

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА ГЕМОЦИТОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ОТРЯДА DICTYOPTERA

Присный А.А.<sup>1</sup>, Гребцова Е.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Белгородский филиал ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко», Белгород, e-mail: andreypriusny@gmail.com;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, e-mail: shtirlitz009@mail.ru

Осуществлен сравнительный анализ морфофункционального статуса гемоцитов представителей отряда Dictyoptera. Изучены морфофункциональные характеристики гемоцитов некоторых представителей отряда Dictyoptera: *Periplaneta americana*, *Shelfordella tartara*, *Gromphadorhina portentosa*, *Blaberus craniifer*, *Nauphoeta cinerea*. В результате решения поставленных задач исследования впервые предложена рациональная классификация гемоцитов *P. americana*, *S. tartara*, *G. portentosa*, *B. craniifer*, *N. cinerea* на основе морфологических и функциональных характеристик и представлена в виде гемоцитарной формулы. Впервые получены показатели упругости клеточной мембраны гемоцитов. Определена фагоцитарная активность для каждого типа форменных элементов крови и рассчитан фагоцитарный индекс. В гемоцитарной формуле всех видов преобладали фагоциты. Гемоцитами типа 1 меньше всего используется мембранный резерв (до 16%). Типы 2, 3 и 5 активно участвуют в процессах фагоцитоза, и для них характерно максимальное использование мембранного резерва. Способность к поглощению инородных частиц была выявлена для второго, третьего и шестого типов форменных элементов гемолимфы. У всех изученных представителей основную массу клеток, участвующих в поглощении инородных объектов, составили гемоциты типа 3.

Ключевые слова: гемоциты, фагоцитоз, мембранный резерв, сила адгезии, упругость

## A COMPARATIVE ANALYSIS OF HAEMOCYTES MORPHOFUNCTIONAL STATUS OF DICTYOPTERA REPRESENTATIVES

Prisny A.A.<sup>1</sup>, Grebtsova E.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>All-Russian research institute for experimental veterinary medicine named Ya.R. Kovalenko, Belgorod, e-mail: andreypriusny@gmail.com;

<sup>2</sup>Belgorod State National Research University, Belgorod, e-mail: shtirlitz009@mail.ru

A comparative morphofunctional analysis of haemocytes of the status of members of the Dictyoptera. Studied morphological and functional characteristics of haemocytes of some members of the Dictyoptera: *Periplaneta americana*, *Shelfordella tartara*, *Gromphadorhina portentosa*, *Blaberus craniifer*, *Nauphoeta cinerea*. As a result of the decision of tasks of the study first proposed a rational classification of haemocytes of *P. americana*, *S. tartara*, *G. portentosa*, *B. craniifer*, *N. cinerea* based on morphological and functional characteristics, and are presented in the form haemocytes part. For the first time derived indicators of elasticity of the cell membrane of haemocytes. The phagocytic activity are defined for each type of blood cells and calculated the phagocytic index. In haemocytes part of all kinds prevailed phagocytes. The haemocytes of the type 1 membrane is used the least reserve (up to 16%). Types 2, 3 and 5 are actively involved in the processes of phagocytosis and are characterized by the maximum use of the membrane reserve. The ability to absorb was determined for second, third and sixth types of formed elements of hemolymph. In all studied representatives of the majority of cells involved in the absorption of objects, was the haemocytes of type 3.

Keywords: the haemocytes, phagocytosis, membrane reserve, the strength of adhesion, elasticity

Гемолимфа беспозвоночных животных обладает всеми необходимыми функциями, несмотря на простоту организации, и отражает физиологическое состояние животного, а также эволюционную ступень развития. Известно, что разнообразные виды воздействий влияют на насекомых на физиологическом уровне и обуславливают их жизнеспособность. В настоящее время не существует конкретных критериев оценки физиологического состояния насекомых. Возможно изучение влияния стрессоров и их идентификация по

морфологическим особенностям, которые иногда являются противоречивыми и обманчивыми. Зачастую невозможно определить, какой именно фактор оказал то или иное воздействие. Чтобы развиваться в этом направлении, у исследователей должна быть точная информация о физиологически и биохимически активных и чувствительных компонентах организма насекомых [10]. Антропогенные загрязнения воздействуют на живые организмы в самых различных сочетаниях, комплексно. Их интегральное влияние можно оценить по реакции живых организмов или целых сообществ. Возможно использование параметров иммунитета беспозвоночных как критерия состояния их популяций и экосистем в целом, в норме и при техногенном воздействии. Одним из подходов к оценке состояния окружающей среды может стать оценка динамики клеточного состава гемолимфы беспозвоночных, в частности насекомых [9]. Гемоциты выполняют ряд функций, такие как коагуляция, фагоцитоз и инкапсуляция; синтез и транспорт питательных веществ и гормонов для заживления ран посредством формирования соединительной ткани. Воздействия разнообразных стрессоров на клетки изучены недостаточно [7]. Доступна весьма скудная информация о типах гемоцитов насекомых, включая многочисленные виды экономической важности. Названия типов гемоцитов иногда отличаются между таксонами таким образом, что системы классификации и используемые критерии для идентификации гемоцитов в одной группе насекомых могут полностью не соответствовать другой [8].

В связи с вышесказанным, **целью** данной работы является изучение морфофункциональных характеристик гемоцитов некоторых представителей отряда Dictyoptera.

#### **Материал и методы исследования**

В экспериментах использованы представители класса Insecta, отряда Dictyoptera: *Periplaneta americana*, *Shelfordella tartara*, *Gromphadorhina portentosa*, *Blaberus craniifer*, *Nauphoeta cinerea*. Гемолимфу получали по стандартной методике [1]. Каплю помещали на предметное стекло или в чашку Петри для дальнейшего изучения морфологических особенностей и функциональной активности гемоцитов. Были проведены исследования с применением световой и зондовой микроскопии (Nikon Eclipse Ti-E, «Интегра Вита NT-MDT»).

Первым этапом исследования была подготовка фиксированных образцов для световой микроскопии. Предварительно высушенный на воздухе мазок гемолимфы фиксировали этиловым спиртом в течение 5-6 минут. После чего препарат промывали фосфатным буфером (pH = 7,2) и окрашивали азур-эозином по Романовскому в течение 10 минут (для лучшей окраски краситель подогревали до 30° C), краситель также смывали фосфатным буфером. Препараты фотографировали, по снимкам проводили измерения клеток, ядер,

гранул и включений по длинной и короткой осям с помощью анализатора изображений «ВидеоТест» (ООО «Микроскоп Сервис», Санкт-Петербург). Определяли ядерно-цитоплазматическое соотношение (ЯЦО).

Вторым этапом стало изучение прижизненных особенностей клеток с использованием инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E. Каплю гемолимфы помещали в чашку Петри с физиологическим раствором для тараканов. Фиксировали способность гемоцитов к движению и его характер. Для изучения фагоцитарной реакции проводили инкубацию форменных элементов гемолимфы с супернатантом дрожжевых клеток (*Saccharomyces cerevisiae*) при комнатной температуре в течение 20 минут. Рассчитывали следующие показатели: фагоцитарный показатель (ФП) – процент гемоцитов, участвовавших в фагоцитозе из числа сосчитанных фагоцитов; фагоцитарный индекс (ФИ) – среднее число объектов, поглощенное одним активным фагоцитом; индекс адгезии (ИА) – процент фагоцитов, имеющих на своей поверхности адгезированных микроорганизмов, по отношению к общему числу фагоцитов.

На третьем этапе определяли величину мембранного резерва и изучали влияние гипосмотической нагрузки на объем гемоцитов. Полученную гемолимфу делили на три части, каждую из которых помещали в отдельную чашку Петри. К каждой части гемолимфы добавляли 10 мкл раствора NaCl определенной концентрации (изотонический раствор – 0,97% NaCl, сильногипотонический – 0,24% NaCl) для определения интенсивности использования мембранного резерва. Инкубацию проводили в течение 1 минуты.

Четвертый этап исследований осуществляли на сканирующем зондовом микроскопе «Интегра Вита NT-MDT» в режиме полуконтактного сканирования. В работе применяли кремниевые зонды серии NSG03 (NT MDT), жесткостью 0,8 Н/м с радиусом закругления 10 нм, частотой развертки сканирования порядка 0,6-0,8 Hz. На полученных сканах определяли линейные размеры клеток. Обработку полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения Nova 1.0.26 Build 1397 (NT MDT). Данные по свойствам упругости и адгезии были получены в режиме атомно-силовой спектроскопии при наложении нагрузки в 16 локальных участках клеточной поверхности. Полученные «силовые кривые» обрабатывали с помощью программного обеспечения Ef3 (NT-MDT, Зеленоград). Анализ зависимости деформации образца от приложенной нагрузки позволил количественно оценить модуль упругости и сравнить этот показатель на разных участках клеточной поверхности.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

В результате проведенной работы выявлено и описано 6 типов форменных элементов

гемолимфы. В гемолимфе *G. portentosa* представлены все 6 типов, у *P. americana* и *N. cinerea* отсутствует 6 тип. Гемоциты типа 4 и 6 в гемолимфе *B. craniifer* и *S. tartara* не были обнаружены.

Гемоциты типа 1 характеризуются наименьшими размерами. Клетки имеют правильную округлую форму, псевдоподий не образуют. Ядро крупное, цитоплазма занимает пристеночное положение. Клетки медленно закрепляются на субстрате, практически не распластываются и не меняют свою форму.

Гемоциты типа 2 представлены полиморфными крупными клетками, цитоплазма которых заполнена гранулами и вакуолями. Данный тип форменных элементов демонстрирует тенденцию формировать агрегаты, число клеток в которых может достигать до 12-16. Подобное явление позволяет предположить участие этих гемоцитов в регенеративных и иммунных реакциях. Способность гемоцитов к распластыванию на субстрате и адгезии к другим клеткам подтверждает их основную роль в процессах инкапсуляции инородных объектов.

Гемоциты типа 3 – круглые или овальные клетки, цитоплазма заполнена мелкими гранулами. Ядро крупное, может занимать как центральное, так и периферическое положение. При инкубации с дрожжами образуют множество псевдоподий, активно передвигаются, распластываются на субстрате медленно.

Гемоциты типа 4 – крупные полиморфные клетки. Цитоплазма заполнена множеством везикул. Ядро овальной или бобовидной формы. Данный тип форменных элементов гемолимфы не способен к образованию псевдоподий.

Гемоциты 5 типа – веретеновидные или вытянутые клетки со светлыми включениями. Ядро небольшое, занимает центральную часть клетки.

Гемоциты 6 типа встречаются только у *G. portentosa*. Клетки выпускают множество длинных филоподий. Проявляют способность к фагоцитозу.

Для гемоцитов каждого представителя было рассчитано ядерно-цитоплазматическое отношение у всех типов клеток (таблица 1).

Максимальное ЯЦО отмечено для гемоцитов типа 1, у которых цитоплазма имеет пристеночное положение и образует светлый узкий ободок вокруг ядра. Минимальное ЯЦО соответствует наиболее крупным гемоцитам типа 4, имеющим относительно небольшое ядро.

Таблица 1

Ядерно-цитоплазматическое отношение гемоцитов представителей отряда Dictyoptera

Тип клеток	<i>G. portentosa</i>	<i>S. tartara</i>	<i>N. cinerea</i>	<i>P. americana</i>	<i>B. craniifer</i>
1	0,52	0,53	0,46	0,8	0,63

2	0,15	0,16	0,2	0,2	0,15
3	0,4	0,24	0,33	0,33	0,22
4	0,15	-	0,1	0,13	-
5	0,12	0,11	0,2	0,34	0,15
6	0,15	-	-	-	-

Определено процентное соотношение различных типов форменных элементов гемолимфы для каждого исследуемого вида и представлено в виде гемоцитарной формулы (таблица 2).

Таблица 2

Процентное соотношение гемоцитов в гемолимфе исследуемых видов

Тип клеток	<i>G. portentosa</i> , %	<i>S. tartara</i> , %	<i>N. cinerea</i> , %	<i>P. Americana</i> , %	<i>B. craniifer</i> , %
1	14	18	13	20	28
2	9	40	31	15	17
3	49	25	15	45	38
4	10	-	26	11	-
5	5	17	15	9	17
6	13	-	-	-	-

В гемолимфе всех видов преобладают фагоциты. У *G. portentosa*, *P. americana*, *B. craniifer* – гемоциты типа 3, у *S. tartara* и *N. cinerea* – форменные элементы второго типа.

Мембранный резерв, определяемый степенью складчатости плазмалеммы, является одной из важнейших морфофункциональных особенностей клеток крови. Он используется фагоцитами при образовании псевдоподий при амебоидном движении и захвате инородных объектов в ходе защитных реакций. В поддержании функциональной активности форменных элементов крови большое значение имеет система саморегуляции объёма клеток и упругие свойства гемоцитов [5]. В норме большинство клеток многоклеточных организмов находятся в изотонических условиях. Изменения концентрации внутри- или внеклеточного растворов приводят к возникновению трансмембранного градиента осмотического давления. На изменения объёма клетки отвечают активацией мембранного транспорта и/или изменением метаболизма, результатом чего является потеря или поглощение воды и, как следствие, восстановление нормальной величины объёма. Объём может регулироваться поступлением в клетку или выходом из неё осмотически активных веществ: электролитов, а также органических осмолитов [6]. В большинстве животных клеток регулируемое уменьшение объёма связано с потерей KCl через активированные калиевые и хлорные каналы или с активацией K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>-котранспорта. Регулируемое увеличение объёма осуществляется путём поглощения KCl и NaCl. Накопление этих солей происходит через Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>- и Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-насосы или благодаря Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup>-котранспорту. Активация этих систем происходит в течение нескольких секунд или минут в связи с тем, что плазмалемма богата транспортными

белками или они быстро в неё встраиваются в составе цитоплазматических везикул [2]. Ключевую роль в объёмном гомеостазе клетки играют органические осмолиты. Они обнаружены в гиалоплазме клеток всех организмов: от бактерий до млекопитающих. Благодаря физическим и химическим свойствам они могут накапливаться клеткой в большом количестве без нарушения структуры и функции, в то время как большие изменения концентрации электролитов могут вызывать нарушения метаболизма (например, денатурацию макромолекул, изменение мембранного потенциала) [3].

Рассчитывали абсолютную величину мембранного резерва как разность между площадью поверхности клетки в сильно гипотоническом растворе и площадью поверхности клетки в изотонической среде.

Гемоцитами типа 1 меньше всего используется мембранный резерв (до 16%). Типы 2, 3 и 5 активно участвуют в процессах фагоцитоза. Мембранный резерв необходим для образования фагосом, формирования псевдоподий при миграции. Крупным клеткам часто соответствует большее значение абсолютного мембранного резерва, как в случае с гемоцитами 2 типа у *N. cinerea* и *S. tartara*, однако по доле используемого мембранного резерва эти клетки уступают в связи с большой площадью поверхности относительно  $\Delta S$ .

При инкубации с супернатантом дрожжевых клеток гемоциты типа 1 не проявляют ни двигательной, ни фагоцитарной активности. Способность к поглощению инородных частиц была выявлена у второго, третьего и шестого типов гемоцитов. Гемоциты проявляют активность, выпускают псевдоподии по направлению к инородным объектам. Движение гемоцитов типа 3 осуществляется с помощью ризоподий. Закрепления на субстрате не происходит, клетки свободно плавают в среде. Характерно образование агрегатов, окружающих дрожжевые клетки с их последующим поглощением. Процесс фагоцитоза протекает медленно. Один гемоцит фагоцитирует до четырех инородных объектов, большее число дрожжевых клеток адгезируется на поверхности. Максимальные значения показателей активности фагоцитарного процесса демонстрируют форменные элементы гемолимфы *G. portentosa*. У всех изученных представителей основную массу клеток, участвующих в поглощении инородных объектов, составили гемоциты типа 3.

В настоящее время установлено, что механическая прочность живой клетки, наряду с липидным бислоем, обеспечивается системой белковых микротрубочек и сетью мембранных белков. Большое влияние на деформируемость мембраны клетки оказывает химический состав среды, в которой находится клетка. Уровень деформируемости клеток главным образом определяется модулем упругости клеточных мембран. Механические свойства мягких клеток определяются в первую очередь элементами цитоскелета и физическим взаимодействием с окружающей средой. Они могут существенно меняться в

процессе клеточного деления или гибели клеток, движения везикул, поглощения внеклеточных материалов, передачи сигналов и других типов взаимодействия, в результате движения. Даже клетки, принадлежащие одной и той же ткани, могут существенно менять упругие свойства в зависимости от возраста [4].

У всех гемоцитов жесткость мембраны значительно различается в разных точках, относящихся к одной клетке. Наименьший разброс значений характерен для гемоцитов типа 1. У гемоцитов типа 3 значения модуля Юнга варьируют от 17,3 до 38,4 кПа. Подобные различия в показателях в пределах одной клетки характерны и для форменных элементов второго и четвертого типов. У исследованных видов показатели упругости плазмалеммы у гемоцитов 1 типа выше, чем у остальных клеток. Это может быть связано с наличием у данного типа крупного ядра, занимающего практически всю клетку, что придает ей большую жесткость.

Сила адгезии в точке подвода кантилевера также значительно отличается в пределах одной клетки. Максимальные величины демонстрируют гемоциты второго и пятого типов.

### **Выводы**

Осуществлена классификация форменных элементов гемолимфы *P. americana*, *S. tartara*, *G. portentosa*, *B. craniifer*, *N. cinerea* и представлена их морфофункциональная характеристика, на основании чего выделено 5 типов в гемолимфе *N. cinerea* и *P. americana*, 6 типов – у *G. portentosa*, и 4 типа гемоцитов обнаружено у *S. tartara* и *B. craniifer*.

В гемоцитарной формуле всех видов преобладали фагоциты. Гемоциты типа 3 преобладали у *G. portentosa* (49%), *P. americana* (45%), *B. craniifer* (38%), форменные элементы второго типа – у *S. tartara* (40%) и *N. cinerea* (31%).

Гемоцитами типа 1 меньше всего используется мембранный резерв (до 16%). Типы 2, 3 и 5 активно участвуют в процессах фагоцитоза, и для них характерно максимальное использование мембранного резерва.

Способность к поглощению инородных частиц была выявлена для второго, третьего и шестого типов форменных элементов гемолимфы. У всех изученных представителей основную массу клеток, участвующих в поглощении инородных объектов, составили гемоциты типа 3. Гемоциты типа 2 адгезируют на своей поверхности максимальное число дрожжевых клеток.

Максимальные значения показателей активности фагоцитарного процесса демонстрируют форменные элементы гемолимфы *G. portentosa*: ФА=0,48; ФИ=2,84; ИА=0,88.

У исследованных видов показатели упругости плазмалеммы у гемоцитов 1 типа выше, чем у остальных клеток ( $\approx 26,6$  кПа). Максимальные значения модуля Юнга для мембран гемоцитов типа 2, 3 и 4 составили  $\approx 24,3$  кПа в области гранул и ядра.

Максимальные величины силы адгезии демонстрировали гемоциты второго ( $\approx 111,8$  нН) и пятого типов ( $\approx 97,54$ ). Наименьшие показатели выявлены у гемоцитов типа 1 ( $\approx 82$  нН).

### Список литературы

1. Злотин А.З. Техническая энтомология. – Киев : Наукова Думка, 1989. – 184 с.
2. Орлов С.Н., Гурло Т.Г. Механизмы активации ионного транспорта при изменении объема клеток // Цитология. – 1991. – Т. 33, Вып. 11. – 101-110 с.
3. Орлов С.Н., Новиков К.Н. Регуляция объема клеток: механизмы, сопряженные клеточные реакции и патофизиологическое значение // Физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 1996. – Т. 82, Вып. 8-9. – С. 1-15.
4. Плескова С.Н. Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях. – Долгопрудный : Издательский Дом «Интеллект», 2011. – 184 с.
5. Bagge U., Amundson B., Lauritzen C. White blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock // Acta Physiol. Scand. – 1980. – Vol. 108 (2). – P. 159-163.
6. McManus M.L., Kevin B. Regulation of Cell Volume in Health and Disease // The New England Journal of Medicine. – 1995. – Vol. 19. – P. 123-134.
7. Pandey J.P. Studies on stress induced haematological changes in *Dysdercus cingulatus* Fabr. (Heteroptera: Pyrrhocoridae) and *Danais chrysippus* (Lepidoptera: Nymphalidae) // Ph.D. Thesis, 2004. – P. 12-16.
8. Pandey J.P., Tiwari R.K., Kumar D. Reduction in hemocyte mediated immune response in *Danais chrysippus* following treatment with neem based insecticides. // J. Entomol. – 2008. – Vol. 5. – P. 200-206.
9. Pandey J.P., Tiwari R.K., Kumar D. Temperature and ganglionectomy stresses affect haemocyte counts in plain tiger butterfly, *Danais chrysippus* L. (Lepidoptera: Nymphalidae) // J. Entomol. – 2008. – Vol. 5. – P. 113-121.
10. Tiwari R.K., Pandey J.P., Kumar D. Effects of neem based insecticides on metamorphosis, haemocytes count and reproductive behavior in red cotton bug, *Dysdercus koenigii* Fabr. (Heteroptera: Pyrrhocoridae) // Entomology. – 2006. – Vol. 31. – P. 267-275.