



УДК 591.111.1:595.76

## ВЛИЯНИЕ ГИПООСМОТИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА ОБЪЕМ КЛЕТОК И ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕМБРАННОГО РЕЗЕРВА ГЕМОЦИТОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ОТРЯДА *DICTYOPTERA*

**А.А. Присный, Е.А. Гребцова**

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

E-mail: Prisny@bsu.edu.ru

Исследованы реакции гемоцитов некоторых представителей отряда Dictyoptera на гипосмотическую нагрузку. Осуществлено определение площади и объема гемоцитов, инкубированных в растворах разной осмотичности. Выявлены различия в использовании мембранного резерва гемоцитами разных типов.

Ключевые слова: гемоциты, объем клеток, мембранный резерв.

### Введение

Гемолимфа беспозвоночных животных обладает всеми необходимыми функциями, несмотря на простоту организации, и отражает физиологическое состояние животного, а так же эволюционную ступень развития. 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 из множества факторов 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 [1].

Наука о гемоцитах обширна и остается неизменно актуальной. Возможность выделять и идентифицировать гемоциты важна для исследований клеточного иммунитета насекомых. Гемоциты, необходимый компонент иммунной системы насекомого, 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 и состояние здоровья насекомых, их практическое и биомедицинское прикладное применения не достаточно изучены [2].

Доступна весьма скудная информация о типах гемоцитов насекомых, включая многочисленные виды экономической важности. Ключевой проблемой является небольшой размер многих насекомых, что делает сбор и идентификацию комплекса гемоцитов практически невозможной. Названия типов гемоцитов, которые им дают, иногда отличаются между таксонами, таким образом, что системы классификации и используемые критерии для идентификации гемоцитов в одной группе насекомых, могут полностью не соответствовать другой [3].

Авторами ранее проведены исследования и опубликованы данные о морфометрических показателях и типологии гемоцитов различных представителей класса Насекомые [4-5]. Однако информации о мембранных реакциях этих клеток на различные условия среды в доступной литературе не обнаружено.

В связи с вышесказанным целью данной работы является изучение влияния гипосмотической нагрузки на объем клеток и определение мембранного резерва гемоцитов некоторых представителей отряда *Dictyoptera*.

### 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 отряда Dictyoptera: *Periplaneta americana*, *Shelfordella tartara*, *Gromphadorhina portentosa*, *Blaberus craniifer*, *Nauphoeta cinerea*. Животных содержали в оборудованных укрытиями садках с кокосовым и опилочным грунтом. Для успешного разведения тараканов поддерживали высокий уровень влажности. Кормление проводили 2 раза в неделю.

Гемолимфу получали по стандартной методике [6]. Были проведены исследования с применением световой и зондовой микроскопии (Nikon Eclipse Ti-E, Интегра Вита NT-MDT).



Препараты фотографировали, по снимкам проводили измерения клеток, ядер, гранул и включений по длинной и короткой осям с помощью анализатора изображений «ВидеоТест» (ООО «Микроскоп Сервис», г. Санкт-Петербург).

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 мембранного резерва.

Инкубацию проводили в течение 1 минуты. Далее изучали прижизненные особенности клеток, их морфометрические показатели с помощью оптического инвертированного микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E. Получали фотографии в режиме реального времени и проводили линейные измерения, применяя анализатор изображений «Видео-Тест».

Гемоциты имеют относительно эллипсоидную форму, поэтому измеряли большую, среднюю и малую ось. Используя значения этих линейных размеров, рассчитывали площадь поверхности клеток и их объём.

Формулы для расчёта показателей:

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

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

где S – площадь поверхности гемоцита, V – объём, а – большая полуось, b – малая полуось, с – средняя полуось, p=1,6075 - коэффициент К. Томсена.

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

$$\Delta S=S(CT)-S(I),$$

где ΔS – резерв плазматической мембраны (μm<sup>2</sup>); S(CT) – площадь поверхности клетки, после инкубации в сильно гипотонической среде (μm<sup>2</sup>); S(I) – площадь поверхности клетки, после инкубации в изотонической среде (μm<sup>2</sup>).

Для определения доли используемого мембранного резерва (MR) использовали следующую формулу:

$$(\Delta S / S(CT)) \cdot 100 \%,$$

где ΔS – резерв плазматической мембраны (μm<sup>2</sup>); S(CT) – площадь поверхности клетки, после инкубации в сильно гипотонической среде (μm<sup>2</sup>);

Полученные данные обрабатывали с использованием методов вариационной статистики.

### Результаты и их обсуждение

Мембранный резерв, определяемый степенью складчатости плазмалеммы, является одной из важнейших морфофункциональных особенностей клеток крови. Он используется фагоцитами при образовании псевдоподий при амебoidalном 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 [7, 8]. Работы по изучению величины мембранного резерва ядерных клеток гемолимфы насекомых до настоящего времени не проводились.

В норме большинство клеток многоклеточных организмов находятся в изотонических условиях. Изменения концентрации внутри- или внеклеточного растворов приводят к возникновению трансмембранного градиента осмотического давления. Поскольку плазмалемма проницаема для воды, то это приводит к перемещению растворителя в клетку или из неё. Таким образом, происходит или увеличение, или уменьшение объёма клетки.

Проведена инкубация гемоцитов исследуемых видов в изотонической и сильногипотонической средах. Определили площадь и объём гемоцитов, инкубированных в различных растворах.

У *B. craniifer* наибольшее увеличение объема в сильно гипотоническом растворе происходило у гемоцитов типа 3 и 5. Для последнего характерно увеличение линейных размеров только по короткой оси.

Значительное увеличение объема клеток в ответ на гипосмотическую нагрузку у гемоцитов типа 3 и 5 связано с высокой фагоцитарной активностью.

Гемоциты типа 1 демонстрируют наименее выраженное увеличение объема в ответ на гипосмотическую нагрузку. Это может быть связано с наличием крупного ядра, занимающего практически всю цитоплазму, и ведет к неспособности клеток существенно изменять свою форму и образовывать псевдоподии.



Максимальное увеличение объема у *G. portentosa* демонстрируют гемоциты типа 5 и 4, у *N. cinerea* – клетки 2 и 4 типов. Последние очень нестабильны даже в изотонической среде. Под воздействием гипосмотической нагрузки увеличиваются в объеме, часто с последующим разрывом мембраны, сопровождающимся выходом сферических везикул.

Рассчитывали абсолютную величину мембранного резерва (таблицы 1-2) как разность между площадью поверхности клетки в сильно гипотоническом растворе и площадью поверхности клетки в изотонической среде.

Таблица 1

**Абсолютный мембранный резерв ( $\Delta S$ ) и доля используемого мембранного резерва (MR) представителей семейства Blaberidae**

Представители	<i>N. cinerea</i>		<i>B. craniifer</i>		<i>G. portentosa</i>	
	$\Delta S$ ( $\mu\text{m}^2$ )	MR (%)	$\Delta S$ ( $\mu\text{m}^2$ )	(MR) (%)	$\Delta S$ ( $\mu\text{m}^2$ )	(MR) (%)
Тип 1	7.4	12.4	17.3	16.0	3.4	6.6
Тип 2	61.4	33.3	23.4	8.0	21.3	13.8
Тип 3	9.0	10.0	49.1	28.0	15.1	17.7
Тип 4	94.3	60.0	-	-	41.3	41.3
Тип 5	19.0	15.0	90.1	29.0	162.8	53.0

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.

Таблица 2

**Абсолютный мембранный резерв ( $\Delta S$ ) и доля используемого мембранного резерва (MR) представителей семейства Blattidae**

Представители	<i>P. americana</i>		<i>S. tartara</i>	
	$\Delta S$ ( $\mu\text{m}^2$ )	MR (%)	$\Delta S$ ( $\mu\text{m}^2$ )	(MR) (%)
Тип 1	11.9	12.0	10.7	13.0
Тип 2	24.3	15.0	119.4	36.7
Тип 3	50.2	39.0	48.6	29.2
Тип 4	18.3	12.0	-	-
Тип 5	46.9	25.0	76.9	38.0

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  $\Delta S$ .

На изменения объема клетки отвечают активацией мембранного транспорта и/или изменением метаболизма, результатом чего является потеря или поглощение воды и, как следствие, восстановление нормальной величины объема. Объем может регулироваться поступлением в клетку или выходом из неё осмотически активных веществ: электролитов (прежде всего  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ ), а также органических осмолитов [9].

В большинстве животных клеток регулируемое уменьшение объема связано с потерей KCl через активированные калиевые и хлорные каналы или с активацией  $\text{K}^+$ , Cl<sup>-</sup>-котранспорта [10]. Регулируемое увеличение объема осуществляется путём поглощения KCl и NaCl. Накопление этих солей происходит через  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ - и Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-насосы или благодаря  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , 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.

### Заключение

В результате проведенных исследований осуществлено определение площади и объема гемоцитов, инкубированных в растворах разной осмотичности.

Гемоцитами типа 1 меньше всего используется мембранный резерв (до 16%). Для гемоцитов типов 2, 3 и 5 характерно максимальное использование мембранного резерва, так как именно эти клетки активно участвуют в процессах фагоцитоза.

### Список литературы

1. 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. – V. 31. – P. 267-275.



2. Pandey J.P. Studies on stress induced haematological changes in *Dysdercus cingulatus* Fabr. (Heteroptera: Pyrrhocoridae) and *Danaïa chrysippus* (Lepidoptera: Nymphalidae). // Ph.D Thesis. – 2004. – P.12-16.
3. Pandey J.P., Tiwari R.K., Kumar D. Reduction in hemocyte mediated immune response in *Danaïa chrysippus* following treatment with neem based insecticides. // J. Entomol. – 2008. – V.5. – P. 200-206.
4. Присный А.А., Гребцова Е.А. Морфофункциональные особенности иммунных клеток некоторых представителей отряда Coleoptera // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Естественные науки. – 2012. – № 15 (134). Выпуск 20. – С. 115-118.
5. Присный А.А., Гребцова Е.А. Механические свойства плазматической мембраны гемоцитов некоторых представителей отряда Dictyoptera // Вестник Тамбовского университета. Серия Естественные и технические науки. – 2013. – Том 18. Выпуск 4. – С. 1635-1636.
6. Злотин А.З. Техническая энтомология. – Киев: Наукова Думка, 1989. – 184 с.
7. Bagge U., Amundson B., Lauritzen C. White blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock. // Acta Physiol Scand. – 1980. – V. 108(2). – P. 159-163.
8. Bagge U., Skalak R., Attefors R. Granulocyte rheology. Experimental studies in an in vitro microflow system. // Adv Microcirc. – 1977. – V. 7. – P. 29-49.
9. McManus M.L., Churchwell K.B. Regulation of Cell Volume in Health and Disease. // The New England Journal of Medicine. – 1995. – № 19. – P. 123-134.
10. Орлов С.Н., Гурло Т.Г. Механизмы активации ионного транспорта при изменении объема клеток // Цитология. – 1991. – Т.33, №11. – С. 101-110.

## **HYPOSMOTIC LOADING INFLUENCE ON CELLS VOLUME AND IDENTIFICATION OF HAEMOCYTES MEMBRANE RESERVE FOR THE REPRESENTATIVES OF *DICTYOPTERA* ORDER.**

**A.A. Prisny, E.A. Grebcova**

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

*E-mail: Prisny@bsu.edu.ru*

Haemocytes reactions of some representatives of Dictyoptera order on hypoosmotic loading are investigated. Evaluation of the area and volume of haemocytes, incubated in different osmotic solutions is carried out. Distinctions are drawn in the usage of membrane reserve by the haemocytes of different types.

Key words: haemocytes, volume of cells, membrane reserve.