

DOI: 10.17117/na.2016.12.02.348

<http://ucom.ru/doc/na.2016.12.02.348.pdf>

Поступила (Received): 29.12.2016

**Присный А.А., Артемчук О.Ю.
Энергетический статус гемоцитов беспозвоночных
животных под действием температурного фактора**

**Prisnyi A.A., Artemchuk O.Yu.
The invertebrates hemocytes energy status under
the influence of the temperature factor**

Описано влияние изменения температурного фактора на энергетический статус клеток гемолимфы беспозвоночных животных.

Использование метода конфокальной микроскопии позволило изучить динамику энергетики клеток. Получены результаты, позволяющие разделить стратегию адаптации клеток к температурному фактору

Ключевые слова: гемоциты, температура, флуоресценция

The influence of change of the temperature factor on power invertebrates hemocytes is described. Method application of confocal microscopy has allowed studying dynamics of power of cells. The data which allow dividing strategy of adaptation of cells to the temperature factor are obtained

Key words: hemocytes, temperature, fluorescence

Присный Андрей Андреевич

*Кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник
Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им.
Я.Р. Коваленко
г. Белгород, ул. Курская, 4*

Prisnyi Andrey Andreevich

*Candidate of Biology Science, Associate Professor,
Leading Researcher
All-Russian research institute of experimental
veterinary medicine named Ya.R. Kovalenko
Belgorod, Kurskaya st., 4*

Артемчук Олеся Юрьевна

*Научный сотрудник
Ярославский государственный университет им.
П.Г. Демидова
г. Ярославль, проезд Матросова, 9*

Artemchuk Olesya Yuryevna

*Researcher
Yaroslavl state university named P.G. Demidov
Yaroslavl, pass. Matrosova, 9*

Клетки гемолимфы ряда беспозвоночных животных представляют особый интерес с точки зрения сравнительной физиологии, поскольку у представителей аннелид, моллюсков и членистоногих хорошо развита циркуляторная система.

Оценка уровня энергетического метаболизма в гемоцитах важна для реализации комплексного подхода в изучении морфофизиологических свойств клеток. Проникающие катионные флуоресцентные зонды селективно накапливаются в митохондриях живых клеток. Митохондриально-специфическое взаимодействие таких молекул зависит от высокого уровня трансмембранного

потенциала, который поддерживается функционирующими митохондриями. Потенциал-чувствительные красители – это важный инструмент для исследования динамики трансмембранного потенциала, а также для визуализации митохондрий, обладающих трансмембранным потенциалом на уровне около -150 мВ (Митрошина Е.В., 2012). Известен ряд прижизненных красителей, которые под действием возбуждающего света вызывают флуоресценцию клеточной цитоплазмы без видимых нарушений жизнедеятельности (Ромейс Б., 1954). Нами был выбран родамин Б, поскольку он характеризуется высоким уровнем проникающей способности и, в малых концентрациях, не приводит к повреждению генетического аппарата клетки.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили гемоциты *Helix pomatia*, *Hirudo medicinalis* и *Nauphoeta cinerea*. В серии экспериментов осуществляли изучение энергетического статуса гемоцитов в условиях *in vitro*. Исследования проводили с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E и программного обеспечения C1 (Nikon) (Кулько С.В., Присный А.А., 2011). Для оптической индикации различий клеточного митохондриального мембранного энергетического резерва был использован потенциалзависимый флуоресцентный зонд родамин Б. По результатам серии экспериментов осуществлена оценка уровня энергетического метаболизма гемоцитов в различных условиях.

Флуорохром Родамин Б используется для прижизненной окраски митохондрий. Этот краситель относится к медленным потенциалзависимым красителям, предназначенным для регистрации изменений потенциалов мембраны невозбудимых клеток, которые вызваны изменениями дыхательной деятельности, проницаемости ионных каналов, фармакологическими воздействиями и другими факторами (Reungpatthanaphong P.L., et al., 2003; Smith S.N., Steer R.P., 2001).

После 30 мин инкубации клеточных элементов с красителем приступали к их изучению с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ), на базе инвертированного светового микроскопа Nikon Eclipse Ti-E. Использование программного приложения EZ-C1 (Nikon) позволило осуществить оценку интенсивности флуоресценции гемоцитов. Родамин Б имеет волну возбуждения $\lambda_{\max}(ex) = 554 \text{ nm}$, и эмиссии – $\lambda_{\max}(em) = 579 \text{ nm}$ (Terpetschnig E. et al., 2002). Интенсивность флуоресценции измеряли стандартными средствами программы C1 (Nikon) для десяти клеток каждого типа в каждой пробе (Кулько С.В., 2015).

Результаты исследования и их обсуждение

Нативные препараты гемоцитов виноградной улитки, медицинской пиявки и мраморного таракана, окрашенные родамином Б, помещали в термостабилизирующую ячейку и осуществляли измерение интенсивности флуоресценции при температурах +26°C, +30°C, +35°C, +40°C, +45°C, +50°C.

Исследования показали, что в клетках гемолимфы *Helix pomatia* интенсивность флуоресценции родамина Б увеличивается при повышении температуры от 26 до 35°C, затем стабилизируется и значительно уменьшается при 50°C.

В клетках *Hirudo medicinalis* интенсивность флуоресценции родамина Б увеличивается при повышении температуры от 26 до 35°C, затем стабилизируется и остается примерно на одном уровне до 50°C.

В гемоцитах *Nauphoeta cinerea* интенсивность флуоресценции родамина Б увеличивается при повышении температуры от 26 до 35°C, затем стабилизируется и значительно возрастает при 50°C.

В целом, максимальный уровень флуоресценции отмечен у фагоцитов представителей всех изученных видов; минимальный – у прогемоцитов. Это можно рассматривать как закономерное явление, исходя из их специфических функций – для амебоцитов характерны высокие энергетические запросы в связи с активным передвижением и фагоцитозом, требующим быстрого изменения клеточной формы (Stang-Voss C., 1970; Yoshino T.P., 1976).

При анализе полученных данных по беспозвоночным животным было выявлено отсутствие достоверных закономерностей в изменении двигательной активности и показателей интенсивности флуоресценции. Возрастание интенсивности флуоресценции гемоцитов свидетельствует о высокой энергетической потребности для идентификации инородных объектов и осуществления фагоцитоза.

Интенсивность внутриклеточных энергетических процессов у амебоцитов значительно превосходит аналогичные показатели других типов клеток внутренней среды. Это свидетельствует о высоком уровне их энергетического метаболизма для обеспечения двигательной активности и процессов фагоцитоза.

Заключение

Воздействие температурного фактора на гемоциты беспозвоночных животных приводит к неоднозначной динамике интенсивности использования энергетических резервов клеток. В целом, следует отметить высокий уровень энергетических процессов у амебоидных элементов, что связано с их специфической функцией в реализации процессов клеточного иммунитета.

Список используемых источников:

1. Кулько С.В. Морфофункциональная характеристика гемоцитов моллюсков (*Gastropoda, Bivalvia*) в норме и при осмотической нагрузке: дис. ... канд. биол. наук: 03.03.01. Белгород, 2015. 207 с.
2. Кулько С.В., Присный А.А. Использование методов инвертированной оптической и конфокальной микроскопии в исследовании гемоцитов беспозвоночных животных // Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты: Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции. М: ИНТЕРГЕН, 2011. С. 49-51.
3. Митрошина Е.В. Оптический имиджинг в приложении к исследованию нейробиологических систем мозга. Нижний Новгород: НГУ, 2012. 40 с.
4. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Издательство иностранной литературы, 1954. С.171-172.
5. Reungpatthanaphong P.L., Dechsupa S., Meesungnoen J., Loetchutinat C., Mankhetkorn S. Rhodamine B as a mitochondrial probe for measurement and monitoring of mitochondrial membrane potential in drug-sensitive and -resistant cells // J. Biochem. Biophys. Methods. 2003. Vol. 57(1). P. 1-16.

6. Smith S.N., Steer R.P. *The photophysics of Lissamine rhodamine-B sulphonyl chloride in aqueous solution: implications for fluorescent protein-dye conjugates* // *J. Photochemistry and Photobiology. A. Chemistry*. 2001. Vol. 139. P. 151-156.
7. Stang-Voss C. *Zur Ultrastruktur der Blutzellen Wirbelloser Tiere III. Über die Hamocyten der schnecke Lymnaea stagnalis L. (Pulmonata)* // *Z. Zellforsch.* 1970. Vol. 107. P. 141-156.
8. Terpetschnig E., Povrozin Y. *Polarization Standards* // *J. Eichorst. ISS. Inc.*, 2002. 120 p.
9. Yoshino T.P. *The ultrastructure of circulating hemolymph cells of the marine snail Cerithidea californica (Gastropoda: Prosobranchiata)* // *J. Morphol.* 1976. Vol. 150. P. 485-494.

© 2016, Присный А.А., Артемчук О.Ю.

Энергетический статус гемоцитов беспозвоночных животных под действием температурного фактора

© 2016, Prisnyi A.A., Artemchuk O.Yu.

The invertebrates hemocytes energy status under the influence of the temperature factor