

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«Белгородский государственный национальный
исследовательский университет»

На правах рукописи

ГРЕБЦОВА Елена Александровна

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И
ОСМОРЕГУЛЯТОРНЫЕ РЕАКЦИИ ГЕМОЦИТОВ
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ОТРЯДА DICTYOPTERA**

03.03.01 – физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук, доцент
А.А. Присный

Белгород – 2017

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Подходы к классификации форменных элементов гемолимфы насекомых	11
1.2. Особенности иммунных реакций у насекомых	33
1.2.1. Гемоцитарные и гуморальные защитные механизмы насекомых	36
1.2.2. Клеточная адгезия и взаимодействие гемоцитов, приводящее к распознаванию собственных и инородных клеток	38
1.2.3. Коагуляция гемолимфы у насекомых	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	48
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	66
3.1. Гемоцитарный состав гемолимфы представителей отряда Dictyoptera	66
3.2. Морфофизиологические показатели гемоцитов представителей отряда Dictyoptera в норме и при осмотической нагрузке	76
3.2.1. Изменение объема и использование мембранного резерва гемоцитами в условиях осмотической нагрузки	76
3.2.2. Показатели фагоцитарной активности гемоцитов в норме и при осмотической нагрузке	90
3.3. Упруго-эластические свойства и топография поверхности гемоцитов в норме и условиях осмотической нагрузки	91
3.3.1. Влияние осмотической нагрузки на упругость и адгезионные свойства плазмалеммы гемоцитов	91
3.3.2. Топография поверхности гемоцитов в условиях осмотической нагрузки	96
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	144
ВЫВОДЫ	161
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	163
Список литературы	164

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АСМ – атомно-силовая микроскопия;
- ГПО – гемопозитический орган;
- И – изотонический (физиологический) раствор хлорида натрия;
- СГ – сильно гипотонический раствор хлорида натрия;
- a – большая полуось, т.е. $\frac{1}{2}$ длины гемоцита (μm);
- b – малая полуось, т.е. $\frac{1}{2}$ высоты гемоцита (μm);
- c – средняя полуось, т.е. $\frac{1}{2}$ ширины гемоцита (μm);
- Co– (coagulocytes) коагулоциты;
- Cr– (crescent cells) серповидные эноцитойды;
- Gr – (granulocytes) гранулоциты;
- MR – относительный мембранный резерв (%);
- Oe (oenocytoides) – эноцитойды
- Pl (plasmocytes) – плазмоциты;
- Pr (prohemocytes) – прогемоциты;
- S – площадь поверхности гемоцита (μm^2);
- ΔS – резерв плазматической мембраны клетки (μm^2);
- Sds – плотность вершин (пиков) ($1/\mu\text{m}^2$)
- Sku (Kurtosis) – эксцесс, характеризующий протяженность распределения профиля;
- Sp (Maximum Peak Height, nm) – высота самого высокого пика (nm);
- Sph (spherulocytes) – сферулоциты;
- Sq (Square Roughness) – средняя квадратическая шероховатость;
- Ssk (Skewness) – асимметрия, которая характеризует скошенность распределения профиля;
- Sv (Maximum Valley Depth, nm) – глубина самой глубокой впадины (nm);
- Sz – толщина поверхностного возмущенного слоя (nm);
- V – объём гемоцита (μm^3);
- Ver (vermicytes) – вермициты.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Гемолимфа беспозвоночных животных выполняет все необходимые для организма функции, несмотря на простоту организации, и характеризует физиологический статус животного, а так же эволюционную ступень развития. Представители класса Насекомые известны как одна из самых высокоорганизованных таксономических групп беспозвоночных. Разнообразные виды воздействий оказывают влияние на организм насекомых на физиологическом уровне и обуславливают их жизнеспособность. В настоящее время не установлены конкретные критерии оценки физиологического состояния насекомых. Результаты изучения влияния стрессоров и их идентификации по изменению морфологических показателей зачастую являются противоречивыми и обманчивыми. Очень сложно определить, какой конкретно фактор оказал то или иное воздействие. Поэтому исследователи нуждаются в точной информации о физиологически и биохимически активных и чувствительных компонентах организма насекомых (Akai H., Sato S., 1973; Alaux C. et al., 2010; Tiwari R.K. et al., 2006). Появление новых данных в области физиологии и иммунологии насекомых имеют значение для изучения филогенеза иммунных реакций у представителей царства Животные в целом (Галактионов В.Г., 1995, 1998, 2005; Давтян Т.К. с соавт., 2007; Житенева Л. Д. с соавт., 2001). Помимо теоретического интереса существует и важный практический аспект, поскольку ряд видов насекомых являются переносчиками инфекционных заболеваний животных и человека (Игнатов П.Е., 2002).

Таракановые (Dictyoptera) являются одной из наиболее древних групп насекомых. Высокая плодовитость, круглогодичная активность, способность к изменению поведенческих реакций в различных условиях обитания, возникновение популяций, устойчивых к современным инсектицидам, способствуют расселению видов тараканов и приобретению ими доминирующего положения среди синантропных членистоногих.

Полифагия, способность к быстрым перемещениям, контакт с продуктами питания и различными отходами, определяют значение тараканов как переносчиков возбудителей инфекционных и паразитарных заболеваний животных и человека. Продукты жизнедеятельности тараканов являются источником аллергенов и причиной возникновения аллергических заболеваний (Алешо Н.А., 1993; Дремова В.П., Алешо Н.А., 2011).

Степень разработанности темы исследования. Наука о гемоцитах обширна и является перманентно актуальной. Выделение и идентификация гемоцитов важны для изучения клеточного иммунитета насекомых. В 1758 году Шваммердам впервые описал клетки гемолимфы насекомых (гемоциты) как «транспортные капли» (Schwammerdam J., 1758). Циркуляция гемоцитов играет жизненно важную роль в механизмах защиты организма насекомого от воздействия патогенных микроорганизмов. Несмотря на то, что в течение следующих 250 лет было проведено множество исследований форменных элементов гемолимфы, часть физиологических и морфологических аспектов все еще осталась необъясненной. В последние годы осуществлен ряд исследований морфофункционального статуса гемоцитов беспозвоночных животных (Кулько С.В., 2015; Пигалева Т.А., 2015; Присный А.А., 2016), однако изучению представителей насекомых в целом, и таракановых, в частности, уделено недостаточно внимания. Гемоциты являются необходимым компонентом иммунной системы насекомых, выполняют множество функций: коагуляция, фагоцитоз и инкапсуляция, синтез и транспорт нутриентов и гормонов для заживления ран посредством формирования соединительной ткани (Russo J., 1996; Silva J.E.V. et al., 2002). Влияние различных стрессоров на физиологическое состояние насекомых изучено недостаточно (Pandey J.P., 2004).

Несмотря на значительное количество работ, направленных на изучение функциональных и морфологических особенностей гемоцитов насекомых (Schmidt O., 1992; Berger J., Slavíčková K., 2008; Lawrence P.O.,

2008; Scapigliati G., 1993), проблема систематизации и всестороннего исследования клеток гемолимфы является актуальной для современных сравнительно-физиологических исследований. Изучение изменений морфофизиологических показателей и реактивности клеток в условиях осмотической нагрузки позволяет оценить участие отдельных гемоцитарных типов в адаптации организма в целом. Встречающиеся в литературе названия типов гемоцитов могут отличаться между таксономическими группами. Таким образом, типологические системы и применяемые критерии для идентификации и классификации гемоцитов могут полностью не соответствовать в работах разных авторов (Pandey J.P. et al., 2008a).

В связи с вышесказанным была сформулирована цель исследования и поставлены основные задачи.

Цель работы: осуществить сравнительную оценку функциональных и структурных показателей гемоцитов представителей отряда Dictyoptera в норме и в условиях осмотической нагрузки.

Задачи исследования:

1. Разработать функциональную типологию гемоцитов и на ее основе составить гемоцитарную формулу клеток гемолимфы представителей отряда Dictyoptera.

2. Изучить морфофункциональные характеристики гемоцитов исследованных видов в норме и при инкубации в условиях осмотической нагрузки.

3. Оценить интенсивность использования гемоцитами мембранного резерва при осуществлении нагрузочных осмотических тестов *in vitro*.

4. Осуществить анализ характера изменений упруго-эластических, адгезионных свойств мембраны и топографии поверхности гемоцитов в норме и в условиях осмотической нагрузки.

Научная новизна

Впервые предложена рациональная классификация гемоцитов *Periplaneta americana*, *Blatta orientalis*, *Shelfordella tartara*, *Blattella germanica*, *Gromphadorhina portentosa*, *Blaberus craniifer* и *Nauphoeta cinerea* на основе функциональных и морфологических характеристик. В выполненном исследовании впервые дана характеристика гемоцитарной формулы гемолимфы для 7 видов тараканов. Идентифицировано восемь клеточных типов, встречающихся в различных сочетаниях в зависимости от вида. Установлено наличие в гемолимфе тараканов 3 типов фагоцитирующих клеток.

Впервые изучены осморегуляторные реакции гемоцитов 7 видов отряда Dictyoptera. Впервые исследована топография поверхности клеточных элементов гемолимфы, проведена оценка упругости и силы адгезии мембраны гемоцитов представителей отряда Dictyoptera, а также выявлены изменения этих параметров при осмотической нагрузке.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования расширяют и углубляют имеющиеся представления о компенсаторных гомеостатических реакциях гемоцитов насекомых и могут быть использованы для последующего изучения механизмов ответа на осмотическую нагрузку.

Полученные данные о типологии форменных элементов гемолимфы представителей отряда Dictyoptera дополняют имеющуюся информацию об анатомии и физиологии беспозвоночных животных. Определение морфофизиологических реакций клеток гемолимфы при воздействии осмотической нагрузки расширяет и углубляет существующие представления о клеточных механизмах адаптации гемоцитов насекомых.

Выявленные в ходе исследования изменения морфофункциональных свойств гемоцитов следует учитывать при использовании представителей отряда Dictyoptera в ходе биомониторинга.

Полученные результаты используются в учебном процессе на кафедре биологии НИУ «БелГУ», при написании учебных и методических пособий по дисциплинам: «Физиология животных», «Биофизика», «Функциональная морфология животных» для студентов направления подготовки 06.03.01 – Биология; «Эволюционная физиология» для магистрантов по направлению 06.04.01 – Биология, магистерская программа «Физиология человека и животных».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Гемоцитарная формула клеток гемолимфы представителей отряда Dictyoptera включает восемь клеточных типов: прогемоциты, плазмоциты, гранулоциты, сферулоциты, веретеновидные плазмоциты (вермициты), коагулоциты, эноцитоиды и серповидные эноцитоиды.

2. Гемоциты исследованных видов отряда Dictyoptera в пределах использованной осмотической нагрузки сохраняют подвижность и морфологическую целостность при снижении способности к выполнению защитных функций.

3. Морфофункциональные реакции гемоцитов представителей отряда Dictyoptera при воздействии осмотической нагрузки осуществляются за счет мобилизации мембранного резерва плазмалеммы и сопровождаются изменениями микрорельефа поверхности клеточных мембран.

4. Изменение упруго-эластических и адгезионных свойств гемоцитов представителей отряда Dictyoptera в условиях осмотической нагрузки связано со специфическими функциями, выполняемыми клетками.

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием репрезентативной выборки объектов, соответствующей целям и задачам исследования, применением современных методов и сертифицированного высокоточного микроскопического оборудования, соответствующих компьютерных программ обработки и анализа изображений, достаточным объемом фактического материала, обработанным с помощью методов статистики, применяемых в

биологических исследованиях; публикацией результатов работы в рецензируемых журналах.

Личный вклад автора. Основные результаты получены автором самостоятельно. Автор лично осуществлял планирование экспериментов и обобщал полученные данные. Исследования с использованием световой и атомно-силовой микроскопии осуществлены самостоятельно. Выводы сделаны на основе собственных оригинальных данных.

Апробация результатов работы

Материалы, изложенные в диссертации, доложены и обсуждены на II Международной заочной научно-практической конференции «Инновации в науке: пути развития» (Чебоксары, 2012), XI Всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми НЦ УрО РАН (Сыктывкар, 2012), «Современные научно-практические достижения в морфологии животного мира» (Брянск, 2012, 2013), V Всероссийской научно-практической конференции «Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2012), IV съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012), Международной научно-практической конференции «Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды» (Челябинск, 2012, 2014), Всероссийской научной конференции с международным участием «Животные: экология, биология и охрана» (Саранск, 2012), Международной научной конференции «Микроциркуляция и гемореология» (Ярославль, 2013, 2015), XXII съезде Физиологического общества имени И. П. Павлова (Волгоград, 2013), VII Всероссийском конгрессе молодых биологов «Симбиоз-Россия 2014» (Екатеринбург, 2014), «Biological motility: new facts and hypotheses» (Pushchino, 2016), Пятнадцатом Всероссийском Совещании с международным участием и восьмой Школе по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2016).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 22 научные работы общим объемом 8,2 п.л., авторский вклад – 4,97 п.л., в том числе 5 статей в журналах рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 184 страницах, содержит 70 таблиц и 84 рисунка. Список литературы включает 201 наименование, из которых 44 отечественных и 157 иностранных источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Подходы к классификации форменных элементов гемолимфы насекомых

Насекомые – эволюционно успешные организмы, составляющие приблизительно 75% от численности всех животных. До конца не ясно, как, будучи пойкилотермными организмами, без приобретенных иммунных реакций, они выживают во всех географических областях мира. Эффективная иммунная система – один из показателей такого эволюционного успеха. Необходимо тщательное изучение механизмов гемоцитарных иммунных реакций. Изменения во внутренней среде организма, вызванные стрессорами, могут быть использованы в качестве индикатора физиологического состояния в прикладных и биомедицинских науках (Pandey J.P., Tiwari R.K., 2007).

Система циркуляции насекомых имеет почти полностью открытый тип, гемолимфа ограничена полостью тела или гемоцелом. Спинной сосуд – замкнутая структура, выполняющая функцию главного циркуляторного насоса. Гемолимфа – внеклеточная циркулирующая жидкость, которая заполняет полость тела насекомого. Она физически изолирована от прямого контакта с тканями тела тонкой водопроницаемой мембраной, которая покрывает гемоцель (Житенева Л.Д. с соавт., 2001). Гемоциты, плазма и растворенные неорганические и органические молекулы составляют гемолимфу. Питательные вещества, продукты обмена, гормоны и множество других веществ также транспортируются в гемолимфу для распределения к различным тканям (Pathak J.P.N., 1993).

К настоящему времени известно, что беспозвоночные, в том числе и насекомые, обладают неадаптивным иммунитетом, для которого характерна низкая специфичность, отсутствие иммунологической памяти и индуцибельных высокоспецифичных иммуноглобулинов. При этом следует отметить высокую эффективность систем, которые участвуют в формировании иммунного ответа, в результате которого осуществляется

элиминация чужеродных объектов, в том числе и патогенных, из организма насекомых (Хвощевская М.Ф., 2003; Ratcliffe N.A., Rowley A.F., 1975; Lackie A.M., 1988; Bangham J. et al., 2006; Shin S.W. et al., 2005).

Насекомые демонстрируют разнообразные формы иммунологического ответа на внедрение в организм чужеродных агентов, включая микроорганизмы, многоклеточных паразитов, имплантированные ткани и т.д. Иммунная система представлена клеточными и гуморальными компонентами, которые взаимодействуют во время иммунной реакции в манере, сопоставимой с иммунитетом позвоночных животных. Наиболее существенной составляющей в иммунном ответе насекомых является клеточная система, представляющая собой популяцию свободно циркулирующих клеток крови (гемоцитов), перикардальных клеток и гемопоэтической ткани (Хвощевская М.Ф., 2003; Pandey J.P., 2004).

Гемоциты – клетки, которые циркулируют в прозрачной жидкости, плазме, в пределах гемоцеля насекомых. У большинства личинок насекомых гемоцитопоэз происходит в гемопоэтических органах, где осуществляется их деление и дифференцировка. Гемоциты либо находятся в свободном взвешенном состоянии в плазме, либо оседают на поверхности внутренних органов. У большинства насекомых в 1 мм³ гемолимфы содержится от 10000 до 100000 клеток. Общее число гемоцитов, циркулирующих в теле таракана, составляет 9-13 миллионов, а их суммарный объем достигает 10% от общего объема гемолимфы (Тыщенко В.П., 1986).

Число и типы гемоцитов отличаются в зависимости от видовой принадлежности насекомых, стадии развития и физиологического состояния. Число гемоцитов в единице объема увеличивается в ходе личиночного развития, достигая максимума после каждой личиночной линьки. Качественные и количественные колебания в популяции гемоцитов также могут возникать под влиянием эндокринной системы, микробных и паразитарных инфекций (Присный А.А., 2016; Beckage N., 2008).

Гемоциты – клетки мезодермального происхождения, которые выполняют несколько физиологических функций, включая защиту от болезнетворных микроорганизмов. В гемоцитах присутствуют гликоген, нейтральные мукополисахариды, фосфолипиды, аскорбиновая кислота, различные ферменты и гормоны. Благодаря такому биохимическому составу, гемоциты участвуют в тканевом обмене, выполняя трофическую функцию. Клетки гемолимфы играют также формообразующую роль, выделяя вещества, которые способствуют образованию новых тканей, или непосредственно дифференцируются в другие типы клеток. Такие гемоциты, как плазмоциты, мигрируют к поверхности тканей, где путем выделения специфических секретов участвуют в формировании базальной мембраны. Из-за крупных размеров гемоциты не поступают в отдельные участки сосудистого русла: сердце, дорсальный сосуд, сосуды крыльев. Клетки гемолимфы первыми взаимодействуют с проникшими в гемоцель чужеродными объектами и инициируют запуск ряда механизмов защитных реакций. Клеточный иммунитет насекомых включает в себя фагоцитоз, инкапсуляцию и нодуляцию, которые могут сопровождаться меланизацией (Хвощевская М.Ф., 2003). Определены некоторые молекулярные и клеточные механизмы, которые регулируют и поддерживают иммунитет насекомых (Gupta A.P, 1985a; Brehelin M., Zachary D., 1986; Lackie A.M., 1988; Gillespie P.J. et al., 1997; Gardiner E.M., Strand M.R., 1999, 2000; Lavine M.D., Strand M.R., 2002).

Основной преградой для исследований клеточного иммунитета является отсутствие единой классификации гемоцитов (Присный А.А., 2016). Литература содержит множество различных названий клеток гемолимфы насекомых, описывающих несколько морфотипов (табл. 1) (Gupta A.P., 1979; Ratcliffe N.A. et al., 1985; Lackie A.M., 1988; Ribeiro C., Brehelin M., 2006).

Общепринято, что основными типами гемоцитов, вовлеченными в иммунологические реакции, являются плазмоциты и гранулоциты. Данные клетки путем фагоцитоза уничтожают бактерий и другие инородные

объекты; некоторые заключают в капсулу яйца паразитических организмов. Часть гемоцитов остается прикрепленной к поверхностям тканей, у некоторых видов такие клетки могут составлять большинство гемоцитов. Гемоциты и профенолоксидазная система составляют мгновенную врожденную иммунную систему у насекомых. Эти компоненты иммунитета присутствуют на любой постэмбриональной жизненной стадии (Lavine M.D., Strand M.R., 2002).

Таблица 1 – Различные типы гемоцитов и их обозначение
(по Gupta A.P, 1979; Ratcliffe N.A. et al., 1985; Lackie A.M., 1988; Ribeiro C., Brehelin M., 2006)

Типы гемоцитов	Обозначение
Прогемоциты	PRs
Плазмоциты	PLs
Гранулоциты	GRs
Сферулоциты	SPs
Адипогемоциты	ADs
Эноцитойды	OEs
Вермициты	VEs
Подоциты	POs
Коагулоциты	COs
Ламеллоциты	LAs
Тромбоцитойды	THs
Спиноциты	SNs

Соотношение числа гранулярных и агранулярных клеточных форм может иметь существенную внутривидовую вариабельность, которая во многом обусловлена экологическими факторами различного происхождения. Исходя из этого, можно предположить, что в условиях повышенного стрессового воздействия и повреждения тканей возрастает уровень пролиферативной активности гемоцитов и, как следствие, повышается доля молодых агранулярных клеток. С другой стороны, снижение численности зрелых гранулоцитов в циркуляции может быть связано с их миграцией в ткани для вовлечения в процесс фагоцитоза поврежденных клеток (Анисимова А.А., 2011). Некоторые важные вопросы относительно их соотношений, разнородности и деятельности во время иммунологических ответов оставались без ответа. В настоящее время совсем немного известно о

молекулярных механизмах, которые управляют этими реакциями (Pandey J.P. et al., 2008a).

Hollande (1911) после работ более ранних авторов впервые попытался классифицировать гемоциты и разделил их на шесть типов: пролейкоциты, фагоциты, гранулированные лейкоциты, адиполейкоциты, эноцитоиды и сферулоциты (Hollande A.C., 1911). Wigglesworth (1939) включил категории, предложенные Hollande, и разделил фагоциты на два класса на основе размера их ядер (Wigglesworth V.B., 1939). Yeager (1945) идентифицировал у *Prodenia eridania* 10 классов гемоцитов, содержащих 32 различных типа (Yeager J.F., 1945). Jones (1962) различал девять типов клеток, и его работа заняла особое место в истории, так как его классификация была взята за основу большинством авторов (Jones J.C., 1962). Price и Ratcliffe (1974) исследовали гемоциты представителей 15 отрядов насекомых и выделили шесть клеточных типов: прогемоциты PRs, плазмоциты PLs, гранулоциты GRs, сферулоциты SPHs, цистоциты CYs и эноцитоиды OEs (Price C.D., Ratcliffe N.A., 1974). Классификация гемоцитов стала более точной благодаря использованию электронной микроскопии, обеспечивающей выделение не более семи типов гемоцитов (Gupta A.P., 1979), даже при том, что в нескольких отрядах насекомых обнаружено от трех до восьми типов гемоцитов с неоднородной спецификацией (Brehelin M. et al., 1975; Brehelin M. et al., 1978) и, позже посредством световой микроскопии в функциональных исследованиях – три или четыре типа гемоцитов (Giulianini P.G. et al., 2003).

Jones (1959, 1962) исследовал клетки крови с помощью фазово-контрастной микроскопии и сравнил свои наблюдения с более ранними исследованиями фиксированных клеток (Jones J.C., 1959, 1962). Он принял классификацию Hollande, но отказался от термина «лейкоциты» в пользу «гемоцитов». Также им не были использованы физиологические термины, такие как «фагоциты», «амебоциты», «трофоциты», определяющие функции клетки. Gupta (1979), Rowley и Ratcliffe (1985) попытались разработать свою

классификацию, состоящую из шести главных типов. Была осуществлена идентификация и разработана классификация гемоцитов основанная на их ультраструктурных (Ratcliffe N.A. et al., 1985; Brehelin M., Zachary D., 1986) и иммунохимических особенностях (Elizabeth W. et al., 1994; Charalambidis D.N. et al., 1996; Ceraul S.M. et al., 2003; Gandhe A.S. et al., 2007).

Классификация по Jones является наиболее приемлемой. О более или менее подобной классификации также сообщали другие исследователи. Основываясь на морфологии, реакции на красители и ответной реакции на различные факторы, у различных насекомых были идентифицированы шесть типов гемоцитов (Tiwari R.K. et al., 2002; Tiwari R.K. et al., 2006; Pandey J.P. et al., 2008b). Это – прогемоциты, плазмоциты, гранулоциты, сферулоциты, энцитойды и адипоциты. Кроме того, вермициты и подоциты были обнаружены на определенной стадии развития насекомых (Pandey J.P., 2004; Tiwari R.K. et al., 2006; Pandey J.P. et al., 2010). Классификация гемоцитов, основанная на морфологии или комплексе морфологических и функциональных особенностей, была разработана для различных насекомых (Gupta A.P., 1979; Brehelin M., Zachary D., 1986; Lackie A.M., 1988; Gardiner E.M., Strand M.R., 1999, 2000; Lavine M.D., Strand M.R., 2002).

Гемоциты происходят из средне-вентральной борозды мезодермы у эмбриона и дифференцируются далее в различные функциональные типы (Jones J.C., 1970). Важные обзоры, описывающие различные свойства гемоцитов (то есть функции, клеточные ответы и т.д.) принадлежат Wigglesworth V.B. (1959), Rizki M.T.M. (1962), Jones J.C. (1962), Gupta A.P. (1979, 1985b), Arnold J.W. (1982), Rowley A.F., Ratcliffe N.A. (1981), Brehelin M., Zachary D. (1986), Lackie A.M. (1988) и Ribeiro C., Brehelin M. (2006).

Классификация гемоцитов базируется, прежде всего, на морфологии клеток. У всех насекомых наиболее распространены следующие шесть типов: прогемоциты, гранулоциты, плазмоциты, энцитойды, сферулоциты, адипогемоциты.

Рассмотрим подробнее вышеперечисленные типы клеток.

Прогемоциты – самые мелкие форменные элементы гемолимфы (4-6 μm). Это округлые базофильные клетки с большим ядром, занимающим большую часть цитоплазмы, лишены синтезирующих органоидов. Ядро приблизительно 4 μm в диаметре, заметно ядрышко. Цитоплазма характеризуется заметным развитием гранулярной ЭПС в виде маленьких электронно-плотных пузырьков и развитым микротубулярным цитоскелетом в перинуклеарной области. Они делятся путем митоза, по-видимому, давая начало плазмоцитам, и, вероятно, гранулоцитам. Таким образом, их считают стволовыми клетками (Gupta A.P, 1985a; Brehelin M., Zachary D., 1986).

Гранулоциты – полиморфные клетки с многочисленными включениями и пиноцитозными пузырьками. Размер клеток варьирует от 7 до 12 μm . Гранулярная эндоплазматическая сеть всегда хорошо развита, многочисленные цистерны заполнены коагулянтом. Цитоплазма также включает круглые митохондрии с пластинчатыми кристами, свободные рибосомы и полисомы, иногда в цитоплазме рассеяны гранулы гликогена и однородные ацидофильные цитоплазматические включения. Размер и форма гранулоцитов варьируют, клетки имеют маленькое полиморфное ядро с заметным ядрышком в центре. Нуклеоплазма гомогенная и четко гранулирована. Гранулоциты характеризуются наличием больших, электронно-плотных, бесструктурных, примыкающих к мембране гранул небольшого диаметра 573 ± 192 nm круглой/овальной или лимоноподобной формы.

Гранулы могут быть разделены на три типа:

- гранулы первого типа представляют собой внутренние структуры, включающие многочисленные короткие микроканалы, они происходят из аппарата Гольджи;
- включения второго типа – гомогенные электронно-плотные мембранные гранулы, также эндогенного происхождения, гранулы могли произойти из включений первого типа путем уплотнения их содержимого;

- включения третьего типа – гетерогенные тела резорбтивной природы, которые представляют собой вторичные лизосомы, включающие эндогенные (основные лизосомы) и внешние (фагосомы), эти мембранные гранулы заполнены пузырьками, аморфным материалом.

Пучки микротрубочек, расположенных на противоположном полюсе непосредственно под плазматической мембраной, образуют кольцо. Плазматическая мембрана проявляет эндо/экзоцитозную активность, что заметно по пузырькам низкой электронной плотности и способности к образованию псевдоподий на своей поверхности. Важную роль играют пузырьки Гольджи в формировании гранул: маленькие электронно-плотные пузырьки высвобождают свое содержимое в большие незрелые гранулы. Численность популяции гранулоцитов колеблется от 30 до 65% от общего числа гемоцитов (Wigglesworth V.B., 1959).

Есть вероятность, что гранулоциты могут формироваться из плазмоцитов, это объясняет тенденцию к уменьшению численности плазмоцитов и росту популяции гранулоцитов с возрастом (Huang F. et al., 2010).

В исследованиях процесса инкапсуляции у *Lepidoptera* гранулоциты высвобождали свое содержимое (дегрануляция) на поверхность инородного тела во время начальной фазы формирования капсулы, и выделяли цитокины, которые привлекали плазмоцитов к цели. Внутренние клетки капсулы развивают десмосомы, которые скрепляют клетки. Между клетками внешних и внутренних слоев капсулы образуются промежутки, обеспечивая межклеточный транспорт гормонов и цитокинов для передачи сигналов, питательных веществ, других факторов, необходимых для поддержания целостности капсулы (Beckage N., 2008).

Происхождение гемоцитов и возможные варианты их преобразований были рассмотрены в работах многих авторов (Gupta A.P., Sutherland D.J., 1967; Tiwari R.K. et al., 2002). Gupta (1985) предположил, что гранулоциты произошли от прогемоцитов или стволовых клеток через плазмоциты.

Гранулоциты, возможно, далее дифференцируются в сферулоциты, эноцитойды, коагулоциты и адипогемоциты (Gupta A.P., 1985a).

Клетки гемопоэтического органа, включая прогемоциты, могли дать начало гранулоцитам. Это открытие не означает, что все гранулоциты получены из личиночного гемопоэтического органа. Предполагается, что значительная часть циркулирующих гранулоцитов образуется на эмбриональной стадии, потому что число гранулоцитов, вышедших из гемопоэтического органа, намного меньше, чем циркулирующих (Nakahara Y., 2003b). Единственная клеточная культура циркулирующих прогемоцитов привела к производству плазмоцитов и гранулоцитов на схожем уровне. Однако детерминированность к превращению в линию гранулоцитов гемопоэтического органа, возможно, подавляется, потому что эти клетки редко встречались в органах. Самовозобновление стволовых клеток и их детерминированное дифференцирование зависит в основном от микросреды, называемой нишей стволовой клетки (Martinez-Agosto J.A. et al., 2007). Прогемоциты, оказавшиеся вне ниши, могли дифференцироваться в гранулоциты.

Плазмоциты обычно составляют более 28% у большинства насекомых. Это полиморфные клетки, непостоянные по размеру (10-17 μm) и форме: от дискообразной до веретеновидной, и имеют одно ядро, которое занимает приблизительно 40-50% клетки, цитоплазма базофильная гранулированная. Круглое ядро диаметром $3,8 \pm 0,5 \mu\text{m}$ занимает центральное или околоцентральное положение. Цитоплазма менее электронно-плотная в сравнении с гранулоцитами, имеет маленькие круглые или удлинённые митохондрии и комплекс Гольджи. Более характерная особенность – присутствие в цитоплазме большого числа гетерогенных, примыкающих к мембране, пузырьков: самые большие с переменной электронной плотностью и гранулированной структурой (включение диаметром $356 \pm 71 \text{ nm}$). Плазматическая мембрана часто образует пузырьки $0,8 \mu\text{m}$ в диаметре, которые иногда присутствуют недалеко от наружной плазматической

мембраны (Giulianini P.G. et al., 2003). Плазмоциты так же обладают развитыми гЭПС и комплексом Гольджи, что доказывает синтетическую функцию плазмоцитов. Клетки очень подвижны и обладают повышенной фагоцитарной активностью. Имеют лизосомальные пузырьки и являются основной линией защиты в клеточном ответе на микробную инфекцию. Плазмоциты выделяют вещества, которые вызывают дегрануляцию гранулоцитов во время заключительного этапа инкапсуляции. Они также участвуют в других связанных с защитой процессах, таких как нодуляция и, наряду с цистоцитами, в плазменной коагуляции. Предполагается, что подоциты являются формой плазмоцитов (Gupta A.P., 1979; Hoffman J.A., 2003).

Было обнаружено много транскрипционных факторов, влияющих на дифференцирование гемоцитов у дрозофил (Lebestky T. et al., 2000; Fossett N. et al., 2001, 2003; Fossett N., Schulz R.A., 2001; Evans C.J., Banerjee U., 2003; Meister M., Lagueux M., 2003). Описан общий план преобразований гемоцитов у дрозофил: плазмоциты могут преобразоваться в ламеллоциты (Rizki M.T.M., 1962), а предшественники кристаллических клеток превращаются в плазмоциты (Lebestky T. et al., 2000). Долгое время вопрос, касающийся способности плазмоцитов к дифференцировке, был спорным. Hinks и Arnold (1976) предполагали, что плазмоциты дают начало эноцитоидам, тогда как Yamashita и Iwabuchi рассматривали плазмоциты как конечную форму дифференциации (Hinks C.F., Arnold J.W., 1976; Yamashita M., Iwabuchi K., 2001). В своем исследовании Nakahara с соавт. (2010) выявили, что плазмоциты *B. mori* способны дифференцироваться в эноцитоиды. Одним из свойств, объединяющих эти 2 типа гемоцитов, является профенолоксидазная активность (Nakahara Y. et al., 2010). Иммуногистохимический анализ показал, что только плазмоциты и эноцитоиды содержат этот фермент (Ashida M. et al., 1988).

Гемопозитический орган *Bombix mori* представлен двумя типами островков – компактными и неплотными, которые содержат незрелые клетки

(прогемоциты) и морфологически зрелые гемоциты, соответственно (Han S.S. et al., 1998). В ГПО детерминированность направлена, в основном, в сторону плазмоцитов. Плазмоциты в ГПО еще функционально незрелые, и способность к распластыванию проявляется лишь после попадания в гемолимфу. Приблизительно 70% клеток – это плазмоциты чувствительные к паралитическому пептиду (PP) (Nakahara Y. et al., 2003b). Нечувствительные к PP клетки округлой формы и бедны по внутриклеточному содержанию, что является особенностью и прогемоцитов, и нераспластывающихся плазмоцитов (рис.1, стадия 1 и 2). Их невозможно отличить по морфологии, так как неясны пороговые различия в размере между ними.

Поэтому, предполагается, что нечувствительные к PP клетки представляют собой комплекс некоммутированных прогемоцитов, и клеток-предшественниц плазмоцитов, которые еще не приобрели способность реагировать на PP. Вышедшие прогемоциты – это бипотенциальные клетки-предшественницы, которые дают начало плазмоцитам и гранулоцитам (рис. 1, стадии 3 и 4) (Yamashita M., Iwabuchi K., 2001).

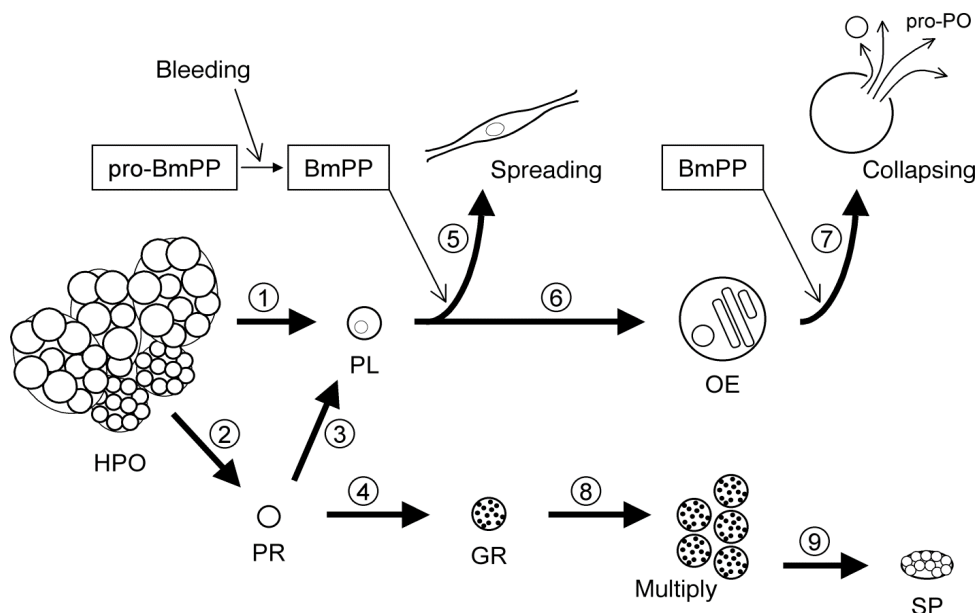


Рисунок 1 – Схема дифференцировки гемоцитов на личиночной стадии развития *B. mori* (по Saito T., Iwabuchi K., 2003):

HPO – орган гемопоэза, PR – прогемоцит, PL – плазмоцит, OE – энотоид, GR – гранулоцит, SP – сферулоцит, pro-BmPP – неактивная форма паралитического пептида *B. mori*, BmPP – активный паралитический пептид *B. mori*

В случае возникновения повреждений у личинок *B. mori* происходит привлечение плазмоцитов для закупоривания раны и инкапсуляции попавших в тело инородных объектов. Без воспаления плазмоциты могут увеличиться в размере, потерять адгезивные свойства (гибкость структуры клетки) и стать эноцитоидами, производящими ряд белков, вовлеченных в иммунный ответ. Является ли подобное преобразование спонтанным процессом, или оно регулируется внешними сигналами – неизвестно. Эноцитоиды разрушаются и выделяют свое содержимое (главным образом белки) после стимуляции паралитическим пептидом. Гранулоциты имеют иное происхождение. Их популяция повышает свою численность с помощью митотического деления (Saito T., Iwabuchi K., 2003), и некоторые из них могут дифференцироваться в сферулоциты, хотя это не было подтверждено.

В случае возникновения раны, предшественник паралитического пептида (про-PP) переходит в активную форму и вызывает распластывание плазмоцитов (рис. 1, стадия 5). При отсутствии воспаления, вызванного PP, плазмоциты могут дифференцироваться в эноцитоиды (рис. 1, стадия 6). Эноцитоиды также активируются PP и выпускают свое внутриклеточное содержимое, включая ферменты, вовлеченные в меланизацию (рис. 1, стадия 7). Гранулоциты, образовавшиеся от прогемоцитов, делятся путем митоза, увеличивая свою численность (рис. 1, стадия 8). Некоторые гранулоциты могут дифференцироваться в сферулоциты (рис. 1, стадия 9) (Saito T., Iwabuchi K., 2003).

Эта модель соотносится с другими исследованиями гемопоэза у представителей *Lepidoptera*. У *E. declarata* (Noctuidae) плазмоциты и эноцитоиды образуются в ГПО, в то время как гранулоциты и сферулоциты пролиферируют через умножение циркулирующих гемоцитов (Arnold J.W., Hinks C.F., 1976). У *M. sexta* (Sphingidae) гранулоциты и плазмоциты также представляют собой различные линии (Nardi J.B., 2004). Gardiner и Strand (1999) предположили наличие тесной связи между плазмоцитами и эноцитоидами, в то время как гранулоциты связаны со сферулоцитами у *P.*

inclusens (Noctuidae) (Gardiner E.M., Strand M.R., 1999). Эти данные указывают на то, что гемоцитарные линии у представителей Lepidoptera сохраняются одинаковыми для разных семейств, и их можно экстраполировать на другие отряды насекомых. У *D. melanogaster* бипотентные клетки-предшественницы, дающие начало ламеллоцитам и кристаллическим клеткам, т.е. аналогам плазмоцитов и эноцитоидов Lepidoptera, располагаются в ГПО (Crozatier M. et al., 2004).

Эноцитоиды легко различимы под световым микроскопом благодаря их большому размеру (18-38 μm в диаметре). Имеют постоянную форму, гомогенную цитоплазму. Иногда встречаются клетки с двумя эксцентрично расположенными ядрами. Они содержат несколько больших электронно-плотных окруженных мембранами гранул, очень напоминающих таковые у гранулоцитов. Гранулы имеют длину 557 ± 114 nm, а средняя ширина 432 ± 55 nm. Цитоплазма однородная, мелко гранулированная, средней или высокой электронной плотности, бедна органеллами, присутствует немного овальных митохондрий, шероховатая эндоплазматическая сеть, несколько гранул, многочисленны свободные рибосомы и полисомы. Цитоплазма с многочисленными микроканальцами и малым числом синтетических органоидов. Они демонстрируют эндогенную фенолоксидазную активность и, как предполагается, участвуют в процессе меланизации, часто связываемом с заживлением ран и инкапсуляцией. Кроме того, фенолоксидаза является одним из самых важных ферментов, участвующих в апоптозе клеток, это объясняет, почему относительное содержание эноцитоидов в личинках Lepidoptera достигает максимума в период каждой линьки (Huang F. et al., 2010). Эноцитоиды обнаружены у большинства насекомых, но отсутствуют у представителей отряда Orthoptera (*Locusta migratoria*). Они никогда не составляют больше чем 1-2% всех гемоцитов у здорового насекомого. Другая особенность эноцитоидов – их неустойчивость; они особенно хрупки в пробирке и быстро разрушаются, выпуская содержимое в гемолимфу (Rowley A.F., Ratcliffe N.A., 1981).

Серповидные клетки были обнаружены в гемолимфе мадагаскарского таракана, *Gromphadorhina portentosa* (Dictyoptera: Blaberidae). Эти гемоциты относятся к эноцитоидам. Они появляются как полиморфные безъядерные клетки. Их размер варьирует от 16 до 28 μm в длину и от 10 до 23 μm в ширину. Самые специфические особенности ОЕс у этого таракана – присутствие единственного серповидного включения и постепенное ядерное вытеснение. Ядерное вытеснение не наблюдалось ни в одном из других пяти типов гемоцитов, найденных у этого вида. Вытеснение ядра может произойти в любом месте вдоль клетки, таким образом, производя различные формы безъядерных клеток. Эти клетки могут играть косвенную роль в заключительных этапах формирования кутикулы (Gupta A.P., 1985b).

Сферулоциты – очень крупные гемоциты (9-25 μm , размер ядра 5-9 μm). Цитоплазма заполнена гетерогенными круглыми или овальными крупными гранулами («сферулами») диаметром 753 ± 191 nm, с микротубулярноподобным матриксом (более заметным в незрелых гранулах) переменной электронной плотности. Эти характерные включения окружены мембраной. У *Lepidoptera* (*Bombyx mori*, *Antheraea pernyi*) они обладают внутренней сетью мембран, расположенных в концентрических слоях (Akai H., Sato S., 1973; Beaulaton J., Monpeysson M., 1977; Beaulaton J., 1979). У других видов (например, у *Coleoptera*: *Melolontha melolontha*) они электронно-плотные (Devauchelle G., 1971). У *Lepidoptera* эндоплазматическая сеть гемоцитов расположена компактно, но увеличена, цистерны и комплексы Гольджи так же могут встречаться в большом количестве. Сферулы образуются из аппарата Гольджи. Попадая в пробирку сферулоциты, так же как и эноцитоиды, быстро разрушаются, высвобождая сферулы. Клетки имеют непостоянную форму, похожую на морулу, что облегчает их идентификацию, но их легко спутать с гранулоцитами, заполненными поглощенным материалом. В некоторых случаях, сферулоциты составляют приблизительно 4% от общего числа гемоцитов. Функции этих клеток до конца неизвестны. Они могут участвовать в синтезе

мукополисахаридов у *B. mori* (Akai H., Sato S., 1973). Nittono (1960) указывал на их возможную роль в образовании шелка у *B. mori* (Nittono Y., 1960, 1964). У другого представителя Lepidoptera (*Pieris brassicae*) отсутствуют сферулоциты. Возможно, что это открытие подтверждает гипотезу Nittono, т.к. в отличие от *B. mori*, *P. brassicae* не прядет шелковый кокон во время метаморфоза (Pathak J.P.N., 1993).

Адипогемоциты различны по размеру, яйцевидные с четкими липидными включениями и гранулированной цитоплазмой с гранулярной эндоплазматической сетью (гЭПС) и комплексами Гольджи, что является показателем синтетических и секреторных функций этих клеток (Beckage N., 2008).

Цистоциты. Размер клеток может варьировать от 5 до 30 μm . Некоторые авторы считают, что цистоциты (также именуемые коагулоцитами) являются молодой формой гранулоцитов, потому что они участвуют в процессе коагуляции. Как и у гранулоцитов, у цистоцитов небольшое ядро и ацидофильные цитоплазматические включения. Поскольку их цитоплазма прозрачная, цистоциты иногда называют гиалиновыми клетками (Kevin K., 2009). У представителей Coleoptera это непостоянные клетки дисковидной формы приблизительно 8 μm в диаметре. Ядро имеет центральное расположение, характеризуется электронно-прозрачной нуклеоплазмой с глыбами гетерохроматина, расположенными непосредственно под ядерной оболочкой. Вокруг мембраны много маленьких электронно-прозрачных отпочковывающихся пузырьков. Периферическая область цитоплазмы, в отличие от перинуклеарной, богата комплексами Гольджи. Коагулоциты – довольно непостоянные клетки и легко извергают свое содержимое. Фактически в клетках часто возникают разрывы мембраны, через которые цитоплазма и пузырьки выходят во внешнюю среду (Giulianini P.G. et al., 2003).

Yamashita и Iwabuchi (2001) продемонстрировали возможность превращения прогемоцитов в сферулоциты через гранулоцитарно-подобную

форму, но не непосредственно. В данном исследовании только небольшое количество гранулоцитов было получено из гемопоэтического органа *in vitro*. Следовательно, это могло бы привести к небольшой возможности для их дифференцировки в сферулоциты. Альтернативно сферулоциты могут возникнуть, например, из популяции эмбриональных гемоцитов (Yamashita M., Iwabuchi K., 2001).

Вакуолизованные клетки – до 14-23 μm в диаметре. Характеризуются обширной вакуолизацией цитоплазмы, по-видимому, это результат впячивания клеточной мембраны. Многочисленные свободные рибосомы, гЭПС, аппарат Гольджи и митохондрии рассеяны по цитоплазме. Эти клетки составляют 20% от общего количества гемоцитов. Они характерны для двукрылых, хотя не встречаются у всех видов (Rowley A.F., Ratcliffe N.A., 1981).

Тромбоциты – круглые клетки с несколькими структурами в виде впячиваний мембран, проникающими глубоко в цитоплазму почти к ядру. Возможно, что эти гемоциты участвуют в осуществлении фагоцитоза бактериальных клеток, а также в заживлении ран и инкапсуляции (Wang C.L. et al., 2010).

Другие типы, такие как подоциты и вериформные клетки могут быть формами плазмоцитов, но, ни их происхождение, ни функции не известны (Житенева Л.Д., 2001; Beckage N., 2008).

Гемопоэз насекомых достаточно изучен у *D. melanogaster* (Diptera), при этом было продемонстрировано много общих черт между позвоночными животными и насекомыми относительно молекулярных механизмов, регулирующих дифференцировку гемоцитов (Crozatier M., Meister M., 2007; Wood W., Jacinto A., 2007). У личинок *D. melanogaster* три класса циркулирующих иммунных клеток могут быть определены как: плазмоциты, кристаллические клетки и ламеллоциты. Плазмоциты составляют до 95% циркулирующих гемоцитов. Около 5% гемоцитов представлено кристаллическими клетками, которые секретируют компоненты,

необходимые для меланизации, а также для заживления ран. Третий тип клеток известен как ламеллоциты, которые редко можно увидеть у здоровых личинок. Они участвуют в инкапсуляции вторгающихся болезнетворных микроорганизмов (Williams M.J., 2007).

Ламеллоциты участвуют в инкапсуляции крупных болезнетворных микроорганизмов, которые не могут быть уничтожены путем фагоцитоза. Кристаллические клетки секретируют компоненты каскада фенолоксидазы и участвуют в меланизации инородных объектов и в заживлении ран. Факторы транскрипции из GATA, RUNX, и семейства Friend-of-GATA регулируют несколько этапов гемопоэза и у позвоночных и у дрозофил (Evans C.J. et al., 2003). Хотя геном дрозофилы кодирует пять GATA-факторов (включая Serpent (Srp)), это Srp экспрессируется перед всеми маркерами дифференцировки в эмбриональных прогемоцитах.

В ходе эмбриогенеза плазмоциты и кристаллические клетки берут начало от ранней популяции прогемоцитов (Lebestky T. et al., 2000). Srp участвует в этой дифференциации, и его экспрессия необходима для поддержания клеток во время развития. Геном *Drosophila* кодирует три транскрипционных фактора RUNX, из которых Lozenge (Lz) участвует в гемопоэзе. Изначально было отмечено, что у мутантов с Lozenge-дисфункцией не образуются кристаллические клетки. Позже было обнаружено, что Lz не функционирует в одиночку, а образует комплекс с Srp, и вместе они индуцируют формирование кристаллических клеток. Для дифференциации плазмоцитов требуется два взаимосвязанных транскрипционных фактора: фактор отсутствия глиальных клеток (Gcm) и фактор отсутствия глиальных клеток-2 (Gcm 2) (Bernardoni R. et al., 1999).

При отсутствии обоих факторов, плазмоциты неспособны дифференцироваться нормально, и их число существенно уменьшается, в то время как на образование кристаллических клеток это не влияет (Alfonso T.V., Jones B.W., 2002). Ранее считалось, что во время их дифференциации кристаллические клетки должны экспрессировать Lz, а не gcm/gcm2, в свою

очередь, плазматоциты экспрессируют *gcm/gcm2*, а не *Lz*. Однако, Bataille с соавторами (2005) показали, что это не совсем так. Согласно их данным, на ранних стадиях развития *Gcm* экспрессируется во всех прогемотоцитах, но затем происходит подавление экспрессии клеток в передней части гемопоэтического органа. Эти клетки, где *Gcm* подавляется, начинают экспрессировать *Lz*. Имеет место значительное увеличение числа кристаллических клеток – двойных мутантов по *Gcm* и *Gcm2*. Это показывает, что, по крайней мере, в подгруппе прогемотоцитов, экспрессия *Gcm/Gcm2* необходима, чтобы ингибировать развитие кристаллических клеток (Bataille L. et al., 2005).

Показано, что *Gcm/Gcm2*-ингибирование формирования кристаллических клеток является двухэтапным процессом. Первоначально *Gcm/Gcm2* регулируют количество клеток, которые экспрессируют *Lz*. Если *Gcm/Gcm2* отсутствуют, то *Lz* сохраняется в подгруппе клеток, и они дифференцируются в кристаллические клетки вместо плазматоцитов. Таким образом, прогемотоциты являются бипотентными предшественниками. У-образный (*ush*) гомолог Friend-of-GATA противодействует развитию кристаллических клеток. У дрозофилы *ush* экспрессируется предшественниками гемоцитов и в течение развития линии плазматоцитов *ush* экспрессируется также предшественниками кристаллических клеток, но подавляется по мере их развития клеток. Как и на эмбриональной стадии, несколько сигнальных путей, связанных с гемопоэзом у личинок дрозофилы, также участвуют в регулировании гемопоэза млекопитающих. И у млекопитающих, и у *Drosophila*, повышенная активация пути *Ras/Raf* приводит к неконтролируемой пролиферации. Два исследования показали, что экспрессия активного *Ras* вызывает сверхпролиферацию личиночных гемоцитов (Asha H. et al., 2003; Zettervall C.J. et al., 2004). Кроме того, два ETS транскрипционных фактора (*Pointed* и *Anterioropen*) участвуют в спецификации гемоцитов. Сверхэкспрессия *Pointed-P1* вызывает значительное увеличение числа плазматоцитов, тогда как избыточная

экспрессия активной формы ингибитора Anterioropen индуцирует образование ламеллоцитов.

У млекопитающих JAK/Stat путь участвует и в кроветворении и иммунных реакциях. У *Drosophila* было показано, что гиперактивация гомолога JAK Hopscotch (Hop) индуцирует пролиферацию плазмоцитов и дифференциацию ламеллоцитов (Harrison D. et al., 1995). Тем не менее, при Hop-дисфункции у личинок число циркулирующих гемоцитов сопоставимо с диким типом личинок. Интересно, что Hop необходим личинкам для эффективной иммунной реакции на внедрение паразитов (Sorrentino R. P. et al., 2004). Это может быть связано с неспособностью гемопоэтического органа, известного как лимфатические железы, быть активированным. Все это говорит о том, что JAK/Stat путь может принимать более активное участие в регулировании клеточного иммунного ответа, чем в регуляции гемопоэза.

Дифференцировка гемоцитов *Lepidoptera* была исследована у *Bombyx mori* (Bombycidae), *Euxoa declarata* (Noctuidae), *Pseudoplusia includens* (Noctuidae) и *Manduca sexta* (Sphingidae). К настоящему времени известно что: 1) во время эмбриогенеза гранулоциты образуются из головной мезодермы, и плазмоциты – из грудной мезодермы – эти области соответствуют двум парам гемопоэтических органов (Nardi J.B., 2004); 2) личиночный гемопоэтический орган (ГПО) является, главным образом, источником прогемоцитов и плазмоцитов (Han S.S. et al., 1998); 3) прогемоциты дают начало другим гемоцитарным типам; 4) циркулирующие гемоциты подвергаются митозу, за исключением эноцитоидов (Gardiner E.M., Strand M.R., 2000).

В естественных условиях и *in vitro* была исследована дифференцировка предшественников гемоцитов в гемопоэтическом органе *B. mori*, для выявления взаимосвязи среди пяти гемоцитарных типов. В гемопоэтическом органе *B. mori* образуются гранулоциты, плазмоциты, и эноцитоиды, но не сферулоциты. Кроме того, было обнаружено, что у плазмоцитов,

вовлеченных в клеточную защиту, есть потенциал для дифференцировки в эноцитоиды, вовлеченные в гуморальную защиту. Поэтому гемоциты *B. mori* представлены двумя линиями, со способностью дифференцироваться или в гранулоциты, или в эноцитоиды (Nakahara Y. et al., 2003a).

Эксперименты по имплантации были проведены для определения способности клеток гемопоэтического органа дать начало всем морфотипам. Трансгенная линия *CecB-GFP B. mori* является полезным инструментом для этих экспериментов, потому что все гемоциты флуоресцируют зеленым цветом. Гемопоэтические органы личинок *CecB-GFP* были введены в личинку L5D0 стандартной линии, и получающиеся гемоциты были восстановлены 5 дней спустя. Часть GFP-экспрессированных клеток (GFP+) обнаруживалась в гемоцитарных агрегатах. Среди циркулирующих гемоцитов, процент циркулирующих GFP+ клеток составляет $7,9 \pm 6,1\%$. Их появления были распределены преимущественно среди плазмоцитов ($57,7 \pm 4,5\%$), гранулоцитов ($27,9 \pm 4,8\%$) и эноцитоидов ($13,5 \pm 2,8\%$) (Nakahara Y. et al., 2003a; Nakahara Y. et al., 2010).

GFP-экспрессированные клетки (GFP+) включали главным образом плазмоциты и эноцитоиды, хотя последние нестабильны в условиях *in vitro* и быстро разрушались. Исследованная под микроскопом GFP+ популяция содержала прогемоциты, плазмоциты, эноцитоиды, и гранулоциты, но не сферулоциты. Это указывает, что сферулоциты не могут быть дифференцированы из клеток имплантированного гемопоэтического органа (Nakahara Y. et al., 2003a; Nakahara Y. et al., 2003b).

Для исследования гемоцитарных типов была получена культура клеток ГПО и зарегистрированы их морфологические изменения. В начале развития большинство клеток были примерно одинаковы по размеру (7-10 μm в диаметре) и имели круглую форму, внешне напоминая циркулирующие прогемоциты. У большинства клеток, культивированных в среде, содержащей очищенную плазму гемолимфы личинок, в течение суток проявлялись признаки, характерные для плазмоцитов. Число гемоцитов

увеличилось в 4,2 раза во второй день и в 5,1 раз на четвертый день ($n = 3$). Параллельно, размер клеток увеличился до $11,6 \pm 2,7 \mu\text{m}$ в диаметре во второй день и до $17,7 \pm 7,9 \mu\text{m}$ на четвертый день. Особенно большие круглые клетки $20-40 \mu\text{m}$ в диаметре с аморфными включениями появились на третий-четвертый дни. Эти клетки были похожи на циркулирующие эноцитойды. Процент эноцитойдоподобных клеток на четвертый день составлял $4,0 \pm 0,9\%$. Обнаружены скопления мелких, подобных прогемоцитам, клеток, окруженных плазмоцитоподобными клетками, и немного крупных эноцитойдоподобных клеток. Это свидетельствует о том, что прогемоцитоподобные клетки активно пролиферировали и дифференцировались в плазмоциты и эноцитойды. После этого культивированные клетки начали агрегировать (Nakahara Y. et al., 2010).

Напротив, в среде без плазмы клетки ГПО активно не пролиферировали. Три дня спустя много клеток оказалось поврежденными и сморщенными. Эти гемоциты содержали несколько больших гранул в своей цитоплазме, но отличались от типичных гранулоцитов или сферулоцитов, хотя небольшое количество живых гранулоцитоподобных клеток было также найдено. На седьмой день, эноцитойдоподобные клетки появились, это на четыре дня позже, чем обнаруженные в культуре с личиночной плазмой. Дифференцирование в сферулоциты никогда не наблюдалось ни в одном из экспериментов вне зависимости от наличия личиночной плазмы (Nakahara Y. et al., 2010).

Хотя гранулоциты редко обнаруживались в культуре рассеянного ГПО с личиночной плазмой, небольшое количество гранулоцитоподобных клеток появилось, когда клетки ГПО были культивированы без плазмы. Они были окрашены характерным для гранулоцита антителом, чтобы определить, дали ли клетки ГПО действительно начало гранулоцитам. Неотделенный ГПО и рассеянные клетки ГПО демонстрируют очень слабое окрашивание, по сравнению с циркулирующими гемоцитами. Возможно, что ГПО содержат немного зрелых гранулоцитов, если таковые вообще имеются, но слабое

окрашивание указывает на присутствие незрелых гранулоцитов. Напротив, спустя четыре дня, клетки, культивированные в среде без плазмы, действительно сильно окрашивались с антителом. Эти результаты указывают, что незрелые гранулоциты или свободные (несвязанные) предшественники гемоцитов в ГПО действительно дифференцировались в зрелые гранулоциты во время культивирования. В содержащей плазму среде, с другой стороны, было очень немного клеток, окрашенных антителом, возможно потому, что большое количество плазмоцитов разбавило небольшое число гранулоцитов (Nakahara Y. et al., 2010).

Крупные клетки, появляющиеся далее в культуре, были определены как эноцитоиды. За период культивирования клеток гемопоэтического органа были обнаружены гемоциты, обладающие особенностями и плазмоцитов, и эноцитоидов, то есть ассиметричным характером распластывания (адгезивная способность) и обильным внутриклеточным содержанием. Возможно, плазмоциты и эноцитоиды принадлежат к той же линии. Возникает вопрос относительно того, дифференцируются ли эноцитоиды непосредственно из предшественников гемоцитов или через форму плазмоцитов. Для проверки последней гипотезы были проведены эксперименты *in vitro* с культурой чистой популяции функционально зрелых плазмоцитов (Nakahara Y. et al., 2010).

Очищенные плазмоциты были культивированы в среде MGM-450, содержащей 3% личиночной плазмы. Почти все клетки быстро распластывались, но некоторые вернулись к круглой форме через несколько дней. Спустя 10 суток были обнаружены круглые клетки с обильным внутриклеточным содержанием и другие, которые уже разрушились, как эноцитоиды. Таким образом, можно прийти к заключению, что зрелые плазмоциты дифференцируются в зрелые эноцитоиды (Nakahara Y. et al., 2010).

Первая популяция гемоцитов развивается на эмбриональных стадиях развития, и численность ее увеличивается на личиночных стадиях. Вторая

популяция образуется в гемопоэтическом органе мезодермального происхождения. У *Lepidoptera* гемопоэтический орган рассматривается, главным образом, как источник прогемоцитов и плазмоцитов (Nakahara Y. et al., 2003a).

1.2. Особенности иммунных реакций у насекомых

Гемоциты выполняют важную роль в защите беспозвоночных от патогенных микроорганизмов и паразитов, проникающих в гемоцель (Tiwari R.K. et al., 2006). Иммунная система насекомых обладает только врожденным защитным звеном, которое включает и гуморальные, и клеточные ответные реакции. Поведение и функции гемоцитов реализуются через такие гуморальные факторы, как цитокины, молекулы клеточной адгезии, лектины и агглютинин.

Гуморальный ответ характеризуется быстрым запуском каскада фенолоксидазы и синтезом множества антибактериальных белков в жировом теле в течение нескольких часов после инфицирования. Клеточная иммунная реакция мгновенна, индуцируется в течение нескольких минут после вторжения микробов. Гемоциты выполняют множество функций инкапсуляция, коагуляция, синтез и транспорт питательных веществ и гормонов, заживление ран (Pathak J.P.N., 1993).

Врожденная иммунная система включает гемоцит-опосредованные и растворимые компоненты и индуцируется посредством распознавания молекулярных паттернов болезнетворных микроорганизмов (Girardin S.E. et al., 2002). У многих беспозвоночных растворимый элемент иммунной системы включает антибактериальные пептиды – аттацины (Gillespie P.J. et al., 1997), лизозим (Koracek P. et al., 1999), лектины (Chen S.C. et al., 2001), дефензин (Nakajima Y. et al., 2002; Johns R. et al., 2001) и другие (Strand M.R., Pech L.L., 1995). У насекомых выделение дефензина идет в жировом теле вслед за инфекцией (Gillespie P.J. et al., 1997). У дрозофил вторжение микроорганизмов вызвало выработку дефензина между 0 и 90 минутами после инфицирования (Lemaitre B. et al., 1997). У *Mytilus galloprovincialis*

дефензин выделяется гранулоцитами в плазму спустя 24 часа после инфицирования разрушенным тепловой обработкой *Vibrio alginolyticus* (Mitta G. et al., 1999). У *Ornithodoros moubata* дефензин выявлен в средней кишке уже на 60-ой минуте (Nakajima Y. et al., 2002). Дефензин был также обнаружен в гемолимфе *Dermacentor variabilis*, между 1 и 6 часами после заражения спирохетами *Borrelia burgdorferi* (Johns R. et al., 2001).

Kevin (2009) показал, что некоторые моли и дрозодилы, отвечают на микробную инфекцию таким же образом, как и млекопитающие, и это может быть использовано для проверки эффективности новых ядов; таким образом, исключается необходимость тестировать их на млекопитающих. Нейтрофилы, которые являются одним из типов лейкоцитов и частью иммунной системы млекопитающих, и гемоциты, которые являются клетками, выполняющими подобную функцию у насекомых, сходно реагируют на инфицирование микробами. Гемоциты насекомых и млекопитающих производят вещества с похожей структурой, которые перемещаются на поверхность клеток, чтобы уничтожить вторгающиеся микроорганизмы. Иммунциты окружают инородные объекты и вырабатывают ферменты, чтобы разрушить их (Kevin K., 2009).

Количество и типы гемоцитов хозяина являются двумя ключевыми факторами, требуемыми для успешного иммунного ответа. Изменения в морфологии гемоцитов и различия в количестве во время иммунной реакции отмечены рядом ученых (Sorrentino R.P. et al., 2002; Ceraul S.M. et al., 2003; Strand M.R., Pech L.L., 1995; Figueiredo M.B. et al., 2006; Gandhe A.S. et al., 2007; Singh G.P. et al., 2008; Pandey J.P. et al., 2008a, 2010). Резюме некоторых научных исследований представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Особенности иммунных реакций у различных представителей класса Насекомые по материалам иностранных источников

Авторы	Объекты исследования	Исследованное явление
Christensen B.M. et al. (1989)	<i>Aedes aegypti</i>	Изменения в гемоцитарных популяциях в ходе иммунных реакций на инфекции.
Stanley-Samuels D.W. et al. (1991)	Insecta	Иммунная реакция насекомого на бактериальную инфекцию индуцируется эйкозаноидами.
Charalambidis D.N. et al. (1996)	<i>Ceratitis capitata</i>	Проявление фенолоксидазной активности и иммунная реакция на липополисахариды (LPS).

Продолжение таблицы 2.

Авторы	Объекты исследования	Исследованное явление
Cardens W., Dankert J.R.(1997)	<i>Procambarus clarkii</i>	Понимание активации прфенолоксидазной системы смогло привести к разработке диагностических инструментов для оценки здоровья животных.
Sorrentino R.P.et al. (2002)	<i>Drosophila</i>	Изучена регуляция клеточной иммунной реакции на паразитическую инфекцию в лимфатической железе дрозофилы
Hillyer J.F. et al. (2003)	<i>Armigera subalbatus</i>	Фагоцитоз и меланизация у москитов после иммунного ответа на внедрение бактерий.
Song Y.L. et al. (2003)	Pacific white shrimp	Были исследованы характеристики гемолимфы, чтобы определить гематологические изменения у креветок, зараженных Таура-вирусом. Эти параметры можно использовать в качестве индикаторов, чтобы точно оценить физиологический статус креветок.
Hoffman J.A. (2003)	<i>Drosophila</i>	Иммунные реакции дрозофил.
Stanley D., Miller J.S. (2006)	Insecta	Участие эйкзаноидов в клеточных иммунных реакциях у насекомых.
Figueiredo M.B. et al. (2006)	<i>Rhodnius prolixus</i>	Клеточная иммунная реакция у <i>Rhodnius prolixus</i> была изучена и показала роль экдизонов в явлении фагоцитоза.
Pandey J.P. et al. (2008)	<i>Danais chrysippus</i>	Спад гемоцитарной иммунной реакции был обнаружен после воздействия пестицидами.
Alaux C. et al. (2010)	<i>Apis mellifera</i>	ТНС (total hemocyte count – общее число гемоцитов) и фенолоксидазная активность были проанализированы как параметры индивидуального иммунитета.
Kevin K. (2009)	Insecta	Гемоциты насекомых и нейтрофилы млекопитающих функционируют сходно: захватывают и уничтожают болезнетворные микроорганизмы. Насекомые могут использоваться для скрининга болезнетворных микроорганизмов так же успешно, как и ядов.
Lorgeril J. et al. (2010)	Shrimp	Экспрессия гена иммунной системы как инструмент для мониторинга здоровья.
Wang C.L.et al. (2010)	<i>B. mori</i>	Гемоциты могут быть использованы для изучения механизма иммунных реакций помимо других физиологических функций гемоцитов.
Pandey J.P. et al. (2010)	<i>Antheraea mylitta</i>	Температура оказывала сильное влияние на гемоцитарные иммунные реакции гранулоцитов и плазмоцитов тропического шелкопряда.

1.2.1. Гемоцитарные и гуморальные защитные механизмы насекомых

Гемоцитарные защитные механизмы включают нодуляцию, инкапсуляцию и фагоцитоз. Основной защитной гемоцитарной реакцией является инкапсуляция – процесс, в котором клетки закрепляются на инородном организме и пытаются уничтожить его. Во время инкапсуляции гемоциты связываются с антигеном и друг с другом, в итоге это приводит к формированию гладкой капсулы, включающей накладывающиеся слои клеток. Морфология капсул подобна у всех насекомых, хотя существуют различия среди видов в том, как быстро объект заключается в капсулу, какие типы гемоцитов участвуют в инкапсуляции и произошла ли меланизация капсулы (Rowley A.F., Ratcliffe N.A., 1981; Lackie A.M., 1988; Strand M. R. Pech L.L., 1995). Клеточные иммунные реакции различных насекомых под воздействием различных температурных режимов показали, что плазмоциты и гранулоциты подвержены влиянию любых температурных изменений (Pandey J.P., 2004; Pandey J.P. et al., 2010).

Биохимические/гистохимические и ультраструктурные аспекты синтеза, накопления и секреции гемоцитов были изучены в нескольких исследованиях (Crossley A.C.S., 1979; Ashhurst D.E., 1982). Внешние свойства инородных объектов также управляют инкапсуляцией, индуцируя активность гемоцитов. С возможным исключением некоторых двукрылых (Gotz P., 1986) инкапсуляция у большинства насекомых зависит от взаимодействия гемоцитов. То, что остается сомнительным – является ли этот ответ опосредованным функционально единой популяцией гемоцитов или идет посредством коммуникации среди функционально несходных субпопуляций. Электронно-микроскопическое исследование *Galleria mellonella* и *Clitumnus extradentatus* указывает, что инкапсуляция идет в две фазы. Установлено, что гранулоциты (GRs) связываются с инородным объектом, происходит дегрануляция материала, что обеспечивает связывание плазмоцитов. Впоследствии многократные слои плазмоцитов формируют капсулу (Schmit A.R., Ratcliffe N.A., 1977). Однако ранее Brehelin (1975) сообщает лишь об

одном классе клеток, гранулоцитах, которые участвуют инкапсуляции у *Locusta migratoria* и *Melolontha melolontha*. Вероятно, подобные вариации отражают частичные межвидовые различия в морфологии гемоцитов (Brehelin M. et al., 1975).

Существует две главные проблемы, которые тормозят понимание того, как у насекомых согласованы клеточные иммунные реакции. Во-первых, трудно идентифицировать типы клеток в многослойных капсулах или узнать, составляют ли морфологические классы клеток функционально специализированные подклассы. Во-вторых, чрезвычайно сложно дать точные ответы на вопросы об инкапсуляции в естественных условиях. Поэтому знания о взаимодействии гемоцитов при формировании капсулы, главным образом основаны на описательных, микроскопических исследованиях (Присный А.А., 2016). Понятный выбор состоял бы в том, чтобы провести соответствующий эксперимент *in vitro*. Но гемоциты насекомых часто очень нестабильны в культуре: некоторые клетки быстро образуют агрегаты или разрушаются, в то время как другие быстро адгезируют к поверхности стекла или стенкам пробирки. Таким образом, гемоциты не формируют капсулу вокруг экспериментальной цели. Методы предотвращения скопления клеток во время кровотечения включают сбор гемоцитов в среду с низким pH/ Ca^{2+} буфера. Агрегация гемоцитов в культуре была также подавлена трипсинизацией (Ratner S., Vinson S.B., 1983). Необходимо выяснить, требует ли инкапсуляция участия определенной субпопуляции гемоцитов.

Нодуляция – основной защитный клеточный ответ на бактериальную инфекцию у насекомых и других беспозвоночных. Установлено, что гемоциты образуют агрегаты вокруг бактерий и грибов (точно так же проявляется инкапсуляция – в виде скопления гемоцитов вокруг более крупных организмов, таких как нематоды). Посредниками процесса являются эйкозаноиды. Подавление биосинтеза эйкозаноидов у личинок *Manduca sexta*

при инфицировании бактериями *Serratia marcescens* немедленно уменьшает нодуляционный ответ (Miller J.S. et al., 1994).

1.2.2. Клеточная адгезия и взаимодействие гемоцитов, приводящее к распознаванию собственных и инородных клеток

Клеточное поглощение инородных объектов включает сближение и взаимодействие, приводящие к узнаванию посторонних агентов. Адгезия и взаимодействие гемоцитов и микробов приводит либо к фагоцитозу, когда поглощение зависит от адгезионных рецепторов мембраны, постепенно окружающей инородный объект, либо к формированию мембранного впячивания, втягивающего объект в клетку (рис. 2) (Beckage N., 2008; Pathak J.P.N., 1993).

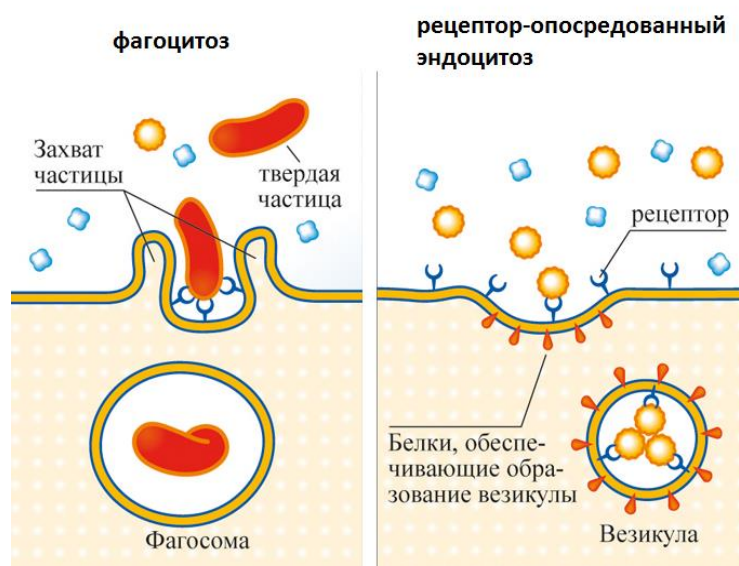


Рисунок 2 – Схема фагоцитоза и эндоцитоза (Mukherjee S. et al., 1977)

После начального адгезивного контакта рецепторами адгезии (рис. 3) разрушение мембранных контактов до цитоплазматических тяжей обеспечивает латеральное движение рецепторов. Это приводит к постепенному притягиванию мембран, сближению клеток и формированию более прочных контактов. В конечном счете, эти две клетки формируют общую плоскую поверхность двух смежных мембран, воздействия клеток друг на друга уравновешены. Сила взаимодействия мембран различных

клеток с неодинакова и это приводит к формированию пузырька и последующему фагоцитозу (Beckage N., 2008).

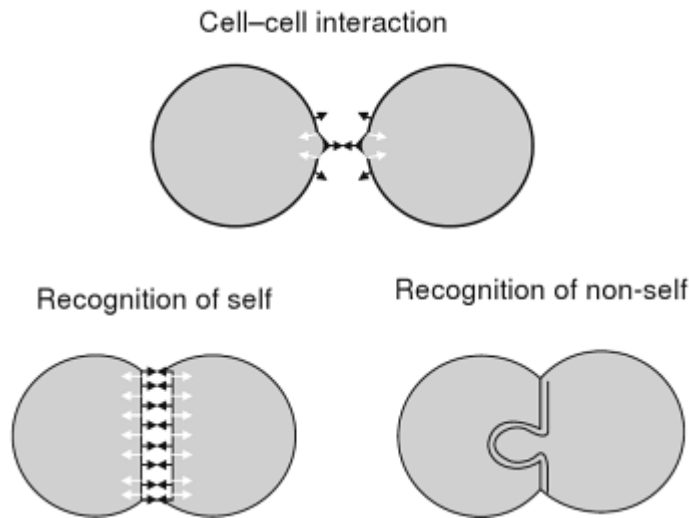


Рисунок 3 – Механизм распознавания объектов гемоцитами (Beckage N., 2008)

Насекомые, а именно *D.melanogaster*, становятся предпочтительной моделью исследования механизмов, лежащих в основе фагоцитоза апоптотических клеток фагоцитами при формировании или преобразовании тканей (Franc N.C., 2002). Обнаружение апоптотических клеток и их поглощение макрофагоподобными иммунными или пограничными эпителиальными клетками обеспечивается иммунными и скавенджер-рецепторами (Franc N.C. et al., 1999; Grimstone A.V. et al., 1967).

В то время как множество генных функций было идентифицировано у *D. melanogaster* и *Caenorhabditis elegans*, механизм узнавания и апоптоза все еще неясен. Однако уникальные механизмы самоузнавания, как «перетягивание каната» между двумя клетками, где мелкие изменения в составе комплексов мультипротеинов могут создать различие в равновесии сил, являются основанием для поглощения апоптотических клеток без потребности в передаче сигналов. Например, эпителиальные клетки изменяют мембранные свойства путем выделения фосфатидилсерина на внешней мембранной поверхности, что может привести к нестабильности межклеточного взаимодействия. В результате происходит формирование вакуолей, которые указывают на поглощение

апоптотических клеток пограничными (соседними) или макрофагоподобными клетками (Beckage N., 2008).

Фагоциты распознают инородные частицы посредством ряда рецепторов на их клеточной мембране. При связывании рецепторов с мишенью запускается серия реакций, индуцирующих поглощение объекта и, в конечном счете, его разрушение. Сформировавшиеся в результате захвата чужеродного материала фагосомы вскоре взаимодействуют с лизосомами, образуя фаголизосомы. Эти процессы приводят к активации гидролитических ферментов (кислой фосфатазы, неспецифической эстеразы, пероксидазы), разрушающих микроорганизмы. Конечная стадия фагоцитоза – внутриклеточное разрушение – завершается достаточно быстро. К примеру, гемоцитам таракана *Blaberus craniifer* необходим всего 1 час для полного разрушения различных видов бактерий. Несмотря на существенный объем накопленных знаний о фенолоксидазной системе и синтезе антибактериального пептида, явления фагоцитоза и нодуляции недостаточно изучены. Сравнительно недавно были обнаружены два трансмембранных белка Eater и Nimrod на поверхности гемоцитов дрозофилы. Эти белки являются медиаторами бактериального фагоцитоза. Однако об участниках, вовлеченных в нодуляцию, до сих пор не сообщается (Beckage N., 2008).

Фагоцитоз у жесткокрылых (*Popillia japonica*) был количественно изучен после различных воздействий (Wang Y., Gaugler R., 1998), но к настоящему моменту в доступной литературе нет данных, касающихся вопроса, какой тип гемоцитов в первую очередь вовлечен в фагоцитоз у представителей этого семейства (Giulianini P.G. et al., 2003).

Как отмечает Kurtz (2002), было бы интересно выяснить, оказывает ли влияние возраст клетки на фагоцитарную активность у беспозвоночных в отсутствие адаптивной иммунной системы (Kurtz J., 2002). Отмеченное экологическое различие между личиночной и взрослой стадией у *Cetonischema aeruginosa* побудило изучить гемоциты, вовлеченные в иммунологические реакции этого вида (Giulianini P.G. et al., 2003). Можно

предположить, что иммунологическая система личинки должна быть более эффективной, чем у взрослых особей. Следовательно, различные классы гемоцитов будут играть различную роль на этих двух стадиях развития.

Giulianini и соавт. было проведено исследование процесса фагоцитоза у личинок *C. aeruginosa*. У контрольной группы насекомых брали гемолимфу из спинного сосуда и делали мазки для световой микроскопии. Насекомым из опытной группы №1 вводили стерильный фосфатный буфер. В спинной сосуд представителям опытной группы №2 были введены 100 мкл латексных частиц диаметром 0,9 μm (водная суспензия, 10%-ое содержание твердых частиц) растворенные 1:10 в 0,15 М стерильном фосфатном буфере. После 4 ч. гемоциты были собраны и приготовлены препараты. Шесть типов клеток гемолимфы было обнаружено в гемолимфе *C. aeruginosa*, и они были идентифицированы как прогемоциты, гранулоциты, плазмоциты, коагулоциты, эноцитоиды и сферулоциты. Процентное соотношение типов гемоцитов личинок *C. aeruginosa* представлено в таблице 3.

Таблица 3 – Процентное соотношение типов гемоцитов у личинок *C. aeruginosa* (Giulianini P.G. et al., 2003)

Тип гемоцитов	Контроль	Опыт 1	Опыт 2
PRs	1,4 \pm 1,9	0,9 \pm 0,6	1,4 \pm 0,9
GRs	49,3 \pm 7,1	17,0 \pm 5,0	23 \pm 1,2
GRs*	-	-	5,8 \pm 2,9
PLs	10,9 \pm 4,0	2,5 \pm 1,8	10,8 \pm 3,4
COs	30,7 \pm 6,1	47,5 \pm 21,0	23,4 \pm 9,4
OEs	0,1 \pm 0,3	0,7 \pm 0,5	0,9 \pm 0,7
OEs*	-	-	0,4 \pm 0,3
SPs	2,0 \pm 0,9	19,7 \pm 6,9	40,8 \pm 9,4
Неидентифицированные клетки	5,6 \pm 2,3	11,8 \pm 11,3	14,3 \pm 6,3

GRs* и OEs* – процент гранулоцитов и эноцитоидов, участвовавших в фагоцитозе.

Спустя 4 ч. после инъекции $0,9 \mu\text{m}$ латексных шариков гранулоциты демонстрируют заметную активность наличием в них фагосом, содержащих объекты фагоцитоза. Можно отметить и одиночные шарики латекса внутри фагосом или до 11 штук внутри одной фагосомы. Гранулы сливаются с фагосомами и извергают в них свое содержимое, что делает пространство вокруг использованных объектов фагоцитоза более электронноплотным. Мультивезикулярные тельца также присутствуют. В гранулоцитах, которые демонстрируют заметную фагоцитарную активность, цитоплазма наполнена латексными шариками, отсутствуют гранулы и характерны разрывы плазмалеммы (Giulianini P.G. et al., 2003).

Активированные плазмоциты имеют неправильную форму, от круглой до очень удлинённой, и их ядра могут быть глубоко изрезаны. Отличительной особенностью является наличие в цитоплазме различного числа (до 20) круглой или неправильной формы светлых (ярких, светящихся) пузырьков размером около $0,8 \mu\text{m}$. Активированные эноцитойды могут поглощать до девяти латексных шариков, каждый из которых находится внутри фагосомы: поверхность плазматической мембраны остается гладкой и имеется лишь несколько коротких филоподий. В своей работе авторы отмечают, что поглощение одного латексного шарика производится короткими большими филоподиями. Активированные сферулоциты претерпевают кардинальные изменения, становятся неправильной формы и количество гранул в цитоплазме может в значительной степени варьировать. Латексные гранулы не были обнаружены внутри сферулоцитов (Giulianini P.G. et al., 2003).

После слабой активации стерильным натрий-фосфатным буфером количество сферулоцитов, вероятно, участвующих в нодуляции, существенно увеличивается (от $2,0 \pm 0,9\%$ до $19,7 \pm 6,9\%$) и их форма изменяется при контактировании с другими клетками. Кроме того, они выпускают свои гранулы в гемолимфу. После инъекции латексных шариков количество сферулоцитов увеличивается до $40,8 \pm 9,4\%$. Следовательно, имеет место

быстрое массовое вовлечение этого класса гемоцитов из кроветворных тканей (Giulianini P.G. et al., 2003).

Rowley и Ratcliffe отметили, что энцитойды мало распространены среди различных таксонов насекомых, и они, в основном, встречаются у Lepidoptera (Rowley A.F., Ratcliffe N.A., 1981). Наличие энцитойдов у *C. aeruginosa* согласуется с их присутствием и ультраструктурным описанием у *M. melolontha* (Devauchelle G., 1971). Кроме того, наличие гранул, аналогичных таковым у гранулоцитов, а также их фагоцитарная активность, совпадает с предположением, что они могут являться незрелыми гранулоцитами и представлены как «полужернистые клетки» в исследовании Battistella и Amirante (Battistella S., Amirante G.A., 1999). Они составляют $0,1 \pm 0,3$ % от числа циркулирующих гемоцитов в нормальных условиях, и их численность достигает $1,3 \pm 0,9$ % (или 22%, если опустить существенный процент сферулоцитов) после инъекции латексных шариков. Эти факты можно объяснить привлечением энцитойдов из гемопоэтических тканей (Battistella S., Amirante G.A., 1999).

Различные вмешательства приводят к значительным изменениям в соотношении типов гемоцитов у *C. aeruginosa*. Уменьшение численности гранулоцитов после инъекции только натрий-фосфатного буфера и в комплексе с латексными шариками можно объяснить сопутствующим повышением числа коагулоцитов и сферулоцитов. Введение латексных гранул также способствовало цитолизу гранулоцитов, участвующих в фагоцитозе. Обращает на себя внимание увеличение численности плазматоцитов и сферулоцитов, которые контактируют друг с другом (Battistella S., Amirante G.A., 1999).

Brehelin при изучении инкапсуляции имплантированных инородных тел в *L. migratoria* и *M. melolontha* выявил, что гранулоциты не способны к фагоцитозу, а коагулоциты, обладая «структурированными глобулами», обладают мощной способностью к фагоцитозу (Brehelin M. et al., 1975). Brehelin с соавт. проводили сравнительный анализ форменных элементов

гемолимфы насекомых из девяти отрядов и отметили, что гранулоциты не фагоцитируют, но играют важную роль в инкапсуляции (Brehelin et al., 1978). Кроме того Ratcliffe и Rowley сообщили, что плазмоциты являются преобладающим типом гемоцитов и участвуют в фагоцитозе у насекомых, как в естественных условиях, так и *in vitro* (Ratcliffe N.A., Rowley A.F., 1979). Ими описан эксперимент *in vitro*, где плазмоциты *P. americana* извергали свои гранулы в фагосомы, содержащие поглощенные латексные частицы. У *Galleria mellonella* плазмоциты являются основным типом фагоцитирующих гемоцитов *in vitro* (Rowley A.F., Ratcliffe N.A., 1979), но, с другой стороны, исследования показывают, что у одних и тех же видов и гранулоциты, и плазмоциты участвуют в фагоцитозе в условиях *in vitro* (Tojo S. et al., 2000).

Плазмоциты *Mythimna unipuncta* демонстрировали пониженную фагоцитарную активность, в то время как гранулоциты были главным фагоцитирующим элементом (Ribeiro C. et al., 1996). Гранулоциты и энцитойды из *C. aeruginosa* являются единственными типами гемоцитов, вовлеченными в процесс фагоцитоза в условиях *in vivo*. Нельзя с уверенностью исключить фагоцитарную роль плазмоцитов *C. aeruginosa*, которые, на самом деле демонстрируют интенсивный пиноцитоз и распластывание, но их неспособность поглощать крупные частицы в естественных условиях была подтверждена (Giulianini P.G., 2003).

У дрозофилы вторжение инородных объектов вызывает мощный клеточный ответ, с выходом плазмоцитов из лимфатической железы (Lanot R. et al., 2001). Кроме того, запускается дифференциация ламеллоцитов (Carton Y., Nappi A.J., 1997). После того, как распознается внедряющийся объект, следует инкапсуляция. Она требует приобретения циркулирующими плазмоцитами адгезивных свойств, что позволит им связаться с мишенью. Плазмоциты контактируют и распластываются по всей поверхности объекта. После того, как клетки распределились, они формируют перегородки, таким образом, отделяя инородное тело от гемоцеля. Последние фазы инкапсуляции

включают адгезию ламеллоцитов и меланизацию связанную с дегрануляцией кристаллических клеток (Russo J., et al., 1996).

1.2.3. Коагуляция гемолимфы у насекомых

При повреждении покровов у многих насекомых гемолимфа, вытекающая наружу, свертывается и образует кровяной сгусток. В свертывании гемолимфы принимают участие гемоциты и плазма. Этот процесс протекает в два этапа: сначала происходит коагуляция плазмы, а затем агглютинация гемоцитов.

Насекомые, у которых происходит истинное свертывание гемолимфы, довольно редки; например, у *Gryllus* образуется настоящий сгусток с выпадением фибрина. Этот процесс не останавливается в присутствии оксалатов, и для него не обязательно наличие кальция. Набранная в капилляр гемолимфа многих видов жесткокрылых, в особенности жуков нарывников и насекомых, обладающих способностью выбрасывания крови, свертывается через 5-10 мин (Шовен Р., 1953).

У *Periplaneta* свертывание гемолимфы состоит в образовании клеточного «сгустка» из гемоцитов; клетки теряют присущую им дискоидальную или веретенообразную форму, округляются, начинают преломлять свет, затем выпускают тонкие отростки и, наконец, дегенерируют и слипаются вместе. Плазма при этом изменяется довольно слабо; в ней можно заметить выпадение небольшого количества частиц, находящихся в броуновском движении, но не наблюдается, ни образования волокон, ни изменения вязкости. Свертывание гемолимфы у *Blatta* происходит в основном так же, как и у мечехвоста *Limulus*. Этот процесс можно полностью или частично затормозить, нагревая насекомое до 60° в течение 10 мин.; гемоциты, взятые у таких «нагретых» насекомых, сохраняют свой нормальный вид. Присутствие щавелевокислого кальция не оказывает никакого влияния на свертывание гемолимфы, а предварительная инъекция нуклеиновой кислоты может его затормозить. Наконец, гемолимфа личинок

пчел, *Rhodnius* и *Schistocerca* вообще не свертывается (Шовен Р., 1953; Житенева Л.Д. с соавт., 2001).

Некоторые коагулоциты способны выделять коагулины – вещества, вызывающие свертывание гемолимфы. Цитоплазма коагулоцитов заполнена гранулами, исчезающими вскоре после начала коагуляции. По-видимому, содержимое этих гранул расходуется на образование коагулинов (Тыщенко В.П., 1986).

У насекомых, гемолимфа которых не свертывается, коагулоциты не демонстрируют важных изменений в структуре. Коагулоциты видов, у которых происходит коагуляция гемолимфы, неустойчивы и не адгезируются на подложке или стеклянных стенках сосуда. Они быстро подвергаются изменениям в структуре, которые играют важную, если не исключительную, роль в иницировании коагуляции плазмы (Vilmos P., Kurucz E., 1998). Первый вид изменений у представителей *Orthoptera*, характеризуется последовательностью различных местных реакций в цитоплазме коагулоцитов, вызванных нарушениями поверхностного напряжения в этих элементах, образуются сгустки в виде «островков». У различных видов распространение этих процессов приводит к общему свертыванию (Gregoire С.Н., 1951).

Второй вид изменений в цитоплазме коагулоцитов включает выпячивание несколькими клетками одновременно нитевидных псевдоподий и формирование из них «сетей» различной сложности. Эти изменения сопровождаются формированием в плазме псевдоподиальных прозрачных, упругих, медленно развивающихся «завес». В отличие от коагулоцитов, другие категории клеток гемолимфы не принимают участие в процессе коагуляции. Они включены в «островки» коагуляции, в «завесах», или собраны в группы, вдоль расширений псевдоподиальной сети коагулоцитов (Gregoire С.Н., 1951).

Вероятно, что беспозвоночные с открытой системой циркуляции используют реакции коагуляции не только для заживления ран, но также и для инактивации болезнетворных микроорганизмов (Theopold U. et al., 2004). Ранее информация об этих внеклеточных реакциях защиты долго оставалась

неизвестной из-за трудностей анализа продуктов коагуляции на биохимическом уровне, сейчас же стало очевидно, что регуляторные каскады, управляющие коагуляцией и меланизацией (Cerenius L., Söderhäll K., 2011), являются частью наследственной защитной реакции. Частицы, содержащие липиды – липофорин и вителлогенин – известны, как прокоагулянты у членистоногих (Hall M. et al., 1999). Некоторые плазменные компоненты, включая иммунные белки, связаны с липидными частицами, изменяющими их свойства в присутствии элиситоров (Schmidt O., Theopold U., 1992). Например, липофориновые частицы у насекомых взаимодействуют с липопротеинами и другими белками плазмы крови, такими как аполипопротеин III (Niere M. et al., 2001), профенолоксидаза, факторами роста имагинального диска и с морфогенами. Эти частицы могут быть вовлечены в многоэтапные процессы, включая метаболизм липидов, иммунные реакции, рост и развитие (Schmidt O. et al., 2005).

Присутствие уникальных липидных частиц, вовлеченных в гомеостатические функции внутри и снаружи клеток, совместимо с функцией «датчика». Фактически, некоторые белки, требуемые для поглощения и транспорта липидов, такие как аполипопротеин III у насекомых, регистрируют состав липида и присутствие липополисахаридов (LPS). Липидные частицы отвечают на LPS агрегацией (Ma G. et al., 2006), и возможно, что первые шаги в процессе распознавания вовлекают комплекс LPS в липидную часть частицы. Аналогично, эти частицы могут отвечать на другие изменения, такие как модификация липида в условиях окисления, изменениями в их свойствах (Panakova D. et al., 2005).

Липидные частицы – идеальные биологические датчики. Они распределены повсеместно, содержат липиды и гликолипиды, которые легко изменяются и окисляются, обеспечивая возможность реагирования на многие изменения в окружающей среде. Кроме того, будучи подобными клеточным мембранам, они в состоянии подражать вредным воздействиям, отвечая на экологические сигналы и изменяя свои функциональные свойства. Они превращаются в иммунные исполнительные элементы, становясь адгезивными частицами, которые могут скапливаться вокруг токсинов или болезнетворных микроорганизмов (Beckage N., 2008).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования, организация эксперимента

Исследования проведены на базе кафедры биологии НИУ «БелГУ». Проведено 4 серии исследований.

В экспериментах использованы представители класса Insecta, отряда Dictyoptera (Blattodea): *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758), *Blatta orientalis* (Linnaeus, 1758), *Shelfordella tartara* (Saussure, 1874) (сем. Blattidae), *Blattella germanica* (Linnaeus, 1767) (сем. Blattellidae), *Gromphadorhina portentosa* (Schaum, 1853), *Blaberus craniifer* (Burmeister, 1838), *Nauphoeta cinerea* (Olivier, 1789) (сем. Blaberidae). В связи с тем, что единой систематики мировой фауны таракановых нет, поскольку таксономическая ревизия этой группы насекомых не осуществлена (Дремова В.П., Алешо Н.А., 2011), в работе использована систематика видов тараканов, которая была разработана McKittrick F.A. (1964), Roth L.M. (1970) и дополнена Cochran D.G. (1999) и Анисюткиным Л.Н. (2006).

Определение видовой принадлежности подопытных животных осуществляли при помощи различных источников (Беклемишев В.Н., 1958; Плавильщиков Н.Н., 1994; Жужиков Д.П., Алешо Н.А., 1997; Дремова В.П., Алешо Н.А., 2011).

Исследования выполнены с соблюдением требований Хельсинкской декларации по гуманному обращению с животными (Хельсинкская декларация этических принципов, 2008) и в соответствии с директивами Совета Европейского сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и научных целях. Сбор и содержание экспериментальных животных осуществляли в соответствии с общепринятыми методами (Коган А.Б., Щитов С.И., 1954; Присный А.А., 2013, 2016).

Для проведения каждой серии экспериментов использовали гемолимфу 12 представителей каждого вида. Из пробы гемолимфы каждой особи отобрано и использовано в исследованиях по 50 клеток всех типов.

В первой экспериментальной серии проведено изучение морфометрических показателей гемоцитов в изотонических условиях. Осуществлено исследование таких параметров, как линейные размеры клеток, площадь поверхности и объем клеток, способность гемоцитов к формированию псевдоподий, форма и размеры ядра, положение ядра в клетке, наличие и размеры гранул. Определение размеров гемоцитов и оценку визуальных параметров проводили с применением инвертированного оптического микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E в режиме дифференциально-интерференционного контраста с использованием системы фиксации изображения. Обработку полученных изображений осуществляли с помощью программного обеспечения ВидеоТест-Размер 5.0 (ООО «Микроскоп Сервис», г. Санкт-Петербург) (рис. 4). Кроме того, линейные размеры клеток, высоту гемоцитов и их объем определяли, используя Зондовую Нанолaborаторию «Интегра Вита» (NT-MDT, Россия).

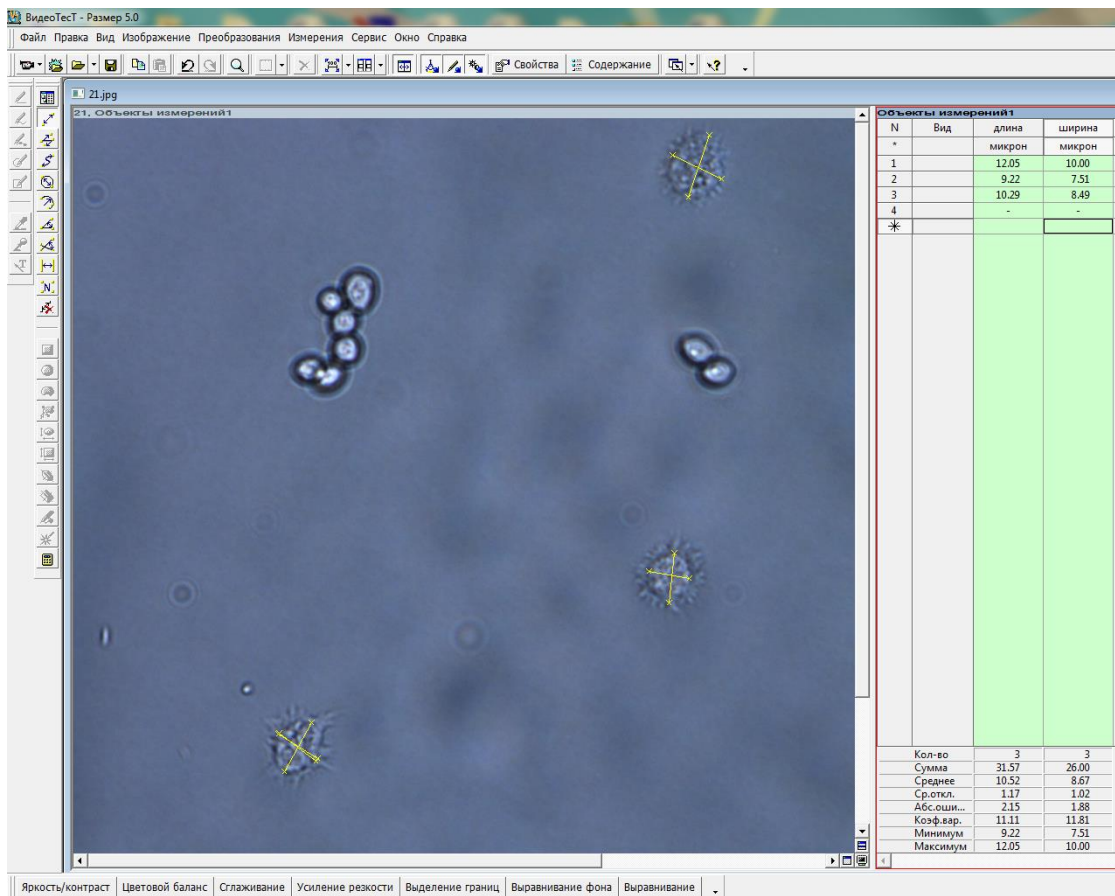


Рисунок 4 – Измерение гемоцитов с помощью программного приложения «ВидеоТест – Размер 5.0»

Во второй серии экспериментов исследовали способность гемоцитов к фагоцитозу в изотонических условиях, а также при осуществлении проб с осмотической нагрузкой *in vitro*. Фагоцитарные реакции изучали с помощью инкубации гемоцитов с культурой дрожжевых клеток (*Saccharomyces cerevisiae*) при комнатной температуре в течение 30 минут. С помощью программного приложения Nis-Elements в режиме реального времени получали фотографии гемоцитов, после чего определяли способность различных клеток к фагоцитозу в норме и при использовании осмотической нагрузки с расчетом фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа.

В третьей серии исследований осуществляли изучение осморегуляторных реакций гемоцитов при проведении осмотических тестов *in vitro*. Были определены следующие параметры: линейные размеры клеток, площадь поверхности и объем клеток, способность гемоцитов к формированию псевдоподий, форма и размеры ядра, положение ядра в клетке, наличие и размеры гранул. По итогам третьей серии экспериментов были рассчитаны показатели абсолютного и относительного мембранного резерва, интенсивность использования мембранного резерва в условиях сильногипотонической нагрузки.

В четвертой экспериментальной серии были исследованы показатели упругости клеточной мембраны, сила адгезии мембраны к нанозонду, а также рельеф поверхности гемоцитов в норме и при проведении осмотической нагрузки *in vitro*. Изучение этих параметров осуществляли, используя Зондовую Нанолабораторию «Интегра Вита» (NT-MDT, Россия). Определены амплитудные и функциональные среднестатистические показатели шероховатости поверхности.

Обоснование методик исследования

Объектами исследования в данной работе выбраны гемоциты насекомых, относящихся к отряду Dictyoptera.

Работы по исследованию и классификации клеток гемолимфы насекомых велись на протяжении достаточно длительного времени, но,

преимущественно, не содержали достаточного исследовательского материала (Gupta A.P, 1979; Ratcliffe N.A. et al., 1985; Lackie A.M., 1988; Ribeiro C., Brehelin M., 2006). Единая классификация гемоцитов насекомых приведена в работе А.А. Присного (2016), однако представителям Таракановых было уделено недостаточно внимания. Кроме того, детальное исследование гемолимфы семи видов тараканов привело к необходимости пересмотра разработанной типологии и описания гемоцитов изученных видов в соответствии с новыми данными.

Важность исследования физиологических свойств гемоцитов тараканов обусловлена уникальным для беспозвоночных количеством идентифицированных клеточных типов, а также тем, что эти клетки выполняют в организме ряд значимых функций: транспортную, концентрационную, гомеостатическую и защитную, обеспечивая широкие адаптационные возможности исследуемых животных (Беклемишев В.Н., 1964; Галактионов В.Г., 2005).

В связи с тем, что в большинстве ранних исследований (Житенева Л.Д., 2001; Akai H., Sato S., 1973; Rowley A.F., Ratcliffe N.A., 1981; Brehelin M., Zachary D., 1986; Pathak J.P.N., 1993; Giulianini P.G. et al., 2003; Beckage N., 2008; Wang C.L. et al., 2010) динамика функциональных свойств нативных гемоцитов практически не изучена, наиболее удачным подходом к типологии клеток гемолимфы насекомых является комплексный анализ физиологических и морфологических свойств гемоцитов.

Представители отряда Dictyoptera относятся к пойкилотермным животным, подвержены паразитарным и инфекционным инвазиям, поэтому важным является исследование осмотической устойчивости иммунных клеток гемолимфы.

Морфофункциональной основой для реализации объемных гомеостатических реакций клеток является мембранный резерв, т.е. запасы плазмалеммы, которые заложены в ее складчатости (Зацепина Г.Н. с соавт., 1992; Тарасова И.М., 1985; Федорова М.З., Левин В.В., 2001; Скоркина

М.Ю., 2014). Физиологическая роль клеточного мембранного резерва заключается в активации волюмо-чувствительных путей ионного транспорта, осуществлении механизмов эндоцитоза, особых разновидностей подвижности клеток, активирования и стимуляции внутриклеточных метаболических реакций (Федорова М.З. с соавт., 2007; Pastan I., Willingham M. C., 1981; Steinman R.M. et al., 1983; Al-Habori M., 2001; Minton A.O., 2005). Мембранный резерв является одной из важнейших морфофункциональных особенностей клеток циркулирующих жидкостей. Он используется фагоцитами для образования псевдоподий при амебоидном движении и захвате инородных объектов в ходе защитных реакций. В поддержании функциональной активности форменных элементов большое значение имеет система саморегуляции объема клеток и упругие свойства мембраны гемоцитов (Bagge U. et al., 1977, 1980). 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 нее. Таким образом, происходит или увеличение, или уменьшение объема гемоцита. 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 нее осмотически активных веществ: электролитов (прежде всего Na^+ и K^+), а также органических осмолитов (McManus M.L. et al., 1995).

В большинстве животных клеток регулируемое уменьшение объема связано с потерей KCl через активированные калиевые и хлорные каналы или с активацией K^+, Cl^- -котранспорта. Регулируемое увеличение объема осуществляется путем поглощения KCl и NaCl . Накопление этих солей происходит через Na^+/H^+ - и $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -насосы или благодаря Na^+ , K^+ , 2Cl^- -

котранспорту. Активация этих систем происходит в течение нескольких секунд или минут в связи с тем, что плазмалемма богата транспортными белками или они быстро в нее встраиваются в составе цитоплазматических везикул (Орлов С.Н., Гурло Т.Г., 1991).

Ключевую роль в объемном гомеостазе клетки играют органические осмолиты. Они обнаружены в гиалоплазме клеток всех организмов: от бактерий до млекопитающих. Основными группами этих веществ являются аминокислоты и их производные (аланин, пролин, таурин), многоатомные спирты (глицерол, сорбитол, миоинозитол) и метиламины (бетаин). Благодаря физическим и химическим свойствам они могут накапливаться клеткой в большом количестве без нарушения структуры и функции, в то время как большие изменения концентрации электролитов могут вызывать нарушения метаболизма (например, денатурацию макромолекул, изменение мембранного потенциала) (Головко С.И., 2010; Орлов С.Н., Новиков К.Н., 1996).

Для осуществления оценки относительной величины мембранного резерва гемоцитов использовали динамическую пробу в виде осмотической нагрузки *in vitro*. При проведении нагрузок в качестве среды для гемоцитов представителей отряда Dictyoptera применяли соответствующие растворы солей (Коган А.Б., Щитов С.И., 1954; Присный А.А., 2013, 2016).

Механизмы регуляции объема зависят не только от ионной концентрации, которая создается работой систем транспорта, но и от упруго-эластических свойств мембраны и подмембранных белков (Скоркина М.Ю., 2014). Поэтому осуществляли исследования упруго-эластических свойств с использованием методов атомно-силовой микроскопии.

Осмотические тесты *in vitro*

Отбор материала. Гемолимфу тараканов получали с применением модифицированных стандартных методик (Шовен Р., 1953; Злотин А.З., 1989; Присный А.А., 2013). Гемолимфу не подвергали центрифугированию, антикоагулянты не использовали.

Осмотическая нагрузка. Осморегуляторные реакции гемоцитов и использование ими мембранного резерва определяли при помощи проб с гипертоническими и гипотоническими нагрузками (Фёдорова М.З., Левин В.Н., 1997). Гипотонический и гипертонический растворы хлорида натрия применяли в качестве сред с измененной осмолярностью (Коган А.Б., Щитов С.И., 1954).

Осмолярность растворов хлорида натрия, использовавшихся в эксперименте для гемоцитов представителей отряда Dictyoptera, составила 331,9 мосмоль/л для изотонического раствора хлорида натрия (0,97 % NaCl), 160,8 мосмоль/л для гипотонического раствора хлорида натрия (0,47 % NaCl), 513,2 мосмоль/л для гипертонического раствора хлорида натрия (1,5 % NaCl) и 82,1 мосмоль/л для сильногипотонического раствора хлорида натрия (0,24 % NaCl).

Для изучения резервных возможностей мембраны и осморегуляторных реакций гемоцитов был модифицирован комплексный метод (Фёдорова М.З., Левин В.Н., 1997; Федорова М.З., Левин В.Н., 2001; Зубарева Е.В., 2011; Скоркина М.Ю., 2014; Присный А.А., 2016; Raucher D., Sheetz M., 1999; Groulx N. et al., 2006).

Полученную гемолимфу делили на четыре части, каждую из которых помещали в отдельную чашку Петри. Далее добавляли по 10 μ m раствора NaCl определенной концентрации.

Инкубацию проводили в течение 30 минут. В течение данного периода с помощью оптического инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E отмечали происходящие изменения активности клеток, их формы и размера, а также фиксировали случаи гибели гемоцитов вследствие разрыва плазматической мембраны. По истечении времени инкубации делали фотографии в режиме реального времени в программном приложении Nis-Elements и измеряли морфометрические параметры гемоцитов.

При изучении клеточных характеристик допускали, что гемоциты имеют форму неравностороннего эллипсоида, в связи с этим осуществляли

измерение большой, средней и малой осей. Используя значения полученных линейных размеров, рассчитывали площадь поверхности клеток и их объём по следующим формулам: (Трасатти С., Петрий О.А., 1993):

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

где S – площадь поверхности гемоцита (μm^2); a – большая полуось, т.е. S длины (μm); b – малая полуось, т.е. S высоты (μm); c – средняя полуось, т.е. S ширины (μm); $p=1,6075$ – коэффициент К. Томсена;

$$V=4/3(pabc), \quad (2)$$

где V – объём (μm^3); a – большая полуось, т.е. S длины (μm); b – малая полуось, т.е. S высоты (μm); c – средняя полуось, т.е. S ширины (μm).

Используя значения площади поверхности, оценивали резервные возможности плазмалеммы гемоцитов.

Рассчитывали абсолютную величину мембранного резерва (ΔS) как разность между площадью поверхности клетки в сильногипотоническом растворе и площадью поверхности клетки в изотонической среде (Орлов С.Н. Новиков К.Н., 1996).

$$\Delta S = S(CT) - S(I), \quad (3)$$

где ΔS – резерв плазматической мембраны (μm^2); $S(CT)$ – площадь поверхности клетки, после инкубации в сильногипотонической среде (μm^2); $S(I)$ – площадь поверхности клетки, после инкубации в изотонической среде (μm^2).

С целью сравнения использования мембранного резерва в сильногипотоническом растворе гемоцитами насекомых определяли относительный мембранный резерв (MR) с использованием формулы (Орлов С.Н., Новиков К.Н., 1996):

$$MR = (\Delta S / S(CT)) \cdot 100 \%, \quad (4)$$

где MR – доля используемого мембранного резерва (%); ΔS – резерв плазматической мембраны (μm^2); $S(CT)$ – площадь поверхности клетки, после инкубации в сильногипотонической среде (μm^2).

Определяли ядерно-цитоплазматическое соотношение (ЯЦО) с использованием следующей формулы:

$$\text{ЯЦО} = S_{\text{я}}/S_{\text{ц}}, \quad (5)$$

где: $S_{\text{я}}$ – площадь ядра клетки, $S_{\text{ц}}$ – площадь цитоплазмы.

Изучение показателей фагоцитоза

Особенностью метода является то, что объектом фагоцитоза являются живые пекарские дрожжи *S. cerevisiae*. Для исследования фагоцитарной реакции гемоцитов *S. cerevisiae* удобны и интересны по нескольким причинам. Во-первых, одними из наиболее распространенных заболеваний насекомых являются микозы. Поэтому выявление дефекта фагоцитоза по отношению именно к грибам, может свидетельствовать о потенциальной уязвимости тестируемых организмов к микозам. Во-вторых, в клеточной стенке *S. cerevisiae* содержится зимозан, поэтому они не требуют опсонизации, что значительно упрощает постановку реакции фагоцитоза. В-третьих, в силу своих размеров (3-4 μm) они хорошо визуализируются при микроскопии (Злотин А.З., 1989; Присный А.А., 2016).

Приготовление суспензии дрожжей включало следующие этапы:

1. Растворяли 0,5 г сухих пекарских дрожжей в 25 мл изотонического раствора.
2. Выдерживали суспензию в течение 30 мин на водяной бане при 25° С и производили фильтрацию через ватно-марлевый фильтр.
3. Непосредственно перед постановкой реакции 1,0 мл суспензии трижды отмывали изотоническим раствором путем центрифугирования при 1000 об/мин по 5 мин. К 0,1 мл осадка добавляли 9,9 мл физиологического раствора для получения рабочей концентрации дрожжей.

Для изучения фагоцитарной реакции каплю гемолимфы помещали в чашку Петри с физиологическим раствором с последующей инкубацией с культурой дрожжевых клеток (*S. cerevisiae*) при комнатной температуре в течение 30 минут. Фиксировали изменение активности клеток, появление на

поверхности гемоцитов псевдоподиальных выростов и их тип, а также характер и направление движения клеток.

Наиболее распространенная морфология нативных гемоцитов, инкубированных в физиологическом растворе, обозначена как «нормальное распластывание» (НР), представляет полностью адгезировавшую клетку с клеточной мембраной, имеющей равномерные выпячивания и углубления. Данный тип характеризует неподвижное сидячее поведение этих гемоцитов. Два активных морфологических класса, «неполяризованный» (Не/П) и «поляризованный» (П), характерны для гемоцитов инкубированных в среде с добавлением дрожжевых клеток. Оба класса представляют полностью адгезировавшую клетку, которая демонстрирует чрезвычайно активную клеточную мембрану, образующую выступы и углубления под различными углами по отношению к области средней точки клетки, формируя раффлы. Существенное различие между этими двумя классами – то, что поляризованные клетки производят ламеллиподии (Гребцова Е.А., 2014).

Рассчитывали следующие показатели: фагоцитарный индекс (ФИ) – процент гемоцитов, участвовавших в фагоцитозе из числа сосчитанных фагоцитов; фагоцитарное число (ФЧ) – среднее число объектов, поглощенное одним активным фагоцитом.

Методы изучения топографии клеток и физических свойств мембраны

Одним из современных способов исследования морфологических особенностей мембраны клеток является атомно-силовая микроскопия (АСМ) (Гущина Ю.Ю. с соавт., 2005; Wu Y. et al., 2009; Beckmann M. et al., 1994). Используя для исследования топографии поверхности биологических образцов атомно-силовую микроскопию, возможно получение сканогамм с разрешением от нанометра до ангстрема (Deng Z. et al., 2010; Zou Q. et al., 2004). Преимущество использования АСМ для биологов состоит в том, что с помощью АСМ можно исследовать непроводящие объекты в невакуумной (например, на воздухе (Ushiki T. et al., 1996) или в жидкости (Hörber J.K., 1992), при этом, не окрашивая и не напыляя препараты (Ushiki T. et al., 1996).

С помощью сканирующего зондового микроскопа «Интегра Вита» (NT-MDT, Россия) проводили изучение морфологии поверхности нефиксированных гемоцитов.

В контактном режиме сканирования зонд, представляющий собой микроиглу с радиусом кривизны кончика 10 nm, непосредственно взаимодействует с поверхностью образца. Зонд прикреплен к концу очень гибкого кантилевера в виде балки прямоугольного сечения (Храмцов Ю.В., 2013). Кантилевер, в свою очередь, прикреплен к жесткому кремниевому основанию.

В контактном режиме зонд сканирует поверхность образца, находясь в непосредственном взаимодействии с ней. При этом, в зависимости от рельефа поверхности, меняется изгиб кантилевера. На верхнюю поверхность кантилевера падает луч лазера, который отражается на фотодетектор. Таким образом, изменение изгиба кантилевера фиксируется. За движение кантилевера относительно образца отвечает сканер на пьезоэлементах. Нами был задан изгиб кантилевера, который отвечает определённому значению сигнала с фотодетектора ($setpoint=2,144$). Система обратной связи в каждой точке поверхности (x, y) образца поддерживает постоянным значение этого изгиба с помощью вертикального (по оси z) движения сканера. Тем самым сила взаимодействия между зондом и образцом всегда остаётся постоянной и равной $-kx$, где k – коэффициент жесткости кантилевера, а x – изгиб кантилевера. При сканировании сила взаимодействия зонда с образцом составляет обычно от нескольких наноньютонов до нескольких десятков наноньютонов. Оператором также задаются пропорциональное и интегральное усиления, которые задают скорость, с которой система обратной связи реагирует на изменение рельефа образца. Они регулируют напряжение, которое подается на пьезоэлемент, отвечающий за вертикальное движение сканера АСМ. Оптимизация этих усилений позволяет добиться наилучшего сканирования зондом исследуемой поверхности. Контактный режим атомно-силовой микроскопии обладает рядом преимуществ перед

другими режимами. Он позволяет сканировать поверхность с высокой скоростью, что важно, например, при изучении протекания некоторых процессов в реальном времени. Кроме того, образцы с сильными вертикальными изменениями топографии проще всего сканировать именно в контактном режиме. Помимо этого, только в контактном режиме можно достичь атомарного разрешения исследуемой поверхности (Храмцов Ю.В., 2013).

Для исследования морфофизиологических характеристик гемоцитов методом контактной атомно-силовой микроскопии сканирование проводили с использованием кантилеверов марки НА_С1, жесткостью 0,06 Н/м с радиусом закругления 10 нм, частотой развертки сканирования 14 Hz.

Изучение взаимодействия зонда кантилевера с исследуемым образцом включает в себя использование силовых кривых. При этом сканирование в плоскости образца (x, y) прекращается, а осуществляется только вертикальное движение сканера. Силовые кривые представляют собой зависимости отклонения кантилевера (используя константу жесткости кантилевера можно рассчитать силу) от величины вертикального перемещения сканера микроскопа. По кривой, отвечающей за контакт зонда с образцом, можно определить эластические свойства образца, а по точке отрыва зонда от образца, оценить силу взаимодействия между зондом и образцом (Храмцов Ю.В., 2013). Сканирование клеток, а также анализ и обработку данных АСМ осуществляли с помощью программного обеспечения NT-MDT SPM Software – Nova 1.0.26.1443 (рис. 5-6) и Image Analysis P9.

Были определены линейные размеры гемоцитов по длинной и короткой осям (рис. 7), их высота (рис. 8) и объем (рис. 9).

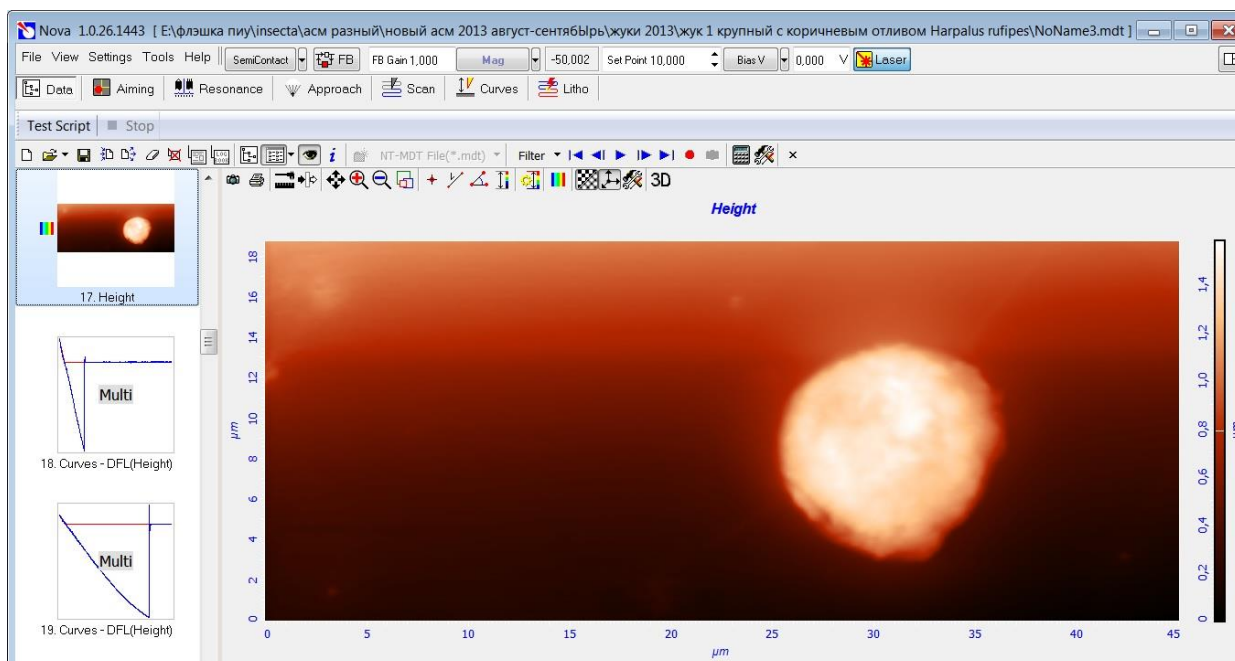


Рисунок 5 – Окно просмотра 2D данных (АСМ-изображений) программы Nova 1.0.26.1443, позволяющее оценивать морфологические параметры отсканированных образцов

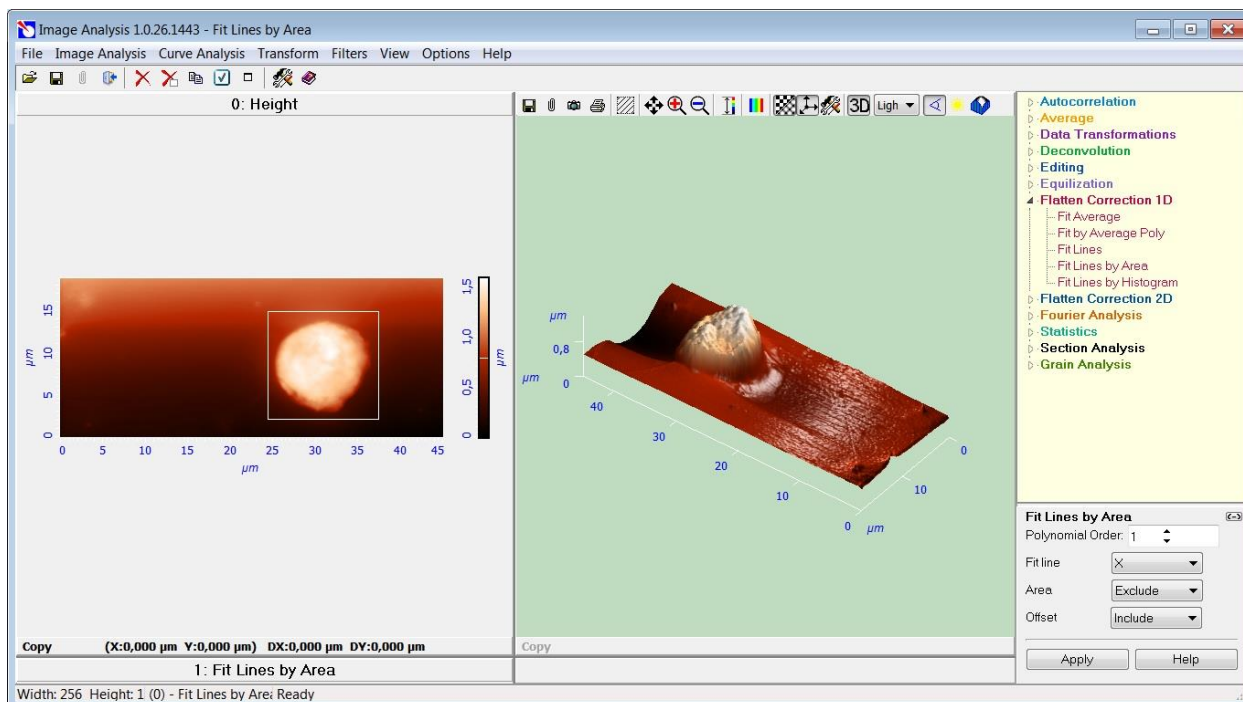


Рисунок 6 – Трёхмерное представление данных с помощью инструмента 3D/2D Image Representation, справа – после применения Fit Lines by Area Exclude (построчного вычитания полиномов)

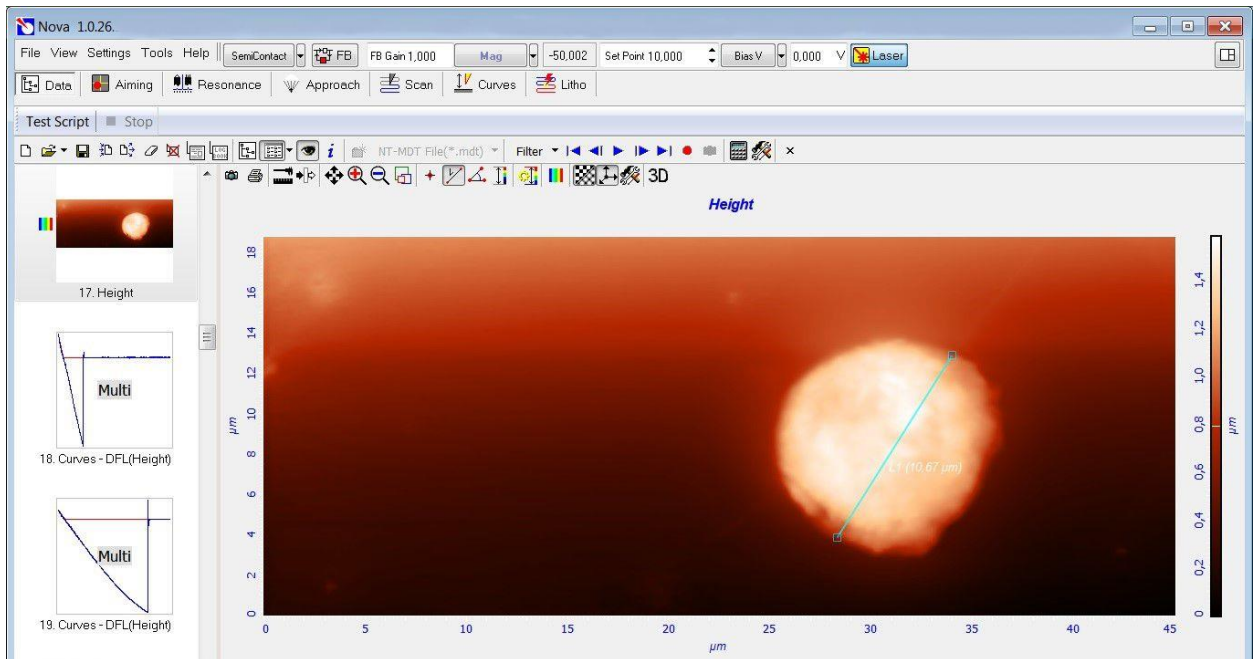


Рисунок 7 – Измерение линейных размеров клетки с помощью инструмента Length Instrument панели инструментов Окна 2D-данных, который позволяет измерить расстояние между двумя выделенными точками

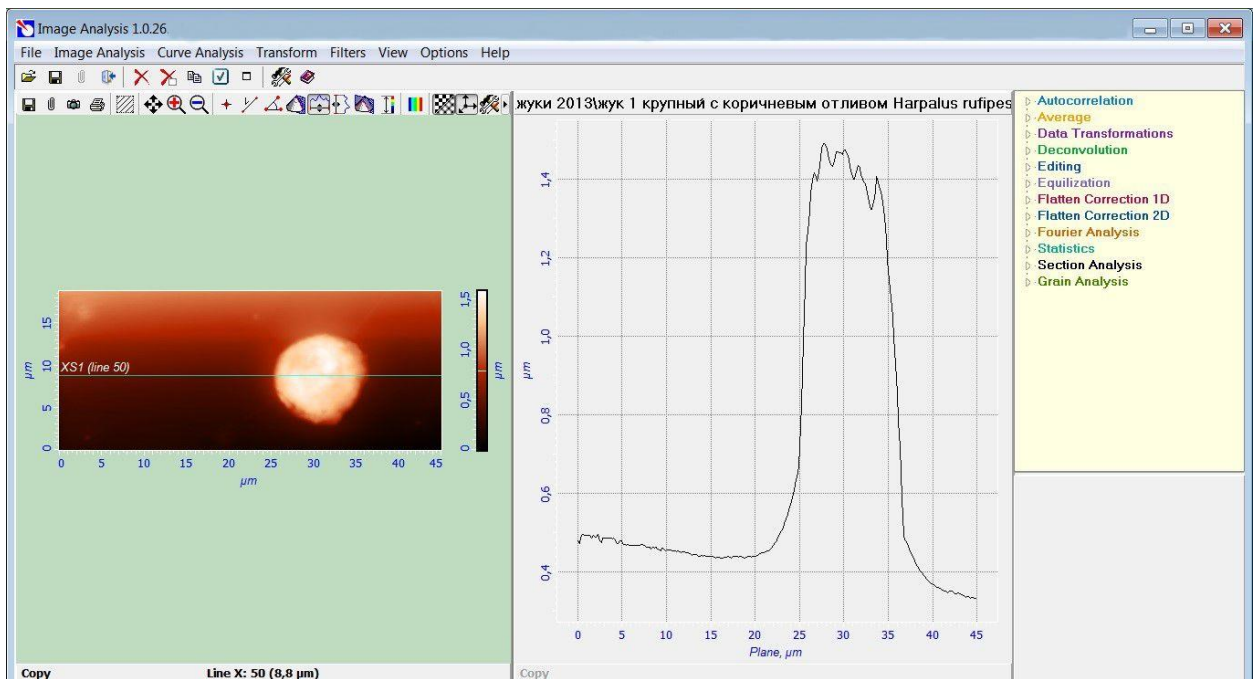


Рисунок 8 – Измерение высоты клетки в Окне 1D-данных с помощью инструмента Markers (одиночный маркер), после включения инструмента XSection (Сечения)

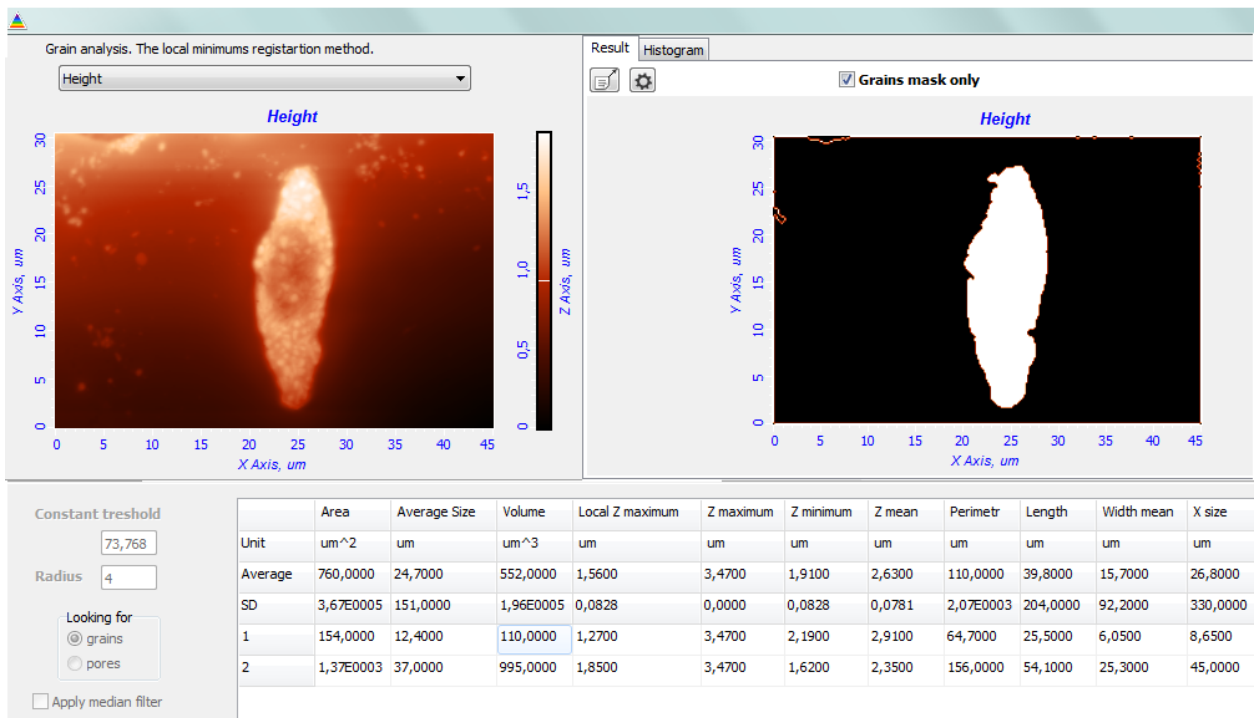


Рисунок 9 – Определение объёма клетки с помощью метода Grain Analysis

Данные по свойствам упругости и силы адгезии были получены в режиме атомно-силовой спектроскопии при наложении нагрузки в 16 локальных участках клеточной поверхности. В основе метода лежит снятие «силовых кривых» (DFL (Z)) с поверхности, отражающих отклонение гибкой консоли АСМ-зонда при приближении зонда к образцу в каждой точке наноидентирования. Отклонение балки от положения равновесия детектируется на четырехсекционном фотодиоде и выражается через ток рассогласования между верхней и нижними частями фотодиода. Полученные «силовые кривые» обрабатывали с помощью инструмента «Curves Analysis» (рис. 10-11). Анализ зависимости деформации образца от приложенной нагрузки позволил количественно оценить модуль упругости и сравнить этот показатель на разных участках клеточной поверхности.

Шероховатость поверхности, т.е. совокупность неровностей, образующих микрорельеф поверхности с относительно малыми шагами, является причиной того, что истинная площадь поверхности выше, чем геометрическая. 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 (Трасатти С., Петрий О.А., 1993). Учитывая параметры шероховатости, метод атомно-силовой микроскопии позволил точнее определить объем форменных элементов гемолимфы.

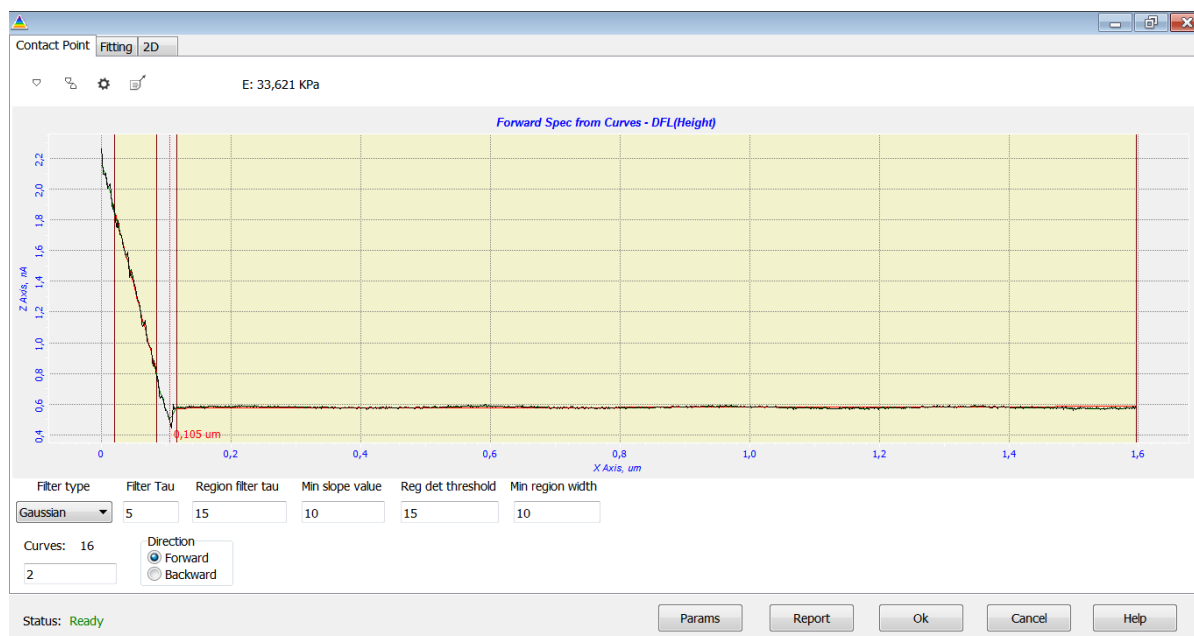


Рисунок 10 – Окно вычисления значений упругости на разных участках клеточной поверхности

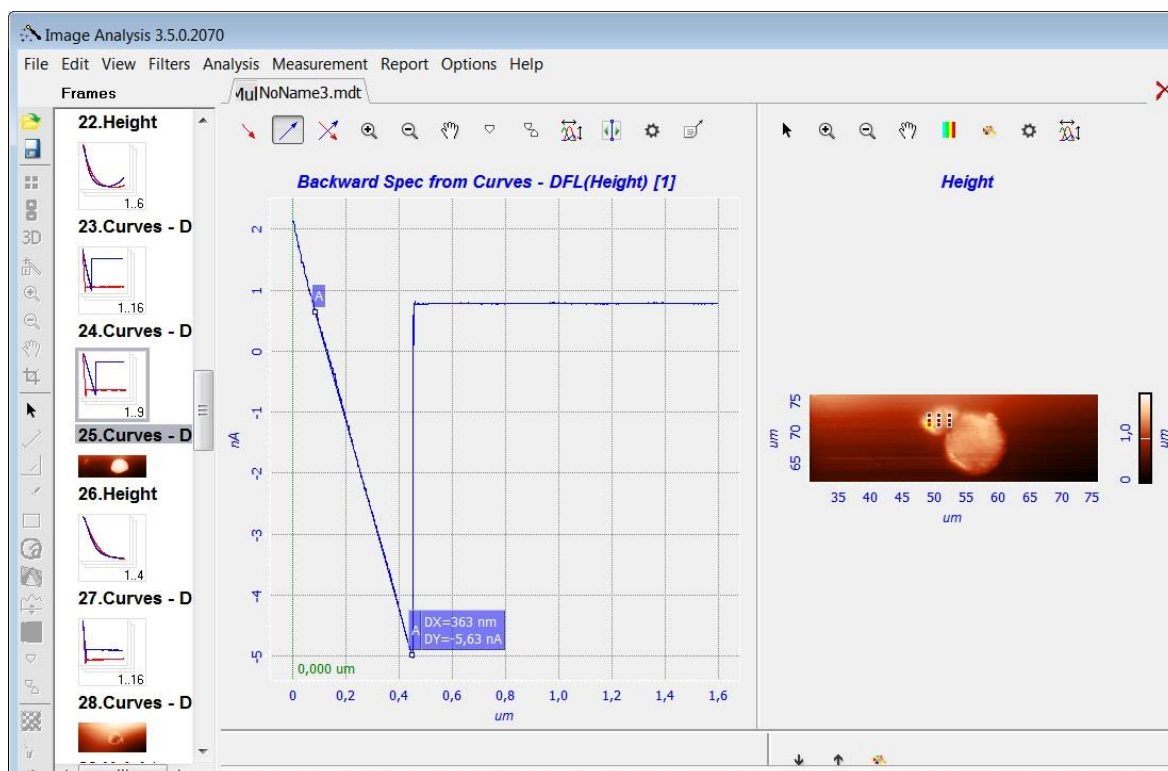


Рисунок 11 – Окно вычисления значений адгезии на разных участках клеточной поверхности

С помощью программного приложения Image Analysis P9 проведен анализ амплитудных (или, так называемых, высотных) среднестатистических параметров, служащих для характеристики нерегулярности поверхности в вертикальном направлении (Новак А.В., Новак В.Р., 2013).

Средняя квадратическая шероховатость S_q (Square Roughness) 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. Если данный параметр принимает отрицательные значение, то можно говорить о преобладаний микровпадин на поверхности гемоцитов, а при $S_{sk} > 0$ – о преобладаний возвышений в структуре микрорельефа.

Эксцесс S_{ku} (Kurtosis) характеризует протяженность распределения профиля. Если S_{ku} принимает значения больше или меньше трех, можно говорить о наличии экстремальных возвышений или впадин на поверхности мембраны. Значения, близкие трём, характеризуют нормальное распределение.

Параметр S_z ($\equiv S_t$) – 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.

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

Методы статистической обработки данных

Статистический анализ и обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica v.10.0, SPSS 11.0 (SPSS, Chicago, USA) и Excel 2013. Проверку нормальности распределения количественных показателей осуществляли с использованием критерия Колмогорова–Смирнова ввиду большой величины выборки ($n > 50$) (Гржибовский А.М., 2008б; Лапач С.Н. с соавт., 2001).

Для определения достоверности различий в случае негауссовых распределений использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Данные представлены как медиана и верхняя и нижняя квартили. Различия между данными, распределенными нормально, оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Критический уровень значимости был принят за 0,01. Показатели представлены как среднее арифметическое (M) и стандартная ошибка среднего значения (m) (Гржибовский А.М., 2008а; Гланц С., 1998; Малков П.Ю., 2009).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Гемоцитарный состав гемолимфы представителей отряда *Dictyoptera*

Анализ клеточного состава гемолимфы представителей отряда *Dictyoptera* позволил выделить 7 типов гемоцитов, которые были обнаружены в различных комбинациях у исследуемых видов. В гемолимфе *G. portentosa* присутствует специфичный восьмой тип форменных элементов – серповидные эноцитоиды.

Прогемоциты (Pr) (рис. 12-13) характеризуются наименьшими размерами. Клетки имеют правильную округлую форму, псевдоподий не образуют. Ядро крупное, цитоплазма занимает пристеночное положение.



Рисунок 12 – Прогемоциты (окраска азур-эозином по Романовскому), увеличение 40×

Прогемоциты, как правило, компактные, с относительно гладкими контурами. Ядерно-цитоплазматическое отношение максимально среди всех типов клеток. Клетки медленно закрепляются на субстрате, практически не распластываются и не меняют свою форму.

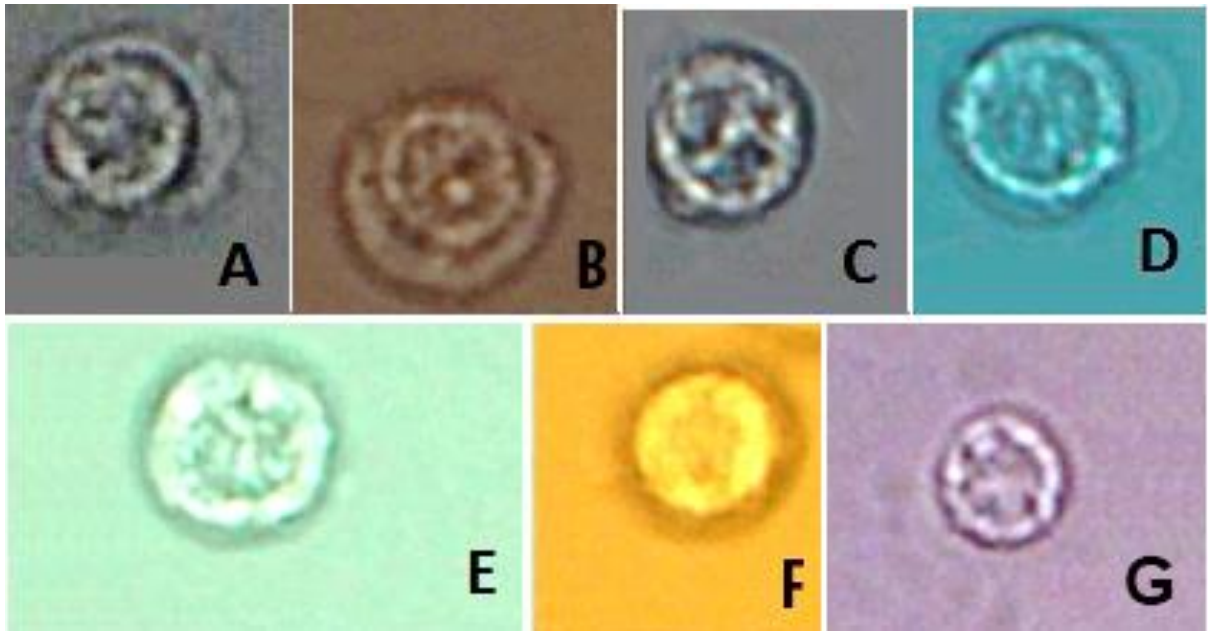


Рисунок 13 – Прогемоциты (изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×): А – *B. craniifer*, В – *G. portentosa*, С – *N. cinerea*, D – *P. americana*, E – *S. tartara*, F – *B. orientalis*, G – *B. germanica*

Плазмоциты (Pl) (рис. 14-15) – полиморфные крупные клетки, центрально расположенное ядро окружено мелкозернистой цитоплазмой. Данный тип форменных элементов демонстрирует тенденцию формировать агрегаты, число клеток в которых может достигать до 12-16. Подобное явление позволяет предположить участие этих гемоцитов в регенеративных и иммунных реакциях.

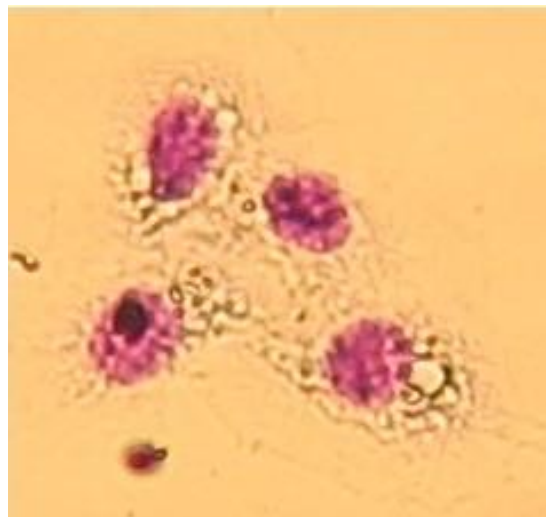


Рисунок 14 – Плазмоциты (окраска азур-эозином по Романовскому), увеличение 40×

Способность плазмоцитов к быстрому распластыванию на субстрате и адгезии к другим клеткам подтверждает их основную роль в процессах инкапсуляции инородных объектов. При инкубации с дрожжевыми клетками

адгезируют их на своей поверхности и некоторое время могут двигаться с ними с последующим поглощением.

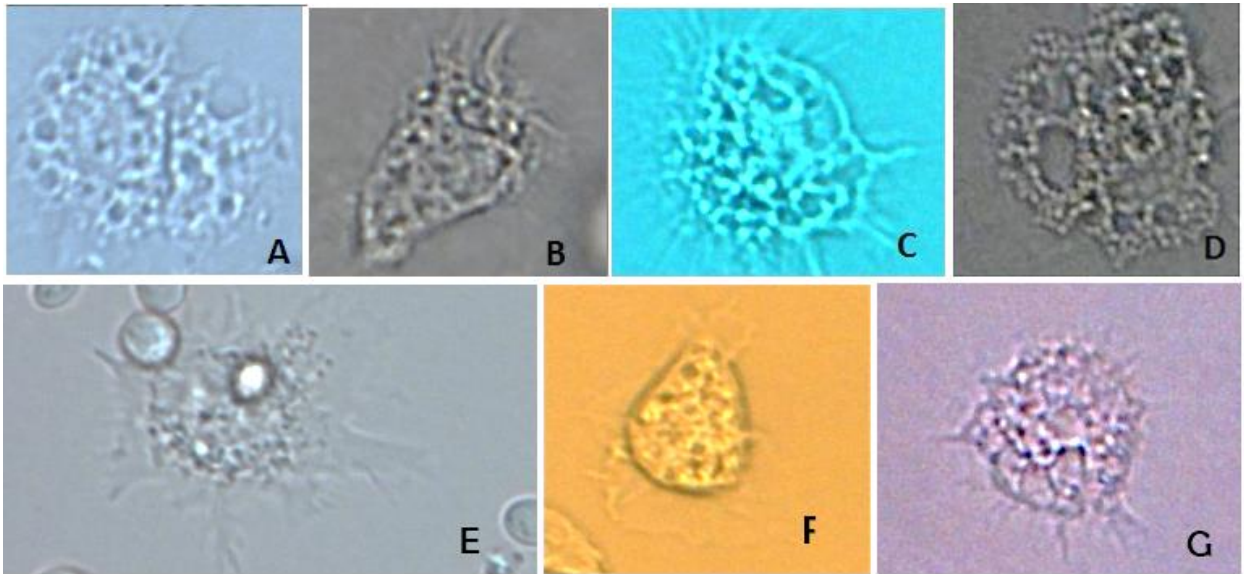


Рисунок 15 – Плазмодии (изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×): А – *P. americana*, В – *N. cinerea*, С – *G. portentosa*, D – *B. craniifer*, Е – *S. tartara*, F – *B. orientalis*, G – *B. germanica*

Гранулоциты (Gr) (рис. 16-17) – круглые или овальные клетки, цитоплазма заполнена мелкими гранулами. Ядро крупное, занимает как центральное, так и периферическое положение. При инкубации с дрожжами образуют множество ложноножек, активно передвигаются, распластывание на субстрате идет медленно.



Рисунок 16 – Гранулоциты (окраска азур-эозином по Романовскому; предварительно проведена инкубация с культурой *S. cerevisiae*, увеличение 60×): А – гемоцит, В – *S. cerevisiae*

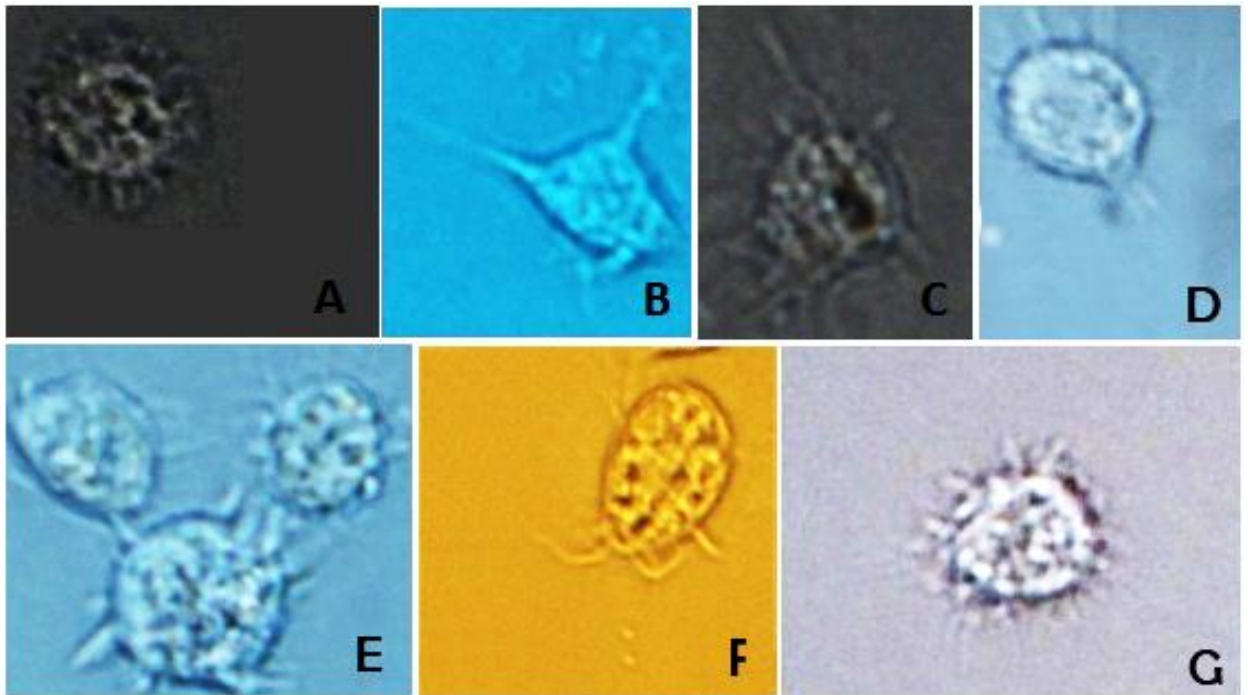


Рисунок 17 – Гранулоциты (изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×): А – *B. craniifer*, В – *G. portentosa*, С – *N. cinerea*, D – *P. americana*, E – *S. tartara*, G – *B. germanica*

Сферулоциты (Sph) (рис. 18) – крупные полиморфные клетки. Цитоплазма заполнена множеством везикул, которые иногда маскируют небольшое овальное или бобовидное ядро, расположенное эксцентрично.

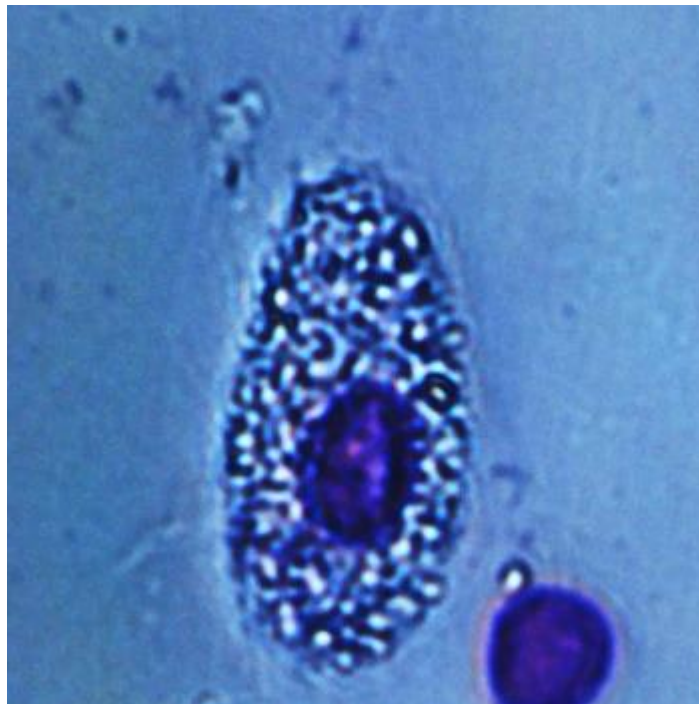


Рисунок 18 – Сферулоцит (окраска азур-эозином по Романовскому), увеличение 100×

Данный тип форменных элементов гемолимфы не способен к образованию псевдоподий. При добавлении к нативным сферулоцитам культуры дрожжевых клеток происходит быстрый выход везикул из цитоплазмы и окружение ими инородных объектов. Сферулоциты *S. tartara* и *P. americana* отличаются присутствием небольшого количества мелких сферул в цитоплазме и их рыхлым расположением (рис. 19). Во внутренней среде *B. orientalis* и *B. germanica* данный тип гемоцитов не был обнаружен.

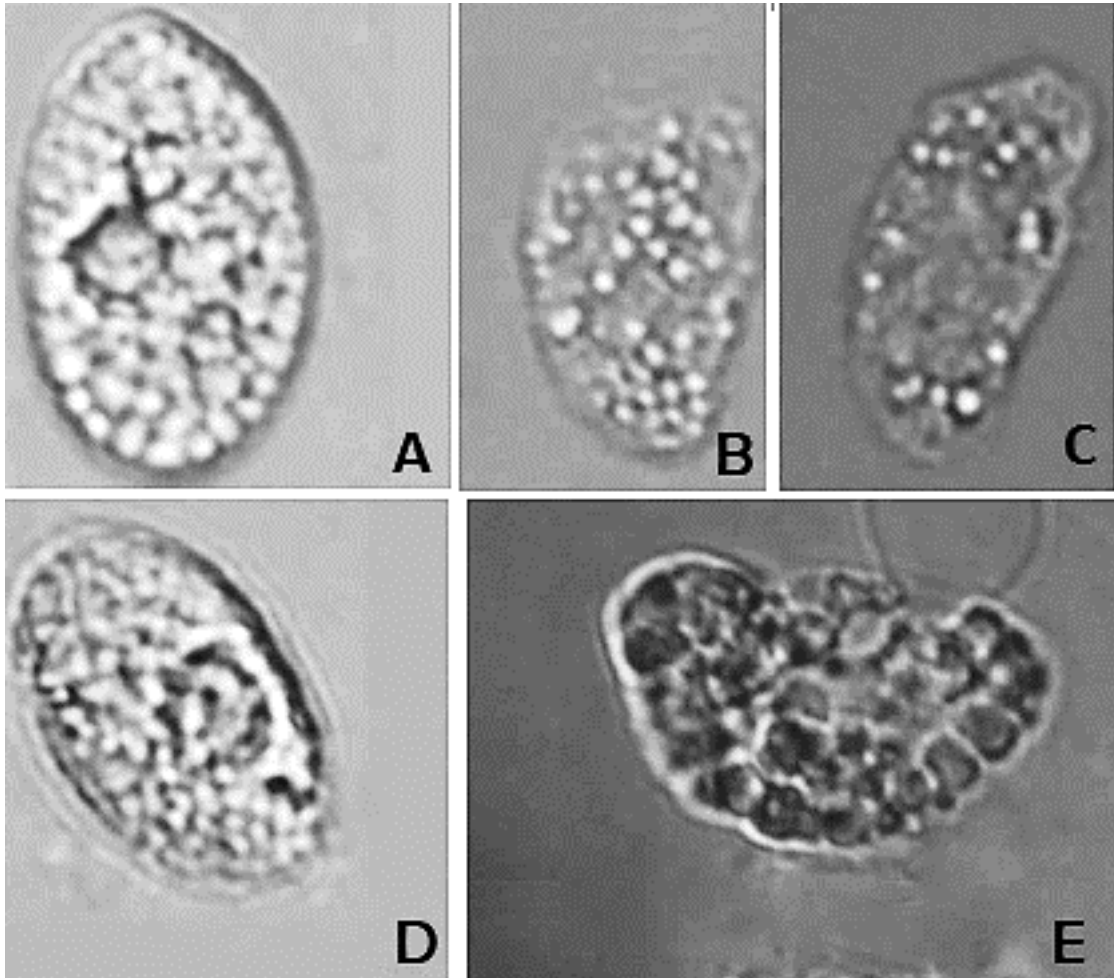


Рисунок 19 – Сферулоциты (изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×): А – *G. portentosa*, В – *S. tartara*, С – *P. americana*, D – *N. cinerea*, Е – *B. craniifer*

В гемолимфе *B. craniifer*, *S. tartara*, *P. americana*, *G. portentosa* обнаружены клетки, достигающие 17-20 μm в диаметре, их цитоплазма плотно заполнена бурыми сферическими гранулами, меньшего размера в сравнении с включениями сферулоцитов. Гемоциты имеют правильную круглую форму, ядро крупное (рис. 20). К отдельному типу эти клетки

отнесены не были. Предположительно, эти форменные элементы гемолимфы являются молодой формой сферулоцитов. Клетки образуют небольшое количество псевдоподий, и, вероятно, берут начало от гранулоцитов.



Рисунок 20 – Молодая форма сферулоцитов *B. craniifer*, *S. tartara*, *P. americana*, *G. portentosa* (изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×)

Веретеновидные плазмоциты или вермициты (Ver) (рис. 21-22) – веретеновидные или вытянутые клетки со светлыми включениями. Центральную часть клетки занимает небольшое ядро.

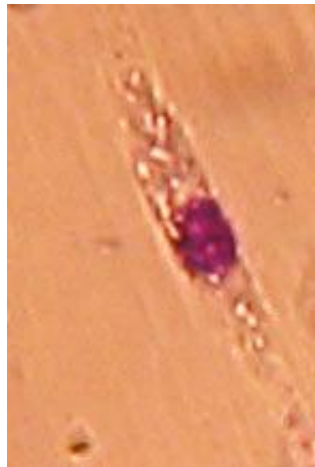


Рисунок 21 – Вермицит (окраска азур-эозином по Романовскому), увеличение 40×

При инкубации с дрожжами филоподии образуются чаще всего у полюсов, иногда по периферии появляются мелкие ризоподии. В гемолимфе *B. germanica* вермициты отсутствуют.

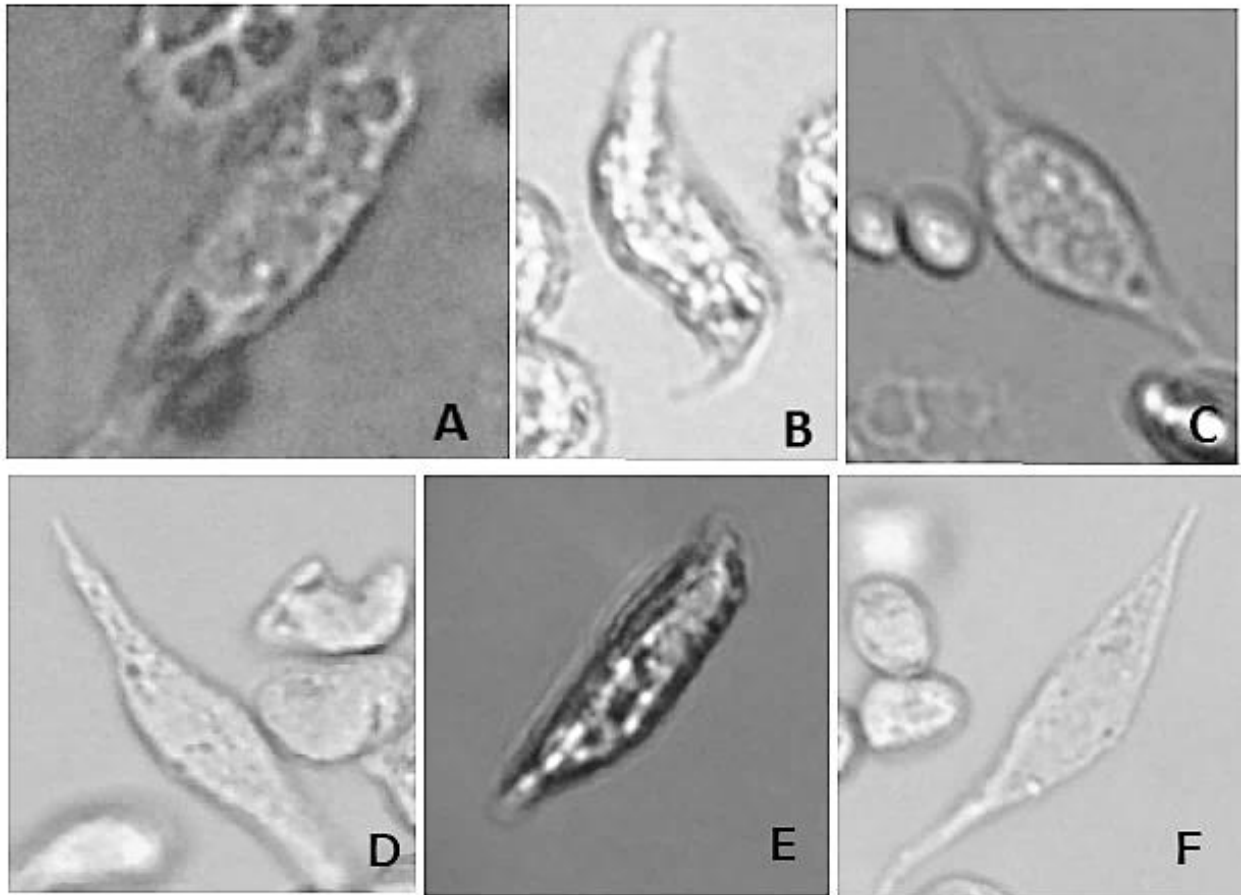


Рисунок 22 – Вермициты (изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×) – веретеновидные плазмоциты: А – *B. craniifer*, В – *S. tartara*, С – *P. americana*, D – *G. portentosa*, E – *N. cinerea*, F – *B. orientalis*

Коагулоциты (Co) (рис. 23) – хрупкие клетки, с чертами как гранулированных гемоцитов, так и энцитоидов. Как и гранулоциты, коагулоциты содержат цитоплазматические включения. Это форменные элементы дисковидной формы около 15 μm в диаметре. Ядро расположено эксцентрично, реже характеризуется центральным размещением. Скопления гранул сосредоточены ближе к периферии клетки. Коагулоциты – неустойчивы и вне организма большая часть этих гемоцитов извергает свое содержимое. Коагулоциты неподвижны и не способны к формированию псевдоподий.

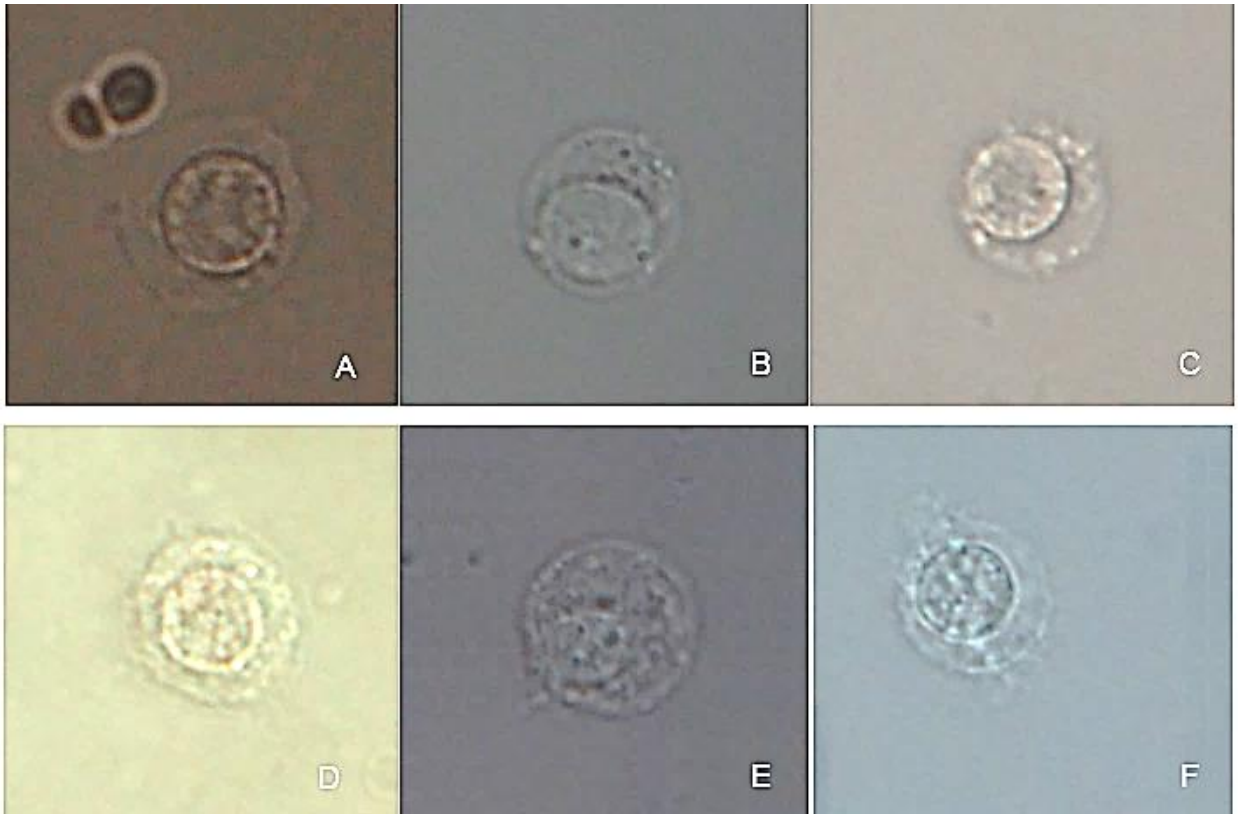


Рисунок 23 – Коагулоциты (изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×): А – *B. craniifer*, В – *N. cinerea*, С – *P. americana*, D – *S. tartara*, E – *B. germanica*, F – *G. portentosa*

Эноцитоиды (Oe) (рис. 24) – овальные или округлые крупные клетки. Ядро небольшое (около 3,5 μm), расположено эксцентрично. Цитоплазма гомогенная, содержит различные комплексы канальцев, гранул или кристаллов. Клетки неподвижные. Одна из особенностей эноцитоидов – их неустойчивость; они особенно хрупки *in vitro* и быстро разрушаются, выпуская материал в окружающую среду.

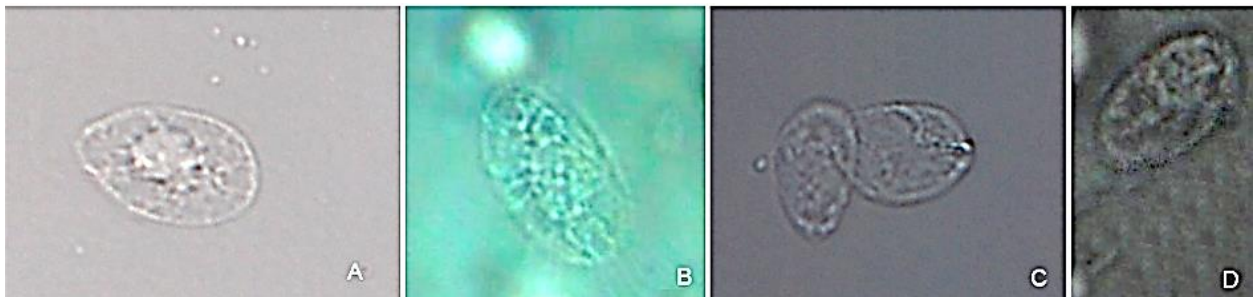


Рисунок 24 – Эноцитоиды (изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×):

А – *G. portentosa*, В – *N. cinerea*, С – *B. germanica*, D – *B. craniifer*

Серповидные эноцитоиды (Cr) (рис. 25-26) были обнаружены только у представителей *G. portentosa*.

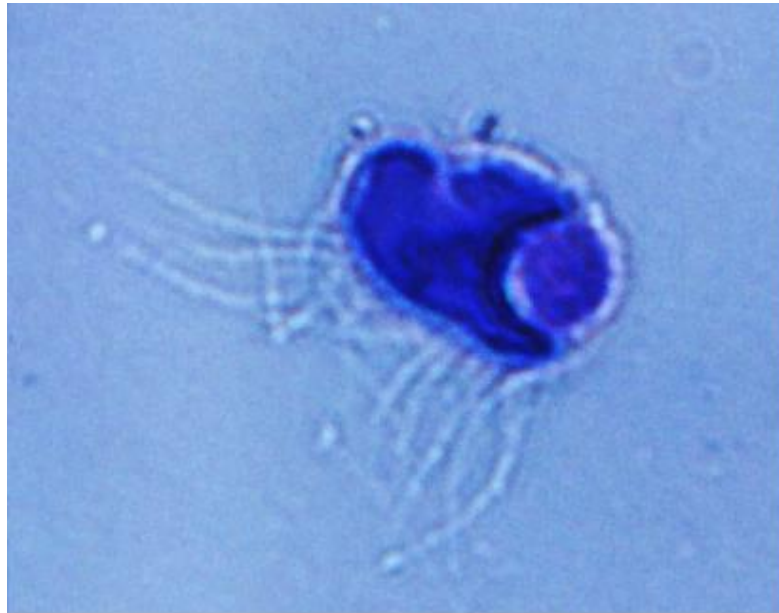


Рисунок 25 – Серповидный эноцитоид (окраска азур-эозином по Романовскому), увеличение 60×

Эти клетки малоподвижны – перемещение осуществляется с помощью длинных филоподий.



Рисунок 26 – Серповидный эноцитоид (изображение получено с помощью микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E, увеличение 60×

Процентное соотношение различных типов гемоцитов для каждого исследуемого вида представлено в виде гемоцитарной формулы (рис. 27).

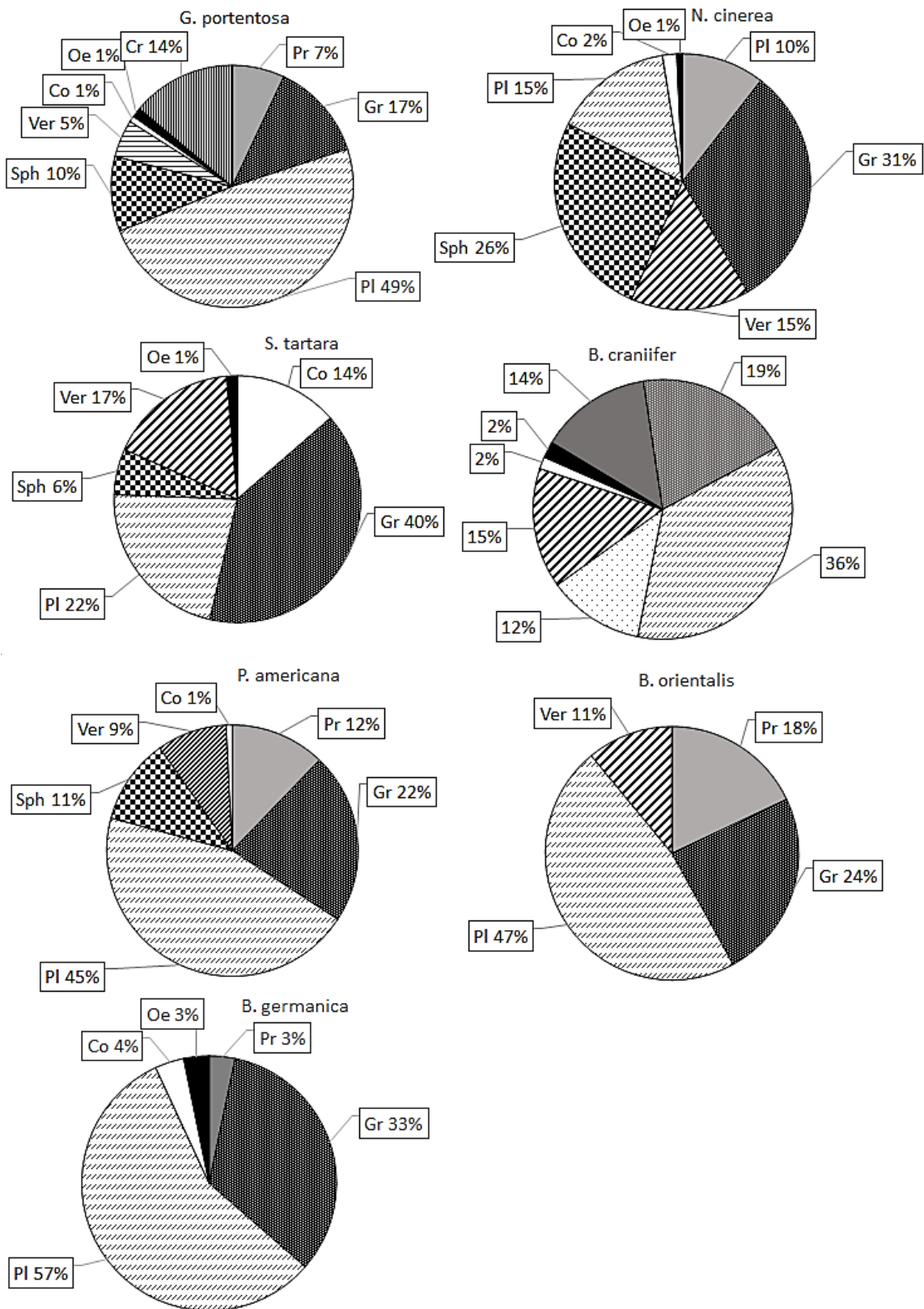


Рисунок 27 – Гемоцитарная формула гемолимфы представителей отряда Dictyoptera, %

У *S. tartara* и *N. cinerea* преобладающим типом гемоцитов являются гранулоциты, у остальных видов – плазмоциты. Минимальная доля приходится на коагулоциты и эноцитойды.

Для всех типов форменных элементов гемолимфы было рассчитано ядерно-цитоплазматическое отношение (табл. 4).

Таблица 4 – Ядерно-цитоплазматическое отношение гемоцитов представителей отряда Dictyoptera, усл. ед.

Тип	<i>N. cinerea</i>	<i>B. craniifer</i>	<i>G. portentosa</i>	<i>S. tartara</i>	<i>P. americana</i>	<i>B. orientalis</i>	<i>B. germanica</i>
Pr	0,42	0,47	0,39	0,33	0,54	0,51	0,60
Gr	0,14	0,11	0,14	0,12	0,22	0,19	0,17
Pl	0,33	0,13	0,37	0,33	0,41	0,27	0,12
Sph	0,18	0,13	0,12	0,12	0,22	-	-
Ver	0,30	0,20	0,30	0,28	0,24	0,09	-
Co	0,31	0,31	0,15	0,16	0,14	-	0,09
Oe	0,17	0,07	0,06	-	-	-	0,10
Cr	-	-	0,22	-	-	-	-

Максимальное ЯЦО отмечено у прогемоцитов ($\approx 0,47$), чья цитоплазма имеет пристеночное положение и образует светлый, узкий ободок вокруг ядра. Достаточно высокие значения ядерно-цитоплазматического отношения демонстрируют гранулоциты у всех изученных видов ($\approx 0,34$), за исключением *B. craniifer* и *B. germanica*. Минимальное ЯЦО установлено у эноцитойдов, имеющих относительно небольшое ядро.

3.2. Морфофизиологические показатели гемоцитов представителей отряда Dictyoptera в норме и при осмотической нагрузке

3.2.1. Изменение объема и использование мембранного резерва гемоцитами в условиях осмотической нагрузки

При воздействии на гемоциты исследуемых видов растворов различной солености установлены изменения показателей объема клеток. У *N. cinerea* в условиях гипоосмотической нагрузки происходит достоверное увеличение объема всех типов клеток, при этом объем сферулоцитов возрастает на 33 % ($p < 0,01$), а объем эноцитойдов не более, чем на 4,5 %. В гипертонических

условиях зафиксировано значительное снижение значений объема у прогемоцитов, гранулоцитов и вермицитов (на 20-22%) (табл. 5).

Таблица 5 – Объем гемоцитов *N. cinerea* в условиях осмотической нагрузки, μm^3

Тип клеток	Изотоническая среда	Гипотоническая среда	Гипертоническая среда
Pr	21,5 (20,7-22,2)	24,0* (22,6-25,3)	18,4* (17,7-19,0)
Pl	45,9 (42,4-49,1)	61,4* (58,5-64,5)	38,1* (36,5-39,8)
Gr	28,7 (28,0-29,4)	31,8* (30,9-32,7)	22,5* (20,6-24,2)
Sph	40,5 (38,1-43,3)	51,9* (49,9-54,2)	37,5* (35,2-39,4)
Ver	39,5 (37,4-41,6)	45,8* (44,1-47,9)	31,3* (30,0-32,5)
Co	104,7 (103,8-105,7)	127,6* (126,3-129,1)	95,4* (94,7-96,2)
Oe	37,4 (35,7-39,1)	39,0 (38,0-39,9)	37,4 (36,4-38,5)

* – статистически достоверные различия между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки по U-критерию Манна-Уитни при $p < 0,01$.

Плазмоциты, сферулоциты и коагулоциты, в целом, проявляют слабую устойчивость к гипоосмотической нагрузке. Клетки быстро увеличиваются в объеме, у 12% гемоцитов этот процесс сопровождается разрывом мембраны, из-за сильного набухания, и выходом внутриклеточных включений. У энцитозидов изменения объемных показателей при инкубации в гипертонической среде находятся вне пределов значимости.

Воздействие пониженной осмолярности среды ведет к увеличению размеров гранулоцитов всего на 10% и более рыхлому распределению гранул, инкубация в гипертонической среде способствует существенному уменьшению объема гранулоцитов (на 22%) с сохранением способности формировать псевдоподии (рис. 28).

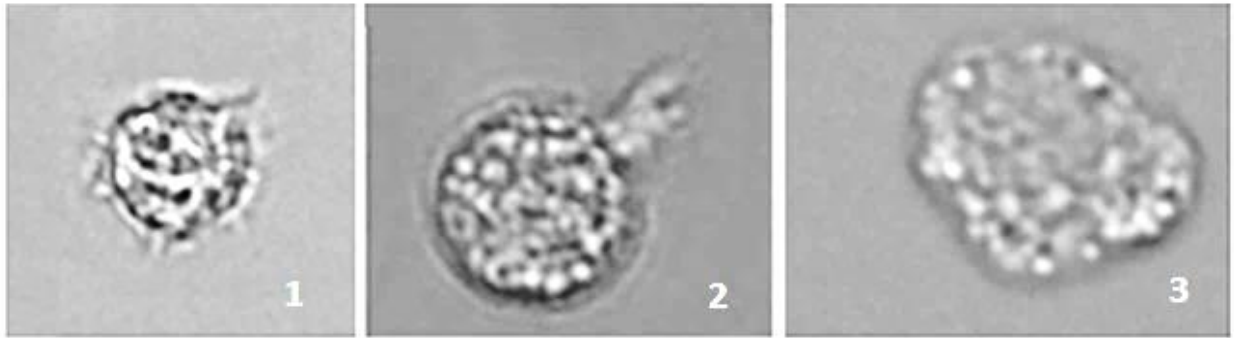


Рисунок 28 – Морфологические изменения гранулоцита *N. cinerea* при осмотической нагрузке: 1 – гипертонический раствор 2 – изотонический раствор, 3 – гипотонический раствор

У коагулоцитов низкое осмотическое давление приводит к сильному раздуванию клеток и увеличению их объема на 21,8%, тогда как гипертоническая среда не вызывает существенных изменений в величине линейных параметров.

Прогемоциты *N. cinerea*, в отличие от таковых форменных элементов гемолимфы других исследованных видов, демонстрируют наиболее высокие значения относительного мембранного резерва (табл. 6).

Таблица 6 – Площадь поверхности и значения мембранного резерва гемоцитов *N. cinerea*

Тип клеток	S поверхности (изотоническая среда, μm^2)	S поверхности (сильногипотоническая среда, μm^2)	Абсолютный мембранный резерв (μm^2)	Относительный мембранный резерв (%)
Pr	52,38 \pm 0,05	59,85 \pm 0,07	7,46 \pm 0,08	14,30 \pm 0,17
Pl	122,91 \pm 0,06	184,29 \pm 0,12	61,38 \pm 0,12	49,96 \pm 0,11
Gr	77,92 \pm 0,11	89,66 \pm 0,11	11,74 \pm 0,15	15,21 \pm 0,21
Sph	108,66 \pm 0,05	122,52 \pm 0,08	13,86 \pm 0,09	12,77 \pm 0,09
Ver	108,04 \pm 0,05	126,89 \pm 0,06	18,86 \pm 0,08	17,47 \pm 0,08
Co	237,30 \pm 0,06	285,79 \pm 0,05	48,49 \pm 0,07	20,44 \pm 0,04
Oe	99,76 \pm 0,07	102,93 \pm 0,07	3,17 \pm 0,10	3,21 \pm 0,10

В гипертонической среде веретеновидные плазмоциты демонстрируют значительное уменьшение размеров только по короткой оси. В условиях гипотонической среды наблюдается расширение центральной части гемоцита, величина мембранного резерва составляет 15%. Плазмоциты характеризуются максимальной величиной мембранного резерва, которая составляет 50%, что соотносится с данными о плазмоцитах, как о главных

фагоцитирующих элементах внутренней среды насекомых (Beckage N., 2008; Pathak J.P.N., 1993).

Наименьшая величина мембранного резерва зафиксирована у эноцитоидов, которая в среднем составляет около 3%. У гранулоцитов, коагулоцитов и вермицитов данный параметр находится в диапазоне 15%-20%.

Прогемоциты *B. craniifer* отличаются хорошей устойчивостью к понижению осмотического давления – при инкубации в гипотонической среде отмечено увеличение в объеме не более, чем на 10% (табл. 7). В условиях повышенной осмолярности клетки уменьшаются всего на 8%.

Таблица 7 – Объем гемоцитов *B. craniifer* в условиях осмотической нагрузки, μm^3

Тип клеток	Изотоническая среда	Гипотоническая среда	Гипертоническая среда
Pr	27,8 (26,2-29,3)	30,6* (29,9-31,3)	25,6* (23,8-27,4)
Pl	51,4 (50,1-52,7)	62,1* (60,5-63,6)	38,8* (36,9-40,7)
Gr	39,5 (38,3-40,6)	44,0* (42,9-45,5)	31,9* (30,9-32,9)
Sph	120,1 (118,1-122,1)	121,0 (118,5-124,0)	120,0 (118,1-121,7)
Ver	46,7 (43,7-49,4)	52,9* (50,6-55,5)	41,3* (36,0-46,7)
Co	115,6 (111,9-119,1)	125,6* (123,4-128,3)	109,2* (107,8-110,5)
Oe	38,4 (36,9-39,8)	38,8 (37,3-40,3)	36,0* (34,0-38,2)

* – статистически достоверные различия между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки по U-критерию Манна-Уитни при $p < 0,01$.

Гранулоциты и плазмоциты демонстрируют закономерность в реакции на воздействие осмотической нагрузки – величина объемных показателей изменяется в среднем на 22% и 15% соответственно для двух типов клеток. Плазмоциты за короткое время полностью распластываются на подложке, теряют способность формировать агрегаты. Оба типа плазмоцитов демонстрируют наибольшие значения мембранного резерва (табл. 9). У гранулоцитов и коагулоцитов зафиксирован небольшой мембранный резерв, его величина близка к таковой у прогемоцитов (около 10%).

Сферулоциты не реагируют изменением размеров в ответ на инкубацию в среде, отличной от физиологически нормальной. Веретенновидные плазмоциты более устойчивы к понижению осмолярности среды, в сравнении с обычными плазмоцитами. Они способны дольше сохранять свою форму и не расплываться на субстрате. Объем коагулоцитов уменьшается на 5,5% в условиях повышенного осмотического давления, и возрастает на 8,7% в гипотонической среде. В среде с пониженной концентрацией солей использование мембранного резерва энцитоидами минимально, как и у предыдущих исследованных видов (табл. 8).

Таблица 8 – Площадь поверхности и значения мембранного резерва гемоцитов *B. craniifer*

Тип клеток	S поверхности(изотоническая среда, μm^2)	S поверхности (сильногипотоническая среда, μm^2)	Абсолютный мембранный резерв(μm^2)	Относительный мембранный резерв (%)
Pr	67,69±0,05	73,80±0,10	6,10±0,10	9,06±0,17
Pl	137,51±0,05	165,28±0,07	27,77±0,09	20,20±0,07
Gr	94,23±0,09	104,05±0,09	9,82±0,12	10,48±0,14
Sph	271,08±0,19	276,89±0,13	5,81±0,23	2,17±0,09
Ver	107,30±0,12	123,23±0,14	15,92±0,18	14,93±0,18
Co	261,40±0,09	281,59±0,08	20,19±0,12	7,73±0,05
Oe	85,23±0,11	86,14±0,17	0,92±0,20	1,18±0,24

Форменные элементы гемолимфы *G. portentosa* демонстрируют высокую устойчивость к изменениям осмолярности среды. Лишь некоторые сферулоциты претерпевают разрыв наружной плазматической мембраны, в результате чего внутриклеточные включения выходят наружу (рис. 29). Величина объемных показателей прогемоцитов остается неизменной (табл.9).

Гемоциты, выполняющие фагоцитарную функцию (плазмоциты, гранулоциты и веретенновидные плазмоциты), значительно увеличиваются в объеме, однако сохраняют способность к формированию псевдоподий, что говорит об эффективном использовании мембранного резерва в условиях гипотонической нагрузки.

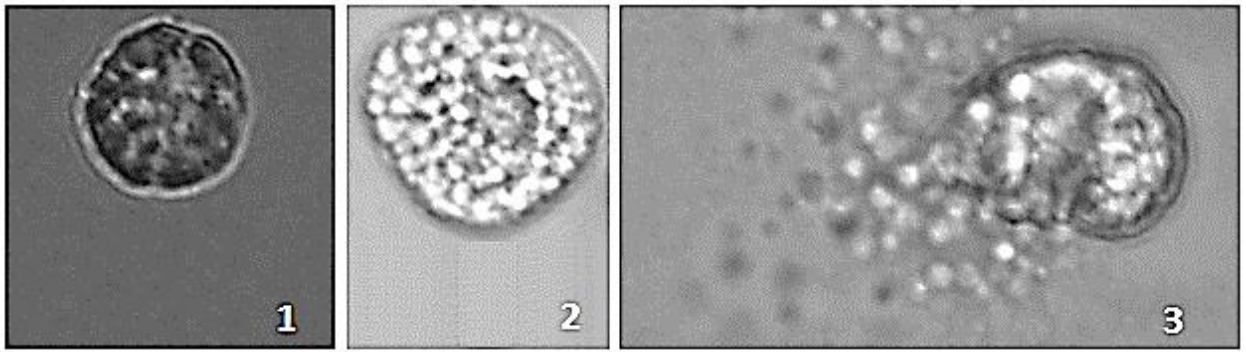


Рисунок 29 – Морфологические изменения сферулоцита *G. portentosa*: при инкубации в условиях осмотической нагрузки: 1 – гипертонический раствор, 2 – изотонический раствор, 3 – сильногипотонический раствор

Плазмоциты (оба типа), гранулоциты и коагулоциты *G. portentosa* сходным образом реагируют на воздействие различных сред – в условиях низкой осмолярности увеличение размеров клеток не является столь резким, по сравнению с уменьшением линейных параметров в гипертонической среде. Объем плазмоцитов и гранулоцитов возрастает примерно на 10%, а при попадании клеток в условия повышенного осмотического давления он сокращается на 25% и 33 % соответственно.

Таблица 9 – Объем гемоцитов *G. portentosa* в условиях осмотической нагрузки, μm^3

Тип клеток	Изотоническая среда	Гипотоническая среда	Гипертоническая среда
Pr	19,4 (17,8-21,0)	20,1 (18,2-21,8)	19,3 (17,8-20,6)
Pl	50,0 (48,9-51,0)	55,3* (54-56,7)	37,2* (35,9-38,4)
Gr	36,8 (35,2-38,0)	40,4* (39,4-41,3)	24,7* (23,1-26,3)
Sph	103,6 (100,9-106,6)	113,7* (110,3-117,5)	94,8* (91,0-98,7)
Ver	53,1 (49,9-56,6)	66,6* (63,2-70,1)	41,5* (39,0-44,4)
Co	114,7 (113,5-115,9)	121,1* (120,2-122,0)	95,4* (93,9-96,7)
Oe	34,6 (32,8-36,4)	35,7* (34,2-37,1)	33,6* (31,0-35,9)
Cr	47,7 (43,7-52,0)	49,1 (45,7- 52,0)	47,2 (44,4-50,4)

* – статистически достоверные различия между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки по U-критерию Манна-Уитни при $p < 0,01$.

Изменение условий инкубации оказывает минимальное влияние на величину эноцитоидов и серповидных клеток.

Гранулоциты, плазмоциты, сферулоциты и коагулоциты характеризуются примерно одинаковым уровнем использования мембранного резерва, который находится в пределах 8-11% (табл. 10).

Таблица 10 – Площадь поверхности и значения мембранного резерва гемоцитов *G. portentosa*

Тип клеток	S поверхности (изотоническая среда, μm^2)	S поверхности (сильногипотоническая среда, μm^2)	Абсолютный мембранный резерв (μm^2)	Относительный мембранный резерв (%)
Pr	49,09±0,07	51,19±0,10	2,10±0,12	4,35±0,22
Pl	131,89±0,10	146,72±0,10	14,83±0,14	11,28±0,12
Gr	87,17±0,14	96,45±0,09	9,28±0,16	10,82±0,21
Sph	233,43±0,17	256,94±0,14	23,51±0,21	10,10±0,10
Ver	122,37±0,10	144,73±0,12	22,36±0,14	18,31±0,13
Co	256,73±0,14	278,40±0,11	21,67±0,18	8,46±0,07
Oe	82,92±0,07	85,07±0,07	2,15±0,10	2,64±0,12
Cr	111,19±0,09	111,56±0,09	0,37±0,13	0,29±0,11

Максимальная величина данного показателя зафиксирована у вермицитов и составляет около 18%. У прогемоцитов и двух видов эноцитоидов значения мембранного резерва минимальны и близки к нулю.

У прогемоцитов *P. americana*, как и у большинства исследованных видов, различие в осмолярности среды не вызывает существенных изменений линейных параметров и, соответственно, объема клеток (табл. 11). В условиях пониженного осмотического давления плазмоциты приобретают неправильную форму, однако распластываются с меньшей скоростью по сравнению с этим типом клеток у *N. cinerea*.

Плазмоциты, гранулоциты и коагулоциты более чувствительны к понижению осмотического давления – объем клеток увеличивается на 12-20%. Гранулоциты в равной степени реагируют как на гипертоническую, так и на гипотоническую нагрузку, изменяя объем в пределах 15-18% от исходного. Осмолярность среды не оказывает существенного влияния на сферулоциты, объем клеток изменяется в пределах 4%.

Таблица 11 – Объем гемоцитов *P. americana* в условиях осмотической нагрузки, μm^3

Тип клеток	Изотоническая среда	Гипотоническая среда	Гипертоническая среда
Pr	22,9 (21,9-23,8)	24,1* (21,9-26,2)	22,4* (20,4-24,0)
Pl	50,6 (49,4-51,9)	57,7* (55,9-59,5)	49,9 (48,0-51,7)
Gr	34,6 (33,7-35,6)	39,9* (38,9-40,8)	28,3* (27,7-28,8)
Sph	50,8 (49,3-52,5)	53,5* (52,2-54,6)	50,4 (49,0-51,7)
Ver	52,4 (50,5-54,2)	59,3* (57,7-60,8)	43,1* (42,0-44,2)
Co	98,8 (98,1-99,6)	112,4* (110,7-114,4)	93,4* (92,3-94,7)
Oe	22,8 (21,6-24,1)	24,4* (22,0-26,8)	22,2 (20,1-24,3)

* – статистически достоверные различия между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки по U-критерию Манна-Уитни при $p < 0,01$.

При воздействии гипертонической нагрузки на вермициты отмечено уменьшение их объема на 17-18%, пониженное осмотическое давление способствует росту величины данного показателя на 13%.

Наименьшее использование мембранного резерва зафиксировано у прогемоцитов и сферулоцитов (табл. 12). У остальных гемоцитарных типов величина этого показателя составляет 13-15%, и максимальна у плазмоцитов – $18,91 \pm 0,14\%$.

Таблица 12 – Площадь поверхности и значения мембранного резерва гемоцитов *P. americana*

Тип клеток	S поверхности (изотоническая среда, μm^2)	S поверхности (сильногипотоническая среда, μm^2)	Абсолютный мембранный резерв (μm^2)	Относительный мембранный резерв (%)
Pr	$56,19 \pm 0,09$	$59,47 \pm 0,10$	$3,28 \pm 0,13$	$5,98 \pm 0,24$
Pl	$134,86 \pm 0,10$	$160,32 \pm 0,15$	$25,45 \pm 0,17$	$18,91 \pm 0,14$
Gr	$82,70 \pm 0,15$	$94,30 \pm 0,06$	$11,59 \pm 0,16$	$14,25 \pm 0,22$
Sph	$116,45 \pm 0,16$	$121,56 \pm 0,14$	$5,11 \pm 0,21$	$4,51 \pm 0,19$
Ver	$119,26 \pm 0,11$	$136,18 \pm 0,06$	$16,92 \pm 0,13$	$14,24 \pm 0,12$
Co	$222,70 \pm 0,14$	$252,75 \pm 0,17$	$30,05 \pm 0,21$	$13,52 \pm 0,10$

Прогемоциты *S. tartara* демонстрируют стабильность величины линейных параметров и формы при инкубации в различных средах (табл. 13).

Их контуры остаются ровными, без складок. Ядро также сохраняет размеры, характерные для физиологически нормальных условий (рис. 30).

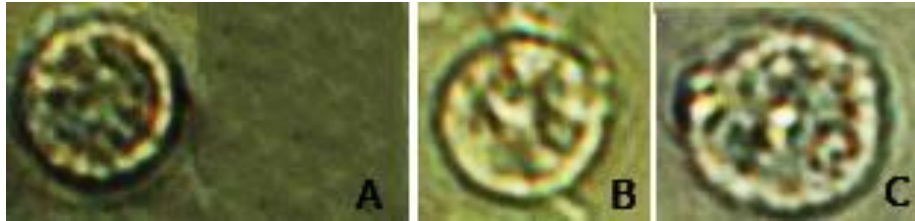


Рисунок 30 – Инкубация прогемоцитов в условиях осмотической нагрузки:
А – гипертонический раствор, В – изотонический раствор, С – гипотонический раствор

В условиях гипоосмотической нагрузки зафиксирован невысокий уровень использования плазмocyтaми мембранного резерва – около 7-9% (табл. 14). В гипертонической среде клетки демонстрируют разнообразные морфологические изменения. На поверхности возникают многочисленные складки, она приобретает ячеистый вид за счет округлых углублений, по периферии формируются краевые раффы. Отмечено уменьшение объема на 19%.

Таблица 13 – Объем гемоцитов *S. tartara* в условиях осмотической нагрузки, μm^3

Тип клеток	Изотоническая среда	Гипотоническая среда	Гипертоническая среда
Pr	25,3 (23,9-26,7)	26,8 (24,9-28,6)	23,9 (22,6-25,2)
Pl	89,5 (85,8-93,1)	96,8* (94,7-98,8)	72,8* (69,2-76,9)
Gr	51,0 (48,8-53,5)	66,2* (64,3-68,4)	37,3* (35,6-39,0)
Sph	106,4 (103,4-109,1)	111,28* (108,5-113,8)	102,4* (99,4-104,8)
Ver	57,4 (54,9-59,6)	62,9* (60,9-65,0)	53,4* (50,9-55,6)
Co	100,3 (98,8-102,0)	114,4* (112,6-116,2)	95,4* (93,7-97,2)

* – статистически достоверные различия между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки по U-критерию Манна-Уитни при $p < 0,01$.

Веретеновидные плазмocyтaы теряют способность формировать боковые ризоподии при помещении их в среду пониженным осмотическим давлением. На одном из полюсов клетки, реже на двух, присутствует одна короткая псевдоподия. Воздействие гипертонической среды способствует уменьшению объема клеток на 7-10%, при этом вермицитов отмечено

сокращение линейных размеров только по короткой оси. Активность сохраняется на том же уровне, что и у группы контрольных клеток. Мембранный резерв, используемый клетками в гипотонической среде, составляет около 11%.

Таблица 14 – Площадь поверхности и значения мембранного резерва гемоцитов *S. tartara*

Тип клеток	S поверхности (изотоническая среда, μm^2)	S поверхности (сильногипотоническая среда, μm^2)	Абсолютный мембранный резерв (μm^2)	Относительный мембранный резерв (%)
Pr	61,69±0,05	65,98±0,08	4,30±0,10	7,00±0,16
Pl	235,62±0,14	250,78±0,17	15,16±0,22	6,46±0,09
Gr	134,21±0,09	171,74±0,08	37,53±0,13	28,00±0,11
Sph	237,58±0,15	252,52±0,16	14,93±0,22	6,31±0,10
Ver	130,83±0,06	145,29±0,09	14,47±0,11	11,07±0,09
Co	225,99±0,14	256,14±0,14	30,16±0,21	13,37±0,10

Гранулоциты в гипертонической среде формируют псевдоподии менее интенсивно и длина их значительно укорачивается. Края клеток приобретают игольчатый вид. Объем уменьшается на 25%, после получасовой инкубации гемоциты продолжают свободно плавать, не закрепляясь на субстрате (рис. 31, А). В изотонической среде гранулоциты успевают осесть и закрепиться на субстрате (рис.31, В). В условиях гипоосмотической нагрузки происходит увеличение объема на 29%.

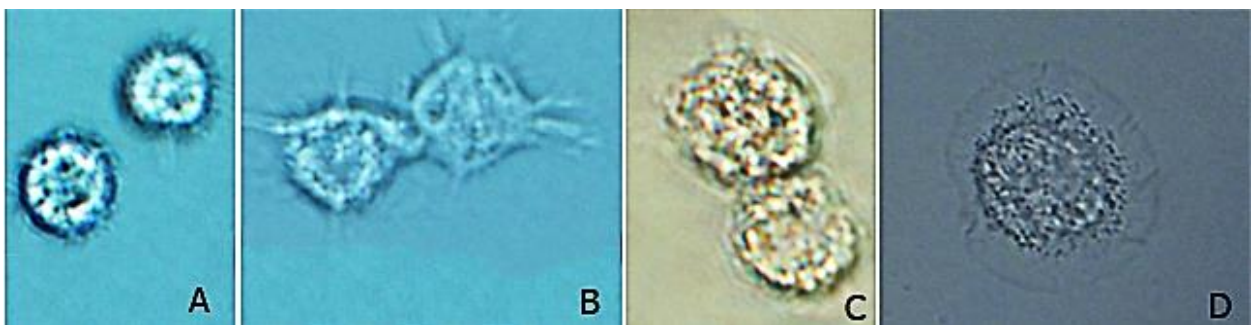


Рисунок 31 –Инкубация гранулоцитов в условиях осмотической нагрузки: А –после 30 мин. инкубации в гипертонической среде, В – после 30 мин. инкубации в изотонической среде, С – после 15 мин. инкубации в гипотонической среде D – спустя 30 мин. инкубации в гипотонической среде

Время распластывания в условиях пониженного осмотического давления уменьшается до 10-15 минут. При этом гемоциты сначала округляются, увеличиваются в размере, псевдоподии исчезают, и гранулы в

цитоплазме приобретают более рыхлое расположение (рис.31, С). Затем клетки оседают и «растекаются» по стеклу, формируя равномерный широкий обод ламеллоплазмы (рис.31, D). Гранулоциты *S. tartara* характеризуются наибольшими значениями использования мембранного резерва при снижении осмолярности среды (табл. 14)

Молодые формы сферулоцитов *S. tartara* имеют форму, близкую к веретеновидной. На этом этапе гемоциты способны формировать небольшое количество ризоподий на периферии или полюсах клетки, их легко спутать с веретеновидными плазмоцитами (рис. 32). Зрелые сферулоциты *S. tartara*, как и у других видов, псевдоподий не имеют. Клетки овальной или неправильной формы. Гранулы сферулоцитов наиболее мелкие среди всех изученных представителей отряда, их меньше, а соответственно плотность заполнения ими цитоплазмы ниже. Инкубация, как в гипо-, так и в гипертонической средах не ведет к существенному изменению размеров клеток. Однако в условиях пониженного осмотического давления отмечено распределение сферул по всей цитоплазме, включая участки над ядром, которое, по истечении времени, становится едва различимым. Величина относительного мембранного резерва редко превышает 7%.

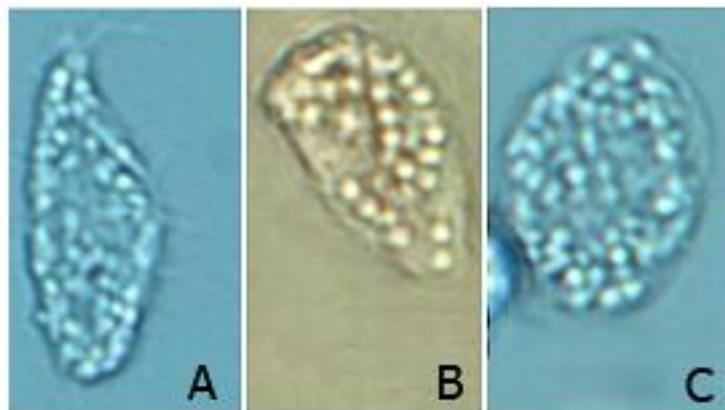


Рисунок 32 – Сферулоциты *S. tartara*: А – молодая форма сферулоцита с ризоподиями, В – зрелая форма сферулоцита, С – зрелый сферулоцит в гипотонической среде; заметно равномерное распределение гранул по всей клетке, включая зону над ядром

Коагулоциты *S. tartara* являются устойчивыми к воздействию осмотической нагрузки. В гипертонической среде объем клеток уменьшается всего на 5%, а при воздействии гипоосмотических условий увеличивается в

среднем на 13%. Значения использования мембранного резерва данным типом гемоцитов находится в диапазоне от 9 до 20%

Объем прогемоцитов *B. orientalis* в условиях пониженной осмолярности увеличивается лишь на 1,5%, а инкубация в гипертонической среде приводит к уменьшению данного показателя на 10% (табл. 15).

При воздействии гипертонической нагрузки плазмоциты теряют округлые очертания, филоподии укорачиваются и приобретают вид игл. В гипотонической среде у некоторых клеток отмечено наличие разрывов мембраны, в меньшей степени это касается веретеновидных плазмоцитов. Мембранный резерв плазмоцитов наибольший среди всех гемоцитарных типов и составляет $17,87 \pm 0,08\%$.

Таблица 15 – Объем гемоцитов *B. orientalis* в условиях осмотической нагрузки, μm^3

Тип клеток	Изотоническая среда	Гипотоническая среда	Гипертоническая среда
Pr	26,7 (25,9-27,4)	27,1* (26,1-28,1)	24,1* (23,1-25,0)
Pl	68,5 (65,1-71,6)	79,4* (77,2-81,6)	52,1* (51,1-53,2)
Gr	47,3 (45,8-48,6)	53,1* (52,4-53,8)	46,7* (44,8-48,5)
Ver	35,2 (34,2-36,2)	36,9* (36,0-37,8)	31,7* (30,7-32,6)

* – статистически достоверные различия между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки по U-критерию Манна-Уитни при $p < 0,01$.

Гранулоциты проявляют большую чувствительность к среде с пониженным осмотическим давлением. В данных условиях наблюдается увеличение объема клеток на 12%. Гранулы занимают более рыхлое расположение, псевдоподии формируются в меньшем количестве по сравнению с контрольными клетками. В гипертонической среде происходит незначительное снижение объема клеток. Минимальный мембранный резерв отмечен у гранулоцитов и веретеновидных плазмоцитов, которые претерпевают изменения объема не более чем на 6% (табл. 16).

Таблица 16– Площадь поверхности и значения мембранного резерва
гемоцитов *B. orientalis*

Тип клеток	S поверхности (изотоническая среда, μm^2)	S поверхности (сильногипотоническая среда, μm^2)	Абсолютный мембранный резерв(μm^2)	Относительный мембранный резерв (%)
Pr	63,68±0,09	66,56±0,08	2,88±0,13	4,67±0,21
Pl	178,12±0,08	209,93±0,10	31,81±0,13	17,87±0,08
Gr	108,57±0,13	122,27±0,13	13,70±0,18	12,71±0,18
Ver	82,93±0,13	87,11±0,08	4,18±0,16	5,19±0,20

Прогемоциты *B. germanica* в условиях измененного осмотического давления среды сохраняют свои размеры и форму. Гранулоциты демонстрируют существенное увеличение объема в среде с пониженной осмолярностью, 10-16% этих клеток разрушается вследствие разрыва плазматической мембраны (рис. 33). При воздействии гипоосмотической нагрузки гранулоциты максимально используют мембранный резерв ($\approx 23,8\%$). Повышение осмотического давления приводит к значительному укорочению филоподий и снижает подвижность гранулоцитов, а также способствует уменьшению объема клеток на 20% (табл. 18). При возвращении в изотоническую среду происходит восстановление размеров. В гипотонической среде, в отличие от гранулоцитов *G.portentosa*, данный тип клеток *B. germanica* утрачивает способность к образованию псевдоподий.

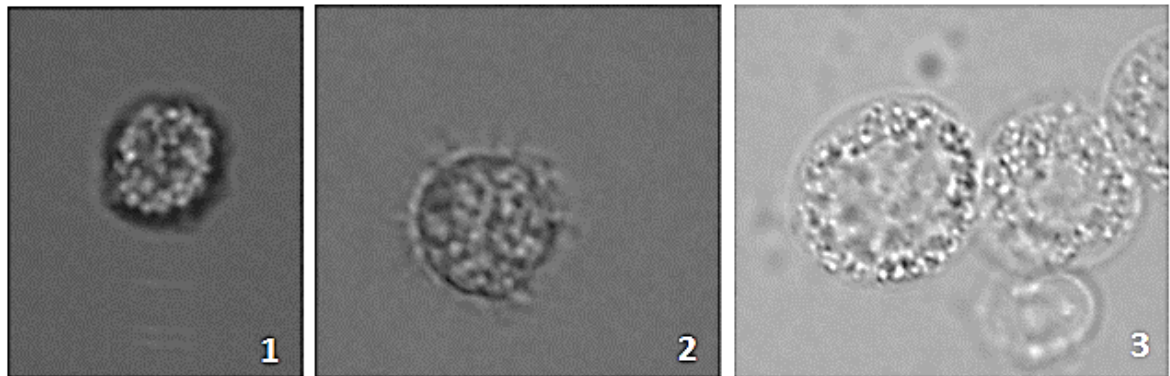


Рисунок 33 – Морфологические изменения гранулоцита *B. germanica* при инкубации в условиях осмотической нагрузки: 1 - гипертонический раствор, 2 – изотонический раствор, 3 –гипотонический раствор

Плазмоциты в условиях гипотонии снижают двигательную активность, уплощаются и, в течение 2-5 минут, закрепляются на субстрате. Повышенное осмотическое давление приводит к уменьшению линейных параметров и,

соответственно, объема клеток, образуется большое количество складок и выпячиваний плазмалеммы (табл.17). Значения мембранного резерва плазмоцитов невелики и не превышают 7-8%, клетки быстро теряют активность и распластаются на подложке, появляются множественные разрывы мембраны.

Таблица 17 – Объем гемоцитов *B. germanica* в условиях осмотической нагрузки, μm^3

Тип клеток	Изотоническая среда	Гипотоническая среда	Гипертоническая среда
Pr	22,3 (20,6-22,99)	22,3 (21,3-24,0)	22,0* (20,9-22,9)
Pl	51,5 (50,2-52,9)	48,2* (46,8-49,8)	42,2* (40,4-44,3)
Gr	40,9 (38,2-43,8)	51,9* (50,1-53,6)	32,7* (31,4-34,0)
Co	110,9 (109,4-112,4)	125,6* (123,5-127,7)	102,3* (100,5-103,8)
Oe	38,5 (37,1-39,7)	38,8 (37,3-40,4)	38,1 (36,8-39,3)

* – статистически достоверные различия между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки по U-критерию Манна-Уитни при $p < 0,01$.

В гипотонической среде коагулоциты сильно увеличиваются в объеме, кроме того возрастает диаметр ядра. Величина относительного мембранного резерва составляет около 13-14%, клетки приобретают ровные контуры, изначально компактно расположенные гранулы хаотично распределяются по всей цитоплазме.

Эноцитойды *B. germanica* не реагируют изменением формы и объема в ответ на осмотическую нагрузку. Как и прогемоциты, они характеризуются низким уровнем использования запасов мембранного резерва (табл. 18).

Таблица 18– Площадь поверхности и значения мембранного резерва гемоцитов *B. germanica*

Тип клеток	S поверхности (изотоническая среда, μm^2)	S поверхности (сильногипотоническая среда, μm^2)	Абсолютный мембранный резерв (μm^2)	Относительный мембранный резерв (%)
Pr	52,51±0,09	55,43±0,10	2,92±0,13	5,74±0,25
Pl	128,91±0,15	137,62±0,09	8,70±0,18	6,84±0,15
Gr	96,77±0,11	119,80±0,13	23,03±0,17	23,80±0,20
Co	248,58±0,22	281,54±0,16	32,96±0,27	13,31±0,12
Oe	89,34±0,11	92,57±0,12	3,23±0,16	3,71±0,19

3.2.2. Показатели фагоцитарной активности гемоцитов в норме и при осмотической нагрузке

Способностью к поглощению инородных объектов обладают гранулоциты, плазмоциты и вермициты. Для определения активности фагоцитарного процесса в целом и функционирования отдельных этапов фагоцитоза рассчитывали фагоцитарный индекс и фагоцитарное число (табл. 19).

Таблица 19 – Показатели фагоцитарной активности гемоцитов представителей отряда Dictyoptera

Показатель	ФИ (%)			ФЧ (шт.)		
	Гипотония	Изотония	Гипертония	Гипотония	Изотония	Гипертония
<i>N. cinerea</i>	5	41	11	1	1,74	1
<i>B. craniifer</i>	8	66	10	1	2,70	1
<i>G. portentosa</i>	11	58	10	1	2,84	1
<i>S. tartara</i>	2	36	7	1	1,87	1
<i>P. americana</i>	4	43	6	1	2,51	1
<i>B. orientalis</i>	0	32	0	0	1,67	0
<i>B. germanica</i>	0	37	0	0	1,60	0

Максимальные значения показателей активности фагоцитарного процесса демонстрируют форменные элементы гемолимфы *B. craniifer* и *G. portentosa*. У всех изученных тараканов основную массу клеток, участвующих в поглощении инородных объектов, составляют гранулоциты. Плазмоциты менее активны, несмотря на то, что являются преобладающим гемоцитарным типом у всех исследованных видов, за исключением *S. tartara* и *N. cinerea*.

При инкубации в гипо- и гипертоническом растворах фагоциты *B. orientalis* и *B. Germanica* не проявляют способность поглощать инородные объекты. В средах с измененной осмолярностью гемоциты прочих видов тараканов сохраняют способность к фагоцитозу.

3.3. Упруго-эластические свойства и топография поверхности гемоцитов в норме и условиях осмотической нагрузки

3.3.1. Влияние осмотической нагрузки на упругость и адгезионные свойства плазмалеммы гемоцитов

Использование атомно-силового микроскопа позволило изучить параметры упругости мембраны гемоцитов, а также силу адгезии к нанозонду в точках идентифицирования.

В целом для гемоцитов *N. cinerea* в условиях гипертонии характерно увеличение значения модуля Юнга. В гипотонической среде по сравнению с физиологически нормальной повышается или остается неизменной упругость и сила адгезии у всех типов клеток (табл.20). Минимальные значения силы адгезии присущи вермицитам, коагулоцитам и прогемоцитам.

Таблица 20 – Параметры клеток *N. cinerea*, полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)
Pr	46,61±0,40	17,37±0,59*	47,91±0,60	19,51±0,68*	49,88±0,46*	17,20±0,91*
Pl	33,46±0,64	22,27±0,63	37,18±0,44*	34,45±0,81*	41,45±0,64*	15,80±0,40*
Gr	33,51±0,62	21,54±2,61	39,04±0,66*	37,52±0,58*	47,83±0,78*	17,71±0,32*
Sph	31,74±0,66	22,19±0,45	33,38±0,85	37,16±0,64*	36,74±0,66*	20,23±0,51*
Ver	30,35±0,80	16,48±0,50	32,79±0,738	30,80±0,56*	41,43±0,82*	14,65±0,41*
Co	32,34±0,67	18,08±0,77	34,83±0,79*	32,96±0,57*	39,54±0,82*	14,84±0,87*
Oe	33,49±0,70	20,65±0,44	37,85±0,92*	22,34±0,58*	47,05±0,83*	15,80±0,52*

Примечание: Pr – прогемоциты; Pl – плазмоциты; Gr – гранулоциты; Sph – сферулоциты; Ver – веретенovidные плазмоциты; Co – коагулоциты; Oe – энотоиды; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$); достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Максимальный модуль упругости отмечен у прогемоцитов (табл. 20). При инкубации в гипотонической среде у прогемоцитов и вермицитов наблюдается увеличение модуля Юнга на 3-8%. Также незначительно возрастает данный показатель у сферулоцитов и коагулоцитов (на 5% и 7% соответственно). Наибольшее увеличение характерно для гранулоцитов (на 18%). Минимальные изменения значений модуля упругости в условиях

гиперосмотической нагрузки зафиксированы у прогемоцитов (6%), у сферулоцитов, коагулоцитов и плазмоцитов на 16-24%. Самыми чувствительными к воздействию гипертонической среды являются вермициты, гранулоциты и эноцитойды (модуль Юнга возрастает в среднем на 39%).

Снижение величины силы адгезии наиболее существенно у плазмоцитов и эноцитойдов (на 28% и 24% соответственно). Уменьшение значений этого показателя у прогемоцитов и сферулоцитов составляет всего 10%. Воздействие гипосмотической нагрузки ведет к увеличению силы адгезии в среднем на 70%, исключение составляют прогемоциты и эноцитойды – уменьшение осмолярности среды не оказывает такого сильного влияния – значения возрастают на 7-12%.

При инкубации гемоцитов *B. craniifer* в средах, отличных от физиологически нормальных, наблюдается незначительное увеличение упругости (на 3-9%) у прогемоцитов, плазмоцитов сферулоцитов, коагулоцитов и эноцитойдов (табл. 21). У гранулоцитов и вермицитов этот показатель вырос на 14-22%.

Таблица 21 – Параметры клеток *B. craniifer* полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)
Pr	54,23±0,90	12,43±0,17	55,88±0,74	12,70±0,22	56,21±0,58	9,36±0,28*
Pl	37,93±0,54	24,13±0,33	39,84±0,45	26,04±0,19*	44,17±0,77*	14,21±0,29*
Gr	47,44±0,43	22,65±0,24	53,52±0,30*	24,23±0,20*	54,28±0,29*	21,76±0,28*
Sph	36,74±0,41	15,52±0,15	37,15±0,32	15,56±0,32	39,01±0,36	15,08±0,21
Ver	37,53±0,36	18,38±0,28	44,91±0,44*	20,63±0,30*	45,64±0,42*	13,99±0,23*
Co	41,25±0,27	11,49±0,24	42,47±0,33*	15,54±0,28*	45,35±0,39*	11,18±0,21
Oe	44,58±0,37	20,45±0,33	48,39±0,31	20,41±0,22	48,45±0,34*	14,26±0,21*

Примечание: Pr – прогемоциты; Pl – плазмоциты; Gr – гранулоциты; Sph – сферулоциты; Ver – веретенновидные плазмоциты; Co – коагулоциты; Oe – эноцитойды; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$); достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

На силу адгезии клеток *B. craniifer* гипотоническая среда оказывает минимальное влияние. Только у коагулоцитов этот параметр вырос на 35%, у

остальных же гемоцитарных типов величина силы адгезии возрастает не более чем на 11%.

Инкубация в среде, как с пониженным, так и с повышенным осмотическим давлением оказывает незначительное влияние на модуль упругости прогемоцитов, плазмоцитов, сферулоцитов и эноцитоидов (двух типов) *G. portentosa* (табл. 22).

Таблица 22 – Параметры клеток *G. portentosa* полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)
Pr	68,81±0,23	17,08±0,36	72,13±0,28*	17,29±0,32	73,14±0,21*	17,03±0,20
Pl	54,00±0,39	24,74±0,29	56,27±0,32*	29,22±0,27*	58,29±0,25*	20,67±0,20*
Gr	56,56±0,32	20,27±0,26	67,17±0,29*	22,95±0,30*	67,43±0,25*	16,04±0,33*
Sph	59,97±0,12	14,81±0,23	62,19±0,11*	17,14±0,20*	63,06±0,36*	12,96±0,27*
Ver	57,54±0,34	12,80±0,22	67,50±0,38*	16,60±0,17*	74,43±0,38*	12,11±0,20*
Co	52,51±0,33	17,47±0,25	58,09±0,41*	22,77±0,21*	66,42±0,40*	11,58±0,20*
Oe	61,31±0,30	25,35±0,24	64,30±0,29*	26,34±0,24*	65,73±0,40*	16,50±0,22*
Cr	65,28±0,24	16,76±0,32	65,15±0,33±	17,44±0,25	66,03±0,34	16,08±0,16

Примечание: Pr – прогемоциты; Pl – плазмоциты; Gr – гранулоциты; Sph – сферулоциты; Ver – веретеновидные плазмоциты; Co – коагулоциты; Oe – эноцитоиды; Cr – серповидные эноцитоиды; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$); достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента

У гранулоцитов, вермицитов и коагулоцитов этот показатель увеличивается на 11-18% в гипотонических условиях, в гипертонических – изменения более выражены и составляют 18-29%. Также эти условия не вызывают изменения силы адгезии прогемоцитов и серповидных эноцитоидов. В гипертонической среде существенное снижение величины данного параметра свойственно коагулоцитам и эноцитоидам (35-36%).

Модуль упругости гранулоцитов и коагулоцитов *P. americana* в гипотонической среде значительно увеличивается (на 17-18%). А в гипертонической этот показатель возрастает у всех типов клеток, кроме прогемоцитов (табл. 23). Величина силы адгезии в данных условиях значительно снижается у плазмоцитов и гранулоцитов (на 45-55%), в меньшей степени – у сферулоцитов и коагулоцитов (на 25-30%).

Таблица 23 – Параметры клеток *P. americana* полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)
Pr	42,53±0,27	20,00±0,19	45,36±0,33*	22,87±0,34*	42,93±0,25	17,08±0,22*
Pl	34,31±0,22	28,71±0,38	35,90±0,17*	29,93±0,29*	41,44±0,27*	16,38±0,14*
Gr	32,35±0,28	24,69±0,23	35,19±0,22*	26,92±0,20*	38,16±0,26*	11,17±0,28*
Sph	27,42±0,72	21,15±0,23	30,18±0,31*	22,05±0,31*	32,93±0,78*	16,06±0,20*
Ver	33,98±0,41	14,64±0,18	35,72±0,27*	14,69±0,26	42,74±0,23*	13,04±0,16
Co	38,16±0,28	15,87±0,20	44,80±0,29*	22,36±0,20*	46,71±0,28*	11,15±0,24*

Примечание: Pr – прогемоциты; Pl – плазмоциты; Gr – гранулоциты; Sph – сферулоциты; Ver – веретеновидные плазмоциты; Co – коагулоциты; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$); достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Гипоосмотическая нагрузка способствует увеличению модуля Юнга плазмоцитов, гранулоцитов, вермицитов и коагулоцитов *S. tartara* (табл. 24). Еще более сильное изменение вызывают гипертонические условия, однако у прогемоцитов на данный показатель ни одна из сред не оказывает существенного влияния. Величина силы адгезии возрастает у плазмоцитов, гранулоцитов и коагулоцитов на 13-32% в гипоосмотической среде, и снижается в гипертонической на 12-22%.

Таблица 24 – Параметры клеток *S. tartara* полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)
Pr	39,43±0,37	16,18±0,85	41,20±0,32*	17,40±0,21*	42,12±0,95*	16,24±0,28*
Pl	25,20±0,17	22,29±0,25	30,33±0,11*	29,50±0,35*	34,29±0,32*	18,01±0,19*
Gr	27,36±0,14	22,24±0,30	33,23±0,29*	25,16±0,32*	38,05±0,30*	19,22±0,22*
Sph	20,00±0,25	24,67±0,23	18,29±0,30*	24,46±0,40	23,23±0,21*	23,93±0,24*
Ver	18,55±0,19	22,75±0,35	24,13±0,30*	22,96±0,34*	25,56±0,19*	21,43±0,30*
Co	20,48±0,28	22,54±0,31	24,46±0,41	27,00±0,28*	28,32±0,33*	17,31±0,20*

Примечание: Pr – прогемоциты; Pl – плазмоциты; Gr – гранулоциты; Sph – сферулоциты; Ver – веретеновидные плазмоциты; Co – коагулоциты; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$); достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Осмотическая нагрузка не оказывает влияния на величину, как модуля упругости, так и силы адгезии прогемоцитов *B. orientalis* (табл. 25).

Гипотоническая среда способствует увеличению модуля Юнга на 12-15% у плазмоцитов и гранулоцитов, у вермицитов только на 4%. Сила адгезии в данных условиях возрастает на 11% и 18% у плазмоцитов и вермицитов соответственно, наибольший рост отмечен у гранулоцитов – 23%. В гипертонической среде значительное снижение силы адгезии зафиксировано только у плазмоцитов (33%).

Таблица 25 – Параметры клеток *B. orientalis* полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)
Pr	43,53±0,43	19,03±0,18	43,81±0,31	19,14±0,30	44,79±0,37	18,21±0,55
Pl	36,16±0,28	25,94±0,18	40,85±0,31	28,84±0,25	44,24±0,24	17,32±0,28
Gr	32,09±0,31	21,44±0,24	37,12±0,33	26,37±0,23	41,10±0,21	18,45±0,19
Ver	31,79±0,31	20,38±0,25	33,07±0,36	24,13±0,25	37,96±0,27	18,94±0,20

Примечание: Pr – прогемоциты; Pl – плазмоциты; Gr – гранулоциты; Ver – веретеневидные плазмоциты; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$); достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Ни одно из условий инкубации не приводит к изменению адгезионных и упругостных свойств прогемоцитов *B. germanica*. При инкубации в гипотонии сила адгезии плазмоцитов и коагулоцитов возрастает на 40%, гранулоцитов и эноцитоидов – на 15-19%. Модуль Юнга гранулоцитов и коагулоцитов увеличивается на 11% и 22% соответственно (табл. 26).

Таблица 26 – Параметры клеток *B. germanica* полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)
Pr	37,07±0,35	8,28±0,15	37,29±0,32	10,29±0,11*	37,47±0,28	8,01±0,10*
Pl	30,04±0,28	9,15±0,16	33,75±0,18*	12,82±0,13*	34,11±0,32*	8,11±0,13*
Gr	26,18±0,24	10,82±0,19	29,15±0,32*	12,97±0,14*	37,85±0,38*	10,33±0,15*
Co	31,86±0,24	8,25±0,13	39,08±0,40*	11,53±0,19*	39,90±0,43*	9,09±0,17*
Oe	33,22±0,43	13,46±0,11	34,32±0,30	11,66±0,10*	36,04±0,31*	9,37±0,12*

Примечание: Pr – прогемоциты; Pl – плазмоциты; Gr – гранулоциты; Co – коагулоциты; Oe – эноцитоиды; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$); достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Плазмоциты в равной степени реагируют как на гипертоническую, так и на гипотоническую среду, величина модуля упругости изменяется в пределах в пределах 12-13% от исходной. Осмотическая нагрузка оказывает минимальное воздействие на данный показатель эноцитоидов.

3.3.2. Топография поверхности гемоцитов в условиях осмотической нагрузки

При изучении морфологии гемоцитов с помощью зондовой микроскопии уделяли внимание линейным размерам клеток, а также способности мембраны поддерживать целостность и форму клетки. Использование изображений, полученных с помощью атомно-силовой микроскопии, позволило оценить характер изменения микрорельефа поверхности гемоцитов.

На поверхности нативных прогемоцитов *B. craniifer* преобладают микровозвышения, не превышающие 187 нм. Снижение осмотического давления среды ведет к незначительному увеличению объема клеток. На сканограммах гемоциты имели близкую к шарообразной форму и гладкую, лишенную складок, мембрану (рис. 34).

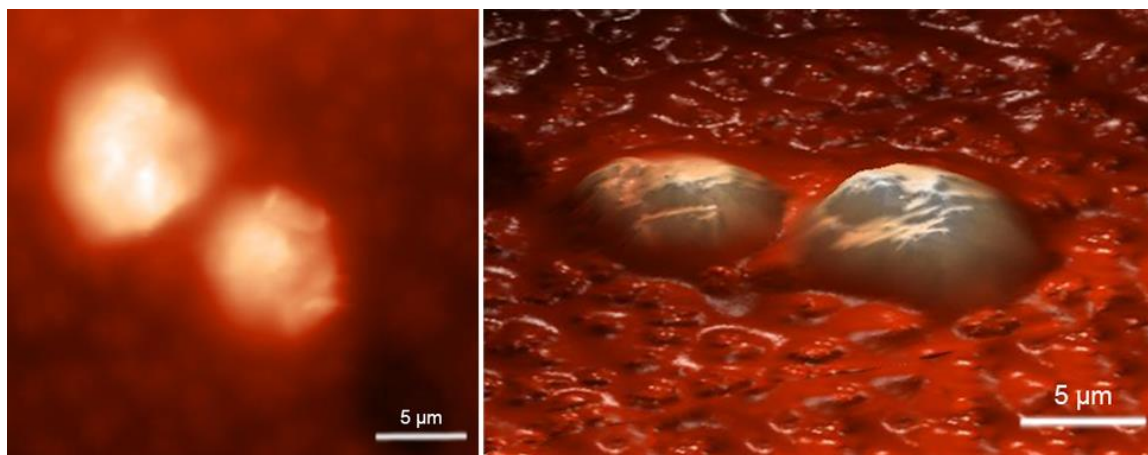


Рисунок 34 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности прогемоцитов *B. craniifer* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

В гипертонических условиях показатели среднеквадратичной шероховатости поверхности повышаются с 28,41 до 32,04, но уменьшается расстояние между возвышениями. Происходит увеличение высоты пиков и глубины впадин (табл. 27). В условиях понижения осмотического давления

отмечено сглаживание рельефа. Изменений в симметричности распределения различных структур рельефа при воздействии осмотической нагрузки не наблюдается.

Таблица 27 – Показатели шероховатости поверхности прогеоцитов *B. craniifer* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/ μm^2	Sz, nm
Изотоническая среда	28,65±0,08	105,16±0,24	52,44±0,18	0,70 [#]	157,45±0,3
Гипотоническая среда	26,58±0,06*	100,29±0,30*	52,15±0,14	0,68* [#]	152,35±1,4*
Гипертоническая среда	32,04±0,13*	117,90±0,20*	55,35±0,13*	0,70 [#]	159,26±0,3*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

Нативные плазмоциты *B. craniifer* отличаются формой, близкой к дисковидной (рис. 35). Высота клеток около 1,2 μm . Наружная плазматическая мембрана формирует гребневидные складки на периферии. В условиях пониженного осмотического давления отмечено значительное распластывание гемоцитов, экстремальные перепады профиля по высоте отсутствуют, чем объясняется значение показателя S_{ku} , равное 2,88. По периферии формируется широкий обод ламеллоплазмы. Рельеф мембраны приобретает большее количество микровозвышений и микровпадин в гипертонической среде, о чем свидетельствует увеличение показателя плотности пиков на единицу поверхности (табл. 28). Инкубация гемоцитов в гипотонической среде не вызывает существенного изменения по данному параметру.

Толщина возмущенного слоя (S_z) нативных плазмоцитов составляет 546,52±0,4 nm. У гемоцитов, инкубированных в среде с повышенной осмолярностью, этот показатель увеличивается до 562,32±0,8 nm, а в гипотонической снижается до 409,36±1,2 nm. Таким образом, происходит уменьшение толщины возмущенного слоя в условиях пониженного

осмотического давления с сохранением или увеличением числа микровозвышений на единице поверхности.

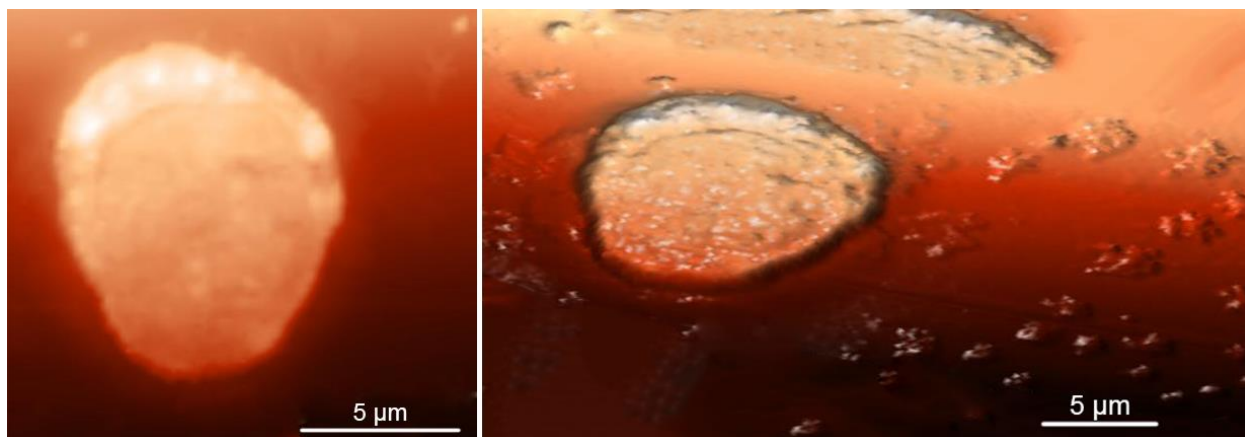


Рисунок 35 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности плазмоцитов *B. craniifer* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Таблица 28 – Показатели шероховатости поверхности плазмоцитов *B. craniifer* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/µm ²	Sz, nm
Изотоническая среда	50,88±0,17	426,74±1,08	117,29±0,71	0,89 [#]	544,02±1,47
Гипотоническая среда	50,12±0,08	307,99±0,78*	101,32±0,29*	0,87* [#]	409,31±0,79*
Гипертоническая среда	56,85±0,06*	430,77±0,28*	113,69±0,70*	1,12* [#]	562,47±0,77*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической ($m < 0,000$).

Нативные гранулоциты *B. craniifer* характеризуются правильной округлой или овальной формой (рис. 36). Поверхность неровная, отмечено выпячивание гранул. Профиль гемоцитов этого типа имеет углубление в нуклеарной области. Высота клеток около 1,5 µm, в области ядра данный параметр может быть ниже – около 1,1-1,2 µm.

В гипотонической среде микрорельеф поверхности принимает более однородный характер, что подтверждается уменьшением высоты микровозвышений на поверхности мембраны практически в 2 раза, сокращением толщины возмущенного слоя с 325 нм до 151 нм (табл. 29). Также снижается количество неровностей на единицу площади. В условиях

повышенного осмотического давления микровозвышения на поверхности гемоцитов приобретают угловатые очертания. В гипертонической среде их число на единицу площади увеличивается на 18%, возрастает и их высота.

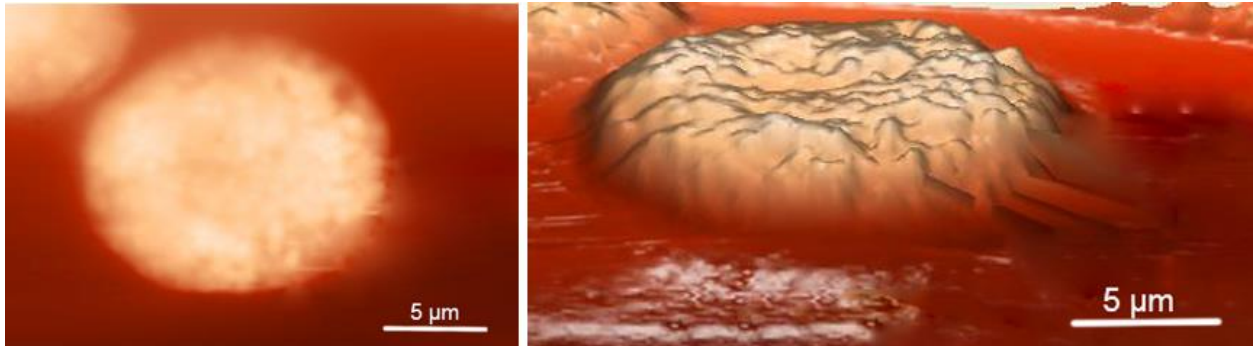


Рисунок 36 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности гранулоцитов *B. craniifer* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Таблица 29 – Показатели шероховатости поверхности гранулоцитов *B. craniifer* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/µm ²	Sz, nm
Изотоническая среда	48,54±0,15	244,20±1,06	29,41±0,18	0,69 [#]	273,62±1,13
Гипотоническая среда	32,84±0,14*	130,82±0,96*	21,42±0,13*	0,52* [#]	152,25±0,99*
Гипертоническая среда	60,09±0,12*	298,01±1,84*	31,34±0,11*	0,84* [#]	329,35±1,85*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической ($m < 0,000$).

Сферулоциты *B. craniifer* – шарообразные или яйцевидные гемоциты. Ядро хорошо заметно на сканограмме, имеет правильную круглую форму, расположено в центре или может быть немного смещено к краю (рис. 37). От ядра к периферии в виде лучей отходят радиальные тяжи с поперечными отростками, формирующими ячейки – здесь происходит накопление сферических включений. В области ядра высота клетки не превышает 1,0 µm, в то время как профиль остальной части гемоцита достигает 1,8-2 µm.

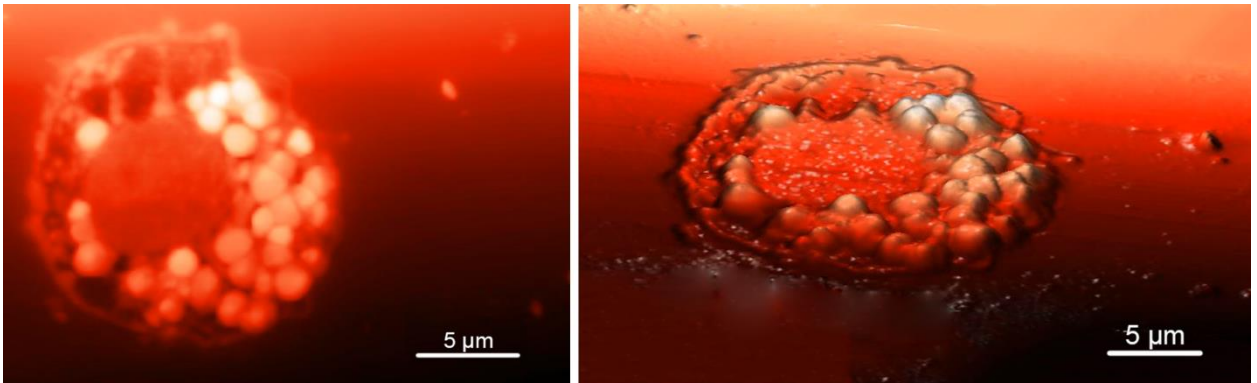


Рисунок 37 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности сферулоцитов *B. craniifer* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

На сканограмме хорошо заметны как крупные (около 1,5 μm), так и более мелкие гранулы (0,3 μm). В среде, отличной от физиологически нормальной, клетки демонстрируют стабильность – это касается как формы, так и параметров, характеризующих особенности микрорельефа поверхности (табл. 30).

Таблица 30 – Показатели шероховатости поверхности сферулоцитов *B. craniifer* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/ μm^2	Sz, nm
Изотоническая среда	155,74 \pm 0,13	624,61 \pm 0,21	177,95 \pm 0,13	0,64 [#]	802,55 \pm 1,4
Гипотоническая среда	155,02 \pm 0,11	621,03 \pm 0,24*	174,96 \pm 0,29	0,64 [#]	796,03 \pm 1,5*
Гипертоническая среда	156,13 \pm 0,08*	624,54 \pm 0,14	179,52 \pm 0,13*	0,66* [#]	803,38 \pm 0,8*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

Характер поверхности веретеновидных плазмоцитов *B. craniifer* отличается меньшим морфологическим разнообразием по сравнению с простыми плазмочитами. Данный тип клеток лучше сохраняет форму, в том числе при инкубации в средах, отличных от физиологической. Крупное овальное ядро, расположенное центрально, едва заметно (рис. 38). Высота гемоцитов не имеет достоверных отличий в области ядра и на периферии клетки. Мембрана формирует полусферические микровозвышения, которые

после инкубации гемоцитов в гипертонической среде приобретают угловатые очертания.

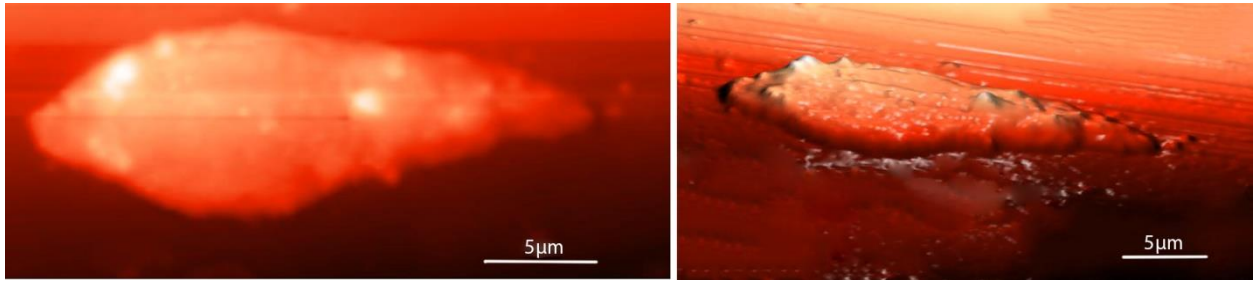


Рисунок 38 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности веретеновидных плазмоцитов *B. craniifer* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Повышение и понижение осмолярности среды оказывает достоверное обратно пропорциональное влияние на изменение линейных размеров клеток только по короткой оси. Изменения, касающиеся топографии поверхности, менее выражены, по сравнению с плазмócитами и гранулоцитами, и отражаются в основном на величине микровозвышений и микровпадин. (табл. 31).

Таблица 31 – Показатели шероховатости поверхности веретеновидных плазмócитов *B. craniifer* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/μm ²	Sz, nm
Изотоническая среда	54,88±0,10	494,48±0,35	110,13±0,15	0,96 [#]	604,80±1,6
Гипотоническая среда	52,77±0,14*	481,35±0,42*	92,06±0,17*	0,96 [#]	574,03±0,6*
Гипертоническая среда	59,59±0,13*	496,85±0,26*	113,54±0,18*	1,08 ^{*#}	611,03±0,9*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

Мембрана коагулоцитов *B. craniifer* формирует множество складок, что определяет способность коагулоцитов сохранять целостность при инкубации в гипотонической среде, используя мембранный резерв. Четко различима центральная приподнятая область ядра. Во всех условиях тонкий слой цитоплазмы по направлению от околядерного пространства к периферии гемоцита находится практически вровень с подложкой (рис. 39).

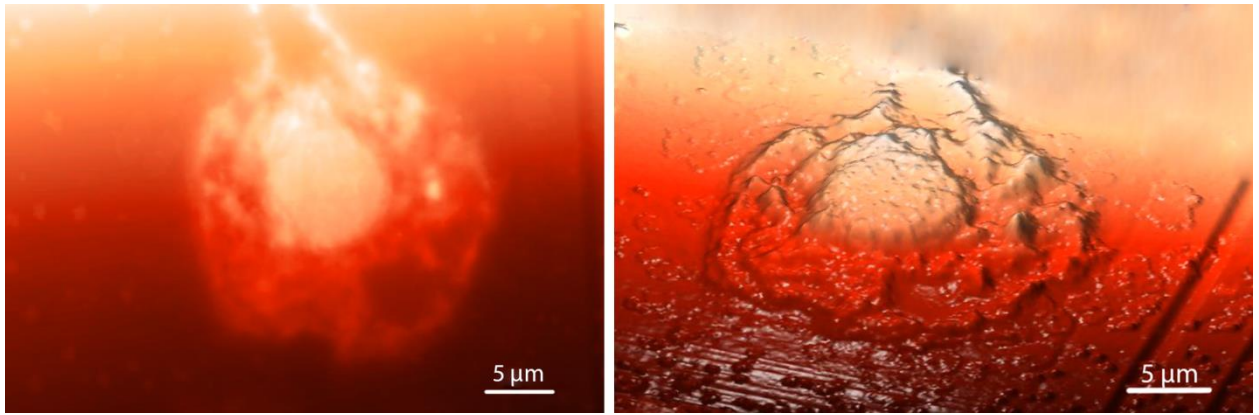


Рисунок 39 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности коагулоцитов *B. craniifer* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Таким образом, высота клеток в области ядра составляет 1,6 μm , а остальная часть клетки не превышает 0,9 μm . В условиях гипертонии поверхность приобретает максимальную плотность распределения борозд и гребней (табл. 32). Степень инвагинаций возрастает на 17%, что влечет за собой увеличение показателя Sz на 20,8%

Таблица 32 –Показатели шероховатости поверхности коагулоцитов *B. craniifer* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, $1/\mu\text{m}^2$	Sz, nm
Изотоническая среда	151,92 \pm 0,55	610,02 \pm 0,33	52,24 \pm 0,20	0,77 [#]	662,25 \pm 0,36
Гипотоническая среда	137,43 \pm 1,05*	599,80 \pm 0,28*	42,44 \pm 0,11*	0,74 ^{**}	642,24 \pm 0,30*
Гипертоническая среда	163,29 \pm 0,48*	612,38 \pm 0,51*	61,31 \pm 0,22*	0,97 ^{**}	673,69 \pm 0,56*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

Поверхность энцитойдов *B. craniifer* характеризуется наличием глубоких инвагинаций мембраны в периферической области, что подтверждается отрицательным значением эксцесса (-0,81). Инкубация в среде с повышенной соленостью к заметным изменениям в высоте микровозвышений не приводит, но глубина впадин увеличивается на 10%. При этом возрастает частота встречаемости микровозвышений на единице площади, особенно в области ядра (табл. 33).

Воздействие гипотонической среды лишь немного уменьшает значение средней квадратической шероховатости, понижая высоту микровозвышений на 4%. Число неровностей на единицу площади остается прежним.

Таблица 33 – Показатели шероховатости поверхности эноцитоидов *B. craniifer* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/ μm^2	Sz, nm
Изотоническая среда	102,71 \pm 0,12	363,31 \pm 0,53	179,49 \pm 0,24	0,62 [#]	543,22 \pm 1,4
Гипотоническая среда	98,93 \pm 0,17*	349,42 \pm 0,51*	162,65 \pm 0,36*	0,62 [#]	512,80 \pm 1,8*
Гипертоническая среда	119,31 \pm 0,18*	364,36 \pm 0,41	197,34 \pm 0,36*	0,71 ^{**}	561,81 \pm 1,5*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической ($m < 0,000$).

На сканах заметны гребни с поперечными ответвлениями, тянущиеся от центра к краям клетки. Область ядра приподнята относительно остальной части гемоцита (рис. 40). В целом микрорельеф поверхности эноцитоидов отличается наибольшим разнообразием, что отражается на показателях шероховатости.

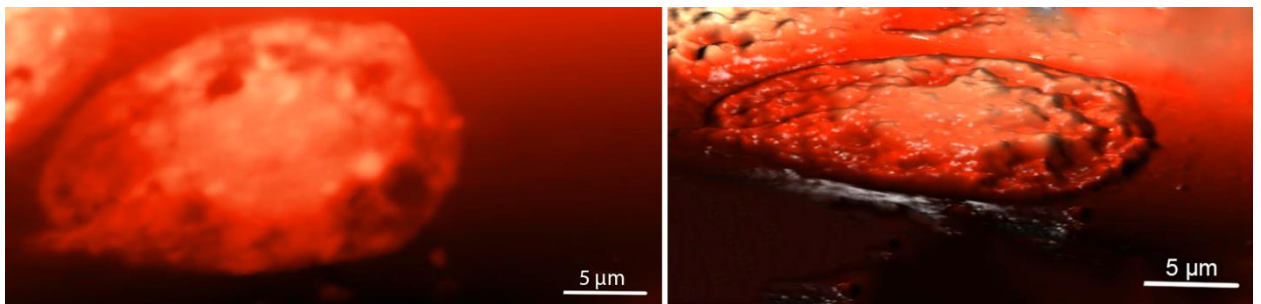


Рисунок 40 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности эноцитоидов *B. craniifer* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Микрорельеф прогемоцитов *G. portentosa* практически гладкий, отличается однородностью. В небольшом количестве присутствуют микровозвышения и микровпадины. По краю прогемоцитов выпячивания могут располагаться в виде цепочки, формируя ободок, несколько возвышающийся над остальной поверхностью клетки (рис. 41).

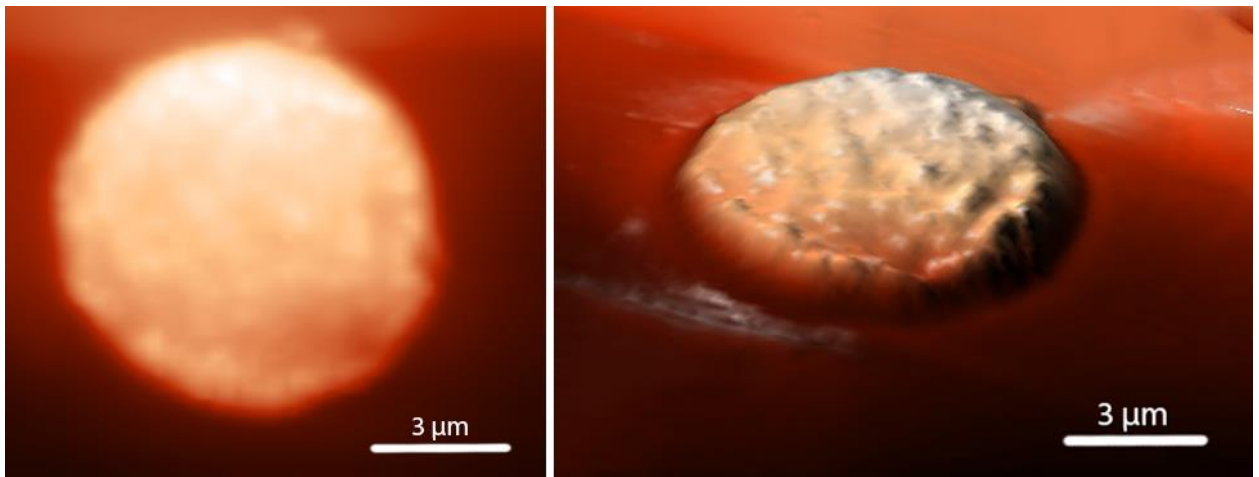


Рисунок 41 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности прогемоцитов *G. portentosa* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

В гипотонической среде этот перепад высот исчезает. Наличие борозд и гребней, обусловленных элементами цитоскелета, не отмечено. Области ядра и периферии слабо дифференцируются. Инкубация в гипертонической среде приводит к незначительному уменьшению диаметра гемоцитов. На изменение микрорельефа поверхности осмотическое давление среды оказывает минимальное влияние (табл. 34).

Таблица 34 – Показатели шероховатости поверхности прогемоцитов *G. portentosa* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/μm ²	Sz, nm
Изотоническая среда	33,91±0,13	202,34±0,23	94,19±0,20	0,55 [#]	296,53±0,30
Гипотоническая среда	30,21±0,16*	195,66±0,27*	89,26±0,14*	0,55 [#]	284,92±0,32*
Гипертоническая среда	36,73±0,22*	202,16±0,13	95,25±0,28*	0,55 [#]	297,41±0,31

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической ($m < 0,000$).

Микрорельеф поверхности плазмоцитов *G. portentosa* отличается однородностью. Основную массу шероховатости рельефа составляют одиночные пикообразные возвышения, реже встречаются борозды и складки (рис. 42). Среди показателей шероховатости не отмечено экстремальных возвышений или понижений микропрофиля. Отмечена небольшая амплитуда варьирования высот возвышений и углублений на поверхности клетки.

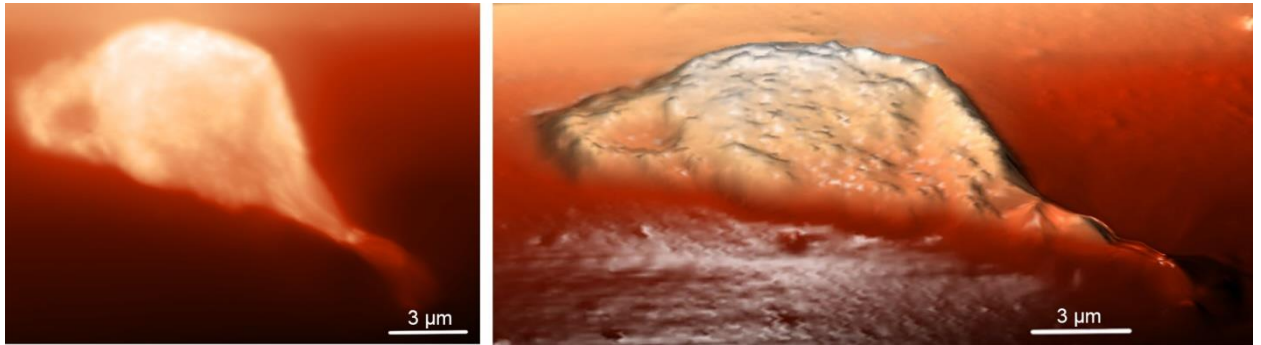


Рисунок 42 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности плазмоцитов *G. portentosa* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Клетки, сохранившие целостность мембраны после воздействия гипотонической среды, округляются, псевдоподиальные выросты у них не обнаружены. Величина Sz снижается на 60% ввиду уменьшения плотности распределения микровозвышений с $0,71 \text{ 1}/\mu\text{m}^2$ до $0,27 \text{ 1}/\mu\text{m}^2$ (табл. 35). У небольшой части гемоцитов (около 7%) подобные условия инкубации приводят к разрыву мембраны и скорому распластыванию.

Таблица 35 – Показатели шероховатости поверхности плазмоцитов *G. portentosa* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	$Sp, \text{ nm}$	$Sv, \text{ nm}$	$Sds, \text{ 1}/\mu\text{m}^2$	$Sz, \text{ nm}$
Изотоническая среда	$72,86 \pm 0,71$	$516,85 \pm 2,77$	$148,44 \pm 2,23$	$0,71^{\#}$	$665,29 \pm 3,64$
Гипотоническая среда	$55,20 \pm 0,44^*$	$229,30 \pm 1,39^*$	$50,05 \pm 1,89^*$	$0,28^{*\#}$	$279,35 \pm 2,47^*$
Гипертоническая среда	$84,85 \pm 0,74^*$	$563,09 \pm 2,99^*$	$168,01 \pm 0,60^*$	$0,76^{*\#}$	$731,10 \pm 3,04^*$

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

Среда с повышенным осмотическим давлением способствует возникновению многочисленных дискретных выпячиваний и обширных понижений рельефа, толщина возмущенного слоя увеличивается на 9%. Периферийная часть приобретает инвагинации в виде борозд длиной до 1,8-2 μm , направленных от периферии к центру.

На сканах гранулоцитов *G. portentosa* хорошо заметны внутриклеточные включения округлой и палочковидной формы, плотно

заполняющие цитоплазму (рис. 43). В нуклеарной области гемоциты могут иметь углубление, совпадающее с диаметром ядра.

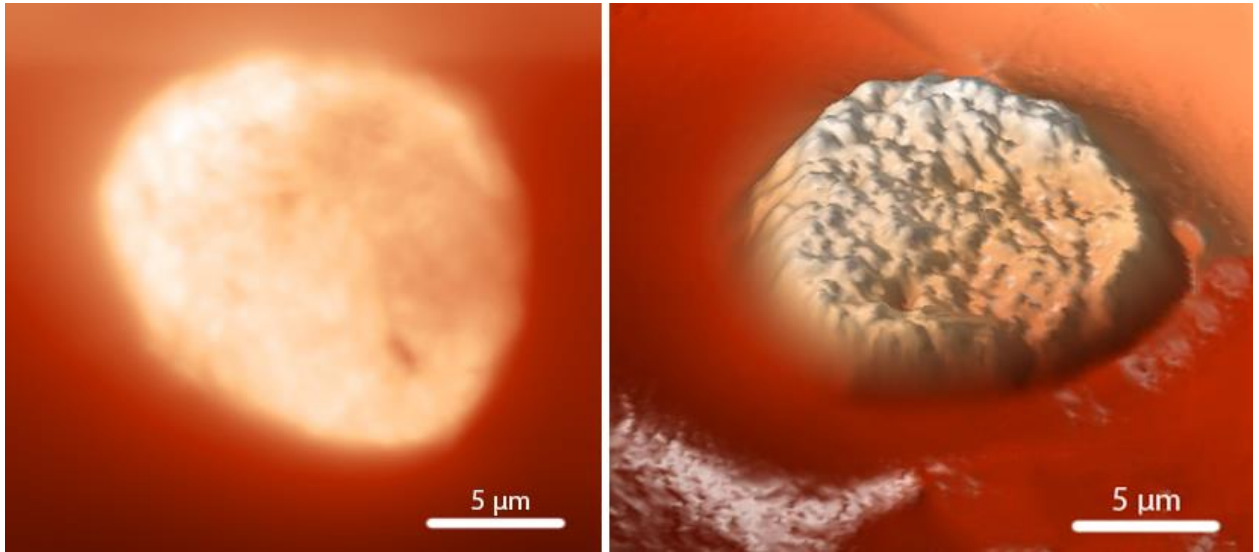


Рисунок 43 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности гранулоцитов *G. portentosa* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Толщина возмущенного слоя колеблется в пределах 648-650 nm. Коэффициент шероховатости после инкубации гемоцитов в гипертонической среде незначительно может превышать данный параметр у нативных клеток. Поверхность гранулоцитов, инкубированных в среде с пониженным осмотическим давлением, становится более гладкой. Снижаются перепады высот, создаваемые выпячиванием гранул (табл. 36).

Таблица 36 – Показатели шероховатости поверхности гранулоцитов *G. portentosav* условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/μm ²	Sz, nm
Изотоническая среда	61,74±0,16	483,93±1,66	165,12±0,83	0,51 [#]	649,04±1,82
Гипотоническая среда	54,35±0,13*	398,68±1,24*	131,08±0,98*	0,47* [#]	529,76±1,48*
Гипертоническая среда	69,08±0,17*	492,11±0,89*	171,00±0,69*	0,53* [#]	663,11±1,02*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической (m) < 0,000.

Сферулоциты *G. portentosa* отличаются понижением профиля поверхности клетки в области ядра. Остальная часть клетки имеет выпячивания мембраны, которые обусловлены наличием в сферулоцитах

гранул (рис. 44). Диаметр цитоплазматических включений варьирует в пределах 0,4 до 1,2 μm , у *G. portentosa* они в равной степени представлены как сферическими, так и палочковидными формами.

В области, расположенной над ядром, гранулы распределены не плотно или вовсе отсутствуют, аналогично сферулоцитам других видов тараканов.

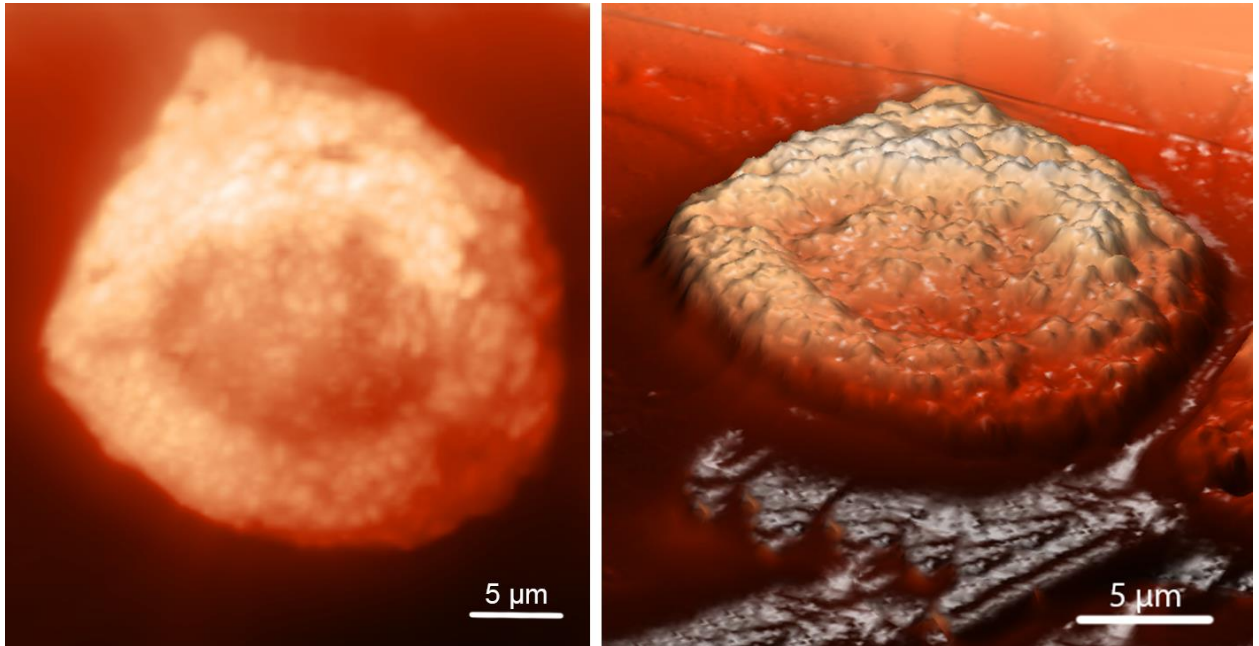


Рисунок 44 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности сферулоцитов *G. portentosa* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Инкубация в гипотонической среде приводит к выравниванию высоты профиля, область над ядром заполняется цитоплазмой и гранулами. Высота выпячиваний, создаваемых сферулами, уменьшается с 725 nm до 530 nm, соответственно меняется и глубина инвагинаций между цитоплазматическими включениями (табл. 37). Толщина возмущенного слоя уменьшается на 28%.

В условиях повышенной осмолярности происходят не такие значительные изменения в структуре микрорельефа и в размерах его элементах. Количество микровозвышений и микровпадин остается прежним, немного углубляются впадины между включениями.

Таблица 37 – Показатели шероховатости поверхности сферулоцитов *G. portentosa* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/μm ²	Sz, nm
Изотоническая среда	105,08±0,25	726,84±1,22	170,91±1,33	0,70 [#]	897,75±1,70
Гипотоническая среда	97,58±0,14*	531,88±1,02*	121,18±1,51*	0,69 [#]	653,06±1,94*
Гипертоническая среда	106,31±0,13	729,23±0,54*	183,16±0,68*	0,70 [#]	912,39±0,87*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической ($m < 0,000$).

Поверхность веретеновидных плазмоцитов *G. portentosa* околоядерной области равномерно покрывают отдельные борозды, длина которых варьирует от 0,70 до 1,3μm (рис. 45). Отмечено наличие массовых точечных возвышений у одного из полюсов гемоцитов, которые являются гранулами, скопившимися под цитоплазмой.

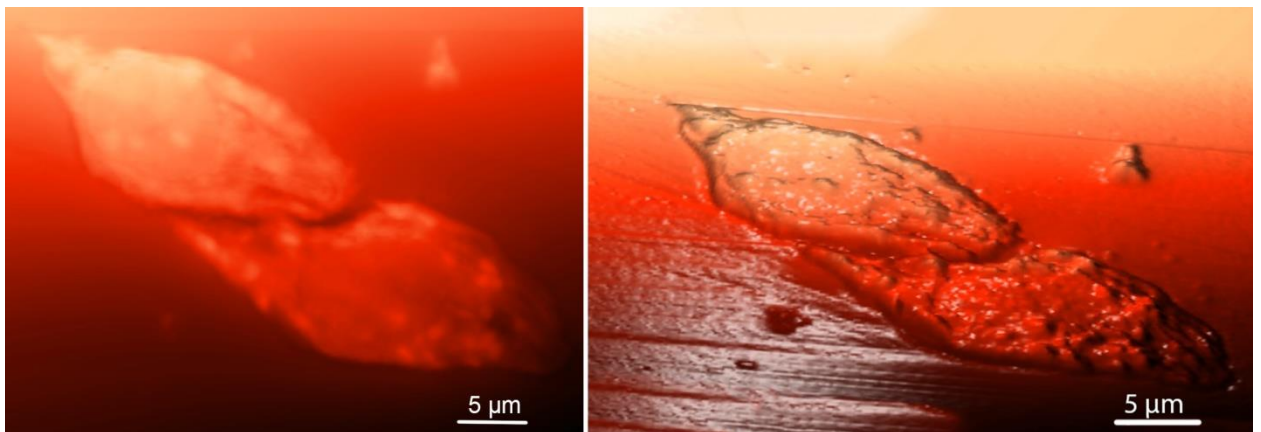


Рисунок 45 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности веретеновидных плазмоцитов *G. portentosa* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Инкубация в различных условиях не приводит к существенным колебаниям размеров микровозвышений и впадин, однако влияет на их количество, о чем свидетельствует величина параметра Sds (табл. 38). Среднеквадратическая шероховатость в обоих случаях изменяется на 12%.

Таблица 38 – Показатели шероховатости поверхности веретеновидных плазмоцитов *G. portentosa* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/μm ²	Sz, nm
Изотоническая среда	61,80±0,27	479,47±0,68	166,20±0,30	0,50 [#]	654,06±0,73
Гипотоническая среда	55,82±0,23*	461,96±0,64*	152,40±0,29*	0,48* [#]	614,36±0,68*
Гипертоническая среда	70,30±0,28*	499,31±0,43*	169,23±0,26*	0,55* [#]	660,59±0,55*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической (m) < 0,000.

Коагулоциты *G. portentosa* имеют дисковидную форму, область ядра значительно приподнята в сравнении с остальной частью гемоцита. Ядро расположено в центре или смещено к периферии. Поверхность коагулоцитов характеризуется наличием крупных не часто повторяющихся волнообразных впадин и выступов, идущих по краю клетки (рис. 46). Плотность распределения микровозвышений невысока (0,30). Инкубация в гипотонической среде приводит к ещё большему распластыванию гемоцитов по подложке. Это способствует увеличению перепада высот в ядерной области и на периферии: 0,57 μm в краевой зоне и 1,2 μm в нуклеарной зоне.

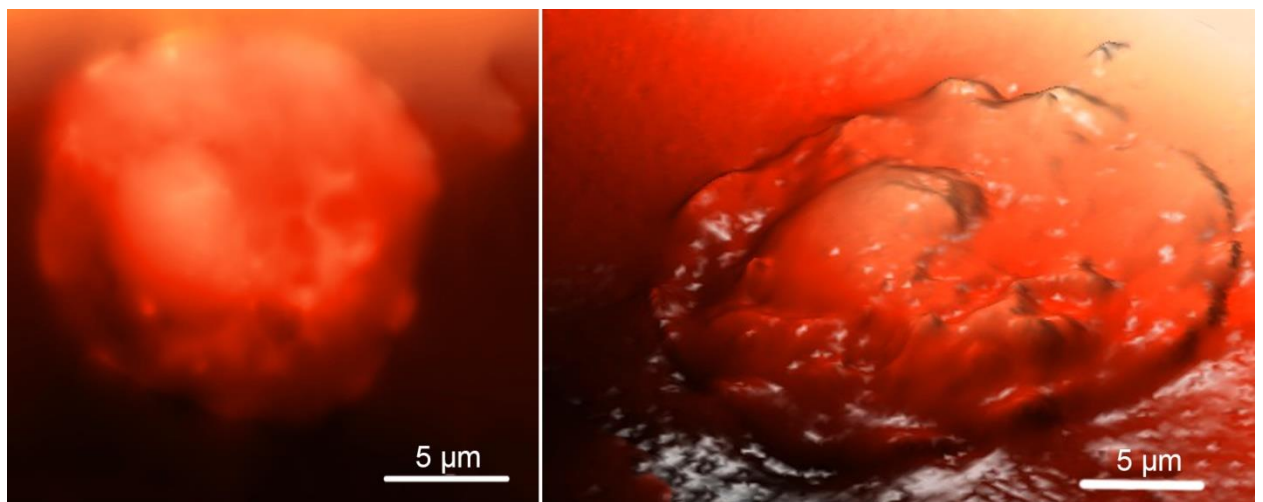


Рисунок 46 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности коагулоцитов *G. portentosa* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Мелкие неровности исчезают, снижается значение средней квадратической шероховатости (табл. 39), однако из-за распластывания на

периферии формируется от 2 до 4 ободов ламеллоплазмы с разной высотой, по краям гребни становятся крупнее за счет их слияния.

Таблица 39 – Показатели шероховатости поверхности коагулоцитов *G. portentosa* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/μm ²	Sz, nm
Гипотоническая среда	71,36±0,34	567,28±0,62	200,29±0,26	0,29 [#]	767,57±0,69
Изотоническая среда	94,53±0,20	442,67±0,50	214,91±0,47	0,30 [#]	657,57±0,73
Гипертоническая среда	98,65±0,28	478,93±0,42	223,98±0,54	0,30 [#]	702,91±0,66

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

В среде с повышенной соленостью краевая и нуклеарная зоны возвышаются над остальной частью клетки – она становится проваленной.

Эноцитойды *G. portentosa* – полиморфные гемоциты, неспособные к формированию псевдоподий. Высота клетки в области ядра достигает 1,3 μm, в перинуклеарной зоне опускается до 0,8 μm, а на периферии клетки формируется обод ламеллоплазмы шириной около 3 μm, высота здесь не превышает 0,58 μm. От центра клетки к краям радиально расходятся тяжи, образуя на поверхности клетки гребни протяженностью от 0,8 до 1,5 μm (рис. 47). Заметные полусферические микровозвышения поверхности располагаются над ядром и занимают часть перинуклеарной зоны. Их высота может достигать 500 nm, а глубина борозд редко превышает 150 nm (табл. 40).

По краю эноцитоида проходят волнообразные образования. В результате инкубации в гипертонической среде происходит значительное сужение обода ламеллоплазмы до 0,4 μm. Пониженная осмолярность среды приводит, напротив, к расширению обода ламеллоплазмы и уменьшению диаметра перинуклеарной зоны. Изменение параметров среды влияет на значение средней квадратической шероховатости в основном не за счет

перепада высот микрорельефа поверхности, а связано с увеличением или сокращением количества неровностей на единицу площади.

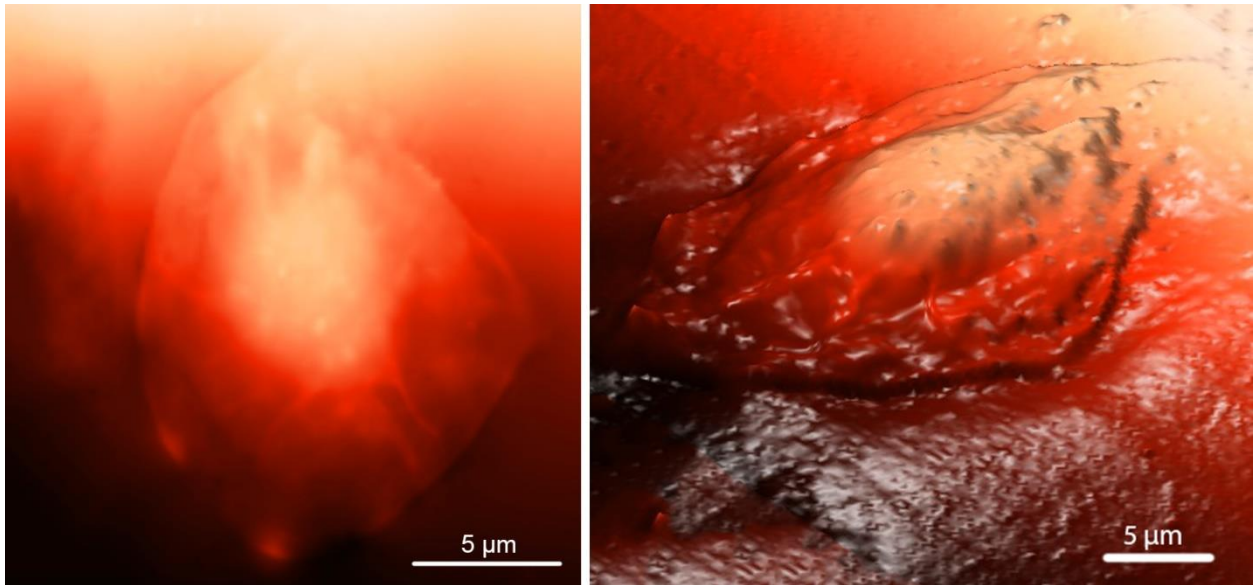


Рисунок 47 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности эноцитоидов *G. portentosa* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Таблица 40 – Показатели шероховатости поверхности эноцитоидов *G. portentosa* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/µm ²	Sz, nm
Изотоническая среда	112,10±0,18	504,56±0,66	154,52±0,24	0,34 [#]	659,09±0,69
Гипотоническая среда	109,71±0,17*	310,64±0,63*	148,32±0,28*	0,16**	458,96±0,67*
Гипертоническая среда	187,31±0,17*	517,80±0,53*	198,59±0,26*	0,76**	716,38±0,58*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической ($m < 0,000$).

Серповидные эноцитоиды *G. portentosa* хорошо сохраняют форму и четкие контуры при инкубации во всех средах. Перепады высоты в области серповидного образования незначительны, на поверхности клетки могут присутствовать единичные выступы в виде бугорков. Высота гемоцита в этой зоне около 1,7 µm, в то время как в области ядра едва достигает 0,6 µm (рис. 48).

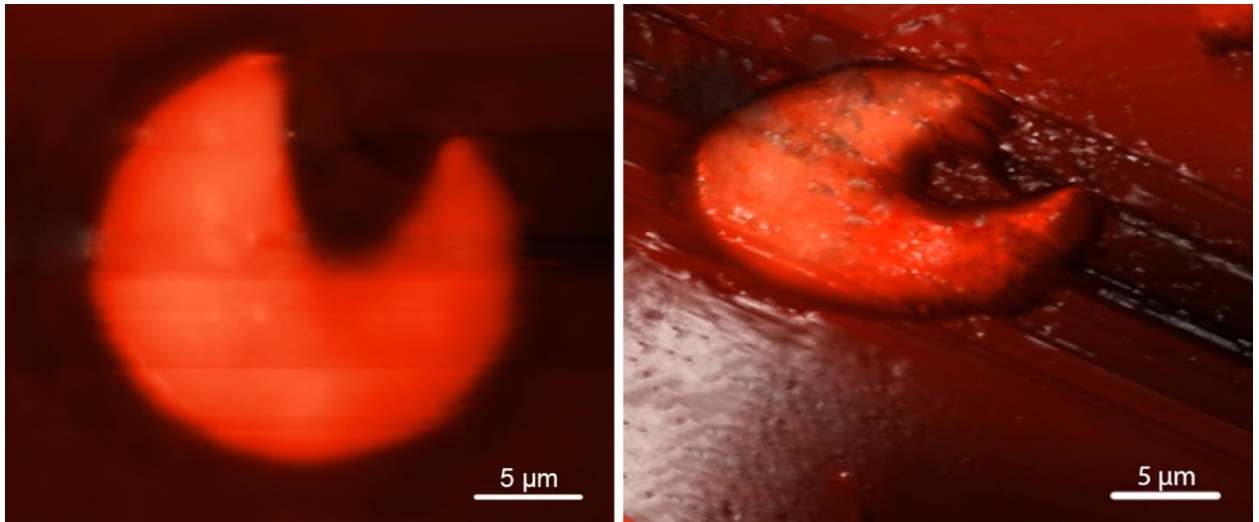


Рисунок 48 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности серповидных энцитойдов *G. portentosa* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Клетки характеризуются минимальным значением средней квадратической шероховатости, высоты возвышений, а глубина микровпадин не превышает 11 nm (табл. 42).

Таблица 41 – Показатели шероховатости поверхности серповидных энцитойдов *G. portentosa* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/µm ²	Sz, nm
Изотоническая среда	0,15±0,01	10,18±0,15	10,04±0,13	0,57 [#]	20,98±0,8
Гипотоническая среда	0,15±0,01	9,85±0,12	8,46±0,11*	0,55* [#]	18,59±1,3*
Гипертоническая среда	0,15±0,01	10,82±0,09	10,26±0,18	0,57 [#]	20,36±1,6

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической ($m < 0,000$).

Изменение осмолярности среды не оказывает влияния на особенности микрорельефа поверхности и объемные характеристики гемоцитов.

Прогемоциты *N. cinerea* – мелкие клетки с однородной цитоплазмой и крупным, центрально расположенным ядром. В нуклеарной зоне наблюдается понижение общего рельефа (рис. 49). Края прогемоцитов ровные без инвагинаций. Под воздействием как гипо-, так и гипертонической сред возникают радиально расходящиеся короткие гребни или полусферические выпячивания.

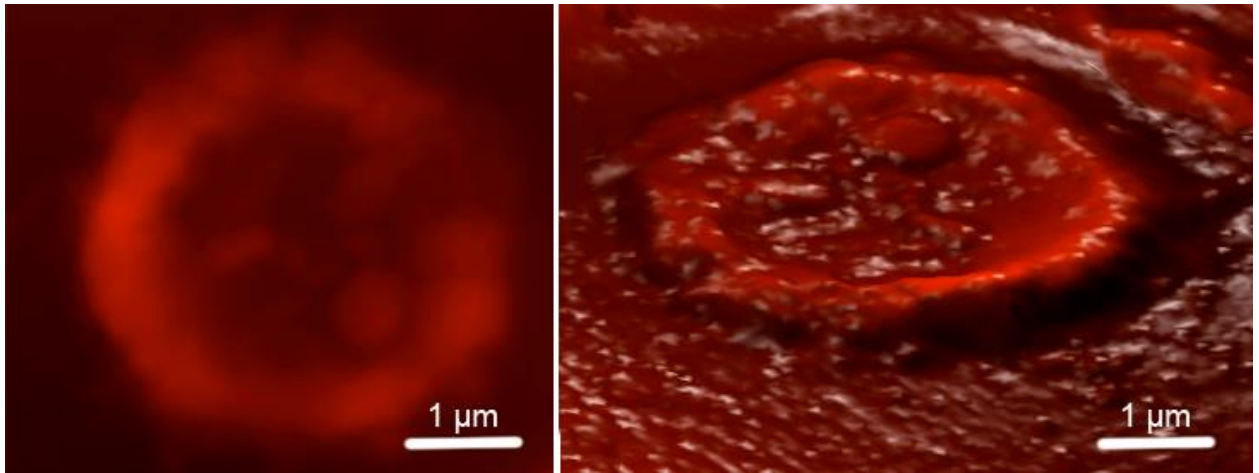


Рисунок 49 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности прогемоцитов *N. cinerea* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Характерно небольшое увеличение шероховатости в гипертонических условиях и уменьшение в среде с пониженной соленостью. Под действием гипотонической среды также происходит сокращение плотности возвышений на поверхности прогемоцитов (табл.43).

Таблица 43 – Показатели шероховатости поверхности прогемоцитов *N. cinerea* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/µm ²	Sz, nm
Изотоническая среда	32,44±0,30	159,89±0,24	65,31±0,21	0,58 [#]	225,00±0,28
Гипотоническая среда	26,20±0,20*	133,07±0,31*	65,12±0,25	0,41* [#]	198,19±0,42*
Гипертоническая среда	41,57±0,28*	160,43±0,30	68,35±0,26*	0,60* [#]	228,78±0,38*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической (m) < 0,000.

Плазмоциты *N. cinerea* характеризуются гребневидными выростами, высота которых не превышает 84-111 nm, имеют дорсальное расположение. У нативных гемоцитов их наблюдают на всей свободной поверхности. Более высокие пластинчатые выросты – раффлы – характеризуются в основном краевым расположением (рис. 50). При инкубации в среде с пониженным осмотическим давлением гемоциты принимают вид диска с несколько более вогнутым центром и сильно уплощенной периферией. После завершения

процесса расплывания края клетки плотно прилегают к поверхности субстрата.

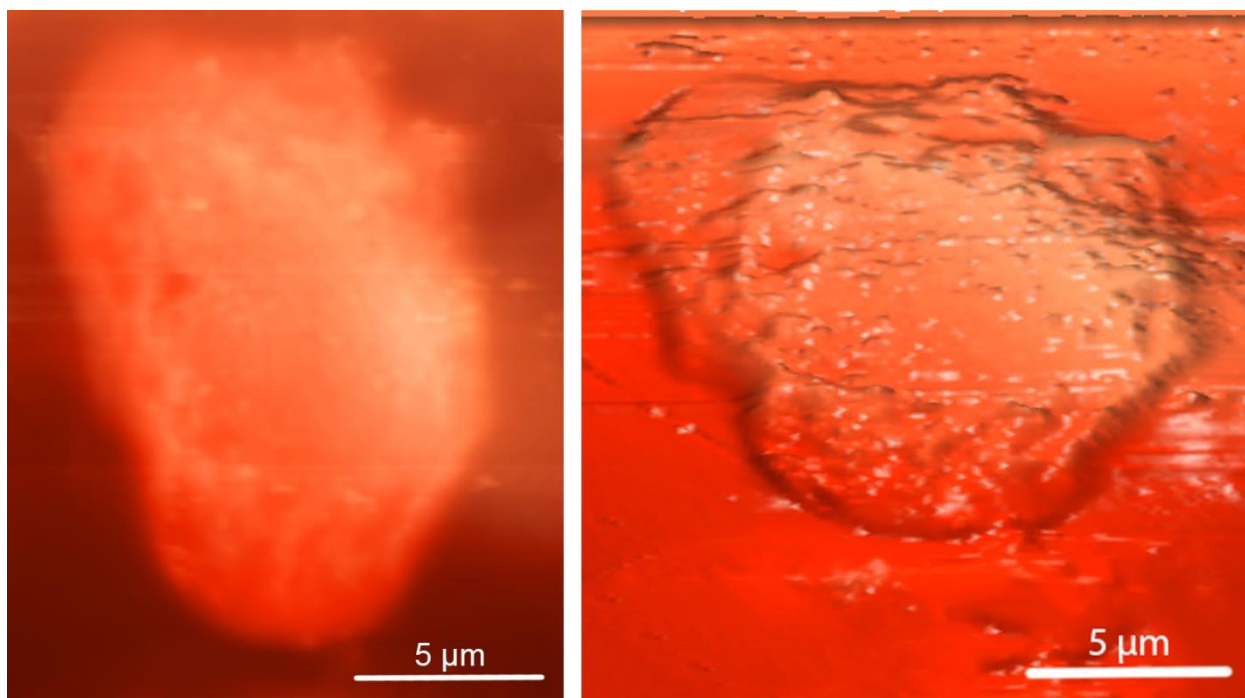


Рисунок 50 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности плазмоцитов *N. cinerea* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Скошенность распределения профиля не превышает 0,5 и не опускается ниже -0,5, что говорит о приблизительно равном соотношении впадин и выступов плазматической мембраны. Величина эксцесса находится в пределах от 0 до 3, следовательно, на поверхности клеток отсутствуют экстремальные пики и впадины. Поверхность приобретает сложное строение с максимальным размером возвышений и впадин в гипертонической среде. Поскольку параметр S_{sk} принимает значение от -0,65 до -0,80, можно говорить о преобладании микровпадин в структуре микрорельефа. Заметное сглаживание поверхности в нуклеарной зоне наблюдается в гипотонических условиях, что подтверждается уменьшением высоты пиков и сокращением толщины возмущенного слоя (табл. 44).

Таблица 44 – Показатели шероховатости поверхности плазмоцитов *N. cinerea* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/ μm^2	Sz, nm
Изотоническая среда	130,10±0,47	649,88±1,00	128,57±0,43	0,72 [#]	778,45±1,10
Гипотоническая среда	113,36±0,43*	300,26±0,91*	123,76±0,42*	0,64* [#]	424,02±1,09*
Гипертоническая среда	159,22±0,37*	654,18±0,88*	148,08±0,39*	0,78* [#]	802,26±0,91*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

Гранулоциты *N. cinerea* демонстрируют большое количество обширных возвышений профиля, которые обусловлены наличием у этих типов внутриклеточных включений (рис. 51). В нуклеарной зоне отмечено понижение рельефа. На периферии формируется узкий тонкий слой ламеллоплазмы, сильно исчерченный и покрытый некрупными раффлами. В гипотонических условиях он становится шире, общая высота клетки снижается до 0,9 μm .

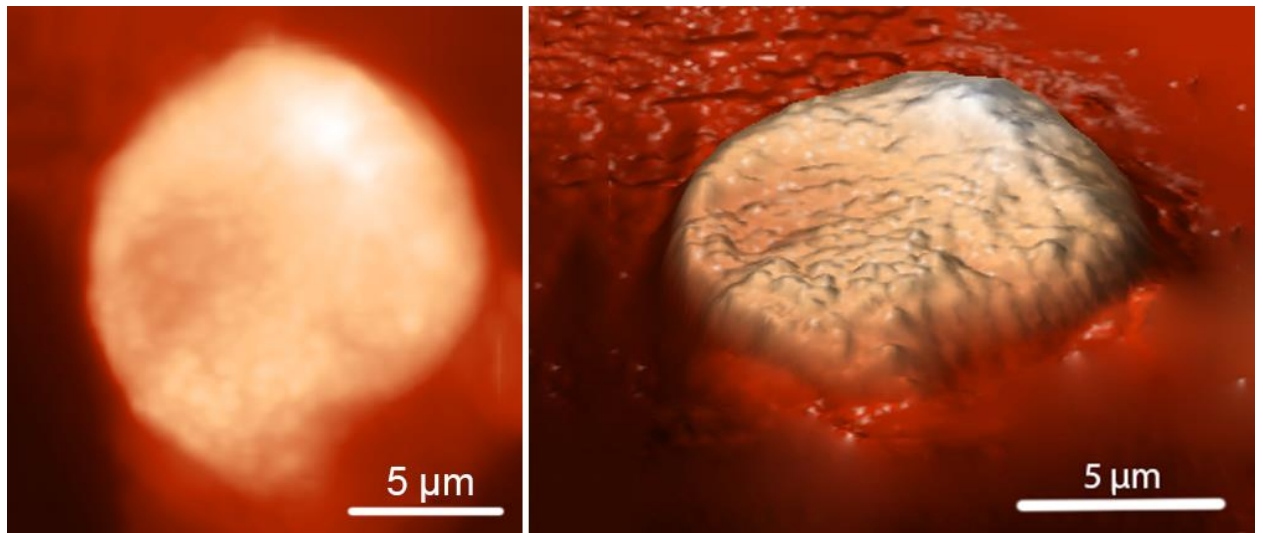


Рисунок 51 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности гранулоцитов *N. cinerea* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Характерно небольшое увеличение шероховатости в гипертонических условиях и снижение в условиях пониженной солености среды. В первом случае высота неровностей не претерпевает значительных изменений, а глубина впадин возрастает и появляется много новых мелких углублений, что отражается в показателе Sds (табл.45).

Таблица45– Показатели шероховатости поверхности гранулоцитов *N. cinerea* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, $1/\mu\text{m}^2$	Sz, nm
Изотоническая среда	79,95±0,41	513,50±0,71	304,91±0,49	0,78#	818,41±0,97
Гипотоническая среда	61,28±0,45*	488,14±1,13*	214,52±0,43*	0,62**	702,66±1,23*
Гипертоническая среда	84,25±0,52*	543,16±0,91*	387,18±1,18*	0,81**	930,34±1,51*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

Высота сферулоцитов *N. cinerea* в области ядра не превышает $0,9 \pm 0,07 \mu\text{m}$, в остальной части клетки колеблется от 1,2 до $1,4 \mu\text{m}$ (рис. 52). Гемоциты не распластаются и не теряют характерной формы при инкубации в условиях различной осмолярности. Гипотоническая среда способствует увеличению высоты клеток до $1,5 \pm 0,05 \mu\text{m}$, что ведет к росту перепада высот в сравнении с нуклеарной зоной. Поверхность мембраны краевой зоны визуально становится более гладкой, выступающие гранулы не так заметны, как в центральной части клетки.

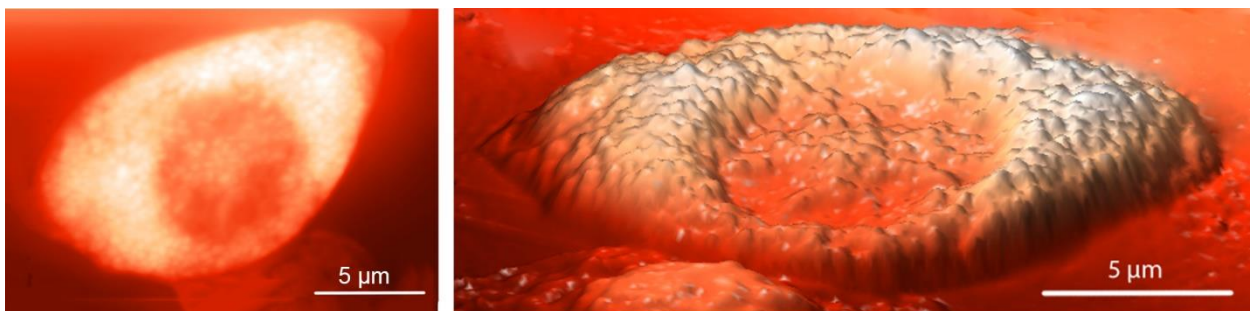


Рисунок 52 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности сферулоцитов *N. cinerea* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Мелкие гранулы (диаметр не более 0,6 μm) расположены очень плотно друг другу, перегородки между ними незаметны. Значение показателя Sds около 1,02 (табл.46). Величина углублений между включениями в гипертонической среде увеличивается на 14%, в то время как у сферулоцитов, содержащих сферулы диаметром 1,0-1,2 μm , она возрастает на 31%. В таких гемоцитах включения расположены так же плотно, но из-за их небольшого количества показатель Sds не превышает 0,6.

Таблица 46 – Показатели шероховатости поверхности сферулоцитов *N. cinerea* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/ μm^2	Sz, nm
Изотоническая среда	126,99±0,49	563,01±1,18	235,12±0,58	1,03 [#]	799,62±2,6
Гипотоническая среда	112,44±0,42*	407,39±1,05*	196,82±0,57*	0,75* [#]	605,88±2,3*
Гипертоническая среда	161,76±0,64*	570,52±1,31*	296,09±0,79*	1,03 [#]	867,48±3,7*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

Веретеновидные плазмоциты *N. cinerea* характеризуются сложной структурой поверхности. Данный тип форменных элементов гемолимфы *N. cinerea* характеризуется плотным расположением палочковидных и сферических внутриклеточных включений, которые зачастую маскируют борозды и гребни, обусловленные элементами цитоскелета (рис. 53).

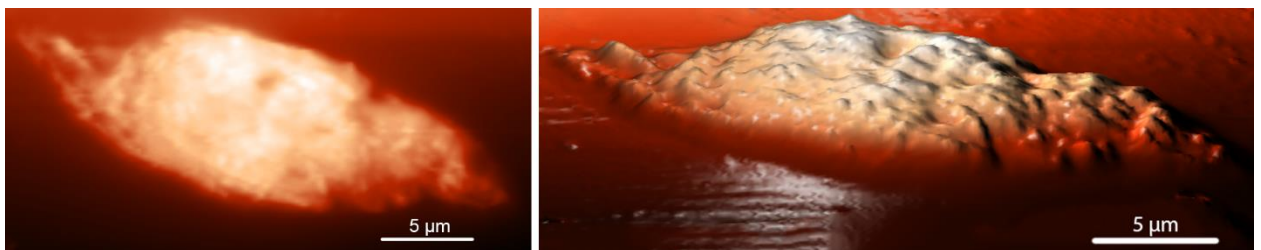


Рисунок 53 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности веретеновидных плазмоцитов *N. cinerea* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Инкубация в среде с повышенной соленостью приводит к еще большей инвагинации участков мембраны между гранулами, что отражается на показателях шероховатости. Высота гемоцитов в области полюсов не превышает 0,67 μm , а в центре достигает 1,3 μm . Понижение осмолярности

среды способствует выравниванию высоты клетки по всей площади. Значительно снижаются перепады высот микрорельефа, толщина возмущенного слоя не более 300 nm, в то время как гипертоническая среда способствует увеличению данного показателя до 1 μm . Также изменения затрагивают частоту встречаемости разнообразных структур микрорельефа (табл. 47).

Таблица 47 – Показатели шероховатости поверхности веретеновидных плазмоцитов *N. cinerea* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/ μm^2	Sz, nm
Изотоническая среда	136,67 \pm 0,50	542,82 \pm 1,11	236,42 \pm 1,14	0,55 [#]	779,24 \pm 1,39
Гипотоническая среда	87,77 \pm 0,31*	187,20 \pm 0,63*	101,69 \pm 1,15*	0,14**	288,89 \pm 1,37*
Гипертоническая среда	202,87 \pm 0,55*	722,92 \pm 1,24*	365,60 \pm 0,95*	0,87**	1088,52 \pm 1,59*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической ($m < 0,000$).

Коагулоциты *N. cinerea* – одни из наиболее устойчивых форменных элементов к изменению осмолярности среды, в сравнении с данным типом гемоцитов других видов исследуемых насекомых (не отмечено ни одного случая разрыва мембраны и разрушения клетки при инкубации в гипотонической среде). Коагулоциты сохраняют правильную дисковидную форму, контур ядра отчетлив и на скане представлен тонкой бороздкой. Поверхность коагулоцитов характеризуется смешанным рельефом. Присутствуют глубокие понижения профиля на периферии (рис. 54).

Под влиянием инкубации в гипертонической среде поверхность клетки визуально становится более зернистой. Амплитуда колебаний высот на периферии усиливается: значение Sp и Sv увеличивается на 10% и 70% соответственно по сравнению с изотоническими условиями (табл. 48). Ssk принимает значения от -0,70 до -0,77, что говорит о преобладании впадин на поверхности клетки. В гипотонической среде величина Ssk не значительно отличается от таковой в физиологически нормальных условиях. Толщина

возмущенного слоя уменьшается на 23%, микрорельеф сохраняет возвышения и микровпадины в виде коротких борозд.

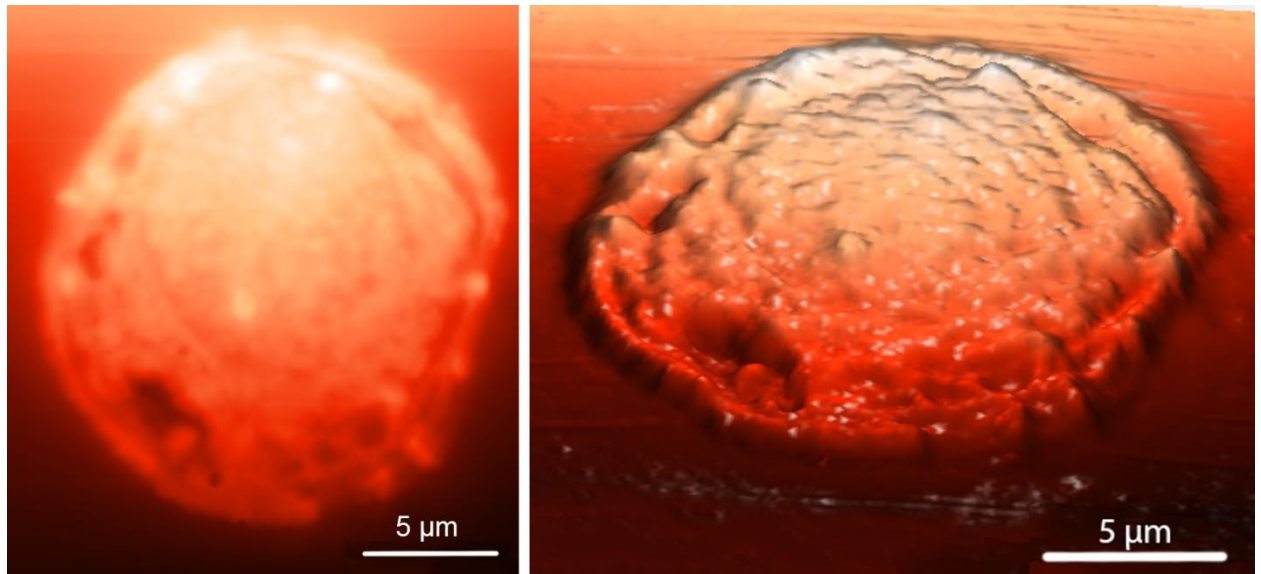


Рисунок 54 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности коагулоцитов *N. cinerea* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Таблица 48 – Показатели шероховатости поверхности коагулоцитов *N. cinerea* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/µm ²	Sz, nm
Изотоническая среда	109,26±0,54	576,51±1,41	227,36±0,47	0,95 [#]	803,87±1,41
Гипотоническая среда	86,36±0,49*	403,53±1,69*	220,16±0,44*	0,86* [#]	623,69±1,83*
Гипертоническая среда	143,91±0,75*	632,32±1,57*	388,19±0,58*	1,37* [#]	1020,50±1,76*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

Эноцитойды *N. cinerea* имеют форму эллипсоида, центральная часть, содержащая ядро, возвышается над периферической (рис. 55). Высота в центре гемоцита составляет 1,3 µm, а по краю – 0,6 µm. При инкубации в гипотонической среде формируются ламеллоподии, которые быстро сливаются в сплошное кольцо – ламеллоплазму. Она концентрически распространяется вокруг основания клетки, которая продолжает уплощаться: ее выпуклая центральная часть оказывается окруженной тонкой ламеллоплазмой.

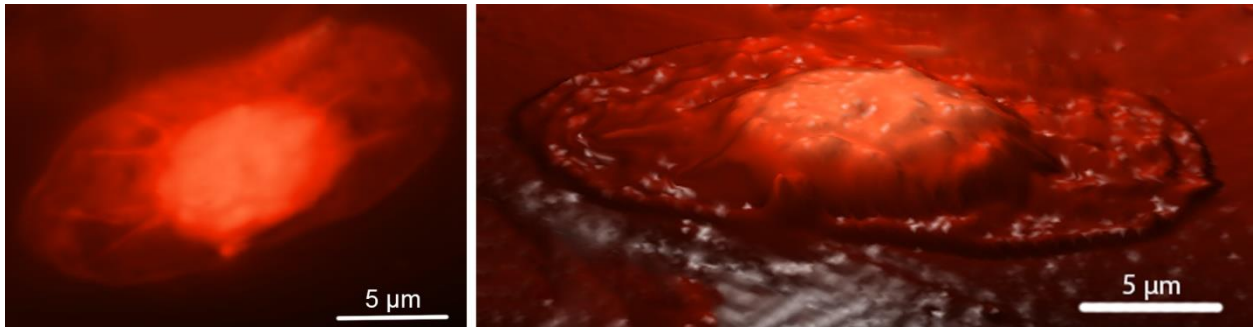


Рисунок 55 –2D и 3D-изображение топографии поверхности энцитозидов *N. cinerea* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Энцитозиды имеют сложную структуру поверхности. В периферической части клетки отмечено наличие выпячиваний гранул и вакуолей, хорошо развитые структуры цитоскелета формируют борозды и гребни.

После инкубации в гипотонической среде в отдельных областях клетки по краю заметны выступающие неровные участки ламеллоплазмы. В гипертонических условиях микрорельеф поверхности гетерогенный с преобладанием невысоких выпячиваний до $0,45\mu\text{m}$ (табл.49). Число микровозвышений и впадин на единицу площади не меняется.

Таблица 49– Показатели шероховатости поверхности энцитозидов *N. cinerea* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, $1/\mu\text{m}^2$	Sz, nm
Изотоническая среда	$130,64\pm 0,34$	$407,82\pm 0,91$	$120,96\pm 0,41$	$0,61^\#$	$528,78\pm 0,99$
Гипотоническая среда	$125,25\pm 0,36^*$	$365,28\pm 0,81^*$	$102,45\pm 0,40^*$	$0,60^\#$	$467,72\pm 0,88^*$
Гипертоническая среда	$142,93\pm 0,35^*$	$450,50\pm 0,98^*$	$120,78\pm 0,43$	$0,61^\#$	$571,28\pm 1,12$

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

Прогемоциты *P. americana* – наиболее мелкие, округлые клетки. Отмечено повышение профиля в центральной части, соответствующей нуклеарной зоне (рис. 56). Высота в данной области около $1,2\mu\text{m}$, в периферической части от $1-1,07\mu\text{m}$. По краям могут встречаться небольшие гребневидные или глобулярные возвышения, частота их появления увеличивается после инкубации в гипертонической среде.

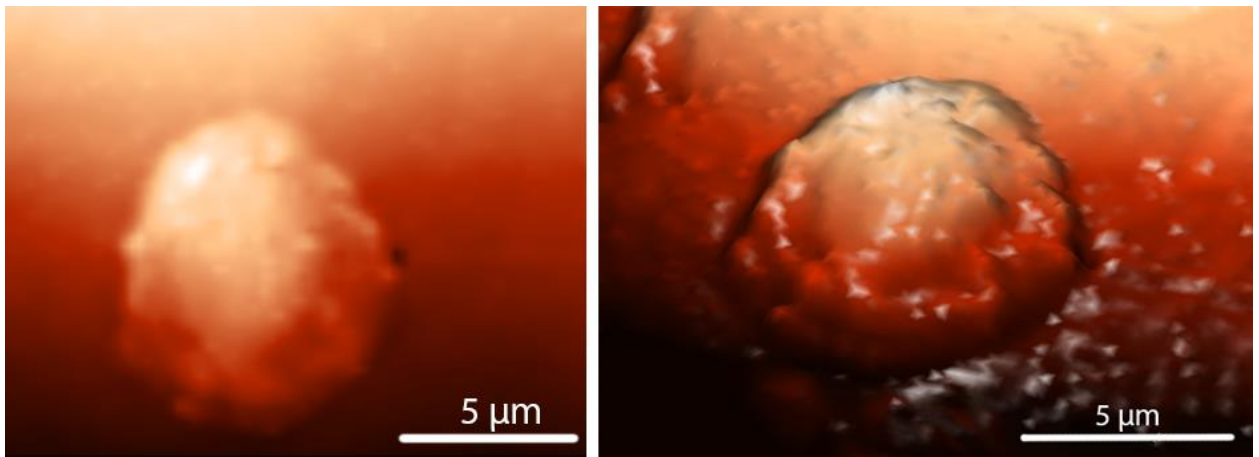


Рисунок 56 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности прогемоцитов *P. americana* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

В гипотонических условиях клетки могут незначительно увеличиваться, поверхность сглаживается, исключая краевую зону – там по-прежнему сохраняются гребенчатые и бороздчатые структуры.

Инкубация в гипертонической среде не приводит к достоверно значимым изменениям параметров шероховатости поверхности (табл.50).

Таблица 50 – Показатели шероховатости поверхности прогемоцитов *P. americana* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/µm ²	Sz, nm
Изотоническая среда	33,01±0,26	184,73±0,56	86,28±0,30	0,74 [#]	271,01±0,57
Гипотоническая среда	30,14±0,23*	154,36±0,50*	75,11±0,33*	0,70* [#]	229,47±0,59*
Гипертоническая среда	33,17±0,28	185,62±0,40	86,62±0,29	0,74 [#]	272,24±0,48

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической (m) < 0,000.

Плазмоциты *P. americana* в большинстве случаев имеют равномерную высоту, ядро не возвышается над цитоплазмой. Через мембрану хорошо заметны гранулы и впадины вакуолей (рис. 57). После инкубации в гипотонических условиях хорошо различимы ядерная область, которая понижается относительно остальной части клетки, и периферическая, в которой наблюдаются впадины неправильной формы. Микровыпячивания покрывают всю поверхность клетки, они чаще одиночные и располагаются хаотично.

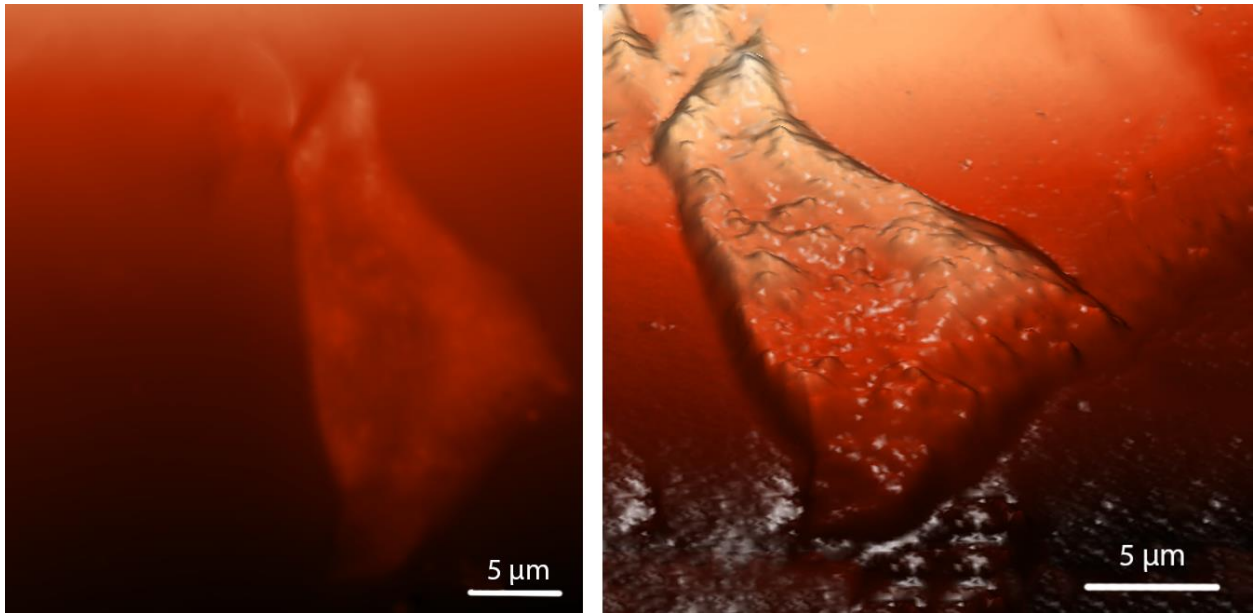


Рисунок 57 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности плазмоцитов *P. americana* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

В гипертонической среде на поверхности плазмоцитов формируется большое количество обширных понижений профиля, которые обусловлены наличием у этих типов фагоцитарных вакуолей и лизосом. Число микровозвышений на единицу площади возрастает (табл.51), высота пиков увеличивается незначительно, а углубления становятся более заметными.

Таблица 51 – Показатели шероховатости поверхности плазмоцитов *P. americana* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/µm ²	Sz, nm
Изотоническая среда	112,18±0,33	448,13±1,53	247,34±1,05	0,60 [#]	796,15±1,06
Гипотоническая среда	94,52±0,46*	152,70±0,60*	116,05±1,29*	0,24 ^{**}	268,75±1,50*
Гипертоническая среда	192,33±0,40*	687,12±1,92*	334,72±1,16*	0,84 ^{**}	1021,84±2,08*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

Гранулоциты *P. americana* хорошо сохраняют целостность и форму при инкубации в любых условиях. Микрорельеф гранулоцитов определяется наличием большого количества гранул, а также небольшим понижением высоты клетки в области ядра (рис. 58). Края клетки имеют вид пологих

скатов с волнообразными гребнями, перепады высот которых усиливаются при воздействии гипертонической среды.

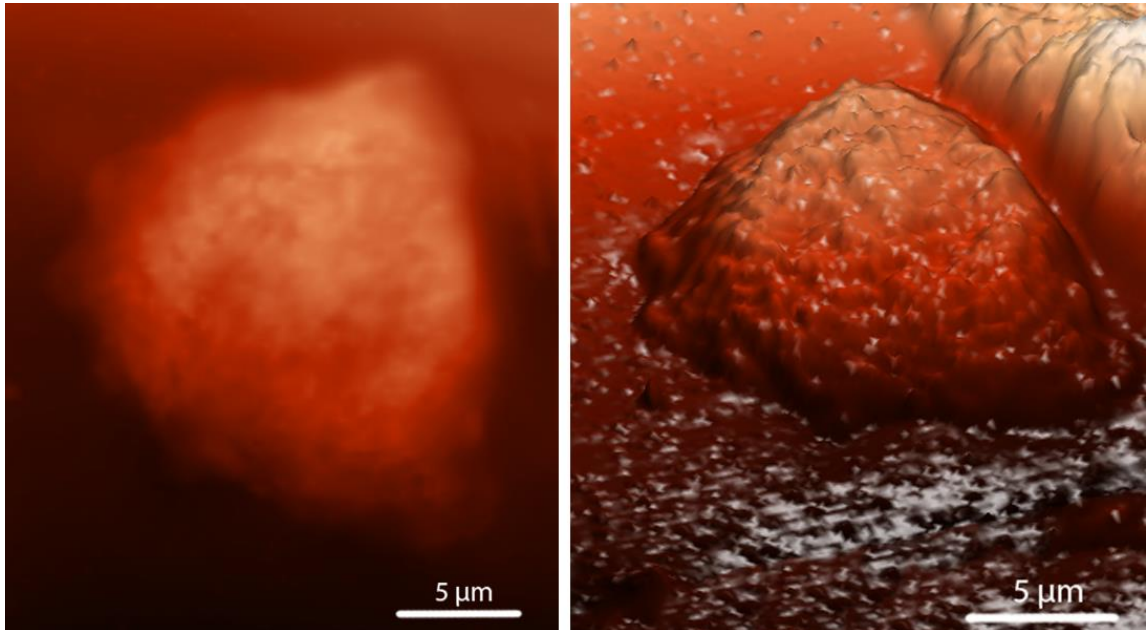


Рисунок 58 –2D и 3D-изображение топографии поверхности гранулоцитов *P. americana* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

В гипотонической среде поверхность гранулоцитов приобретает куполообразную форму. Ядро, которое может располагаться как в центре, так и на периферии, возвышается над поверхностью, его окружает цитоплазма, которую отделяет неглубокая борозда. Поверхность клетки сглаживается – о чем свидетельствует уменьшение толщины возмущенного слоя (табл.52). После инкубации в условиях пониженного осмотического давления микрорельеф представлен сферическими выпячиваниями и углублениями неправильной формы.

Таблица 52 –Показатели шероховатости поверхности гранулоцитов *P. americana* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/ μm^2	Sz, nm
Изотоническая среда	65,18±0,38	409,53±1,38	252,11±0,79	0,73 [#]	661,64±1,60
Гипотоническая среда	52,39±0,27*	218,68±1,26*	108,90±1,00*	0,54**	327,59±1,49*
Гипертоническая среда	82,81±0,43*	489,27±0,46*	391,42±1,12*	0,83**	880,69±1,11*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической ($m < 0,000$).

Сферулоциты *P. americana* характеризуются наибольшими отличиями от всех остальных клеточных типов. По всей поверхности сквозь мембрану проступают сферические гранулы диаметром 0,4-1,1 μm . Края клетки ровные, без инвагинаций. Между впадинами и возвышениями цитоскелета заметны выступающие через мембрану борозды и тяжи, которые формируют и отграничивают мембранные пузырьки (рис. 59).

В области ядра наблюдается общее понижение рельефа. В гипотонических условиях нуклеарная зона приобретает вид кратера, периферическая часть клетки становится более гладкой – борозды между внутриклеточными включениями становятся менее глубокими (табл.53).

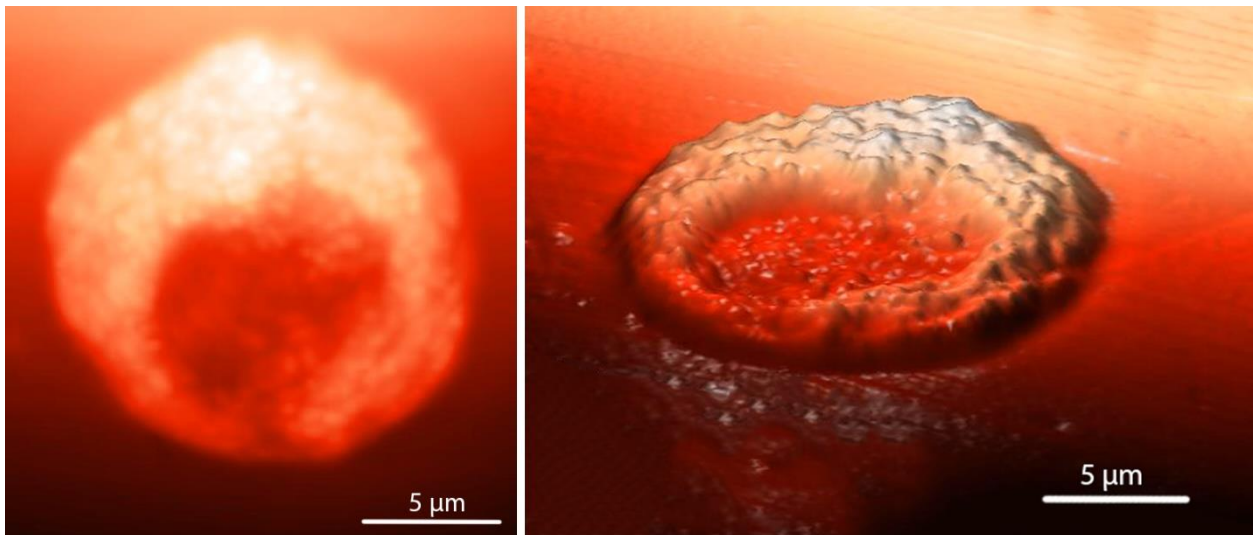


Рисунок 59 –2D и 3D-изображение топографии поверхности сферулоцитов *P. americana* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Таблица 53–Показатели шероховатости поверхности сферулоцитов *P. americana* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, $1/\mu\text{m}^2$	Sz, nm
Изотоническая среда	115,33±0,46	542,78±1,46	97,28±0,46	0,89 [#]	640,06±1,49
Гипотоническая среда	97,65±0,47*	198,86±1,35*	84,25±0,41*	0,74**	283,11±1,42*
Гипертоническая среда	122,12±0,47*	551,80±0,63*	109,76±0,38*	0,90 [#]	661,55±0,72*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической ($m < 0,000$).

Воздействие гипертонической среды способствует формированию по краям инвагинаций, положение которых соответствует промежуткам между гранулами. Толщина возмущенного слоя увеличивается, однако наличие максимальных пиков и впадин не отмечено.

Во всех условиях инкубации веретеновидные плазмоциты *P. americana* отличаются возвышенной центральной частью, которая без резких перепадов постепенно снижается, переходя к периферии (рис. 60). У полюсов гемокрита края, контактирующие с подложкой, характеризуются наличием небольших волнообразных образований.

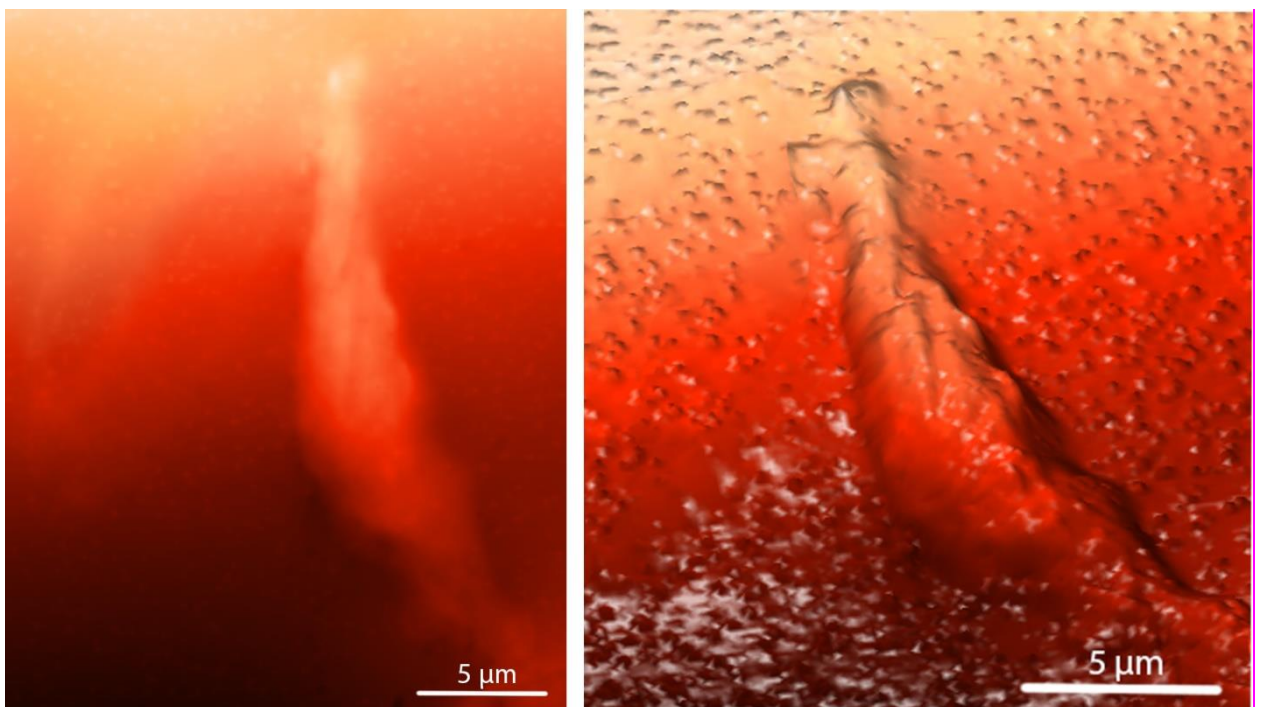


Рисунок 60 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности веретеновидных плазмоцитов *P. americana* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

В условиях пониженного осмотического давления данный тип клеток приобретает более гомогенный рельеф, основную массу составляют продолговатые цилиндрические возвышения длиной 1,1-2,3 μm . Значение S_q снижается на 32% (табл. 54).

В гипертонической среде гребни на сканах выглядят более контрастными, борозды между ними углубляются. Заметным становится и небольшое количество гранул, проступающих сквозь мембрану.

Таблица 54– Показатели шероховатости поверхности веретеновидных плазмоцитов *P. americana* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/μm ²	Sz, nm
Изотоническая среда	59,08±0,42	524,95±1,34	206,99±0,77	0,50 [#]	731,94±1,59
Гипотоническая среда	40,20±0,51*	429,83±1,03*	140,85±0,78*	0,50 [#]	570,69±1,29*
Гипертоническая среда	79,29±0,49*	559,81±1,27*	221,71±0,86*	0,50 [#]	781,52±1,51*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической ($m < 0,000$).

Микрорельеф поверхности коагулоцитов *P. americana* гетерогенный с преобладанием невысоких выпячиваний (табл.55). Глубокие понижения профиля отсутствуют. Область клетки, содержащая ядро, приподнята над периферией (рис. 61). Через мембрану выступают структуры цитоскелета, которые в центральной части клетки имеют вид отдельных возвышений, а ближе к краю формируют тяжи и складки. Поверхность периферической части клеток отличается наличием округлых инвагинаций, реже в виде коротких борозд длиной 50-170 nm. Кроме того могут быть едва заметны концентрические углубления в количестве 2-3.

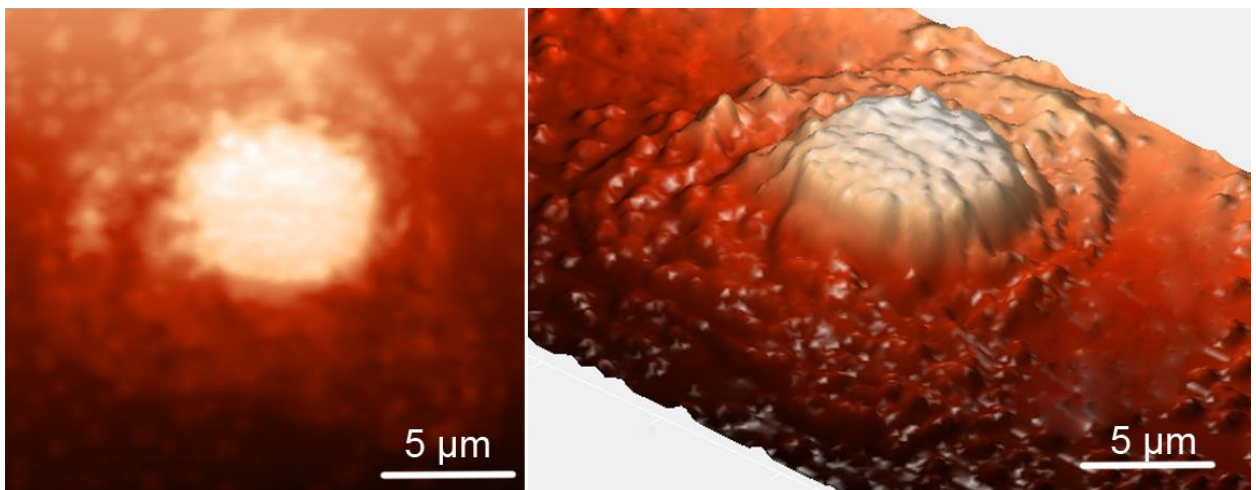


Рисунок 61 –2D и 3D-изображение топографии поверхности коагулоцитов *P. americana* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Инкубация коагулоцитов в условиях пониженного осмотического давления не приводит к значительным изменениям морфологии клеток. Под воздействием гипертонической среды микрорельеф меняется в сторону

увеличения складок, впадин и возвышений. Гранулы более контрастно выделяются на поверхности, их диаметр уменьшается до 2,5-3 μm .

Таблица 55– Показатели шероховатости поверхности коагулоцитов *P. americana* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, $1/\mu\text{m}^2$	Sz, nm
Изотоническая среда	87,01±0,44	529,68±1,00	116,48±0,52	0,87#	646,16±1,01
Гипотоническая среда	64,73±0,35*	237,06±1,02*	100,36±0,49*	0,50*#	337,42±1,24*
Гипертоническая среда	98,90±0,61*	547,89±1,14*	143,06±0,42*	0,87#	690,95±1,21*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

Микрорельеф поверхности прогеоцитов *S. tartara* характеризуется наличием выпячивания в виде одиночных глобул, а также впадин неправильной формы. Ядро над общей площадью поверхности клетки не возвышается, напротив – в данной области может сформироваться углубление (рис. 62). Края прогеоцитов ровные, в гипотонической среде формируется узкий равномерный слой ламеллоплазмы. В этих условиях микрорельеф характеризуется меньшим разнообразием структур, перинуклеарная зона разглаживается – значение Sz уменьшается до $160,02 \pm 0,59$ nm (табл.56).

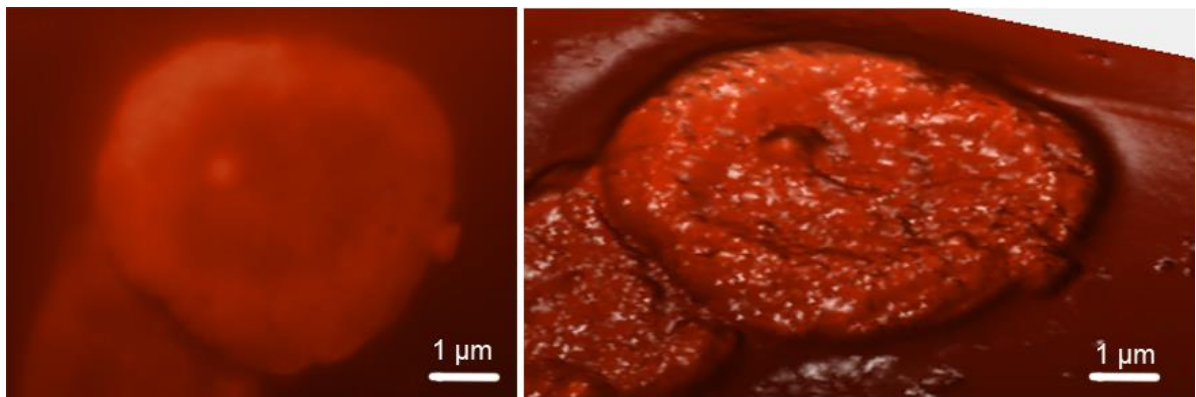


Рисунок 62 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности прогеоцитов *S. tartara* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

В гипертонических условиях поверхность приобретает зернистый вид, на границе ядерной и периферической зон усиливается исчерченность. Величина параметра Sds возрастает на 7,4%, глубина микровпадин между

глобулярными возвышениями достигает $76,9 \pm 2,4 \text{ nm}$, что влечет за собой увеличение толщины возмущенного слоя.

Таблица 56– Показатели шероховатости поверхности прогемотитов *S. tartara* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, $1/\mu\text{m}^2$	Sz, nm
Изотоническая среда	$35,37 \pm 0,26$	$113,14 \pm 0,42$	$64,56 \pm 0,41$	0,50 [#]	$177,70 \pm 0,58$
Гипотоническая среда	$30,62 \pm 0,23^*$	$108,58 \pm 0,47^*$	$51,44 \pm 0,44^*$	0,50 [#]	$160,02 \pm 0,59^*$
Гипертоническая среда	$39,06 \pm 0,33^*$	$134,01 \pm 0,41^*$	$77,12 \pm 0,56^*$	0,54 ^{**}	$211,13 \pm 0,75^*$

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

В периферической части плазмоцитов *S. tartara* могут формироваться отдельные волнообразные и гребневидные образования, в центральной части присутствует несколько крупных глобулярных и цилиндрических возвышений (рис. 63). Среди структур микрорельефа этого типа клеток отмечен широкий диапазон изменения линейных размеров возвышений и углублений поверхности.

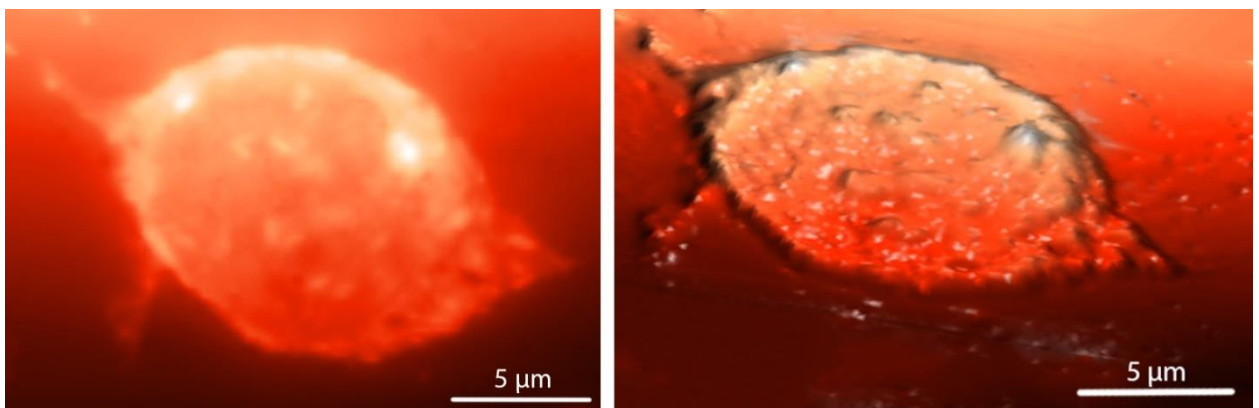


Рисунок 63–2D и 3D-изображение топографии поверхности плазмоцитов *S. tartara* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

В гипертонических условиях складчатость микрорельефа краевой зоны значительно усилилась, величина Sds достигает 1,3. При инкубации в гипотонической среде разнообразие структур микрорельефа снижается, исчезают глобулярные выросты, гребенчатые складки характеризуются более

плавными переходами и меньшей высотой, значение S_v и S_p не превышает 150 nm (табл.57).

Таблица 57– Показатели шероховатости поверхности плазмоцитов *S. tartara* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	S_q	S_p , nm	S_v , nm	S_{ds} , $1/\mu\text{m}^2$	S_z , nm
Изотоническая среда	58,65±0,29	451,70±1,33	136,26±0,88	0,82 [#]	587,96±1,54
Гипотоническая среда	45,23±0,29*	146,01±1,24*	102,21±0,69*	0,77* [#]	248,22±1,54*
Гипертоническая среда	71,71±0,48*	480,65±0,63*	140,96±0,48*	1,30* [#]	621,62±0,82*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

Как и у других исследуемых видов, гранулоциты *S. tartara* отличаются наличием характерных сферических выпячиваний, формируемых цитоплазматическими гранулами (рис. 64). В зрелых клетках хорошо заметно их расположение концентрическими кругами, в молодых гранулоцитах включения разбросаны хаотично. Клетки, инкубированные в изотонической среде, на сканограмме имеют вид полусферы (высота 1,2-1,3 μm) с ободом ламеллоплазмы по периферии шириной от 1,8 до 2,5 μm . Высота клетки в этой зоне не имеет значимых колебаний и составляет около 0,8 μm . Гипотоническая среда способствует увеличению ширины периферической части до 3,7 μm , обод приобретает волнистый вид – высота здесь колеблется от 0,8 до 0,2 μm , а в центральной части не превышает 1 μm .

Согласно показателям шероховатости гранулоциты характеризуются наименьшим разнообразием микроструктур поверхности мембраны среди всех типов клеток, но наибольшей площадью их распределения (табл.58). Экстремальные пики и впадины отсутствуют.

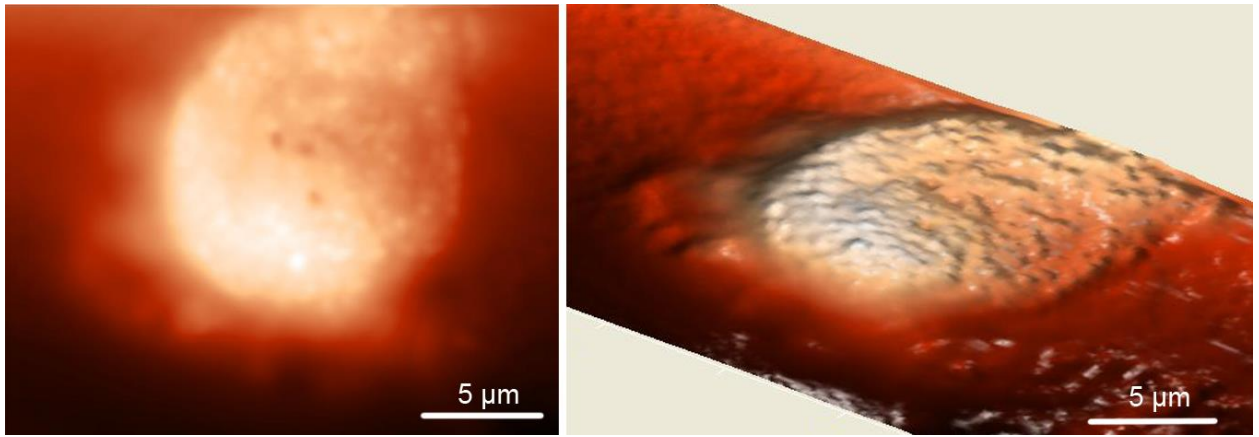


Рисунок 64 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности гранулоцитов *S. tartara* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Таблица 58– Показатели шероховатости поверхности гранулоцитов *S. tartara* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/µm ²	Sz, nm
Изотоническая среда	84,51±0,45	329,14±1,18	105,20±0,28	0,79#	434,35±1,22
Гипотоническая среда	70,29±0,39*	189,32±0,88*	99,88±0,25*	0,52*#	289,3±0,94*
Гипертоническая среда	91,91±0,33*	349,00±1,38*	124,50±0,41*	0,80*#	473,50±1,43*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической ($m < 0,000$).

Визуально у сферулоцитов *S. tartara* можно выделить 2 типа выпячиваний: 1) формируемые крупными сферами и расположенные в перинуклеарной зоне (реже – и над ядром) и 2) палочковидные, длиной до 1,2 µm, обнаруживаемые как в зоне ядра, так и на периферии (рис. 65).

Второй тип образований немногочисленный, лежат параллельно друг другу, формируя группы по 2-4 штуки. Также отмечены единичные случаи их одиночного расположения между сферами. Высота палочковидных гребней не более 100 nm, тогда как величина возвышений, образуемых цитоплазматическими включениями, достигает 350 nm.

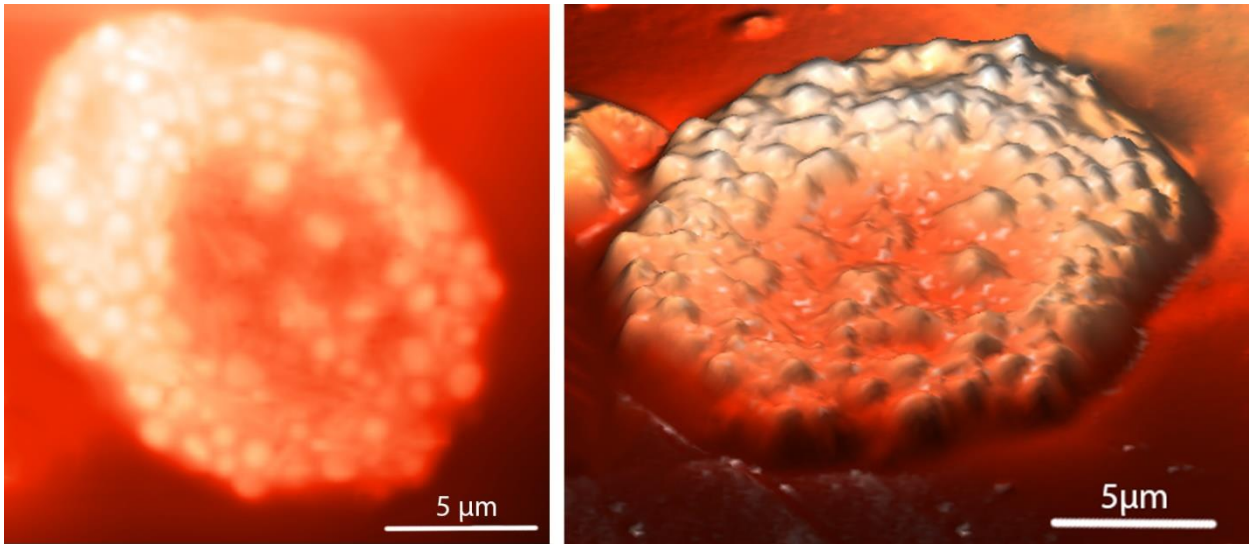


Рисунок 65 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности сферулоцитов *S. tartara* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Число структур на единице площади не меняется при инкубации гемоцитов в средах различной осмолярности (табл. 59). Отмечено уменьшение S_q до $95,87 \pm 0,49$ в гипотонической среде, поверхность разглаживается, значительно меняется толщина возмущенного слоя (с $835,58 \pm 1,20 \mu\text{m}$ до $392,89 \mu\text{m}$).

Таблица 59 – Показатели шероховатости поверхности сферулоцитов *S. tartara* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	S_q	S_p , nm	S_v , nm	S_{ds} , $1/\mu\text{m}^2$	S_z , nm
Изотоническая среда	$118,04 \pm 0,57$	$698,37 \pm 1,09$	$137,22 \pm 0,44$	0,87 [#]	$835,58 \pm 1,20$
Гипотоническая среда	$95,87 \pm 0,49^*$	$302,25 \pm 0,89^*$	$90,64 \pm 0,49^*$	0,87 [#]	$392,89 \pm 1,10^*$
Гипертоническая среда	$128,63 \pm 0,62^*$	$699,31 \pm 0,98$	$150,69 \pm 0,51^*$	0,87 [#]	$850,0 \pm 1,06^*$

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

Веретеновидные плазмоциты *S. tartara* характеризуются небольшим разнообразием структур микрорельефа – он в основном представлен невысокими (около 70-100 nm) узкими гребневидными ветвящимися тяжами, образующими сеть. Отмечено наличие единичных глубоких впадин (до 614 nm). Нуклеарная зона находится на одном уровне с периферической (рис. 66).

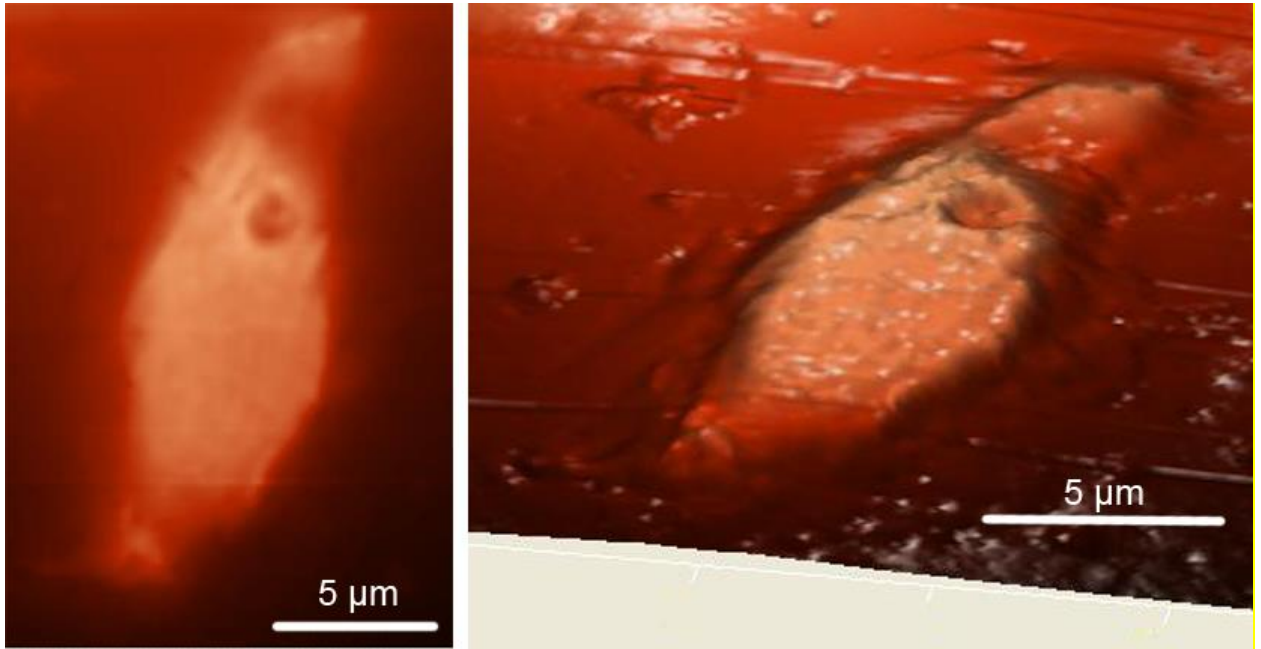


Рисунок 66 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности веретеновидных плазмоцитов *S. tartara* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Даже при инкубации в гипотонической среде гемоциты распластываются незначительно, сохраняя характерную веретеновидную форму. Высота в области ядра и прилегающей к нему зоне снижается от 1,1 μm до 0,8 μm . Центральная часть клетки становится шире. В гипертонических условиях увеличивается значение параметра Sq (табл. 60). Исчерченность поверхности становится более выраженной, расстояние между гребневидными тяжами уменьшается. Величина Sv изменяется от 185,5 до 380,0 nm по сравнению с таковой у гемоцитов, инкубированных в физиологически нормальных условиях.

Таблица 60 – Показатели шероховатости поверхности веретеновидных плазмоцитов *S. tartara* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp , nm	Sv , nm	Sds , $1/\mu\text{m}^2$	Sz , nm
Изотоническая среда	$95,12 \pm 0,39$	$538,00 \pm 0,91$	$184,62 \pm 0,55$	0,60 [#]	$722,61,7 \pm 1,10$
Гипотоническая среда	$85,45 \pm 0,40^*$	$500,91 \pm 1,02^*$	$134,35 \pm 0,59^*$	0,57 ^{*#}	$635,26 \pm 1,18^*$
Гипертоническая среда	$131,93 \pm 0,47^*$	$540,97 \pm 0,71$	$379,76 \pm 0,61^*$	0,60 [#]	$920,73 \pm 0,91^*$

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической ($m < 0,000$)

Коагулоциты *S. tartara* на сканах имеют вид диска, область ядра может понижаться относительно остальной части клетки. На поверхности гемоцитов хорошо заметны холмообразные и игольчатые возвышения, располагающиеся концентрическими рядами (рис. 67). Кроме того отмечено наличие мелких внутриклеточных включений, густо заполняющих цитоплазму. В гипертонических условиях отметили увеличение показателей шероховатости (табл.61). Возрастание количества неровностей микрорельефа также отразилось на их высоте. Величина параметра Ssk находится в диапазоне от 0,78 до 0,97, следовательно, возвышения становятся преобладающими элементами в структуре микрорельефа.

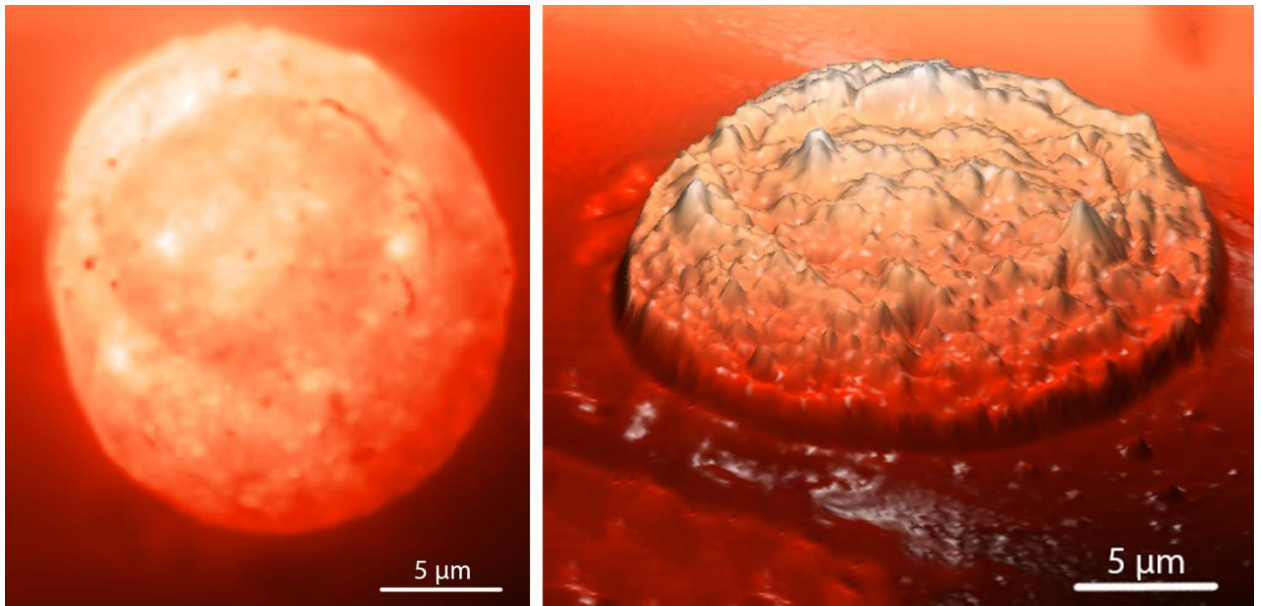


Рисунок 67 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности коагулоцитов *S. tartara* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Коагулоциты уменьшаются в объеме почти на 27%, клетки приобретают компактную форму, а гранулы более плотно располагались в цитоплазме. У данного типа форменных элементов гемолимфы зафиксированы случаи разрушения клеток с выделением гранул при инкубации в гипотонической среде.

Таблица 61–Показатели шероховатости поверхности коагулоцитов *S. tartara* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/μm ²	Sz, nm
Изотоническая среда	51,45±0,35	554,80±0,54	147,63±0,72	1,17 [#]	702,16±0,92
Гипотоническая среда	40,66±0,34*	551,54±0,51*	80,44±0,31*	0,80* [#]	631,98±0,59*
Гипертоническая среда	67,40±0,53*	560,38±0,48*	160,55±0,63*	1,17 [#]	720,92±0,71*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической ($m < 0,000$)

Прогемоциты *B. orientalis* отличаются сглаженным профилем поверхности, с преобладанием неглубоких понижений микрорельефа (рис. 68), что подтверждает величина Ssk, находящаяся в пределах $0,70 \pm 0,08$. В гипотонической среде значение Sq снижается от 36 до 30 – на сканах гемоциты выглядят гладкими, с четкими ровными контурами.

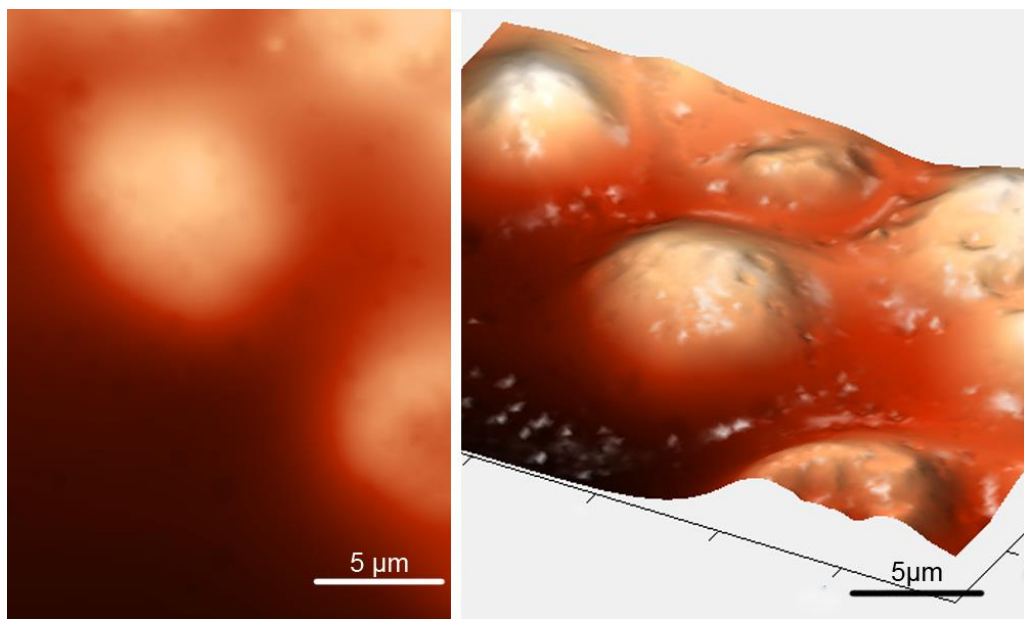


Рисунок 68 –2D и 3D-изображение топографии поверхности прогемоцитов *B. orientalis* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Высота увеличивается от 1,1 до 1,3 μm, при этом диаметр прогемоцитов остается неизменным. Профиль данных форменных элементов становится куполообразным. Инкубация в гипертонических условиях способствует значительному уменьшению размеров клеток (на 10-12%), сильную складчатость приобретает зона узкого периферийного обода

цитоплазмы. На поверхности отмечено наличие невысоких, но плотно и часто расположенных гребней: $Sds=0,81$ (табл.62).

Таблица 62 – Показатели шероховатости поверхности прогеоцитов *B. orientalis* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, $1/\mu\text{m}^2$	Sz, nm
Изотоническая среда	$35,70\pm 0,30$	$117,93\pm 0,68$	$100,53\pm 0,62$	0,30 [#]	$218,46\pm 0,94$
Гипотоническая среда	$30,04\pm 0,28^*$	$60,77\pm 0,57^*$	$80,45\pm 0,62^*$	0,30 [#]	$141,22\pm 0,80^*$
Гипертоническая среда	$49,90\pm 0,47^*$	$120,10\pm 0,25^*$	$114,58\pm 0,30^*$	0,81 ^{**}	$234,68\pm 0,38^*$

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической ($m < 0,000$).

Плазмоциты *B. orientalis* на сканах выглядят плоскими, профиль клеток этого типа имеет возвышение в области ядра (рис. 69). Высота гемоцитов едва достигает 1 μm . В периферической части клетки отмечали наличие выпячиваний гранул и вакуолей. Микрорельеф поверхности однообразный с преобладанием невысоких волнообразных и гребневидных возвышений (табл. 63). Глубокие понижения профиля отсутствуют.

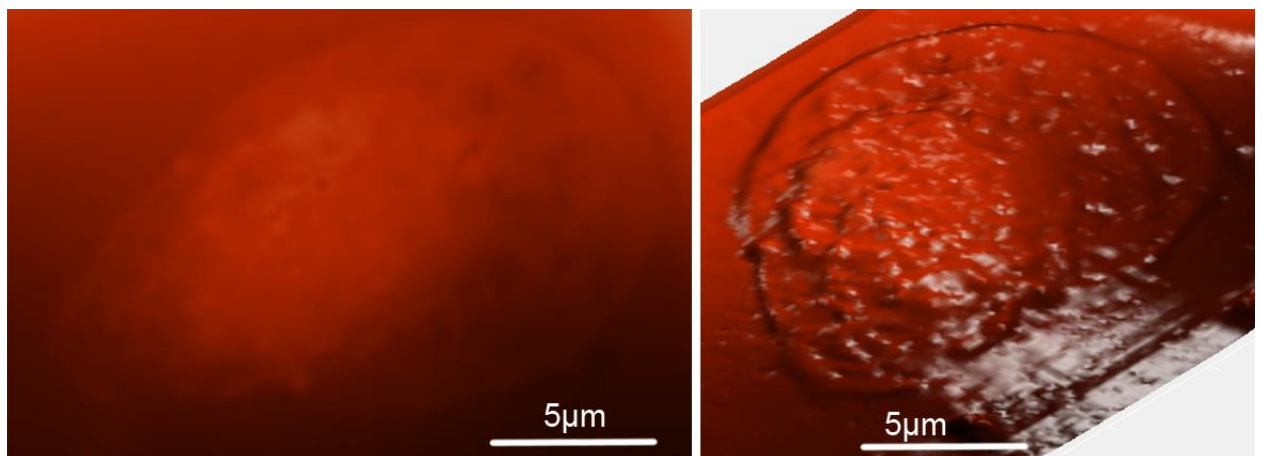


Рисунок 69–2D и 3D-изображение топографии поверхности плазмоцитов *B. orientalis* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Гипотонические условия способствуют распластыванию клеток до такой степени, что их высота не превышает 0,8 μm , в то время как диаметр увеличивается на 17-19%. Клетки распластываются неравномерно, форма их далека от округлой – зачастую изменениям может подвергаться край, противоположный ядру. В условиях повышенной осмолярности плазмоциты приобретают угловатые очертания, гребни микрорельефа становятся более острыми, амплитуда изгибов волнообразных выступов возрастала. Толщина возмущенного слоя достигает $567,37 \pm 1,50 \text{nm}$.

Таблица 63 – Показатели шероховатости поверхности плазмоцитов *B. orientalis* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, $1/\mu\text{m}^2$	Sz, nm
Изотоническая среда	49,79 \pm 0,49	416,40 \pm 1,33	82,12 \pm 0,61	0,63 [#]	498,52 \pm 1,46
Гипотоническая среда	39,42 \pm 0,50*	192,30 \pm 0,93*	65,23 \pm 0,39*	0,52* [#]	257,53 \pm 1,09
Гипертоническая среда	68,25 \pm 0,54*	482,68 \pm 1,44*	84,70 \pm 0,38*	0,63 [#]	567,37 \pm 1,50

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

Микрорельеф гранулоцитов *B. orientalis* мелкозернистый с сочетанием неглубоких извилистых борозд ($Sv = 124,36 \pm 0,45 \text{nm}$). Значительные перепады профиля по высоте отсутствуют. Величина Sku находится в пределах от 1,98 до 2,14. Гранулы этого типа клеток располагаются плотно, глубокие впадины между ними не были замечены (рис. 70). В гипотонической среде показатели микрорельефа не менялись значительно и общий профиль гемоцитов сохранялся.

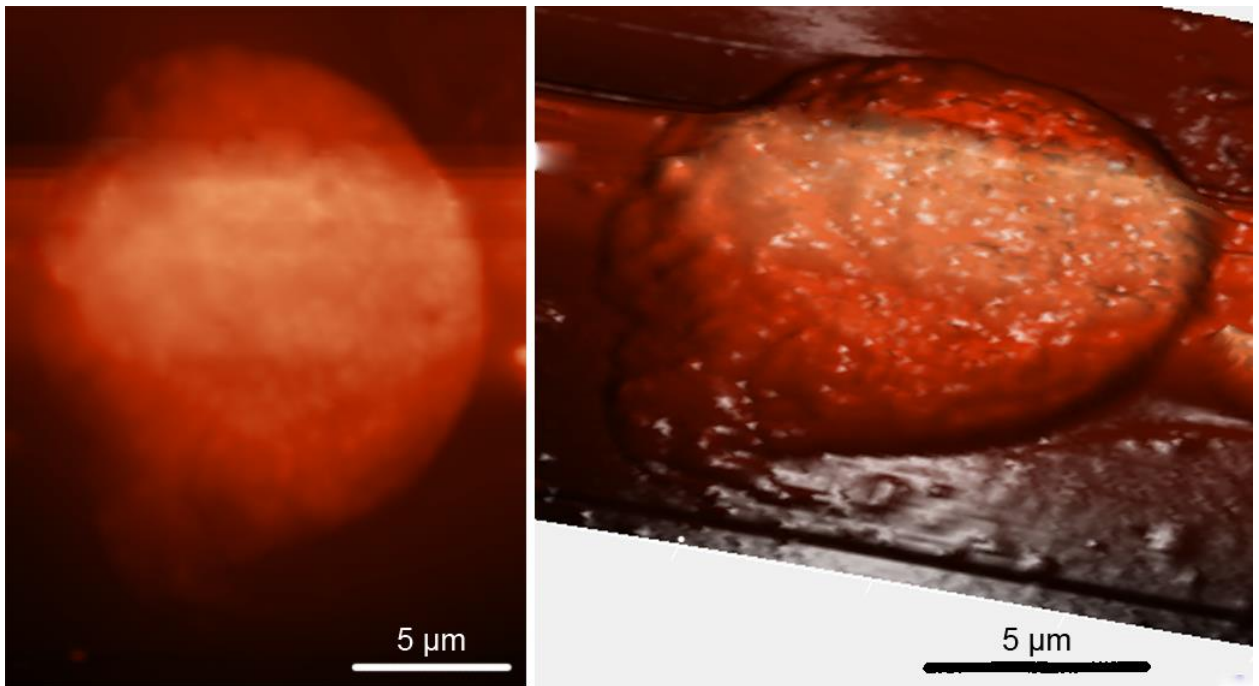


Рисунок 70 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности гранулоцитов *B. orientalis* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Гранулоциты (как и предыдущие 2 типа клеток) *B. orientalis* характеризуются невысокими значениями показателей шероховатости. Параметр $Sq_{не}$ превышает 60 даже после инкубации в гипертонической среде. Возрастание количества неровностей микрорельефа не сопровождается увеличением их высоты (табл.64).

Таблица 64 – Показатели шероховатости поверхности гранулоцитов *B. orientalis* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/µm ²	Sz, nm
Изотоническая среда	44,68±0,50	140,41±0,76	124,36±0,45	0,68 [#]	264,77±0,80
Гипотоническая среда	38,80±0,39*	68,37±0,68*	97,97±0,60*	0,50**	166,34±0,90*
Гипертоническая среда	57,52±0,57*	141,60±0,30	130,64±0,53*	0,74**	272,23±0,63*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической ($m < 0,000$).

Внутриклеточные включения способствуют наличию мелких полусферических и холмообразных возвышений на поверхности веретеновидных плазмоцитов (рис. 71). По краю клеток возвышаются гребни и единичные бугорки, перепады высот между центральной частью и

возвышениями периферии усиливаются в гипертонических условиях (табл. 65).

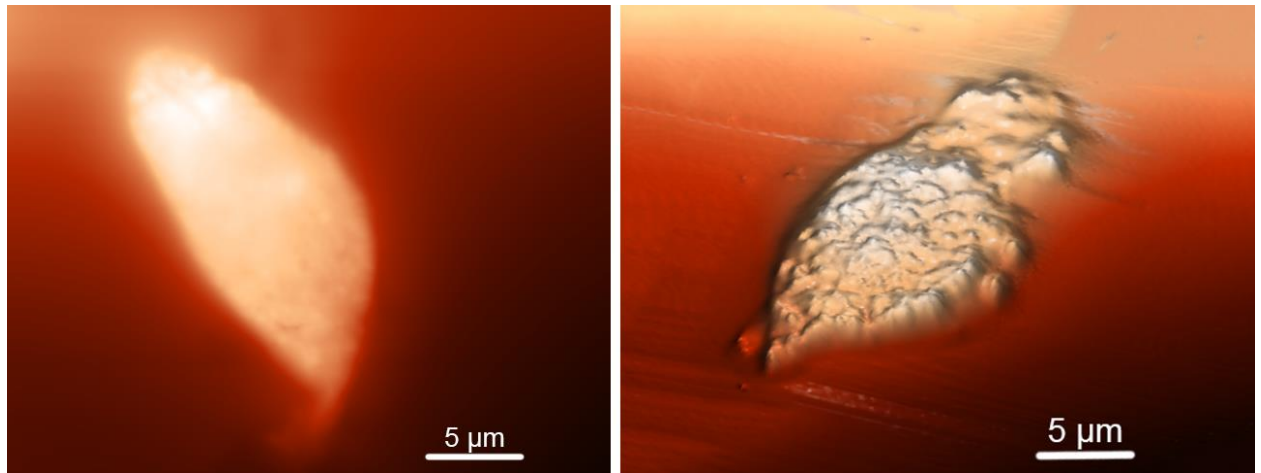


Рисунок 71 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности веретеновидных плазмоцитов *B. orientalis* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Инкубация в гипотонической среде способствует выравниванию профиля клеток. Значения Sq и Sz снижаются до $40,57 \pm 0,40$ и $326,76 \pm 0,88 \mu\text{m}$ соответственно. Количество структур микрорельефа на единице площади уменьшается до 1,3.

Таблица 65 – Показатели шероховатости поверхности веретеновидных плазмоцитов *B. orientalis* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	$Sds, 1/\mu\text{m}^2$	Sz, nm
Изотоническая среда	$52,64 \pm 0,64$	$291,13 \pm 0,74$	$61,72 \pm 0,43$	1,7 [#]	$352,85 \pm 0,86$
Гипотоническая среда	$40,57 \pm 0,40^*$	$272,97 \pm 0,66^*$	$53,79 \pm 0,48^*$	1,3 ^{**}	$326,76 \pm 0,88^*$
Гипертоническая среда	$55,35 \pm 0,47^*$	$292,37 \pm 0,40$	$84,45 \pm 0,45^*$	1,7 [#]	$376,82 \pm 0,61^*$

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

Коэффициент шероховатости прогемоцитов *B. germanica* низок (табл. 66), что визуально заметно по профилю клеток – отсутствуют значительные перепады высот.

Поверхность прогемоцитов практически гладкая, отличается однородностью. В центральной части отмечено углубление до 100nm ,

которое соответствует положению ядра (рис. 72). По периферии едва заметны микровозвышения и микровпадины ($87,78 \pm 0,28$ nm и $98,05 \pm 0,60$ nm). В гипотонической среде этот перепад высот исчезает.

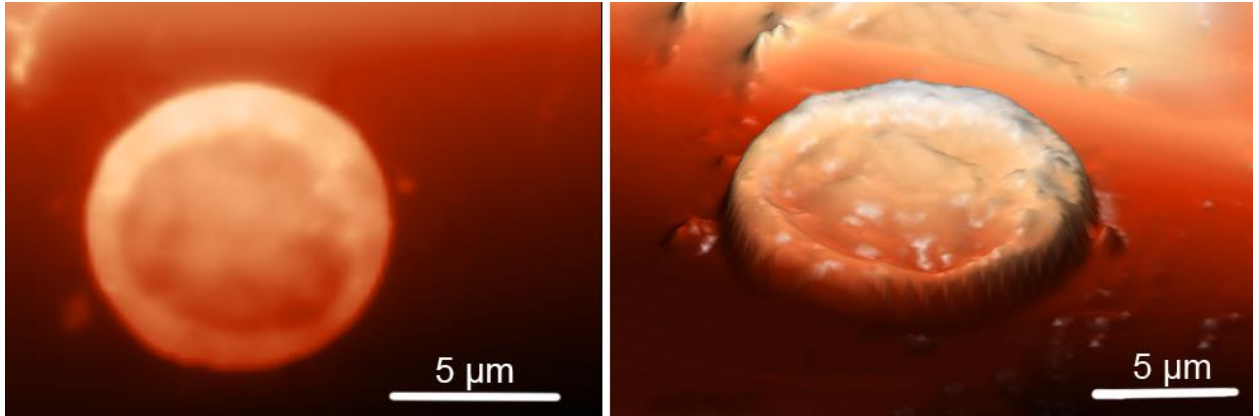


Рисунок 72 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности прогемоцитов *B. germanica* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Области ядра и периферии слабо дифференцируются. Инкубация в гипертонической среде приводит к незначительному уменьшению диаметра гемоцитов. На изменение микрорельефа поверхности осмотическое давление среды достоверно значимого влияния не оказывает (табл.66).

Таблица 66 – Показатели шероховатости поверхности прогемоцитов *B. germanica* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, $1/\mu\text{m}^2$	Sz, nm
Изотоническая среда	$32,48 \pm 0,52$	$87,78 \pm 0,28$	$98,05 \pm 0,60$	0,28#	$185,83 \pm 0,67$
Гипотоническая среда	$27,53 \pm 0,50^*$	$85,05 \pm 0,25^*$	$55,57 \pm 0,83^*$	0,20*#	$140,62 \pm 0,81^*$
Гипертоническая среда	$34,62 \pm 0,42^*$	$88,32 \pm 0,37$	$98,28 \pm 0,43$	0,28#	$186,60 \pm 0,55$

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

Микрорельеф вблизи активного края плазмоцитов *B. germanica* имеет небольшое количество тяжей, вытянутых цилиндрических образований. Направление текстуры этой части гемоцита проходит по направлению формирования псевдоподиального образования (рис. 73). В средней части плазмоцитов микрорельеф представлен цилиндрическими структурами и

гребнями, длиной 0,4-0,7 μm . Поверхность неактивного края образует большое количество одиночных глобулярных выпячиваний.

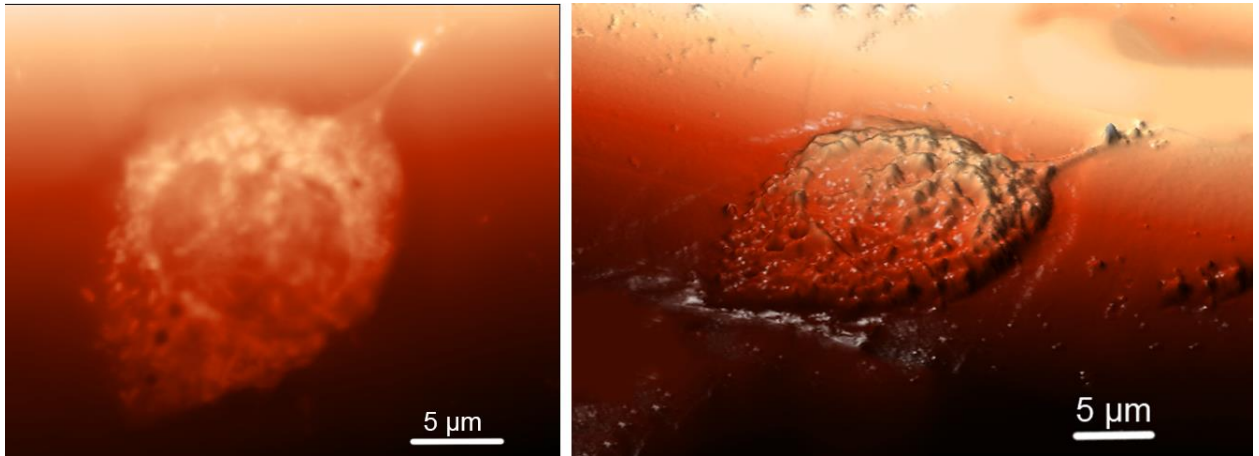


Рисунок 73 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности плазмоцитов *B. germanica* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

В гипертонической среде возрастают параметры S_{ds} и S_z (табл.67), что ведет к увеличению общего коэффициента шероховатости. Гипотонические условия способствуют значительному уменьшению возмущенного слоя, также снижается высота клетки за счет распластывания. Микрорельеф характеризуется наличием только плавных волнообразных возвышений. Глубина впадин уменьшается с $329,00 \pm 1,25$ до $111,86 \pm 0,66 \text{ nm}$.

Таблица 67 – Показатели шероховатости поверхности плазмоцитов *B. germanica* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	S_q	$S_p, \text{ nm}$	$S_v, \text{ nm}$	$S_{ds}, 1/\mu\text{m}^2$	$S_z, \text{ nm}$
Изотоническая среда	$70,63 \pm 0,40$	$203,56 \pm 0,50$	$296,57 \pm 0,66$	1,20 [#]	$500,13 \pm 0,76$
Гипотоническая среда	$83,51 \pm 0,49^*$	$185,13 \pm 0,52^*$	$111,86 \pm 0,80^*$	1,00 ^{*#}	$296,99 \pm 0,98^*$
Гипертоническая среда	$51,49 \pm 0,6^*$	$248,92 \pm 0,71^*$	$329,00 \pm 1,25^*$	1,45 ^{*#}	$577,92 \pm 1,56^*$

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

Цитоплазматические гранулы гранулоцитов *B. germanica* мелкие, разбросаны хаотично. В зоне над ядром их меньше, чем в периферической части клетки, и гранулы располагаются здесь в виде небольших скоплений. Нуклеарная область имеет углубление, особенно глубоким является край

этой зоны, проходящий по контуру ядра (рис. 74). Значение S_p здесь достигает 176-190 nm (табл.68).

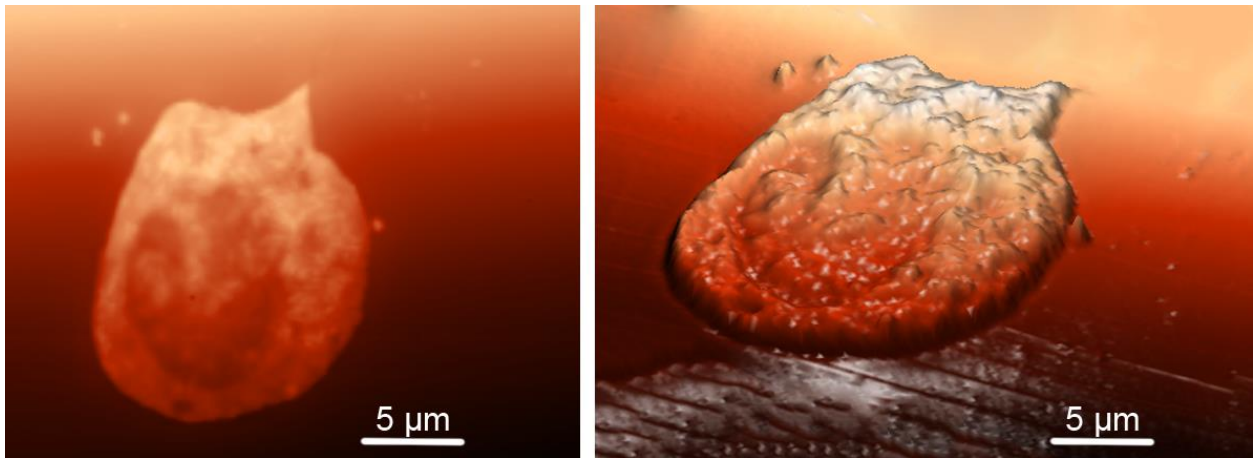


Рисунок 74 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности гранулоцитов *B. germanica* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

В гипотонических условиях гранулы равномерно распределяются по всей цитоплазме, плотность их расположения сокращается. Включения собраны в группы, реже встречаются поодиночке. Гипертоническая среда способствует возникновению множества складок и впадин. Борозда вокруг ядра становится более глубокой (≈ 235 nm), псевдоподии утончаются и принимают вид игл. В гипотонической же среде клетка равномерно расплывается без образования псевдоподиальных выростов. Изредка отмечено наличие широких лобоподий.

Таблица 68 – Показатели шероховатости поверхности гранулоцитов *B. germanica* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	S_q	S_p , nm	S_v , nm	S_{ds} , $1/\mu m^2$	S_z , nm
Изотоническая среда	$78,27 \pm 0,61$	$505,06 \pm 0,81$	$96,50 \pm 0,41$	$1,44^{\#}$	$601,56 \pm 0,89$
Гипотоническая среда	$56,68 \pm 0,43^*$	$421,49 \pm 1,00^*$	$70,32 \pm 0,41^*$	$1,10^{*\#}$	$491,80 \pm 1,19^*$
Гипертоническая среда	$105,65 \pm 0,63^*$	$512,46 \pm 0,86^*$	$200,53 \pm 0,51^*$	$1,62^{*\#}$	$712,99 \pm 0,93^*$

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической (m) $< 0,000$.

Коагулоциты *B. germanica* – крупные гемоциты дисковидной формы, контур ядра отчетливо выражен. Уровень нуклеарной зоны всегда расположен ниже остальной части клетки, кроме того здесь отмечены глубокие понижения профиля. В микрорельефе преобладают крупные холмообразные и мелкозернистые образования (рис. 75).

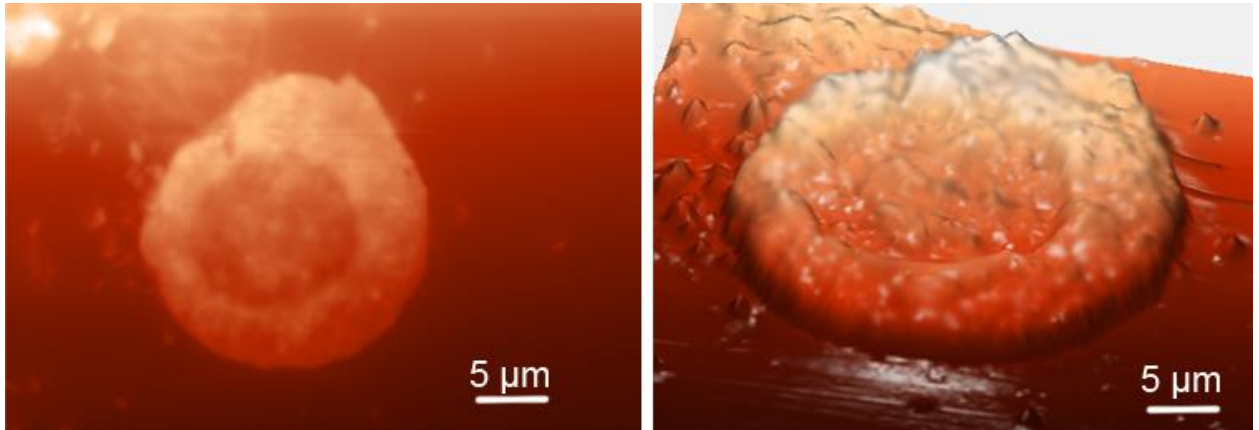


Рисунок 75 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности коагулоцитов *B. germanica* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Гипертоническая среда способствует уменьшению значения S_{sk} до $-0,82$ (табл.69). Глубина борозд увеличивается на 12%. Микрорельеф складывается из дискретных одиночных возвышений мембраны. В гипотонических условиях происходит снижение величины средней квадратической шероховатости. Толщина возмущенного слоя сокращается на 27%, перепад высот между нуклеарной и периферической частями клетки уменьшается.

Таблица 69 – Показатели шероховатости поверхности коагулоцитов *B. germanica* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, $1/\mu\text{m}^2$	Sz, nm
Изотоническая среда	100,03±0,87	426,08±0,96	268,78±0,81	0,96 [#]	694,86±1,18
Гипотоническая среда	81,18±0,59*	310,94±0,82*	196,34±0,55*	0,74**	507,27±1,07*
Гипертоническая среда	139,44±0,73*	430,86±0,99*	300,45±0,82*	1,12**	731,30±1,30*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; # – ошибка средней арифметической ($m < 0,000$).

Микрорельеф эритроцитов *B. germanica* отличается наличием редких глубоких впадин мембраны на периферии, что подтверждается отрицательным значением эксцесса (-0,84) (табл. 70). Поверхность покрыта часто встречающимися продолговатыми гребневидными образованиями высотой не более 80 нм (рис.76). Гипертоническая среда не способствует увеличению их количества или изменению высоты.

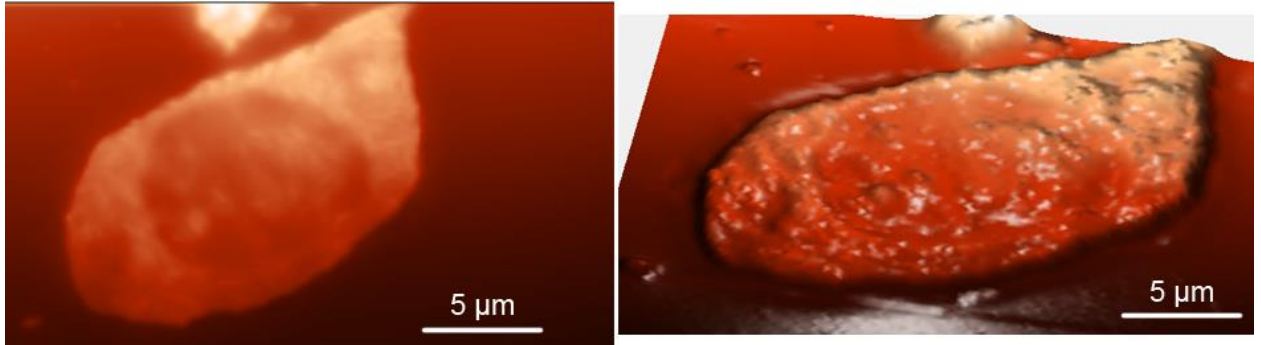


Рисунок 76 – 2D и 3D-изображение топографии поверхности эритроцитов *B. germanica* (СЗМ «ИНТЕГРА Вита», НТ-МДТ, Россия)

Таблица 70 – Показатели шероховатости поверхности эритроцитов *B. germanica* в условиях осмотической нагрузки

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/μm ²	Sz, nm
Изотоническая среда	102,42±1,0	234,51±1,2	129,32±1,5	0,70 [#]	363,83±1,6
Гипотоническая среда	91,33±0,7*	220,13±0,9*	92,61±0,8*	0,70 [#]	312,74±2,1*
Гипертоническая среда	104,13±0,9*	237,15±1,7*	134,43±1,2*	0,71 [#]	373,58±1,7*

* – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ($p < 0,01$), достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента; [#] – ошибка средней арифметической ($m < 0,000$).

В условиях гипоосмотической нагрузки величина средней квадратической шероховатости снижается за счет уменьшения глубины впадин. Параметр Sds остается без изменений.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Представители членистоногих в целом являются филогенетически наиболее продвинутой группой беспозвоночных животных. Ранние исследования клеток гемолимфы членистоногих показали широкий спектр подходов к их классификации. Среди членистоногих наиболее полно изучены гемоциты насекомых. Исследование гемолимфы представителей отряда Dictyoptera позволило идентифицировать восемь типов клеток.

Наибольшим разнообразием гемоцитарных типов обладают представители семейства Blaberidae. В гемолимфе *G. portentosa* обнаружены все восемь разновидностей форменных элементов, а также их переходные формы. Во внутренней среде тараканов из семейства Blattidae отсутствуют энцитойды.

Особи *B. orientalis* характеризуются минимальным набором гемоцитарных типов – в их гемолимфе присутствует только четыре типа клеток, сферулоциты, коагулоциты и энцитойды не обнаружены.

У *B. germanica* исследовано пять типов гемоцитов: прогемоциты, плазмоциты, гранулоциты, коагулоциты и энцитойды. Веретеновидные плазмоциты не обнаружены даже после повторных отборов гемолимфы.

Среди представителей *N. cinerea*, *B. craniifer*, *G. portentosa* изучены как взрослые, так и личиночные формы. На стадии личинки прогемоциты обнаружены у каждого насекомого, в то время как у подросших особей этот тип форменных элементов присутствует не всегда и появляется после многократного взятия гемолимфы у одной и той же особи, или же после линьки, в случае с *N. cinerea* и *B. craniifer*. Прогемоциты *B. orientalis* характеризуются наименьшим диаметром – 5,5 μm . Самыми крупными являются прогемоциты *B. craniifer* – их диаметр может достигать 8 μm .

В целом, максимальные линейные размеры клеток присущи представителям семейства Blaberidae. Самые мелкие форменные элементы характерны для *B. orientalis*. Единственным типом гемоцитов, который

существенно превосходит по величине соответствующие клетки других насекомых, являются веретеновидные плазмоциты: их размер по длинной оси у *B. orientalis* может превышать 20 μm .

Линейные размеры плазмоцитов внутри изученной группы насекомых не имеют достоверных отличий. Тем не менее, существенная разница наблюдается в способности к максимальному распластыванию, а также в скорости этого процесса. Клетки представителей группы Blattidae дольше сохраняют компактную форму в физиологически нормальных условиях. Плазмоцит Blaberidae способен «захватить» участок диаметром 30-35 μm в течение 10 минут инкубации (рис. 77).

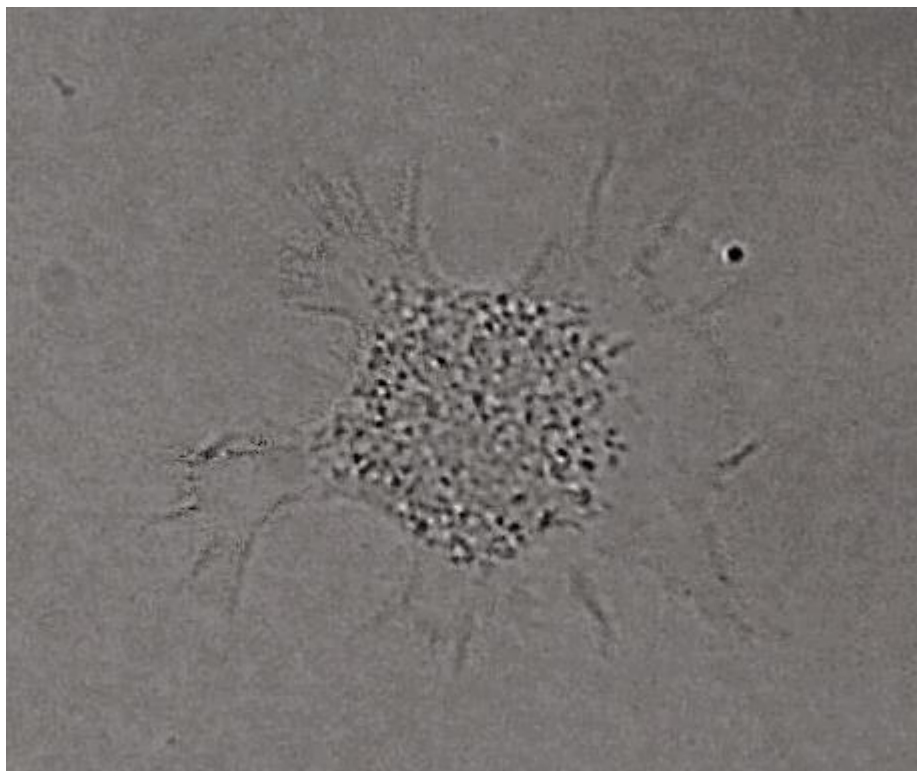


Рисунок 77 – Плазмоцит *G. portentosa* спустя 10 минут после начала инкубации в изотоническом растворе.

Равную по величине площадь плазмоциты *S. tartara* и *P. americana* могут занять только по истечении 25-30 минут (рис. 78). Подобная реакция отмечена и у плазмоцитов *B. germanica*.

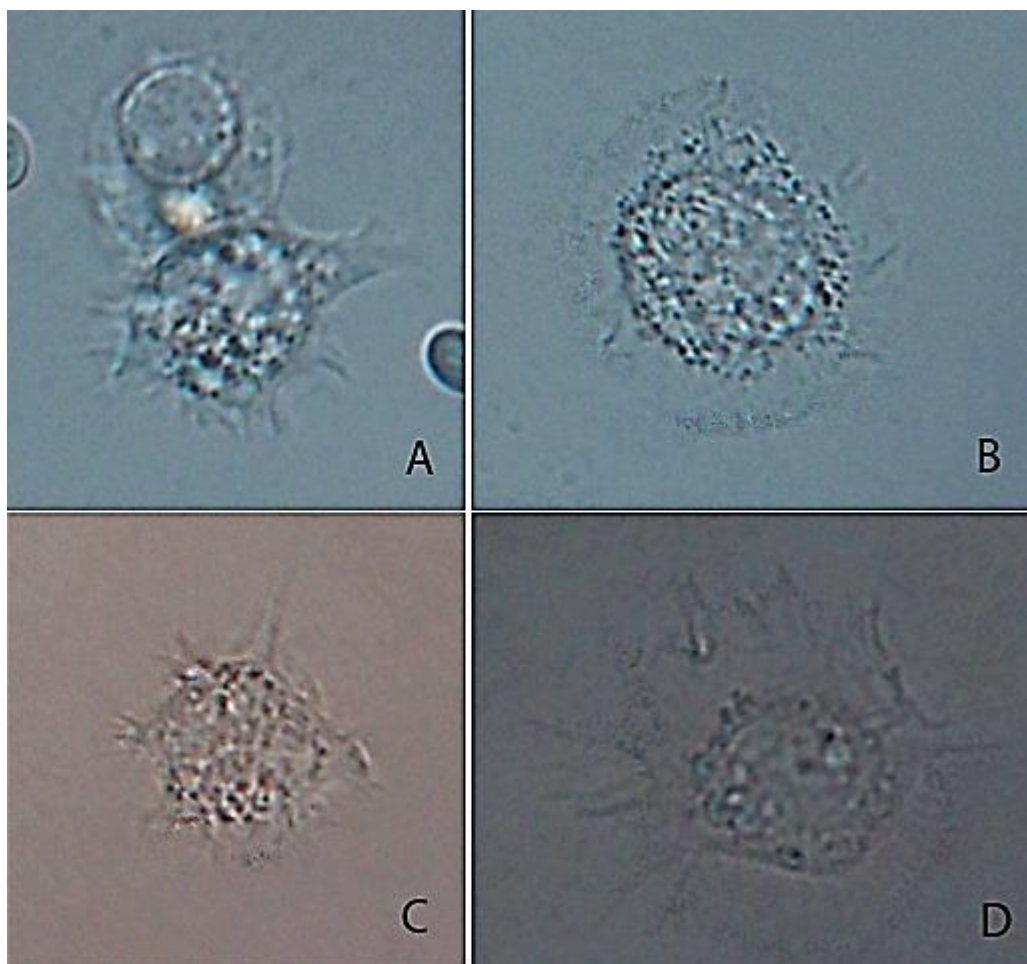


Рисунок 78 – Плазмоциты *S. tartara* и *P. americana* на 10-й (А и С соответственно) и 30-й минутах (В и D) после начала инкубации в изотоническом растворе

Размеры гранулоцитов незначительно отличаются внутри отряда и варьируют в пределах – от 7 до 9,5 μm . Данный тип форменных элементов является преобладающим у *S. tartara* и *P. americana*. У других видов плазмоциты превосходят по численности все остальные клетки. Фагоцитарная активность этих клеточных типов существенно снижается в гипо- и гипертонической средах. В условиях пониженного осмотического давления у 90-100% гемоцитов отсутствуют псевдоподии, клетки остаются неподвижными. При инкубации в гипертоническом растворе фагоциты значительно уменьшаются в размере, что затрудняет возможность захвата клетки *S. cerevisiae*.

Обнаруженные у *B. craniifer*, *S. tartara*, *P. americana*, *G. portentosa* крупные гранулярные клетки, диаметр которых может достигать 20 μm , возможно являются молодой формой сферулоцитов. Данные гемоциты

способны формировать псевдоподии, и, вероятно, берут начало от гранулоцитов. Последние, постепенно теряя способность к образованию псевдоподий, накапливают в цитоплазме все большее количество плотно расположенных гранул, достигающих 1,5 μm в диаметре. У некоторых особей в гемолимфе обнаружены именно переходные формы клеток (рис. 79). Их цитоплазма отличается содержанием более крупных гранул, чем в гранулоцитах, однако их диаметр не превышает 0,85 μm . Кроме того, на поверхности этих клеток возникают немногочисленные короткие ризоподии.

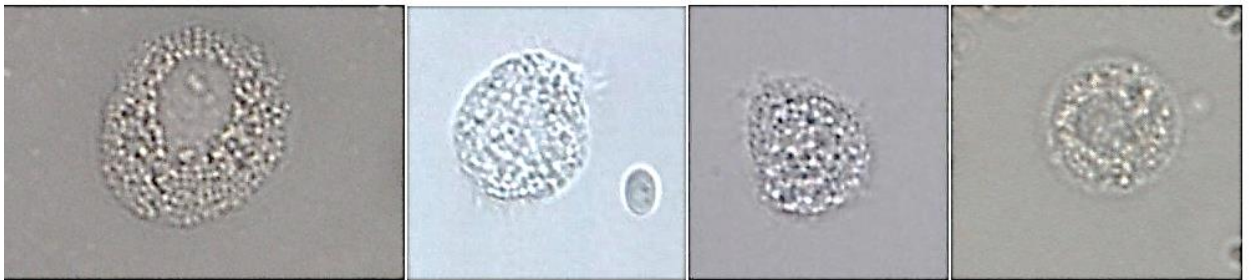


Рисунок 79 – Молодая форма сферулоцитов *B. craniifer*, *S. tartara*, *P. americana*, *G. portentosa*

У *G. portentosa* можно четко проследить стадии формирования сферулоцитов от прогемоцитов путем накопления гранул, постепенно увеличивающихся в размере (рис. 80).

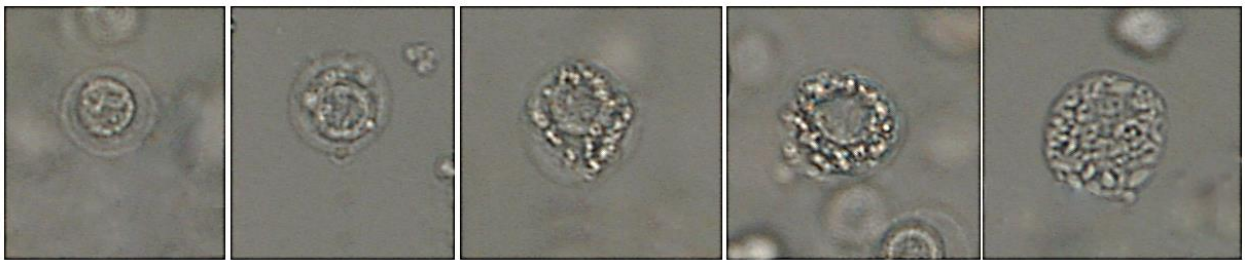


Рисунок 80 – Этапы превращения прогемоцита *G. portentosa* в сферулоцит

Самые большие сферулоциты принадлежат *G. portentosa* и *B. craniifer*. Данный тип гемоцитов *G. portentosa* и *N. cinerea* характеризуется большим разнообразием форм как самих клеток: от круглой до веретеновидной, так и гранул: они могут быть круглыми, овальными или палочковидными (рис. 81). Величина сферулоцитов также варьирует: от 9 до 16 μm в диаметре. При этом в размере внутриклеточных включений мелкие клетки не уступают

более крупным. Плотность расположения гранул в клетках *P. americana* и *S. tartara* меньше, чем у остальных видов насекомых.



Рисунок 81 – Многообразие форм сферулоцитов и их гранул

На рисунке 82 представлены стадии формирования сферулоцитов из гранулоцитов. На начальных этапах гранулы заполняют цитоплазму полностью. Диаметр включений не превышает $0,2 \mu\text{m}$, на сканах едва заметны контуры крупного ядра. Клетки сохраняют способность к незначительному распластыванию и формированию 1-2 крупных ламеллоподий в сочетании с короткими филоподиями.

В дальнейшем гемоциты увеличиваются в размере, часть из них приобретает овальную форму, иногда приближающуюся к веретеновидной, остальные клетки сохраняют сферическую форму. Ядро принимает исключительно центральное положение после потери способности сферулоцитов к активному передвижению. Включения становятся больше в диаметре, который может достигать $1,7 \mu\text{m}$. В зрелых сферулоцитах гранулы теперь занимают только область вокруг ядра – как видно на сканах (рис. 82), включения над ядром отсутствуют.

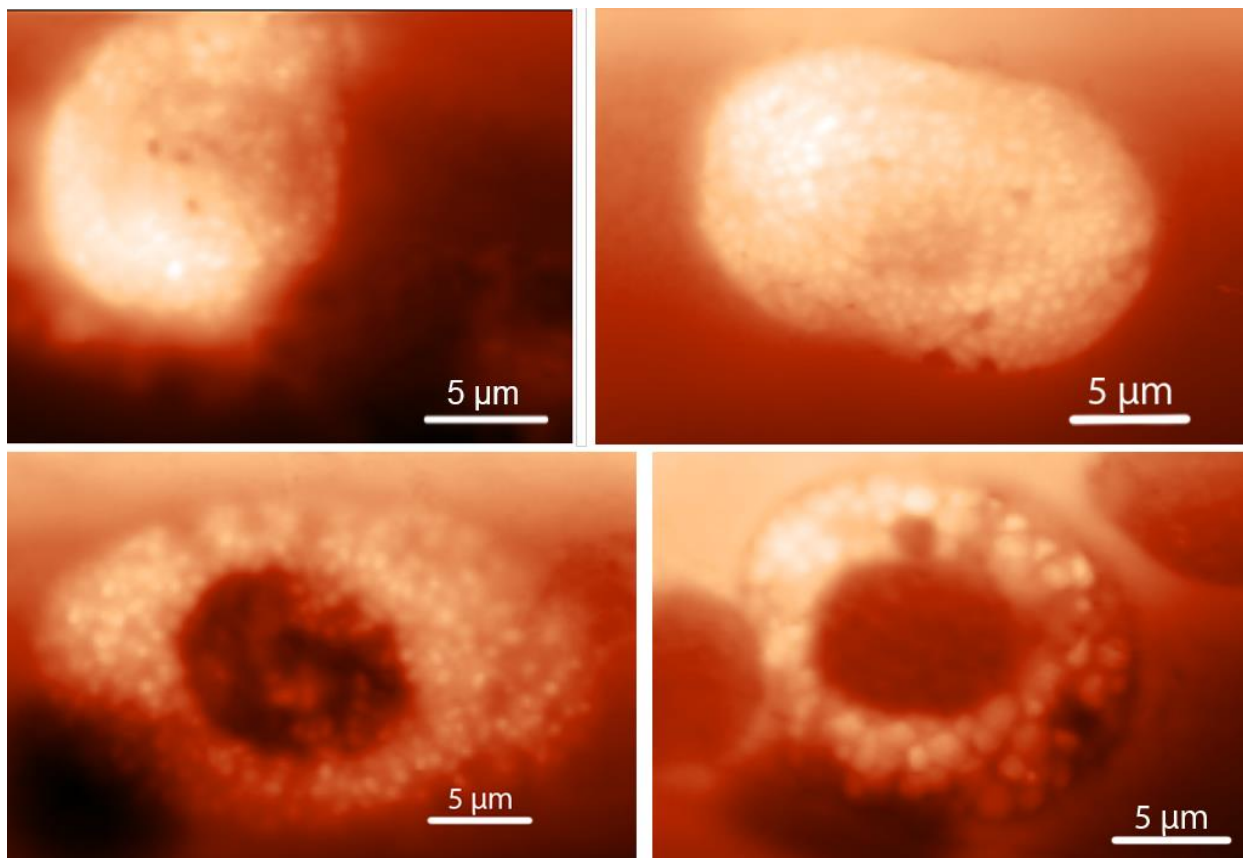


Рисунок 82 – Этапы заполнения цитоплазмы гранулами и характер их распределения у сферулоцитов

Веретеновидные плазмоциты не являются постоянным элементом в гемоцитарном ряду исследуемых насекомых. У некоторых особей они появляются лишь после повторного отбора гемолимфы. Длина клеток колеблется от 12 до 23 μm . Соотношение размера тела и отростков вермицита может варьировать. В случае, когда данный тип гемоцитов исследуется при повторном взятии пробы, длина и ширина клеток близки к минимальным (12 и 2,5 μm соответственно). Тело гемоцита слабо выражено: клетки имеют сильно вытянутую форму. Спустя несколько дней вермициты, полученные от этой же особи становятся крупнее, тело выглядит оформленным, и его диаметр уже достигает 4-5 μm (рис. 83).

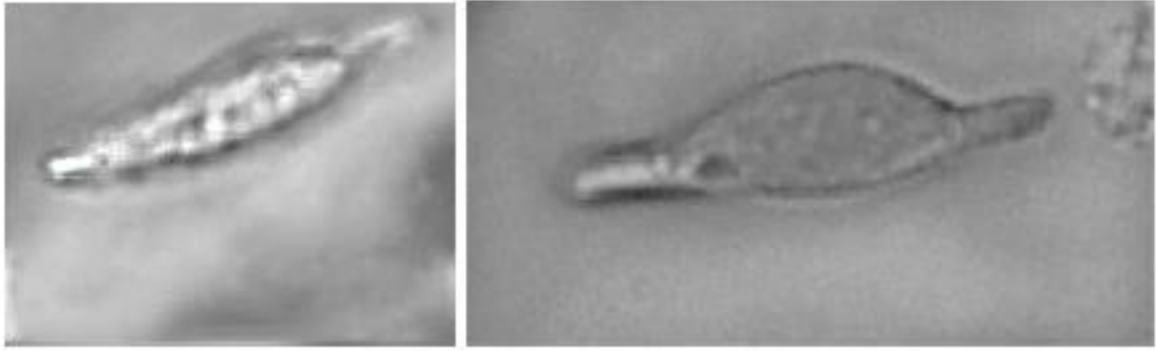


Рисунок 83 – Вермициты: молодая и зрелая клетка

Наименьший объем (около $98,8 \mu\text{m}^3$) имеют коагулоциты у *P. americana*. Клетки, отличающиеся наибольшим объемом, были обнаружены в гемолимфе *B. craniifer* ($\approx 115,6 \mu\text{m}^3$) и *G. portentosa* ($\approx 114,7 \mu\text{m}^3$). Коагулоциты *B. germanica* характеризуются наличием сравнительно небольшого ядра, диаметр которого не превышает $3,5 \mu\text{m}$ (диаметр ядра у прочих видов $4,3-5 \mu\text{m}$).

Линейные и объемные показатели энцитойдов не имеют существенных отличий среди исследованных видов. Максимальная доля коагулоцитов и энцитойдов характерна для гемоцитарной формулы *B. germanica*. В гемолимфе представителей семейства Blattidae энцитойды отсутствуют.

Серповидные энцитойды, характерные исключительно для *G. portentosa*, составляют около 14% от всех гемоцитов. В зарубежной литературе (Gupta A.P., 1985b) эти клетки описаны как один из видов энцитойдов с огромным серповидным включением, занимающим практически всю клетку. Данное включение имеет плотную структуру, края гладкие (рис. 84, А). Нами отмечено отделение округлого образования с филоподиями (рис. 84, В), после чего происходит замыкание концов оставшегося плотного элемента.



Рисунок 84 – Этапы трансформации серповидных энцитоеидов. 1) начало и 2) завершение разделения гемоцита на серповидное тело (А) и структуру с филоподиями (В) 3) смыкание концов серповидного образования (А).

Среди прогемоцитов наибольшие изменения объемных показателей претерпевают клетки *N. cinerea*. В гипертонической среде объем гемоцитов уменьшается на 12-15%, в то время как у прогемоцитов остальных видов это изменение не превышает 7%. Подобную реакцию демонстрируют и клетки *B. orientalis* – в среде с повышенным осмотическим давлением объем прогемоцитов уменьшается на 11%, однако в гипотонических условиях их размер остается прежним. Мембранный резерв данного типа клеток у *N. cinerea* максимален и составляет в среднем 14%, при общем увеличении размеров гемоцитов величина ядер остается постоянной.

Рекордсменами в отношении использования мембранного резерва не только среди плазмоцитов, но и всех форменных элементов гемолимфы, являются плазмоциты *N. cinerea*. Величина MR составляет $\approx 50\%$. Минимальное использование мембранного резерва демонстрируют плазмоциты *B. germanica* и *S. tartara*, в гипертонической среде эти клетки уменьшаются в объеме на 13% и 16,6% соответственно. Самыми устойчивыми к воздействию повышенной солености оказались плазмоциты *P. americana*. Данный тип гемоцитов *B. orientalis* имеет мембранный резерв,

равный 18%, однако значительная часть клеток после увеличения объема не выдерживает гипоосмотической нагрузки и разрушается.

Среди гранулоцитов клетки *S. tartara* отличаются наибольшим мембранным резервом (27,4%), а также значительным уменьшением объема (на 27%) в гипертонических условиях. Подобное снижение данного параметра в условиях с повышенным осмотическим давлением характерно и для клеток *N. cinerea* и *G. portentosa*. У *B. orientalis* гранулоциты практически не изменяются в объеме.

За значительным изменением объема клеток *S. tartara* и *B. germanica* следует существенное идентичное изменение диаметра ядер (на 12-20%). Время расплывания гранулоцитов в гипотонических условиях сокращается до 10-15 минут. Для данного типа гемоцитов в гипертонической среде свойственно сохранение способности формировать псевдоподии, однако их длина уменьшается, и снижается активность клеток. «Раздувание» гранулоцитов в условиях с пониженным осмотическим давлением может приводить к полному разглаживанию поверхности. Выросты мембраны отмечаются только у гемоцитов *G. portentosa* и *B. craniifer*. В гемолимфе последних переходная форма клеток от гранулоцитов к сферулоцитам в меньшей степени претерпевает влияние среды на объем, однако эти гемоциты теряют псевдоподии и становятся неподвижными.

Для веретеновидных плазмоцитов (вермицитов) свойственно увеличение размеров по короткой оси при инкубации в гипотонических условиях. На данный тип гемоцитов *B. orientalis* осмотическое давление среды оказывает наименьшее влияние. Самые высокие значения мембранного резерва веретеновидных плазмоцитов отмечены у *N. cinerea* (17-18%).

Наибольшим мембранным резервом ($12,77 \pm 0,09\%$) среди сферулоцитов характеризуются клетки *N. cinerea*, но они демонстрируют низкую устойчивость к среде с пониженным осмотическим давлением. Кроме того у сферулоцитов данного вида в условиях гипертонии объем становится

минимальным. Гемоциты *B. craniifer* и *P. americana* не претерпевают морфологических изменений при различных условиях инкубации. Мембранный резерв сферулоцитов у остальных тараканов не превышает 10%, а также они более устойчивы к условиям с повышенным осмотическим давлением.

Исследование коагулоцитов показывает, что клеткам *N. cinerea* свойственно максимальное увеличение в объёме при действии гипоосмотической нагрузки. Соответственно для них характерен и наибольший мембранный резерв ($=20,44 \pm 0,04\%$). Однако, аналогично сферулоцитам, многие коагулоциты после сильного разбухания разрушаются. К значительному уменьшению объёма коагулоцитов *G. portentosa* – на 16,8%, приводит действие гипертонической среды. У данного типа форменных элементов гемолимфы прочих видов этот параметр изменяется не более, чем на 10%.

Эноцитоиды, в том числе серповидные эноцитоиды *G. portentosa*, не подвергаются существенным изменениям в отношении линейных параметров и формы в условиях осмотической нагрузки.

У гранулоцитов и плазмоцитов в гипотонической среде отмечено увеличение скорости распластывания и изменение его характера. Прикрепление клетки к субстрату, принятие характерной для данного типа клеток формы, а также локомоция могут определяться несколькими элементарными клеточными реакциями (морфогенетически): реакцией активного прикрепления, контактным торможением и реакцией стабилизации поверхности (Vasiliev J.M., Gelfand I.M., 1976). Объекты, которые вследствие больших размеров не могут быть фагоцитированы, окружаются плазмоцитами, вермицитами или/и гранулоцитами и инкапсулируются. Реакции инкапсуляции и фагоцитоза фундаментально сходны: распластывание клеток при инкапсуляции можно представить как попытку поглощения слишком крупного объекта (Dybas L., Fankboner P.V., 1986).

Ранее петалоидная (с лепестковыми образованиями), ламеллярная и филоподиальная формы рассматривались как разные клеточные типы, однако после исследования Эддса (DeRosier D.J., Edds K.T., 1980; Edds K.T., 1977, 1993) стало известно, что морфологическая трансформация одной формы клеток в другую обусловлена перестройками цитоскелета (контактно-зависимая филоподиальная трансформация после прикрепления к субстрату). Нами отмечено, что в период распластывания в гипертонической среде плазмоциты приобретают ламеллярно-филоподиальную форму, на периферии клетки появляются длинные тонкие ветвящиеся филоподии. У гемоцитов, прикрепленных ко дну чашек, в гипотонических условиях возникает ореол в виде кругового распластанного по субстрату ободка (ламеллы), который через 10-15 минут достигает максимального диаметра. К этому времени почти вся цитоплазма с гранулами оказывается в данном ободке; становится заметным ядро, скрытое в интактной клетке включениями. Сетчатые цитоплазматические тяжи лежащих рядом гемоцитов, объединяются в общую массу. Агрегацию и распластывание гемоцитов по субстрату можно рассматривать как контактную активацию с преобладанием контактов клетка-клетка или клетка-субстрат и проявление *in vitro* защитных клеточных реакций в условиях, имитирующих повреждение организма (Gotz P., 1986).

В случае коагулоцитов при распластывании в гипотонической среде формируется широкий обод ламеллоплазмы, причём внутриклеточные гранулы остаются вокруг ядра, не смещаясь к периферии, но располагаются не плотно друг к другу.

Наиболее активное участие в фагоцитозе принимают гранулоциты, не смотря на численное преимущество плазмоцитов, что соотносится с исследованиями Ribeiro C. (Ribeiro C. et al., 1996). Результаты нашего исследования согласуются с данными Tojo S. и Ribeiro C., которые установили ведущую роль гранулоцитов в поглощении инородных объектов

(Tojo S. et al., 2000; Ribeiro C. et al., 1996). В свою очередь плазмоциты и вермициты являются основными участниками процесса нодуляции.

В ряде научных трудов зарубежными авторами отмечается выполнение фагоцитарной функции энцитоидами (Giulianini P.G. et al., 2003) и коагулоцитами (Brehelin M. et al., 1975), однако у представителей *Ductioptera* подобная особенность данных гемоцитов не зафиксирована.

По данным Пигалевой Т.А. все гемоциты *Hirudo medicinalis* в условиях пониженного осмотического давления демонстрируют снижение двигательной активности и увеличение адгезии клеток к субстрату. У представителей рода *Lumbricus* большие амебоциты в гипотонической среде усиливают двигательную активность, увеличивают скорость формирования филоподий и складок плазматической мембраны. У аннелид и в гипертонических, и в гипотонических условиях происходит увеличение среднего объема клеток, при этом в гипертонической среде чаще происходит снижение двигательной активности клеток, а в гипотонических условиях наряду с увеличением объема клеток также усиливается образование ложноножек и локомоция (Пигалева Т.А., 2015). У изученных же представителей класса *Insecta* мы отметили закономерное увеличение объема клеток, снижение или полное прекращение локомоционной и фагоцитарной активности при инкубации в условиях пониженной осмолярности. Величина фагоцитарного индекса падает в среднем в 10 раз. В гипертонической среде объем всех гемоцитарных типов уменьшается, при этом число псевдоподий у фагоцитирующих элементов возрастает, однако это не ведет к повышению интенсивности фагоцитоза.

Согласно аналогичным исследованиям Кулько С.В. у гемоцитов моллюсков существенных изменений в функциональной активности гемоцитов в условиях осмотической нагрузки (как в гипоосмолярной, так и в гиперосмолярной средах) не выявлено, что свидетельствует о высоком уровне резистентности и способности к сохранению функционального гомеостаза в системе циркуляции моллюсков (Кулько С.В., 2015).

Характеристика совокупности неровностей (т.е. шероховатости) поверхности мембран имеет важное практическое значение, так как позволяет выяснить степень влияния гомогенности и гетерогенности поверхности на осуществление поглощения инородных объектов при фагоцитозе и устойчивость к воздействию осмотической нагрузки (Трасатти С., 1993).

Наиболее гладкой поверхностью характеризуются прогемоциты *B. craniifer*. В гипертонической среде у данного типа гемоцитов *B. orientalis* число элементов микрорельефа и плотность их распределения возрастает более чем в 2 раза. Это сказывается и на среднеквадратичной шероховатости: показатель S_q увеличивается от 36 до 50.

Гипотоническая среда способствует заметному разглаживанию поверхности мембраны прогемоцитов. У *N. cinerea*, *P. americana* толщина возмущенного слоя уменьшается на 12-15%. У остальных видов изменение осмотического давления среды влияет либо на параметры S_p и S_v , либо на S_d , что отражается и на величине среднеквадратичной шероховатости. Прослеживается общая закономерность: с повышением солености среды значения S_q растут, а в гипотонической среде снижаются.

Высокими показателями шероховатости поверхности обладают плазмоциты *N. cinerea* и *P. americana* (S_q находится в диапазоне 110-130), наиболее же гладкая мембрана среди гемоцитов этого типа свойственна *B. craniifer*, *B. orientalis* и *S. tartara* (S_q находится в диапазоне 50-58). То же касается и гранулоцитов – клетки *B. craniifer* и *B. orientalis* демонстрируют наименьшие значения показателя шероховатости S_q , максимум отмечен у *N. cinerea* и *S. tartara*.

Для мембраны плазмоцитов *N. cinerea* характерен максимальный размер возвышений мембраны, минимальный выявлен у *B. germanica*. Глубина впадин на поверхности у клеток *B. orientalis* не более 85nm, тогда как у прочих видов величина данного параметра находится в диапазоне от 110 до 150 nm. Изменения величин перечисленных параметров при

инкубации гемоцитов в различных условиях менее заметны у *B. craniifer* и *B. orientalis*. Плазмоциты *G. portentosa*, *N. cinerea* и *S. tartara* демонстрируют сильную вариабельность параметров шероховатости в различных условиях среды, при этом большее влияние оказывает гипоосмотическая нагрузка. Толщина возмущенного слоя уменьшается на 20-50%, а в гипертонической среде увеличивается не более, чем на 15%. Значительные изменения в плотности распределения элементов микрорельефа у *B. craniifer*, *P. americana* и *S. tartara* вызывает гипертоническая среда: Sds увеличивается на 20%, а в гипотонических условиях изменяется не более, чем на 2-10%. Для гемоцитов *G. portentosa* характерна обратная ситуация – более значимым оказывается влияние гипотонической среды – величина Sds уменьшается на 60%. Плазмоциты *N. cinerea* и *B. orientalis* с одинаковой интенсивностью реагируют как на действие гипоосмотической, так и гиперосмотической нагрузки: Sds изменяется в пределах 10% в обоих случаях.

В гипотонической среде значительнее всего разглаживается поверхность гранулоцитов *P. americana*, *B. germanica*, *N. cinerea*, *S. tartara*, *G. portentosa* и *B. germanica*. У последних Sq увеличивается на 35%, в гипертонических условиях. У остальных видов данный параметр увеличивается не более, чем на 12%.

Микрорельеф гранулоцитов *B. craniifer* приобретает больше неровностей при инкубации в условиях с повышенным осмотическим давлением. На этот параметр первостепенное значение оказывает изменение числа элементов микрорельефа на единице площади: Sds возрастает на 4,3%. В гипотонической среде среднеквадратическая шероховатость практически не меняется.

У гранулоцитов *G. portentosa* в гипертонических условиях происходит увеличение Sds на 3,9 %. В гипотонической среде изменение данного параметра составляет 8% и уменьшение Sq прежде всего связано с уменьшением толщины возмущенного слоя на 21%. Сокращение числа неровностей на единицу поверхности мембраны в условиях пониженной

осмолярности свойственно гранулоцитам *G. portentosa*, *N. cinerea*, *P. americana*, максимальные изменения (34%) демонстрируют клетки *S. tartara*.

Веретеновидные плазмоциты сходным образом реагируют на изменение осмолярности среды, что и обычные плазмоциты. Рекордсменами в степени шероховатости мембраны являются вермициты *N. cinerea*. Значительная толщина возмущенного слоя обуславливает высокие значения S_q . Максимальное количество элементов микрорельефа отмечено у клеток *B. craniifer*.

Самые низкие значения S_q среди сферулоцитов демонстрируют клетки *G. portentosa* и *P. americana*. Гемоцитам последних свойственна и наименьшая толщина возмущенного слоя. Впадины мембраны незначительны, и величина микровозвышений в 1,5 раза меньше, чем у клеток остальных видов. Величина S_{ds} стремится к 1 у всех, кроме *B. craniifer* – не более 0,65. При инкубации клеток в различных условиях данный показатель не претерпевает достоверных изменений.

Максимальное разглаживание мембраны коагулоцитов наблюдается у *G. portentosa* (S_q снижается на 24,5%), *N. cinerea* (S_q снижается на 21%), *P. americana* (S_q снижается на 25,5%). Гемоциты *S. tartara* и *B. germanica* характеризуются заметным уменьшением глубины впадин мембраны: на 19-20%. Минимальные изменения данного параметра затрагивают коагулоциты *P. americana* (11,5%), максимальные *G. portentosa* (52,0%). В целом, для коагулоцитов в условиях повышенной солености среды толщина возмущенного слоя изменяется на 5-15%. Плотность распределения элементов микрорельефа снижается при разглаживании мембраны в гипотонических условиях у *B. germanica*, *N. cinerea*, *P. americana* и *B. craniifer* на 12-17%, у *G. portentosa* на 7%. В гипертонической среде наибольшее увеличение S_v отмечено у клеток *N. cinerea* (70%).

У эноцитоидов пониженная осмолярность среды приводит к расширению обода ламеллоплазмы и уменьшению диаметра перинуклеарной зоны. Изменение параметров среды влияет на значение средней

квадратической шероховатости энцитойдов *G. portentosa* как за счет перепада высот микрорельефа поверхности, так и связано с увеличением или сокращением количества неровностей на единицу площади. У остальных видов параметр Sds претерпевает минимальные изменения.

Среди множества морфофункциональных показателей клетки особого внимания заслуживает жесткость подмембранного каркаса, которая определяет функциональную активность клетки, направленное перемещение и участие в реакциях фагоцитоза (Эккерт Дж. с соавт., 1991).

У всех изученных видов тараканов наибольшей жесткостью мембраны отличаются прогемоциты, что связано с минимальным использованием этими клетками мембранного резерва. Самые низкие значения модуля Юнга среди прогемоцитов – у *B. germanica*. Величина Модуля Юнга значительно ниже у плазмоцитов, гранулоцитов и коагулоцитов, возможно, это позволяет им максимально использовать мембранный резерв, а также образовывать псевдоподии и осуществлять фагоцитоз. Повышение жесткости мембраны ведет к снижению подвижности и адгезивных свойств фагоцитов. Однако данная закономерность не прослеживается у сферулоцитов: их значения модуля Юнга могут совпадать с показателями вышеперечисленных типов клеток, но значения MR у них невелики. У всех типов форменных элементов гемолимфы отмечено постоянство (чаще всего у прогемоцитов) или увеличение модуля Юнга в гипотонической среде, а в гипертонической это изменение носит достоверный характер.

Минимальной величиной силы адгезии обладают прогемоциты, фагоциты и коагулоциты демонстрируют наибольшие значения. У всех типов клеток данный параметр снижается в гипертонических условиях. Клетки *G. portentosa* отличаются максимальными значениями упругости мембраны среди изученных нами видов тараканов. Гемоциты *P. americana* являются наиболее чувствительными к воздействию осмотической нагрузки, в гипертонических условиях сила адгезии к нанозонду значительно падает.

В целом, экзогенные воздействия оказывают влияние на живые организмы в самых различных сочетаниях, комплексно. Их интегральное влияние можно оценить по реакции живых организмов или целых сообществ. Возможно использование параметров иммунитета насекомых как критерия состояния их популяций и экосистем в целом, в норме и при техногенном воздействии. Одним из подходов к оценке состояния окружающей среды может стать изучение динамики клеточного состава гемолимфы насекомых, в частности тараканов. Значимым показателем является доля фагоцитирующих гемоцитов, обеспечивающих захват и ликвидацию чужеродных клеточных структур, проникших во внутреннюю среду организма. Через общее количество гемоцитов в единице объема и соотношение их основных типов представляется возможным охарактеризовать состояние популяции, ее устойчивость к антропогенной нагрузке. Такие биоиндикационные методы оценки состояния природной среды широко используются в современных биологических исследованиях (Присный А.А., 2016; Pandey J.P. et al., 2008b).

ВЫВОДЫ

1. Осуществлена типология клеток гемолимфы представителей отряда Dictyoptera. Идентифицировано восемь типов гемоцитов: прогемоциты, плазмоциты, гранулоциты, сферулоциты, вермициты, коагулоциты, энцитойды, серповидные энцитойды. Гемолимфа тараканов характеризуется неоднородностью гемоцитарного состава, все восемь типов гемоцитов обнаружены только во внутренней среде *Gromphadorhina portentosa*. Преобладающими в гемоцитарной формуле типами клеток являются гранулоциты и плазмоциты.

2. Фагоцитарные реакции в гемолимфе представителей отряда Dictyoptera осуществляются гранулоцитами, плазмоцитами и вермицитами. Инкубация гемоцитов в условиях гипоосмотической нагрузки приводит к снижению интенсивности двигательной активности и способности к формированию псевдоподий у фагоцитирующих клеток, что уменьшает значения показателей фагоцитоза.

3. Участие мембранного резерва в регуляции клеточного объема у фагоцитирующих клеток и коагулоцитов превышает в 1,5-2 раза данный показатель других клеточных элементов гемолимфы. Наибольшие значения показателей использования мембранного резерва свойственны гемоцитам *Nauphoeta cinerea*.

4. Клетки, выполняющие фагоцитарную функцию (плазмоциты, гранулоциты и вермициты), характеризуются наибольшими значениями силы адгезии и низкой величиной модуля Юнга.

5. Максимальное использование гемоцитами мембранного резерва соотносится с наименьшими значениями показателей упруго-эластических свойств клеточной мембраны. Отмечено снижение величины силы адгезии к нанозонду в гипертонической среде у всех клеток гемолимфы, при этом минимальные значения силы адгезии выявлены у прогемоцитов.

6. Изменение топографии клеточной поверхности в условиях гипоосмотической нагрузки приводит к сглаживанию поверхности

гемоцитов, что сопровождается уменьшением впадин и микровозвышений, а также снижением количества структур микрорельефа на единицу площади. На особенности микрорельефа эноцитоидов и прогемоцитов осмотическая нагрузка оказывает минимальное влияние.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработанную типологию гемоцитов представителей отряда Dictyoptera, установленные изменения функциональных свойств и морфологических параметров клеток гемолимфы в условиях осмотической нагрузки можно использовать при выборе модельного объекта для биоиндикации, а также при планировании санитарно-эпидемиологических мероприятий по борьбе с синантропными видами тараканов.

Список литературы

1. Алешо, Н.А. Биологическое обоснование разработки и использования пищевых токсических приманок в системе интегрированной борьбы с синантропными тараканами: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.09 / Алешо Нина Александровна. – СПб, 1993. – 22 с.
2. Анисимова, А.А. Исследование клеточного состава гемолимфы двусторчатых моллюсков методом проточной цитометрии / А.А. Анисимова // Вторые чтения памяти академика В.Л. Касьянова. – Владивосток, 2011. – С. 2.
3. Анисюткин, Л.Н. Отряд Таракановые (Dictyoptera) – эволюция и систематика / Л.Н. Анисюткин // РЭТ-ИНФО. – 2006. – № 2. – С. 6-8.
4. Беклемишев, В.Н. Определитель членистоногих, вредящих здоровью человека / В.Н. Беклемишев. – М.: Государственное издательство медицинской литературы, 1958. – 420 с.
5. Беклемишев, В.Н. Основы сравнительной анатомии беспозвоночных: Т. 2. Органология / В.Н. Беклемишев. – М.: Издательство «Наука», 1964. – 446 с.
6. Галактионов, В.Г. Очерки эволюционной иммунологии / В.Г. Галактионов. – М.: Наука, 1995. – 256 с.
7. Галактионов, В.Г. Иммунология / В.Г. Галактионов. – Москва: Изд. МГУ, 1998. – 480 с.
8. Галактионов, В.Г. Эволюционная иммунология / В.Г. Галактионов. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2005. – 408 с.
9. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
10. Головкин, С.И. Сравнительная характеристика мембранного резерва ядерных клеток крови позвоночных животных: дис. ... канд. биол. наук: 03.03.01 / Головкин Сергей Иванович. – Белгород, 2010. – 120 с.
11. Гребцова, Е.А. Исследование подвижности гемоцитов *Gromphadorhina portentosa* / Е.А. Гребцова // Universum: Химия и биология: электронный научный журнал – 2014. – № 4 (5). URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/1198>

12. Гржибовский, А.М. Типы данных, проверка распределения и описательная статистика / А.М. Гржибовский // Экология человека. – 2008а. – № 1. – С. 52-58.

13. Гржибовский, А.М. Анализ количественных данных для двух независимых групп / А.М. Гржибовский // Экология человека. – 2008б. – № 2. – С. 54-61.

14. Гущина, Ю.Ю. Исследование различий морфологических параметров клеток крови человека методом сканирующей зондовой микроскопии / Ю.Ю. Гущина, С.Н. Плескова, М.Б. Звонкова // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. – 2005. – №1. – С.48-53.

15. Давтян, Т.К. Возникновение и факторы эволюции иммунной системы / Т.К. Давтян, Г.А. Геворкян, Д.А. Погосян // Успехи современной биологии. – 2007. – Т. 127, № 1. – С. 5-12.

16. Дремова, В.П. Тараканы. Биология, экология, санитарно-эпидемиологическое значение, контроль численности синантропных тараканов / В.П. Дремова, Н.А. Алешо. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2011. – 306 с.

17. Житенева, Л.Д. Эволюция крови / Л.Д. Житенева, Э.В. Макаров, О.А. Рудницкая. – Ростов-на-Дону, 2001. – С. 38-39.

18. Жужиков, Д.П. Тараканы рядом с нами / Д.П. Жужиков, Н.А. Алешо. – М.: Studio Print, 1997. – 44 с.

19. Зацепина, Г.Н. Изменение адаптационной способности и кинетики адаптации Т-лимфоцитов к гипотонии в патологических состояниях организма млекопитающих / Г.Н. Зацепина, С.В. Егудина, О.В. Тарнопольская // Биофизика. – 1992. – Т.37, вып.1. – С. 142-148.

20. Злотин, А.З. Техническая энтомология / А.З. Злотин. – Киев: Наукова думка, 1989. – 184 с.

21. Зубарева, Е.В. Функциональные и микрореологические свойства лейкоцитов при экзогенном перегревании в опытах *in vivo* и *in vitro*: автореф.

дис. ... канд. биол. наук: 03.03.01 / Зубарева Екатерина Владимировна. – Ярославль, 2011. – 18 с.

22. Игнатов, П.Е. Иммуитет и инфекция / П.Е. Игнатов. – М.: Время, 2002. – 352 с.

23. Коган, А.Б. Практикум по сравнительной физиологии / А.Б. Коган, С.И. Щитов. – М.: Советская наука, 1954. – 533 с.

24. Кулько, С.В. Морфофункциональная характеристика гемоцитов моллюсков (*Gastropoda*, *Bivalvia*) в норме и при осмотической нагрузке: дис. ... канд. биол. наук: 03.03.01 / Кулько Светлана Владимировна. – Белгород, 2015. – 186 с.

25. Лапач, С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич.– Киев: «Морион», 2001. – 408 с.

26. Малков, П.Ю. Количественный анализ биологических данных / П.Ю. Малков. – Горно-Алтайск: РИО ГАГУ, 2009. – 71 с.

27. Новак, А.В. Шероховатость пленок аморфного, поликристаллического кремния и поликристаллического кремния с полусферическими зернами / А.В. Новак, В.Р. Новак // Письма в ЖТФ. – 2013. – Т. 39, вып. 19. – С. 32-40.

28. Орлов, С.Н. Механизмы активации ионного транспорта при изменении объема клеток / С.Н. Орлов, Т.Г. Гурло // Цитология. – 1991. – Т. 33, № 11. – 101-110 с.

29. Орлов, С.Н. Регуляция объема клеток: механизмы, сопряженные клеточные реакции и патофизиологическое значение / С.Н. Орлов, К.Н. Новиков // Физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 1996. – Т. 82, № 8-9. – С. 1-15.

30. Пигалева, Т.А. Морфофункциональные особенности и осморегуляторные реакции клеточных элементов системы циркуляции представителей класса *Clitellata*: дис. ... канд. биол. наук: 03.03.01 / Пигалева Татьяна Александровна. – Белгород, 2015. – 207 с.

31. Плавильщиков, Н.Н. Определитель насекомых: Краткий определитель наиболее распространенных насекомых европейской части России / Н.Н. Плавильщиков. – М.: Топикал, 1994. – 544 с.

32. Присный, А.А. Практикум по физиологии беспозвоночных животных / А.А. Присный. – Белгород: Изд-во БелГУ, 2013. – 116 с.

33. Присный, А.А. Сравнительный анализ морфофункционального статуса клеточных элементов циркулирующих жидкостей беспозвоночных животных: дис. ... докт. биол. наук: 03.03.01 / Присный Андрей Андреевич. – Белгород, 2016. – 403 с.

34. Скоркина, М.Ю. Морфофизиологический анализ механизмов регуляции объема клеток крови: дис. ... докт. биол. наук: 03.03.01 / Скоркина Марина Юрьевна. – Астрахань, 2014. – 391 с.

35. Тарасова, И.М. Изменение физико-химических свойств лимфоцитов в процессах развития индуцированного канцерогенеза и общей реакции на повреждения: дис. ... канд. физ.-мат. наук: 03.00.02 / Тарасова Ирина Михайловна – М., 1985. – 187 с.

36. Трасатти, С. Измерения истинной площади поверхности в электрохимии / С. Трасатти, О.А. Петрий // Электрохимия. – 1993. – Т. 29, № 4. – С. 557-575.

37. Тыщенко, В.П. Физиология насекомых / В.П. Тыщенко. – М.: Высшая школа, 1986. – С. 91-130.

38. Федорова, М.З. Метод комплексного исследования геометрии, площади поверхности, резервных возможностей мембраны и осморегуляции лейкоцитов крови / М.З. Федорова, В.Н. Левин // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – № 11. – С. 44-46.

39. Федорова, М.З. Использование мембранного резерва лимфоцитами крови при деформации и в условиях гипотонии / М.З. Федорова, В.Н. Левин // Биологические мембраны. – 2001. – Т. 18, № 14. – С. 306-311.

40. Федорова, М.З. Сравнительная оценка «мембранного резерва» клеток крови земноводных и млекопитающих / М.З. Федорова, С.В.

Надеждин, С.И. Головки, Е.В. Зубарева // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2007. – Т. 43, № 5. – С. 419-422.

41. Хвощевская, М.Ф. Генерация активированных кислородных метаболитов и антиоксидантные ферменты в гемолимфе насекомых отряда *Lepidoptera* при бактериозах, вызываемых бактериями *Bacillus thuringiensis*: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.09 / Хвощевская Марина Федоровна. – Новосибирск, 2003. – 103 с.

42. Храмов, Ю.В. Атомно-силовая микроскопия как метод изучения с нанометровым разрешением морфологии поверхности объектов / Ю.В. Храмов. – М.: Центр коллективного пользования ИБГ РАН, 2013. – 27 с.

43. Шовен, Р. Физиология насекомых / Р. Шовен. – М.: Издательство иностранной литературы, 1953. – С. 198-199.

44. Эккерт, Р. Физиология животных: механизмы и адаптации: в 2 т. / Р. Эккерт, Д. Рэндел, Дж. Огастин. – М.: Мир, 1991. – Т. 1. – 423 с.

45. Akai, H. Ultrastructure of the larval hemocytes of the silkworm *Bombyx mori* L / H. Akai, S. Sato // International Journal of Insect Morphology and Embryology. – 1973. – Vol. 2. – P. 207-231.

46. Alaux, C. Interactions between *Nosema* microspores and aneonicotinoid weaken honey bees (*Apis mellifera*) / C. Alaux, J.L. Brunet, C. Dussaubat, S. Tchamitchan // Environ. Microbiol. – 2010. – Vol. 12. – P. 774-782.

47. Alfonso, T.B. Gcm2 promotes glial cell differentiation and is required with glial cells missing for macrophage development in *Drosophila* / T.B. Alfonso, B.W. Jones // Dev. Biol. – 2002. – Vol. 248. – P. 369-383.

48. Al-Habori, M. Macromolecular crowding and its role as intracellular signaling of cell volume regulation / M. Al-Habori // The international journal of biochemistry and cell biology. – 2001. – Vol. 33(9). – P. 844-864.

49. Arnold, J.W. Haemopoiesis in *Lepidoptera*. I. The multiplication of circulating haemocytes / J.W. Arnold, C.F. Hinks // Can. J. Zool. – 1976. – Vol. 54. – P. 1003-1012.

50. Arnold, J.W. Larval haemocytes in Noctuidae (Insecta: Lepidoptera) / J.W. Arnold // Int. J. Insect Morphol. Embryol. – 1982. – Vol. 11. – P. 173-188.
51. Asha, H. Analysis of Ras-induced over proliferation in *Drosophila* hemocytes / H. Asha, I. Nagy, G. Kovacs, D. Stetson, I. Ando, C.R. Dearolf // Genetics. – 2003. – Vol. 163. – P. 203-215.
52. Ashhurst, D.E. Histochemical properties of the Spherulocytes of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) / D.E. Ashhurst // Int. J. Insect Morphol. Embryol. – 1982. – Vol. 11. – P. 285-292.
53. Ashida, M. Immunolocalization of prophenoloxidase among hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori* / M. Ashida, M. Ochiai, T. Niki // Tissue Cell. – 1988. – Vol. 20. – P. 599-610.
54. Bagge, U. Granulocyte rheology. Experimental studies in an *in vitro* microflow system / U. Bagge, R. Skalak, R. Attefors // Adv. Microcirc. – 1977. – Vol. 7. – P. 29-49.
55. Bagge, U. White blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock / U. Bagge, B. Amundson, C. Lauritzen // Acta Physiol. Scand. – 1980. – Vol.108(2). – P. 159-163.
56. Bangham, J. Insect Immunity: The Post-Genomic Era / J. Bangham, F. Jiggins, B. Lemaitre // Immunity. – 2006. – Vol. 25. – P. 1-5.
57. Bataille, L. Resolving embryonic blood cell fate choice in *Drosophila*: interplay of GCM and RUNX factors / L. Bataille, B. Auge, G. Ferjoux, M. Haenlin, L. Waltzer // Development. – 2005. – Vol. 132. – P. 4635-4644.
58. Battistella, S. Prime in dagini sui meccanismi immunitari di larve e adultidi, *Cetonischema aeruginosa* Drury (1770) / S. Battistella, G.A. Amirante // Bull. Soc. Adriatica. Sc. – 1999. – Vol. 78 – P. 27-34.
59. Beaulaton, J. Ultrastructure et cytochimie des hemocytes d'*Antheraea pernyi* Guer. (Lepidoptera, Attacidae) II. Cellules a spherules et oenocytoides / J. Beaulaton, M. Monpeysson // Biologie Cellulaire. – 1977. – Vol. 28. – P.13-18.
60. Beaulaton, J. Hemocytes and hemocytogenesis in silkworms / J. Beaulaton // Biochimie. – 1979. – Vol. 61. – P. 157-164.

61. Beckage, N. Insect immunology / N. Beckage. – Academic Press, 2008. – P. 25-49.

62. Beckmann, M. Atomic force microscopy of peritoneal macrophages after particle phagocytosis / M. Beckmann, H.A. Kolb, F. Lang // Membrane biology. – 1994. – Vol. 140. – P. 197-204.

63. Berger, J. Morphological Characterization of Hemocytes in the Adult Linden Bug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera) / J. Berger, K. Slavičková // Zoological Studies. – 2008. – Vol. 47(4). – P.466-472.

64. Bernardoni, R. Gliogenesis depends on glide/gcm through asymmetric division of neuroglioblasts / R. Bernardoni, M. Kammerer, J.-L. Vonesch, A. Giangrande // Dev. Biol. – 1999. – Vol. 216. – P. 265-275.

65. Brehelin, M. Encapsulation of implanted foreign bodies by hemocytes in *Locusta migratoria* and *Melolontha melolontha* / M. Brehelin, J.A. Hoffmann, G. Matz, A. Porte // Cell Tissue Res. – 1975. – Vol. 160. – P. 283-289.

66. Brehelin, M. A comparative ultrastructural study of blood cells from nine insect orders / M. Brehelin, D. Zachary, J.A. Hoffmann // Cell Tissue Res. – 1978. – Vol. 195. – P. 45-57.

67. Brehelin, M. Insect Haemocytes: A new Classification to Rule out Controversy / M. Brehelin, D. Zachary // Immunity in Invertebrates. – 1986. – P. 36-48.

68. Cardens, W. Phenoloxidase specific activity in the red swamp crayfish *Procambarus clarkia* / W. Cardens, J.R. Dankert // Fish Shellfish Immunol. – 1997. – Vol. 7. – P. 283-295.

69. Carton, Y. Drosophila cellular immunity against parasitoids / Y. Carton, A.J. Nappi // Parasitol. Today. – 1997. – Vol. 13. – P. 218-227.

70. Ceraul, S.M. An arthropod defensin expressed by the hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) / S.M. Ceraul, D.E. Sonenshine, R.E. Ratzlaff, W.L. Hynes // Insect Biochem. Mol. Biol. – 2003. – Vol. 33. – P. 99-103.

71. Cerenius, L. Coagulation in invertebrates / L. Cerenius, K. Söderhäll // J. Innate Immun. – 2011. – Vol. 3. – P. 3-8.

72. Charalambidis, D.N. Haemocyte surface phenoloxidase (PO) and immune response to lipopolysaccharide (LPS) in *Ceratitis capitata* / D.N. Charalambidis, C.L. Foukas, G.C. Zervas, J.V. Marmaras // Insect Biochem. Mol. Biol. – 1996. – Vol. 26. – P. 67-74.

73. Chen, S.C. Biochemical properties and cDNA cloning of two new lectins from the plasma of *Tachypleus tridentatus*: Tachypleus plasma lectin 1 and 2+ / S.C. Chen, C.H. Yen, M.S. Yeh, C.J. Huang, T.Y. Liu // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 31-39.

74. Christensen, B.M. Hemocyte population change during the immune responses of *Aedes aegypti* to inoculated microfilariae of *Diofilarie immitis* / B.M. Christensen, B.M. Huff, G.S. Miranpuri, K.L. Haris, L.A. Christensen // J. Parasitol. – 1989. – Vol. 75. – P. 19-23.

75. Cochran, D.G. Cockroaches: Their Biology, Distribution and Control / D.G. Cochran // World Health Organization Communicable Diseases Prevention and Control. – 1999. – 83 p.

76. Crossley, A.C.S. Biochemical and ultrastructural aspects of synthesis, storage and secretion in haemocytes / A.C.S. Crossley // In: Insect Haemocytes, Gupta, A.P. (Ed.). Cambridge University Press, 1979. – P. 423-473.

77. Crozatier, M. Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue *collier* / M. Crozatier, J.M. Ubeda, A. Vincent, M. Meister // PLoS ONE. – 2004. – Vol. 2.

78. Crozatier, M. *Drosophila* haematopoiesis / M. Crozatier, M. Meister // Cell Microbiol. – 2007. – Vol. 9. – P. 1117-1126.

79. 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. – Vol. 114. – № 18. – P. 5971-5982.

80. De Rosier, D.J. Evidence for fascin cross-links between the filaments in coelomocyte filopodia / D.J. De Rosier, K.T. Edds // *Exp. Cell Res.* – 1980. – Vol. 126. – P. 490-494.

81. Devauchelle, G. Etude ultrastructure des hemocytes du coleoptere *Melolontha melolontha* (L.) / G. Devauchelle // *J. Ultrastruct. Res.* – 1971. – Vol. 34. – P. 492-516.

82. Dybas, L. Holothurian survival strategies: Mechanisms for the maintenance of a bacteriostatic environment in the coelomic cavity of the sea cucumber / L. Dybas, P.V. Fankboner // *Dev. Comp. Immunol.* – 1986. – Vol.10. – P.311-330.

83. Edds, K.T. Dynamic aspects of filopodial formation by reorganization of microfilaments / K.T. Edds // *J. Cell Biol.* – 1977. – Vol. 73(2). – P. 479-480.

84. Edds, K.T. Cell biology of echinoid coelomocytes I. Diversity and characterization of cell types / / K.T. Edds // *J. Invertebr. Pathol.* – 1993. – Vol. 61. – P. 173-178.

85. Elizabeth, W. Immunochemical identification of insect haemocytes population: Monoclonal antibodies distinguish four major haemocyte types in *Manduca sexta* / W. Elizabeth, T. Trenczek, W.T. Larry, M.R. Kanost // *Eur. J. Cell Biol.* – 1994. – Vol. 62. – P. 417-423.

86. Evans, C.J. Transcriptional regulation of hematopoiesis in *Drosophila* / C.J. Evans, U. Banerjee // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2003. – P. 223-228.

87. Figueiredo, M.B. Cellular immune response in *Rhodnius prolixus*: Role of ecdysone in haemocyte phagocytosis / M.B. Figueiredo, D.P. Castro, N.F.S. Nogueira, E.S. Garcia, P. Azambuja // *J. Insect Physiol.* – 2006. – Vol. 52. – P. 711-716.

88. Fossett, N. Functional conservation of hematopoietic factors in *Drosophila* and vertebrates / N. Fossett, R.A. Schulz // *Differentiation.* – 2001. – Vol. 69. – P. 83-90.

89. Fossett, N. The friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1, and FOG-2 function as negative regulators of blood, heart, and eye development in

Drosophila / N. Fossett, S.G. Tevosian, K. Gajewski, Q. Zhang, S.H. Orkin, R.A. Schulz // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2001. – Vol. 98. – P. 42-47.

90. Fossett, N. Combinatorial interactions of serpent, lozenge, and U-shaped regulate crystal cell lineage commitment during *Drosophila* hematopoiesis / N. Fossett, K. Hyman, K. Gajewski, S.H. Orkin, R.A. Schulz // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2003. – Vol. 100. – P.51-56.

91. Franc, N.C. Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila* / N.C. Franc, P. Heitzler, R.A. Ezekowitz, K. White // Science. –1999. – P. 91-94.

92. Franc, N.C. Phagocytosis of apoptotic cells in mammals, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*: molecular mechanisms and physiological consequences / N.C. Franc // Front. Biosci. – 2002. – Vol. 7. – P. 1298-1313.

93. Gandhe, A.S. A novel immune up-regulated protein mediates nodulation response in insects / A.S. Gandhe, S.H. John, N.J. Noduler // J. Immunol. – 2007. – Vol. 179. – P. 43-51.

94. Gardiner, E.M. Monoclonal antibodies bind distinct classes of haemocytes in the moth *Pseudoplusia includes* / E.M. Gardiner, M.R. Strand // J. Insect. Physiol. – 1999. – Vol. 45. – P. 13-26.

95. Gardiner, E.M. Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includes* and *Spodoptera frugiperda* / E.M. Gardiner, M.R. Strand // Arch. Insect. Biochem. Physiol. – 2000. – Vol. 43. – P. 147-164.

96. Gillespie, P.J. Biological mediators of insect immunity / P.J. Gillespie, M. Kanost, T. Trenczek // Annu. Rev. Entomol. – 1997. – Vol. 42. – P. 11-13.

97. Girardin, S.E. Intracellular vs. extracellular recognition of pathogens- common concepts in mammals and flies / S.E. Girardin, P.J. Sansonetti, D.J. Philpott // Trends Microbiol. – 2002. – Vol. 10. – P. 93-99.

98. Giulianini, P.G. Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids *in vivo* phagocytosis / P.G. Giulianini, F. Bertolo, S. Battistella, G.A. Amirante // Tissue and Cell. – 2003. – Vol. 35. – P. 243-251.

99. Gotz, P. Encapsulation in arthropods / P. Gotz // In: Immunity in Invertebrates Cells, Molecules and Defense Reactions, Brehelin M. (Ed.). – 1986. – P. 153-170.
100. Gregoire, C.H. Blood Coagulation in Arthropods: II. Phase Contrast Microscopic Observations on Hemolymph Coagulation in Sixty-one Species of Insects blood / C.H. Gregoire // The American Society of Hematology. – 1951. – Vol. 6. – P. 1175-1180.
101. Grimstone, A.V. An Electron-Microscope Study of Capsule Formation by Insect Blood Cells / A.V. Grimstone, S. Rotheram, G. Salt // Journal of Cell Science. – 1967. – Vol. 2. – P. 281-292.
102. Groulx, N. Membrane Reserves and Hypotonic Cell Swelling / N. Groulx, F. Boudreault, S.N. Orlov, R. Grygorczyk // J. Membrane Biol. – 2006. – Vol. 214. – P. 43-56.
103. Gupta, A.P. Phase contrast and histochemical studies of spherule cells in cockroaches (Dictyoptera) / A.P. Gupta, D.J. Sutherland // Ann. Ent. Soc. Am. – 1967. – Vol. 60. – P. 557-565.
104. Gupta, A.P. Haemocyte Types: Their Structure, Synonymies, Interrelationships and Taxonomic Significance / A.P. Gupta // In: Insect Haemocytes. – 1979. – P. 85-127.
105. Gupta, A.P. Cellular Elements in the Hemolymph / A.P. Gupta // In: Comprehensive Insect Physiology Biochemistry Pharmacology. – New York: Pergamon Press, 1985a. – P. 400-451.
106. Gupta, A.P. The identity of the so-called crescent cell in the haemolymph of the cockroach, *Gromphadorhina portentosa* (Schaum) (Dictyoptera: Blaberidae) / A.P. Gupta // Cytologia. – 1985b. – Vol. 50. – P. 739-746.
107. Hall, M. The crayfish plasma clotting protein: A vitellogenin-related protein responsible for clot formation in crustacean blood / M. Hall, R. Wang, R. van Antwerpen, L. Sottrup-Jensen, K. Söderhäll // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – Vol. 96 – P. 1965-1970.

108. Han, S.S. Hemocytic differentiation in hemopoietic organ of *Bombyx mori* larvae / S.S. Han, M.H. Lee, W.K. Kim, H. Wago, S.M. Yoe // Zool. Sci. – 1998. – Vol. 15. – P. 371-379.

109. Harrison, D.A. Activation of a Drosophila Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects / D.A. Harrison, R. Binari, T.S. Nahreini, M. Gilman, N. Perrimon // EMBO J. – 1995. – Vol. 14. – P. 2857-2865.

110. Hillyer, J.F. Hemocyte-mediated phagocytosis and melanization in the mosquito *Armigeres subalbatus* following immune challenge by bacteria / J.F. Hillyer, S.L. Schmidt, B.M. Christensen // Cell Tissue Res. – 2003. – P. 117-127.

111. Hinks, C.F. Haemopoiesis in Lepidoptera. II. The role of the haemopoietic organs / C.F. Hinks, J.W. Arnold // Can. J. Zool. – 1977. – Vol. 55. P. 1740-1755.

112. Hoffman, J.A. The immune response of Drosophila / J.A. Hoffman // Nature. – 2003. – P. 33-38.

113. Hollande, A.G. Comparative histological study of the blood of insects and insect-free hemorrhea / A.G. Hollande // Arch. Zool. Exp. Gen. (Ser. 5). – 1911. – Vol. 6. – P. 283-323.

114. Hörber, J.K. Investigation of living cells in the nanometer regime with the scanning force microscope / J.K. Hörber, W. Hieberle, F. Ohnesorge, G. Binnig, H.G. Liebich, C.P. Czermy, H. Mahnel, A. Mayr // Scanning Microsc. – 1992. – Vol. 6. – P. 919-929.

115. Huang, F. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Plutellaxylostella* larva: cell types and their role in phagocytosis / F. Huang, Y.Y. Yang, M. Shi, J.Y. Li, Z.Q. Chen, F.S. Chen, X.X. Chen // Tissue Cell. – 2010. – Vol. 42(6). – P. 360-410.

116. Johns, R. Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* / R. Johns, D.E. Sonenshine, W.L. Hynes // Insect Biochem. Mol. Biol. – 2001. – Vol. 31. – P. 857-865.

117. Jones, J.C. A phase contrast study of the blood cells in *Prodenia* larvae (Order Lepidoptera) / J.C. Jones // Quart. J. Micr. Sci. – 1959. – Vol. 100. – P. 17-23.
118. Jones, J.C. Current concepts concerning insect haemocytes / J.C. Jones // Am. Zool. – 1962. – Vol. 2. – P. 209-246.
119. Jones, J.C. Haemocytopoiesis in Insects / J.C. Jones // Regulation of Haemocytopoiesis in Insects. – 1970. – Vol. 1. – P. 7-65.
120. Kevin, K. Hemocyte and neutrophils / K. Kevin // Proceedings of the Society for General Microbiology's Meeting. – 2009. – P. 2-7.
121. Kopacek P. Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata* / P. Kopacek, R. Vogt, L. Jindrak, C. Weise, I. Safarik // Insect Biochem. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 29. – P. 989-997.
122. Kurtz, J. Phagocytosis by invertebrate hemocytes: causes of individual variation in *Panorpa vulgaris* scorpionflies / J. Kurtz // Microsc. Res. Tech. – 2002. – Vol. 57(6). – P. 456-68.
123. Lackie, A.M. Haemocyte behavior / A.M. Lackie // Adv. Insect. Physiol. – 1988. – Vol. 21. – P. 85-178.
124. Lanot, R. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila* / R. Lanot, D. Zachary, F. Holder, M. Meister // Dev. Biol. – 2001. – Vol. 230. – P. 243-257.
125. Lavine, M.D. Insect hemocytes and their role in immunity / M.D. Lavine, M.R. Strand // Insect. Biochem. Mol. Biol. – 2002. – Vol. 32. – P.1295-1309.
126. Lawrence, P.O. Hemocytes of Insects: Their Morphology and Function / P.O. Lawrence // Encyclopedia of Entomology. – 2008. –P. 1787-1790.
127. Lebestky, T. Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors / T. Lebestky, T. Chang, V. Hartenstein, U. Banerjee // Science – 2000. –Vol. 288. – P. 146-149.
128. Lemaitre, B. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms /

B. Lemaitre, J.M. Reichhart, J.A. Hoffmann // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – Vol. 94. – P. 14-19.

129. Lorgeril, J. Analyse of immune gene expression in shrimps: a tool for health monitoring or genetic selection / J. Lorgeril, D. Janech, M.C. Goarant, E.D. Goayard, J. Xiang // Eur. Commission. – 2010. – P. 13-16.

130. Ma, G. Recognition and inactivation of LPS by lipophorin particles / G. Ma, D.L. Hay, S. Asgari, O. Schmidt // Developmental and Comparative Immunology. – 2006. – Vol. 30. – P. 619-626.

131. Martinez-Agosto, J.A. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view / J.A. Martinez-Agosto, H.K. Mikkola, V. Hartenstein, U. Banerjee // – Genes Dev. – 2007. – Vol. 21. – P. 3044-3060.

132. McKittrick, F.A. Evolutionary Studies of Cockroaches / F.A. McKittrick // Cornell University Agricultural Experiment Station Memoir. – 1964. – Vol. 189. – 197 p.

133. McManus, M. L. Regulation of cell volume in health and disease / M. L. McManus, K. B. Churchwell, K. Strange // New Engl. J. Medicine. – 1995. – Vol. 333. – P. 1260-1266.

134. Meister, M. *Drosophila* blood cells / M. Meister, M. Lagueux // Cell Microbiol. – 2003. – Vol. 5. – P. 573-580.

135. Miller, J.S. Eicosanoids Mediate Insect Nodulation Responses to Bacterial Infections / J.S. Miller, T. Nguyen, D.W. Stanley-Samuelson // Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA. – 1994. – Vol. 91, № 26. – P. 418-422.

136. Minton, A.O. Influence of macromolecular crowding upon the stability and state of association of proteins: predictions and observation / A.O. Minton // J. Pharm. Sci. – 2005. – Vol. 94. – P. 1668-1675.

137. Mitta, G. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge / G. Mitta, F. Vandebulcke, F. Hubert, P. Roch // J. Cell Sci. – 1999. – Vol. 112. – P. 233-242.

138. Mukherjee, S. Endocytosis / S. Mukherjee, R.N. Ghosh, F.R. Maxfield // Physiol. Rev. – 1997. – Vol. 77. – P. 759-803.

139. Nakahara, Y. Effects of silkworm paralytic peptide on *in vitro* hematopoiesis and plasmatocyte spreading / Y. Nakahara, Y. Kanamori, M. Kiuchi, M. Kamimura // Arch. Insect. Biochem. Physiol. – 2003a. – Vol. 52. P. 163-174.

140. Nakahara, Y. *In vitro* studies of hematopoiesis in the silkworm: cell proliferation in and hemocyte discharge from the hematopoietic organ / Y. Nakahara, Y. Kanamori, M. Kiuchi, M. Kamimura // J. Insect Physiol. – 2003b. – Vol. 49. – P. 907-916.

141. Nakahara, Y. Two Hemocyte Lineages Exist in Silkworm Larval Hematopoietic Organ / Y. Nakahara, Y. Kanamori, M. Kiuchi, M. Kamimura // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5(7).

142. Nakajima, Y. Antibacterial peptide defensin is involved in midgut immunity of the soft tick, *Ornithodoros moubata* / Y. Nakajima, A. van der Goes, D. Taylor, M. Yamakawa // Insect Mol. Biol. – 2002. – Vol. 11. – P. 611-618.

143. Nardi, J.B. Embryonic origins of the two main classes of hemocytes granular cells and plasmatocytes in *Manduca sexta* / J.B. Nardi // Dev. Genes. Evol. – 2004. – Vol. 214. – P. 19-28.

144. Niere, M. Insect immune activation by apolipoprotein III is correlated with the lipid-binding properties of this protein / M. Niere, M. Dettloff, T. Maier, M. Ziegler, A. Wiesner // Biochemistry. – 2001. – Vol. 40. – P. 1-2.

145. Nittono, Y. Studies on the blood cells in the silkworm, *Bombyx mori* L / Y. Nittono // Bull. Seric. Expt. Sta. – 1960. – Vol. 16. – P. 171-266.

146. Nittono, Y. Formation of hemocytes near the imaginal wing disc in the silkworm, *Bombyx mori* L / Y. Nittono // Journal of Sericulture Science. – 1964. – Vol. 33. – P. 43-45.

147. Panakova, D. Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signaling / D. Panakova, H. Sprong, E. Marois, C. Thiele, S. Eaton // Nature. – 2005. – P. 58-65.

148. Pandey, J.P. Studies on stress induced haematological changes in *Dysdercus cingulatus* Fabr. (Heteroptera: Pyrrhocoridae) and *Danais chryssippus* (Lepidoptera: Nymphalidae) / J.P. Pandey // Ph.D. Thesis, 2004. – P. 12-16.

149. Pandey, J.P. Stress induced quantitative and structural changes in haemocyte of red cotton bug, *Dysdercus koenigii* (Heteroptera: Pyrrhocoridae) / J.P. Pandey, R.K. Tiwari // Indian J. Entomol. – 2007. – Vol. 69. – P.298-306.

150. Pandey, J.P. Reduction in hemocyte mediated immune response in *Danais chrysippus* following treatment with neem based insecticides / J.P. Pandey, R.K. Tiwari, D. Kumar // J. Entomol. – 2008a. – Vol. 5. – P. 200-206.

151. Pandey, J.P. Temperature and ganglionectomy stresses affect haemocyte counts in plain tiger butterfly, *Danais chrysippus* L. (Lepidoptera: Nymphalidae) / J.P. Pandey, R.K. Tiwari, D. Kumar // J. Entomol. – 2008b. – Vol. 5. – P. 113-121.

152. Pandey, J.P. Effect of temperature on hemocytic immune responses of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* / J.P. Pandey, P.K. Mishra, D. Kumar, B.M.K. Singh, B.C. Prasad // Res. J. Immunol. – 2010. – Vol. 3. – P. 169-177.

153. Pastan, I. Receptor-mediated endocytosis of hormones in cultured cells / I. Pastan, M.C. Willingham // Ann. Rev. Physiol. – 1981. – Vol. 43. – P. 239-250.

154. Pathak, J.P.N. Insect Immunity / J.P.N. Pathak. – Dordrecht; Boston: Kluwer Academic Publishers, 1993. – P. 3-24.

155. Price, C.D. A reappraisal of insect haemocyte classification by the examination of blood from fifteen insect orders / C.D. Price, N.A. Ratcliffe // Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. – 1974. – Vol. 147. – P. 537-549.

156. Ratcliffe, N.A. Role of haemocytes in defense against biological agents / N.A. Ratcliffe, A.F. Rowley // In: Gupta, A.P. (Ed.), Insect Haemocytes: Development, Forms, Functions, and Techniques. – Cambridge University Press, Cambridge, 1979. – P. 331-414.

157. Ratcliffe, N.A. Cellular defense reactions of insect hemocytes *in vitro*: phagocytosis in a new suspension culture system / N.A. Ratcliffe, A.F. Rowley // *J. Invert. Pathol.* – 1975. – Vol.26. – P. 225-233.

158. Ratcliffe, N.A. Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances / N.A. Ratcliffe, A.F. Rowley, S.W. Fitzgerald, P.R. Hodes // *Int. Rev. Cytol.* – 1985. – Vol. 97. – P. 183-350.

159. Ratner, S. Phagocytosis and encapsulation: Cellular immune responses in Arthropoda / S. Ratner, S.B. Vinson // *Am. Zool.*, 1983. – Vol. 23. – P. 185-194.

160. Raucher, D. Characteristic of a membrane reservoir buffering membrane tension / D. Raucher, M. Sheetz // *Biophysical J.* – 1999. – Vol. 77. – P. 1992-2002.

161. Ribeiro, C. Insect immunity: the haemocytes of the armyworm, *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their role in defence reactions. *In vivo* and *in vitro* studies / C. Ribeiro, N. Simões, M. Brehélin // *J. Insect Physiol.* – 1996. – Vol. 42. – P. 815-822.

162. Ribeiro, C.M. Insect haemocytes: What type of cell is that? / C. Ribeiro, M. Brehelin // *Journal of Insect Physiology.* – 2006. – Vol. 52. – P. 417-429.

163. Rizki, M.T.M. Experimental analysis of haemocyte morphology in insects / M.T.M. Rizki // *Am. Zool.* – 1962. – Vol. 2. – P. 247-256.

164. Roth, L.M. Evolution and taxonomic significance of reproduction in Blattaria / L.M. Roth // *Annual Review of Entomology.* – 1970. – Vol. 15. – P. 75-96.

165. Rowley, A.F. An ultrastructural and cytochemical study of the interaction between latex particles and the haemocytes of the wax moth, *Galleria mellonella* *in vitro* / A.F. Rowley, N.A. Ratcliffe // *Cell Tissue Res.* – 1979. – Vol. 199. – P. 127-137.

166. Rowley, A.F. Insects / A.F. Rowley, N.A. Ratcliffe // *Invertebrate Blood Cells.* – 1981. – Vol. 2. – P. 421-488.

167. Russo, J. Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina bouhardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila* / J. Russo, S. Dupas, F. Frey, Y. Carton, M. Brehelin // *Parasitology*. – 1996. – Vol. 112. – P. 135-142.

168. Saito, T. Effect of bombyxin-II, an insulin-related peptide of insects, on *Bombyx mori* hemocyte division in single-cell culture / T. Saito, K. Iwabuchi // *Appl. Entomol. Zool.* – 2003. – Vol. 38. – P. 583-588.

169. Scapigliati, G. Morphological and cytoskeletal characterization of hemocytes in stick insects (Phasmatodea) / G. Scapigliati, A.M. Fausto, M. Mazzini // *Bolletino di zoologia*. – 1993. – Vol. 60, № 1. – P. 25-32.

170. Schmidt, O. Mode of action of antimicrobial proteins, pore-forming toxins and biologically active peptides (Hypothesis) / O. Schmidt, M.M. Rahman, G. Ma, U. Theopold, Y. Sun, M. Sarjan, M. Fabbri, H. Roberts // *Inv. Survival J.* – 2005. – Vol. 2. – P. 82-90.

171. Schmidt, O. Immune protection in an insect host-parasitoid system / O. Schmidt, U. Theopold // *Endocytobiosis and Cell Research*. – 1992. – Vol. 8. – P. 205-208.

172. Schmit, A.R. The encapsulation of foreign tissue implants in *Galleria mellonella* larvae / A.R. Schmit, N.A. Ratcliffe // *J. Insect Physiol.* – 1977. – Vol. 23 – P. 175-184.

173. Schwammerdam, J. The book of nature or the history of insects / J. Schwammerdam // *Particular instances*. – London, 1758. – P. 4-11.

174. Shin, S.W. REL1, a homologue of Dorsal regulates toll antifungal immune pathway in the female mosquito, *Aedes aegypti* / S.W. Shin, V. Kokoza, G. Bian, H.M. Cheon, Y.J. Kim, A.S. Raikhel // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 16499-16507.

175. Silva, J.E.B. Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) Larvae / J.E.B. Silva, I.C. Boleli, Z.L.P. Simões // *Braz. J. Biol.* – 2002. – Vol. 62, № 4a. – P. 37-42.

176. Singh, G.P. Susceptibility of three Eco-races of tropical tasar silkworm to *Antheraea mylitta* cytoplasmic polyhedrosis virus (AmCPV) / G.P. Singh, S.B. Zeya, A.K. Srivastava, B. Prakash, N.G. Ojha, N. Suryanarayana // *Caspian J. Env. Sci.* – 2008. – Vol. 6. – P. 161-165.

177. Song, Y.L. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus / Y.L. Song, Y. Chun, T.W. Lien, C.C. Huang, M.N. Lin // *Fish Shellfish Immunol.* – 2003. – Vol. 14. – P. 317-331.

178. Sorrentino, R.P. Cellular immune responses to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated / R.P. Sorrentino, Y. Carton, S. Govind // *Dev. Biol.* – 2002. – Vol. 243. – P. 65-80.

179. Sorrentino, R.P. Genetic analysis of contributions of dorsal group and JAK-Stat92E pathway genes to larval hemocyte concentration and the egg encapsulation response in *Drosophila* / R.P. Sorrentino, J.P. Melk, S. Govind // *Genetics.* – 2004. – Vol. 166. – P. 1343-1356.

180. Stanley, D. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions / D. Stanley, J.S. Miller // *Entomol. Exp. Appl.* – 2006. – Vol. 119. – P. 1-13.

181. Stanley-Samuelson, D.W. Insect immune response to bacterial infection is mediated by eicosanoids / D.W. Stanley-Samuelson, E. Jensen, K.W. Nickerson, K. Tiebel, C.L. Ogg, R.W. Howard // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol. 88. – P. 1064-1068.

182. Steinman, R.M. Endocytosis and recycling of plasma membrane / R.M. Steinman, I.S. Mellman, W.A. Muller, Z.A. Cohn // *J. Cell Biology.* – 1983. – Vol. 96. – P. 1-27.

183. Strand, M.R. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships / M.R. Strand, L.L. Pech // *Ann. Rev. Entomol.* – 1995. – Vol. 40. – P. 31-56.

184. Theopold, U. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing / U. Theopold, O. Schmidt, K. Söderhäll, M.S. Dushay // *Trends Immunol.* – 2004. – Vol. 25. – P. 289-94.

185. Tiwari, R.K. Haemopoietic organs and effect of their ablation on total haemocyte count in lemon-butterfly, *Papilio demoleus* L / R.K. Tiwari, J.P. Pandey, R. Salehi // Indian J. Exp. Biol. – 2002. – Vol. 40. – P. 1202-1205.

186. Tiwari, R.K. Effects of neem based insecticides on metamorphosis, haemocytes count and reproductive behavior in red cotton bug, *Dysdercus koenigii* Fabr. (Heteroptera: Pyrrhocoridae) / R.K. Tiwari, J.P. Pandey, D. Kumar // Entomology. – 2006. – Vol. 31. – P. 267-275.

187. Tojo, S. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella* / S. Tojo, F. Naganuma, K. Arakawa, S. Yokoo // J. Insect Physiol. – 2000. – Vol. 46. – P. 1129-1135.

188. 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. – Vol. 5 (59). – P. 421-431.

189. Vasiliev, J.M. Effects of colcemid on morfogenetic processes and locomotion of fibroblasts / J.M. Vasiliev, I.M.Gelfand // In: Cell Motility. – Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab, 1976. – P. 280.

190. Vilmos, P. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system / P. Vilmos, E. Kurucz // Immunology Letters – 1998. – Vol. 62. – P. 59-66.

191. Wang, C.L. Physiological functions of hemocytes newly emerged from the cultured hematopoietic organs in the silkworm, *Bombyx mori* / C.L. Wang, Z.X. Wang, M.M. Kariuki, Q.Z. Ling, K. Kiguchi, E.J. Ling // Insect Sci. – 2010. – Vol. 17. – P. 7-20.

192. Wang, Y. Steinernemaglaseri surface coat protein suppresses the immune response of *Popillia japonica* (Coleoptera; Scarabaeidae) larvae / Y. Wang, R. Gaugler // Biol. Contr. – 1998. – Vol. 14. – P. 45-50.

193. Wigglesworth, V.B. The Principles of Insect Physiology / V.B. Wigglesworth. – London: Methuen, 1939. – P. 2-7.

194. Wigglesworth, V.B. Insect blood cells / V.B. Wigglesworth // Ann. Rev. Ent. – 1959. – Vol. 4. – P. 1-16.
195. Williams, M.J. Drosophila Hemopoiesis and Cellular Immunity / M.J. Williams // J. Immunol. – 2007. – Vol. 178. – P. 4711-4716.
196. Wood, W. Drosophila melanogaster embryonic haemocytes: masters of multitasking / W. Wood, A. Jacinto // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2007. – Vol. 8. – P. 542-51.
197. 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.942-947.
198. Yamashita, M. *Bombyxmori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures / M. Yamashita, K. Iwabuchi // J. Insect Physiol. – 2001. – Vol. 47. – P. 325-331.
199. Yeager, J.F. The blood picture of the southern armyworm (*Prodenia eridania*) / J.F. Yeager // J. Agric. Res. – 1945. – Vol. 71. – P. 1-40.
200. Zettervall, C.J. A directed screen for genes involved in Drosophila blood cell activation / C.J. Zettervall, I. Anderl, M.J. Williams, R. Palmer, E. Kurucz, I. Ando, D. Hultmark // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101. – P. 14192-14197.
201. Zou, Q. Control issues in high-speed AFM for biological applications: collagen imaging example / Q. Zou, K.K. Leang, E. Sadoun, M.J. Reed, S. Devasia // Asian Journal Of Control. – 2004. – Vol. 2 (6). – P. 164-178.