

АГГЛЮТИНАЦИЯ И ФАГОЦИТОЗ ЧУЖЕРОДНЫХ АБИОТИЧЕСКИХ ЧАСТИЦ  
ГЕМОЦИТАМИ МЯСНОЙ МУХИ *CALLIPHORA VICINA* IN VIVO.  
II. ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИММУННОЙ ИНДУКЦИИ  
НА ГЕМОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ

© Т. В. Кунд

Лаборатория биофармакологии и иммунологии насекомых  
Биологического НИИ С.-Петербургского государственного университета;  
электронный адрес: [tatiana.kind@mail.ru](mailto:tatiana.kind@mail.ru)

Реакция гемоцитов *Calliphora vicina* на инъекцию чужеродных частиц зависит как от возраста личинок, так и от наличия или отсутствия иммунизации. В период опустошения зоба иммунизация индуцирует значительное повышение уровня фагоцитоза частиц угля ювенильными плазматоцитами через 2—4 ч после инъекции. После завершения опустошения зоба картина защитной клеточной реакции значительно меняется. Уже в 1-е минуты после инъекции (от 3 до 15 мин) у иммунизированных личинок наблюдаются интенсивное прилипание частиц к поверхности плазматоцитов I и образование крупных скоплений плазматоцитов (морул). У неиммунизированных контрольных особей подобной адгезии и образования скоплений не отмечено. Этот процесс продолжается недолго, и через 30 мин происходят диссоциация угля с поверхности клеток и распад скоплений на отдельные плазматоциты. У иммунизированных зрелых личинок также интенсифицируется формирование капсул из плазматоцитов вокруг заполненных чужеродными частицами тромбоцитоидных агглютинатов. Образование капсул не сопровождается адгезией плазматоцитами частичек угля. Значительного влияния на уровень фагоцитоза и образование гиалиновых клеток предварительная иммунизация у зрелых личинок не оказывает. Можно предположить, что иммунизация влияет как на механизмы распознавания чужого, что выражается в адгезии частиц к мембране плазматоцитов и образовании морул, так и на значительно более поздние процессы фагоцитоза.

Ключевые слова: насекомые, *Calliphora*, иммунитет, фагоцитоз, плазматоциты, тромбоцитониды, гиалиновые клетки.

В настоящее время хорошо известны два основных типа защитной реакции организма насекомых на инвазию бактериальных, грибковых или паразитических организмов. Это гуморальная реакция, при которой клетки жирового тела отзываются на инфекцию выработкой широкого спектра антибактериальных веществ, и клеточная реакция, осуществляющаяся путем фагоцитоза, нодуляции или инкапсуляции чужеродных объектов гемоцитами. Эти две реакции среди прочих факторов различаются и скоростью проявления. Если время гуморального ответа измеряется как минимум часами, то изоляция патогенов и их последующее уничтожение путем фагоцитоза или инкапсуляции может начинаться через считанные минуты после инвазии. Бактериальная иммунизация приводит к значительному повышению титра целого набора видоспецифических пептидов, позволяющих насекомому справиться с грибковой или бактериальной инфекцией, которая в ином случае оказалась бы летальной. Эти вещества и механизмы индукции их синтеза в настоящее время привлекают большое внимание исследователей и достаточно хорошо изучены (Cociancich et al., 1994; Hoffmann, 1995; Bulet et al., 1999; Chernysh et al., 2002).

Значительно фрагментарнее исследовано влияние иммунизации на клеточную защитную реакцию. В то же

время гемоциты играют роль не только в фагоцитозе и изоляции патогенных организмов, но и в более широких аспектах иммунитета. Экспрессия антибактериального гена после инфицирования личинок *Drosophila* фитопатогенными бактериями *Erwinia carotovora* слабо выражена у мутантных линий с пониженным содержанием гемоцитов. Это говорит об участии гемоцитов в регуляции антимикробного ответа (Basset et al., 2000).

Тот же эффект генной экспрессии в ответ на бактериальную инфекцию выявлен у табачного бражника (Geng, Dunn, 1989). У имаго *Sarcophaga peregrina* повреждение стенки тела инъекционной иглой вызывает одновременную индукцию антибактериальной активности и гемоглинирующей активности (по отношению к эритроцитам овцы) (Kubo et al., 1984). Повышение клеточной активности может быть запущено не только в ответ на бактериальную инфекцию, но и при введении в гемоцель других чужеродных абиотических и биотических элементов. Инъекция латексных шариков в гусениц последнего возраста *Galleria mellonella* также вызывает сильную защитную реакцию. При этом клеточная реакция гемоцитов сопровождается увеличением антибактериальной активности гемолимфы. Предполагается, что в процессе клеточной защитной реакции из гемоцитов выделяются ве-

щества, индуцирующие выработку антибактериальных белков (Wiesner, 1991). При добавлении к монослою плазматочитов *Galleria mellonella* силикатных шариков, индуцирующих фагоцитоз, они вырабатывают стимулирующий фагоцитоз фактор, интенсифицирующий этот процесс как *in vitro*, так и *in vivo* (Wiesner et al., 1996). Быстрота клеточной реакции на септическое воздействие заставляла предполагать, что фагоцитоз не опосредуется гуморальными механизмами, а индуцируется непосредственно бактериями, паразитами или иными чужеродными частицами. Однако уже в 1979 г. было предположено наличие лимфокинин-подобного фактора, интенсифицирующего фагоцитарную реакцию гемоцитов и расширяющего спектр их ответа (Mohrig, Schittek, 1979). Таким образом, неспецифическая иммунная реакция включает не только запуск синтеза набора антибактериальных белков, но и повышение активности иммуноцитов. В то же время ни у одного из исследованных видов не были изучены ни динамика клеточного ответа, ни влияние этапа развития на поведение различных типов клеток. У широко используемой в качестве модельного объекта мясной мухи *Calliphora vicina* (Виноградова, 1984) достаточно полно исследованы иммунная стимуляция выработки антибактериальных пептидов (Chernysh et al., 1995, 2000, 2002), а также общие проявления защитной клеточной реакции — фагоцитоз и инкапсуляция чужеродных объектов (Zachary et al., 1975; Кинд, 2005, 2007). Было показано, что интенсивность и скорость реакции на чужеродные частицы зависят как от типа иммуноцитов, так и от этапа развития личинок. При этом скорость ответа разных типов клеток сильно различается. Это предполагает различные механизмы их активации и наличие каскада реакций, приводящих к последовательному вовлечению в процесс иммунного ответа гемоцитов различного типа. Очень велика вероятность разных механизмов активации рано и поздно реагирующих клеток: гуморальная — у поздно реагирующих и прямая — у рано реагирующих. Для проверки этого предположения было проведено исследование эффекта бактериальной иммунизации на функционирование разного типа гемоцитов у личинок *C. vicina* на последовательных этапах развития.

### Материал и методика

Для работы была использована природная популяция *C. vicina* из Петергофа со значительной склонностью к диапаузе. Личинок выращивали на свиных почках при 12 °С и 12-часовом световом дне (условия, провоцирующие диапаузу). После окончания питания личинки покидали мясо и переходили к стадии бродяжничества и диапаузы. Диапаузирующих личинок перемещали в условия 5 °С. Возврат в условия повышенной температуры через 1—3 мес охлаждения приводил к быстрому возобновлению развития и пупаризации через 2—3 сут. Иммунизацию опустошающих зоб, бродячих и диапаузирующих личинок осуществляли путем укола тонкой иглой, смоченной в суспензии грамположительных и грамотрицательных бактерий (*Esherichia coli* и *Micrococcus luteus*). Это воздействие в отличие от укола стерильной иглой приводило к значительному повышению гуморального иммунитета. Для максимального проявления эффекта иммунизации контрольных и иммунизированных особей содержали 2 сут при 15 °С. После этого им производили инъекцию 10 мкл стерильной 2—5%-ной суспензии мел-

ко растертого медицинского активированного угля с величиной частиц 0.1—1.0 мкм в физиологическом растворе (0.65 г NaCl, 0.014 г KCl, 0.012 г CaCl<sub>2</sub> и до 100 мл дистиллированной воды). В каждой серии использовали по 50—100 особей. Развитие контрольных и иммунизированных личинок происходило абсолютно синхронно, и к пупаризации они приступали одновременно. Через различное время после инъекции (от 3 мин до 4 ч) пробы гемолимфы исследовали под микроскопом с использованием дифференциально-интерференционного контраста (ДИК) по Номарскому при увеличении 400× (об. 40×). Эта методика позволяет получить барельефные полихромные изображения клеток и ряда клеточных структур, включая ядра, ядрышки и вакуоли. Она очень удобна для распознавания отдельных типов гемоцитов и для анализа их состояния в процессе функционирования. В каждом варианте использовали по 2 временных препарата гемолимфы. Капли гемолимфы, взятые после прокола в передних сегментах 5 личинок, смешивали на предметном стекле и немедленно исследовали под микроскопом. Изображения монослоя гемоцитов были получены с использованием цифровой видеокамеры Digital CDSP, установленной на микроскопе Jenamed. Они захватывались с помощью программы iuVCR и редактировались в Adobe Photoshop (v. 7). Для статистической обработки (среднее значение, стандартное отклонение и доверительный интервал) подсчитывали количество гемоцитов различного типа и количество гемоцитов с прилипшими к мембране и с фагоцитированными частицами угля в 10 произвольно выбранных полях (по 5 полей для каждого препарата). В каждом варианте учитывали данные не менее чем по 100 клеткам.

### Результаты

Динамика реакции гемоцитов неиммунизированных опустошающих и опустошивших зоб личинок была подробно описана ранее (Кинд, 2005). Она полностью соответствовала результатам, полученным в настоящей работе для контрольных личинок.

После иммунизации личинок с наполовину опустошенным зобом через 2 сут при 15 °С как иммунизированные, так и контрольные особи достигают стадии короткого зоба. У неиммунизированных личинок через 30 мин после инъекции частицы угля скапливаются в крупных тромбоцитоидных агглютинатах с отдельными прилипшими плазматочитами, а через 1—2 ч начинается накопление угля в ювенильных плазматочитах. У иммунизированных личинок через 30 мин после инъекции частицы угля также захватываются тромбоцитоидами с образованием агглютинатов, но в отличие от предыдущего варианта вокруг агглютинатов скапливается довольно большое количество плазматочитов, часто с образованием капсул (рис. 2, в; 7). Через 1 ч после инъекции количество прилипших к агглютинатам плазматочитов значительно сокращается и уголь появляется в отдельных свободно плавающих клетках. Через 2—4 ч увеличивается как количество плазматочитов с углем, так и степень их заполненности, причем оба этих параметра заметно превышают таковые у неиммунизированных личинок (рис. 1, а; 2, б, г; 7). На более поздних этапах развития регистрация состояния гемоцитов проводилась подробнее, начиная с 3—4 мин после инъекции угля и заканчивая 4 ч.

У неиммунизированных личинок с почти опустошенным зобом после переноса в условия 15 °С через 2 сут достигается стадия полного очищения кишечника. Ювенильные плазматочиты исчезают и полностью заменяются плазматочитами I. Спустя 3—4 мин после инъекции накопление частиц угля наблюдается, как и в предыдущем варианте, только в тромбоцитоидных агглютинатах. Вплоть до 10—15 мин после инъекции к агглютинатам прилипают только отдельные плазматочиты, а позже наблюдается образование капсул и незначительная адгезия частиц угля к плазматочитам I (рис. 3, а, б; 7). Подобная адгезия является временной, продолжается около получаса, и затем частицы вновь отходят от плазматочитов. Наличие капсул также является временным, и они распадаются на агглютинаты с углем и отдельные плазматочиты через 2—4 ч.

После предварительной иммунизации через 3—4 мин после инъекции угля помимо агглютинатов появляются крупные конгломераты, состоящие из агглютинатов и гемоцитов. Через 7 мин плазматочиты выходят за пределы конгломератов и образуют вокруг агглютинатов капсулы, полукапсулы или просто группы прилипших клеток. Но адгезия угля к мембране плазматочитов в пределах капсул или скоплений плазматочитов выражена очень слабо (рис. 3, в, з). Не заметно и перехода частиц из агглютинатов в плазматочиты в более поздние сроки — через 2—4 ч после инъекции. Только через 1—2 сут они заполняются углем при параллельном опустошении тромбоцитоидных агглютинатов.

У личинок, полностью опустошивших зоб и перешедших в стадию бродяжничества, превалирующим типом гемоцитов становятся плазматочиты I, хотя тромбоциты в виде фрагментов цитоплазмы и «голых» ядер также представлены достаточно широко (Кинд, 2003).

При отсутствии иммунизации уголь начинает накапливаться в тромбоцитоидах через 3—4 мин после инъекции, т. е. с некоторой задержкой по сравнению с реакцией гемоцитов у опустошающих зоб личинок, и в гемолимфе присутствует довольно большое количество свободно плавающих частиц (25—40 в поле зрения). Еще через 5—10 мин появляются отдельные скопления плазматочитов с прилипшими к их поверхности частицами, которые были названы нами морулами (Кинд, 2005). В отличие от классических нодул или розеток, формирующихся вокруг групп бактериальных клеток у представителей других отрядов насекомых (Lavine, Strand, 2002), они не содержат центрального скопления частиц и не показывают никаких признаков меланизации. При этом количество свободно плавающих частиц значительно сокращается (7—10 в поле зрения). Через 30 мин гемолимфа освобождается от свободных частиц угля полностью, а плазматочиты I начинают окружать агглютинаты; образуются пока еще немногочисленные капсулы, количество которых постепенно увеличивается через 1—2 ч. В отличие от предыдущего варианта фагоцитоза частиц плазматочитами в пределах первых 4 ч наблюдений не выявляется.

У иммунизированных личинок через 3—4 мин после инъекции частицы угля скапливаются в различной величины тромбоцитоидных агглютинатах, значительно более крупных, чем у неиммунизированных особей. Часто агглютинаты окружены плазматочитами. Некоторые из плазматочитов с прилипшими частицами угля вместе с агглютинатами могут образовывать конгломератные скопления. Свободные частицы угля есть, но заметно

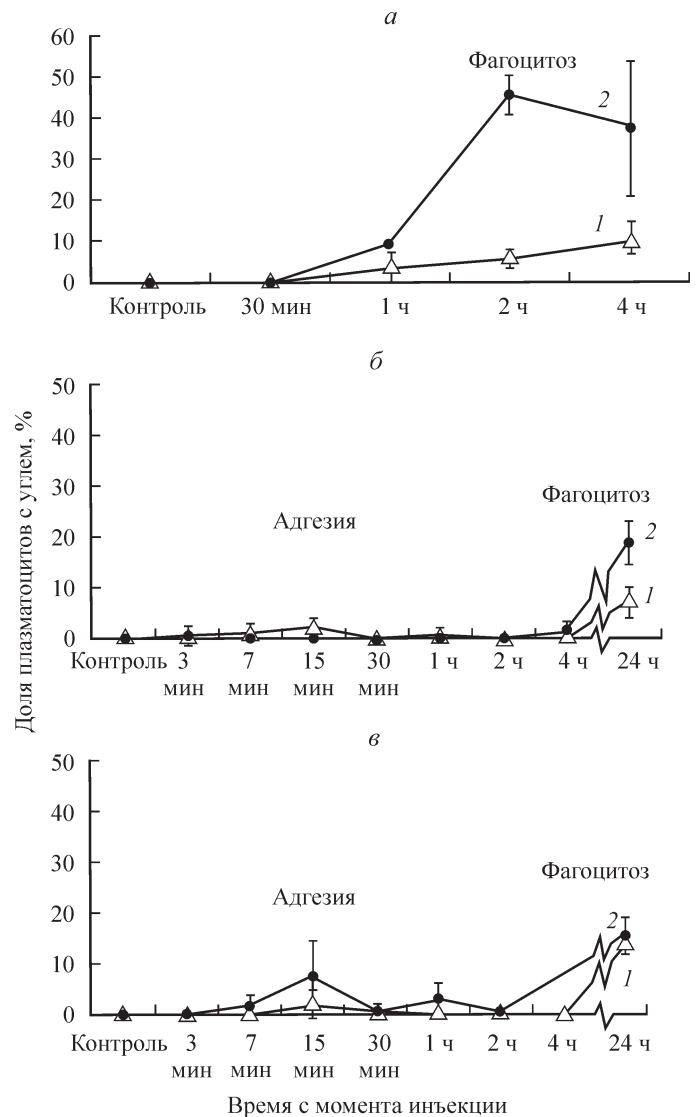


Рис. 1. Влияние иммунизации на защитную реакцию плазматочитов личинок *Calliphora vicina*.

Доля плазматочитов с адгезированными или фагоцитарными частицами угля через различные сроки после инъекции в неиммунизированных (1) и иммунизированных (2) личинок в начале (а), в конце (б) опустошения зоба и через 1 нед после его опустошения (в). Даны средние значения и их доверительные интервалы ( $P = 0.05$ ).

меньше, чем у контрольных личинок того же срока (2—5 в поле зрения). Через 15 мин появляются морулы, состоящие из плазматочитов с прилипшими частицами. В этот же период плазматочиты окружают многие агглютинаты, образуя капсулы. Капсулы сохраняются в гемолимфе довольно продолжительное время, вплоть до 2 ч, морулы распадаются значительно быстрее (через 30 мин), и уголь, отделяясь от плазматочитов, переходит в агглютинаты.

У постдиапаузных личинок, содержавшихся 1 мес при 5 °С, через 2 сут после переноса в условия 15 °С наступает период запуска пупаризации, характеризующийся (на уровне форменных элементов гемолимфы) появлением значительного количества плазматочитов II и III. В это время наблюдается та же закономерность реакции на иммунизацию, что и на более ранних стадиях. На протяжении первых 3—4 мин после инъекции угля образуются

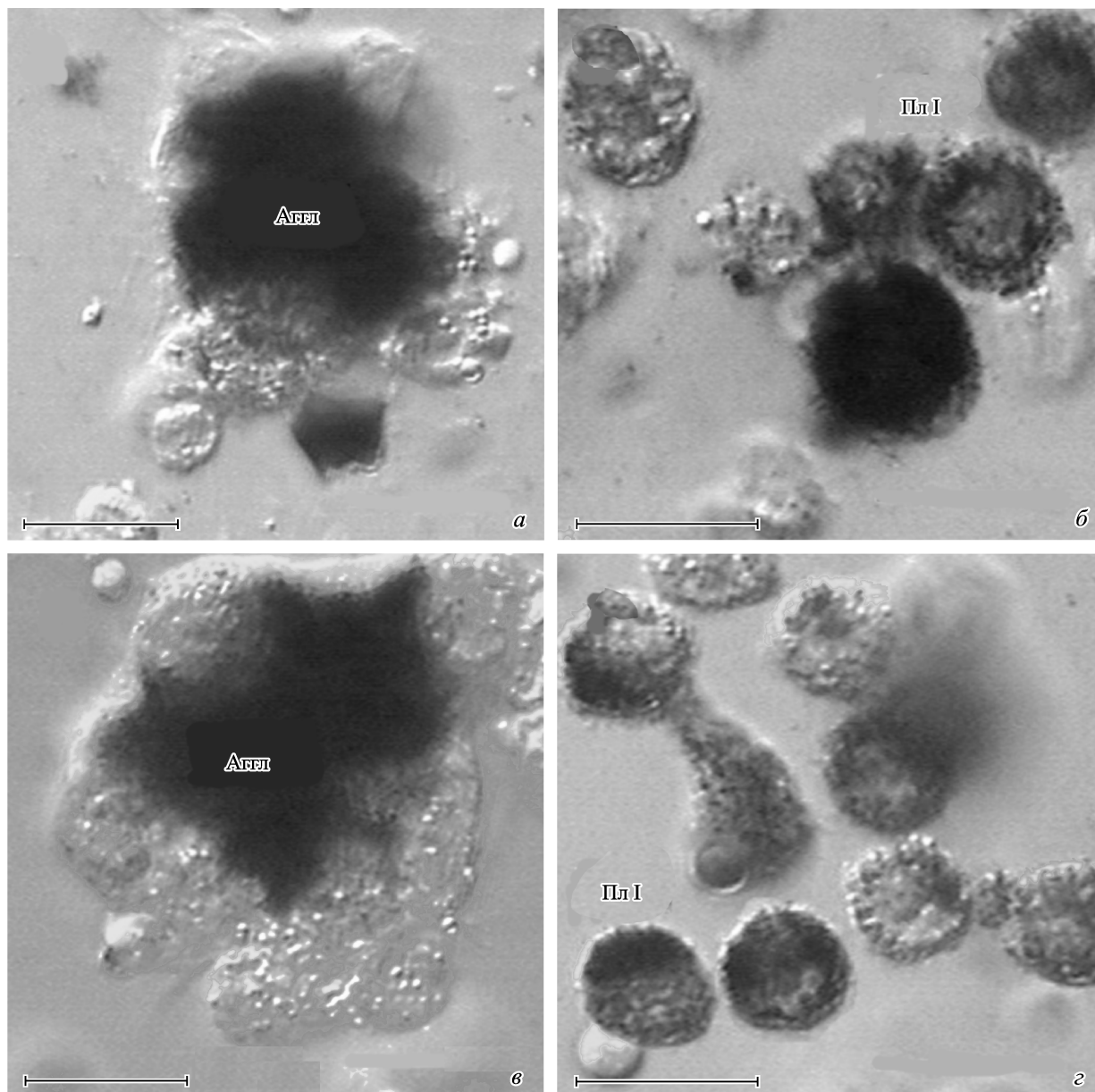


Рис. 2. Гемоциты полуупустошивших зоб неиммунизированных (верхний ряд) и иммунизированных (нижний ряд) личинок *Calliphora vicina* через 30 мин (а, в) и 4 ч (б, з) после инъекции суспензии угля. Дифференциальный интерференционный контраст по Номарскому.

Аггл — тромбоцитоидные агглютинаты, Пл I — плазматоциты I. Масштабные отрезки — 20 мкм.

тромбоцитоидные агглютинаты с частицами угля, окруженные у предварительно иммунизированных личинок присоединившимися плазматоцитами. При этом сами присоединившиеся клетки свободны от угля, а плазматоциты с адгезированным углем часто собираются в морулы. У неиммунизированных личинок ни морул, ни адгезии угля не наблюдается. Через 7—15 мин морулы почти полностью распадаются, частицы угля также покидают поверхность плазматоцитов и переходят в агглютинаты (рис. 4, в, з). В отличие от более ранних стадий развития фагоцитоз угля плазматоцитами начинается приблизительно через 1 ч после инъекции, независимо от того были личинки предварительно иммунизированы или нет. Через 4 ч имеется довольно много плазматоцитов I с фагоцитированным углем (рис. 5, а), а агглютинаты

частично освобождаются от частиц и принимают форму тяжей.

В повторной серии экспериментов, проведенных на другой линии *C. vicina* с более прочной диапаузой, через 2 сут после переноса в условия при 15 °C имеют место только первые признаки запуска метаморфоза. У этих особей при сохранении общей динамики защитных реакций разница между контрольными и иммунизированными личинками была выражена значительно отчетливее. Доля плазматоцитов с адгезированным углем в ранние сроки после инъекции могла возрастать до 30—40 % против 10—15 % в первом варианте (рис. 5, б).

Отчетливо выраженный ответ гемоцитов на иммунизацию постдиапаузных личинок через 3—4 мин при-

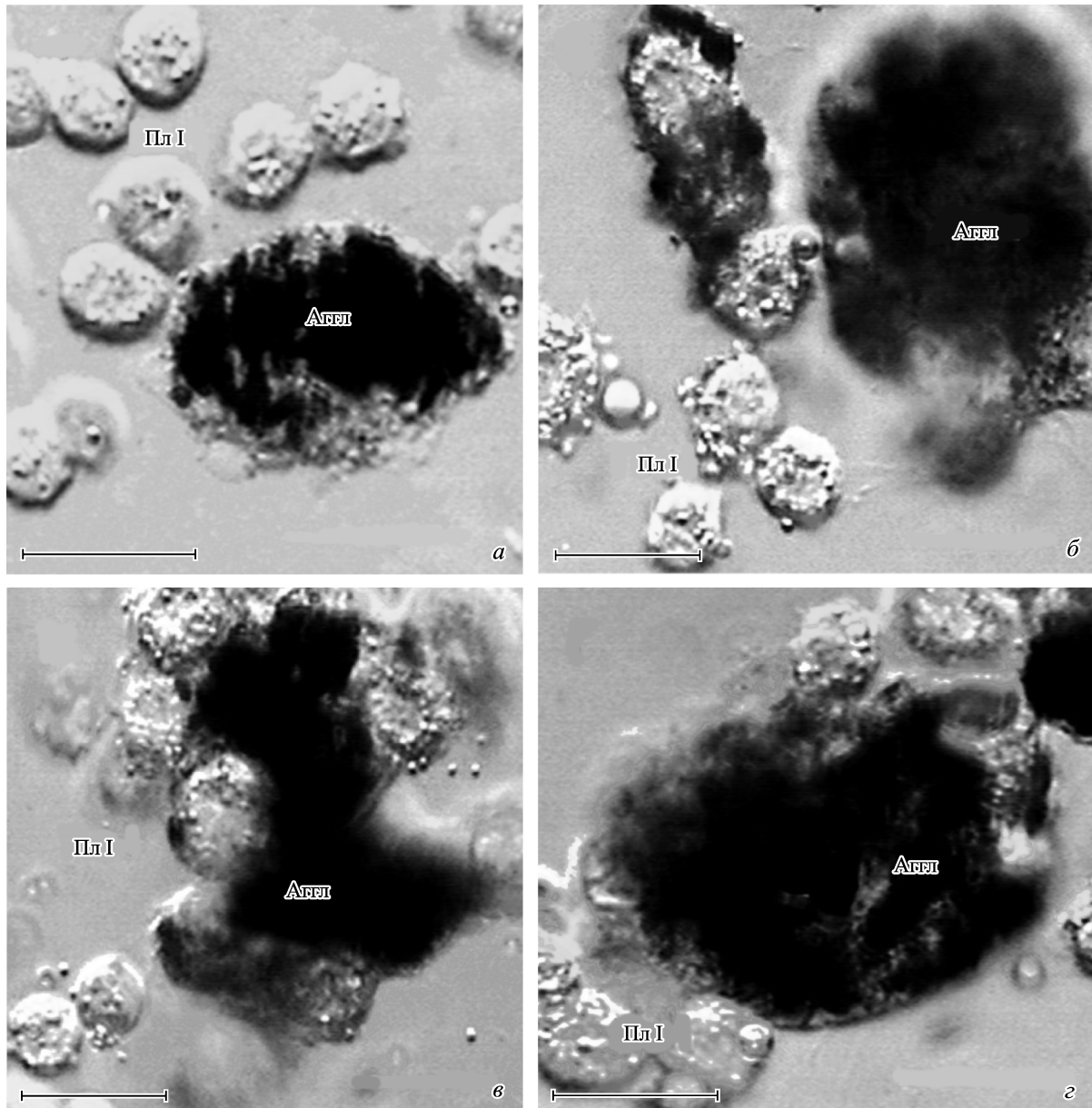


Рис. 3. Гемоциты почти опустошивших зоб неиммунизированных (верхний ряд) и иммунизированных (нижний ряд) личинок *Caliphora vicina* через 7 (а, в) и 60 (б, з) мин после инъекции суспензии угля. Дифференциальный интерференционный контраст по Номарскому.

Обозначения те же, что и на рис. 2. Масштабные отрезки — 20 мкм.

вел к необходимости исследовать более ранние стадии агглютинации и адгезии. Оказалось, что уже через 1 мин как у контрольных, так и у иммунизированных личинок начинается формирование тромбоцитоидных агглютинатов, однако к агглютинатам иммунизированных личинок прилипают группы плазматочитов, которые через 2 мин после инъекции окружают агглютинаты с образованием капсул или морул с центральным заполненным углем тромбоцитоидным ядром. В этот период к мембране плазматочитов угольные частицы еще не прилипают. Через 4 мин у иммунизированных особей наблюдается резкий всплеск гемоцитарной реакции, выражающийся в адгезии к поверхности плазматочитов I многочисленных частиц угля и очищении от них гемолимфы. У контрольных личинок заметно только постепенное заполнение углем аг-

глютинатов с немногочисленными примкнувшими плазматочитами. Никаких признаков адгезии не отмечено (рис. 6).

Одной из защитных гемоцитарных реакций у *C. vicina* является интенсификация дифференцировки стабильных гиалиновых клеток (предшественников тромбоцитоидов). Однако среди испытанных воздействий иммунизация практически не оказывала влияние на этот процесс (Кинд, 2008). В настоящей работе анализ препаратов гемолимфы контрольных и иммунизированных личинок разного возраста позволяет сделать вывод о том, что определенная тенденция к увеличению доли гиалиновых клеток после иммунизации имеется. В большинстве вариантов доля гиалиновых клеток в гемолимфе иммунизированных личинок была больше таковой у контрольных личинок, однако

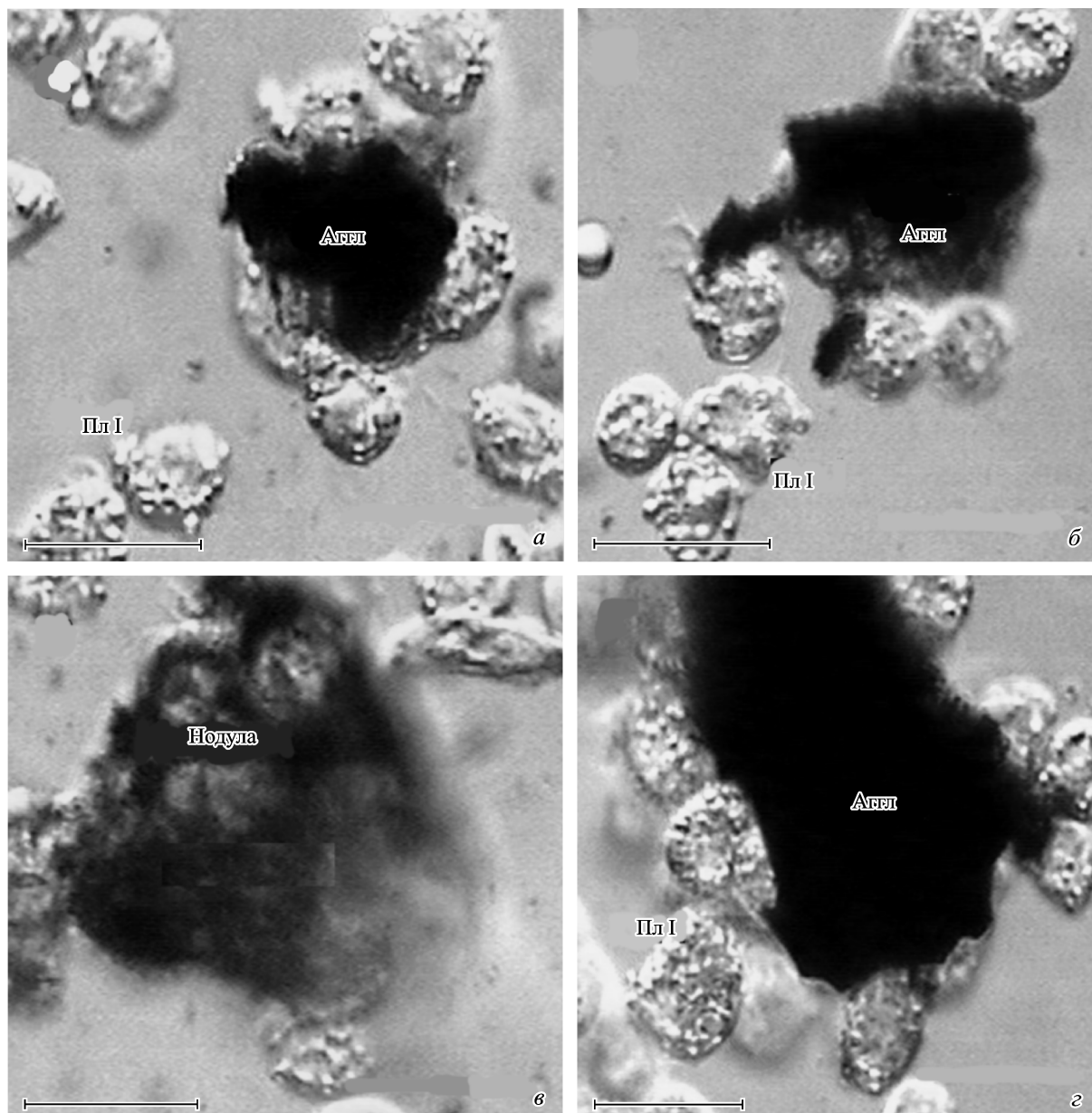


Рис. 4. Гемоциты постдиапаузных неиммунизированных (верхний ряд) и иммунизированных (нижний ряд) личинок *Calliphora vicina* через 15 мин (а, б) и 2 ч (в, г) после инъекции суспензии угля. Дифференциальный интерференционный контраст по Номарскому.

Масштабные отрезки — 20 мкм.

разница между опытом и контролем редко превышала уровень достоверности. Поэтому говорить о заметном влиянии иммунизации на степень дифференцировки гиалиновых клеток не приходится.

### Обсуждение

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что у *C. vicina* предварительная бактериальная иммунизация личинок приводит к заметному усилению защитной клеточной реакции по отношению к абиотическим чужеродным частицам, введенным в гемоцель. В основном это касается плазматоцитов. В значительно меньшей степени иммунизация влияет на функциониро-

вание тромбоцитоидов и дифференцировку гиалиновых клеток.

У личинок разного возраста наблюдается различная реактивность гемоцитов по отношению к чужеродным частицам. Опустошающие зоб личинки, форменные элементы гемолимфы которых представлены, не считая прогемоцитов, тромбоцитоидами, ювенильными плазматоцитами и гиалиновыми клетками, освобождаются от инъектированного угля преимущественно за счет тромбоцитоидов. При этом формирование тромбоцитоидных агглютинатов (слипание клеточных безъядерных фрагментов с параллельным захватом чужеродных частиц) происходит вне зависимости от иммунизации. Облипания плазматоцитов частицами не наблюдается ни у контрольных, ни у иммунизированных особей. В то же время фаго-

цитоз (вернее, переход частиц из агглютинатов в плазматоциты) явственно стимулируется предварительной бактериальной обработкой. Иммунизация резко повышает реактивность клеток, и доля содержащих уголь ювенильных плазматоцитов через 2 ч приближается к 50 % против 6—10 % у неиммунизированных особей. Таким образом, реакция протекает в два этапа: первый — иммуннезависимый (тромбоцитоподобный) и второй — зависимый от иммунизации, осуществляющийся с помощью ювенильных плазматоцитов.

После смены популяций плазматоцитов, наступающей при опустошении зоба (Кинд, 2003, 2007), основными представителями этой категории клеток становятся плазматоциты I, при запуске метаморфоза дифференцирующиеся в плазматоциты II и III и далее в макрофаги. По ряду параметров их реакция на чужеродные частицы значительно отличается от таковой ювенильных плазматоцитов. Наблюдаются два разделенных во времени этапа. В 1-е мин после инъекции происходит адгезия чужеродных частиц к плазматоцитам, отчетливо выраженная только после иммунизации, и слипание плазматоцитов с образованием морул или конгломератов из тромбоцитоподобных агглютинатов и скоплений окруженных частицами плазматоцитов. Склонность к образованию морул и к адгезии угля в значительной степени зависит от завершенности дифференцировки плазматоцитов I. Сразу после опустошения зоба скопления плазматоцитов у иммунизированных личинок образуются, но адгезии угля практически не наблюдается. В процессе дифференцировки плазматоцитов при взрослении личинок способность к адгезии нарастает и достигает максимума у постдиапаузных особей.

У многих насекомых описаны индуцированные инфекцией скопления плазматоцитов, или нодулы. Эти скопления окружают слипшуюся кучку бактерий, впоследствии обычно меланизированных. Однако в данном случае классических нодул никогда не образуется, меланизации не наблюдается, а частицы угля с поверхности плазматоцитов, вероятнее всего, переходят в тромбоцитоподобные агглютинаты, и сами скопления распадаются. Время существования морулообразных скоплений невелико и обычно составляет не более получаса. Плазматоциты могут слипаться не только друг с другом, но и с тромбоцитоподобными агглютинатами, иногда окружая их сплошным слоем и образуя капсулу. Образование капсул также значительно сильнее выражено у иммунизированных личинок. Реакция между плазматоцитами и агглютинатами начинается несколько позже, чем образование морул, и продолжается дольше. Через 1—2 ч после инъекции еще можно видеть облепленные плазматоцитами агглютинаты. В отличие от плазматоцитов, собирающихся в морулы, плазматоциты в капсулах не окружены частицами угля и накапливают его только в более поздние сроки, через несколько часов после инъекции.

Вторым этапом плазматоцитарной реакции на появление чужеродных частиц является фагоцитоз. Иммунизация оказывает на адгезию и фагоцитоз различное влияние. Фагоцитоз чужеродных частиц плазматоцитами опустошивших зоб личинок происходит в значительно более поздние сроки, чем агглютинация, и его уровень зависит от иммунизации.

Картины на ранних стадиях реакции свидетельствуют о том, что первыми, практически немедленно, реагируют на чужое тромбоцитоподобные, причем иммунизация оказыва-

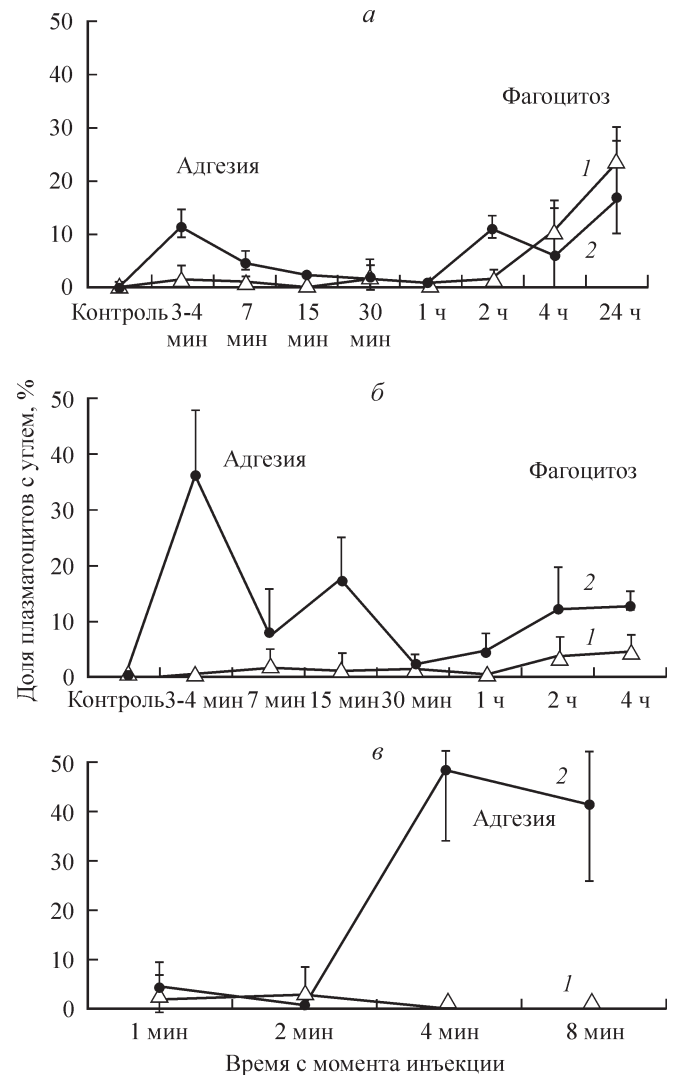


Рис. 5. Влияние иммунизации на защитную реакцию плазматоцитов постдиапаузных личинок *Calliphora vicina*.

Доля плазматоцитов с адгезированными или фагоцитированными частицами угля через различные сроки после инъекции суспензии угля в неиммунизированных (1) и иммунизированных (2) личинок. а — начало предметаморфозной дифференцировки гемоцитов; б — до начала запуска метаморфоза; в — до начала запуска метаморфоза, ранние этапы реакции. Даны средние значения и их доверительные интервалы ( $P = 0.05$ ).

ет на их поведение весьма умеренно стимулирующее влияние. Сверхбыстрая реакция тромбоцитоподобных на появление чужеродных частиц свидетельствует о том, что они распознают чужеродные объекты путем прямого взаимодействия рецепторов с чужими молекулами. Опсонизация мишеней, играющая заметную роль в распознавании «чужого» гемоцитами, у тромбоцитоподобных в этом процессе не участвует или почти не участвует. Это наводит на мысль об отсутствии или по крайней мере очень низком уровне гуморальной регуляции их активности.

Иммунизация оказывает наиболее выраженный эффект на более поздние защитные реакции, свойственные плазматоцитам, когда распознавание происходит опосредованно, после опсонизации поверхности вторженца. И только впоследствии происходит их связывание путем фагоцитоза.

Эти процессы привлекают пристальное внимание исследователей, однако к настоящему моменту еди-

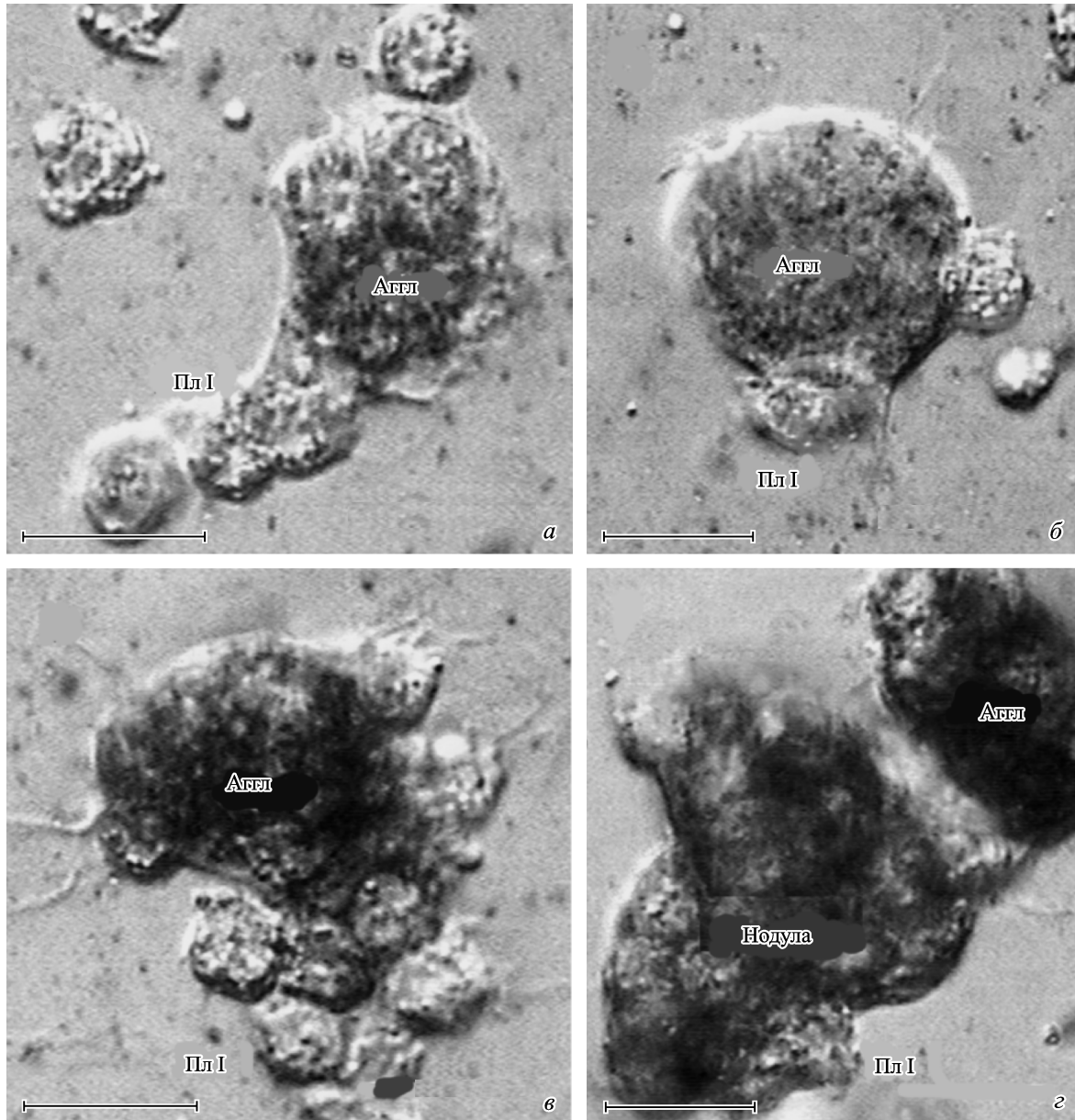


Рис. 6. Реакция гемоцитов постдиапаузных неиммунизированных (верхний ряд) и иммунизированных (нижний ряд) личинок *Calliphora vicina* через 1 (а, в) и 4 (б, г) мин после инъекции суспензии угля. Дифференциальный интерференционный контраст по Номарскому.

Обозначения те же, что и на рис. 2—4. Масштабные отрезки — 20 мкм.

ной гипотезы, объясняющей реакцию гемоцитов как на биотические, так и на абиотические вещества, не существует.

Предполагается, что гемоциты насекомых в ответ на бактериальную инвазию и опознание бактериальных липополисахаридов могут сами выделять путем экзоцитоза белок распластывания (белок 47 кДа) (Charalambidis et al., 1995). Этот белок локализован как на поверхности, так и в гранулах плазматоцитов. При этом наружно локализованный белок 47 кДа ответствен за фагоцитоз, инкапсуляцию и нодуляцию, в то время как его секретлируемая копия ответственна за внеклеточное уничтожение бактерий.

Стимулирующие фагоцитоз факторы (предположительно эйкозаноиды, или биогенные амины) могут выра-

батывать активированные латексными шариками гемоциты гусениц вошинной моли через 2 ч после начала собственного фагоцитоза (Wiesner et al., 1996). Тот же эффект в ответ на бактериальную инфекцию выявлен у табачного бражника (Geng, Dunn, 1989).

Еще одними веществами, ответственными за связывание чужеродных веществ, являются лектины (агглютинины). В ответ на повреждение стенки тела увеличивается как синтез лектина клетками жирового тела, так и присоединение его к поверхности гемоцитов. Предполагается, что молекулы лектинов могут служить перемычками при агглютинации. У *Calliphora vomitoria* лектин концентрируется в основном на плазматоцитах I (McKenzie, Preston, 1992a) и вызывает успешную агглютинацию ряда видов бактерий. Очевидно, он играет значительную роль во



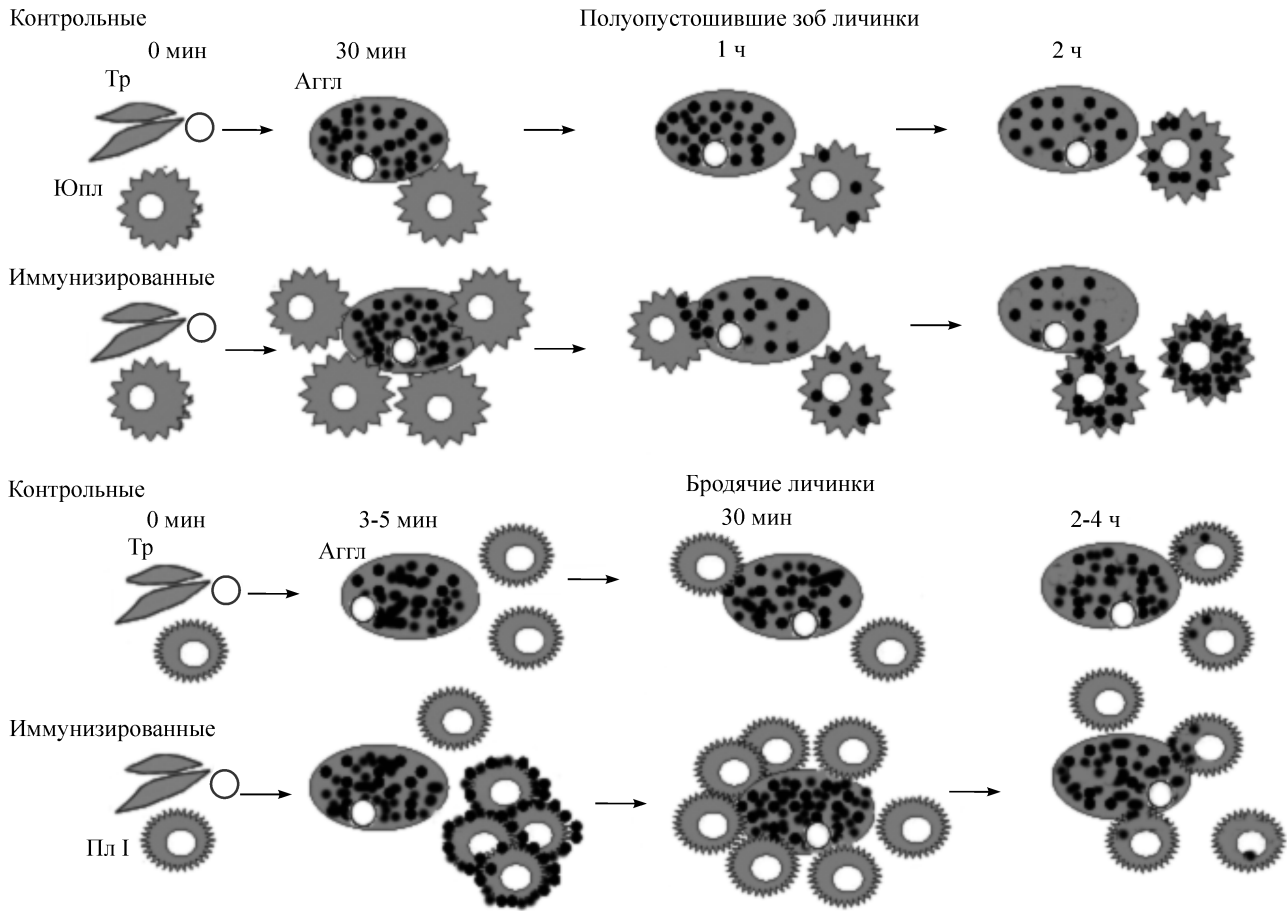


Рис. 7. Схема динамики реакции гемоцитов на инъекцию суспензии угля у личинок *Calliphora vicina* различного возраста. Черные кружки обозначают захваченные частицы угля. В тромбоцитоидах (Тр) обозначено по 1 ядру, хотя их количество может варьировать от 0 до 5—6. Цифры над рисунками означают время после инъекции угля. Пл I — плазматциты I, Юпл — ювенильные плазматциты.

взаимодействии частица—гемоцит. Лектин значительно увеличивает уровень присоединения гемоцитов к латексным шарикам и, вероятно, действует как опсонин (McKenzie, Preston, 1992b). Опсонизация гемоцитов и увеличение способности образовывать капсулы или розетки после обработки лектинами были обнаружены также у *Extatosoma tiaratum* (Richards, Ratcliffe, 1990) и *Drosophila melanogaster* (Ao et al., 2007).

Присоединение плазматцитов к заполненным углем тромбоцитоидным агглютинатам по временным параметрам очень напоминает конъюгацию плазматцитов с мишенными раковыми клетками лейкемии К-562 (Chernysh et al., 2004). В обоих случаях присоединение плазматцитов наступает через 5—10 мин и продолжается в течение 1—2 ч. Примкнувшие к агглютинатам плазматциты постепенно заполняются углем при параллельном опустошении агглютинатов, что позволяет предположить переход частиц через мембраны.

Заполненные углем тромбоцитоидные агглютинаты становятся распознаваемыми плазматцитами, приобретая свойства чужеродного объекта. В то же время присоединение к агглютинатам плазматцитов не сопровождается адгезией свободных частиц угля. Очевидно, плазматциты обладают альтернативными адгезивными свойствами по отношению к чужеродным абиотическим частицам и к заполненным этими частицами тромбоцитоидам, что говорит о наличии у разных клеток

в пределах одной популяции различных рецепторных паттернов.

Таким образом, защитная клеточная реакция личинок *C. vicina* является комплексной и включает в себя целый ряд самостоятельных или взаимосвязанных компонентов (агглютинацию, адгезию частиц, адгезию плазматцитов и, наконец, фагоцитоз). Ее механизмы могут варьировать в зависимости от гемоцитарного состава гемолимфы, степени дифференцировки иммуоцитов и предварительной иммунизации. Это делает мясную муху великолепным модельным объектом для исследования процессов агглютинации, адгезии и фагоцитоза на молекулярном уровне.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ 7130. 2006.4).

#### Список литературы

- Виноградова Е. Б. 1984. Мясная муха (*Calliphora vicina*) — модельный объект физиологических и экологических исследований. Л.: Наука. 272 с. (Труды Зоол. ин-та АН СССР, т. 118).
- Кинд Т. В. 2003. Гемоциты мясной мухи *Calliphora vicina* и их динамика при развитии личинок и индукции метаморфоза. Цитология. 45 (1) : 14—25.

- Kind T. V. 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.
- Kind T. V. 2007. Гемоциты с различными типами защитной реакции в онтогенезе трех видов мясных мух рода *Calliphora*. Труды БиНИИ СПбГУ. 53 : 306—335.
- Kind T. V. 2008. Инъекция чужеродных частиц вызывает дифференцировку стабильных гиалиновых клеток в гемолимфе личинок мясной мухи *Calliphora vicina*. Цитология. 50 (9) : 745—764.
- Ao J., Ling E., Yu X. Q. 2007. *Drosophila* C-type lectins enhance cellular encapsulation. Mol. Immunol. 44 : 2541—2548.
- Basset A., Khush R. S., Braun A., Gardan L., Boccard F., Hoffmann J. A., Lemaitre B. 2000. The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 97 : 3376—3381.
- Bulet P., Hetru C., Dimarcq J. L., Hoffmann D. 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Develop. Comp. Immunol. 23 : 329—344.
- Charalambidis N. D., Zervas C. G., Lambropoulou M., Katsoris P. G., Marmaras V. J. 1995. Lipopolysaccharide-stimulated exocytosis of nonself recognition protein from insect hemocytes depends on protein tyrosine phosphorylation. Eur. J. Cell Biol. 67 : 32—41.
- Chernysh S. I., Filatova N. A., Chernysh N. S., Nesin A. P. 2004. Cytotoxic activity of blowfly *Calliphora vicina* hemocytes. J. Insect. Physiol. 50 : 777—781.
- Chernysh S. I., Gordja N. A., Simonenko N. P. 2000. Diapause and immune response: induction of antimicrobial peptides synthesis in the blowfly, *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera: Calliphoridae). Entomol. Sci. 3 : 139—144.
- Chernysh S. I., Kim S. I., Bekker G., Pleskach V. A., Filatova N. A., Anikin V. B., Platonov V. G., Bulet P. 2002. Antiviral and antitumor peptides from insects. PNAS. 99 : 2628—2632.
- Chernysh S. I., Simonenko N. P., Braun F., Meister M. 1995. Developmental variability of the antibacterial response in larvae and pupae of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) and *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). Eur. J. Entomol. 92 : 203—209.
- Cociancich S., Bulet P., Hetru C., Hoffmann J. A. 1994. The inducible antibacterial peptides of insects. Parasitol. Today. 10 : 132—139.
- Geng C. X., Dunn P. E. 1989. Plasmacyte depletion in larvae of *Manduca sexta* following injection of bacteria. Develop. Comp. Immunol. 13 : 17—23.
- Hoffmann J. A. 1995. Innate immunity of insects. Curr. Opin. Immunol. 7 : 4—10.
- Kubo T., Komano H., Okada M., Natori S. 1984. Identification of hemagglutinating protein and bactericidal activity in the hemolymph of adult *Sarcophaga peregrina* on injury of the body wall. Develop. Comp. Immunol. 8 : 283—291.
- Lavine M. D., Strand M. R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem. Mol. Biol. 32 : 1295—1309.
- McKenzie A. N., Preston T. M. 1992a. Functional studies on *Calliphora vomitoria* haemocyte subpopulations defined by lectin staining and density centrifugation. Develop. Comp. Immunol. 16 : 19—30.
- McKenzie A. N., Preston T. M. 1992b. Biological characteristics of the *Calliphora vomitoria* agglutinin. Develop. Comp. Immunol. 16 : 85—93.
- Mohrig W., Schitteck D. 1979. Phagocytosis-stimulating mediators in insects. Acta Biol. Med. Ger. 38 : 953—958.
- Richards E. H., Ratcliffe N. A. 1990. Direct binding and lectin-mediated binding of erythrocytes to haemocytes of the insect *Extatosoma tiaratum*. Develop. Comp. Immunol. 14 : 269—281.
- Wiesner A. 1991. Induction of immunity by latex beads and by hemolymph transfer in *Galleria mellonella*. Develop. Comp. Immunol. 15 : 241—250.
- Wiesner A., Wittwer D., Gotz P. 1996. A small phagocytosis stimulating factor is released by and acts on phagocytosing *Galleria mellonella* haemocytes in vitro. J. Insect. Physiol. 42 : 829—835.
- 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.

Поступила 27 IV 2009

AGGLUTINATION AND PHAGOCYTOSIS OF FOREIGN ABIOTIC PARTICLES BY BLUEBOTTLE *CALLIPHORA VICINA* HAEMOCYTES IN VIVO.  
II. INFLUENCE OF THE PREVIOUS SEPTIC IMMUNE INDUCTION ON HAEMOCYTIC ACTIVITY

T. V. Kind

Department of Entomology, Laboratory of Insect Biopharmacology and Immunology, St. Petersburg State University;  
e-mail: tatiana.kind@mail.ru

The rate of *Calliphora vicina* haemocytic defense reaction to foreign particles injection depends on the larval age and on the previous bacterial immunization. Immunization of crop-empting larvae induces an evident increase in particles phagocytosis by juvenile plasmacytes in 2—4 h after injection. Both the hemogram and the pattern of cellular defense reaction change significantly after crop-empting. Immunized larvae start intensive adhesion of foreign particles to plasmacytes surface and formation of great aggregations of plasmacytes (morules) no longer than in 3—4 min after injection. The period of particle-haemocyte adhesion is short-termed and no more than after 30 min cell aggregates dissociate and adhered charcoal particles pass to thrombocytoidal agglutinates. Unimmunized control larvae of the same age have shown no adhesion and morules formation. In immunized wading and diapausing larvae, formation of capsules consisting of central thrombocytoidal agglutinat filled with alien particles and adherent plasmacytes I is intensified. In contrast to morules, this capsule formation is not accompanied by charcoal particles adhesion to plasmacytes. Immunization of

mature larvae of *C. vicina* shown no prominent influence on both the rate of phagocytosis and the hyaline cells differentiation. It might be supposed that the receptors system is complex and the immunization both the mechanisms of foreigners recognition (adhesion, morulation and incapsulation) and the far more lately occurring phagocytosis.

Key words: insects, *Calliphora*, immunity, phagocytosis, plasmatocytes, thrombocytoids, hyaline cells.

---