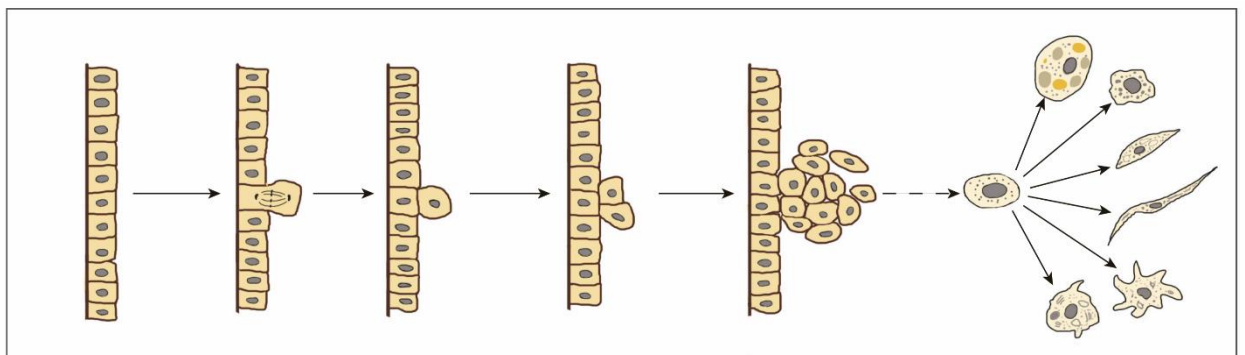
AmGal-BDCr16	Gal-binding and CUB domains containing receptor 16	MZ593372
AmGal-BDCr7	Gal-binding and CUB domains containing receptor 7	MZ593373
AmGal-BDCr3	Gal-binding and CUB domains containing receptor 3	MZ593374
AmGal-BDCr1	Gal-binding and CUB domains containing receptor 1	MZ593375
AmGal-BDCr19	Gal-binding and CUB domains containing receptor 19	MZ593376
AmGal-BDCs1	Gal-binding and CUB domains containing protein 1	MZ593377
AmGal-BDCs2	Gal-binding and CUB domains containing protein 2	MZ593378
AmGal-BDCs3	Gal-binding and CUB domains containing protein 3	MZ593379
AmGal	galectin	MZ593380
AmADGR	adhesion G protein-coupled receptor, Latrophilin	MZ593381
AmPSMA6	proteasome subunit alpha type-1	MZ593382
AmPSMA4	proteasome subunit alpha type-3	MZ593383
AmPSMA5	proteasome subunit alpha type-5	MZ593384
AmPSMA1	proteasome subunit alpha type-6	MZ593385
AmPSMB6	proteasome subunit beta type-1	MZ593386
AmPSMB3	proteasome subunit beta type-3	MZ593387
AmPSMB2	proteasome subunit beta type-4	MZ593388
AmPSMB5	proteasome subunit beta type-5	MZ593389
AmPSMB1	proteasome subunit beta type-6	MZ593390
AmPSMB4	proteasome subunit beta type-7	MZ593391
AmPSMC2	26S proteasome regulatory subunit 7	MZ593392
AmPSMC1	26S proteasome regulatory subunit 4	MZ593393
AmPSMC4	26S proteasome regulatory subunit 6B	MZ593394
AmPSMC6	26S proteasome regulatory subunit 10B	MZ593395
AmPSMC3	26S proteasome regulatory subunit 6A	MZ593396
AmPSMC5	26S proteasome regulatory subunit 8	MZ593397
AmPSMD2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	MZ593398
AmPSMD1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	MZ593399
AmPSMD9	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	MZ593400
AmPSMD11	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11A	MZ593401
AmPSMD7	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	MZ593402
AmPSMD13	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	MZ593403
AmPSMD14	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	MZ593404
AmPSMD8	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	MZ593405
AmADRM1	proteasomal ubiquitin receptor ADRM1	MZ593406
AmPSME3	proteasome activator complex subunit 3	MZ593407
AmPSME4	proteasome activator complex subunit 4	MZ593408
AmPSMG1	proteasome assembly chaperone 1	MZ593409
AmPSMG2	proteasome assembly chaperone 2	MZ593410
AmPSMG3	proteasome assembly chaperone 3	MZ593411
AmPSMG4	proteasome assembly chaperone 4	MZ593412
AmPSMD10	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10	MZ593413
AmPOMP	proteasome maturation protein	MZ593414
AmPSMF1	proteasome inhibitor PI31 subunit	MZ593415
AmLAC1	Laccase-1	MZ593416
AmLAC2	Laccase-2	MZ593417

AmLAO	L-ascorbate oxidase	MZ593418
AmTOLIP-DC	toxin-TOLIP domain-containing protein	MZ593419
AmpSAP	Prosaposin	MZ593420
AmPXD1	Dye-decolorizing peroxidase-like	MZ593421
AmPXD5	Glutathione peroxidase-like	MZ593422
AmPXD3	thyroid peroxidase-like	MZ593423
AmPXD4	probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	MZ593424
AmPXD2	peroxidase	MZ593425
AmNOS	nitric oxide synthase	MZ593426
AmCPR	NADPH--cytochrome P450 reductase	MZ593427
AmSOD2	superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	MZ593428
AmSOD3	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	MZ593429
AmSOD1	superoxide dismutase [Cu-Zn]	MZ593430
AmCAT	Catalase	MZ593431
AmPSMA7	Proteasome subunit alpha type-4	MZ593432
AmPSMD6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	MZ593433
AmPSMD12	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	MZ593434
AmPSMD3	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	MZ593435
AmPSMA2	Proteasome subunit alpha type-2	MZ593436
AmPSMB7	Proteasome subunit beta type-2	MZ593437
AmPSMA3	Proteasome subunit alpha-type 7	MZ593438
AmSEM1	26S proteasome complex subunit SEM1	MZ593439
AmPSMD4	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	MZ593440
AmPSMD5	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5	MZ593441

## ПРИЛОЖЕНИЕ II. ИЛЛЮСТРАЦИИ

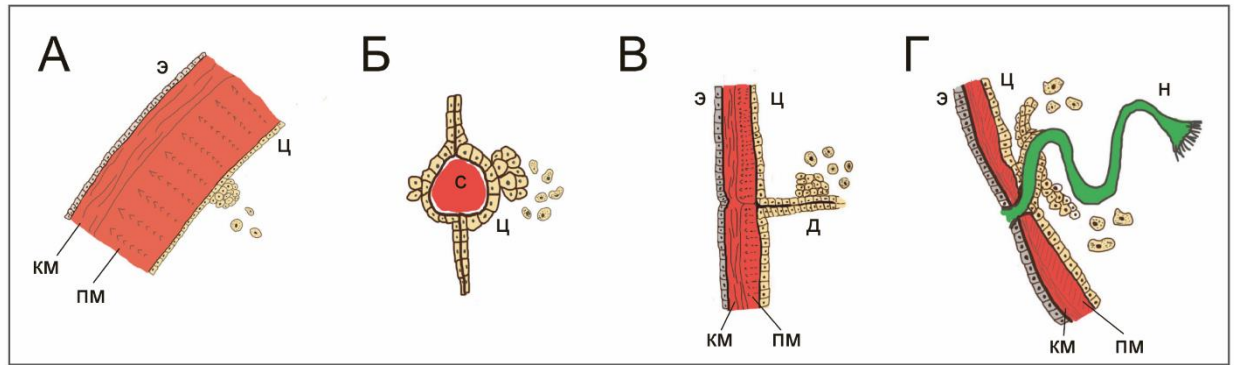


**Рисунок 1.** Целомоциты *Lumbricus terrestris* (по Stein et al., 1977). А – базофил; Б – ацидофил I типа; В – ацидофил II типа с пузырьками на поверхности; Г – гранулоцит; Д – нейтрофил; Е – эозинфил. в – вакуоль; фс – фагосомы; хс – хлорогенные гранулы (хлорогенные гранулы); я – ядро. Цветными точками отмечены различные гранулы в цитоплазме (красные и розовые – ацидофильные, синие – базофильные) (из Stanovova, 2019).

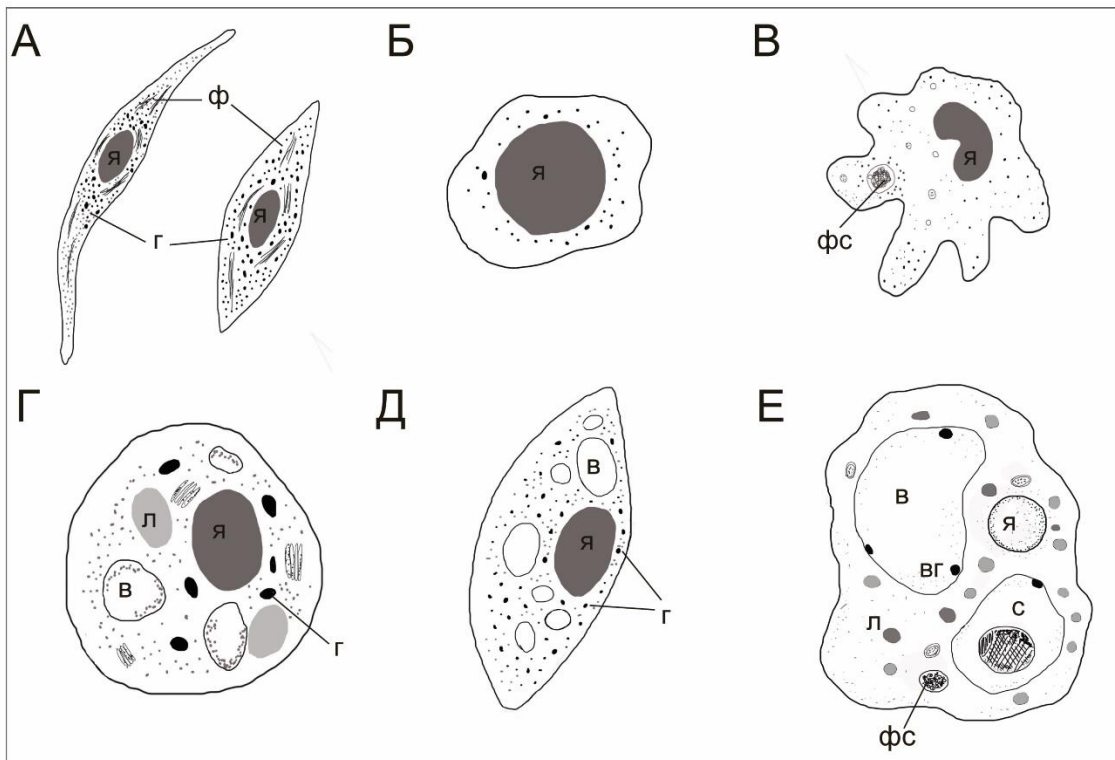


**Рисунок 2.** Гипотетическая схема образования целомоцитов аннелид из целомического эпителия. Пунктирной стрелкой показано формирование клетки-предшественника (из Stanovova, 2019).



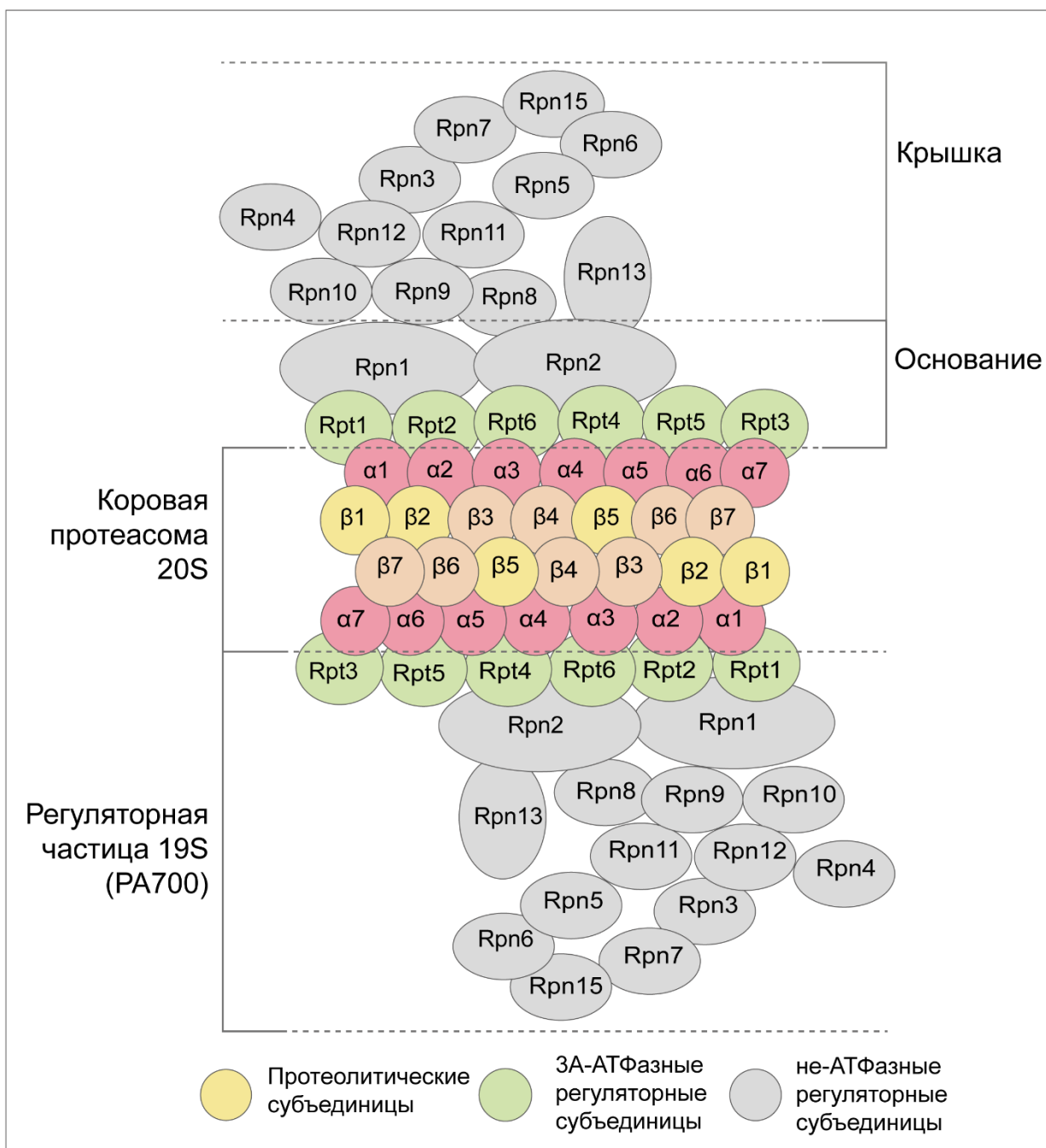


**Рисунок 3.** Возможные сайты пролиферации целомоцитов в организме аннелид. А – целотелий стенки тела (париетальный); Б – целотелий выстилки кровеносных сосудов (образование т. н. «лимфоидных желез»); В – целотелий диссепимента; Г – разрастание целотелия вокруг нефридия. д – диссепимент; км – кольцевая мускулатура; н – нефридий; пм – продольная мускулатура; с – просвет сосуда; ц – целомический эпителий; э – поверхностный эпителий с кутикулой (из Stanovova, 2019).

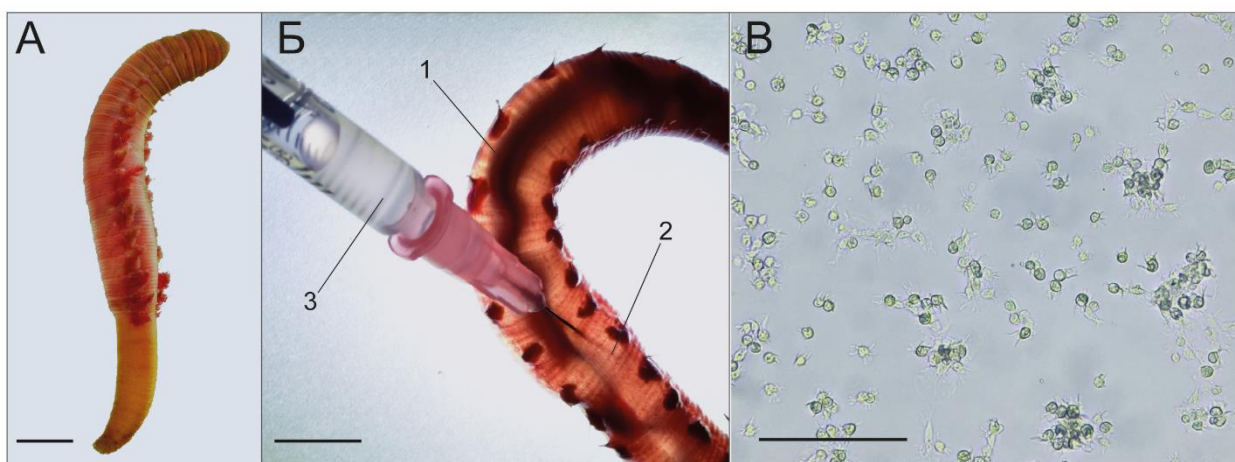


**Рисунок 4.** Типы целомоцитов полихет (по Baskin, 1974; Dhainaut, Porchet-Henneré, 1988). А – амебоцит (гранулоцит) типа I; Б – амебоцит (гранулоцит) типа II; В – амебоцит (гранулоцит) типа III; Г – амебоцит (гранулоцит) типа IV; Д – амебоцит (гранулоцит) типа V; Е – элеоцит. в – вакуоль; вг – электронно-плотные глобулы на мембране вакуоли; л –

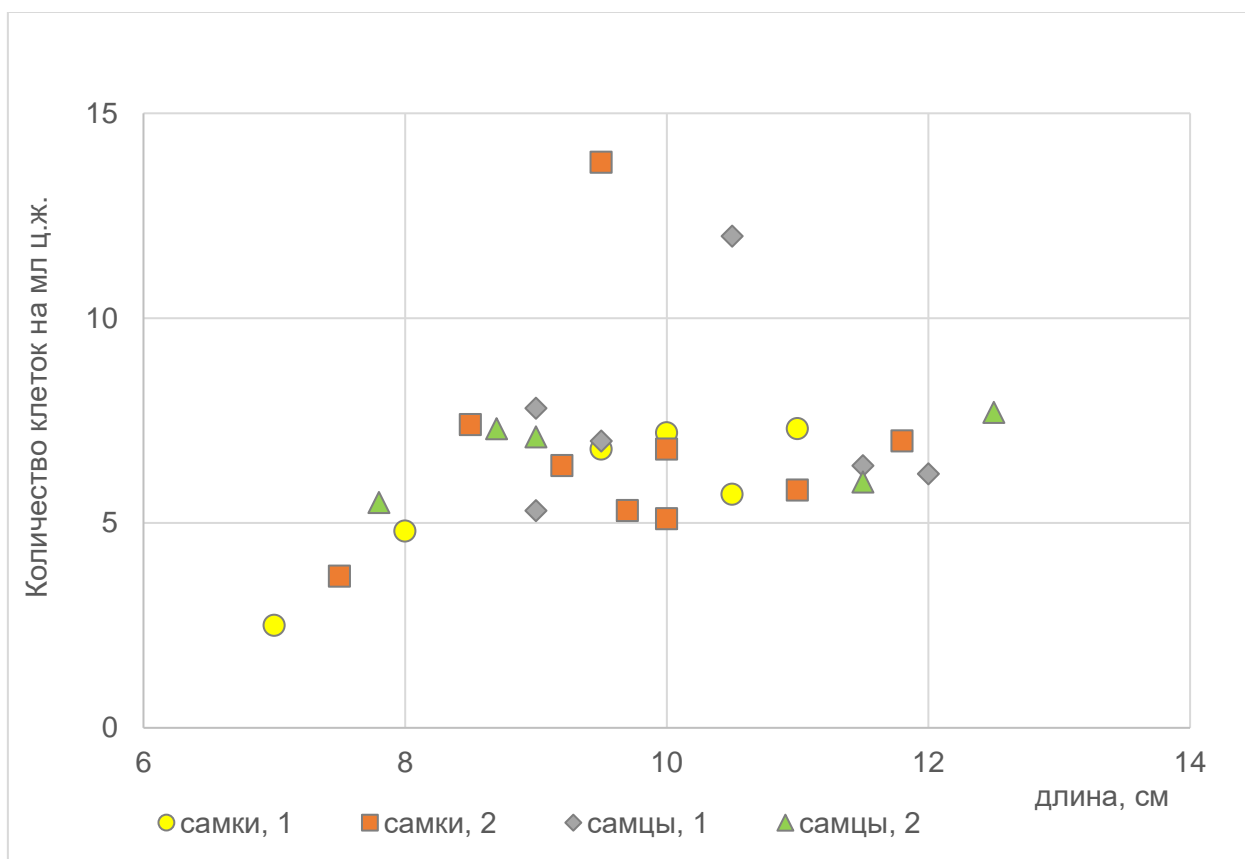
липидные капли; с – поглощенный сарколит; ф – филаменты; фс – фагосомы; я – ядро.  
 Черными точками разного размера отмечены гранулы в цитоплазме (из Stanovova, 2019).



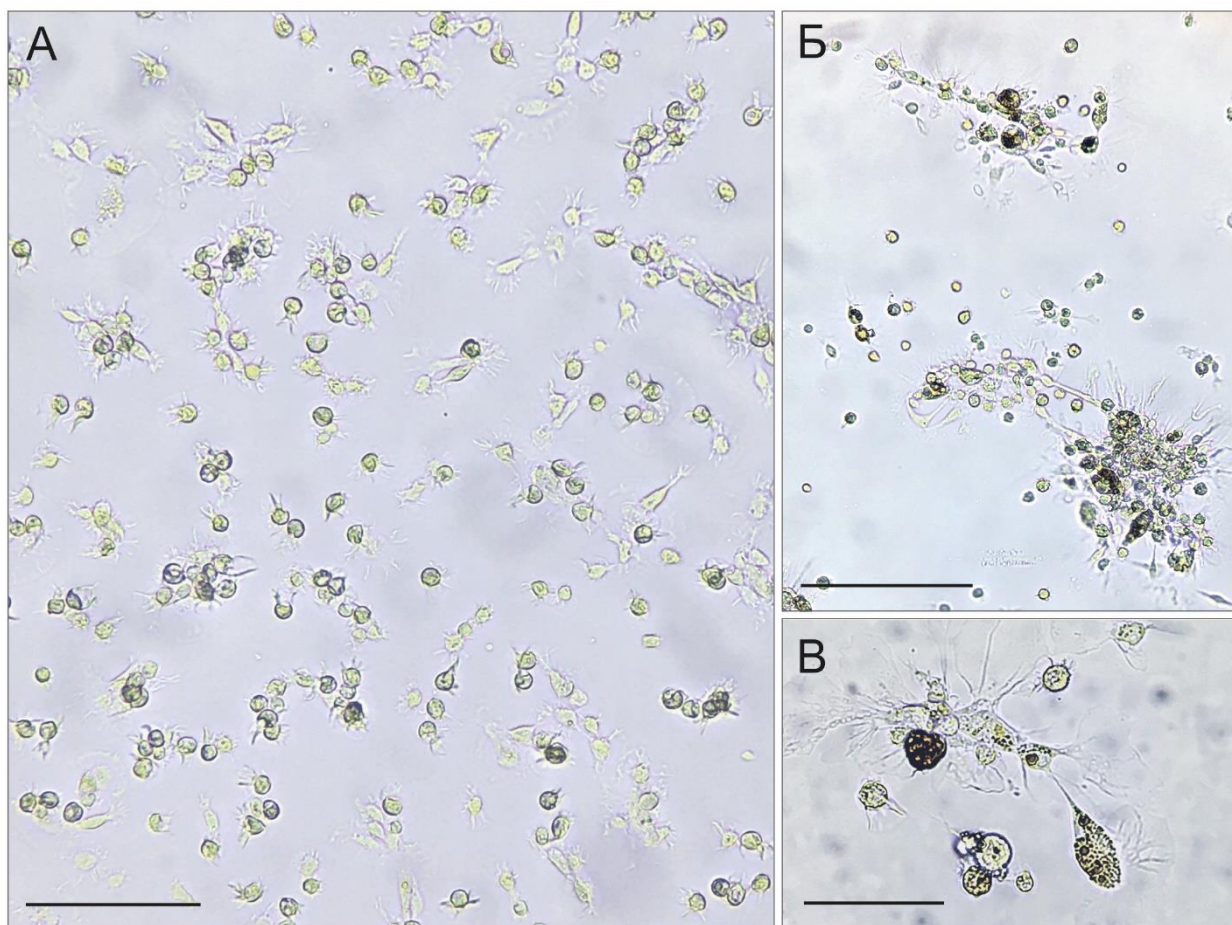
**Рисунок 5.** Строение 26S протеасомы (по KEGG: map03050 ([www.genome.jp](http://www.genome.jp))).



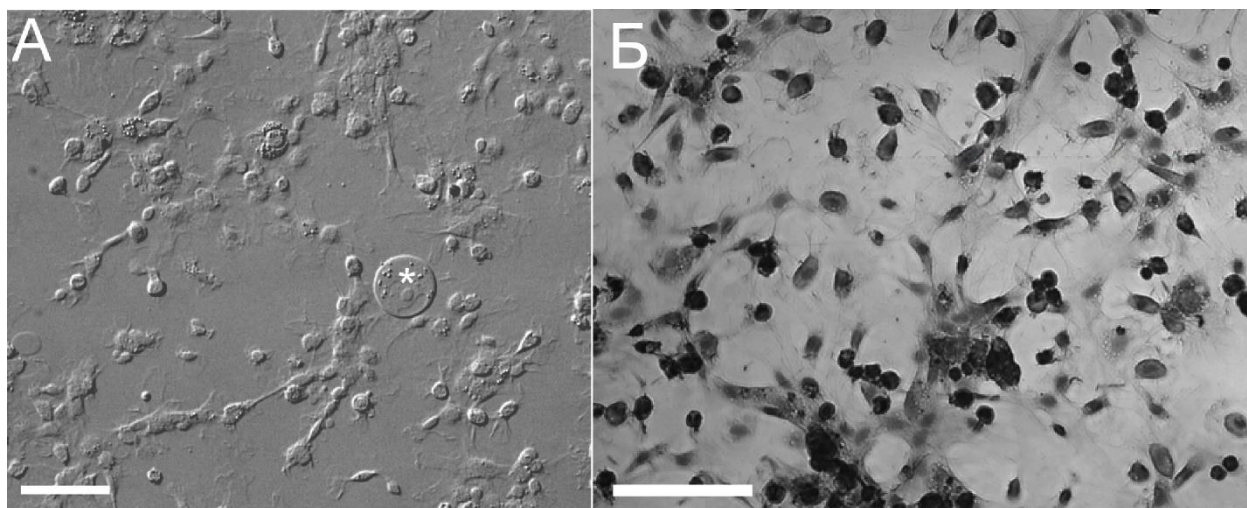
**Рисунок 6.** А – *Arenicola marina*, общий вид; Б – отбор целомической жидкости: 1 – кишечник, 2 – положение иглы, 3 – прозрачная целомическая жидкость; В – образец целомической жидкости на стекле. Масштаб: А, Б – 1 см, В – 100 мкм.



**Рисунок 7.** Общее число целоцитов (кл.х10<sup>6</sup>/мл) особей разного пола и размера, начало июня (1) и конец июля (2), выборка 2018 г.

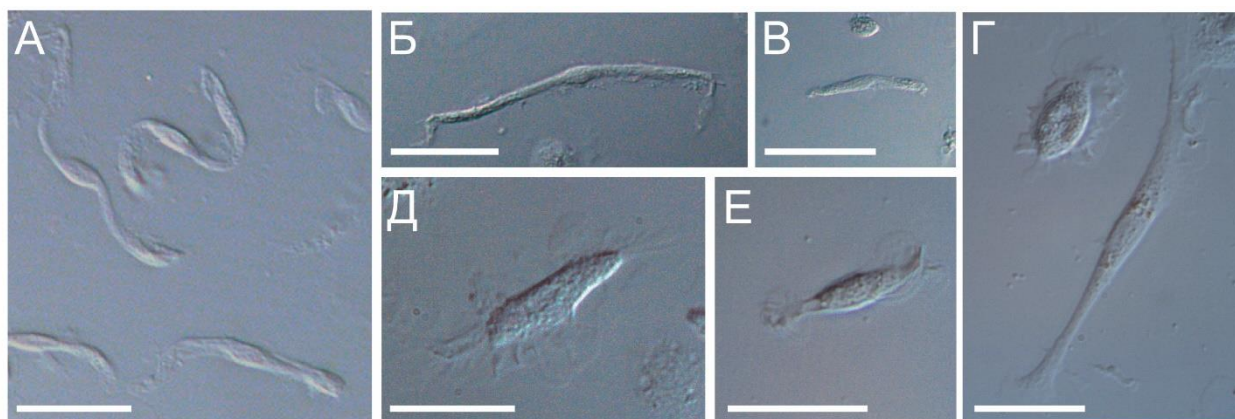


**Рисунок 8.** Живые целомоциты на стекле. А – общий вид, Б, В – формирование агрегатов. Масштаб: А, В – 50 мкм, Б – 100 мкм.

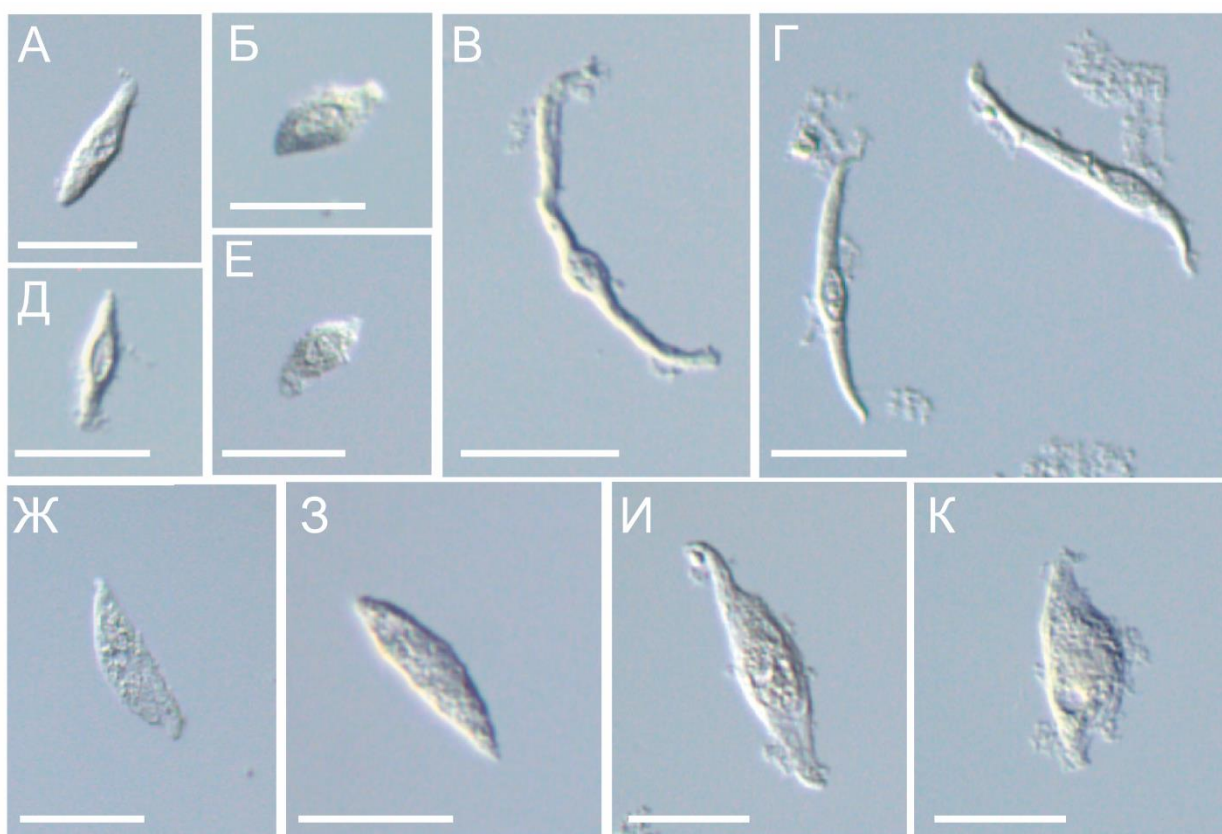


**Рисунок 9.** Целомоциты, формирующие монослой на стекле. А – живые, Б, – зафиксированные на стекле. Фиксация 4% PFA на FSW. Окраска гематоксилином по Караччи. Звездочкой отмечен ооцит. Масштаб: 50 мкм.

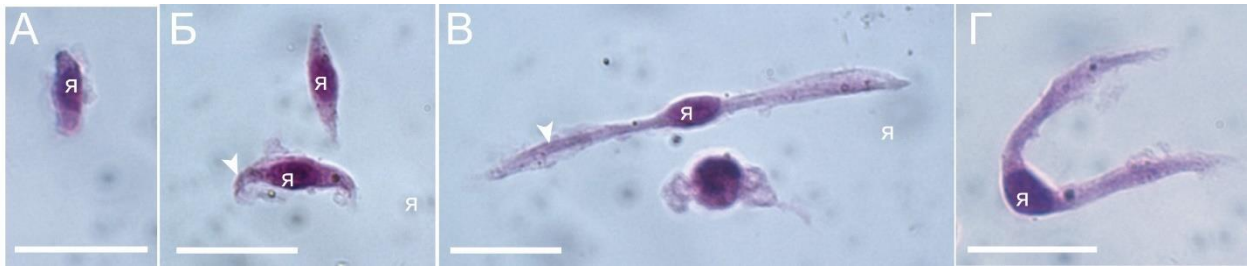




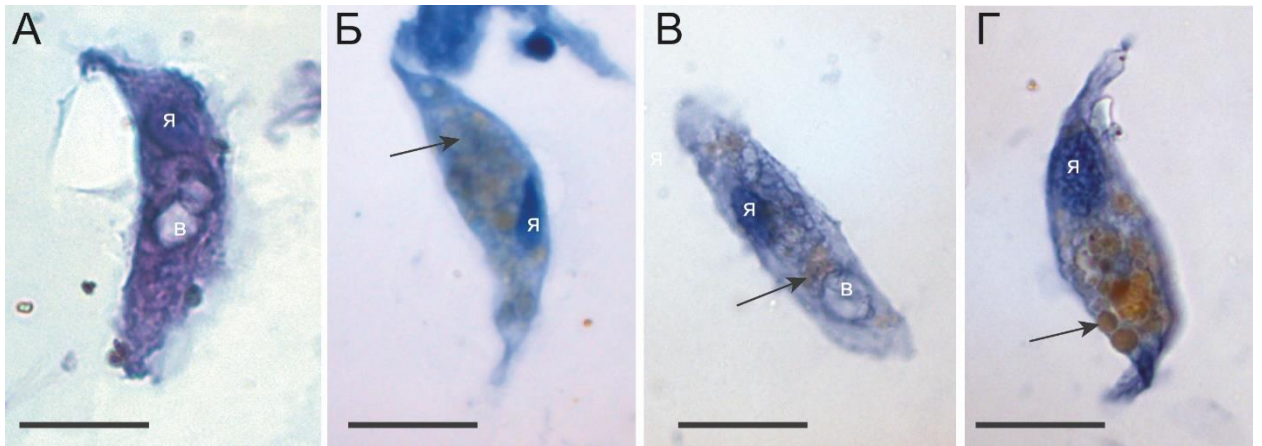
**Рисунок 10.** Живые целомоциты «веретеновидной» формы разных размеров. Дифференциальный интерференционный контраст. Масштаб 20 мкм.



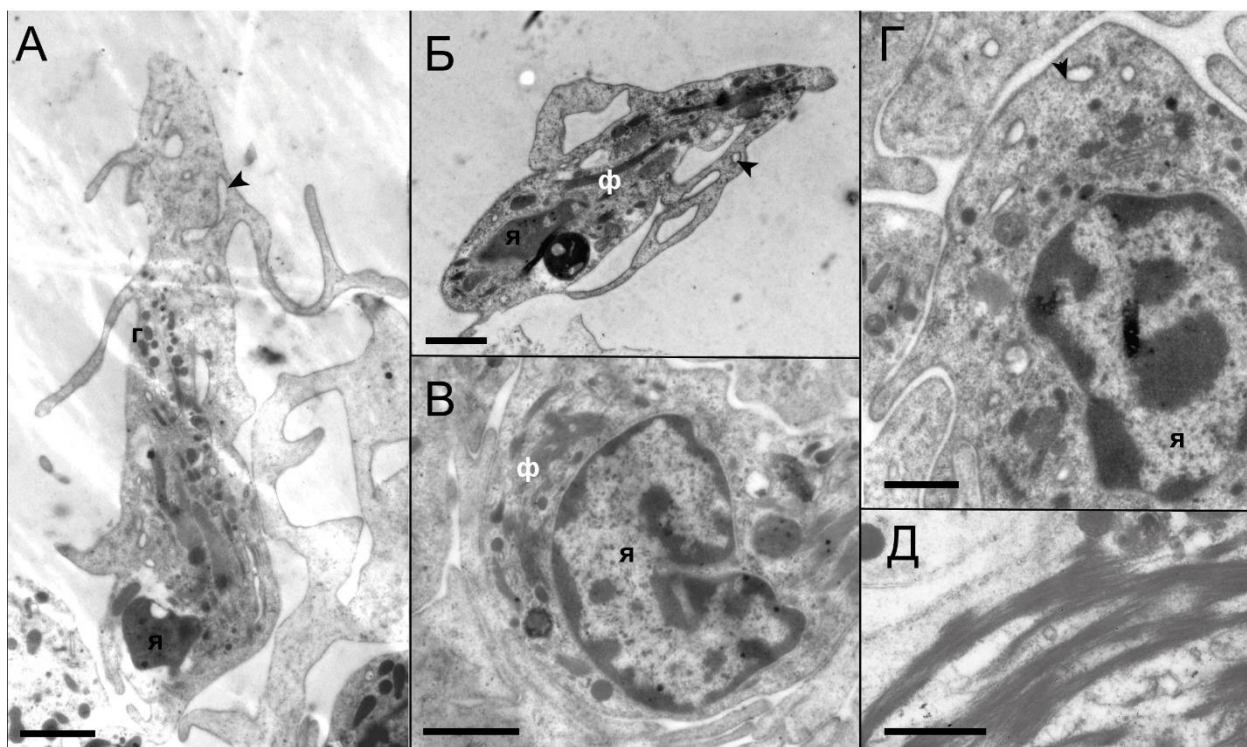
**Рисунок 11.** Целомоциты «веретеновидной» формы, зафиксированные в суспензии. Фиксация 4% PFA на FSW. Дифференциальный интерференционный контраст. Масштаб 20 мкм.



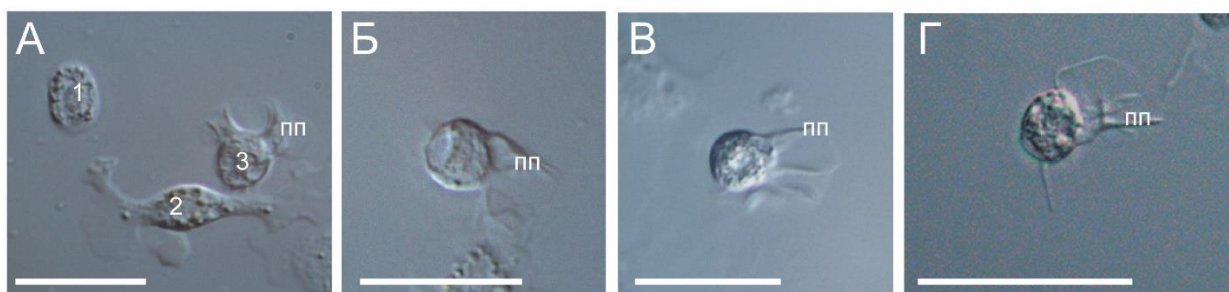
**Рисунок 12.** Целомоциты «веретеновидной» формы, зафиксированные на стекле. Стрелками отмечены окрашиваемые элементы цитоскелета. Фиксация 4% PFA на FSW. Окраска гематоксилин+эозин. я – ядра, масштаб 20 мкм.



**Рисунок 13.** Целомоциты «веретеновидной» формы с включениями, зафиксированные на стекле. Фиксация 4% PFA на FSW. Окраска гематоксилин+эозин. я – ядра, в – вакуоли. масштаб 20 мкм.

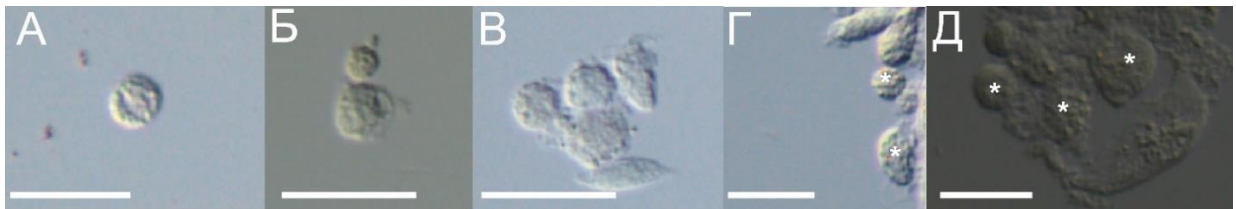


**Рисунок 14.** ТЭМ. Целомциты «веретеновидной» формы: А, Б – продольные срезы, В, Г – поперечные срезы, Д – филаменты. я – ядра, г – гранулы, ф – филаменты. Стрелками отмечены прозрачные вакуоли, формируемые поверхностным слоем цитоплазмы. Масштаб: А-В – 2 мкм, Г, Д – 0,5 мкм.

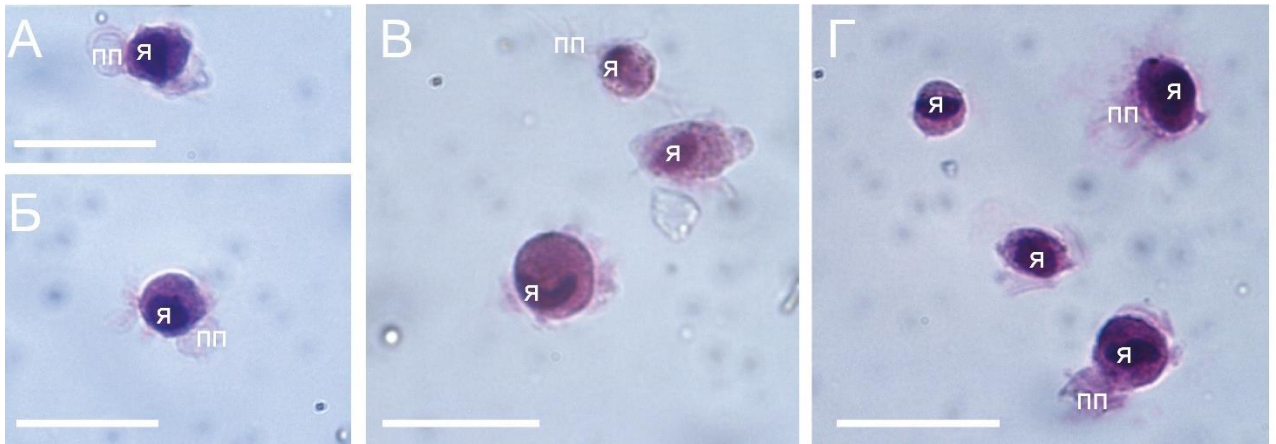


**Рисунок 15.** Живые мелкие целомциты округлой формы с псевдоподиями (пп). Дифференциальный интерференционный контраст. На рисунке А: 1 – гранулярный целомцит без псевдоподий, 2 – мелкий целомцит веретеновидной формы, 3 – мелкий округлый целомцит с псевдоподиями. Масштаб 20 мкм.

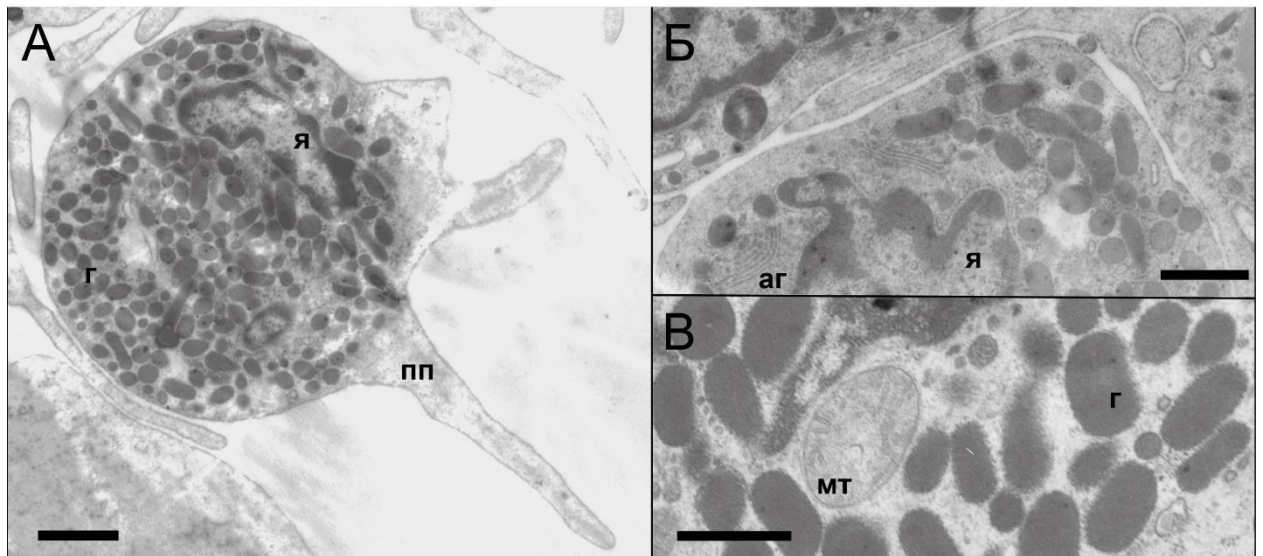




**Рисунок 16.** Целомоциты округлой формы, зафиксированные в суспензии. Дифференциальный интерференционный контраст. Г, Д – звездочками отмечены округлые клетки в составе агрегатов. Масштаб 20 мкм.



**Рисунок 17.** Мелкие целомоциты округлой формы, зафиксированные на стекле. Фиксация 4% PFA на FSW. Окраска гематоксилин+эозин. я – ядра, пп – псевдоподии. Масштаб 20 мкм.

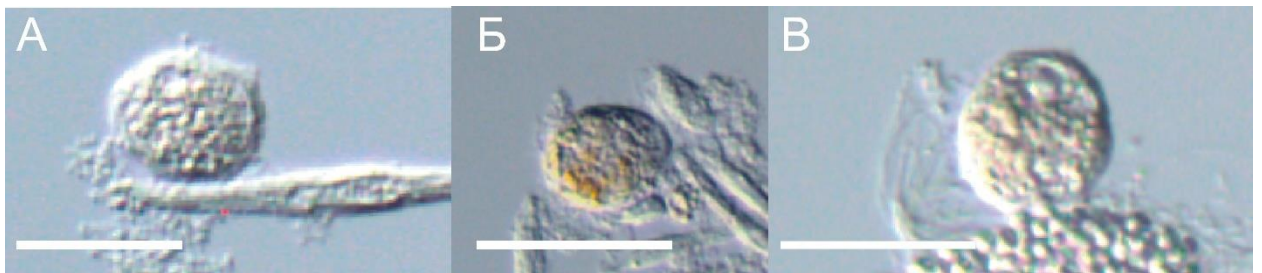


**Рисунок 18.** ТЭМ. А – округлый целомоцит с псевдоподиями (пп), Б, Г – гранулы. я – ядра, г, гранулы, аг – аппарат Гольджи, мт – митохондрия. Масштаб: А, Б – 1 мкм, В – 0,5 мкм.

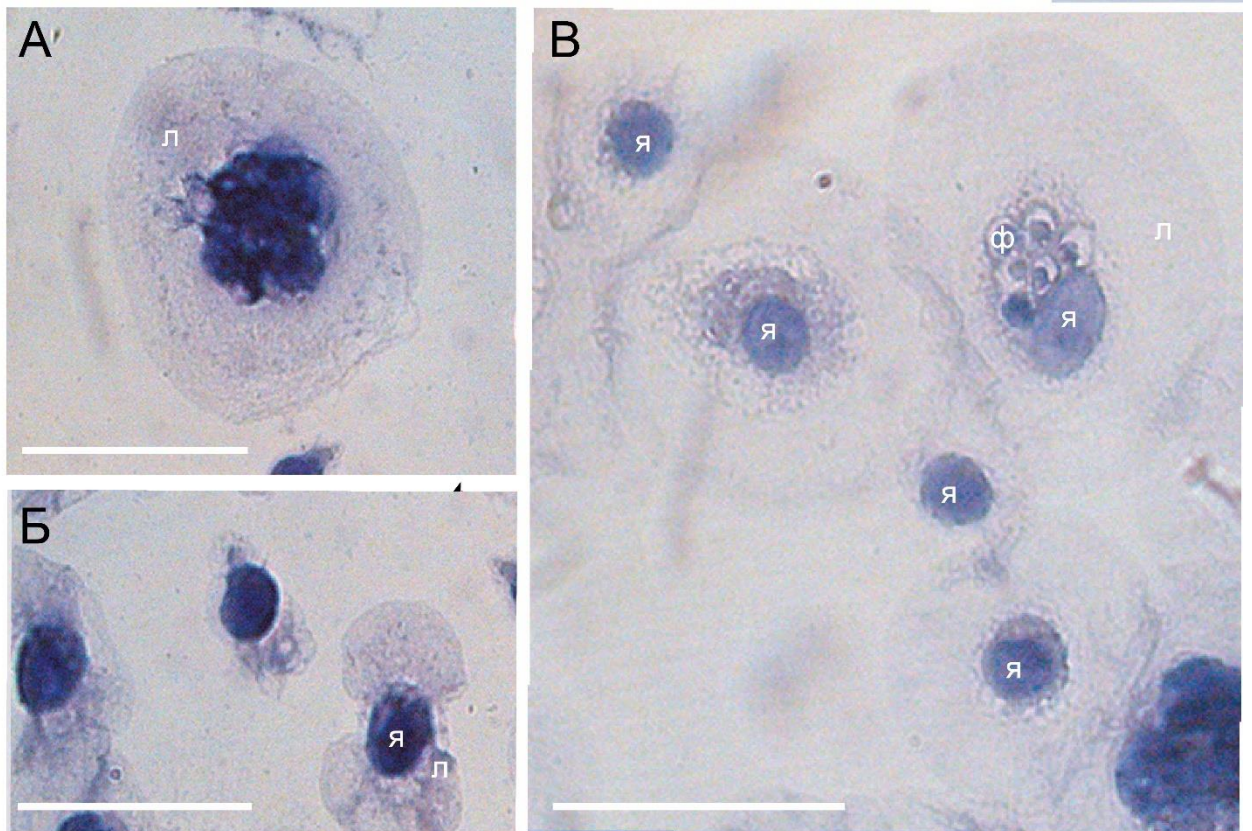




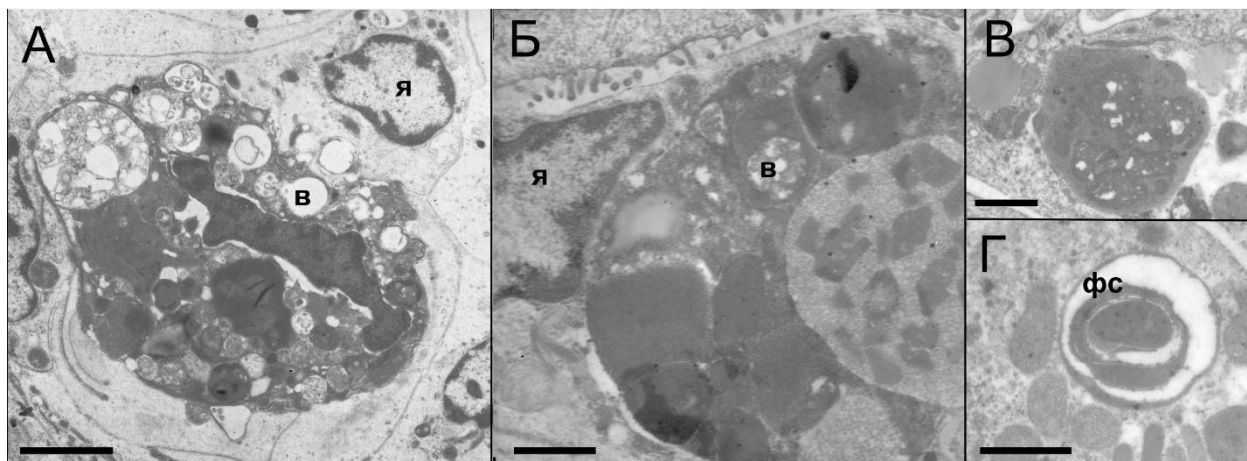
**Рисунок 19.** Живые целомоциты, распластывающиеся на стекле. Дифференциальный интерференционный контраст. л – ламеллоподии. Масштаб: А – 50 мкм, Б-Г – 20 мкм.



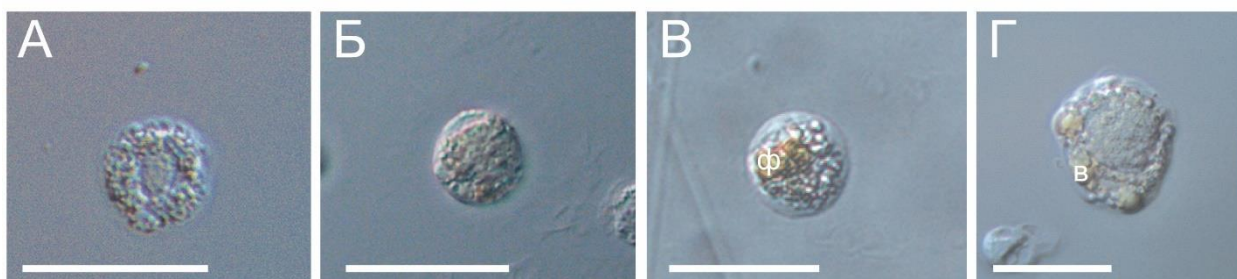
**Рисунок 20.** Целомоциты округлой формы с включениями, зафиксированные в суспензии. Дифференциальный интерференционный контраст. Масштаб 20 мкм.



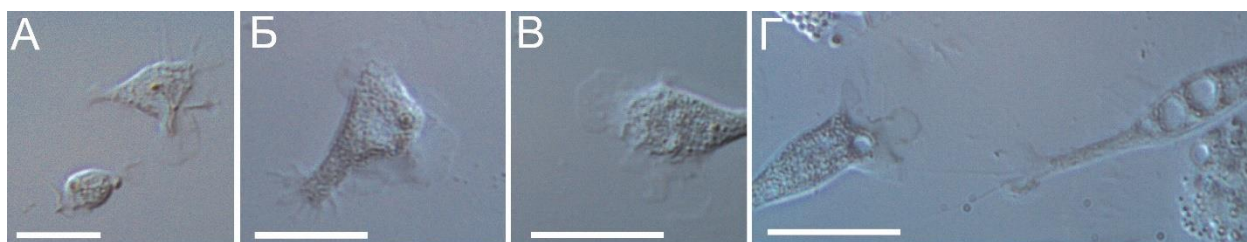
**Рисунок 21.** Распластывающиеся целомоциты, зафиксированные на стекле. Фиксация 4% PFA на FSW. Окраска гематоксилин+эозин. я – ядра, л – ламеллоподии, ф – фагосомы. Масштаб 20 мкм.



**Рисунок 22.** ТЭМ. Вакуолизованные целомоциты с включениями. я – ядра, фс – фагосомы, в – вакуоли. Масштаб: А, Б – 2 нм, В, Г – 0,5 нм.

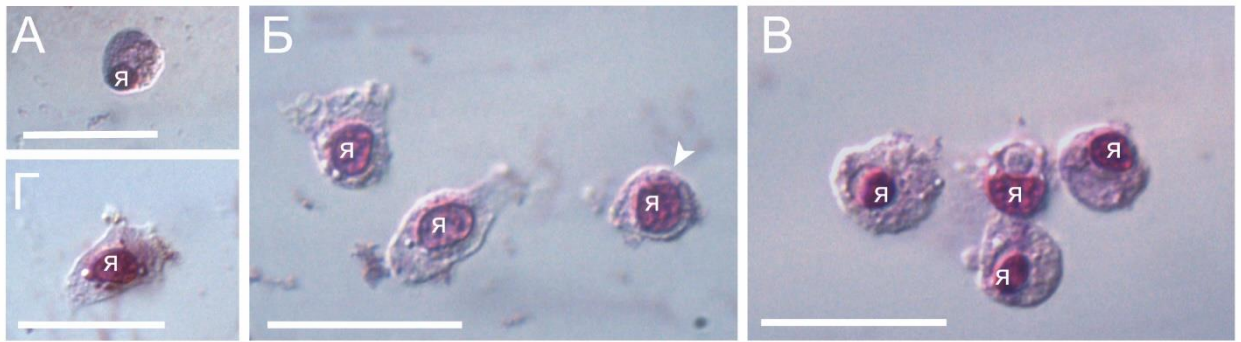


**Рисунок 23.** Живые целомоциты округлой формы с включениями. Дифференциальный интерференционный контраст. в – вакуоль, ф – фагосома. Масштаб 20 мкм.

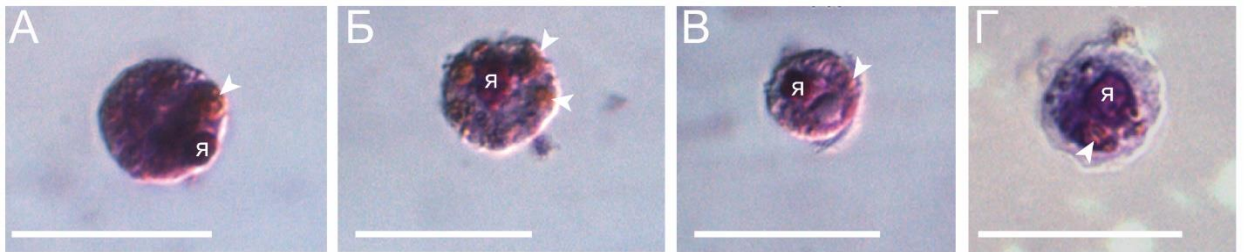


**Рисунок 24.** Живые целомоциты неопределенной формы, расплывающиеся на стекле. Дифференциальный интерференционный контраст. Масштаб 20 мкм.

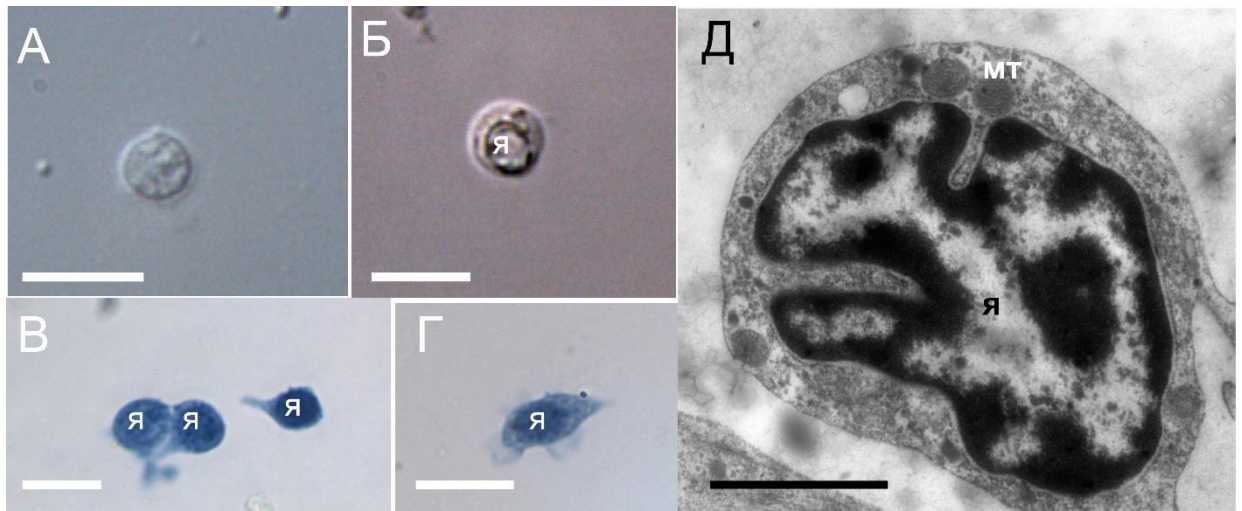




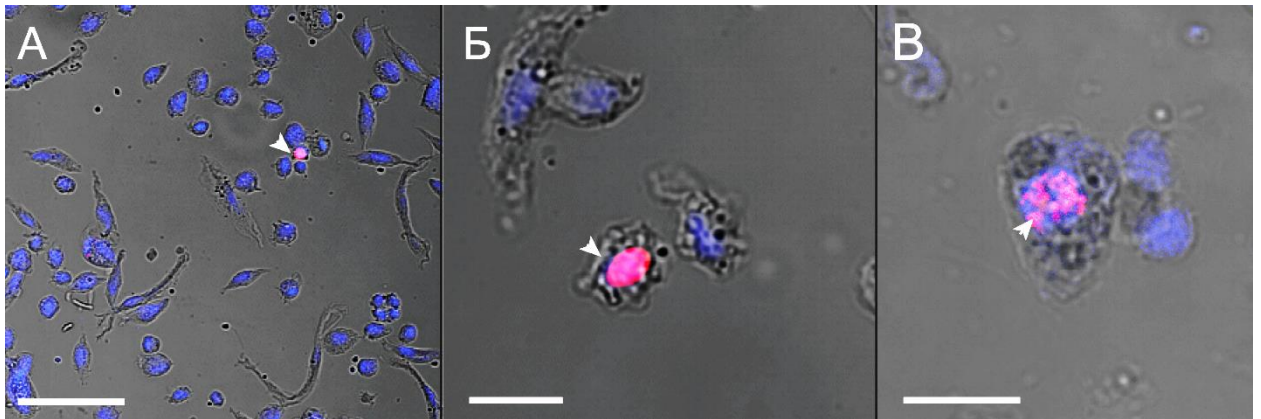
**Рисунок 25.** Мелкие целомоциты с прозрачной цитоплазмой без псевдоподий, зафиксированные на стекле. Фиксация 4% PFA на FSW. Окраска гематоксилин+эозин. я – ядра. Масштаб 20 мкм.



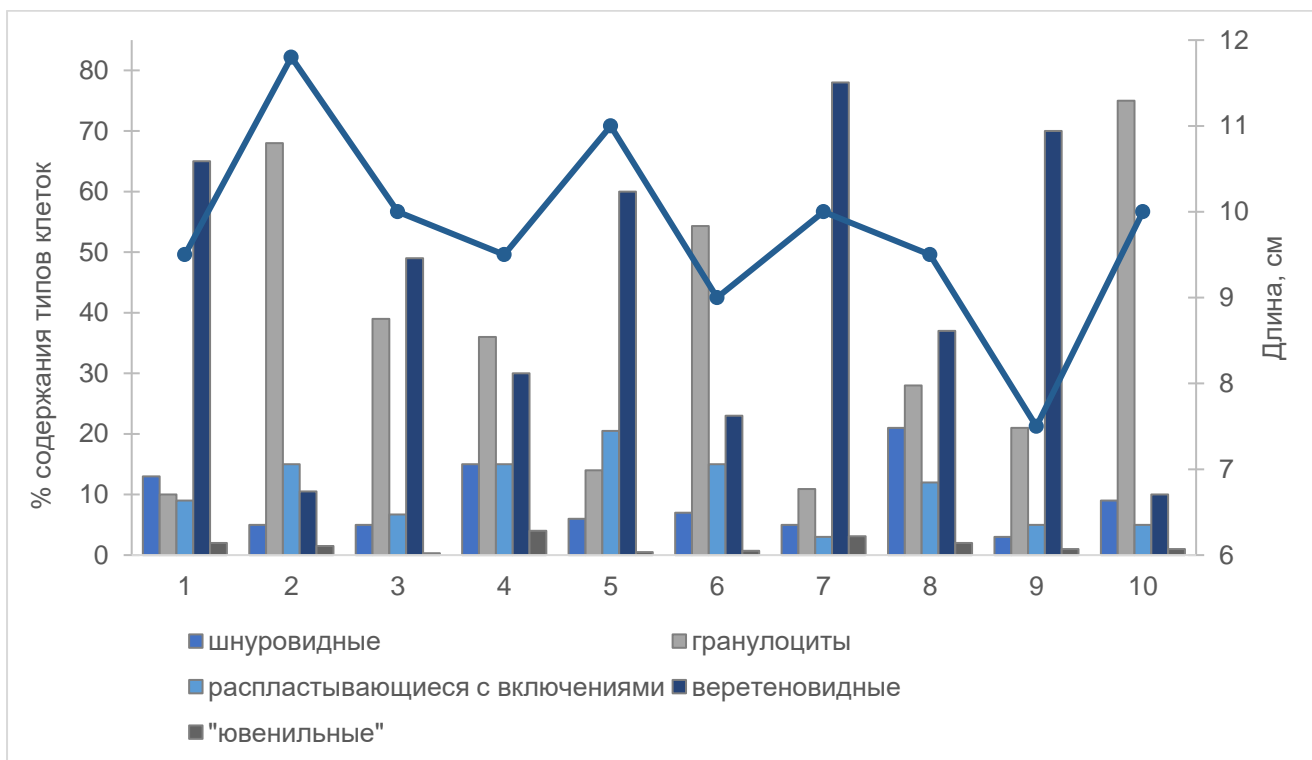
**Рисунок 26.** Целомоциты округлой формы с фагосомами (стрелки) и без псевдоподий, зафиксированные на стекле. Фиксация 4% PFA на FSW. Окраска гематоксилин+эозин. я – ядра, масштаб 20 мкм.



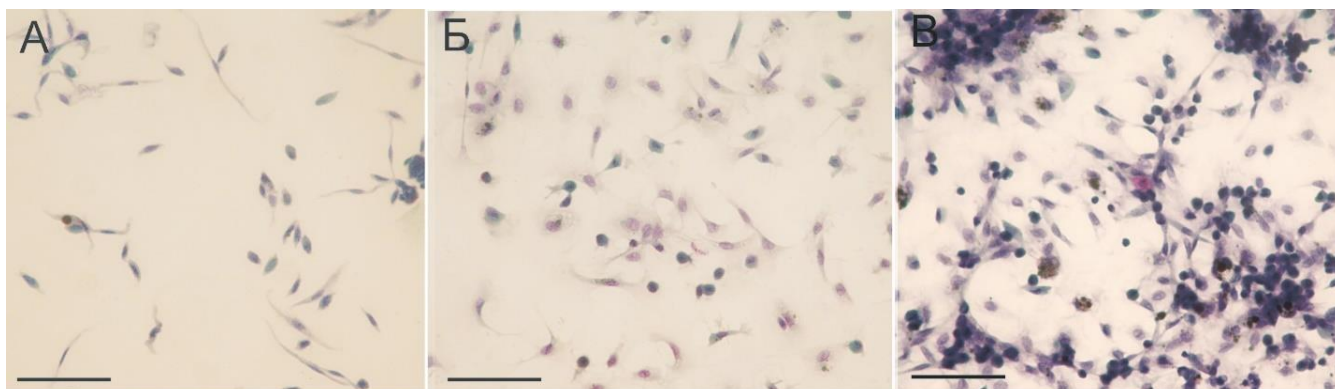
**Рисунок 27.** «Ювенильные» целомоциты. А, Б – живые, В, Г – зафиксированные на стекле (фиксация 4% PFA на FSW, окраска гематоксилином по Караччи), Д – ТЭМ. я – ядра, мт – митохондрии. Масштаб: А-Г – 10 мкм, Д – 1 мкм.



**Рисунок 28.** Мечение EdU (ядра с меткой отмечены стрелками). А, Б – целомоциты после инкубации с предшественником в течение 12 часов, В – остаточная метка в образце после 24 часов инкубации. Масштаб: А – 50 мкм, Б-В – 10 мкм.

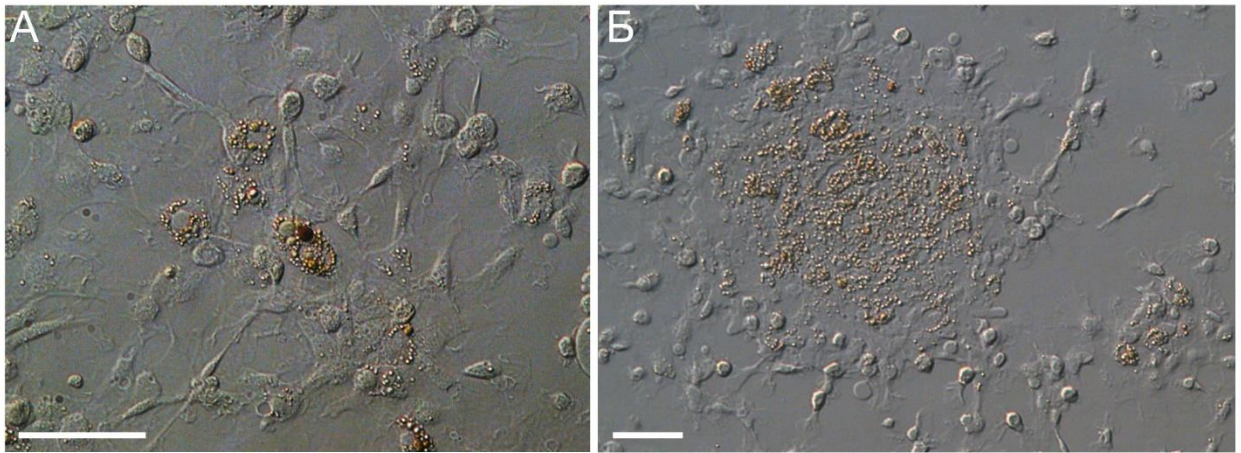


**Рисунок 29.** Соотношение клеточных типов в образцах целолической жидкости, разбавленных CMFSS в 2-4 раза и осажденных на стекло. Фиксация 2,5% глутаральдегидом на FSW. Окраска по Гимза-Романовскому. Для примера представлена выборка, отобранная в июле 2018 г, 1-5 – самки, 6-10 – самцы, для каждой особи учтено не менее 1000 клеток.

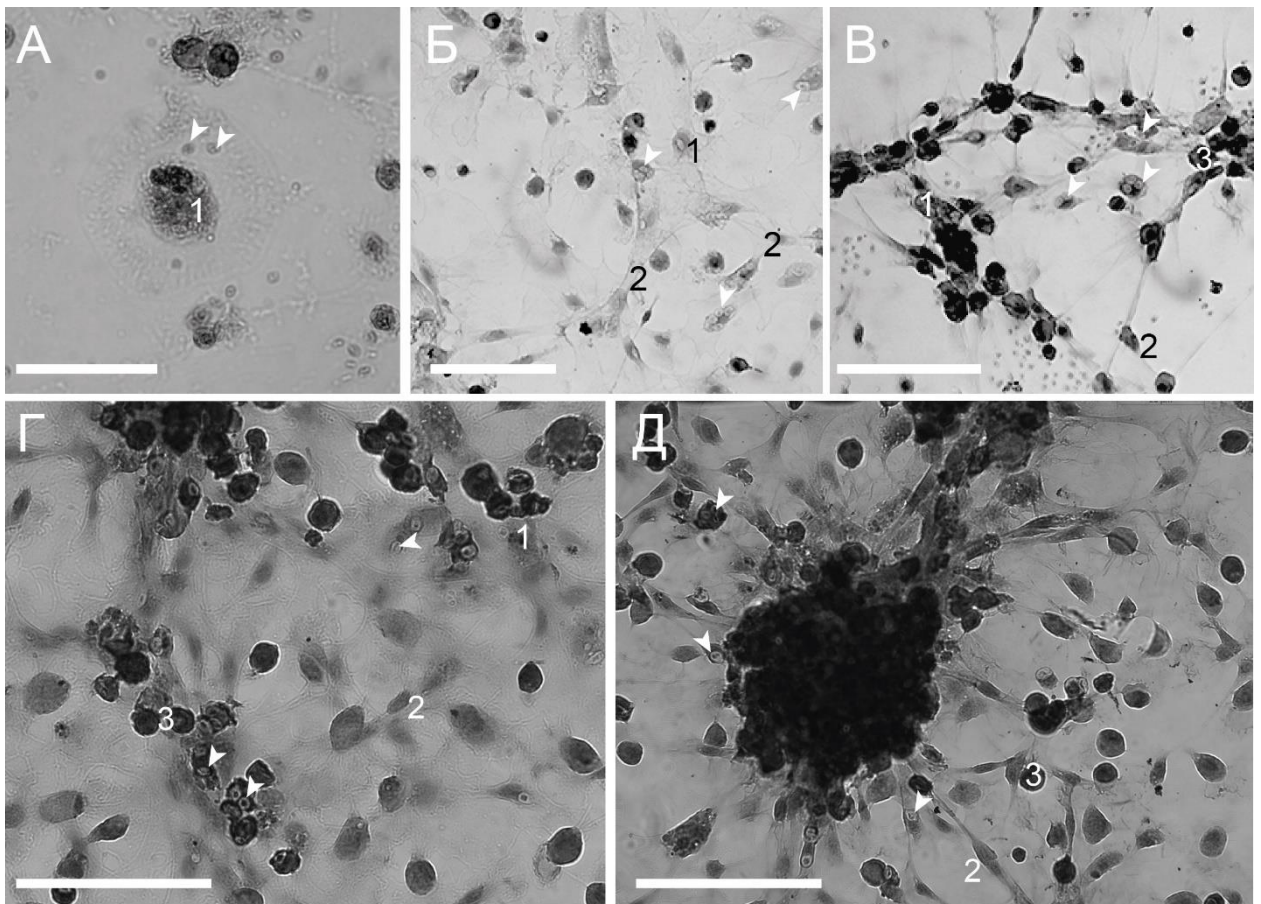


**Рисунок 30.** А – целоциты, зафиксированные в суспензии, Б, В – на стекле в процессе формирования монослоя, через 30 минут после оседания. Б – образец, разбавленный в 4 раза CMFSS, В – неразбавленный образец. Фиксация 2,5% глутаральдегидом на FSW, окраска по Гимза-Романовскому. Масштаб 50 мкм.

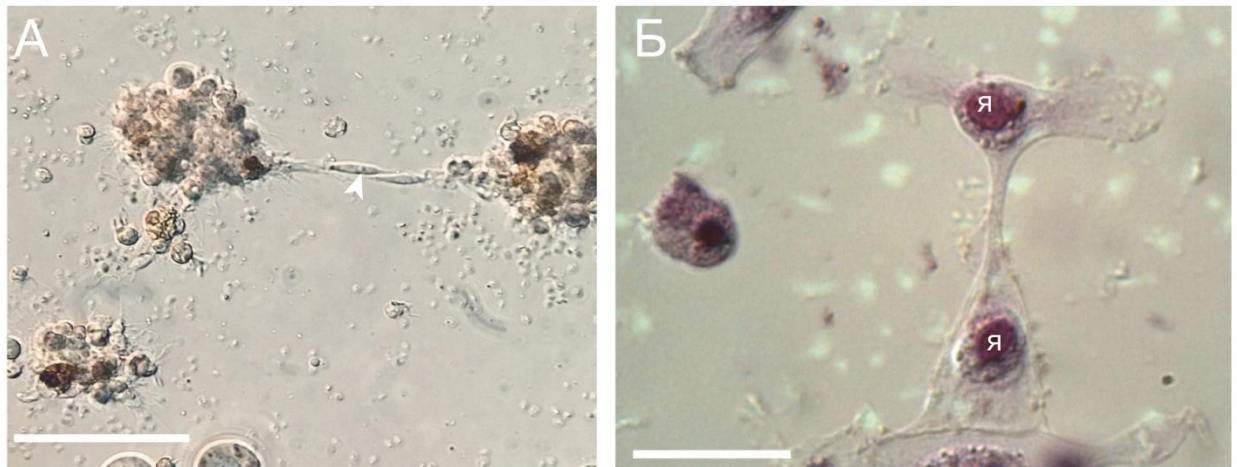




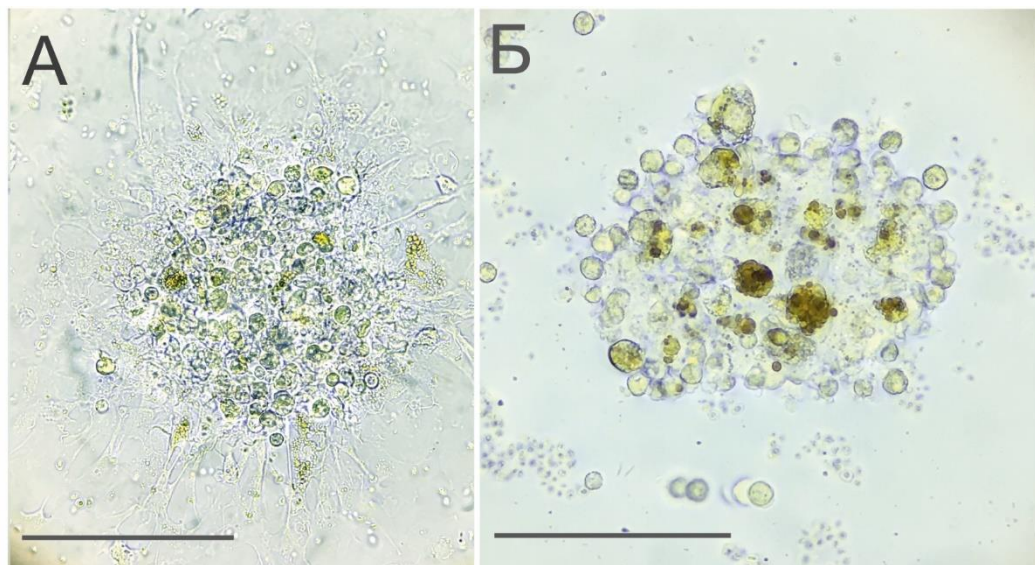
**Рисунок 31.** А – распластывающиеся целомоциты с включениями, участвующие в формировании монослоя, Б – дегрануляция распластывающихся целомоцитов, инициирующая агрегацию. Дифференциальный интерференционный контраст. Масштаб 50 мкм.



**Рисунок 32.** Целомоциты, зафиксированные на стекле, после смешивания с суспензией зимозана. А-В – фиксация через 15 минут, Б, В – фиксация через 30 минут, Д – фиксация через 1 час. Фиксация 4% PFA на FSW. Окраска гематоксилином по Караччи. Стрелками отмечены частицы зимозана. 1 – распластывающиеся целомоциты с включениями, 2 – распластывающиеся веретеновидные целомоциты, 3 – мелкие целомоциты с псевдоподиями. Масштаб 50 мкм.

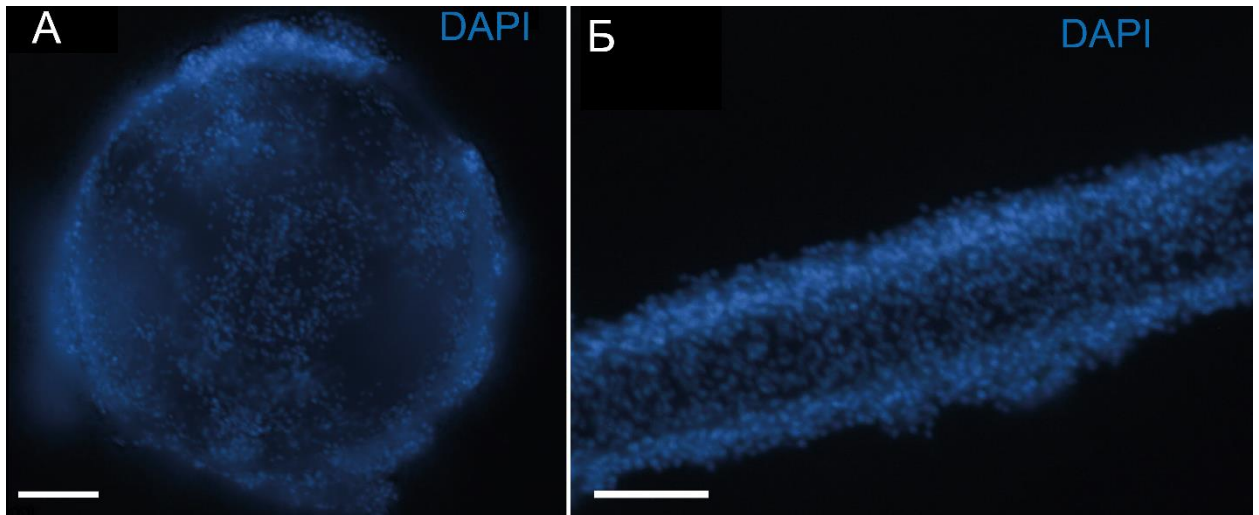


**Рисунок 33.** А – формирование агрегатов живыми целомоцитами через 30 минут после смешивания с суспензией зимозана, стрелкой отмечены клетки вытянутой формы, создающие «мостики» между агрегатами. Б – цитоплазматический мостик между двумя распластывающимися целомоцитами вытянутой формы в процессе формирования монослоя, фиксация 4% PFA на FSW, окраска гематоксилином по Караччи. Формирование «мостиков» происходит посредством прозрачной цитоплазмы без включений. я – ядра. Масштаб: А – 50 мкм, Б – 20 мкм.

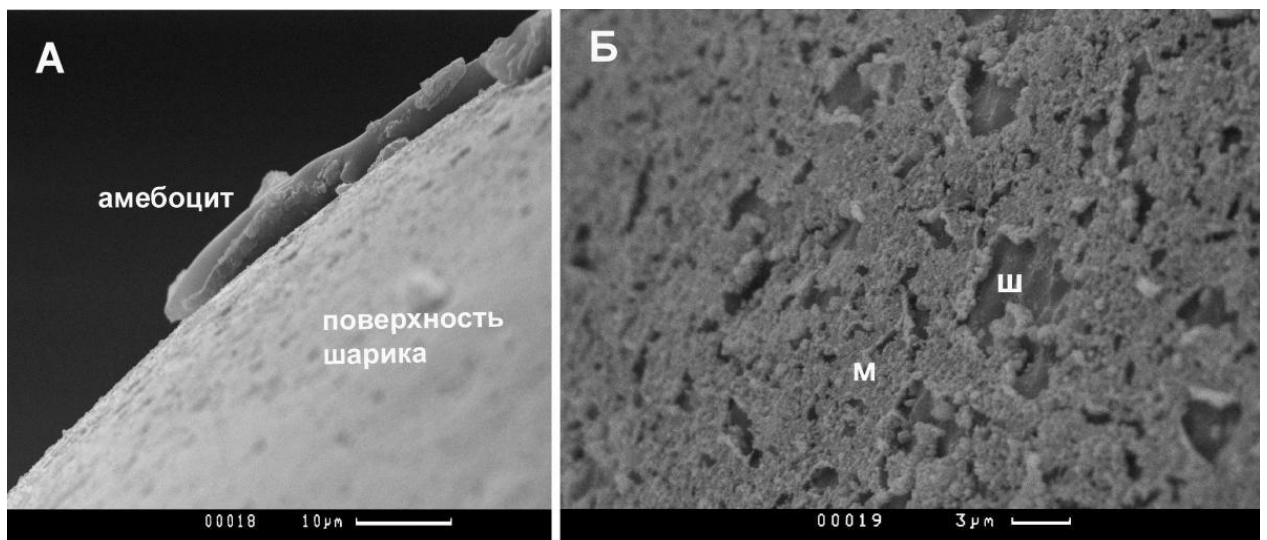


**Рисунок 34.** А, Б – живые агрегаты целомоцитов, отобранные из целомической полости через 20 минут (А) и через 1 час (Б) после инъекции зимозана. Масштаб 50 мкм.



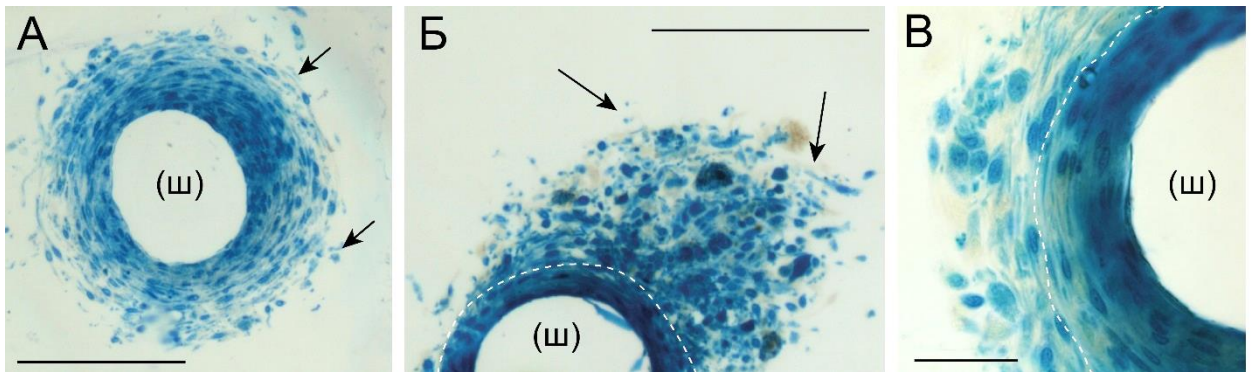


**Рисунок 35.** Капсулы, окружающие инородные тела после суток инкубации. А – стеклянный шарик, Б – отрезок шерсти. Ядра клеток визуализированы DAPI. Конфокальная микроскопия. Масштаб 50 мкм.

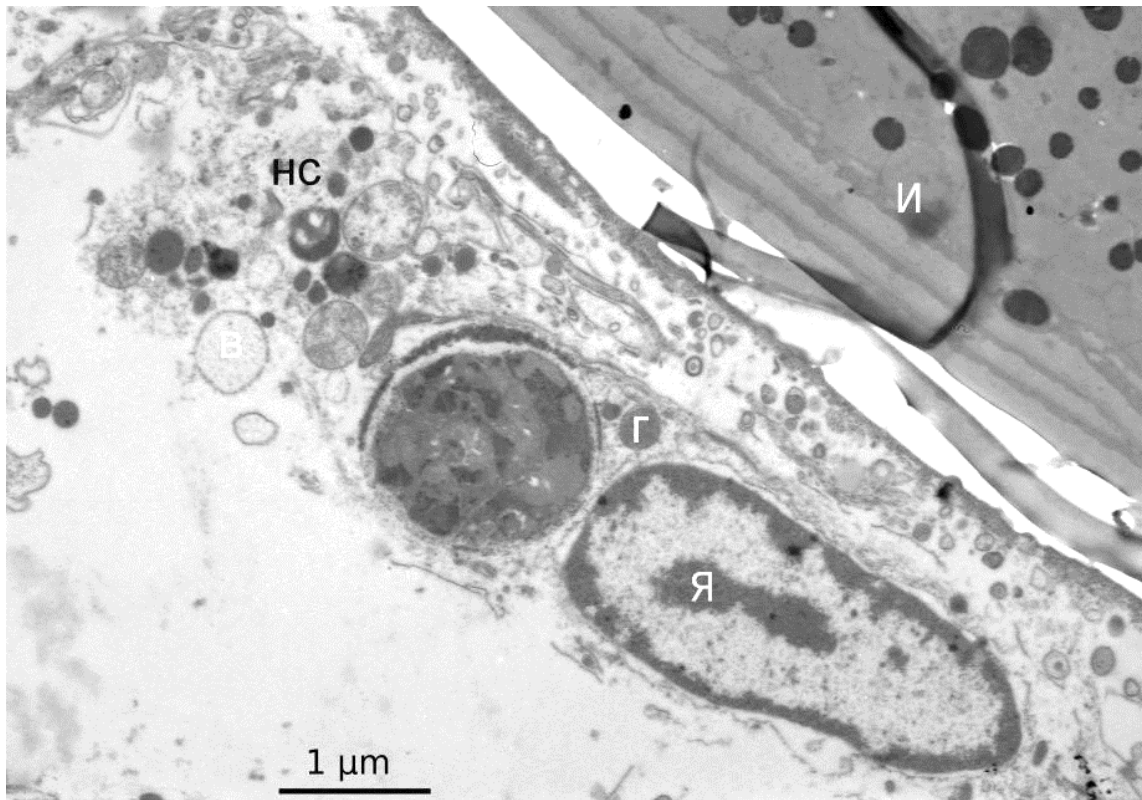


**Рисунок 36.** А – амебоцит на поверхности стеклянного шарика, Б – внеклеточный матрикс на поверхности шарика. СЭМ. ш – поверхность шарика, м – матрикс.

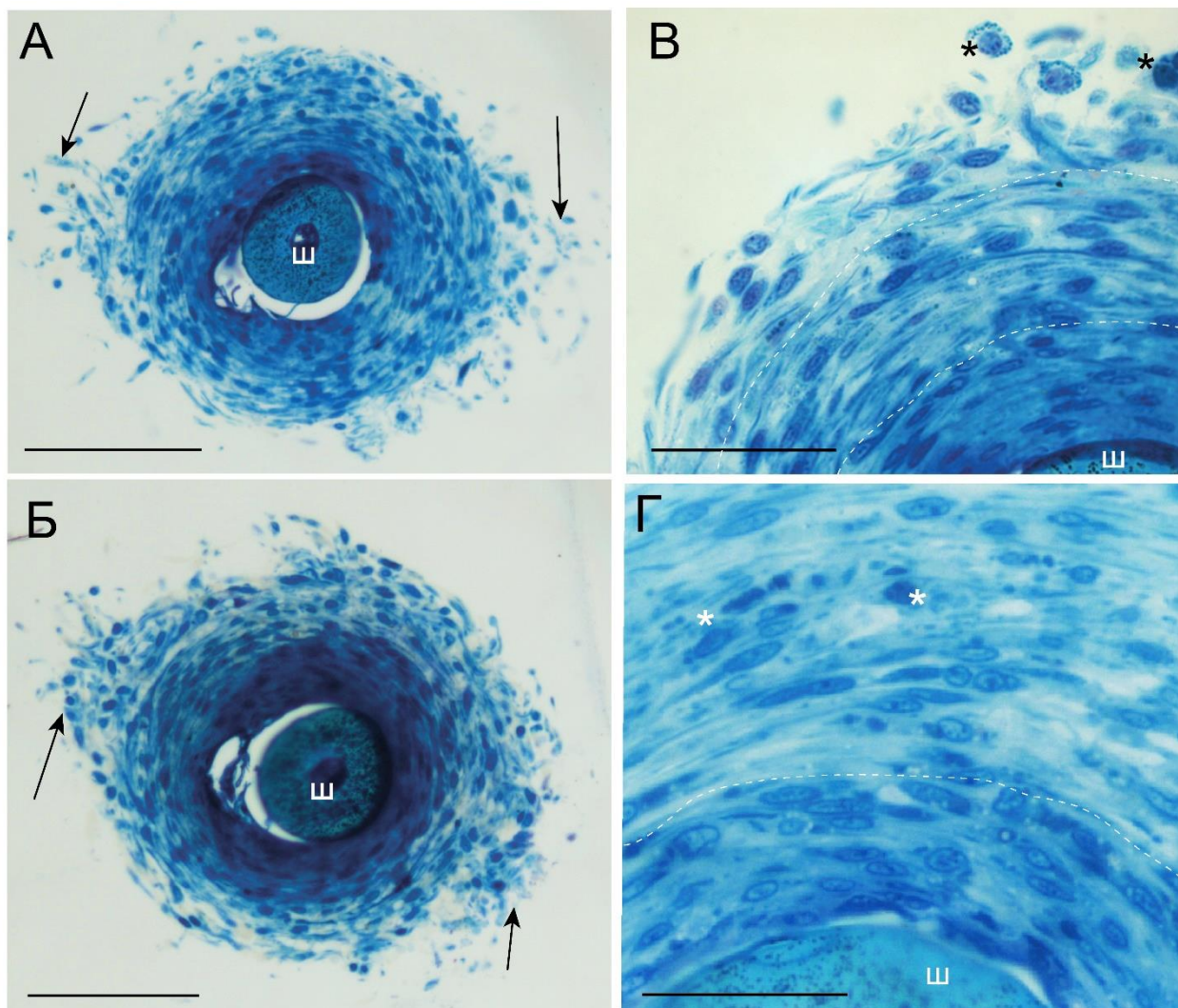




**Рисунок 37.** Поперечные срезы капсул возраста 2 суток (шерсть выпала при резке). Окраска метиленовый синий + толлуидиновый синий. (ш) – место, где была шерсть. Проведена граница между двумя слоями клеток. Стрелки указывают подвижные клетки в поверхностном слое. Масштаб: А, Б – 100 мкм, В – 20 мкм.

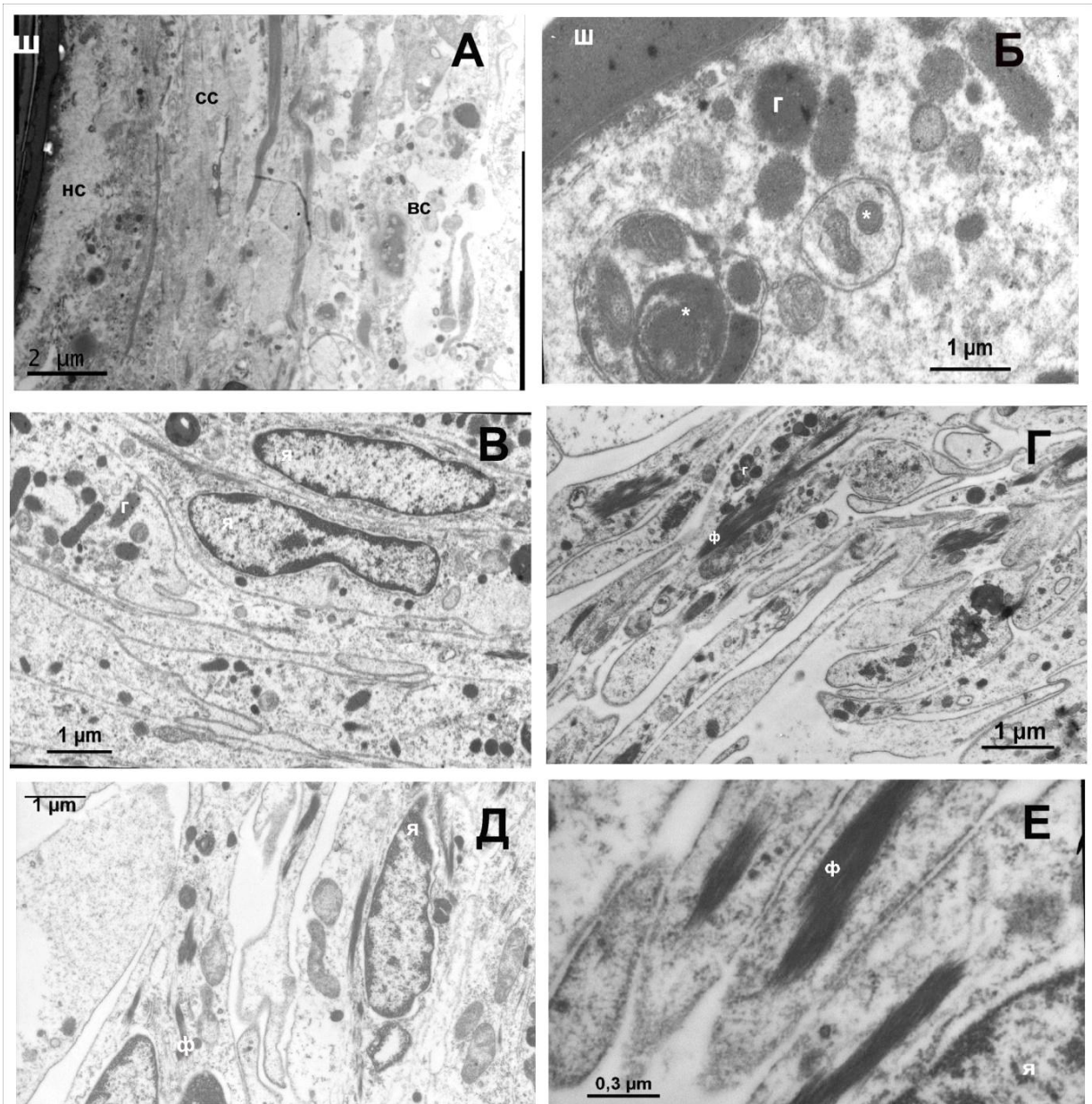


**Рисунок 38.** Участок капсулы на начальной стадии инкапсуляции. И — инородное тело (шерсть), я — ядро, в — вакуоль, г — гранулы, нс — неклеточный слой, представленный разрушающимися целоμοцитами.

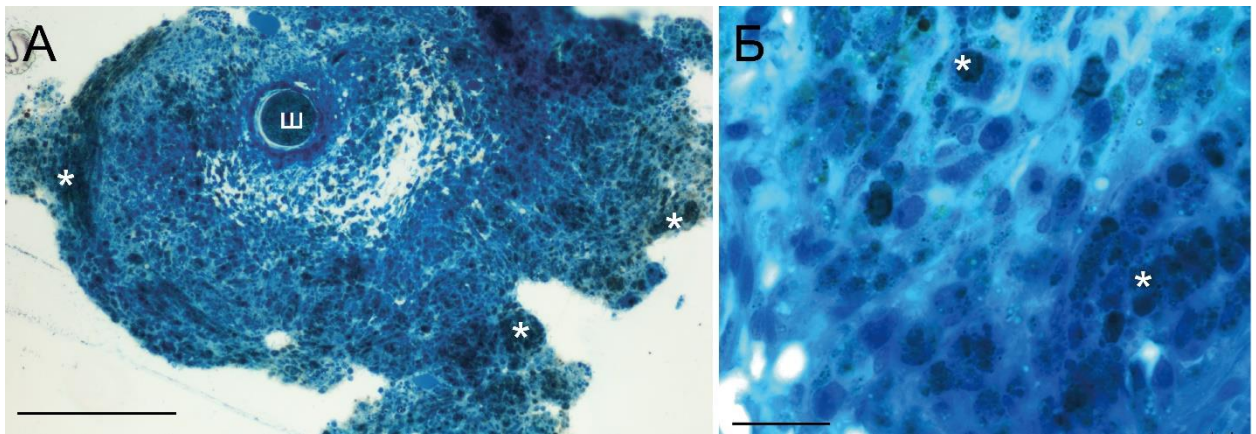


**Рисунок 39.** Поперечные срезы капсулы: А, Б - возраста 4 суток, В, Г – возраста 6 суток. Окраска метиленовой синий + толлуидиновой синий. Проведены границы между слоями клеток. Ш — шерсть. Стрелки указывают подвижные клетки в поверхностном слое, звездочками отмечены клетки с включениями. Масштаб: А, Б – 100 мкм, В, Г – 20 мкм.

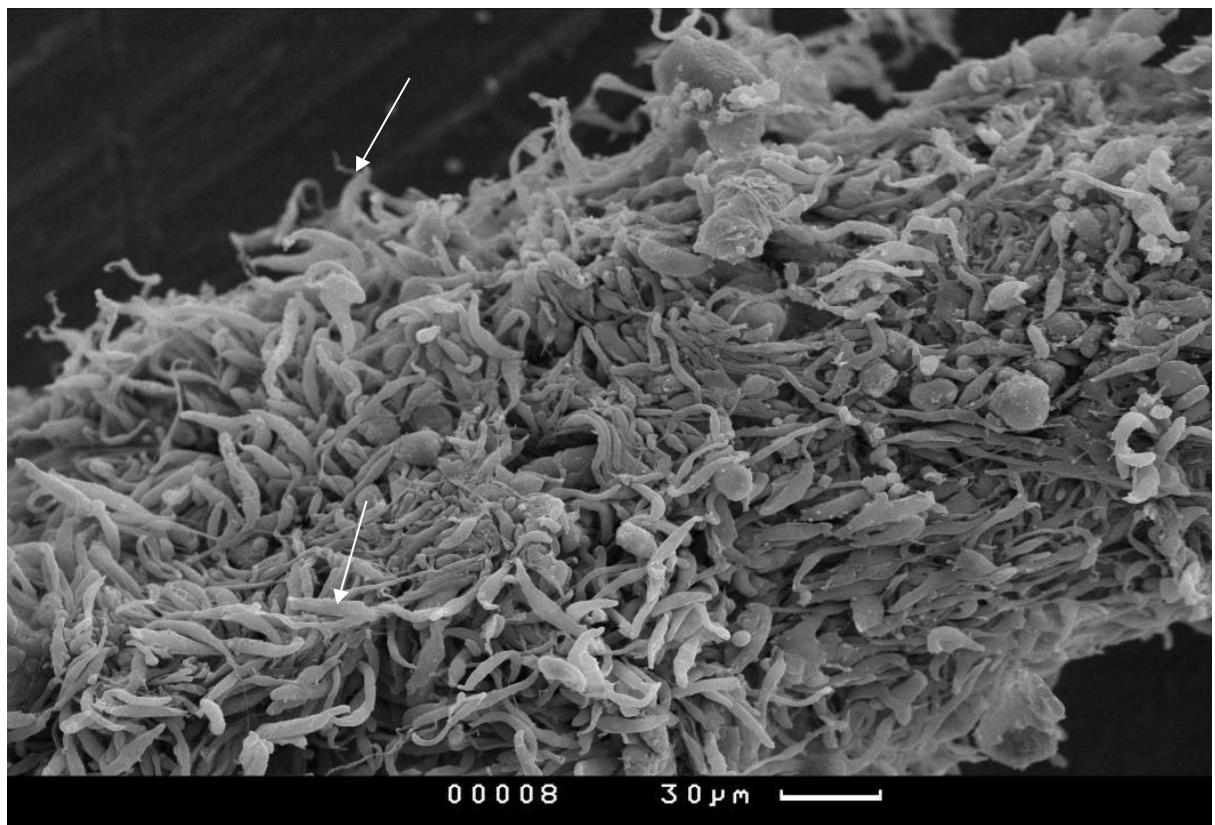




**Рисунок 40.** Ультратонкое строение капсулы возраста 4 суток. А — общий вид, Б — участок внутреннего слоя, В — участок среднего слоя, Г, Д — участки внешнего слоя, Е — филаменты в отростках клеток внешнего слоя капсулы. нс — неклеточный внутренний слой, сс — средний слой, вс — внешний слой, я - ядра, г — гранулы, ф — пучки филаментов. Звездочками отмечены структуры, характерные для разрушающихся клеток внутреннего слоя.

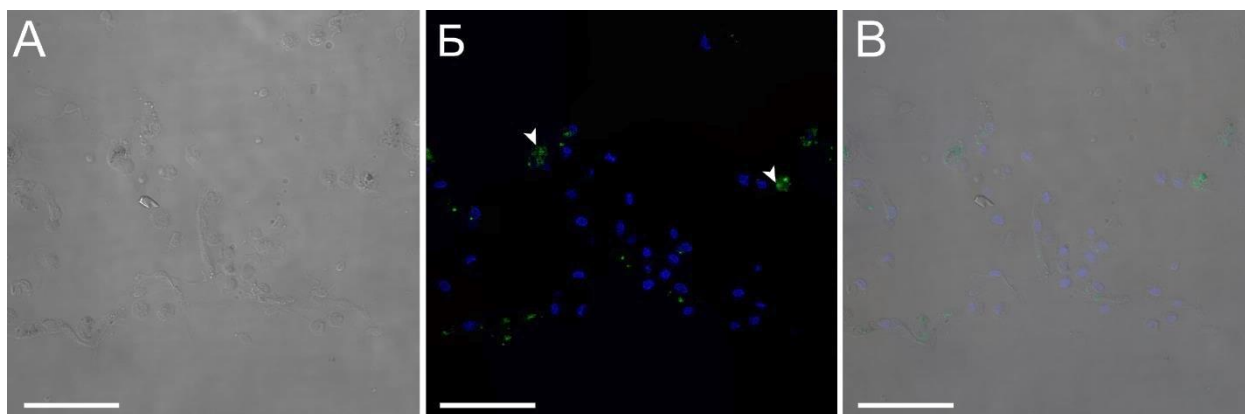


**Рисунок 41.** Поперечные срезы капсулы возраста 12 суток. Ш — шерсть. Звездочками отмечены пигментированные участки. Масштаб: А – 200 мкм, Б – 20 мкм.

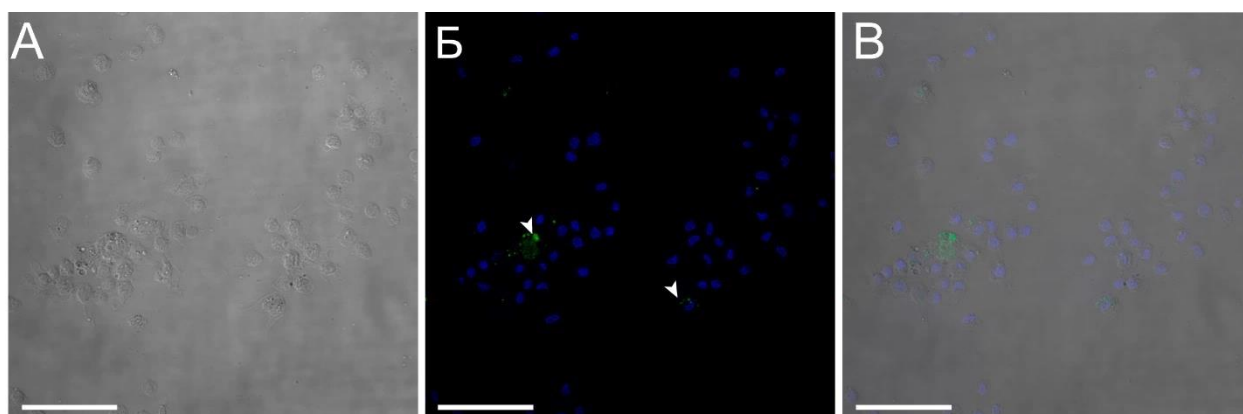


**Рисунок 42.** Поверхность капсулы возраста 6 суток. СЭМ. Видны многочисленные отростки подвижных клеток (стрелки).

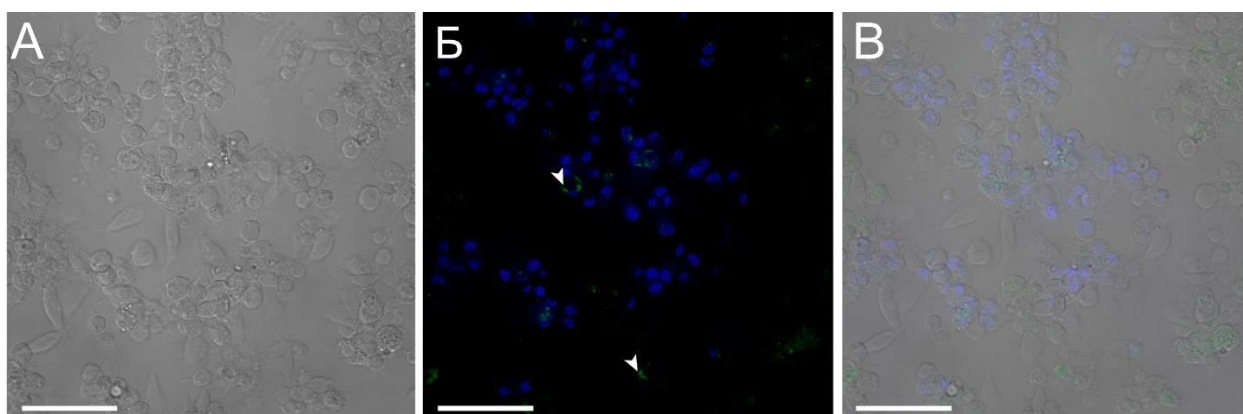




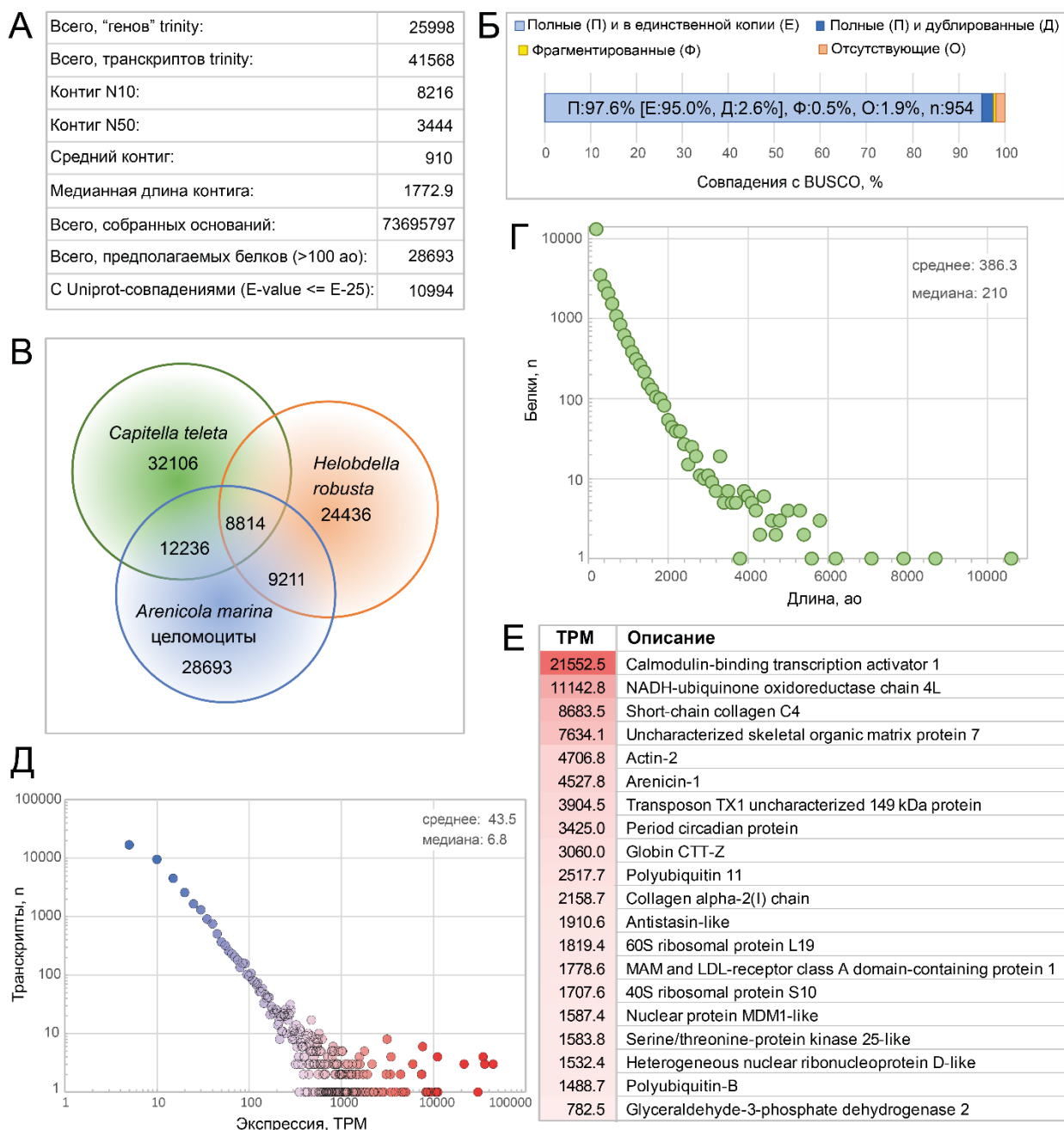
**Рисунок 43.** Образец целомической жидкости, отобранный через 15 минут после инъекции LPS. А – внешний вид целомоцитов; Б – **DAPI**, **LPS** (стрелки), В – суммированное изображение. Масштаб 50 мкм.



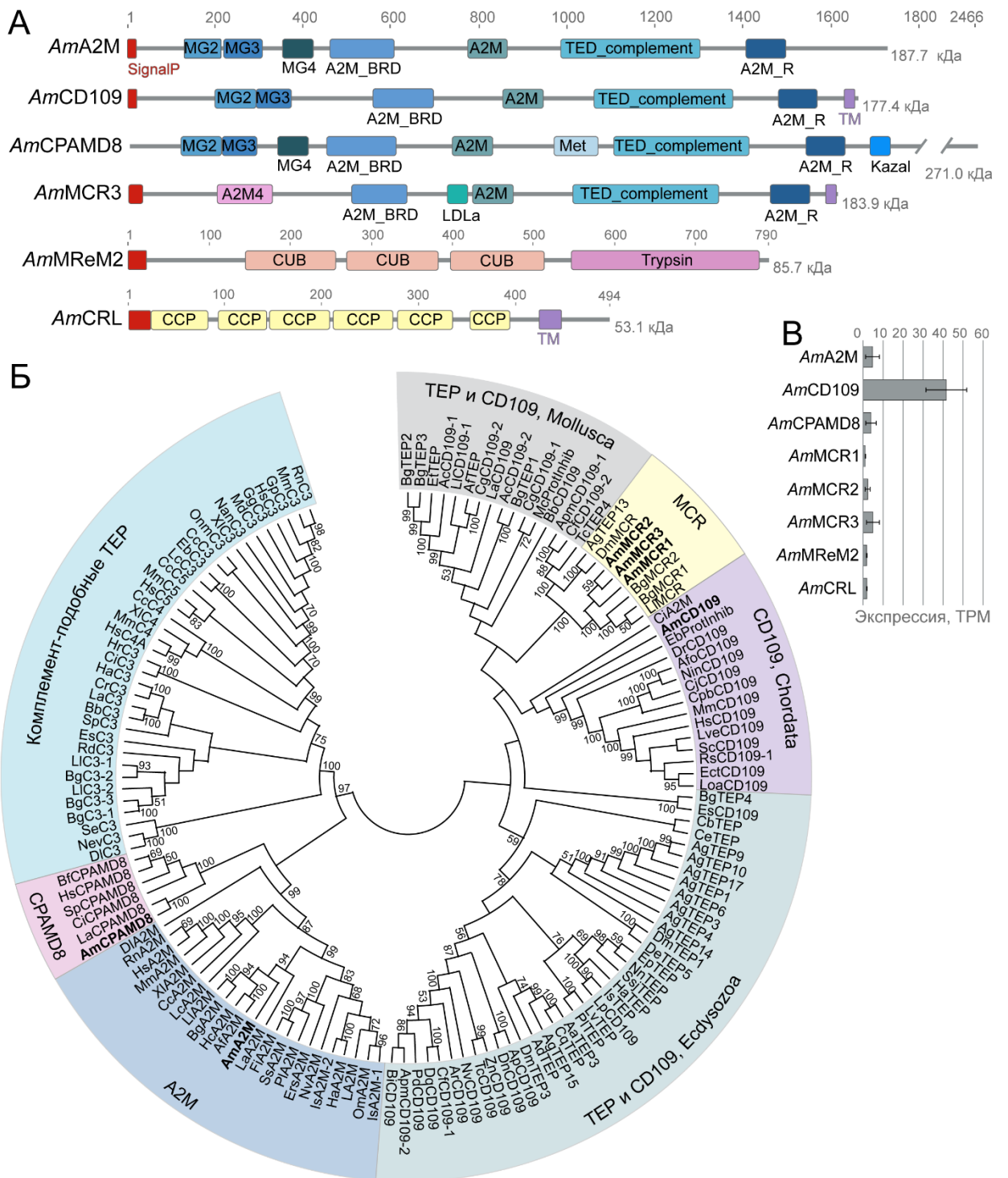
**Рисунок 44.** Образец целомической жидкости, отобранный через 30 минут после инъекции LPS. А – внешний вид целомоцитов; Б – **DAPI**, **LPS** (стрелки), В – суммированное изображение. Масштаб 50 мкм.



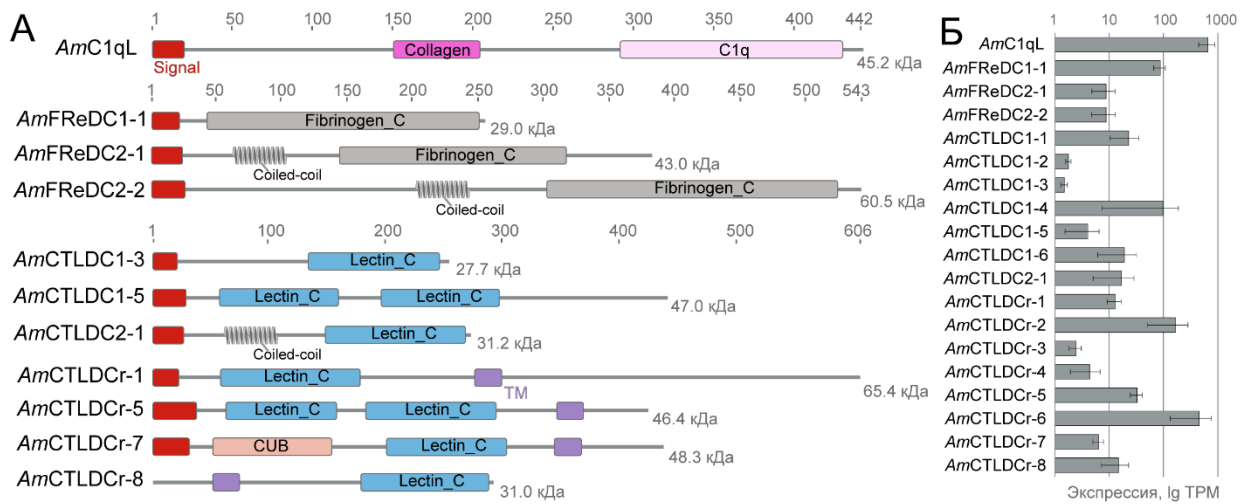
**Рисунок 45.** Образец целомической жидкости, отобранный через час после инъекции LPS. А – внешний вид целомоцитов; Б – **DAPI**, **LPS** (стрелки), В – суммированное изображение. Масштаб 50 мкм.



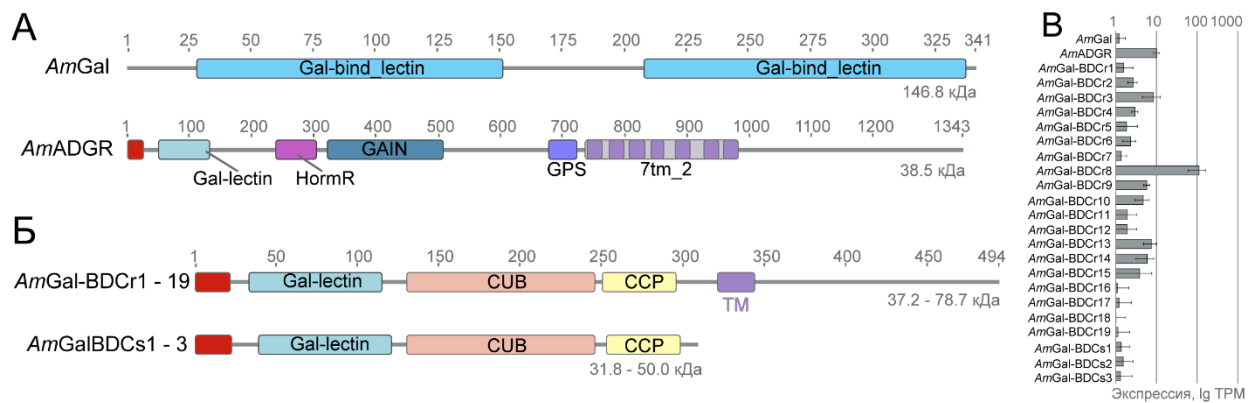
**Рисунок 46.** Характеристика сборки транскриптома целомоцитов *A. marina*. А – суммарная статистика сборки; Б сравнительный анализ множества предсказанных белков с набором BUSCO (v4.1.4; Metazoa\_odb10); В – сходство числа белков в транскриптоме целомоцитов и белков, предполагаемых из геномов *Capitella teleta* и *Helobdella robusta* (диаграмма Венна); Г – распределение длины предполагаемых белков; Д – распределение экспрессии транскриптов (TPM) на основе оценки *in silico*; Е – экспрессия первых 20 аннотированных белков (распределение по величине экспрессии) (из Stanovova, Gazizova, Gorbushin, 2022).



**Рисунок 47.** Характеристика белков группы прото-комплемента. А – доменная архитектура тиозэфир-содержащих белков (ТЕР), сериновой протеазы AmMReM2 и комплемент-рецептор-подобного белка; Б – филогенетическое дерево белков ТЕР *A. marina* и других членов суперсемейства. Для построения дерева использован модифицированный датасет из Duval et al., 2020. Белки *A. marina* выделены полужирным. В – экспрессия транскриптов, нормализованная средняя оценка TPM с доверительными интервалами 95% (из Stanovova, Gazizova, Gorbushin, 2022).

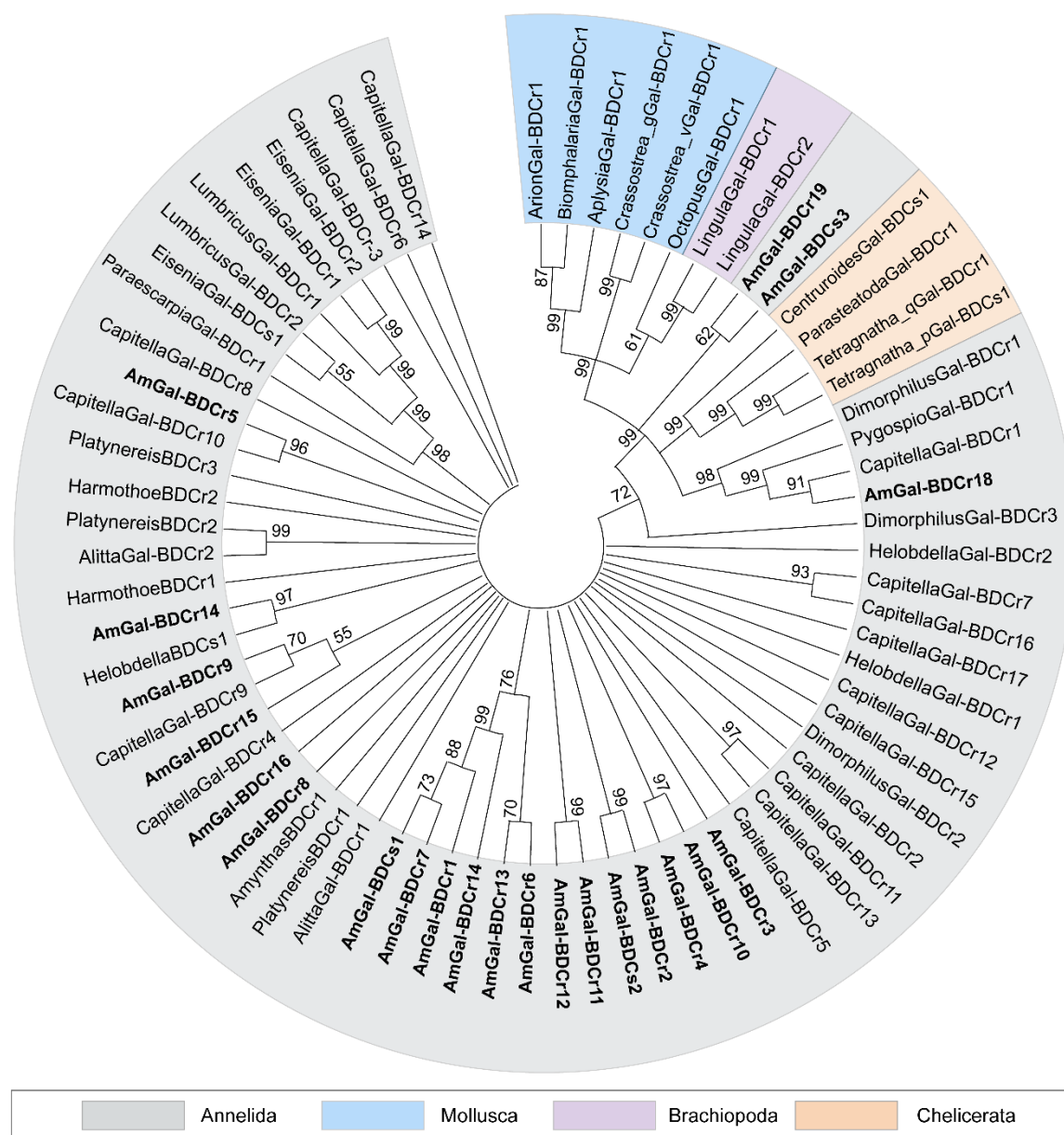


**Рисунок 48.** Характеристика лектин-подобных белков C1qL, FReDC и CTLDC из целомоцитов *A. marina*. А – доменная архитектура, Б – экспрессия транскриптов.

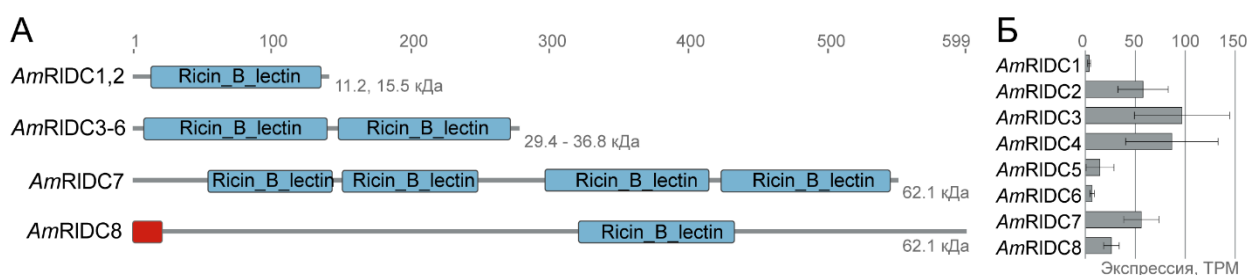


**Рисунок 49.** Характеристика галектинов *A. marina*. А – доменная архитектура галектина *AmGal*, латрофилин-подобного рецептора *AmADGR*; Б – доменная архитектура нового подсемейства галектин-подобных рецепторов *AmGal-BDCr* и секретируемых белков *AmGal-BDCs*; В – экспрессия транскриптов (из Stanovova, Gazizova, Gorbushin, 2022).

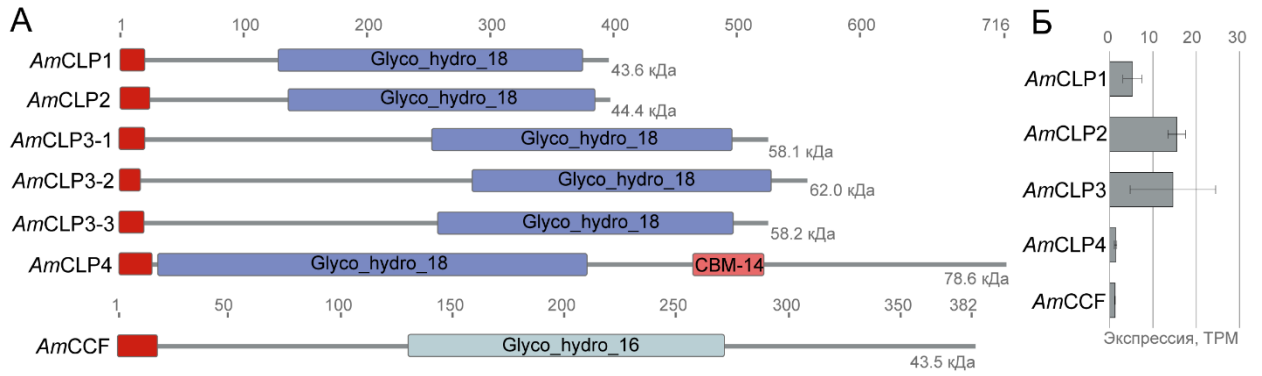




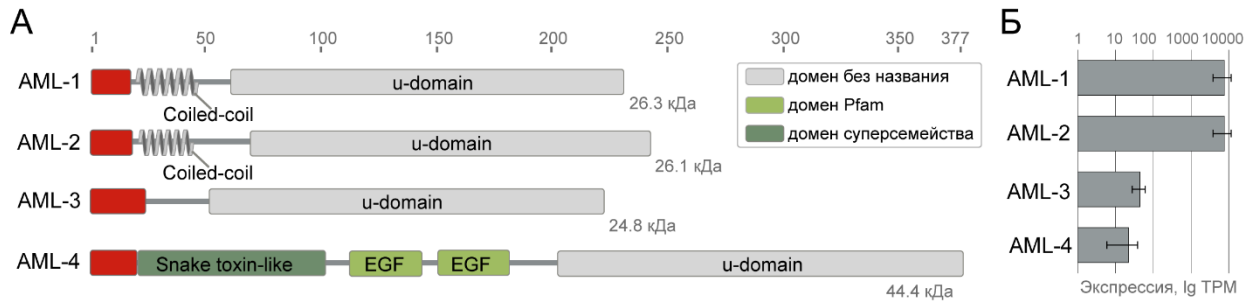
**Рисунок 50.** Филогенетическое дерево отношений нового подсемейства галектин-подобных белков *AmGal-BDC* с белками представителей других таксонов. Белки *A. marina* выделены полужирным (из Stanovova, Gazizova, Gorbushin, 2022).



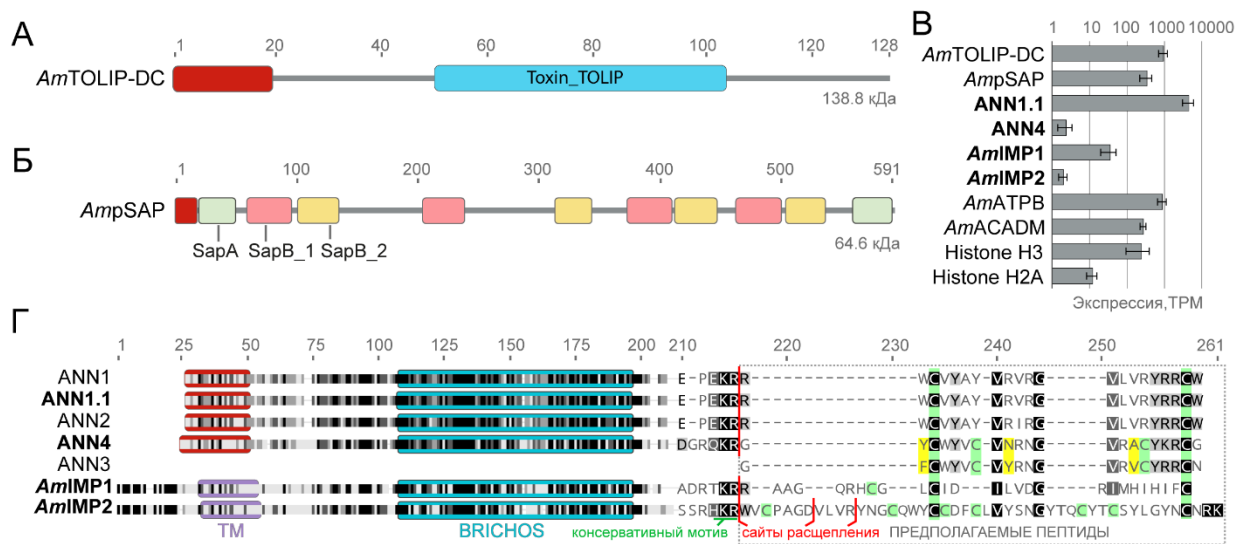
**Рисунок 51.** Характеристика белков *A. marina*, содержащих ридин-лектиновый домен (RIDC). А – доменная архитектура, Б – экспрессия транскриптов (из Stanovova, Gazizova, Gorbushin, 2022).



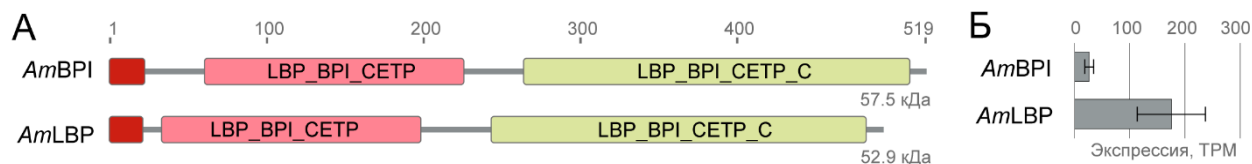
**Рисунок 52.** Характеристика хитиназа-подобных лектинов (CLP) и целомического цитолитического фактора (CCF) *A. marina*. А – доменная архитектура, Б – экспрессия транскриптов (из Stanovova, Gazizova, Gorbushin, 2022).



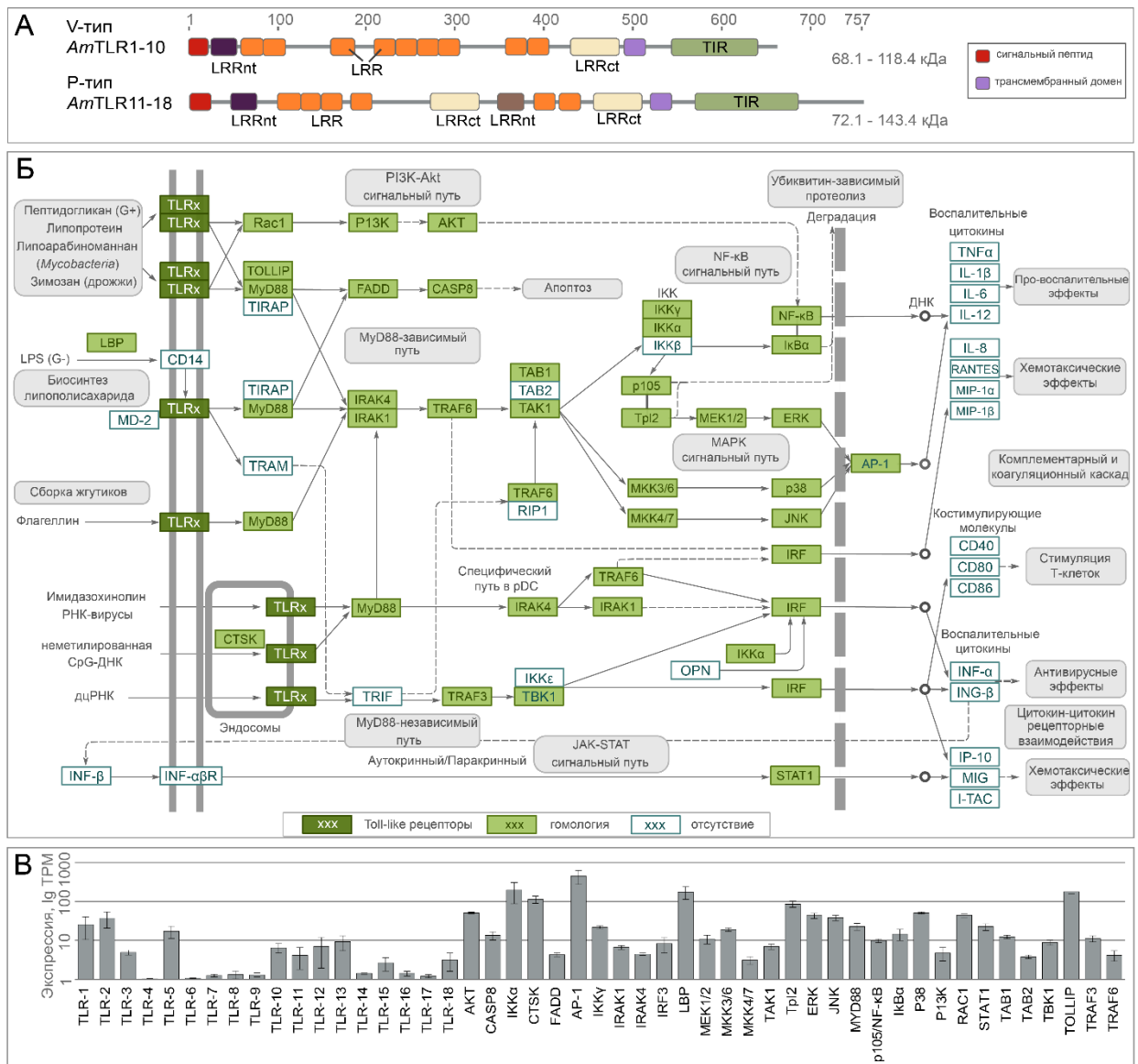
**Рисунок 53.** Доменная архитектура (А) и экспрессия транскриптов (Б) AML-1 и AML-подобных лектинов *A. marina* (из Stanovova, Gazizova, Gorbushin, 2022).



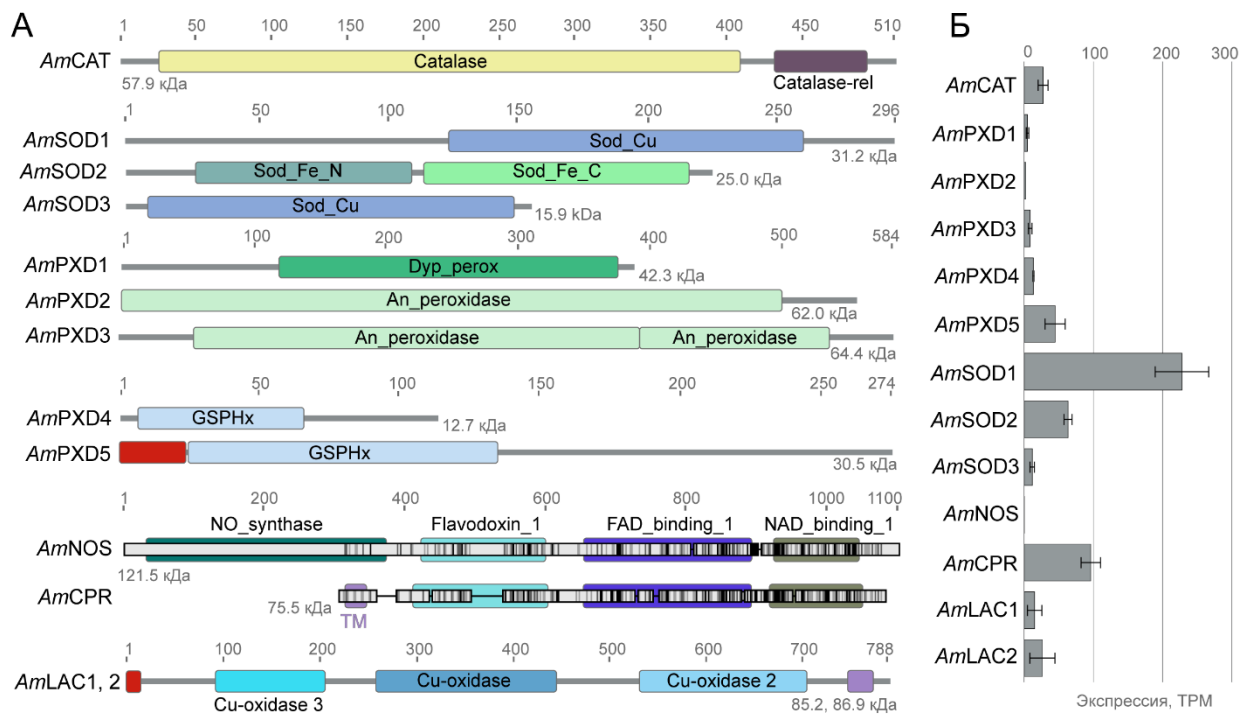
**Рисунок 54.** Характеристика поро-формирующих молекул и предшественников антимикробных пептидов *A. marina*. А – доменная архитектура TOLIP-содержащего белка *AmTOLIP-DC*; Б – доменная архитектура просапонина *AmpSAP*; В – экспрессия *AmTOLIP-DC*, *AmpSAP*, BRICHOS-содержащих белков, митохондриальных и гистон-производных AMP; Г – выравнивание BRICHOS-содержащих белков: ареницинов (ANNs), предшественников интегральных мембранных белков (*AmIMPs*) и предполагаемых производных пептидов. Новые последовательности выделены полужирным. Потенциальные сайты расщепления для сериновых протеаз были предположены с помощью iProt-Sub (Song et al., 2019). Цистеиновые остатки выделены зеленым. Парные отличия пептидов и отмечены желтым. Нумерация аминокислотных остатков соответствует позициям на выравнивании (из Stanovova, Gazizova, Gorbushin, 2022).



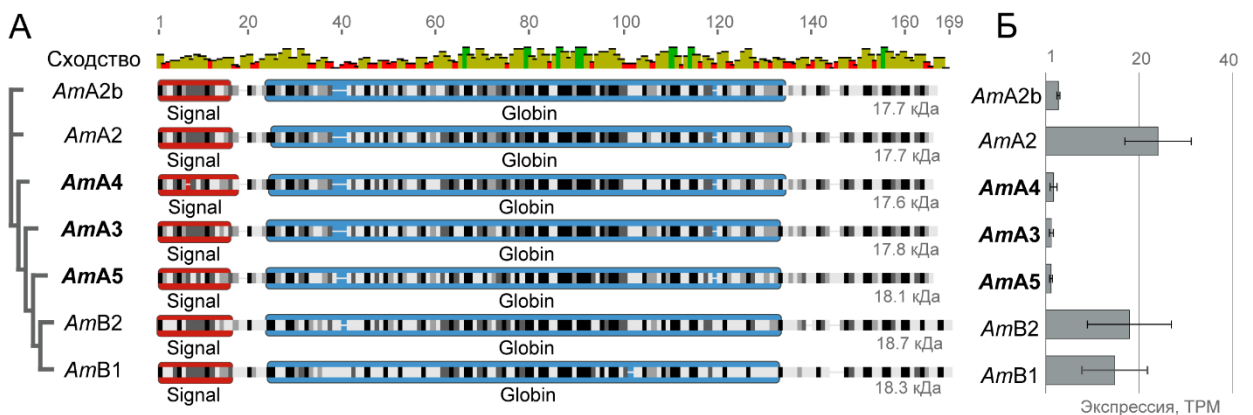
**Рисунок 55.** Доменная архитектура (А) и экспрессия транскриптов (Б) LPS-связывающего белка (LBP) и бактерицидного/повышающего проницаемость белка (BPI) *A. marina* (из Stanovova, Gazizova, Gorbushin, 2022).



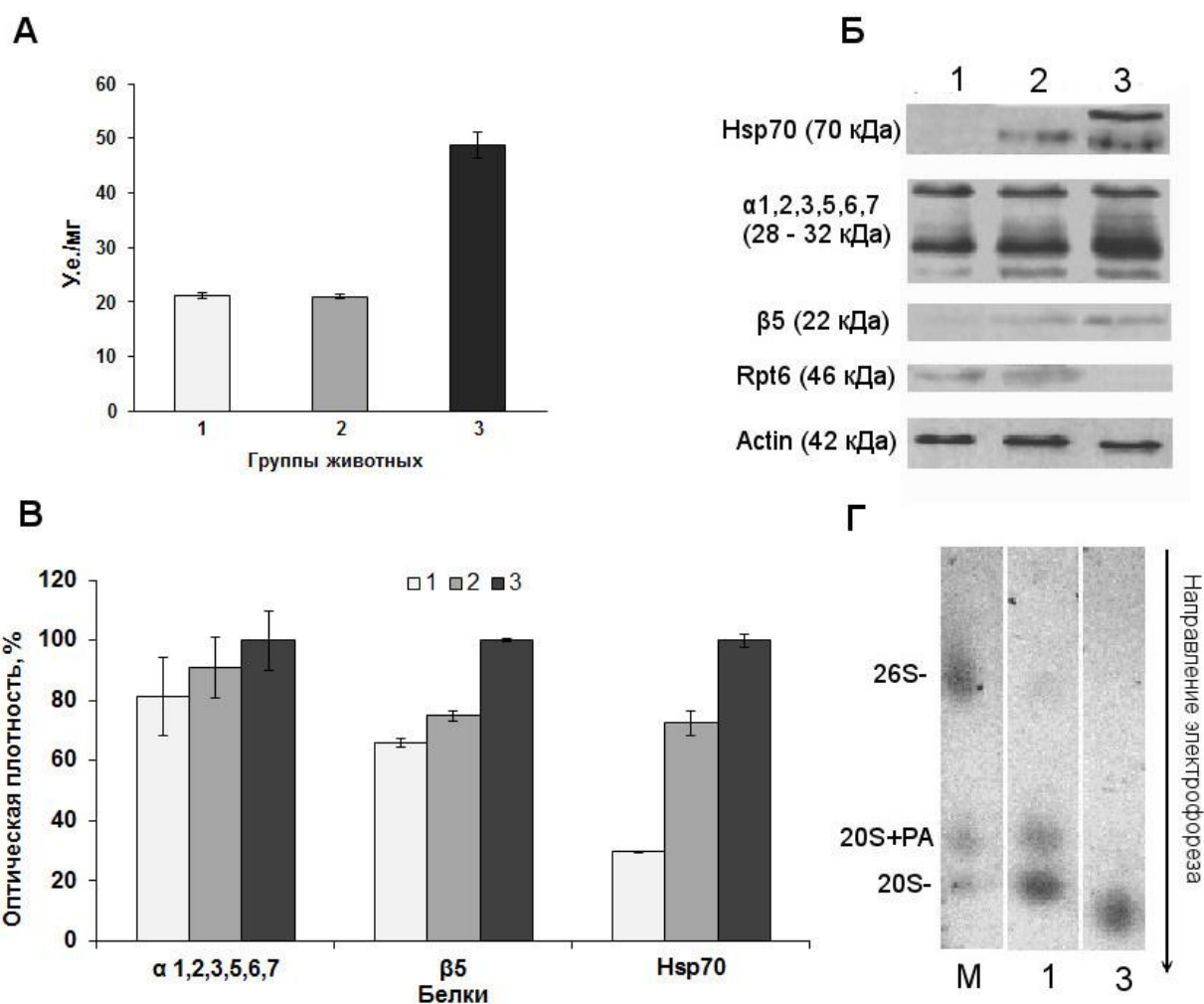
**Рисунок 56.** Характеристика Toll-like пути *A. marina*. А – доменная архитектура Toll-like рецепторов; Б – картирование белков *A. marina* на каноничный сигнальный Toll-like путь позвоночных (KEGG: map04620 с изменениями). Белки пескожила, гомологичные референсным последовательностям (прямоугольники), отмечены зеленым, отсутствующие белки не окрашены. В – экспрессия транскриптов (из Stanovova, Gazizova, Gorbushin, 2022).



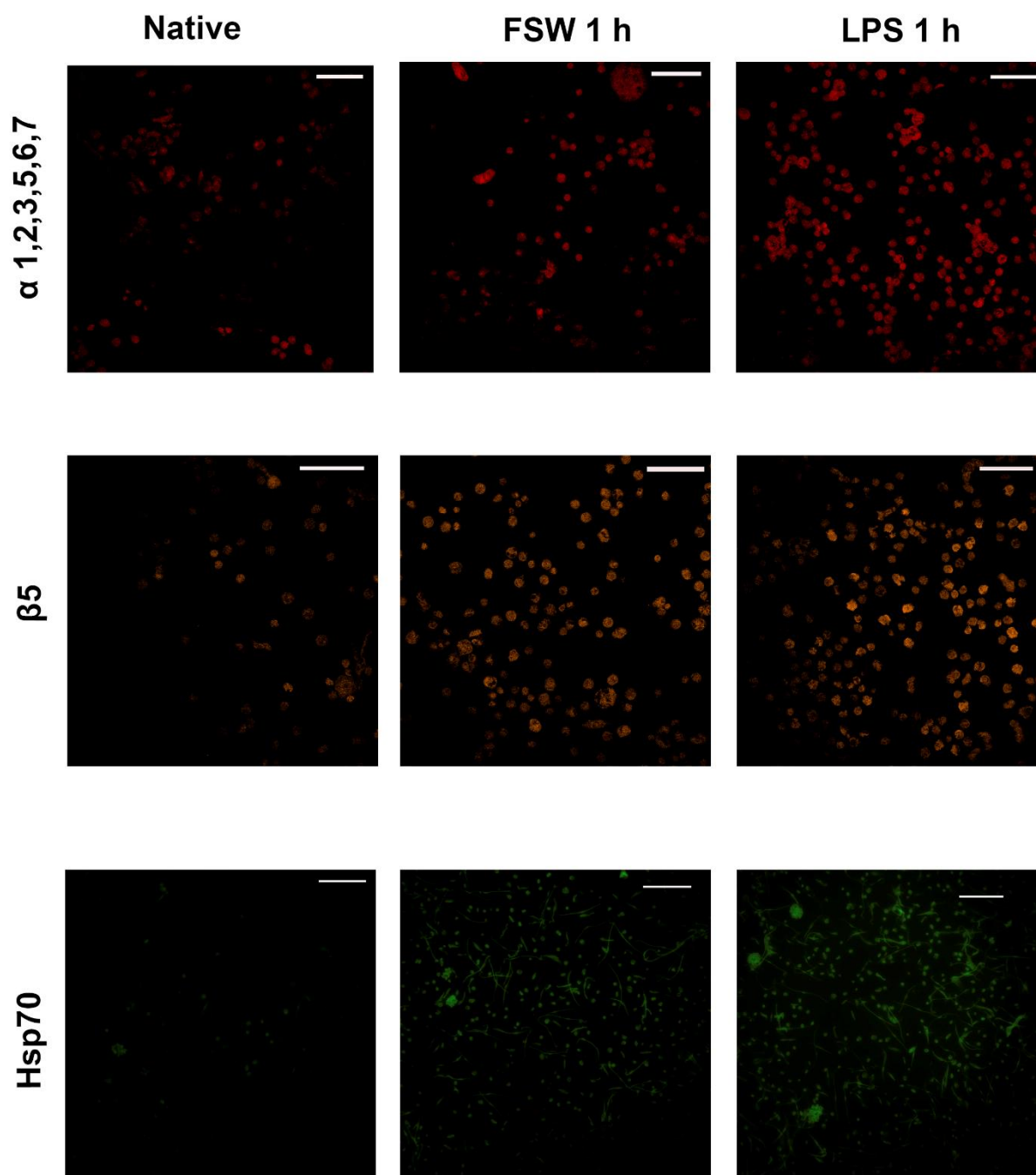
**Рисунок 57.** Характеристика белков антиоксидантной системы (CAT, SOD, PXD), синтазы оксида азота (NOS) и фенолоксидазного (PO) фермента лакказы (LAC). А – доменная архитектура, выравнивание *AmNOS* и *AmCRP*; Б – экспрессия транскриптов (из Stanovova, Gazizova, Gorbushin, 2022).



**Рисунок 58.** Характеристика семи глобиновых цепей экстраклеточного гемоглобина (Hb), экспрессируемых в целомочитах *A. marina*. А – выравнивание: показаны доменная архитектура, дерево Neighbor-Joining и сходство последовательностей. Б – экспрессия транскриптов. Новые последовательности выделены полужирным (из Stanovova, Gazizova, Gorbushin, 2022).

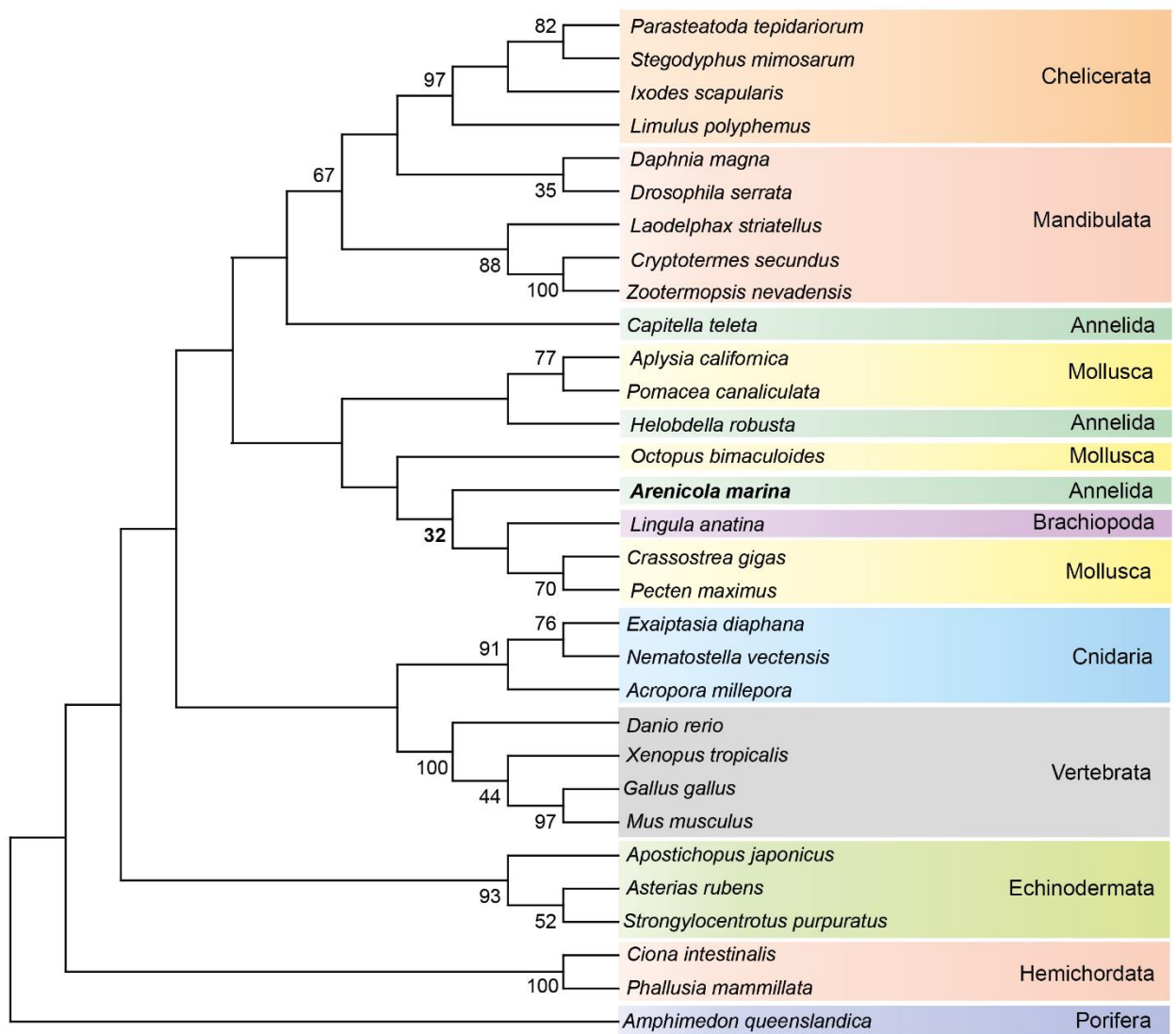


**Рисунок 59.** Изменения в протеолитической активности протеасом (А), содержании белков (Б, В) и в структуре протеасом в целомоцитах *A. marina* при введении липополисахарида. А – ХПА протеасом в целомоцитах (условные единицы на мг белка). Б – вестерн-блот субъединиц протеасом типа  $\alpha$ 1, 2, 3, 5, 6, 7,  $\beta$ 5, Rpt6 и белков теплового шока Hsp70. В – величина относительной концентрации белков по сравнению с таковым актина в пробах фрагмента б рисунка. Г – ХПА протеасом в геле после электрофореза в нативных условиях. 1 – интактные черви, 2 – контрольная группа (через 1 ч после введения FSW), 3 – инфицированные черви (через 1 ч после введения ЛПС), М – маркер (экстракт клеток печени крыс) (из Stanovova et al., 2016).



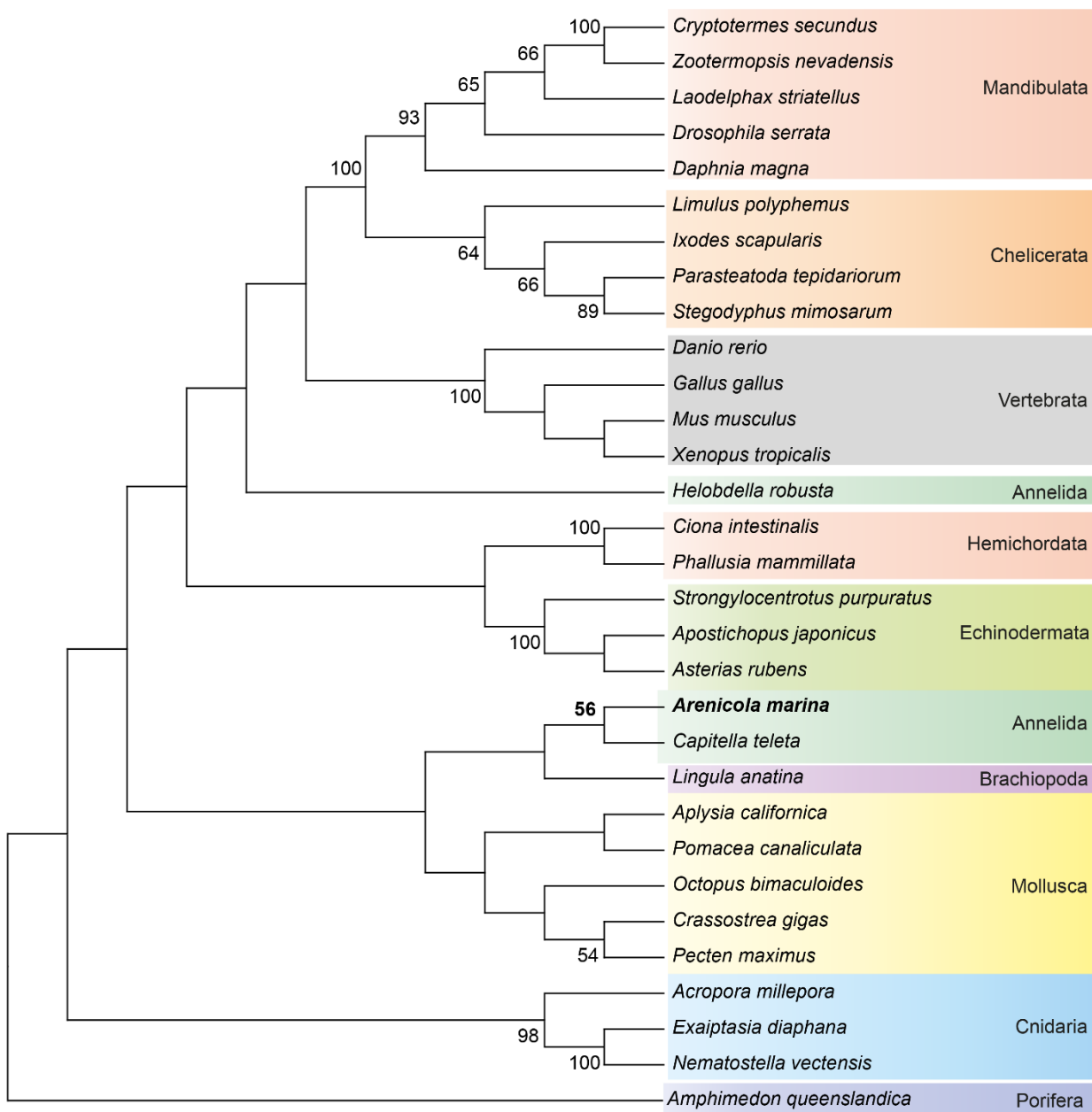
**Рисунок 60.** Реакция протеасомного комплекса на разные виды стресса. Native – нативные целоциты, FSW 1 h, LPS 1 h – целоциты через час после инъекции FSW и LPS, соответственно. Окраска специфическими моноклональными антителами.



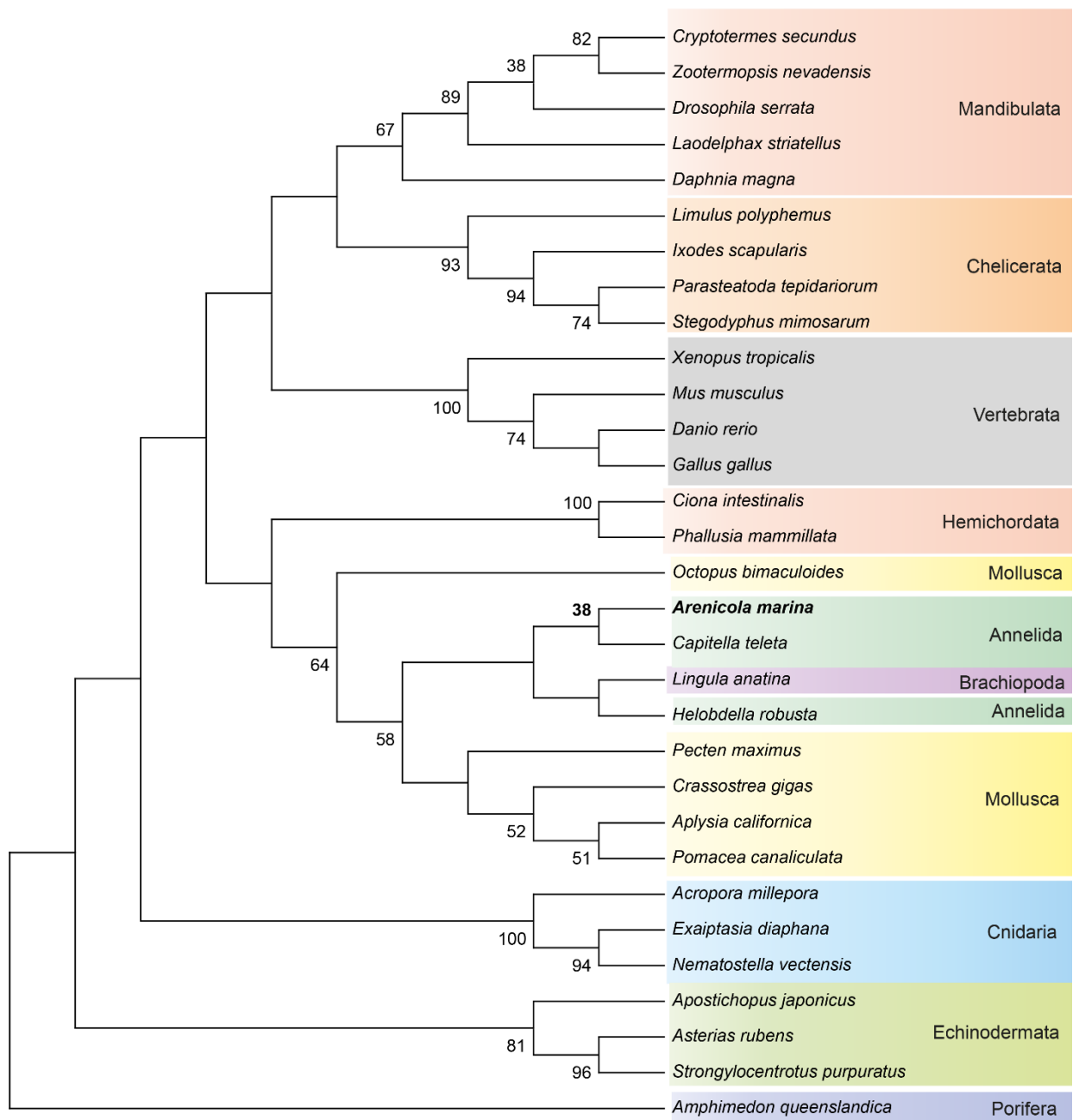


**Рисунок 61.** Филогенетическое дерево (консенсус), построенное с использованием алгоритма максимального сходства, для субъединицы  $\alpha 6$  (PSME1).

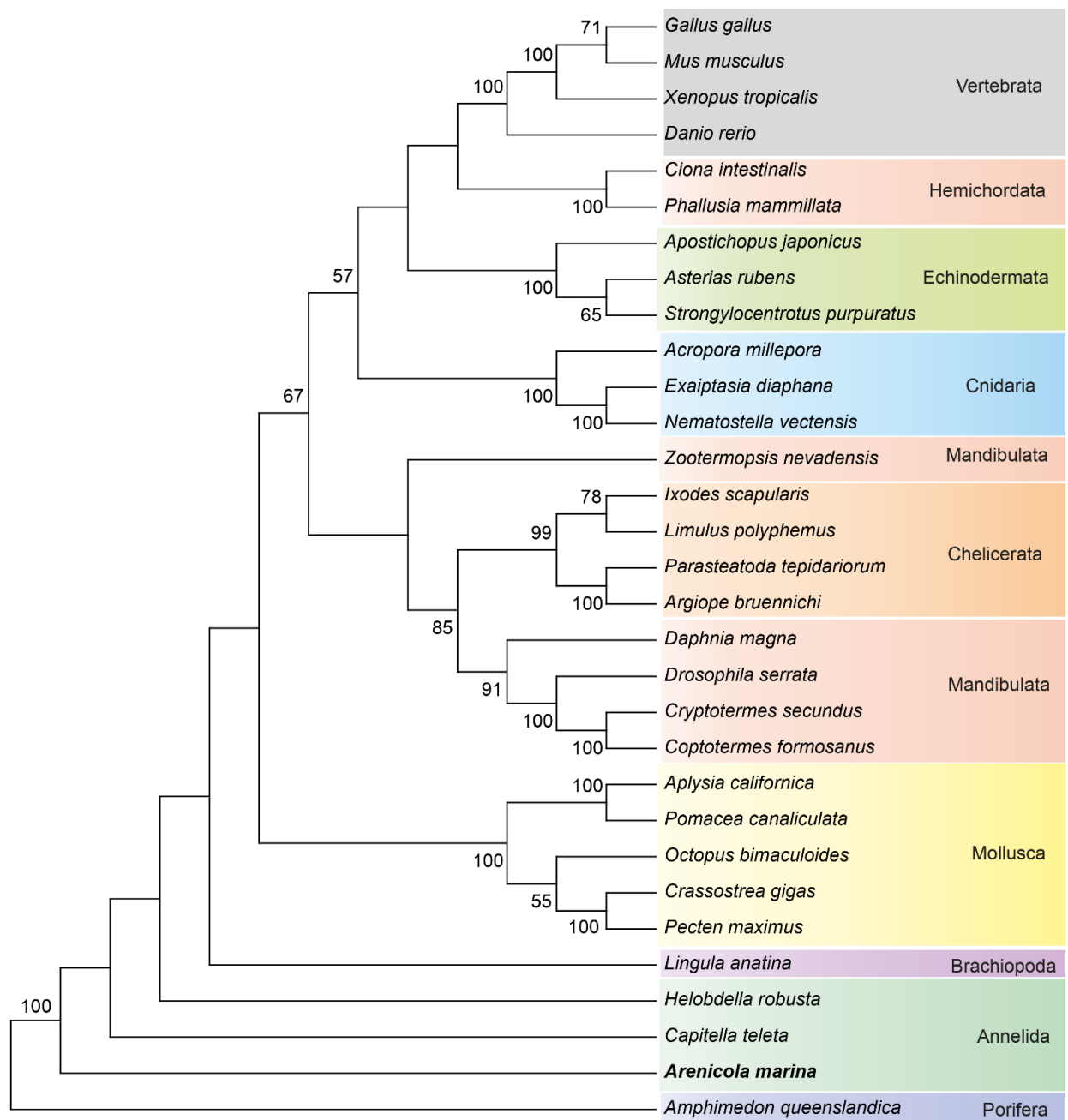




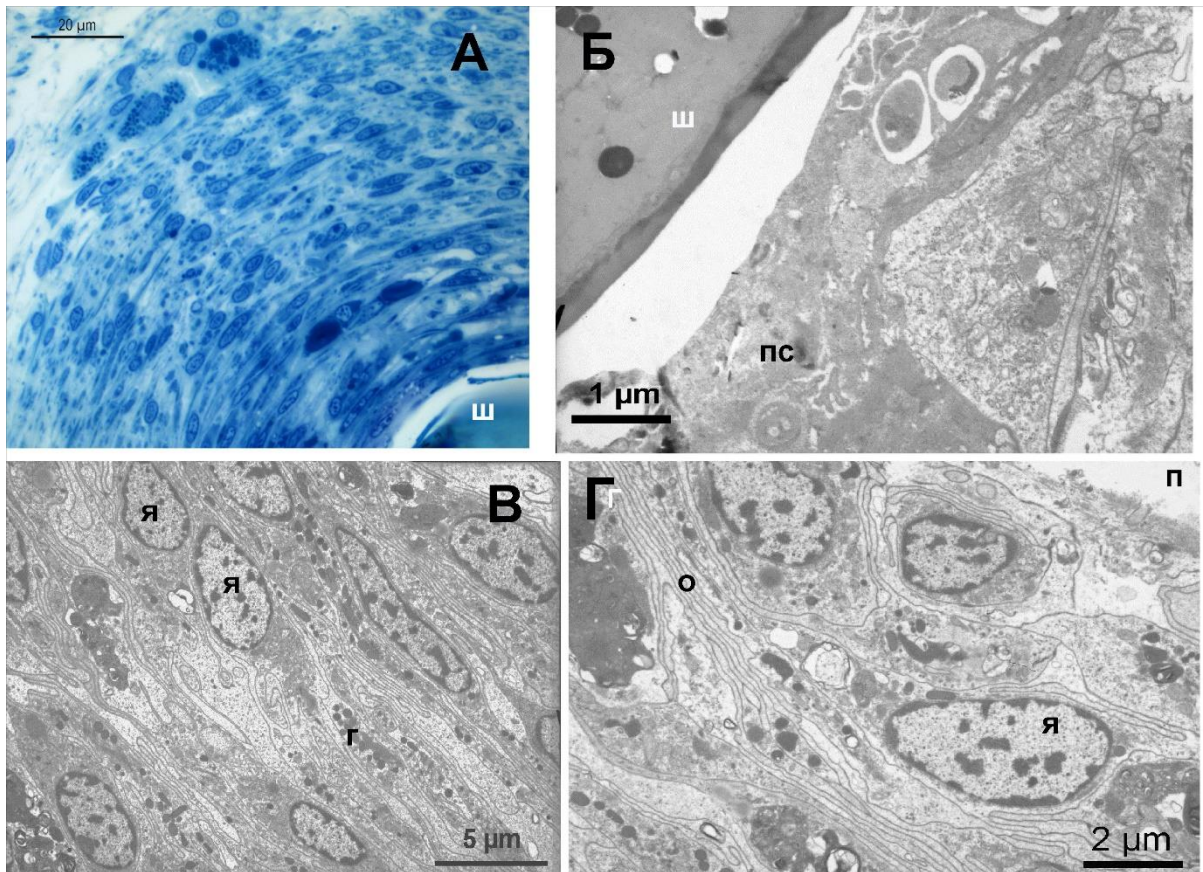
**Рисунок 62.** Филогенетическое дерево (консенсус), построенное с использованием алгоритма максимального сходства, для субъединицы b5 (PSMB5).



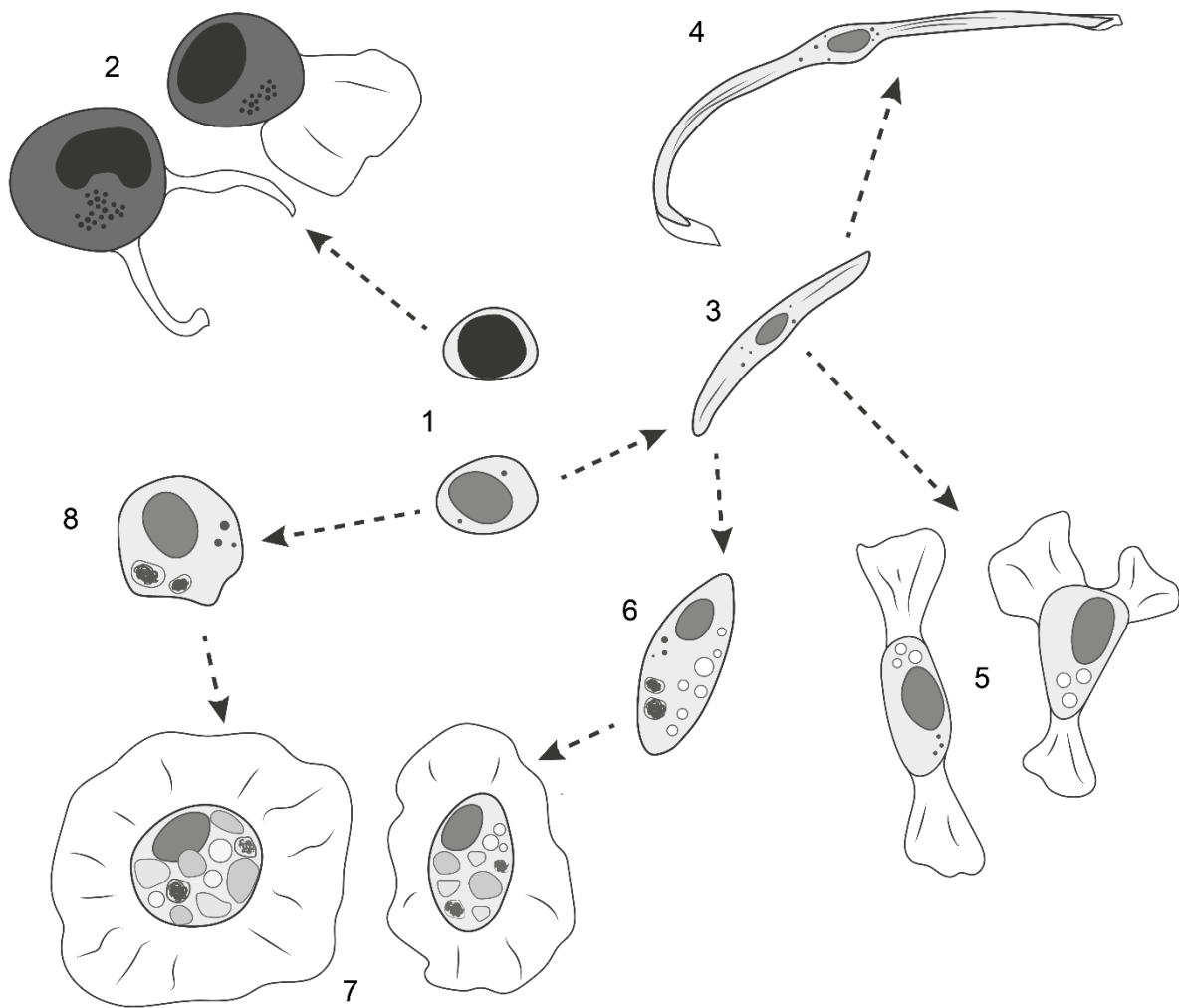
**Рисунок 63.** Филогенетическое дерево (консенсус), построенное с использованием алгоритма максимального сходства, для субъединицы гртб.



**Рисунок 64.** Филогенетическое дерево (консенсус), построенное с использованием алгоритма максимального сходства, для субъединицы PA200.



**Рисунок 65.** Поперечные срезы капсулы *Lepidonotus squamatus* возраста 4 суток. А – общий вид, окраска метиленовым синим и толлуидиновым синим. Б, В, Г — ТЭМ. Б – внутренний неклочный слой, В — средний слой, Г — внешний слой. я — ядра, г – гранулы, о — переплетающиеся отростки клеток, п — поверхность капсулы. (из: Становова, 2014, курсовая работа).



**Рисунок 66.** Гипотетическая схема взаимоотношений типов целомоцитов. 1 – ювенильные амебоциты, 2 – гранулоциты с псевдоподиями, 3, 4, 6 – шнуровидные амебоциты, 5 – расплывающиеся веретеновидные амебоциты, 7 – расплывающиеся вакуолизированные округлые амебоциты, 8 – мелкий амебоцит с фагосомами и прозрачной цитоплазмой.