

УДК 591.111.7:594.382.4

Кулько С.В.

**МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ
ОСОБЕННОСТИ ГЕМОЦИТОВ
МОЛЛЮСКА-ИНТРОДУЦЕНТА
STENOMPHALIA RAVERGIERI****Кулько Светлана Владимировна**

Областное государственное казенное учреждение «Управление
по делам гражданской обороны и чрезвычайным ситуациям Белгородской области»,
пр. Славы 102, г. Белгород, 308015, Россия
E-mail: psychonautica@inbox.ru

АННОТАЦИЯ

Показаны особенности форменных элементов гемолимфы моллюска *Stenomphalia ravergeri*. Идентифицировано четыре типа гемоцитов. Сферические гемоциты типа 1 способны к распластыванию и формированию многочисленных псевдоподий, что позволяет им активно участвовать в фагоцитарных реакциях. Гемоциты типа 2 – овальные клетки устойчивой формы, редко формирующие псевдоподии, способны адгезировать на своей поверхности чужеродные объекты. Гемоциты типа 3 – аморфные клетки небольшого размера, с малыми лобоподиями. Гемоциты типа 4 отличаются от предыдущего типа клеток, исключительно размерами и, вероятно, являются промежуточной фазой развития гемоцитов третьего типа. Выявлены индивидуальные изменения в составе клеточных популяций и динамике количества гемоцитов.

Ключевые слова: гемолимфа, гемоциты, псевдоподии, фагоцитарная активность.

UDC 591.111.7:594.382.4

*Kulko S.V.***MORPHO-FUNCTIONAL
FEATURES OF HAEMOLIMPH
ELEMENTS OF THE GASTROPOD
STENOMPHALIA RAVERGIERI****Kulko Svetlana Vladimirovna**

The office of civil defense and emergency situations,
102 Slava str., Belgorod, 308015, Russia
E-mail: psychonautica@inbox.ru

ABSTRACT

Features of formed elements of the haemolymph of mollusc *Stenomphalia ravergeri* are shown. Four types of haemocytes have been identified. Spherical haemocytes of the first type are capable of spreading and the formation of multiple pseudopodia that allows them to participate actively in phagocytic reactions. Haemocytes of type 2 are oval cells of the steady form which seldom form pseudopodia, they can adhere alien objects on their surface. Haemocytes of type 3 are amorphous cells of small size, with small pseudopodia. Haemocytes of type 4 differ from the previous type of cells in size only, and, probably, are an intermediate phase of the development of the third type haemocytes. Individual changes in the structure of cellular populations and dynamics of the number of haemocytes are revealed.

Keywords: haemolymph, haemocytes, pseudopodia, phagocytic activity.

Определяющая роль в иммунных реакциях моллюсков принадлежит клеткам гемолимфы. Существуют различные морфологические типы клеток гемолимфы, которые обладают определенной степенью подвижности по особым путям циркуляции и участвуют в инкапсуляции чужеродных объектов.

Особое внимание в литературе уделяется фагоцитарной активности гемоцитов различных морфотипов. В проведенных ранее исследованиях выявлено, что среди гемоцитов встречаются клетки различного уровня специализированности, что, вероятно, определяет морфологию клеток и соотношение их групп в организме моллюска. Изучена морфология клеточных элементов гемолимфы отдельных моллюсков [1, 2]. Однако морфологические признаки гемоцитов различных типов *in vitro*, а также их способность образовывать псевдоподии рассмотрены недостаточно полно.

В последние десятилетия возникла потребность в понимании эволюционных аспектов становления иммунных реакций. Поэтому важно получать сведения о характере защитных реакций разнообразных животных.

Моллюски представляют собой один из самых удобных объектов для таких исследований. В результате, выявление сходных закономерностей защитных реакций позволяют ставить вопрос о конвергентности стратегий защиты у беспозвоночных и позвоночных животных.

Целью представленного исследования было изучение морфофункциональных особенностей гемоцитов брюхоногого моллюска *Stenomphalia ravergieri*.

Материалы и методы исследования

Исследования осуществлены в период с 2010 по 2011 год на базе научно-исследовательской лаборатории «Физиология адаптационных процессов» кафедры анатомии и физиологии живых организмов.

Для проведения исследования использовали половозрелых моллюсков *S. ravergieri*, собранных в пойме реки Везелка осенью (сентябрь-октябрь) 2010 года. Видовую при-

надлежность объектов устанавливали по специальным определительным ключам [3, 4]. Особей *S. ravergieri* содержали в стеклянных емкостях, из расчета 1 литр объема на 10-15 особей, со слоем почвы на дне 2-3 см и установленными в емкостях веточками растений. Для поддержания влажности в емкости ставили чашки Петри с водой и периодически обрызгивали стенки и крышки емкостей при помощи пульверизатора. Время от времени емкости проветривали, чтобы избежать заплесневения и чрезмерного обводнения грунта.

Гемолимфу моллюсков отбирали стандартным методом, просверливая браншей ножниц во втором завитке от устья раковины небольшое отверстие, затем аккуратно надавливали на тело моллюска, чтобы к проделанному отверстию подошла часть брюшины. Ее осторожно прокалывали стерильной иглой, выделяющуюся гемолимфу собирали в пробирки [5].

Полученную из моллюсков гемолимфу делили на две части. Первую часть наносили на чистые предметные стекла, оставляли для оседания гемоцитов (примерно 60 минут) и давали возможность высохнуть на воздухе, затем фиксировали этанолом и окрашивали азур-эозином по Романовскому. Полученные окрашенные мазки изучали под оптическим микроскопом и осуществляли измерение размеров клеток при помощи анализатора изображений «ВидеоТест» (ООО «Микроскоп Сервис», г. Санкт-Петербург).

Вторую часть собирали при помощи микропипетки в пластиковую чашку Петри и, затем, изучали на инвертированном оптическом микроскопе Nikon Digital Eclipse Ti-E.

Для исследования процесса фагоцитоза в чистую пластиковую чашку Петри помещали каплю раствора супернатанта дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в физиологическом растворе. Сверху помещали каплю гемолимфы, только что взятой у моллюска. Свежая гемолимфа необходима ввиду того, что амебоциты, обладающие выраженной фагоцитарной активностью, достаточно быстро адгезируют к стеклу и исключаются из про-

цесса фагоцитоза, оставаясь в пробирке. Далее была произведена видеозапись процесса фагоцитоза в течение 30 минут.

Полученные данные обрабатывали с использованием методов вариационной статистики [6].

Результаты исследования и их обсуждение

Исследования выявили наличие в гемолимфе улиток *S. ravergieri* нескольких типов клеток (табл. 1).

Таблица 1

Морфометрические параметры гемоцитов *S. ravergieri*

Table 1

Morfometric parameters of haemocytes *S. ravergieri*

Тип гемоцита	Линейные размеры клетки, μm		Линейные размеры ядра, μm	
	по длинной оси	по короткой оси	по длинной оси	по короткой оси
1	41,7 \pm 7,28	30,67 \pm 5,5	20,3 \pm 1,89	18,13 \pm 1,43
2	25,17 \pm 1,85	22,25 \pm 3,29	18,63 \pm 1,92	16,77 \pm 2,50
3	19,51 \pm 3,08	14,39 \pm 1,91	10,83 \pm 1,55	8,13 \pm 1,14
4	11,75 \pm 1,93	11,87 \pm 3,11	8,08 \pm 2,22	6,54 \pm 1,39

Тип 1. Большие клетки (средний размер – 41,7 μm), не имеющие стабильной формы. Составляют около 60% всех клеток гемолимфы. Обладают многочисленными псевдоподиями. На окрашенных фиксированных мазках выглядят как клетки, состоящие из ярко-розового округлого ядра с одним-двумя темными ядрышками и фиолетовой зернистой цитоплазмой, образующей неправильный контур.

Тип 2. Округлые клетки (средний размер – 25,17 μm), могут иметь тонкие филоподии. Составляют около 15% всех клеток гемолимфы. На окрашенных мазках выглядят как однородные розовые округлые образования, от которых могут отходить прозрачные тяжи (псевдоподии).

Тип 3. Малые аморфные клетки (средний размер – 19,51 μm) небольшого размера, с малыми лобоподиями. Составляют около 20% всех клеток гемолимфы. На окрашенных мазках выглядят как продолговатые розовые ядра, окруженные прозрачной цитоплазмой с неправильным контуром.

Тип 4. Отличаются от предыдущего типа клеток, исключительно, размерами (в среднем – 11,75 μm) и, вероятно, не является самостоятельным типом клеток, а лишь промежуточной фазой развития гемоцитов третьего типа. Однако это предположение требует дополнительной проверки.

В ходе исследований удалось выявить некоторые функциональные особенности описанных типов клеток. Критерием разделения были выбраны подвижность, способность закрепляться на поверхности, а также способность к фагоцитозу и фагоцитарная активность.

Тип 1. Большие клетки, не имеющие стабильной формы. Клетки этого типа закрепляются на субстрате, но сохраняют подвижность в течение всего времени наблюдения. Выпускают псевдоподии, имеющие вид лобоподий и иногда – тонких длинных филоподий. Проявляют умеренную фагоцитарную активность и способны инкапсулировать крупные объекты, попадающие в гемолимфу (рис. 1).

Тип 2. Округлые клетки, образующие тонкие филоподии, не закрепляющиеся на субстрате. Фагоцитарную активность не проявляют, однако активно взаимодействуют с инородными клетками, помещенными в гемолимфу, «ощупывая» их (рис. 2).

Тип 3. Малые аморфные клетки: небольшого размера, способны к образованию псевдоподий – главным образом, лобоподий, не слишком большой длины. Клетки этого типа способны к активному передвижению по стеклу, сливаются в агрегаты с подобными клетками, и в таком виде могут проявлять фагоцитарную активность. На мазках выглядят как продолговатые розовые ядра, окруженные прозрачной цито-

плазмой с неправильным контуром (рис. 3).

При инкубировании во влажной камере среди гемоцитов преобладают крупные клетки с ядрами, идентифицированные нами как клетки типа 1. Морфологически похожие клетки были описаны ранее в составе капсул вокруг дегенерирующих спорцист и трансплантатов тканей [7]. Высказано предположение, что такие гемоциты более устойчивы к патологическим изменениям, происходящим в организме зараженного моллюска [8-10]. Они же оказываются наиболее жизнеспособными при инкубировании, в условиях накопления продуктов обмена веществ.

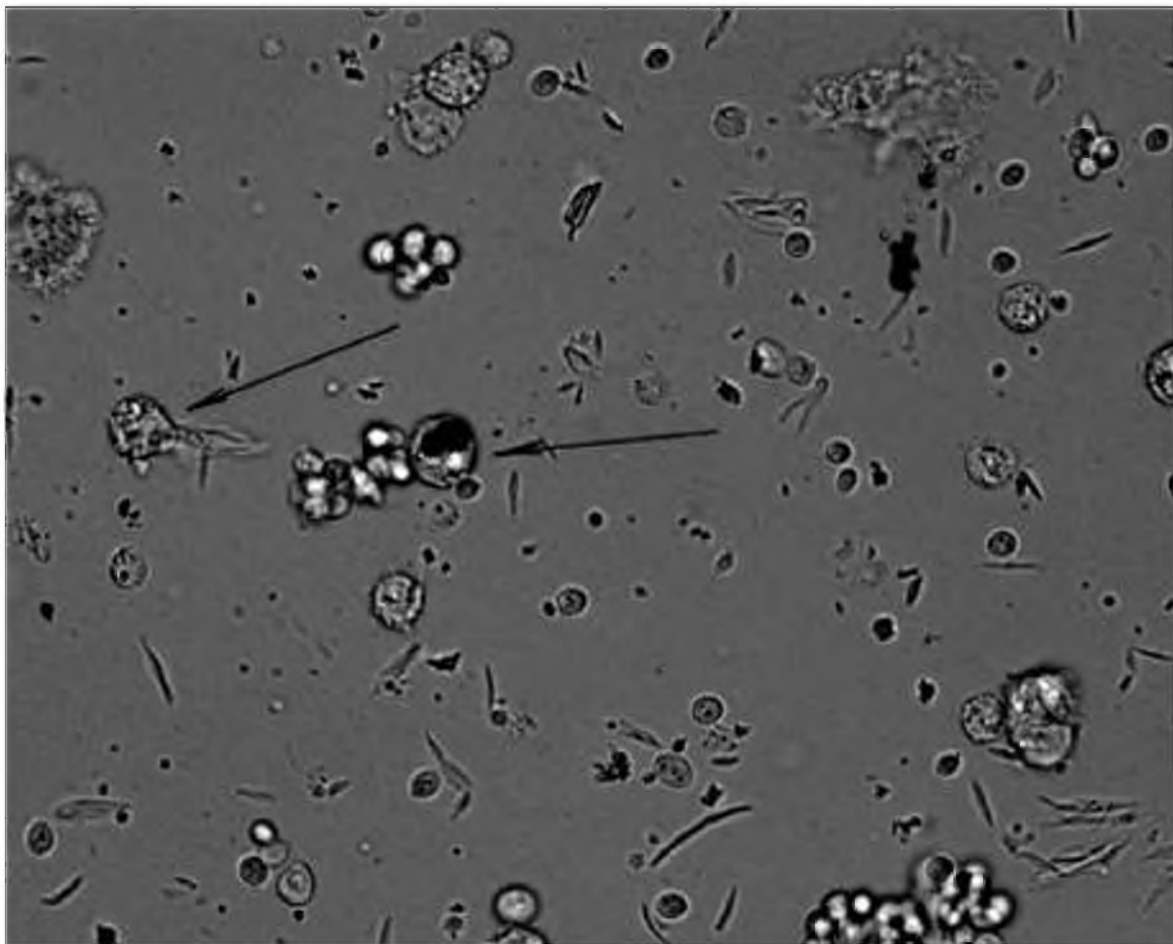


Рис. 1. Гемоциты типа 1

Fig. 1. Haemocytetes type 1

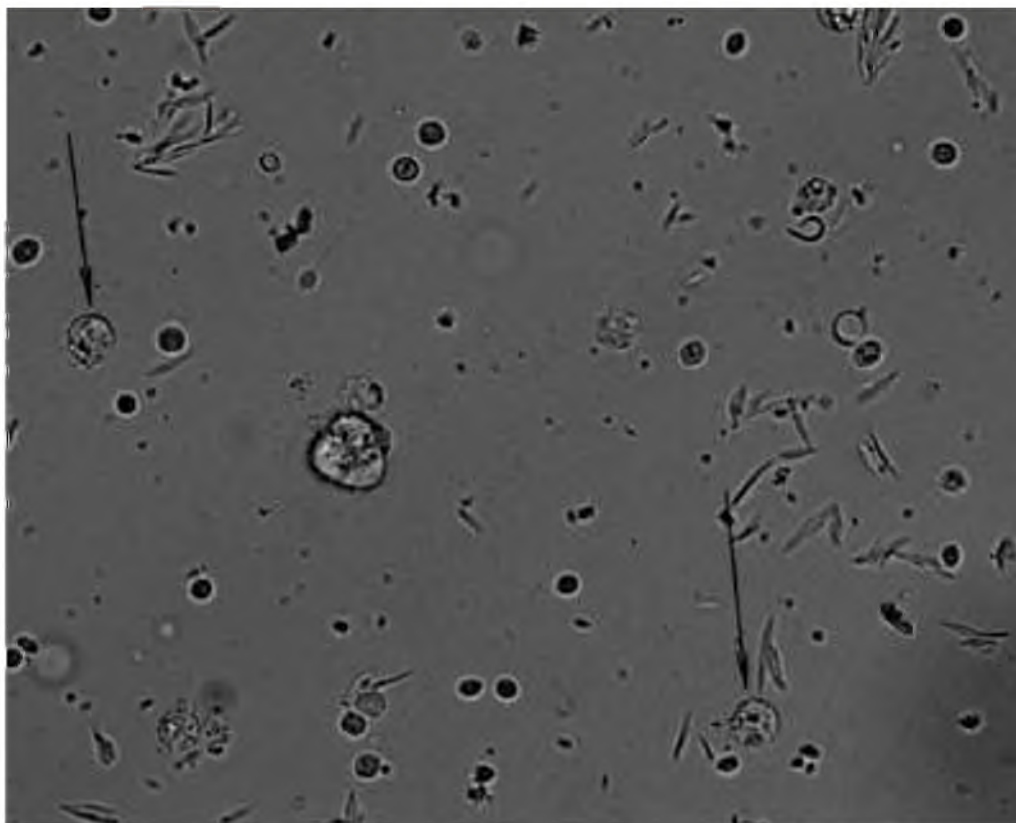


Рис. 2. Гемоциты типа 2

Fig. 2. Haemocytes type 2

Можно предположить, что крупные гранулоциты являются специализированной группой гемоцитов, участвующих в процессах инкапсуляции.

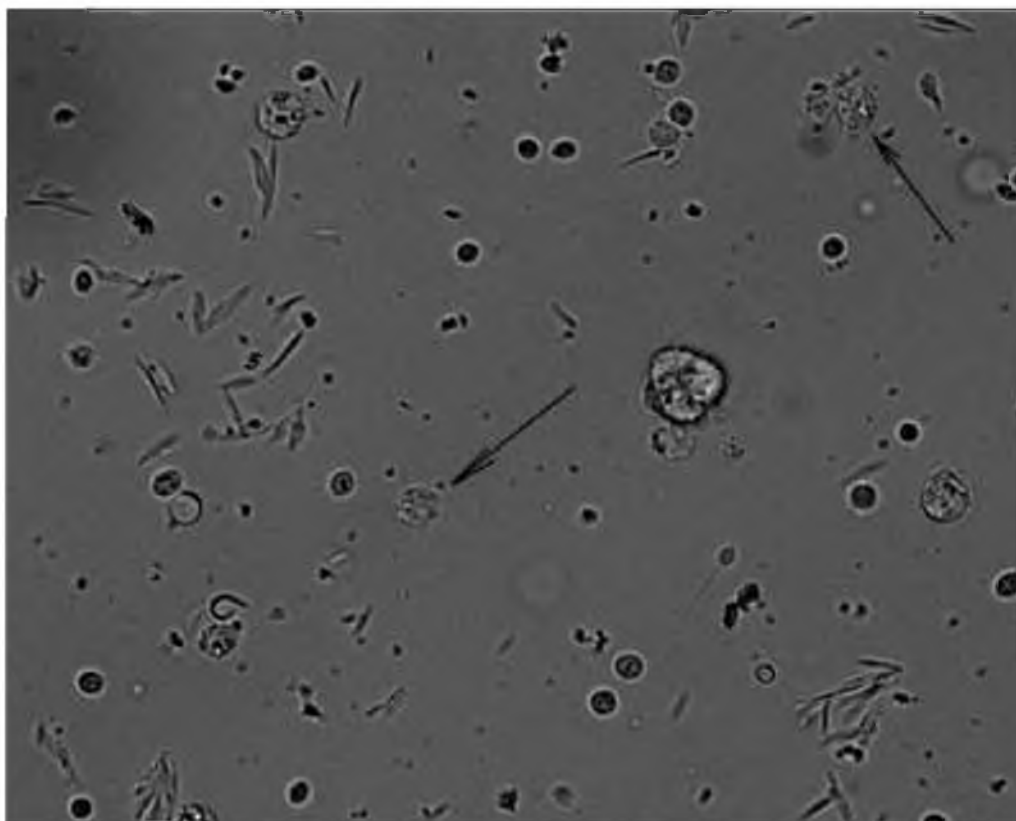


Рис. 3. Гемоциты типа 3

Fig. 3. Haemocytes type 3

Заключение

Большую часть клеточных элементов гемолимфы *Stenomphalia ravergieri* (ок. 60%) составляют амебоциты, способные к формированию псевдоподий и расплыванию на субстрате. Количество клеток второго типа достаточно сильно варьирует, но в целом держится в пределах 15%, количество клеток 3-4 типа составляет примерно 20%.

В гемолимфе *Stenomphalia ravergieri* наибольшую фагоцитарную активность проявляют клетки типа 1, а клетки 2 типа не проявляют фагоцитарной активности, и не способны

к образованию многочисленных псевдоподий. Клетки типа 3 и 4 проявляют умеренную фагоцитарную активность, и образуют немногочисленные псевдоподии.

Результаты исследования подтверждают точку зрения, что элементами защитных реакций брюхоногих моллюсков являются циркулирующие клетки гемолимфы – гемоциты. Это подтверждается как изменением клеточного состава гемолимфы, так и изменением функциональной активности гемоцитов при воздействии чужеродных объектов, в частности, клеток *Saccharomyces cerevisiae*.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Adema C.M., Harris R.A., Van Deutekom-Mulder E.C. A comparative study of hemocytes from six different snails: morphology and functional aspects. *J. Inv. Path.*, 1992. 59: 24-32.
2. Adamowicz A., Bolaczek M. Blood cells morphology of the snail *Helix aspersa maxima* (Helicidae), 2003
3. Chang S. J., Tseng S. M., Chou H. Y. Morphological Characterization via Light and Electron Microscopy of the Hemocytes of two Cultured Bivalves: A Comparison Study between the Hard Clam (*Meretrix lusoria*) and Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Zoological Studies*, 2005. 44:144-153.
4. Cima, F., V. Matozzo, M. G. Marin & L. Ballarin. 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. *Fish Shellfish Immunol.* 10:677-693.
5. Ruddell C. L. The fine structure of the granular amebocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 1971 - 18:269-275.
6. Donaghy L., Artigaud S., Sussarellu R., Lambert C., Le Goïc N., Hégaret H., Soudant P. Tolerance of bivalve mollusc hemocytes to variable oxygen availability: a mitochondrial origin. *Aquatic Living Resources*, 26, pp 257-261. 2013
7. Sminia T. Structure and function of blood and connective tissue cells of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. *Z Zellforsch* 1972 – 130:497-526.
8. Wen C. H., Kou G. H., Chen S. N. Light and electron microscopy of hemocytes of the hard clam, *Meretrix lusoria* (Roding). *Comp. Biochem. Physiol.* 1994 - 108:270-286.
9. Zbikowska E. Comparative quantitative studies of hemocytes of the snails: *Helix pomatia* L. and *Lymnaea stagnalis* (L.) (Gastropoda: Pulmonata). *Biol. Bull. Poznań* 1998 - 35:25-32.
10. Accorsi A., Bucci L., Eguileor M., Ottaviani E., Malagoli D., Comparative analysis of circulating hemocytes of the freshwater snail *Pomacea canaliculata* – *Fish and shellfish immunology*, 2013. 1-9.

REFERENCES:

1. Adema C.M., Harris R.A., Van Deutekom-Mulder E.C. A comparative study of hemocytes from six different snails: morphology and functional aspects. *J. Inv. Path.*, 1992. 59: 24-32.
2. Adamowicz A., Bolaczek M. Blood cells morphology of the snail *Helix aspersa maxima* (Helicidae), 2003
3. Chang S. J., Tseng S. M., Chou H. Y. Morphological Characterization via Light and Electron Microscopy of the Hemocytes of two Cultured Bivalves: A Comparison Study between the Hard Clam (*Meretrix lusoria*) and Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Zoological Studies*, 2005. 44:144-153.
4. Cima, F., V. Matozzo, M. G. Marin & L. Balarin. 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. *Fish Shellfish Immunol.* 10:677-693.
5. Ruddell C. L. The fine structure of the granular amebocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 1971 - 18:269-275.
6. Donaghy L., Artigaud S., Sussarellu R., Lambert C., Le Goïc N., Hégaret H., Soudant P. Tolerance of bivalve mollusc hemocytes to variable oxygen availability: a mitochondrial origin. *Aquatic Living Resources*, 26, pp 257-261. 2013
7. Sminia T. Structure and function of blood and connective tissue cells of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. *Z Zellforsch* 1972 – 130:497-526.
8. Wen C. H., Kou G. H., Chen S. N. Light and electron microscopy of hemocytes of the hard clam, *Meretrix lusoria* (Roding). *Comp. Biochem. Physiol.* 1994 - 108:270-286.
9. Zbikowska E. Comparative quantitative studies of hemocytes of the snails: *Helix pomatia* L. and *Lymnaea stagnalis* (L.) (Gastropoda: Pulmonata). *Biol. Bull. Poznań* 1998 – 35:25-32.
10. Accorsi A., Bucci L., Eguileor M., Ottaviani E., Malagoli D., Comparative analysis of circulating hemocytes of the freshwater snail *Pomacea canaliculata* – *Fish and shellfish immunology*, 2013. 1-9.