

УДК 591.111.1:595.76

DOI: 10.18413/2409-0298-2016-2-4-3-7

Гребцова Е.А.

ОСОБЕННОСТИ ОСМОРЕГУЛЯТОРНЫХ РЕАКЦИЙ ГЕМОЦИТОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ОТРЯДА DICTYOPTERA

Аннотация

Исследовано влияние измененного осмотического давления на форму гемоцитов. Определена способность использования клетками мембранного резерва. Максимальные значения мембранного резерва отмечены у гемоцитов *N. cinerea*. Плазмоциты *N. cinerea*, *B. craniifer*, *B. orientalis*, а также гранулоциты *S. tartara* и *B. germanica* имеют наибольший мембранный резерв и претерпевают значительные изменения при воздействии осмотической нагрузки. В период расплывания плазмоциты приобретают ламеллярно-филоподиальную форму. У прикрепленных к подложке плазмоцитов в гипотонических условиях возникает ореол в виде кругового распластанного по субстрату ободка (ламеллы), который через несколько минут достигает максимального диаметра. Прогемоциты и энцитойды практически не изменяют свой объем и форму. Коагулоциты и сферулоциты *N. cinerea* менее устойчивы к осмотической нагрузке, часть клеток разрушается в гипотонической среде.

Ключевые слова: гемоциты; мембранный резерв; осморегуляция; расплывание.

Grebtsova E.A.

FEATURES OF THE OSMOREGULATORY REACTIONS OF THE DICTYOPTERA'S HEMOCYTES

Abstract

The author studied the effect of the modified osmotic pressure on a hemocytes's shape. Besides, the author studied the ability of cells to use a membrane reserve (MR). The maximum values of MR were noted in *N. cinerea* hemocytes. The plasmocytes of *N. cinerea*, *B. craniifer*, *B. orientalis*, and the granulocytes of *S. tartara* and *B. germanica* are characterized by the maximum MR and they underwent considerable changes under the action of the osmotic pressure. During their spreading, the plasmocytes acquire a mixed form with filopodia and lamellipodia. The plasmocytes attached to the substrate got spread with a wide ring of cytoplasm like lamella, which diameter became maximum after a few minutes. The prohemocytes and oenocytoides practically didn't change their size and shape. The coagulocytes and spherulocytes of *N. cinerea* were less stable to the osmotic pressure – some cells are destroyed in the hypotonic medium.

Key words: hemocytes; membrane reserve; osmoregulation; spreading

Складчатость мембраны является главной составляющей в реализации способности клеток использовать мембранный резерв. Он, в свою очередь, определяет устойчивость гемоцитов к гипоосмотическим нагрузкам, кроме того играет важную роль в осуществлении фагоцитами своих функций [4, с.152; 5 с.36]. Цель исследования – определить значения мембранного резерва каждого типа гемоцитов у изучаемых видов насекомых, выявить наиболее устойчивые к осмотическим нагрузкам клетки, а также изучить влияние различной осмолярности среды на изменение формы гемоцитов.

Материалы и методы исследования

Исследованы гемоциты семи представителей отряда Dictyoptera: *Periplaneta americana*, *Shelfordella tartara*, *Gromphadorhina portentosa*, *Blaberus craniifer*, *Nauphoeta cinerea*, *Blatta orientalis*, *Blatella germanica*.

Определяли величину мембранного резерва и изучали влияние гипоосмотической нагрузки на объем гемоцитов. Полученную гемолимфу делили на три части, каждую из которых помещали в отдельную чашку Петри. К каждой части гемолимфы добавляли 10 µl раствора NaCl определенной концентрации (изотонический раствор – 0,97% NaCl, сильно гипотонический – 0,24% NaCl) для определения мембранного резерва. Предварительно выявили 8 гемоцитарных типов, встречающихся в различных вариациях среди видов. Наблюдение за клетками проводили в течение 30 минут. Далее отмечали прижизненные особенности гемоцитов, их морфометрические показатели с помощью оптического инвертированного микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E. Получали фотографии в режиме реального времени, проводили линейные измерения, применяя анализатор изображений «Видео-Тест».

Гемоциты имеют относительно эллипсоидную форму, поэтому была измерена большая, средняя и

малая ось. В исследованиях форменных элементов гемолимфы тараканов, проведенных ранее [2, с.1635-1636] установлено, что высота гемоцитов, инкубированных в гипотонической среде остается неизменной относительно физиологически нормальных условий. Используя значения этих линейных размеров, рассчитывали площадь поверхности клеток и их объём.

Формулы для расчёта показателей [3, с.558]:

$$S = 4\pi[(a^p b^{p+1} + a^p c^{p+1} + b^p c^p)/3]^{\frac{1}{p}}$$

где S – площадь поверхности гемоцита (μm^2);

a – большая полуось, т.е. $\frac{1}{2}$ длины (μm);

b – малая полуось, т.е. $\frac{1}{2}$ высоты (μm);

c – средняя полуось т.е. $\frac{1}{2}$ ширины (μm);

p=1,6075 – коэффициент К. Томсена.

$$V=4/3(\pi abc)$$

V – объём (μm^3);

a – большая полуось, т.е. $\frac{1}{2}$ длины (μm);

b – малая полуось, т.е. $\frac{1}{2}$ высоты (μm);

c – средняя полуось т.е. $\frac{1}{2}$ ширины (μm).

Используя значения площади поверхности, оценивали резервные возможности плазмалеммы гемоцитов.

Рассчитывали абсолютную величину мембранного резерва (ΔS) как разность между площадью поверхности клетки в сильно гипотоническом растворе и площадью поверхности клетки в изотонической среде [1, с.4].

$$\Delta S=S(\text{ГГ})-S(\text{И})$$

где ΔS – резерв плазматической мембраны (μm^2);

S(ГГ) – площадь поверхности клетки, после инкубации в сильно гипотонической среде (μm^2);

S(И) – площадь поверхности клетки, после инкубации в изотонической среде (μm^2).

С целью сравнения использования мембранного резерва в гипотоническом растворе клетками насекомых разных видов определяли

относительный мембранный резерв (MR) с применением формулы [9, с.4]:

$$MR=(\Delta S/S(\text{И}))\cdot 100\%$$

где MR – доля используемого мембранного резерва (%);

ΔS – резерв плазматической мембраны (μm^2);

S(И) – площадь поверхности клетки, после инкубации в изотонической среде (μm^2).

Результаты исследования и их обсуждение

Наибольшие изменения объемных показателей претерпевают прогемоциты *N. cinerea*. В гипертонической среде объем клеток уменьшается на 12-15%, в то время как у прогемоцитов остальных видов этот показатель не превышает 7%. Подобную реакцию демонстрируют и клетки *B. orientalis* – в среде с повышенным осмотическим давлением объем прогемоцитов уменьшается на 11%, однако в гипотонических условиях их размер не изменяется. Мембранный резерв данного типа клеток у *N. cinerea* максимален и составляет в среднем 14% (таблица 1).

Рекордсменами в отношении использования мембранного резерва не только среди плазмоцитов, но и всех форменных элементов гемолимфы, являются плазмоциты *N. cinerea*. Величина MR составляет $\approx 50\%$. Минимальное использование мембранного резерва демонстрируют плазмоциты *B. germanica* и *S. tartara*, в гипертонической же среде эти клетки уменьшаются в объеме на 13% и 16,6% соответственно. Самыми устойчивыми к воздействию повышенной солености оказались плазмоциты *P. americana*. Данный тип гемоцитов *B. orientalis* имеет мембранный резерв, равный 18%, однако значительная часть клеток после увеличения объема не выдерживает гипоосмотической нагрузки и разрушается.

Таблица 1

Значения мембранного резерва различных типов гемоцитов исследованных видов, %

Table 1

Membrane reserve values of different types of hemocytes, %

Вид	Pr	Pl	Gr	Sph	Ver	Co	Oe	Cr
<i>N. cinerea</i>	14,1 \pm 3,8	50,0 \pm 2,5	15,3 \pm 4,0	12,8 \pm 2,2	17,5 \pm 1,9	20,4 \pm 0,9	0	-
<i>B. canifer</i>	9,2 \pm 4,1	20,2 \pm 1,6	10,4 \pm 1,4	0	14,4 \pm 2,1	7,9 \pm 1,3	0	-
<i>G. porentosa</i>	0	11,0 \pm 1,2	10,7 \pm 1,4	9,1 \pm 0,9	10,0 \pm 1,2	8,0 \pm 0,8	0	0
<i>P. americana</i>	0	13,3 \pm 1,4	14,1 \pm 1,2	0	13,7 \pm 1,7	13,8 \pm 2,0	-	-
<i>S. tartara</i>	5,8 \pm 2,1	6,6 \pm 0,8	27,4 \pm 2,2	6,5 \pm 1,2	11,1 \pm 1,4	12,1 \pm 1,5	-	-
<i>B. orientalis</i>	0	17,5 \pm 2,3	12,2 \pm 1,9	-	5,7 \pm 1,5	-	-	-
<i>B. germanica</i>	0	6,3 \pm 0,6	19,2 \pm 1,7	-	-	11,5 \pm 1,7	0	-

Pr-прогемоциты; Pl-плазмоциты; Gr-гранулоциты; Sph-сферулоциты; Ver- веретеновидные плазмоциты (вермициты); Co-коагулоциты; Oe-эноцитойды; Cr-серповидные эноцитойды
«-» - отсутствие гемоцитарного типа у данного вида

Среди гранулоцитов клетки *S. tartara* отличаются наибольшим мембранным резервом (27,4%), а также значительным уменьшением объема (на 27%) в гипертонических условиях. Подобное снижение данного параметра в условиях с повышенным осмотическим давлением характерно и для клеток *N. cinerea* и *G. portentosa*. У *B. orientalis* гранулоциты практически не изменяются в объеме.

За значительным изменением объема клеток *S. tartara* и *B. germanica* следует существенное идентичное изменение диаметра ядер (на 12-20%). Время расплывания гранулоцитов в гипотонических условиях сокращается до 10-15 минут. Для данного типа гемоцитов в гипертонической среде свойственно сохранение способности формировать псевдоподии, однако их длина уменьшается, и снижается активность клеток. «Раздувание» гранулоцитов в условиях с пониженным осмотическим давлением может приводить к полному разглаживанию поверхности. Выросты мембраны отмечаются только у гемоцитов *G. portentosa* и *B. craniifer*. В гемолимфе последних переходная форма клеток от гранулоцитов к сферулоцитам в меньшей степени претерпевает влияние среды на объем, однако эти гемоциты теряют псевдоподии и становятся неподвижными.

Для веретенновидных плазмоцитов (вермицитов) свойственно увеличение размеров по короткой оси при инкубации в гипотонических условиях. На данный тип гемоцитов *B. orientalis* осмотическое давление среды оказывает наименьшее влияние. Самые высокие значения мембранного резерва для веретенновидных плазмоцитов отмечены у *N. cinerea* (17-18%).

Наибольшим мембранным резервом (13%) среди сферулоцитов характеризуются клетки *N. cinerea*, но они демонстрируют низкую устойчивость к среде с пониженным осмотическим давлением. Кроме того, у сферулоцитов данного вида в условиях гипертонии объем становится минимальным. Гемоциты *B. craniifer* и *P. americana* не претерпевают морфологических изменений при различных условиях инкубации. Мембранный резерв сферулоцитов у остальных насекомых не превышает 10%, а также они более устойчивы к условиям с повышенным осмотическим давлением.

Исследование коагулоцитов показывает, что клеткам *N. cinerea* свойственно максимальное увеличение в объеме при действии гипоосмотической нагрузки. Соответственно для них характерен и наибольший мембранный резерв (=20%). Однако, аналогично

сферулоцитам, многие клетки после сильного разбухания разрушаются. К значительному уменьшению объема коагулоцитов *G. portentosa* – на 17%, приводит действие гипертонической среды. У данного типа форменных элементов гемолимфы прочих видов этот параметр изменяется не более, чем на 10%.

Эноцитойды, в том числе серповидные эноцитойды *G. portentosa*, не подвергаются существенным изменениям в отношении линейных параметров и формы в условиях осмотической нагрузки.

У гранулоцитов и плазмоцитов в гипотонической среде отмечено увеличение скорости расплывания и изменение его характера. Прикрепление клетки к субстрату, принятие характерной для данного типа клеток формы, а также локомоция могут определяться несколькими элементарными клеточными реакциями (морфогенетическими): реакцией активного прикрепления, контактным торможением и реакцией стабилизации поверхности [11, с.280]. Объекты, которые вследствие больших размеров не могут быть фагоцитированы, окружаются плазмocyтами или/ и гранулоцитами и инкапсулируются. Реакции инкапсуляции и фагоцитоза фундаментально сходны: расплывание клеток при инкапсуляции можно представить как попытку поглощения слишком крупного объекта [7, с. 322-324].

Ранее петалоидная (с лепестковыми образованиями), ламеллярная и филоподиальная формы рассматривались как разные клеточные типы, однако после исследования Эддса [6, с.492; 8, с.479-480; 9, с.174-176] стало известно, что морфологическая трансформация одной формы клеток в другую обусловлена перестройками цитоскелета (контактно-зависимая филоподиальная трансформация после прикрепления к субстрату). Нами отмечено, что в период расплывания в гипертонической среде плазмocyты приобретают ламеллярно-филоподиальную форму, на периферии клетки появляются длинные тонкие ветвящиеся филоподии. У прикрепленных ко дну чашек гемоцитов в гипотонических условиях возникает ореол в виде кругового распластанного по субстрату ободка (ламеллы), который через 10-15 минут достигает максимального диаметра. К этому времени почти вся цитоплазма с гранулами оказывается в данном ободке; становится заметным ядро, скрытое в интактной клетке включениями. Сетчатые цитоплазматические тяжи лежащих рядом гемоцитов, объединяются в общую массу. Агрегацию и расплывание

гемоцитов по субстрату можно рассматривать как контактную активацию с преобладанием контактов клетка-клетка или клетка-субстрат и проявление *in vitro* защитных клеточных реакций в условиях, имитирующих повреждение организма [10, с.162].

В случае коагулоцитов при распластывании в гипотонической среде формируется широкий обод ламеллоплазмы, причём внутриклеточные гранулы остаются вокруг ядра, не смещаясь к периферии, но располагаются не плотно друг к другу.

Заключение

В результате проведенных исследований определены площадь и объем гемоцитов, инкубированных в растворах разной осмолярности.

1) Максимальное использование мембранного резерва свойственно гемоцитам *N. cinerea*. Для фагоцитов (плазмоцитов, гранулоцитов, вермицитов) отмечены высокие значения MR и более быстрое распластывание. Плазмоциты претерпевают морфологическую трансформацию: в гипертонической среде они приобретают ламеллярно-филоподиальную форму, в гипотонической – ламеллярную. Подобные изменения также характерны и для гранулоцитов, но переход от одной формы к другой выражен не так ярко.

2) Коагулоциты и сферулоциты *N. cinerea* менее устойчивы к осмотической нагрузке, часть клеток разрушается в гипотонической среде. Они характеризуются наибольшими значениями MR в сравнении с этими же клетками у других видов. Коагулоциты в условиях повышенного осмотического давления уменьшаются в объеме, сохраняя прежние очертания. В среде с пониженной концентрацией солей они приобретают ламеллярную форму. Сферулоцитам изменение формы не свойственно.

3) Морфология и размеры прогемоцитов и энцитойдов у всех исследованных видов насекомых остаются практически неизменными при инкубации в различных условиях.

Список литературы

1. 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, № 8-9. С. 1-15.
2. Присный А.А., Гребцова Е.А. Механические свойства плазматической мембраны гемоцитов некоторых представителей отряда Dictyoptera // Вестник Тамбовского университета. Серия Естественные и технические науки. 2013. Т. 18, Вып. 4. С. 1635-1636.

3. Трасатти С., Петрий О.А. Измерения истинной площади поверхности в электрохимии // Электрохимия. 1993. Т. 29. № 4. С. 557-575.

4. 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). Pp. 159-163.

5. Bagge U., Skalak R., Attefors R. Granulocyte rheology. Experimental studies in an *in vitro* microflow system // Adv. Microcirc. 1977. Vol. 7. Pp. 29-49.

6. DeRosier D.J., Edds K.T. Evidence for fascin cross-links between the filaments in coelomocyte filopodia // Exp. Cell Res. 1980. Vol. 126. Pp. 490-494.

7. Dybas L., Fankboner P.V. Holothurian survival strategies: Mechanisms for the maintenance of a bacteriostatic environment in the coelomic cavity of the sea cucumber // Dev. Comp. Immunol. 1986. Vol. 10. Pp. 311-330.

8. Edds K.T. Dynamic aspects of filopodial formation by reorganization of microfilaments // J. Cell Biol. 1977. Vol. 73(2). Pp. 479-480.

9. Edds K.T. Cell biology of echinoid coelomocytes. I. Diversity and characterization of cell types // J. Invertebr. Pathol. 1993. Vol. 61. Pp. 173-178.

10. Gotz P. Encapsulation in arthropods. In: Immunity in Invertebrates. Cells, Molecules and Defense Reactions. 1986. Pp. 153-170.

11. Vasiliev J.M., Gelfand I.M. Effects of colcemid on morphogenetic processes and locomotion of fibroblasts. In: Cell Motility. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. 1976. 280 p.

References

1. Orlov S.N., Novikov K.N. Regulation of cells' volume: mechanisms, coupled cells reactions and pathophysiological significance // Fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova. 1996. Vol. 82, No. 8-9. Pp. 1-15.
2. Prisky A.A., Grebtsova E.A. Mechanical properties of the hemocytes' plasma membrane of several representatives of the Dictyoptera // Bulletin of Tambov University. Series Natural and Technical Sciences. 2013. Vol. 18. No. 4. Pp. 1635-1636.
3. Trasatti S. Measurements of the real surface area in electrochemistry // Electrochemistry. 1993. Vol. 29. No. 4. Pp. 557-575.
4. 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). Pp. 159-163.
5. Bagge U., Skalak R., Attefors R. Granulocyte rheology. Experimental studies in an *in vitro* microflow system // Adv. Microcirc. 1977. Vol. 7. Pp. 29-49.
6. DeRosier D.J., Edds K.T. Evidence for fascin cross-links between the filaments in coelomocyte filopodia // Exp. Cell Res. 1980. Vol. 126. Pp. 490-494.
7. Dybas L., Fankboner P.V. Holothurian survival strategies: Mechanisms for the maintenance of a bacteriostatic environment in the coelomic cavity of the sea cucumber // Dev. Comp. Immunol. 1986. Vol. 10. Pp. 311-330.

8. Edds K.T. Dynamic aspects of filopodial formation by reorganization of microfilaments // J. Cell Biol. 1977. Vol. 73(2). Pp. 479-480.

9. Edds K.T. Cell biology of echinoid coelomocytes. I. Diversity and characterization of cell types // J. Invertebr. Pathol. 1993. Vol. 61. Pp. 173-178.

10. Gotz P. Encapsulation in arthropods. In: Immunity in Invertebrates. Cells, Molecules and Defense Reactions. 1986. Pp. 153-170.

11. Vasiliev J.M., Gelfand I.M. Effects of colcemid on morfogenetic processes and locomotion of fibroblasts. In: Cell Motility. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. 1976. 280 p.

Гребцова Елена Александровна, аспирант,
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Белгородский государственный национальный
исследовательский университет»,
ул. Победы 85, г. Белгород, 308015, Россия
E-mail: grebtsova_e@mail.ru

Grebtsova Elena Alexandrovna, Post-graduate
Student
Belgorod National Research University,
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia
E-mail: grebtsova_e@mail.ru