

УДК 591.111.7:594.382.4

КУЛЬКО С.В.*KULKO S.V.***ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО
СТАТУСА ГЕМОЦИТОВ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ
КЛАССА GASTROPODA (MOLLUSCA) В УСЛОВИЯХ
ОСМОТИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ****DYNAMISCS OF ENERGY STATUS INDECIES OF HEMOCYTES
IN SOME GASTROPOD (MOLLUSCA) SPECIES
IN OSMOTIC STRESS CONDITIONS****Аннотация**

В статье рассматриваются особенности энергетических реакций гемоцитов некоторых представителей типа Mollusca в ответ на инкубацию в растворах с различной осмолярностью. Исследование было произведено при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа, с окраской гемоцитов родамином Б, и позволило доказать, что наибольшими энергетическими затратами обладают большие амебоциты всех изученных видов-представителей.

Ключевые слова: гемолимфа; гемоциты; митохондрии; энергетический статус; осмотическая нагрузка.

Гемоциты – циркулирующие клетки гемолимфы моллюсков, обладают рядом функций, среди которых важную роль играют эффекторные функции. Являясь действующими единицами иммунного ответа, гемоциты, несомненно, должны обладать большими энергетическими требованиями, поскольку фагоцитоз предусматривает изменение конформации клетки и непосредственные затраты на ликвидацию чужеродных агентов, попавших в гемолимфу [1,2]. Морфологические исследования, подтвер-

Abstract

The article discusses the features of hemocyte energy reactions in some representatives of Mollusca type in response to incubation in solutions with different osmolarity. The study was conducted with the use of a confocal laser scanning microscope, with hemocytes coloring by rhodamine B. The study proves that large amoebocytes have the highest energy consumption.

Key words: hemolymph; hemocytes; mitochondries; energetic status; osmotic stress.

ждающие наличие в цитоплазме большого числа митохондрий [3,4,5] еще не доказывает их активность в конкретный момент времени [6]. Кроме того, гемоциты должны обладать достаточно высокой осморезистентностью, чтобы иметь возможность выполнять специфические функции в различных условиях.

Гемоциты, в особенности, клетки, способные к самостоятельному передвижению, несущие эффекторные функции в иммунной системе моллюсков, безусловно,

имеют большие энергозатраты, что, отчасти, подтверждается в морфологических исследованиях отечественных и зарубежных ученых [7,8,9]. Разумно предположить, что особенно высокие энергетические требования присущи фагоцитирующим клеткам, которые обладают способностью к амебоидному движению и поглощению чужеродных агентов [10].

Материалы и методы исследования. Исследование энергетической активности митохондрий в условиях осмотической нагрузки было произведено в 2013-2014 году на базе кафедры анатомии и физиологии живых организмов НИУ «БелГУ» с использованием КЛСМ Nikon Digital Eclipse Ti-E и программного обеспечения C1. Для проведения исследования брали половозрелых моллюсков *Helix pomatia*, *Stenomphalia ravergeri*, *Viviparus viviparus*, *Achatina fulica*, *Planorbarius corneus*, *Lymnaea stagnalis* и *Ampullaria australis*, по 12 особей от каждого вида. Гемолимфу от каждой особи каждого вида-представителя отбирали стандартным методом [11] и делили на три пластиковые

чашки Петри, по 5 мкл на чашку. В пробы приливали по 5 мкл 0,01 mM раствора родамина Б [12], приготовленного с использованием растворов различной осмолярности: (изотонический раствор - 171,6 мосмоль/л NaCl, гипотонический - 41,19 мосмоль/л NaCl, и гипертонический – 212,79 мосмоль/л NaCl [11]) и после 30-минутной инкубации облучали лазером с длиной волны 545 nm.

Для получения результатов измеряли по 10 клеток каждого типа от каждой изученной особи каждого изученного вида.

Результаты исследования и их обсуждение. При изучении гемоцитов *H. pomatia* было выявлено, что наибольшей энергетической активностью обладают большие амебоциты (БА) (табл. 1), и показатели резко возрастают в гипертонической среде, в то время как в гипотонической среде достоверных изменений не наблюдается. Малые амебоциты (МА) в целом ведут себя аналогичным образом, а малые гранулярные (МГ) и круглые клетки (КК) слабо реагируют на изменение осмотичности среды.

Таблица 1

Интенсивность флуоресценции гемоцитов *H. pomatia*, инкубированных в средах с различной осмолярностью

Среда/тип клеток	БА	МА	МГ	КК
гипотония	250,20±22,58	203,56±19,87	162,50±18,26	169,44±12,27
изотония	263,30±16,31	213,89±15,96	183,20±20,34	164,50±16,68
гипертония	367,89±16,04*	279,56±20,59*	202,00±19,52	162,75±26,92

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с изотонией ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента

При исследовании клеток гемолимфы *S. ravergeri* было выявлено, что наибольшей энергетической активностью обладают большие амебоциты (табл. 2), однако их энергетическое состояние в ответ на снижение осмотичности среды не претерпевает достоверных изменений, что верно

и для малых амебоцитов. Малые гранулярные клетки и круглые клетки несколько снижают энергетическую активность при понижении осмотичности среды, а на повышение осмотичности достоверной реакции не проявляют.

Таблица 2

Интенсивность флуоресценции гемоцитов *S. ravergeri*, инкубированных в средах с различной осмолярностью

Среда/тип клеток	БА	МА	МГ	КК
гипотония	320,90±27,59	264,25±20,68	177,00±20,49*	138,20±11,37*
изотония	332,00±18,84	267,00±20,88	221,83±14,14	166,00±17,70
гипертония	362,80±19,26	260,29±14,59	206,60±29,07	144,90±14,91

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с изотонией ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Из всех гемоцитов *V. viviparus* наибольшей энергетической активностью обладают большие амебоциты (табл. 3), причем они резко реагируют на понижение осмотичности среды снижением энергетических показателей. Малые амебоциты, ма-

лые гранулярные клетки и крепкие клетки на инкубацию в гипертоническом растворе отвечают повышением напряженности энергетических процессов, в то время как на снижение осмотичности среды достоверной реакции не показывают.

Таблица 3

Интенсивность флуоресценции гемоцитов *V. viviparus*, инкубированных в средах с различной осмолярностью

Среда/тип клеток	БА	МА	МГ	КК
гипотония	160,40±18,60*	141,50±16,11	121,60±14,39	129,60±11,50
изотония	260,50±28,22	184,20±27,38	135,60±16,27	123,10±12,40
гипертония	298,80±23,39	292,10±14,78*	220,40±20,91*	195,70±22,29*

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с изотонией ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

При изучении гемоцитов *A. fulica* было выявлено, что наибольшими значениями энергетических показателей (табл. 4) обладают большие амебоциты, эти показатели достаточно резко возрастают в гипоосмотической среде, а на повышение осмотичности клетки не проявляют достоверной реакции. Наименьшими показателями обладают круглые клетки, их энергетическая активность с изменением

осмотичности среды не изменяется. Аналогичные реакции показывают и малые гранулярные клетки. Малые амебоциты отчетливо реагируют на снижение осмотичности, в то время как повышение осмотичности раствора практически не оказывает влияния на клетки данного типа.

Таблица 4

**Интенсивность флуоресценции гемоцитов *A. fulica*,
инкубированных в средах с различной осмолярностью**

Среда/тип клеток	БА	МА	МГ	КК
гипотония	379,50±20,58*	270,30±12,46*	213,60±21,46	145,40±18,84
изотония	306,70±17,58	215,50±15,30	193,00±15,44	158,10±16,87
гипертония	323,30±22,87	213,90±16,56	172,40±12,54	128,20±19,40

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с изотонией ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

В гемолимфе *P. corneus* наибольшими энергетическими показателями (табл. 5) обладают большие амебоциты. На изменение осмотичности среды энергетические показатели клеток данного типа практически не реагируют. Наименьшими показателями обладают круглые клетки, из-

менения в их энергетических процессах, связанные с инкубацией в растворах с различной осмотичностью также недостоверны. Малые амебоциты и малые гранулярные клетки аналогично не проявляют очевидных реакций.

Таблица 5

**Интенсивность флуоресценции гемоцитов *P. corneus*,
инкубированных в средах с различной осмолярностью**

Среда/тип клеток	БА	МА	МГ	КК
гипотония	193,90±18,22	181,70±15,95	181,10±16,83	147,30±17,86
изотония	214,40±20,98	181,10±16,67	174,80±14,00	153,10±18,35
гипертония	212,00±22,64	221,70±12,19	157,00±18,46	150,20±12,03

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с изотонией ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Наибольшей интенсивностью флуоресценции среди гемоцитов *L. stagnalis* обладают большие амебоциты (табл. 6), их энергетическая активность не показывает достоверных изменений в ответ на изменения осмотичности среды. Малые амебоциты показывают возрастание

энергетических показателей в гипосмотическом растворе. Круглые клетки не проявляют реакций на изменение концентрации солей в инкубационном растворе.

Таблица 6

Интенсивность флуоресценции гемоцитов *L. stagnalis*, инкубированных в средах с различной осмолярностью

Среда/тип клеток	БА	МА	МГ	КК
гипотония	367,70±23,66	307,20±17,18*	156,10±12,76	145,40±18,84
изотония	317,90±25,78	260,00±16,53	151,10±17,23	158,10±16,87
гипертония	345,70±18,33	237,60±14,49	157,40±17,12	128,20±19,40

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с изотонией ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

При исследовании гемоцитов *A. Australis* было выявлено, что наибольшими значениями флуоресценции обладают большие амeboциты (табл. 7), и эти показатели достоверно снижаются при инкубации в гиперосмотическом растворе. При инкубации в гипоосмотическом растворе клетки не проявляют выраженных реакций.

Малые амeboциты отвечают снижением напряженности энергетических процессов на любое изменение осмотичности среды, круглые клетки отвечают снижением показателей на инкубацию в гиперосмотическом растворе, а инкубация их в гипоосмотической среде не вызывает достоверных изменений энергетического статуса.

Таблица 7

Интенсивность флуоресценции гемоцитов *A. australis*, инкубированных в средах с различной осмолярностью

Среда/тип клеток	БА	МА	МГ	КК
гипотония	256,50±15,69	163,20±12,20*	181,90±19,83	147,30±17,86
изотония	270,89±17,31	205,67±18,25	194,20±15,74	153,10±18,35
гипертония	153,40±18,71*	117,10±10,53*	101,00±7,09*	150,20±12,03

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с изотонией ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Заключение. Максимальный уровень флуоресценции зафиксирован у больших амeboцитов всех изученных видов. Это представляется закономерным, исходя из их специфических функций – большие амeboциты имеют, вероятно, наибольшие энергетические запросы в связи со способностью к активному передвижению и фагоцитозу, который требует быстрого изменения формы клетки. Минимальный уровень флуоресценции показали круглые клетки; очевидно,

их низкая энергопотребность объясняется пассивным передвижением и отсутствием способности к образованию псевдоподий, а также к поглощению чужеродных агентов. Наиболее чувствительными к изменению концентрации солей в окружающем растворе являются малые амeboциты, большие амeboциты и в несколько меньшей степени, круглые клетки. Малые гранулярные клетки на изменения осмолярности инкубационного раствора реагируют слабо.

Литература:

1. Adema C.M., Harris R.A., Van Deutekom-Mulder E.C. A comparative study of hemocytes from six different snails: morphology and functional aspects. *J. Inv. Path.*, 1992. 59: 24-32.
2. Adamowicz A., Bolaczek M. Blood cells morphology of the snail *Helix aspersa maxima* (Helicidae), 2003
3. Chang S. J., Tseng S. M., Chou H. Y. Morphological Characterization via Light and Electron Microscopy of the Hemocytes of two Cultured Bivalves: A Comparison Study between the Hard Clam (*Meretrix lusoria*) and Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Zoological Studies*, 2005. 44:144-153.
4. Cima, F., V. Matozzo, M. G. Marin & L. Ballarin. 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. *Fish Shellfish Immunol.* 10:677-693.
5. Ruddell C. L. The fine structure of the granular amebocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 1971 - 18:269-275.
6. Donaghy L., Artigaud S., Sussarellu R., Lambert C., Le Goïc N., Hégaret H., Soudant P. Tolerance of bivalve mollusc hemocytes to variable oxygen availability: a mitochondrial origin. *Aquatic Living Resources*, 26, pp 257-261. 2013
7. Sminia T. Structure and function of blood and connective tissue cells of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. *Z Zellforsch* 1972 – 130:497-526.
8. Wen C. H., Kou G. H., Chen S. N. Light and electron microscopy of hemocytes of the hard clam, *Meretrix lusoria* (Roding). *Comp. Biochem. Physiol.* 1994 - 108:270-286.

9. Zbikowska E. Comparative quantitative studies of hemocytes of the snails: *Helix pomatia* L. and *Lymnaea stagnalis* (L.) (Gastropoda: Pulmonata). *Biol. Bull. Poznań* 1998 - 35:25-32.
10. Accorsi A., Bucci L., Eguileor M., Ottaviani E., Malagoli D., Comparative analysis of circulating hemocytes of the freshwater snail *Pomacea canaliculata* – *Fish and shellfish immunology*, 2013. 1-9.
11. Присный А.А. Практикум по физиологии беспозвоночных животных, Белгород: Изд-во БелГУ, 2013 г.
12. 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 – 57(1):1-16.

References:

1. Adema C.M., Harris R.A., Van Deutekom-Mulder E.C. A comparative study of hemocytes from six different snails: morphology and functional aspects. *J. Inv. Path.*, 1992. 59: pp. 24-32.
2. Adamowicz A., Bolaczek M. Blood cells morphology of the snail *Helix aspersa maxima* (Helicidae), 2003.
3. Chang S. J., Tseng S. M., Chou H. Y. Morphological Characterization via Light and Electron Microscopy of the Hemocytes of two Cultured Bivalves: A Comparison Study between the Hard Clam (*Meretrix lusoria*) and Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Zoological Studies*, 2005. 44: pp. 144-153.
4. Cima, F., V. Matozzo, M. G. Marin & L. Ballarin. 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. *Fish Shellfish Immunol.* 10: pp. 677-693.

5. Ruddell C. L. The fine structure of the granular amebocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 1971 - 18:269-275.
6. Donaghy L., Artigaud S., Sussarellu R., Lambert C., Le Goïc N., Hégaret H., Souchant P. Tolerance of bivalve mollusc hemocytes to variable oxygen availability: a mitochondrial origin. *Aquatic Living Resources*, 26, pp. 257-261. 2013.
7. Sminia T. Structure and function of blood and connective tissue cells of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. *Z Zellforsch* 1972 – 130: pp. 497-526.
8. Wen C. H., Kou G. H., Chen S. N. Light and electron microscopy of hemocytes of the hard clam, *Meretrix lusuria* (Roding). *Comp. Biochem. Physiol.* 1994 - 108:270-286.
9. Zbikowska E. Comparative quantitative studies of hemocytes of the snails: *Helix pomatia* L. and *Lymnaea stagnalis* (L.) (Gastropoda: Pulmonata). *Biol. Bull. Poznań* 1998 - 35:25-32.
10. Accorsi A., Bucci L., Eguileor M., Ottaviani E., Malagoli D., Comparative analysis of circulating hemocytes of the freshwater snail *Pomacea canaliculata* – *Fish and shellfish immunology*, 2013. pp. 1-9.
11. Prisny A.A. *Praktikum po fiziologii bespozvonochnyh zhivotnyh* [Practical Course on Physiology of Invertebrate Animals]. Belgorod: BSU Publ., 2013.
12. 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 – 57(1):1-16.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ

Кулько
Светлана Владимировна
аспирант

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

E-mail: psychonautica@inbox.ru

DATA ABOUT THE AUTHOR

Kulko Svatlana Vladimirovna
Postgraduate Student
Belgorod State National
Research University

85, Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia
E-mail: psychonautica@inbox.ru