



УДК 591.111.7:595.142.39

ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЕМОЦИТОВ *HIRUDO MEDICINALIS* И *HEMOPIS SANGUISUGA* В ОТВЕТ НА ОСМОТИЧЕСКУЮ НАГРУЗКУ

А.А. Присный, Т.А. Пигалева

Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет, Россия, 308015,
г. Белгород, ул. Победы, 85

E-mail: prisny@bsu.edu.ru

Описано изменение морфометрических показателей гемоцитов пиявок в ответ на осмотическую нагрузку. Применение методов световой микроскопии позволило оценить линейные параметры и поведение клеток циркулирующей жидкости в растворах с различной осмолярностью. Получены данные об ответной реакции больших амебоцитов, средних амебоцитов и неамебоцитов пиявок на инкубацию в гипер- и гипотонической среде.

Ключевые слова: гемоциты, осмотическое давление, псевдоподии.

Введение

Поддержание постоянства внутренней среды является важной функцией живой системы на разных уровнях организации. Особое значение этот процесс имеет для нормальной жизнедеятельности водных животных. Сохранение стабильности происходит за счет сбалансированной работы нескольких систем организма – это изменение проницаемости покровов, выделение излишних солей, потребление воды животным при недостатке жидкости. Некоторые из этих явлений описаны для аннелид. Так, Т.Н. Dietz и R.H. Alvarado в 1970 г описали способность дождевого червя поддерживать постоянство внутренней среды после помещения в сбалансированный водный раствор или дистиллированную воду. При этом важную роль играли процессы избирательной проницаемости покровов животного. Но все же эти механизмы не являлись идеальными, и через определенное время черви увеличивались в объеме и массе, после чего начиналось активное выделение жидкости и солей [1]. Во время разбавления или концентрирования целомической жидкости в форменных элементах происходят определенные структурные изменения. М. R. Kasschau et al. описали увеличение количества ложноножек у клеток дождевого червя, помещенных в гипертоническую среду. Изменение концентрации раствора способствовало перестройке цитоскелета и влияло на способность клеток к адгезии [2].

Авторами ранее проведены исследования и опубликованы данные о морфометрических показателях и типологии гемоцитов различных представителей аннелид [3, 4]. Однако детального исследования влияния изменения тоничности среды на морфофункциональные свойства клеток циркулирующей жидкости медицинской и большой ложноконской пиявок ранее не проводилось.

Целью данной работы является изучение динамики морфометрических показателей гемоцитов пиявки медицинской (*Hirudo medicinalis*) и пиявки большой ложноконской (*Hemopis sanguisuga*) в ответ на осмотическую нагрузку.

Объекты и методы исследования

Исследования проведены в течение 2011-2013 годов на базе кафедры анатомии и физиологии живых организмов ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет».

В экспериментах использованы представители видов *Haemopis sanguisuga* и *Hirudo medicinalis* (отряд *Hirudinomorpha*). Видовую принадлежность животных определяли с использованием различных источников [5, 6].

Для обездвиживания исследуемых животных использовали кратковременное погружение в 10% этиловый спирт [7].

Для проведения эксперимента использовали циркулирующую жидкость 12 представителей каждого вида. Гемоциты получали путем отбора жидкости микропипеткой из брюшной лакуны пиявок. Из системы распределения каждой особи отобрано и обработано не менее 100 клеток.

Полученные форменные элементы использовали для изучения морфологии и функциональной активности. Для этого были проведены исследования нефиксированных клеток с приме-



нением световой микроскопии (Nikon Eclipse Ti-E). Все измерения были выполнены с использованием анализатора изображений «ВидеоТест» (ООО «Микроскоп Сервис», г. Санкт-Петербург).

Осморегуляторные реакции форменных элементов исследовали с помощью проб с гипотоническими и гипертоническими нагрузками. Осмолярность растворов хлорида натрия, использовавшихся в эксперименте, составляла 273,7 мосмоль/л для физиологического раствора хлорида натрия (0,8% NaCl), 136,8 мосмоль/л для гипотонического раствора хлорида натрия (0,40% NaCl) и 374,5 мосмоль/л для гипертонического раствора хлорида натрия (1,2% NaCl) [7, 8]. Инкубацию гемоцитов в растворах разной осмолярности осуществляли в течение 30 минут при температуре 24°C.

Полученные данные обработаны при помощи методов вариационной статистики.

Результаты и их обсуждение

Анализ клеточного состава гемоцитов медицинской пиявки позволил разделить все гемоциты *H. medicinalis* на 3 типа (таблица 1).

Таблица 1

Морфометрические показатели гемоцитов *H. medicinalis*, инкубированных в растворах различной осмолярности

Тип клеток	Линейные размеры клетки по длинной оси (µm)	Линейные размеры клетки по короткой оси (µm)	Линейные размеры ядра по длинной оси (µm)	Линейные размеры ядра по короткой оси (µm)
Изотоническая среда				
БА	10.93±3.13	6.5±3.27	3.11±0.57	2.55±0.61
СА	4.30±1.22	4.6±0.99	2.66±0.73	1.81±0.37
НА	6.13±1.72	7.1±1.42	3.17±0.42	2.84±0.29
Гипотоническая среда				
БА	12.39±1.32	12.91±1.31*	4.61±0.65*	2.42±0.48
СА	7.84±1.41*	7.21±0.97*	4.25±0.32*	1.94±0.26
НА	8.11±0.47*	8.95±0.72	5.97±0.38*	2.01±0.67
Гипертоническая среда				
БА	7.52±2.01	6.31±2.17	4.51±0.72*	2.13±0.54
СА	3.82±2.55	2.59±0.18*	3.12±0.41	1.75±0.38
НА	6.17±0.31	4.25±0.11*	4.71±0.34*	2.11±0.76

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; НА – Не Амебоциты; * – достоверность различий между значениями линейных параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Большие Амебоциты (БА) – крупные клетки, которые при прижизненном наблюдении демонстрировали быстрое изменение формы и направленное перемещение к чужеродному объекту. Цитоплазма содержит вакуоли, а так же большое количество светлых и темных гранул, которые, возможно, являются фагоцитированным материалом. Гемоциты перемещаются посредством образования широких лобоподий и совершенно не способны к образованию филоподий. Ядро имеет небольшие размеры и занимает положение, близкое к центральному. По мере перемещения клетки, положение ядра меняется. БА появляются в системе циркуляции в ответ на повреждение целостности покровов. Эти клетки отсутствуют в гемолимфе пиявки, у которой пробу отбирают впервые, и, видимо, являются тканевыми макрофагами, которые входят в лакуны для остановки кровопотери и защиты организма.

В условиях гипотонии БА снижают двигательную активность, клетки адгезируют к подложке и другим гемоцитам. Этот тип клеток уплощается в дорзо-вентральном направлении и растекается по субстрату. Мембрана образует на поверхности многочисленные складки, цитоплазма вакуолизируется.

В условиях повышенного осмотического давления линейные размеры клеток уменьшаются. Двигательная активность БА снижается, мембрана образует большое количество складок и выпячиваний на дорзальной поверхности.

Средние Амебоциты (СА) – это наиболее многочисленный тип клеток в гемолимфе *H. medicinalis*, клетки округлой формы с однородной цитоплазмой и равномерно окрашенным ядром, смещенным к периферии клетки. Данный тип гемоцитов не способен к активному линейному передвижению, но за счет длинных филоподий, нередко происходит поворот клеток и



небольшое спонтанное смещение. Цитоплазма вакуолизирована, присутствуют гранулы. Клетки способны выпускать длинные филоподии и фагоцитировать чужеродные объекты.

После инкубации клеток в условиях пониженного осмотического давления отметили увеличение размеров гемоцитов. Ложноножки формируются в меньшем количестве по сравнению с клетками в изотонии, они имеют вид тонких нитевидных образований. Мембрана разглаживается и не образует складок. Гемоциты приобретают тороидальную форму – с углублением в центральной части клетки и приподнятой периферией.

Повышение осмотического давления способствовало снижению двигательной активности, клетки практически полностью прекращают образовывать филоподии. Гемоциты приобретают угловатую форму, на поверхности появляются крупные впадины и возвышения.

Клетки, не способные к самостоятельному передвижению, не амебоциты (НА) – клетки круглые или овальные с четкими контурами, которые в зависимости от размера были поделены на два подтипа, большие – с крупным ядром и меньшие по размеру – с небольшим ядром. Это гемоциты с увеличенным ядерно-цитоплазматическим отношением, ядро обычно смещено к периферии клетки, цитоплазма может содержать гранулы и вакуоли. В условиях измененного осмотического давления явных морфологических изменений у данного типа гемоцитов не отметили. Размеры увеличиваются как при инкубации в гипотонических, так и в гипертонических условиях.

Клеточный состав циркулирующей жидкости большой ложноконской пиявки объединяет три типа клеток (таблица 2).

Большие амебоциты (БА) представляют собой крупные клетки, которые активно перемещаются в гемолимфе. БА содержат крупное ядро, которое смещено к периферии. Цитоплазма имеет зернистый вид и заполнена гранулами и вакуолями. Гемоциты способны к активному фагоцитозу. Клетки выпускают длинные ложноножки, которые при объединении нескольких клеток переплетаются между собой и образуют тяжи до 15 μm . БА массово появляются после повреждения целостности эндотелия лакун пиявки, что, видимо, является защитной реакцией.

В гипотонической среде этот тип гемоцитов увеличивается в размерах. Клетки образуют складки и немногочисленные филоподии по краю.

Повышение осмотического давления увеличивает подвижность клеток этого типа, гемоциты формируют длинные псевдоподии.

Таблица 2

Морфометрические показатели гемоцитов *H. sanguisuga*, инкубированных в растворах различной осмолярности

Тип клеток	Линейные размеры клеток по длинной оси (μm)	Линейные размеры клеток по короткой оси (μm)	Линейные размеры ядра по длинной оси (μm)	Линейные размеры ядра по короткой оси (μm)	Линейные размеры псевдоподий (μm)
Изотоническая среда					
БА	6.06±0.44	6.61± 0.42	1.44±0.07	1.07±0.27	4.02±1.23
СА	4.94±0.63	3.83±0.67	0.51±0.13	1.42 ±0.29	2.51±0.72
МА	2.75±0.32	2.43±0.27	0.79±0.16	0.42±0.18	3.35±0.96
Гипотоническая среда					
БА	8.61±0.67*	7.48±0.28*	0.81±0.14*	0.93±0.21	3.56±1.71
СА	7.95±0.31*	5.37±0.24*	0.75±0.05*	1.12±0.11*	2.54±0.32
МА	2.96±0.55	2.53±0.35	1.05±0.19	1.31±0.21*	3.48±1.64
Гипертоническая среда					
БА	7.71±0.41*	6.53±0.26	0.95±0.28*	0.63±0.49	3.88±0.97
СА	3.68±0.67	4.44±0.97	0.96±0.17*	0.91±0.23	2.14±0.54
МА	2.78±0.31	2.34±0.22	0.94±0.31	0.53±0.15	1.61±0.47*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; * – достоверность различий между значениями линейных параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Средние амебоциты (СА) немногочисленны, клетки имеют округлую форму и правильный контур. Клетки среднего размера с небольшим ядром. Цитоплазма светлая, иногда присутствуют гранулы. Клетки способны образовывать длинные, короткие псевдоподии по типу филоподий, к активному передвижению не способны, но перемещаются пассивно с током жидкости и не расплываются. Амебоциты не фагоцитируют, и, видимо, выполняют запасующую функцию.

В условиях измененного осмотического давления СА увеличивались в размерах.



Малые амебоциты (МА) это наиболее многочисленный тип среди форменных элементов большой ложноконской пиявки, численность клеток составляют 98-99% всей клеточной популяции. Клетки имеют круглую форму, линейные размеры клеток значительно варьируют. МА способны образовывать длинные псевдоподии, которые по форме являются филоподиями и достигают длины до 6 μm . Клетки этого типа способны к активному перемещению, которое они осуществляют за счет движения ложноножек. Некоторые малые амебоциты содержат большое количество вакуолей и включений в цитоплазме, что говорит об их способности к фагоцитозу. В гипотонических условиях наблюдали образование складок мембраны, которые занимали как дорзальное, так и латеральное положение. Отдельные клетки распластывались на подложке с образованием циркулярной ламеллоплазмы. Данные морфологические изменения отражаются на микрорельефе клетки.

Повышение осмотического давления вызывает снижение двигательной активности клеток. Гемоциты приобретают угловатые очертания, цитоплазма вакуолизируется.

Заключение

Реакция гемоцитов на изменение осмотических условий несколько отличается у изученных представителей подкласса *Hirudinea*.

Все гемоциты *H. medicinalis* в условиях пониженного осмотического давления демонстрировали увеличение линейных размеров. Одновременно фиксировали снижение двигательной активности.

Гемоциты типа БА одновременно с увеличением размеров сохраняли способность образовывать филоподии. Реакция клеток *H. sanguisuga* на снижение осмотического давления оказалась идентичной. Поэтому можно отметить хорошую приспособленность гемоцитов *H. medicinalis* и *H. sanguisuga* к гипотоническим условиям. Этот факт объясняет эврибионтность медицинской и большой ложноконской пиявок. Представители этих видов легко переносят масштабные пересыхания водоемов.

Увеличение солёности среды вызывает уменьшение линейных параметров гемоцитов *H. medicinalis*, при этом, форменные элементы гемолимфы *H. sanguisuga* реагировали на гипертонические условия увеличением размеров.

Список литературы

1. Dietz T.N., Alvarado R.H. Osmotic and isotonic regulation in *Lumbricus terrestris*. – L. Biol. Bull. – 1970. – Vol. 138. – Pp. 247–261.
2. Kasschau M.R., Ngo D.T., Sperber L.M., Трап K.L. Formation of filopodia in earthworm (*Lumbricus terrestris*) coelomocyte in response to osmotic stress. – Zoology. – 2007. – Vol. 110 – Pp. 66–76.
3. Присный А.А. Фагоцитарная активность гемоцитов аннелид как один из путей достижения постоянства внутренней среды // В мире научных открытий. – 2012. – №2 (26). – С. 106–109.
4. Присный А.А., Пигалева Т.А. Типология и функциональные особенности клеточных элементов внутренней среды обыкновенного земляного червя (*Lumbricus terrestris* L.) // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Естественные науки. – 2012. – №3 (122). Вып. 18. – С. 151–154.
5. Лукин Е.И. Пиявки пресных и солоноватых водоемов. Фауна СССР. Пиявки. Т. 1. – Л.: Наука, 1976. – 484 с.
6. Присный А.В. Ключ для определения пиявок. Практические работы школьников по экологии: Ч.2. Методические материалы к практическим работам (модельные методики и ключи для распознавания организмов). – Белгород: Издательство БелГУ, 1999. – 3 с.
7. Коган А.Б., Щитов С.И. Практикум по сравнительной физиологии. – М.: Советская наука. – 1954. – 533 с.
8. Присный А.А. Практикум по физиологии беспозвоночных животных. – Белгород: ИД «Белгород» НИУ «БелГУ». – 2013. – 116 с.

THE MORPHOMETRICAL CHANGE HEMOCYTES OF THE *HIRUDO MEDICINALIS* AND *HEMOPIS SANGUISUGA* IN REPLY TO OSMOTIC LOADING

A.A. Prisky, T.A. Pigaleva

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

E-mail: Prisky@bsu.edu.ru

The change of bloodsuckers hemocytes indicators in reply to osmotic loading is described. Application of methods of light microscopy has allowed to estimate linear parameters and cells behaviour of a circulating liquid in solutions with various osmotic. The data about response big cells, averages cells and other cells of bloodsuckers in hyper- and the hypotonic environment is obtained.

Key words: hemocytes, osmotic pressure, pseudopodia.