

Анализ клеточного состава гемолимфы трёх видов планорбид (Gastropoda: Pulmonata)

**Е.Е. Прохорова¹, М.С. Серебрякова², А.С. Токмакова¹,
И.В. Кудрявцев², Р.Р. Усманова¹, Г.Л. Атаев¹**

¹ *Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, наб. реки Мойки, 48, Санкт-Петербург 191186. E-mail: ataev@herzen.spb.ru*

² *Институт экспериментальной медицины, ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург 197376.*

РЕЗЮМЕ: Изучен клеточный состав гемолимфы трёх видов пульмонат семейства Planorbidae: *Biomphalaria glabrata*, *Planorbarius corneus* и *Planorbis planorbis*. По данным морфологического, морфометрического и цитофлуориметрического анализов гемоциты этих моллюсков представлены популяцией гиалиноцитов и гетерогенной фракцией, состоящей из двух популяций гранулоцитов — крупных и мелких клеток. С использованием специфического лизосомного красителя LysoTracker и красителя нуклеиновых кислот SYTO62 в составе каждой популяции определены четыре субпопуляции клеток. Между клетками, относящимися к разным морфологическим популяциям, обнаружены достоверные различия в содержании лизосом и накоплении нуклеинового красителя. Гиалиноциты содержат меньшее количество лизосом, чем гранулоциты. При этом крупные гранулоциты характеризуются наибольшей концентрацией лизосом и метаболической активностью, а мелкие сильнее варьируют по степени гранулярности и более гетерогенны по составу гранул.

Как цитировать эту статью: Prokhorova E.E., Serebryakova M.S., Tokmakova A.S., Kudryavtsev I.V., Usmanova R.R., Ataev G.L. 2018. The analysis of cell composition in the hemolymph of three Planorbidae species (Gastropoda: Pulmonata) // *Invert. Zool.* Vol.15. No.1. P. 103–113. doi: 10.15298/invertzool.15.1.08

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Biomphalaria glabrata*, *Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis*, гемоциты, проточная цитофлуориметрия.

The analysis of cell composition in the hemolymph of three Planorbidae species (Gastropoda: Pulmonata)

**E.E. Prokhorova¹, M.S. Serebryakova², A.S. Tokmakova¹,
I.V. Kudryavtsev², R.R. Usmanova¹, G.L. Ataev¹**

¹ *Herzen State Pedagogical University of Russia, Saint-Petersburg 191186 Russia. E-mail: ataev@herzen.spb.ru*

² *Institute of Experimental Medicine RAMS, Saint-Petersburg 197376 Russia.*

ABSTRACT: Cell composition of the hemolymph of three Planorbidae snails (*Biomphalaria glabrata*, *Planorbarius corneus* and *Planorbis planorbis*) was examined. The flow-cytometric and the morphometric analysis revealed two main hemocyte types: a population of hyalinocytes and polymorphic fraction of granulocytes including two populations of

large and small cells. Staining with specific fluorochromes SYTO62 (stain nucleic acids) and LysoTracker (accumulated in lysosomes) allowed to distinguish four functional subpopulations of hemocytes. The significant differences in the lysosomes concentration and accumulation of nucleic dye were revealed between cells belonging to different morphological populations. Hyalinocytes contain fewer lysosomes than granulocytes. Large granulocytes are characterized by the highest concentration of lysosomes and metabolic activity, and small granulocytes are varying in the degree of granularity and composition of the granules.

How to cite this article: Prokhorova E.E., Serebryakova M.S., Tokmakova A.S., Kudryavtsev I.V., Usmanova R.R., Ataev G.L. 2018. The analysis of cell composition in the hemolymph of three Planorbidae species (Gastropoda: Pulmonata) // *Invert. Zool.* Vol.15. No.1. P. 103–113. doi: 10.15298/invertzool.15.1.08

KEY WORDS: *Biomphalaria glabrata*, *Planorbarius corneus*, *Planorbis planorbis*, hemocytes, flow cytometry.

Введение

Клетки гемолимфы (гемоциты) являются основными эффекторными элементами защитных реакций легочных моллюсков: они обеспечивают купирование ран, реакции иммунного ответа на проникновение патогенов различной природы, а также ликвидацию последствий инвазии (участие в разборке гемоцитарных капсул и других форм агглютинаций). Циркулирующие клетки гемолимфы пульмонат активно изучаются при оценке физиологического состояния улиток. Эти сведения имеют большое практическое значение, так как пульмонаты являются важнейшим компонентом пресноводных биоценозов. Данные о них учитываются в гидробиологических, экологических и паразитологических исследованиях. В частности, возможно использование сведений о составе гемолимфы улиток для определения их зараженности трематодами (Ataev *et al.*, 2016).

К настоящему времени накоплен большой фактический материал о механизмах подавления инвазии как на клеточном, так и на гуморальном уровнях. Установлено, что циркулирующие клетки гемолимфы участвуют на всех этапах реализации иммунного ответа моллюсков на чужеродные факторы различной природы (Атаев, Полевщиков, 2004 [Ataev, Polevshchikov, 2004]; Атаев и

др., 2005 [Ataev *et al.*, 2005]). Тем не менее, относительно классификации гемоцитов до настоящего времени не выработано общего мнения. Большинство авторов (Cheng, 1975; Lie, Heyneman, 1976; Jourdane, Cheng, 1987; Ataev *et al.*, 2016 и др.) выделяют два основных морфологических типа гемоцитов: гиалиноциты, определяемые как малогранулярные (или негранулярные) клетки и гранулоциты (клетки, цитоплазма которых содержит многочисленные гранулы и везикулы). Такое различие клеток гемолимфы отмечено как на световом, так и на электронномикроскопическом уровнях (Joky *et al.*, 1983; Ottaviani, Franchini, 1988; Cueto *et al.*, 2015).

Однако морфологические критерии классификации клеток гемолимфы пока сформулированы не четко, что во многом обусловлено полиморфизмом гемоцитов. Поэтому в ряде работ (Joky *et al.*, 1983; Cavalcanti *et al.*, 2012; Cueto *et al.*, 2015) наряду с этими основными морфотипами выделяются другие формы клеток (в основном гранулярных). Другой причиной, затрудняющей классификацию гемоцитов, является слабая изученность их онтогенетических и функциональных изменений.

В целях повышения объективности анализа крови, гемолимфы и целомической жидкости животных все активнее используется метод проточной цитофлуориметрии (Кудрявцев и др., 2012 [Kudryavtsev *et al.*,

2012]). Однако применение данного метода требует его адаптации для каждой группы животных.

В нашей работе изучен клеточный состав гемолимфы трёх видов моллюсков семейства Planorbidae: *Biomphalaria glabrata* Say, 1818, *Planorbarius corneus* L., 1758 и *Planorbis planorbis* L., 1758. Цитофлуориметрический анализ по параметрам размера и гранулярности клеток был дополнен морфологическим исследованием гемоцитов с использованием световой микроскопии. Для изучения функциональных и метаболических свойств клеток разных популяций в работе были использованы специфические флуоресцентные красители LysoTracker и SYTO62. Лизосомный краситель LysoTracker относится к числу ацидофильных красителей, накапливающихся в компартментах клетки со сниженными значениями pH (MacIntyre *et al.*, 1988). SYTO62 является представителем большой группы катионных цианиновых красителей, окрашивающих нуклеиновые кислоты — ДНК и РНК в живых и погибающих клетках различного происхождения (Wlodkowic *et al.*, 2009, 2012). Изменение уровня его флуоресценции в окрашенной клетке может свидетельствовать не только о разной степени конденсации хроматина, но и об изменении количества РНК (Гринченко и др., 2014 [Grinchenko *et al.*, 2014]). Отмеченные свойства красителей позволяют разделять общий пул исследуемых клеток на отдельные популяции по содержанию лизосом и транскрипционной (следовательно, и метаболической) активности (Кудрявцев и др., 2012 [Kudryavtsev *et al.*, 2012]).

Материал и методы

Моллюски *Planorbarius corneus* (n=48) и *Planorbis planorbis* (n=30) были собраны в реке Оредеж в районе поселка Вырица (Ленинградская область) в период с июля по сентябрь 2015 г. Моллюски лабораторной линии *Biomphalaria glabrata* (n=40) постоянно культивируются в Лаборатории экспе-

риментальной зоологии РГПУ им. Герцена (исходно культура получена из Лаборатории биологии животных Перпеньянского университета, Франция).

Все моллюски содержались в аэрируемых аквариумах при температуре 22–24 °С. Улитки, собранные в природных водоемах, в лаборатории рассаживались индивидуально по стаканчикам, которые в течение двух недель просматривались с целью обнаружения церкарий. Эмиссия последних позволяет выявить моллюсков, зараженных трематодами. Окончательно инвазия улиток определялась при их вскрытии после забора гемолимфы. В дальнейшем изучалась гемолимфа только незаражённых особей.

Гемолимфу собирали из кровеносного синуса головного отдела моллюсков с помощью стеклянной пипетки Пастера. Для предотвращения агрегации клеток, свежесобранная гемолимфа смешивалась с раствором Чернина (Chernin, 1963) в соотношениях 1:1 (для *P. corneus* и *B. glabrata*) и 1:4 (для *P. planorbis*). Разведение определялось объемом образца, необходимым для осуществления цитофлуориметрического исследования. Во всех случаях проводился анализ только свежесобранной гемолимфы.

Для цитофлуориметрического анализа образцы гемолимфы окрашивали специфическими красителями SYTO62® Red Fluorescent Nucleic Acid Stain (далее SYTO62) и LysoTracker® Green DND-26 (далее LysoTracker) (Life Technologies, США) в соответствии с описанной ранее методикой (Серебрякова и др., 2015 [Serebryakova *et al.*, 2015]). Изучаемые препараты гемолимфы инкубировали с красителями (в концентрации 250 нМ и 100 нМ соответственно) в течение 10 минут в темноте на льду. Анализ образцов выполнялся непосредственно после их окрашивания на проточном цитометре BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, США). При этом оценивали параметры прямого (FS, пропорционально размеру клетки) и бокового (SS, характеризует гранулярность цитоплазмы) светорассеяния. Кроме того, определяли интенсивность флуоресценции кра-

сителей LysoTracker и SYTO62. В каждой пробе анализировали по 30000 событий. Обработку результатов проводили с помощью программ Kaluza™ v.1.3 (Beckman Coulter, США). Для выявления наиболее типичных клеточных популяций в рамках проведенного исследования был использован подход, основанный на слиянии в один файл данных, полученных от нескольких особей, после чего задавались границы для разделения популяций клеток, которые в дальнейшем применялись ко всей исследуемой выборке. Анализ в рамках каждой из групп животных производился для каждой особи отдельно.

Для статистической обработки полученных данных использовали пакеты программ MS Excel и Statistica 8.0 (StatSoft, США). Нормальность распределения в полученных выборках оценивали при помощи критерия Колмогорова-Смирнова. Так как полученные нами данные имели не нормальное распределение, то данные были представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q25, Q75), а для сравнения парных количественных значений использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

Морфологический и количественный анализ клеток гемолимфы проводили параллельно *in vitro* и на постоянных препаратах. Для изучения гемоцитов *in vitro* гемолимфу помещали на предметные многоячеистые стекла с тефлоновым покрытием (диаметр ячейки 5 мм). Для продолжительного наблюдения за клетками предметные стёкла

помещали во влажную камеру на 4–8 ч. Клетки фотографировали через каждые 10–20 мин наблюдения в режиме фазового контраста (микроскоп Leica DM5000). Постоянные препараты изготавливали и анализировали по описанной ранее методике (Ataev *et al.*, 2016), окрашивая мазки клеток гематоксилином Эрлиха с последующей подкраской 0,1%-ным водным раствором эозина. Морфометрический анализ клеток осуществляли на постоянных препаратах и живых клетках через 30–40 мин после приготовления препаратов с помощью программного обеспечения ImageScore (СМА 90, Russia). Измеряли максимальный и минимальный диаметры, а также площади клеток и их ядер.

Результаты

Морфологический анализ гемоцитов

Большая часть клеток гемолимфы изученных моллюсков представлена гранулоцитами, цитоплазма которых содержит многочисленные гранулы и везикулы. Это наиболее крупные клетки гемолимфы (табл. 1; рис. 1), имеющие овальные ядра и способные хорошо расплываться на субстрате. Они могут формировать как филоподии, так и лобоподии. Ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) варьирует от 0,08 до 0,13. Гранулоциты *P. planorbis* вакуолизированы заметно сильнее, чем у других изученных видов моллюсков (рис. 1B).

Таблица 1. Размеры гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus*, *Biomphalaria glabrata* и *Planorbis planorbis*.

Table 1. Measurements of hemocytes of *Planorbarius corneus*, *Biomphalaria glabrata* and *Planorbis planorbis* snails.

Популяции гемоцитов	Гранулоциты			Гиалиноциты		
	<i>P. corneus</i>	<i>B. glabrata</i>	<i>P. planorbis</i>	<i>P. corneus</i>	<i>B. glabrata</i>	<i>P. planorbis</i>
Диаметр клетки (мкм)	1,2±6,91	14,03±5,6	16,8±4,67	7,12±1,32	7,21±1,01	7,6±2,7
Диаметр ядра (мкм)	4,67±2,44	7,00±1,2	6,5±2,41	3,45±1,05	4,51±1,19	4,8±0,95

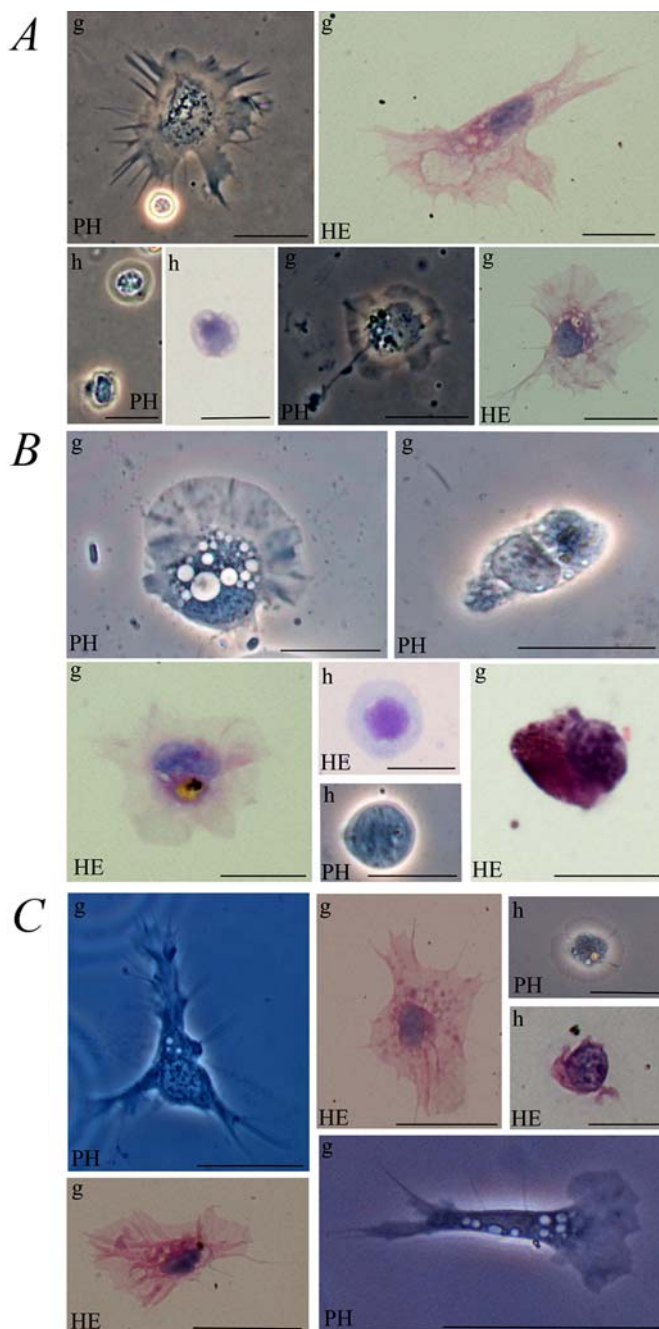


Рис. 1. Морфологические типы гемоцитов легочных моллюсков. А — *Biomphalaria glabrata*; В — *Planorbis planorbis*; С — *Planorbarius corneus*.

Обозначения: g — гранулоциты, h — гиалиноциты, PH — живые клетки в режиме фазового контраста, HE — клетки, окрашенные гематоксилин-эозином. Масштаб — 10 мкм.

Fig. 1. Morphological types of hemocytes of Planorbidae snails. А — *Biomphalaria glabrata*; В — *Planorbis planorbis*; С — *Planorbarius corneus*.

Abbreviations: g — granulocytes, h — hyalinocytes, PH — phase-contrast microphotography, HE — hematoxylin-eosin staining. Scale — 10 μ m.

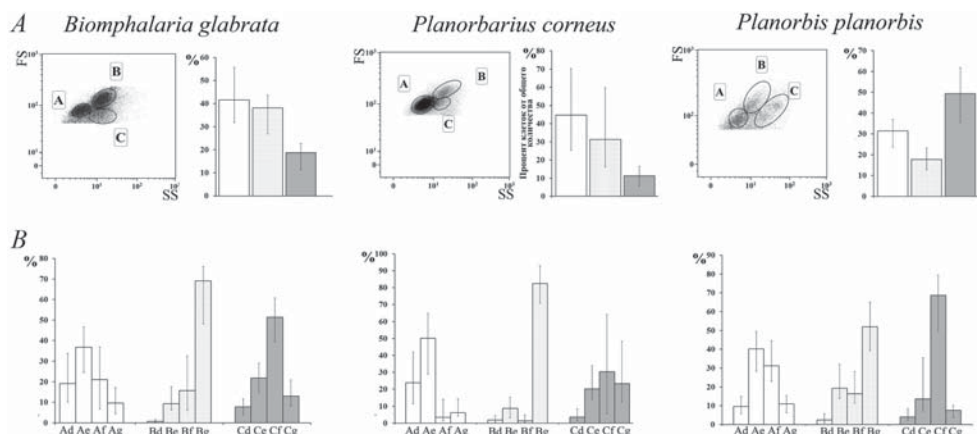


Рис. 2. Популяции клеток гемолимфы моллюсков *Biomphalaria glabrata*, *Planorbis planorbis* и *Planorbarius corneus*, выявляемые при цитофлуориметрическом анализе.

А — популяции гемоцитов, отличающиеся по параметрам прямого и бокового светорассеяния и их соотношение в гемолимфе улиток; Б — субпопуляции гемоцитов, определяющиеся при последующем гейтировании популяций гранулоцитов и гиалиноцитов по параметрам поглощения красителей Syto 62 и LysoTracker и их относительное количество среди клеток пула. По оси абсцисс указан процент клеток от общего количества в циркуляции (Me(Q25;Q75)). Обозначения: А — гиалиноциты; В, С — популяции гранулоцитов; FS — прямое светорассеивание; SS — боковое светорассеивание.

Fig. 2. Population of hemolymph cells defined by flow-cytometric analysis in molluscs *Biomphalaria glabrata*, *Planorbis planorbis* and *Planorbarius corneus*.

А — the hemocytes populations identified by parametres of direct and side scattering and their ratio in hemolymph of snails; B — subpopulations of hemocytes, defined by the subsequent separation of hyalinocytes and granulocytes in the parameters of absorption of the dyes Syto 62 and LysoTracker. The percentage of cells from total number of hemocytes in circulation (Me(Q25;Q75)) is designated. Abbreviations: A — hyalinocytes; B, C — population of granulocytes; FS — direct scatter; SS — side scatter.

Второй клеточный тип — гиалиноциты — округлые клетки, не содержащие скоплений гранул в цитоплазме. ЯЦО находится в пределах от 0,19 до 0,27. Гиалиноциты плохо распластываются на субстрате, хотя иногда формируют лобоподии (рис. 2). Размерные характеристики клеточных морфотипов приведены в таблице 1.

Микроскопические исследования показали большую вариабельность в размерах и ЯЦО клеток обеих популяций, особенно выраженную среди гранулоцитов. На протяжении нескольких часов инкубирования они могут менять форму, количество и размер псевдоподий.

Популяции гемоцитов, выделяемые по параметрам FS/SS

На основании анализа FS и SS гемоцитов моллюсков *P. corneus* (n=48), *B. glabrata*

(n=40) и *P. planorbis* (n=35) можно выделить три популяции клеток (табл 2, рис. 2А), обозначенные нами А, В и С. Популяция А представлена более мелкими клетками. Для них характерна относительно простая организация цитоплазматического компартамента, что соответствует морфологическим характеристикам гиалиноцитов. Клетки, составляющие популяции В и С, имеют более выраженную структурированность, обусловленную, скорее всего, наличием многочисленных гранул в цитоплазме. Это позволяет с высокой вероятностью отнести клетки регионов В и С к гранулоцитам двух категорий: гранулоциты популяции С более мелкие и сильнее варьируют по степени гранулярности по сравнению с гранулоцитами из популяции В.

Относительное число гранулоцитов и гиалиноцитов в гемолимфе разных видов моллюсков различается. У *P. planorbis* про-

Таблица 2. Содержание клеток в популяциях гемоцитов моллюсков *Biomphalaria glabrata*, *Planorbis planorbis* и *Planorbarius corneus* по данным цитофлуориметрического анализа.Table 2. Percentage of hemocytes of different populations in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata*, *Planorbis planorbis* and *Planorbarius corneus* snails.

Алгоритм гейтирования	Виды улиток Популяции гемоцитов	Процент клеток в популяции от общего их количества		
		<i>B. glabrata</i>	<i>P. corneus</i>	<i>P. planorbis</i>
Последовательное гейтирование по FS/SS и интенсивности поглощения Syto62/Lyso Tracker	Гиалиноциты			
	Популяция А	41,67 (31,87; 55,81)	44,73 (25,21; 70,17)	31,38 (23,69; 37,03)
	Субпопуляция Ad	19,06 (10,07; 33,61)	23,88 (11,41; 42,05)	9,52 (5,71; 14,84)
	Субпопуляция Ae	36,68 (24,43; 46,45)	50,08 (28,87; 64,93)	40,17 (28,36; 49,33)
	Субпопуляция Af	21,06 (6,62; 36,82)	3,43 (1,21; 14,18)	31,18 (22,95; 44,62)
	Субпопуляция Ag	9,6 (4,38; 17,11)	6,2 (4,11; 14,27)	10,99 (6,18; 15,29)
	Гранулоциты			
	Популяция В	38,26 (26,97; 43,74)	31,16 (16,18; 59,75)	17,67 (12,73; 23,33)
	Субпопуляция Vd	0,68 (0,23; 1,52)	1,89 (0,59; 4,28)	2,47 (1,03; 5,77)
	Субпопуляция Ve	9,24 (6,32; 17,57)	8,73 (3,22; 14,51)	19,31 (13,82; 32,10)
	Субпопуляция Vf	15,63 (5,93; 32,51)	1,39 (0,45; 4,89)	16,41 (11,19; 28,02)
	Субпопуляция Vg	68,88 (48,04; 75,89)	82,42 (70,86; 92,78)	52,03 (39,11; 65,02)
	Популяция С	18,88 (11,48; 22,77)	11,25 (5,49; 16,40)	49,29 (35,53; 61,88)
	Субпопуляция Cd	7,66 (3,85; 11,62)	3,56 (1,38; 8,53)	4,04 (2,14; 8,35)
	Субпопуляция Ce	21,7 (14,86; 28,83)	20,36 (14,10; 33,92)	13,58 (6,98; 35,51)
Субпопуляция Cf	51,20 (39,40; 60,57)	30,47 (5,64; 64,16)	68,63 (49,61; 79,37)	
Субпопуляция Cg	12,87 (8,23; 20,8)	23,33 (12,4; 48,37)	7,55 (3,68; 10,25)	
Последовательное гейтирование по интенсивности поглощения Syto62/Lyso Tracker и по FS/SS	Популяция D	8,93 (6,61; 15,13)	14,87 (4,26; 22,08)	5,55 (3,49; 9,41)
	Субпопуляция Da	80,86 (72,91; 88,72)	87,36 (75,72; 93,17)	53,79 (35,81; 68,11)
	Субпопуляция Db	2,97 (1,13; 6,01)	3,67 (1,76; 12,68)	6,67 (3,5; 11,88)
	Субпопуляция Dc	13,16 (6,84; 21,61)	4,38 (1,92; 10,06)	35,26 (20,39; 51,19)
	Популяция E	23,72 (19,08; 31,34)	27,9 (13,10; 40,05)	26,54 (15,63; 35,88)
	Субпопуляция Ea	66,34 (57,43; 78,04)	72,34 (59,62; 87,13)	51,53 (40,62; 63,85)
	Субпопуляция Eb	14,18 (8,81; 22,54)	10,69 (5,97; 17,08)	15,23 (10,92; 20,13)
	Субпопуляция Ec	16,75 (11,32; 25,05)	11,00 (6,67; 22,21)	34,04 (15,74; 44,19)
	Популяция F	27,34 (12,37; 38,02)	4,65 (1,32; 15,81)	49,20 (32,57; 57,08)
	Субпопуляция Fa	33,16 (23,1; 41,46)	39,17 (11,71; 66,39)	25,20 (14,95; 32,40)
	Субпопуляция Fb	23,88 (16,18; 30,43)	11,83 (6,66; 14,96)	6,72 (3,62; 10,15)
	Субпопуляция Fc	43,84 (29,41; 56,28)	47,93 (17,58; 75,76)	67,52 (51,22; 77,19)
	Популяция G	35,30 (18,27; 43,84)	36,18 (22,14; 57,84)	15,81 (11,20; 21,92)
	Субпопуляция Ga	12,56 (6,68; 32,97)	9,65 (2,91; 19,96)	18,01 (12,04; 29,59)
	Субпопуляция Gb	76,11 (55,25; 87,39)	78,19 (50,62; 93,01)	53,86 (41,64; 63,79)
Субпопуляция Gc	7,00 (4,82; 10,96)	8,24 (1,67; 19,13)	19,83 (11,43; 32,01)	

центная доля гранулоцитов от общего количества гемоцитов (68,35) достоверно выше ($p < 0,05$), чем у *B. glabrata* (58,5) и *P. corneus* (54,34). В свою очередь, количество гранулоцитов у *B. glabrata* больше, чем у *P. corneus* ($p < 0,05$).

Различается и соотношение популяций гранулоцитов. У *B. glabrata* и *P. corneus* большая часть гранулоцитов представлена клетками популяции *B* (65,00 и 77,29% соответственно). В то же время, среди гранулоцитов *P. planorbis* преобладают клетки по-

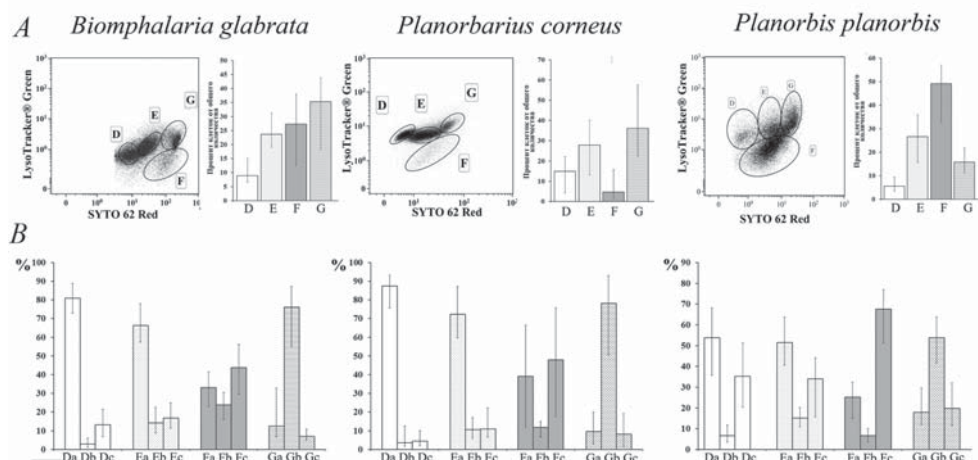


Рис. 3. Популяции клеток гемолимфы моллюсков *Biomphalaria glabrata*, *Planorbis planorbis* и *Planorbarius corneus*, выявляемые при цитофлуориметрическом анализе с использованием специфических флуоресцентных красителей Syto62 и LysoTracker. А — популяции гемоцитов, отличающиеся по параметрам прямого поглощения красителей Syto 62 и LysoTracker и их относительное содержание в гемолимфе улиток; В — субпопуляции гемоцитов, определяющиеся при последующем гейтировании выделенных клеточных фракций по параметрам прямого и бокового светорассеяния и их соотношение. По оси абсцисс указан процент клеток от общего количества в циркуляции (Me(Q25;Q75)).

Fig. 3. Population of hemolymph cells defined by flow-cytometric analysis in molluscs *Biomphalaria glabrata*, *Planorbis planorbis*, and *Planorbarius corneus*, using specific fluorescent dyes Syto62 and LysoTracker. А — populations of hemocytes with different absorption of Syto 62 and LysoTracker; В — subpopulations of hemocytes, defined by the subsequent separation of selected cell fractions in the parameters of direct and side light scattering. The percentage of cells from total number of hemocytes in circulation (Me(Q25;Q75)) is designated.

пуляции С (72,79%). При этом у *P. planorbis* популяция С является более гетерогенной по составу: клетки располагаются в пределах большего диапазона значений FS и SS и более гранулированы, чем у *B. glabrata* и *P. corneus* ($p < 0,001$).

Популяции гемоцитов, выделяемые по параметрам накопления LysoTracker и SYTO62

Окрашивание клеток гемолимфы флуоресцентными красителями, специфически связывающимися с лизосомами (LysoTracker) и нуклеиновыми кислотами (SYTO62), позволило нам разделить общий пул гемоцитов на четыре популяции, характеризующиеся различными функциональными особенностями (содержанием лизосом и

метаболической активностью) составляющих их клеток: D, E, F, C (рис. 3А, табл. 2). Анализ содержания клеток данных популяций в гемолимфе изучаемых видов выявил достоверные различия в относительном количестве клеток в популяции F. Наименьшим числом клеток эта популяция представлена у *P. corneus* ($p < 0,001$), а наибольшим — у *P. planorbis* ($p < 0,001$). Также отмечено достоверно меньшее количество гемоцитов популяции G у моллюсков *P. planorbis* относительно других видов ($p < 0,001$).

Последовательное гейтирование по параметрам FS/SS и накоплению LysoTracker и SYTO62

Для исследования клеточного состава циркулирующих клеток моллюсков был раз-

работан алгоритм, основанный на первоначальной оценке параметров прямого и бокового светорассеяния с последующим анализом параметров флуоресценции клеток в рамках выявленных популяций. Также было осуществлено гейтирование в обратном порядке. Такой подход позволил уточнить внутрипопуляционный состав (табл. 2, рис. 2B).

Среди гиалиноцитов (популяция *A*) моллюсков изученных видов преобладают клетки фракции *E* (субпопуляция *Ae*), характеризующиеся средним уровнем накопления лизосомного и нуклеинового красителей (рис. 2B). У *B. glabrata* и *P. corneus* в популяции *A* второй по численности является фракция *D* (субпопуляция *Ad*), которая характеризуется наименьшим накоплением лизосомного красителя. При этом наиболее слабо представлены среди гиалиноцитов клетки фракции *G* (субпопуляция *Ag*), накапливающие наибольшее количество обоих красителей. В рамках популяции гиалиноцитов, численность клеток фракции *F* (субпопуляция *Af*), характеризующихся минимальным накоплением лизосомного красителя и флуоресценцией SYTO62 на уровне от среднего до высокого, и достоверно отличается у разных видов планорбид ($p < 0,001$).

Гейтирование клеток в обратном порядке также подтвердило, что среди клеток фракций *D* и *E* (накапливающих наименьшее количество нуклеин-связывающего красителя) у моллюсков всех трёх видов преобладают гиалиноциты (популяция *A*).

У всех моллюсков большая часть крупных гранулоцитов популяции *B* интенсивно окрашивается обоими флуорохромами, что позволяет отнести эти клетки к фракции *G* (субпопуляция *Bg*) (рис. 3B, табл. 2). У всех моллюсков минимальное число гранулоцитов отмечено во фракции *D* (субпопуляция *Bd*), накапливающей среднее количество лизосомного и наименьшее количество нуклеинового красителей. Заметно варьирует относительное количество клеток во фракциях *E* и *F*, характеризующихся средним уровнем накопления нуклеинового красителя (субпопуляции *Be* и *Bf*) (рис. 3B, табл. 2).

Среди гранулоцитов популяции *C*, у всех улиток преобладает фракция *F* (субпопуляция *Cf*), находящаяся в области низкой флуоресценции лизосомного красителя. Вторые по численности — фракции *E* и *G* (субпопуляции *Ce* и *Cg*), характеризуются выраженным накоплением лизосомного и нуклеинового красителей. Меньше всего гранулоцитов было отмечено в составе популяции *D* (субпопуляция *Cd*).

Обратное гейтирование также подтвердило, что среди клеток фракции *G* преобладают крупные гранулоциты популяции *B*, а клетки фракции *F* в основном представлены гранулоцитами популяции *C*.

Обсуждение

В целях стандартизации условий проведения морфологического и цитофлуориметрического анализов изучение клеточного состава гемолимфы моллюсков *P. corneus*, *B. glabrata* и *P. planorbis* было выполнено по общей схеме. Параллельное применение двух подходов — световой микроскопии и проточной цитометрии — позволило определить в гемолимфе исследованных планорбид наличие двух популяций гемоцитов: гиалиноцитов и гранулоцитов. Первые представляют собой малогранулярные клетки, содержащие небольшое количество лизосом, а также обладающие низкой по сравнению с гранулоцитами метаболической активностью.

Гранулоциты составили более многочисленную и гетерогенную популяцию клеток, отличающихся от гиалиноцитов большими размерами (табл. 1). На основании данных, полученных с помощью проточной цитометрии (по параметрам FS и SS) среди гранулярных клеток выявляются две популяции клеток, отличающиеся размером и характером гранулярности. Дальнейший анализ показал, что они отличаются и по функциональным характеристикам. Так, гранулоциты популяции *B*, имеющие большие размеры и относительно небольшой разброс по степени гранулярности, представлены в основном субпопуляцией *Bg*. Клетки этой

группы характеризуются наибольшей концентрацией лизосом и метаболической активностью, что позволяет рассматривать их как фагоциты. В то же время популяция *C*, включающая в себя гранулоциты меньшего размера, у всех исследованных видов моллюсков оказалась более гетерогенной как по степени гранулярности, так и по уровню включения лизосомного красителя. Несмотря на преобладание в этой популяции клеток субпопуляции *Cf*, здесь также представлены субпопуляции *Ce* и *Cg*, что свидетельствует о наличии в цитоплазме описанных клеток гранул не только с кислым, но и с щелочным содержанием (Pierzynska-Mach *et al.*, 2014).

Отмеченная гетерогенность гранулоцитов гемолимфы моллюсков ранее была описана при изучении морфологии гемоцитов моллюсков рода *Biomphalaria* (Joky *et al.*, 1983; Cavalcanti *et al.*, 2012) и клеточных иммунных реакций моллюсков на трансплантаты и паразитов (Cheng, 1984; Ataev, Coustaou, 1999). В работах по исследованию гемоцитов *in vitro* и анализу клеточных иммунных реакций пульмонат авторы отмечают изменение морфологии и формы гемоцитов в зависимости от стадии культивирования и этапа клеточной реакции. Так, гемоциты в составе внутренних слоев капсул, формирующихся вокруг спорцист трематод, постепенно уплощаются, а потом дегенерируют (Атаев, 2000). В капсулах вокруг ксенотрансплантатов и при длительном наблюдении гемоцитов во влажной камере описаны крупные вакуолизованные гранулоциты с маленьким ЯЦО (Cheng, 1984). Возможно, эти две формы гранулоцитов являются разными этапами клеточного цикла одного клеточного типа. Сначала такие клетки активируются, что всегда сопровождается эухроматинизацией ядра и синтезом значительного количества РНК (популяция *B*). В результате усложняется их внутренняя структура: накапливаются лизосомы, гранулы, усложняется система внутренних мембран.

Таким образом, проведенный анализ выявил принципиальное сходство клеточного состава гемолимфы трех видов планорбид.

Вместе с тем между ними установлены достоверные различия по соотношению популяций гемоцитов. Особенно отличается гемолимфа моллюсков *P. platorbis*, у которых гранулоциты представлены в основном мелкими гранулоцитами популяции *C*. К тому же эти клетки значительно сильнее вакуолизованы, чем гранулоциты *B. glabrata* и *P. corneus*. Такое отличие выявлено не только на морфологическом уровне, но и прослеживается в цитофлуорограммах. Большую часть гранулоцитов популяции *C* составляют клетки субпопуляции *Cf*, характеризующиеся средним накоплением лизосомного красителя, и интенсивным окрашиванием нуклеиновым красителем.

В то же время субпопуляция *Bg*, хорошо накапливающая лизосомный краситель менее представлена среди гранулоцитов *P. platorbis*, чем у других улиток. Следовательно, гранулоциты популяции *C* этого моллюска могут быть охарактеризованы как сильно гранулярные, метаболически активные клетки, содержащие небольшое количество лизосом. Возможно, гранулы в этом случае имеют нейтральное или щелочное содержание (Sminia, 1972; Cheng, 1975).

Выраженный полиморфизм клеток гемолимфы пульмонат затрудняет выработку критериев, на основании которых циркулирующие клетки могут быть отнесены к различным популяциям, что значительно усложняет создание классификации гемоцитов. Использование проточной цитометрии как метода, основанного на количественном анализе по строго заданным морфологическим и функциональным параметрам, позволяет совместно с другими методами выявить популяции гемоцитов и стандартизировать саму процедуру анализа гемолимфы моллюсков.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта Гранта Министерства образования 6.1278. 2014/К, Гранта РФФИ 16-04-00793а.

Литература

- Ataev G.L., Coustau C. 1999. Cellular response to *Echinostoma caproni* infection in *Biomphalaria glabrata* strains selected for susceptibility/resistance // *Developmental and comparative immunology*. Vol.23. P.187–198.
- Ataev G.L., Eremina E.E., Polevshchikov A.V. 2005. [Defensive reactions of Gastropod Molluscs. Humoral reactions] // *Parazitologiya*. Vol.39. No.1. P.3–15 [in Russian].
- Ataev G.L., Polevshchikov A.V. 2004. [Defensive reactions of Gastropod Molluscs. I. Cell reactions] // *Parazitologiya*. Vol.38. No.4. P.342–351 [in Russian].
- Ataev G.L., Prokhorova E.E., Kudryavtsev I.V., Polevshchikov A.V. 2016. The influence of trematode infection on the hemocyte composition in *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) // *Invertebrate survival journal*. Vol.13. P.164–171.
- Cavalcanti M.G.S., Filho F.C., Mendonça A.M.B., Duarte G.R., Barbosa C.C.G.S., De Castro C.M. M.B, Alves L.C., Brayner F.A. 2012. Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea* // *Micron*. Vol.43. No.2–3. P.285–291.
- Cheng T.C. 1975. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes // *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol.66. P.343–379.
- Cheng T.C. 1984. A classification of molluscan hemocytes based on functional evidence // *Comparative Pathobiology*. Vol.6. P.111–146.
- Chernin E. 1963. Observations on hearts explanted in vitro from the snail *Australorbis glabratus* // *The Journal of Parasitology*. Vol.49. No.3. P.353–364.
- Cueto J.A., Rodriguez C., Vega I.A., Alfredo C.-V. 2015. Immune defenses of the invasive apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae): phagocytic hemocytes in the circulation and the kidney // *PLoS One*. Vol.10. No.4. e0123964.
- Grinchenko V. A., Kudryavtsev I. V., Kumeiko V. V., Shilov A. S., Polevshchikov A.V. 2014. [Experience of application of flow cytometry in the evaluation of protective responses of the bivalve *Modiolus modiolus* (Linnaeus, 1758)] // *Russian journal of immunology*. Vol.8. No.17(4). P.993–1001 [in Russian].
- Joky A., Matricón-gondran M., Benex J. 1983. Fine structural differences in the amoebocytes of *Biomphalaria glabrata* // *Developmental and comparative immunology*. Vol.7. No.4. P.669–672.
- Jourdane J., Cheng T. C., 1987. The two-phase recognition process of allografts in Brazilian strain of *Biomphalaria glabrata* // *The Journal of Invertebrate Parasitology*. Vol.49. No.2. P. 145–158.
- Kudryavtsev I.V., Khaydukov S.V., Zurotchka A.V., Chereshev V.A. 2012. [Flow cytometry in experimental biology]. Yekaterinburg: RAS. 192 p. [in Russian]
- Lie K.J., Heyneman D. 1976. Studies on resistance in snails. 3. Tissue reaction to *Echinostoma lindoense* sporocysts in sensitized and resensitized *Biomphalaria glabrata* // *The Journal of Parasitology*. Vol.62. No.1. P.51–58.
- MacIntyre A.C., Culter D.J. 1988. The potential role of lysosomes in tissue distribution of weak bases // *Biopharmaceutics & drug disposition*. Vol.9. No.6. P.513–526.
- Ottaviani E., Franchini A. 1988. Ultrastructural study of haemocytes of the freshwater snail *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) // *Acta Zoologica*. Vol.69. No.3. P.157–162.
- Pierzynska-Mach A., Janowski P.A., Dobrucki J.W. Evaluation of Acridine Orange, LysoTracker Red, and Quinacrine as Fluorescent Probes for Long-Term Tracking of Acidic Vesicles // *Cytometry*. Vol.85. No.8. P.729–737.
- Sminia T. 1972. Structure and function of blood and connective tissue cells of the fresh-water pulmonate *Lymnea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry // *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* Vol.130. No.4. P.497–526.
- Serebryakova M.K., Prokhorova E.E., Tokmakova A.S., Kudryavtsev I.V., Polevshchikov A.V., Ataev G.L. 2015. [The new method for differentiation of hemocytes of Pulmonata snails by flow cytometry] // *Russian immunological journal*. Vol.9. No.2. P.160–162 [in Russian].
- Tian P., Bates A.H., Jensen H.M., Mandrell R.E. 2006. Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells // *Letters in Applied Microbiology*. Vol.43. No.6. P. 645–651.
- Włodkowiec D., Skommer J. 2007. SYTO probes: markers of apoptotic cell demise // *Curr. Protoc. Cytom.* Vol.7. U.7. P.33.
- Włodkowiec D., Skommer J., Pelkonen J. 2007. Towards an understanding of apoptosis detection by SYTO dyes // *Cytometry*. Vol.71. P.61–72.
- Włodkowiec D., Skommer J., Faley S., Darzynkiewicz Z., Cooper J.M. 2009. Dynamic analysis of apoptosis using cyanine SYTO probes: from classical to microfluidic cytometry // *Experimental cell research*. Vol.315. No.10. P.1706–1714.
- Włodkowiec D., Skommer J., Darzynkiewicz Z. 2012. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances // *Exp. Oncol.* Vol.34. P.255–262.

Responsible editor E.N. Temereva