

УДК 591.111.1:595.76

ГРЕБЦОВА Е.А.
*GREBTSOVA E.A.***СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА
ГЕМОЛИМФЫ ЛИЧИНОК И ИМАГО ZOPHOBAS MORIO****THE COMPARATIVE ANALYSIS OF CELL COUNTS
IN LARVAE AND ADULTS OF ZOPHOBAS MORIO****Аннотация**

Поведен сравнительный анализ клеточного состава гемолимфы личинок и имаго *Zophobas morio*. Для обеих групп доминирующим типом форменных элементов гемолимфы являются плазмциты. Веретенновидные клетки у личинок появляются лишь через некоторое время после повреждения покровов. Определены показатель упругости гемоцитов и параметры, служащие для характеристики шероховатости поверхности клеток. Максимальные значения Модуля Юнга демонстрируют плазмциты личинок.

Ключевые слова: гемоциты; Модуль Юнга; упругость; шероховатость поверхности клеток.

Abstract

The author compares the cell counts in larvae and adults of *Zophobas morio*. Plasmatocytes are the dominant type of the formed elements of hemolymph in both groups. Larval vermicytes appear within some minutes after damaging the integument. The study reveals the parameter of elasticity and characteristics of the cell surface roughness. Larval plasmatocytes demonstrate a maximum value of Young's modulus.

Key words: hemocytes; Young's modulus; elasticity; cell surface roughness.

Общее физиологическое состояние организма насекомых может быть охарактеризовано общим количеством гемоцитов в единице объема и соотношением их типов [5, с.1740-1755; 7, с.7-65; 9, с.7-20]. Формула гемолимфы существенно изменяется в разных стадиях развития вида и даже на протяжении одной стадии [1, с.73-79; 4, с.5971-5982].

Шероховатость поверхности, т.е. совокупность неровностей, образующих микрорельеф поверхности с относитель-

но малыми шагами, является причиной того, что истинная площадь поверхности выше, чем геометрическая [8, с.421-423; 10, с. 942-944]. Количественная оценка шероховатости поверхности мембран имеет важное практическое значение, так как позволяет выявить влияние гомогенности или гетерогенности поверхности на процессы захвата инородных объектов и устойчивость к гипоосмотическим нагрузкам (3, с. 557-575; 6, с. 919-929).

Материалы и методы исследования. Пробы гемолимфы *Zophobas morio* брали у каждой особи по 2 раза, с промежутком в 1 час. Фиксировали изменения гемоцитарного состава с течением времени. После окукливания личинок провели повторную серию экспериментов с двукратным отбором гемолимфы.

Прижизненные особенности клеток изучали в физиологическом растворе с использованием инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E. Провели типологизацию форменных элементов гемолимфы. В результате подсчета 100 гемоцитов строили гистограмму – запись морфологического состава гемолимфы каждой особи. На основании сопоставления гистограмм выводили формулу гемолимфы насекомых данного вида [1, с. 73-79].

Высушенные на воздухе нефиксированные препараты исследовали с помощью атомно-силового микроскопа. Данные по свойствам упругости и адгезии были получены в режиме атомно-силовой спектроскопии при наложении нагрузки в 16 локальных участках клеточной поверхности. Анализ зависимости деформации образца от приложенной нагрузки позволил количественно оценить модуль упругости и сравнить этот показатель на разных участках клеточной поверхности.

С помощью программного приложения Image Analysis P9 проведен анализ амплитудных (или, так называемых, высотных) среднестатистических параметров, служащих для характеристики нерегулярности поверхности в вертикальном направлении [2, с. 32-40].

Средняя квадратическая шероховатость S_q (Square Roughness, nm) – является определяющей характеристикой шероховатости.

Параметры S_p (Maximum Peak Height, nm) и S_v (Maximum Valley Depth, nm) определяются как высота самого высокого пика и глубина самой глубокой впадины, отсчитанные от средней плоскости. Поскольку

по определению величина S_v равна расстоянию от нижней точки поверхности до уровня средней плоскости, то S_v соответствует средней толщине поверхностного слоя.

Асимметрия S_{sk} (Skewness) – характеризует скошенность распределения профиля, когда один спад крутой, а другой – пологий;

Эксцесс S_{ku} (Kurtosis) характеризует протяженность распределения профиля.

Параметр S_z (Maximum height of the scale limited surface) – максимальная высота рельефа поверхности, определяемая как разность высот между самой высокой и самой низкой точками поверхности на выборочной площади. Этот параметр соответствует толщине поверхностного слоя, заключенного между плоскостями, проходящими через самую низкую и самую высокую точки поверхности. Ниже этого слоя лежит сплошной материал. Таким образом, S_z можно рассматривать как параметр, характеризующий толщину поверхностного, возмущенного слоя, не полностью заполненного материалом, в котором происходит изменение рельефа.

Также были определены значения одного из функциональных параметров, характеризующих рельеф в локальной области и степень гладкости поверхности – плотность вершин (пиков) S_{ds} ($1/\mu m^2$). Данный показатель демонстрирует количество вершин на единицу площади, составляющих поверхность.

Результаты исследования и их обсуждение. Гемоцитарный состав *Z. morio* неодинаков для исследуемых групп. Было выявлено различие в процентном соотношении разных типов клеток (табл. 1). Выявлено 3 типа форменных элементов гемолимфы: прогемоциты, плазмоциты и вермициты (рис. 1).

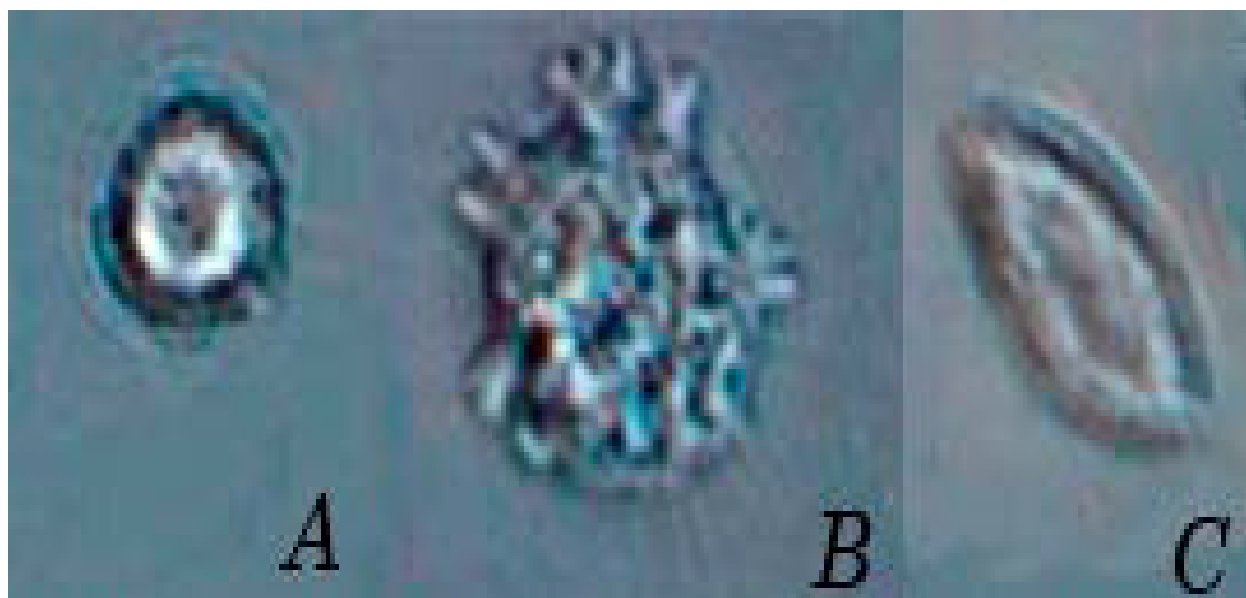


Рис.1. Нативные форменные элементы гемолимфы *Z. morio*:
A – прогемоцит, B – плазмоцит, C – веретеновидный гемоцит

Прогемоциты – округлые клетки, диаметром от 5 до 7 μm . Ядро занимает большую часть цитоплазмы. Не способны к активному передвижению, псевдоподий не образуют.

Плазмоциты – полиморфные клетки. Быстро распластываются по подложке, постепенно формируя широкий цитоплазматический обод по периферии.

Способны к образованию филоподий длиной до 1,8 μm и коротких ризоподий.

Вермициты сильно уплощены в дорзо-вентральном направлении, имеют веретеновидную или листовидную форму. На полюсах клеток могут образовываться пучки коротких неветвящихся псевдоподий.

Таблица 1

Гемоцитарная формула *Z. morio* на разных стадиях развития

Типы гемоцитов	Pro	Pl	Ve
Личинки (первый отбор проб)	24%	76%	–
Личинки (второй отбор проб спустя 1 час)	13%	65%	22%
Имаго	–	68%	32%

Pro – прогемоциты, Pl – плазмоциты, Ve – веретеновидные гемоциты

В гемолимфе личинок веретеновидные клетки (Ve) возникали лишь после повторного взятия пробы, что можно объяснить как реакцию организма на по-

вреждение покровов (рис. 2). У взрослых особей данный тип форменных элементов был обнаружен сразу после первого отбора гемолимфы.

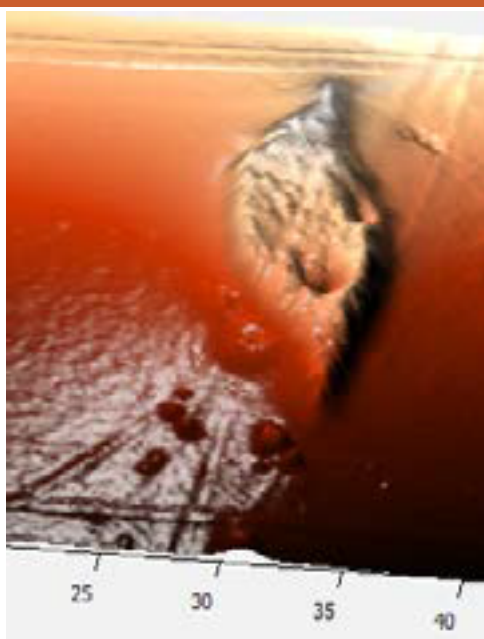


Рис.2. Веретеновидный гемоцит *Z.morio*

Прогемоциты (Pro), являющиеся родоначальниками остальных форменных элементов гемолимфы, присутствовали лишь на личиночной стадии развития (рис. 3).

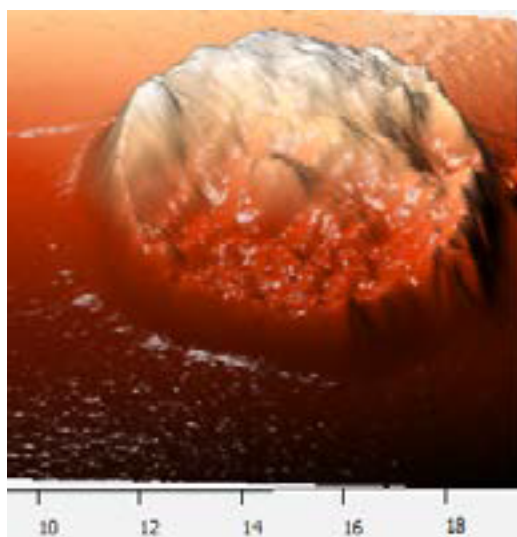


Рис.3. Прогемоцит *Z.morio*

Доминирующим типом клеток в обеих группах были плазмоциты (Pl), активно участвующие в процессах фагоцитоза (рис. 4).

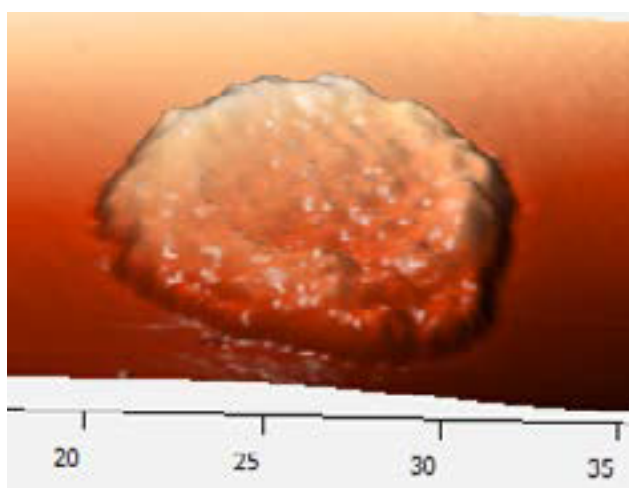


Рис.4. Плазмоцит *Z.morio*

Линейные размеры гемоцитов среди исследуемых групп не имеют достоверных отличий (табл. 2).

Таблица 2

Линейные размеры гемоцитов личинок и имаго *Z. morio*

	Тип гемоцитов	Длина клетки	Ширина клетки	Длина ядра	Ширина ядра
Личинки	Pro	7,5±0,6	6,9±0,7	4,7±0,5	4±0,2
	Pl	11,80±0,8	7,9±0,5	5,8±0,3	5,1±0,3
	Ve	14,7±1,7	6,1±0,1	5,3±0,2	4,0±0,05
Имаго	Pl	11,4±0,8	7,3±0,3	5,9±0,1	5,3±0,4
	Ve	13,2±	5,9±0,3	4,8±0,4	4,8±0,1

Модуль Юнга, характеризующий упругость поверхности гемоцитов, принимает максимальные значения для плазмоцитов (Pl) личинок (45,6±0,5 nN). У взрослых особей этот показатель не превышает 30,7 nN. Упругость веретенovidных гемоцитов (Ve) обеих групп насекомых составляет 45,5±0,4 nN.

Поверхность всех клеток характеризуется отсутствием экстремальных пиков и впадин, о чем свидетельствует значение параметра $S_{ku}=2,5$. $S_{sk}>0$ и не превышает трех, что говорит о приблизительно равном соотношении выростов и углублений мембраны.

Толщина поверхностного возмущенного слоя у плазмоцитов больше, чем у веретенovidных клеток (табл. 3). Величина параметра Sz у гемоцитов личинок превышает таковую у имаго, однако число выступов на единицу площади (S_{ds}) у гемоцитов взрослых особей почти в 2 раза выше.

Углубления максимальной величины (≈ 300 nm) характерны для вермицитов. Выросты же на поверхности клеток для исследуемых групп находятся в диапазоне 350-450 nm.

Таблица 3

**Параметры, характеризующие микрорельеф
поверхности гемоцитов и их упругость**

Показатели	Личинки		Имаго	
	Pl	Ve	Pl	Ve
Модуль Юнга	45,6±0,7	45,8±0,4	30,7±1,1	45,5±0,3
Sq	48,3±13,8	31±4,7	55,6±6,6	26,3±9,4
Sv	125±32	321±36	134±37	348±46
Sp	335±24	469±38	396±27	377±23
Sku	2,8±0,7	2,5±0,3	2,5±0,1	2,7±0,02
Ssk	0,9±0,2	0,4±0,2	0,4±0,1	0,6±0,1
Sds	1,27±0,4	1,1±0,2	2±0,3	1,9±0,5
Sz	210±28	148±10	262±29	148±31

Заключение. Гемоцитарная формула отличается на разных стадиях развития насекомого. Так, для личинок младших возрастов характерно содержание большого количества прогемоцитов, в то время как у взрослых особей они не были обнаружены. Применение АСМ позволяет оценить такие параметры гемоцитов, как микрорельеф клеточной поверхности, линейные размеры клеток, включая высоту. К числу

важнейших применений атомно-силовой микроскопии относится использование АСМ для изучения механических (упругих) свойств плазмалеммы. Мембрана вермицитов и плазмоцитов имеет многочисленные выступы и впадины, формирующие мембранный резерв клеток. Максимальный коэффициент шероховатости свойствен гемоцитам, принимающим активное участие в фагоцитозе..

Литература:

1. Злотин А.З. Техническая энтомология. – Киев: Наукова Думка, 1989. – С. 73-79.
2. Новак А.В., Новак В.Р. Шероховатость пленок аморфного, поликристаллического кремния и поликристаллического кремния с полусферическими зернами. Письма в ЖТФ, 2013, том 39, вып. 19, С. 32-40
3. Трасатти С. Измерения истинной площади поверхности в электрохимии / С. Трасатти, О.А. Петрий // Электрохимия. – 1993. – Т. 29. – № 4. – С. 557–575.
4. Deng, Z. Applications of atomic force microscopy in biophysical chemistry of cells / Z. Deng, V. Lulevich, F.T. Liu, G.Y. Liu // The journal of physical chemistry. B. – 2010. – Vol.114. – No.18. – P.5971-5982.
5. Hinks C.F., Arnold J.W. Haemopoiesis in Lepidoptera. II. The role of the haemopoietic organs. – Can J Zool – 1977– P.1740–1755.
6. Hörber J.K. Investigation of living cells in the nanometer regime with the scanning force microscope / J.K. Hörber, W. Hiiberle, F. Ohnesorge, G. Binnig, H.G. Liebich, C.P. Czerny, H. Mahnel, and A. Mayr // Scanning Microsc. – 1992. – Vol.6. – P.919-929.
7. Jones J.C. Haemocytopoiesis in Insects. // In: Regulation of Haemocytopoiesis in In-

- sects, Gordon, A.S. (Ed.). – 1970. – Vol. 1. – P. 7-65.
8. Ushiki T. Atomic force microscopy in histology and cytology / T. Ushiki, J. Hitomi, S. Ogura, T. Umamoto, M. Shigeno // Archives of histology and cytology. – 1996. – Vol.59. – No.5. – P.421-423.
9. Wang C.L., Wang Z.X., Kariuki M.M., Ling Q.Z., Kiguchi K., Ling E.J. Physiological functions of hemocytes newly emerged from the cultured hematopoietic organs in the silkworm, *Bombyx mori* // Insect Sci. – 2010.–Vol. 17. – P. 7-20.
10. Wu Y. Membrane surface nanostructures and adhesion property of T lymphocytes exploited by AFM / Y. Wu, H. Lu, J. Cai, X. He, Y. Hu, H. Zhao, X. Wang // Nanoscale Res Lett. – 2009. – Vol.4. – P.942-944.

References:

1. Zlotin A.Z. *Tekhnicheskaya entomologiya* [Technical Entomology]. Kiev: Naukova Dumka, 1989. pp. 73-79.
2. Novak A.V., Novak V.R. *Sherokhovatost' plenok amorfnoho, polikristallicheskogo kremniya i polikristallicheskogo kremniya s polusfericheskimi zernami. Pis'ma v ZhTF* [The Roughness of Amorphous Polycrystal Membranes and the Polycrystal with Polyspherical Grains. Letters in Journal of Theoretical Physics]. 2013. pp. 32-40.

3. Trassaty S. *Izmereniya istinnoy ploshchadi poverkhnosti v elektrokhimii // Elektrokhimiya* [Measuring the True Surface in Electrochemistry]. 1993. pp. 557-575.
4. Deng Z. Applications of atomic force microscopy in biophysical chemistry of cells / Z. Deng, V. Lulevich, F.T. Liu, G.Y. Liu // *The Journal of Physical Chemistry*, 2010. pp. 5971-5982.
5. Hinks C.F., Arnold J.W. Haemopoiesis in Lepidoptera. II. The role of the haemopoietic organs. *Can J Zool.* 1977. pp. 1740-1755.
6. Hörber J.K. Investigation of living cells in the nanometer regime with the scanning force microscope / J.K. Hörber, W. Hiiberle, F. Ohnesorge, G. Binnig, H.G. Liebich, C.P. Czermy, H. Mahnel, and A. Mayr // *Scanning Microsc.*, 1992. pp. 919-929.
7. Jones J.C. Haemocytogenesis in Insects. // In: *Regulation of Haemocytogenesis in Insects*, Gordon, A.S. (Ed.), 1970. pp. 7-65.
8. Ushiki T. Atomic force microscopy in histology and cytology / T. Ushiki, J. Hitomi, S. Ogura, T. Umemoto, M. Shigeno // *Archives of Histology and Cytology*, 1996. pp. 421-423.
9. Wang C.L., Wang Z.X., Kariuki M.M., Ling Q.Z., Kiguchi K., Ling E.J. Physiological functions of hemocytes newly emerged from the cultured hematopoietic organs in the silkworm, *Bombyx mori*. // *Insect Sci.*, 2010. pp. 7-20.
10. Wu Y. Membrane surface nanostructures and adhesion property of T lymphocytes exploited by AFM / Y. Wu, H. Lu, J. Cai, X. He, Y. Hu, H. Zhao, X. Wang // *Nanoscale Res Lett.*, 2009. pp. 942-944.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ**Гребцова****Елена Александровна**

аспирант

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

*E-mail: shtirlitz009@mail.ru***DATA****ABOUT THE AUTHOR****Grebtsova****Elena Alexandrovna***Postgraduate Student*

Belgorod State National
Research University

85, Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

E-mail: shtirlitz009@mail.ru