МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**КОНЦЕПТУАЛЬНЫЕ
И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ
НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
И ОБРАЗОВАНИЯ
В ОБЛАСТИ ЗООЛОГИИ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ**

**Сборник статей
V Международной конференции**

*26–28 октября 2020 г.
г. Томск, Россия*

Томск
Издательство Томского государственного университета
2020

время суток (июнь–июль) // Изв. Иркутского госуд. ун-та. Сер. «Биология. Экология». 2018. Т. 23. С. 54–67.

4. Тахтеев В.В., Карнаухов Д.Ю., Говорухина Е.Б., Мишарин А.С. Суточные вертикальные миграции гидробионтов в прибрежной зоне оз. Байкал // Биология внутренних вод. 2019. № 2. С. 50–61.

5. Тахтеев В.В., Батрагин Д.А., Еропова И.О., Говорухина Е.Б. Ночной миграционный комплекс амфипод в прибрежной пелагиали Байкала и его связь с современной экологической ситуацией на озере // Современное состояние водных биоресурсов: матер. 5-й междунар. конф., 27–29 нояб. 2019 г. Новосибирск, 2019. С. 144–147.

УДК 594.38+591.113.1

DOI: 10.17223/978-5-94621-931-0-2020-38

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕМОЦИТОВ ЛЕГОЧНЫХ МОЛЛЮСКОВ

Токмакова А.С., Прохорова Е.Е.,
Серебрякова М.К., Атаев Г.Л.

*Российский государственный педагогический университет
им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия
arina.tokmakova@gmail.com*

Аннотация. Гемоциты, клетки гемолимфы, играют ключевую роль в иммунном ответе легочных моллюсков на различные патогены, включая инфекцию трематод. Известно, что количество гемоцитов увеличивается после иммунизации, но механизм их размножения остается дискуссионным. В данной работе мы исследовали функциональную и пролиферативную активность гемоцитов у двух видов легочных моллюсков: *Biomphalaria glabrata*, *Planorbarius corneus*. Метод ImageStream впервые был использован для изучения популяций гемоцитов этих видов моллюсков. Гемоциты всех изученных видов представлены двумя основными типами: зернистыми клетками и гиалиноцитами. Микроскопическое и проточно-цитометрическое исследование гемоцитов с использованием EdU выявило несколько EdU-положительных клеток. Однако анализ клеточного цикла гемоцитов показал, что количество ДНК в этих клетках не увеличилось.

Ключевые слова: Легочные моллюски, гемоциты, проточная цитометрия, ImageStream, фагоцитарная активность, пролиферация.

FUNCTIONAL ACTIVITY OF HEMOCYTES OF PULMONARY MOLLUSCS

**Tokmakova A.S., Prokhorova E.E.,
Serebryakova M.K., Ataev G.L.**

*Herzen State Pedagogical University, St. Petersburg, Russia
arina.tokmakova@gmail.com*

Abstract. Hemocytes, the cell of the hemolymph, play a key role in the immune response of pulmonate molluscs to various pathogens including trematode infection. The number of hemocytes is known to increase after immunization but the mechanism of their multiplication remains debatable. In this work we studied the functional and proliferative activity of hemocytes in two species of pulmonate molluscs: *Biomphalaria glabrata*, *Planorbarius corneus*. ImageStream technique was used for the study of the hemocyte populations of these molluscan species for the first time. The hemocytes of all the studied species were represented by two main types, granular cells and hyalinocytes. Microscopic and flow-cytometric study of the hemocytes with the use of EdU revealed some EdU-positive cells. However, the analysis of the cell cycle of the hemocytes showed that the amount of DNA in these cells was not increased.

Keywords: Pulmonate molluscs, hemocytes, flow cytometry, ImageStream, phagocytic activity, proliferation.

За выполнение иммунных реакций моллюсков на любом уровне отвечают циркулирующие клетки гемолимфы моллюсков – гемоциты [1, 2]. Гемоциты пульмонат разделяются на два основных типа – гранулоциты и гиалиноциты [2–4]. Эти клеточные популяции различаются по ряду признаков: размеру клеток, способности образовывать псевдоподии, фагоцитарной активности, количественному соотношению в кровотоке, а также набором и строением органелл. Гемоциты участвуют в различных физиологических процессах в организме моллюска, включая иммунные реакции. В результате их количество может значительно сокращаться, но эти потери восполняются в результате гемопоэза. Однако, вопрос о мультипликации гемоцитов остается дискуссионным. Одни исследователи признают пролиферативную способность гемоцитов, а другие считают, что их пополнение возможно только в специальных центрах гемопоэза за счет деления гемопоэтических стволовых клеток.

С целью получения новых данных о клетках гемолимфы легочных моллюсков было проведено исследование функциональной и пролиферативной активности гемоцитов *Planorbarius corneus* и *Biomphalaria glabrata*.

Микроскопический анализ циркулирующих клеток, проведенный с использованием световой, электронной и флуоресцентной микроскопии также позволил разделить их на две основные популяции – гранулоциты и гиалиноциты. Все клетки имеют хорошо развитый актиновый цитоскелет, который обеспечивает их форму. Гранулоциты имеют более крупные размеры, содержат многочисленные гранулы и способны формировать филоподии. Они хорошо распластываются на субстрате. Их эксцентрично расположенные ядра имеют неправильную форму и содержат скопления гетерохроматина. Цитоплазма гранулоцитов богата органеллами. В центральной части клеток располагаются диктиосомы, мультивезикулярные тела, митохондрии и хорошо развитая эргастоплазма. Агранулярные гиалиноциты имеют округлую форму и могут формировать лобоподии. Цитоплазма клеток содержит многочисленные свободные рибосомы, аппарат Гольджи, митохондрии и другие органеллы.

На основании цитометрического анализа по параметрам FS/SS гемоциты тоже разделяются на две клеточные популяции. Первая представлена клетками меньшего размера, для которых характерна относительно простая организация цитоплазматического компартмента, что соответствует морфологическим характеристикам гиалиноцитов. Клетки, составляющие вторую популяцию, имеют более гранулированную цитоплазму, характерную для гранулоцитов.

Также был применен метод анализа популяционного состава гемоцитов, основанный на оценке количества в них нуклеиновых кислот и лизосом. Для этого использовали флуоресцентные красители SYTO62 Red и LysoTracker® Green, спонтанно проникающие через клеточные билипидные мембраны. При этом красители семейства SYTO связываются с нуклеиновыми кислотами (ДНК и РНК) в цитоплазме, ядре и митохондриях клетки, а LysoTracker является ацидофильным красителем, накапливающимся в лизосомах. Одновременный анализ уровня флуоресценции этих красителей позволяет выделить четыре популяции клеток: две из них представлены гиалиноцитами (FSlowSSlowLtlowS62low и FSlowSSlowLThighS62high), а две другие были представлены гранулоцитами (FShighSShighLtlowS62low и FShighSShighLThighS62high). Полученные данные свидетельствуют о разной функциональной активности клеток [3].

Кроме этого, был также проведен анализ гемоцитов с использованием технологии ImageStream, которая позволяет сопоставлять данные цитометрии и микроскопии. Полученные результаты подтвердили наличие в гемолимфе гиалиноцитов и гранулоцитов. Однако среди последних выделяются небольшие, сильно вакуолизированные клетки,

очевидно находящиеся на терминальных стадиях апоптоза. Таким образом, результаты анализа ImageStream позволяют корректировать тактику гейтирования при анализе цитограмм и исключить апоптотические клетки из анализа.

Изучение фагоцитарной активности гемоцитов проводилось с помощью проточного цитофлуориметра, а также *in vitro* с использованием флуоресцентной микроскопии: свежесобранную гемолимфу инкубировали с суспензиями бактерий *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, меченных флуоресцеин-5-изотиоционатом. Было показано, что гранулоциты интенсивнее поглощают стафилококков по сравнению с гиалиноцитами. Однако в отношении *E. coli* наблюдаются отличия в фагоцитарной активности гемоцитов между моллюсками *Biomphalaria glabrata* и *Planorbarius corneus*. У биомфаларий гранулоциты лучше проявляют фагоцитарную активность по отношению к бактериям, в то время как в роговых катушках кишечную палочку активнее фагоцитируют гиалиноциты.

Для изучения пролиферативной активности гемоцитов были проведены микроскопический и цитометрический анализы включения EdU (5-этил-2- дезоксиуридин) в состав ДНК гемоцитов моллюсков на фоне распределения циркулирующих клеток по фазам клеточного цикла. Большая часть EdU+ клеток находится в области агрегатов, а также клеточного дебриса. После исключения клеточных агрегатов из зоны анализа количество EDU+ гемоцитов у *Biomphalaria glabrata* составило 5,8% (5,57; 6,21) от общего числа одиночных клеток. При этом большая часть этих клеток (4,02% (3,45; 4,94) от одиночных гемоцитов) по количеству ДНК находится в области G0/G1 пика. У *Planorbarius corneus* число EDU+ клеток гемолимфы было ниже и составляло 2,89% (1,59; 3,53) от общего числа одиночных гемоцитов. Из них более половины 2,03% (0,78; 2,72) локализованы в области G0/G1 пика [4].

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-54-15003 НЦНИ_а.

Литература

1. Атаев Г. Л., Полевщиков А.В. Защитные реакции брюхоногих моллюсков. 1. Клеточные реакции // Паразитология. 2004. Т. 38, № 4. С. 342–351.
2. Pila E.A., Sullivan J.T., Wu X.Z., Fang J., Rudko S.P., Gordy M.A., Hanington P.C. Haematopoiesis in molluscs: A review of haemocyte development and function in gastropods, cephalopods and bivalves // Developmental and Comparative Immunology. 2016. Vol. 58. P. 119–128.
3. Prokhorova E.E., Serebryakova M.K., Tokmakova A.S., Ataev G.L. Hemocytes of mollusc *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Pulmonata) // Invertebrate Survival Journal. 2018. Vol. 15. P. 346–351.

4. Tokmakova A.S., Serebryakova M.K., Prokhorova E.E., Ataev G.L. Study of the proliferative activity of hemolymph cells in pulmonate molluscs // *Invertebrate survival Journal*. 2020. Vol. 17. P. 63–74.

УДК 595.762.12

DOI: 10.17223/978-5-94621-931-0-2020-39

ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ *TRECHUS SECALIS* (PAYKULL, 1790) (COLEOPTERA, CARABIDAE) В УСЛОВИЯХ ЮГА МЕЩЁРСКОЙ НИЗМЕННОСТИ

Трушицына О.С.

*Рязанский государственный университет имени С.А. Есенина, Рязань, Россия
trushicina01@mail.ru*

Аннотация. Исследования проводились в 2008 г. на пойменных лугах Мещерской низменности. Описан и обсужден жизненный цикл *Trechus secalis* (Paykull, 1790) по данным о половозрастной структуре его локальных популяций на различных пойменных лугах Мещерской низменности. Жизненный цикл реализуется однолетниками, наблюдается летне-осенний период размножения и зимовка личинок.

Ключевые слова: Coleoptera, Carabidae, *Trechus secalis*, динамика активности, жизненный цикл, пойменные луга, Мещерская низменность.

LIFE CYCLE OF *TRECHUS SECALIS* (PAYKULL, 1790) (COLEOPTERA, CARABIDAE) IN THE SOUTH MESHCHERSKAYA LOWLAND

Trushitsyna O.S.

*Ryazan State University named for S.A. Yesenin, Ryazan, Russia
trushicina01@mail.ru*

Abstract. Research was carried out in 2008 in the floodplain meadows of the Meshchera Lowland. The life cycle of *Trechus secalis* (Paykull, 1790) according to data on sex and age structure of its local populations in different floodplain meadows of Meschera Lowland are described and discussed. The life cycle is realized as annuals the summer-autumn period of reproduction and larval hibernation are observed.

Keywords: Coleoptera, Carabidae, *Trechus secalis*, activity dynamics, life cycle, floodplain meadows, Meshchera Lowlands.