

591.111.7:595.142.39

*Пигалева Т.А.***ИЗМЕНЕНИЕ  
МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ  
ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЕМОЦИТОВ  
ПИЯВОК В ОТВЕТ НА  
ОСМОТИЧЕСКУЮ НАГРУЗКУ**

**Пигалева Татьяна Александровна,**  
*ассистент кафедры экологии, физиологии и биологической эволюции*  
Белгородский государственный национальный исследовательский университет,  
ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия  
*E-mail: pigaleva@bsu.edu.ru*

## АННОТАЦИЯ

**О**писано 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.

**К**лючевые слова: гемоциты, осмотическое давление, псевдоподии.

UDC 591.111.7:595.142.39

*Pigaleva T.A.****THE MORPHOMETRICAL  
CHANGE HEMOCYTES OF THE  
HIRUDO MEDIC-INALIS AND  
HEMOPIS SANGUISUGA IN  
REPLY TO OSMOTIC LOADING***

**Pigaleva Tatiana Alexandrovna**  
Belgorod State National Research University,  
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia  
*E-mail: pigaleva@bsu.edu.ru*

**ABSTRACT**

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.

**Keywords:** hemocytes, osmotic pressure, pseudopodia.

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. M. 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 (*Hemopsis sanguisuga*) в ответ на осмотическую нагрузку.

**Материалы и методы исследования.** Исследования проведены в течение 2011-2013 годов на базе кафедры анатомии и физиоло-

гии живых организмов ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет».

В экспериментах использованы представители видов *Haemopsis 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 применением 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) [8, 9]. Инкубацию гемоцитов в растворах разной осмолярности осуществляли в течение 30 минут при температуре 24°C.

Полученные данные обработаны при помощи методов вариационной статистики.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Анализ клеточного состава гемоцитов медицинской пиявки позволил разделить все гемоциты *H. medicinalis* на 3 типа (табл. 1).

Таблица 1

Морфометрические параметры гемоцитов *H. medicinalis* в растворах различной осмотичности

Table 1

Morfometric parameters of haemocytes *H. medicinalis* surface under conditions of different osmolarity

Тип клеток	Линейные размеры клетки по длинной оси ( $\mu\text{m}$ )	Линейные размеры клетки по короткой оси ( $\mu\text{m}$ )	Линейные размеры ядра по длинной оси ( $\mu\text{m}$ )	Линейные размеры ядра по короткой оси ( $\mu\text{m}$ )
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 выходят 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 (табл. 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  $\mu\text{m}$ . 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.

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 распластаются. Амебоциты не фагоцитируют, и, видимо, выполняют запасную функцию.

В условиях измененного осмотического давления СА увеличивались в размерах.

Таблица 2

Морфометрические параметры гемоцитов *H. sanguisuga* в растворах различной осмотичности

Table 2

Morfometric parameters of haemocytes *H. sanguisuga* surface under conditions of different osmolarity

Тип клеток	Линейные размеры клеток по длинной оси ( $\mu\text{m}$ )	Линейные размеры клеток по короткой оси ( $\mu\text{m}$ )	Линейные размеры ядра по длинной оси ( $\mu\text{m}$ )	Линейные размеры ядра по короткой оси ( $\mu\text{m}$ )	Линейные размеры псевдоподий ( $\mu\text{m}$ )
Изотоническая среда					
БА	6,06 $\pm$ 0,44	6,61 $\pm$ 0,42	1,44 $\pm$ 0,07	1,07 $\pm$ 0,27	4,02 $\pm$ 1,23
СА	4,94 $\pm$ 0,63	3,83 $\pm$ 0,67	0,51 $\pm$ 0,13	1,42 $\pm$ 0,29	2,51 $\pm$ 0,72
МА	2,75 $\pm$ 0,32	2,43 $\pm$ 0,27	0,79 $\pm$ 0,16	0,42 $\pm$ 0,18	3,35 $\pm$ 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.

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  $\mu\text{m}$ . 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 солености среды вызывает уменьшение линейных параметров гемоцитов *H. medicinalis*, при этом, форменные элементы гемолимфы *H. sanguisuga* реагировали на гипертонические условия увеличением размеров.

**ЛИТЕРАТУРА:**

1. Беклемишев В.Н. Основы сравнительной анатомии беспозвоночных: Т. 2. Органология. – М: Наука, 1964. – 448 с.
2. Галактионов В.Г. Эволюционная иммунология: Учеб. пособие/ В.Г. Галактионов. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2005. – 408 с.
3. Любвина И.В., Рацевский Ю.К., Романюк Г.П. Влияние нефтепромысла на функциональное состояние лесного биогеоценоза. / Ю.К. Рацевский, Г.П. Романюк, И.В. Любвина. – Экология и охрана животных. Куйбышев: Куйбыш. ун-т, 1982. – С.27-43.
4. Перель Т.С. Распространение и закономерности распределения дождевых червей фауны СССР (с определительными таблицами). – М.: Наука, 1979. – 272 с.
5. Cooper E.L. Oligochaetes. / E.A. Stein, E.L. Cooper. – In N. A. Ratcliffe and A. F. Rowley (eds.), Invertebrate blood cells, Academic Press: New York, 1981. – Vol. 1, pp. 75-140.
6. Cameron G. R. Inflammation in earthworms. – J. Gen. Path. Biol., 1932. – 35. – P. 833-872.
7. Dales R.P. Phagocytic defense by earthworm against pathogenic bacteria. / R.P. Dales, Y. Kalaç. – Comp. Biochem. Physiol., 1992. – 101A. – P. 487-490
8. Ratcliffe N.A. Invertebrate Blood Cells / A.F. Rowley, N.A. Ratcliffe. – Academic Press: London, 1981. – Vol. 2. – 641 p.
9. Valembois P. Etude autoradiographique du role trophique des cellules chloragogenes des vers de terre. / M. Cazaux, P Valembois. – C.R. Soc. Biol., 1970. – 164. – P. 1015-1018.

**REFERENCES:**

1. Beklemishev V.N. Fundamentals of comparative anatomy of invertebrates: T. 2. Organology. – Moscow: Nauka, 1964. – 448.
2. Galaktionov V.G. Evolutionary immunology: Proc. Benefit / V.G. Galaktionov. – M.: ICC «Akademkniga», 2005. – 408.
3. Lyubvin I.V., Ratsevsky J.K., Romaniuk G.P. Influence on the functional state oilfield forest biogeocenosis. / JK Ratsevsky, GP Romaniuk, IV Lyubvin. – Environmental and animal welfare. Kuibyshev: Kuibyshev. Univ, 1982. – P.27-43.
4. Perel T.S. Distribution and patterns of distribution of earthworm fauna of the USSR (with identification key). – Moscow: Nauka, 1979. – 272.
5. Cooper E.L. Oligochaetes. / E.A. Stein, E.L. Cooper. – In N. A. Ratcliffe and A. F. Rowley (eds.), Invertebrate blood cells, Academic Press: New York, 1981. – Vol. 1, pp. 75-140.
6. Cameron G. R. Inflammation in earthworms. – J. Gen. Path. Biol., 1932. – 35. – P. 833-872.
7. Dales R.P. Phagoytic defense by earthworm against pathogenic bacteria. / R.P. Dales, Y. Kalaç. – Comp. Biochem. Physiol., 1992. – 101A. – P. 487-490
8. Ratcliffe N.A. Invertebrate Blood Cells. / A.F. Rowley, N.A. Ratcliffe. - Academic Press: London, 1981. – Vol. 2. – 641 p.
9. Valembos P. Etude autoradiographique du role trophique des cellules chloragogenes des vers de terre. / M. Cazaux, P Valembos. – C.R. Soc. Biol., 1970. – 164. – P. 1015-1018.