

УДК 591.111.7:595.142.39

ТИПОЛОГИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ВНУТРЕННЕЙ СРЕДЫ ОБЫКНОВЕННОГО ЗЕМЛЯНОГО ЧЕРВЯ (*LUMBRICUS TERRESTRIS* L.)

А.А. Присный
Т.А. Пигалева

Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет, Россия, 308015,
г. Белгород, ул. Победы, 85
E-mail: Prisny@bsu.edu.ru

Целью данной работы является изучение морфофункциональных характеристик гемоцитов *Lumbricus terrestris*. Проведенные исследования позволили впервые осуществить типологию, дать морфофункциональные характеристики, а также составить гемоцитарную формулу клеток крови *L. terrestris*. Определена фагоцитарная активность для каждого форменного элемента крови *L. terrestris*.

Ключевые слова: гемоциты, псевдоподии, фагоцитарная активность.

Введение

Беспозвоночные животные часто являются объектами для оценки антропогенной нагрузки на природные и искусственные экосистемы. Являясь удобными объектами для мониторинга, они непосредственно оказываются подвержены неблагоприятному влиянию со стороны человека. Существуют методы мониторинга, которые основаны на оценке состояния организма по качественному и количественному составу гемолимфы [1]. Биоиндикационные методы оценки состояния природной среды широко используются в современных экологических исследованиях [2]. Одной из многочисленных и представленных во всех биогеоценозах групп почвообитающих животных-биоиндикаторов являются дождевые черви [3].

Клеточные элементы внутренней среды животных обладают высокой чувствительностью к воздействию экзогенных факторов. В связи с этим, морфофункциональные показатели гемоцитов дождевых червей можно использовать при биоиндикации.

Однако детальный анализ реакций внутренней среды организма дождевых червей не проведен, в связи с недостаточностью данных о морфофункциональном статусе клеточных элементов циркулирующих жидкостей. При использовании дождевых червей для биомониторинга необходимо четко знать нормальные показатели качественного и количественного состава гемоцитов. Изучение этих показателей позволит осуществлять более адекватную оценку физиологического состояния животных в меняющихся условиях окружающей среды.

Целью представленного исследования было изучение морфофункциональных особенностей гемоцитов дождевого червя *Lumbricus terrestris* L.

Объекты 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.

В исследованиях использованы представители вида Обыкновенный земляной червь (*L. terrestris*). Видовую принадлежность животных определяли с использованием различных источников [4–6].

Представители вида *L. terrestris* были собраны весной 2010 года в типичном агроценозе Борисовского района Белгородской области. Животных содержали в деревянной кадке с количеством чернозема из расчета 5–6 ведер на сотню червей, который был перемешан с листовым опадом, необходимым для питания червей. Почву периодически увлажняли из пульверизатора. Раз в неделю проводили осмотр на выявление



больных и умерших червей, которых удаляли из общего садка.

Для обездвиживания исследуемых животных использовали кратковременное погружение в 10% этиловый спирт.

Животных неподвижно фиксировали препаративными иглами, после чего делали разрез кожи и мышц брюшной стороны, затем микропипеткой непосредственно из брюшного сосуда отбирали кровь.

При пробоподготовке фиксированных препаратов для световой микроскопии возник ряд трудностей. Во-первых, это отсутствие стандартной методики фиксации и окраски форменных элементов крови беспозвоночных животных. Во-вторых, это физико-химические особенности внутренней среды аннелид. Методы приготовления фиксированного препарата форменных элементов внутренней среды, подбирали на основе классических техник, разработанных для гемоцитов млекопитающих. Проведены испытания таких фиксаторов как этанол (C_2H_5OH), формалин (CH_2O (40%), CH_3OH (8%), H_2O (52%)), глутаровый альдегид ($C_5H_8O_2$); красители – аzur-эозин по Романовскому, Гимза и Май-Грюнвальду. Для каждой комбинации красителя и фиксатора варьировали время операции. В итоге было подобрано наилучшее сочетание красителя и фиксатора, а так же время экспозиции.

Для изучения морфологических особенностей клеток *L. terrestris* использовали модифицированную окраску по Романовскому. Кровь наносили на чистое сухое предметное стекло, и оставляли её до полного высыхания. После этого следовала фиксация этиловым спиртом в течение 3-4 минут, после чего препарат промывали фосфатным буфером ($pH=7.2$) и окрашивали аzur-эозином по Романовскому в течение 10-12 минут (для лучшей окраски краситель подогревали до $30^{\circ}C$), краситель так же смывали фосфатным буфером.

Все полученные измерения были выполнены с использованием анализатора изображений «ВидеоТест» (ООО «Микроскоп Сервис», г. Санкт-Петербург).

В опытах *in vitro* изучали один из основных показателей фагоцитоза – поглотительную способность клеток крови. Суспензии форменных элементов с объектами фагоцитарной реакции инкубировали при комнатной температуре в течение 20 и 40 минут. В качестве объектов фагоцитоза использовали инертные откалиброванные частицы агломерированного латекса (НИИМСК, Ярославль) диаметром $0.8 \mu m$ [7] и супернатант дрожжевых клеток (*Saccharomyces cerevisiae*).

Для наблюдения фагоцитоза и прижизненного поведения клеток использовали инвертированный микроскоп Nikon Eclipse Ti-E в режиме дифференциально-интерференционного контраста с программным приложением NIS-Elements.

Полученные данные обрабатывали с использованием методов вариационной статистики [8].

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований гемоциты *L. terrestris* были разделены на несколько групп (табл. 1).

Таблица 1

Линейные размеры (μm) гемоцитов и их ядер дождевого червя *Lumbricus terrestris*

Тип гемоцита	Гемоциты		Ядра	
	длинная ось	короткая ось	длинная ось	короткая ось
1	18.09±5.52	17.15±5.07	7.26±2.21	6.71±1.18
2	18.66±4.62	18.78±5.81	6.85±2.02	7.05±0.95
3	27.44±6.76	21.19±5.41	6.89±0.87	6.98±0.76
4	15.49±4.64	15.01±4.39	6.35±2.25	5.96±1.47
5	12.51±1.71	12.24±1.59	6.15±1.81	5.37±1.71
6	9.73±1.62	9.75±1.33	6.05±1.53	5.07±1.31
7	6.13±0.77	6.12±0.92	4.19±0.44	4.46±0.91

Тип 1. Большие амёбовидные клетки, цитоплазма заполнена большим количеством вакуолей. Ядро относительно небольшое, располагается эксцентрично. Клетки отличаются активным перемещением, по стеклу не распластываются. Отмечена секреция клетками этого типа содержимого вакуолей во внешнюю среду.

Тип 2. Большие амёбовидные клетки, цитоплазма заполнена крупными вакуолями. Ядро небольшое, располагается периферически. Клетки распластываются по стеклу, после чего уже не способны к активному движению.

Тип 3. Большие клетки, овальной формы с четкими контурами, полностью заполненные гранулами (темными и светлыми). Иногда гранулы маскируют небольшое ядро, которое располагается эксцентрично. Клетки не способны к образованию псевдоподий.

Тип 4. Средние амёбовидные клетки, цитоплазма заполнена крупными и мелкими темными гранулами. Ядро может располагаться как в центре, так и на периферии. Клетки способны адгезировать к стеклу, активное перемещение отсутствует.

Тип 5. Округлые клетки с четкими контурами. Ядро овальное, занимает периферическое положение. Цитоплазма содержит темные гранулы и светлые вакуоли. Клетки не осуществляют активного перемещения, но способны выпускать длинные филоподии.

Тип 6. Округлые клетки с четкими контурами. Ядро овальное, относительно крупное, занимает периферическое положение. Цитоплазма гомогенная. Клетки способны выпускать филоподии.

Тип 7. Небольшие округлые клетки, цитоплазма гомогенная. Ядро круглое, цитоплазма образует светлый, узкий ободок вокруг ядра.

В гемоцитарной формуле преобладали клетки первого, второго и четвертого типа, которые занимали по 18–19,5% от всего количества клеток, остальные гемоциты представлены в равном количестве, на каждый тип приходится по 10–13% всех гемоцитов (рис. 1).

Одной из основных функций системы циркуляции является защита организма, которая выполняется, в том числе, и посредством фагоцитоза. Гемоциты способные к фагоцитозу, составляют линию иммунной защиты и имеют функциональное название – иммуноциты.

При оценке фагоцитарной и двигательной активности гемоцитов *L. terrestris* выявлено, что введение латекса в дозах, угрожающих жизни, стимулирует фагоцитоз у всех 7 клеточных типов.

При инкубации с дрожжами и тушью, гемоциты проявляли активность, выпускали псевдоподии по направлению к инородным объектам, но фагоцитоз происходил в единичных случаях.

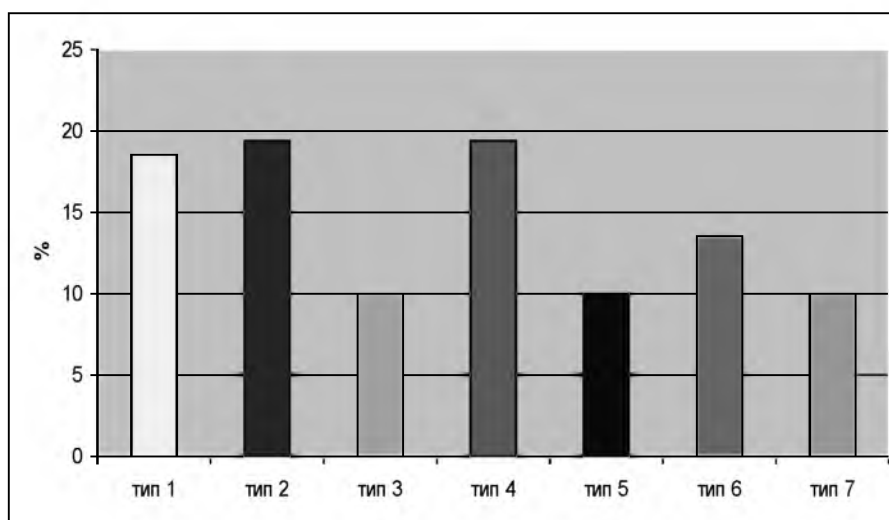


Рис. 1. Гемоцитарная формула *Lumbricus terrestris*



По способности к передвижению клетки крови червя можно разделить на способные к активному перемещению, способные к выпячиванию псевдоподий и не способные к выпячиванию псевдоподий. К первой группе относятся большие амёбовидные клетки (тип 1), к третьей – наиболее крупные клетки, заполненные темными гранулами (тип 2), ко второй – все остальные клетки.

Заключение

В результате проведенных исследований осуществлена типология и дана морфофункциональная характеристика гемоцитов семи клеточных типов для *L. terrestris*. Среди гемоцитов преобладали клетки первого, второго и четвертого типа, остальные гемоциты представлены в равном количестве.

Все типы клеток крови *L. terrestris* способны к фагоцитозу при инкубации с частицами латекса в концентрации, угрожающей жизни организма. При снижении концентрации частиц фагоцитарная активность резко падает. В процессе экспозиции клеток с супернатантом дрожжей (*S. cerevisiae*) фагоцитарную активность не наблюдали.

Список литературы

1. Алехина Г.П., Логинова Е.Г., Мисетов И.А. Иммунологическая реакция пресноводных двустворчатых моллюсков на неблагоприятное воздействие среды // Вестник ОГУ. – 2010. – №6. – 112. – С. 52–54.
2. Interactions between environmental pollution and cold tolerance of soil invertebrates: a neglected field of research / Holmstrup M., Bayley M., Sjørnsen H., Hrjer R., Bossen S., Friis K. // CryoLetters. – 2000. – Vol. 21. – P. 309–314.
3. Cadmium toxicity in earthworm, *Metaphire posthuma*: Ultrastructural changes in secretory cells of clitellar epithelium / Gupta S.K., Baskar Singh S., Sundararaman V. // Indian J. Exp. Biol. – 1997. – № 7. – P. 780–786.
4. Перель Т.С. Распространение и закономерности распределения дождевых червей фауны СССР (с определительными таблицами). – М.: Наука, 1979. – 272 с.
5. Всеволодова-Перель Т.С. Дождевые черви фауны России: Кадастр и определитель. – М.: Наука, 1997. – 102 с.
6. Присный А.В. Работы с дождевыми червями / Практические работы школьников по экологии: Ч.2. Методические материалы к практическим работам (модельные методики и ключи для распознавания организмов). – Белгород: Издательство БелГУ, 1999. – 7 с.
7. Изучение поглотительной способности нейтрофилов крови с использованием инертных частиц латекса / Потапова С.Г., Хрустиков В.С., Демидова Н.В., Козинец Г.И. // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1977. – Т. XXII, №9. – С. 58–59.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL FEATURES OF HAEMATOCYTES OF AN ORDINARY EARTHWORM

A.A. Prisky
T.A. Pigaleva

Belgorod State National Research University, Pobedy St, 85, Belgorod,
308015, Russia

E-mail: Prisky@bsu.edu.ru

The purpose of the given work is to study haemocytal morphofunctional characteristics of *Lumbricus terrestris*. Research has allowed for the first time to carry out a typology, to give morphofunctional characteristics, and also to make haemocytal count of *L. terrestris* blood cells. Phagocytal activity is defined for each uniform element of *L. terrestris* blood.

Key words: haematocytes, pseudopodia, phagocytal activity.