

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА СТАБИЛЬНЫХ ГИАЛИНОВЫХ КЛЕТОК В ГЕМОЛИМФЕ ЛИЧИНОК МЯСНОЙ МУХИ *CALLIPHORA VOMITORIA* В ОТВЕТ НА ИНЪЕКЦИЮ ЧУЖЕРОДНЫХ ЧАСТИЦ

© Т. В. Кинд

Лаборатория биофармакологии и иммунологии насекомых Биологического института
С.-Петербургского государственного университета;
электронный адрес: tatiana.kind@mail.ru

Инъекция в гемоцель личинок *Calliphora vomitoria* чужеродных частиц вызывает комплексную клеточную иммунную реакцию, заключающуюся в их фагоцитозе, инкапсуляции и нодуляции плазматоцитами и тромбоцитоидами. Инъекции в опустошающих и опустошивших зоб личинок приводят также к значительному увеличению количества стабильных гиалиновых клеток, которые являются аналогами ламеллоцитов *Drosophila* и предшественниками тромбоцитоидов. Гиалиновые клетки трансформируются из прогемоцитов и, возможно, слабодифференцированных плазматоцитов через 1 сут после инъекции. В более поздние сроки наблюдается их преобразование в протромбоцитоиды и тромбоцитоиды. Количество прогемоцитов и молодых плазматоцитов у *C. vomitoria* в конце опустошения зоба значительно больше, чем у *C. vicina*; очевидно, этим объясняется более высокий уровень роста концентрации стабильных гиалиновых клеток у этого вида. Их доля после стимуляции инъекцией угля или эритроцитов может достигать 40—50 % против 20—25 % у *C. vicina*. После опустошения зоба степень индукции образования гиалиновых клеток значительно снижается, хотя и остается достаточно четко выраженной. Инъекция физиологического раствора также стимулирует трансформацию прогемоцитов в стабильные гиалиновые клетки, однако нарастание их количества является более слабым и плавным. Укол толстой иглой и иммунизация не оказывают заметного эффекта. Воздействия, вызывающие у личинок *Calliphora* нарастание количества гиалиновых клеток, параллельно индуцируют задержку начала метаморфоза, что дает возможность предположить участие в этом процессе эндокринной системы.

Ключевые слова: насекомые, *Calliphora*, иммунология, гемоциты, гиалиновые клетки.

Среди осуществляющих защитную реакцию гемоцитов *Calliphora* особое место занимают гиалиновые клетки, обычно упоминаемые во многих исследованиях как энотоиды (Jones, 1956; Whitten, 1964; Zachary, Hoffmann, 1973; Каага, Ratkliff, 1982; Rivers et al., 2002). Основными морфологическими особенностями этих клеток являются крупные размеры, сферическая форма и гомогенная сильно преломляющая свет цитоплазма. Благодаря этим особенностям они и получили свое название. При оптических методах исследования живых клеток с использованием фазового контраста или оптики Номарского свежeweделенные гиалиновые клетки представляются единым типом. Однако дополнительный анализ их реакции на перенесение в условия *in vitro* позволяет разделить гиалиновые клетки на два подтипа. Первый — нестабильные гиалиновые клетки, содержащие профенолоксидазу и участвующие в реакциях меланизации капсул или скоплений гемоцитов в местах нарушения целостности кутикулы (Crossley, 1964; Shrestha, Gattef, 1982; Тулин, Чага, 2003). Через считанные минуты после выделения гемолимфы эти клетки разрушаются с выбросом содержимого, которое образует крупные периферические пузыри, в дальнейшем сливающиеся в фестончатое прозрачное гало (Кинд, 2003). Второй тип гиалиновых клеток представлен стабильными клетками, сохраняющими

на временных препаратах целостность на протяжении десятков минут. Эти гемоциты не обладают способностью ни к адгезии, ни к фагоцитозу, но они служат предшественниками уникальных иммунонеактивных клеток, тромбоцитоидов, способных как к фагоцитозу мелких чужеродных объектов, так и к инкапсуляции крупных (Crossley, 1975; Zachary et al., 1975; Lanot et al., 2001; Кинд, 2005). Оба типа гиалиновых клеток дифференцируются из прогемоцитов у питающихся и начавших опустошение зоба личинок. У трех исследованных нами видов *Calliphora* — *C. vicina*, *C. uralensis* и *C. vomitoria* — при общей идентичности набора гемоцитов наблюдаются достаточно заметные различия в динамике гемоцитарной формулы после окончания питания личинок. У гомотинамного вида *C. vomitoria* нарастание количества плазматоцитов начинается значительно раньше, чем у обладающих диапаузой *C. vicina* и *C. uralensis*, еще до полного опустошения зоба, а их дифференцировка в плазматоциты I, напротив, происходит позже, за пределами кластеров (Кинд, 2007).

Значительный рост количества гиалиновых клеток у *C. vicina* может быть индуцирован инъекцией в гемоцель чужеродных абиотических и биотических частиц (Кинд, 2008). Так как основным источником стабильных гиалиновых клеток при индукции их дифференцировки инъе-

цированными чужеродными частицами являются прогемоциты и слабодифференцированные плазматоциты, в настоящей работе была исследована зависимость интенсивности дифференцировки от межвидовых особенностей динамики гемоцитарной формулы гемолимфы на примере *C. vomitoria*.

Материал и методика

Для экспериментов была использована лабораторная линия *Calliphora vomitoria* английского происхождения, отличающаяся полным отсутствием диапаузы. Личинок выращивали на свиной печени или почках при 12 °С. При низкой температуре (5 °С) развитие у опустошивших зоб личинок можно заблокировать на несколько недель, однако через 2—3 мес пупаризация наступала практически у всех особей. При 15 °С первые пупарии наблюдали через 2 сут после опустошения зоба.

Для индукции защитной реакции личинок различного возраста иммунизировали путем укола иглой, смоченной в суспензии смеси грамотрицательных и грамположительных бактерий, или инъецировали в полость тела по 10 мкл физиологического раствора (0.65 г NaCl, 0.014 г KCl, 0.012 г CaCl₂ и дистиллированная вода до 100 мл), а также суспензии мелко растертого медицинского активированного угля или эритроцитов человека в физиологическом растворе. В каждой серии использовали по 50 личинок. Как контрольных, так и подопытных личинок содержали при 15 °С.

Ежедневно подопытных и контрольных личинок проверяли на наличие пупаризации. Из этих же вариантов брали пробы для исследования состояния гемоцитов.

Для подсчета гемоцитарной формулы в каждом варианте использовали по 2 временных препарата гемолимфы. Капли гемолимфы, взятые после прокола в передней части 5 личинок, смешивали на предметном стекле и немедленно исследовали под микроскопом с использованием оптики Номарского (дифференциальный интерференционный контраст — ДИК) при объективе 40×. Таким образом, в каждом варианте был изучен клеточный состав гемолимфы 10 личинок. Изображения монослой гемоцитов были получены с использованием цифровой видеокамеры Digital CDSP, установленной на

микроскопе Jenamed (Германия). Изображения обрабатывали и редактировали с помощью программ iuVCR и Adobe Photoshop (v. 7) соответственно. Для вычисления доли гиалиновых клеток подсчитывали количество гемоцитов различного типа в 10 произвольно выбранных полях (по 5 полей для каждого из двух препаратов). Эти результаты служили базой для статистической обработки, а именно вычисления средней доли гиалиновых клеток, квадратичного отклонения и доверительного интервала ($P = 0.05$) для каждого варианта.

Результаты

Наполовину опустошившие зоб личинки *C. vomitoria*, служившие контролем для изучения влияния различных влияний на клеточный состав гемолимфы, обладали характерным для этого этапа онтогенеза (Кинд, 2007) набором гемоцитов (рис. 1). Значительную долю клеток составляют прогемоциты, недифференцированные мелкие полигональные клетки, объединенные в крупные кластеры. В гемолимфе опустошающих зоб личинок присутствуют два типа плазматоцитов: крупные ювенильные, заполненные включениями различной величины, и немногочисленные плазматоциты I, практически лишенные катаболических включений. Гиалиновых клеток немного, они составляют менее 10 % от общего количества гемоцитов. Заметны как стабильные, так и нестабильные клетки, а тромбоцитоиды представлены отдельными небольшими удлинёнными фрагментами цитоплазмы и редкими «голыми» ядрами.

Через 2 сут при 15 °С у опустошивших зоб личинок, служащих контролем для второго срока инъекции, число и величина кластеров прогемоцитов заметно сокращаются, а количество плазматоцитов I соответственно увеличивается. В их цитоплазме появляются первые катаболические липидные включения. Число гиалиновых клеток и ювенильных плазматоцитов снижается почти до нуля (рис. 1; 2, а). При последующем содержании контрольных личинок при 14—15 °С становятся заметными изменения, свидетельствующие о подготовке к пупаризации, значительное дальнейшее уменьшение доли прогемоцитов и заполнение плазматоцитов I включениями с переходом их в стадию плазматоцитов II (рис. 1; 2, б). Еще через 1 сут появляются первые пупарии.

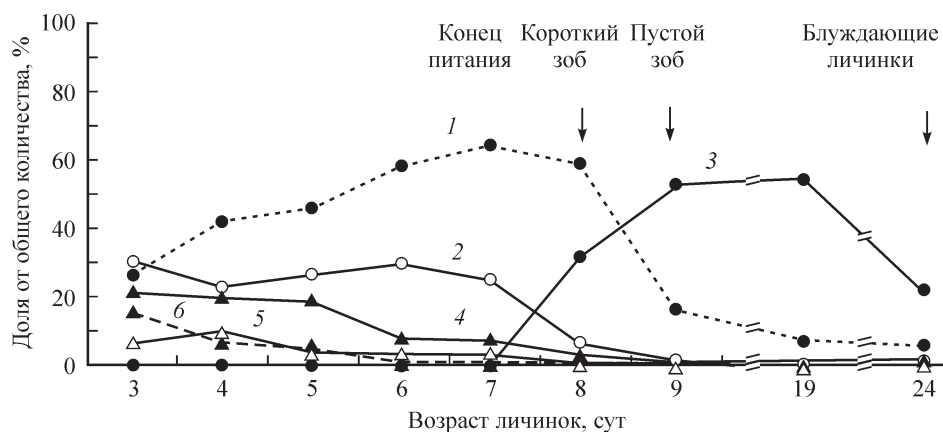


Рис. 1. Динамика гемоцитарной формулы при развитии личинок *Calliphora vomitoria*.

1 — прогемоциты, 2 — плазматоциты I, 3 — стабильные гиалиновые клетки, 4 — тромбоцитоиды. В верхней части рисунка указаны стадии развития личинок; стрелками отмечены моменты будущих повреждающих воздействий.

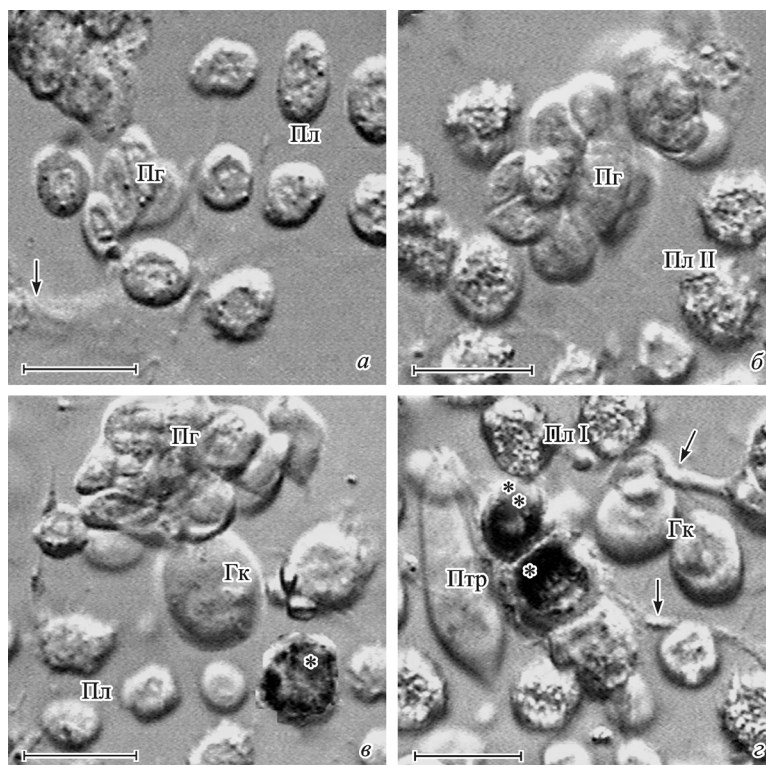


Рис. 2. Влияние инъекции угля на гемоциты наполовину опустошивших зоб личинок.

а — контрольные личинки с почти опустошенным зобом; видны небольшой кластер недифференцированных прогемоцитов, несколько плазматочитов I с отдельными включениями и распластанный фрагмент тромбоцитоидной цитоплазмы. *б* — контроль через 3 сут при 14 °С; прогемоциты в кластере без признаков дифференцировки; плазматочиты перешли в стадию II и заполнены включениями. *в* — через 1 сут после инъекции угля (почти опустошившие зоб личинки); видны кластер прогемоцитов с двумя молодыми гиалиновыми клетками, 1 гиалиновая клетка рядом с кластером, мелкие свободные плазматочиты и заполненный углем ювенильный плазматочит (*звездочка*). *г* — через 3 сут после инъекции; видны два заполненных углем ювенильных плазматочита (*звездочки*), гиалиновые клетки разной формы, в том числе переходная форма к тромбоцитоиду, тяжи тромбоцитоидов (*стрелки*) и плазматочиты I, заполняющиеся включениями. Гк — стабильная гиалиновая клетка, Пг — прогемоциты, Пл — плазматочит, Пл I — плазматочит I, Пл II — плазматочит II, Птр — протромбостоид. Масштабный отрезок — 20 мкм.

Инъекции угля и эритроцитов крови человека вызывают характерные реакции иммуноактивных гемоцитов. Уже через 1 мин после инъекции начинается захват эритроцитов тромбоцитоидами. Через 3 мин они концентрируются в небольших агглютинатах, образовавшихся из слившихся фрагментов тромбоцитоидной цитоплазмы, и начинают адгезировать к ювенильным плазматочитам, а через 10—20 мин плотно заполняют агглютинаты и фагоцитируются плазматочитами. Через 40 мин образуются конгломераты из крупных агглютинатов и содержащих фагоцитированные эритроциты гемоцитов (рис. 3, *а*). В этот же период начинается дезинтеграция эритроцитов на мелкие капельки как в плазматочитах, так и в агглютинатах. В то же время многие эритроциты остаются неизменными в течение 24 ч после поглощения тромбоцитоидами. Через 1 сут как в небольших тромбоцитоидных агглютинатах, так и в ювенильных плазматочитах остаются отдельные эритроциты, но основная масса их распадается и, судя по всему, утилизируется (рис. 3, *б*). В отличие от реакции тромбоцитоидов на инъекцию частиц угля эритроциты практически не аккумулируются в долгоживущих тьяжах, как это происходит с остатками угольных частиц.

Увеличение количества гиалиновых клеток в гемолимфе после инъекции эритроцитов наступает через 1 сут, когда наблюдается соответствующая переориентация дифференцировки прогемоцитов. Их доля продол-

жает возрастать на протяжении последующих 2—3 сут и снижается только после наступления пупаризации, на 7-е сут (рис. 3, *в*, *г*).

Частицы угля также захватываются ювенильными плазматочитами и тромбоцитоидами в 1-е мин после инъекции. При этом заполненные углем ювенильные плазматочиты не исчезают, как это происходит у контрольных личинок, сразу после опустошения зоба, а сохраняются на протяжении нескольких суток, вплоть до пупаризации. Тромбоцитоидные агглютинаты через несколько часов распадаются на толстые тьяжи с относительно небольшим количеством частиц.

Через 1 сут после инъекции становится заметной трансформация прогемоцитов в стабильные гиалиновые клетки — прогемоциты становятся более округлыми, в составе кластеров появляются первые небольшие гиалиновые клетки (рис. 2, *в*), которые впоследствии отделяются от кластеров, увеличиваются в размерах и часто приобретают неправильную форму, преобразуясь в протромбостоиды (рис. 2, *г*). Через 3—5 сут после инъекции их доля достигает 30 % от общего количества, тогда как у контрольных особей она составляет всего 1—5 %; увеличивается и количество тромбоцитоидов, представленных сетями тьяжей с отдельными частицами угля. Часто тромбоцитоидные сети захватывают другие гемоциты, образуя рыхлые скопления. Через 1 нед после инъекций, при запуске пупаризации, значительно сокращается количество прогемоцитов, дифференцировка новых пар-

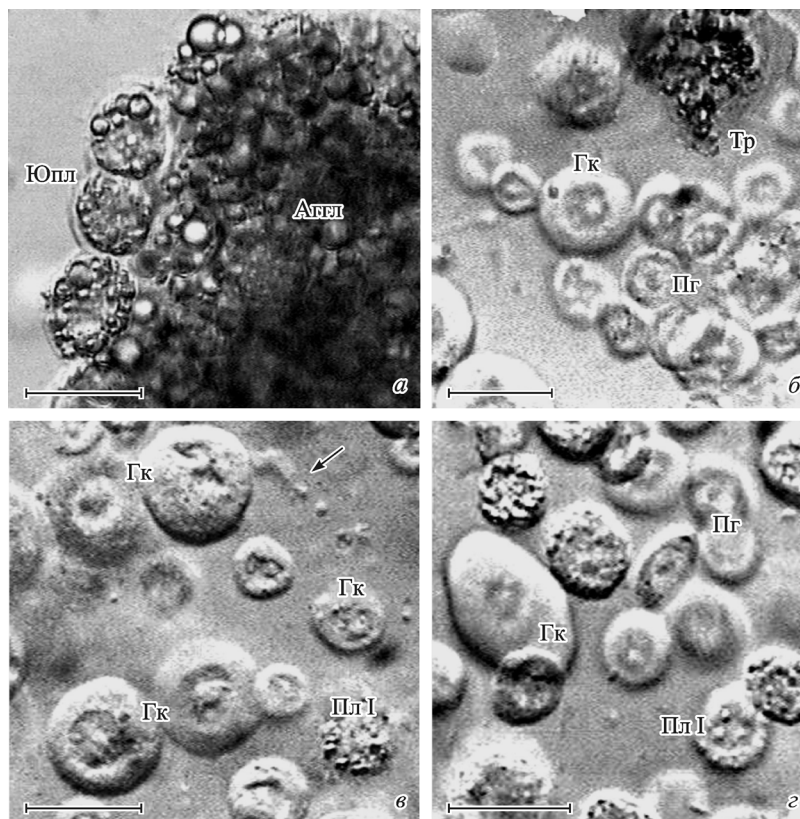


Рис. 3. Гемоциты только что опустошивших зоб личинок после инъекции эритроцитов.

а — 20 мин с момента инъекции; эритроциты внутри очень крупного тромбоцитоидного агглютината; по периферии агглютината видно несколько ювенильных плазматочитов с адгезированными эритроцитами. *б* — через 2 сут после инъекции; в правом верхнем углу — остатки эритроцитов в тромбоцитоидном агглютинате; в кластере прогемоцитов видно образование молодых гиалиновых клеток; более крупные стабильные гиалиновые клетки — в левом нижнем углу. *в* — через 5 сут после инъекции; эритроцитов не заметно; присутствуют много стабильных гиалиновых клеток различной величины и единственный плазматочит I. *г* — через 7 сут после инъекции; присутствуют немногочисленные прогемоциты, плазматочиты I и гиалиновые клетки различной величины; эритроцитов не обнаруживается. Аггл — тромбоцитоидный агглютинат, Тр — тромбоцитоид, Юпл — ювенильный плазматочит; остальные обозначения те же, что и на рис. 2. Масштабный отрезок — 20 мкм.

тий гиалиновых клеток практически прекращается и их количество заметно снижается (рис. 4, *а*).

Динамика гемоцитарной формулы как у контрольных, так и у инъекцированных суспензиями угля или эритроцитов опустошивших зоб личинок практически полностью соответствует таковой личинок с коротким зобом (с учетом сдвига развития). На фоне постепенного снижения доли гиалиновых клеток у контрольных особей наблюдается ее увеличение у личинок, инъекцированных как углем, так и эритроцитами. Гиалиновые клетки у личинок с запущенным метаморфозом часто неправильной формы, с ацентрическими бобовидными или серповидными ядрами. Как и в предыдущем варианте, видны переходные формы к тромбоцитоидам, количество тромбоцитоидных тяжей тоже возрастает (рис. 5).

Так как даже при умеренно низкой температуре (12—15 °С) после опустошения зоба очень быстро наступает подготовка к пупаризации, для анализа индуцированного инъекциями эффекта у особей с уже дифференцированными плазматочитами I личинок с коротким зобом помещали в температуру 5 °С, где опустошение зоба завершалось в течение 7 сут. Еще через 13 сут холодного оцепенения производили иммунизацию (укол смоченной в суспензии бактерий тонкой иглой) и инъекцию физиологического раствора или угля. После этого контрольных и опытных личинок перемещали в 15 °С.

Массовую пупаризацию при этой температуре наблюдали на 4-е сут.

Через 13 сут охлаждения в гемолимфе контрольных особей наблюдается довольно много различной величины кластеров со слегка угловатыми или округлыми прогемоцитами. В цитоплазме многочисленных плазматочитов I уже имеются включения (рис. 6, *а*). Тромбоцитоиды представлены «голыми» ядрами и тонкими филаментами, быстро образующими небольшие звездчатые агглютинаты или сети. Гиалиновые клетки в этот период почти не встречаются. Через 3 сут при 15 °С гемоциты принимают вид, характерный для период подготовки к пупаризации (рис. 6, *б*).

Иммунизация не оказывает заметного влияния на гемоцитарную формулу опустошивших зоб личинок. Через 1 сут картина клеточных элементов гемолимфы почти полностью совпадает с таковой у контрольных особей. Единственными отличиями являются более округлая форма прогемоцитов и появление отдельных довольно крупных стабильных гиалиновых клеток. Однако их доля не превышает 3 %. Через 3 сут также происходят заполнения большей части плазматочитов включениями и их переход в фазу II. В этот же период появляются характерные для начала метаморфоза небольшие гиалиновые и веретеновидные клетки. Через 4 сут, как и в контроле, наступает пупаризация, и плазматочиты ста-

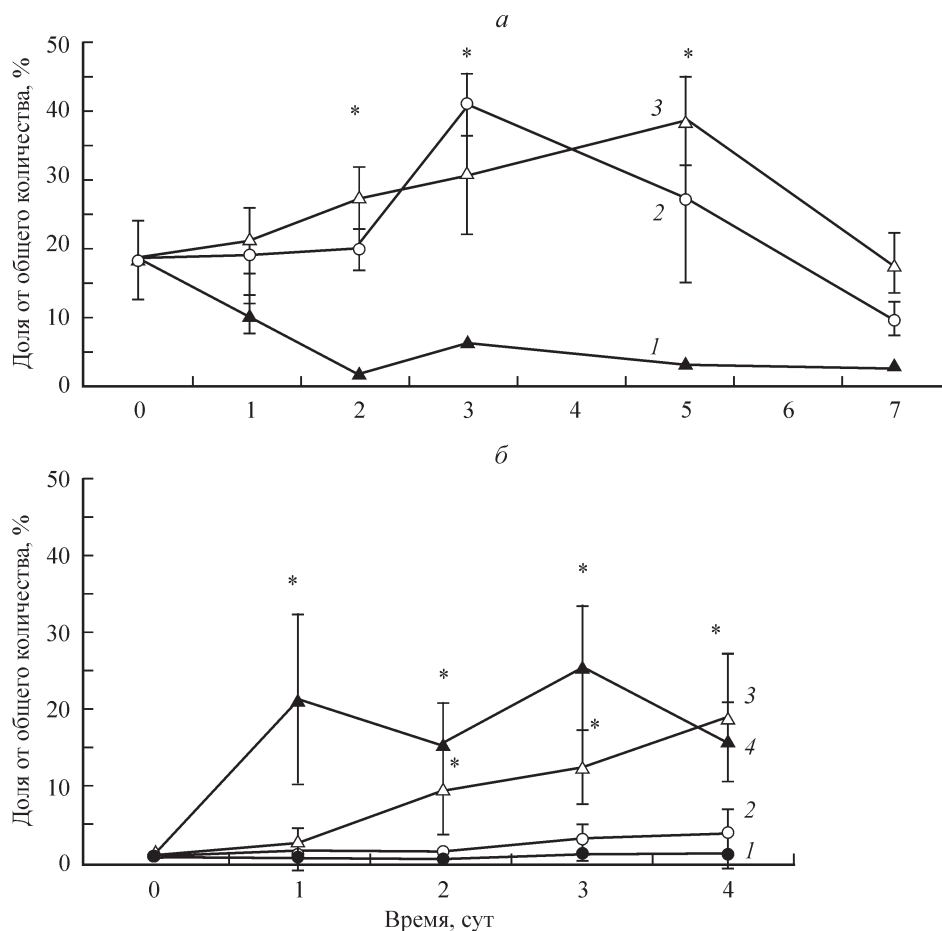


Рис. 4. Влияние различных воздействий на долю гиалиновых клеток у личинок, опустошающих зоб (а), и личинок, содержащих зоб после опустошения зоба 20 сут при 5 °С (б) (среднее и доверительный интервал при $P = 0.05$).

а: 1 — контроль, 2 — инъекция угля, 3 — инъекция эритроцитов. б: 1 — контроль, 2 — иммунизация, 3 — инъекция физиологического раствора, 4 — инъекция угля. Звездочки указывают на достоверные различия между опытом и контролем.

новятся макрофагами, заполняясь фрагментами апоптозных тканей.

Инъекция физиологического раствора оказывает заметно больший эффект. Если в 1-е сут после инъекции гемоцитарная формула мало отличается от контрольной, то через 3—4 сут наблюдается повышение доли гиалиновых клеток до 10—18 % (рис. 4, б).

Через 1 сут после инъекции угля он концентрируется в основном в толстых тяжках тромбоцитоидов, реже — в плазматоцитах. Прогемоциты в кластерах приобретают более округлую форму, наблюдается их дифференцировка в молодые стабильные гиалиновые клетки с одиночными крупными ядрышками (рис. 7). Количество свободных гиалиновых клеток увеличивается. Большинство из них небольшие (15—17 мкм), но есть и отдельные крупные клетки, до 20—25 мкм (рис. 6, в).

Через 3 сут после инъекции и переноса в 15 °С большинство плазматоцитов находится на стадии I, хотя количество включений в них заметно увеличивается. Количество стабильных гиалиновых клеток еще возрастает, причем преобладают крупные (20—25 мкм) клетки (рис. 4, б; 6, з). Это, очевидно, связано с тем, что кластеров остается мало и соответственно уменьшается количество мелких гиалиновых клеток на стадии начала дифференцировки и роста. В то же время доля стабильных гиалиновых клеток заметно меньше, чем после инъекции

в личинок, еще не опустошивших или только что опустошивших зоб. Она достигает 20—23 % от общего количества гемоцитов, тогда как в более раннем возрасте может увеличиваться до 35—40 % (рис. 4). Через 4 сут после инъекции угля пуларизация только начинается (на 1 сут позже, чем в контроле и после иммунизации). В это время у личинок плазматоциты еще увеличиваются в размерах и полностью заполняются включениями, часто довольно крупными, маскирующими ядро, и переходят в стадии II и III. Гиалиновые клетки в основном крупные, их количество незначительно отличается от предыдущего срока наблюдений. В гемолимфе появляется много небольших фрагментов цитоплазмы тромбоцитоидов. Видны также «голые» ядра. У пулариев плазматоциты переходят в стадию макрофагов, количество гиалиновых клеток несколько сокращается, а тромбоцитоиды образуют сети, объединяющие плазматоциты и гиалиновые клетки в рыхлые конгломераты.

При взятии проб гемолимфы у контрольных личинок и личинок, подвергавшихся различным воздействиям, параллельно проводили регистрацию образования пулариев. Было обнаружено, что во всех возрастных категориях личинок инъекции физиологического раствора и суспензий угля и гемоцитов приводят к задержке пуларизации приблизительно на 1 сут. Эти данные полностью совпадают с результатами цитологического ана-

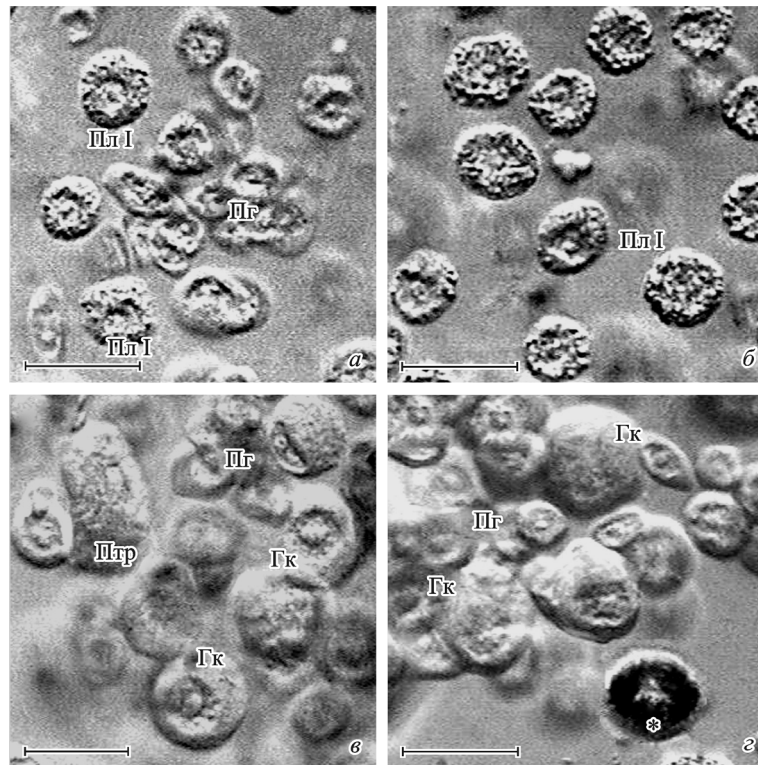


Рис. 5. Влияние инъекции частиц угля на гемоциты только что опустошивших зоб личинок.

а — контрольные личинки через 3 сут после опустошения зоба; в центре виден небольшой кластер угловатых прогемоцитов; в плазматоцитах довольно значительное количество включений. *б* — контроль через 7 сут после опустошения зоба; количество включений в плазматоцитах I увеличивается, некоторые из них переходят в стадию II. *в* — через 3 сут после инъекции угля; прогемоцитов увеличиваются в размерах, появляются многочисленные гиалиновые клетки, одна из которых трансформируется в протромбоцитойд; плазматоцитов с включениями не заметно. *г* — через 5 сут после инъекции угля; видны мелкие и средней величины прогемоциты, различной величины гиалиновые клетки и заполненный фагоцитированным углем плазматочит (звездочка). Обозначения те же, что и на рис. 2, 3. Масштабный отрезок — 20 мкм.

лиза гемоцитарной формулы — у инъекцированных личинок дифференцировка плазматоцитов также заметно запаздывала по сравнению с контролем.

Обсуждение

Два близких вида мясных мух (*C. vicina* и *C. vomitoria*) различаются не только сезонным ритмом развития (наличием личиночной диапаузы у *C. vicina* и ее полным отсутствием у *C. vomitoria*), но и динамикой гемоцитарной формулы у личинок. Поэтому неудивительно, что клеточная защитная реакция на появление в гемолимфе чужеродных частиц при общем принципиальном сходстве также имеет свои специфические особенности. Так, если у *C. vicina* доля стабильных гиалиновых клеток в ответ на инъекцию угля возрастает у наполовину опустошивших зоб личинок максимум до 30 %, а в более поздние сроки всего до 10 % от общего количества (Кинд, 2008), то у *C. vomitoria* эта реакция выражена значительно сильнее (40 и 25 % соответственно). Очевидно, это связано с особенностями дифференцировки гемоцитов в критический период опустошения зоба. Основная волна трансформации прогемоцитов в плазматоциты и выход последних за пределы кластеров у *C. vomitoria* наблюдаются еще до окончания опустошения зоба личинок. При этом плазматоциты еще очень слабо дифференцированы. Накопление катаболических включений и рост клеток происходят значительно позже, уже после полного опус-

тошения зоба. У *C. vicina*, напротив, резкое увеличение популяции плазматоцитов сдвинуто на более поздний этап развития, а дифференцировка начинается еще в пределах кластеров. Большое количество и меньшая степень дифференцированности прогемоцитов *C. vomitoria*, очевидно, и определяют у этого вида более выраженную возможность их трансформации в протромбоцитойдные гиалиновые клетки. Личинки обладают также способностью к ответу на более широкий спектр воздействий. Если у *C. vicina* инъекция физиологического раствора практически не оказывает индуцирующего воздействия, то у *C. vomitoria* эта операция приводит к более плавному и слабому, но достаточно хорошо заметному подъему доли гиалиновых клеток даже у опустошивших зоб личинок (рис. 4, б). В целом реакция *C. vomitoria* на различные стрессорные воздействия напоминает таковую *Drosophila melanogaster*, появление ламеллоцитов у которой может быть вызвано не только яйцами паразитов, но и инъекцией туши и физиологического раствора и даже уколком толстой иглы (Rizki, Rizki, 1992). Правда, реакция *C. vomitoria* более избирательна и нарушение целостности кутикулы без инъекций не вызывает индукции дифференцировки прогемоцитов в стабильные гиалиновые клетки. Вторым значительным отличием реакции *Calliphora* на повреждения является тот факт, что они никогда не вызывают появления нестабильных профенолоксидазных гиалиновых клеток. Эти аналогичные кристаллическим клеткам *Drosophila* гемоциты обнаруживаются только до момента опустошения зоба и ни

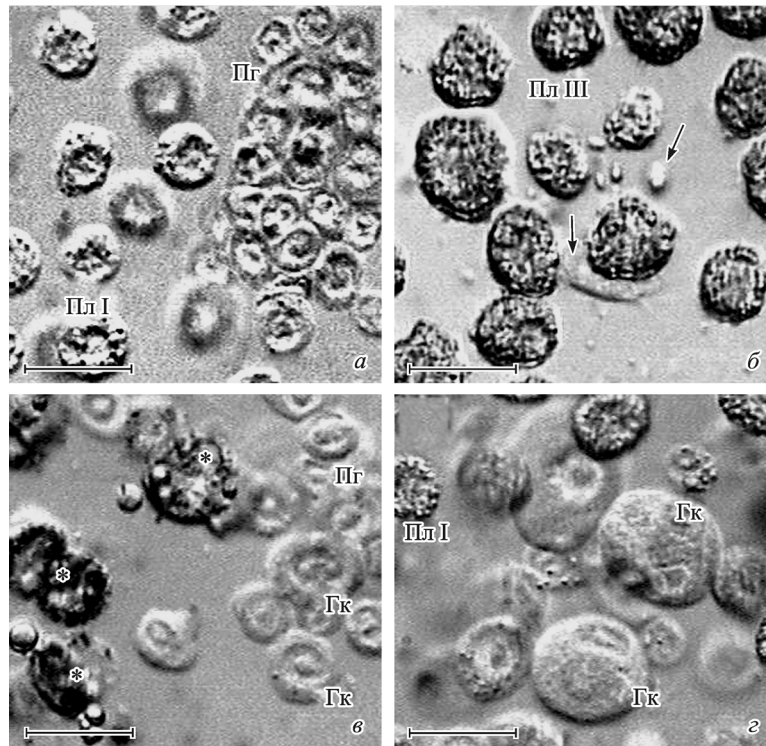


Рис. 6. Влияние инъекции частиц угля на гемоциты личинок, содержащихся после опустошения зоба 20 сут при 5 °С.

а — контрольные личинки через 1 сут после переноса в 15 °С; видны крупный кластер прогемоцитов и плазматоциты I, заполняющиеся катаболическими включениями. *б* — контрольные личинки через 3 сут после переноса в 15 °С; основным типом гемоцитов являются заполненные включениями II и III (Пл III); видны также небольшие тяжи тромбоцитодов. *в* — через 1 сут после инъекции угля; справа виден небольшой кластер довольно крупных округлых прогемоцитов с образующимися гиалиновыми клетками; слева — плазматоциты I, заполненные фагоцитированными частицами угля (звездочки). *г* — через 3 сут после инъекции угля; видны крупные гиалиновые клетки и плазматоциты I с различным количеством включений. Обозначения те же, что и на рис. 2, 3, 5. Масштабный отрезок — 20 мкм.

разу ни в контроле, ни под влиянием воздействий не были выявлены у более взрослых личинок.

Как и у *C. vicina* (Кинд, 2005, 2008), у *C. vomitoria* постстрессорная трансформация прогемоцитов в гиалиновые клетки сопровождается задержкой пупаризации личинок приблизительно на 1 сут. Эта задержка имеет место на всех исследованных стадиях, начиная от полу-

опустошенного зоба и кончая периодом холодowego оцепенения. Можно предположить, что одним из условий дифференцировки является пониженный титр экдизона, характерный для ранних этапов развития, предшествующих запуску метаморфоза. В то же время уже сформированные стабильные гиалиновые клетки могут сохраняться в гемолимфе и у молодых пупариев. Эти сохранивши-

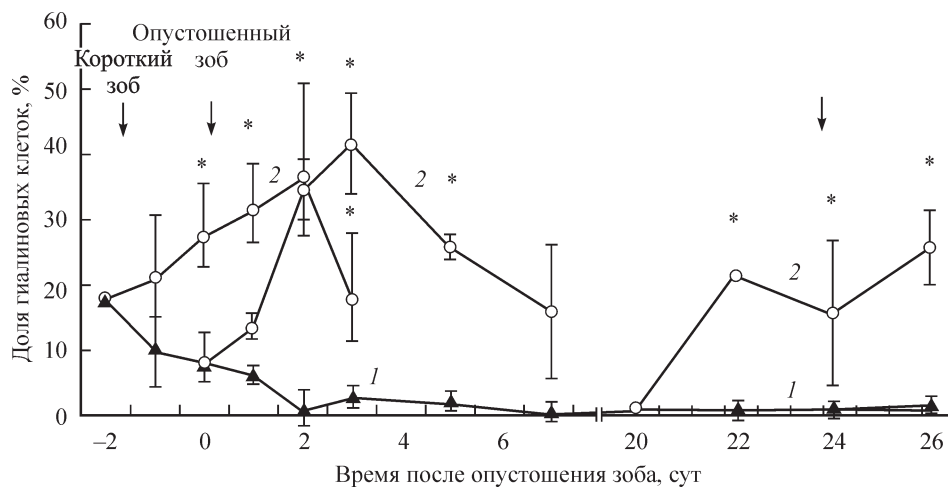


Рис. 7. Влияние инъекции угля на продукцию стабильных гиалиновых клеток у личинок разного возраста (средние и доверительные интервалы).

1 — контроль, 2 — инъекции угля. Стрелками обозначены моменты инъекций, звездочки указывают на достоверные различия между опытом и контролем.

еся клетки заметно отличаются от вновь образованных гиалиновых клеток с ацентрическими бобовидными ядрами и от веретенновидных клеток, характерных для этой стадии (Кинд, 2003). Таким образом, гемоциты, основной функцией которых является инкапсуляция крупных чужеродных объектов, слишком больших для фагоцитоза, могут очень сильно различаться по своей морфологии, происхождению и гормональному фону запуска их дифференцировки даже у представителей достаточно близких семейств высших двукрылых. Это делает весьма актуальным их исследование для понимания формирования механизма клеточной защиты, обеспечивающей столь успешную резистентность к бактериальной и паразитической инвазии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента РФ (Ведущие научные школы, НШ-2232).

Список литературы

- Кинд Т. В. 2003. Гемоциты мясной мухи *Calliphora vicina* и их динамика при развитии личинок и индукции метаморфоза. Цитология. 45 (1) : 14—25.
- Кинд Т. В. 2005. Агглютинация и фагоцитоз чужеродных абиотических частиц гемоцитами мясной мухи *Calliphora vicina* in vivo. I. Динамика фагоцитарной активности гемоцитов в онтогенезе личинок. Цитология. 47 (7) : 609—622.
- Кинд Т. В. 2007. Гемоциты с различными типами защитной реакции в онтогенезе трех видов мясных мух рода *Calliphora*. В кн.: Стратегия адаптации наземных членистоногих к неблагоприятным условиям среды. Тр. БиНИИ СПбГУ. СПб.: Изд-во СПбГУ. 53 : 306—335.
- Кинд Т. В. 2008. Инъекция чужеродных частиц вызывает дифференцировку стабильных гиалиновых клеток в гемолимфе личинок мясной мухи *Calliphora vicina*. Цитология. 50 (9) : 757—764.
- Тулин Д. В., Чага О. Ю. 2003. Гемоциты личинки *Calliphora vicina*. I. Гистологический анализ. Цитология. 45 (10) : 976—985.
- Crossley A. C. S. 1964. An experimental analysis of the origins and physiology of haemocytes in the bluefly *Calliphora erythrocephala* (Meig.). J. Exp. Zool. 157 : 375—398.
- Crossley A. C. 1975. The cytophysiology of insect blood. Adv. Insect Physiol. 11 : 117—221.
- Jones J. C. 1956. The hemocytes of *Sarcophaga bullata* Parker. J. Morphol. 99 : 233—257.
- Kaaya G. P., Ratcliffe N. A. 1982. Comparative study of hemocytes and associated cells of some medically important Dipterans. J. Morphol. 173 : 351—365.
- Janot R., Zachary D., Holder F., Meister M. 2001. Postembryonic hematopoiesis in *Calliphora*. Develop. Biol. 230 : 243—257.
- Rivers D. B., Ruggiero L., Hayes A. 2002. The ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) differentially affects cells mediating the immune response of its flesh fly host, *Sarcophaga bullata* Parker (Diptera: Sarcophagidae). J. Insect Physiol. 48 : 1053—1064.
- Rizki T. M., Rizki R. M. 1992. Lamellocyte differentiation in *Drosophila* larvae parasitized by *Leptopilina*. Develop. Comp. Immunol. 16 : 103—110.
- Shrestha R., Gateff E. 1982. Ultrastructure and cytochemistry of the cell types in the larval hematopoietic organs and hemolymph of *Drosophila melanogaster*. Develop. Growth Differ. 24 : 65—82.
- Whitten J. M. 1964. Haemocytes and the metamorphosing tissues in *Sarcophaga bullata*, *Drosophila melanogaster*, and other Cyclorraphous Diptera. J. Insect Physiol. 10 : 447—469.
- Zachary D., Brehelin M., Hoffmann J. A. 1975. Role of the «thrombocytoids» in capsule formation in the dipteran *Calliphora erythrocephala*. Cell Tissue Res. 162 : 343—348.
- Zachary D., Hoffmann J. A. 1973. The haemocytes of *Calliphora erythrocephala* (Meig.) (Diptera). Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 141 : 55—73.

Поступила 10 X 2007

DIFFERENTIATION OF THE STABLE HYALINE CELLS IN RESPONSE TO FOREIGN PARTICLES INJECTIONS INTO THE LARVAE OF BLOWFLY *CALLIPHORA VOMITORIA*

T. V. Kind

Laboratory of Biopharmacology and Immunology of Insects, Biological Institute of St. Petersburg State University;
e-mail: tatiana.kind@mail.ru

Injection of foreign particles (charcoal and human erythrocytes) into the larvae of *Calliphora vomitoria* provokes the complex immune response including their phagocytosis, nodulation and encapsulation by plasmatocytes and thrombocytoids. Precursors of thrombocytoids and analogs of *Drosophila* lamellocytes are very frequent during the periods of feeding and crop emptying, but fully disappear in wandering larvae. Injection of charcoal or erythrocytes into crop emptying larvae leads also to a dramatic increase in the number of stable hyaline cells, precursors of thrombocytoids. The hyaline cells differentiate from prohaemocytes and, quite possibly, from young weakly-specialized plasmatocytes in a day after injection. Later they are transformed to prothrombocytoids and thrombocytoids. The number of hyaline cells and young plasmatocytes in the crop emptying larvae of *C. vomitoria* is far greater than that in the same age larvae of *C. vicina*. Presumably it accounts for significantly increasing rate of stable hyaline cells differentiation in the injected larvae of *C. vomitoria*. Their part after injection of charcoal particles or erythrocytes may reach 40—50 % of the main haemocyte number compared to 20—25 % in *C. vicina*. After completion of the crop emptying, the rate of hyaline cells differentiation in response to the foreign particles injection is evidently reduced but remains to be distinctly visible. Injections of saline also stimulate the differentiation of the stable hyaline cells from prohaemocytes but elevation of their amount is more weak and gradual. The bacterial immunization and needle prick show no effect. The treatments, inducing the rising of hyaline cells differentiation, lead also to pupariation delay. This correlation suggests involvement of the endocrine system into this process.