

*На правах рукописи*

**КУЛЬКО Светлана Владимировна**

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
ГЕМОЦИТОВ МОЛЛЮСКОВ (Gastropoda, Bivalvia)  
В НОРМЕ И ПРИ ОСМОТИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ**

03.03.01 – физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

**БЕЛГОРОД – 2015**

Работа выполнена в ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

**Научный руководитель:** кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры экологии, физиологии и биологической эволюции ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород  
**Присный Андрей Андреевич**

**Официальные оппоненты: Сафонова Татьяна Алексеевна,** доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры общей физиологии биологического факультета ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург

**Зотин Алексей Александрович,** доктор биологических наук, ведущий сотрудник лаборатории эволюционной биологии развития ФГБУ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра РАН

Защита состоится «25» сентября 2015 г. в «10.00» часов на заседании диссертационного совета Д 220.004.01 при Белгородском государственном аграрном университете имени В.Я. Горина по адресу: 308503, Россия, Белгородская обл., Белгородский район, пос. Майский, ул. Вавилова 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Белгородский ГАУ им. В.Я. Горина», [www.bsaa.edu.ru](http://www.bsaa.edu.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Литвинов Юрий Николаевич

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Система циркуляции беспозвоночных до настоящего времени слабо изучена. В частности, в отношении клеточного состава и функционального статуса клеток циркулирующей жидкости моллюсков не сложилась единая точка зрения. Гемоциты моллюсков описывают как многофункциональные клеточные элементы. Они выполняют функцию переноса питательных веществ, а также иммунную функцию, функцию ранозаживления, перестройки тканей, восстановления поврежденных нервных волокон и, отчасти, выделительную функцию, вынося захваченные из гемолимфы инородные частицы за пределы тела (Галактионов В.Г., 1998). Однако вопросы, касающиеся конкретных функций разных типов клеток и влияния условий среды на функциональную активность гемоцитов, исследованы недостаточно подробно.

В современной литературе до сих пор нет единообразной типологии гемоцитов, основанной на общепринятых для классификации признаках. Известные классификации в основном исходят из постулата, что все гемоциты делятся на гранулоциты и гиалиновые клетки (Cheng T.C., 1981; Ratcliffe N.A., Söderhäll K., 1985). Согласно функциональной классификации выделяют стволовые клетки, фагоциты, гемостатически активные клетки, которые ответственны за поддержание гемостаза, и трофические клетки (Glinski Z., Jarosc J., 1997); а морфологически – круглые клетки и амебоциты (Sminia T., 1981; Hegaret H. et al., 2003). При этом функциональная классификация остается отдельным пластом знаний, который с морфологической типологией не связан. В целом, основные классификации базируются большей частью на морфологии и цитохимических особенностях, и, в меньшей степени, на изучении уникальных клеточных функций (Anderson R.S., 1987; Auffret M., 1988; Suresh K., Mohandas A., 1990; Söderhäll K., 2010).

Отсутствие критериев согласованной и единой классификации гемоцитов моллюсков затрудняет анализ и сравнение результатов работы разных исследовательских групп. Понимание классификации гемоцитов и соотнесение их морфофункциональных типов с типами циркулирующих клеток более высокоорганизованных групп животных важно для накопления информации о становлении функционального статуса форменных элементов в процессе эволюции.

**Степень разработанности темы исследования.** Исследования отечественных и зарубежных авторов выявляют в гемолимфе моллюсков разное число клеточных типов – от двух до множества (Glinski Z., Jarosc J., 1997; Barracco M.A. et al., 1993; Adamowicz A., Bolaczek M., 2003; Ракочий В.К., Громик О.А., 2009).

Изучены строение и функции амебоцит-продуцирующего органа моллюсков (Sminia T., 1981; Lie K.J., Heyneman D., 1976; Галактионов В.Г., 1998), клеточные реакции на вторжение в организм моллюска инородных тел, в частности, на трематодную инвазию (Sminia T., 1981, Sullivan J.T., 1990; Sullivan J.T. et al, 1995, 2004), гуморальные реакции, опосредуемые гемоцитами (Галактионов В.Г., 1998; Xing J. et al, 2002), взаимодействие гемоцитов друг с другом (Foley D.A., 1974; Hine P.M., 1999),

морфофункциональные особенности гемоцитов различных типов (Sminia T.A., 1981; Атаев Г.Л., Прохорова Е.Л., 2010).

К настоящему времени разработано несколько однотипных классификаций, основанных, преимущественно, на морфологических критериях (Wen С.Н., 1994; Carballal M.J. et al., 1997; Glinski Z., Jarosc J., 1997; Hegaret H. et al., 2003). Несмотря на множество работ по изучению морфофизиологических свойств гемоцитов моллюсков (Zbikowska E., 1998; Wootton E.C., Pipe R.K., 2003; Adamowicz A., Wolaczek M., 2003; Хлус Л.М., 2003), проблема их функциональной классификации по-прежнему остаётся актуальной для сравнительной физиологии.

Исследование динамики морфофизиологических показателей гемоцитов моллюсков (размеры, функциональная активность клеток, свойства клеточной мембраны) при изменении осмотического давления окружающей среды позволяет оценить адаптивные возможности и резистентность различных клеточных типов, таксономические отличия в реакциях клеточных элементов; получить новые данные об адаптивных механизмах системы циркуляции моллюсков.

С учетом вышесказанного была сформулирована цель исследования и поставлены основные задачи.

**Цель работы:** исследование функциональных и структурных характеристик гемоцитов отдельных представителей типа Mollusca в норме и при осмотической нагрузке.

**Задачи исследования:**

1. Разработать типологию гемоцитов представителей типа Mollusca.
2. Оценить фагоцитарную активность гемоцитов представителей типа Mollusca в условиях осмотической нагрузки.
3. Оценить митохондриальную активность гемоцитов представителей типа Mollusca в условиях осмотической нагрузки.
4. Проанализировать осморегуляторные реакции гемоцитов представителей типа Mollusca: изменение клеточного объема и упруго-эластических свойств мембраны, использование мембранного резерва.

**Научная новизна**

Впервые осуществлена типология форменных элементов гемолимфы у представителей типа Mollusca: *Helix pomatia*, *Stenomphalia ravergeri*, *Viviparus viviparus*, *Achatina fulica*, *Planorbarius corneus*, *Lymnaea stagnalis*, *Ampullaria australis*, *Anodonta cygnea* и *Dreissena polymorpha*, базирующаяся не только на морфологических критериях, и учитывающая комплекс морфофункциональных признаков.

Впервые исследованы осморегуляторные реакции различных типов гемоцитов моллюсков. Изучены изменения морфометрических показателей, потенциальный мембранный резерв клеток, упругостные и адгезионные свойства мембран гемоцитов, осуществлена оценка изменений топографии поверхности гемоцитов и их энергетического статуса в физиологических условиях и при осмотической нагрузке.

**Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные данные о функциональных и структурных свойствах гемоцитов моллюсков в различных осмотических условиях расширяют и углубляют существующие представления о клеточных механизмах осморе-

зистентности у беспозвоночных животных, и дают более полное представление о становлении этих механизмов в сравнительно-физиологическом аспекте. Полученные данные о функциональных реакциях гемоцитов на осмотический стресс можно применять при борьбе с видами-вредителями, а также в целях обеспечения большей продуктивности культивируемых видов моллюсков.

Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедре экологии, физиологии и биологической эволюции НИУ «БелГУ» при написании учебных и методических пособий по дисциплинам: «Биофизика», «Физиология животных» для студентов направления подготовки 020400.62 (06.03.01) – Биология; «Эволюционная физиология» для магистрантов по направлению 020400.68 (06.04.01) – Биология, магистерская программа «Физиология человека и животных».

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Идентифицировано четыре функциональных типа клеточных элементов циркуляции изученных представителей типа Mollusca: большие амебоциты, малые амебоциты, гранулярные клетки, круглые клетки.

2. Гемоциты исследованных видов типа Mollusca в пределах предъявленной осмотической нагрузки сохраняют способность к выполнению защитных функций.

3. Для гемоцитов изученных видов типа Mollusca характерна прямая взаимосвязь интенсификации внутриклеточных энергетических процессов с функциональной активностью клеток и изменениями осмолярности инкубационной среды.

4. Осморегуляторные реакции гемоцитов изученных представителей типа Mollusca включают в себя регуляцию клеточного объема, в том числе за счет использования мембранного резерва, и сопровождаются изменениями упруго-эластических свойств мембран клеточных элементов.

**Достоверность полученных результатов** подтверждается наличием репрезентативной выборки объектов, адекватной целям и задачам исследования, проведенного с помощью современных методик и сертифицированного высокоточного микроскопического оборудования (атомно-силовой микроскоп, система видеорегистрации и документирования изображений «ВидеоТест», конфокальный микроскоп), соответствующих компьютерных программ обработки и анализа изображений, большим объемом фактического материала, который обработан с использованием традиционных методов статистики, применяемых в биологических исследованиях, публикацией результатов работы в рецензируемых журналах.

**Личный вклад автора.** Основные результаты получены автором самостоятельно. Автор лично планировал эксперименты и обобщал полученные данные. Исследования с использованием световой, конфокальной и атомно-силовой микроскопии осуществлены самостоятельно. Выводы сделаны на основе собственных оригинальных данных.

#### **Апробация результатов работы**

Материалы, изложенные в диссертации, доложены и обсуждены на Всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми научного центра УО РАН «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике» (Сыктывкар, 2011, 2012), VII съез-

де казахского физиологического общества с международным участием «Современная физиология: от клеточно-молекулярной до интегративной – основа здоровья и долголетия», посвященного 100-летию академиков АН КАЗССР Н.У. Базановой и Ф.М. Мухамедгалиева. (Алматы, 2011), X Всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми научного центра УО РАН (Сыктывкар, 2011), III Съезде физиологов СНГ (Москва, 2011), XIV международном совещании и VII школе по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2011), Всероссийской научно-практической конференции «Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2011, 2012), Съезде физиологов с международным участием «VII Сибирский съезд физиологов» (Красноярск, 2012), II Международной научно-практической конференции памяти д.б.н. профессора М.А. Козлова, (Чебоксары, 2012), XII Международной научно-практической экологической конференции «Структурно-функциональные изменения в популяциях и сообществах на территориях с разным уровнем антропогенной нагрузки» (Белгород, 2012), IV Съезде биофизиков России «Физико-химические основы функционирования биополимеров и клеток» (Нижний Новгород, 2012), VII Международной конференции «Микромеханизмы пластичности разрушения и сопутствующих явлений» (Тамбов, 2013), XXII съезде Физиологического общества имени И.П. Павлова (Волгоград, 2013).

### Публикации

По теме диссертации опубликовано 27 научных работ общим объемом 11,3 п.л., авторский вклад – 7,3 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 186 страницах, содержит 47 таблиц и 84 рисунка. Список литературы включает 212 наименований, из которых 34 отечественных и 178 иностранных источников.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Объект исследования, организация эксперимента.** Для проведения исследования использовали половозрелых моллюсков класса **Gastropoda**: *Helix pomatia* (Linnaeus, 1758), *Stenomphalia ravergieri* (Férussac, 1855), *Lymnaea stagnalis* (Lamarck, 1799), *Viviparus viviparus* (Linnaeus, 1758), *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758), *Achatina fulica* (Férussac, 1821) и *Ampullaria australis* (Reeve, 1856); и **Bivalvia**: *Anodonta cygnea* (Lamarck, 1799), *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771).

Исследования выполнены с соблюдением всех требований Хельсинкской декларации по гуманному обращению с животными (Хельсинкская декларация этических принципов, 2008) и директивами Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях.

Для проведения серий эксперимента использовали гемолимфу 12 представителей каждого вида. Из системы циркуляции каждой особи обра-

ботано не менее 100 клеток. Гемолимфу моллюсков отбирали модифицированным стандартным методом (Присный А.А., 2013).

В первой серии экспериментов пробоподготовка включала следующие операции: гемолимфу помещали в пластиковые чашки Петри, по три пробы на особь. К пробам добавляли растворы различной осмолярности из расчета 1:1 и оставляли для 30-минутной инкубации. В данной части работы была исследована динамика следующих параметров: линейные размеры клеток по длинной/короткой оси, способность клеток к образованию псевдоподий с описанием характерных типов псевдоподий, образуемых клетками разных типов в условиях осмотической нагрузки, форма и относительный размер ядра, положение ядра в клетке, наличие/отсутствие и относительные размеры гранул. Также были изучены поведенческие особенности клеток, их активность, способность к закреплению на субстрате. Определение линейных размеров клеток, а также оценку визуальных параметров производили с помощью инвертированного оптического микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E в режиме дифференцированного контраста, с фиксацией изображений. Полученные фотографии обрабатывали с помощью ПО ВидеоТест-Размер 5.0 (ООО «Микроскоп Сервис», г. Санкт-Петербург). Всего в первой серии исследовано 2400 клеток.

Во второй серии исследований изучали фагоцитарную активность гемоцитов моллюсков. Полученную гемолимфу делили на 3 части, помещали в пластиковые чашки Петри, по три пробы на особь, приливали супернатант культуры *Saccharomyces cerevisiae*, разведенной в растворах с различной осмолярностью, и оставляли для взаимодействия на 30 минут в режиме видеосъемки с помощью инвертированного оптического микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E и программы Nis-Elements (Nikon). Впоследствии пробы дополнительно фотографировали для расчета фагоцитарного индекса (ФИ), равного отношению числа фагоцитировавших клеток к общему числу фагоцитов. Фагоцитарное число рассчитывали как среднее число клеток *S. cerevisiae*, нейтрализованных одним фагоцитом (Нишева Е.С., Галустьян А.Н., 2011). Всего во второй серии исследовано 2600 клеток.

В третьей серии экспериментов проводили исследование энергетического статуса гемоцитов *in vitro*. Полученную из тела моллюсков гемолимфу распределяли в пластиковые чашки Петри по 3 пробы на особь, приливали по 3 мкл раствора родамина Б (0,01 mM), приготовленного с использованием растворов NaCl различной осмолярности, и оставляли для взаимодействия и окрашивания в темноте на 30 минут. Полученные образцы исследовали с помощью конфокального микроскопа Nikon Digital Eclipse Ti-E с установленным лазерным модулем и программы C1 (Nikon). Обработку данных флуоресценции производили одновременно с получением изображений. Интенсивность флуоресценции измеряли стандартными средствами программы C1 для десяти клеток каждого типа в каждой пробе. Всего в третьей серии исследовано 2300 клеток.

В четвертой серии экспериментов анализировали осморезистентность гемоцитов. Для АСМ-исследований пробы гемолимфы наносили тонким слоем на предметные стекла (по 1 мкл на стекло), приливали растворы различной осмотичности (из расчета 1:1) и оставляли на 30 минут

для инкубации в закрытой камере с увлажненным сорбентом. Затем отбирали линзу жидкости (за прошедшее время гемоциты оседают на подложке, и вероятность их исключения из пробы с надосадочной жидкостью сводится к минимуму) и исследовали в режиме полуконтактного сканирования. Мембраны клеток при этом сохраняют свои прижизненные свойства. Полученные данные были обработаны при помощи ПО Nova 1.0.26.1508 (NT-MDT SPM Software, Зеленоград) и IA P9 Image Analysis 3.5.0.2070 (NT-MDT, Зеленоград). Всего в четвертой серии исследовано 2300 клеток.

**Осмотические тесты *in vitro*.** Осмотическую стойкость, осморегуляторные реакции гемоцитов моллюсков, а также использование ими мембранного резерва исследовали с помощью проб с осмотическими нагрузками. В качестве инкубационных сред со сниженной осмолярностью использовали растворы хлорида натрия – гипотонический (массовая доля NaCl = 0,2%) и гипертонический (массовая доля NaCl = 0,8%) (Присный А.А., 2013). После 30-минутной инкубации с растворами различной осмолярности пробу гемолимфы исследовали при помощи атомно-силового микроскопа с последующим определением значений упругости мембран гемоцитов, адгезии их к нанозонду, объема, площади и характера их поверхности. Об осморегуляторных реакциях клеток судили по показателю использования ими мембранного резерва. Мембранный резерв представляет собой разницу между объемом клетки в гипотоническом растворе и объемом клетки в изотонической среде (Raucher D., Sheetz M., 1999; Groulx N. et al., 2006; Федорова М.З., Левин В.Н., 2001; Зубарева Е.В., 2011):

$$\Delta V = V(\text{СГ}) - V(\text{И}), (1)$$

где  $\Delta V$  – резерв плазматической мембраны клетки ( $\text{мкм}^3$ );  $V(\text{СГ})$  – общий объем клетки, измеренный после инкубации клеток в сильно гипотоническом растворе ( $\text{мкм}^3$ );  $V(\text{И})$  – объем клетки после инкубации в изотоническом растворе ( $\text{мкм}^3$ ).

В качестве сравнительной характеристики использовали величину относительного мембранного резерва, рассчитываемую по формуле (Зубарева Е.В., 2011):

$$\Delta V_{\text{отн}} = \Delta V / V(\text{И}), (2)$$

где  $\Delta V_{\text{отн}}$  – относительный резерв плазматической мембраны (отн. ед.);  $\Delta V$  – резерв плазматической мембраны клетки ( $\text{мкм}^3$ );  $V(\text{И})$  – объем клетки в изотоническом растворе ( $\text{мкм}^3$ ).

Использование мембранного резерва клетками в гипотонической среде оценивали, вычисляя процент относительного мембранного резерва от абсолютного мембранного резерва, принимаемого за 100%.

#### Изучение топографии клеток и физических свойств мембраны

Использовали микромеханические зонды модели NSG-03 со значением жесткости 1,4 Н/м, с радиусом закругления 10 нм, частотой развертки сканирования порядка 0,6-0,8 Нз. Сканирование образцов проводили в полуконтактном режиме. Определение упругостных характеристик мембран клеток и силы адгезии нанозонда к образцу выполнено методом спектроскопии в контактном режиме.

Расчеты и оценку параметров упругости и адгезии клеточных мембран к нанозонду производили с помощью программного обеспечения Im-



age Analysis P9 BUILD 3.5.0.2069 (NT-MDT). Параметр адгезии клеточной мембраны к нанозонду рассчитывали по формуле (Мионов В.Л., 2007):

$$F=k \cdot D_x \text{ (закон Гука),}$$

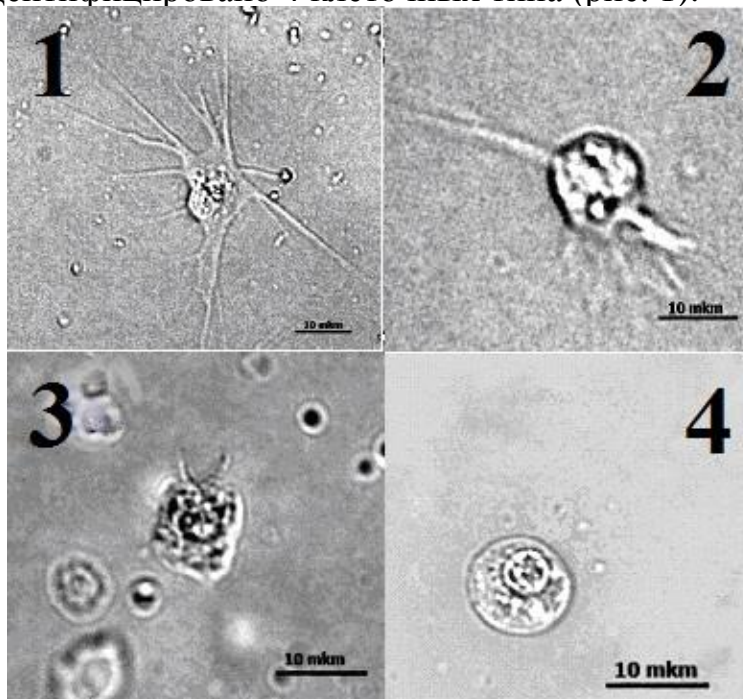
где  $k$  – значение жесткости кантилевера,  $D_x$  – вычисляемый параметр ( $=\Delta \text{Height}$ ).

**Методы статистической обработки.** Итоговые результаты были обработаны методами вариационной статистики (Лакин Г.Ф., 1990). С помощью компьютерной программы Excel 7.0 вычисляли значение средней арифметической выборочной совокупности ( $M$ ) и стандартной ошибки среднего значения ( $m$ ). Статистический анализ результатов экспериментов проведен с применением критерия Стьюдента для 5%-го уровня значимости.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 1. Типология клеточных элементов гемолимфы моллюсков

Показано, что типологически клеточный состав гемолимфы всех изученных видов моллюсков единообразен. В результате проведенного исследования идентифицировано 4 клеточных типа (рис. 1).



**Рис. 1 – Типы гемоцитов моллюсков: 1 – большой амебоцит *L. stagnalis*, 2 – малый амебоцит *L. stagnalis*, 3 – гранулярная клетка *A. fulica*, 4 – круглая клетка *V. viviparus***

Морфометрические показатели этих клеточных типов могут существенно варьировать в зависимости от размеров тела и вида животного, однако соотношение линейных размеров у разных типов клеток остается неизменным. Большие амебоциты имеют максимальный размер у всех изученных моллюсков. В зависимости от вида, их максимальный линейный размер составляет от 10 до 22 мкм. Малые амебоциты в среднем в 1,5 раза меньше больших амебоцитов. Гранулярные клетки и округлые клетки имеют приблизительно одинаковые размеры, в среднем они в 2 раза меньше больших амебоцитов. Форма клеток различных типов также может от-

личаться у разных видов моллюсков, однако существуют специфические черты, присущие каждому отдельному типу, которые позволяют отличить клетки одного типа от остальных.

Большие амебоциты соответствуют амебоцитам, описанным в литературе (Wagge L.E., 1955; Sminia T., 1981; Brown M., Brown R., 2002). Обычно это клетки нестабильной формы, максимального для каждого вида размера, с множеством псевдоподий. Ядро овальной или округлой формы, чаще всего располагается ближе к периферии. В цитоплазме находятся гранулы и множество вакуолей разного размера. Основной функцией больших амебоцитов, по-видимому, является фагоцитоз. Клетки отличаются высокой фагоцитарной активностью, способны закрепляться на субстрате и после закрепления передвигаться в сторону инородных частиц, с последующим захватом.

Малые амебоциты – это клетки среднего размера, непостоянной формы, обладающие разнородными псевдоподиями по периферии, среди которых преобладают лобоподии. Малые амебоциты способны к активному передвижению после закрепления на субстрате. Ядро чаще всего располагается ближе к периферии, в цитоплазме содержатся мелкие вакуоли и единичные гранулы. В большинстве случаев клетки этого типа в гемолимфе встречаются в виде агрегатов, что отчасти объясняется их специфической функцией – в гемолимфе агрегаты малых амебоцитов окружают большие инородные частицы и изолируют их. Даже находясь в агрегированном состоянии, клетки не теряют способности к передвижению, и зачастую бывает сложно определить границы каждой отдельной клетки, входящей в состав функциональной единицы.

Гранулярные клетки – это клетки небольшого размера, близкой к овальной формы, часто с тонкими короткими лобоподиями. Ядерная часть клетки, как правило, окружена слоем прозрачной цитоплазмы. Ядро мелкое, округлое, занимает центральное положение. В цитоплазме содержится большое число гранул. Клетки данного типа не участвуют в фагоцитозе инородных частиц. При закреплении на поверхности принимают форму, характерную для всех клеток этого типа – наружный слой цитоплазмы «расплывается» и окружает внутреннюю часть клетки прозрачным ареолом. Закрепленные клетки теряют способность к передвижению, однако они могут ограниченно перемещаться на небольшое расстояние, где снова произойдет закрепление. Основная функция гранулярных клеток не установлена. Можно предположить, что функция этих клеток аналогична функции гранулоцитов крови позвоночных – уничтожение бактерий и инактивация токсинов, попавших в организм.

Круглые клетки, очевидно, аналогичны бластоподобным клеткам (Gorbushin A.M., 2006). Их форма близка к шарообразной, размер в зависимости от вида моллюска составляет от 5 до 12 мкм. Эти клетки не способны к активному передвижению и перемещаются с током жидкости. В цитоплазме содержатся мелкие вакуоли и различные по размеру гранулы. Ядро округлое, средних размеров, чаще всего располагается ближе к центру. Таким образом, круглые клетки лишены каких-либо специфических признаков и, вполне вероятно, что этот тип клеток гетерогенен по выполняемым функциям. Морфологически они сходны с недифференцирован-

ными кроветворными клетками-предшественниками позвоночных. Можно предположить, что, по крайней мере, часть их также выполняет функцию кроветворения, поддержания количества других клеток внутренней среды.

## 2. Результаты исследования фагоцитарной активности гемоцитов в условиях осмотической нагрузки

Наибольшей фагоцитарной активностью у всех изученных представителей моллюсков обладают большие амебоциты (табл. 1). Большие амебоциты виноградной улитки способны поглощать до 8 чужеродных клеток. Малые амебоциты также способны к фагоцитированию мелких частиц, хотя в эксперименте с *S. cerevisiae* в абсолютном большинстве случаев они проявляли исключительно инкапсуляторную активность. В опытах с осмотической нагрузкой достоверных изменений фагоцитарной активности больших амебоцитов исследованных видов моллюсков не выявлено.

**Таблица 1 - Значения фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа больших амебоцитов изученных представителей типа Mollusca**

Вид моллюска	Фагоцитарный индекс	Фагоцитарное число
Класс Gastropoda		
<i>H. pomatia</i>	0,89	4,42±1,76
<i>S. ravigieri</i>	0,29	1,20±0,41
<i>V. viviparus</i>	0,58	1,94±0,99
<i>A. fulica</i>	0,61	2,47±1,45
<i>P. corneus</i>	0,49	1,39±0,58
<i>L. stagnalis</i>	0,42	1,90±0,88
<i>A. australis</i>	0,44	1,47±0,68
Класс Bivalvia		
<i>A. cygnea</i>	0,33	2,58±0,97
<i>D. polymorpha</i>	0,48	1,76±0,72

Таким образом, большие амебоциты обладают способностью к осморегуляции и преодолевают осмотическую нагрузку в среднем за 5-7 минут. Большие амебоциты, претерпевавшие значительные изменения в результате изменения осмолярности окружающего раствора, в фагоцитозе не участвуют.

## 3. Оценка энергетического статуса гемоцитов изученных представителей типа Mollusca в условиях осмотической нагрузки

Энергетический статус клеток оценивали путем измерения интенсивности флуоресценции после окрашивания родамином Б – потенциал-зависимым красителем, интенсивность флуоресценции которого тем больше, чем больше относительное количество активных митохондрий (Reungpatthanaphong P.L. et al., 2003).

Максимальный уровень флуоресценции (табл. 2) характерен для больших амебоцитов (в среднем он составляет 280 у.е., достигая 417,3 у.е. у *A. cygnea*).

Минимальный уровень флуоресценции выявлен у круглых клеток, в среднем – 164 у.е. Соотношение между уровнями флуоресценции разных

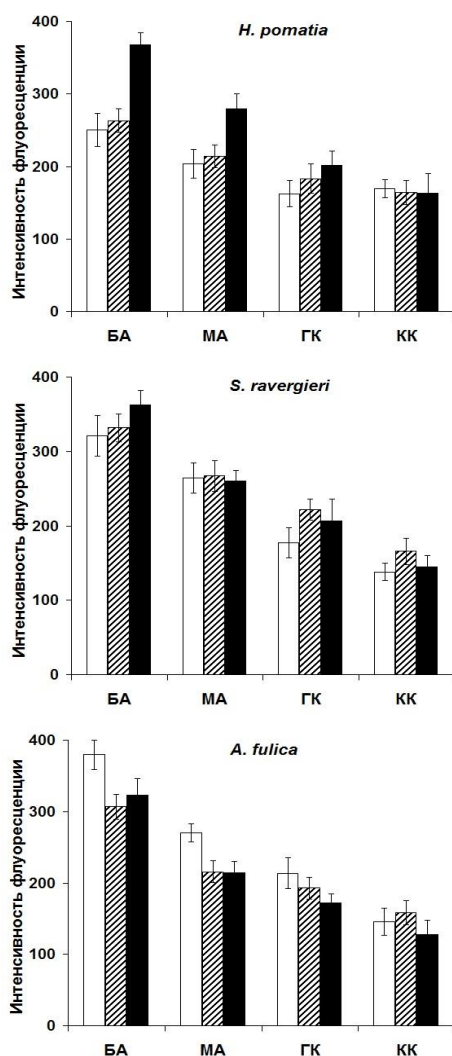
клеточных типов не зависит от осмотической нагрузки и видовой принадлежности. В среднем уровень флуоресценции малых амебоцитов составляет 80% от уровня флуоресценции больших амебоцитов, гранулярных клеток – 70%; круглых клеток – 60%.

**Таблица 2 – Интенсивность флуоресценции гемоцитов представителей типа Mollusca, инкубированных в средах с различной осмолярностью, у.е.**

Наименование вида	Большие амебоциты	Малые амебоциты	Гранулярные клетки	Круглые клетки
<i>Гипотоническая среда</i>				
Класс Gastropoda				
<i>H. pomatia</i>	250,20±22,58	203,56±19,87	162,50±18,26	169,44±12,27
<i>S. ravergeri</i>	320,90±27,59	264,25±20,68	177,00±20,49	138,20±11,37
<i>V. viviparus</i>	160,40±18,60	141,50±16,11	121,60±14,39	129,60±11,50
<i>A. fulica</i>	379,50±20,58	270,30±12,46	213,60±21,46	145,40±18,84
<i>P. corneus</i>	193,90±18,22	181,70±15,95	181,10±16,83	147,30±17,86
<i>L. stagnalis</i>	367,70±23,66	307,20±17,18	-	156,10±12,76
<i>A. australis</i>	256,50±15,69	163,20±12,20	-	181,90±19,83
Класс Bivalvia				
<i>A. cygnea</i>	297,6±16,42	306,6±20,37	308,80±19,07	345,50±20,61
<i>D. polymorpha</i>	196,50±11,79	174,00±17,50	192,40±11,36	126.70±12.97
<i>Изотоническая среда</i>				
Класс Gastropoda				
<i>H. pomatia</i>	263,30±16,31	213,89±15,96	183,20±20,34	164,50±16,68
<i>S. ravergeri</i>	332,00±18,84	267,00±20,88	221,83±14,14	166,00±17,70
<i>V. viviparus</i>	260,50±28,22	184,20±27,38	135,60±16,27	123,10±12,40
<i>A. fulica</i>	306,70±17,58	215,50±15,30	193,00±15,44	158,10±16,87
<i>P. corneus</i>	214,40±20,98	181,10±16,67	174,80±14,00	153,10±18,35
<i>L. stagnalis</i>	317,90±25,78	260,00±16,53	-	151,10±17,23
<i>A. australis</i>	270,89±17,31	205,67±18,25	-	194,20±15,74
Класс Bivalvia				
<i>A. cygnea</i>	417,30±22,45	315,80±33,70	312,3±17,91	276,80±19,08
<i>D. polymorpha</i>	171,50±13,75	171,00±17,16	129,20±10,47	108.30±14.58
<i>Гипертоническая среда</i>				
Класс Gastropoda				
<i>H. pomatia</i>	367,89±16,04	279,56±20,59	202,00±19,52	162,75±26,92
<i>S. ravergeri</i>	362,80±19,26	260,29±14,59	206,60±29,07	144,90±14,91
<i>V. viviparus</i>	298,80±23,39	292,10±14,78	220,40±20,91	195,70±22,29
<i>A. fulica</i>	323,30±22,87	213,90±16,56	172,40±12,54	128,20±19,40
<i>P. corneus</i>	212,00±22,64	221,70±12,19	157,00±18,46	150,20±12,03
<i>L. stagnalis</i>	345,70±18,33	237,60±14,49	-	157,40±17,12
<i>A. australis</i>	153,40±18,71	117,10±10,53	-	101,00±7,09
Класс Bivalvia				
<i>A. cygnea</i>	523,00±28,63	410,70±25,87	340,90±26,50	347,00±27,55
<i>D. polymorpha</i>	205,20±16,93	145,00±14,27	180,90±15,37	159.90±19.05

Снижение митохондриальной активности в ряду большие амебоциты – малые амебоциты – гранулярные клетки – круглые клетки представляется закономерным, исходя из специфических функций клеток, – большие амебоциты имеют наибольшие энергетические запросы в связи со способностью к активному передвижению и фагоцитозу, который требует быстрого изменения формы клетки (Stang-Voss С., 1970; Yoshino Т.Р., 1976). Низкая энергопотребность круглых клеток объясняется пассивным передвижением и отсутствием способности к образованию псевдоподий и поглощению чужеродных агентов.

Клетки разнородно реагируют на повышение/снижение осмолярности инкубационного раствора у разных видов. Это хорошо видно из рисунка 2, на котором представлены данные по 3 видам наземных брюхоногих моллюсков: большие амебоциты *H. pomatia* энергетически наиболее активны в гипертонической среде, большие амебоциты *A. fulica* – в гипотонической среде. Активность большие амебоциты *S. ravergeri* не зависит от осмотичности среды.



**Рис. 2 – Интенсивность флуоресценции (у.е.) разных клеточных типов в разных условиях среды у 3 видов наземных брюхоногих моллюсков.**

Белые столбцы – гипотоническая среда; штрихованные столбцы – изотоническая среда; черные столбцы – гипертоническая среда. БА – большие амебоциты; МА – малые амебоциты; ГК – гранулярные клетки; КК – круглые клетки.

Достоверное изменение митохондриальной активности в зависимости от осмотичности среды показано и для других клеточных типов. Виды и типы клеток, для которых были установлены достоверные различия, приведены в таблице 3.

Корреляции наблюдаемых различий с типом клеток, таксономической принадлежностью или образом жизни моллюсков обнаружить не удалось.

#### 4. Динамика морфофизиологических характеристик гемоцитов в условиях осмотической нагрузки

При изучении воздействия осмотической нагрузки на гемоциты моллюсков выявлены общие для большинства изученных видов закономерности реагирования, связанные с функциональной активностью исследуемых клеточных элементов.

Для сухопутных моллюсков в условиях спячки свойственно повышение осмолярности гемолимфы. Подобные изменения внутренней среды не должны вызывать нарушения функций гемоцитов в соответствующих пределах стрессовой нагрузки. Равно как и снижение осмолярности среды в периоды повышенной атмосферной влажности и в условиях интенсивного подошвенного питания не должно влиять на выполнение гемоцитами защитных функций. Пресноводные моллюски всегда гипертоничны в отношении окружающей среды и активно поддерживают осмотическое давление внутренней среды. Вместе с тем они в меньшей степени приспособлены к повышению осмолярности внутренней среды из-за меньшей изменчивости среды обитания.

**Таблица 3 – Изменение митохондриальной активности различных клеточных типов в зависимости от осмотических условий**

Условия	Изменение активности*	Большие амебоциты	Малые амебоциты	Гранулярные клетки	Круглые клетки
Гипотоническая среда	Увеличение	<i>A. fulica</i> <sup>1</sup>	<i>A. fulica</i> <sup>1</sup>	<i>D. polymorpha</i> <sup>3</sup>	<i>A. cygnea</i> <sup>1</sup>
	Уменьшение	<i>A. cygnea</i> <sup>3</sup> <i>V. viviparus</i> <sup>3</sup>	-	-	-
Гипертоническая среда	Увеличение	<i>A. cygnea</i> <sup>2</sup> <i>H. pomatia</i> <sup>3</sup>	<i>A. cygnea</i> <sup>1</sup> <i>H. pomatia</i> <sup>1</sup> <i>V. viviparus</i> <sup>3</sup>	<i>D. polymorpha</i> <sup>1</sup> <i>V. viviparus</i> <sup>3</sup>	<i>D. polymorpha</i> <sup>1</sup> <i>V. viviparus</i> <sup>2</sup>
	Уменьшение	<i>A. australis</i> <sup>3</sup>	<i>A. australis</i> <sup>3</sup>	-	<i>A. australis</i> <sup>3</sup>

Примечания: \* по сравнению с изотоническими условиями. Уровни значимости по критерию Стьюдента: <sup>1</sup> -  $p < 0.05$ ; <sup>2</sup> -  $p < 0.01$ ; <sup>3</sup> -  $p < 0.001$ . Для *L. stagnalis*, *P. corneus*, *S. ravergieri* достоверного изменения митохондриальной активности не обнаружено.

В гипосмотическом растворе большие амебоциты увеличиваются в размерах в среднем на 15%, активность их на некоторое время снижается, но, спустя 5-7 минут, подвижность клеток, количество выпускаемых псевдоподий и фагоцитарная активность восстанавливается.

В условиях гиперосмотической среды большие амебоциты снижают активность, число выпускаемых псевдоподий уменьшается, среди псевдоподий начинают преобладать филоподии, расстояние между которыми су-

щественно увеличивается. Клетки закрепляются на субстрате и на некоторое время приостанавливают фагоцитарную активность. Такой тип реакции характерен для больших амебоцитов почти всех исследованных видов. Исключение составляет *A. fulica*. Большие амебоциты этого вида при повышении осмотического давления сливаются в агрегаты и покрывают субстрат аморфной сетью, которая, однако, не теряет фагоцитарной активности.

Малые амебоциты в гипотонической среде, как правило, увеличиваются в размерах в среднем на 25%, агрегируют и закрепляются на субстрате, снижая активность и уменьшая количество выпускаемых псевдоподий. В условиях повышенной осмолярности клетки, наоборот, уменьшаются в размерах и прекращают фагоцитарную активность.

Гранулярные клетки при понижении концентрации солей в инкубационной среде могут увеличиваться в размерах до 30%, хотя, следует отметить, что подобный эффект проявляется не у всех изученных видов. При этом псевдоподии, как правило, становятся короче, активность клеток снижается, они закрепляются на субстрате и теряют способность к передвижению. В гипертоническом растворе клетки чаще всего не изменяют размеров. Нередки случаи, когда инкубированные в гиперосмотическом растворе клетки прекращают закрепляться на субстрате и перемещаются с током жидкости.

Круглые клетки при понижении осмотического давления, как правило, увеличиваются в размерах до 30%. В гиперосмотической среде наблюдается некоторое уменьшение линейных размеров клеток, однако чаще клетки не проявляют выраженных реакций.

## 5. Использование мембранного резерва гемоцитами моллюсков

Одной из морфофункциональных особенностей гемоцитов моллюсков является наличие мембранного резерва, что проявляется в выраженной складчатости плазмалеммы. Мембранный резерв может использоваться для образования фагосом, формирования псевдоподий при амёбоидном движении.

**Таблица 4 – Показатели мембранного резерва гемоцитов моллюсков**

Наименование вида	Мембранный резерв, $\mu\text{m}^3$			
	Большие амебоциты	Малые амебоциты	Гранулярные клетки	Круглые клетки
Класс <i>Gastropoda</i>				
<i>H. pomatia</i>	0	38,49±1,35	14,96±3,01	0
<i>S. ravigieri</i>	38,35±1,64	35,80±1,13	17,93±2,87	6,57±1,68
<i>V. viviparus</i>	20,60±2,11	0	8,79±1,56	0
<i>A. fulica</i>	12,97±3,52	14,65±1,27	9,08±1,31	0
<i>P. corneus</i>	8,05±1,78	1,53±0,47	4,01±1,68	3,55±1,13
<i>L. stagnalis</i>	35,13±4,82	0	0	29,27±3,54
<i>A. australis</i>	5,93±2,52	12,51±4,83	0	5,04±1,96
Класс <i>Bivalvia</i>				
<i>A. cygnea</i>	0	23,35±3,69	12,48±1,82	0
<i>D. polymorpha</i>	11,78±2,26	0	1,61±0,71	0

В результате проведенного исследования были получены данные об использовании мембранного резерва гемоцитами отдельных представителей типа Mollusca в гипоосмотических условиях (табл. 4).

Средние показатели мембранного резерва фагоцитирующих клеток (БА и МА) близки и составляют  $14,4 \pm 3,4 \mu\text{m}^3$ . Для нефагоцитирующих клеток (ГК и КК) значение показателя приблизительно в 2 раза меньше –  $6,3 \pm 1,9 \mu\text{m}^3$ . Таким образом, фагоциты имеют большую потенциальную способность увеличивать размеры по сравнению с другими гемоцитами.

В результате сопоставления полученных данных по клеточным типам было установлено, что показатель мембранного резерва гемоцитов увеличивается в ряду: *D. polymorpha* ( $3,3 \mu\text{m}^3$ ) – *P. corneus* ( $4,3 \mu\text{m}^3$ ) – *A. australis* ( $5,9 \mu\text{m}^3$ ) – *V. viviparus* ( $7,3 \mu\text{m}^3$ ) – *A. cygnea* ( $9,0 \mu\text{m}^3$ ) – *A. fulica* ( $9,2 \mu\text{m}^3$ ) – *H. pomatia* ( $13,4 \mu\text{m}^3$ ) – *L. stagnalis* ( $16,1 \mu\text{m}^3$ ) – *S. ravergeri* ( $24,7 \mu\text{m}^3$ ). Корреляции между показателем мембранного резерва и таксономической принадлежностью или экологическими видовыми особенностями обнаружить не удалось.

#### **6. Упруго-эластические свойства плазмалеммы гемоцитов представителей типа Mollusca в условиях осмотической нагрузки**

Исследование упруго-эластических свойств гемоцитов моллюсков показало, что динамика показателей адгезии и упругости мембран в условиях осмотического стресса связана с защитной активностью клеточных элементов.

У большинства изученных видов максимальными значениями силы адгезии обладают малые амебоциты, что связано с выполнением ими инкапсуляторной функции, которая требует объединения клеток в агрегаты для выполнения защитных функций. Однако и другие клеточные элементы способны проявлять высокую адгезионную способность. Так, наибольшей силой адгезии у *H. pomatia* обладают малые амебоциты, у *S. ravergeri* – малые амебоциты и круглые клетки, у *V. viviparus* – гранулярные клетки, у *A. cygnea* – малые амебоциты, у *D. polymorpha* – малые амебоциты, у *A. fulica* – большие амебоциты и малые амебоциты, у *P. corneus* – круглые клетки, у *L. stagnalis* – большие амебоциты и малые амебоциты, у *A. australis* – большие амебоциты и круглые клетки.

У большинства изученных видов максимальное значение параметра упругости характерно для круглых клеток, с чем, очевидно, связан тот факт, что эти клетки не способны к изменению формы и образованию лобоподий. Наибольшими значениями параметра упругости у *H. pomatia* обладают круглые клетки, у *S. ravergeri* – круглые клетки, у *V. viviparus* – круглые клетки, у *A. cygnea* – большие амебоциты, у *D. polymorpha* – малые амебоциты, у *A. fulica* – большие амебоциты, у *P. corneus* – круглые клетки, у *L. stagnalis* – малые амебоциты, у *A. australis* – малые амебоциты.

Наименее восприимчивыми к изменениям осмолярности инкубационного раствора в рамках изучаемых параметров оказались большие амебоциты. У пяти из девяти изученных видов они не проявляли достоверных изменений показателей упругости и силы адгезии мембран к нанозонду, у двух представителей в ответ на изменение осмолярности среды менялись только значения показателя упругости мембран клеток (*L. stagnalis* и *H.*



*potatia*), у *D. polymorpha* в ответ на повышение осмотичности среды изменялся только уровень адгезии мембраны к нанозонду, у *A. australis* гемоциты оказались восприимчивы к любому изменению осмолярности инкубационного раствора (табл. 5).

Малые амебоциты четырех представителей (*H. pomatia*, *S. ravergeri*, *A. cygnea* и *V. viviparus*) не проявляют достоверных реакций на изменение осмолярности инкубационного раствора. У *P. corneus*, *A. fulica* и *L. stagnalis* в ответ на изменение концентрации солей в растворе достоверные реакции были зафиксированы только в отношении показателя упругости мембран малых амебоцитов. У малых амебоцитов *D. polymorpha* в условиях гипотонической среды изменялся только показатель адгезии мембран к нанозонду. Малые амебоциты *A. australis* (табл. 5) были восприимчивы к любому изменению осмолярности по обоим изученным параметрам.

**Таблица 5 – Параметры гемоцитов *L. stagnalis* и *A. australis*, как наиболее восприимчивых к осмотической нагрузке представителей, полученные с применением СЗМ после инкубации в средах с различным осмотическим давлением**

<i>L. stagnalis</i>			<i>A. australis</i>		
Тип клеток/показатели	Адгезия мембран гемоцитов к нанозонду, nN	Модуль упругости мембран гемоцитов, kPa	Тип клеток/показатели	Адгезия мембран гемоцитов к нанозонду, nN	Модуль упругости мембран гемоцитов, kPa
Гипотоническая среда					
Большие амебоциты	8,38±1,38	18,92±0,60*	Большие амебоциты	16,52±0,28	41,25±4,31*
Малые амебоциты	11,88±2,86	22,83±3,24*	Малые амебоциты	13,28±1,84	51,19±1,28*
Круглые клетки	10,24±2,07*	25,95±4,42	Круглые клетки	12,80±2,52	42,18±2,31
Изотоническая среда					
Большие амебоциты	8,82±2,42	30,90±1,36	Большие амебоциты	15,92±0,32	50,82±0,63
Малые амебоциты	8,85±1,79	34,52±3,55	Малые амебоциты	14,49±0,38	67,48±0,58
Круглые клетки	5,83±1,11	29,28±1,45	Круглые клетки	15,69±0,66	39,90±0,81
Гипертоническая среда					
Большие амебоциты	8,07±2,60	29,99±1,18	Большие амебоциты	11,63±2,86	39,56±1,56*
Малые амебоциты	7,31±2,06	28,31±1,55*	Малые амебоциты	10,68±1,37*	45,64±1,85*
Круглые клетки	8,03±3,99	22,88±2,08	Круглые клетки	16,54±1,91	31,68±2,89*

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

Гранулярные клетки двух из изученных представителей (*A. cygnea* и *V. viviparus*) не проявляют достоверных реакций на инкубацию в растворах

с различной осмолярностью. У *A. australis* и *L. stagnalis* (табл. 5) гранулярные клетки в гемолимфе не обнаружены. У *A. fulica*, *P. corneus* и *S. ravergeri* в ответ на изменение осмолярности инкубационного раствора изменяется только параметр упругости гранулярных клеток. У гранулярных клеток *H. pomatia* в ответ на изменение осмолярности среды изменяются оба изученных в ходе данного эксперимента параметра.

Круглые клетки двух изученных представителей (*D. polymorpha* и *S. ravergeri*) по уровню показателей упругости и адгезии плазмалеммы к нанозонду показали высокий уровень резистентности к изменениям осмолярности среды. У круглых клеток *H. pomatia*, *V. viviparus* и *L. stagnalis* (табл. 5) в ответ на изменение осмотического давления инкубационного раствора изменялся только показатель адгезии, а у круглых клеток *A. fulica*, *P. corneus*, *A. australis* и *A. cygnea* – только параметр упругости клеточных мембран.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования показано, что по морфофункциональным характеристикам клеточный состав у разных таксономических групп брюхоногих и двустворчатых моллюсков представлен 4 клеточными типами: большие амебоциты (основная функция – фагоцитоз), малые амебоциты (основная функция – инкапсуляция чужеродных объектов), гранулярные клетки (основная функция – инактивация вредных для организма веществ) и круглых клеток (основная функция не установлена; по-видимому, в состав этой группы входят недифференцированные предшественники клеток тканей внутренней среды).

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. Высокий уровень резистентности клеток к осмотической нагрузке обеспечивается энергозатратным процессом осморегуляции, что доказывают исследования митохондриальной активности.

Клеткам изученных представителей типа Mollusca присущи стереотипные реакции в ответ на изменение осмолярности инкубационного раствора. Так, например, при снижении осмотического давления среды у клеток большинства изученных моллюсков наблюдается сглаживание плазмалеммы и увеличение клеток в объеме. В то же время для некоторых представителей выявлено наличие атипичных реакций, когда увеличение линейных размеров гемоцитов и повышение упругости клеточных мембран является ответом на инкубацию в гипертонической среде.

### ВЫВОДЫ

1. Клеточный состав гемолимфы всех исследованных видов моллюсков типологически единообразен. По морфофункциональным характеристикам идентифицировано 4 типа клеток: большие амебоциты, малые амебоциты, гранулярные клетки и круглые клетки

2. Изменение осмолярности инкубационного раствора не влияет на фагоцитарную активность клеточных элементов изученных представителей типа Mollusca. В условиях осмотической нагрузки гемоциты моллюсков сохраняют способность к выполнению защитных функций.

3. Изменение осмотичности инкубационного раствора по-разному воздействует на интенсивность митохондриальной активности клеток гемолимфы разных типов. Если для больших амебоцитов отмечено возрастание митохондриальной активности при инкубации в условиях гипертонаии, то круглые клетки нескольких представителей (*H. pomatia*, *S. ravergeri*, *A. fulica*, *P. corneus*, *L. stagnalis*) практически не показывают выраженных реакций по данному параметру в ответ на изменения осмолярности окружающего раствора.

4. Гемоциты исследованных видов класса Gastropoda в условиях осмотической нагрузки проявляют способность регулировать объем клетки. Диапазон изменений объема больших амебоцитов *V. viviparus* достигает 26% ( $p < 0,05$ ). Реакция на осмотическую нагрузку гемоцитов представителей класса Bivalvia.

5. Участие мембранного резерва в регуляции клеточного объема у фагоцитирующих клеток гемолимфы (больших и малых амебоцитов) приблизительно в 2 раза выше, чем у других клеточных элементов (гранулярных и круглых клеток). Показатели резерва гемоцитов разных видов моллюсков широко варьируют, их корреляции с таксономической принадлежностью и экологическими особенностями вида обнаружить не удалось.

6. Гемоциты большинства представителей типа Mollusca реагируют на снижение осмотического давления сглаживанием структуры микрорельефа и увеличением высоты клеток. Исключение составляют *L. stagnalis* и *A. australis*, характер изменения сил упругости и адгезии мембран гемоцитов которых при снижении осмолярности раствора демонстрирует высокий уровень восприимчивости клеточных типов к осмотической нагрузке.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Комплексный подход, заключающийся в исследовании микрорельефа поверхности, объемной морфометрии, упругости и силы адгезии гемоцитов с использованием инструментария атомно-силовой микроскопии может быть рекомендован для исследования морфофункционального состояния клеток гемолимфы представителей видов культивируемых моллюсков.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

#### Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобразования и науки РФ:

1. Присный А.А., Кулько С.В., Пигалева Т.А. Морфофункциональные особенности форменных элементов гемолимфы виноградной улитки (*Helix pomatia*) // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Естественные науки. – 2010. – № 21 (92). Выпуск 13. – С. 73-76.

2. Присный А.А., **Кулько С.В.**, Пигалева Т.А. Морфофункциональные особенности гемоцитов сухопутных брюхоногих моллюсков // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 5. – С. 206-210.

3. Присный А.А., **Кулько С.В.**, Пигалева Т.А. Исследование фагоцитарной активности гемоцитов *Helix pomatia* и *Lumbricus terrestris* // Аллергология и иммунология. – 2011. – Т. 12, №3. – С. 303-304.

4. Присный А.А., **Кулько С.В.** Морфофункциональные особенности гемоцитов брюхоногого моллюска *Stenomphalia ravergieri* (Ferussac) // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Естественные науки. – 2012. - № 9 (128). Выпуск 19. – С. 90-95.

5. Присный А.А., **Кулько С.В.** Показатели упругости и адгезии клеточных мембран гемоцитов моллюсков // Вестник Тамбовского университета. Серия Естественные и технические науки. – 2013. – Том 18. Выпуск 4. – С. 1633-1634.

#### **Публикации в других изданиях:**

1. **Кулько С.В.** Морфофункциональные особенности гемоцитов брюхоногих пульмонат *Helix pomatia* и *Stenomphalia ravergieri* // Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике. Материалы X Всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми научного центра УО РАН. – Сыктывкар, 2011. – С. 115-118.

2. **Кулько С.В.** Морфофункциональные особенности гемоцитов брюхоногих пульмонат *Helix pomatia* и *Stenomphalia ravergieri* // Материалы X Всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми научного центра УО РАН. – Сыктывкар, 2011. – С. 167-170.

3. **Кулько С.В.** Морфофункциональные особенности гемоцитов брюхоногих моллюсков *Ampullaria australis* // Сборник трудов международной конференции молодых ученых «Вклад молодых ученых в биологические исследования». – Иркутск, 2012. – С. 74-76.

4. **Кулько С.В.** Упругостные и адгезионные свойства клеточных мембран гемоцитов моллюска *Stenomphalia ravergieri* // Материалы XI Всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми научного центра УО РАН. – Сыктывкар, 2012. – С. 124-126.

5. **Кулько С.В.** Влияние осмотического давления на показатели упругости и адгезии мембран гемоцитов виноградной улитки (*Helix pomatia*) // Материалы Съезда физиологов с международным участием «VII Сибирский съезд физиологов». – Красноярск, 2012. – С. 284-285.

6. Prisky A.A., Pigaleva T.A., **Kulko S.V.**, Grebcova E.A. A comparative analysis of the strategy of the blood cells movement in some invertebrates // Biological Motility: Fundamental and Applied Science. – Pushchino, 2012. – P. 169-172.

7. **Кулько С.В.** Показатели упругости и адгезии клеточных мембран гемоцитов *Anodonta cygnea* // Материалы докладов 4 Съезда биофизиков России. – Нижний Новгород, 2012. – С. 168.

8. **Кулько С.В.** Динамика показателей энергетического статуса гемоцитов некоторых представителей класса Gastropoda (Mollusca) в условиях осмотической нагрузки // Научный результат. Серия «Физиология». – 2014. – № 1 (1). – С. 42-48.

**КУЛЬКО СВЕТЛАНА ВЛАДИМИРОВНА**

**Морфофункциональная характеристика  
гемоцитов моллюсков (Gastropoda, Bivalvia)  
в норме и при осмотической нагрузке**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук