

*На правах рукописи*

**ПИГАЛЕВА Татьяна Александровна**

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ  
И ОСМОРЕГУЛЯТОРНЫЕ РЕАКЦИИ  
КЛЕТОЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ СИСТЕМЫ ЦИРКУЛЯЦИИ  
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КЛАССА CLITELLATA**

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 «24» 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.** Отправной точкой развития представлений о защитных функциях клеток системы циркуляции беспозвоночных можно считать открытие фагоцитоза И.И. Мечниковым. Однако современных данных об особенностях функционирования клеточных элементов циркулирующей жидкости беспозвоночных совершенно недостаточно для формирования системы знаний об эволюции этой системы поддержания гомеостаза.

До настоящего времени единая общепринятая классификация клеточных элементов внутренней среды беспозвоночных не разработана. Особый интерес с точки зрения сравнительной физиологии представляют клеточные элементы и система циркуляции кольчатых червей. Аннелиды имеют хорошо развитую циркуляторную систему: роль внутренней среды организма выполняет целом, формируется замкнутая сосудистая система. В данной работе исследованы морфологические характеристики и осморегуляторные реакции клеточных элементов системы циркуляции представителей класса Clitellata, подклассов Hirudinomorpha и Oligochaeta. Физиологические особенности клеток крови пиявок и олигохет близки, но в связи с анатомическими и функциональными различиями систем циркуляции этих животных, в литературе за этими форменными элементами закрепились разные названия. Клетки распределительного аппарата пиявок называют гемоцитами, а форменные элементы циркулирующей жидкости олигохет – целомоцитами (Беклемишев В.Н., 1964). Эти клетки выполняют в организме ряд важных функций: транспортную, трофическую, гомеостатическую и защитную, демонстрируя широкий диапазон адаптационных возможностей (Беклемишев В.Н., 1964; Галактионов В.Г., 2005).

Опубликованные исследования отечественных и зарубежных авторов вносят значительный вклад в изучение клеточных структур аннелид и закладывают основы их первичной классификации, однако не содержат исчерпывающей информации о морфологических характеристиках и функциональном статусе гемоцитов и целомоцитов (Dales R.P., Dixon L.R.J., 1981; Ratcliffe N.A., Rowley A.F., 1981; Персина М.С., Чага О.Ю., 1995). В большинстве доступных публикаций описана морфология фиксированных клеток (Stein E.A., Cooper E.L., 1983), применены методы меченых атомов и проточной цитометрии (Cossarizza A. et al., 1996; Engelmann P. et al., 2002; 2005). Прижизненная динамика функциональных показателей клеточных элементов практически не изучена. Проблема систематизации и всестороннего исследования нативных форменных элементов циркулирующей жидкости аннелид остается актуальной для современной сравнительной физиологии.

Исследование динамики морфофизиологических показателей и особенностей функциональной активности клеток внутренней среды организма в условиях осмотического стресса позволяет оценить адаптационные возможности отдельных типов клеток и их роль в поддержании гомеостаза. Пресноводные и почвенные виды кольчатых червей, которые составляют большую часть класса, в течение жизни неизбежно сталкиваются с изменением солености среды обитания. Учитывая экологические последствия антропогенной нагрузки на окружающую среду, в том числе засоление почвы и водных ре-

сурсов, изучение осморегуляторных реакций гемоцитов и целомоцитов аннелид при воздействии осмотического стресса является актуальной задачей исследования.

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

**Цель работы:** исследование морфофункционального статуса клеточных элементов системы циркуляции представителей класса Clitellata в условиях осмотической нагрузки.

**Задачи исследования:**

1. Разработать типологию клеточных элементов системы циркуляции поясковых червей на примере представителей подклассов Oligochaeta и Hirudinomorpha.

2. Изучить динамику морфофункциональных характеристик клеточных элементов системы циркуляции исследованных видов при инкубации в условиях осмотической нагрузки.

3. Оценить интенсивность использования мембранного резерва клеточных элементов системы циркуляции исследованных видов, выявляемого при осмотическом стрессе.

4. Провести анализ характера изменений упруго-эластических свойств мембраны и топографии поверхности клеточных элементов системы циркуляции в условиях осмотической нагрузки.

**Научная новизна.** Впервые проведена типологическая классификация клеточных элементов внутренней среды поясковых червей, учитывающая их функциональные и морфологические характеристики, на примере представителей класса Clitellata: *Eiseniella tetraedra* (Savigny, 1826), *Eisenia gordejjeffi* (Michaelsen, 1899), *Eisenia nordenscoldii* (Eisen, 1879), *Eisenia rosea* (Savigny, 1826), *Eisenia fetida* (Savigny, 1826), *Octolasion complanatum* (Dugès, 1828), *Allobophora caliginosa* (Savigny, 1826), *Lumbricus terrestris* (Linnaeus, 1758), *Lumbricus rubellus* (Hoffmeister, 1843), *Lumbricus castaneus* (Savigny, 1826) (подкласс Oligochaeta) и *Hirudo medicinalis* (Linnaeus, 1758), *Haemopis sanguisuga* (Linnaeus, 1758), *Erpobdella octoculata* (Linnaeus, 1758) (подкласс Hirudinomorpha).

Впервые исследованы осморегуляторные реакции гемоцитов и целомоцитов 14 видов аннелид. Получены новые данные о функциональных и морфологических изменениях форменных элементов циркулирующей жидкости аннелид в условиях осмотической нагрузки. Впервые получены количественные характеристики упругости и адгезионной способности мембраны клеток системы циркуляции аннелид и установлены их изменения при осмотическом стрессе.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** На основании полученных данных разработана типологическая классификация клеточных элементов внутренней среды аннелид. Идентифицировано 5 типов клеток. Проведена количественная оценка изменения параметров морфофизиологических реакций гемоцитов и целомоцитов аннелид при инкубации клеток в условиях осмотической нагрузки. Результаты работы расширяют и углубляют существующие представления о компенсаторных гомеостатических реакциях клеток внутренней среды аннелид и могут быть использованы для дальнейшего изучения механизмов ответа на осмотический стресс. При разведе-

нии представителей типа Annelidae в культуре следует учитывать выявленные в ходе данной работы особенности осморегуляторных реакций гемоцитов и целомоцитов исследованных видов.

Полученные результаты 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 диссертации, выносимые на защиту:**

1. На основании морфофункциональных характеристик клеточных элементов системы циркуляции представителей класса Clitellata классифицировано пять клеточных типов: большие амебоциты, средние амебоциты, малые амебоциты, неамебоциты, хлорогеновые клетки.

2. Клеточные элементы системы циркуляции исследованных видов Oligochaeta и Hirudinomorpha в пределах использованной осмотической нагрузки сохраняют морфологическую целостность, подвижность и способность к образованию псевдоподий.

3. Осмозависимая регуляция объема гемоцитов и целомоцитов обеспечивается путем мобилизации мембранного резерва плазмалеммы.

4. Динамика упруго-эластических свойств клеточных элементов системы циркуляции представителей подклассов Oligochaeta и Hirudinomorpha в условиях осмотической нагрузки не связана со специфическими функциями, выполняемыми клетками.

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

**Личное участие автора.** Основные результаты получены автором самостоятельно. Автор лично планировал эксперименты 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 диссертации доложены и обсуждены на XIV международном совещании и VII школе по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2011), XXIV Российской конференции по электронной микроскопии РКЭМ-2012 (Черноголовка, 2012), VII Сибирском съезде физиологов (Красноярск, 2012), XI Всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми НЦ УрО РАН (Сыктывкар, 2012), V Всероссийской научно-практической конференции «Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2012), Международной заочной конференции молодых ученых

«Вклад молодых ученых в биологические исследования» (Иркутск, 2012), I Симпозиуме «Физико-химические основы функционирования биополимеров и клеток» (Нижний Новгород, 2012), II Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические механизмы адаптации и экология человека» (Тюмень, 2012), Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптации гидробионтов» (Борок, 2012), Всероссийском конкурсе «Инновационный потенциал молодежи 2012» (Ульяновск, 2012), XXII съезде Физиологического общества имени И.П. Павлова (Волгоград, 2013), XIII Международной научно-практической экологической конференции «Биоразнообразии и устойчивость живых систем» (Белгород, 2014).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 28 научных работ общим объемом 9,65 п.л., авторский вклад – 6,65 п.л., в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методов, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 207 страницах машинописного текста, включает 54 таблицы и 53 рисунка. Список литературы состоит из 240 наименований: 46 отечественных и 194 иностранных источников.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

В экспериментах использовали представителей класса Clitellata подкласс Oligochaeta, семейство Lumbricidae: *Eiseniella tetraedra* (Savigny, 1826), *Eisenia gordejjeffi* (Michaelsen, 1899), *Eisenia nordenscolldii* (Eisen, 1879), *Eisenia rosea* (Savigny, 1826), *Eisenia fetida* (Savigny, 1826), *Octolasion complanatum* (Dugès, 1828), *Allobophora caliginosa* (Savigny, 1826), *Lumbricus terrestris* (Linnaeus, 1758), *Lumbricus rubellus* (Hoffmeister, 1843), *Lumbricus castaneus* (Savigny, 1826); подкласс Hirudinomorpha: *Hirudo medicinalis* (Linnaeus, 1758) (семейство Hirudinidae), *Haemopis sanguisuga* (Linnaeus, 1758) (семейство Haemopidae), *Erpobdella octoculata* (Linnaeus, 1758) (семейство Erpobdellidae). Видовую принадлежность животных определяли с помощью таксономических справочников (Всеволодова-Перель Т.С., 1997; Лукин Е.И., 1976; Перель Т.С., 1979; Присный А.В., 1999).

С целью изучения морфофункциональных свойств клеток циркулирующих жидкостей аннелид было проведено три серии экспериментов. Циркулирующую жидкость 12 особей каждого вида отбирали микропипеткой непосредственно из лакуны или сосуда. Из системы распределения каждой особи отобрано и обработано не менее 100 клеток. Форменные элементы исследовали с применением световой и зондовой микроскопии (Nikon Eclipse Ti-E, Интегра Вита NT-MDT).

Осмотическую стойкость, осморегуляторные реакции форменных элементов гемолимфы и целомической жидкости аннелид и степень использования ими мембранного резерва исследовали с помощью проб с гипотоническими и гипертоническими нагрузками (Фёдорова М.З., Левин В.Н., 1997). В качестве сред с осмотической нагрузкой применяли растворы хлорида натрия – гипотонический (массовая доля NaCl в котором составляет 0,4 %) и гипер-

тонический (массовая доля NaCl в котором составляет 1,2%) (Коган А.Б., 1954).

Циркулирующую жидкость, отобранную по стандартной методике, делили на три части, каждую из которых помещали в отдельную пластиковую чашку Петри, куда добавляли равный по объему изо-, гипо- или гипертонический солевой раствор. Время инкубации составляло 30 минут.

В первой серии экспериментов исследовано 3700 клеток. Работа проведена на инвертированном микроскопе Nikon Eclipse Ti-E в режиме дифференциально-интерференционного контраста. Для наблюдения за клетками использовали программное приложение NIS-Elements. Клетки фотографировали в режиме реального времени, после чего определяли их линейные размеры. Обработку полученных снимков проводили с помощью компьютерной программы «ВидеоТест-Размер 5.0» (Санкт-Петербург, Россия).

Во второй серии экспериментов изучали влияние осмотической нагрузки на морфометрические характеристики форменных элементов и использование клетками мембранного резерва. По окончании осмотической нагрузки анализировали изменение объема и использование клетками запаса плазмалеммы в гипотонических условиях. Всего во второй серии исследовано 3800 клеток.

В третьей серии исследований оценивали действие осмотической нагрузки на структуру поверхности клеток. По окончании инкубации в растворах различной концентрации рассчитывали значения объема, площади поверхности клетки, анализировали шероховатость поверхности и характер микрорельефа. Для этого применяли атомно-силовую микроскопию (АСМ Интегра Вита NT-MDT) в режиме полуконтактного сканирования. Всего в третьей серии исследовано 3500 клеток.

Исследования с использованием зондовой микроскопии проводили на АСМ Интегра Вита NT-MDT полуконтактным методом с использованием кантилеверов марки NSG 03, жесткостью 1,4 Н/м с радиусом закругления 10 нм, частотой развертки сканирования порядка 0,6-0,8 Hz.

Сканирование клеток, а также анализ и обработку данных АСМ осуществляли с помощью программы NT-MDT SPM Software – Nova 1.0.26.1397 (рис. 1).

На полученных сканах измеряли линейные размеры клеток, затем рассчитывали площадь поверхности и объем клеток. При исследовании геометрических характеристик допускали, что клетки имеют правильную сферическую форму, объем клеток вычисляли по формуле шара.

Резервные возможности плазмалеммы гемоцитов и целомоцитов оценивали по изменению объема клеток. Мембранный резерв рассчитывали как 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):

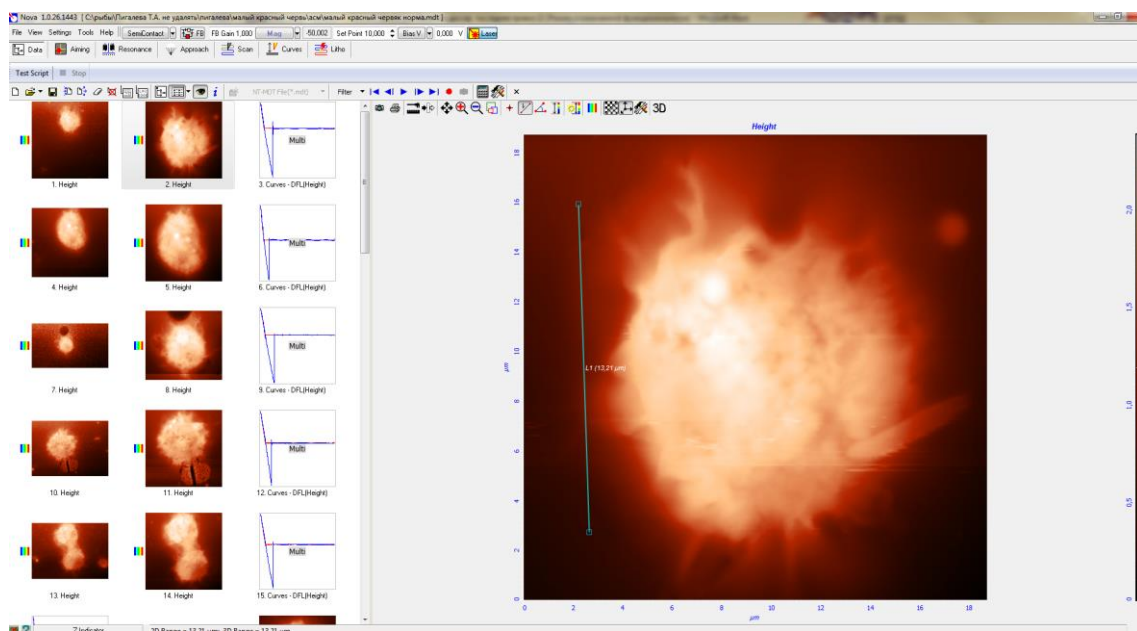
$$\Delta V = V (СГ) - V (И), (1)$$

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

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

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

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



**Рис. 1 – Измерение ширины клетки с помощью инструмента Length Instrument панели инструментов Окна 2D-данных, который позволяет измерить расстояние между двумя выделенными точками**

Интенсивность использования относительного мембранного резерва клетками в гипотонической среде оценивали, вычисляя процент относительного мембранного резерва, используемого клеткой от абсолютного мембранного резерва, принимаемого за 100%.

Показатели упругости мембраны и способности клеточных элементов к адгезии были получены в режиме атомно-силовой спектроскопии при наложении нагрузки в 10 локальных участках клеточной поверхности. В основе метода лежит снятие «силовых кривых» (DFL (Z)) с поверхности клетки, отражающих отклонение гибкой консоли АСМ-зонда при приближении зонда к образцу в каждой точке нанoidентирования (Снеддон И.Н., 1961; Лебедев Д.В. с соавт., 2009). Полученные «силовые кривые» обрабатывали с помощью программы «Ef3» (NT-MDT, Зеленоград).

С целью исследования макрорельефа проводили визуальную оценку поверхностных структур. Описание образований поверхности мембраны выполняли согласно классификации Ровенского (1979). Для определения состояния микрорельефа использовали опцию Roughness 3D Nova 1.0.26.1397 (NT-MDT, Зеленоград), которая позволяет исследовать микрорельеф в случайно выбранной области площадью  $25 \text{ мкм}^2$  и определить такие параметры как  $S_q$ , среднеквадратическая шероховатость поверхности (nm);  $S_a$ , средняя шероховатость поверхности (nm);  $S_p$ , высота самого высокого пика (nm);  $S_v$ , глубина самой глубокой впадины (nm);  $S_{ds}$ , плотность пиков ( $1/\text{um}\cdot\text{um}$ );  $S_{sc}$ , сред-



няя кривизна вершины (nm).  $S_q$  и  $S_a$  показывают среднюю высоту возвышений поверхности. Для построения полной картины изменения профиля поверхности необходимо учитывать величины  $S_p$  и  $S_v$ , которые при одних и тех же показателях средней шероховатости поверхности могут значительно варьировать.

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

## **ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **1. Разработка типологии клеточных элементов циркулирующих жидкостей представителей класса Clitellata**

Клеточный состав системы циркуляции кольчатых червей изучен недостаточно. Имеющаяся в литературе классификация клеток основана на данных, полученных на фиксированном материале после окраски препаратов тем или иным способом. Наши исследования мы проводили на живых клетках, что позволило классифицировать клетки по признакам, хорошо различимым при прижизненном наблюдении. При типологизации форменных элементов мы учитывали существующие данные, но основным критерием для классификации стал функциональный. Морфологические показатели значительно варьируют у клеток одного и того же типа среди представителей различных видов, поэтому они не могут являться достоверными и достаточными критериями классификации клеток внутренней среды аннелид.

Показано, что для всех описанных видов поясковых червей характерно наличие двух основных типов клеток циркулирующей жидкости – это амебоциты, которые выполняют иммунную функцию, и элеоциты (термин введен в работе Stein, Cooper, 1983), которые участвуют в накоплении и хранении питательных веществ. Форменные элементы циркулирующей жидкости практически всех исследованных видов класса Clitellata представлены несколькими типами амебоцитов, которые отличаются по степени активности, а также адгезионной и поглотительной способности.

Выявлено два типа элеоцитов, которые разнятся качественными и количественными характеристиками гранул и вакуолей. Обязательным элементом циркулирующих жидкостей исследованных аннелид являются хлорагогенные клетки и *хлорагогенные гранулы*. Некоторые типы клеток обнаружены не у всех видов. На основе результатов исследования составлена типологическая классификация клеточных элементов циркулирующих жидкостей представителей класса Clitellata (табл. 1, рис. 2).

### **2. Анализ действия осмотической нагрузки на клеточные элементы циркулирующих жидкостей представителей класса Clitellata**

В условиях осмотической нагрузки у всех клеточных типов выявлены значимые изменения морфометрических показателей. Показано, что на гипотоническую среду клетки циркулирующей жидкости реагировали увеличени-

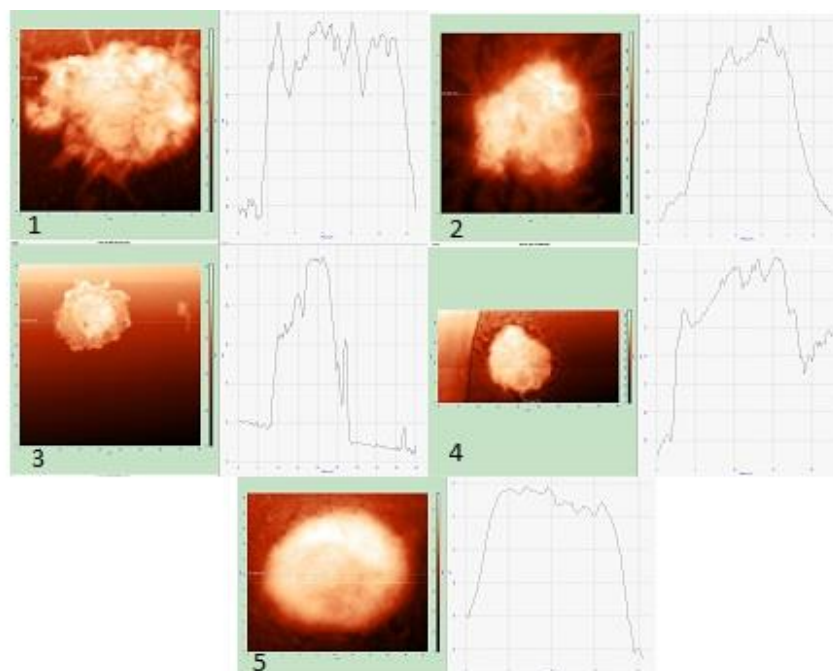
ем линейных размеров, распластыванием по субстрату, адгезией либо усилением двигательной активности.

**Таблица 1 – Типология клеток внутренней среды представителей класса Clitellata**

Группа клеток	Тип клетки	Описание	Виды, у которых клетки не обнаружены
Амебоцит	Большой амебоцит (БА)	Большие, подвижные клетки. В цитоплазме содержатся вакуоли и гранулы. Клетки этого типа способны активно перемещаться в целомической жидкости, не адгезируются к подложке, способны к фагоцитозу.	-
	Средний амебоцит (СА)	Клетки, способны к адгезии к подложке и движению. В цитоплазме содержатся гранулы и вакуоли. Способны к фагоцитозу.	-
	Малый амебоцит (МА)	Небольшие клетки, способны к образованию филоподий. К адгезии не способны. Фагоцитоз не зафиксирован.	<i>E. nordenskioldi</i>
Элеоцит	Неамебоцит (НА)	Клетки с четкими краями, не способны к движению, адгезии и фагоцитозу. Цитоплазма заполнена некоторым количеством гранул.	<i>H. sanguisuga</i>
	Хлорогогенная клетка (ХЛ)	Крупные клетки. Цитоплазма заполнена большим количеством бурых гранул. Клетки нестабильны, способны к саморазрушению. Подразделяются на способные образовывать филоподии и не образующие ложноножки.	<i>E. nordenskioldi</i> <i>H. medicinalis</i> <i>E. octoculata</i> <i>H. sanguisuga</i>

В ходе прижизненного исследования клеточных элементов установлено, что распластывание клеток происходит через цепь стадий, отличающихся временными параметрами у разных видов аннелид. Распластывание свидетельствует о снижении двигательной активности клеток (Брагина Е.Е. и др., 1976). Осевшая на субстрат клетка прикрепляется, формирует ламеллоподии и уплощается, микрорельеф ее дорзальной поверхности сглаживается в результате «расправления» микроворсинок, складок или пузырей (Follett E.A., Goldman R. D., 1970; Erickson C.A., Trinkaus J.P., 1976). При этом объем клетки достигает максимума, а двигательная активность прекращается.

В гипертонических условиях активность клеток снижалась, они принимали угловатую форму и теряли ложноножки, линейные размеры уменьшались. В отличие от остальных клеточных элементов гемоциты исследованных видов *Hirudinomorpha* реагировали увеличением линейных размеров независимо от изменения концентрации окружающего раствора.



**Рис. 2 – Двухмерное изображение клеток внутренней среды представителей класса *Clitellata* (А) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (Б) (получено с помощью ПО Nova): 1 – БА *E. rosea*, 2 – СА *H. sanguisuga*, 3 – МА *L. castaneus*, 4 – НА *A. caliginosa*, 5 – ХЛ *O. complanatum***

В условиях низкой осмолярности среды гемоциты *H. medicinalis* и *H. sanguisuga* (рис. 3) увеличивали объем и линейные размеры, сохраняя способность передвигаться и формировать псевдоподии.

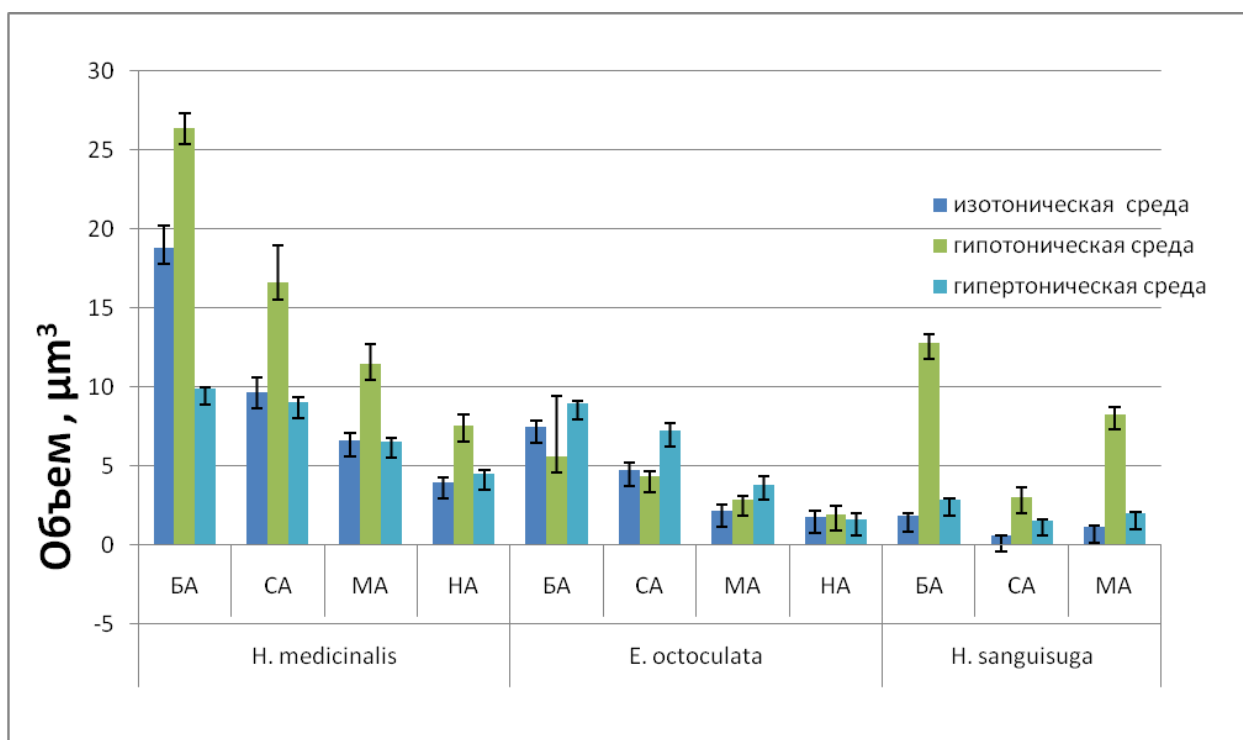
Объем амебоцитов *E. octoculata* в гипертонических условиях уменьшается, а активность и показатель адгезии увеличивается.

Выявлено нескольких типов амебоцитов пиявок, обладающих разной осмотической устойчивостью. *H. medicinalis* и *H. sanguisuga* – эврибионты, они способны переносить пересыхание водоемов, поэтому их клетки крови хорошо адаптированы к гипертоническим условиям, за исключением БА *H. medicinalis* (рис 3). *E. octoculata* обитает в проточных водоемах. Установлено, что ее клеточные элементы осмоустойчивы к разнонаправленному воздействию.

Объем целомоцитов *Oligochaeta*, как правило, увеличивается в гипотонической среде, но эта тенденция не является общей закономерностью и зависит как от видовой принадлежности особи, так и от типа клетки. Целомоциты *E. nordenskioldi* реагируют увеличением объема клетки и на гипертоническую ( $11,79 \mu\text{m}^3$ ), и на гипотоническую среду ( $15,4 \mu\text{m}^3$ ).

Показатели объема форменных элементов *E. fetida* (кроме ХЛ) увеличиваются при любой осмотической нагрузке, при этом активность клеточные элементы не утрачивают, что является адаптивной реакцией на изменение условий обитания.

Показатели объема форменных элементов *E. fetida* (кроме ХЛ) увеличиваются при любой осмотической нагрузке, при этом активность клеточные элементы не утрачивают, что является адаптивной реакцией на изменение условий обитания.



**Рис. 3 – Изменение объема гемоцитов *H. medicinalis*, *H. sanguisuga* и *E. octoculata* в условиях разного осмотического давления.**

Объем клеток *A. caliginosa* и *O. complanatum* в гипертонических условиях уменьшался в 1,5-2 раза.

Хлорогенные клетки всех исследованных аннелид функциональных реакций на осмотическую нагрузку не проявляют.

Динамика физиологических реакций клеток в условиях гипо- и гипертонической нагрузки зависит от типа и функции гемоцитов и целомоцитов. Способность к образованию филоподий, адгезии или передвижению активизируется независимо от изменения размеров или объема клеток. В условиях осмотического стресса клетки используют внутренний мембранный резерв, что позволяет сохранять морфологическую целостность и функциональную активность.

### **3. Анализ использования мембранного резерва клетками распределительного аппарата**

Благодаря эластичной клеточной мембране, клетки животных могут изменять объем и форму в зависимости от воздействия внешних условий, величины мембранного резерва и степени его мобилизации. Эта способность позволяет клеткам сохранять структуру и функцию под действием осмотической нагрузки. Поддержание функционального состояния клетки обеспечивается изменением формы, сглаживанием поверхностных структур, растяжением липидного бислоя (3%), встраиванием экзоцитозных везикул. Наибольшее значение имеет высвобождение фагоцитозных пузырьков и вакуолей (Nichol J.A., Hutter O.F., 1996; Hamill, O.P., Martinac, B., 2001).

Показано, что степень использования мембранного резерва существенно различается в зависимости от таксономической принадлежности животных (табл. 2), что особенно характерно для видов подкласса Hirudinomorpha. У представителей этого подкласса разные клеточные типы используют мем-

бренный резерв в сопоставимой степени. В то же время для разных видов наблюдаются значительные различия по этому параметру. Клетки *H. sanguisuga* способны мобилизовать мембранный резерв, увеличивая объем более чем в 5 раз без потери функциональной активности. Гемоциты *E. octoculata* практически не используют мембранный резерв, исключение составляют малые амебоциты (табл. 2) и, по-видимому, адаптируются к изменению осмоллярности при помощи иных механизмов. Использование мембранного резерва клетками *H. medicinalis* в среднем составляет 70%.

**Таблица 2 – Использование мембранного резерва клетками внутренней среды представителей класса Clitellata**

Семейство	Вид	Мембранный резерв (%)				
		БА	СА	МА	НА	ХЛ
Hirudinidae	<i>H. medicinalis</i>	40,03	71,61	72,89	88,94	-
Erpobdellidae	<i>E. octoculata</i>	0	0	31,81	0	-
Haemopidae	<i>H. sanguisuga</i>	594,57	410,17	633,23	-	-
Lumbricidae	<i>E. rosea</i>	0	0	58,17	117,25	19,31
	<i>E. fetida</i>	42,20	61,00	69,35	45,43	59,70
	<i>E. nordenskioldi</i>	6,53	5,91	-	63,72	0
	<i>E. gordejefi</i>	0	9,51	70,68	60,15	-
	<i>E. tetraedra</i>	14,01	1,04	33,42	0	11,41
	<i>L. terrestris</i>	26,00	5,00	29,00	18,00	6,00
	<i>L. castaneus</i>	36,00	29,00	4,00	16,00	45,00
	<i>L. rubellus</i>	23,80	28,32	41,56	9,03	9,34
	<i>A. caliginosa</i>	3,61	0	7,09	0	8,18
	<i>O. complanatum</i>	35,15	3,63	0	0	9,66

*Примечание:* БА – большие амебоциты; СА – средние амебоциты; МА – малые амебоциты; НА – неамебоциты; ХЛ - хлорогенные клетки. Положительные значения приведены в тех случаях, когда использование мембранного резерва достоверно отлично от 0 ( $p < 0/05$ ); 0 - использование мембранного резерва достоверно не отличается от 0; "-" - клетки у данного вида отсутствуют.

Разброс значений степени использования мембранного резерва в семействе *Lumbricidae* не столь значителен. Анализ данных, полученных на разных видах этого семейства, показывает, что пределы использования мембранного резерва примерно одинаковы для больших амебоцитов, средних амебоцитов и хлорогенных клеток (в среднем  $17 \pm 3\%$ ). Значения этого параметра для малых амебоцитов и неамебоцитов в 2 раза выше ( $34 \pm 8\%$ ).

Совокупность данных, полученных для разных клеточных типов, показывает, что использование мембранного резерва клетками представителей семейства *Lumbricidae* возрастает в ряду: *O. complanatum* (10%) – *E. tetraedra* (12%) – *L. terrestris* (17%) – *L. rubellus* (22%) – *E. nordenskioldi* (25%) – *L. castaneus* (26%) – *E. gordejefi* (28%) – *E. rosea* (39%) – *E. fetida* (56%), значения этого показателя увеличиваются в ряду: клетки представителей лесных биоценозов – целоמוциты животных, предпочитающих луговые биотопы и пашню.

#### 4. Изменение упруго-эластических свойств и топографических характеристик плазмалеммы гемоцитов и целомоцитов представителей класса Clitellata при действии осмотической нагрузки

Упругость мембраны клеток крови связана с изменением расположения актиновых фибрилл цитоскелета, а вязкость – с переходом холестерина из внутреннего слоя мембраны в наружный и наоборот (Дерябин Д.Г., 2005). Жесткость подмембранного каркаса определяет функциональную активность клетки, ее способность к направленному движению и участию в фагоцитозе, она является одним из критериев, описывающих адаптационные реакции клетки и способность к реакции на осмотическую нагрузку.

Модуль упругости может быть использован в качестве показателя реорганизации цитоскелета при адгезии, в процессе которой происходит увеличение эластичности клеточной поверхности в 2-3 раза. Согласно литературным данным модуль упругости актиновых фибрилл составляет от 10 до 20 кПа (Hoffmann et al., 1997).

Максимальные значения модуля упругости, выявленные в изотонических условиях у форменных элементов *H. medicinalis*, составляют 76,87 кПа (БА), 38,12 кПа (МА); *L. rubellus* – 64,98 кПа (БА), 69,47 кПа (СА), 63,11 кПа (МА); *L. terrestris* – 63,11 кПа (НА) и 69,29 кПа (ХЛ).

В гипотонических условиях наибольшие показатели упругости мембраны были зафиксированы у клеток *H. medicinalis*, – 51,60 кПа (БА); *H. sanguisuga* – 43,62 кПа (СА), 65,35 кПа (МА); *O. complanatum* – 67,65 кПа (БА), 60,75 кПа (СА), 51,39 кПа (МА), 71,65 кПа (ХЛ). *O. complanatum* встречается в переувлажненной почве, по берегам водоемов, изредка – в воде, это объясняет способность к адаптационным реакциям клеточной поверхности в гипотонических условиях.

В гипертонических условиях наибольшее значение модуля упругости среди представителей подкласса Hirudinomorpha выявлено у *H. sanguisuga*: для БА, СА, и МА значения модуля упругости составляют 51,94 кПа, 48,94 кПа, 60,55 кПа соответственно. Наибольшее значение показателя упругости амебоцитов представителей подкласса Oligochaeta зафиксировано у *E. fetida*, а неамебоцитов – у *A. caliginosa*. Эти виды являются типичными обитателями почв богатых перегноем, соответственно их целомоциты имеют высокий уровень физиологической адаптации к гипертоническим условиям.

Снижение осмотического давления приводит к уменьшению показателей упругости клеточной мембраны амебоцитов *H. medicinalis* и *E. octoculata* и к увеличению у *H. sanguisuga* (табл. 3). Значения показателей адгезионной способности мембраны под действием осмотической нагрузки достоверно не изменяются.

Сравнительный анализ показателей шероховатости поверхности форменных элементов показал, что количество выпячиваний поверхности гемоцитов *H. medicinalis* существенно изменяется в зависимости от осмотических условий. Микрорельеф клеток *H. medicinalis* характеризуется наиболее плотным расположением микровыпячиваний среди всех описанных гемоцитов пиявок. Наименьшие значения шероховатости поверхности клеток отмечены у больших амебоцитов *E. octoculata* –  $0,13 \pm 0,04$  nm. У амебоцитов всех изученных представителей р. *Lumbricus* показатели упругости и адгезии мембраны к нанозонду не менялись или снижались в условиях осмотической

нагрузки. В гипотонической среде адгезия мембраны к нанозонду не менялась, а жесткость мембраны увеличивалась у целомоцитов *L. rubellus* и *L. terrestris* и снижалась у *L. castaneus*.

**Таблица 3 – Модуль упругости амебоцитов представителей класса Clitellata в изотонических (И) и гипотонических (Г) условиях, кПа**

Наименование вида	Модуль упругости					
	БА		СА		МА	
	И	Г	И	Г	И	Г
<i>H. medicinalis</i>	76,87±1,31	51,60±2,94*	43,83±2,51	16,73±2,14*	-	-
<i>E. octoculata</i>	51,31±0,71	18,72±1,81*	33,41±0,84	11,26±1,21*	38,12±1,02	8,91±0,37*
<i>H. sanguisuga</i>	32,93±1,43	42,62±8,75*	19,92±0,98	43,62±2,03*	18,92±0,85	65,36±5,03*
<i>E. rosea</i>	28,58±1,01	19,29±1,11*	26,57±0,98	21,71±0,72*	25,29±2,61	21,02±0,03*
<i>E. fetida</i>	39,88±5,61	47,76±1,28*	31,48±5,69	45,21±5,08*	12,11±1,48	53,12±3,48*
<i>E. nordenskioldi</i>	27,56±3,67	39,25±3,31*	29,07±3,35	53,38±4,11*	-	-
<i>E. gordejefi</i>	29,70±1,82	50,91±5,87*	15,93±2,31	50,53±3,99*	16,48±1,63	46,73±3,76*
<i>E. tetraedra</i>	55,07±2,35	22,52±2,68*	51,42±3,32	29,64±3,05*	48,27±2,11	27,89±5,31*
<i>L. terrestris</i>	63,46±4,66	43,36±3,91*	51,16±7,07	46,34±2,75*	59,71±2,31	45,51±7,10*
<i>L. castaneus</i>	40,97±3,31	22,68±1,53*	45,41±6,08	22,16±3,74*	43,95±10,65	22,76±3,66*
<i>L. rubellus</i>	64,98±4,98	50,91±4,18*	69,47±4,93	49,89±1,57*	63,11±4,11	41,02±1,97*
<i>O. complanatum</i>	56,83±3,71	67,65±2,34*	51,39±2,27	60,75±5,82	51,39±2,27	63,41±6,77
<i>A. caliginosa</i>	41,63±3,44	40,87±1,76	42,53±1,99	39,99±12,55	43,43±2,58	41,32±3,31

Примечание: БА – большие амебоциты; СА – средние амебоциты; МА – малые амебоциты; \* – достоверность различий между значениями линейных параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ( $p < 0,05$ ).

В гипертонических условиях наблюдалось увеличение эластичности мембраны целомоцитов *E. fetida*, *E. gordejefi*, *E. nordenskioldi* и уменьшение у *E. tetraedra* и *E. rosea* (рис. 4). Клетки *A. caliginosa* и *O. complanatum* демонстрировали сходные изменения упруго-эластических свойств мембран и адгезии к нанозонду (табл. 4).

У клеток представителей *Allobophora*, *Octolasion*, *Lumbricus* и *E. tetraedra* при повышении осмотического давления жесткость клеточной мембраны увеличивается, а показатель адгезии меняется слабо.

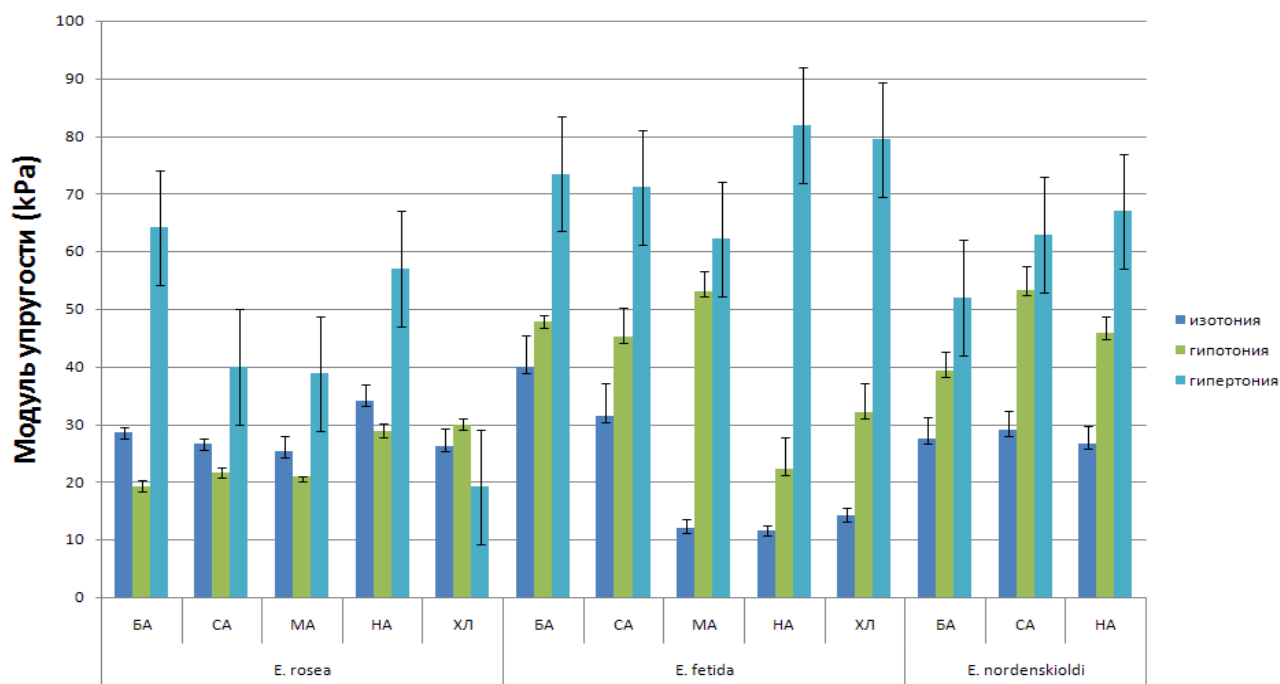
В гипотонических условиях жесткость мембраны целомоцитов исследованных видов *Lumbricus*, *E. tetraedra* и *E. rosea* увеличивалась.

Сила адгезии мембраны к нанозонду в условиях пониженного осмотического давления повышалась у клеток большинства представителей, кроме *Lumbricus*, *E. fetida* и *E. tetraedra*.

### Заключение

Совокупность полученных данных позволила идентифицировать 5 типов клеточных элементов циркулирующих жидкостей представителей подклассов Oligochaeta и Hirudinomorpha.

В зависимости от динамики значений модуля упругости, показателей адгезии и величины мембранного резерва в условиях осмотической нагрузки были выделены клетки циркулирующей жидкости, которые являются основными фагоцитами. Это клетки, обладающие значительным мембранным резервом, повышенными показателями упругости и адгезии поверхности.



**Рис. 4 – Значения модуля упругости целомацитов *E. rosea*, *E. fetida*, *E. nordenskioldi*, полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки**

**Таблица 4 – Модуль упругости клеток внутренней среды представителей класса Clitellata в изотонических (И) и гипертонических (Г) условиях, кПа**

Вид животного	Модуль упругости					
	БА		СА		МА	
	И	Г	И	Г	И	Г
<i>H. medicinalis</i>	76,87±1,31	11,65±1,09*	43,83±2,51	8,52±0,41*	-	-
<i>E. octoculata</i>	51,31±0,71	23,81±1,31*	33,41±0,84	18,07±0,43*	38,12±1,02	20,03±0,63*
<i>H. sanguisuga</i>	32,93±1,43	51,19±0,92*	19,92±0,98	48,94±0,54*	18,92±0,85	60,55±1,05*
<i>E. rosea</i>	28,58±1,01	64,10±3,51*	26,57±0,98	39,92±1,71*	25,29±2,61	38,81±4,35*
<i>E. fetida</i>	39,88±5,61	73,47±5,67*	31,48±5,69	71,14±4,01*	12,11±1,48	62,15±5,27*
<i>E. nordenskioldi</i>	27,56±3,67	52,02±2,67*	29,07±3,35	62,87±1,08*	-	-
<i>E. gordejefi</i>	29,70±1,82	40,38±7,11*	15,93±2,31	42,07±4,65*	16,48±1,63	39,11±3,47*
<i>E. tetraedra</i>	55,07±2,35	55,90±0,33	51,42±3,32	50,04±3,15	48,27±2,11	62,91±4,27*
<i>L. terrestris</i>	63,46±4,66	55,90±0,33	51,16±7,07	50,04±3,15	59,71±2,31	62,91±4,27*
<i>L. castaneus</i>	40,97±3,31	35,28±4,05*	45,41±6,08	33,09±5,32*	43,95±10,65	32,32±1,11*
<i>L. rubellus</i>	64,98±4,98	10,68±2,07*	69,47±4,93	11,87±1,76*	63,11±4,11	11,94±2,34*
<i>O. complanatum</i>	56,83±3,71	6,73±0,54*	51,39±2,27	9,06±0,25*	51,39±2,27	7,78±0,54*
<i>A. caliginosa</i>	41,63±3,44	65,29±7,84*	42,53±1,99	13,08±2,46*	43,43±2,58	70,89±4,03*

Примечание: БА – большие амебоциты; СА – средние амебоциты; МА – малые амебоциты; \* – достоверность различий между значениями линейных параметров в изотонических условиях и в условиях осмотической нагрузки ( $p < 0,05$ ).

Согласно перечисленным критериям к универсальным фагоцитирующим клеткам следует отнести малые амебоциты. У пиявок в гипотонических условиях малые амебоциты являются основными фагоцитирующими и инкапсуляторными клетками. В условиях повышенного осмотического давле-



ния только амебоциты *H. sanguisuga* удовлетворяют вышеперечисленным критериям и не утрачивают способность к фагоцитозу.

У представителей подкласса Oligochaeta в гипотонических условиях амебоциты усиливают двигательную активность, показатель адгезии достоверно не изменяется (за исключением *E. rosea*, *E. gordejefi* и отдельных клеточных типов *O. complanatum* (МА, НА, ХЛ). В гипертонических условиях у *O. complanatum*, *L. terrestris*, *L. castaneus* модуль упругости клеточной поверхности снижается, показатель адгезии возрастает, клеточный объем уменьшается. В совокупности эти показатели отражают начало расплывания клеток по субстрату. Модуль упругости клеточных элементов остальных видов увеличивается, что говорит о перестройке цитоскелета и клеточной активности. Показатель адгезии возрастает в гипертонических условиях только у СА *A. caliginosa*, а у *E. fetida* – снижается в 2 раза.

При ранении животного наблюдается гипоосмотический стресс. В таком случае основная реакция клеток направлена на восстановление целостности раневой поверхности, при этом увеличивается подвижность амебоцитов и способность клеток к адгезии; отдельные виды амебоцитов сохраняют способность к фагоцитозу. При пересыхании водоема или почвы, а также при патогенной инвазии происходит гиперосмотический стресс, в результате чего часть клеток внутренней среды уменьшается в объеме и снижает двигательную активность, а другая – активизирует образование выпячиваний, что приводит к повышению модуля упругости.

Приспособленность отдельных организмов к условиям среды связана с образом жизни. Стенобионты имеют в составе клеточной популяции несколько групп клеток, которые адаптированы к различным условиям, а клетки эврибионтных часто приспособлены к любому изменению условий среды.

Для пиявок *H. medicinalis*, *H. sanguisuga*, *E. octoculata* характерен значительный полиморфизм реакций клеточных элементов. Показано, что клетки *E. octoculata* по своим характеристикам в большинстве случаев занимают промежуточное положение между клетками *H. medicinalis* и *H. sanguisuga*, но значительно отличаются от последних при сравнении показателей использования мембранного резерва в гипотонических условиях. При снижении осмотического давления значения упруго-эластических параметров клеток *H. sanguisuga* возрастают, для амебоцитов остальных видов отмечали увеличение этого показателя. Таким образом, в изотонических условиях гемоциты пиявок демонстрируют сходные морфофункциональные характеристики, а при адаптации в стрессовой ситуации используют различные механизмы.

Реакция на осмотический стресс выделенных пяти типов клеток олигохет различается в зависимости от родовой принадлежности животного. Для представителей рода *Lumbricus* характерно уменьшение показателей адгезии к нанозонду при изменении осмотического давления среды, в то время как у целомоцитов большинства представителей рода *Eisenia* наблюдали увеличение адгезии в гипотонических и гипертонических условиях. Клетки *E. tetraedra* нарушают эту закономерность – показатели адгезии целомоцитов этого вида понижаются при любом изменении условий среды подобно таковым у клеток рода *Lumbricus*. Показатель упругости мембраны целомоцитов большинства представителей рода *Eisenia* при любом изменении солёности раствора увеличивается, исключение составляют клетки *E. rosea* и *E. tetraedra*.

Клетки целомической жидкости большинства видов рода *Lumbricus* при изменении осмотического давления увеличивают жесткость мембраны, за исключением целомоцитов *L. castaneus*.

В отношении использования мембранного резерва клеточными элементами циркуляции олигохет можно выделить в отдельную группу люмбрицид, все типы клеток которых используют мембранный резерв при осмотическом стрессе. В популяции целомоцитов представителей родов *Eisenia*, *Octolasion* и *Allobophora* имеются типы клеток, которые не задействовали мембранный резерв при гипоосмотическом стрессе.

Микрорельеф поверхности клеточных элементов системы циркуляции олигохет в основном сглаживается, только у *Eisenia nordenskioldi* отмечали увеличение показателей среднеквадратической шероховатости у большинства клеточных типов.

Таким образом, исследованные виды класса Clitellata по морфофункциональным адаптациям гемоцитов и целомоцитов в условиях осмотической нагрузки можно разделить на следующие группы:

1. *Eisenia rosea*, *Eisenia fetida*, *Eisenia nordenskioldi*, *Eisenia gordejefi*;
2. *Lumbricus terrestris*, *Lumbricus castaneus*;
3. *Eiseniella tetraedra*;
4. *Lumbricus rubellus*;
5. *Hirudo medicinalis*, *Haemopsis sanguisuga*, *Erpobdella octoculata*.

Внутри этих групп существуют более тесные филогенетические связи, что соответствует общепринятой классификации класса Clitellata. Исключение составляют *E. tetraedra* и *L. rubellus*, целомоциты которых отлично от всех остальных реагируют на осмотическую нагрузку.

## ВЫВОДЫ

1. Идентифицировано четыре типа клеточных элементов внутренней среды изученных представителей подклассов Oligochaeta и Hirudinomorpha: большие амебоциты, средние амебоциты, малые амебоциты и неамебоциты. Для целомической жидкости олигохет характерно наличие еще одного типа – хлорогагенные клетки.

2. В условиях гипоосмотической нагрузки объем целомоцитов исследованных видов подкласса Oligochaeta возрастает в среднем на 23,5 %.

3. Большинство гемоцитов представителей подкласса Hirudinomorpha реагируют на осмотическую нагрузку увеличением объема вне зависимости от типа осмотического стресса.

4. Наиболее интенсивное использование мембранного резерва в осморегуляторных реакциях наблюдается у малых амебоцитов и составляет в среднем у представителей подкласса Oligochaeta – 35,4 %, у представителей подкласса Hirudinomorpha – 245,97 %. Амебоциты большой ложноконской пиявки характеризуются самым значительным уровнем использования мембранного резерва, который составляет  $6,84 \mu\text{m}^3$ .

5. Упруго-эластические свойства клеточных элементов системы циркуляции в условиях осмотической нагрузки характеризуются неоднозначной динамикой значений модуля Юнга и показателя адгезии. Показатель эластичности мембраны *E. fetida* увеличивается в гипертонической среде в 5,6

раза. Показатель модуля Юнга *L. rubellus* при гиперосмотической нагрузке шестикратно снижается.

6. В условиях гипоосмотической нагрузки топография клеточной поверхности меняется: наблюдается сглаживание структур микрорельефа с уменьшением размеров микровозвышений и микровпадин. У представителей рода *Lumbricus* плотность пиков уменьшается в 2-3 раза. Показатель среднеквадратической шероховатости поверхности средних амебоцитов люмбрицид в большинстве случаев достоверно снижается.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Комплексный подход, заключающийся в исследовании с использованием атомно-силовой микроскопии рельефа поверхности, объемной морфометрии, упругости и силы адгезии гемоцитов и целоцитов, может быть рекомендован для изучения морфофункционального состояния клеток циркулирующих жидкостей различных представителей культивируемых беспозвоночных животных и дальнейшего изучения механизмов развития ответа на осмотический стресс.

### **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. Исследование фагоцитарной активности гемоцитов *Helix pomatia* и *Lumbricus terrestris* // Аллергология и иммунология. – 2011. – Т. 12. – № 3. – С. 303-304.

2. Присный А.А., Пигалева Т.А. Типология и функциональные особенности клеточных элементов внутренней среды обыкновенного земляного червя (*Lumbricus terrestris* L.) // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Естественные науки. – 2012. – № 3 (122), выпуск 18. – С. 151-154.

3. Присный А.А., Пигалева Т.А. Влияние динамики осмотического давления на механические свойства плазматической мембраны гемоцитов некоторых представителей аннелид // Вестник Тамбовского университета. Серия Естественные и технические науки. – 2013. – Том 18, выпуск 4. – С. 1629-1631.

4. Присный А.А., Пигалева Т.А. Изменение морфометрических показателей гемоцитов *Hirudo medicinalis* и *Haemopis sanguisuga* в ответ на осмотическую нагрузку // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Естественные науки. – 2014. – № 17 (188), выпуск 28. – С. 125-128.

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

1. Пигалева Т.А. Структурные и функциональные особенности клеточного иммунитета дождевого червя (*Lumbricus terrestris*) // Материалы X Всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН. – Сыктывкар, 2011. – С. 167-170.

2. Пигалева Т.А., Присный А.А. Структурные и функциональные свойства гемоцитов медицинской пиявки // Проблемы иммунологии,

патологии и охраны здоровья рыб. Расширенные материалы III Международной конференции. – М., 2011. – С. 184-187.

3. **Пигалева Т.А.** Структурные и функциональные особенности гемоцитов некоторых представителей аннелид // Материалы всероссийского конкурса научно-исследовательских работ студентов и аспирантов в области биологических наук в рамках всероссийского фестиваля науки: сборник материалов всероссийского конкурса научно-исследовательских работ. – Ульяновск, 2011. – Т. 2. – С. 165-166.

4. 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.

5. **Пигалева Т.А.** Определение значений модуля Юнга гемоцитов *Hirudo medicinalis* // VII Сибирский съезд физиологов. Материалы съезда. – Красноярск, 2012. – С. 418-419

6. **Пигалева Т.А.** Влияние изменения осмотического давления на морфологические и упругостные показатели целомоцитов медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*: *Hirudinea*, *Annelida*) // XI Всероссийская молодежная научная конференция Института физиологии Коми НЦ УрО РАН. – Сыктывкар, 2012. – С. 182-185.

7. **Пигалева Т.А.** Сравнительный анализ методов атомно-силовой и световой микроскопии, используемых для определения морфологических показателей целомоцитов медицинской пиявки в измененных осмотических условиях // «Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные аспекты» Материалы V Всероссийской научно-практической конференции. – Москва, 2012. – С. 104-106.

8. **Пигалева Т.А.** Влияние изменения осмотического давления на структуру целомоцитов медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*) // Всероссийская конференция с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптации гидробионтов». – Борок, 2012. – С. 301-304.

9. **Пигалева Т.А.** Структурные и функциональные особенности гемоцитов некоторых представителей аннелид // Материалы всероссийского конкурса «Инновационный потенциал молодежи 2012». – Ульяновск, 2012. – С. 712-740.

10. **Пигалева Т.А.** Морфофункциональная характеристика целомоцитов *Lumbricus castaneus* (аннелиды, олигохеты) // Биоразнообразие и устойчивость живых систем: материалы XIII Международной научно-практической экологической конференции – Белгород, 2014. – С. 52-53.

11. **Пигалева Т.А.** Сравнительный анализ морфофункционального статуса целомоцитов представителей рода *Lumbricus* (аннелиды, олигохеты) // Научный результат. Серия «Физиология». – 2014. – № 1 (1). – С. 56-62.

**ПИГАЛЕВА ТАТЬЯНА АЛЕКСАНДРОВНА**

**Морфофункциональные особенности и осморегуляторные реакции  
клеточных элементов системы циркуляции  
представителей класса Clitellata**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук