

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕМОЦИТОВ СУХОПУТНЫХ БРЮХОНОГИХ МОЛЛЮСКОВ

Присный А.А., Пигалева Т.А., Кулько С.В.

*НИУ «Белгородский государственный университет», Белгород,
e-mail: Prisny@bsu.edu.ru*

Показаны особенности форменных элементов гемолимфы *Helix pomatia* и *Stenomphalia ravergieri*. Идентифицировано два типа гемоцитов: тип I и тип II. Сферические гемоциты типа I способны к распластыванию и формированию многочисленных псевдоподий, что позволяет активно участвовать в фагоцитарных реакциях. Гемоциты типа II – овальные клетки устойчивой формы, редко формирующие псевдоподии, способны адгезировать на своей поверхности чужеродные объекты. Выявлены индивидуальные изменения в составе клеточных популяций и динамике количества гемоцитов.

Ключевые слова: гемолимфа, гемоциты, псевдоподии, фагоцитарная активность

Обычно понятие «иммунитет» используется для описания защитных реакций млекопитающих и особенно человека. Медицинское толкование иммунологических аспектов привело к массовому осознанию их связи с лечением и профилактикой конкретных заболеваний. Однако иммунология как наука прошла свое становление благодаря открытиям И.И. Мечникова, труды которого привели к возникновению сравнительной иммунологии.

Ведущая роль в защитных реакциях моллюсков принадлежит клеткам гемолимфы. Известно, что существуют различные морфотипы клеток гемолимфы, которые обладают определенной степенью подвижности по особым путям циркуляции и участвуют в инкапсуляции чужеродных объектов.

В последние десятилетия возникла потребность в понимании эволюционных аспектов становления защитных 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 позволяет ставить вопрос о конвергентности стратегий защиты у беспозвоночных и позвоночных животных.

Целью представленного исследования было изучение морфофункциональных особенностей форменных элементов гемолимфы *Helix pomatia* и *Stenomphalia ravergieri*.

Объекты и методы исследования

В основу работы положены результаты исследований гемолимфы *Helix pomatia* и *Stenomphalia ravergieri*. Моллюски были собраны на территории города Белгорода, в пойме реки Везелка. Собранные особи содержались в стеклянных емкостях со слоем почвы на дне (5–6 см), для поддержания влажности в емкостях находились чашки Петри с водой. Периодически емкости опрыскивали водой при помощи пульверизатора. Кормление осуществляли один раз в сутки. Перед использованием в эксперименте моллюска предварительно лишали пищи.

Гемолимфу добывали через отверстие, проделанное во втором завитке от входа в раковину. После надавливания на тело улитки через входное отверстие из проделанного отверстия выступает брюшина. Из прокола, сделанного иглой, гемолимфу отбирали с помощью микропипетки и помещали на 2 мин в пластиковую чашку Петри (диаметр 3 см) для осаждения осколков раковины и слизи. Затем стекло располагали на столике инвертированного микроскопа (Nikon C1).

Для оценки динамики изменения количества циркулирующих гемоцитов в гемолимфе моллюсков была использована методика, предложенная К. Кусто и Т. Йошино [2]. Количество адгезированных и неадгезированных гемоцитов в 1 мкл гемолимфы подсчитывали одновременно для каждой пробы.

Для светооптических исследований был использован микроскоп Nikon С1. Измерения объектов проводили традиционным способом с использованием объективов $\times 25$, $\times 40$ и $\times 60$. Фотоработы были выполнены на оптической системе Nikon. Для компьютерной обработки материала использовали следующие программы: Word 2003, Excel 2003.

Результаты и их обсуждение

Гемоциты моллюсков очень разнообразны, их количество и модификации могут существенно меняться в зависимости от условий окружающей среды и физиологического статуса животного. Несмотря на поступательное развитие исследований гемоцитов моллюсков, к настоящему времени не сложилось какой-либо однородной

и удовлетворительной системы классификации форменных элементов гемолимфы. Такая ситуация возникла из-за некоторых противоречий при определении критериев классификации. Критерии могут быть морфологические или функциональные.

С функциональной точки зрения различают следующие типы клеток: стволовые клетки, фагоцитирующие клетки, гемостатически активные клетки и трофические клетки [3].

При использовании морфологических критериев выделяют два типа клеток: круглые клетки и клетки, образующие псевдоподии [6].

Предлагаемые нами критерии классификации гемоцитов предполагали морфологические и функциональные характеристики. Было выявлено два основных типа клеток: гемоциты типа I и гемоциты типа II.

Гемоциты типа I представляют собой популяцию полиморфных клеток. Они могут быть сферическими или овальными и способны к формированию многочисленных псевдоподий. Псевдоподии обычно имеют форму длинных филоподий, чаще всего равномерно распределенных по периферии клетки (рис. 1).

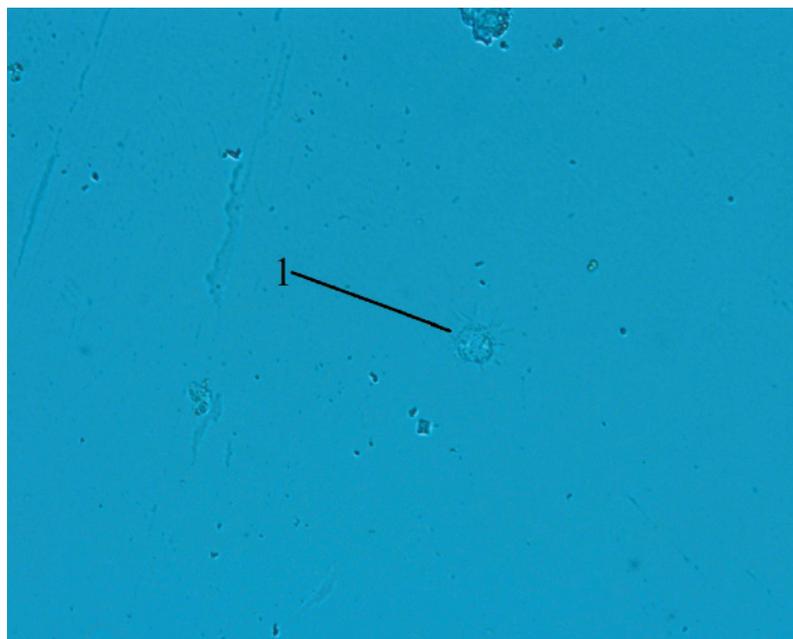


Рис. 1. Гемоцит типа I в гемолимфе *Stenomphalia ravergieri*:
1 – гемоцит типа I

В нативном препарате гемоциты типа I за время наблюдения расплываются на субстрате, изменяя форму и перемещаясь относительно первоначального места прикрепления. На окрашенных мазках хорошо выражено эксцентрично расположенное ядро, овальное или имеющее форму почки. При окраске выявлена чувствительность ядра к кислым красителям, вследствие чего наблюдается интенсивное розовое окрашивание. Цитоплазма клеток окрашивается слабо, обычно содержит несколько базофильных гранул. Способность гемоцитов типа I к расплыванию на субстрате и адгезии к другим клеткам подтверждает их основную роль в процессах инкапсуляции чужеродных объектов.

Псевдоподии клеток типа I содержат специальные поддерживающие структуры, которые обнаруживаются в клетках представителей и других видов брюхоногих моллюсков.

Следует отметить, что гемоциты типа I демонстрируют тенденцию формировать скопления и даже агрегаты из 10–12 клеток, что можно рассматривать как участие в регенеративных и иммунных реакциях, а также как реализацию гемостатической функции.

Гемоциты типа II – вторая категория клеток гемолимфы *Helix pomatia* и *Stenophalia gavigieri*, они характеризуются высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением и ограниченной способностью формировать псевдоподии. Клетки этой категории имеют устойчивую форму и очень редко формируют короткие лобоподии.

Гемоциты типа II имеют преимущественно овальную форму, у некоторых выявлено образование коротких псевдоподий. Ядра окрашиваются кислыми красителями и окружены тонким слоем гомогенной цитоплазмы, содержащей многочисленные базофильно окрашенные гранулы. Клетки типа II медленно закрепляются на субстрате и в течение времени наблюдения практически не меняют свою форму.

Предложенная многими авторами дифференциация клеток гемолимфы на две

категории: гранулоциты и гиалиноциты вполне соответствует предложенной классификации у *Helix pomatia*. В этом случае гемоциты типа I морфологически максимально соответствуют гранулоцитам, а гемоциты типа II – гиалиноцитам, описанным у Cheng и Yoshino [1, 7].

Количество гемоцитов обеих категорий зависит от различных факторов. В частности, число клеток отличается в пробах гемолимфы, взятой из различных частей тела: проба, полученная из ноги, содержит в два раза меньше гемоцитов, чем проба, полученная из сердца. Кроме того, на количестве гемоцитов отражается и возраст животного: чем старше организм, тем большее число клеток гемолимфы содержится в его внутренней среде. С возрастом моллюски подвергаются влиянию большего количества антигенов, что вызывает возрастание числа функционально активных клеток. Если рассматривать соотношение гемоцитов типа I и гемоцитов типа II в гемолимфе *Helix pomatia*, то видно, что оно составляет 90% типа I и 10% типа II.

Гемоциты *Helix pomatia* сохраняют жизнеспособность во влажной камере в течение 2–4 часов, в зависимости от объема пробы и физиологического состояния моллюска. В дальнейшем происходит гибель клеток гемолимфы.

При инкубировании во влажной камере среди гемоцитов преобладают крупные клетки с ядрами, идентифицированные нами как клетки типа I. Морфологически похожие клетки были описаны ранее в составе капсул вокруг дегенерирующих спороцист и трансплантатов тканей [5]. Высказано предположение, что такие гемоциты более устойчивы к патологическим изменениям, происходящим в организме зараженного моллюска [4]. Они же оказываются наиболее жизнеспособными при инкубировании, в условиях накопления продуктов обмена веществ. Можно предположить, что крупные гранулоциты являются специализированной группой гемоцитов, участвующих в процессах инкапсуляции.

При изучении гемоцитов *in vitro* нами отмечена широкая вариабельность не только размеров, но и формы клеток: на протяжении нескольких часов они могут менять форму, размер и количество псевдоподий. Это подтверждает принадлежность описанных ранее морфотипов гемоцитов к одному клеточному типу, хотя и весьма полиморфному.

Дополнительно был выполнен анализ корреляции между размерами моллюска и соотношением гемоцитов типа I и гемоцитов типа II в циркуляции. Установлено наличие достоверной отрицательной корреляции между этими параметрами. У мелких особей клеток типа I меньше, а клеток типа II больше, чем у более крупных моллюсков.

Для исследования фагоцитарной активности гемоцитов *in vitro* использовали культуру клеток *Saccharomyces cerevisiae*. Видеосъемка нативного препарата в течение 20 минут показала, что за этот период около 80% дрожжевых клеток было фагоцитировано. Наиболее активно в процессе фагоцитоза участвовали клетки типа I, в то время как гемоциты типа II большей частью участвовали в процессах адгезии клеток *Saccharomyces cerevisiae* на своей поверхности (рис. 2). В результате были образованы агрегаты клеток типа II и дрожжевых клеток, что существенно ограничивало подвижность дрожжей.

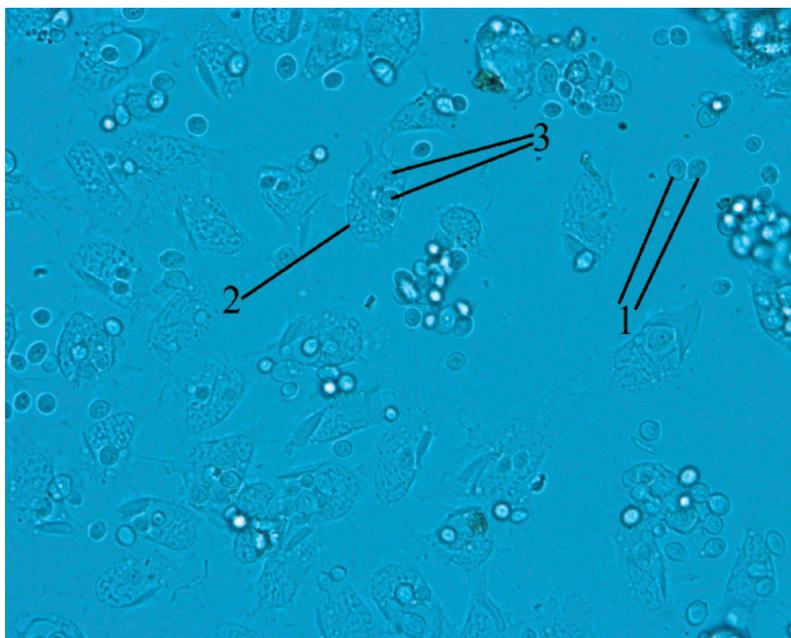


Рис. 2. Фагоцитоз клеток *Saccharomyces cerevisiae* гемоцитами *Helix pomatia*:
1 – клетки *Saccharomyces cerevisiae*; 2 – фагоцитирующие клетки типа I;
3 – фагоцитированные клетки *Saccharomyces cerevisiae*

Заключение

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*.

Детальное изучение клеточного иммунитета моллюсков по-прежнему дает неоднозначные результаты. К настоящему времени имеются данные о существовании клеточных реакций, их участии в подавлении развития паразитов, однако сведения о характере и динамике этих процессов разноречивы.

Детальное изучение клеточного иммунитета моллюсков по-прежнему дает неоднозначные результаты. К настоящему времени имеются данные о существовании клеточных реакций, их участии в подавлении развития паразитов, однако сведения о характере и динамике этих процессов разноречивы.

Список литературы

1. Cheng, T.C. A classification of molluscan hemocytes based on functional evidences. – *Comp. Path.* 6, 1984. – P. 111-146.
2. Coustau C., Yoshino T. Surface membrane polypeptides associated with hemocytes from *Schistosoma mansoni*-susceptible and -resistant strains of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) // *Exp. Parasitol.* – 1994. – Vol. 63, № 1. – P. 82-89.
3. Glinski, Z., Jarosc, J. Ukad immunologiczny miêczaków. In: *Zjawiska odporno ci przeciwwzaka nej u bezkrêgowców.* – Wyd. UMC. – Lublin, 1997. – P. 90-100.
4. Hernroth B. The influence of temperature and dose on antibacterial peptide response against lipopolysaccharide in the blue mussel, *Mytilus edulis* // *Fish & Shellfish Immunology*, 2003. – P. 25-37.
5. Lie K.J., Heyneman D. Studies on resistance in snails. 3. Tissue reaction to *Echinostoma lindoense* sporocysts in sensitized and resensitized

Biomphalaria glabrata // *The Journal of Parasitology*, 1976. – P. 51-58.

6. Sminia, T. Gastropods. In: *Invertebrate Blood Cells.* – Academic Press, London-New York, 1981. – P. 191-232.

7. Yoshino, T.P. The ultrastructure of circulating hemolymph cells of the marine snail *Cerithidea californica* (Gastropoda: Prosobranchiata) // *J. Morphol.* 150. – 1976. – P. 485–494.

Рецензенты:

Викулов А.Д., д.б.н., профессор, декан факультета физической культуры ГОУ ВПО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского», Ярославль;

Капустин Р.Ф., д.б.н., доцент, профессор кафедры морфологии и физиологии ФГОУ ВПО «Белгородская государственная сельскохозяйственная академия» Министерства сельского хозяйства РФ, Белгородская обл.

MORPHOPHYSIOLOGY FEATURES OF HEMOLIMPH ELEMENTS OF THE GRAPE SNAIL (HELIX POMATIA)

Prisny A.A., Pigaleva T.A., Kulko S.V.

Belgorod State University, Belgorod,

e-mail: Prisny@bsu.edu.ru

Morphological characters of haemocytes and seasonal changes in selected blood indices were studied in *Helix pomatia* and *Stenomphalia ravergieri*. Two types of haemocytes were identified: I and II. Spherical type I haemocytes are cells capable of spreading on the substratum and forming numerous pseudopodia. Type II haemocytes are oval cells of stable shape, rarely forming pseudopodia. A wide individual variation and significant changes were found, involving the number of haemocytes and haematological indices.

Keywords: hemolymph, hematocytes, pseudopodia, phagocytal activity