

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования

«Белгородский государственный национальный
исследовательский университет»

На правах рукописи

Пигалева Татьяна Александровна

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

03.03.01 – физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Белгород – 2015

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Организация целома и системы циркуляции у аннелид	10
1.2. Классификация клеточных элементов целома и системы циркуляции у аннелид	15
1.3. Особенности иммунных реакций аннелид	32
1.4. Фагоцитоз у аннелид	36
1.5. Инкапсуляция у аннелид	40
1.6. Регуляция объема и ионного состава целомической жидкости в различных осмотических условиях	42
1.7. Регуляция объема целомоцитов аннелид в различных осмотических условиях	48
1.8. Изменение цитоскелета при осмотическом стрессе	50
ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	70
3.1. Оценка клеточных реакций, возникающих в результате действия ос- мотической нагрузки на гемоциты представителей подкласса <i>Hirudinomorpha</i>	70
3.1.1. Типология гемоцитов представителей <i>Hirudinomorpha</i>	70
3.1.2. Изменение морфометрических показателей гемоцитов пред- ставителей подкласса <i>Hirudinomorpha</i> в ответ на осмотическую нагрузку	71
3.1.2.1. Динамика морфометрических параметров гемоцитов в ответ на осмотическую нагрузку, регистрируемая методом световой микроскопии	71
3.1.2.2. Результаты исследования топографии гемоцитов методами полу- контактной атомно-силовой микроскопии	76
3.1.3. Осморегуляторные реакции гемоцитов представителей подкласса <i>Hirudinomorpha</i>	83
3.1.4. Влияние осмотической нагрузки на упругость и адгезионные свой- ства плазмалеммы гемоцитов представителей подкласса <i>Hirudinomorpha</i>	86
3.2. Оценка клеточных реакций, возникающих в результате действия ос- мотической нагрузки на целомоциты представителей подкласса <i>Oligochaeta</i>	88
3.2.1. Типология целомоцитов представителей <i>Oligochaeta</i>	88
3.2.2. Изменение морфометрических показателей целомоцитов пред- ставителей подкласса <i>Oligochaeta</i> в ответ на осмотическую нагрузку	

.....	90
3.2.2.1. Динамика морфометрических параметров целомоцитов в ответ на осмотическую нагрузку, регистрируемая методом световой микроскопии	90
3.2.2.2. Результаты исследования топографии целомоцитов методами полуконтактной атомно-силовой микроскопии	105
3.2.3. Осморегуляторные реакции целомоцитов представителей под- класса <i>Oligochaeta</i>	146
3.2.4. Влияние осмотической нагрузки на упругость и адгезионные свойства плазмалеммы целомоцитов представителей подкласса <i>Oligochaeta</i>	153
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	159
4.1. Анализ действия осмотической нагрузки на клеточные элементы циркулирующих жидкостей представителей класса <i>Clitellata</i>	159
4.1.1. Динамика морфометрических характеристик гемоцитов (целомо- цитов) при действии осмотической нагрузки	159
4.1.2. Динамика линейных параметров и объема гемоцитов и целомоци- тов в условиях измененного осмотического давления	163
4.1.3. Динамика функциональных свойств клеток распределительного аппарата аннелид при действии осмотической нагрузки	168
4.2. Анализ динамики упруго-эластических свойств и топографических характеристик плазмалеммы гемоцитов и целомоцитов представителей класса <i>Clitellata</i> при действии осмотической нагрузки	176
4.3. Построение типологии клеточных элементов циркулирующих жид- костей представителей класса <i>Clitellata</i>	180
ВЫВОДЫ	183
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	184
Библиографический список	185

ВВЕДЕНИЕ

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 ресурсов, 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 gordejefi* (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 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 внут-

ренной среды аннелид и могут быть использованы для дальнейшего изучения механизмов ответа на осмотический стресс. При разведении представителей типа *Annelidae* в культуре следует учитывать выявленные в ходе данной работы особенности осморегуляторных реакций гемоцитов и целоцитов 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, хлорогогенные 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 целоцитов обеспечивается путем мобилизации мембранного резерва плазмолеммы.

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 «Биоразнообразие и устойчивость живых систем» (Белгород, 2014).

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Организация целома и системы циркуляции у аннелид

В каждом сегменте кольчатых червей симметрично залегают два целоми-ческих мешка, изолированных от целомов соседних сегментов поперечными септами. Левый и правый целомы в каждом сегменте отделены друг от друга продольными мезентериями, тянущимися вдоль мидсагиттальной плоскости тела; один из них расположен дорсально над кишкой, а второй вентрально, под ней. Положение септ соответствует положению перетяжек на поверхности тела. Каждая септа состоит из двух слоев мезотелия (один из них принадлежит предшествующему, а второй последующему сегментам) и залегающего между ними тонкого слоя соединительной ткани. Мезентерий организован так же, как и септы, но возникает в результате контакта стенок левого и правого целомов одного сегмента (Рупперт Э.Э. с соавт., 2008).

Кольчатые черви, локомоция которых основана на использовании подвижных придатков или перистальтических сокращений всего тела, обычно имеют хорошо развитые септы, представляющие собой более или менее полные «переборки» между сегментами. Поскольку септы изолируют гидроскелет каждого отдельного сегмента, воздействие силы, возникающей при сокращении сегментарных мышц, ограничено только этим самым сегментом. С другой стороны, септы могут быть неполными или вообще подвергаются редукции. Подобное имеет место у кольчатых червей, ведущих сидячий образ жизни, а также у форм, которые используют иные механизмы локомоции, нежели упомянутые выше: например, ресничное движение (мелкие кольчатые черви), резкое изгибание тела или подтягивание за счет глотки, способной попеременно сильно выворачиваться и втягиваться (некоторые роющие кольчецы) (Догель В.А., 1981; Иванов А.В. с соавт., 1983; Рупперт Э.Э. с соавт., 2008).

Парные целоми-ческие полости каждого сегмента выстланы ресничным мезотелием, что следует рассматривать как примитивный признак. Участок мезотелиальной стенки целома, обращенный наружу, состоит из видоизмененных

эпителиально-мышечных клеток, которые образуют и мышцы стенки тела. Из сократимых мезотелиальных клеток могут также формироваться радиальные и кольцевые мышцы септ, кольцевые мышцы кровеносных сосудов и мышцы стенки кишки (преимущественно кольцевые). На отдельных участках мезотелий представлен специализированными хлорогенными клетками, которые желтым или коричневым слоем покрывают часть кишки и некоторые кровеносные сосуды. Функции этой ткани у кольчатых червей сравнимы с функциями печени позвоночных животных. Хлорогенная ткань – это главный центр, в котором синтезируются и запасаются гликоген и жир. Кроме того, в ее клетках накапливаются и обезвреживаются токсины, синтезируется гемоглобин, протекает катаболизм белков и образуется аммиак, осуществляется синтез мочевины (Иванов А.В. с соавт., 1983).

Целомическая жидкость, циркулирующая которой обеспечивается работой ресничек и сокращением мышц стенки тела, содержит целомоциты. Эти клетки участвуют в реализации защитных реакций, а иногда и в газообмене (гемоглобинсодержащие целомоциты) (Барнс Р. с соавт., 1992; Догель В.А., 1981; Иванов А.В. с соавт., 1983; Рупперт Э.Э. с соавт., 2008).

В целомических полостях каждого сегмента осуществляется локальная циркуляция, однако транспорт в масштабах всего тела осуществляется хорошо развитой кровеносной системой, состоящей из кровеносных сосудов и сердец. У кольчатых червей с рудиментарными септами или, совсем лишенных септ, кровеносные сосуды сильно редуцированы или полностью исчезают. В подобных случаях транспорт по всему телу обеспечивает целомическая жидкость. Кровеносные сосуды и синусы представляют собой заполненные жидкостью каналы в компартменте соединительной ткани. В отличие от сосудов позвоночных они не выстланы эндотелием. Главные сосуды – спинной кровеносный сосуд в спинном мезентерии и брюшной кровеносный сосуд в брюшном мезентерии. По спинному сосуду кровь течет вперед, а по брюшному – назад. В каждом сегменте кровь возвращается из брюшного сосуда в спинной по капиллярной сети (плексусу), залегающему в стенке тела. Из спинного сосуда в брюшной

кровь попадает по капиллярному плексусу, сосудам или синусам, охватывающим кишку. Главные кровеносные сосуды, особенно спинной, сократимы и прогоняют кровь за счет перистальтики. У некоторых кольчатых червей расширенный передний отдел спинного сосуда преобразован в мускулистое сердце, а у многих дождевых червей сердцами становятся несколько специализированных дорсовентральных сосудов, огибающих передний отдел кишечника (Беклемишев В.И., 1964; Барнс Р. с соавт., 1992; Догель В.А., 1981; Иванов А.В. с соавт., 1983; Рупперт Э.Э. с соавт., 2008).

Наиболее постоянным компонентом кровеносного аппарата аннелид является околкишечный синус – узкое щелевидное пространство, заключенное в толще пограничной пластинки кишечника, между кишечным эпителием и соматоплеврой. У крупных аннелид околкишечный синус может быть заменен околкишечным сплетением. От спинной части синуса отходит кпереди спинной сосуд, который продолжается в ларвальных сегментах, залегая в спинном мезентерии (Беклемишев В.И., 1964; Иванов А.В. с соавт., 1983; Рупперт Э.Э. с соавт., 2008).

Наряду с околкишечным синусом в брюшном мезентерии большинства аннелид залегает самостоятельный брюшной или подкишечный сосуд. В этих случаях спинной и брюшной синус сливаются в задней части тела червя. Кроме того, сплетение сосудов или отдельный сосуд обычно бывают и вдоль брюшной нервной цепочки. Эти продольные пути соединяются между собой метамерными сосудистыми дугами. В состав каждой метамеры входят две главные пары дуг – висцеральная и париетальная. Висцеральные дуги перемещают кровь от спинного сосуда к стенке кишечника, а оттуда насыщенную кислородом кровь ведут к брюшному сосуду. Париетальные сосуды ведут кровь от брюшного и околонервного сосудов к стенке тела, где сосуды распадаются на капилляры (Беклемишев В.И., 1964; Барнс Р. с соавт., 1992; Догель В.А., 1981; Иванов А.В. с соавт., 1983; Рупперт Э.Э. с соавт., 2008).

Гемоглобин, обычный дыхательный пигмент кольчатых червей, может находиться в целомической жидкости, крови, мышцах и в нервах. В целоме ге-

моглобин сконцентрирован в целомоцитах, а в кровеносной системе растворен в плазме крови. Газообмен осуществляется через стенку тела, придатки и жаберы (Догель В.А., 1981; Иванов А.В. с соавт., 1983; Рупперт Э.Э. с соавт., 2008).

Кровеносная система олигохет устроена принципиально так же, как и у всех остальных кольчатых червей. У дождевых червей обнаруживается несколько специфических особенностей, к числу которых можно отнести присутствие капилляров в толще покровов и наличие сердец, которые у многих олигохет функционально дополняют работу сократимого спинного кровеносного сосуда. Сердца представляют собой расширенные мускулистые области околокишечных сосудов, связывающие брюшной и спинной продольные сосуды. Число сердец варьирует. Представители *Lumbricus* имеют пять пар сердец, кольцами охватывающих пищевод (в VII-XI сегментах). Представители *Tubifex* имеют лишь одну пару околокишечных сердец. Сердца снабжены клапанами, представляющими собой складки их стенок. Сходные клапаны присутствуют также и в спинном кровеносном сосуде в местах соединения последнего с сосудами сегментов (Рупперт Э.Э. с соавт., 2008).

Усиленное развитие компартмента соединительной ткани связано с редукцией целома и септ – признак, который отличает пиявок от прочих кольчатых червей. Пиявки лишены целомических мешков, столь характерных для аннелид вообще. Единственное исключение составляет пиявка *Acanthobdella peledina*. Целом, лишенный септ и мезентериев, непрерывно тянется вдоль всего тела пиявки. Таким образом, он превратился в общую циркуляторную систему, которая поначалу взяла на себя лишь часть функций кровеносной системы, а позднее полностью ее заместила (Догель В.А., 1981; Иванов А.В. с соавт., 1983; Рупперт Э.Э. с соавт., 2008).

В процессе замещения целомическая система приобрела черты сходства со старой кровеносной системой. Она состоит из двух главных продольных сосудов, артерий, вен и даже капилляров, но два признака все же выдают ее целомическое происхождение. Во-первых, два главных продольных сосуда проходят по бокам тела, а не по спинной и брюшной сторонам. Во-вторых, сосуды

выстланы мезотелием, в то время как сосуды обычной кровеносной системы ограничены только базальной пластинкой. Существенная часть целомического мезотелия, особенно в капиллярах, специализирована и превратилась в особые крупные клетки, в которых запасаются питательные вещества. Такой видоизмененный мезотелий называется хлорогогенной тканью у *Rhynchobdellida* и ботриоидной тканью у *Arhynchobdellida*. Движение целомической жидкости осуществляется за счет мышечных сокращений боковых продольных каналов (Рупперт Э.Э. с соавт., 2008).

Функцию целома у целомических животных можно обозначить как распределительную. При этом у *Annelidae* он выполняет в первую очередь экскреторно-распределительную функцию. В пользу этого говорит обнаружение уратов в целомической жидкости полихет, а так же расположение нефридиев, погруженных в целом. Трофическая функция целома осуществляется за счет специализированных клеточных элементов (Liebmann E., 1946), при этом сама жидкость бедна растворенными питательными веществами. У большинства представителей аннелид целом выполняет дыхательную функцию при помощи растворенного пигмента или специализированных клеточных элементов. Имунная функция целомической жидкости доказана в ряде экспериментов по трансплантации и фагоцитозу. У аннелид между целомом и кровеносным аппаратом существует известный антагонизм, и при слабом развитии последнего участие в газообмене полностью переходит к целому. При отсутствии кровеносного аппарата вся функция распределения полностью падает на целом. Наиболее яркий пример вытеснения кровеносной системы системой целомических каналов (лакун) выявлен у челюстных пиявок (Беклемишев В.И., 1964; Барнс Р. с соавт., 1992; Догель В.А., 1981; Иванов А.В. с соавт., 1983; Рупперт Э.Э. с соавт., 2008).

Кровеносный аппарат возникает из совокупности схизоцельных полостей и является наиболее совершенным приспособлением последних к выполнению распределительной функции. Этот подход к пониманию происхождения кровеносного аппарата был впервые обоснован М. Fernandez (Fernandez M., 1904),

продолжателем идей стал – Н. А. Ливанов (Ливанов Н.А., 1914). По Ливанову кровеносные сосуды представляют щели мезенхимы, вокруг которых уплотнилось её промежуточное вещество и которые приняли форму правильных каналов. Кровь – есть соединительная ткань с разжиженным основным веществом, а попадающие в сосуд мезенхимные клетки становятся форменными элементами крови; за счет них может возникать выстилка сосуда. Очень часто сосуды не имеют совсем выстилки. Беклемишев (1964) делит по строению кровеносной системы всех беспозвоночных на две группы. Первый тип относится к тем группам животным, опорная ткань которых имеет преимущественно клеточный характер, второй – тем, у которых в качестве опорной ткани преобладает студенистое вещество. Ко второму типу относятся немертины и аннелиды.

У аннелид мезенхима зажата между целомом и прочими органами и превращена в систему пограничных образований. Поэтому и кровеносная система оказалась зажата в толще этих образований, пронизывая их. Стенки сосудов аннелид образованы просто веществом этих пограничных пластинок. Мускулатура и клапаны сосудов образуются за счет выселяющихся в ретроперитонеальном направлении клеток целомического эпителия.

Наряду с примитивным строением стенок сосудов кровеносный аппарат типичных аннелид обладает сложным архитектурным расчленением (Ливанов Н.А., 1910).

1.2. Классификация клеточных элементов целома и системы циркуляции у аннелид

Известно несколько методологических подходов к способам классификации клеток системы циркуляции аннелид, обычно при описании клеток используют морфологический, функциональный или иммунный критерий.

Несмотря на полиморфность клеток, у кольчатых червей Stein и Cooper (Stein E.A., Cooper E.L., 1983) выделили две большие группы клеток – амебоциты и элеоциты.

Амебоциты – мобильные фагоцитирующие клетки, содержащие различное количество гранул. У земляных червей агранулярные амебоциты или гиалиновые, варьируют по размеру от небольших форм (5-8 μm) с небольшим объемом цитоплазмы и малым нуклеоцитоплазматическим отношением, до крупных клеток (30 μm в диаметре) с большим объемом цитоплазмы. Гранулярные амебоциты так же сильно различаются по размеру и количеству в зависимости от видовой принадлежности аннелид. Среди гранул абсолютно преобладают ацидофильные, но функции их до конца не выяснены. Представители некоторых олигохет содержат, по крайней мере, две субпопуляции гранулярных амебоцитов. Для таких представителей доминирующий тип гемоцитов обозначается как «линоциты» или «лампроциты» (позднее были названы «мукоциты») (Hess R.T., 1970). Основной функцией этих клеток является трофическая, и они не принимают непосредственного участия в воспалительном процессе. Полихеты также как и олигохеты обладают гиалиновыми и гранулярными амебоцитами, морфология таких клеток, также как и их относительное число, достаточно варьирует среди представителей класса (Dales R.P., Dixon L.R.J., 1981). Основная форма амебоцитов овальная или круглая, но могут встречаться также и веретенообразные. Цитоплазма имеет выпячивания микрофиламентов (Baskin D.G., 1974; Dales R.P., Dixon L.R.J., 1981). Гранулярные амебоциты содержат ограниченные мембраной электронно-плотные гранулы, которые Baskin (1974) рассматривал как лизосомы. У пиявки амебоциты относительно небольшие (6-10 μm в диаметре) по сравнению с остальными аннелидами. Но их амебоциты изучены хуже, чем у полихет и олигохет. Амебоциты пиявок более гомогенны, чем амебоциты земляных червей.

Элеоциты (хлорогогенные клетки) присутствуют почти у всех аннелид (Ratcliffe N.A., Rowley A.F., 1981). Элеоциты являются доминирующим типом целомоцитов у некоторых видов аннелид, у земляных червей составляют менее двух процентов. Это самые большие клетки в целомической жидкости аннелид, их размер достигает 40-60 μm в диаметре. Они содержат везикулы или гранулы (хлорогогеносомы) заполненные липидным или липидоподобным содержимым

и белками. Гликоген обычно присутствует в небольшом количестве, в целом, содержание цитоплазматических включений меняется в зависимости от рациона животного (Valembois P., Cazaux M., 1970; Stein E.A., Cooper E.L., 1978; Dales R.P., Dixon L.R.J., 1981). Элеоциты земляного червя претерпевают морфологические изменения, связанные с синтезом определенных белков, на протяжении жизненного цикла животного. Элеоциты пиявок также как и амебоциты отличаются от клеток полихет меньшим размером (Sawyer R.T., Fitzgerald S.W., 1981). Основной функцией элеоцитов является трофическая (Liebmann E., 1946; Valembois P., 1971), также они участвуют в фагоцитозе и отторжении дезинтегрированных мускульных волокон, что становится необходимым в ходе метаморфоза (Baskin D.G., 1974).

Некоторые виды полихет в целомической жидкости содержат гемоглобинсодержащие клетки, или эритроциты. Несмотря на наличие основной функции – переноса и хранения кислорода, эритроциты вовлекаются и в реакции иммунной защиты (Hoffman R.J., Mangum C.P., 1970).

Методом проточной цитометрии обнаружены две основные субпопуляции среди иммунокомпетентных клеток дождевых червей (Cossarizza A., Cooper E.L., Suzuki M.M., Salvioli S., Capri M., Gri G., et al., 1996; Engelmann P. et al., 2002; Engelmann P. et al., 2005). Клетки субпопуляции больших целомоцитов (25-50 μm в диаметре) активны в фагоцитозе и инкапсуляции бактерий, но не имеют поверхностных маркеров моноклональных антител. Малые целомоциты (10-25 μm в диаметре) проявляют цитотоксичность и взаимодействуют с антителами к CD11a, CD45RA, CD45RO, CDw49b, CD54, CD90, и бета-2-микроглобулином. Субпопуляция негранулярных целомоцитов распознает и нейтрализует чужеродные антигены. Эти клетки несут поверхностные маркеры Thy-1 (CD90) и бета-2-микроглобулина, эти две молекулы принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов (Shalev A., et al., 1981; Roch P., et al., 1983).

Галактионов (2005) делит целомоциты олигохет (*Olygochaeta*) на пять основных типов: базофилы и нейтрофилы (гиалиновые амебоциты), гранулоциты и ацидофилы (гранулярные амебоциты) и хлорогеновые клетки (элеоциты).

При этом, данные электронной микроскопии позволяют отнести базофилы к лимфоцитоподобным клеткам двух типов: с большим или меньшим количеством псевдоподий. Эти клетки демонстрируют структурное сходство с незрелыми лимфоцитами позвоночных. Нейтрофилы напоминают макрофаги позвоночных животных. В их вакуолях заметны различного рода включения, в том числе и бактериальные клетки. Гранулоциты и ацидофилы – клетки с большим количеством включений и вакуолей. Элеоциты – клетки самой разнообразной величины. У них отсутствуют псевдоподии. Цитоплазма переполнена гранулами. Данный класс клеток выполняет функцию обеспечения организма питательными веществами, у кольчатых червей процесс фагоцитоза, инкапсуляции, распознавания чужеродности, трансплантационного отторжения и адаптивного переноса обеспечивается в основном амебоцитами гиалинового типа: лимфоцитоподобными амебоцитами первого и второго типов (базофилами), а также нейтрофилами, характеризующимися способностью к активному фагоцитозу. Гранулярные клетки принимают незначительное участие в процессе фагоцитоза. Элеоциты вообще не фагоцитируют.

Рассмотрим подробнее вышеперечисленные типы клеток.

Базофилы – наиболее многочисленные целоциты, составляющие приблизительно 60-70% всей популяции (Stein E.A. et al., 1977). Большинство базофилов имеет размер 8-15 μm в диаметре, но могут встречаться с размерами от 5 до 30 μm . Тело клетки сферическое или овальное, часто с многочисленными псевдоподиями. Они могут принимать вытянутую форму или распластываться листообразно. Обычно цитоплазма не имеет больших гранул, а содержит более или менее многочисленные небольшие плотные гранулы (0,5 μm). Две трети от всех базофилов содержат разнообразные по числу (от 1 до 15, иногда 4-5), размером – 2-8 μm , нерегулярной формы чистые везикулы или вакуоли, некоторые из них содержат фагоцитированный ранее материал (Stein E.A. et al., 1977; Stein E.A., Cooper E.L., 1978).

Цитоплазма малых базофилов прочно окрашивается пиронином, у больших базофилов цитоплазма окрашивается хуже; связывание пиронина суще-

ственно снижается или совсем пропадает после обработки рибонуклеазой. Окрашивание клеток ртутным бромфенолом голубым, также зависит от размера клетки, и различается от слабой до средней по интенсивности. Базофилы не окрашиваются альциановым голубым и черным суданом В (слабая и умеренная окраска). Двухвалентных и трехвалентных форм железа, обнаружено не было (Stein E.A., Cooper E.L., 1978).

Окрашивание небольших плотных гранул (0,5 μm) показало, что часто соседние гранулы сливаются в чистые вакуоли. Другая популяция гранул больше по размеру (до 1 μm), но относительно меньшие по количеству, окрашиваются, как и небольшие гранулы, суданом черным В, но также реагируют и на другие красители. Связывание с суданом у обоих этих типов гранул пропадает после обработки этанолом.

Два типа больших, нерегулярного размера гранул, соединяясь вместе, образуют прозрачные вакуоли живой клетки. Одна группа, представляющая большинство этих вакуолей интенсивно окрашивается в PAS реакции (Periodic acid-Schiff) и умеренно йодом, но больше не реагирует ни на какие красители. Это окрашивание прекращается после разрушения амилазы. Вторая группа вакуолей или везикул наблюдается в меньшем количестве и могут, что касается малых базофилов, заполнять практически всю клетку. Эти вакуоли положительно окрашиваются на такие ферменты как кислая фосфатаза и β -глюкуронидаза. Обычно эти два фермента локализуются внутри небольших отдельных вакуолей размером 0,5 μm . В популяции целомоцитов в целом, число клеток содержащих кислую фосфатазу близко к числу клеток содержащих β -глюкуронидазу. У базофилов количество кислой фосфатазы в клетках больше чем в популяции в целом (74% и 60% соответственно). Пероксидаза не представлена ни в базофилах, ни в других целомоцитах (Dales R.P., Dixon L.R.J., 1981; Stein E.A., Cooper E.L., 1978; Valembois P., Cazaux M., 1970).

Нейтрофилы – быстро адгезирующие клетки и способны распластываться, образуя тонкий слой почти просвечиваемой цитоплазмы. Края клеток неправильные и неотчетливые. Размер может находиться в пределах от 12 до 50

μm в зависимости от степени адгезии к субстрату. Часто присутствуют в цитоплазме небольшие гранулы, они относительно не видны, и, на окрашенном препарате, имеют сходную плотность с плотностью цитоплазмы. Пищеварительные вакуоли явно видны. Ядро достаточно большое (8-10 μm) и круглое; хроматин имеет тенденцию находиться в неконденсированном виде. Цитоплазма нейтрофила слабо реагирует на цитологические окрашивания. Часто не происходит окрашивания с суданом черным В (Ratcliffe N.A., Rowley A.F., 1981; Stein E.A., Cooper E.L., 1983). Гранулы 0,5-4 μm , обычно неправильной формы и с нечеткими очертаниями. Нейтрофилы содержат гранулы 0,5-2 μm , которые слабо окрашиваются при различных рН, независимо от фиксации метанолом или формалином. Малые (0,5 μm) суданофильные гранулы часто многочисленны, похожи по внешнему виду и способности окрашиваться на малые, содержащие липиды, гранулы базофилов и остальных целомоцитов. Кислая фосфатаза и β -глюкуронидаза локализованы в гранулах значительно варьирующих по величине, но достаточно многочисленных; преимущественно они небольшие (около 0,5 μm), но встречаются больше и более светло окрашенные. Процент кислой фосфатазы в нейтрофилах высок и его превышает только содержание кислой фосфатазы в базофилах. Ядра нейтрофилов уникальны не из-за их размера, а по свойству окрашиваться метиловым зеленым и другими ядерными красителями, окрашиваются более светло и диффузнее, чем ядра других целомоцитов (Linthicum D.S. et al., 1977; Ratcliffe N.A., Rowley A.F., 1981; Valembois P., Cazaux M., 1970).

Ацидофилы – типичные гранулярные клетки. Их популяция состоит из двух подгрупп. Ацидофильные клетки первого типа обычно наибольшие по размеру из двух типов (20-30 μm), но встречаются и небольшие представители (10 μm). Ацидофилы второго типа обладают меньшими размерами (10-15 μm). Гранулы ацидофилов первого типа меньше (1-2 μm), чем гранулы ацидофилов второго типа (3-4 μm), и потому весьма многочисленны. Только в редких исключениях, ацидофилы полностью заполнены гранулами. Клетки имеют сферическую форму, в редких случаях могут присутствовать псевдоподии, но

обычно выпячивания мембраны нет. Ядра у обоих типов ацидофилов содержат конденсированный хроматин, 5-9 μm в диаметре и имеют тенденцию занимать эксцентричное положение. Цитохимическая реакция цитоплазмы обычно обусловлена гранулами. Наблюдались цитохимические реакции сходные с большими базофилами, за исключением стойкого окрашивания с ртутным бромфенолом голубым и амилазоустойчивой реакцией Шиффа (PAS). Ацидофилы включают три типа гранул, но абсолютно доминировали мелкие трудноразличимые гранулы. При большинстве цитохимических окрашиваний доминирующие гранулы двух типов ацидофилов окрашиваются схоже, за исключением гранул второго типа, которые окрашиваются более слабо, чем первый тип. Ацидофильные гранулы явно участвовали в окрашивании реактивом Viegmann Scarlet, окрашиваясь от умеренного до сильного при любых значениях pH и при любой фиксации клеток – метанолом или формалином. Первый тип гранул проявлял слабую пиронинофилию, не поддающуюся влиянию удаления рибонуклеазы. Доминирующие гранулы встречаются в обоих типах клеток со средней частотой, как пузыри на поверхности клетки или как отдельные гранулы, окружающие клетки (Dales R.P., Dixon L.R.J., 1981; Engelmann P. et al., 2005; Stein E.A. et al., 1977; Valembois P., Cazaux M., 1970).

Вторая группа гранул, небольшие по размеру (около 0,5 μm) и обычно в количестве нескольких, схожие по характеристикам окрашивания с малыми суданофильными гранулами базофилов. Третья группа гранул так же малочисленна, но более вариабельна в размере (0,5-1,5 μm), окрашиваются йодом. В этом случае, накопленная амилаза выявляется PAS-реакцией неверно, потому что маскируется положительным эффектом доминирующих гранул. Кислая фосфатаза и β -глюкуронидаза присутствует во всех типах ацидофильных клеток в небольшом или среднем количестве. Это средние и большие клетки (12-40 μm) амебовидной и крайне нестабильной формы. Они содержат многочисленные выпячивающиеся гранулы размерами 0,5-2 μm , которые более рассеяны по клетке, чем у ацидофилов. Прозрачные вакуоли часто присутствуют, но без явного содержания фагоцитированного ранее материала. Ядро содержит относи-

тельно конденсированный материал, 5-9 μm в диаметре и не имеет четкой локализации внутри клетки. Как и ацидофилы, гранулоциты содержат более одного типа гранул. Наиболее обильные гранулы также обозначают как доминирующие. Многочисленный тип везикул у гранулоцитов вступает в схожие реакции, что и доминантные гранулы первого типа ацидофилов, исключая окрашивание реактивом Biebrich Scarlet (при реакции происходила менее интенсивная окраска). Гликогена не обнаружено ни йодным методом, ни PAS-реакцией. Небольшие, размером около 0,5 μm , гранулы цитохимически схожи у двух типов клеток, и также представлены в небольшом количестве. Кислая фосфатаза встречается редко и в небольшом количестве. Как и у ацидофилов, она выявлена в агранулярных формах. Распределение β -глюкуронидазы сходное, но в немногих больших размерах, иногда это проявляется внутри гранул небольшого размера (0,5 μm) (Engelmann P. et al., 2005; Stein E.A., Cooper E.L., 1978; Valembois P., Cazaux M., 1970).

Элеоциты – гетерогенная группа клеток, которая обычно делится на эргопластические хлорогенные клетки (которые вероятно являются стволовыми клетками или входят в эту группу), хлорогеноциты и свободные элеоциты. Их морфология может меняться от круглой, овальной до вытянутой, размеры клеток от 10 до 60 μm в диаметре. Большинство элеоцитов содержит сферические гранулы (1-3 μm) и хлорогеносомы внутри цитоплазмы. Хлорогеносомы выполняют важную функцию в питании клетки, особенно в поддержании осмотического баланса. Эти клетки не активны в фагоцитозе бактерий или других организмов (Dales R.P., Kalac Y., 1992). Хлорогенные клетки различаются среди разных видов, так у *Eisenia* они участвуют в фагоцитозе, тогда как у *Lumbricus* – нет. Это высоко гранулированные клетки, но значительно отличающиеся от ацидофилов и гранулоцитов. Они представлены двумя формами. Первый тип – это большие удлиненные клетки, 10-25 \times 30-60 μm , заполненные желто-коричневыми, 1-3 μm диаметром, везикулами или гранулами. Второй тип клеток меньше (11-20 μm), имеет более правильную форму и наполнен красно-коричневыми гранулами (0,5-2 μm) непостоянной формы. Они обычно

представлены кластерами, состоящими из нескольких клеток. У обоих типов клеток псевдоподии незаметны или отсутствуют. Ядро 6-9 μm в диаметре, располагается эксцентрично и часто скрыто из-за большого количества гранул. Первый тип хлорогенных клеток является наиболее хрупким из всех видов целоцитов, часто при приготовлении мазков они разрушаются, тогда как остальные типы целоцитов (включая второй тип хлорогенных клеток) остаются неповрежденными. Определенное количество распада этих клеток, очевидно, происходит в естественных условиях в целомической жидкости. Целомическая жидкость, приготовленная для изучения живых клеток, часто содержит фрагменты хлорогенных клеток первого типа и остальные целоциты часто включают фагоцитированные хлорогенные гранулы (Stein E.A., Cooper E.L., 1978; Roots B.I., 1960).

Цитохимические реакции двух типов хлорогенных клеток схожи, но не идентичны. Во многих случаях, большая степень различия наблюдается между клетками, составляющими тип, чем между клетками из двух разных типов. Такое разнообразие внутри типа проявляется в окрашивании цитоплазмы с ртутным бромфенолом голубым и PAS-реакцией. В тоже время реакция Viebrich Scarlet не выявляет внутритиповых различий, когда они достаточно велики. В отличие от остальных типов целоцитов цитоплазма хлорогенных клеток часто окрашивается альциановым голубым, при pH от 2,5 до pH 1,0. К тому же, PAPS-реакция клеток достаточно разнообразна. Цитоплазматический гликоген не может быть охарактеризован в хлорогенных клетках путем накопления PAS-выделенной амилазы, в результате присутствия в большом количестве разнообразных амилазоустойчивых карбогидратов. В этом случае йодное окрашивание практичнее и показывает относительно большие запасы гликогена (Engelmann P. et al., 2005; Hoffman R.J., Mangum C.P., 1970; Stein E.A., Cooper E.L., 1978).

Хлорогенные везикулы или гранулы также окрашиваются разнообразно ртутным бромфенолом голубым и PAS реакцией, но относительно слабо реагируют с Viebrich Scarlet. В отличие от цитоплазмы, гранулы не окрашиваются ни

с альциановым голубым, ни в PAPS реакции. Они окрашиваются в реакциях с суданом черным В, причем второй тип более интенсивно, чем первый. Гранулы второго типа окрашиваются пиронином, независимо от экстракции рибонуклеопротеидов. Кислая фосфатаза и β -глюкуронидаза содержатся в одинаковых количествах в обоих типах хлорогенных клеток. Ферменты присутствуют в небольшом (первый тип) и в среднем количестве (второй тип) количестве в относительно небольших пропорциях на клетку. В хлорогенных клетках, как и в остальных целомацитах, не присутствует пероксидаза (Stephenson J., 1930).

Хлорогенные клетки выделяются из хлорогенной ткани, которая окружает пищеварительный тракт земляного червя. Эту ткань сравнивают с тканью позвоночных (Roots B.J., 1960; Semal-van Gansen P., 1958) и получены данные, что именно она выполняет трофическую функцию (Liebmann E., 1942; Duprat P., Bouc-Lasalle A.M., 1967). В свободной целомацитарной жидкости первый тип хлорогенных клеток находится в частичной дезинтеграции и гранулы фагоцитируются остальными целомацитами. Хлорогенные клетки более широко изучены, чем любой тип целомацитов. Liebmann (1942) обнаружил белки и липиды в хлорогенных гранулах, тогда как Roots (1960) нашел два типа фосфолипидов. Liebmann (1942), Semal-van Gansen (1956), Roots (1960), Duprat and Bouc-Lasalle (1967) описали присутствие гликогена. Также было зафиксировано включение в хлорогенные клетки уратов (Hiedrmanns C., 1937), пуринов (Semal-van Gansen P., 1956), пигментов флавинового типа (Moment G.B., 1974), ферритина (Lindner E., 1965; Stang-Voss C., 1971), гемоглобина (Lindner E., 1965; Chapron C., 1970; Stang-Voss C., 1971). Были так же обнаружены кислые мукополисахариды, присутствующие в различном количестве в цитоплазме (но не в гранулах) двух типов хлорогенных клеток. Это единственные целомациты содержащие эту группу соединений. Базируясь на объяснении Spicer, хлорогеноциты содержат как карбоксильные, так и сульфатные мукополисахариды (Spicer S.S., 1960).

Устойчивое пиронинофильное вещество в гранулах хлорогенных клеток второго типа остается неопределенным. Это вещество подобно слабому пи-

ронинофильному материалу из ацидофилов и гранулоцитов, явно не имеет отношения к РНК или кислым мукополисахаридам. Второй тип гранул первично был выявлен по сильной базофилии (Stein E.A. et al., 1977), возможно, обусловленной этим веществом.

На электронных микрофотографиях хлорогенных клеток, иногда гранулы образуют кристаллические структуры, которые Lindner (1965) и Stang-Voss (1971) рассматривали как гемоглобин. Гранулы в обоих типах хлорогенных клеток положительно реагируют на двухвалентные и трехвалентные ионы железа, так же хорошо, как и на псевдопероксидазу. Положительная псевдопероксидазная реакция не может рассматриваться как достоверная проверка на присутствие гемоглобина, так как определенные пиронин содержащие металлы могут реагировать схоже.

Важно учитывать, что, по крайней мере, у Lumbricidae, свободные целомические клетки происходят из мезодермальных перетонеальных клеток содержащих висцеральную или париетальную эпителиальную выстилку целома (спланхноплевра и соматоплевра) (Fischer E., 1993; Sima P., Slipka J., 1995; Sima P. et al., 1995). Другой вероятный источник – это эпителий, выстилающий кровеносные сосуды и септа, формирующая специализированные продуцирующие структуры (Liebmann E., 1942; Valembois P., 1971). Третий возможный случай, специализированная область органа гемопоэза, называемая кровяная железа или кровяной фолликул, описанные у некоторых представителей *Lumbriculus* sp. и родов *Sparganophilus*, *Maoridrilus*, *Pheretima* и *Pontodrilus* (Sima P., 1994). В дальнейшем исследовано, что утрата целомоцитов после их истощения индуцировала раздражение, за которым следовала обширная клеточная пролиферация в целомическую линию, в тифозоль и метанефридиальную область (Homa J. et al., 2008). Мезодермальное происхождение всех субпопуляций свободно передвигающихся клеток дождевого червя подтверждено с использованием реакции антиген-специфичных моноклональных антител млекопитающих со специфичным поверхностным маркером целомоцитов (Engelmann P. et al., 2002).

Существуют две точки зрения по поводу функций хлорогенной ткани и хлорогенных клеток дождевых червей.

В соответствии с одним из подходов, функции этих клеток тесно связаны с целомической выстилкой стенки тела и подобна печени. Питательные вещества, мигрируя через стенку кишки, попадают внутрь хлорогенных клеток, которые перемещаются и переносят питательные вещества по всему телу, а также могут выпускать свои гранулы в кровь или целомическую жидкость, контролируя постоянство внутренней среды организма.

Второй подход связывает хлорогенные клетки и экскреторную функцию организма. Вредные вещества, которые циркулируют в крови или находятся в целомической жидкости, концентрируются в хлорогенных клетках, трансформируются в хлорогеноцитах в мочевины или аммиак, затем клетки отрываются от стенки кишки для автолиза в целоме, остатки выводятся нефридиями. Высокий уровень аммония и мочевины зафиксирован как в целомической жидкости, так и в крови животных. Возможно, как кровь, так и целомическая жидкость принимают непосредственное участие в переносе продуктов обмена к нефридиям: из тканей при помощи кровеносных сосудов, а из остальных частей тела через целом. После голодания в течение месяца сухая масса червя *Aporrectoidea caliginosa* снизилась, но в теле животного были обнаружены жиры в двух формах в виде липидов и жиров, что говорит о том, что эти продукты расходуются в последнюю очередь. В хлорогенных клетках не обнаружено щелочной фосфатазы, которая встречается в тканях с быстрым метаболизмом, а её место занимает щелочная фосфатаза. Возможно, кислая фосфатаза целомацитов имеет происхождение из кишечной стенки, которая содержит большое количество этого фермента в дистальных частях клеток. Клетки кишечной стенки располагаются неподалеку от хлорогенной ткани, при помощи активного транспорта хлорогенные клетки поглощают ферменты из этих клеток. Гранулы хлорогенных клеток интенсивно окрашиваются суданом черным, что указывает на наличие фосфолипидов и этиленовых групп. Типичное бурое окрашивание гранул опосредовано наличием хромолипида, происхождение ко-

того пока не открыто, но возможно является окисленным фосфолипидом, который полимеризуется с пуринами внутри клеток (van Gansen P., 1957). Roots (1960) изучала этот хромолипид и пришла к выводу, что он состоит из фосфолипида, который является родственным с спектрально не характеризуемым материалом, что говорит о его составном строении. Остальные включения содержат агрегаты минеральных веществ, которые идентифицируются при помощи электронной микроскопии и дифракции рентгеновских лучей как мусковит или слюда (van Gansen P., van der Meersche G., 1958). Эти факты указывают в пользу теории, что хлорогогенные клетки принимают активное участие в метаболизме организма, за счет абсорбции, трансформации и переноса питательных веществ. Эта ткань имеет идеальное расположение для поглощения питательных веществ через стенку кишечника.

Возможны следующие три способа распределения содержимого этих клеток.

Первый способ связан со способностью хлорогогенных клеток покидать место прикрепления к кишке и свободно перемещаться в целомической жидкости. Они могут передавать содержимое из сегмента в сегмент, а иногда накапливать содержимое. Восстановление хлорогогенной ткани во время регенерации тканей червя происходит в течение нескольких часов, а так же наблюдается активное высвобождение содержимого клеток. Предположительно пролиферирующие клетки для заживления раны и регенерации организма способны использовать материал доставленный хлорогогеноцитами.

Во-вторых, у неповрежденных животных хлорогогенные клетки также находятся в целоме, постепенно расщепляя содержимое гранул, поэтому включения, гликоген, жиры и т.д. переходят в раствор целомической жидкости. Остатки клеток и гранул фагоцитируются амебоцитами. Дополнительно высвобождаются и минеральные вещества. Химический состав целомической жидкости заметно отличается от крови, так например, глюкоза, протеины и аминокислоты содержатся в меньших количествах, а по содержанию мочевины эти две жидкости являются идентичными. Это говорит о том, что питательные ве-

щества стремятся перейти из целомической жидкости в ткани, поэтому концентрация этих веществ будет стремиться к минимуму.

Кровеносная система является третьим механизмом транспорта питательных веществ, так как кишечник густо оплетен кровеносными сосудами, и питательные вещества способны всасываться напрямую.

Экскреторная функция целомочитов долгое время изучалась Willem and Minne (1900), которые утверждали, что гранулы внутри хлорогеновых клеток содержат гуанин, являющийся конечным продуктом азотистого обмена. Это предположение опровергали Peschen (1939), Abdel-Fattah (1955), van Gansen (1956) and Roots (1957). Roots (1957) сомневаясь в способности хлорогеновых гранул накапливать продукты азотистого обмена, изолировала гранулы и определила их состав, который состоял из углерода (43%), водорода (6%), азота (4%), фосфора (3-5%) серы (1%), так как гуанин содержит 60% азота, то его в хлорогеновых гранулах быть не может, а так же маловероятно, что другие продукты азотистого обмена содержатся в клетках. Гуанин позже был обнаружен Bahl (1947) в стенке нефридиев.

У *Hirudinea* клеточная популяция, заполняющая гемоцель, делится на амебоциты и элеоциты (хлорогеновые клетки), что соответствует составу целомочитов остальных отрядов аннелид (Ottaviani E., 2011). Амебоциты, которые именуются как лейкоциты или лимфоциты обычно гомогенны по размеру и форме. Выполняют одну из основных защитных функций, за счет фагоцитоза (Sawyer R.T., Fitzgerald S.W., 1981). Эти клетки могут свободно перемещаться в гемоцеле или быть закрепленными на стенках. Гипотезы, касающиеся их происхождения, носят лишь предположительный характер. Размеры хлорогеновых клеток изменчивы среди разных видов отряда. Их происхождение известно, они продуцируются гемопоэтическим эпителием (Oka A., 1894) и цилиофагоцитирующим органом нефридиев (Abeloos M., 1925).

Среди свободно циркулирующих клеток *Theromyzon tessulatum* (*Hirudinea*) выделили три клеточных типа: большие целомические клетки, малые целомические клетки и гранулярные амебоциты. Большие целомические

клетки размером 100-150 μm , располагаются свободно или закреплены к мезентелию, содержат гранулы. Большие целомоциты не фагоцитируют, но существует мнение о способности этих клеток к распознаванию, инкапсуляции чужеродных объектов. Гранулярные амебоциты (30-70 μm), имеют вакуолизированную цитоплазму и способны образовывать многочисленные псевдоподии. Описаны случаи фагоцитоза бактерий. Цитоплазма малых целомических клеток (7-12 μm) содержит хорошо развитую ЭПС, гранулы и вакуоли отсутствуют. Клетки не обладают фагоцитарной активностью (Lefebvre C., et al., 2008).

Мезентеальная ботридиальная ткань, выполняющая ангиогенную функцию, у некоторых видов *Glossiphoniidae* выполняет важную роль в продукции свободных целомических клеток. Преваскулярные структуры ассоциируются с жесткими клеточными тяжами, которые выпускают циркулирующие клетки, свободные от контактов друг с другом и быстро проходящие через просвет кровеносных сосудов (De Equileor M., et al., 2001). У пиявки *Hirudo medicinalis* ангиогенный процесс регулируется и координируется ботридиальной тканью (Vetvicka V., Sima P., 2009).

Циркулирующие клетки целомической жидкости полихет подробно изучены Персониной М.С. (1995). Исследования были проведены на беломорских полихетах – пескожилах, *Arenicola marina* (L.). Количество целомоцитов мало меняется в течение лета, но широко варьирует среди отдельных животных, от 2 до 9 млн. клеток/мл. Число циркулирующих элементов не коррелируют с размерами и полом животных. Идентифицировано шесть типов целомоцитов: ювенильные клетки, молодые, средние и зрелые амебоциты (веретенovidные клетки), эозинофилы и гранулоциты.

Первый тип целомоцитов объединяет ювенильные клетки, это мелкие (5-7 мкм) округлые клетки, известные в литературе под названием лимфоцитоподобных (Romieu M., 1923; Dales R.P., Dixon L.R.J., 1981). Они имеют относительно крупные ядра с ядрышками. Очертания ядер не ровные, в ядрах имеются более плотно упакованные участки хроматина. При ультраструктурном анализе было выделено множество свободных рибосом, отдельные цистерны шерохова-

той ЭПС и митохондрии, расположенные по периферии клетки. Среди целомочитов этого типа отмечены митотически делящиеся клетки, на стадии поздней анафазы и телофазы. Митотический индекс 0,25-1,25%. Доля ювенильных клеток составляет в среднем 10% при значительных индивидуальных колебаниях (3,2-21,5 %).

Самый многочисленный тип объединяет молодые и средние веретеновидные клетки. Всего на их долю приходится 50-90%, из них около 5% – это молодые амебоциты. Отличительная черта этих клеток – вытянутая веретеновидная форма. Овальное ядро обычно находится в центральной, расширенной части клетки, которая к концам равномерно сужается. Размер молодых клеток варьирует от 10 до 30 мкм, а ядра – от 5 до 10. при этом самые мелкие амебоциты имеют относительно крупные ядра. По мере роста клеток ядерно-цитоплазматическое соотношение уменьшается. Ультраструктурный анализ показывает, что органоиды в веретеновидных клетках развиты слабо; имеются отдельные цистерны шероховатой ЭПС, митохондрии и микрофибриллы. Цитоплазма этих клеток обычно содержит включения гликогена, фагосомы и в различной степени вакуолизирована. При этом мембрана, которая окружает вакуоли, морфологически не отличается от цитоплазматической мембраны. Наконец, все веретеновидные амебоциты содержат некоторое количество гранул различной формы и электронной плотности. При окрашивании акридиновым оранжевым часть гранул дает интенсивное свечение, что говорит о лизосомальной природе.

Зрелые амебоциты составляют от 5 до 30%. Эти очень узкие клетки достигают в длину 100 мкм и содержат в цитоплазме осевой цитоскелетный тяж, окрашивающийся белковыми красителями. Обычно это один тяж, но иногда наблюдается несколько тяжей или параллельных структур, напоминающих сеточку. Ядра в зрелых амебоцитах обычно расположены в средней части клеток, имеют углубление в том месте, где проходит тяж. Среди средних и зрелых амебоцитов встречаются клетки с эксцентрично расположенными ядрами и двуядерные клетки. Зрелые амебоциты отличаются от остальных типов целомочи-

тов тем, что содержат меньшее количество гранул, но имеют более мощный цитоплазматический тяж. Было определено, что тяж представлен пучком филаментов, который окружен микротрубочками. Зрелые амебоциты во многом похожи на средние амебоциты, между этими клетками существуют множество переходных форм и трудно установить четкие границы.

Эозинофилы – это округлые и веретеновидные клетки, цитоплазма которых интенсивно окрашивается эозином и акридиновым оранжевым. Они известны в литературе под названием округлых гиалиновых лейкоцитов и эозинофильных амебоцитов (Romieu M, 1923). Ядра этих клеток относительно мелкие (1-5 мкм), неправильной формы с плотно упакованным хроматином. У веретеновидных клеток этого типа ядра обычно палочковидные, узкие. Попадают двоядерные формы с плотно упакованным хроматином. Доля эозинофилов обычно не превышает 2%, варьируя у отдельных животных от 0,1 до 5,5%. Все это позволяет предполагать, что эозинофилами являются деградирующими, вышедшими из дифференцировки целомацитами, вставшими на путь апоптоза (Ormerod T., 2008; Martin S.J., 1993).

Гранулоциты впервые описаны Ромье (Romieu M, 1923), позднее Дейлс и Диксон (Dales R.P., Dixon L.R.J., 1981) обнаружили эти клетки при электронномикроскопическом анализе. Гранулоциты имеют размер от 10 до 20 мкм и содержат в цитоплазме множество мелких гранул, которые окружены мембраной (Dales R.P., Dixon L.R.J., 1981). Форма клеток овальная или каплевидная. Цитоплазма при окрашивании остается прозрачной, ядра голубые, светлые с конденсированным хроматином, гранулы резко эозинофильные. Гранулы также способны к положительной реакции на катионные белки. Доля гранулоцитов не велика (около 3%). Предположительно гранулоциты являются самостоятельной клеточной популяцией (Персинина М.С., 1995).

На временных и постоянных препаратах целомацитов полихет Персинина М.С. (1995) обнаружила клетки с полихромными гранулами. Встречаются как эозинофильные, так и базофильные гранулы, а так же с эозинофильной центральной частью, которая окрашивается азуром II. Клетки с гранулами пред-

ставляют собой амебоциты на разных стадиях дифференцировки. У одного животного присутствуют как клетки с гранулами, так и амебоциты с прозрачной цитоплазмой. Оказалось, что распределение клеток с гранулами зависит от возраста и пола животного, а так же коррелирует со стадией созревания половых продуктов. Целомоциты с гранулами отсутствовали у молодых животных, а были обнаружены только у самцов в период активного сперматогенеза (Персинина М.С., 1995).

На основе автордиографических опытов, Персинина (1995) определила, что целомоциты пескожила активно пролиферируют и обновление этой клеточной популяции происходит за счет размножения свободных малодифференцированных целомоцитов – ювенильных и молодых амебоцитов. Вероятно, имеется пул клеток, которые обновляются крайне редко. Такие стволовые клетки могут быть свободно циркулирующими или прикрепленными, например, входить в состав целомического эпителия. Вопрос о возможных гистогенетических отношениях между разными типами целомоцитов у полихет постоянно поднимается в литературе, но конкретных фактов для его решения нет (Dales R.P., Dixon L.R.J., 1981). Большинство исследователей придерживается мнения, что у полихет свободные клетки целома не делятся (Dales R.P., 1961; Dales R.P., Dixon L.R.J., 1981; Porchet-Hennere E. et al., 1987). Ромье (Romieu M, 1923) обнаружил единичные митотически делящиеся клетки у *Arenicola marina*. Персинина (1995) встречала у пескожила делящиеся ювенильные клетки, однако, их количество было явно недостаточно для того, чтобы объяснить гистогенетические отношения. Низкое число митотически делящихся клеток на исследованных препаратах может являться следствием пониженной адгезионной способностью и мелкими размерами.

1.3. Особенности иммунных реакций аннелид

Заживление ран у большинства целомических животных включает несколько форм реактивности, которые в разных группах организмов могут быть представлены в том или ином сочетании.

1. Закупорка раны выходом жирового тела или других органов в раневое отверстие в результате мышечного сокращения (как это имеет место у моллюсков и кольчатых червей), коагуляцией гемолимфы.

2. Миграция лейкоцитов к месту ранения, где они агрегируют, чтобы закрыть рану, инкапсулируют и подвергают фагоцитозу поврежденные ткани и проникшие патогены.

3. Дифференцировка лейкоцитов с целью образования непроницаемого для внешних агентов слоя, например коллагена.

4. Нарост эпителиальной ткани на раневые участки и образование посредством этого процесса новых тканевых слоев.

5. Формирование новых кутикулы, эктодермы, эпителия.

Многие из перечисленных явлений в процессе заживления ран сходны с воспалительными реакциями, встречающимися у позвоночных после повреждения поверхностной ткани.

Неспецифические клеточные формы реагирования можно разделить на шесть категорий, которые имеют разную степень проявления у представителей различных групп животных.

1. Коагуляция гемолимфы и тромбирование раны клетками крови посредством агрегации.

2. Тромбирование раны путем коагуляции плазмы.

3. Фагоцитоз.

4. Образование узелков.

5. Инкапсуляция.

6. Цитотоксические реакции при контакте с чужеродным материалом (Галлактионов В.Г., 2005; Valembois P., 1963).

Кольчатые черви способны практически ко всем формам реагирования, за исключением тромбирования раны при помощи коагуляции плазмы. У кольчатых червей начальный этап реакции включает быстрое сокращение круговой мышцы вблизи повреждения. Такая острая реакция необходима для того, чтобы препятствовать потере жидкости тела до минимума, а также предотвращать

проникновение инфекционных агентов уже в самом начале поражения (Галактионов В.Г., 2005; Duprat P., 1967).

Уменьшение раневого пространства облегчает заживление раны. У большинства видов кольчатых червей не происходит коагуляции плазмы. Как поверхностные раны, так и более глубокие повреждения, захватывающие целом, закрываются у полихет и олигохет раневой пробкой, состоящей из агрегированных гемо- и целоцитов, часто образуя белый рубец. В процессе заживления ран целоциты мигрируют через мышечную ткань к участку поражения (Duprat P., 1967; Stein E.A., Cooper E.L., 1983). На примере работы с полихетой *Nephtys sp.* получены данные об увеличении рН у края образовавшейся раны, что создает щелочной градиент, вдоль которого мигрируют целоциты. У пиявок заживление ран осуществляется также мигрирующими клетками, появляющимися в пораженных наружных покровах, соединительной ткани, мышцах. Среди мигрирующих в очаг поражения клеток большую часть составляют фагоциты. Не выявлено каких-либо количественных отношений между числом фагоцитирующих клеток в гемолимфе и таксономическим положением животного. Так у кольчатых червей более 20% клеток способны к фагоцитозу (Valembois P., 1963; Duprat P., 1967; Stein E.A., Cooper E.L., 1983). У ракообразных имеются виды с крайне низким содержанием фагоцитирующих клеток – всего 1-2%, и виды, у которых количество этих клеток значительно больше – около 28%. У насекомых колебания количества фагоцитов от вида к виду составляют 3-25%. Значительные различия в количестве клеток, способных к фагоцитозу, зарегистрированы у моллюсков. Они составляют от 30 до 100% всей клеточной популяции. Остается неясным, являются ли столь выраженные колебания от вида к виду внутри крупных таксонов отражением истинных различий видового характера или же они связаны с условиями проведения экспериментов, поскольку уровень фагоцитоза прямо зависит от времени инкубации, температуры, сбалансированности среды культивирования. Имеется достаточное количество работ, выполненных с кольчатыми червями, моллюсками, насекомыми, которые показывают, что хемотаксис предшествует реакции контактного

взаимодействия лейкоцитов с инородными телами (Valembois P., 1963; Duprat P., 1967; Stein E.A., Cooper E.L., 1983). Так, у дождевого червя (*Lumbricus terrestris*) в опытах *in vitro* лейкоциты отвечают прямой миграцией к месту локализации чужеродных тканей или бактерий. Хемоаттракантом в стенке тела другого вида олигохет *Eisenia fetida* является термолабильный белок с молекулярной массой менее 10 кДа. В середине 1960-х годов, когда господствовало мнение об отсутствии какой-либо формы специфического иммунитета у всех без исключения беспозвоночных, три исследователя Valembois (1963), Duprat (1967) и Cooper (1983) показали, что представители сем. *Lumbricidae* способны к специфическому распознаванию чужеродного трансплантата и созданию иммунологической памяти. Эксперименты проводили с кусочками покровных тканей. Аутологичная ткань полностью срасталась с тканью хозяина. В то же время при алло- или ксенотрансплантации регистрировали депигментацию клеток пересаженной ткани, ее набухание и в итоге отмирание трансплантата. При работе с *Eisenia fetida* установлено, что первичный аллотрансплантат отторгается в хронической форме с временными колебаниями в пределах 15-225 дней. Максимальная продолжительность жизни вторичного трансплантата – 70 дней. Однако реакция несовместимости не носит всеобщего характера и развивается лишь в 25% случаев. Процент отторжения аллотрансплантата у червей одной популяции достаточно низок. Трансплантат отторгается значительно быстрее, когда трансплантационные партнеры состоят из особей, принадлежащих к географически более удаленным популяциям. Объяснение, этих результатов, основано на представлениях о генетической структуре популяций. Особи одной и той же популяции в силу внутривидового инбридинга генетически более гомогенны, чем особи разных популяций. Подобная генетическая мозаичность, а, следовательно, и аллоантигенная неоднородность являются причиной разной степени несовместимости на внутри- и межпопуляционном уровнях (Valembois P., 1963; Duprat P., 1967; Stein E.A., Cooper E.L., 1983). Межвидовая трансплантационная реакция в сем. *Lumbricidae* имеет более острый характер. Трансплантат от *E. fetida* отторгался хозяином *L. terrestris* приблизительно за 40 дней.

Вторичный ксенотрансплантат погибал быстрее. При этом формирование памяти регистрировали не во всех случаях: 60% реципиентов формировали достаточно выраженную иммунологическую память, у 30% память имела слабый характер и у 10% память отсутствовала. Повышение температуры содержания животных с 15 до 20° С приводило к активизации процессов отторжения: время выживания первичного трансплантата сокращалось до 25 дней, а формирование иммунологической памяти наблюдалось у всех взятых в эксперимент животных. Таким образом, представители сем. *Lumbricidae* способны к алло- и ксено-специфическому распознаванию и формированию иммунологической памяти, хотя и первичный и вторичный иммунологические процессы не всегда проявляются в достаточной степени. Тем не менее, можно с полной уверенностью утверждать, что на уровне кольчатых червей существует инструмент специфического распознавания чужеродности, способность отличать «свое» от «чужого». Более того, зависимость реакции отторжения от температурных воздействий указывает на то, что процесс, реализующий ответ на чужеродность, носит активный характер и подвержен регуляторным влияниям (Галактионов В.Г., 2005; Valembois P., 1963; Duprat P., 1967; Stein E.A., Cooper E.L., 1983).

1.4. Фагоцитоз у аннелид

Первые клеточные реакции на повреждение или воспаление выражаются в проникновении лимфоцитов в область воздействия (Ryan G.B., Majno G., 1977). У позвоночных сигналом к этой реакции являются растворимые химические факторы, выделяемые поврежденными тканями или, в случае инфекции, антитела и факторы комплемента. Хемотаксис был изучен только на одном представителе аннелид, *Lumbricus terrestris* (Marks D.H., Stein E.A., Cooper E.L., 1979). Была обнаружена миграция целомоцитов *in vitro* к бактериям, а так же к части тела других червей (*Eisenia fetida*, *Preretima sp.*) и насекомого (*Tenebrio molitor*). Величина воздействия ответной реакции на бактерию была пропорциональна их концентрации. Сила хемотаксиса к части тела, внесенной от других животных, варьировала в зависимости от видовой принадлежности донора и

имела обратную закономерность от филогенетического родства. Хемоаттрактант *Eisenia fetida* достоверно был протеином низкомолекулярным. В иммунном ответе доминировали нейтрофилы, они составляли 92-94 % мигрировавших клеток (Marks D.H., Stein E.A., Cooper E.L., 1979).

Все пять типов целомоцитов способны к фагоцитозу, за исключением хлорогенозных клеток. Частицы угля были фагоцитированы полностью в течение 96 часов, за это время 55% всей клеточной популяции содержала богатые углем включения. Количество поглощенного угля широко варьирует среди поглощающих типов клеток. В то время как ацидофилы и гранулоциты не аккумулируют углерод больше определенного количества, базофилы и нейтрофилы заполняют поглощенным материалом все пространство клетки. В хлорогенозных клетках не было найдено включений углерода, но часто частицы оседали на их поверхности. Некоторое количество угля присутствовало в свободном состоянии в цитоплазме, это говорит о том, что доступность материала для фагоцитоза не является определяющим фактором. Изучение клеточного состава гемолимфы кольчатых червей привело к важному заключению. У этих животных впервые наблюдается дивергенция клеток с иммунологическими потенциями на два самостоятельных типа: макрофаги (нейтрофилы), обеспечивающие неспецифическую защиту, и лимфоцитоподобные амебоциты – участники специфических форм реагирования. (Галактионов В.Г., 2005; Marks D.H., Stein E.A., Cooper E.L., 1979).

Фагоцитоз является фундаментальной составляющей иммунных реакций, обнаружен у всех изученных видов аннелид, и характерен для различных типов клеток. Амебоидные целомоциты наиболее хорошо изучены и выполняют важную роль в иммунных реакциях, благодаря проникновению в ткани и способности перемещаться по всему телу. Аналогично целомоцитам, клетки целомического эпителия способны фагоцитировать инородные вещества (Metchnikoff E., 1893, Cuenot L., 1898, Cameron G.R., 1932) так же хорошо, как и некоторые нефридиальные клетки. У пиявок клетки ботриоидной или вазо-фиброзной тка-

ни целомического синуса также способны к фагоцитозу и могут быть сравнены с ретикулоэндотелиальной системой позвоночных (Bradbury S., 1959).

Фагоцитоз был изучен у многих видов аннелид (Stephenson J., 1930; Stein E.A., Cooper E.L., 1981; Dales R.P., Dixon L.R.J., 1981; Sawyer T.R., Fitzgerald S.W., 1981). У земляных червей целомическая полость взаимодействует с окружающей средой через дорсальные поры и нефридиопоры, поэтому целомическая жидкость постоянно содержит небольшое количество бактерий, грибов, простейших и нематод (Keng L.B., 1895; Cuenot L., 1898; Marks D.H., Stein E.A., Cooper E.L., 1977). Детальные исследования Cameron (1932) земляных червей установили аналогичную возможность фагоцитоза и у других целомоцитов. Было обнаружено, что гиалиновые амебоциты наиболее активны в фагоцитозе, гранулярные амебоциты – менее, а элеоциты не проявляют фагоцитарной активности. Индийская тушь, кармин и коллоидные частицы были быстро фагоцитированы, в то время как другие материалы, такие как, масляные и жировые капли поглощались редко. Специфическое распознавание также было продемонстрировано при фагоцитозе спермиев животных различных видов. Гомологичные сперматозоиды меньше фагоцитировались, чем сперматозоиды других видов.

У дождевого червя оба типа гиалиновых амебоцитов способны к быстрому фагоцитозу, в то время как гранулярные амебоциты (ацидофильные и гранулярные), в соответствии с утверждением Cameron, слабее фагоцитируют, но также и менее активны (Stein E.A. et al, 1977). Опсоины в целомической жидкости облегчают фагоцитоз дрожжей нейтрофилами, но не базофилами и не гранулярными амебоцитами (Stein E.A., Cooper E.L., 1981). Поэтому общая фагоцитарная способность гемоцитов дождевого червя не зависит от гуморальных факторов, так как доля нейтрофилов менее 20% от клеточной популяции (Stein E.A. et al, 1977).

Целомоциты полихет активно фагоцитируют, был обнаружен широкий круг фагоцитируемых объектов (Dales R.P., Dixon L.R.J., 1981). Целомоциты *Arenicola marina* фагоцитировали эритроциты млекопитающих и бактерии как

in vitro, так и *in vivo*, при дифференциальной окраске в них была выявлены кислая фосфатаза (Dales R.P., Dixon L.R.J., 1981). Амебоциты очищают целом от избытка гамет путем фагоцитоза ослабленных яйцеклеток и спермиев (Siedlecki M., 1903; Dehorne A., 1922; Dales R.P., 1950). В отличие от земляных червей, элеоциты полихет способны к фагоцитозу и участвуют в удалении отторгаемых мускульных клеток из целома в процессе метаморфоза (Baskin D.G., 1974).

Амебоциты пиявок активно фагоцитируют. Клетки поглощают бактерии также хорошо, как и инертные субстраты (индийская тушь, кармин) (Willem V., Minne A., 1889).

Фагоцитарная активность полихет была изучена в ряде работ, которые выявили, высокую активность амебоцитов и более низкую для эозинофилов (Ashworth J.H., 1904; Fitzgerald S.W., Ratcliffe N.A., 1980, 1989; Персина М.С., 1995). Целомоциты пескожила агглютинируют *in vitro*. Многоклеточные агрегаты образуются почти мгновенно и состоят как из веретеновидных, так и из округлых клеток. Отдельные целомоциты, не вступившие в контакт с другими клетками, оседают на поверхности предметного стекла, быстро меняя форму и образуя многочисленные псевдоподии. Со временем агрегаты распадаются, а входившие в их состав клетки так же распластываются на стекле.

Высокий уровень фагоцитарной активности целомоцитов пескожила по отношению к инородным частицам отмечает большинство авторов (Ashworth J.H., 1904; Kermarck, 1955). В опытах с введением кармина через 2 часа Персина М.С. (1995) наблюдала появление большого числа амебоцитов с мелкими захваченными частицами, а вокруг более крупных частиц образовывались клеточные агрегаты (Персина М.С., 1995). Аналогичным образом ведут себя целомоциты пескожилов при инъекции бактерий в полость тела (Fitzgerald S.W., Ratcliffe N.A., 1980, 1989). Целомоциты пескожила способны фагоцитировать оставшиеся после нереста гаметы (Персина М.С., 1995).

Фагоцитоз и образование клеточных агрегатов являются основными клеточными защитными механизмами у пескожила. Фагоцитоз, агглютинация, а также амебоидная подвижность – это процессы тесно связанные с реорганиза-

цией цитоскелета. У пескожила большинство целомацитов имеют уникальную цитоскелетную структуру – осевой тяж. Он формируется в процессе дифференцировки клеток и представлен актиновыми филаментами, окруженными микротрубочками, в неактивированных амебоцитах выявляются кольцевые структуры актиновой природы. При активации амебоцитов осевой тяж и актиновое кольцо подвергается быстрой деполимеризации, уже через 15-30 минут фибрилярный актин выявляется только по периферии цитоплазмы, при этом веретенovidные клетки теряют свою характерную форму (Персинина М.С., 1995).

Персинина М.С. (1995) предположила, что цитоскелетный стержень выполняет двоякую функцию. Во-первых, служит для поддержания весьма необычной формы зрелых веретенovidных клеток, а, во-вторых, является источником цитоскелетных белков, необходимых для обеспечения быстрых процессов амебоидной подвижности.

1.5. Инкапсуляция у аннелид

Инкапсуляции подвергаются объекты, которые не могут быть фагоцитированы клетками, по причине слишком большого размера. Например, это простейшие организмы или паразитические черви, которые окружаются большим количеством целомацитов (в первую очередь амебоцитами) и, таким образом, заключаются в капсулу. У олигохет нематоды, заселяющие целомическую полость, часто инкапсулируются и погибают внутри капсулы (Metchnicoff E., 1893, Cameron G.R., 1932). Мечников описал случай инкапсуляции и гибели взрослой грегарины в целомической полости (Metchnicoff E., 1893). Stephenson (Stephenson J., 1930), напротив, утверждал, что взрослые формы не подвергаются атаке и инкапсулируются только цисты, с находящимися внутри трофоцитами. Мечников описывал образование капсулы вокруг нематод и грегаринов у дождевого червя, которые состояли из 2х слоев: внутреннего – неклеточного, возможно, хитинового слоя, который наиболее вероятно синтезируется паразитом, и внешнего – состоящего из распластанных и пигментированных клеток (Metchnicoff E., 1893).

Cameron (1932) наблюдал последовательность образования капсул вокруг хлопковой нити, которую он помещал в целомическую полость земляного червя: начальный слой амебоцитов, окружающий нить, привлекает добавление последующих клеточных слоев и одновременное уплощение внутреннего слоя. После семи дней, в капсуле откладываются фиброзные нити, явно проявляется кальцификация. Одновременно с инкапсуляцией Cameron наблюдал пролиферацию смежного целомического эпителия, клетки которого вырастали наружу из целома, и в будущем покрывали хлопковую нить. Капсула, иногда, включала небольшие кровеносные сосуды. Результатом инкапсуляции часто является формирование временной структуры, которая именуется «коричневое тельце» и накапливается в терминальных сегментах червя. Ультраструктура коричневого тельца капсулы, образованной вокруг нематоды была описана Poinar and Hess (1977), как состоящая из 2х слоев: неклеточного – внутреннего слоя, предположительно образованного из целомической жидкости, и второго – клеточного слоя. Клеточный слой содержит, по меньшей мере, 4 типа целомоцитов, включая оба типа гиалиновых и гранулярных клеток. Микроскопия выявила в коричневых тельцах также элеоциты, или хлорогогенные клетки (Duprat P., Bouc-Lasalle A.M., 1967; Semal P., van Gansen P., 1956). Способность к инкапсуляции паразита внутри полихеты варьирует в зависимости от типа паразита и вида червя (Dales R.P., Dixon L.R.J., 1981). Инкапсуляция паразитических нематод наблюдалась у *Poecillochaetus sp.* и паразитических копепод, у инцистированных *Sabella pericillum* и *S. spallanzanii* (Dales R.P., Dixon L.R.J., 1981). Простейшие, особенно грегарины и кокцидии – общие внутрицеломические паразиты. Незрелые стадии спорозоитов инкапсулируются, в то время, как зрелые – нет (Siedlecki M., 1903). Среди полихет описаны случаи инкапсуляции живых трофозоитов некоторых паразитических видов, в то время как остальные паразиты подвергаются иммунной атаке только после смерти (Caullery M., Mesnil F., 1898).

1.6. Регуляция объема и ионного состава целомической жидкости в различных осмотических условиях

Происхождение аннелид связывают с пресноводными предками (Stephenson J., 1930), поэтому, дождевые черви способны поддерживать постоянный объем циркулирующих жидкостей, а так же увеличивать его при необходимости. Дождевые черви живут во влажной почве, но во время дождливого сезона переходят практически к водному образу жизни. Roots (1956) продемонстрировала, что несколько видов наземных олигохет, предпочитающих влажную почву, способны к жизни в пресной воде. В более ранних работах, Adolph (1927) показал, что дождевые черви теряют вес под воздействием концентрированного раствора NaCl, но способны вернуть его в растворах концентрации 200 mOsm. Maluf (1939) подтвердил исследования Adolph, что черви помещенные в раствор NaCl способны поддерживать постоянную концентрацию циркулирующих жидкостей. Но в растворах глюкозы и мочевины, Maluf наблюдал червей с постоянной массой тела (Maluf N.S.R., 1939). В лабораторных условиях аннелиды способны выживать несколько месяцев в водной среде с подобранным ионным составом (Roots B.I., 1956). Многочисленные ранние исследования, обзор Oglesby (1978) и Carley (1982), поверхностно описывают параметры водного баланса. Хорошо известно, что *Lumbricus* способен регулировать концентрацию целомической жидкости, поддерживая её на уровне 100 mOsm (Dietz T.N., Alvarago R.H., 1970). Существует несколько работ, которые наиболее полно описывают водный баланс (Dietz T.N., Alvarago R.H., 1970; Carley W.W., 1975, 1978). Dietz and Alvarago (1970) и Carley (1975, 1978) измеряли ионные и водные потоки через покровы червя для изучения осморегуляции. Функция аминокислот в осморегуляции *Eisenia fetida* была оценена Takeuchi (1980).

Явное уменьшение объема межклеточной жидкости в разбавленных растворах показывает несколько возможных механизмов регуляции объема. Jackson (1926) продемонстрировал, что целомическая полость люмбрикуса теряет большое количество воды во время высыхания (эквивалентно гипертонической среде), в отличие от тканей кишки и стенки тела. Так как кишка важна в осмо-

регуляции (Maluf N.S.R., 1939; Oglesby L.C., 1978) через нее может быть осуществлен обмен водой, при котором не участвует стенка тела. В это же время наблюдается повышение внутрицеломического уровня свободных аминокислот и одновременное их уменьшение внутри клеток стенки тела червя. Объем клеток не изменяется достоверно, подтверждая некоторые формы клеточной регуляции. Уменьшение клеточного осмотического давления может быть результатом постоянства или уменьшения гидратации тканей, в это время вода осмотически поступает в целом. Это отличает олигохет от полихет (*Nereis succinea*), ткани которых становятся более гидратированными, когда животное переносят в более разбавленный раствор (Freel R.W. et al., 1973), что говорит о более развитой изоосмотической регуляции. Один из принципиальных механизмов осморегуляции дождевых червей – это активный транспорт ионов через стенку тела.

Отдельные транспортные системы для натрия и хлора были описаны Dietz (1974) и Dietz and Alvarago (1970). Так как оба эти иона избирательно поглощаются животными из раствора, *Lumbricus* способен поддерживать высокий градиент и, таким образом, регулировать ионный состав целомической жидкости. Начало и остановка активации транспорта связана с достижением оптимального веса, названного «dying worm» (Maluf N.S.R., 1939). Stephens с коллегами продемонстрировал, что пресноводные беспозвоночные не способны к активному транспорту органических молекул через стенку тела (Stephens G.C., 1966), что подтверждает данные об отсутствии регуляции объема дождевых червей при помещении в раствор сахарозы или мочевины. Carley (1975, 1978) показал сокращение водного обмена дождевых червей в наземных условиях, что сохраняет воду в условиях засухи.

Большое значение в поддержании гомеостаза внутренней среды отводится органическим кислотам, таким как фумарат, сукцинат и лактат (Zerbst-Boroffka I., 1970). McLaughlin (1971) выявил следовые концентрации фумаровой и янтарной кислоты в крови *Eisenia*. Takeuchi (1980) определил, что коли-

чество свободных аминокислот *Eisenia* колеблется практически от нуля в изотонических условиях до 150 mOsm в сильно гипертоническом растворе NaCl.

После перенесения дождевых червей из почвы в искусственный водный раствор ионов (PW) происходит увеличение в весе в течение двух дней. В стационарном состоянии они достигали 115% от веса в почве. Это увеличение веса отражает накопление воды, которая инициировала разбавление солей в целомической жидкости. Разбавление носит временный характер, так как после пребывания 7 дней в PW, концентрация ионов в целомической жидкости восстанавливалась до уровня контроля, но это не влекло за собой потерю воды. Поглощение Na и Cl начинается практически сразу после помещения животных в емкости с искусственной концентрацией ионов. Как показывает эксперимент, животные пришли в стационарное состояние относительно Cl в течение трех дней, но накопление Na продолжалось в течение всего времени (Dietz T.N., Alvarago R.H., 1970). В других экспериментах животные приближались к стабильному состоянию относительно Na в течение 7 дней. Важно отметить, что количество поглощенного Cl не эквивалентно количеству Na, и время их поглощения не обязательно схожее. Во время эксперимента наблюдался отток калия из целомической жидкости. Предположительно, именно разбавление тканевой жидкости, после погружения в PW активирует ионную регуляцию. После адаптации к новым условиям дождевые черви поддерживают устойчивое состояние в отношении натрия и хлора (Dietz T.N., Alvarago R.H., 1970). В конечном счете, Na и Cl аккумулируются, восстанавливая концентрацию целомической жидкости до уровня, сопоставимого с почвенными животными.

Люмбрикусы неустойчивы к содержанию в DW (дистиллированная вода), за неделю смертность составила 50%, однако, они могли выживать 3-4 дня. За это время они испытывали потерю натрия, которая была максимальна в первые 4 часа (от 0,35 до 2,39 $\mu\text{eq Na}/10 \text{ g-hr}$) и затем стабилизировалась на среднем уровне $0,28 \pm 0,05 \mu\text{eq}/10 \text{ g-hr}$ в течение 72 часов. Хотя объем емкости был ограничен (50 мл), черви не приходили в устойчивое состояние относительно натрия. В присутствии кальция наблюдали потерю натрия, которая, однако, бы-

ла меньше на 30%, чем в дистиллированной воде. Потеря ионов за время экспозиции в дистиллированной воде отражается в уменьшении их концентрации в целомической жидкости. Так после трех дней концентрация натрия уменьшилась на 19% и хлора на 39% относительно PW-адаптированных животных. Причем животные не увеличивались в весе (Dietz T.N., Alvarago R.H., 1970).

Ионы натрия и хлора транспортируются независимо. Кальций имеет наибольшее значение для изменения проницаемости эпителия. Схожие результаты были получены в экспериментах на личинках миноги Morris and Bull (1968).

Механизм поддержания водного баланса в основном схож с другими пресноводными животными (Krogh A., 1939; Potts W.T.W., Parry G., 1964). Они обладают относительно низкой проницаемостью стенки тела для воды, её практически не пьют и не выводят гипотонический раствор. Желудочно-кишечный тракт дождевых червей активно вовлекается в элиминацию воды.

Имеются еще два пути поступления воды – покров и кишка (Maluf N.S.R., 1939). Maluf (1939) показал, что наложение лигатуры на передний и задний конец тела червя не приводило к существенному изменению поглощению воды, когда животных переносили из почвы в воду. Дождевые черви, как и большинство пресноводных животных, пьют минимальное количество воды. Путем помещения животных в раствор, содержащий инулин-С-14, определили, что объем раствора, попадающего через ЖКТ равен примерно 4 мл/10 g-hr, что составляет 4% от воды, поглощенной червем. Это говорит о том, что большая часть поступающей воды попадает через стенку тела. Dietz and Alvarago (1970) рассчитали площадь поверхности у червя весом в 10 г, которая оказалась 50 см². Коэффициент проницаемости для воды, был около 2 м\с. Это немного больше, чем у большинства пресноводных животных, у которых коэффициент поглощения составляет от 0,1 до 1 м\с, но сравним с показателем у лягушки (4 м\с) (Potts W.T.W., Parry G., 1964).

Формирование урины нефридиями включает перемещение целомической жидкости через нефростом путем движения ресничек, затем происходит реаб-

сорбция и возможная секреция. Voroffka (1965) продемонстрировал, что разбавление урины происходит первично в дистальных отделах нефридиев путем активной реабсорбции натрия. Ректальная жидкость обычно менее разбавлена, в то время как жидкость зоба практически изоосмотическая с целомической жидкостью. Происхождение зобной жидкости неизвестно, однако, предположительно – это инфильтрат крови. Кровь вполне сходна с целомической жидкостью (Kamemoto F.I. et al., 1962). Таким образом, кровь, войдя в заднюю часть пищевода (область кальциевых желез) инфильтруется в ЖКТ. Присутствие обширных кровяных синусов, отделенных от просвета пищевода тонким слоем клеток это подтверждает (Semal P., van Gansen P., 1959; Laverack M.S., 1963). Количество хлора в зобной жидкости небольшое, возможно из-за замены хлора на анион гидрокарбоната между кровью и кишкой. Присутствие кальция и небольшого количества HCO_3^- объясняется появлением из карбоната кальция (Robertson J.D., 1936).

Входящий ток натрия у дождевых червей зависит от внешней концентрации при низких значениях, но при высокой концентрации является натрий-независимым. Так как входящий ток натрия незначительный при таком концентрационном диапазоне, можно сделать вывод, что проницаемость мембран для этого элемента низкая (Dietz T.N., Alvarago R.H., 1970).

Если животных содержать 3-4 дня в среде лишенной ионов, то входящий поток при перемещении в РW увеличился в 9 раз для натрия и 2,6 раз для хлора. Такая ответная реакция характеризует большинство пресноводных животных. В этом механизме, возможно, задействована нейроэндокринная система (Dietz T.N., Alvarago R.H., 1970).

Свободные аминокислоты являются важнейшим регулятором межклеточного объема у многих эвригалинных беспозвоночных. Уровень свободных аминокислот в тканях улитки *Melanopsis trifasciata* (Bedford J.J., 1971) и двустворчатого моллюска *Rangia cuneata* (Henry R.P., Mangum C.P., 1980; Henry R.P. et al., 1980) коррелирует с внешней соленостью и приводит к клеточному набуханию в разбавленной среде. Clark (1968) отметил схожую тенденцию у

нескольких типов изученных полихет. Свободные аминокислоты в клетках стенки тела люмбрикуса также выполняют функцию регуляции в зависимости от внешней солености.

Источник свободных аминокислот, используемый в осморегуляции, остается неизвестным. Возможно, включается синтез новых аминокислот, катаболизм протеинов и транспорт между жидкостями животного. Henry et. al. (1980) поддержали мнение о синтезе аминокислот де ново через изменение механизмов гликолитического пути у *Rangia*, но *Melanopsis* может использовать протеины вторично (Bedford J.J., 1971). Если белки тканей являются источником свободных аминокислот, то отношение аминокислот будет соответствовать частоте их присутствия в белках. McLaughlin (1971) продемонстрировал, что это предположение правдиво для эйзении, в которой встречаются в одинаковой пропорции свободные аминокислоты и гемоглобин. Такие данные о люмбрикусе пока отсутствуют. Регуляция объема и осморегуляция является комплексным процессом, включающим многие органы, включая стенку тела, нефридии и кишку. Взаимодействие этих органов является предметом пристального контроля нейрогормонов, которые продуцирует мозг. Kamemoto (1964) и Carley (1975, 1978) продемонстрировали, что нейроэндокринный фактор мозга индуцирует уменьшение проницаемости покровов люмбрикуса. Этот сходный фактор может также прямо или косвенно влиять на входящий ток ионов и их концентрацию (Kamemoto F.I., 1964; Takeuchi N., 1980). Takeuchi (1980) показал, что мозг также контролирует содержание свободных аминокислот в целомической жидкости в *Pheretima*. Удаление мозга увеличивает их концентрацию в 6-13 раз по сравнению с концентрацией интактных животных. Инъекция гомогенизированных тканей мозга возвращала концентрацию аминокислот на прежний уровень. Carley W.W., Caracciolo E.A. и Mason R.T. (1983) продемонстрировали, что люмбрикус террестрис способен к регуляции осмотического давления целомической жидкости, проницаемости покровов для воды, а так же концентрации свободных аминокислот в целомической жидкости и межклеточном

пространстве клеток стенки тела. Перечисленные механизмы регуляции объема находятся под контролем нервной системы (Carley W.W., 1974).

1.7. Регуляция объема целоцитов аннелид в различных осмотических условиях

Усиленная регуляция водно-солевого обмена в теле дождевого червя в большой мере защищает клетки целомической жидкости от резких перепадов осмолярности. При изменении внеклеточной концентрации солей, активируется входящий ток воды в клетку (Kevers C. et al., 1979; Pierce S.K., 1982; Deaton L.E., 1990; Scemes E. et al., 1991; Souza M.M., Scemes E., 2000). Эти перемещения жидкости определяют активацию механизмов клеточной регуляции объема, которая необходима как при помещении клеток в раствор с измененной концентрацией солей, так и в обычных метаболических условиях (Macknight A.D.C. et al., 1994; Hoffmann E.K., Dunham P.B., 1995; Lang F. et al., 1998; Russell J.M., 2000). Первоначально было показано участие неорганических молекул в процессе регуляции объема, а затем и органических растворов (P'equieux A. et al., 1979; Deaton L.E., 1990, 1994; Bishop M.D. et al., 1994; Hoffmann E.K., Dunham P.B., 1995; Neufeld D.S., Wright S.H., 1996; Lang F., Waldegger S., 1997; Lang F. et al., 1998). После гиперосмотического стресса для увеличения объема клетки активируются $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ и Na^+ / H^+ котранспортеры и $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ обменники, способствующие поглощению натрия, калия и хлора. Поглощение органических растворов может быть зависимым или независимым от натрия (Hoffmann E.K., Dunham P.B., 1995; Lang F. et al., 1998; Wehner F. et al., 2003). При гиперосмотическом стрессе увеличивается количество внутриклеточных аминокислот в результате гидролиза белков и\или поглощения извне (P'equieux A., 1995). Система адаптации к изменению осмотического давления окружающей среды лучше развита у животных, ведущий водный образ жизни (P'equieux A., 1995; Ahern M.D., Morris S., 1998, 1999).

Исследования гемоцитов моллюсков под воздействием изменения осмотического давления показали повышение смертности, как в гипотоническом, так и в гипертоническом растворе (Rodrick G.B., 2008).

Воздействие осмотического стресса на изолированные целоциты морского ежа *Strongylocentrotus droebachiensis* отражалось в изменении их морфологии. Когда целоциты этого морского беспозвоночного инкубировали в гипотоническом растворе, 60 % от нормальной морской воды, они трансформировались из округлой формы в клетки с множеством филоподий (Edds K.T., 1979; D'Andrea L. et al., 1994). Псевдоподии, которые формировали целоциты морского ежа поддерживались актиновым цитоскелетом (Edds K.T., 1979, 1980). В противоположность целоцитам морского ежа, клетки асцитной опухоли Эрлиха формировали филоподии, когда осмолярность сильно возрастала (Kajstura J., Korohoda W., 1988). Исследования Палсонской лаборатории (Oh D.J. et al., 2000) показали, что человеческие кроветворные клетки протягивают длинные тонкие осмоподии, когда клетки инкубируют в гипертонической среде.

Филоподии конуса роста быстро удлиняются при повышении осмотического давления окружающей среды. Возрастание этого показателя на 100 mOsm в два раза увеличивает длину филоподий (Bray D. et al., 1991). При помещении в растворы различных концентраций у клеток дождевых червей так же отмечается адаптация и изменение структуры клеток.

Целоциты дождевого червя, по способности формировать псевдоподии после 1 часа инкубации при комнатной температуре (22°C) в LBSS при осмотических условиях начиная от 90 до 715 mOsm, были разделены на группы. Kasschau M.R. et al. (2007) определили форму целоцитов для каждой осмотической среды. При изотоническом или низком осмотическом давлении (170 mOsm или ниже) менее, чем 5 % от всей популяции полученных целоцитов обладали филоподиями, в то время как большинство клеток популяции имели либо круглую, либо уплощенную форму, а иногда среднюю между ними. Когда осмотическое давление раствора увеличилось до 715 mOsm, примерно 40% от

основной популяции целомоцитов изменили внешний вид на форму клеток с обилием филоподий. Процесс изменения с округло-приплюснутой клетки на форму с филоподиями занимал 2-5 минут, после чего клетки оставались стабильными на протяжении 60 минут и более, не смотря на растущую осмолярность (Kasschau M.R. et. al., 2007).

Некоторые клетки выпускали только 1-4 длинные филоподии (Тип 1), тогда как другие имели множество отростков (Тип 2). Некоторые целомоциты обладали многочисленными филоподиями, которые обладали подвижностью (Тип 3). У остальных клеток филоподии были короткими, широкими и неподвижными с количеством от 1 до 4 на клетку (Тип 4). Последняя группа включала клетки, которые выпускали особенно длинные (в 3-10 раз больше клеточного диаметра), тонкие, гибкие цитонемы или цитонемоподобные структуры. Kasschau M.R. et. al. определили, что как при 150 так и при 715 мосмомоль около 50% клеточной популяции имели 10 и более филоподий на клетку и приблизительно, у половины клеток эти выросты были неподвижны. Клетки с цитонемами занимали небольшую часть, около 6 % от всех клеток с псевдоподиальными структурами (Kasschau M.R. et. al., 2007).

1.8. Изменение цитоскелета при осмотическом стрессе

Известно, что целомоциты дождевых червей содержат F-актин (Kasschau M.R. et. al., 2007). В круглых/приплюснутых клетках F-актин часто находится на периферии клетки, образуя первичное кортикальное кольцо, остальные клетки демонстрируют его мозаичное распределение.

Предварительная обработка цитохалазином, который является разрушительным для F-актина, не ингибировала формирование филоподий при 715 mOsm (28% по сравнению с 39,7% после обработки цитохалазином), в то время как достоверно стимулировала формирование филоподий у клеток, инкубированных при 170 mOsm (8,3-34,7% клеточной популяции). Результаты обработки латрикулином оказались схожими (Kasschau M.R. et. al., 2007). Морфология клеток после обработки цитохалазином не отличалась от контроля. Это говорит

о том, что кроме актина другие элементы цитоскелета, такие как микротрубочки тоже вовлечены в формирование псевдоподий у дождевого червя (Adamowicz A., 2005).

Предварительной обработки клеток в течение тридцати минут колхицином, который изолирует димеры тубулина, перед увеличением осмолярности LBSS до 715 mOsm, достоверно уменьшило формирование филоподий (11 % против 28%). Похожие результаты показала и предварительная обработка нокодазолом. Клетки, помещенные в изотонический раствор (170 mOsm) после предварительной обработки колхицином или нокодазолом поддерживали количество клеток с филоподиями на уровне контроля (8% популяции). Это говорит о том, что высокая осмолярность и цитохалазин, могут независимо инициировать деполимеризацию актинового кортикального кольца, таким образом, позволяя формироваться филоподиям. Около 10% клеточной популяции сохраняет актиновое кортикальное кольцо после обработки цитохалазином и помещения в условия высокой осмолярности (715 mOsm) (Adamowicz A., 2005).

Окрашивание на микротрубочки продемонстрировало, что тубулин также формирует кортикальное кольцо (36,0 % клеточной популяции) при низкой осмолярности. В присутствии цитохалазина Д при 170 mOsm 22,7% клеточной популяции имела тубулиновые филоподии. При 715 mOsm с обработкой цитохалазином и без нее, около 25% популяции клеток имели филоподии, состоящие из тубулина. Предварительная обработка колхицином уменьшала более чем на 12,3% количество клеток, которые формировали филоподии из микротрубочек (Kasschau M.R. et al., 2007).

В противоположность, целоцитам морского ежа, которые продуцируют филоподии в гипотонической среде (Otto J.J. et al., 1979; Edds K.T., 1979, 1980), целоциты дождевых червей нуждаются в гипертонических условиях для формирования филоподий. Если мы рассматриваем естественные условия существования этих организмов, мы можем заключить, что в обоих случаях целоциты вытягивают свое тело в 2-10 раз для уменьшения стрессовой ситуации. У целоцитов облигатных морских беспозвоночных, например морского

ежа, с нормальной жидкостью тела около 1000 mOsm, уменьшение осмолярности или значительно гипотонические условия (60% от нормального) вызывают стресс. В противоположность, целомическая жидкость дождевых червей, которые находятся в почве, смоченной пресной водой, имеет осмолярность 154 мосмомоль. Однако увеличение осмолярности выше 715 мосмомоль может быть рассмотрена как стрессовая ситуация (Dietz T.N., Alvarado R.H., 1970).

Начиная с самых первых исследований с использованием родамин-фаллоидина, в сочетании с опубликованными данными по филоподиям морского ежа (Edds K.T., 1979, 1980; Otto J. J., Bryan J., 1981; Edds K.T., 1984), утверждается, что цитоскелет дождевых червей состоит из микрофиламентов, формирование филоподий в условиях гипертонии происходит за счет других структур цитоскелета. Целомоциты нуждаются в высвобождении кортикального кольца, высокой осмолярности или присутствии веществ, разрушающих актин, для формирования филоподий. Актиновое кортикальное кольцо уже давно считается физическим барьером экзоцитоза (Muallem S. et al., 1995; Galkina S.I. et al., 2001). Карус А. и его коллеги определили, что гиперосмотический стресс индуцирует формирование тонкого актинового кольца, предотвращающего экзоцитоз у нейтрофилов (Rizoli S.B. et al., 2000; Карус А., Di Ciano C., Lewis A. et al., 2002). Однако, клетки почек крысы, которые, подобно целомоцитам дождевого червя, были подвергнуты изменению осмотических условий, в остро гипертонических условиях деполимеризовали актиновое кортикальное кольцо, что приводило к диффузной связке сети F-актина (Bustamante M. et al., 2003). Разрушение актинового кортикального кольца, следующее после обработки цитохалазином D, также индуцировало в культуре нервных клеток РС 12 формирование множества выступов, содержащих микротрубочки (Aoki J. et al., 2000).

Термин «филоподии» часто используется для описания длинных, тонких выступающих структур, образованных актиновыми филаментами, которые тесно соединены друг с другом (Svitkina T.M. et al., 2003; Passey S. et al., 2004; Mogilner A., Rubinstein B., 2005). Однако, в добавок к актину, микротрубочки так же хорошо, как и микрофиламенты вовлекаются в формирование филопо-

дий (Kasschau M.R. et al., 2007). Существует множество ситуаций, когда клетка использует микрофиламенты и микротрубочки для формирования филоподий. Примером являются, свободные клетки, найденные в псевдоцеломической полости тела коловратки, *Asplanchna*, формируют сеть филоподий, содержащих микрофиламенты и микротрубочки (Baumann O. et al., 2000). Эмбрионы морского ежа, которые формируют филоподии для миграции мезенхимальных клеток, образуют их, используя микротрубочки, направленные параллельно длинной оси (Kato H., Solursh M., 1981), а так же волокнистые филоподии, которые разрушаются цитохалазином D, что подтверждает присутствие микрофиламентов (Karp G.C., Solursh M., 1985). Филоподии, которые служат для ориентации в пространстве у диатомовых водорослей, так же содержат микротрубочки (Pollock F.M., Pickett-Heaps J.D., 2005).

Структуру и функции филоподий Henley и Poo изучали на развитии конуса роста нервных клеток, где существует тесное взаимодействие между микротрубочками и филоподиальными актиновыми связками. Основа филоподии нервного конуса роста состоит из F-актина, который часто тянется вдоль центральной части конуса роста (Henley J., Poo M., 2004). Микротрубочки, которые найдены в нервном отростке пронизывают конус роста, место, где они локализованы с актиновыми филаментами и образуют филоподии (Gallo G., 1998; Henley J., Poo M., 2004; Gordon-Weeks P.R., 2004). Филоподии конуса роста могут служить для направления полимеризации микротрубочек и помогать транспортировать их (Schaefer A.W., et al., 2002).

Филоподиям, которые формируют целоциты дождевых червей, необходимо, чтобы первичное актиновое кортикальное кольцо разрушалось, после этого микрофиламенты и микротрубочки вовлекаются в формирование выростов. Гипертонические условия инициируют образование филоподий, возможно термин осмоподия, который ввел Palsson (Oh D.J et al., 2000), может быть более подходящим описанием клеточных выростов, обнаруженных у целоцитов дождевых червей. Филоподии\осмоподии, путем удлинения клеточной поверх-

ности исследуют окружающие условия, определяя направление миграции (Kasschau M.R. et. al., 2007).

ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования, организация эксперимента

Исследование проведено на базе кафедры анатомии и физиологии живых организмов Белгородского государственного национального исследовательского университета.

С целью изучения морфофункциональных свойств клеток циркулирующих жидкостей аннелид было организовано исследование, включающее три экспериментальные серии. В экспериментах использовали представителей класса Clitellata подкласс Oligochaeta, семейство Lumbricidae: *Eiseniella tetraedra* (Savigny, 1826), *Eisenia gordejefi* (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 использованием различных источников (Всеволодова-Перель Т.С., 1997; Лукин Е.И., 1976; Перель Т.С., 1979; Присный А.В., 1999а, 1999б).

Представители видов *L. terrestris*, *L. rubellus*, *L. castaneus*, *E. rosea* были собраны в 2011-2013 гг. в типичном агроценозе Борисовского района Белгородской области. Остальные представители олигохет собраны и определены среди представителей нагорной дубравы, участок «Лес на Ворскле» ГПЗ «Белогорье». Животных содержали в деревянной кадке с количеством чернозема, из расчета 5-6 ведер на сотню червей, который был перемешан с листовым опадом, необходимым для питания червей. Почву периодически увлажняли из пульверизатора. Раз в неделю проводили осмотр на выявление больных и умерших червей, которых удаляли из общего садка.

Особь *H. medicinalis* были приобретены у официального поставщика, представители *H. sanguisuga* и *E. octoculata* собраны в природных водоемах

Белгородской области. Каждую особь содержали в стеклянной банке объемом 1 л с водой, недолитой до края на 6-8 см. На дно банки помещали песок и камни, верх закрывали сеткой. У животных еженедельно осуществляли замену воды. Кормление пиявок не проводили.

Для проведения всех серий эксперимента использовали циркулирующую жидкость 12 представителей каждого вида. Из системы распределения каждой особи отобрано и обработано не менее 100 клеток.

Для обездвиживания исследуемых животных использовали кратковременное погружение в 10% этиловый спирт (Коган А.Б., 1954).

Животных неподвижно фиксировали препаративными иглами, после чего делали разрез кожи и мышц брюшной стороны, затем микропипеткой непосредственно из брюшной лакуны или целомических мешков передних сегментов тела отбирали циркулирующую жидкость. Дождевых червей использовали для получения проб только один раз, в то время как пиявки многократно подвергались этой процедуре. Отобранную кровь и целомическую жидкость не подвергали центрифугированию, в образцы не добавляли антикоагулянты.

В первой серии эксперимента исследование осуществляли на инвертированном микроскопе Nikon Eclipse Ti-E в режиме дифференциально-интерференционного контраста. Для наблюдения за клетками использовали программное приложение NIS-Elements.

Для наблюдения фагоцитоза и прижизненного поведения клетки инкубировали во влажной камере при комнатной температуре в течение 30 минут. 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). Всего в первой серии исследовано 3700 клеток.

Во второй серии изучали влияние осмотической нагрузки на геометрические характеристики форменных элементов и использование ими мембранного резерва в условиях измененного осмотического давления. Циркулирующую жидкость, отобранную по стандартной методике, делили на три части, каждую

из которых помещали в отдельную пластиковую чашку Петри. В каждый из сосудов добавляли равную по объему каплю раствора (гипертонического, гипотонического и изотонического). Время инкубации, во всех случаях, составляло 30 минут. По окончании действия осмотической нагрузки исследовали объем и использование клетками запаса плазмалеммы в гипотонических условиях. Исследования проводили с помощью светового микроскопа, при использовании аппаратно-программного комплекса «ВидеоТест-Размер 5.0» (Санкт-Петербург, Россия). Всего во второй серии исследовано 3800 клеток.

В третьей серии исследований оценивали действие осмотической нагрузки на структуру поверхности клеток после инкубации в растворах различной концентрации. У животных отбирали пробу циркулирующей жидкости, которую делили на три равные части. Каждую часть помещали в отдельную пластиковую чашку Петри. Добавляли гипертонический, гипотонический и изотонический растворы. Время инкубации клеток для каждого из растворов составляло 30 минут. По окончании действия осмотической нагрузки готовили три препарата для изучения объёма, площади поверхности, характера микрорельефа, шероховатостей поверхности с помощью АСМ Интегра Вита NT-MDT полуконтактным методом. Всего в третьей серии исследовано 3500 клеток.

Обоснование методик исследования

Исследование морфофункциональных характеристик клеток проводили с использованием оптических микроскопов Nikon Eclipse Ti-E и АСМ Интегра Вита NT-MDT.

В таблице 1 представлены основные характеристики оптической, сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии.

Недостатком использования световой микроскопии является существенный дифракционный предел, который в случае оптимума устанавливает достигаемые пространственные границы в пределах 180 нм в фокальной плоскости и 500 нм вдоль оптической оси (Muys J.J. et al., 2006).

Основные характеристики различных видов микроскопии
(Зубарева Е.В., 2011)

Характеристика	Оптическая микроскопия	Атомно-силовая микроскопия
Механизм формирования контраста	Абсорбция света (дифракция, поляризация, рассеяние и т.д.) или флуоресценция	Силы взаимодействия зонда и образца
Предел измерения по оси ХУ	200 нм – 1 мм	0,1 нм – 200 мкм
Предел измерения по оси Z	500 нм – 10 мм	0,05 нм – 20 мкм
Что исследуют	Оптический срез	Поверхность
Сложная пробоподготовка	Необязательна	Необязательна

Одним из современных способов исследования морфологических особенностей мембраны клеток является атомно-силовая микроскопия (Гущина Ю.Ю. и др., 2005; Wu Y. et al., 2009; Beckmann M. et al., 1994; Barbee K.A. et al., 1994; Barbee K.A. et al., 1995; Hoh J.H., Schoenenberger C.A., 1994; Hörber J.K. et al., 1992; Kasas S. et al., 1993; Oberleithner H. et al., 1994; Schaus S.S., Henderson E.R., 1997). Используя для исследования топографии поверхности биологических образцов атомно-силовую микроскопию (АСМ), возможно получение сканнограмм с разрешением от нанометра (Deng Z. et al., 2010; Zou Q. et al., 2004) до ангстрема (Goldsbury C.S. et al., 2002). Преимущество использования АСМ для биологов состоит в том, что с его помощью можно исследовать непроводящие объекты в невакуумной (например, на воздухе (Ushiki T. et al., 1996) или в жидкой (Hörber J.K., Miles M.J., 2003) среде, при этом не окрашивая и не напыляя препараты (Ushiki T. et al., 1996).

С помощью сканирующего зондового микроскопа АСМ Интегра Вита NT-MDT проводили изучение прижизненной морфологии поверхности целомоцитов.

Зондовая Нано Лаборатория «Интегра Вита» (NT-MDT, Россия) представляет собой соединение мощного оптического инвертированного микроскопа (Olympus IX71) и АСМ (рис. 1).



Рис. 1. Зондовая Нано Лаборатория «Интегра Вита» (NT-MDT, Россия)
(оборудование научно-исследовательской лаборатории НИУ БелГУ)

Сканирование объектов осуществляли в полуконтактном режиме, который называют также прерывисто-контактным методом, а в иностранной литературе – «intermittent contact» или «tapping mode» (Миронов В.Л., 2004). При этом сканирование поверхности образца осуществляется колеблющимся кантилевером, так что зонд «ощущает» контактные отталкивающие силы только в течение короткой части периода колебаний. Таким образом, существенно уменьшается давление кантилевера на поверхность образца, что позволяет работать с более мягкими и легко разрушающимися материалами, такими как живые клетки крови (рис. 2).

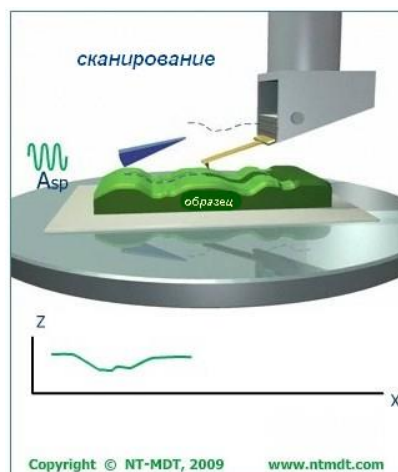


Рис. 2. Сканирование образца в полуконтактном (прерывисто-контактном) режиме
(Зубарева Е.В., 2011)

Исследование морфометрических параметров клеток

В ходе исследования использовали световой микроскоп Nikon Eclipse Ti-E, фотоснимки делали с помощью встроенного фотоаппарата, используя автоматический режим и автофокусировку. Обработку полученных снимков проводили с помощью компьютерной программы «ВидеоТест-Размер 5.0». Схема измерения линейных размеров клеток целомической жидкости с помощью данной программы представлена на рисунке 3.

Используя значение диаметра клетки, рассчитывали объём и площадь поверхности клеток по формулам для шара (Выгодский М.Я., 2006).

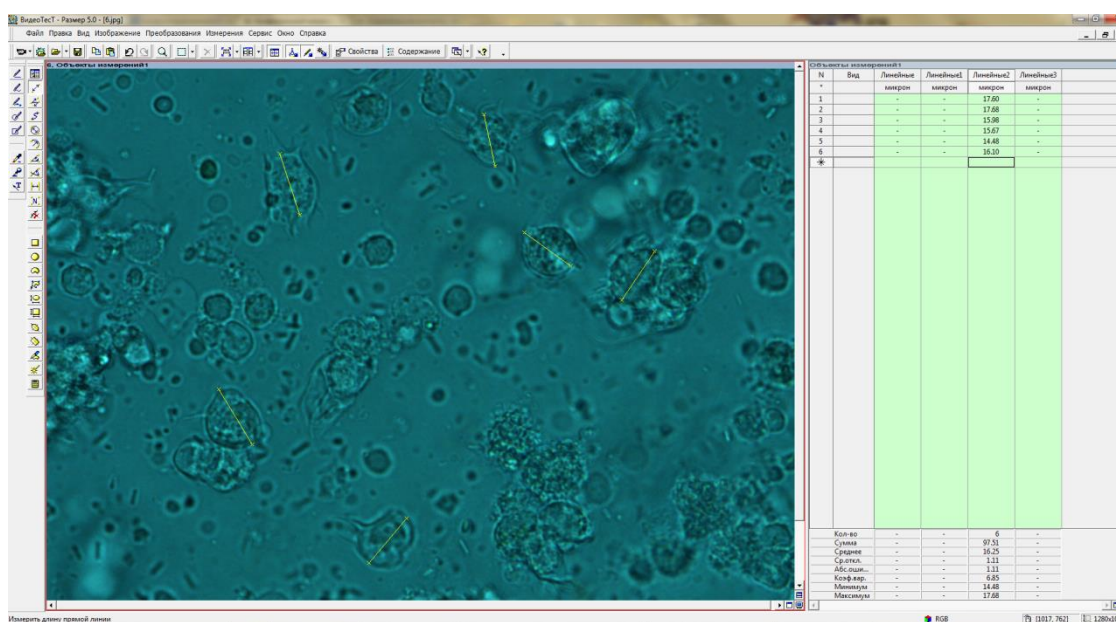


Рис. 3. Измерение диаметра целоцитов аннелид с помощью компьютерной программы «ВидеоТест - Размер 5.0» (Nikon Eclipse Ti-E, 60x)

Осмотические тесты *in vitro*

Осмотическую стойкость, осморегуляторные реакции форменных элементов аннелид и использование ими мембранного резерва исследовали с помощью проб с гипотоническими и гипертоническими нагрузками. В качестве сред со сниженной осмолярностью использовали растворы хлорида натрия – гипотонический (массовая доля NaCl в котором составляет 0,40%) и гипертонический (массовая доля NaCl в котором составляет 1,2%) (Коган А.Б., 1954). Осмотические свойства растворов оценивали по величине их осмолярной концентрации (осмолярности), которая определяется количеством всех кинетиче-

ски активных частиц, содержащихся в 1 л раствора, независимо от их формы, размера и природы (Литвинова Т.Н., Кириллова Е.Г., 2009). Теоретическую осмолярность растворов хлорида натрия определяли по формуле:

$$C_{\text{осм}} = n \cdot C, \quad (1)$$

где n – количество частиц, на которые диссоциирует молекула NaCl в водном растворе; C – молярная концентрация хлорида натрия в растворе (моль/л).

Молярную концентрацию хлорида натрия в растворе рассчитывали по формуле:

$$C = m / (M \cdot V), \quad (2)$$

где m – масса хлорида натрия в растворе (г);

M – молекулярная масса хлорида натрия (58,44 г/моль);

V – общий объём раствора (л).

Кроме осмолярной концентрации для учёта осмотических свойств плазмы крови нередко пользуются осмоляльной концентрацией (осмоляльностью), которая отражает концентрацию частиц в 1 кг растворителя (осмоль/кг) (Рябов Г.А., 1994). Однако разница между осмолярностью и осмоляльностью плазмы и других биологических растворов незначительна вследствие их относительной разбавленности. В норме осмолярная концентрация целомической жидкости равна 210 мосмоль/л, определена для *E. fetida* (Valembois T. et al., 1971; Bilej M. et al., 1990).

Теоретическая осмолярность растворов хлорида натрия, использовавшихся в эксперименте, составляла 273,7 мосмоль/л для физиологического раствора хлорида натрия (0,8% NaCl), 136,8 мосмоль/л для гипотонического раствора хлорида натрия (0,40% NaCl) и 374,5 мосмоль/л для гипертонического раствора хлорида натрия (1,2% NaCl).

С целью получения данных по осмотической стойкости, резервным возможностям мембраны и осморегуляторным реакциям для клеток аннелид модифицировали комплексный метод (Фёдорова М.З., Левин В.Н., 1997) (рис. 4).



Рис. 4. Схема изучения осмотической стойкости клеток аннелид: 0,8% – инкубация клеток в изотоническом растворе NaCl; 0,40% – инкубация клеток в гипотоническом растворе NaCl; 1,2% – инкубация клеток в гипертоническом растворе NaCl

В пластиковые чашки помещали по 20 мкл суспензии клеток, к которым добавляли по 20 мкл растворов хлорида натрия различной осмолярности. В первую чашку – изотонический раствор (0,8% раствор NaCl), во вторую чашку – гипотонический раствор (0,4% раствор NaCl), в третью чашку – гипертонический раствор (1,2% раствор NaCl). По истечении 30 минут проводили изучение морфофизиологических характеристик клеток.

Исследование объёма, микрорельефа поверхности форменных элементов и использования клетками мембранного резерва в условиях гипотонии проводили методами световой и зондовой микроскопии. При этом клетки, инкубированные в растворах различной концентрации в течение 30 минут, не подвергались воздействию фиксирующих растворов при дальнейшем исследовании.

Суспензию нефиксированных клеток помещали во влажную камеру (рис. 5).

Измерение диаметра клеток проводили с помощью аппаратно-программного комплекса «ВидеоТест-Размер 5.0» (Санкт-Петербург, Россия).

Изучение морфофизиологических характеристик клеток проводили при помощи 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. На полученных сканах измеряли линейные размеры клеток. Обработку полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения «Nova 1.0.26 Build 1397» (NT-MDT).

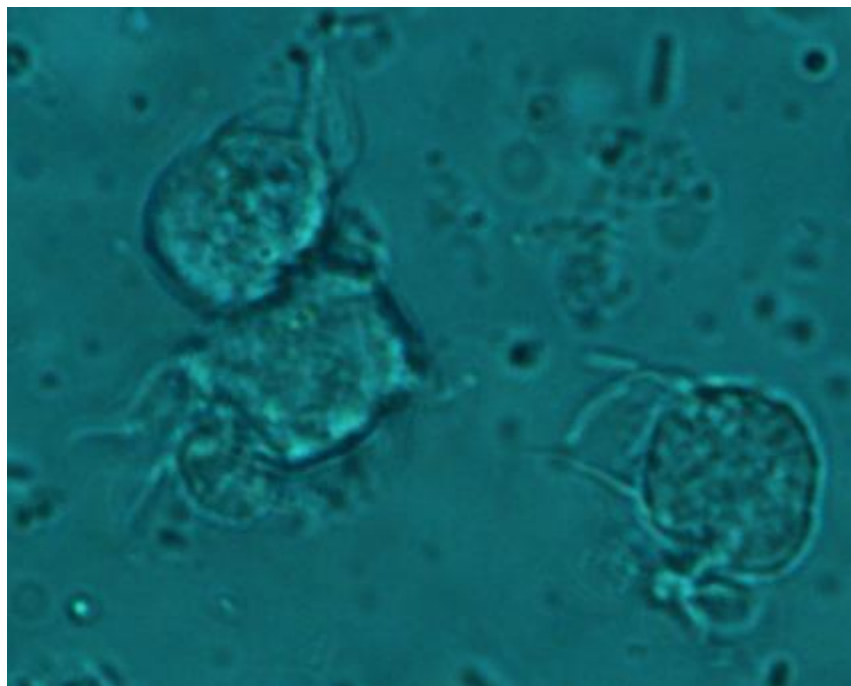


Рис. 5. Микрофотограмма живых клеток во влажной камере получена с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse Ti-E (большие амебоциты, *L. rubellus*)

Используя полученные данные, высчитывали площадь поверхности и объём клеток.

При исследовании геометрических характеристик клеток методом световой микроскопии допускали, что клетки имеют правильную сферическую форму и рассчитывали объём поверхности клеток по формулам для шара (Выгодский М.Я., 2006):

$$V = (4/3) \cdot (\pi \cdot R^3), \quad (3)$$

где V – объём шара (мкм^3); π – число пи; R – радиус клетки, равный половине диаметра (мкм).

При исследовании морфометрических параметров клеток методом полу-контактной атомно-силовой микроскопии получали данные о размерах клеток в трёх измерениях. Таким образом, зная не только диаметр клетки, но и её высоту, определяли площадь поверхности клетки путём сложения площади кривой поверхности шарового сегмента (Выгодский М.Я., 2006) и площади его основания, представляющего собой проекцию клетки на подложку:

$$S = 2 \cdot \pi \cdot R \cdot h + S', \quad (4)$$

где S – площадь поверхности клетки (мкм^2); S' – площадь проекции клетки на подложку (мкм^2); π – число пи; R – радиус клетки, равный половине диаметра (мкм); h – высота клетки (шарового сегмента) (мкм).

Используя значения площади поверхности, оценивали резервные возможности плазмалеммы целомацитов. 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):

$$\Delta V = V(\text{СГ}) - V(\text{И}), \quad (5)$$

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

С целью сравнения использования мембранного резерва определяли относительный мембранный резерв по формуле (Зубарева Е.В., 2011):

$$\Delta V_{\text{отн}} = \Delta V / V(\text{И}), \quad (6)$$

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

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

Изучение топографии клеток и физических свойств мембраны

Сканирование клеток, а также анализ и обработку данных АСМ осуществляли с помощью программного обеспечения NT-MDT SPM Software – Nova 1.0.26.1397 (рис. 6-10).

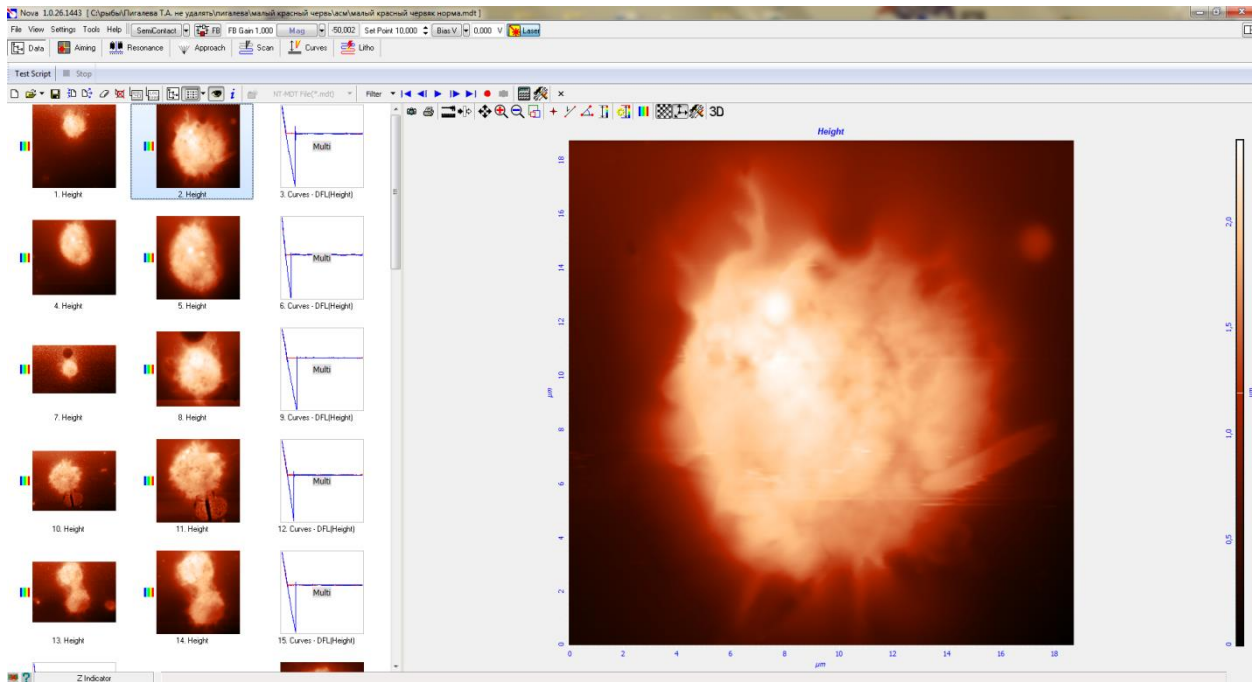


Рис. 6. Окно просмотра 2D данных (СЗМ-изображений) программы Nova 1.0.26.1397, позволяющее оценить морфологические параметры отсканированных образцов

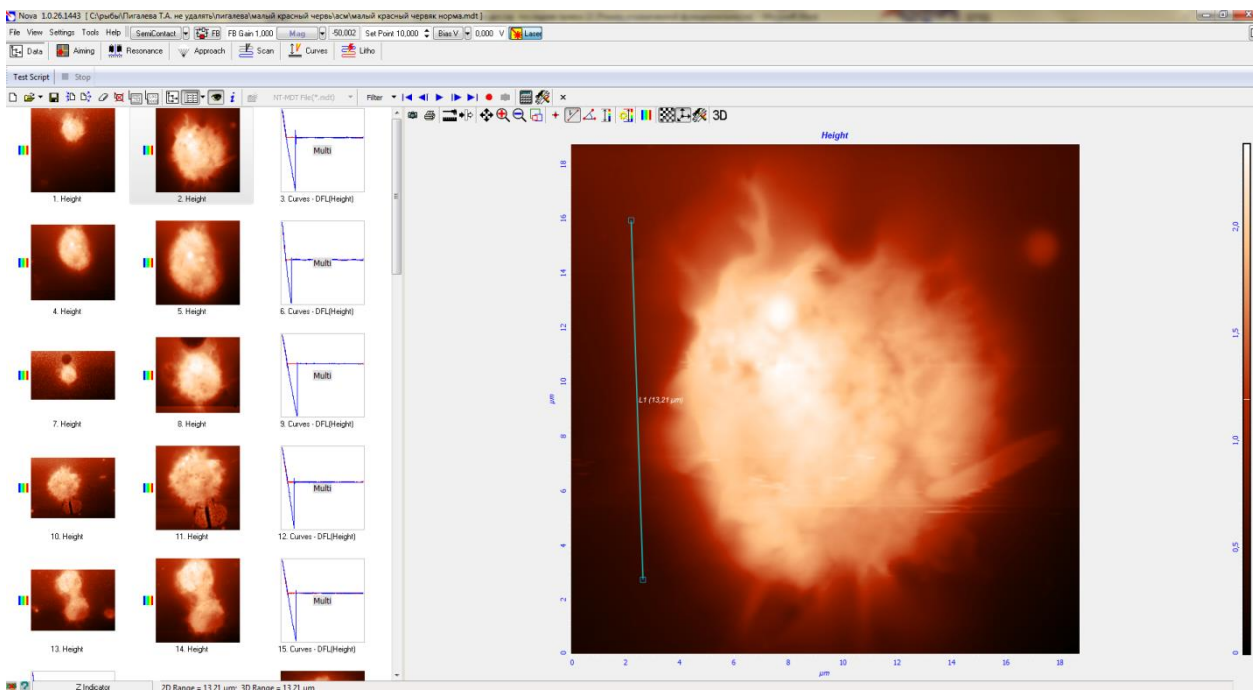


Рис. 7. Измерение ширины клетки с помощью инструмента Length Instrument панели инструментов Окна 2D-данных, который позволяет измерить расстояние между двумя выделенными точками

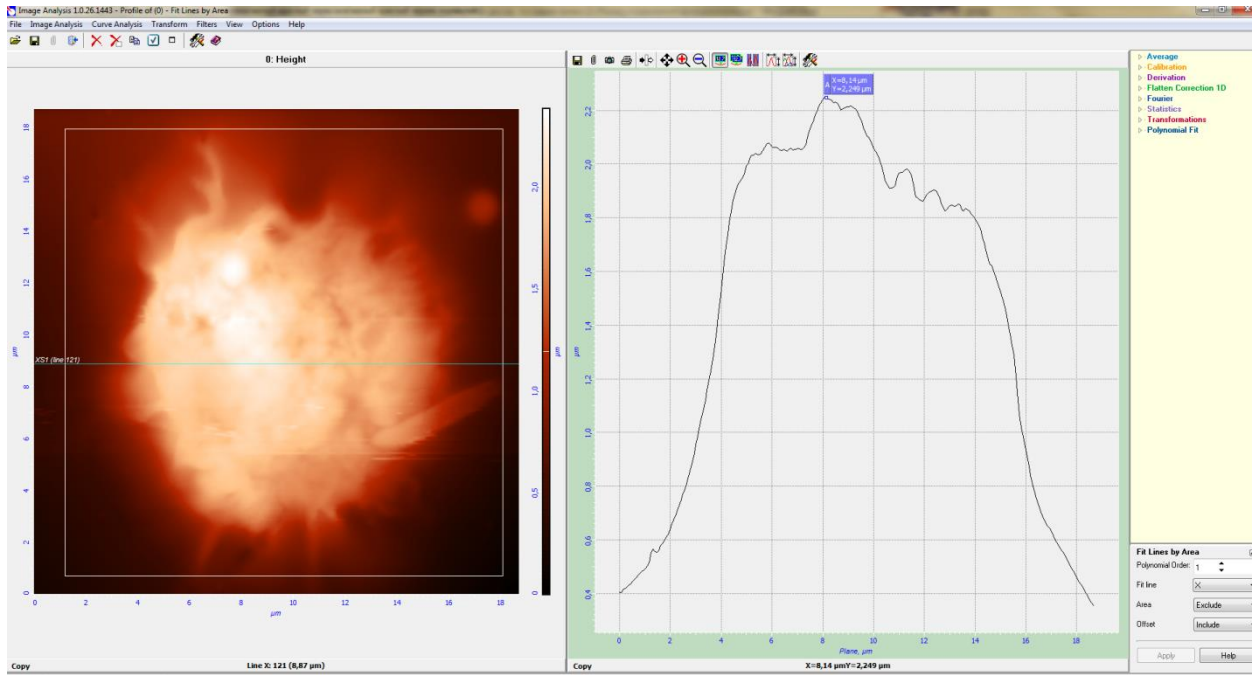


Рис. 8. Измерение высоты клетки в Окне 1D-данных с помощью инструмента Markers (одиночный маркер), после включения инструмента X Section (Сечения)

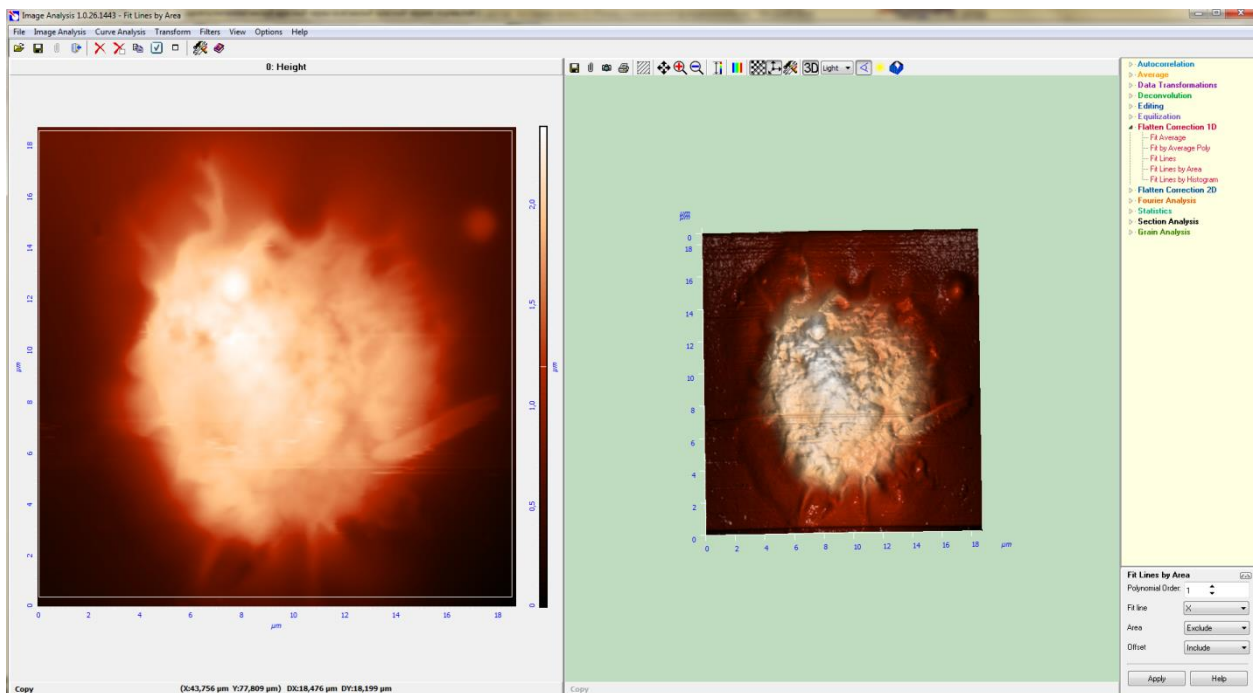


Рис. 9. Трёхмерное представление данных с помощью инструмента 3D/2D Image Representation, справа – после применения Fit Lines by Area Exclude (построчного вычитания полиномов)

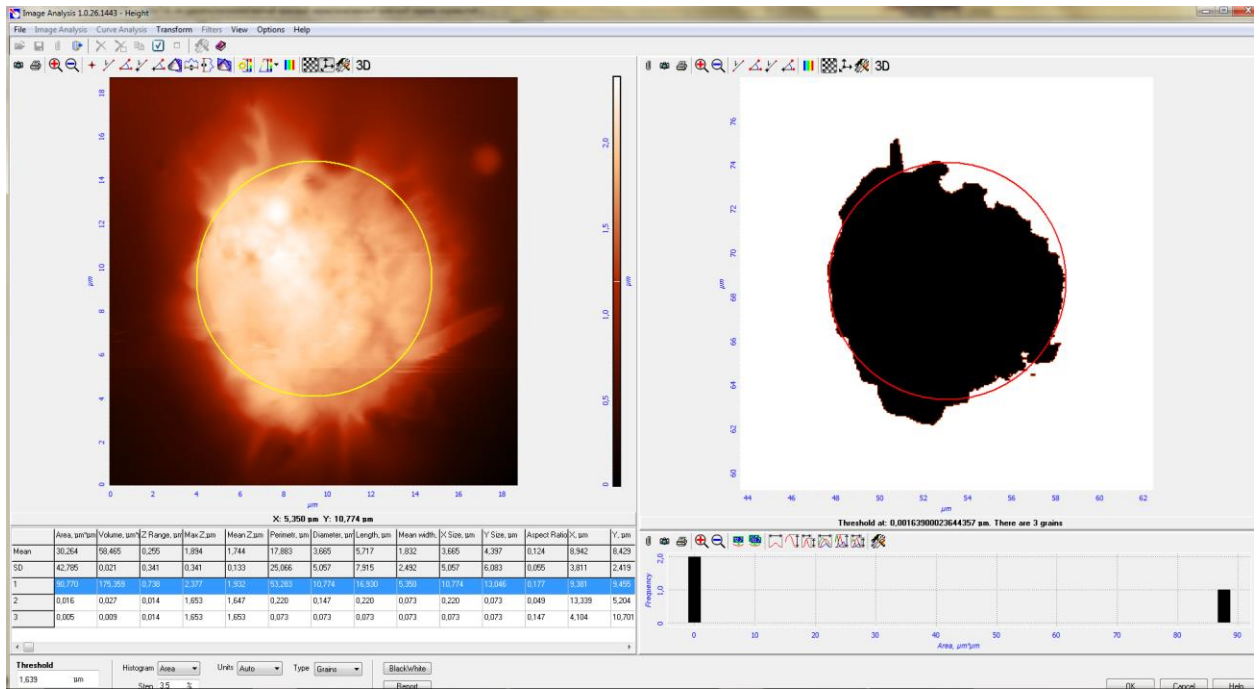


Рис.10. Определение объема клетки с помощью метода Grain Analysis

Данные по свойствам упругости и 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, отражающих отклонение гибкой консоли АСМ-зонда при приближении зонда к образцу в каждой точке нанoidентификации.

Отклонение балки от положения равновесия детектируется на четырехсекционном фотодиоде и выражается через ток рассогласования между верхней и нижними частями фотодиода. Расчет локального модуля Юнга проводили на основе контактной задачи модели Герца в модификации Снеддона (Снеддон И.Н., 1961). При работе с клетками предполагали, что клетка есть упругая изотропная среда с коэффициентом Пуассона $\nu=0,5$, а игла АСМ – твердый конус (Лебедев Д.В. с соавт., 2009).

Полученные «силовые кривые» обрабатывали с помощью программного обеспечения «Ef3» (NT-MDT, Зеленоград) (рис. 11). Анализ зависимости деформации образца от приложенной нагрузки позволил количественно оценить модуль упругости и сравнить этот показатель на разных участках клеточной поверхности.

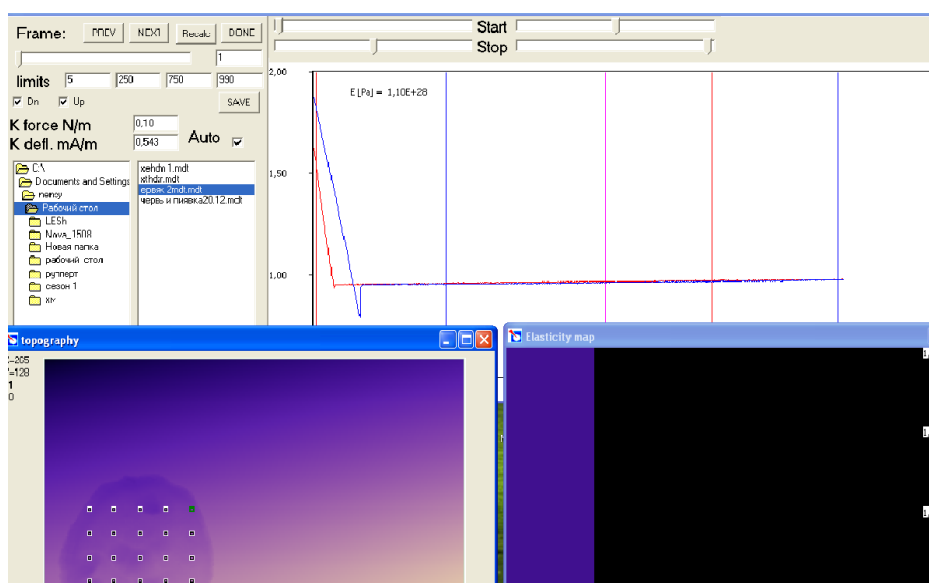


Рис. 11. Вид программного приложения «Ef3» (NT-MDT, Зеленоград)

С целью исследования макрорельефа проводили визуальную оценку поверхностных структур. Описание образований проводили согласно классификации Ровенского (1979).

Для определения состояния микрорельефа использовали опцию Roughness 3D Nova 1.0.26.1397 (NT-MDT, Зеленоград), которая определяла состояние микрорельефа в случайно выбранной области площадью 25 мкм^2 .

При помощи этой надстройки можно 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 ($1/\text{ум}\cdot\text{ум}$); S_{sc} , средняя кривизна вершины (nm).

S_q и S_a , показывают среднюю высоту среди всех возвышений поверхности, но для построения полной картины изменения профиля поверхности необходимо использовать S_p и S_v , которые при одних и тех же показателях средней шероховатости поверхности могут значительно варьировать.

Методы статистической обработки

Итоговые результаты были обработаны методами вариационной статистики (Лакин Г.Ф., 1990). С помощью компьютерных программ Excel 7.0 вычисляли значение средней арифметической выборочной совокупности (M) и

стандартной ошибки среднего значения (m), позволяющей оценить меру точности среднего значения в генеральной совокупности на основании данных исследуемой выборки (Венчиков А.И., Венчиков В.А., 1974; Реброва О.Ю., 2002; Рокицкий П.Ф., 1973). Оценивали нормальность распределения количественных значений признака и с помощью непарного (двухвыборочного) t -критерия Стьюдента (Петри А., Сэбин К., 2003).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Оценка клеточных реакций, возникающих в результате действия осмотической нагрузки на гемоциты представителей подкласса *Hirudinomorpha*

3.1.1. Типология гемоцитов представителей подкласса *Hirudinomorpha*

У представителей *Hirudinomorpha* выделили 4 клеточных типа, два из которых (БА и СА) отмечены у всех исследованных животных, а МА и НА отсутствуют у *H. medicinalis* и *H. sanguisuga* соответственно.

Большие Амебоциты (БА) – крупные клетки, которые при прижизненном наблюдении демонстрировали быстрое изменение формы и направленное перемещение. Цитоплазма содержит вакуоли, а так же большое количество светлых и темных гранул, которые, возможно, являются фагоцитированным материалом. Гемоциты перемещаются посредством образования широких лобоподий и совершенно не способны к образованию филоподий. Ядро имеет небольшие размеры и занимает положение близко к центральному. По мере перемещения клетки, положение ядра меняется. БА появляются в гемолимфе в ответ на повреждение целостности покровов. Эти клетки отсутствуют в гемолимфе пиявки, у которой пробу отбирают впервые, и, видимо, являются тканевыми макрофагами, которые выходят в лакуны для остановки кровопотери и защиты организма.

Средние амебоциты (СА), клетки округлой формы с крупным центрально расположенным ядром. Цитоплазма, обычно прозрачная, но может содержать небольшое количество гранул и вакуолей. Этот тип гемоцитов не способен к активному перемещению, но за счет длинных филоподий, нередко происходит поворот клеток и небольшое спонтанное смещение. У *E. octokulata* клетки адгезируются к субстрату с образованием циркулярной ламеллоплазмы. Амебоциты не фагоцитируют, и, видимо, выполняют запасную функцию.

Малые амебоциты (МА), небольшие клетки округлой формы. Отсутствуют у *H. medicinalis*. Ядро крупное, располагается центрально. Цитоплазма го-

могенная, в ней отсутствуют вакуоли, гранулы, тяжи цитоскелета не заметны. Клетки не способны к активному перемещению, образуют 1-2 длинные филоподии. МА не адгезируются к стеклу.

НА – обнаружены у всех кроме *H. sanguisuga*, клетки не способные к самостоятельному передвижению. Клетки круглые или овальные с четкими контурами, которые в зависимости от размера были поделены на два подтипа большие – с крупным ядром и меньшие по размеру – небольшим ядром. Это гемоциты с увеличенным ядерно-цитоплазматическим отношением, ядро обычно смещено к периферии клетки, цитоплазма может содержать гранулы и вакуоли.

3.1.2. Изменение морфометрических показателей гемоцитов представителей подкласса Hirudinomorpha в ответ на осмотическую нагрузку

3.1.2.1. Динамика морфометрических параметров гемоцитов в ответ на осмотическую нагрузку, регистрируемая методом световой микроскопии

Анализ клеточного состава гемоцитов медицинской пиявки позволил разделить все гемоциты *H. medicinalis* на 3 типа (табл. 2).

Большие Амебоциты (БА) – в условиях гипотонии большие амебоциты снижают двигательную активность, клетки адгезируют к подложке и другим гемоцитам. Этот тип клеток уплощается в дорзо-вентральном направлении и растекается по субстрату. Мембрана образует на поверхности многочисленные складки, цитоплазма вакуолизируется.

В условиях повышенного осмотического давления объем и линейные размеры клеток уменьшаются. Двигательная активность БА снижается, мембрана образует большое количество складок и выпячиваний на дорзальной поверхности.

Средние Амебоциты (СА) – после инкубации в условиях пониженного осмотического давления отметили увеличение размеров гемоцитов. Ложноножки формируются в меньшем количестве по сравнению с контрольными клетками, они имеют вид тонких нитевидных образований. Мембрана разглаживается и не образует складок. Гемоциты приобретают тороидальную форму – с углублением в центральной части клетки и приподнятой периферией.

Таблица 2

Морфометрические показатели гемоцитов *H. medicinalis*, инкубированных в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	линейные размеры клетки по длинной оси (μm)	линейные размеры клетки по короткой оси (μm)	линейные размеры ядра по длинной оси (μm)	линейные размеры ядра по короткой оси (μm)
Изотоническая среда				
БА	10,93±3,13	6,5±3,27	3,11±0,57	2,55±0,61
СА	4,30±1,22	4,6±0,99	2,66±0,73	1,81±0,37
НА	6,13±1,72	7,1±1,42	3,17±0,42	2,84±0,29
Гипотоническая среда				
БА	12,39±1,32	12,91±1,31*	4,61±0,65*	2,42±0,48
СА	7,84±1,41*	7,21±0,97*	4,25±0,32*	1,94±0,26
НА	8,11±0,47*	8,95±0,72	5,97±0,38*	2,01±0,67
Гипертоническая среда				
БА	7,52±2,01	6,31±2,17	4,51±0,72*	2,13±0,54
СА	3,82±2,55	2,59±0,18*	3,12±0,41	1,75±0,38
НА	6,17±0,31	4,25±0,11*	4,71±0,34*	2,11±0,76

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; НА – Не амебоциты; * – достоверность различий между значениями линейных параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Повышение осмотического давления способствовало снижению двигательной активности, клетки практически полностью прекращают выпячивать филоподии. Гемоциты приобретают угловатую форму, на поверхности появляются крупные впадины и возвышения.

НА в условиях измененного осмотического давления не проявляли явных морфологических изменений. Объем увеличивался как при инкубации в гипотонических, так и в гипертонических условиях.

В гемолимфе *E. octoculata* выделили 4 клеточных типа гемоцитов, которые отличались как морфологически, так и функционально (табл. 3).

Морфометрические показатели гемоцитов *E. octoculata*, инкубированных в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	линейные размеры клетки по длинной оси (μm)	линейные размеры клетки по короткой оси (μm)	линейные размеры ядра по длинной оси (μm)	линейные размеры ядра по короткой оси (μm)
Изотоническая среда				
БА	7,36±0,87	6,95±0,88	2,4±0,21	2,56±0,15
СА	5,65±0,48	4,94±0,54	2,45±0,40	2,52±0,35
МА	5,65±0,48	4,74±0,24	2,45±0,40	2,52±0,35
НА	6,01±0,42	5,28±0,21	2,71±0,48	2,32±0,12
Гипотоническая среда				
БА	7,26±0,29	7,29±0,60	3,43±0,37*	3,53±0,28*
СА	5,99±0,71	5,50±0,42	2,61±0,37	2,49±0,23
МА	3,82±0,26*	4,13±0,42	2,59±0,24	2,63±0,49
НА	6,16±0,58	5,76±0,25	2,86±0,37	2,76±0,31
Гипертоническая среда				
БА	6,14±0,64	5,89±0,63	2,74±0,53	2,55±0,28
СА	4,62±0,44*	4,61±0,40	2,72±0,38	2,71±0,27
МА	3,78±0,34*	3,60±0,41*	1,68±0,16*	1,59±0,12*
НА	8,11±0,22*	4,76±0,14*	2,54±0,18	2,61±0,11

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; * – достоверность различий между значениями линейных параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

У больших амебоцитов (БА) в условиях сниженного осмотического давления наблюдали увеличение размеров ядра, объем и линейные размеры амебоцитов не возрастали. Цитоплазма вакуолизировалась, фибриллы локализовались в околядерной области. Двигательная активность амебоцитов снижалась. Клетки теряли способность образовывать филоподии, а адгезировались к субстрату. Вокруг некоторых амебоцитов отмечали циркулярную ламеллоплазму.

В гипертонических условиях большие амебоциты демонстрировали разнообразные морфологические изменения. Поверхность одних клеток покрывалась многочисленными складками, гемоциты образовывали краевые раффлы и выпячивания. У таких клеток отмечали образование ламеллоплазмы и адгезию, с полным распластыванием клетки по субстрату. Другая группа БА приобретала шаровидную форму, мембрана имела равномерное строение.

Средние амебоциты (СА) – в гипотонических условиях цитоплазма клеток этого типа вакуолизируется. Форма приобретает вид ближе к шаровидной.

В цитоплазме заметны тяжи цитоскелета, которые отходят из околядерной области и заканчиваются возле плазматической мембраны.

Повышение осмотического давления приводит к образованию складок на дорзальной поверхности СА. Увеличивается скорость формирования филоподий и их длина.

Малые амебоциты (МА) – после инкубации в гипотонических условиях клетки увеличивались в объеме, округлялись и теряли способность выпускать ложноножки. При повышении осмотического давления наблюдали увеличения объема малых амебоцитов. Клетки сохраняли способность образовывать ложноножки, часто отмечали выпячивание 1-2 филоподий. После инкубации МА в гипертонических условиях малые амебоциты приобретали угловатую форму и складки на дорзальной поверхности.

Неамебоциты (НА) – в гипотонических условиях наблюдали увеличение объема клеток и линейных размеров ядра. Гранулы занимали более рыхлое расположение, мембрана образовывала несколько складок. В условиях снижения осмотического давления, в микрорельефе преобладали выпячивающиеся сквозь мембрану тяжи цитоскелета. Фибриллы располагались с образованием мелкоячеистой сети однообразной по всей поверхности гемоцита.

После помещения клеток в гипертоническую среду наблюдали изменение формы НА с округлой на овальную или каплевидную. Гранулы более плотно располагались в цитоплазме. Объем гемоцитов этого клеточного типа сокращался. Микрорельеф НА инкубированных в гипертонической среде не приобретал морфологических отличий.

Клеточный состав гемолимфы *H. sanguisuga* объединяет три типа клеток, два типа из которых является постоянным, а третий появляется после нарушения целостности покровов (табл. 4).

Большие амебоциты (БА) в гипотонической среде увеличиваются в размерах. Клетки образуют складки и немногочисленные филоподии по краю. На сканах поверхность гемоцитов выглядела гетерогенно. Повышение осмотического давления увеличивает подвижность клеток этого типа, гемоциты форми-

руют длинные псевдоподии. Поверхность ровная, отмечено выпячивание гранул и фибрилл цитоскелета.

Таблица 4

Морфометрические показатели гемоцитов *H. sanguisuga*, инкубированных в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	линейные размеры клеток по длинной оси (μm)	линейные размеры клеток по короткой оси (μm)	линейные размеры ядра по длинной оси (μm)	линейные размеры ядра по короткой оси (μm)	линейные размеры псевдоподий (μm)
Изотоническая среда					
БА	6,06 \pm 0,44	6,61 \pm 0,42	1,44 \pm 0,07	1,07 \pm 0,27	4,02 \pm 1,23
СА	4,94 \pm 0,63	3,83 \pm 0,67	0,51 \pm 0,13	1,42 \pm 0,29	2,51 \pm 0,72
МА	2,75 \pm 0,32	2,43 \pm 0,27	0,79 \pm 0,16	0,42 \pm 0,18	3,35 \pm 0,96
Гипотоническая среда					
БА	8,61 \pm 0,67*	7,48 \pm 0,28*	0,81 \pm 0,14*	0,93 \pm 0,21	3,56 \pm 1,71
СА	7,95 \pm 0,31*	5,37 \pm 0,24*	0,75 \pm 0,05*	1,12 \pm 0,11*	2,54 \pm 0,32
МА	2,96 \pm 0,55	2,53 \pm 0,35	1,05 \pm 0,19	1,31 \pm 0,21*	3,48 \pm 1,64
Гипертоническая среда					
БА	7,71 \pm 0,41*	6,53 \pm 0,26	0,95 \pm 0,28*	0,63 \pm 0,49	3,88 \pm 0,97
СА	3,68 \pm 0,67	4,44 \pm 0,97	0,96 \pm 0,17*	0,91 \pm 0,23	2,14 \pm 0,54
МА	2,78 \pm 0,31	2,34 \pm 0,22	0,94 \pm 0,31	0,53 \pm 0,15	1,61 \pm 0,47*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; * – достоверность различий между значениями линейных параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Средние амебоциты (СА) в условиях измененного осмотического давления увеличивались в объеме.

Малые амебоциты (МА) в гипотонических условиях образовывали складки мембраны, которые занимали как дорзальное, так и латеральное положение. Отдельные клетки распластывались на подложке с образованием циркулярной ламелоплазмы. Данные морфологические изменения отражаются на микрорельефе клетки. Повышение осмотического давления вызывает снижение двигательной активности клеток. Гемоциты приобретают угловатые очертания, цитоплазма вакуолизируется.

3.1.2.2. Результаты исследования топографии гемоцитов методами полуконтактной атомно-силовой микроскопии

Меняясь под воздействием факторов среды, микрорельеф поверхности клеток отражает особенности их функционального статуса. Использование изображений, полученных при помощи атомно-силового микроскопа, позволило оценить характер изменения микрорельефа поверхности гемоцитов *H. medicinalis* после инкубации в растворах различной концентрации.

Снижение осмотического давления ведет к значительному увеличению объема всех типов клеток. На сканограммах гемоциты имеют шарообразную форму и гладкую, лишенную складок, мембрану (рис. 12). Преобладают микровозвышения поверхности, а крупных возвышений и понижений не отмечали.

В гипертонической среде поверхность клеток крови медицинской пиявки значительно меняется. Наблюдали выпячивание гранул цитоплазмы и фибрилл цитоскелета через плазматическую мембрану, микровозвышения отсутствовали. Амебоциты распластывались по подложке. Все клетки проявляют тенденцию к образованию вакуолей (рис. 13).

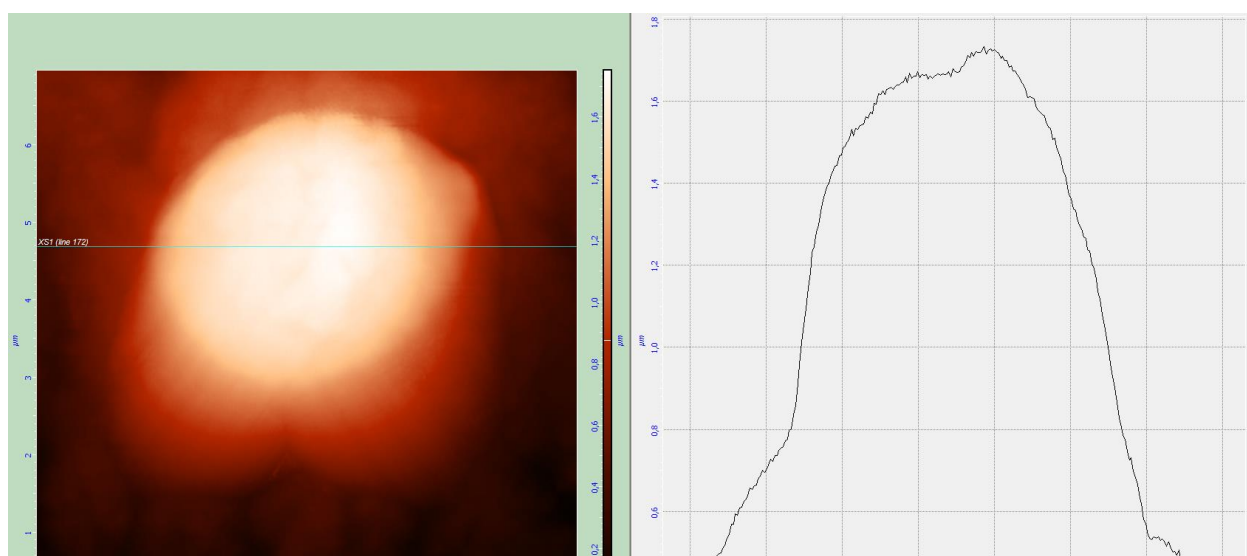


Рис. 12. Двухмерное изображение топографии поверхности БА *H. medicinalis* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гипоосмотической нагрузки

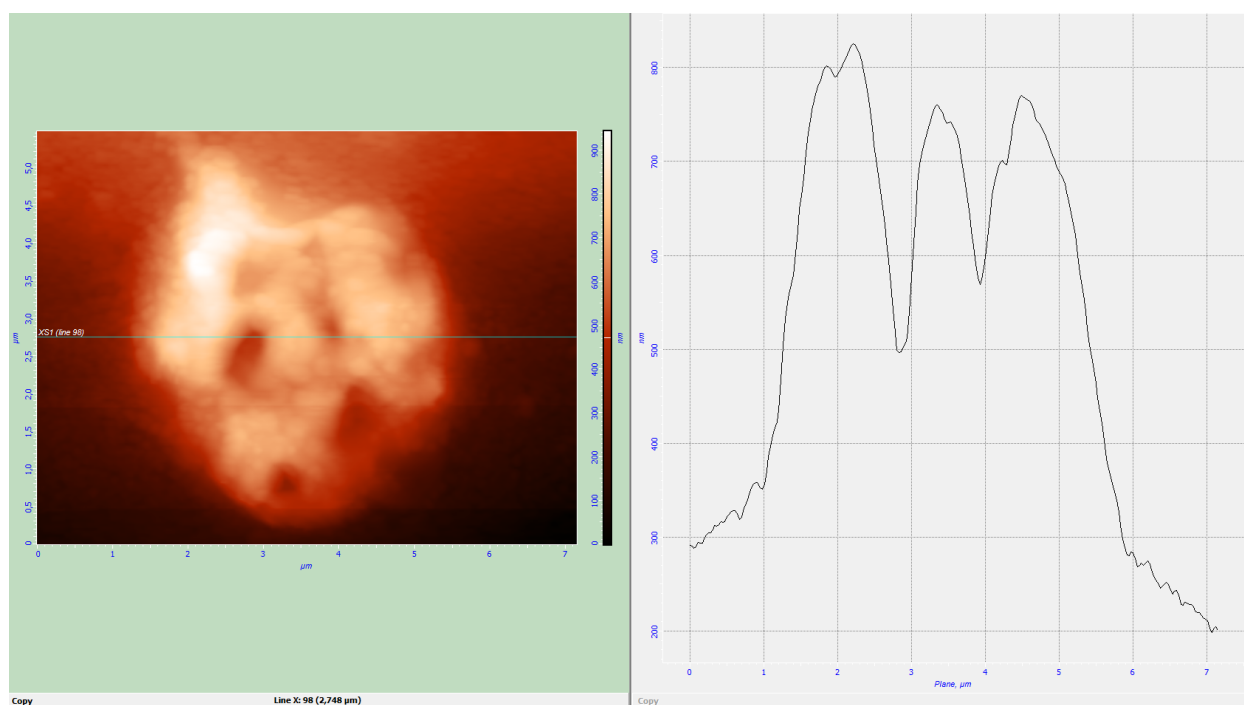


Рис. 13. Двухмерное изображение топографии поверхности БА *H. medicinalis* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гиперосмотической нагрузки

Анализ шероховатостей поверхности демонстрирует сглаживание микро возвышений и микро впадин на мембране клетки в ряду изотонические условия – гипотонические условия – гипертонические условия.

В гипертонических условиях в несколько раз снижаются показатели среднеквадратичной и средней шероховатости поверхности, но уменьшается расстояние между возвышениями. В гипотонической среде происходит увеличение высоты пиков и глубины впадин, в условиях повышения осмотического давления наблюдается сглаживание рельефа. Изменений в симметричности распределения различных структур рельефа при изменении осмотического давления не наблюдали. Вся клеточная поверхность равномерно трансформировалась при воздействии не характерной солености. Под влиянием гипотонических условий микрорельеф МА имеет более гладкое строение, невысокие пики и впадины располагаются удаленно друг от друга (табл. 5).

Показатели неоднородности микрорельефа поверхности
геоцитов *H. medicinalis*

Показатели	БА	СА	НА
Изотоническая среда			
Sq, среднеквад. шероховатость поверхности, nm	91,89±7,54	67,25±5,16	125,43±34,56
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	69,82±9,65	51,82±2,84	105,53±10,71
Sp, высота самого высокого пика, nm	676,51±43,87	653,67±4,67	776,97±63,92
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	237,64±23,19	279,95±9,58	212,93±31,28
Sds, плотность пиков, 1/um·um	39,65±6,51	45,13±6,83	10,97±2,13
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	37,02±3,22	25,87±4,92	16,48±3,41
Гипотоническая среда			
Sq, среднеквад. шероховатость поверхности, nm	57,19±8,93*	65,18±7,22	0,11±0,01*
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	45,92±4,48*	53,08±7,48	0,09±0,01*
Sp, высота самого высокого пика, nm	713,56±12,04	859,18±73,11*	1,18±0,01*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	400,83±21,28*	487,74±90,08*	0,65±0,01*
Sds, плотность пиков, 1/um·um	79,11±6,39*	79,48±10,61*	1,53±0,05*
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	38,99±2,97	26,70±3,34	3,72±0,15*
Гипертоническая среда			
Sq, среднеквад. шероховатость поверхности, nm	29,48±4,68*	20,02±2,57*	62,31±3,93*
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	23,14±2,71*	16,22±1,42*	50,71±3,92*
Sp, высота самого высокого пика, nm	279,56±4,09*	196,26±5,45*	356,33±7,79*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	104,53±11,95*	60,81±6,81*	45,59±6,27*
Sds, плотность пиков, 1/um·um	20,47±2,31*	36,82±2,25	14,86±0,56*
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	8,89±2,11*	14,39±3,68*	10,88±2,10*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; НА – Не амебоциты; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

На сканах амебоцитов *E. octoculata*, полученных при помощи атомно-силового микроскопа, можно четко различить центральную приподнятую область ядра и околядерного пространства и зону цитоплазмы, которая располагается практически вровень с подложкой (рис. 14). Мембрана, покрывающая ядро, образует возвышения, обусловленные выпячиванием фибрилл цитоскелета, которые располагаются хаотично. В периферической части клетки отметили наличие более длинных и направленных радиально от ядра фибрилл.

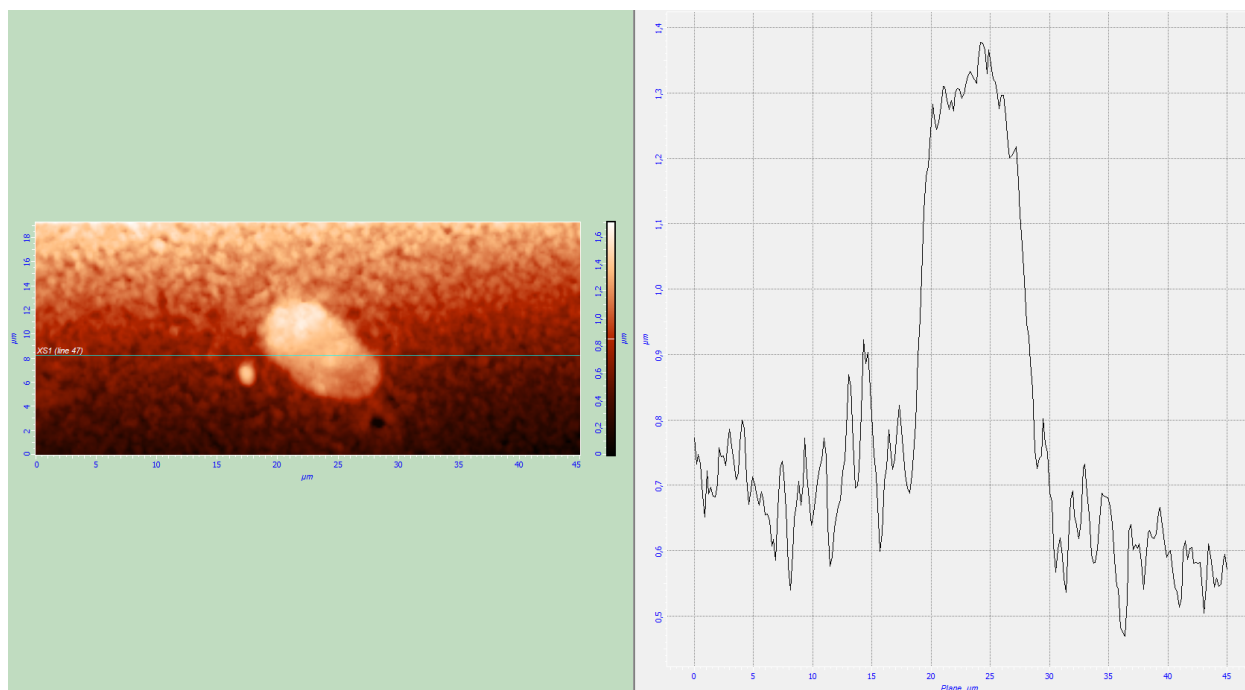


Рис. 14. Двухмерное изображение топографии поверхности БА *E. octoculata* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гипоосмотической нагрузки

В гипертонических условиях клетки амёбоцитов имели единообразное морфологическое строение. На поверхности гемоцитов образовывались складки и борозды.

Анализ топографии поверхности целомацитов *E. octoculata* выявил небольшое увеличение показателей среднеквадратичной и средней шероховатости в гипотонической среде и уменьшение – в гипертонических условиях (рис. 15).

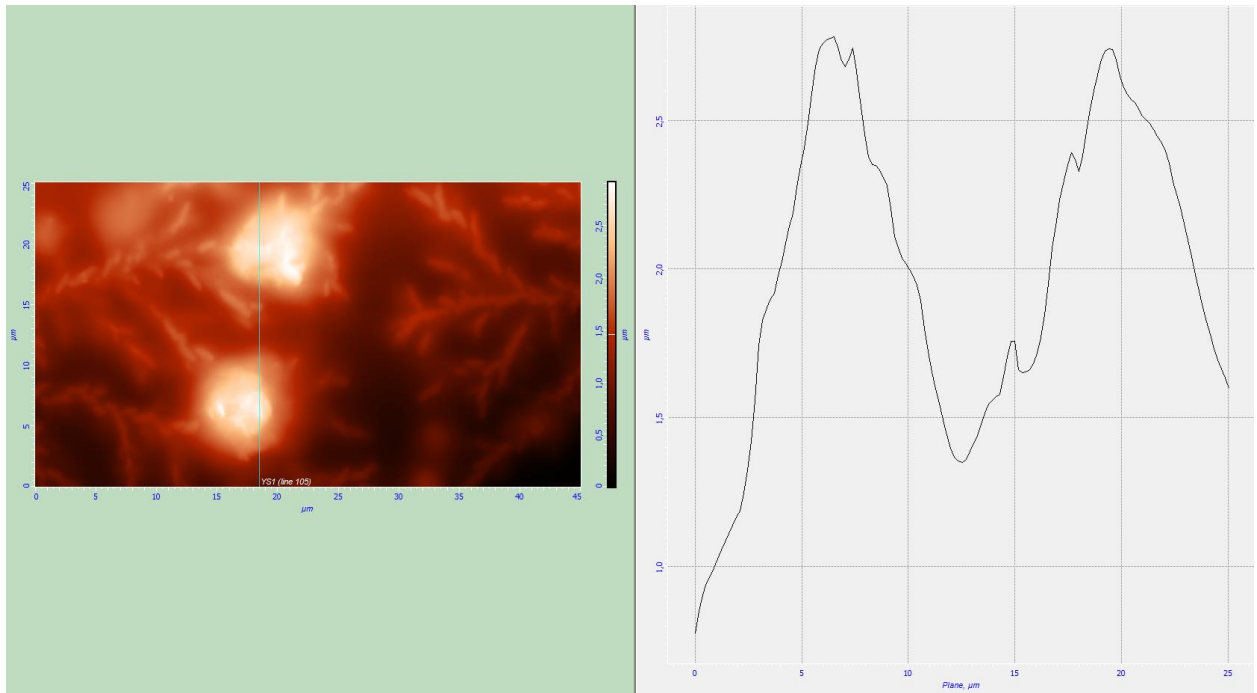


Рис. 15 – Двухмерное изображение топографии поверхности БА *E. octoculata* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гиперосмотической нагрузки

Большие амебоциты (БА) сходно реагировали на повышение и снижение солености среды. Гладкая поверхность в нормальных условиях приобретала сложное строение с максимальным размером возвышений и впадин в условиях гипотонии. Значительное сглаживание микрорельефа НА наблюдается в гиперосмотических условиях. У остальных клеточных типов характерно небольшое увеличение шероховатости в гипотонических условиях и снижение в условиях увеличенной солености среды. Под действием измененного осмотического давления происходит уменьшение плотности возвышений на поверхности малого амебоцита (табл. 6).

Топография поверхности гемоцитов *H. sanguisuga*, при повышении осмотического давления, на сканограммах атомно-силовой микроскопии отличается однородностью рельефа (рис. 16). Заметны фибриллы цитоскелета, на поверхности гемоцитов через плазматическую мембрану выступали тяжи. Повышение осмотического давления увеличивает выпячивание гранул и фибрилл цитоскелета. Поверхность клеток относительно ровная.

Показатели неоднородности микрорельефа поверхности
гемоцитов *E. octoculata*

Показатели	БА	СА	МА	НА
Изотоническая среда				
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,13±0,04	49,74±4,66	63,56±1,97	40,09±3,01
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,09±0,03	37,81±1,41	51,89±8,06	31,25±0,76
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,46±0,02	126,81±0,08	515,34±19,66	417,98±13,66
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,67±0,06	236,35±3,43	151,55±6,51	209,95±11,43
Sds, плотность пиков, 1/um·um	2,41±0,81	1,08±0,19	4,74±1,14	34,19±5,61
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	11,34±0,05	5,21±0,009	8,24±0,02	11,43±1,98
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,34±0,09	0,21±0,004	0,26±0,04	40,09±7,11
Гипотоническая среда				
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	43,33±4,65*	51,11±5,72	81,97±3,84*	68,77±2,44*
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	36,42±8,31*	35,93±9,76	62,55±5,65	55,02±1,58*
Sp, высота самого высокого пика, nm	485,59±60,42*	468,33±5,37*	545,74±4,84*	268,16±29,09*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	209,95±30,22*	154,02±4,51*	57,63±4,91*	287,34±8,04*
Sds, плотность пиков, 1/um·um	2,87±0,19	2,29±0,31*	1,33±0,03*	1,48±0,42*
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	12,17±1,78	5,19±0,01	6,26±0,03*	9,27±0,05
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,19±0,03	0,21±0,01	0,27±0,02	0,28±0,05*
Гипертоническая среда				
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	48,80±9,02*	43,44±2,12	0,12±0,01*	46,47±0,44*
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	41,30±9,36*	35,09±8,72	0,09±0,03*	36,14±0,31*
Sp, высота самого высокого пика, nm	395,06±41,67*	392,47±20,53*	1,59±0,16*	627,10±2,51*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	125,72±11,24*	258,32±6,52*	0,82±0,24*	286,55±6,65*
Sds, плотность пиков, 1/um·um	2,11±0,31	2,62±0,66*	1,12±0,13*	2,29±0,38*
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	17,19±2,13*	6,21±0,04*	7,28±0,43*	5,22±0,02*
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,19±0,02*	0,22±0,04	0,27±0,08	0,24±0,01*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

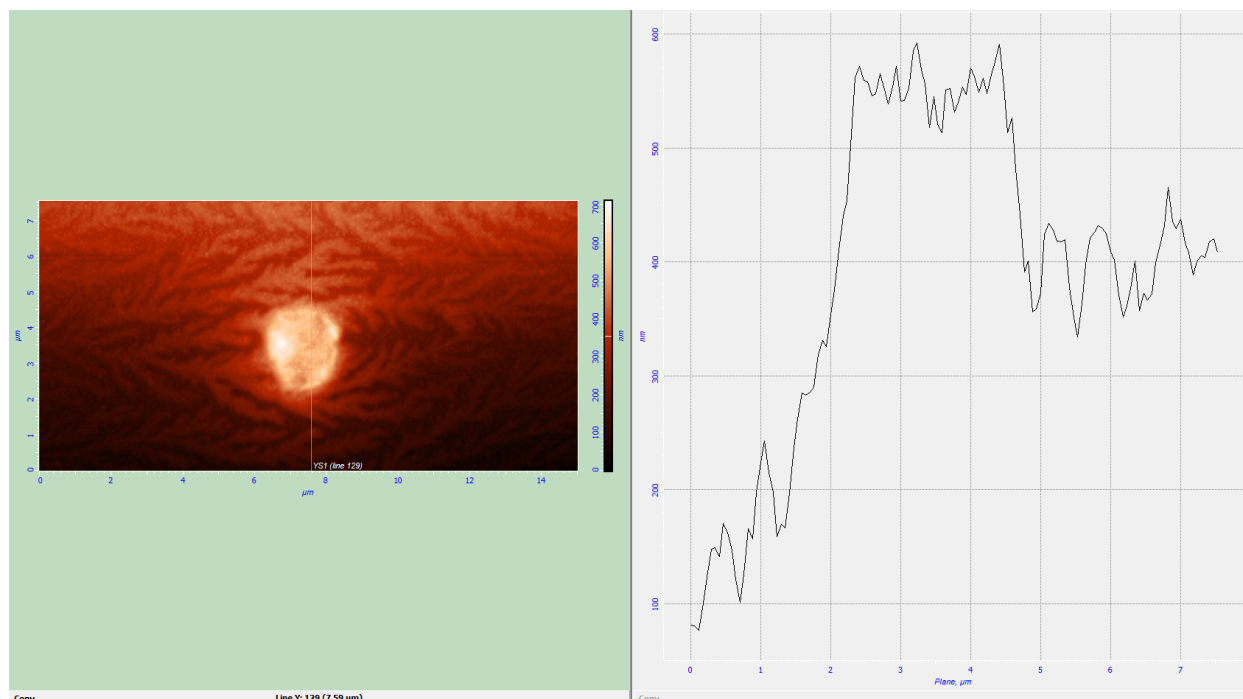


Рис. 16. Двухмерное изображение топографии поверхности БА *H. sanguisuga* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемócита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гиперосмотической нагрузки

В условиях гипотонии гемócиты этого типа уплощались, от ядра клетки заметны радиальные тяжи фибрилл к клеточной мембране (рис. 17). Снижение осмотического давления отражается на микрорельефе клетки, который содержит большое количество выпячиваний и борозд. В гипотонической среде на сканах поверхность гемócитов выглядела гетерогенно.

Средняя шероховатость в гипотонической среде не менялась у больших амебócитов, отмечено увеличение количества выпячиваний на единицу площади (S_{ds}) и их средней кривизны (S_{sc}). Остальные показатели не претерпевали значительных изменений. У малых амебócитов и неамебócитов зафиксировано увеличение таких показателей как S_q в условиях повышения солености, микрорельеф меняется в сторону увеличения выпячиваний и уменьшения количества впадин на единицу площади.

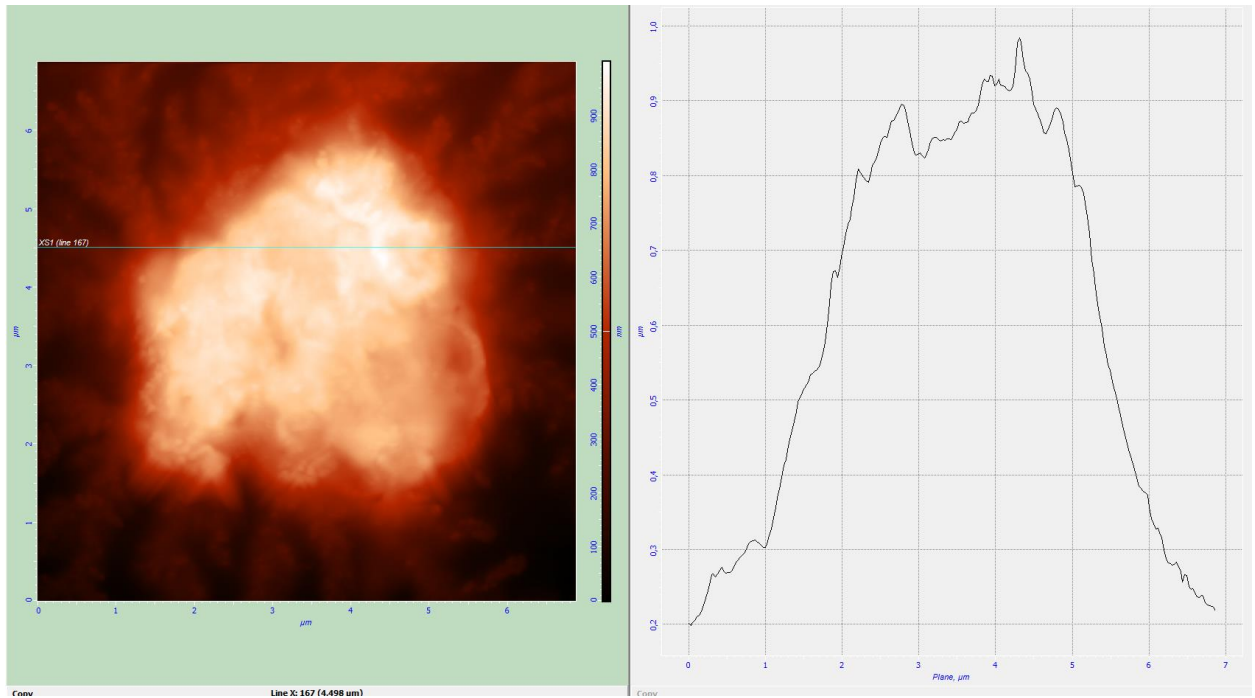


Рис. 17 – Двухмерное изображение топографии поверхности БА *H. sanguisuga* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение гемоцита вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гипоосмотической нагрузки

В гипертонических условиях наблюдали небольшое увеличение основных показателей шероховатости поверхности. Расстояние между возвышениями и их максимальная высота увеличивается. Плотность инвагинаций и их кривизна в гипертонических условиях достоверно не отличается от этих показателей в нормальных условиях (табл. 7).

3.1.3. Осморегуляторные реакции гемоцитов представителей подкласса *Hirudinomorpha*

Под воздействием растворов различной солености на клетки гемолимфы различных представителей *Hirudinomorpha*, наблюдали изменения показателей объема и площади гемоцитов, которые варьировали в зависимости от видовой принадлежности животного.

Показатели неоднородности микрорельефа поверхности
гемоцитов *H. sanguisuga*

Показатели	БА	СА	МА
Изотоническая среда			
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	41,39±4,32	44,66±9,41	33,09±2,41
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	36,13±9,45	34,14±7,22	25,42±3,69
Sp, высота самого высокого пика, nm	512,30±42,7	494,76±61,11	433,91±10,46
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	336,34±38,52	248,88±30,61	248,03±10,63
Sds, плотность пиков, 1/um·um	4,64±0,43	10,03±2,31	26,69±2,97
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	3,94±0,09	9,31±1,17	7,81±0,45
Гипотоническая среда			
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	42,38±3,23	64,89±8,91*	61,57±4,06*
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	32,71±2,04	44,76±3,56	49,49±5,51*
Sp, высота самого высокого пика, nm	456,95±4,29*	581,54±14,33*	643,81±10,23*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	229,41±7,53*	187,35±25,12*	347,71±7,48*
Sds, плотность пиков, 1/um·um	22,09±4,10*	9,27±0,45	7,41±0,89*
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	10,37±1,49*	5,67±0,76*	8,63±0,57*
Гипертоническая среда			
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	64,82±7,21*	58,31±4,32	44,66±7,02*
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	53,14±3,45*	45,84±7,11	34,14±4,21
Sp, высота самого высокого пика, nm	629,49±6,78*	658,11±22,95*	494,76±18,21*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	307,06±13,21	388,35±17,31*	248,88±32,12
Sds, плотность пиков, 1/um·um	3,94±0,75	10,86±2,32	10,03±3,01*
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	4,69±1,31	12,57±2,31	9,31±2,31

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Гемоциты *H. medicinalis* значительно увеличивали показатели объема после помещения в гипотонические условия. Наибольшее увеличение наблюдали у не амебоцитов (НА), клеток у которых не регистрировали активного передвижения. Минимальный мембранный резерв определили у больших амебоцитов, которые претерпели изменения объема только на 40%. В гипотонических условиях все гемоциты, кроме БА, не демонстрировали изменения объема. Гемоциты БА в гипертонических условиях снизили показатели объема практически на 50% (табл. 8).

Таблица 8

Объем и резерв мембраны гемоцитов *H. medicinalis* в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Объем (изотоническая среда, μm^3)	Объем (гипотоническая среда, μm^3)	Объем (гипертоническая среда, μm^3)	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, μm^3	Интенсивность использования относительно мембранного резерва гемоцитов, %
БА	18,81±1,38	26,34±0,98*	9,87±0,11*	7,53±1,01	40,03
СА	9,65±0,96	16,56±2,43*	9,05±0,34	6,91±0,85	71,61
МА	6,64±0,46	11,48±1,22*	6,55±0,21	4,84±0,17	72,89
НА	3,98±0,29	7,52±0,74*	4,54±0,25*	3,54±0,24	88,94

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

У гемоцитов *E. octoculata* характерно уменьшение показателей объема в гипотонических условиях, только МА отличается увеличением объема на 31,81%. В условиях повышения концентрации солей наблюдали небольшое увеличение объема гемоцитов всех типов, кроме хлорогеновых клеток (табл. 9).

Таблица 9

Объем и резерв мембраны гемоцитов *E. octoculata* в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Объем (изотоническая среда, μm^3)	Объем (гипотоническая среда, μm^3)	Объем (гипертоническая среда, μm^3)	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, μm^3	Интенсивность использования относительно мембранного резерва гемоцитов, %
БА	7,47±0,37	5,57±3,86	8,92±0,22*	0	0
СА	4,77±0,43	4,33±0,36	7,27±0,48*	0	0
МА	2,19±0,36	2,89±0,25*	3,84±0,54	6,9±1,12	31,81
НА	1,75±0,39	1,91±0,54	1,59±0,41	0	0

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Объем всех типов гемоцитов *H. sanguisuga* увеличивался после инкубации в растворах с измененным осмотическим давлением. В гипотонических условиях клетки существенно увеличивались в объеме. Повышение показате-

лей отмечали как у амебоцитов, так и у клеток, не обладающих подвижностью. В условиях повышенной концентрации солей наблюдали увеличение объема клеток в 2-3 раза (табл. 10).

Таблица 10
Объем и резерв мембраны гемоцитов *H. sanguisuga* в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Объем (изотоническая среда, μm^3)	Объем (гипотоническая среда, μm^3)	Объем (гипертоническая среда, μm^3)	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, μm^3	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %
БА	1,84±0,18	12,78±0,56*	2,84±0,15*	10,94±2,31	594,57
СА	0,59±0,03	3,01±0,62*	1,58±0,07*	2,42±0,49	410,17
МА	1,13±0,13	8,29±0,46*	2,03±0,08*	7,16±1,87	633,23

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

3.1.4. Влияние осмотической нагрузки на упругость и адгезионные свойства плазмалеммы гемоцитов представителей подкласса *Hirudinomorpha*

Применение методов атомно-силовой микроскопии позволило оценить изменение упругостных показателей мембраны и адгезию гемоцитов *H. medicinalis* к нанозонду после воздействия растворов различной концентрации (табл. 11).

Таблица 11
Параметры гемоцитов *H. medicinalis*, полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)
БА	76,87±1,31	22,4±2,09	51,60±2,94*	49,71±4,11*	11,65±1,09*	12,67±2,39*
СА	43,83±2,51	32,65±5,16	16,73±2,14*	40,01±0,15*	8,52±0,41*	13,99±1,21*
МА	38,91±2,76	56,62±1,92	79,21±0,44*	33,72±0,77*	14,58±0,01*	10,55±1,89*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Наибольший показатель упругости в нормальных условиях отмечен у БА, а наименьший – у НА. При изменении осмотического давления происходит увеличение жесткости мембраны. Для НА характерна обратная тенденция – повышение упругости клеточной поверхности в гипотонических условиях.

Адгезия к нанозонду мембраны амебоцитов повышается в гипотонической среде и снижается в гипертонической. У не амебоцитов наблюдали уменьшение силы адгезии при любом изменении осмотического давления.

Определены параметры упругостных и адгезивных свойств гемоцитов *E. octoculata* в условиях измененного осмотического давления (табл. 12).

При помещении гемоцитов в гипотонический раствор жесткость мембраны амебоцитов клеток возрастала, а неамебоцитов – падала. В гипертоническом растворе упругость мембраны гемоцитов типа НА была максимальна, а у амебоцитов наблюдали её снижение в два раза. Адгезия мембраны амебоцита к нанозонду в условиях пониженного осмотического давления увеличилась у больших амебоцитов, тогда как у остальных клеточных типов наблюдали снижение этого показателя. В гипертонических условиях отмечали небольшое повышение силы адгезии у всех типов клеток целомической жидкости.

Таблица 12

Параметры гемоцитов *E. octoculata*, полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки

Типы клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)
БА	51,31±0,71	4,76±0,29	18,72±1,81*	32,44±3,43*	23,81±1,31*	20,72±1,56*
СА	33,41±0,84	25,73±0,91	11,26±1,21*	22,71±1,58*	18,07±0,43*	27,19±3,77*
МА	38,12±1,02	26,14±0,88	8,91±0,37*	21,79±1,07*	20,03±0,63*	29,03±3,74
НА	24,31±3,04	18,71±2,06	55,45±0,56*	17,31±0,78*	79,98±0,53*	19,96±0,12

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не Амебоциты; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Показатели упругости гемоцитов всех типов *H. sanguisuga* увеличивались при изменении осмотического давления. Поверхность амебоцитов демонстри-

рвала большую упругость в гипертонии, а неамебоцитов – в гипотонии (табл. 13).

Таблица 13

Параметры гемоцитов *H. sanguisuga*, полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки

Типы клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)
БА	32,93±1,43	3,66±0,09	42,62±8,75*	2,75±0,36*	51,19±0,92*	4,21±0,14*
СА	19,92±0,98	3,55±0,34	43,62±2,03*	2,53±0,01*	48,94±0,54*	3,71±0,11
МА	18,92±0,85	3,22±0,25	65,36±5,03*	6,72±0,26*	60,55±1,05*	7,18±0,83*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

3.2. Оценка клеточных реакций, возникающих в результате действия осмотической нагрузки на целомоциты представителей подкласса *Oligochaeta*

3.2.1. Типология целомоцитов представителей подкласса *Oligochaeta*

У представителей *Oligochaeta* выделили 5 постоянных клеточных типов, которые обнаружили у всех, кроме *E. nordenskioldi*.

БА – большие амебоциты, центральная часть клетки заполнена гранулами и обширными вакуолями, которые, видимо, содержат фагоцитированный материал. Ядро небольшое, часто смещенное к периферии клетки. Целомоциты этого типа равномерно распластываются по подложке у *E. rosea*. Тонкий ободок цитоплазмы растекается правильной окружностью, в которой можно обнаружить радиально расходящиеся тяжи фибрилл. Большие амебоциты способны к агрегации в группы по 3-4 клетки, при этом не адгезируясь к подложке (*E. tetraedra*, *L. terrestris*, *L. rubellus*, *A. caliginosa*). Единичные клетки встречались только в распластанном виде. Большие амебоциты не адгезируются к подложке, способны к активному передвижению, выпуская небольшое количество филоподий у *E. fetida*, *E. gordejefi*, *E. nordenskioldi*, *L. rubellus*, *O. complanatum*. У

L. castaneus большие амебоциты были разделены на две подгруппы по способности и неспособности адгезироваться.

СА – средние амебоциты, цитоплазму которых заполняет небольшое количество прозрачных гранул. Клетки с небольшим ядром, которое не имеет четкого центрального положения, а перемещается в зависимости от поворота и движения амебоцита. СА не адгезировались к подложке, а свободно перемещались в целомической жидкости у *E. nordenskioldi*, *E. gordejefi*, *E. tetraedra*, *A. caliginosa*. Амебоциты формировали длинные филоподии, которые могли разветвляться на концах. Этот тип целомоцитов способен распластываться на подложке, у *L. terrestris*, *O. complanatum*. направленное движение клеток отсутствует. Средние амебоциты способны к агрегации с другими типами целомоцитов, нередко образуют скопления (*E. fetida*, *L. castaneus*).

МА – малые амебоциты с центрально расположенным ядром. Клетки адгезировались к подложке у *L. castaneus*, *E. rosea*, *L. rubellus*, *O. complanatum*, выпуская большое количество небольших коротких филоподий. Цитоплазма МА прозрачна и содержит по 2-4 небольшие вакуоли. Целомоциты способны объединяться в крупные агрегаты, состоящие из 5-20 клеток. МА не адгезируются к подложке у *E. nordenskioldi*, *E. tetraedra*, *E. fetida*, *A. caliginosa*.

Неамебоциты (НА) – клетки с центрально расположенным ядром и четкими краями. Этот клеточный тип включал клетки разные по размеру. Общим для целомоцитов является отсутствие способности образовывать филоподии и активно перемещаться.

Хлорогогенные клетки (ХЛ) – большие клетки, внутреннее содержимое которых составляют бурые гранулы. Клетки не способны выпускать ложноножки и адгезироваться к поверхности стекла. Были отмечены большие клетки с рыхлым содержимым и небольшие плотные клетки. В целомической жидкости червей встречалось большое количество бурых гранул, что указывает на возможность разрушения хлорогогенных клеток, как естественного процесса, постоянно происходящего в целомической жидкости.

3.2.2. Изменение морфометрических показателей целомацитов представителей подкласса *Oligochaeta* в ответ на осмотическую нагрузку

3.2.2.1. Динамика морфометрических параметров целомацитов в ответ на осмотическую нагрузку, регистрируемая методом световой микроскопии

При прижизненном изучении популяции целомацитов *E. rosea* выделили 5 клеточных типов, которые различались по форме, размеру, характеру движения, способности выпускать псевдоподии и адгезироваться к подложке (табл. 14).

Таблица 14

Морфометрические показатели целомацитов *E. rosea*, инкубированных в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	линейные размеры клеток по длинной оси (μm)	линейные размеры клеток по короткой оси (μm)	линейные размеры ядра по длинной оси (μm)	линейные размеры ядра по короткой оси (μm)	линейные размеры псевдоподий (μm)
Изотоническая среда					
БА	10,77±1,08	9,57±0,87	4,69±0,24	4,80±0,39	5,90±1,63
СА	7,40±0,61	6,46±0,57	3,97±0,47	4,02±0,5	5,40±1,52
МА	6,53±0,81	6,3±0,73	3,59±0,3	3,3±0,4	1,59±0,44
НА	5,56±0,71	5,01±0,43	2,80±0,42	2,91±0,22	-
ХЛ	14,3±0,75	13,3±1,24	3,46±0,1	3,02±0,41	-
Гипотоническая среда					
БА	12,64±1,61	8,88±1,38	5,79±0,63*	5,32±0,98	8,45±1,45*
СА	8,86±0,86	6,18±0,74	3,93±0,48	4,11±0,42	6,14±0,31
МА	6,24±0,43	6,02±0,57	3,03±0,55	3,03±0,57	1,66±0,31
НА	5,82±0,51	5,98±0,53	2,98±0,21	3,01±0,13	-
ХЛ	12,82±0,71	13,40±0,64	3,83±1,64	4,06±0,42*	-
Гипертоническая среда					
БА	11,47±1,76	10,84±1,80	3,52±0,31*	3,94±0,75	-
СА	9,51±0,95*	8,93±1,03*	3,71±0,32	3,51±0,21	-
МА	8,99±1,36*	4,61±0,46*	3,23±0,92	2,31±0,37	-
НА	5,22±0,74	5,27±0,66	3,22±0,11	3,12±0,31	-
ХЛ	13,27±1,84	10,86±2,18	4,11±0,45*	3,44±0,21	-

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

БА – большие амебоциты в гипотонических условиях демонстрировали быстрое распластывание по подложке, цитоплазма отдельных амебоцитов

представляла собой массу в центральной части клетки, по краю формировала циркулярную ламеллоплазму. В краевой части клетки заметны радиальные тяжи фибрилл цитоскелета. В гипертонических условиях большие амебоциты не проявляли активности, теряли способность к образованию филоподий.

СА в гипотонических условиях проявляли тенденцию к адгезии. У средних амебоцитов четко выделен полюс формирования длинных и тонких ложноножек. Противоположная сторона клетки растекается широкими лобоподиями. В гипертонической среде активность этого типа целомоцитов снижалась, мембрана клеток формировала короткие выпячивания.

МА – в условиях снижения осмотического давления поверхность клеток этого типа равномерно покрывали короткие филоподии. Отдельные клетки адгезировали к субстрату. Для этого типа целомоцитов не характерно формирование ламеллоплазмы или лобоподий. В условиях повышенного осмотического давления амебоциты приобретали неправильную форму, мембрана формировала небольшие выпячивания, которые не имели закономерного характера.

НА – клетки с центрально расположенным ядром и четкими краями. Этот клеточный тип включал клетки разные по размеру. Общим для целомоцитов является отсутствие способности образовывать филоподии и активно перемещаться. В гипотонических условиях наблюдали вакуолизацию цитоплазмы. Клетки сохраняли четкие контуры. В условиях повышенной концентрации солей изменения формы этого типа целомоцитов не наблюдали. Мембрана на поверхности клетки формировала складки и борозды.

ХЛ – в гипотонических условиях приобретали округлую форму. Гранулы располагались рыхло в цитоплазме целомоцитов. В гипертонических условиях форма хлорагоцитов не менялась. Гранулы занимали положение ближе к периферии клетки, так что ядро окружало светлое кольцо цитоплазмы.

Для целомической жидкости *E. fetida* характерны следующие клеточные типы (табл. 15).

БА – понижение осмотического давления приводит к увеличению линейных параметров и объема больших амебоцитов. Форма клеток менялась слабо,

на одном из полюсов наблюдали выпячивание филоподий, которые сливались в ламеллоплазму. Микрорельеф поверхности БА в гипотонических условиях сглаживается, поверхность клетки становится ровной. Сквозь мембрану, на периферии целомацита, проступают тяжи фибрилл.

Таблица 15

Морфометрические показатели целомацитов *E. fetida*, инкубированных в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	линейные размеры клеток по длинной оси (μm)	линейные размеры клеток по короткой оси (μm)	линейные размеры ядра по длинной оси (μm)	линейные размеры ядра по короткой оси (μm)	линейные размеры псевдоподий (μm)
Изотоническая среда					
БА	8,85±0,58	7,72±0,65	4,08±0,56	3,46±0,56	3,17±0,89
СА	5,3±0,34	4,97±0,29	3,46±0,35	3,18±0,28	1,49±0,32
МА	4,99±0,46	4,38±0,5	2,73±0,35	2,55±0,43	2,29±0,39
НА	8,79±0,7	7,65±0,62	3,51±0,33	3,03±0,44	-
ХЛ	20,21±3,39	12,01±1,2	3,05±0,66	3,28±0,49	20,21±3,39
Гипотоническая среда					
БА	11,65±0,91*	9,34±0,64*	3,37±0,28	3,28±0,23	2,71±0,59
СА	7,49±0,71*	6,51±0,96*	3,02±0,29	2,78±0,39	2,38±0,97
МА	5,26±0,76	5,31±0,24*	2,49±0,43	2,59±0,43	0,55±0,12*
НА	8,71±0,91	7,58±0,94	2,73±0,36*	2,41±0,28	
ХЛ	19,26±1,94	16,54±1,52*	6,42±0,61*	4,45±0,35*	
Гипертоническая среда					
БА	19,75±1,01	13,46±0,89	3,23±0,16	2,98±0,35	3,13±1,27
СА	10,26±0,51	8,54±0,34	3,18±0,16	3,06±0,16	1,12±0,39
МА	6,39±5,14	5,64±0,49	3,23±0,51	2,89±0,28	1,68±0,12*
НА	5,71±0,64	4,63±0,69	2,28±0,24	2,21±0,26*	
ХЛ	16,32±1,14	13,99±2,01	2,87±0,42	3,05±0,27	

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

СА – в условиях изменения осмотического давления средние амебоциты увеличиваются в объеме и линейных параметрах. После инкубации в гипертонической и гипотонической среде целомациты проявляли различные морфологические изменения. Среди популяции клеток этого типа отмечали образование складок, растекание ободка ламеллоплазмы, образование отдельных филоподий. Изменение осмотического давления активирует адгезию средних амебоцитов, прикрепление клеток к подложке происходит быстрее в гипертонических условиях. Микрорельеф средних амебоцитов в гипертонических условиях содержит большое количество складок и удлинённых выпячиваний фибрилл ци-

тоскелета. В условиях гипотонии целомациты увеличивались в объеме и микрорельеф поверхности сглаживался.

В условиях повышенного осмотического давления малые амебоциты выпускают длинные филоподии на одном или противоположных полюсах клеток. Целомациты сохраняют округлую форму, активно передвигаются в целомической жидкости. После инкубации в растворе со сниженным осмотическим давлением целомациты этого типа приобретали шаровидную форму, количество и размер филоподий заметно уменьшается, двигательная активность снижается до минимума. Микрорельеф малых амебоцитов в гипертонических условиях отличается обилием фибрилл цитоскелета.

НА – при изменении осмотического давления объем клеток увеличивается более чем на 15% как в гипертонических, так и в гипотонических условиях.

ХЛ – крупные клетки, заполненные бурыми гранулами. Целомациты имеют вытянутую неправильную форму. Небольшое ядро имеет тенденцию смещаться к периферии клетки. Плазматическая мембрана образует большое количество лобоподий и тонких филоподий.

Популяция целомацитов *E. nordenskioldi* обладала небольшим разнообразием клеточных типов. Среди свободно циркулирующих клеток нами было выделено три типа, которые отличались морфологически и функционально (табл. 16).

В гипертонических условиях большие амебоциты приобретали шаровидную форму, теряли ложноножки. Двигательная активность таких клеток значительно снижалась. Микрорельеф целомацитов в условиях повышенного осмотического давления. Инкубация клеток в гипотонической среде не отразилось на морфологических особенностях. Амебоциты увеличивали объем и линейные размеры при любом изменении осмотического давления.

В гипотонических условиях наблюдали увеличение объема средних амебоцитов, в цитоплазме увеличивалось количество вакуолей. Двигательная активность возрастала после инкубации целомацитов в гипотонической среде.

Морфометрические показатели целомацитов *E. nordenskioldi*, инкубированных в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	линейные размеры клеток по длинной оси (μm)	линейные размеры клеток по короткой оси (μm)	линейные размеры ядра по длинной оси (μm)	линейные размеры ядра по короткой оси (μm)	линейные размеры псевдоподий (μm)
Изотоническая среда					
БА	10,33±0,9	8,61±0,94	6,46±0,63	4,81±0,78	8,93±2,13
СА	5,65±0,2	5,36±0,3	3,32±0,1	2,52±0,1	-
НА	7,14±0,29	6,88±0,19	4,50±0,35	3,84±0,40	-
Гипотоническая среда					
БА	12,41±0,41*	10,94±0,32*	8,46±0,13*	5,32±0,42	6,53±4,51
СА	6,71±0,12*	7,02±0,31*	3,56±0,19	3,51±0,17*	-
НА	8,94±0,22*	8,03±0,23*	4,22±0,49	4,49±0,35	-
Гипертоническая среда					
БА	13,42±0,19*	12,74±0,71*	8,76±0,18*	6,02±0,34	-
СА	7,17±0,15*	7,84±0,22*	3,31±0,12	3,12±0,17*	-
НА	9,51±0,12*	8,78±0,38*	4,31±0,17	4,81±0,24*	-

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; НА – Не амебоциты; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

МА – при изменении осмотического давления этот тип амебоцитов сильно увеличивается в объеме, вауолизирется в гипотонических условиях. При повышении концентрации солей клетки приобретают угловатую форму.

Среди циркулирующих целомацитов *E. gordejefi* выделили пять постоянных клеточных типов, которые различались морфологически и функционально (табл. 17).

БА – большие амебоциты, клетки заполнены густой цитоплазмой, вакуолями и фагоцитированным материалом. Амебоциты образуют крупные лобоподии, активность образования которых заметно увеличивается в гипотонических и уменьшается в гипертонических условиях.

СА – не проявляли двигательной активности в нормальном и гипертоническом растворе. В условиях гипотонии образовывали короткие филоподии, при помощи которых адгезировались к подложке.

МА – активно образуют псевдоподии только в условиях гипотонии. Направленное движение у данного клеточного типа отсутствует.

Морфометрические показатели целомацитов *E. gordejffi*, инкубированных в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	линейные размеры клеток по длинной оси (μm)	линейные размеры клеток по короткой оси (μm)	линейные размеры ядра по длинной оси (μm)	линейные размеры ядра по короткой оси (μm)	линейные размеры псевдоподий (μm)
Изотоническая среда					
БА	10,8±0,9	10,5±0,5	2,95±0,32	2,62±0,23	-
СА	7,83±0,65	8,0±0,6	3,1±0,3	3,1±0,34	-
МА	6,2±0,9	5,7±0,71	2,73±0,39	2,21±0,24	-
НА	6,75±0,21	7,01±0,33	3,56±0,45	3,51±0,41	-
ХЛ	15,09±2,1	12,58±2,2	3,35±0,52	2,81±0,2	-
Гипотоническая среда					
БА	11,62±2,91	10,41±1,17	5,68±1,18*	4,03±0,39*	0,49±0,19
СА	7,78±0,43	7,33±0,22	3,79±0,19*	3,28±0,47	1,01±0,57
МА	5,43±0,32	5,73±0,47	1,87±0,21*	2,58±0,16	0,65±0,18
НА	6,26±0,45	6,23±0,33*	2,93±0,44	2,61±0,32*	-
ХЛ	17,85±2,99	14,31±0,94	4,62±0,48*	4,23±0,13*	-
Гипертоническая среда					
БА	8,95±0,81	7,18±0,76*	3,71±0,36*	3,41±0,44*	1,12±0,45
СА	6,58±0,44*	6,06±0,61*	2,86±0,41	2,65±0,33	-
МА	5,57±0,45*	4,89±0,67	2,71±0,21	2,43±0,41	-
НА	10,51±1,09*	9,47±0,73*	3,94±0,47	3,81±0,16	-
ХЛ	24,44±6,20*	11,05±2,89	3,61±0,21	3,52±0,22*	-

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

НА – неамебоциты, клетки, не выпускающие ложноножки, с прозрачной цитоплазмой и центрально расположенным ядром, не изменяли морфологию в гипертоническом и гипотоническом растворе.

ХЛ – хлорогенные клетки, плотно заполненные буро-желтыми гранулами, после помещения целомацитов этого типа в растворы с меньшей или большей концентрацией солей заметили явное изменение размера и формы клеток.

Среди циркулирующих целомацитов *E. tetraedra* выделили пять клеточных типов, которые различались морфологически и функционально (табл. 18).

Большие амебоциты (БА) отличаются высокой мобильностью, амебоциты постоянно образовывали длинные ложноножки, которые способствовали пере-

мещению в толще жидкости. В гипотонических условиях наблюдали усиление образования ложноножек и движения клеток.

СА – средние амебоциты – в гипотонической среде увеличивали скорость формирования ложноножек, цитоплазма вакуолизировалась.

МА – в гипотонической среде усиливается адгезия этого типа клеток к субстрату. От ядра к периферии клетки идут радиальные, заметные тяжи цитоскелета. На поверхности клеток заметно возвышение ядра и фибрилл цитоскелета. В гипертонических условиях принимали угловатую форму и теряли активность.

Таблица 18

Морфометрические показатели целомацитов *E. tetraedra*, инкубированных в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	линейные размеры клеток по длинной оси (µm)	линейные размеры клеток по короткой оси (µm)	линейные размеры ядра по длинной оси (µm)	линейные размеры ядра по короткой оси (µm)	линейные размеры псевдоподий (µm)
Изотоническая среда					
БА	10,57±0,46	9,38±0,74	4,35±0,28	3,56±0,46	3,90±1,30
СА	17,59±0,73	14,87±0,98	4,49±0,11	4,76±0,10	-
МА	5,85±0,26	5,16±0,40	2,84±0,22	2,51±0,30	1,27±0,35
НА	4,48±0,44	4,55±0,41	2,91±0,33	2,22±0,29	-
ХЛ	30,30±5,67	18,12±3,23	4,73±1,03	3,75±0,97	-
Гипотоническая среда					
БА	9,38±0,9	7,46±0,33*	4,08±0,32	3,21±0,31	7,14±1,22*
СА	8,36±0,80*	7,67±0,40*	3,77±0,44	3,31±0,29*	1,01±0,18
МА	5,90±0,51	5,19±0,61	2,97±0,3	2,31±0,20	-
НА	4,91±0,13	5,11±0,12	3,13±0,22	2,56±0,17	-
ХЛ	17,85±2,99*	14,31±0,94	4,62±0,48	4,23±0,13	-
Гипертоническая среда					
БА	9,33±0,49*	8,08±0,57	3,84±0,38*	2,99±0,30	3,01±0,58
СА	7,35±0,68*	7,24±0,70*	3,71±0,32*	2,62±0,29*	-
МА	5,23±0,42	4,59±0,39	2,27±0,27	2,10±0,29	-
НА	4,19±0,31	4,09±0,27	2,61±0,33	2,07±0,18	-
ХЛ	15,19±4,38*	8,38±0,24*	2,59±0,32*	2,67±0,60	-

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

НА – неамебоциты – малые целомациты с крупным однородным ядром, которое занимает большую часть клетки. Цитоплазма не содержит гранул и ва-

куолей. В гипотонической среде клетки увеличивались в размерах, округлялись.

ХЛ – хлорогенные клетки обычно представлены вытянутыми вдоль продольной оси клетками, заполненными гранулами диаметром около 2 мкм. Ядро располагается периферически. Изменение концентрации солей в среде не приводило к морфофункциональным изменениям.

Среди циркулирующих целомочитов *L. terrestris* выделили пять клеточных типов, которые различались морфологически и функционально (табл. 19).

Таблица 19

Морфометрические показатели целомочитов *L. terrestris*, инкубированных в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	линейные размеры клеток по длинной оси (μm)	линейные размеры клеток по короткой оси (μm)	линейные размеры ядра по длинной оси (μm)	линейные размеры ядра по короткой оси (μm)	линейные размеры псевдоподий (μm)
Изотоническая среда					
БА	9,38±0,64	7,81±0,89	4,20±0,25	3,34±0,22	3,51±0,94
СА	7,91±0,36	7,53±0,27	3,17±0,32	3,05±0,12	0,92±0,03
МА	5,28±0,13	5,29±0,14	2,88±0,32	2,69±0,22	0,88±0,25
НА	8,41±0,42	7,65±0,27	3,26±0,16	3,04±0,21	-
ХЛ	22,59±0,38	15,56±0,66	5,46±0,61	5,16±0,16	-
Гипотоническая среда					
БА	11,69±0,16*	10,22±0,32*	3,88±0,36	3,55±0,22	4,12±2,01
СА	7,37±0,71	7,25±0,28	3,59±0,25	3,19±0,34	-
МА	5,81±0,61	5,43±0,78	2,88±0,29	2,46±0,25	-
НА	7,72±0,76	7,26±1,03	3,65±0,18	3,26±0,31	-
ХЛ	14,04±1,98*	11,37±1,99*	5,25±0,27	5,01±0,71	-
Гипертоническая среда					
БА	10,91±0,22*	10,35±0,34*	4,54±0,33	4,16±0,51*	2,94±0,12
СА	6,24±0,32*	7,02±0,71	3,51±0,25	3,16±0,04	-
МА	5,19±0,25	5,35±0,40	2,87±0,41	2,89±0,21	-
НА	6,61±0,19*	6,57±0,14*	3,59±0,29	3,17±0,22	-
ХЛ	10,70±0,17*	8,89±0,32*	3,28±0,21*	2,92±0,32	-

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

БА – в гипотонических условиях представлены двумя морфологическими группами – подвижными амебоцитами, которые увеличиваются в размерах и вакуолизируются, и адгезированными клетками, которые образуют циркуляр-

ную ламеллоплазму, сглаживают дорзальную поверхность и плотно закрепляются на подложке. В ламеллоплазме можно легко различить тонкие фибриллы, направленные от центра к краю целомацита. Заметного увеличения активности у больших амебоцитов в условиях пониженного осмотического давления не обнаружили. В условиях избытка солей этот тип целомацитов принимал более компактную сферическую форму, цитоплазма становилась зернистой, плотной. Клетки не адгезировали к подложке и друг к другу, но сбивались в небольшие группы по 4-5 шт.

СА – в гипотонической среде клетки приобретают сферическую форму, в образовании ложноножек наблюдается полярность. Целомациты активно перемещаются в среде, не адгезируются к подложке. В гипертонии клетки этого типа также не адгезируются, принимают более компактную форму и выпускают короткие и тонкие филоподии.

МА – в гипотонических условиях клетки округляются, образуют небольшое количество инвагинаций по периметру. В гипертоническом растворе малые целомациты выпускают большое количество длинных филоподий, которые в основании имеют циркулярную ламеллоплазму.

У неамебоцитов после инкубации в гипотонических условиях цитоплазма вакуолизируется, ядро часто занимает пристеночное положение. В гипертонической среде клеточное содержимое принимает более компактную форму, а цитоплазма становится гранулярной и гетерогенной.

ХЛ – хлорогенозные клетки, объединяет различающиеся по размеру клетки, цитоплазма которых заполнена бурыми гранулами.

Среди целомацитов *L. castaneus* выделили пять клеточных типов, которые различались морфологически и функционально (табл. 20).

БА – большие амебоциты – это клетки непостоянной формы, выпускающие множество длинных филоподий, в гипотонической среде, целомациты этого типа увеличиваются в размерах, проявляют большую активность. Филоподии удлиняются, в их образовании наблюдается полярность, часто группа филоподий имеет в основании ламеллоплазму, которая затем отделяет несколько

нитевидных выростов. В цитоплазме появляются обширные вакуоли. Большие амебоциты в гипотонической среде активно перемещаются в толще гемолимфы, не адгезируют к подложке. В гипертонической среде клеточная популяция больших целомацитов делится на две группы – часть целомацитов прочно адгезируется к субстрату, а остальные клетки сохраняют способность активно перемещаться. Все клетки этого типа в условиях повышенного осмотического давления уменьшают скорость образования, размер и количество ложноножек.

Таблица 20

Морфометрические показатели целомацитов *L. castaneus*, инкубированных в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	линейные размеры клеток по длинной оси (μm)	линейные размеры клеток по короткой оси (μm)	линейные размеры ядра по длинной оси (μm)	линейные размеры ядра по короткой оси (μm)	линейные размеры псевдоподий (μm)
Изотоническая среда					
БА	8,97±0,82	7,71±0,58	3,85±0,55	2,77±0,27	5,45±0,82
СА	7,12±0,23	7,01±0,31	4,01±0,56	3,56±0,12	-
МА	6,20±0,16	6,23±0,26	2,42±0,24	2,14±0,37	-
НА	6,20±1,08	6,57±1,24	2,57±0,58	2,03±0,28	-
ХЛ	16,86±5,98	13,33±4,71	2,98±0,74	2,31±0,14	-
Гипотоническая среда					
БА	14,09±1,32*	11,11±0,78*	7,37±0,61*	6,22±0,51*	8,07±1,58*
СА	10,37±0,81*	8,26±0,26*	4,26±0,12	4,01±0,49	9,84±1,46
МА	6,62±0,28	6,47±0,43	3,88±0,58*	3,18±0,32*	0,91±0,24
НА	6,11±0,24	5,85±0,49	3,68±0,36*	3,32±0,32*	-
ХЛ	14,51±1,86	12,99±1,53	4,45±0,76*	3,56±0,17*	-
Гипертоническая среда					
БА	11,91±1,30*	10,81±1,49*	6,21±1,11*	5,21±1,01*	4,44±2,83
СА	8,11±1,27	8,09±1,01	4,82±0,76	4,84±0,93*	3,47±2,42
МА	4,92±0,48*	4,96±0,59*	2,88±0,27	2,58±0,27	1,02±0,18
НА	6,42±0,51	6,42±0,61	3,44±0,34	3,54±0,28*	-
ХЛ	15,81±3,21	13,01±2,15	2,19±0,44	2,28±0,21	-

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

В условиях пониженного осмотического давления активность средних амебоцитов подавлялась. Снижалась количество образуемых ложноножек, некоторые клетки теряли амебидную форму, что говорит об ограниченности мембранного резерва. В гипертонических условиях амебоциты образуют боль-

шое количество тонких филоподий, возможно ретрационных, располагающихся равномерно по всему периметру клетки. Целомоциты не закрепляются на поверхности субстрата. Вакуоли оттесняют ядро на периферию клетки, цитоплазма становится более гетерогенной.

МА – малые амебоциты – в условиях как повышенного, так и пониженного осмотического давления морфология и функциональная активность клеток этого типа не претерпела изменений.

НА – неамебоциты – после инкубации в нефизиологических растворах клетки приобрели сферическую форму, цитоплазма выглядела гомогенно, с присутствием светлых гранул.

В гипотонической среде хлорогеновые клетки увеличивались в размерах, приобретали овальную форму, гранулы цитоплазмы располагались рыхло.

Среди циркулирующих целомоцитов *L. rubellus* выделили пять клеточных типов, которые различались морфологически и функционально (табл. 21).

БА – большие амебоциты – в гипотонии начинают активно передвигаться, а так же поглощать инородные объекты, цитоплазма вакуолизируется.

СА – средние амебоциты – в гипотонии наблюдали резкое увеличение активности клеток этого типа.

При помещении малых амебоцитов в гипотоническую среду заметного увеличения активности не последовало.

НА – неамебоциты, круглые клетки, не выпускают ложноножек и активно не перемещаются, после инкубации в среде с измененным осмотическим давлением морфологических изменений не отметили.

ХЛ – хлорогеновые клетки отличаются тем, что цитоплазма полностью заполнена бурыми гранулами, которые маскируют остальные органоиды и ядро, в гипотоническом и гипертоническом растворе наблюдали более рыхлое расположение гранул.

Морфометрические показатели целомацитов *L. rubellus*, инкубированных в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	линейные размеры клеток по длинной оси (μm)	линейные размеры клеток по короткой оси (μm)	линейные размеры ядра по длинной оси (μm)	линейные размеры ядра по короткой оси (μm)	линейные размеры псевдоподий (μm)
Изотоническая среда					
БА	8,18±0,26	8,11±0,36	3,86±0,34	3,59±0,19	2,74±1,12
СА	6,91±0,58	6,04±0,38	3,05±0,57	2,78±0,16	
МА	5,32±0,10	5,07±0,21	2,79±0,16	2,42±0,18	
НА	5,62±0,23	5,36±0,43	2,74±0,32	2,81±0,18	
ХЛ	10,41±0,31	9,91±0,61	3,05±0,02	2,96±0,21	
Гипотоническая среда					
БА	10,27±0,46*	9,11±0,38*	3,68±0,33	2,88±0,29*	8,49±5,21*
СА	7,47±0,42	6,96±0,37	6,96±0,37*	2,91±0,23	5,61±3,25
МА	5,84±0,42	6,69±0,37*	6,76±0,13*	2,91±0,23	5,61±3,25
НА	5,95±0,32	5,48±0,42	2,71±0,26	2,97±0,22	
ХЛ	17,33±0,91*	16,83±0,41*	2,93±0,33	3,08±0,17	
Гипертоническая среда					
БА	9,32±0,65*	8,21±0,56	3,95±0,28	3,63±0,49	1,67±0,54
СА	7,44±1,07	6,84±0,46	3,90±0,51	3,26±0,22*	
МА	6,04±0,47	5,41±0,37	2,94±0,31	2,53±0,15	
НА	7,02±0,52*	6,11±0,65	2,82±0,26	2,77±0,19	
ХЛ	12,13±0,11*	10,52±0,19	3,14±0,14	3,17±0,49	

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

В целомической жидкости *O. complanatum* выявили 4 клеточных типа (табл. 22).

БА – большие амебоциты – в изотонических условиях БА не проявляли существенной активности, клетки поворачивались вокруг своей оси, но направленное движение и фагоцитоз отсутствовали. В гипотоническом растворе активность клеток этого типа увеличивается. Поверхность больших амебоцитов приобретает большое количество выпячиваний, которые морфологически являются раффлами и складками, пластинчатыми выростами имеющими вид ободка. Эти поверхностные образования располагаются не только в краевом положении, но и дорзально. Раффлы и складки отличаются высотой – 6-8 мкм и до 1 мкм соответственно. Эти элементы наблюдаются на ранних этапах распластывания клеток (Ровенский Ю.А., 1979). Поэтому можно

предположить, что уменьшение осмотического давления активирует распластывание амебоцитов.

Таблица 22

Морфометрические показатели целомоцитов *O. complanatum*, инкубированных в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	линейные размеры клеток по длинной оси (μm)	линейные размеры клеток по короткой оси (μm)	линейные размеры ядра по длинной оси (μm)	линейные размеры ядра по короткой оси (μm)
Изотоническая среда				
БА	10,16±0,72	8,98±0,29	4,11±0,38	4,05±0,37
СА	7,31±0,24	6,37±0,47	3,38±0,31	2,65±0,21
МА	5,48±0,62	4,89±0,41	3,56±0,27	3,20±0,25
НА	5,61±0,13	5,22±0,16	2,37±0,13	2,45±0,15
ХЛ	14,48±3,04	10,82±2,57	3,92±0,82	3,06±0,31
Гипотоническая среда				
БА	11,58±1,11	9,07±0,87	4,39±0,48	3,39±0,36
СА	7,61±0,51	7,28±0,74	3,53±0,48	2,92±0,35
МА	5,66±0,54	5,45±0,55	2,75±0,27	3,13±0,45
НА	5,95±0,32	5,48±0,42	2,71±0,26	2,97±0,22
ХЛ	17,33±0,91	16,83±0,41*	2,93±0,33	3,08±0,17
Гипертоническая среда				
БА	16,38±2,98*	15,21±2,40*	4,37±0,48	3,88±0,54
СА	10,54±2,93	9,34±2,76	3,44±0,45	2,62±0,38
МА	5,35±0,66	4,97±0,66	3,18±0,46	2,51±0,19*
НА	5,17±0,13	5,14±0,32	2,45±0,21	2,38±0,34
ХЛ	11,35±1,63	8,04±1,69	4,04±0,45	2,86±0,25

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлороггенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

В условиях повышенного осмотического давления скорость распластывания клеток заметно увеличивается, они адгезируют к субстрату. Большие амебоциты по этому параметру были разделены на две группы: амебоциты, которые полностью растекаются по поверхности, так что возвышается только центральная часть заполненная гранулами, и клетки, которые сохраняют активность перемещения, выпускают длинные филоподии, поверхность таких амебоцитов покрыта складками и раффлами. Вторая группа целомоцитов – это возможно клетки на начальном этапе адгезии, так как встречаются промежуточные формы с ламеллоплазмой, большим или меньшим

количеством филоподий. Наблюдали тенденцию – чем больше амебоцит содержал различных включений, тем медленнее происходила адгезия клетки.

Применение атомно силовой микроскопии позволило оценить изменение микрорельефа в условиях измененного осмотического давления. В гипотонических условиях поверхность больших амебоцитов покрывали складки, через мембраны отдельных клеток выпячивались округлые гранулы, диаметром около 0,5 мкм. Тяжей цитоскелета и отчетливых псевдоподий не наблюдали, клетки были окружены слоем ламеллоплазмы.

В гипертоническом растворе микрорельеф клеток выглядел гетерогенно. Сквозь мембрану наблюдали выпячивания структур цитоскелета.

СА – при снижении осмотического давления средние амебоциты заметно увеличиваются в размерах. На одном из полюсов клетки наблюдали активное образование филоподий, а в некоторых случаях образование ламеллоплазмы. В гипертонических условиях распластывались, полностью адгезируясь к поверхности. В цитоплазме отмечали наличие крупных вакуолей и гранул. По краю распластанной клетки выступали короткие филоподии.

МА – малые амебоциты – в условиях гипотонии поверхность покрывали невысокие складки, которые в краевом положении образовывали ламеллоплазму. Целомоциты адгезировались к субстрату. Цитоплазма приобретала более гомогенный вид, в ней наблюдали тяжи цитоскелета. В гипертонии этот тип целомоцитов сохранял шаровидную форму, увеличиваясь в объеме. Микрорельеф амебоцитов разглаживался, клетки выпячивали несколько филоподий по краю.

ХЛ – линейные размеры хлорогеноцитов увеличивались при понижении осмотического давления, гранулы занимали дискретное положение. У этого типа целомоцитов наблюдали спонтанное разрушение при изменении осмотического давления. Гранулы из разрушенных клеток наблюдали в цитоплазме. В гипертонической среде хлорогеноциты уменьшались в объеме, приобретали угловатую форму, гранулы более плотно располагались в цитоплазме.

Среди целоцитов *A. caliginosa* выделили пять типов клеток, которые различались как морфологически так и функционально (табл. 23).

В условиях понижения осмотического давления двигательная активность больших амебоцитов снижалась и практически прекращалась. Целоциты образовывали тонкие филоподии по всему периметру клетки или только на одном из её полюсов, которыми прочно адгезировались к субстрату. Дорзальная поверхность клеток приобретала складки, образованные мембраной. Линейные размеры клеток уменьшались, с увеличением объема, что говорит об увеличении высоты клеток в гипотонических условиях. При повышении осмотического давления наблюдали сходные морфологические изменения. Объем клеток в гипертоническом растворе уменьшался.

Таблица 23

Морфометрические показатели целоцитов *A. caliginosa*, инкубированных в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	линейные размеры клеток по длинной оси (μm)	линейные размеры клеток по короткой оси (μm)	линейные размеры ядра по длинной оси (μm)	линейные размеры ядра по короткой оси (μm)	линейные размеры псевдоподий (μm)
Изотоническая среда					
БА	10,65±0,79	10,07±0,61	6,54±0,88	5,68±0,55	1,88±0,40
СА	9,18±0,42	8,11±0,18	3,96±0,33	3,71±0,24	1,65±0,31
МА	7,14±0,47	6,66±0,39	3,02±0,24	3,09±0,21	1,02±0,11
НА	6,17±0,56	5,39±0,17	2,49±0,35	2,18±0,17	-
ХЛ	6,15±1,32	6,07±1,21	3,17±0,35	2,78±0,19	-
Гипотоническая среда					
БА	9,85±1,03	8,94±0,77	3,69±0,67*	3,31±0,21*	1,86±0,36
СА	8,12±1,01	7,47±0,73	2,94±0,34*	3,63±0,85	0,78±0,28*
МА	5,96±0,55*	5,66±0,66	2,47±0,28	2,61±0,22*	0,97±0,14
НА	6,38±0,75	5,68±0,25	2,66±0,15	2,42±0,15	-
ХЛ	22,01±2,02	9,91±2,11	3,62±0,09	3,32±0,26	-
Гипертоническая среда					
БА	10,53±1,07	9,03±0,86	3,85±1,01*	3,98±0,25*	1,07±0,25
СА	8,07±0,53*	7,79±0,22	3,44±0,22	3,11±0,25*	0,96±0,07*
МА	6,75±0,72	6,85±0,41	3,06±0,31	2,83±0,23	1,09±0,39
НА	6,22±0,29	5,45±0,14	2,32±0,11	2,32±0,13	-
ХЛ	5,51±0,61	4,87±0,35	2,27±0,22*	2,38±0,36	-

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

У средних амебоцитов в гипертонических условиях наблюдали полную потерю способности образования ложноножек, целомоциты приобретали угловатую форму, не формировали клеточных агрегатов и не адгезировали к субстрату.

МА – в гипертоническом и гипотоническом растворе клетки приобретали форму близкую к округлой. Целомоциты теряли способность к образованию ложноножек и адгезии.

НА – неамебоциты – при изменении осмотического давления, целомоциты этого типа не претерпевали морфологических изменений.

ХЛ – понижение осмотического давления вызывало увеличение объема хлорогеновых клеток. Форма хлорогеноцитов в гипотоническом растворе была ближе к веретенообразной, а гранулы принимали диффузное расположение.

3.2.2.2. Результаты исследования топографии целомоцитов методами полуконтактной атомно-силовой микроскопии

Микрорельеф целомоцитов *E. rosea* в изотонических условиях имеет однородный характер, обусловленный выпячиванием фибрилл цитоскелета (рис. 18).

Можно отметить значительное развитие субмембранного комплекса, поддерживающего необходимую форму клетки и её функционирование (рис. 19). БА – целомоциты этого типа имели крупные инвагинации мембраны в периферической области, что объясняется присутствием в цитоплазме клеток этого типа гранул и вакуолей.

В целом, микрорельеф больших амебоцитов отличался наибольшим разнообразием, что отразилось в показателях шероховатости у этого клеточного типа (табл. 24).

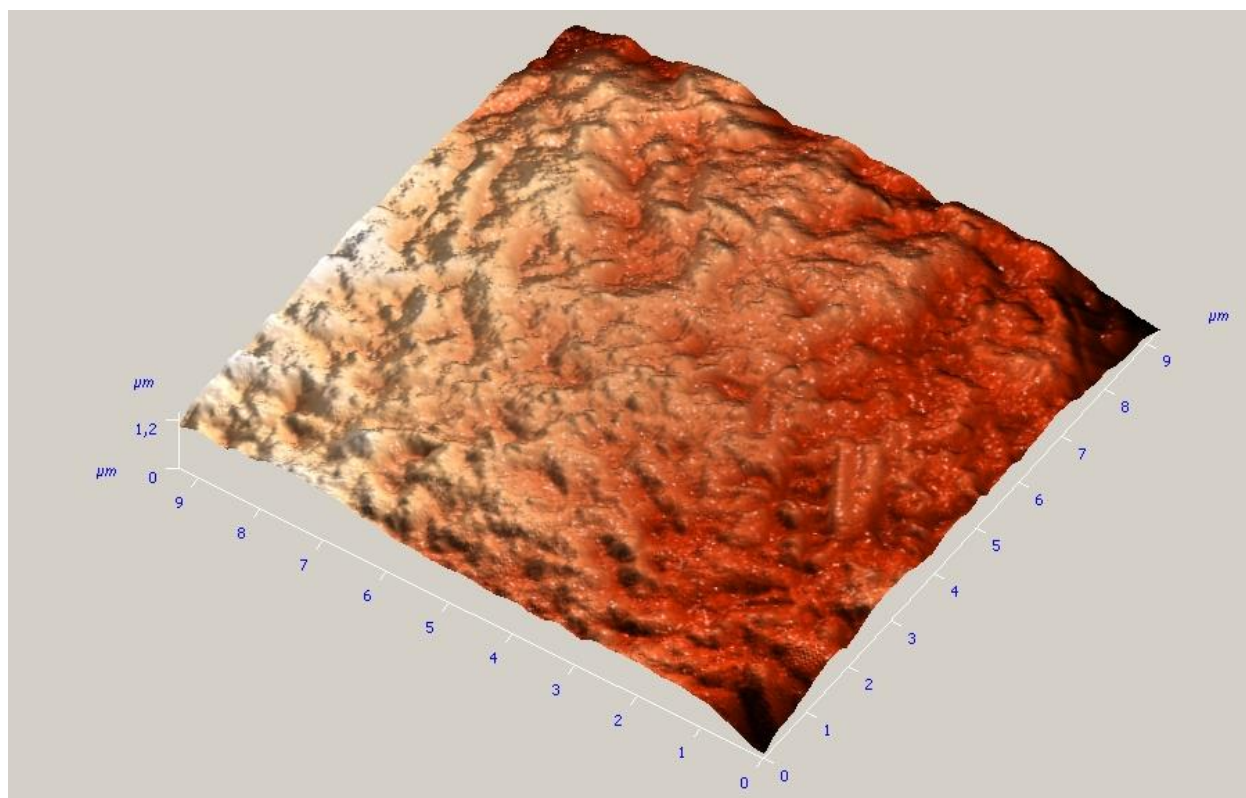


Рис. 18. Трехмерное изображение топографии поверхности целлюлозы *E. rosea* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) в изоосмотических условиях

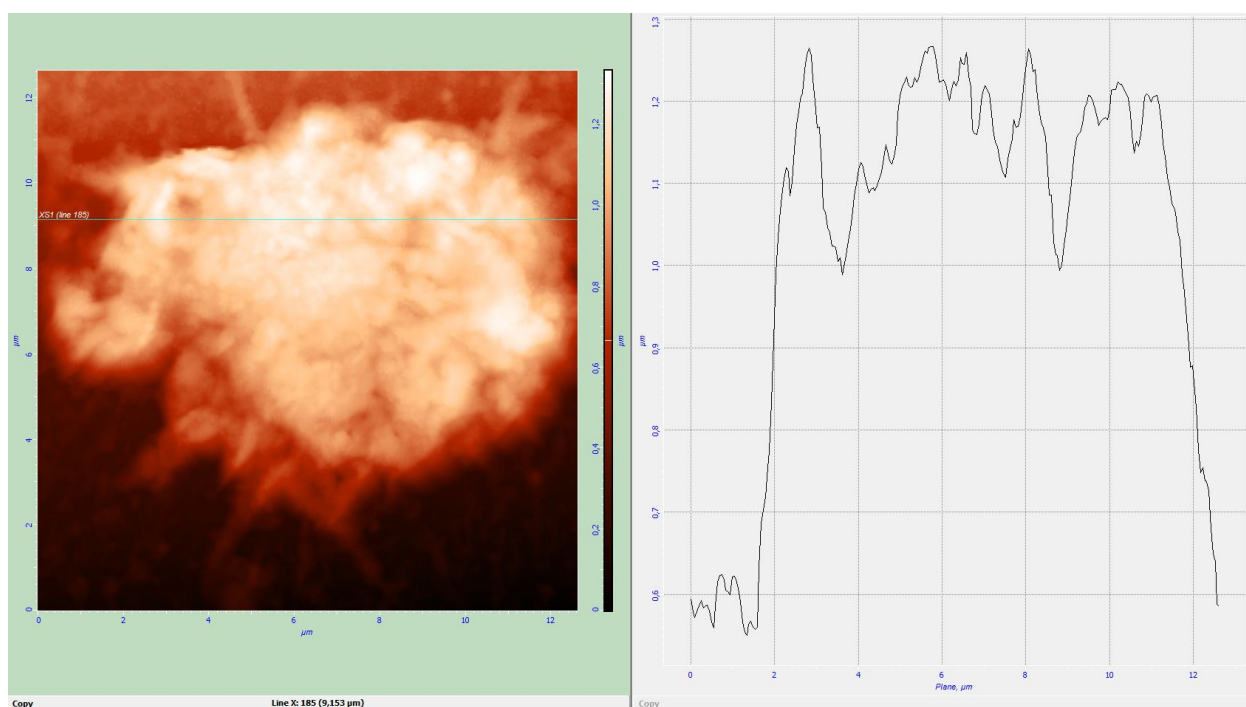


Рис. 19. Двухмерное изображение топографии поверхности целлюлозы *E. rosea* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в изоосмотических условиях

СА – средние амебоциты имеют однородный микрорельеф, образованный выпячиванием фибрилл субмембранной части цитоскелета. Поверхность клетки равномерно покрывают отдельные борозды, длина которых колеблется от 0,51 до 1,22 мкм. Среди структур микрорельефа этого типа клеток отметили широкий диапазон изменения линейных размеров возвышений и углублений поверхности.

МА – рельеф поверхности малого амебоцита отличался полярностью. Часть клетки, где происходит формирование филоподий, имеет многочисленные дискретные выпячивания и обширные понижения рельефа. Остальная поверхность содержит инвагинации в виде борозд длиной до 3 мкм, направленных от периферии к центру. Согласно показателям шероховатости, малый амебоцит содержит наименьшее количество микроструктур среди всех амебоцитов, но наибольшую площадь их распределения и кривизну.

НА – поверхность неамебоцитов имела однородный характер, представленный отдельными пикообразными возвышениями. У клеток этого типа отметили высокие показатели шероховатости поверхности, но кривизны отдельных пиков зафиксирована наименьшая среди всей популяции целомоцитов.

ХЛ – хлорогеновые клетки имели наиболее гладкую мембрану среди всех типов целомоцитов *E. rosea*. На сканограммах наблюдали клетки сферической формы, мембрана которых находилась в натяжении. Сквозь неё слабо выпячивались хлорогеновые гранулы, поверхность мембраны была практически ровной.

В гипотонических условиях отмечали уменьшение всех показателей рельефа у всех типов целомоцитов. На поверхности клеток отсутствовали крупные возвышения и понижения. Не отмечали выпячивания структур цитоскелета, гребни и борозды отсутствовали (рис. 20-21).

В условиях повышенного осмотического давления отмечали сглаживание выпячиваний структур мембраны амебоцитов. Наблюдалось снижение всех показателей шероховатости поверхности у амебоцитов.

Показатели неоднородности микрорельефа поверхности целомоцитов *E. rosea* в условиях осмотической нагрузки

Показатели	БА	СА	МА	НА	ХЛ
Изотоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	93,61±2,34	68,76±2,15	32,44±8,32	78,54±12,41	0,09±0,02
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	75,38±1,65	55,42±7,38	25,68±3,05	61,47±11,47	0,07±0,01
Sp, высота самого высокого пика, nm	520,82±20,81	622,66±64,13	313,97±38,58	413,01±17,46	1,04±0,12
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	21,42±3,41	255,01±35,17	110,38±7,52	36,57±3,21	0,51±0,03
Sds, плотность пиков, 1/um·um	9,40±0,31	14,42±3,81	19,22±4,94	19,02±0,45	13,20±0,93
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	15,75±0,75	11,94±2,31	14,34±3,91	1,31±0,16	9,73±0,41
Гипотоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,11±0,02*	0,13±0,001*	0,19±0,02*	0,15±0,02*	0,16±0,03
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,08±0,02*	0,10±0,01*	0,15±0,01*	0,12±0,01*	0,13±0,02
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,66±0,12*	1,87±0,06*	1,69±0,002*	1,70±0,12*	1,81±0,17*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	1,08±0,16*	1,23±0,11*	0,56±0,05*	0,92±0,14*	0,62±0,08
Sds, плотность пиков, 1/um·um	3,22±0,14*	3,24±0,27*	2,93±0,24*	0,98±0,21*	1,27±0,11*
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	7,56±0,22*	7,32±0,24*	9,22±2,54	2,64±0,15*	4,43±0,21*
Гипертоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,12±0,01*	0,107±0,03*	0,14±0,05*	103,56±16,6*	67,28±4,27*
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,10±0,01*	0,0846±7,57*	0,12±0,04*	78,06±2,91*	54,19±6,41*
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,49±0,05*	1,89±0,07*	2,11±0,34*	783,74±22,8*	888,3±28,9*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,85±0,11*	1,18±0,05*	1,36±0,3*	13,57±2,76*	486,1±19,2*
Sds, плотность пиков, 1/um·um	3,56±0,39*	3,429±0,04*	2,41±0,43*	3,77±0,61*	1,51±0,04*
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	3,95±0,41*	8,727±2,57	5,22±1,31*	3,72±0,09*	3,724±0,39*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогеновые клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

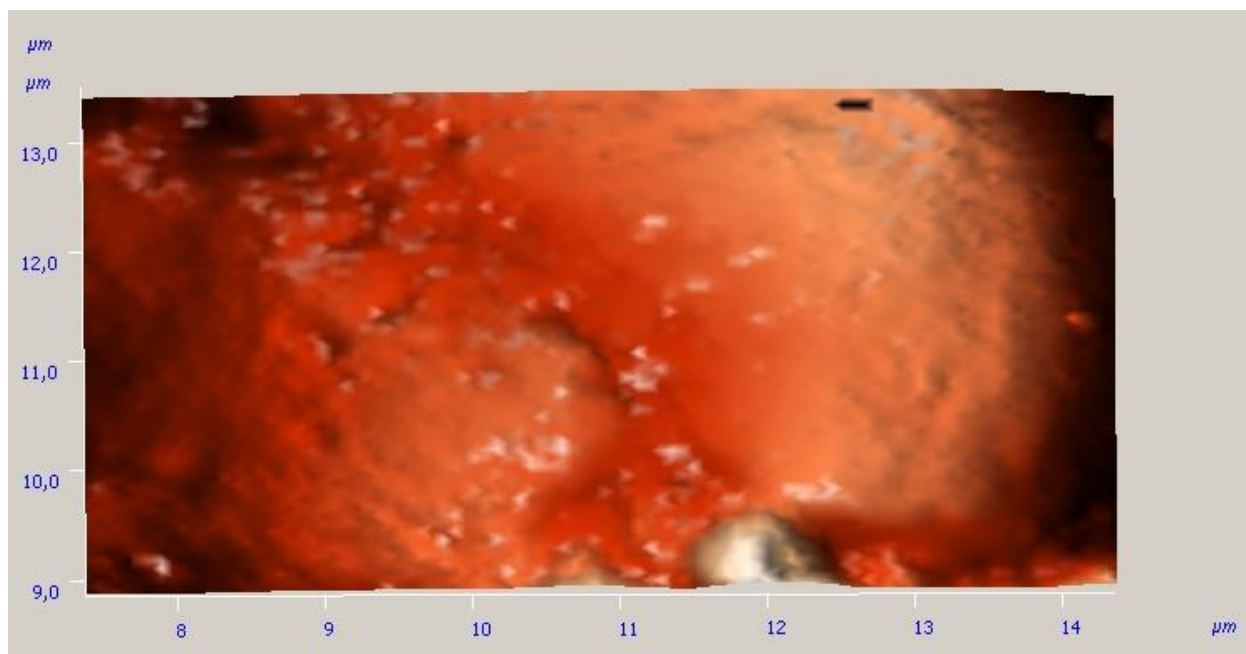


Рис. 20. Трехмерное изображение топографии поверхности целомоцита *E. rosea* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирма НТ-МДТ, Россия) в условиях гипосмотической нагрузки

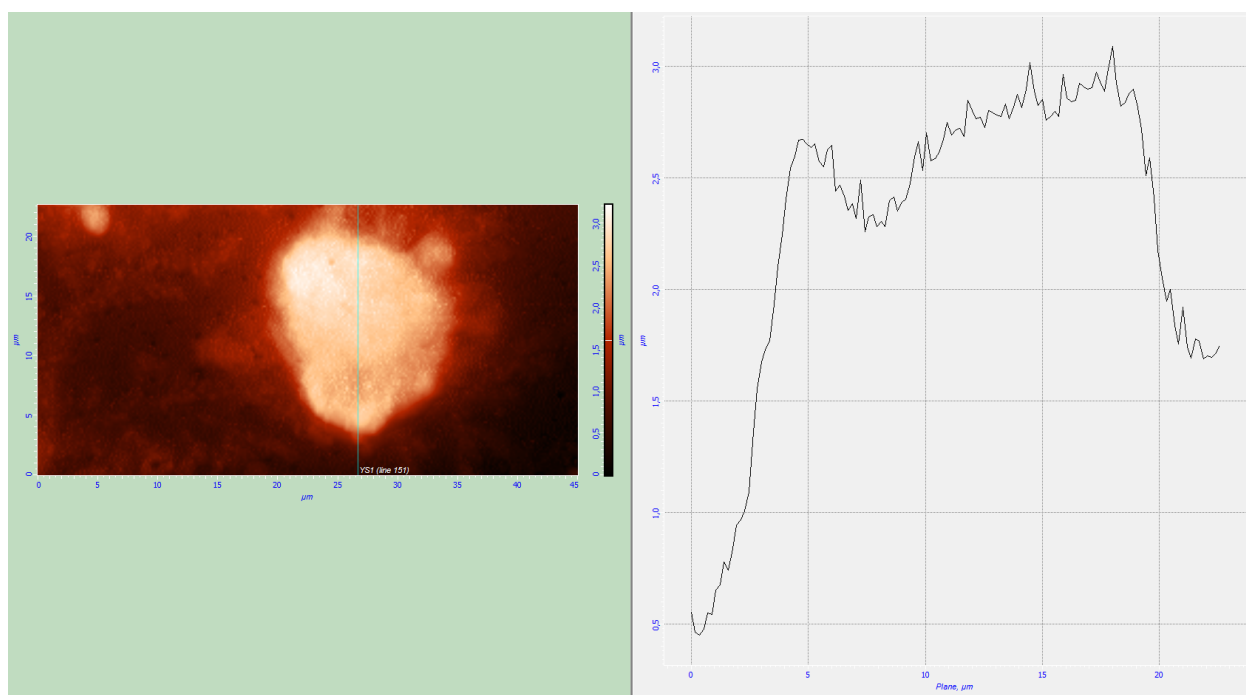


Рис. 21. Двухмерное изображение топографии поверхности целомоцита *E. rosea* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гипосмотической нагрузки

Целомоциты, не способные к активному передвижению, увеличивали складчатость микрорельефа (рис. 22-23). Поверхность целомоцитов типа НА и ХЛ демонстрировала увеличение шероховатости поверхности даже по

сравнению с изотоническими условиями. На поверхности НА и ХЛ при увеличении солености образовывались высокие пики.

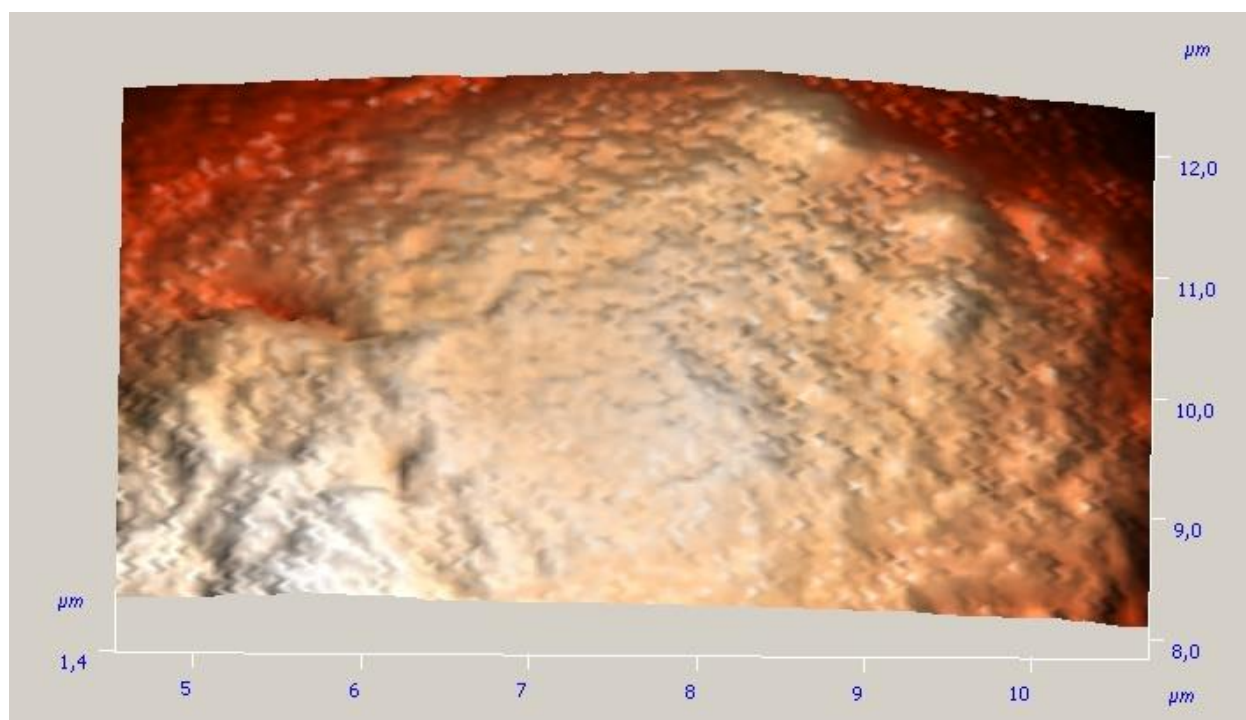


Рис. 22. Трехмерное изображение топографии поверхности целлюлозы *E. rosea* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) в условиях гиперосмотической нагрузки

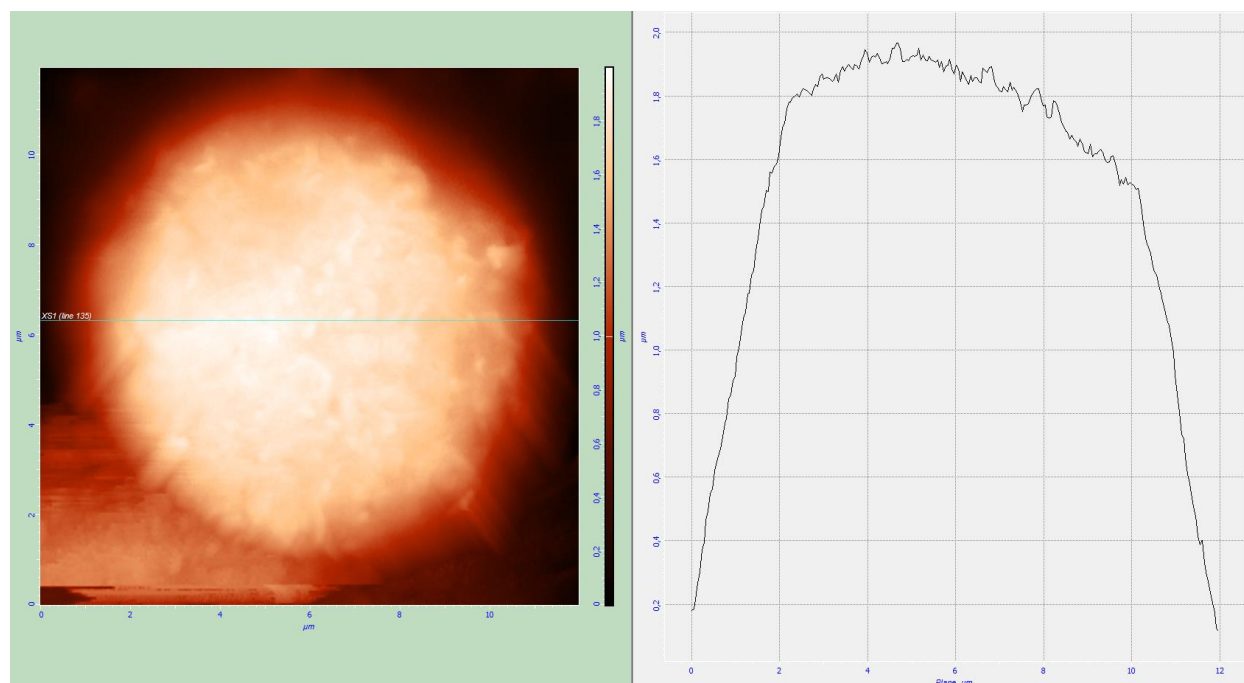


Рис. 23. Двухмерное изображение топографии поверхности целлюлозы *E. rosea* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гиперосмотической нагрузки

Поверхность целоцитов *E. fetida* в изотонических условиях отличалась общим понижением общей высоты рельефа в области ядра (рис. 24-25).

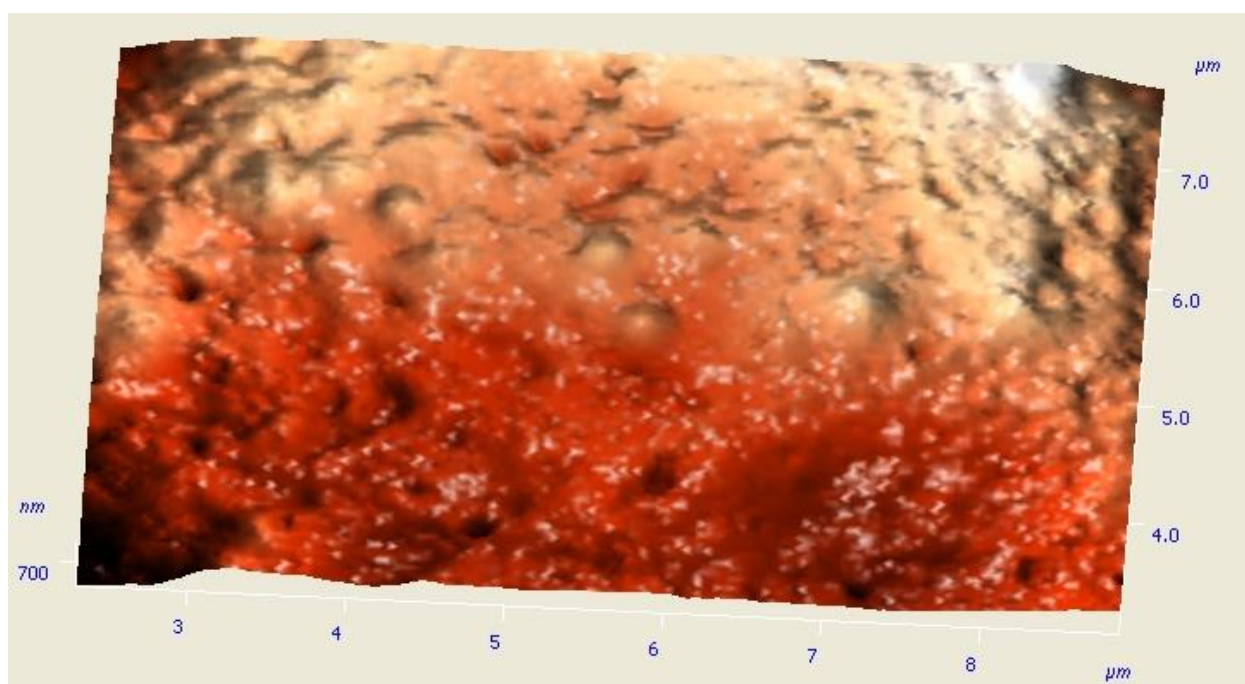


Рис. 24. Трехмерное изображение топографии поверхности целоцита *E. fetida* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) в изоосмотических условиях

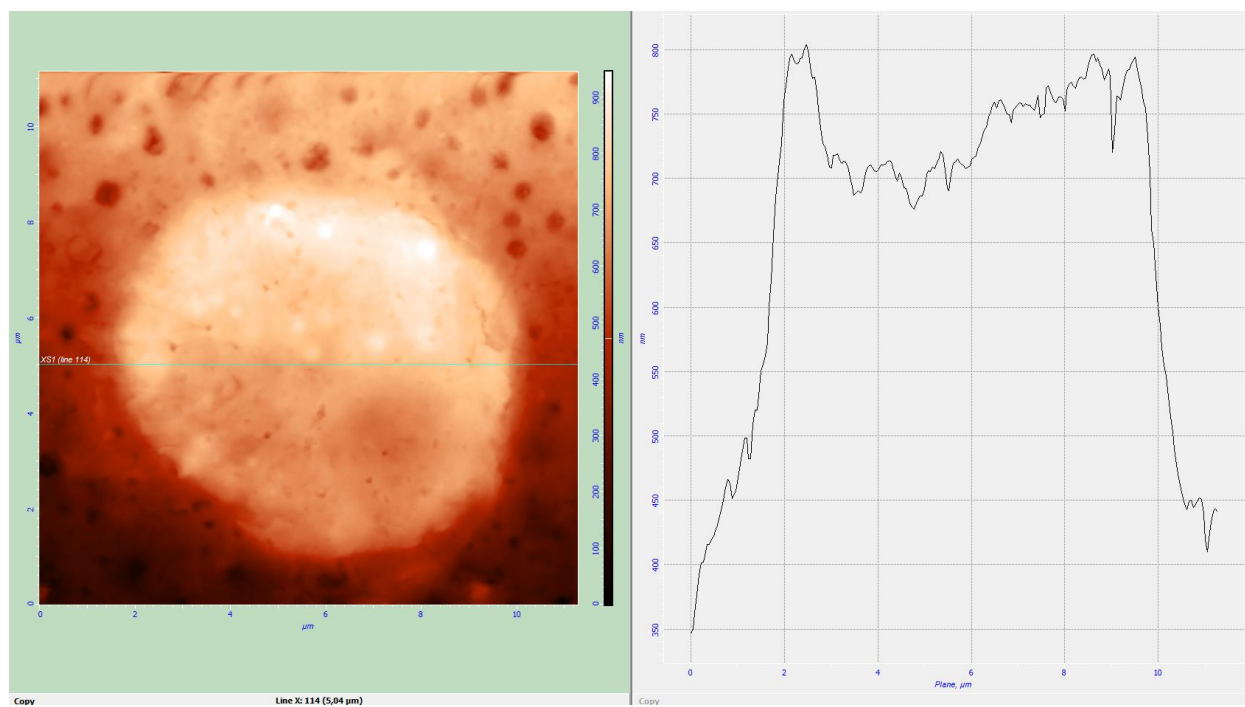


Рис. 25. Двухмерное изображение топографии поверхности целоцита *E. fetida* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в изоосмотических условиях

БА – поверхность большого амебоцита равномерно покрывали возвышения различного характера. Основную массу шероховатости рельефа составляли одиночные пикообразные возвышения, реже встречались борозды и складки. Отметим небольшую амплитуду варьирования высот возвышений и углублений на поверхности клетки.

СА – в микрорельефе среднего амебоцита отмечено преобладание отдельных борозд, отдельные из которых расходились от ядра к периферической части клетки. Для данного типа целоμοцита характерно наличие правильных куполообразных возвышений и отверстий правильной формы, что говорит о способности целомоцитов этого типа в случае воздействия неблагоприятных факторов изливать содержимое гранул, возможно, тем самым задействовать внутренний мембранный бассейн.

МА – малые амебоциты отличаются значительным понижением рельефа в области ядра. Микрорельеф периферической части клетки определяется наличием гранул, которые выпячиваются через мембрану.

НА – микрорельеф неамебоцитов состоит большей частью из одиночных пикообразных возвышений. Этот тип целомоцитов радикально не отличается от остальных по показателям шероховатости мембраны.

ХЛ – микрорельеф хлорогенных клеток отличается большим количеством выпячиваний мембраны, которые обусловлены дегрануляцией хлорогенных гранул. Микрорельеф значительно понижается в области ядра.

В гипотонических условиях наблюдали сглаживание рельефа поверхности у целомоцитов типа БА, СА и НА (рис. 26-27).

Показатели шероховатости поверхности малого амебоцита слабо менялись. У хлорогенных клеток отмечали небольшое увеличение шероховатости, появление высоких выпячиваний и глубоких понижений микрорельефа мембраны. Для микрорельефа хлороцита отметили значительное увеличение максимальной неровности профиля (St) (табл. 25).

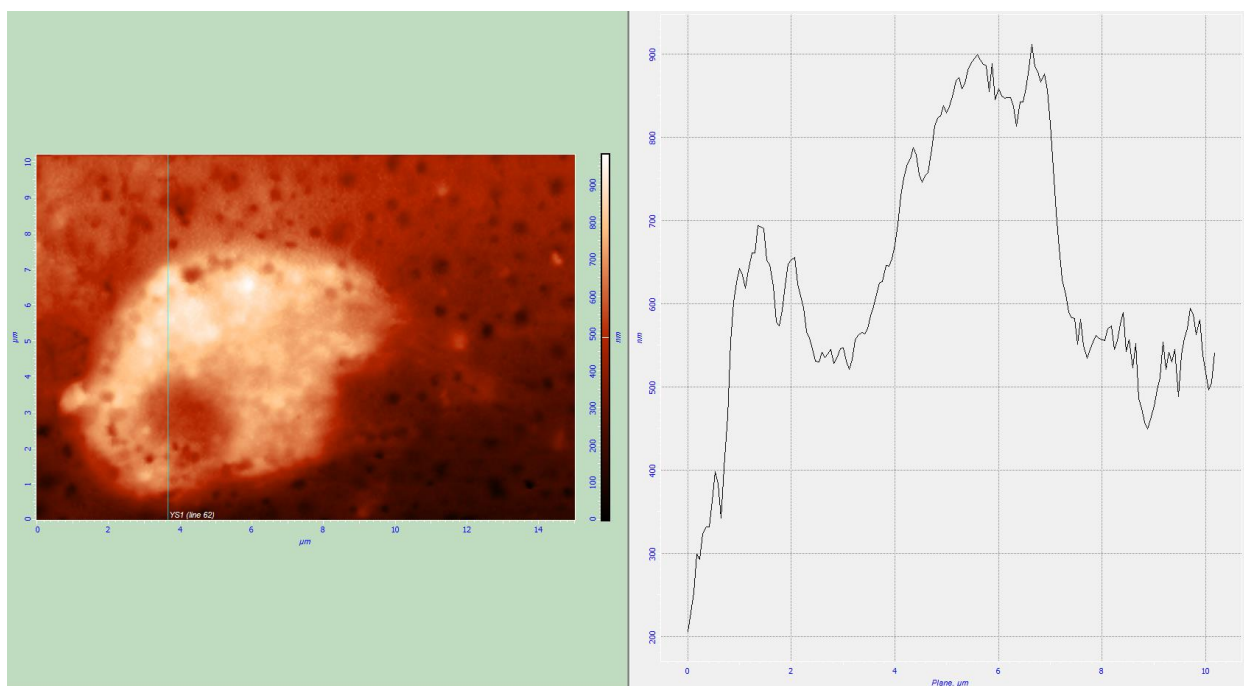


Рис. 26. Двухмерное изображение топографии поверхности целооцита *E. fetida* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гиперосмотической нагрузки

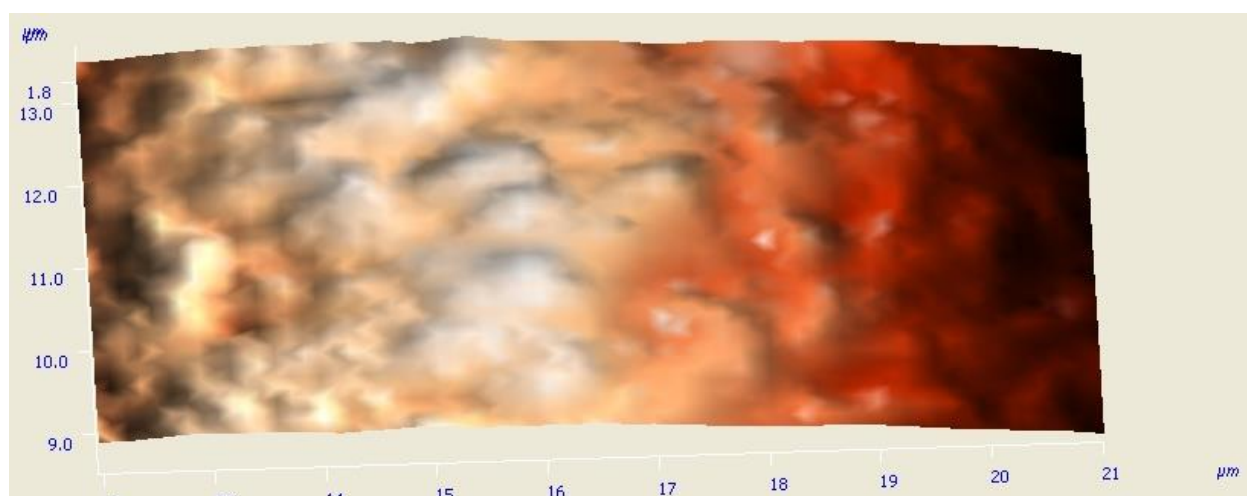


Рис. 27. Трехмерное изображение топографии поверхности целооцита *E. fetida* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) в условиях гиперосмотической нагрузки

В гипертонических условиях наблюдали сглаживание структур микро рельефа у всех клеточных типов, кроме средних амебоцитов. Этот тип целооцитов отличается значительными перепадами профиля поверхности, с преобладанием высоких пиков.

Остальные целооциты имеют поверхность, на которой преобладают крупные выпячивания, мелкие пики и понижения рельефа отсутствуют (рис. 28).

Показатели неоднородности микрорельефа поверхности целомоцитов *E. fetida* в условиях осмотической нагрузки

Показатели	БА	СА	МА	НА	ХЛ
Изотоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	63,18±2,29	64,21±6,11	56,41±2,07	15,06±0,16	53,15±13,31
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	49,93±3,66	54,48±7,23	47,33±8,27	44,09±4,01	60,84±4,51
Sp, высота самого высокого пика, nm	47,95±7,25	31,72±7,53	31,84±1,68	31,32±5,71	42,71±2,31
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	16,81±3,21	49,09±8,42	38,61±4,82	30,12±2,11	23,14±1,21
Sds, плотность пиков, 1/um·um	13,97±0,41	15,29±2,45	15,75±2,41	16,23±2,11	15,46±0,93
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	7,01±1,19	12,83±1,10	9,89±0,96	9,66±1,08	9,64±2,55
Гипотоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,06±0,01*	0,09±0,03*	61,14±6,37	0,13±0,07*	76,65±5,97
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,05±0,01*	0,07±0,03*	51,66±7,98	0,11±0,04*	63,11±2,41
Sp, высота самого высокого пика, nm	0,87±0,11*	0,84±0,11*	40,26±6,44	1,15±0,03*	524,25±15,32
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,53±0,09*	0,33±0,11*	68,52±8,20*	0,48±0,04*	93,56±8,54
Sds, плотность пиков, 1/um·um	0,12±0,02*	0,48±0,07*	0,86±0,03*	0,11±0,03*	0,72±0,06
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	0,13±0,03*	0,67±0,18*	0,77±0,05*	0,36±0,02*	1,28±0,09
Гипертоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	24,91±2,95*	166,79±16,13*	0,26±0,04*	0,24±0,05*	0,13±0,02*
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	19,89±4,31*	135,68±5,79*	0,22±0,02*	0,22±0,04*	0,11±0,01*
Sp, высота самого высокого пика, nm	21,48±5,74*	854,97±26,19*	1,84±0,05*	1,04±0,05*	1,27±0,11*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	175,4±30,5*	147,38±18,15*	0,87±0,15*	0,19±0,03*	0,48±0,14*
Sds, плотность пиков, 1/um·um	2,66±0,94*	2,30±0,06*	0,78±0,06*	1,14±0,07*	1,81±0,12*
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	3,26±0,37*	3,64±0,07*	1,61±0,11*	3,14±0,12*	3,44±0,13*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

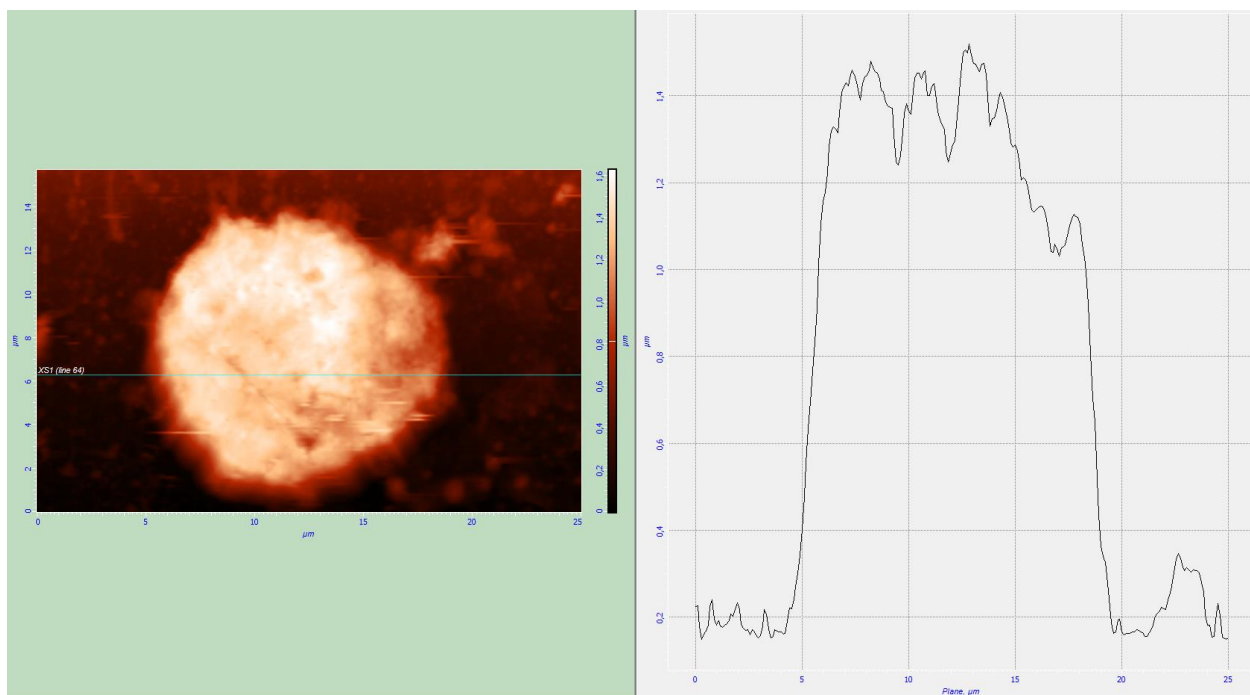


Рис. 28. Двухмерное изображение топографии поверхности целомоцита *E. fetida* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гипосмотической нагрузки

Микрорельеф поверхности целомоцитов *E. nordenskioldi* отличается преобладанием крупных выпячиваний и углублений правильной формы, которые являются гранулами или отверстиями после их высвобождения (рис. 29).

БА – большие амебоциты отличаются сглаженным профилем поверхности, с преобладанием обширных понижений микрорельефа. Между впадинами и возвышениями цитоскелета заметны выступающие через мембрану борозды и тяжи филаментов, которые формируют и отграничивают мембранные пузырьки. Шероховатость поверхности практически отсутствует (табл. 26).

СА – поверхность средних амебоцитов представлена выпячиванием большого количества фибрилл цитоскелета, которые гомогенно располагаются в виде складок и борозд различной длины. Высота этих структур составляет от 50 до 90 нм.

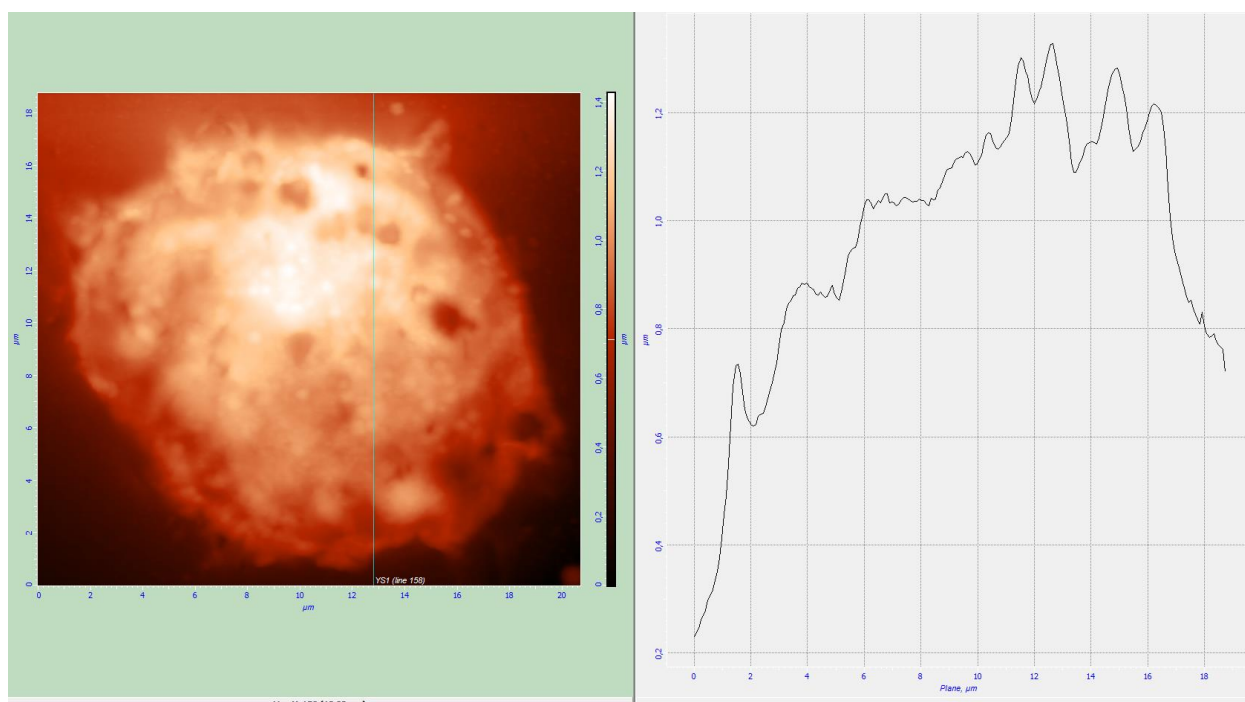


Рис. 29. Двухмерное изображение топографии поверхности целомоцита *E. nordenskioldi* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в изоосмотических условиях

МА – малые амебоциты имеют приподнятую область ядра и небольшое понижение в периферической части клетки.

НА – неамебоидные клетки в условиях изотонии на поверхности имели гетерогенные возвышения фибрилл микрорельефа, которые образовывали борозды и извилины.

ХЛ – микрорельеф поверхности хлорогенных клеток определяли выпячивания хлорогенных гранул размером около 2 мкм. Мембрана хлорогеноцитов практически не формировала микровозвышений и микровпадин.

В условиях измененного осмотического давления наблюдали резкое сглаживание микрорельефа поверхности у целомоцитов типа МА и НА. Большие амебоциты демонстрировали обратную тенденцию. Хлорогенные клетки снижали количество микровозвышений и микровпадин поверхности в условиях гипотонии, а увеличивали – при повышении солености. У средних амебоцитов (СА) не зафиксировали достоверных различий изменения показателей шероховатости (рис. 30-31).

Показатели неоднородности микрорельефа поверхности целомацитов
E. nordenskioldi в условиях осмотической нагрузки

Показатели	БА	СА	НА
Изотоническая среда			
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,09±0,001	0,14±0,04	43,77±3,11
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,07±0,002	0,12±0,01	32,37±7,31
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,25±0,06	0,89±0,9	492,98±19,32
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,78±0,17	0,16±0,03	44,30±4,11
Sds, плотность пиков, 1/um·um	3,97±0,55	2,31±0,29	14,16±1,21
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	4,53±1,46	2,35±0,71	4,99±0,65
Гипотоническая среда			
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,15±0,02*	0,18±0,02	0,18±0,04*
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,12±0,02	0,14±0,02	0,14±0,06*
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,47±0,31*	1,82±0,16	1,74±0,12*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,54±0,02	0,59±0,15*	0,63±0,10*
Sds, плотность пиков, 1/um·um	3,01±0,39	2,95±0,15*	3,16±0,07*
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	9,89±1,18*	10,95±1,51*	14,63±0,65*
Гипертоническая среда			
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,21±0,02*	0,24±0,08	0,085±0,002*
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,15±0,07*	0,18±0,03	0,06±0,01*
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,31±0,16	2,11±0,05	1,05±0,12*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,35±0,02*	0,54±0,07*	0,47±0,02*
Sds, плотность пиков, 1/um·um	3,29±0,17	2,56±0,17	3,29±0,14*
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	10,75±2,3*1	8,26±1,75*	7,95±1,31*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

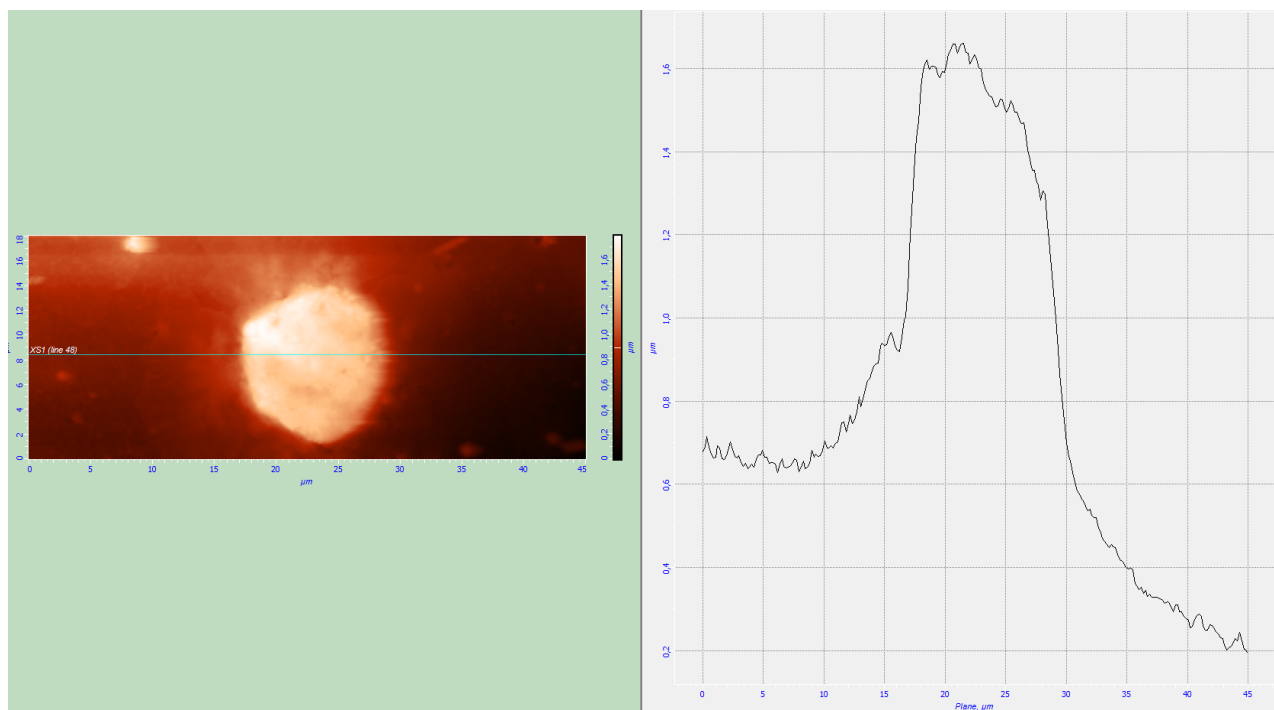


Рис. 30. Двухмерное изображение топографии поверхности целоμοцита *E. nordenskioldi* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гипоосмотической нагрузки

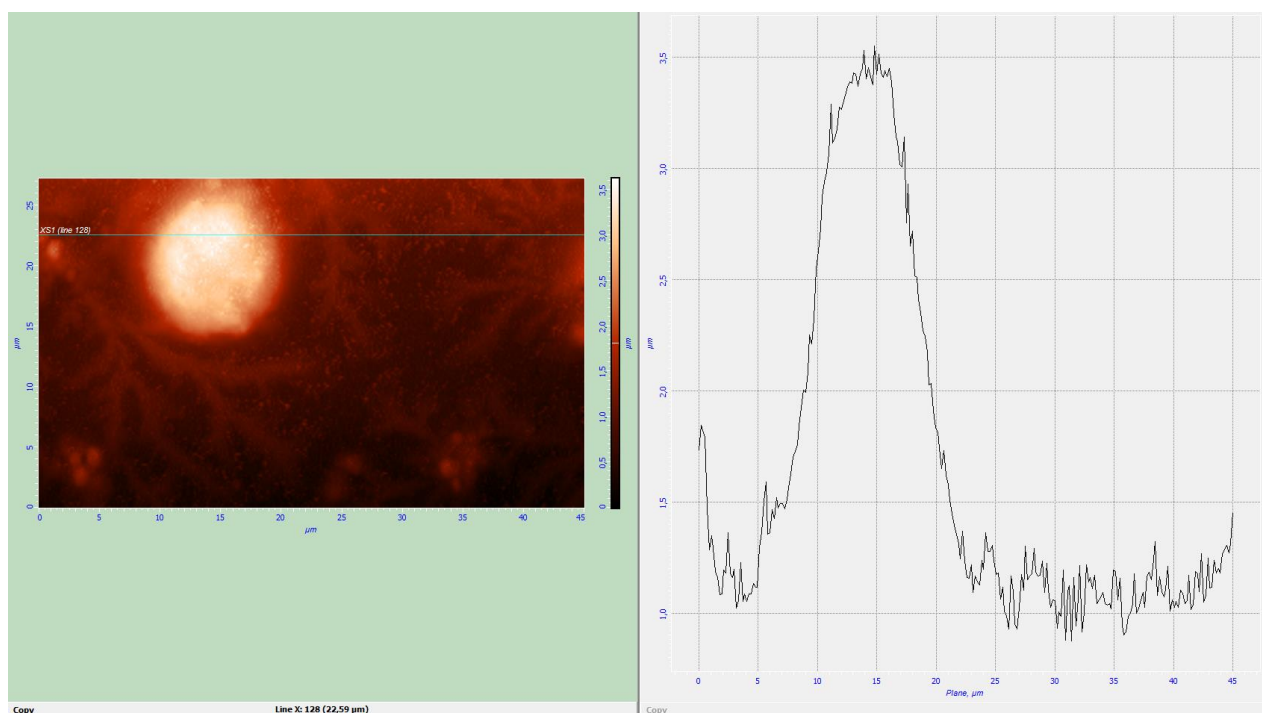


Рис. 31. Двухмерное изображение топографии поверхности целоμοцита *E. nordenskioldi* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гиперосмотической нагрузки

Микрорельеф целоцитов *Eisenia gordejefi* в норме отличался преобладанием дискретных пикообразных выпячиваний, которые располагались с большой плотностью на поверхности клеток (табл. 27).

Такой характер рельефа поверхности характерен для всех типов целоцитов (рис. 32).

В условиях измененного осмотического давления происходит сглаживание микровыпячиваний и микропадин. В гипотонических условиях сглаживание поверхности мембраны происходит меньше, чем в условиях повышенного осмотического давления, целоциты сохраняют отдельные микровозвышения, плотность которых значительно ниже, чем в норме (рис. 33). В гипертонических условиях отмечали отдельные структуры микрорельефа, которые имели дискретный характер (рис. 34).

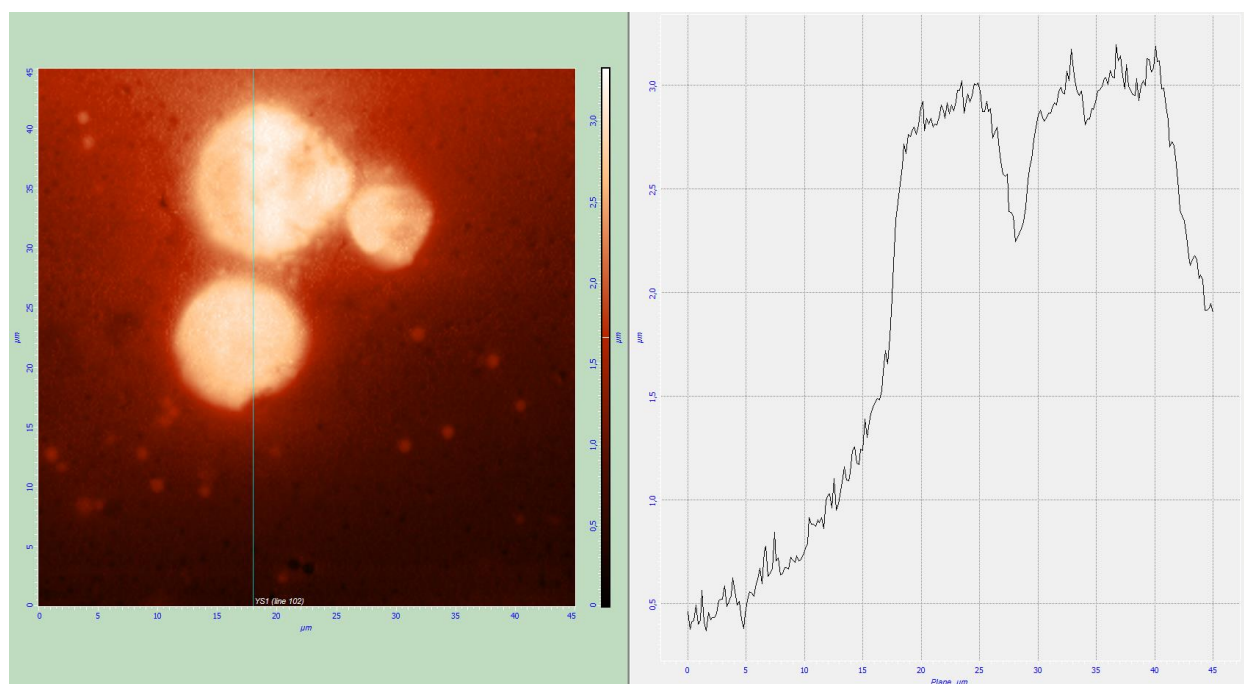


Рис. 32 – Двухмерное изображение топографии поверхности целоцита *E. gordejefi* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в изоосмотических условиях

Показатели неоднородности микрорельефа поверхности целомацитов
E. gordejefi в условиях осмотической нагрузки

Показатели	БА	СА	МА	НА	ХЛ
Изотоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	1,45±0,12	0,53±0,02	0,36±0,12	0,48±0,09	0,12±0,02
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,41±0,11	0,31±0,05	0,41±0,03	0,32±0,03	0,13±0,03
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,73±0,21	2,43±0,17	4,17±0,09	3,29±0,71	1,71±0,17
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	1,13±0,14	2,01±0,13	1,28±0,05	1,71±0,04	2,11±0,23
Sds, плотность пиков, 1/um·um	1,43±0,12	1,41±0,13	1,31±0,22	1,69±0,15	1,31±0,12
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	6,35±0,37	6,38±0,51	8,03±0,75	10,13±1,27	5,41±1,03
Гипотоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,27±0,05*	0,34±0,03*	0,42±0,11	0,37±0,11	0,15±0,03
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,22±0,04*	0,29±0,04	0,34±0,09	0,29±0,04	0,12±0,03
Sp, высота самого высокого пика, nm	2,87±0,61	3,24±0,27	3,12±0,03*	3,31±0,23	1,84±0,32
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	1,48±0,31	1,59±0,19	1,10±0,08	1,15±0,05	1,13±0,4
Sds, плотность пиков, 1/um·um	1,99±0,42	1,64±0,54	1,42±0,26	1,26±0,09	1,49±0,11
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	7,86±1,07	7,94±1,62	8,48±1,57	11,12±1,21	4,47±0,35
Гипертоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,15±0,01*	0,12±0,002*	0,17±0,05*	0,08±0,009*	0,08±0,01
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,13±0,02*	0,09±0,01*	0,13±0,04*	0,06±0,009*	0,07±0,01*
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,81±0,27	1,45±0,15	1,09±0,18*	1,25±0,07*	1,52±0,32
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,98±0,11	0,75±0,06	0,18±0,01*	0,76±0,009*	0,81±0,09
Sds, плотность пиков, 1/um·um	3,01±0,15*	2,93±0,029	2,51±0,13*	3,17±0,04*	2,71±0,46*
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	6,08±2,66	7,29±1,15	6,27±0,54*	5,77±0,58*	7,58±2,35

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

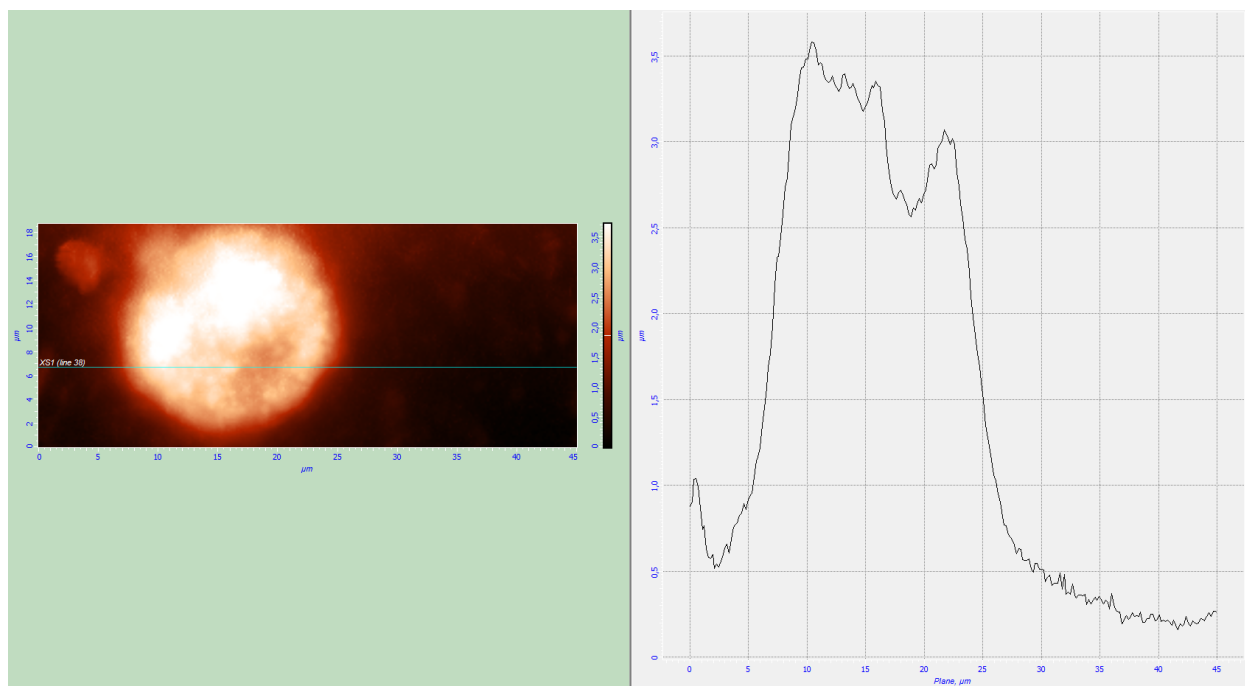


Рис. 33. Двухмерное изображение топографии поверхности целомоцита *E. gordejefi* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гипоосмотической нагрузки.

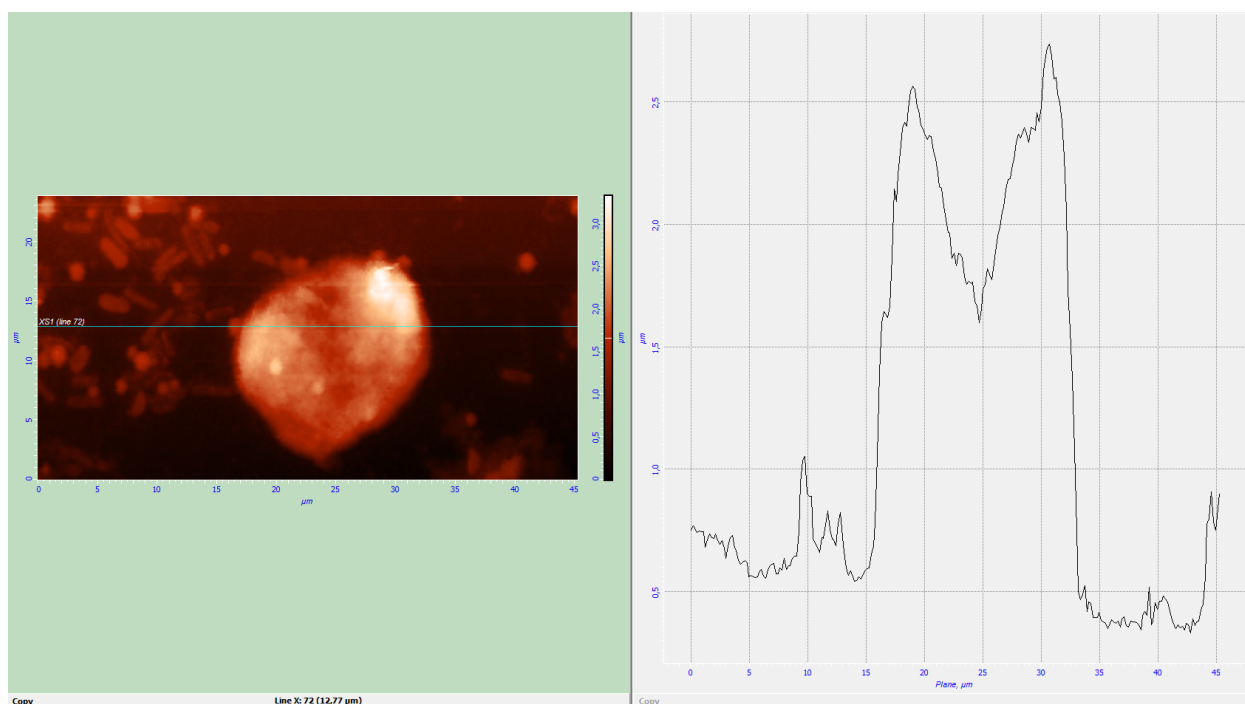


Рис. 34. Двухмерное изображение топографии поверхности целомоцита *E. gordejefi* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гиперосмотической нагрузки

Структура поверхности целомоцитов *E. tetraedra* отличалась разнообразием (табл. 28).

Показатели неоднородности микрорельефа поверхности целомацитов
E. tetraedra в условиях осмотической нагрузки

Показатели	БА	СА	МА	НА	ХЛ
Изотоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,07±0,01	62,69±4,46	0,06±0,01	45,17±4,15	12,31±1,54
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,05±0,009	48,85±2,54	0,05±0,01	22,58±4,35	2,39±0,09
Sp, высота самого высокого пика, nm	0,76±0,12	624,92±9,78	0,53±0,03	0,75±0,15	0,83±0,06
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,42±0,07	181,41±3,39	0,21±0,02	0,75±0,11	0,45±0,02
Sds, плотность пиков, 1/um·um	1,04±0,05	1,15±0,18	1,19±0,23	0,03±0,002	1,45±0,15
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	1,26±0,31	1,08±0,09	1,00±0,15	1,45±0,04	1,32±0,21
Гипотоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	85,68±2,78*	0,07±0,003*	0,09±0,01	23,26±0,97*	3,41±0,38*
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	61,32±3,46*	0,06±0,005*	0,06±0,01	17,42±2,34	7,12±1,21*
Sp, высота самого высокого пика, nm	524,62±3,06*	1,34±0,07*	0,98±0,06*	461,38±9,48*	34,87±6,27*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	253,68±8,43*	0,92±0,05*	0,47±0,002	250,45±5,23*	7,56±0,41*
Sds, плотность пиков, 1/um·um	1,68±0,19	1,57±0,24	7,53±1,16*	1,67±0,34*	2,41±0,43
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	1,46±0,33	1,61±0,03	8,55±0,55*	1,12±0,02	5,12±0,32*
Гипертоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,07±0,02	0,10±0,12*	45,423±4,43*	130,43±4,55*	13,45±1,13
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,06±0,02	0,09±0,01*	36,81±3,02*	103,58±3,28*	5,65±0,35*
Sp, высота самого высокого пика, nm	0,61±0,11	0,65±0,07*	305,06±5,76*	694,56±7,32*	25,11±1,48*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,21±0,02	0,19±0,02*	25,49±4,12*	105,78±4,59*	32,34±1,45*
Sds, плотность пиков, 1/um·um	4,16±0,54*	4,79±0,17*	8,97±1,22*	8,81±0,67*	6,12±0,91*
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	2,37±0,09*	2,96±0,31*	7,12±1,81*	23,48±0,88*	4,59±0,12*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогеновые клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Большие амебоциты – в изотонических условиях этот тип целомоцитов отличался приподнятой над поверхностью центральной частью с ядром, вокруг которой отмечали ободок цитоплазмы. В области ядра располагались выпячивания крупных гранул, микрорельеф складывался из дискретных одиночных возвышений мембраны. Периферия клетки отличалась сложным профилем поверхности, который определяли структуры цитоскелета. Филаменты формировали гексагональную субмембранную сеть.

У малых и средних амебоцитов отмечали тенденцию формировать приподнятую центральную часть клетки, но без значительного перепада по высоте с периферией. Структуры цитоскелета менее выражены, предположительно вследствие более медленной адгезии их к субстрату.

У средних амебоцитов отметили сложную структуру микрорельефа. Для поверхности этого клеточного типа характерно наличие высоких выпячиваний и неглубоких понижений профиля (рис. 35).

Неамебоциты демонстрировали обратную тенденцию – часть клетки, которая содержит ядро, располагалась ниже относительно периферии. По всей поверхности клетки заметно выпячивание отдельных гранул. Микрорельеф определялся выпячиванием большого количества отдельных возвышений, которые имели небольшую высоту.

Хлорогенные клетки *E. tetraedra* отличаются выпячиванием хлорогенных гранул через плазматическую мембрану.

В гипотонических условиях наблюдали уменьшение показателей шероховатости микрорельефа поверхности у СА и НА. У средних амебоцитов выявлено сглаживание рельефа, в то время как у не амебоцитов уменьшается количество выпячиваний поверхности, но показатели их размеров возрастают (рис. 36), в условиях снижения концентрации солей наблюдали повышение всех показателей микрорельефа у больших амебоцитов.

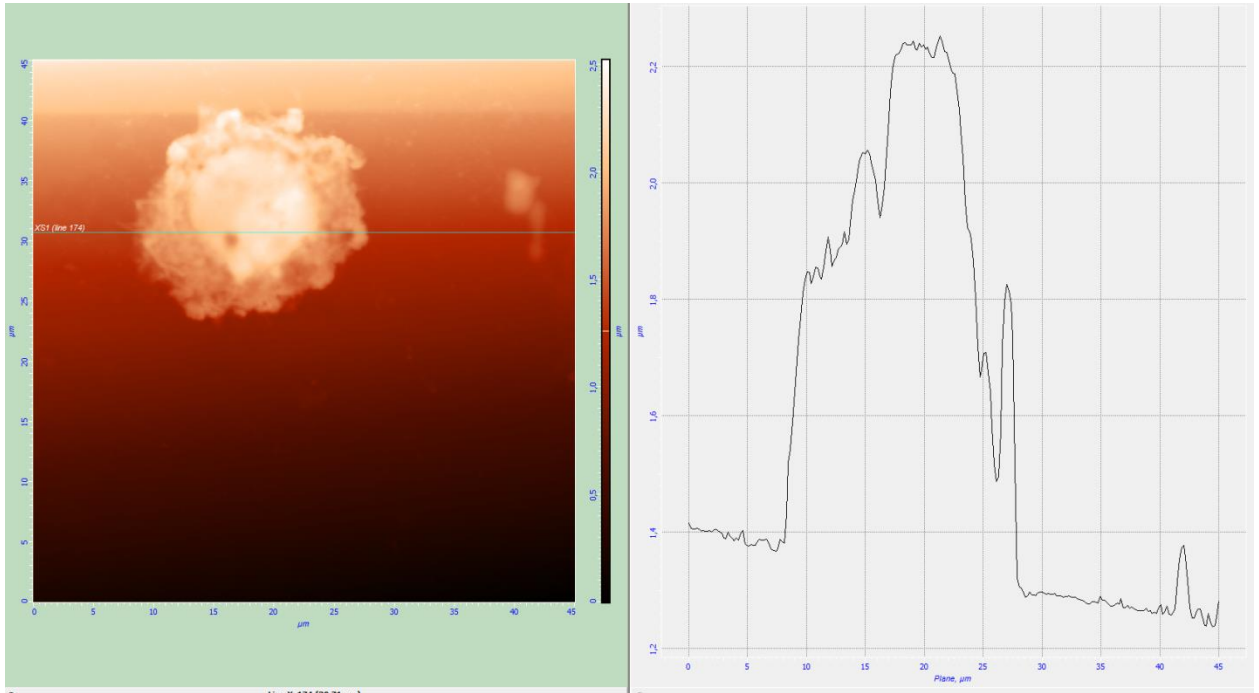


Рис. 35. Двухмерное изображение топографии поверхности целомоцита *E. tetraedra* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в изоосмотических условиях

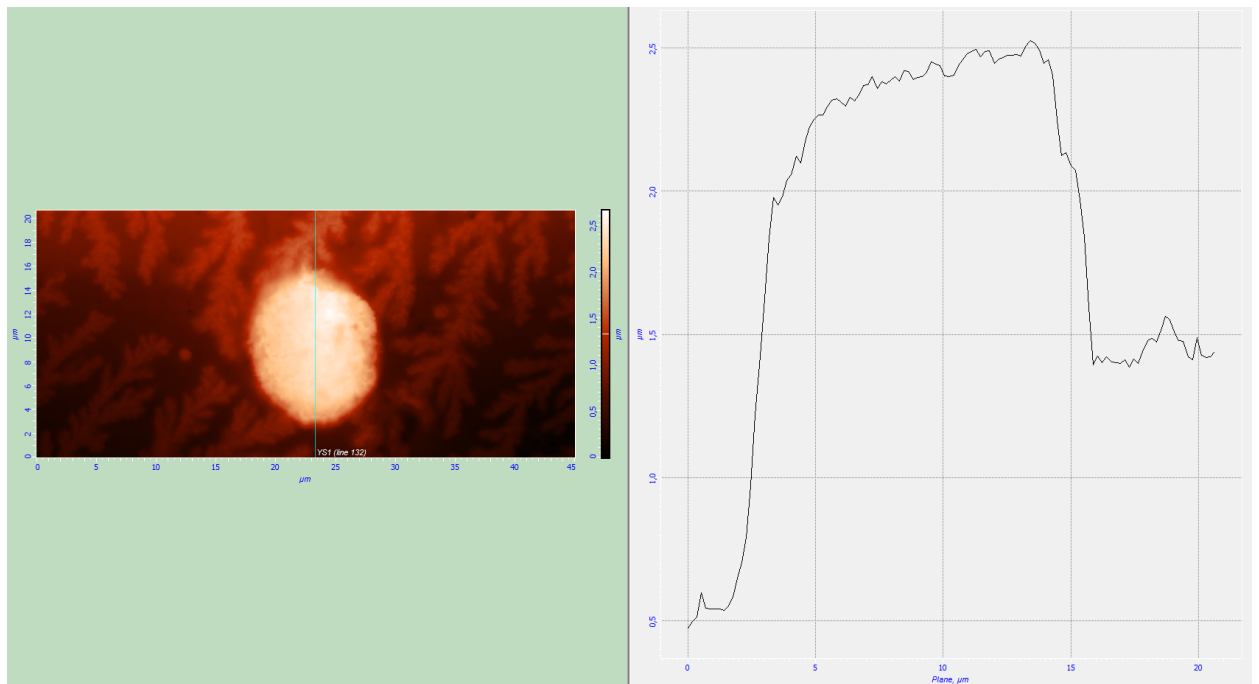


Рис. 36. Двухмерное изображение топографии поверхности целомоцита *E. tetraedra* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гипоосмотической нагрузки

В условиях повышения осмотического давления наблюдали значительное увеличение всех показателей шероховатости у МА и НА. Уменьшение осмотического давления не отражается на микрорельефе поверхности средних амебоцитов (рис. 37).

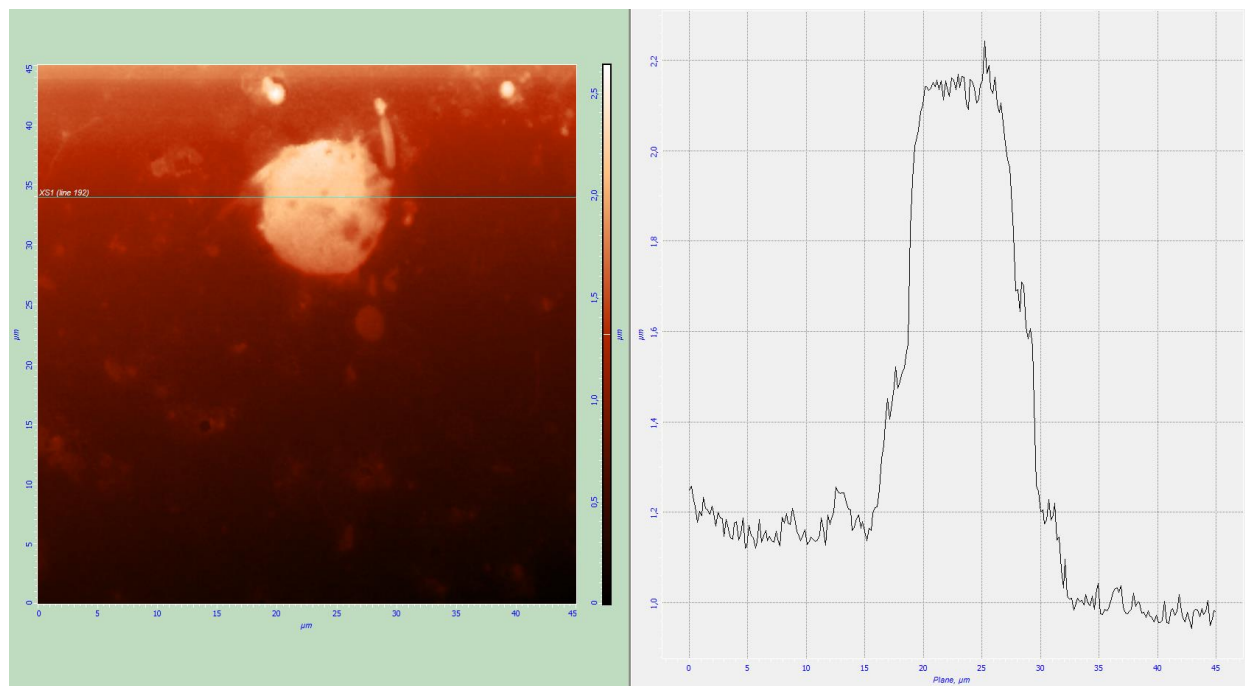


Рис. 37. Двухмерное изображение топографии поверхности целомоцита *E. tetraedra* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гиперосмотической нагрузки

Структура поверхности целомоцитов *L. terrestris* отличается разнообразием (табл. 29).

В норме на сканах большого амебоцита *L. terrestris* можно выделить полярность клетки – один край имеет четкий контур, в то время как другой является полюсом расплывания и имеет плавный переход к поверхности подложки. Область ядра не возвышается над общей поверхностью клетки.

Микрорельеф целомоцитов этой группы является относительно однообразным.

Показатели неоднородности микрорельефа поверхности целомоцитов
L. terrestris в условиях осмотической нагрузки

Показатели	БА	СА	МА	НА	ХЛ
Изотоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,12±0,02	0,23±0,01	0,15±0,04	0,13±0,01	0,12±0,02
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,09±0,01	0,17±0,03	0,11±0,02	0,09±0,02	0,11±0,02
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,93±0,31	1,88±0,41	1,91±0,18	1,84±0,13	1,59±0,25
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	1,17±0,22	1,02±0,26	0,92±0,21	1,08±0,05	0,93±0,07
Sds, плотность пиков, 1/um·um	5,57±1,19	2,61±0,61	2,32±0,63	1,38±0,12	2,95±0,61
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	1,17±0,23	8,11±2,33	6,88±0,37	4,45±0,97	7,27±1,16
Гипотоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,17±0,05	0,76±0,02*	0,21±0,03	1,13±0,11*	0,12±0,02
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,14±0,02	0,14±0,03	1,17±0,05*	0,17±0,02*	0,09±0,01
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,73±0,21	1,92±0,33	1,68±0,03	1,54±0,31*	1,02±0,03*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,82±0,06*	0,96±0,08*	0,48±0,04*	1,31±0,08*	0,29±0,05*
Sds, плотность пиков, 1/um·um	2,16±0,14*	2,58±0,46	2,56±0,31	1,98±0,21	2,92±0,31
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	7,38±0,61*	7,72±0,73	8,25±0,34*	5,32±0,63	8,38±0,42
Гипертоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,185±0,07	0,18±0,03	0,16±0,05	0,12±0,02	0,65±0,03*
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,148±0,04	0,14 ±0,04	0,123±0,03*	0,99±0,04*	0,51± 0,02*
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,39±0,28	1,49±0,42	1,56±0,21	0,681±0,11*	0,36± 0,12*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,45±0,15*	0,43±0,1*	0,654±0,14	0,80±0,07*	0,78± 0,03*
Sds, плотность пиков, 1/um·um	1,39±0,9*	1,17±0,83*	1,64±0,34*	3,16±0,53*	0,21±0,01*
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	2,26±0,71	1,84±0,73*	2,44±1,15*	7,25±0,45*	0,326±0,01*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Поверхность вблизи активного края клетки имеет небольшое количество тяжей, вытянутых цилиндрических образований. Направление текстуры этой части клетки проходит по направлению формирования ложноножки. В средней части клетки микрорельеф представлен дугообразными цилиндрическими образованиями, длиной 1,1-1,2 μm . Поверхность неактивного края образует большое количество одиночных глобулярных выпячиваний.

Поверхность средних целоцитов содержит выпячивания в виде одиночных глобул, а так же впадины неправильной формы. Ядро над общей площадью поверхности клетки не возвышается. Средние амебоциты не формируют активного края, периметр целоцита равномерный.

Малый амебоцит в физиологических условиях имеет равномерную текстуру поверхности, сквозь мембрану проступают невысокие гранулы и неглубокие возвышения. Клетки этого типа имеют четкий контур, который на одном из полюсов плавно переходит к поверхности подложки, поэтому у клетки можно определить активный край. Морфологических различий микрорельефа на поверхности клетки не установили.

Неамебоцит имеет гомогенную структуру микрорельефа, поверхность клетки ровная, содержит большое количество одиночных выпячиваний. Край клетки четкий, без инвагинаций. После инкубации в гипотонических условиях микрорельеф делится на две области – ядерная, которая возвышается над поверхностью клетки и периферическая, в которой наблюдаются впадины неправильной формы. Микровыпячивания покрывают всю поверхность клетки, они чаще одиночные и располагаются незакономерно.

Микрорельеф хлорогенной клетки определяется наличием большого количества гранул, а так же понижением общей высоты клетки в области ядра (рис. 38).

В гипотонических условиях полярность амебоцита сохраняется. На периферии клетки появляются крупные выпячивания неправильной формы, которые предположительно являются фагоцитарными вакуолями. В условиях понижен-

ного осмотического давления основная часть дорзальной поверхности целоμοцита сглаживается и прижимается к подложке.

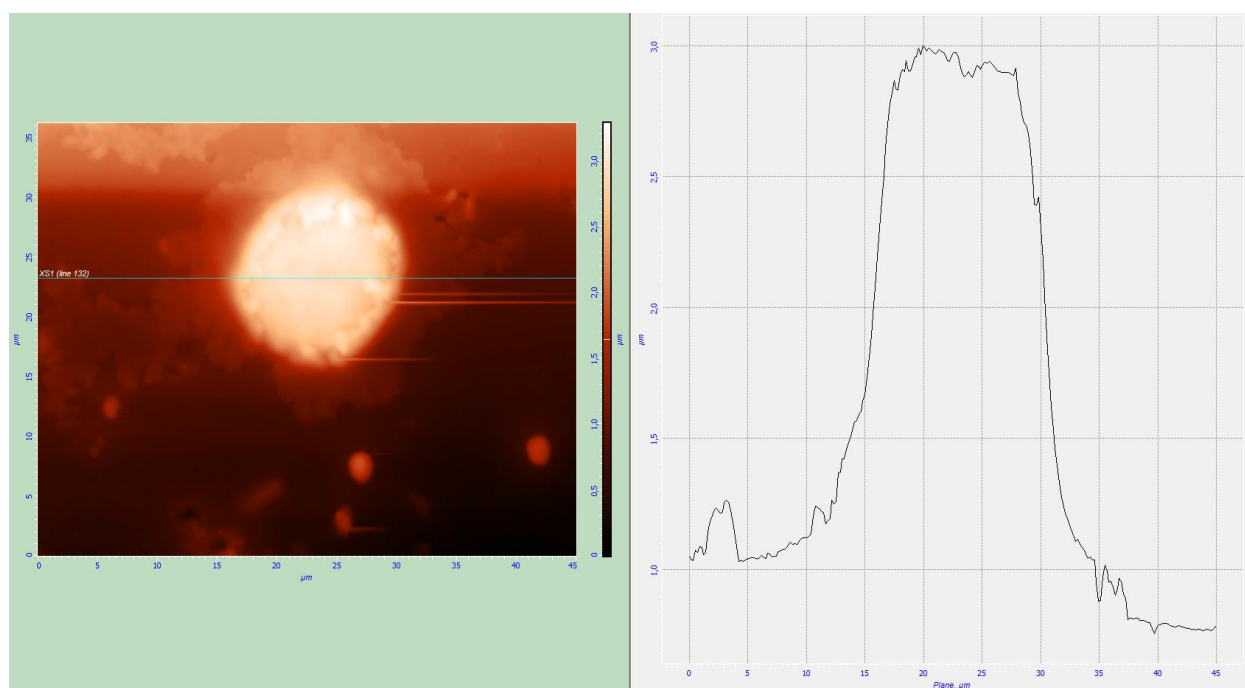


Рис. 38. Двухмерное изображение топографии поверхности целомоцита *L. terrestris* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в изоосмотических условиях

В гипотонической среде поверхность целомоцитов этого типа приобретает куполообразную форму. Ядро, которое может располагаться как в центре, так и на периферии, возвышается над поверхностью, его окружает цитоплазма, которую отделяет неглубокая борозда. Поверхность клетки сглаживается. После инкубации в условиях пониженного осмотического давления у целомоцита формируется активный край. Микрорельеф представлен выпячиваниями по форме близкими к сферическим и углублениями неправильной формы.

В гипотонической среде микрорельеф амебоцита образует структуры в виде гребня в области активного края клетки, а так же выпячивания неправильной формы, которые располагаются бессистемно (рис. 39).

В гипотонической среде встречается большое количество разрушенных хлорогенных клеток. Многие целомоциты этого типа теряют свои гранулы и

уплощаются в дорзо-вентральном направлении. Понижение в области ядра уже не столь заметно, но присутствует.

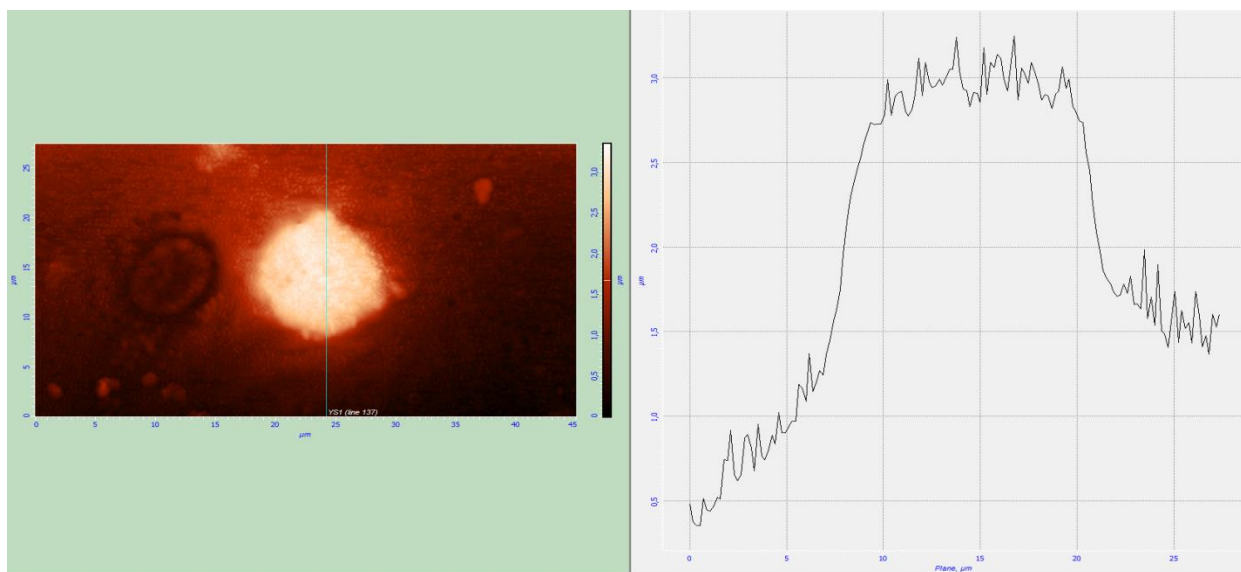


Рис. 39. Двухмерное изображение топографии поверхности целомоцита *L. terrestris* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гипоосмотической нагрузки

В условиях гипертонического стресса у большинства клеток больших амебоцитов выделяется два полюса расплывания, клетка вытягивается и принимает овальную форму (рис. 40). Над поверхностью амебоцита возвышается уплотненное ядерное пространство, а в вакуолизированной области цитоплазмы выделяются впадины неправильной формы – скопления вакуолей. Несмотря на формирование активного края, борозды и складки мембраны среди структур микрорельефа не обнаружены. По всей площади клетки густо расположены одиночные выпячивания в виде пиков и холмов.

В гипертонической среде, вокруг среднего амебоцита заметна циркулярная ламеллопалзма, центральная часть, которую формирует тело целомоцита, имеет сглаженный микрорельеф. Площадь мембраны над ядром практически лишена возвышений и впадин, её отделяет от периферической части клетки небольшой валик цитоплазмы, который располагается циркулярно. На границе ядерной и цитоплазматической области образуются глобулы размером 1,4-1,7 μm в диаметре.

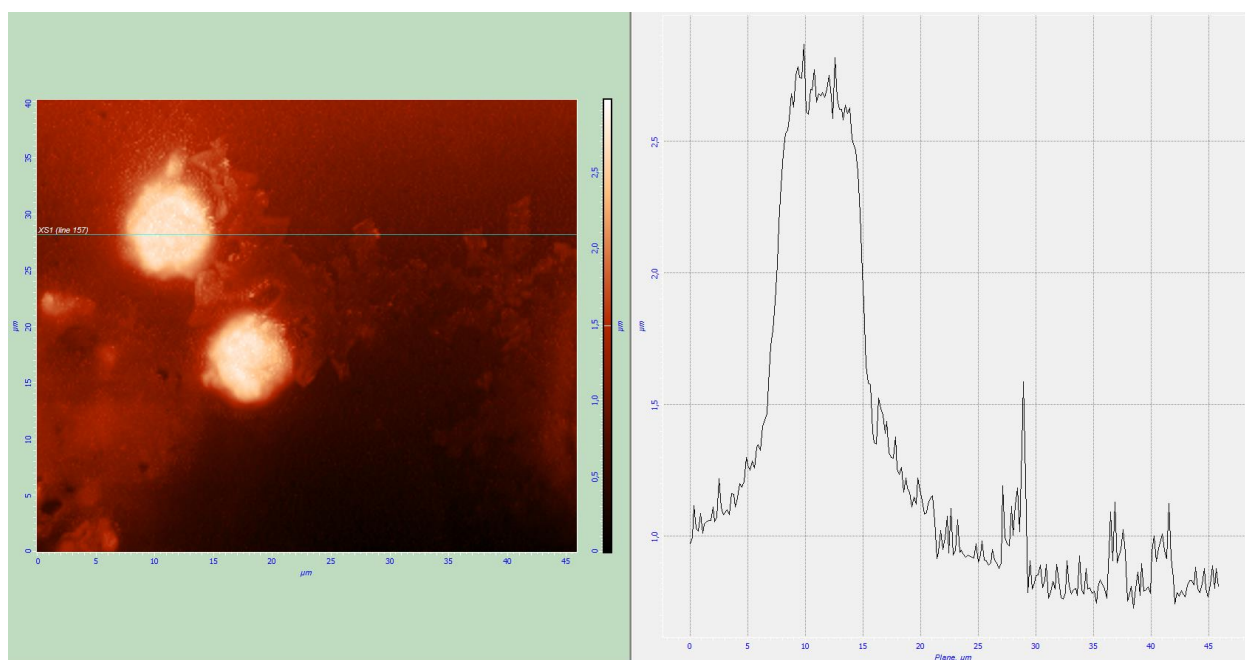


Рис. 40. Двухмерное изображение топографии поверхности целоμοцита *L. terrestris* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гипертонической нагрузки

В гипертонической среде клетка уплощается, её поверхность прижимается к подложке и сглаживается. В центральной части заметны крупные выпячивания и глобулярные образования размером 1,3-1,8 μm . Край целоμοцита не четкий, а плавно перетекающий в подложку.

Форма НА в гипертонических условиях не меняется, поверхность покрыта длинными бороздами, присутствуют впадины, которые имеют неправильную геометрическую форму. Микрорельеф всей поверхности клетки представлен микровыпячиваниями.

Гипертонические условия влияют на морфологию хлорогенной клетки, а так же непосредственно на микрорельеф хлорогенных гранул, которые меняют гладкий рельеф поверхности, на гомогенный рельеф с выщерблинами и возвышениями. Возможно это проявление уплотнения или складчатости мембраны. Хлорогенные гранулы диаметром 2,3-2,6 μm , насчитывают 5-10 микровозвышений.

Микрорельеф поверхности среднего амебоцита *L. castaneus* сглажен, слабо выражен субмембранный фибриллярный остов. Ядро возвышается над цитоплазмой, по всей площади клетки беспорядочно выпячиваются

цитоплазматические гранулы, диаметром 0,6-0,7 μm . По всей поверхности клетки заметны многочисленные впадины вакуолей. По всему периметру имеются инвадоподии – в данном случае они являются местом контакта целомоцита с субстратом.

Малые амебоциты имеют сглаженный гомогенный рельеф поверхности (табл. 30). Центральная часть клетки практически гладкая, периферическая поляризована – один полюс занимают подковообразные складки, другой – ровные широкие подмембранные тяжи фибрилл. Вероятно это связано с движением клетки или ощупыванием субстрата. Складки демонстрируют ретракцию целомоцита, а вытянутые широкие фибриллы, возможно, принимают участие в образовании активного ламеллярного края клетки (рис. 41).

Неамебоциты отличаются отсутствием специализированных образований для контакта с подложкой. В большинстве случаев клетка имеет равномерную высоту, ядро не возвышается над цитоплазмой. Через мембрану хорошо заметны гранулы и впадины вакуолей.

Хлорогеновые клетки отличаются наибольшим образом от всех остальных клеточных типов. По всей поверхности сквозь мембрану проступают хлорогеновые гранулы диаметром 4-5 мкм. Края клетки ровные без инвагинаций. В области ядра наблюдается понижение общего рельефа.

В гипотонических условиях наблюдается окончательное сглаживание микрорельефа поверхности, что связано с увеличением объема целомоцита (рис. 42). По всей поверхности клетки заметны широкие борозды и тяжи, которые особенно выражены в области ядра. Центральная часть целомоцита прогибается, так как ядро не изменяет размера. После инкубации в гипотонических условиях микрорельеф малого амебоцита меняется в сторону увеличения складок, впадин и возвышений. Можно отметить массовые точечные возвышения, которые являются гранулами, скопившимися под цитоплазмой. У отдельных целомоцитов вместо гранул можно заметить отверстия правильной формы – проваленные гранулы.

Показатели неоднородности микрорельефа поверхности целомоцитов
L. castaneus в условиях осмотической нагрузки

Показатели	БА	СА	МА	НА	ХЛ
Изотоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,185±0,07	0,18±0,03	0,16±0,05	0,12±0,02	0,65±0,03
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,148±0,04	0,14 ±0,04	0,123±0,03	0,99±0,04	0,51± 0,02
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,39±0,28	1,49±0,42	1,56±0,21	0,681±0,11	0,36± 0,12
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,448±0,15	0,43±0,1	0,654±0,14	0,80±0,07	0,78± 0,03
Sds, плотность пиков, 1/um·um	1,39±0,9	1,17±0,83	1,64±0,34	3,16±0,53	0,221±0,01
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	2,26±0,71	1,84±0,73	2,44±1,15	7,25±0,45	0,326±0,01
Гипотоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,12±0,04	0,149±0,06	0,31±0,11	0,23±0,11	0,12±0,02*
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,11±0,03	0,12±0,02	0,23±0,1	0,19±0,01*	0,07±0,01*
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,42±0,17	1,35±0,23	1,68±0,63	1,33±0,27*	1,28±0,31*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,789±0,28	0,67±0,233	0,41±0,11	0,32±0,04*	0,77±0,21
Sds, плотность пиков, 1/um·um	1,65±0,46	2,11±1,26	0,63±0,54*	0,39±0,12*	3,62±0,12*
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	3,07±1,05	4,43±3,21*	1,31±0,39	1,61±0,56*	2,53±0,54*
Гипертоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,08±0,02	0,09±0,01*	0,09±0,02	0,09±0,02	0,11±0,01*
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,06±0,02*	0,08±0,01	0,08±0,01	0,08±0,01*	0,08±0,01*
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,45±0,26	1,45±0,14	1,21±0,12	1,21±0,24*	1,18±0,21*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,76±0,12	1,02±0,12*	0,59±0,22*	0,63±0,05	0,65±0,05
Sds, плотность пиков, 1/um·um	1,24±0,34	1,09±0,34	1,02±0,13	1,13±0,31*	0,61±0,07
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	1,17±0,26	1,54±0,4	1,39±0,26	0,41±0,27*	0,98±0,11*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

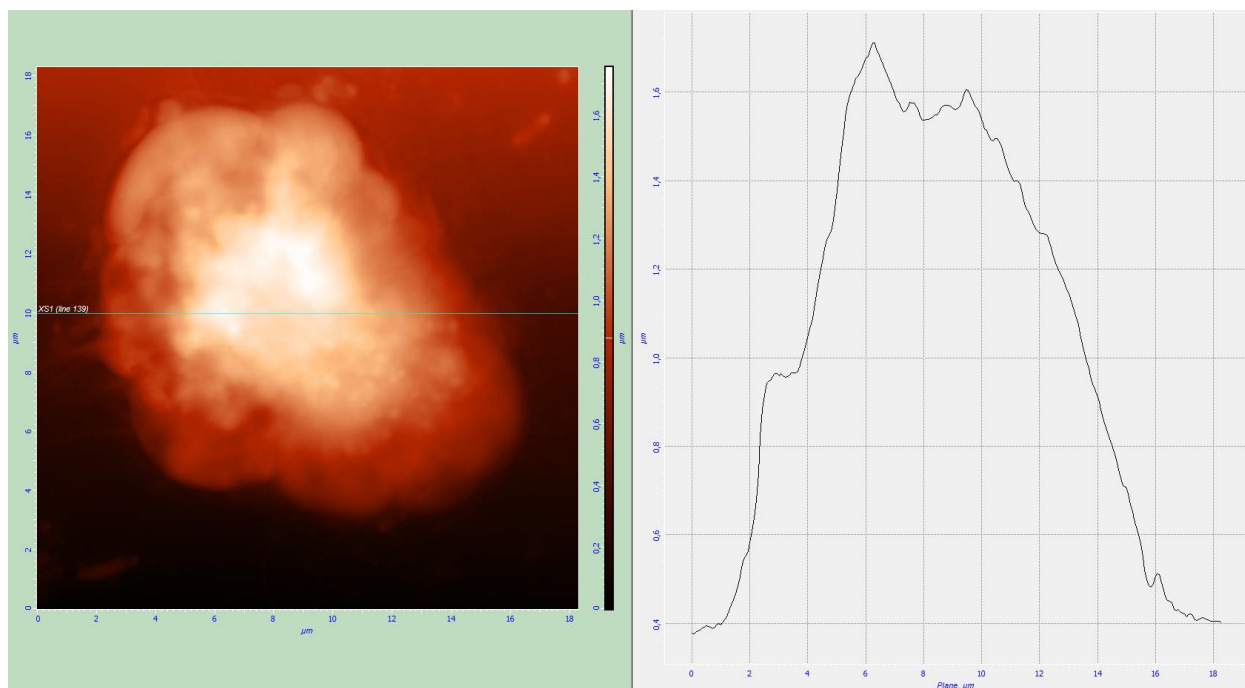


Рис. 41. Двухмерное изображение топографии поверхности целооцита *L. castaneus* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в изоосмотических условиях

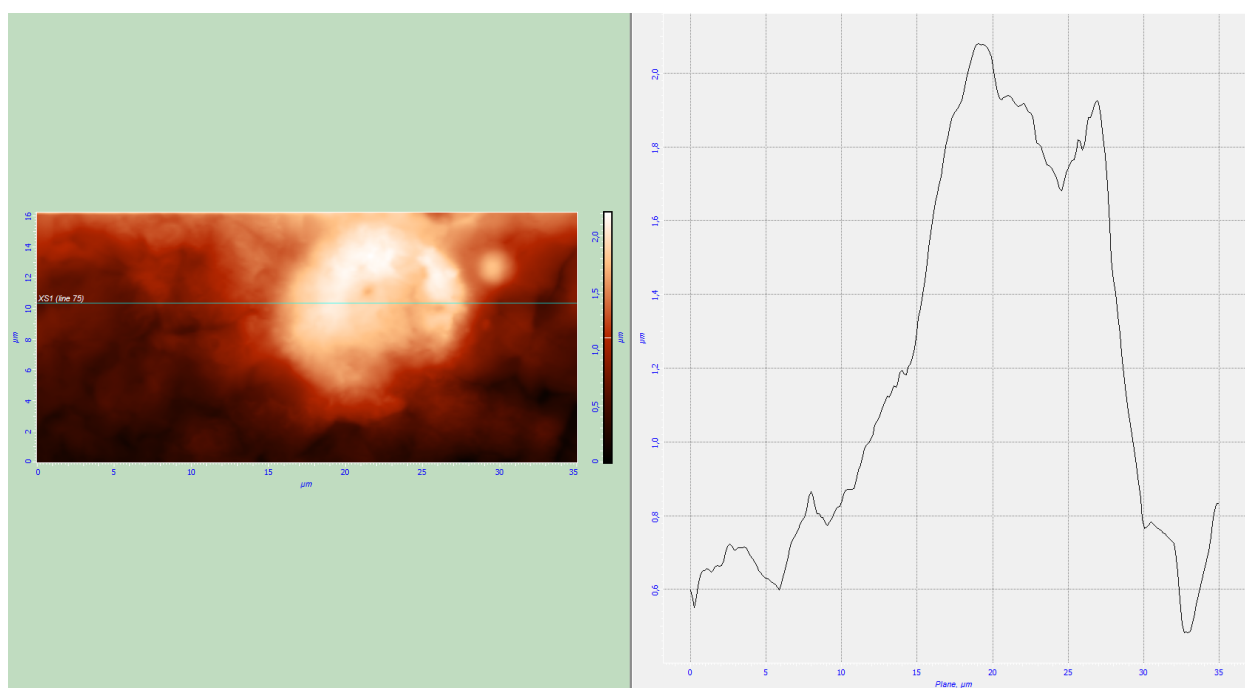


Рис. 42. Двухмерное изображение топографии поверхности целооцита *L. castaneus* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гипоосмотической нагрузки

В условиях пониженного осмотического давления НА приобретает более гомогенный рельеф, над поверхностью возвышается несколько гранул, а основную массу составляют продолговатые цилиндрические возвышения 1,6-

1,8 μm . Вытянутые возвышения сходной природы наблюдаются и по периметру клетки в дорзо-вентральном направлении, возможно являющиеся поддерживающими форму фибриллами.

Инкубация хлорогита в условиях пониженного осмотического давления не приводит к значительным изменениям морфологии клеток. Гранулы более контрастно выделяются на поверхности, их диаметр уменьшается до 2,5-3 μm .

В гипертонических условиях для всех клеточных типов популяции целомоцитов *L. castaneus* характерным является увеличение складчатости мембраны. Широкие фибриллярные тяжи меняются на отрывистые плотно расположенные возвышения, длиной менее 1 μm (рис. 43).

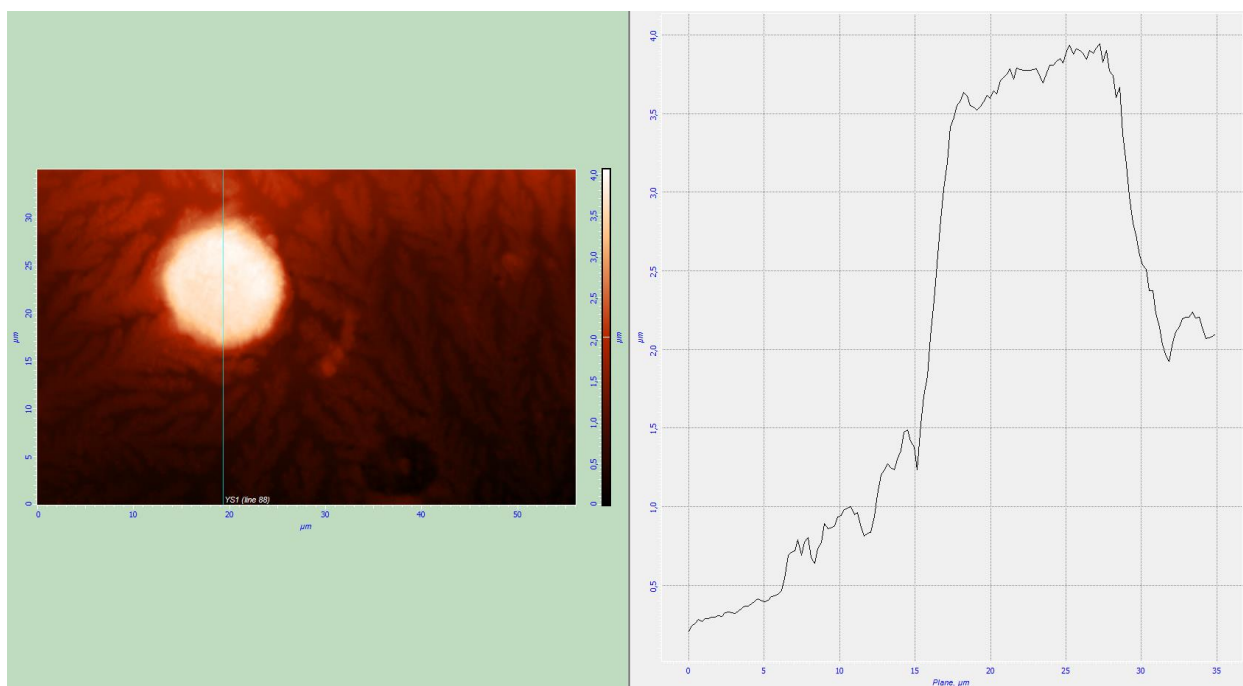


Рис. 43. Двухмерное изображение топографии поверхности целомоцита *L. castaneus* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гипертонической нагрузки

Большие амебоциты *L. rubellus* отличаются сглаженным микрорельефом. Область клетки содержащая ядро приподнята над периферией. Через мембрану выступают структуры цитоскелета, которые в центральной части клетки имеют вид отдельных возвышений, а ближе к краю формируют тяжи и складки (рис. 44).

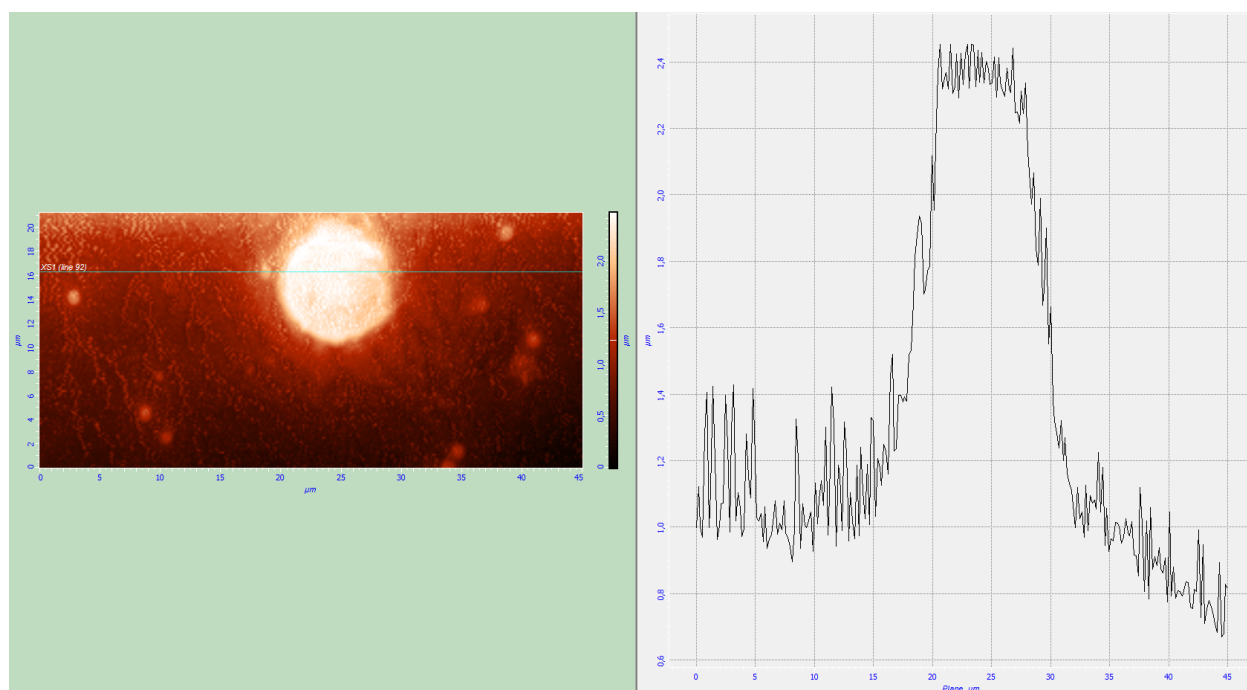


Рис. 44. Двухмерное изображение топографии поверхности целомацита *L. rubellus* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в изоосмотических условиях

Средние и малые амебоциты демонстрируют сложную структуру поверхности. Профиль клеток этого типа имеет возвышение в области ядра. В периферической части клетки отмечали наличие выпячиваний гранул и вакуолей, хорошо развитые структуры цитоскелета формируют борозды и гребни. Микрорельеф поверхности гетерогенный с преобладанием невысоких выпячиваний до 3,18 μm (табл. 31). Глубокие понижения профиля отсутствуют.

Показатели неоднородности микрорельефа поверхности целомацитов
L. rubellus в условиях осмотической нагрузки

Показатели	БА	СА	МА	НА	ХЛ
Изотоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,09±0,01	113,53±8,91	92,62±10,71	57,56±2,31	134,8±16,3
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,08±0,02	91,14±7,01	76,21±8,84	43,96±1,45	108,9±7,6
Sp, высота самого высокого пика, nm	0,43±0,07	579,41±34,3	546,68±39,78	439,61±3,12	756,8±40,1
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,22±0,01	308,9±32,7	147,58±6,39	216,84±4,13	242,6±29,6
Sds, плотность пиков, 1/um·um	2,51±0,12	3,14±0,65	3,18±0,97	3,61±0,54	3,01±0,05
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	3,09±0,37	1,58±0,42	6,39±1,35	43,24±0,93	14,03±0,94
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,32±0,06	0,56±0,07	0,51±0,11	0,56±0,12	0,59±0,01
Гипотоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,16±0,03	0,14±0,02*	0,14±0,04*	0,203±0,07*	0,14±0,01*
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,13±0,03	0,11±0,01*	0,12±0,03*	0,17±0,06*	0,11±0,02*
Sp, высота самого высокого пика, nm	0,96±0,18	0,73±0,11*	0,84±0,07*	1,13±0,07*	0,89±0,13*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,71±0,03*	0,89±0,06*	0,81±0,06*	0,78±0,07*	1,03±0,12*
Sds, плотность пиков, 1/um·um	0,66±0,08*	3,27±0,24	3,02±0,61	2,87±0,45	4,02±0,34
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	2,72±0,03	12,55±1,37*	8,96±1,14	9,14±0,99*	8,89±0,27*
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,11±0,01*	0,76±0,02	0,69±0,08	0,68±0,08	0,64±0,05
Гипертоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,18±0,02	0,08±0,005*	0,19±0,02*	0,11±0,02*	0,16±0,01*
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,16±0,01	0,062±0,002*	0,15±0,01*	0,09±0,02*	0,13±0,01*
Sp, высота самого высокого пика, nm	0,95±0,05	0,46±0,12*	1,58±0,07*	0,66±0,03*	0,93±0,06*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,12±0,01	0,77±0,03*	0,1310,02*	0,08±0,02*	0,92±0,07*
Sds, плотность пиков, 1/um·um	2,47±1,05	2,85±0,31	4,21±1,06	2,46±0,56	2,81±0,31
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	129,81±6,43*	12,38±1,74*	3,88±0,34*	136,82±5,48*	25,42±2,31*
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,59±0,05	0,77±0,12	0,34±0,06	0,56±0,04	0,53±0,08

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Неамебоциты отличаются понижением профиля поверхности клетки в области ядра. Остальная часть клетки имеет выпячивания мембраны, которые обусловлены понижением в области вакуолей и гранул, и выступающими тяжами цитоскелета.

Хлорогенные клетки *L. rubellus* демонстрируют диффузное расположение гетерогенных по размеру гранул. Хлорогенные гранулы располагаются не плотно, большую часть составляют гранулы небольшого размера.

В условиях измененного осмотического давления наблюдали уменьшение показателей шероховатости у всех клеточных типов, за исключением больших амебоцитов. На поверхности клеток не отмечали борозд и гребней, обусловленных фибриллами цитоскелета. Профиль целомицотов приобретал куполообразный вид. Область ядра и периферии не дифференцировались (рис. 45).

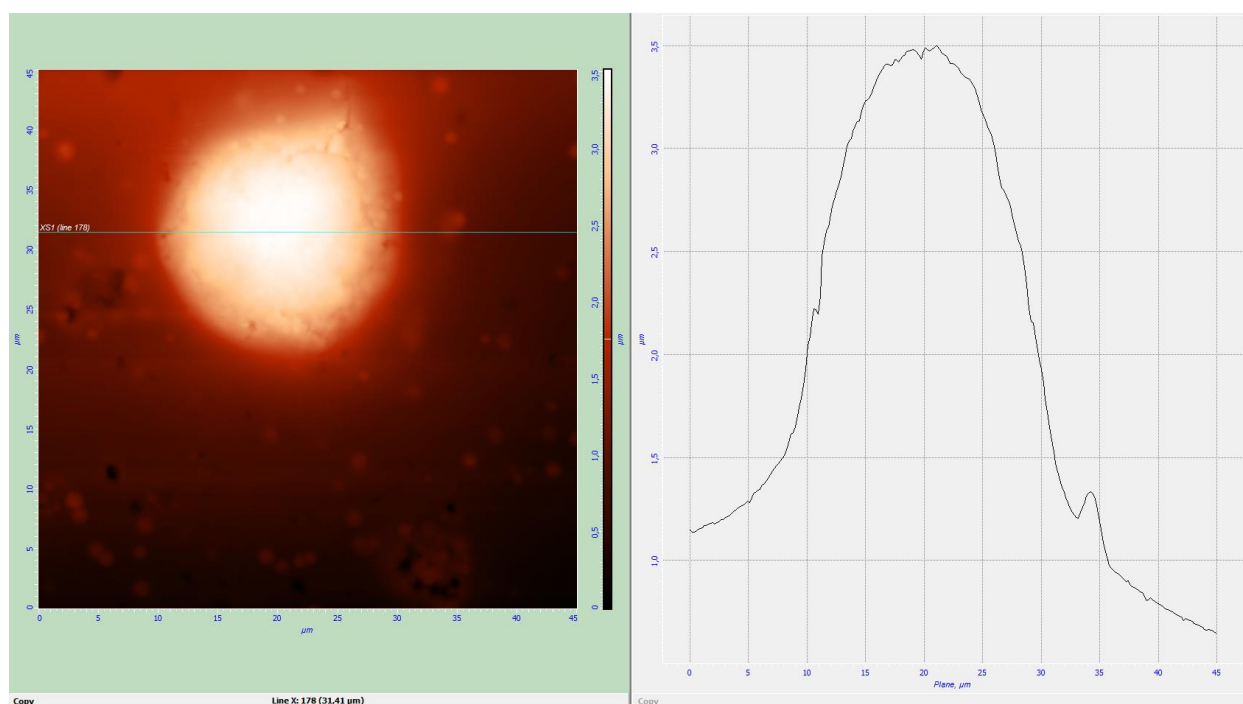


Рис. 45. Двухмерное изображение топографии поверхности целомицота *L. rubellus* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гипосмотической нагрузки

В гипотонических условиях показатели шероховатости не изменялись у БА, но значительно снижались у остальных клеточных типов. Клетки покрывались высокими выпячиваниями. Изменения плотности отметили только у больших амебоцитов, этот параметр уменьшился в несколько раз. Значения средней кривизны пиков изменились в сторону увеличения у неамебоцитов, а у амебоидных клеток отклонение этого параметра отмечали в обратную сторону. В гипертонических условиях наблюдали сглаживание рельефа целомацитов всех типов, кроме БА, которые не претерпевали значительных изменений (рис. 46).

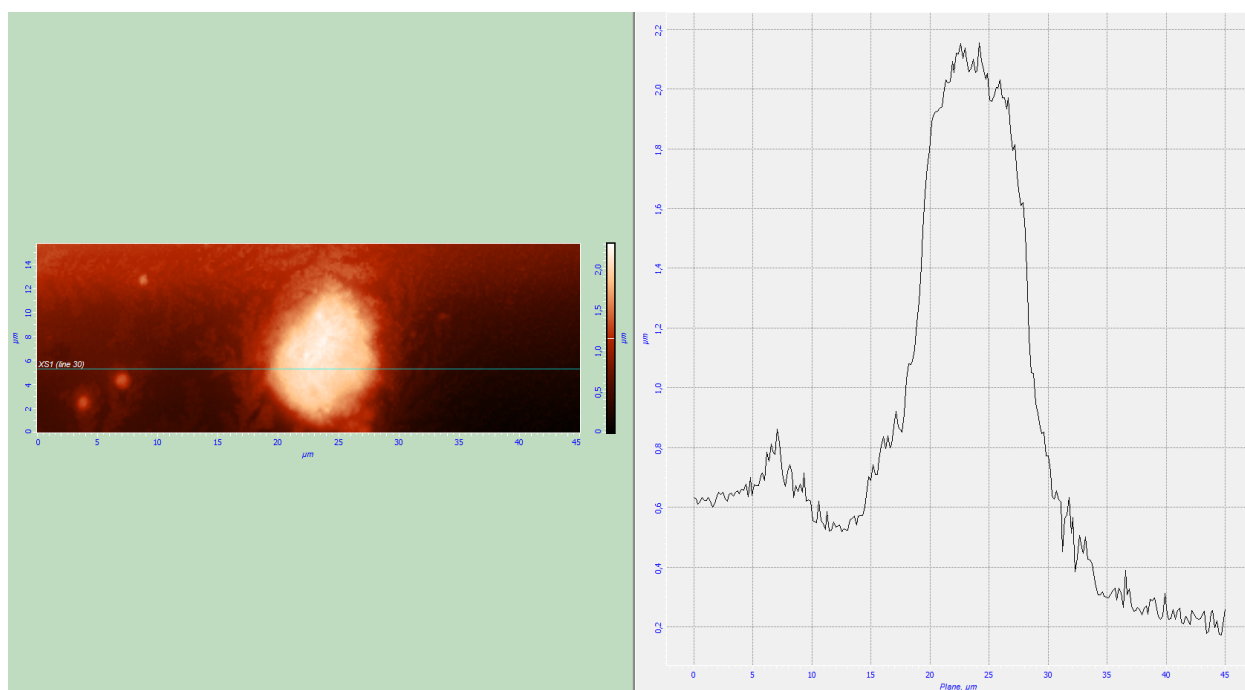


Рис. 46. Двухмерное изображение топографии поверхности целомацита *L. rubellus* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гипертонической нагрузки

Для амебоцитов *O. complanatum* в условиях изотонии характерно выпячивание фибрилл цитоскелета (табл. 32).

Показатели неоднородности микрорельефа поверхности целомацитов
O. complanatum в условиях осмотической нагрузки

Показатели	БА	СА	МА	НА	ХЛ
Изотоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,064±0,007	0,147±0,03	64,23±14,85	0,14±0,02	78,87±6,26
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,06±0,01	0,115±0,01	52,80±9,37	0,12±0,01	61,69±2,77
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,07±0,08	0,926±0,32	681,89±49,48	1,99±0,32	0,918±0,29
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,67±0,11	0,122±0,03	308,39±15,07	1,33±0,07	0,44±0,03
Sds, плотность пиков, 1/um·um	3,11±0,24	0,428±0,12	0,54±0,17	0,96±0,04	1,44±0,28
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	6,18±1,62	1,049±0,29	1,64±0,14	1,15±0,06	2,57±0,12
Гипотоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,12±0,05	0,12±0,04	0,16±0,04*	127,35±8,64*	0,11±0,02*
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,09±0,05	0,09±0,01	0,13±0,04*	102,01±5,49*	0,08±0,01*
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,04±0,01	1,43±0,35	1,46±0,31*	988,6±5,78*	2,01±0,21*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,42±0,12	0,82±0,14	0,64±0,16*	170,93±5,14*	1,33±0,23
Sds, плотность пиков, 1/um·um	0,48±0,008	1,64±0,21*	2,14±0,19*	2,89±0,32*	3,24±1,02
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	0,84±0,04*	3,78±0,34*	5,49±0,91*	9,21±0,73*	8,98±0,05*
Гипертоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,15±0,01	0,14±0,009	0,19±0,02*	0,573±0,06*	0,17±0,01*
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,12±0,01	0,12±0,007	0,16±0,01*	34,97±7,59*	0,14±0,01*
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,58±0,41	1,92±0,32*	1,62±0,45*	0,69±0,08	1,27±0,25
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,81±0,05	1,23±0,18*	0,96±0,22*	0,55±0,04*	0,51±0,06
Sds, плотность пиков, 1/um·um	1,72±0,15*	1,72±0,08*	2,06±0,61	3,25±0,09*	0,67±0,13*
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	2,78±0,58*	1,99±0,17	3,32±2,31*	2,14±0,21*	1,63±0,08*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Большие амебоциты, отличаются более мощной концентрацией фибрилл в центральной части клетки, которая приподнята над остальной поверхностью целомоцита. Микрорельеф этого типа целомоцитов гладкий, отличается однородностью. Отсутствуют микровозвышения и микровпадины.

Поверхность средних и малых амебоцитов демонстрирует большое количество обширных понижений профиля, которые обусловлены наличием у этих типов фагоцитарных вакуолей и лизосом. Микрорельеф поверхности целомоцитов этого типа отличается однородностью. Среди показателей шероховатости не отмечали значительного размера возвышений или понижений микропрофиля.

Неамебоциты и хлорогенные клетки отличались повышенными показателями шероховатости поверхности. У НА отметили высокие показатели максимальной высоты и понижения микрорельефа поверхности. Микрорельеф хлорогенных клеток демонстрировал многочисленное количество выпячиваний и понижений, размером до 1 μm (рис. 47-48).

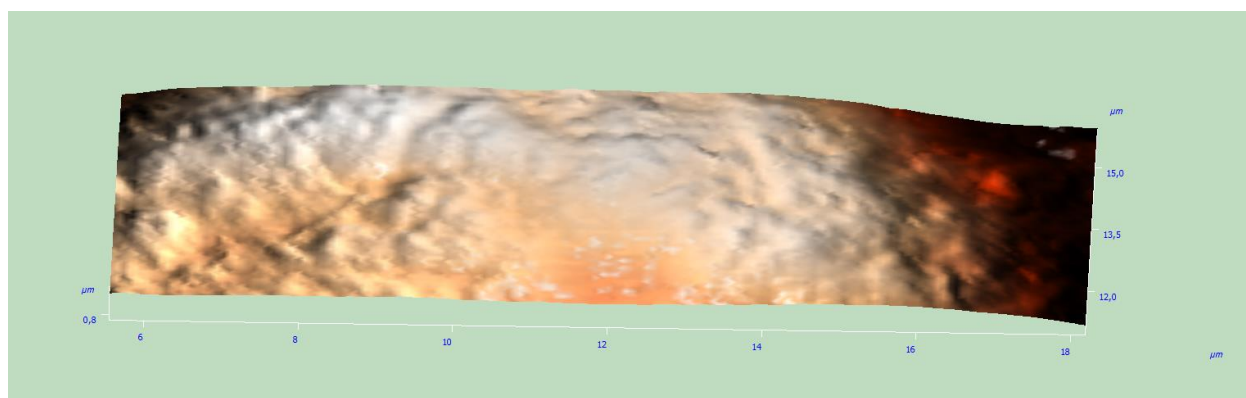


Рис. 47. Трехмерное изображение топографии поверхности целомоцита *O. complanatum* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в изоосмотических условиях

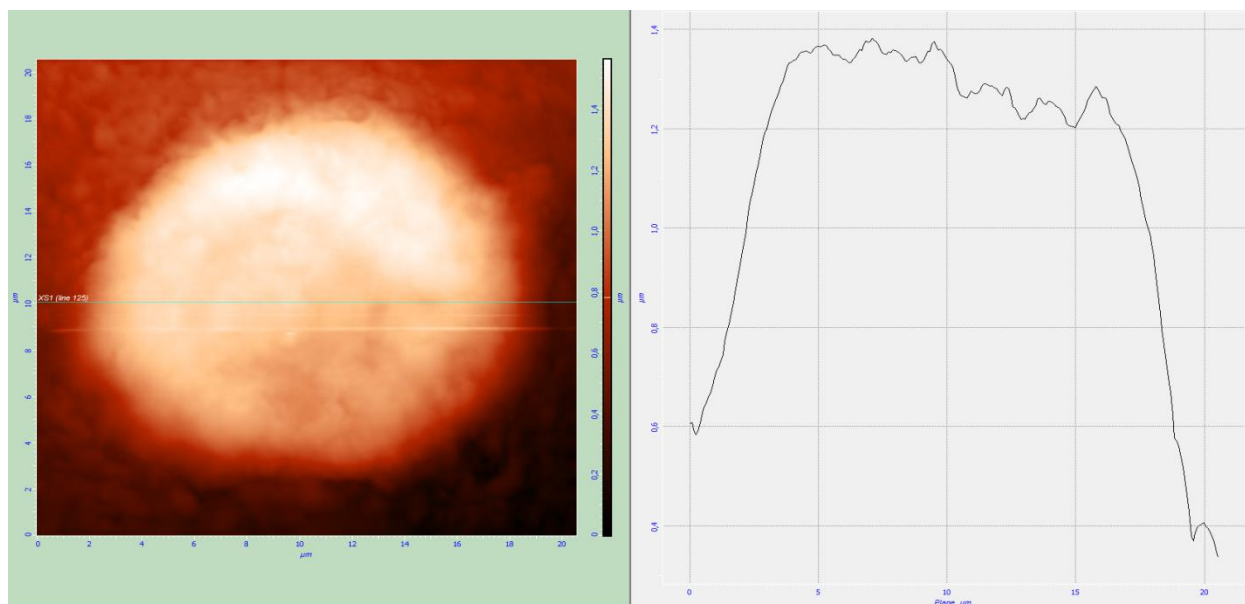


Рис. 48. Двухмерное изображение топографии поверхности целомицита *O. complanatum* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в изоосмотических условиях

В гипертонических условиях профиль целомицитов *O. complanatum* выглядит неоднородно (рис. 49).

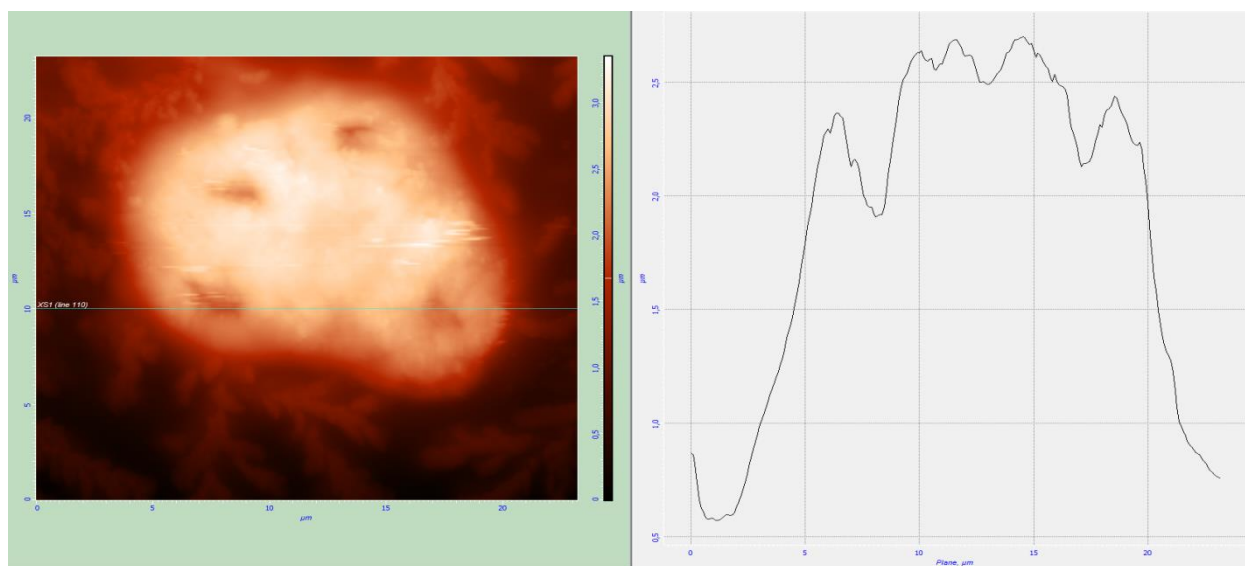


Рис. 49. Двухмерное изображение топографии поверхности целомицита *O. complanatum* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гипертонической нагрузки

На поверхности появляются крупные выпячивания и впадины. Одновременно, микрорельеф всех типов клеток сглаживается. Количество возвышений на единицу поверхности и их кривизна увеличилось у СА, МА и ХЛ. Большие амебоциты демонстрировали снижение значений этих параметров.

В условиях сниженного осмотического давления отметили однородное строение поверхности целомацитов *O. complanatum*. Значительные перепады профиля по высоте отсутствовали (рис. 50). Микрорельеф хлорогенных клеток принял более однородный характер, показатели шероховатости у этого типа клеток значительно снизились. Мембрана неамебоцитов приобрела в гипотонической среде большее количество микровозвышений и микровпадин рельефа. Значение плотности пиков на единицу поверхности увеличилось у неамебоцитов и МА.

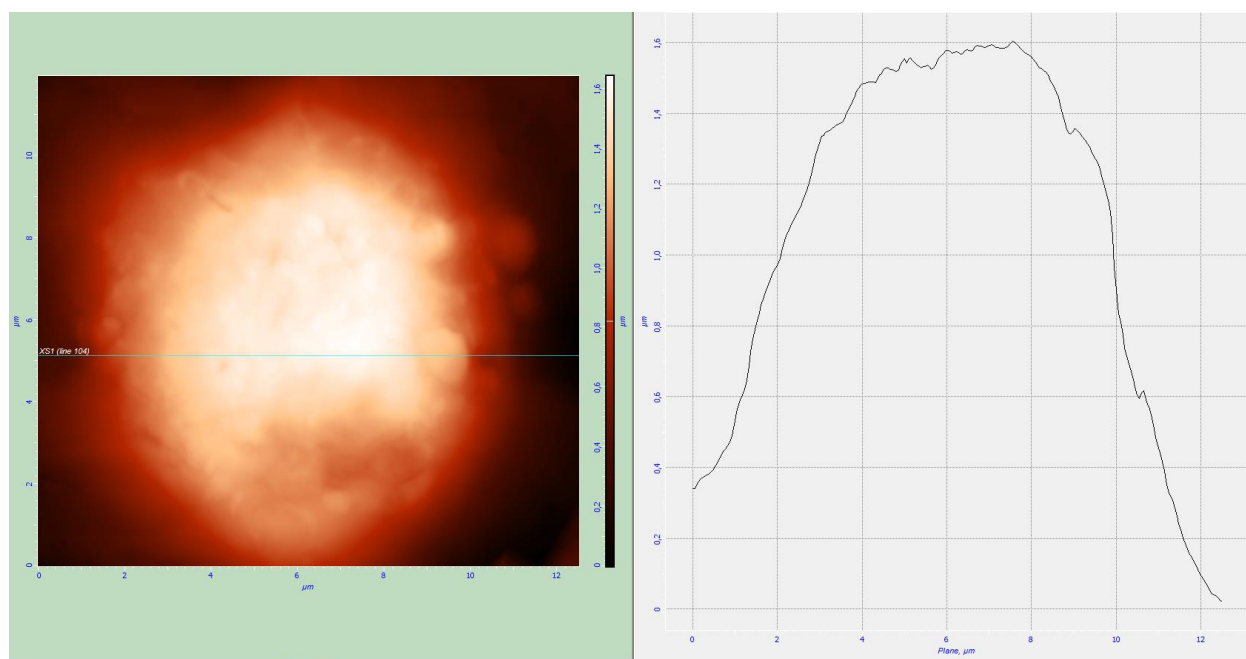


Рис. 50. Двухмерное изображение топографии поверхности целомацита *O. complanatum* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гипоосмотической нагрузки

В изотонической среде микрорельеф целоцитов *A. caliginosa* отличается низкими показателями шероховатости, без значительных повышений и выпячиваний мембраны (табл. 33). Наибольшая плотность и кривизна отклонений профиля микрорельефа зафиксирована у больших амебоцитов.

Популяция целоцитов *A. caliginosa* имеет сходное морфологическое строение поверхности. Только у неамебоцитов отметили наличие обширных вакуолей и выпячивание гранул (рис. 51). Хлорогеновые клетки внешне имели типичное строение с понижением общего профиля в области ядра. Гранулы этого типа клеток располагались плотно.

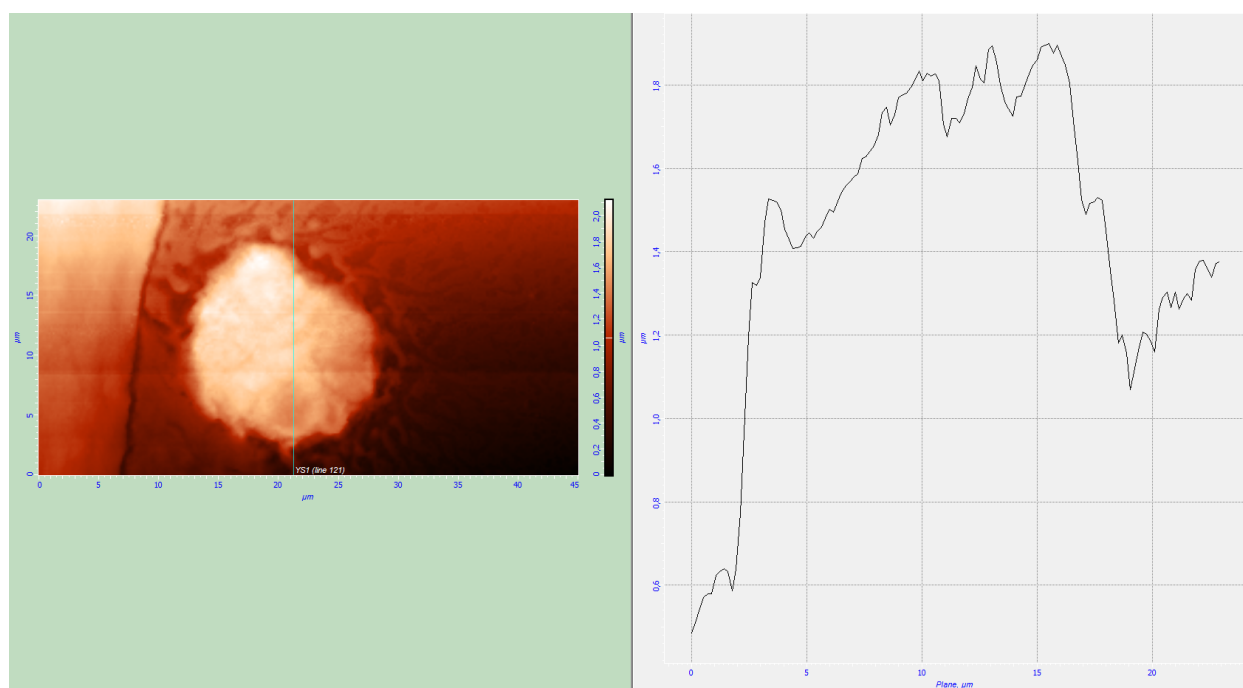


Рис.51. Двухмерное изображение топографии поверхности целоцита *A. caliginosa* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в изотонических условиях

Показатели неоднородности микрорельефа поверхности целомацитов
A. caliginosa в условиях измененного осмотического давления

Показатели	БА	СА	МА	НА	ХЛ
Изотоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,12±0,05	0,09±0,02	0,13±0,05	0,15±0,007	0,15±0,002
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,09±0,01	0,07±0,01	0,11±0,04	0,12±0,01	0,12±0,007
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,06±0,12	1,61±0,07	1,31±0,12	1,31±0,04	1,66±0,06
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,19±0,05	0,95±0,14	0,54±0,12	0,39±0,03	0,96±0,06
Sds, плотность пиков, 1/um·um	7,23±0,45	0,89±0,01	0,82±0,09	1,56±0,53	0,72±0,03
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	17,47±1,23	1,49±0,01	1,39±0,21	2,32±0,54	1,11±0,15
Гипотоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	0,16±0,03	0,09±0,006	0,14±0,01	0,16±0,03	0,12±0,02
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,13±0,02	0,07±0,005	0,11±0,01	0,13±0,01	0,095±0,01
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,51±0,05*	1,13±0,10	1,04±0,03	1,67±0,41	0,85±0,03*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,66±0,02*	0,48±0,03	0,15±0,06*	0,72±0,28	0,21±0,04*
Sds, плотность пиков, 1/um·um	9,95±0,84	7,33±0,38*	10,56±2,09*	9,53±0,13*	5,53±0,02*
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	20,64±0,25	12,01±3,08*	41,15±1,75*	21,18±0,83*	13,98±0,24*
Гипертоническая среда					
Sq, среднеквадратическая шероховатость поверхности, nm	1,12±0,03*	2,11±0,01*	2,44±0,15*	0,18±0,03	0,15±0,05
Sa, средняя шероховатость поверхности, nm	0,99±0,12*	1,09±0,01*	1,49±0,06*	0,13±0,01	0,12±0,02
Sp, высота самого высокого пика, nm	1,43±0,20	0,69±0,08*	2,18±0,63*	1,29±0,15	0,79±0,01*
Sv, глубина самой глубокой впадины, nm	0,59±0,01*	1,16±0,09	0,69±0,07	0,04±0,01*	0,19±0,03*
Sds, плотность пиков, 1/um·um	9,78±0,84	10,59±0,14*	6,89±1,48*	8,82±0,71*	8,03±0,02*
Ssc, средняя кривизна вершины, nm	22,68±0,53*	27,21±1,30*	24,98±2,85*	24,54±1,45*	27,25±1,28*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлороггенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

В гипотонической среде показатели микрорельефа значительно не менялись и общий профиль целоцитов сохранялся (рис. 52). Необходимо отметить, увеличение количества выпячиваний на единицу площади и их кривизны после инкубации клеток в условиях пониженной солености.

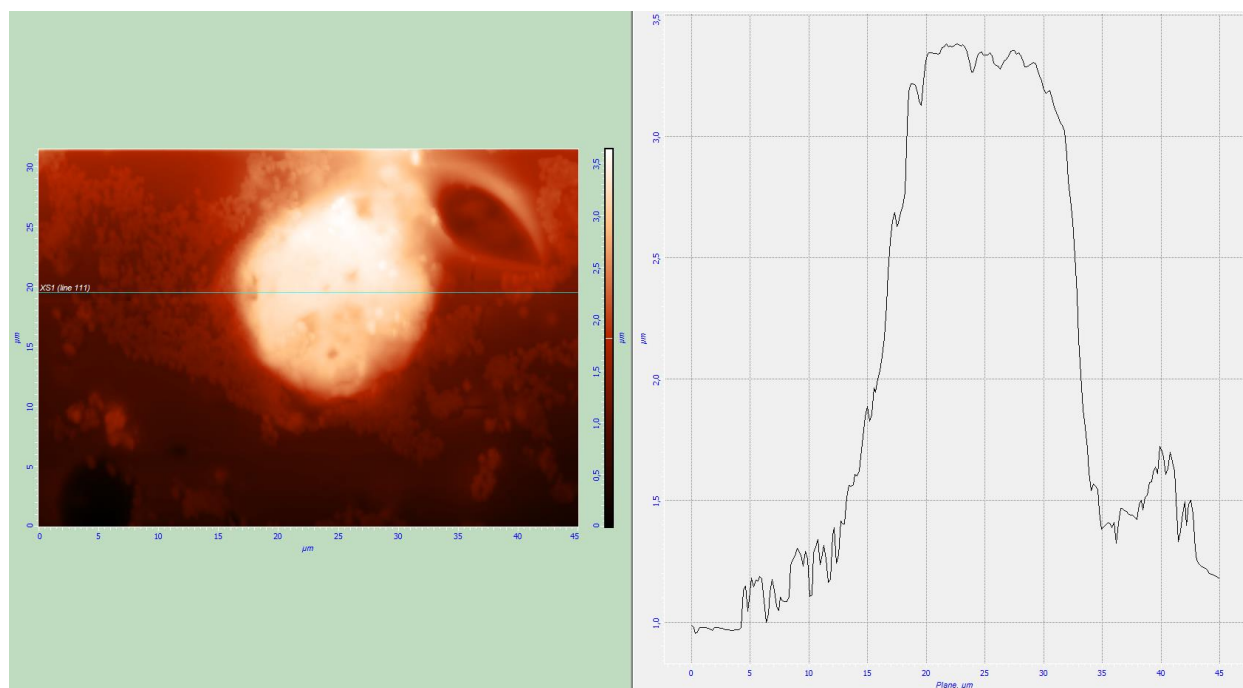


Рис. 52. Двухмерное изображение топографии поверхности целоцита *A. caliginosa* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гипосмотической нагрузки

В условиях повышенного осмотического давления отметили увеличение показателей шероховатости поверхности у всех типов амeboцитов *A. caliginosa* (рис. 53). Увеличение количества неровностей микрорельефа не отразилось на их высоте. Однако, изменение осмотического давления отражалось на средней кривизне неровностей поверхности.

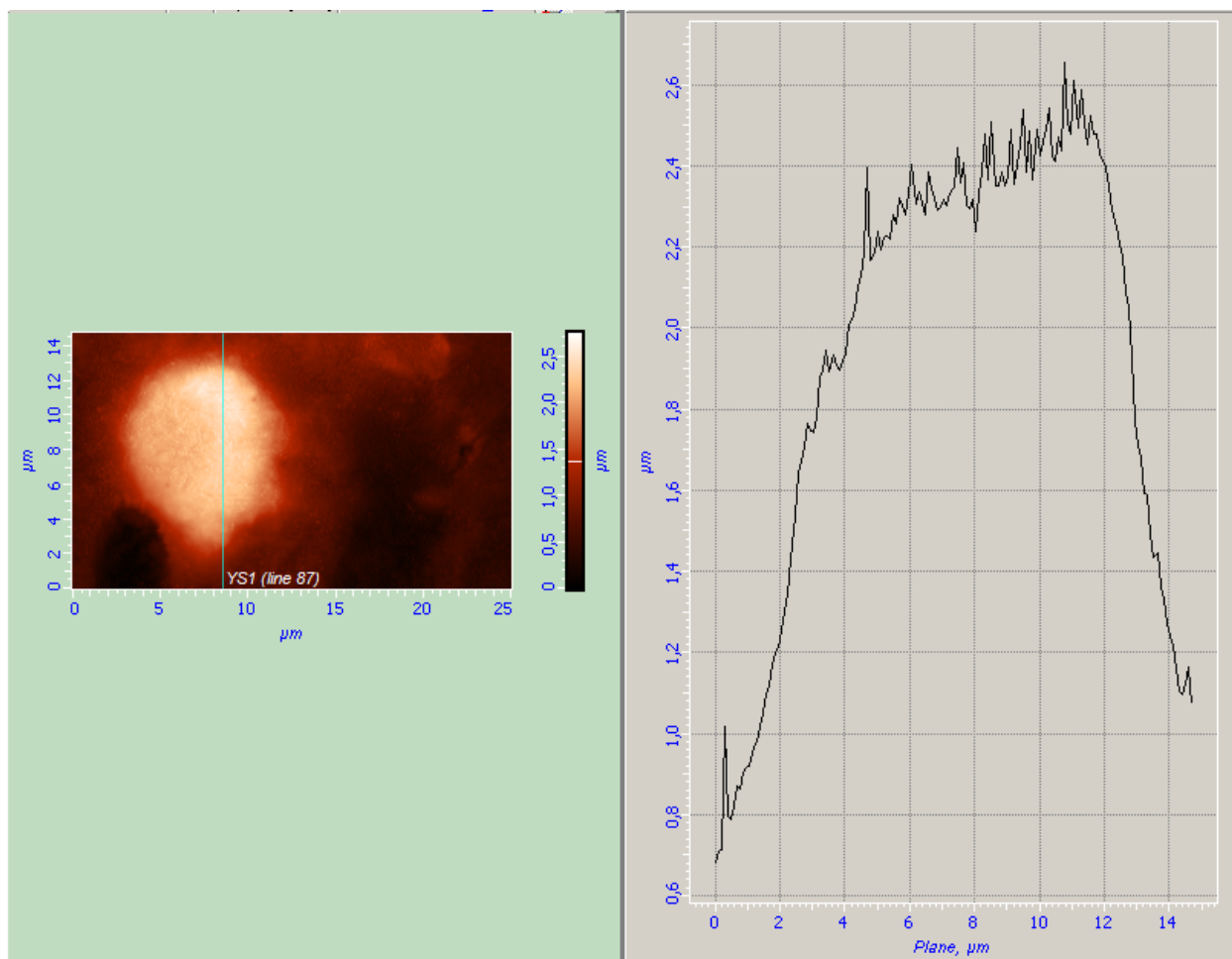


Рис. 53. Двухмерное изображение топографии поверхности целомоцита *A. caliginosa* (вид сверху) (СЗМ «ИНТЕГРА Вита» фирмы НТ-МДТ, Россия) и сечение вдоль плоскости, проходящей перпендикулярно поверхности клетки (получено с помощью ПО Nova) в условиях гиперосмотической нагрузки

3.2.3. Осморегуляторные реакции целомоцитов представителей подкласса *Oligochaeta*

При инкубации целомоцитов *E. rosea* в условиях повышенного и пониженного осмотического давления у всех типов клеток наблюдали увеличение линейных размеров (кроме хлорогеноцитов), которое не всегда приводило к увеличению объема. В гипотонических и гипертонических условиях большие и средние амебоциты распластывались по подложке и не задействовали мембранный резерв (табл. 34). Максимальное увеличение показателей объема отметили у НА, объем которых возрастал практически в два раза.

Таблица 34

Объем и резерв мембраны целомоцитов *E. rosea* в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Объем (изотоническая среда, μm^3)	Объем (гипотоническая среда, μm^3)	Объем (гипертоническая среда, μm^3)	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, μm^3	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %
БА	973,65±45,67	944,95±31,72	928,51±28,11	0	0
СА	464,33±39,15	463,65±40,81	506,52±25,72	0	0
МА	268,25±58,98	326,42±26,11	234,28±33,45	58,17±4,72	21,7
НА	124,83±27,47	242,08±23,63*	179,15±21,49	117,25±11,60	93,9
ХЛ	75,94±5,41	95,25±6,65*	90,08±8,51	19,31±2,15	25,42

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

Амебоциты клеточной популяции *E. fetida* увеличивались в размерах, как в гипотоническом, так и в гипертоническом растворе (табл. 35).

Таблица 35

Объем и резерв мембраны целомоцитов *E. fetida* в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Объем (изотоническая среда, μm^3)	Объем (гипотоническая среда, μm^3)	Объем (гипертоническая среда, μm^3)	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, μm^3	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %
БА	162,97±6,69	243,16±51,19*	194,75±10,76*	80,91±9,46	42,2
СА	52,32±3,11	84,24±10,38*	161,89±9,64*	31,92±3,29	61
МА	20,65±3,12	34,82±5,65*	56,34±3,45*	14,26±2,01	69,35
НА	41,56±4,56	60,41±4,91*	60,56±10,01*	18,85±2,78	45,35
ХЛ	420,11±18,34	670,71±66,28*	367,19±40,49	250,6±22,13	59,7

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

Неамебоциты и хлорогенные клетки не изменяли линейных параметров в условиях пониженного осмотического давления, а в гипертоническом растворе сжимались и уменьшались. Объем клеток увеличивается при изменении концентрации раствора как в сторону увеличения, так и – уменьшения. Значения показателя упругости клеточной мембраны

увеличиваются в гипотонической среде и сильно увеличиваются в условиях гипертонии, которые раздувались и приобретали сферическую форму.

Объем хлорогенных клеток в гипотонических условиях значительно увеличивается (около 60%), целоциты округляются и теряют ложноножки. В условиях повышенного осмотического давления целоциты уменьшаются в объеме. Морфологически хлорогеноциты можно разделить на два типа: первые – уплощаются в дорзо-вентральном направлении и адгезируются к субстрату, вторые – округляются и располагаются во взвешенном состоянии в целомической жидкости. Целоциты этого представителя рода *Eisenia* увеличивали линейные размеры при изменении осмотического давления, максимальное увеличение объема наблюдали у НА в гипертонической среде.

Изменение концентрации раствора вело к увеличению показателей объема всех типов целоцитов *E. nordenskioldi*. Значительное увеличение объема в гипертонических условиях наблюдали у больших амебоцитов. Средние амебоциты не реагировали увеличением показателей объема на изменение осмотического давления раствора. Малые амебоциты слабо увеличивались в объеме в гипотонических условиях и сильно – в гипертонических (табл. 36).

Таблица 36

Объем и резерв мембраны целоцитов *E. nordenskioldi* в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Объем (изотоническая среда, μm^3)	Объем (гипотоническая среда, μm^3)	Объем (гипертоническая среда, μm^3)	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, μm^3	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %
БА	180,35±9,88	192,14±14,42	248,51±10,56*	11,79±2,47	6,53
СА	147,58±8,61	156,31±20,41	142,05±21,65	8,73±1,90	5,91
НА	41,85±8,43	68,52±5,11*	78,61±12,61*	26,67±4,53	63,72

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; НА – Не амебоциты; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

Для целоцитов *E. gordejefi* характерно увеличение линейных размеров амебоцитов при помещении в гипотонические, а неамебоцитов – в

гипертонические условия среды. Наибольшее увеличение объема в гипотонических условиях можем наблюдать у МА и НА. При повышении солености объем целооцитов снижается (табл. 37).

Таблица 37
Объем и резерв мембраны целооцитов *E. gordejjeffi* в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Объем (изотоническая среда, μm^3)	Объем (гипотоническая среда, μm^3)	Объем (гипертоническая среда, μm^3)	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, μm^3	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %
БА	420,51±32,43	395,12±31,21	220,72±10,31*	0	0
СА	243,65±43,54	266,84±22,17	127,96±25,61*	23,19±3,45	9,51
МА	35,92±2,43	61,31±7,97*	37,45±3,21	25,39±3,69	70,68
НА	118,07±17,81	189,09±22,29*	74,24±11,36*	71,02±6,13	60,15
ХЛ	508,48±2,35	487,81±16,73*	361,89±4,51	0	0

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

Для целооцитов *E. tetraedra* характерным является увеличение линейных размеров и объема клетки в гипотонических условиях и уменьшение в гипертонических (табл. 38). После инкубации клеток в гипотоническом растворе наблюдали небольшое увеличение показателей. В гипертонической среде объем клеток уменьшается.

Таблица 38
Объем и резерв мембраны целооцитов *E. tetraedra* в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Объем (изотоническая среда, μm^3)	Объем (гипотоническая среда, μm^3)	Объем (гипертоническая среда, μm^3)	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, μm^3	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %
БА	230,93±11,18	263,27±7,01*	222,04±5,17	32,34±4,39	14,01
СА	170,83±3,76	178,32±1,88*	128,75±3,06*	7,49±1,56	1,04
МА	78,74±3,46	105,36±5,82*	104,62±3,44*	26,62±4,41	33,42
НА	58,05±4,81	52,91±2,04	50,65±4,59	-	-
ХЛ	351,24±11,03	391,32±12,31*	333,43±7,12	40,08±7,19	11,41

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

Линейные размеры целомацитов *L. terrestris* увеличиваются в условиях пониженного и повышенного осмотического давления, в то время как увеличение объема наблюдается только в первом случае (табл. 39).

Таблица 39
Объем и резерв мембраны целомацитов *L. terrestris* в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Объем (изотоническая среда, μm^3)	Объем (гипотоническая среда, μm^3)	Объем (гипертоническая среда, μm^3)	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, μm^3	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %
БА	315,21±32,4	423,74±54,93*	311,56±36,58	108,53±12,92	26
СА	153,30±25,12	160,79±30,87	145,19±25,03	7,49±1,09	5
МА	69,04±10,07	97,94±13,49*	83,18±14,02	28,9±4,83	29
НА	245,27±8,25	301,49±35,72*	235,40±23,65	56,22±6,58	18
ХЛ	533,35±20,44	506,31±33,96	441,742±25,21*	27,04±4,03	6

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

Объем целомацитов *L. castaneus* значительно меняется после инкубации в растворах различной концентрации. Значения объема увеличивались в гипотонической среде у всех клеточных типов, за исключением малых амебоцитов. В гипертонических условиях хлорогенные клетки увеличивались в объеме, а целомациты остальных клеточных типов наоборот уменьшались в объеме или совсем не менялись (табл. 40).

Таблица 40
Объем и резерв мембраны целомацитов *L. castaneus* в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Объем (изотоническая среда, μm^3)	Объем (гипотоническая среда, μm^3)	Объем (гипертоническая среда, μm^3)	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, μm^3	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %
БА	245,03±14,08	384,88±33,39*	267,17±32,06	139,85±19,79	36
СА	156,01±25,76	222,23±33,11*	147,54±10,71	66,22±8,14	29
МА	90,95±10,69	94,89±21,01	80,02±17,68	3,94±1,37	04
НА	122,39±17,45	145,98±15,91	99,14±6,41*	23,59±4,23	16
ХЛ	320,84±18,03	578,52±48,12*	371,97±31,47	257,68±22,95	45

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

Для выявления способности клеток адаптироваться в условиях измененного осмотического давления вычисляли мембранный резерв, как разницу между объемом целомоцита в гипотонической среде и объемом в изотоническом растворе. Наибольшее значение мембранного резерва характерно для хлорогенных клеток, больших и средних амебоцитов. Малые амебоциты практически не меняли объем после инкубирования.

Линейные размеры и объем целомоцитов *L. rubellus* увеличиваются при инкубации в гипотонической и гипертонической среде. Максимальное увеличение демонстрируют малые амебоциты, которые увеличились на 41,56 % в гипотоническом растворе (табл. 41).

Таблица 41
Объем и резерв мембраны целомоцитов *L. rubellus* в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Объем (изотоническая среда, μm^3)	Объем (гипотоническая среда, μm^3)	Объем (гипертоническая среда, μm^3)	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, μm^3	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %
БА	656,56±23,11	725,08±28,73*	897,55±22,09*	172,47±21,45	23,80
СА	366,46±14,76	412,31±25,17*	529,04±31,45*	116,73±15,72	28,32
МА	71,31±6,81	111,86±7,65*	158,36±21,55*	46,5±5,77	41,56
НА	112,99±10,78	237,93±21,83*	259,46±20,87*	21,53±3,69	9,03
ХЛ	750,53±32,12	1344,77±69,29*	1470,45±34,56*	125,68±17,92	9,34

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

Целомоциты типа ХЛ уменьшались в объеме почти на 50 %, клетки приобретали компактную форму, а гранулы более плотно располагались в цитоплазме. У хлорогенных клеток фиксировали увеличение спонтанного распада клеток с выделением бурых хлорогенных гранул при изменении осмотического давления среды.

Отмечали достоверное уменьшение объема целомоцитов *A. caliginosa* в гипертонических условиях (табл. 42). Показатели объема снижались практически у всех клеток в 2 раза. В гипотонических условиях наблюдали

небольшое увеличение параметров, которые не являются достоверными, и уменьшение объема у СА и МА.

Таблица 42

Объем и резерв мембраны целомацитов *A. caliginosa* в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Объем (изотоническая среда, μm^3)	Объем (гипотоническая среда, μm^3)	Объем (гипертоническая среда, μm^3)	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, μm^3	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %
БА	496,31±30,56	514,2±8,56	246,58±12,64*	17,89±4,81	3,61
СА	255,16±12,34	247,24±27,69	133,34±14,02*	0	0
МА	154,29±15,29	165,42±26,65	82,88±4,64*	10,95±2,38	7,09
НА	365,59±19,92	356,05±37,17	197,28±17,89*	0	0
ХЛ	709,01±29,62	767,04±61,04	374,43±22,75*	58,03±7,39	8,18

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

В условиях повышения солености объем всех типов целомацитов *O. complanatum* уменьшался. После инкубации в гипотонических условиях отмечали достоверное увеличение объема целомацитов типа БА и уменьшение – МА (табл. 43).

Таблица 43

Объем и резерв мембраны целомацитов *O. complanatum* в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Объем (изотоническая среда, μm^3)	Объем (гипотоническая среда, μm^3)	Объем (гипертоническая среда, μm^3)	Абсолютный мембранный резерв гемоцитов, μm^3	Интенсивность использования относительного мембранного резерва гемоцитов, %
БА	242,72±22,51	328,05±25,10*	170,95±3,34*	85,33±8,63	35,15
СА	185,64±10,09	192,38±6,52	140,14±14,15*	6,14±0,58	3,63
МА	80,02±7,64	59,59±3,62*	68,59±2,76	0	0
НА	149,62±9,25	134,41±7,97	112,08±15,27*	0-	0
ХЛ	415,15±32,65	455,26±18,13	220,48±22,05*	40,11±6,44	9,66

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не Амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

3.2.4. Влияние осмотической нагрузки на упругость и адгезионные свойства плазмалеммы целомацитов представителей подкласса *Oligochaeta*

Использование атомно-силового микроскопа позволило изучить упругостные параметры целомацитов *E. rosea*, а так же силу адгезии к нанозонду в точках идентифицирования и высоту клеток. Данные представлены в сводной таблице (табл. 44). Упругостный показатель мембраны широко варьировал как в пределах одной клетки, так и среди разных типов целомацитов. Наибольший показатель адгезии зафиксирован у амeboцитов, у которых отмечали и наибольшую жесткость клеточной мембраны.

Таблица 44

Параметры клеток *E. rosea*, полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)
БА	28,58±1,01	7,08±0,45	19,29±1,11*	14,21±0,72*	64,10±3,51*	5,91±0,58*
СА	26,57±0,98	6,53±1,22	21,71±0,72*	15,92±4,02*	39,92±1,71*	19,67±0,52*
МА	25,29±2,61	6,63±1,09	21,02±0,03*	15,33±3,27*	38,81±4,35*	10,97±1,06*
НА	34,15±2,81	14,48±1,35	28,83±1,36*	11,62±0,81*	56,98±4,15*	5,91±0,51*
ХЛ	26,28±3,01	6,72±0,52	29,97±1,17	14,73±0,94*	19,12±1,26*	6,38±1,01

Примечание: БА – Большие Амeboциты; СА – Средние Амeboциты; МА – Малые Амeboциты; НА – Не амeboциты; ХЛ – хлорогеновые клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

Влияние осмотического давления на упругостные свойства клеток выражалось в некотором снижении упругости мембраны в гипотонической среде и резком увеличении – в гипертоническом растворе. Хлорогеноциты демонстрировали обратную тенденцию – при повышении концентрации раствора, упругость этих клеток уменьшалась. Показатели адгезии к нанозонду увеличивались у всех клеточных типов в гипотонической среде, а у целомацитов СА и МА адгезия возрастала при любом изменении солёности среды.

Использование атомно-силового микроскопа позволило изучить упругостные параметры целомацитов *E. fetida*, а так же силу адгезии к нанозонду в точках идентифицирования и высоту клеток. После анализа полученных результатов, можно отметить высокий показатель адгезии и жесткости клеточной мембраны амебоцитов (табл. 45). Адгезия мембраны клеток нанозонду снижается при изменении концентрации раствора.

Таблица 45

Параметры клеток *E. fetida*, полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)
БА	39,88±5,61	72,24±5,65	47,76±1,28*	22,88±3,81*	73,47±5,67*	31,22±2,19*
СА	31,48±5,69	69,32±8,05	45,21±5,08*	21,72±2,32*	71,14±4,01*	36,06±1,35*
МА	12,11±1,48	57,4±3,28	53,12±3,48*	20,57±2,45*	62,15±5,27*	36,35±2,34*
НА	11,66±0,75	60,91±6,28	22,31±5,36*	33,24±1,57*	81,95±5,12*	25,78±2,88*
ХЛ	14,11±1,37	60,81±4,18	32,02±5,09*	16,33±2,57*	79,39±2,29*	27,28±0,61*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

Использование атомно-силового микроскопа позволило изучить упругостные параметры целомацитов *E. nordenskioldi*, а так же силу адгезии к нанозонду в точках идентифицирования и высоту клеток. Для амебоцитов *E. nordenskioldi* характерна высокая жесткость мембраны. Большие амебоциты являются наиболее высокими клетками в популяции целомацитов (табл. 46).

Таблица 46

Параметры клеток *E. nordenskioldi*, полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)
БА	27,56±3,67	17,36±1,97	39,25±3,31*	15,91±2,98	52,02±2,67*	15,37±3,91
СА	29,07±3,35	12,41±3,94	53,38±4,11*	15,12±1,02	62,87±1,08*	17,14±0,53*
НА	26,73±2,92	12,93±2,44	45,86±2,79*	14,18±3,21	66,98±5,32*	14,26±0,19

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; НА – Не Амебоциты; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

Использование атомно-силового микроскопа позволило изучить упругостные параметры целомацитов *E. gordejefi*, а так же силу адгезии к нанозонду в точках идентифирования и высоту клеток. Большие и маленькие амебоциты обладают наибольшей жесткостью, отмечена относительная равномерность распределения показателя адгезии среди популяции целомацитов (табл. 47).

Таблица 47

Параметры клеток *E. gordejefi*, полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)
БА	29,70±1,82	8,46±1,23	50,91±5,87*	14,96±4,39	40,38±7,11*	11,58±1,61*
СА	15,93±2,31	8,37±1,82	50,53±3,99*	19,51±6,58	42,07±4,65*	10,72±0,78*
МА	16,48±1,63	8,46±2,09	46,73±3,76*	20,53±3,48*	39,11±3,47*	11,99±1,27*
НА	14,09±2,75	7,31±1,23	51,31±2,12*	16,84±0,57*	40,39±4,32*	11,45±0,56*
ХЛ	25,59±3,82	12,99±2,07	57,26±4,12*	12,27±2,11	33,94±1,59*	17,71±0,17*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

Использование атомно-силового микроскопа позволило изучить упругостные параметры целомацитов *E. tetraedra*, а так же силу адгезии к нанозонду в точках идентифирования и высоту клеток. Отметим высокий показатель адгезии клеточной мембраны к зонду и упругости. Сохраняется тенденция сохранения максимального показателя жесткости среди популяции больших амебоцитов (табл. 48).

В условиях гипертонической и гипотонической нагрузки отметили снижение модуля упругости клеточной мембраны целомацитов *L. terrestris*. Показатель адгезии не изменялся после инкубации клеток в растворах различной концентрации (табл. 49).

Параметры клеток *E. tetraedra*, полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)
БА	55,07±2,35	23,25±0,37	22,52±2,68*	10,18±0,54*	55,90±0,33	14,15±0,45*
СА	51,42±3,32	23,13±0,48	29,64±3,05*	7,99±2,27*	50,04±3,15	9,63±3,37*
МА	48,27±2,11	22,71±1,08	27,89±5,31*	7,76±2,04*	62,91±4,27*	15,73±0,94*
НА	40,81±3,14	20,11±0,58	18,28±1,02*	6,78±0,34*	27,69±4,31*	18,34±0,63
ХЛ	56,31±2,32	21,04±2,19	25,16±0,94*	10,34±1,24*	38,26±4,12*	20,45±3,21

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогеновые клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента

При инкубации в гипотонических условиях, происходит увеличение линейных размеров и объема клеток целомической жидкости *L. castaneus* (табл. 50). Жесткость клеточной мембраны снижается в гипотонических и сильно уменьшается в гипертонических условиях среды, адгезия мембраны к зонду также падает при изменении концентрации.

Параметры клеток *L. terrestris*, полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)
БА	63,46±4,66	15,91±4,32	43,36±3,91*	14,83±2,91	35,28±4,05*	13,45±2,34
СА	51,16±7,07	17,07±3,37	46,34±2,75*	13,31±1,83	33,09±5,32*	16,45±4,27
МА	59,71±2,31	14,85±2,75	45,51±7,10*	16,08±3,35	32,32±1,11*	16,89±4,87
НА	69,29±1,35	15,01±0,57	36,20±1,19*	14,97±2,09	42,37±3,63*	12,61±1,35
ХЛ	70,06±0,93	14,09±4,79	46,77±4,15*	18,87±1,33*	42,21±3,27*	12,84±1,46

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогеновые клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Инструментально исследовать динамику субмембранных структур целоцитов *L. rubellus* возможно с использованием атомно-силовой микроскопии. Значения упругости и адгезии определены у всех клеточных типов в условиях изменения среды (табл. 51). Наибольшее значение характерно для хлорогеновых клеток при инкубации в гипотонической среде, а

наименьшее значение соответствует хлорогеноцитам и неамебоцитам экспонированным в условиях повышенного осмотического давления.

Таблица 50

Параметры клеток *L. castaneus*, полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)
БА	40,97±3,31	32,91±4,11	22,68±1,53*	14,84±2,46*	10,68±2,07*	14,87±3,42*
СА	45,41±6,08	28,95±4,58	22,16±3,74*	14,68±3,41*	11,87±1,76*	14,32±2,35*
МА	43,95±10,65	49,07±7,85	22,76±3,66*	13,81±1,42*	11,94±2,34*	15,44±1,73*
НА	38,06±6,46	38,56±3,88	20,51±7,02*	11,84±1,41*	12,77±0,25*	15,92±1,38*
ХЛ	40,37±7,34	68,53±3,69	18,16±6,78*	15,67±0,76*	15,37±3,21*	15,63±4,03*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенозные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

В целом для гипертонии характерно снижение значения модуля Юнга. В гипотонических условиях по сравнению с физиологическими снижается упругость хлорогеноцитов, но повышается больших и средних амебоцитов, что может быть связано с увеличением активности этих клеточных типов.

Таблица 51

Параметры клеток *L. rubellus*, полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (kPa)	Адгезия к нанозонду (nN)
БА	64,98±4,98	13,77±1,95	50,91±4,18*	12,82±3,12	6,73±0,54*	30,41±2,31*
СА	69,47±4,93	13,03±3,05	49,89±1,57*	12,85±1,76	9,06±0,25*	11,52±2,36
МА	63,11±4,11	12,53±4,48	41,02±1,97*	15,31±2,83	7,78±0,54*	11,61±1,68
НА	65,06±0,69	17,09±1,88	8,44±1,68*	12,67±0,45*	9,71±1,68*	12,38±2,04*
ХЛ	65,76±2,34	14,45±2,34	29,28±3,94*	13,54±0,68	10,08±1,23*	8,44±1,14*

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не амебоциты; ХЛ – хлорогенозные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

В гипотонических условиях наблюдали динамику активности целомацитов *O. complanatum*. Микрорельеф клеток приобретал более сложное строение. Гипотонические условия активировали способность целомацитов

распластываться, но этот процесс при снижении осмотического давления происходит более медленно, чем при повышении. В гипертонической среде амебоциты сильно увеличивали линейные размеры, но объем их значительно уменьшался. Упругостные свойства целоцитов увеличивались при любом изменении осмотического давления. Адгезия клеток к нанозонду не менялись при помещении в условия измененной концентрации (табл. 52).

Таблица 52

Параметры клеток *O. complanatum*, полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях осмотической нагрузки

Тип клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)
БА	56,83±3,71	11,28±1,75	67,65±2,34*	12,76±1,21	65,29±7,84	11,55±0,06
СА	51,39±2,27	10,53±2,61	60,75±5,82	10,95±1,59	13,08±2,46*	8,60±0,72*
МА	52,47±2,71	11,46±1,04	63,41±6,77	9,93±1,54	70,89±4,03*	11,34±2,61
НА	55,03±2,37	10,79±1,01	67,99±5,64*	15,77±1,71*	69,17±3,64*	10,48±1,25
ХЛ	53,52±5,38	11,65±1,01	71,65±4,35*	12,77±1,08*	49,22±3,49*	9,72±1,36

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не Амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Изменение осмотического давления не отразилось на изменении упругостных показателей целоцитов *A. caliginosa*. Показатели адгезии клеток к нанозонду в условиях измененного осмотического давления увеличились (табл. 53).

Таблица 53

Параметры клеток *A. caliginosa*, полученные с применением атомно-силовой микроскопии в условиях измененного осмотического давления

Тип клеток	Изотоническая среда		Гипотоническая среда		Гипертоническая среда	
	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)	Модуль упругости (кПа)	Адгезия к нанозонду (nN)
БА	41,63±3,44	9,97±2,11	40,87±1,76	12,06±1,31	39,46±1,34	12,02±1,25
СА	42,53±1,99	7,91±1,12	39,99±12,55	12,78±1,09	35,11±0,79	16,06±0,68*
МА	43,43±2,58	8,62±0,71	41,32±3,31	17,99±1,75*	37,81±1,01	11,68±0,87*
НА	39,85±0,57	8,35±1,11	40,23±0,42	12,81±1,35*	36,18±1,18	14,84±2,12*
ХЛ	38,18±11,01	11,21±3,41	39,58±2,02	15,67±2,41*	32,14±0,25	12,65±1,51

Примечание: БА – Большие Амебоциты; СА – Средние Амебоциты; МА – Малые Амебоциты; НА – Не Амебоциты; ХЛ – хлорогенные клетки; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Анализ действия осмотической нагрузки на клеточные элементы циркулирующих жидкостей представителей класса Clitellata

4.1.1. Динамика морфометрических характеристик гемоцитов (целоцитов) при действии осмотической нагрузки

Воздействие измененного осмотического давления на клеточные элементы системы распределения представителей класса Clitellata не имеет однозначных последствий. Морфологическая и функциональная реакция клеток варьирует у представителей различных видов животных и типов форменных элементов.

У исследованных целоцитов определены линейные размеры. Наименьшие линейные размеры отмечены у гемоцитов пиявок. Большие амебоциты достигали максимального размера у *H. medicinalis*, их размер составлял $10,93 \pm 1,13 \text{ }\mu\text{m}$, в то время как размер больших амебоцитов малой ложноконской и большой ложноконской был равен $7,36 \pm 0,87 \text{ }\mu\text{m}$ и $6,61 \pm 0,42 \text{ }\mu\text{m}$ соответственно. Линейные размеры средних амебоцитов у всех представителей *Hirudinidae* не отличались достоверно. Малые амебоциты, которые отмечены только у большой и малой ложноконских пиявок, составляющие значительную часть популяции гемоцитов (у медицинской пиявки эта роль отводится средним амебоцитам, которые разнообразны по размерам) крупнее у *E. octoculata*. Гемоциты, не относящиеся к амебоцитам, обнаружены только у малой ложноконской и медицинских пиявок. Элеоциты *E. octoculata* имели размер $6,58 \pm 0,21 \text{ }\mu\text{m}$ и морфологически напоминали хлорогеновые клетки олигохет. У *H. medicinalis* отмечены элеоциты размером $6,13 \pm 1,72 \text{ }\mu\text{m}$, гранулы которых морфологически отличались от хлорогеновых. Хлорогеновые клетки всех представителей аннелид содержат желто-бурые гранулы, поэтому при отсутствии

последних и способности менять форму целооциты относили к неамебоцитам (НА).

Остальные представители аннелид для удобства обсуждаются группами, составляющими один род. *L. rubellus*, *L. castaneus*, *L. terrestris* относятся к роду *Lumbricus*. В популяции целооцитов исследованных представителей выделили пять типов клеток. Наибольшие линейные размеры отмечали у хлорогеноцитов. Хлорогеноциты происходят из хлорогеноцитной ткани червей, которая окружает кишку. Главной функцией этого типа считают накопление и запас питательных веществ. Хлорогеноциты впервые описаны у *L. terrestris* (Linthicum D.C. et al., 1977). Этот тип клеток отличается разнообразием размеров и форм целооцитов, мы не отметили соотношения размера клеток и видовой принадлежности животного. Наибольший размер имели хлорогеноциты *L. terrestris* – 22,59 μm . Diogene на основе метода проточной цитометрии разделил популяцию целооцитов *L. terrestris* на 7 клеточных субпопуляций, которые отличались размерами. Большие клетки с гранулами имели около 29 μm в диаметре и составляли 3% от всего количества целооцитов (Diogene J. et. al., 1997). При старении или изменении условия среды наблюдается спонтанный распад целооцитов типа 5, а хлорогеноцитные гранулы заполняют целомическую жидкость (Cooper et al. 1995). Собственные наблюдения позволили отметить морфологическое сходство хлорогеноцитных гранул с гранулами гемоглобина, которые содержатся в большом количестве в крови любрицид.

Размеры хлорогеноцитов *L. castaneus* и *L. rubellus*, меньше и составляют $16,86 \pm 5,98 \mu\text{m}$ и $10,41 \pm 0,31 \mu\text{m}$ соответственно. Объем хлорогеноцитов сильно варьирует от $750,53 \pm 32,12 \mu\text{m}^3$ (*L. rubellus*) до $320,84 \pm 18,03 \mu\text{m}^3$ (*L. castaneus*).

Наличие в целомической жидкости и крови олигохет еще одной разновидности не амебоидных клеток (НА), ставит под сомнение наличие трофической и запасающей функции хлорогеноцитов, которая приписывается им (Ratcliffe, Rowley, Fitzgerald et al., 1985). Целооциты типа НА представителей рода *Lumbricus* имеют размеры от $8,41 \pm 0,42 \mu\text{m}$ (*L. terrestris*) до $5,62 \pm 0,23 \mu\text{m}$

(*L. rubellus*), содержат гранулы и пассивно передвигаются с током целомической жидкости. Вероятно, именно эти целомоциты выполняют трофические функции или содержат гранулы с биологически активными веществами.

Наибольший объем неамебоцитов – $245,27 \mu\text{m}^3$ зафиксировали у *L. terrestris*, а наименьший – $112,99 \mu\text{m}^3$ у *L. rubellus*.

Наличие трех типов амебоцитов является обязательным для всех представителей люмбрицид, которые отличаются не только размерами, но и активностью передвижения, способностью к фагоцитозу, характером образуемых ложноножек и др. Все представители рода *Lumbricus* в целомической жидкости содержат большие амебоидные клетки. Размер клеток снижается, а объем увеличивается в ряду *L. terrestris* – *L. castaneus* – *L. rubellus*.

Размер средних амебоцитов составил от $7,91 \pm 0,36 \mu\text{m}$ (*L. terrestris*) до $6,91 \pm 0,58 \mu\text{m}$ (*L. rubellus*).

Малые амебоциты имеют наибольшие линейные размеры у *L. castaneus* – $6,20 \pm 0,16 \mu\text{m}$, размер клеток этой субпопуляции у *L. terrestris* и *L. rubellus* достоверно не отличался. Морфологически и функционально этот тип целомоцитов одинаков у всех представителей рода *Lumbricus*.

Таким образом, наблюдали уменьшение размеров клеток целомической жидкости в ряду *L. terrestris* – *L. castaneus* – *L. rubellus*, динамика соответствует изменению размеров тела и массы червей. Обратная зависимость линейных параметров и объема амебоцитов у различных представителей люмбрицид, позволяет охарактеризовать целомоциты *L. terrestris* как более распластанные, *L. rubellus* – более сферические, при достоверно не меняющихся размерах клеток.

Среди клеток целомической жидкости *E. fetida*, *E. gordejefi*, *E. rosea*, *E. tetraedra* обнаружены большие клетки, цитоплазма которых заполнена бурыми гранулами (хлорогеноциты). Наибольший размер хлорогенозных клеток отметили у *E. tetraedra* – $30,30 \pm 5,67 \mu\text{m}$, а наименьший у *E. rosea* и *E. gordejefi* – $14,3 \pm 0,75 \mu\text{m}$ и $15,09 \pm 2,1 \mu\text{m}$ соответственно. Хлорогеноциты *E. fetida* имеют средние размеры среди описанных представителей – $20,21 \pm 3,39 \mu\text{m}$.

Valembois (1971) первыми описал хлорогеновые клетки у *E. fetida*, как крупные целомоциты с бурыми гранулами. Эти хлорогеноциты были меньше размером, чем у *L. terrestris*, но образовывали агрегаты до 100 μm в диаметре. Объем хлорогеновых клеток варьирует от $420,11 \pm 18,34 \mu\text{m}^3$ (*E. fetida*) до $973,65 \pm 45,67 \mu\text{m}^3$ (*E. rosea*).

E. fetida, которая населяет местообитания богатые перегноем, видимо не нуждается в крупных хлорогеновых клетках, которые выполняют функцию запаса питательных веществ, или функционально заменяет их крупными неамебоцитами.

Большие амебоциты *E. fetida* отличаются наименьшими размерами – $8,85 \pm 0,58 \mu\text{m}$, тогда как остальные представители рода *Eisenia* имеют БА одинакового размера. Объем больших амебоцитов изменяется от $162,97 \pm 6,69 \mu\text{m}^3$ (*E. fetida*) до $464,33 \pm 39,15 \mu\text{m}^3$ (*E. rosea*).

Размер и объем амебоцитов СА *E. fetida* был минимален среди всех исследованных средних амебоцитов – $5,3 \pm 0,34 \mu\text{m}$ и $52,32 \pm 3,11 \mu\text{m}^3$ соответственно.

По данным, полученным при помощи метода проточной цитометрии – минимальный размер клеток у *E. fetida* составляет 5 μm (Diogene J. et. al., 1997), что полностью согласуется с нашими результатами.

Объем целомоцитов типа МА минимален у *E. fetida* – $20,65 \pm 3,12 \mu\text{m}^3$. Наибольший объем отметили у *E. rosea* – $124,83 \pm 27,47 \mu\text{m}^3$.

Неамебоциты варьировали в размерах у отдельных представителей рода *Eisenia*. Наименьший диаметр имеют неамебоциты *E. tetraedra* – $4,48 \pm 0,44 \mu\text{m}$, а наибольший – *E. fetida* – $8,79 \pm 0,7 \mu\text{m}$.

Значения объема и линейных размеров не совпадают, наибольший отмечен у *E. gordejefi* – $118,07 \pm 17,81 \mu\text{m}^3$, а наименьший – *E. fetida* – $41,56 \pm 4,56 \mu\text{m}^3$, клетки которой распластывались на подложке.

У *O. tyrtaeum* и *A. caliginosa* описано 5 типов целомоцитов. Хлорогеноциты этих представителей существенно отличаются размерами $21,31 \pm 2,31 \mu\text{m}$ (*A. caliginosa*) и $14,48 \pm 3,04 \mu\text{m}$ (*O. tyrtaeum*).

Целомоциты типа БА обладают большими линейными размерами ($10,65 \pm 0,79 \mu\text{m}$) и объемом ($242,72 \pm 22,51 \mu\text{m}^3$). Не смотря на одинаковые линейные размеры большие амебоциты *O. complanatum* имеют больший объем – $496,31 \pm 30,56 \mu\text{m}^3$ среди целомоцитов исследованных представителей аннелид.

Целомоциты типа СА – средние амебоциты *A. caliginosa*, размер клеток которых составил – $9,18 \pm 0,42 \mu\text{m}$, а объем – $185,64 \pm 10,09 \mu\text{m}^3$. Амебоциты этого типа *O. complanatum* отличаются пониженной двигательной активностью, размер клеток составил – $7,31 \pm 0,24 \mu\text{m}$, а объем $255,16 \pm 12,34 \mu\text{m}^3$.

Малые амебоциты способны адгезироваться к подложке, диаметр этих клеток составляет $5,48 \pm 0,62 \mu\text{m}$ и $7,14 \pm 0,47 \mu\text{m}$ у *O. tyrtaeum* и *A. caliginosa* соответственно. Объем амебоцитов *O. tyrtaeum* практически в 2 раза больше, чем у *A. caliginosa*, что демонстрирует тенденцию целомоцитов последнего к распластыванию.

Соотношение объема и площади позволяет определить степень распластанности амебоцита. Чем меньше разница между площадью поверхности клетки и её объемом, тем более распластанное состояние ей соответствует. Объем более точно характеризует размеры внутреннего пространства амебоцита, в то время как дополнение объема линейными параметрами позволяет оценить функциональные особенности амебоцита в данный момент времени.

В целом, отмечены значительные отличия в размерах и объеме клеточных элементов подклассов Hirudinomorpha и Oligochaeta. Гемоциты пиявок обладают меньшим размером и разнообразием клеточных типов. Среди Oligochaeta наиболее крупные клеточные элементы принадлежат представителям р. *Lumbricus*.

4.1.2. Динамика линейных параметров и объема гемоцитов и целомоцитов в условиях измененного осмотического давления

Влияние изменения осмотического давления на морфофункциональные особенности клеток описано только у отдельных представителей беспозвоноч-

ных. С. Kevers, M. J. Machin и J. O'Donnell (1979) установили, что изъятые из организма *Glycera dibranchiata* (Annelida, Polychaeta) целоמוциты, после помещения их в раствор измененной концентрации, постепенно возвращаются к своим прежним размерам в гипотонических условиях. В гипертонической среде такого возврата не наблюдали, что говорит о необратимой утечке электролитов из клетки (С.Kevers et al., 1979). Исследования реакции клеток *D. polimorpha* демонстрируют сходство общих клеточных реакций пресноводных моллюсков и клителлят – сохранения подвижности в гипотонии и снижение активности в гипертонии (Присный А.А., Кулько С.В., 2013).

В природных условиях для аннелид характерны поведенческие реакции, которые препятствуют повышению и понижению осмотического давления гемолимфы. Если же организм червя попадает в условия измененной солености, то включаются системные механизмы регуляции – происходит изменение веса животных (Adolph E.F., 1927), включается регуляция осмотического давления целомической жидкости (Dietz T.N., Alvarago R.H., 1970), снижается обмен жидкостями через покровы (Carley W.W., 1975, 1978) и перестраивается механизм выделения (Maluf N.S.R., 1939; Oglesby L.C., 1978).

Аннелиды демонстрируют различные реакции на изменение осмотических условий.

Реакция на изменение осмотических условий среди гемоцитов представителей подкласса Hirudinomorpha отличалась как морфологически, так и функционально.

Все гемоциты *H. medicinalis* в условиях пониженного осмотического давления демонстрировали увеличение линейных размеров. Значительно увеличивался объем клеток, следовательно, высота гемоцитов также возрастала. Одновременно, фиксировали снижение двигательной активности и увеличение адгезии клеток к субстрату.

Гемоциты типа БА одновременно с увеличением объема на 71,61% сохраняли способность образовывать филоподии. Реакция клеток *H. sanguisuga* на снижение осмотического давления оказалась идентичной, изменение объема

гемоцитов отмечали в 2-3 раза. Поэтому можно отметить лучшую приспособленность гемоцитов *H. medicinalis* и *H. sanguisuga* к гипотоническим условиям, чем *E. octoculata*. Этот факт объясняет эврибионтность медицинской и большой ложноконской пиявок. Представители этих видов легко переносят масштабные пересыхания водоемов (прудов и болот). В то время как малая ложноконская пиявка обитает в проточных водоемах.

Увеличение солености среды вызывает уменьшение линейных параметров и объема клеток крови *H. medicinalis*. В гипертонических условиях амебоциты *E. octoculata* повышают активность и скорость адгезии к субстрату. Гемоциты типа МА снижали активность формирования филоподий. Реакция, отмеченная у МА, являлась идентичной клеткам *H. medicinalis*.

Клетки крови *H. sanguisuga* реагировали увеличением объема на гипертонические условия.

Таким образом, для гемоцитов пиявок характерно наличие нескольких типов амебоцитов, которые приспособлены к строго определенным условиям. Среди гемоцитов *E. octoculata* клетки типа БА и СА проявляют лучшие приспособления к гипертонической среде, а МА – к гипотонической. Клетки крови *Hirudo medicinalis* и *Haemopsis sanguisuga* демонстрируют хорошую адаптацию к гипертоническим условиям.

У представителей р. *Lumbricus* (*L. rubellus*, *L. castaneus*, *L. terrestris*) отметили различие в реакции амебоцитов и неамебоцитов на изменения осмотических условий среды.

Среди амебоцитов представителей р. *Lumbricus* отмечены клетки, демонстрирующие лучшую приспособленность в гипотонических, гипертонических условиях и сходно реагирующие на любое изменение солености.

Большие амебоциты в гипотонической среде увеличивают объем от 23,8 до 45 %. Увеличение объема в гипертонической среде наблюдали у больших амебоцитов *L. rubellus* и *L. castaneus*.

Целомоциты типа СА *L. rubellus* и *L. terrestris* в гипотонических условиях принимали сферическую форму, адгезия отсутствовала. Наблюдали увеличе-

ние объема от 5% у средних амeboцитов *L. terrestris* до 28% у клеток *L. rubellus*. Наибольшее увеличение значения отметили у *L. castaneus* – объем клеток увеличивался на 36%.

Малые амeboциты, несмотря на значительное увеличение объема (от 29% до 41%), не демонстрировали морфофункциональных изменений. Лабильность показателей объема *L. castaneus* можно объяснить условиями обитания, этот представитель отмечен в Белгородской области только для луговых почв, которые испытывают значительные перепады увлажненности. В условиях резкого переувлажнения системные механизмы требуют подстраховки со стороны клеточных элементов, которые поддерживают активное функционирование за счет использования мембранного резерва.

У неамeboцитов не наблюдали функциональных изменений в условиях меняющегося осмотического давления. Снижение солености среды способствовало увеличению объема целомицитов типа 4 и 5. Гипертонические условия приводят к незначительным отклонениям объема по сравнению с гипотонией, только у неамeboцитов *L. terrestris* отмечали значительное увеличение объема.

Отсутствие корреляции между изменением объема и активности целомицитов, может объясняться запрограммированным для клеток каждого отдельного типа поведением в условиях измененного осмотического давления. Способность к образованию филоподий, адгезии или передвижению активизируется не зависимо от изменения размеров или объема клеток.

Гемоциты *E. rosea* и *E. gordejefi* уменьшали объем клеток в гипертонических условиях.

В гипотонических условиях значение объема БА изменяются в сторону явного увеличения (*E. fetida*, *E. tetraedra*, *E. nordenskioldi*) или не меняются (*E. rosea*). Уменьшение объема больших амeboцитов наблюдали в условиях снижения осмотического давления у клеток *E. gordejefi*.

В условиях повышенного осмотического давления большие амeboциты *E. fetida* и *E. nordenskioldi* увеличиваются в объеме, целомициты остальных представителей рода *Eisenia* уменьшаются в объеме.

Средние амебоциты не демонстрировали изменения или увеличивали показатели объема. В гипертонической среде объем клеток этого типа не менялся или уменьшался в популяции целомоцитов всех представителей, кроме *E. fetida*. Средние амебоциты *E. fetida* сильно увеличиваются в объеме, более чем на 100%.

Малые амебоциты всех представителей р. *Eisenia* увеличивали объем как в гипертонических, так и в гипотонических условиях, кроме клеток третьего типа *E. gordejefi*, которые в условиях повышенного осмотического давления не менялись в объеме.

При помещении целомоцитов типа 4 и 5 в условия измененного осмотического давления не наблюдали функциональных изменений клеток. Объем неамебоцитов менялся в основном в сторону снижения показателей в гипертонической среде и увеличения в гипотонических условиях. Целомоциты отдельных представителей (*E. fetida*) увеличиваются в условиях гипертонии (неамебоциты).

Целомическая жидкость дождевых червей, которые находятся в почве, смоченной пресной водой, имеет осмолярность 154 mOsm (Dietz T.N., Alvarago R.H., 1970).

Представители рода *Eisenia* в природных условиях обитают в различных природных условиях. *E. fetida*, навозный червь предпочитает почву богатую органическими веществами, которые при разбавлении переходят в раствор, создавая повышенное осмотическое давление. Поэтому целомоциты *E. fetida* демонстрируют разнообразные клеточные реакции, направленные на быстрое увеличение активности, как в условия гипертонии, так и гипотонии.

Целомоциты *A. caliginosa* и *O. complanatum* увеличивались или не менялись в объеме в гипотонических условиях. При повышении осмотического давления среды объем клеток этих представителей уменьшался.

Изменение объема малых амебоцитов в гипертонической среде наблюдали в сторону уменьшения, а в гипотонической в сторону увеличения. Изменение объема не коррелирует со складчатостью поверхности.

4.1.3. Динамика функциональных свойств клеток распределительного аппарата аннелид при действии осмотической нагрузки

Все гемоциты *H. medicinalis* в условиях пониженного осмотического давления демонстрировали снижение двигательной активности и увеличение адгезии клеток к субстрату. Такое поведение необычно для амебоцитов, так как при распластывании гемоцита по субстрату, происходит уменьшение высоты клетки, изменение которой, судя по показателям объема, не происходило. Амебоциты типа БА медицинской пиявки отличались тем, что мембранный резерв способствовал изменению объема гемоцита (увеличение на 40,03%), образованию ламеллоплазмы, а так же вакуолей внутри клетки.

Средние амебоциты одновременно с увеличением объема на 71,61 % сохраняли способность образовывать филоподии. Реакция клеток крови *H. sanguisuga* на снижение осмотического давления оказалась идентичной, с тем исключением, что изменение объема гемоцитов отмечали в 2-3 раза. Способность цитоплазматической мембраны в гипотонических условиях образовывать выпячивания демонстрирует хорошую приспособленность клеток *H. medicinalis* и *H. sanguisuga* к перенесению гипотонических условий.

В условиях сниженного осмотического давления для амебоцитов малой ложноконской пиявки характерна потеря двигательной активности и способности выпячивать ложноножки. Увеличение объема отмечали у малых амебоцитов на 31,81%, это происходило за счет потери выпячиваний и сглаживания рельефа мембраны. Поэтому можно отметить лучшую приспособленность *H. medicinalis* и *H. sanguisuga* к перенесению снижения солености, чем *E. octoculata*. Этот факт объясняет эврибионтность медицинской и большой ложноконской пиявки.

Увеличение солености среды вызывает уменьшение линейных параметров и объема клеток крови *H. medicinalis*. Поверхность клеток покрывается складками, выпячиваниями и впадинами. Активность амебоцитов значительно снижается.

В гипертонических условиях амебоциты *E. octoculata* увеличивали активности и скорость адгезии к субстрату. Малые амебоциты уменьшают активность формирования филоподий и по реакции напоминают клетки медицинской пиявки.

Гемоциты *H. sanguisuga* реагировали увеличением объема на гипертонические условия, два типа целомоцитов (тип БА и СА) увеличивали двигательную активность в гипотоническом растворе, тогда как активность клеток третьего типа повышалась в условиях гипертонии.

Таким образом, у гемоцитов пиявок характерно наличие нескольких типов амебоцитов, которые приспособлены к строго определенным условиям. Среди гемоцитов *E. octoculata* два типа клеток проявляют лучшие приспособления к гипертонической среде, а малые амебоциты – к гипотонической. Клетки крови *H. medicinalis* и *H. sanguisuga* демонстрируют хорошую адаптацию к гипертоническим условиям.

У представителей р. *Lumbricus* (*L. rubellus*, *L. castaneus*, *L. terrestris*) отметили различие в реакции амебоцитов и неамебоцитов на изменения осмотических условий среды.

Среди амебоцитов представителей р. *Lumbricus* отмечены клетки, демонстрирующие лучшую приспособленность в гипотонических, гипертонических условиях и сходно реагирующие на любое изменение солености.

Большие амебоциты в гипотонической среде усиливают двигательную активность, увеличивают скорость формирования филоподий и складок плазматической мембраны. В условиях снижения осмотического давления эти клетки слабо адгезируются к подложке, прикрепляется к субстрату только часть субпопуляции.

В условиях повышения концентрации растворенных солей активность данного типа целомоцитов снижается или не меняется, уменьшается количество формируемых филоподий и усиливается адгезия клеток.

Целомоциты типа СА *L. rubellus* и *L. terrestris* в гипотонических условиях увеличивают двигательную активность и скорость формирования филоподий.

Клетки принимают сферическую форму, адгезия отсутствует. Причем изменения объема не коррелируют с изменением объема клеток. Амебоциты типа СА *L. castaneus* наоборот теряли правильную форму, их подвижность снижалась.

Условия повышенного осмотического давления вели к снижению активности и уменьшению формирования филоподий средними амебоцитами *L. rubellus* и *L. terrestris*. Целомоциты типа СА *L. terrestris* в гипертонических условиях демонстрировали увеличение активности, образования вакуолей и адгезии клеток к субстрату. Целомоциты типа МА не изменялись морфологически и функционально. Малые амебоциты *L. terrestris* в гипертонических условиях демонстрировали увеличение двигательной активности, объема клеток и усиление адгезии к субстрату.

В условиях меняющегося осмотического давления у неамебоцитов не наблюдали функциональных изменений. Снижение солености среды способствовало увеличению объема целомоцитов типа НА и ХЛ.

Отсутствие корреляции между изменением объема и активности целомоцитов, может объясняться запрограммированным для клеток каждого отдельного типа поведением в условиях измененного осмотического давления. Способность к образованию филоподий, адгезии или передвижению активируется независимо от изменения размеров или объема клеток.

Целомоциты представителей рода *Eisenia* не проявляли закономерного поведения в условиях измененного осмотического давления. *E. rosea* и *E. gordejffi* наблюдали тенденцию снижения активности и уменьшение объема клеток в гипертонических условиях, при снижении осмотического давления наоборот подвижность клеток возрастала.

Большие амебоциты в гипотонических условиях увеличивают двигательную активность, образование ложноножек и скорость адгезии к подложке (*E. fetida*, *E. tetraedra*, *E. rosea*), а гипертонических – уменьшают. В ряде случаев поведение клеток этого типа не меняется по сравнению с изотонией (*E. gordejffi*, *E. nordenskioldi*). Показатели объема увеличиваются в гипотонических условиях (*E. fetida*, *E. tetraedra*, *E. nordenskioldi*) или не меняются (*E. rosea*).

Уменьшение объема больших амебоцитов *E. gordejefi* наблюдали в условиях снижения осмотического давления.

Амебоциты СА представителей рода *Eisenia* усиливали двигательную активность и образование филоподий в гипотонических условиях у следующих представителей *E. gordejefi*, *E. rosea* и *E. nordenskioldi*, целомоциты типа СА *E. fetida* и *E. tetraedra* значительно усиливали адгезионную способность и выпячивание ложноножек при повышении осмотического давления.

Целомоциты типа СА не демонстрировали изменения или увеличивали показатели объема. В гипертонической среде объем клеток этого типа не менялся или уменьшался в популяции целомоцитов всех представителей, кроме *E. fetida*.

В гипотонических условиях малые амебоциты резко усиливают активность, образование филоподий, наблюдали адгезию к субстрату. В гипертонической среде клетки этого типа приобретают угловатую форму и резко снижают активность. Такое поведение амебоцитов наблюдают у всех представителей рода *Eisenia*, кроме *E. fetida*. Для целомоцитов типа МА навозного червя характерно обратная закономерность, потеря активности в условиях сниженного осмотического давления и повышение – в гипертонической среде.

При помещении целомоцитов типа НА и ХЛ в условия измененного осмотического давления не наблюдали функциональных изменений клеток. Целомицеллярная жидкость дождевых червей, которые находятся в почве, смоченной пресной водой, имеет осмолярность 154 mOsm (Dietz T.N., Alvarago R.H., 1970).

Представители рода *Eisenia* в природных условиях обитают в различных природных условиях. *E. fetida*, навозный червь, предпочитает почву богатую органическими веществами, которые при разбавлении переходят в раствор, создавая повышенное осмотическое давление. Поэтому целомоциты *E. fetida* демонстрируют разнообразные клеточные реакции, направленные на быстрое увеличение активности, как в условии гипертонии, так и гипотонии.

Целомоциты *A. caliginosa* и *O. complanatum* увеличивались или не менялись в объеме в гипотонических условиях. При повышении осмотического давления среды объем клеток этих представителей уменьшался.

Морфофункциональные изменения целомоцитов типа БА и СА *A. caliginosa* и *O. complanatum* имеют противоположный характер. Так, клетки типа БА и СА *O. complanatum* увеличивают активность, образование филоподий и скорость распластывания по субстрату при любом изменении осмотического давления. Все амебоциты *A. caliginosa* при изменении солености снижают подвижность, выпускают тонкие и неактивные филоподии.

Малые амебоциты *O. complanatum* в гипотонических условиях увеличивают скорость адгезии к субстрату, в гипертонических условиях мембрана разглаживается, целомоциты приобретают шаровидную форму. Изменение объема не коррелирует со складчатостью поверхности.

A. caliginosa и *O. complanatum* отличаются не только клеточными реакциями, но экологическими условиями обитания. *A. caliginosa* типичный эврибионт, который не имеет строгих предпочтений физико-химического состояния почвы, а *O. complanatum* предпочитает переувлажненные берега водоемов.

У каждого представителя в условиях измененного осмотического давления отмечены несколько морфологически различных форм целомоцитов внутри каждого типа клеток, что указывает на потенциальную способность целомоцитов распластываться по подложке при любом изменении осмотического давления. Актиновое кортикальное кольцо, которое образуется в изотонических условиях, считается физическим барьером экзоцитоза и, следовательно, выпячивания филоподий (Muallem S. et al., 1995; Galkina S.I. et al., 2001). Карус А. и его коллеги определили, что гиперосмотический стресс индуцирует формирование тонкого актинового кольца, предотвращающего экзоцитоз у нейтрофилов (Rizoli S.B. et al., 2000; Di Ciano C. et al., 2002; Lewis A. et al., 2002). Повышенное осмотическое давление разрушает кортикальное актиновое кольцо, что необходимо для формирования филоподий (Kasschau M.R. et al., 2007). Таким образом, повышение активности целомоцитов аннелид в гипертонической сре-

де возможно вызвано образованием свободного актина, который способствует образованию органов движения клетки.

В гипотонической среде изменение конформации цитоскелета объясняют перестройкой неактиновых элементов. Микротрубочки так же хорошо, как и микрофиламенты вовлекаются в формирование филоподий (Kasschau M.R. et al., 2007). Существует множество ситуаций, когда клетка использует микрофиламенты и микротрубочки для формирования филоподий. Примером являются, свободные клетки, найденные в псевдоцеломической полости тела коловратки, *Asplanchna*, формируют сеть филоподий, содержащих микрофиламенты и микротрубочки (Baumann O. et al., 2000).

Прикрепление клетки к субстрату, её распластывание, принятие характерной для данного типа клеток формы (поляризация), а так же локомоция клетки может определяться несколькими элементарными клеточными реакциями (так называемыми морфогенетическими): реакцией активного прикрепления, контактным торможением движений и реакцией стабилизации поверхности (Vasiliev J.M., Gelfand I.M., 1976).

Действительно, в ходе прижизненного исследования клеток отметили, что распластывание происходит через цепь стадий, которые могут быть приняты за снижение двигательной активности. Каждая из стадий занимает различное количество времени у целомоцитов отдельных видов аннелид. Осевшая на субстрат клетка некоторое, весьма короткое (10-20 минут), время сохраняет сферическую форму. Несмотря на отсутствие в начале каких-либо контактных взаимодействий, клетка быстро, хотя и весьма непрочно, прилипает к поверхности субстрата. В основе этого первоначального прилипания, вероятно, лежат физические взаимодействия между поверхностями клетки и субстрата (Васильев Ю.М., Масленников А.Г., 1968). Очень скоро в основании прикрепившейся клетки возникают морфологические образования в виде филоподий или ламеллоподий.

Уплотнение клетки, видимо, связано с тем, что прикрепившиеся к субстрату филоподии или ламеллоподии натягиваются. Натяжение может быть

обусловлено формированием в этих образованиях (вблизи участков их контактов с субстратом) пучков микрофиламентов (Брагина Е.Е. и др., 1976).

В процессе распластывания клетки топография её дорсальной поверхности претерпевает изменения. Рельеф поверхности сферической клетки, только что прикрепившейся к субстрату, по мере распластывания в ряде случаев постепенно сглаживается, и у полностью распластанной клетки дорсальная поверхность лишена каких-либо образований. Изменение микрорельефа поверхности достигается в результате «расправления» микроворсинок, складок или пузырей: общая площадь сферической клетки (с учетом поверхности различных морфологических образований) примерно соответствует общей площади той же клетки, достигшей полного распластывания на субстрате (Follett E. A., Goldman R.D., 1970; Erickson C.A., Trinkaus J.P., 1976).

Описанный переход от сферической формы до состояния полного распластывания на субстрате занимает различное время у разных типов клеток. Распластывание – метаболически зависимый процесс и поэтому на его скорость и морфологические характеристики оказывают влияние такие факторы как температура – холод ингибирует распластывание клеток (Wolpert L., 1969; Follett E.A., Goldman R.D., 1970), состав культуральной среды – наличие сыворотки в среде является необходимым условием для распластывания большинства клеток; хотя распластывание некоторых клеток происходит в среде без сыворотки, но морфология самого процесса в этих условиях меняется (Witkowski J.A., Brighton W.D., 1972). Поэтому можем предположить, что реакция целоцитов *in vivo* зависит не только от концентрации ионов в среде, но и от функционального состояния организма, энергетических резервов целоцитов. Распластывание не может происходить без затрат энергии. Увеличение подвижности так же требует усиления метаболизма.

Концентрация ионов в среде определяет скорость адгезии амебоцитов (Dietz T.N., Alvarago R.H., 1970). Часто наблюдали, что активность целоцитов усиливается при любом изменении осмотического давления, но более выражены морфологические изменения происходят в гипотоническом растворе.

Из описанного выше следует, что в формировании филоподий невозможно выделить четкой тенденции образования в условиях гипотонии или гипертонии. В гипертонических и в гипотонических условиях происходит увеличение среднего объема клеток, при этом в гипертонической среде чаще происходит снижение двигательной активности клеток, а в гипотонических условиях наряду с увеличением объема клеток также усиливается образование ложноножек и локомоция.

Поэтому в зависимости от соотношения объем клетки\образование ложноножек существует нескольких механизмов активации мембранного резерва в условиях осмотического стресса. Первый чаще наблюдали в условиях повышенного осмотического давления, он заключается в перераспределении мембранного резерва. Морфология клеток резко меняется, целомациты приобретают угловатую форму, их поверхность покрывается большим количеством складок и борозд. В этом случае, наблюдали зависимость: чем активнее клетка выпускает ложноножки, тем более складчатой становится её поверхность.

В условиях пониженной концентрации солей чаще отмечали иной механизм поддержания функционального состояния. В гипотонических условиях клетки мобилизуют «внутренний мембранный резерв», целомациты, видимо, высвобождают вакуоли, фагоцитарные вакуоли и лизосомы, что позволяет сохранять клетки живыми в условиях пониженного осмотического давления.

Из вышесказанного следует, что снижение фагоцитарной активности в гипертонической среде – это закономерное явление.

Только после анализа морфофункциональных изменений целомацитов, инкубированных в условиях повышенного осмотического давления, возможно определить количество клеточных типов. Амебоциты могут быть представлены несколькими морфами, которые в стрессовых условиях приобретают одинаковый вид.

В гипертонической среде хлорогагенные клетки образовывали агломераты. Изменение осмотического давления среды вызывает у клеток несколько стереотипных реакций. Первая – увеличение складок на поверхности клетки,

это происходит, когда не исчерпан весь мембранный резерв. После образования складок начинается адгезия клеток к субстрату, которая начинается с образования циркулярной ламеллоплазмы и краевых раффлов. На следующем этапе наблюдаем прикрепленную клетку с выступающей центральной частью, содержащей ядро и органоиды (т.к. околядерная область содержит наибольшее количество фибрилл цитоскелета). Только после перераспределения компонентов цитоскелета, целоцит полностью расплывается по поверхности и прочно адгезирует к ней. Распластывание по субстрату может происходить с различной скоростью, это зависит от концентрации раствора, видовой принадлежности животного и типа форменного элемента.

Вторая возможная реакция – это увеличение объема клеток и усиление подвижности. Так реагируют большие амебоциты, которые выпускают длинные филоподии, которые по длине превышают размеры клетки.

Третий вариант адаптации к осмотическому стрессу – это потеря активного перемещения, поверхность клетки может покрываться складками, целоциты теряют способность образовывать псевдоподии, форма их округляется.

4.2. Анализ динамики упруго-эластических свойств и топографических характеристик плазмалеммы гемоцитов и целоцитов представителей класса Clitellata при действии осмотической нагрузки

Упругость мембраны связана с изменением расположения 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, направленное движение и участие в фагоцитозе, являясь неотъемлемым критерием, который описывает важнейшую концепцию биологии – концепцию адаптации (Эккерт Дж. с соавт., 1991). Модуль упругости может быть использован в качестве показателя реорганизации цитоскелета во время адгезии, при этом происходит увеличение эластичности в 2-3 раза (Simon A.,

Durrie M.C., 2006; Mahaffy et al., 2004). Согласно литературным данным модуль упругости актиновых фибрилл составляет от 10 до 20 кПа (Hoffmann et al., 1997).

При снижении осмотического давления у гемоцитов типа БА всех представителей подкласса *Hirudinomorpha* наблюдали сходную реакцию – упругостные свойства мембраны снижались, а адгезионные свойства клеток возрастали. В условиях повышенной солености жесткость мембраны больших амебоцитов *H. medicinalis* и *E. octoculata* возрастала, поверхность клеток БА *H. sanguisuga* наоборот приобретала большую упругость.

Таким образом, увеличение жесткости мембраны происходит у амебоцитов *H. medicinalis* и *E. octoculata* при любом изменении осмотического давления, причем упругость мембраны не соотносилась с адгезионными свойствами. Адгезия амебоцитов *H. medicinalis* повышалась в гипотонических условиях и снижалась в гипертонических, у подвижных гемоцитов *E. octoculata* отметили обратную закономерность.

Неамебоциты *E. octoculata* увеличивали показатели эластичности поверхности клеток и не меняли адгезионных свойств.

Гемоциты *H. medicinalis*, не способные к движению, уменьшают адгезию к нанозонду при изменении осмотического давления, в гипотонических увеличивается упругость мембраны, а в гипертонических – жесткость.

Все клеточные элементы системы распределения *H. sanguisuga* реагировали на любое изменение осмотического давления повышением эластичности мембраны и усилением адгезии клеток к нанозонду.

Сравнительный анализ показателей шероховатости поверхности, продемонстрировал, что поверхность гемоцитов медицинской пиявки наиболее варьирует по количеству выпячиваний. Микрорельеф клеток *H. medicinalis* имеет наиболее плотное расположение микровыпячиваний среди всех описанных гемоцитов пиявок. Наименьшие значения шероховатости отмечены у больших амебоцитов *E. octoculata*.

У амeboцитов всех представителей р. *Lumbricus* показатели упругости и адгезии мембраны к нанозонду не менялись или снижались в условиях пониженного осмотического давления. В гипотонической среде адгезия мембраны к нанозонду практически не менялась, а жесткость мембраны увеличивалась у целомоцитов *L. rubellus* и *L. terrestris* и снижалась у *L. castaneus*.

В гипертонической среде у большинства целомоцитов представителей р. *Lumbricus* характерно повышение жесткости мембраны и снижение силы адгезии к нанозонду. Только целомоциты типа БА *L. rubellus* и клетки типа МА *L. castaneus* демонстрируют повышение показателей адгезии к нанозонду.

Наблюдали увеличение эластичности мембраны целомоцитов представителей *E. fetida*, *E. gordejefi*, *E. nordenskioldi* рода *Eisenia*, как в условиях гипертонии, так и гипотонии. Гемоциты *E. tetraedra* и *E. rosea* наоборот увеличивают жесткость мембраны при изменении осмотического давления. Изменение направления осмотического давления не влияло на динамику свойств мембраны у всех представителей рода *Eisenia*. Только целомоциты *E. rosea* увеличивали жесткость в гипотонических условиях, а упругость в гипертонических.

Адгезия мембраны к нанозонду снижалась у целомоцитов *E. fetida* и *E. rosea* и повышалась или не менялась у – *E. gordejefi*, *E. nordenskioldi*, *E. tetraedra* при помещении в условия измененного осмотического давления.

Клетки *A. caliginosa* и *O. tyrtaeum* демонстрировали сходные изменения упругостных показателей мембран и адгезии к нанозонду. Так при снижении концентрации солей наблюдали слабое повышение эластичности мембраны или не отмечали изменений. Адгезия мембраны к нанозонду оставалась на прежнем уровне или слабо повышалась.

В условиях повышенного осмотического давления увеличение жесткости мембраны и повышение адгезии к нанозонду целомоцитов *A. caliginosa*. Изменение солёности среды не отражалось на силе адгезии целомоцитов *O.*

tyrtaeum, в гипертонических условиях упругость клеток этого представителя слабо повышалась.

В условиях гипотонии наибольшие показатели упругости зафиксировали 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 адаптацию клеточной поверхности к гипотоническим условиям.

В гипертонических условиях наибольшее значение модуля упругости среди представителей подкласса Hirudinomorpha выявлено у *H. sanguisuga*: у 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 зафиксировали у *E. fetida*, а неамебоцитов – у *A. caliginosa*. Эти представители являются типичными животными почв богатых перегноем, поэтому неудивительно, что целомоциты имеют высокий уровень физиологической адаптации к гипертоническим условиям.

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

Сравнительный анализ показателей шероховатости поверхности, продемонстрировал, что поверхность гемоцитов *H. medicinalis* существенно варьирует по количеству выпячиваний в зависимости от осмотических условий. Микрорельеф клеток *H. medicinalis* имеет наиболее плотное расположение микровыпячиваний среди всех описанных гемоцитов пиявок. Наименьшие значения шероховатости отмечены у больших амебоцитов *E. octoculata*.

У амебоцитов всех 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*.

Таким образом, у целомоцитов червей, которые относятся к родам *Allobophora*, *Octolasion*, *Lumbricus* характерно повышение жесткости клеточной мембраны в условиях повышенного осмотического давления, при этом показатель адгезии клетки к нанозонду меняются слабо. Подобную реакцию отмечали у целомоцитов *E. tetraedra* в условиях гипертонии.

В гипотонических условиях жесткость мембраны увеличивалась у целомоцитов представителей р. *Lumbricus*, *E. tetraedra* и *E. rosea*, а у остальных представителей рода *Eisenia* и родов *Allobophora* и *Octolasion*, отмечали увеличение эластичности мембраны. В условиях пониженного осмотического давления повышалась сила адгезии мембраны к нанозонду у представителей всех клеток, кроме р. *Lumbricus*, *E. fetida* и *E. tetraedra*.

4.3. Построение типологии клеточных элементов циркулирующих жидкостей представителей класса Clitellata

На основе анализа полученных результатов, можно сделать вывод о неоднородности клеточной популяции циркулирующих жидкостей аннелид. При типологизации форменных элементов учитывали уже существующее деление их на группы, но основным критерием стал функциональный. Морфологические показатели значительно варьируют у клеток одного и того же типа среди представителей различных видов, поэтому не могут являться достоверными критериями классификации клеток крови.

Для всех описанных видов характерно наличие двух основных классов целомоцитов – это амебоциты, которые выполняют иммунную функцию, и эритроциты, которые участвуют в накоплении и хранении питательных веществ. Практически все виды класса *Clitellata* среди форменных элементов целомической жидкости имеют несколько различных классов амебоцитов, которые обладают различной степенью активности, адгезионной и поглотительной способ-

ности. Характерно присутствие нескольких типов элеоцитов, которые разнятся количественными и качественными показателями гранул и вакуолей. Обязательным элементом циркулирующих жидкостей представителей аннелид являются хлорогогенные клетки и хлорогогенные гранулы. На основе сказанного выше, можно составить единую классификацию целомоцитов класса Clitellata (табл. 54).

Таблица 54
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	Не амебоцит (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>

Для представителей рода *Lumbricus* характерно уменьшение показателей адгезии к нанозонду при изменении осмотического давления среды, в то время как у целомоцитов представителей рода *Eisenia* наблюдаем увеличение адгезии в гипотонических и гипертонических условиях. Клетки *E. tetraedra* нарушают эту закономерность – значения адгезии целомоцитов этого вида понижается подобно клеткам рода *Lumbricus*. Показатель упругости мембраны увеличивается у целомоцитов большинства представителей рода *Eisenia* при любом изменении солености раствора, кроме клеток *E. rosea*, *E. tetraedra*.

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

Для пиявок *H. medicinalis*, *H. sanguisuga*, *E. octoculata* характерен значительный полиморфизм клеточных реакций. Отметим, что *E. octoculata* в большинстве случаев занимает промежуточное положение между *H. medicinalis* и *H. sanguisuga*, но в большой степени отличается от последних при сравнении мембранного резерва. Измерение модуля упругости и способности к адгезии в условиях измененного осмотического давления выделяют *H. sanguisuga*, т.к. значения обоих параметров увеличивается. Таким образом, в изотонических условиях гемоциты пиявок демонстрируют сходные морфофункциональные характеристики, но при преодолении стрессовой ситуации используют различные механизмы.

Таким образом, по морфофункциональным адаптациям гемоцитов и целомоцитов в изменяющихся осмотических условиях всех исследованных представителей класса Clitellata 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. *H. medicinalis*, *H. sanguisuga*, *E. octocukulata*

Внутри этих групп 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 изменение осмотического давления.

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 – хлорогогенные клетки.

2. В условиях гипоосмотической нагрузки объем целоцитов 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 рельефа поверхности, объемной морфометрии, упругости и силы адгезии гемоцитов с использованием инструментария атомно-силовой микроскопии, может быть рекомендован для исследования морфофункционального состояния гемоцитов различных представителей культивируемых беспозвоночных животных.

Библиографический список

1. Алехина, Г.П. Иммунологическая реакция пресноводных двустворчатых моллюсков на неблагоприятное воздействие среды / Г.П. Алехина, Е.Г. Логинова, И.А. Мисетов // Вестник ОГУ. – 2010. – №6. – С. 52-54.
2. Артемьева, Т.И. Комплексы почвенных животных и вопросы рекультивации техногенных территорий / Т.И. Артемьева. – М.: Наука, 1989. – 111 с.
3. Барнс, Р. Беспозвоночные: Новый обобщенный подход / Р. Барнс, П. Кейлоу, П. Олив, Д. Голдинг. – М: Мир, 1992. – 583 с.
4. Беклемишев, В.Н. Основы сравнительной анатомии беспозвоночных: Т. 2. Органология / В.Н. Беклемишев. – М: Наука, 1964. – 448 с.
5. Васильев, М.Ю. Клеточная поверхность и реакции клетки./ М.Ю. Васильев, А.Г. Масленников. – Л.: «Медицина», 1968. – 271 с.
6. Венчиков, А.И. Основные приемы статистической обработки результатов наблюдений в области физиологии / А.И. Венчиков, В.А. Венчиков. – М.: «Медицина», 1974. – 153 с.
7. Всеволодова-Перель, Т.С. Дождевые черви фауны России: Кадастр и определитель / Т.С. Всеволодова-Перель. – М.: Наука, 1997. – 102 с.
8. Выгодский, М.Я. Справочник по высшей математике / М.Я. Выгодский. – М.: АСТ Астрель, 2006. – 991 с.
9. Выгодский, М.Я. Справочник по элементарной математике / М.Я. Выгодский – М.: АСТ Астрель, 2006. – 509 с.
10. Галактионов, В.Г. Эволюционная иммунология: Учеб. пособие / В.Г. Галактионов. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2005. – 408 с.
11. Гущина, Ю.Ю. Исследование различий морфологических параметров клеток крови человека методом сканирующей зондовой микроскопии / Ю.Ю. Гущина, С.Н. Плескова, М.Б. Звонкова // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. – 2005. – №1. – С.48-53.
12. Дерябин, Д.Г. Функциональная морфология клетки: учебное пособие / Д.Г. Дерябин. – М.: КДУ, 2005. – 320 с.
13. Догель В.А. Зоология беспозвоночных: Учебник для ун-тов / Под

ред. проф. Ю. И. Полянского. – 7-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. школа, - 1981. – 606 с.

14. Зубарева, Е.В. Функциональные и микрореологические свойства лейкоцитов при экзогенном перегревании в опытах *in vivo* и *in vitro*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.03.01 / Зубарева Екатерина Владимировна. – Ярославль, 2011. – 18 с.

15. Иванов, А.В. Большой практикум по зоологии беспозвоночных. Типы: Кольчатые черви, Членистоногие: Ч. 2 / А.В. Иванов, А.С. Мончадский, Ю.И. Полянский, А.А. Стрелков. – М.: Высшая школа, 1983. – 543 с.

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

17. Кухтина, Ж.М. Руководство к практическим занятиям по цитологии. / Ж.М. Кухтина. – М.: Просвещение, 1971. – 64 с.

18. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 345с.

19. Лебедев, Д.В. Измерение модуля Юнга биологических объектов в жидкой среде с помощью специального зонда атомно-силового микроскопа / Д.В. Лебедев, А.П. Чукланов, А.А. Бухараев, О.С. Дружинина // Письма в ЖТФ. – 2009. – Т. 35.(8). – С. 54-61.

20. Ливанов, Н.А. Морфологические исследования над *Hirudinea*. К анатомии кровеносной системы / Н.А. Ливанов // Биол. Журнал. – 1910. – №1. - С. 3-8.

21. Ливанов, Н.А. Пограничные образования у *Polychaeta* / Н.А. Ливанов // Труды Об-ва естеств. Казанск. ун-та. – 1914. – №46. – С. 17-21.

22. Литвинова, Т.Н. Учение о растворах. Протолитические и гетерогенные равновесия. / Т.Н. Литвинова, Е.Г. Кириллова // Краснодар: КГМУ. – 2009. – 157 с.

23. Лукин, Е.И. Пиявки пресных и солоноватых водоемов. Фауна СССР. Пиявки. Т. 1. / Е.И. Лукин. – Л.: Наука, 1976. – 484 с.

24. Любвина, И.В. Влияние нефтепромысла на функциональное состоя-

ние лесного биогеоценоза / И.В. Любвина, Ю.К. Рацевский, Г.П. Романюк // Экология и охрана животных. Куйбышев: Куйбыш. ун-т. – 1982. – С.27-43.

25. Миронов, В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии / В.Л. Миронов. – Нижний Новгород: Российская академия наук, Институт физики микроструктур. – 2004. – 110 с.

26. Перель, Т.С. Распространение и закономерности распределения дождевых червей фауны СССР (с определительными таблицами) / Т.С. Перель – М.: Наука, 1979. – 272 с.

27. Персина, М. Обновление и дифференцировка клеток целомической жидкости у полихеты *Arenicola marina*. II. Клетки с полихромными гранулами / М. Персина, О. Чага // Цитология. – 1994. – Т.35. – С. 268-274.

28. Персина, М. Обновление и дифференцировка клеток целомической жидкости у полихеты *Arenicola marina*. III. Авторадиографический анализ / М. Персина, О. Чага // Цитология. – 1995. – Т.37. – С. 101 - 112.

29. Персина, М. Обновление и дифференцировка клеток целомической жидкости у полихеты *Arenicola marina*. I. Морфология и классификация целомочитов / М. Персина, О. Чага // Цитология. – 1994. – Т.36. – С. 261-267.

30. Петри, А. Наглядная статистика в медицине / А. Петри, К. Сэбин. – М.: Издательский дом ГЭОТАР – МЕД, 2003. – 143 с.

31. Порядина, И.М. Панцирные клещи некоторых районов нефтеразработок Тюменской области / И.М. Порядина, Л.Д. Голосова // Проблемы почвенной зоологии: Тез.докл. VIII Всесоюз.совещ. Киев: Наук.думка, 1981. – С. 170-171.

32. Потапова, С.Г. Изучение поглотительной способности нейтрофилов крови с использованием инертных частиц латекса / С.Г. Потапова, В.С. Хрустиков, Н.В. Демидова, Г.И. Козинец // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1977. – Т. XXII, № 9. – С. 58-59.

33. Присный, А.А. Показатели упругости и адгезии клеточных мембран гемоцитов моллюсков / А.А. Присный, С.В. Кулько // Вестник Тамбовского университета. Серия Естественные и технические науки. – 2013. – Том 18. Вы-

пуск 4. – С. 1633-1634.

34. Присный, А.В. Ключ для определения пиявок / Методические материалы к практическим работам (модельные методики и ключи для распознавания организмов) / А.В. Присный. – Белгород: Издательство БелГУ, 1999а. – 3 с.

35. Присный, А.В. Работы с дождевыми червями / Методические материалы к практическим работам (модельные методики и ключи для распознавания организмов) / А.В. Присный. – Белгород: Издательство БелГУ, 1999б. – 7 с.

36. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.

37. Ровенский, Ю.А. Растовая электронная микроскопия нормальных и опухолевых клеток / Ю.А. Ровенский – М., 1979. – 152 с.

38. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. – Минск: «Вышэйшая школа», 1973. – 320 с.

39. Рупперт, Э. Э. Зоология беспозвоночных: Функциональные и эволюционные аспекты : учебник для студ. вузов : в 4 т. Т. 2. Протисты и низшие многоклеточные / Э. Э. Рупперт, Р. С. Фокс, Р. Д. Варне; пер. с англ. Т. А. Ганф, Н.В.Ленцман, Е.В.Сабанеевой; под ред. А.А.Добровольского и А. И. Грановича. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 496 с.

40. Рябов, М.А. Неорганическая химия / М.А.Рябов, Р.В.Линко. – М.: РУДН, 2000. – 100 с.

41. Скоркина, М.Ю. Сравнительная оценка морфофункциональных характеристик нативных и фиксированных эритроцитов. / М.Ю. Скоркина, М.З. Федорова, С.Д. Чернявских, Н.А. Забиняков, Е.А. Сладкова // Цитология, 2011. – том 53. – №1. – с. 17-21.

42. Снеддон, И.Н. Классическая теория упругости / И. Н. Снеддон, С. Д. Берри. – М.: Государственное издательство физико-математической литературы, 1961. – 216 с.

43. Титов И.Н. Вермикультура как возобновляемый источник животного белка из органических отходов / И.Н. Титов, В.М. Усоев // Вестник Томского

гос.университета. Биология, 2012. – №2. – с.74-80.

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

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

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

47. Abdel-Fattah, R.F. The chloragogen tissue of earthworms and its relation to urea metabolism / R.F. Abdel-Fattah // Proc. Egypt. Acad. Sci., 1955. – Vol. 10. – P. 36-50.

48. Abeloos, M. Recherches histochemique et physiologiques sur le parenchyme et les nephridies des *Huridinees Rhynchobdelles* / M. Abeloos // Bull. Biol. Fr. Belg., 1925. – Vol. 59. – P. 436-456.

49. Adamowicz, A. Morphology and ultrastructure of the earthworm *Dendrobaena veneta* (Lumbricidae) coelomocytes / A. Adamowicz // Tissue and Cell, 2005. – Vol. 37. – P. 125-133.

50. Adolph, E.F. The regulation of volume and concentration in the body fluids of earthworms / E.F. Adolph // J. exp. Zool., 1927. – Vol. 47. – P. 31-62.

51. Ahern, M.D. Accumulation of lead and its effects on Na⁺ balance in the freshwater crayfish *Cherax destructor* / M.D. Ahern, S. Morris // J. Exp. Zool., 1998. – Vol. 281. – P. 270-279.

52. Ahern, M.D. Respiratory, acid-base and metabolic responses of the freshwater crayfish *Cherax destructor* to lead contamination / M.D. Ahern, S. Morris // Comp. Biochem. Physiol., 1999. – Vol. 124A. – P. 105-111.

53. Aoki, J. Rnd1, a novel rho family GTPase, induces the formation of neuritic processes in PC12 cells / J. Aoki, H. Katoh, K. Mori, M. Negishi // Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000. – Vol. 278 – P. 604-608.

54. Armstrong, P.B. In vitro phagocytosis by *Limulus* blood cells / P.B. Armstrong, J. Levin // *J. Invert. Pathol.*, 1979. – Vol. 34. – P. 145-151.
55. Ashworth, J.H. *Arenicola* (the lug-worm) / J.H. Ashworth // *Liverpool Mar. Biol. Comm. [LMBC] Memoir.*, 1904. – Vol. 11. – 118 p.
56. Bahl, K.N. Excretion in the oligochaeta / K.N. Bahl. – *Biol. Revs.*, 1947. – Vol. 22. – P. 109-147.
57. Barbee, K.A. Shear stress-induced reorganization of the surface topography of living endothelial cells imaged by atomic force microscopy/ K.A. Barbee, P.F. Davies, R. Lal // *Circ. Res.*, 1994. – Vol. 74. – P. 163-171.
58. Barbee, K.A. Distribution of shear stress on the surface of aligned and non-aligned endothelial monolayers / K.A. Barbee, T. Mundel, R. Lal, P.F. Davies // *Adv. Bioeng.*, 1995. – Vol. 28. – P. 349-350.
59. Baskin, D.G. The coelomocytes of nereid polychaetes. Contemporary topics in immunobiology (E.L. Cooper, ed.) / D.G. Baskin // *New York: Plenum Press*, 1974. – Vol. 4. – P. 34-48
60. Baumann, O. Characterization of an extremely motile cellular network in the rotifer *Asplanchna* spp. structure, kinetics, and the cytoskeleton. \ O. Baumann, K. Arlt, K. Rommling, H. Goller, B. Walz // *Cell Tissue Res.*, 2000. – Vol. 299. – P. 159-172.
61. Beckmann, M. Atomic force microscopy of peritoneal macrophages after particle phagocytosis/ M. Beckmann, H.A. Kolb, F. Lang// *Membrane biology.*, 1994 – Vol. 140. – P. 197-204.
62. Bedford, J.J. Osmoregulation in *Melanopsis trifasciata* Gray 1843 III. The intracellular nitrogenous compounds / J.J. Bedford // *Comp. biochem. Physiol.*, 1971. – Vol. 40A. – P. 899-910.
63. Bedford, J.J. Osmoregulation in *Melanopsis trifasciata*, IV. The possible control of intracellular isosmotic regulation / J.J. Bedford // *Comp. Biochem. Physiol.*, 1971 – №40. – P. 1015-1027.
64. Bilej, M. In vitro antigen-binding properties of coelomocytes of *Eisenia foetida* (Annelida) / M. Bilej, L. Tuckova, J. Rejnek, V. Vetvicka // *Immunology Lett.*

ters, 1990. – Vol. 26. – P. 183-188.

65. Bishop, M.D. A genetic linkage map for cattle \ M.D. Bishop, S.M. Kappes, J.W. Keele, R.T. Stone, G.A. Hawkins, R. Fries, S. Solinas-Toldo, M.D. Grosz, S.L.F. Sunden, J. Yoo, C.W. Beattie // *Genetics*, 1994. – Vol. 136. – P. 619-639.

66. Boroffka, I. Studies on the structure, development and physiology of the nephridia of oligochaeta. VI. The physiology of excretion and the significance of the enteronephric type of nephridial system in Indian earthworms / I. Boroffka // *Quart. J. Microscop. Sci.*, 1965. – Vol. 85 – P. 343-389.

67. Bradbury, S. The botryoidal and vaso-fibrous tissue of the leech *Hirudo medicinalis* / S. Bradbury // *Quart. J. Micr. Sci.*, 1959. – Vol. 100. – P. 483-498.

68. Bray, D. Responses of growth cones to changes in osmolality of the surrounding medium / D. Bray, N.P. Money, F.M. Harold, J.R. Bamburg // *J. Cell Sci.*, 1991. – Vol. 98. – P. 507-515.

69. Bustamante, M. Regulatory volume increase is associated with p38 kinase-dependent actin cytoskeleton remodeling in rat kidney MTAL \ M. Bustamante, F. Roger, M.-L. Bochaton-Piallat, G. Gabbiani, P.-Y. Martin, E. Feraille // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2003. – Vol. 285. – P. 336-347.

70. Cameron, G. R. Inflammation in earthworms / G.R. Cameron // *J. Gen. Path. Biol.*, 1932. – Vol. 35. – P. 833-872.

71. Caracciolo, E.A. Cell and coelomic fluid volume regulation in the earthworm (*Lumbricus terrestris*) / E.A. Caracciolo, R.T. Mason, W.W. Carley // *Comparative Biochemistry and Physiology.*, 1983. – Vol. 74. – P. 569-1975.

72. Carley, W.W. Regulation of hydromineral metabolism in the earthworm / W.W. Carley // *In Proc. Ninth Int. Symp. On Comparative Endocrinology* (Edited by Lofts B.). University of Hong Kong Press, 1982. – Vol. 35 – P. 46-51

73. Carley, W.W. Control the water and ion balance in the earthworm *Lumbricus terrestris* L. / W.W. Carley // M.A. Thesis, University of California, Berkeley, 1974.

74. Carley, W.W. Water economy of the earthworm *Lumbricus terrestris* L.:

coping with the terrestrial environment / W.W. Carley // J. exp. Zool., 1978. – Vol. 205. – P. 71-78.

75. Carley, W.W. Effects of brain removal on integumental water permeability and ion content of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. / W.W. Carley // Gen. comp. Endocr., 1975. – Vol. 27. – P. 509-516.

76. Caullery, M. Sur les parasites internes des annelides polychetes, en particulier des celles de la Manche / M. Caullery, F. Mesnil // C.R. Ass. Fr. Belg., 1899. – Ser. 2. – Vol. 28. – P. 491-496.

77. Chapron, C. Regeneration cephalique chez la loenbricies *Eisenia foetida* unicolor: structure, origine et role du bouchon cicatriciel / C. Chapron // Arch. Zool. Exp. Gen., 1970. – Vol. 111. – P. 217-227.

78. Clark, M.E. A survey of the effect of osmotic dilution on free amino acids of various poly – chaetes / M.E. Clark // Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole., 1968. – Vol. 134. – P. 252-60

79. Clark, M.E. Free amino-acid levels in the coelomic fluid and body wall of polychaetes / M.E. Clark // Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole, 1968. – Vol. 134. – P. 35-47.

80. Cooper, E.L. Oligochaetes / E.L. Cooper, E.A. Stein. – In N. A. Ratcliffe and A. F. Rowley (eds.), Invertebrate blood cells, Academic Press: New York, 1981. – Vol. 1. – P. 75-140.

81. Cooper, E.L. Electron-microscopic observations of normal coelomocytes from the earthworm, *Lumbricus terrestris* / D.S. Linthicum, E.A. Stein, D.H. Marks, E.L. Cooper // Cell Tissue Res. 1977. – Vol. 185(3). – P. 315-330.

82. Cossariza, A. Earthworm leucocytes that are non phagocytic and cross-react with several human epitopes can kill human tumor cell lines / A. Cossariza, E.L. Cooper, M.M. Suzuki, S. Salvioli, M. Capri, G. Gri // Exp. Cell Res., 1996. – Vol. 224. – P. 174-182.

83. Cuenot, L. Etudes physiologiques sur les oligochetes / L. Cuenot // Arch. Biol., 1898. – Vol. 15. – P. 79-124.

84. D'Andrea, L Identification of coelomocyte unconventional myosin and its

association with in vivo particle/vesicle motility / L.D'Andrea, M.A. Danon, G.P. Sgourdas, E.M. Bonder // *J.Cell Sci.*, 1994. – Vol. 107. – P. 2081-2094.

85. Dales, R.P. Phagocytic defense by earthworm against pathogenic bacteria / R.P. Dales, Y. Kalaç // *Comp. Biochem. Physiol.*, 1992. – Vol. 101A. – P. 487-490.

86. Dales, R.P. Polychaetes in N.A. Ratcliffe and A.F. Rolvey (eds invertebrate blood cells) / R.P. Dales, L.R.J. Dixon // Academic Press: New York, 1981. – Vol. 1. – P. 35-74.

87. Dales, R.P. The reproduction and larval development of *Nereis diversicolor* / R.P. Dales // *J. Marine Biol. Assoc. U.K.*, 1950. – Vol. 29. – P. 321-360.

88. Dales, R.P. The coelomic and peritoneal cell systems of some sabellid polychaetes, Quart / R.P. Dales // *J. Microscop. Sci.* – Vol. 102. – P. 327-346.

89. De Equileor, M. Ultrastructure and functional versatility of hirudinea botryoidal tissue / M. De Equileor, A. Grimaldi, G. Tettamanti, T. Congliu, M. Protasoni, M. Reguzzoni, et al. // *Tissue Cell*, 2001. – Vol. 33. – P. 332-341.

90. Deaton, L.E. Potentiation of hypoosmotic cellular volume regulation in the quahog *Mercenaria mercenaria* by 5-hydroxytryptamine, FMRFamid and phorbol esters / L.E. Deaton // *Biol. Bull.*, 1990. – Vol. 178 – P. 260-266.

91. Deaton, L.E. Hypoosmotic volume regulation in bivalve mollusk to oligohaline and fresh waters: phylogenetic and physiological aspects / L.E. Deaton // *Malacol. Rev.*, 1994. – Vol. 24. – P. 1-18.

92. Dehorne, A. Destruction et phagocytose des fibres musculaires a la fin de la maturation des ovocytes chez *Hediste diversicolor* / A. Dehorne // *C.R. Soc. Biol.*, 1922. – Vol. 87. – P. 1305-1307.

93. Deng, Z. Applications of atomic force microscopy in biophysical chemistry of cells / Z. Deng, V. Lulevich, F.T. Liu, G.Y. Liu // *The journal of physical chemistry. B.*, 2010 – Vol. 114. – Vol. 18. – P. 5971-5982.

94. Dietz, T.N. Osmotic and isotonic regulation in *Lumbricus terrestris L.* / T.N. Dietz, R.H. Alvarago // *Biol. Bull.*, 1970. – Vol. 138. – P. 247-261.

95. Dietz, T.N. Active chloride transport across the skin of the earthworm *Lumbricus terrestris L.* / T. N. Dietz, R. H. Alvarago // *Comp. Biochem. Physiol.*,

1974. – Vol. 49A. – P. 251-258.

96. Diogene, J. Extrusion of earthworm coelomocytes: comparison of the cell populations recovered from the species *Lumbricus terrestris*, *Eisenia fetida* and *Octolasion tyrtaeum* / J. Diogene, M. Dufour, G.G. Poirier, D. Nadeau // *Laboratory Animals*, 1997 – Vol. 31. – P. 326-336.

97. Dorn, P. B. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation / P.B. Dorn., J.P. Salanitro // *Chemosphere*, 2000. – Vol. 40. – P. 419-426.

98. Duprat, P. Mise au point et etude du liquide coelomique du lombricien *Eisenia foetida*. / P. Duprat, A.-M. Bouc-Lasalle // *Sav. Bull. Soc. Zool. Fr.*, 1967. – Vol. 92. – P. 767-778.

99. Edds, K.T. Isolation and characterization of two forms of a cytoskeleton / K.T. Edds // *J. Cell Biol.*, 1979. – Vol. 83. – P. 109-115.

100. Edds, K.T. Coelomocyte cytoskeletons. Interaction with cytochalasin B / K.T. Edds // *Exp. Cell Res.*, 1980. – Vol. 130 – P. 371-376.

101. Edds, K.T. Differential distribution and function of microtubules and microfilaments in sea urchin coelomocytes / K.T. Edds // *Cell Motil.*, 1984. – Vol. 4. – P. 269-281.

102. Engelmann, P. Anticipating innate immunity without a Toll. / P. Engelmann, E.L. Cooper, P. Németh // *Mol. Immunol.*, 2005. – Vol. 42. – P. 931-942.

103. Engelmann, P. Earthworm leukocytes react with different mammalian antigen specific monoclonal antibodies. / P. Engelmann, J. Pal, T. Berki, E.L. Cooper, P. Németh // *Zoology*, 2002. – Vol. 105. – P. 257-265.

104. Erickson, C.A. Microvilli and blebs as sources of reserve surface membrane during cell spreading / C.A. Erickson, J.P. Trinkaus. – *Exp. Cell Res.*, 1976 – Vol. 99. – P. 375-384

105. Fernandez, M. Zur mikroskopischen Anatomie des Blutgefäßsystems der Tunicaten. Nebst Bemerkungen zur Phylogenese des Blutgefäßsystems im allgemeinen / M. Fernandez // *Z. Naturw.*, 1904. – Vol. 39. – P. 59.

106. Fischer, E. The myelo-erythroid nature of the chloragogenous-like tissues

of the annelids / E. Fischer // *Comp. Biochem. Physiol.*, 1993. – Vol. 106A. – P. 449-453.

107. Fitzgerald, S.W. In vivo cellular reactions and clearance of bacteria from the coelomic fluid of the marine annelid, *Arenicola marina* L. (polychaeta) / S.W. Fitzgerald, N.A. Ratcliffe // *Journal of Experimental Zoology*, 1989. – Vol. 3. – P. 249-256.

108. Fitzgerald, S.W. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances / S.W. Fitzgerald, N.A. Ratcliffe, A.F. Rowley et al. // *Int. Rev. Cytol.*, 1985. – Vol. 97. – P. 183-350.

109. Follett, E.A. The occurrence of microvilli during spreading and growth of BHK21/C13 fibroblasts / E.A. Follett, R.D. Goldman // *Exp. Cell Res.*, 1970. – Vol. 59. – P. 124-136.

110. Freel, R.W. Solute adjustments in the coelomic fluid and muscle fibers of the coelomic fluid and muscle fibers of a euryhaline polychaete, *Neanthes succinea*, adapted to various salinities / R.W. Freel, S.G. Medler, M.E. Clark // *Biol. Bull.*, 1973. – Vol. 144. – P. 289-303.

111. Galkina, S.I. Inhibition of neutrophil spreading during adhesion to fibronectin reveals formation of long tubulovesicular cell extensions (cytonemes) / S.I. Galkina, G.F. Sud'ina, V. Ullrich // *Exp. Cell Res.*, 2001. – Vol. 266. – P. 222-228.

112. Gallo, G. Involvement of microtubules in the regulation of neuronal growth cone morphologic remodeling / G. Gallo // *J. Neurobiol.*, 1998. – Vol. 35. – P. 121-140.

113. Goldsbury, C.S. Introduction to atomic force microscopy (AFM) in biology / C.S. Goldsbury, S. Scheuring, L. Kreplak // *Current Protocols in Protein Science.*, 2002. – Vol. 17. – P. 1-7

114. Gordon-Weeks, P.R. Microtubules and growth cone function / P.R. Gordon-Weeks // *Jan. In. Journal of Neurobiology.*, 2004. – Vol. 58. – Vol. 1. – P. 70-83.

115. Groulx, N. Membrane Reserves and Hypotonic Cell Swelling / N. Groulx, F. Boudreault, S.N. Orlov, R. Grygorczyk // *J. Membrane Biol.* – 2006. – Vol. 214. –

P. 43-56.

116. Gupta, S.K. Cadmium toxicity in earthworm, *Metaphire posthuma*: Ultrastructural changes in secretory cells of clitellar epithelium / S.K. Gupta, S.Baskar Singh, V. Sundararaman // Indian J. Exp. Biol, 1997. – Vol. 7. – P. 780-786.

117. Henley, J. Guiding neuronal growth cones using Ca^{2+} signals / J. Henley, M. Poo // Trends Cell Biol., 2004. – Vol. 14. – P.320-330.

118. Henry, R.P. Salt and water balance in the oligohaline clam, *Rangia cuneata*. III. Reduction of the free amino acid pool during low salinity adaptation / R.P. Henry, C. P. Mangum // J. exp. Zool., 1980. – Vol. 211. – P. 25-32.

119. Henry R.P. Salt and water balance in the oligohaline clam, *Rangia cuneata*. II. Accumulation of intracellular free amino acids during high salinity adaptation / R.P. Henry, C.P. Mangum, K.L. Webb // J. exp. Zool., 1980. – Vol. 211. – P. 11-24.

120. Hess, R.T. The fine structure of coelomocytes in the annelid *Enchytraeus fragmentosus* / R.T. Hess // J Morphol., 1970. – Vol. 132. – P. 335-352.

121. Hindermanns, C. Uber die harnstoffbildung beim regenwurm / C. Hindermanns // Zool. Jb., 1937. – Vol. 58. – P. 57-68.

122. Hofman, U.G. Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope / U.G. Hofman, C. Rotch, W.J. Parak, M. Radmacher // J. Struct. Biol. – 1997. – Vol. 119. – P. 84-91.

123. Hoffman, R.J. The function of coelomic cell haemoglobin in the polychaete *Glycera dibranchiata*. / R.J. Hoffman, C.P. Mangum // Comp. Biochem. Physiol., 1970. – Vol. 36. – P. 211-218.

124. Hoffmann, E.K. Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation / E.K. Hoffmann, P.B. Dunham // In: Kwang, J.W. (Ed.), Int. Rev. Cytol., 1995. – Vol. 161. – P. 172-262.

125. Hoh, J.H. Surface morphology and mechanical properties of MDCK monolayers by atomic force microscopy / J.H. Hoh, C.A. Schoenenberger // J. Cell Sci., 1994. – Vol. 107. – P. 1105-1114.

126. Holmstrup, M. Interactions between environmental pollution and cold tolerance of soil invertebrates: a neglected field of research. / M. Holmstrup, M. Bayley,

H. Sjursen, R. Hrjer, S. Bossen, K. Friis // *CryoLetters*, 2000. – Vol. 21. – P. 309-314.

127. Homa, J. Flow cytometric quantification of proliferating coelomocytes non-invasively retrieved from earthworm, *Dnedrobaena veneta* / J. Homa, M. Bzowska, M. Klimek, B. Plytycz // *Dev. Comp. Immunol.*, 2008. – Vol. 32. – P. 9-14.

128. Hörber, J.K. Investigation of living cells in the nanometer regime with the scanning force microscope / J.K. Hörber, W. Hiiberle, F. Ohnesorge, G. Binnig, H.G. Liebich, C.P. Czerny, H. Mahnel, A. Mayr // *Scanning Microsc.*, 1992. – Vol. 6. – P. 919-929.

129. Jackson, C.M. Storage of water in various parts of the earthworm at different stages of exsiccation / C.M. Jackson // *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1926. – Vol. 23 – P. 500-504.

130. Kajstura, J. Changes in the morphology of *Ehrlich ascites* tumour cells caused by hyperosmotic media. *Folia Histochem* / J. Kajstura, W. Korohoda // *Cytobiol.*, 1988. – Vol. 26 – P. 91-97.

131. Kamemoto, F.I. The influence of the brain on osmotic and ionic regulation in earthworms / F.I. Kamemoto // *Gen. comp. Endocr.*, 1964. – Vol. 4. – P. 420-426.

132. Kamemoto, F.I. Ionic balance in blood and coelomic fluid of earthworms / F.I. Kamemoto, A.F. Spaulding, S.M. Keister // *Biol. Bull.*, 1962. – Vol. 122. – P. 228-231.

133. Karp, G.C. Dynamic activity of the filopodia of sea urchin embryonic cells and their role in directed migration of the primary mesenchyme *in vitro* / G.C. Karp, M. Solursh // *Dev. Biol.*, 1985 – Vol. 112. – P. 276-283.

134. Kasas, S. Observation of living cells using the atomic force microscope / S. Kasas, V. Gotzos, M.R. Celio // *Biophys. J.*, 1993 – Vol. 64. – P. 539-544.

135. Kasschau, M.R. Formation of filopodia in earthworm (*Lumbricus terrestris*) coelomocyte in response to osmotic stress / M.R. Kasschau, D. T. Ngo, L. M. Sperber, K. L. Tran // *Zoology*, 2007. – Vol. 110. – P. 66-76.

136. Katow, H. Ultrastructural and time-lapse studies of primary mesenchyme cell behavior in normal and sulfate-deprived sea urchin embryos / H. Katow, M. So-

lursh // Exp. Cell Res., 1981. – Vol. 136. – P. 233-245.

137. Keng, L.B. On the coelomic fluid of *Lumbricus terrestris* in reference to a protective mechanism / L.B. Keng // Philos. Trans. R. Soc. London, 1895. – Ser. B. – Vol. 186. – P. 383-400.

138. Kermack, D.M. The Anatomy and Physiology of the Gut of the Polychaete *Arenicola marina* / D.M. Kermack // Proc. zool. Soc., Lond., 1955 – Vol. 125. – P. 347-381.

139. Kevers, C. Effects of hypoosmotic shock on Na, K and Cl of *Carcinus maenas* / C. Kevers, A. Pequeux, R. Gilles // Comp. Physiol., 1979 – Vol. 129. – P. 365-373

140. Kevers, C. Effects of hypo- and hyperosmotic shocks on the volume and ions content of *Carcinus maenas* isolated axons / C. Kevers, A. Pequeux, R. Gilles // Comp. Biochem. Physiol. MA, 1979. – Vol. 11. – P. 427-431.

141. Krogh, A. Osmotic Regulation in Aquatic Animals / A. Krogh. – Cambridge University, London, 1939. – 242 p.

142. Lang, F. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms / F. Lang, G.L. Busch, M. Ritter, H. Volki, S. Waldegger, E. Gulbins, D. Haussinger // Physiol. Rev., 1998. – Vol. 78. – P. 247-305.

143. Lang, F. Regulating cell volume / F. Lang, S. Waldegger // Am. Sci., 1997. – Vol. 85 – P. 456-463.

144. Laverack, M.S. The physiology of Earthworms / M.S. Laverack. – Pergamon, Oxford, 1963. – 206 p.

145. Lefebvre, C. Cathepsin L and cytostatin B gene expression discriminates immune coelomic cells in the leech *Theromyzon tessulatum* / C. Lefebvre, F. Vandenbulcke, B. Bocquet, A. Tasiemski, A. Desmons, M. Verstraete et al. // Dev. Comp. Immunol., 2008. – Vol. 32. – P. 795-807.

146. Lewis, A. Osmotic stress activates Rac and Cdc42 in neutrophils: role in hypertonicity-induced actin polymerization / A. Lewis, C. Di Ciano, O.D. Rotstein, A. Kapus // Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2002. – Vol. 282. – P. 271-279.

147. Liebman, E. The function of leucocytes in the growth and regression of

the egg of *Triturus Viridescens* / E. Liebman // American Journal of Anatomy, 1945. – Vol. 77(2). – P. 273-291.

148. Liebmann, E. The role of the chlorogogen in regeneration of *Eisenia foetida* / E. Liebmann // J. Morph., 1942. – Vol. 70. – P. 151-183.

149. Liebmann, E. The coelomocytes of *Lumbricidae* / E. Liebmann // J. Morph., 1946. – Vol. 71. – P. 221-245.

150. Lindner, E. Ferritin and hemoglobin im chloragog von Lumbriciden (Oligochaeta) / E. Lindner // Z. Zellforsch., 1965. – Vol. 66. – P. 891-913.

151. Linthicum, D.S. Electron-microscopic observations of normal coelomocytes from the earthworm, *Lumbricus terrestris* / D.S. Linthicum, E.A. Stein, D.H. Marks, E.L. Cooper // Cell. Tiss. Res., 1977. – Vol. 185. – P. 315-330.

152. Mahaffy, R.E. Quantitative analysis of the viscoelastic properties of thin regions of fibroblasts using atomic force microscopy / R.E. Mahaffy, S. Park, E. Gerde, J. Käs, S.K. Shin // Biophys. – 2004. – Vol. 86. – P. 1777-1793.

153. Machin, M.J. Volume regulation in the coelomocytes of the blood worm *Glycera dibranchiate* / M.J. Machin, J. O'Donnell // Journal of comparative physiology., 1997. – Vol. 117. – P. 303-311.

154. Macknight, A.D. Problems in the understanding of cell volume regulation / A.D.C. Macknight, L.G.M. Gordon, R.D Purvers // J. Exp. Zool., 1994. – Vol. 268. – P. 80-89.

155. Maluf, N.S.R. The volume- and osmo-regulation functions of the alimentary tract of the earthworms (*Lumbricus terrestris*) and on the absorption of chloride from freshwater by this animal / N.S.R. Maluf // Zool. Jahrb. Abt. Allg. Zool. Physiol., 1940. – Vol. 16(2) – P. 175-187.

156. Marks, D.H. Acid phosphatase changes associated with response to foreign tissue in the earthworm *Lumbricus terrestris* / D.H. Marks, E.A. Stein, E.L. Cooper // Comp. Biochem. Physiol., 1981. – Vol. 68. – P. 681-683.

157. Marks, D.H. *Aeromonas hydrophila* in the coelomic cavity of the earthworms *Lumbricus terrestris* and *Eisenia foetida* / D.H. Marks, E.L. Cooper // J. Invertebr. Pathol., 1977. – Vol. 29. – P. 382-383.

158. Marks, D.H. Chemotactic attraction of coelomocytes to foreign tissue / D.H. Marks, E.A. Stein, E.L. Cooper // Dev. Comp. Immunol., 1979. – Vol. 3. – P. 277-285.

159. Martin, S.J. Apoptosis: suicide, execution or murder? / S.J. Martin // Trends Cell Biol., 1993. – Vol. 3. – P. 141-144.

160. McLaughlin, J. Biochemical studies on *Eisenia foetida* (Svingny, 1826), on brandling worm. III. Blood composition / J. McLaughlin // Comp. Biochem. Physiol., 1971. – Vol. 38B. – P. 179-195.

161. Metchnikoff, E. Lectures on the comparative pathology of inflammation / E. Metchnikoff. – Dover Press: New York, 1893. – 128 p.

162. Mogilner, A. The physics of filopodial protrusion / A. Mogilner, B. Rubinstein // Biophys. J., 2005. – Vol. 89. – P. 782-795.

163. Moment, G.B. The possible roles of celomic cells and their yellow pigment in annelid regeneration and aging / G.B. Moment // Growth, 1974. – Vol. 38. – P. 209-218.

164. Morris, R. Studies on freshwater osmoregulation in the ammocoete larva of *Lamperta planeri* (Bloch). II. The effect of de-ionized water and temperature on sodium balance / R. Morris, M. J. Bull // J. Exp. Biol., 1968. – Vol. 48. – P. 597-609.

165. Muallem, S. Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells / S. Muallem, K. Kwiatkowska, X. Xu, H.L. Yin // J. Cell Biol., 1995. – Vol. 128. – P. 589-598.

166. Muys, J.J. Nanoscale analysis by replication of cellular topography using soft lithography / J.J. Muys, M.M. Alkaisi, J.J. Evans // Journal of Biomedical Nanotechnology., 2006. – Vol. 2 (1). – P. 11-15.

167. Neufeld, D.S. Salinity change and cell volume: the response of tissues from the estuarine mussel *Geukensia demissa* / D.S. Neufeld, S.H. Wright, // J. Exp Biol., 1996. – Vol. 199 – P. 1619-1630.

168. Oberleithner, H. Living renal epithelial cells imaged by atomic force microscopy / H. Oberleithner, A. Schwab, W. Wang, G. Giebisch, F. Hume, J. Geibel // Nephron., 1994. – Vol. 66. – P. 8-13.

169. Oglesby, L.C. Salt and water balance / L.C. Oglesby // In *Physiology of Annelids* (Editor by Mill P. J.) Academic Press, New York., 1978. – P. 555-658.

170. Oh, D.J. Extension of osmolality-induced podia is observed from fluorescently labeled hematopoietic cell lines in hyperosmotic medium / D.J. Oh, A.R. Martinez, G.M. Lee, K. Francis, B.O. Palsson // *Cytometry*, 2000. – Vol. 40 – P. 109-118.

171. Oka A. Beitrage zuz Anatomie der Clepsine. – *Z. Wiss. Zool.*, 1894. – Vol. 58. – P. 79-98.

172. Ormerod, T. Development of inoculated and naturally colonized earthworm populations on landfill cap ameliorated with composted green waste / T. Ormerod, C. Lowe, K. Butt // *Comm. Waste. Res. Man.*, 2008. – Vol. 9. – P. 87-92

173. Ottaviani, E. Immunocyte: the invertebrate counterpart of the vertebrate macrophage / E. Ottaviani // *ISJ.*, 2011. – Vol. 8. – P. 1-4.

174. Otto, J.J. The incorporation of actin and fascin into the cytoskeleton of filopodial sea-urchin coelomocytes / J.J. Otto, J. Bryan // *Cell Motil.*, 1981. – Vol. 1. – P. 179-192.

175. Otto, J.J. Formation of filopodia in coelomocytes: localization of fascin, a 58,000 dalton actin cross-linking protein / J.J. Otto, R.E. Kane, J. Bryan // *Cell*, 1979. – Vol. 17 – P. 285-293.

176. P'equaux, A. Osmotic regulation in crustaceans / A. P'equaux // *J. Crust. Biol.*, 1995. – Vol. 15 – P. 1-60.

177. P'equaux, A. Blood proteins as related to osmorregulation in *Crustacea* / A. P'equaux, A.C. Vallota, R. Gilles // *Comp. Biochem. Physiol.*, 1979. – Vol. 64A. – P. 433-435.

178. Passey, S. What is in a filopodium? Starfish versus hedgehogs / S. Passey, S. Pellegrin, H. Mellor // *Biochem. Soc. Trans.*, 2004. – Vol. 32. – P. 1115-1117.

179. Peschen, K.E. Untersuchungen uber das Vorkommen und den Stoffwechsel des Guanins im Tierreich / K. E. Peschen // *Zool. Jber.*, 1939. – Vol. 59. – P. 429-462.

180. Pierce, S.K. Invertebrate cell volume control mechanisms: a coordinated use of intracellular amino acids and inorganic ions as osmotic solutes / S.K. Pierce //

Biol. Bull., 1982. – Vol. 163. – P. 405-419.

181. Poinar G.O. Immune responses in the earthworm, *Aporreclodea trapezoids* (Annelida), against *Rhabditis pellio* (Nematoda) / G.O. Poinar, R.A. Hess // In L.A. Bulla, Jr. and T. C. Cheng (eds.), Comparative pathobiology, Plenum Pub. Corp.: New York, 1977. – Vol. 3. – P. 69-84.

182. Pollock, F.M. Spatial determinants in morphogenesis: recovery from plasmolysis in the diatom *Ditylum* / F.M. Pollock, J.D. Pickett-Heaps // Cell Motil. Cytoskeleton, 2005. – Vol. 60 – P. 71-82.

183. Porchet-Hennere, E. Selective immunostaining of type 1 granulocytes of the Polychaete Annelid *Nereis diversicolor* by a monoclonal antibody against a cadmium-binding protein (MP II) / E. Porchet-Hennere, A. Nejmeddine, J.L. Baert, A. Dhainaut // Biol. Cell, 1987. – Vol. 60. – P. 259-261.

184. Potts, W.T. Osmotic and Ionic Regulation in Animals / W.T. Potts, W.G. Parry. – Pergamon. Oxford, 1964. – 423 p.

185. Ratcliffe, N.A. Invertebrate Blood Cells / N.A. Ratcliffe, A.F. Rowley. – Academic Press: London, 1981. – 641 p.

186. Raucher, D. Characteristic of a membrane reservoir buffering membrane tension / D. Raucher, M. Sheetz // Biophysical J. – 1999. – Vol. 77. – Pp. 1992-2002.

187. Rizoli, S.B. Hypertonic inhibition of exocytosis in neutrophils: central role for osmotic actin skeleton remodeling / S.B. Rizoli, O.D. Rotstein, J. Parodo, M.J. Phillips, Kapus // Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2000. – Vol. 279. – P. C619–C633.

188. Robertson, J.D. The function of the calciferous glands of earthworms / J.D. Robertson // J. Exp. Biol., 1936. – Vol. 13. – P. 279-297.

189. Roch, P. Serological evidences for a membrane structure related to human beta 2-microglobulin expressed by certain earthworm leukocytes / P. Roch, E.L. Cooper, D.P. Eskinazi // Eur. J. Immunol., 1983. – Vol. 13. – P. 1037-1042.

190. Rodrick, G.B. Effects of Temperature Salinity & Pesticides on Oyster Hemocyte Activity / G.B. Rodrick // Florida water resources, 2008. – P. 4-14.

191. Romieu, M. Recherches histophysiologiques sur le sang et sur le corps

cardiaque des Annelides polychetes / M. Romieu // Arch. Morph.,1923. – Vol. 17. – P. 10.

192. Roots, B.I. The water relation of earthworms. II. Resistance to desiccation and immersion, and behavior when submerged and when allowed a choice of environment / B.I. Roots // J. Exp. Biol.,1956. – Vol. 33. – P. 29-44.

193. Roots B.I. Some observations on the chloragogenous tissue of earthworms / B. I. Roots // Comp. Biochem. Physiol., 1960. – Vol. 1. – P. 219-226.

194. Roots, B.I. Nature of chloragogen granules / B.I. Roots // Nature, Lond., 1957. – Vol. 179. – P. 679-680.

195. Roots, B.I. Some observations on the chloragogenous tissue of earthworms / B.I. Roots // Comp. Biochem. Physiol., 1960. – Vol. 1. – P. 218-226.

196. Russell, J.M. Sodium–potassium–chloride cotransport / J.M. Russell // Physiol. Rev., 2000. – Vol. 80. – P. 211-276.

197. Ryan G.B. Acute inflammation / G.B. Ryan, G. Majno. – The Upjohn Co., Kalamazoo, 1977. – Vol. 86 – P. 183-276.

198. Saterbak A. Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon-contaminated soils / A. Saterbak, R. Toy, D.C.L. Wong, B.J. McMinn, M.P. Williams, P.B. Dorn, L.P. Brzuzy, E.Y. Chai, J.P. Salanitro // Environ. Toxicol. Chem., 1999. – Vol. 18 (7). – P. 1591-1607.

199. Sawyer R.T. Hirudineans. Invertebrae blood cells (Ratcliffe NA, Rowley AF (eds)) / R.T. Sawyer, S.W. Fitzgerald // Academic Press:London, 1981. – Vol. 1. – P. 141-159.

200. Scemes, E. Lack of osmoregulation in *Aplysia brasiliana*: correlation with response of neuron R15 to osphradial stimulation / E.Scemes, J.C. McNamara, A.C. Cassola // Am. J. Physiol., 1991. – Vol. 260. – P. 777-784.

201. Schaefer, A.W. 2002. Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones / A.W. Schaefer, N. Kabir, P. Forscher // J. Cell. Biol., 2002. – Vol. 158. – P. 139-152.

202. Schaus,S.S. Cell viability and probe-cell membrane interactions of XR1

glial cells imaged by atomic force microscopy / S.S. Schaus, E.R. Henderson // *Bio-physical journal.*, 1997. – Vol. 73. – P. 1205-1214.

203. Semal, P. Les cellules chloragogenes des lombriciens / P. Semal, P. van Gansen // *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 1956. – Vol. 90. – P. 335-358.

204. Semal, P. Structure des glandes calciques d'*Eisenia foetida Sav.* / P. Semal, P. van Gansen // *Bull. Biol.*, 1959. – Vol. 93 – P. 38-63.

205. Seman, P. Physiologie des cellules chloragogenes d'un lombricien / P. Semal, P. van Gansen // *Enzymologia*, 1958. – Vol. 20. – P. 98-108.

206. Shalev, A. Beta 2-Microglobulin-like molecules in low vertebrates and invertebrates / A. Shalev, A.H. Greenberg, L. Logdberg, L. Bjorck // *J. Immunol.*, 1981. – Vol. 127. – P. 1186-1191.

207. Siedlecki, M. Quelques observations sur le role des amibocytes dans le coelome d'un Annelide / M. Siedlecki // *Ann. Inst. Pasteur.*, 1903. – Vol. 17. – P. 449-462.

208. Sima, P. Annelid coelomocytes and hemocytes: Role in cellular immune reactions / P. Sima, V. Vetvicka, E.L. Cooper, M. Bilej, P. Roch // *Immunology of Annelids*, CRC Press: Boca Raton, 1994. – P. 115-165.

209. Sima, P. Perienteral chloragogen tissue and its role in defense in lumbricid worms / P. Sima, M. Bilej, J. Slipka // *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1995. – Vol. 371A. – P. 327-329.

210. Sima, P. The spleen and its coelomic and enteric history / P. Sima, J. Slipka // *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1995. – Vol. 371A. – P. 331-334.

211. Simone, A. Strategies and results of atomic force microscopy in the study of cellular adhesion / A. Simone, M.C. Durrie // *Micron.* – 2006. – Vol. 37. – P. 1-13.

212. Souza, M.M. Volume changes in cardiac ventricle from *Aplysia brasiliana* upon exposure to hyposmotic shock / M.M. Souza, E. Scemes // *Comp. Biochem. Physiol.*, 2000. – Vol. 127A – P. 99-111.

213. Spicer, S.S. A correlative study of the Histochemical prorerties of rodent acid mucopolysaccharides / S.S. Spicer // *J. Histochem. Cytochem.*, 1960. – Vol. 8. – P. 18-36.

214. Stang-Voss, C. Zur ultrastruktur der blutzellen wirbelloser tiere. IV. Die hamocyten von *Eisenia foetida* L. (Sav.) (Annelidae) / C. Stang-Voss // Z. Zellforsch., 1971. – Vol. 117. – P. 451-462.

215. Stein, E.A. Carbohydrate and glycoprotein inhibitors of naturally-occurring and induced agglutinins from the earthworm, *Lumbricus terrestris* / E.A. Stein, E.L. Cooper // Comp. Biol. Chem., 1983. – Vol. 76B. – P. 197-206.

216. Stein, E.A. Cytochemical observation of coelomocytes from the earthworm, *Lumbricus terrestris* / E.A. Stein, E.L. Cooper // Histochemical Journal, 1978. – Vol. 10. – P. 657-678.

217. Stein, E.A. Inflammatory responses in annelids / E.A. Stein, E.L. Cooper // Am. Zool., 1983. – Vol. 23. – P. 145-156.

218. Stein, E.A. The coelomocytes of the earthworm *Lumbricus terrestris*: morphology and phagocytic properties. / E.A. Stein, R.R. Avtalion, E. L. Cooper // J. Morphol., 1977. – Vol. 153. – P. 467-477.

219. Stephen G.C. Uptake of organic material by aquatic invertebrates. IV. The influence of salinity on the uptake of amino acids by the brittle star, *Ophiactis arenaosa* / G.C. Stephen, R.A. Virkar // Biological Bulletin, 1966. – Vol. 131 – P. 172-85.

220. Stephenson, J. The Oligochaeta / J. Stephenson // Oxford: Clarendon Press., 1930. – P. 43-71.

221. Svitkina, T.M. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network / T.M. Svitkina, E.A. Bulanova, O.Y. Chaga, D.M.Vignjevic, S. Kojima, J.M. Vasiliev, G.G. Borisy // J. Cell Biol., 2003. – Vol. 160. – P. 409-421.

222. Takeuchi, N. Effects of brain removal on the osmotic and ionic concentration of the coelomic fluid of earthworms placed soil and salt solutions / N. Takeuchi // Comp. Biochem. Physiol., 1980. – Vol. 67a. – P. 347-352.

223. Toupin, J. Earthworm coelomocytes in vitro / J. Toupin, D. H. Marks, E. L. Cooper, G. Lamoureux // In Vitro, 1977. – Vol. 13. – P. 218-222.

224. Ushiki, T. Atomic force microscopy in histology and cytology / T. Ushiki, J. Hitomi, S. Ogura, T. Umemoto, M. Shigeno // Archives of histology and cytology, 1996. – Vol. 5 (59). – P. 421-431.

225. Valembois, P. Etude anatomique de l'évolution de greffons heteroplastiques de paroi du corps chez quelques lombriciens / P. Valembois // C.A. Acad. Sci. (Paris), 1963. – Vol. 257. – P. 3227-3228.

226. Valembois, P. Etude autoradiographique du rôle trophique des cellules chloragogenes des vers de terre / P. Valembois, M. Cazaux // C.R. Soc. Biol., 1970. – Vol. 164. – P. 1015-1018.

227. Valembois, P. Etude ultrastructurale des coelomocytes d'un lombricien *Eisenia foetida* / P. Valembois // Sav. Bull. Soc. Zool. Fr., 1971. – Vol. 96. – P. 59-72.

228. van Gansen, P. Les cellules chloragogenes des Lombriciens / P. van Gansen, P. Semal // Bull. Biol., 1956. – Vol. 90 – P. 335-356

229. van Gansen, P. Le lipopigment des chloragogenes d'un lombricien / P. van Gansen, P. Semal // Enzimologia, 1957. – Vol. 20 – P. 98-108.

230. van Gansen, P. L'ultrastructure des cellules chloragogenes / P. van Gansen, P. Semal, G. van der Meersche, G. // Bull. Mic. Appliq., 1958. – Vol. 8. – P. 7-13.

231. Vasiliev, J.M. Morphogenetic reaction and locomotory behaviour of transformed cells in culture / J.M. Vasiliev, I.M. Gelfand // In: Fundamental aspects of metastasis. North-Holland Publish. Comp., 1976. – P. 71-98.

232. Vetvicka, V. Origins and functions of annelid immune cells: the concise survey / V. Vetvicka, P. Sima // ISJ., 2009. – Vol. 6. – P. 138-143.

233. Wehner, F. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction / F. Wehner, H. Olsen, H. Tinel, E. Kinne-Saffran, R.K.H. Kinne // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 2003. – Vol. 148. – P. 1-80.

234. Willem, V. Recherches sur l'excretion chez quelques annelides / V. Willem, A. Minne // Mem. Acad. Sci. Belg., 1899. – Vol. 58. – P. 51-87.

235. Willem, V. Recherches sur l'excretion chez quelques annelides / V. Willem, A. Minne // Med. Acad. Roy. Belg., 1900. – Vol. 58. – P. 1-73.

236. Witkowski, J.A. Influence of serum on attachment of tissue cells to glass surfaces / J.A. Witkowski, W.D. Brighton // Expl Cell Res., 1972 – Vol. 70. – P. 41-48.

237. Wolvert, L. In "Homeostatic Regulators". (J. Knight, ed.) / L. Wolvert, D. Gingell, // London: Churchill, 1969. – P. 15-36.

238. Wu, Y. Membrane surface nanostructures and adhesion property of T lymphocytes exploited by AFM / Y. Wu, H. Lu, J. Cai, X. He, Y. Hu, H. Zhao, X. Wang // Nanoscale Res Lett., 2009. – Vol. 4. – P. 942-947.

239. Zerst-Boroffka, I. Organische Sauerstoffe als wichtigste Anionen im Blut von *Hirudo medicinalis* / I. Zerst-Boroffka // Z. vergl. Physiol., 1970. – Vol. 70. – P. 313-321.

240. Zou, Q. Control issues in high-speed AFM for biological applications: collagen imaging example / Q. Zou, K.K. Leang, E. Sadoun, M.J. Reed, S. Devasia // Asian journal of control, 2004. – Vol. 2 (6). – P. 164-178.