



УДК 591.111.1:595.76

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИММУННЫХ КЛЕТОК НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ОТРЯДА *COLEOPTERA*

А.А. Присный, Е.А. Гребцова

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 некоторых представителей отряда Coleoptera. Проведенные исследования позволили впервые осуществить типологию, дать морфофункциональные характеристики, а также определить упругость и адгезию к нанозонду мембраны гемоцитов представителей шести видов жесткокрылых.

Ключевые слова: гемоциты, упругость, адгезия.

Введение

Гемоциты насекомых представляют собой комплекс разных типов клеток, отличающихся морфологически и функционально. Гемоциты распознают чужеродные объекты, способны к фагоцитозу, инкапсуляции, коагуляции, обладают цитотоксическими свойствами. Эти защитные реакции проявлялись против болезнетворных организмов, паразитов и других инородных тел, попадающих в гемоцель [1, 2].

Особенности разных типов гемоцитов могут несколько отличаться между видами. В результате гемоциты насекомых остаются не до конца охарактеризованными из-за нехватки проведенных исследований по различным видам. В ряде случаев возникают экономические и этические проблемы с использованием позвоночных животных в биомедицинских экспериментах, поэтому насекомые были предложены в качестве альтернативной биомодели для токсикологических преclinical исследований.

Насекомые широко используются и в других областях биомедицины, в том числе в нейробиологии [3]. Гематология – неотъемлемая часть преclinical исследований животных, и поэтому, требуется получить наиболее полные знания о гемоцитах насекомых, прежде, чем последние достигнут того же уровня в качестве биомодели, как некоторые позвоночные животные с точки зрения сравнительной клинической патологии. Кроме того, физиологические показатели могут использоваться в целях биоиндикации. Общее физиологическое состояние организма может быть охарактеризовано общим количеством гемоцитов в единице объема и соотношением их типов.

У насекомых выделяют от 3 до 7 типов форменных элементов гемолимфы. Так у представителей отряда Lepidoptera различают от 5 до 6 типов [4, 5, 6, 7], у Hemiptera 3-8 типов [8, 9], в гемолимфе *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera) выделено 6 типов гемоцитов [10].

Ratcliffe и Price, исследуя гемолимфу 28 видов насекомых, идентифицировали 6 типов клеток: прогемоциты, плазматоциты, оеаноциты, сферулоциты, тромбоциты, гранулоциты, в зависимости от размера, формы, способности к фагоцитозу и наличия гранул в цитоплазме [11]. В свою очередь М. Брехелин и Д. Захари [12] различают 9 типов гемоцитов: прогемоциты, плазматоциты, оеаноциты, сферулоциты, тромбоциты, гранулоциты *GH1*, *GH2*, *GH3*, *GH4*. Гранулоциты были названы иммуноцитами за их участие в фагоцитозе и инкапсуляции.

Цель данного исследования – охарактеризовать морфологию гемоцитов некоторых представителей отряда Coleoptera, выделить их типы, исследовать упругость цитоплазматической мембраны и адгезию зонда к мембране клетки.

Объекты и методы исследования

В исследованиях использованы представители видов Щелкун черный (*Athous niger*), Коровка семиточечная (*Coccinella septempunctata*), Трещалка лилейная (*Lilioceris lili*), Жук-олень (*Lucanus cervus*), Хрущ майский восточный (*Melolontha hippocastani*), Жук-носорог (*Oryctes nasicornis*).

Исследования проведены с применением световой и сканирующей зондовой микроскопии. Гемолимфу насекомых набирали прикосновением предметного стекла к поперечному разрезу ноги и оставляли до полного высыхания препарата. Для изучения морфологических

особенностей гемоцитов использовали модифицированную окраску по Романовскому. Клетки фиксировали этиловым спиртом в течение 3-4 минут, затем препарат отмывали фосфатным буфером (pH 7.2). Окраску проводили азур-эозином по Романовскому 10 минут, после чего так же отмывали буфером. Препараты фотографировали и проводили линейные измерения с помощью анализатора изображений «Видео-Тест» (ООО «Микроскоп-Сервис», г. Санкт-Петербург).

Данные по свойствам упругости и адгезии были получены с использованием сканирующего зондового микроскопа Интегра Вита NT-MDT в режиме атомно-силовой спектроскопии при наложении нагрузки в 10 локальных участках клеточной поверхности. Полученные «силовые кривые» обрабатывали с помощью программного обеспечения «Efs» (NT-MDT, Зеленоград). Так же на полученных сканах измеряли линейные размеры клеток, результаты обрабатывали при помощи программного обеспечения «Nova 1.0.26 Build 1397» (НТ МДТ).

Полученные данные обрабатывали с использованием методов вариационной статистики.

Результаты и их обсуждение

У каждого из исследованных видов насекомых было выделено по 3 типа клеток.

Тип 1 – наиболее часто встречающиеся клетки, округлой или овальной формы (рис. 1). Цитоплазма содержит большое количество гранул. Образуют псевдоподии типа филоподий. Ядро крупное, расположено в центре. Средняя длина клеток составила 11.04 ± 2.65 мкм, ширина 9.15 ± 2.4 мкм, 1.28 ± 0.43 мкм.

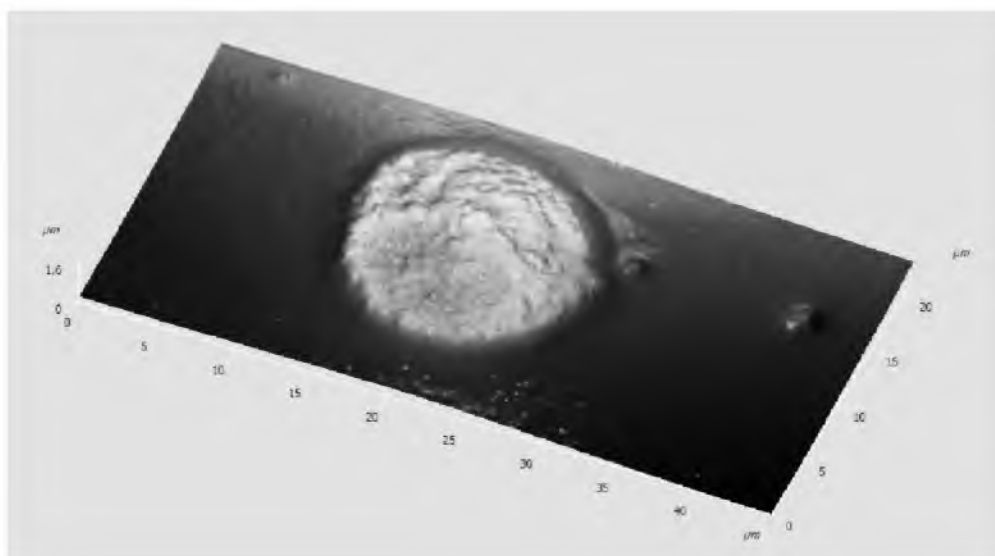


Рис. 1. Гемоцит типа 1

Тип 2 – этот тип клеток характеризуется наименьшими размерами. Форма круглая, псевдоподий не образуют (рис. 2). Ядро крупное, чаще всего занимает всю клетку. Средняя длина клеток составила 5.51 ± 0.73 мкм, ширина 4.82 ± 0.97 мкм, высота 0.98 ± 0.3 мкм.

Тип 3 – клетки веретеновидной или овальной формы. Ядро в виде эллипса, размещено в центре. Могут образовывать псевдоподии. Средняя длина клеток составила 10.97 ± 3.34 мкм, ширина 4.82 ± 2.00 мкм, высота 1.3 ± 0.34 мкм (рис 3).

Для определения особенностей деформационных характеристик гемоцитов было проведено изучение упругих свойств мембраны с помощью атомно-силовой микроскопии (табл. 1). Упругость мембраны определяется особенностями липидного состава и организацией белковых структур.

Обращают на себя внимание сравнительно высокие значения ошибки средней. Это связано с тем, что разные участки клеток имеют разные показатели упругости из-за особенностей плазматической мембраны и локализации внутриклеточных органоидов.

Адгезия – прилипание друг к другу находящихся в контакте поверхностей, за счет электростатических сил, природа которых разная для разных материалов. Причина адгезии – электростатические силы на границе раздела двух тел, возникающие благодаря образующемуся в контакте двойному заряженному слою. В ходе исследования были определены показатели силы адгезии клеточной мембраны различных типов гемоцитов к нанозонду (табл. 2).

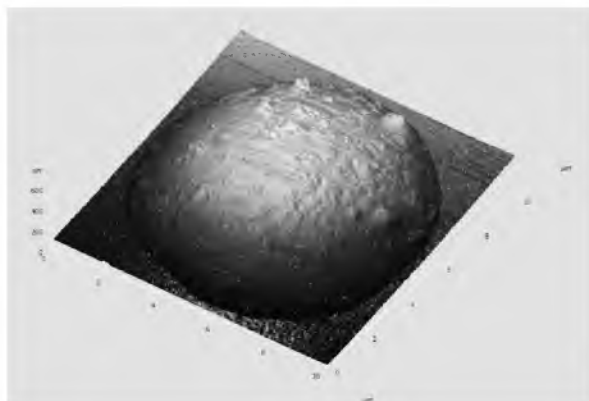


Рис. 2. Гемоцит типа 2

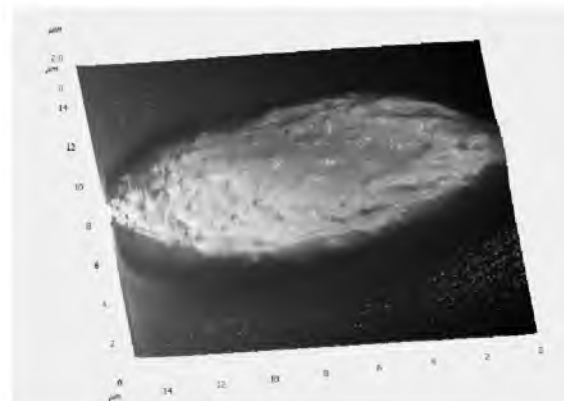


Рис. 3. Гемоцит типа 3

Таблица 1

Упругость гемоцитов у представителей отряда Coleoptera (кПа)

Типы клеток	<i>Athous niger</i>	<i>Coccinella septempunctata</i>	<i>Lilioceris lili</i>	<i>Lucanus cervus</i>	<i>Melolontha hippocastani</i>	<i>Oryctes nasicornis</i>
Тип 1	16.0±4.1	27.6±8.9	17.5±3.1	27.1±7.3	22.1±9.2	14.8±4.4
Тип 2	20±2.2	24.2±3.4	20.5±3.3	22.2±9.7	23.1±4.8	21.2±3.2
Тип 3	11.4±1.8	25±5.6	10.3±1.6	24.2±4.9	24.2±8.3	16.1±4.9

Таблица 2

Сила адгезии гемоцитов у представителей отряда Coleoptera (нН)

Типы клеток	<i>Athous niger</i>	<i>Coccinella septempunctata</i>	<i>Lilioceris lili</i>	<i>Lucanus cervus</i>	<i>Melolontha hippocastani</i>	<i>Oryctes nasicornis</i>
Тип 1	14.2±3.4	49.7±9.7	67.2±21.9	60.2±27.2	124.9±41.5	30.06±4.8
Тип 2	15.6±2.8	48.8±9.3	40.2±9.1	42.2±13.4	146.3±76.3	35.8±4.3
Тип 3	16.2±3.1	45.0±8.0	36.1±5.3	48.5±8.8	100.8±49.1	36.6±8.4

Заключение

В результате проведенных исследований осуществлена типология и дана морфофункциональная характеристика гемоцитов трех клеточных типов для представителей шести видов, принадлежащих к отряду Coleoptera.

Показатели упругости и адгезии клеточной мембраны к нанозонду характеризуют иммунные клетки насекомых как потенциально функционально активные.

Список литературы

1. Brookman J.L., Ratcliffe N.A., Rowley A. F. Optimization of a monolayer phagocytosis and its applications for studying the role of prophenoloxidase system in the wax moth, *Galleria mellonella* // Journ. of Insect Physiology. – 1989. – Vol. 34. – P. 337-346.
2. Ratcliffe N.A., Rowley A.F. and Fitzgerald, S. W., Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances // International Review of Cytology. – 1985. – Vol. 97. – P. 183-349.
3. Rubinsztein D. C. Lessons from animal models of Huntington's disease // Trends Genet. – 2002 – Vol. 18 – P. 202-209.
4. Ayvali C., Cul N. Surface ultrastructure of the larval haemocytes of turnip moth *Agrotis segetum* Denis and Shiff. Lepidoptera: Noctuidae // Commun. Fac. Sci. Univ. Ank. Serie C. – 1988. – Vol. 6. – P. 199-204.
5. Bartninkaite I. Dynamics of the hemolymph structure of the nettle moth in various biotopes and its influence on the trophic relations of the insect // Acta Zoologica Lituanica. Entomologia. – 1998. – Vol. 8. – № 3.
6. Bartninkaite I., Ivinskis P., Rimšaitė J. Scarce Large Blue (*Maculinea teleius*) hemolymph studies in different populations of Lithuania // Ekologia. – 2006. – № 4. – P. 34-39.
7. Falleiros A.M. F., Gregorio E.A., Hemocitos fagocitarios em larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera, Pyralidae) // Revista Brasileira de Zoologia. – 1995. – Vol. 12. – P. 751-758.
8. Berger J., Slavickova K. Morphological Characterization of Hemocytes in the Adult Linden Bug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera) // Zool. Stud. – 2008. – Vol. 47. – P. 466-472.
9. Hypsa V., Grubhoffer L. Two hemocyte populations in *Triatoma infestans*: ultrastructural and lectin-binding characterization // Folia parazitologica. – 1997. – Vol. 44. – P. 62-70.
10. Ebrahimi L., Niknam G. Hemocyte responses of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*



neata, and the greater wax moth, *Galleria mellonella*, to the entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora* // *Journal of Insect Science*. – 2011. – Vol. 11. – № 75. – P. 8-21.

11. Ratcliffe N.A., Rowley A.F., *Insect responses to parasites and other pathogens* // Florida: C. R. C. Press. – 1987. – P. 123-254.

12. Brehelin M., Zachary D. *Insect haemocytes: a new classification to rule out the controversy* // Heidelberg: Spring Verlag. – 1986. – P. 37-48.

FEATURES OF IMMUNE CELLS OF SOME REPRESENTATIVES OF COLEOPTERA

A.A. Prisny, E.A. Grebcova

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

E-mail: Prisny@bsu.edu.ru

The purpose of the given work is studying characteristics cells some representatives of group Coleoptera. The conducted researches have allowed to carry out for the first time typology, to give characteristics, and also to define elasticity and adhesion to nanozond membranes cells representatives of six kinds of Coleoptera.

Key words: haemocytes, elasticity, adhesion.