

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ ГЕМОЦИТОВ МЯСНОЙ МУХИ *CALLIPHORA VICINA*

© Т. В. Кинд

Биологический институт С.-Петербургского государственного университета;
электронный адрес: tatiana.kind@mail.ru

Обзор собственных результатов и литературных данных позволяет сделать ряд выводов относительно гемоцитарного состава гемолимфы мясной мухи *Calliphora vicina* и роли разных типов гемоцитов в клеточной иммунной реакции. В гемолимфе каллифорид выявлено 7 основных типов гемоцитов. Это прогемоциты, являющиеся стволовыми клетками для всех остальных типов, нестабильные гиалиновые клетки — источники профенолоксидазы, стабильные гиалиновые клетки и формирующиеся при их дифференцировке тромбоцитоиды, веретенновидные клетки, ювенильные плазматоциты и, наконец, плазматоциты I—IV, являющиеся последовательными фазами дифференцировки одной клеточной линии. Каждый из этих типов несет определенную функциональную нагрузку и является составной частью защитной реакции против инвайдеров. На протяжении личиночного периода отчетливо прослеживаются две волны дифференцировки гемоцитов. У питающихся и освобождающихся зоб личинок происходит нарастание количества гиалиновых клеток, тромбоцитоидов и ювенильных плазматоцитов. Параллельно увеличивается и защитная функция этих гемоцитов. Вторая волна гемогенеза наблюдается в конце периода опустошения зоба и сопровождается взрывом продукции плазматоцитов I с их дальнейшей дифференцировкой в плазматоциты II—IV. Производство гиалиновых клеток может определяться не только возрастом личинок, но и попаданием в гемоцель чужеродных органических или неорганических частиц. В этом случае прогемоциты начинают дифференцироваться не в плазматоциты, а в стабильные гиалиновые клетки и далее в тромбоцитоиды. Три типа гемоцитов *Calliphora* участвуют в освобождении гемолимфы от чужеродных частиц — тромбоцитоиды, ювенильные плазматоциты и плазматоциты I и II. Тромбоцитоиды ответственны за инкапсуляцию яиц паразитических перепончатокрылых, но они могут и фагоцитировать мелкие органические и неорганические частицы. Ювенильные плазматоциты реагируют на проникновение чужого почти столь же быстро, как и тромбоцитоиды, в первые минуты после инвазии. Плазматоциты I и II начинают фагоцитоз значительно позднее — через часы, часто накапливая частицы, ранее захваченные тромбоцитоидами. Плазматоциты I могут адгезировать на поверхности чужеродные частицы и группироваться в морулы, а также окружать заполненные тромбоцитоиды, образуя своеобразные капсулы. И морулы, и капсулы являются временными структурами и распадаются через несколько часов после образования. Предполагается, что гемоцитарная система осуществляет комплексную реакцию быстрого реагирования, которая подготавливает организм мух к более масштабному гуморальному иммунному ответу.

Ключевые слова: *Calliphora vicina*, защитная реакция, гемоциты, фагоцитоз, инкапсуляция, распознавание.

Прцветание насекомых в самых различных экологических условиях, в том числе и в крайне септической среде типа гниющих растений или животных, обеспечивается несколькими уровнями защиты, первым из которых является механическая, а именно наружная кутикула и кишечная мембрана. При попадании преодолевших механические барьеры чужеродных тел в гемолимфу в дело вступает врожденный иммунитет, включающий механизмы распознавания болезнетворных чужеродных элементов и их элиминацию путем выработки широкого спектра бактерицидных и фунгицидных веществ или изоляции патогенов путем их фагоцитоза или (и) инкапсуляции.

Имеются две системы врожденной иммунной защиты — гуморальная и клеточная. Между ними нет четкой границы — гемоциты могут вырабатывать бактерицидные или контактно-киллерные вещества, а молекулы,

участвующие в гуморальном иммунитете, — оказывать модифицирующее влияние на функционирование гемоцитов. Мясная муха *Calliphora vicina* является одним из популярных объектов изучения общефизиологических процессов у насекомых (Виноградова, 1984). Выработка гуморальных бактерицидных и противовирусных веществ у различных представителей *Calliphoridae* в настоящее время весьма интенсивно исследуется (Chernysh et al., 1995, 2000, 2002). Более того, из гемолимфы *Calliphora* выделены фармакологически активные противовирусные вещества типа аллокина, используемые для лечения герпеса и папилломы шейки матки (Черныш, 2004; Черныш и др., 2005).

В то же время существует значительный дефицит сведений в отношении механизмов распознавания гемоцитами *Calliphora* чужеродных объектов и их последую-

Классификация гемоцитов *Calliphora vicina*, предложенная различными исследователями

Кинд, 2003	Crossley, 1964	Zachary, Hoffmann, 1973	Каава, Ratcliffe, 1982	Тулин, Чага, 2003
Прогемоциты	Z-клетки	Плазматоциты I	Прогемоциты	I, прогемоциты
Нестабильные гиалиновые клетки	C-клетки	Эноцитойды	—	VI, кристаллические клетки
Стабильные гиалиновые клетки	B-клетки	»	Эноцитойды	II, тромбоцитойды
Веретенovidные гиалиновые клетки	D-клетки, E-клетки	Веретенovidные клетки	»	V, поздние посттромбоцитойды
Ювенильные плазматоциты	A-клетки	—	—	VII, филоподоциты
Плазматоциты I	Z-клетки	Плазматоциты II	Плазматоциты	VIII, гистолизocyты
Плазматоциты II	F-клетки	Плазматоциты III	»	То же
Плазматоциты III	То же	То же	Плазматоциты, гранулоциты	» »
Плазматоциты IV (макрофаги)	—	Плазматоциты IV (макрофаги)	Плазматоциты IV (макрофаги)	» »

щего фагоцитоза или инкапсуляции. При всем внимании, которое уделяется в последние годы механизмам рецепции болезнетворных организмов и самым современным методам анализа внутриклеточных процессов, картина не может быть полной без привязки исследований к определенным типам гемоцитов и определенным этапам развития, когда эти исследования проводятся. И вот этих-то общебиологических сведений остро не хватает для получения если и не исчерпывающей, то хотя бы объективной картины. Красноречивым примером отсутствия взаимосвязи между различными уровнями анализа клеточной иммунной системы служит один из модельных объектов — плодовая мушка *Ceratitis capitata*, на которой в последние годы проводится значительное количество биохимических исследований на самом современном уровне (Marmaras, Charalambidis, 1992; Marmaras et al., 1996; Soldatos et al., 2003; Mavrouli et al., 2005; Tsakas, Marmaras, 2010) при практически полном отсутствии данных о строении гемоцитов, их функциональных особенностях и динамике в процессе развития. Подобные сведения совершенно необходимы в связи с тем, что различные типы обладают характерными только для них взаимоотношениями и особенностями в реакции на патогены. Без подобной привязки самая современная работа будет просто демонстрацией возможностей модных методов исследований.

Выделение типов гемоцитов вызывало ожесточенные дискуссии исследователей, особенно во времена, когда единственными критериями были морфологические и электронно-микроскопические особенности клеток (Gupta, 1979; Brehelin, Zachary, 1986). С началом использования биохимических методов окраски и моноклональных антител стало возможным установить принадлежность к определенному типу значительно более достоверно (Chain et al., 1992; Mullet et al., 1993; Willott et al., 1994; Strand, Johnson, 1996; Gardiner, Strand, 1999; Lebestky et al., 2000). Однако подобные исследования проведены только на нескольких видах, а для остальных морфологические характеристики должны сочетаться с функциональным анализом.

Для *Calliphora* изучение гемоцитов имеет достаточно продолжительную историю, и каждый из авторов предлагал свою собственную номенклатуру, основанную по большей части на морфологических и биохимических па-

раметрах клеток. При этом в большинстве случаев использовали личинок только определенных этапов развития, в основном это были особи конца III возраста, уже завершившие питание и освободившие зоб от остатков пищи. Литературные данные приведены в таблице.

Мы посчитали наиболее функциональной классификацию (Zachary, Hoffmann, 1973), которая с некоторыми модификациями была использована во всех последующих работах. Каждый этап развития личинок характеризуется специфическим набором гемоцитов, которые возникают в гемопоэтических органах. Дифференцировка гемоцитов происходит в циркулирующей гемолимфе.

Как и у остальных насекомых (Crossley, 1975; Ribeiro, Brehelin, 2006), базовыми стволовыми клетками для всех типов гемоцитов у *Calliphora* являются прогемоциты — небольшие округлые, овальные или слегка полигональные слабодифференцированные клетки с гомогенной базофильной цитоплазмой. Они выделяются в гемолимфу из гемопоэтических органов, расположенных вдоль спинного сосуда, в виде крупных и очень крупных комков (кластеров) (рис. 1, а, б). Прогемоциты не обладают фагоцитарными свойствами и слабо адгезируют к стеклу. В ходе развития личинки прогемоциты являются основным типом циркулирующих гемоцитов. На протяжении III возраста до стадии «блуждающей» личинки относительное содержание клеток этого типа составляет около 60 %. После опустошения зоба доля прогемоцитов стремительно уменьшается почти до нуля, вновь возрастая до 5—10 % лишь после начала пупаризации (рис. 2).

Дальнейшая дифференцировка прогемоцитов, как уже упоминалось, осуществляется вне гемопоэтических органов, в циркулирующей гемолимфе. Уже в пределах кластеров виден переход прогемоцитов в другие типы — плазматоциты и гиалиновые клетки (рис. 1, в, г). Динамика образования различных типов гемоцитов, с одной стороны, строго приурочена к определенным этапам развития, а с другой стороны, может регулироваться внешними факторами, такими как повреждение, бактериальная инфекция или заражение паразитами. Проследивая наличие и количество разных типов гемоцитов в процессе развития личинок, можно отметить две отчетливые волны дифференцировки, первая из которых приходится на период питания и роста личинок, а вторая — на подготовку к пупаризации и дальнейшему имагинальному развитию (рис. 2).

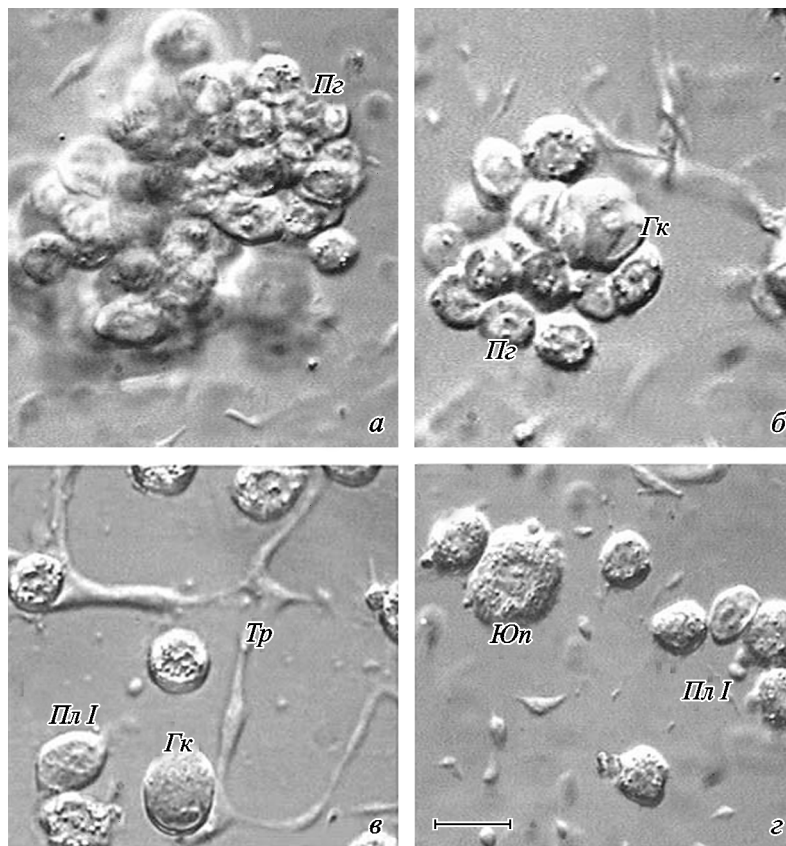


Рис. 1. Гемоциты опустошающей зоб личинки *Calliphora vicina* (оптика Номарского).

a — кластер прогемоцитов с начавшими дифференцировку плазматоцитами I; *б* — небольшой кластер прогемоцитов с формирующейся гиалиновой клеткой; *в* — свободно плавающие плазматоциты I и вытянутые фрагменты цитоплазмы тромбоцитов; *г* — ювенильный плазматоцит, плазматоциты I и мелкие тромбоцитоподобные фрагменты.

Гк — гиалиновая клетка, *Пл I* — плазматоцит I, *Пе* — прогемоциты, *Тр* — тромбоцитоподобный, *Юп* — ювенильный плазматоцит. Масштабный отрезок — 20 мкм.

У питающихся личинок набор гемоцитов невелик. В него входят прогемоциты, стабильные и нестабильные гиалиновые клетки, тромбоцитоподобные и ювенильные плазматоциты. Гиалиновые клетки, описываемые большинством авторов как энцитоподы, являются в этот период наиболее примечательными форменными элементами. Это крупные и очень крупные округлые (30—70 мкм) клетки, не обладающие способностью к адгезии. При прижизненном наблюдении в световом микроскопе они характеризуются плотной гомогенной стекловидной цитоплазмой. По этой причине они и получили свое название (Crossley, 1964; Whitten, 1964). Мы остановились на этом нейтральном термине, так как неразличимые внешне на ранних стадиях формирования, эти элементы гемолимфы имеют совершенно разную судьбу и функцию.

Нестабильные гиалиновые клетки наиболее часто встречаются у питающихся личинок III возраста, где они составляют до 40 % популяции гемоцитов (рис. 2). Много их и у опустошающих зоб личинок. В свежевыделенной гемолимфе хорошо видны эти очень крупные (диаметр клетки 45—60 мкм, ядра 20—25 мкм) клетки, иногда с немногочисленными гранулами в цитоплазме. В округлом ядре заметны одно крупное и группа более мелких ядрышек. После выделения капли гемолимфы на предметное стекло нестабильные гиалиновые клетки быстро испытывают драматические изменения. Изначально гомогенная цитоплазма за считанные секунды приобре-

тает грубоструктурированный характер. Периферическая часть клетки становится совершенно прозрачной и в скором времени выпячивается в виде пузырей, а позже — в виде гало, окруженного тонкой мембраной. В конце концов остается плоский остов клетки с очень рыхлым ядром. Подобные светлые «тени» нестабильных гиалиновых клеток довольно часто встречаются на препаратах гемолимфы опустошающих зоб личинок. Тулиным и Чагой (2003) при использовании фазово-контрастного микроскопа в периферической зоне цитоплазмы этих клеток были выявлены небольшие кристаллические включения, но нам не удалось обнаружить никаких следов подобных структур ни на прижизненных препаратах (дифференциально-интерференционный контраст по Номарскому), ни на препаратах, окрашенных по Гимза—Романовскому.

Нестабильные гиалиновые клетки были обнаружены не только у *C. vicina* и близких видов *C. vomitoria* и *C. uralensis* (Кинд, 2007), но и у хирургических личинок *Lucilia caesar* и *L. sericata*. Однако наиболее впечатляющие картины этих гемоцитов имеют место у представителей серых мясных мух — саркофагид. У личинок III возраста *Sarcophaga carnaria* в очень крупных (30—60 мкм, ядро 10—12 мкм) гиалиновых клетках (сферульные клетки по: Jones, 1956) отчетливо видны цитоплазматические включения в виде глыбок (рис. 3, *a*). Вскоре после помещения капли гемолимфы на предметное стекло глыбки исчезают, цитоплазма становится мелкогранулярной в

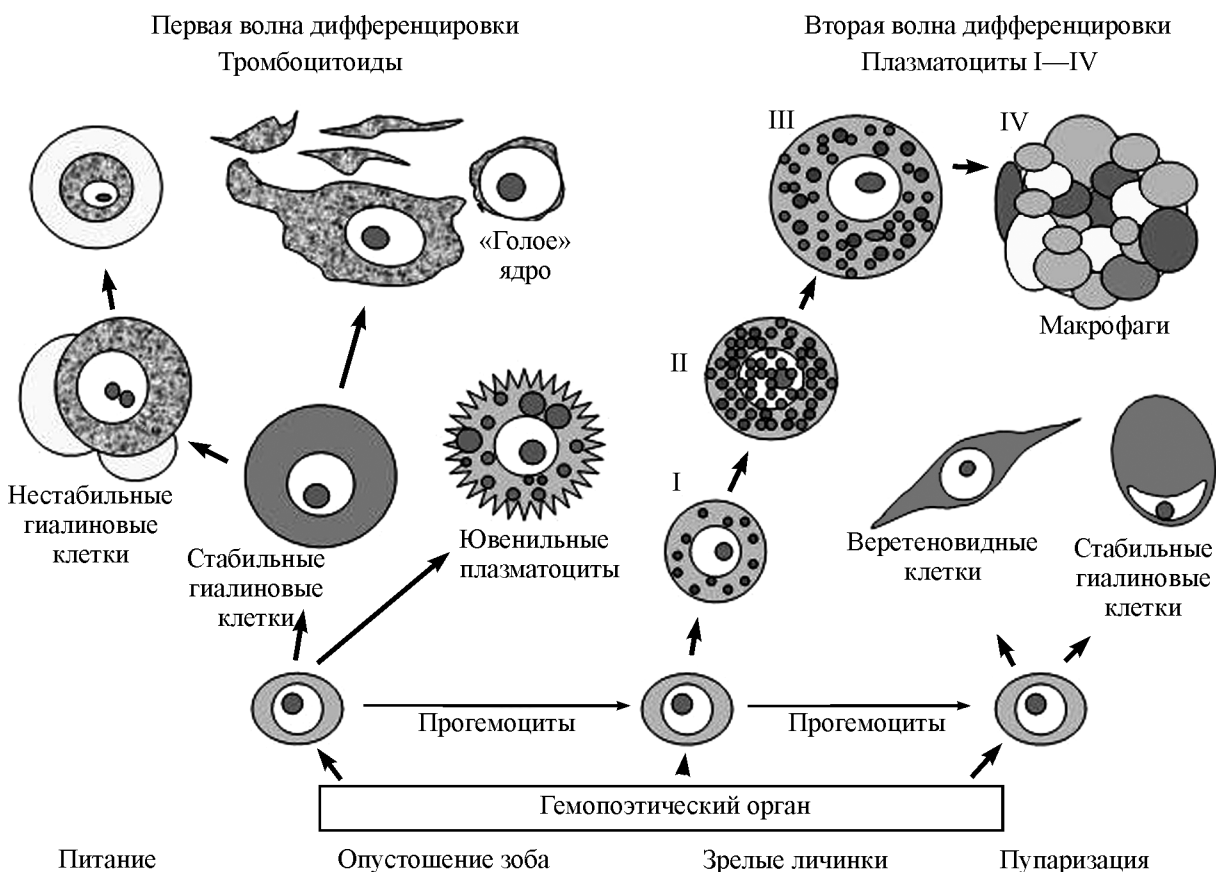


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая предполагаемое происхождение и дифференцировку различных типов гемоцитов *Calliphora* на протяжении личиночного развития и при запуске метаморфоза.

Толстые стрелки указывают направленность дифференцировки, тонкие горизонтальные — на возможность длительного сохранения ранее дифференцированных клеток.

перинуклеарной области и прозрачной по периферии (рис. 3, б). Содержимое образовавшихся фестонов и гало выделяется в гемолимфу, и на месте клетки остается «тень клетки» — скопление гранул вокруг очень светлого ядра (рис. 3, в, г).

Цитохимические исследования показали, что нестабильные гиалиновые клетки как у *Calliphora*, так и у *Sarcophaga* содержат значительные количества профенолоксидазы (Jones, 1956; Crossley, 1964) — фермента, необходимого как для выработки лектинов и распознавания чужеродных инвайдеров (Leonard et al., 1985; Charalambidis et al., 1995, 1996; Lavine, Strand, 2002), так и для образования меланинов в капсулах, изолирующих паразитов в гемоцеле зараженных личинок (Meister, Lagueux, 2003; Ottaviani, 2005).

Среди других видов двукрылых наиболее полно эти клетки описаны как «кристаллические клетки» у *Drosophila melanogaster* (Rizki, Rizki, 1959; Shrestha, Gateff, 1982). По форме, величине и ультраструктуре они очень схожи с энцитоидами и содержат в цитоплазме паракристаллиновые включения (Rizki, Rizki, 1959), но у ряда видов дрозофил эти включения могут быть округлыми или аморфными (Rizki, Rizki, 1980). Как и клетки *Calliphora*, кристаллические клетки после выделения гемолимфы быстро разрушаются с выбросом содержимого цитоплазмы. Профенолоксидаза в небольших клетках концентрируется в кристаллоидных образованиях, а в более крупных выходит в цитоплазму и, возможно, в окружающую

гемолимфу. У комара *Aedes aegypti* содержащие профенолоксидазу гемоциты относятся к энцитоидам (Drif, Brehélin, 1983; Hillyer, Christensen, 2002).

Тромбоцитоида. Сети на захватчиков

Вторым типом гиалиновых клеток, характерных для ранних этапов развития личинок, являются стабильные клетки. Они также принадлежат к типу энцитоида, но имеют совершенно иную роль и судьбу. Стабильные гиалиновые клетки дифференцируются из прогемоцитов в пределах кластеров (рис. 5, а), а затем отделяются и лежат свободно в гемолимфе. По внешнему виду они очень похожи на нестабильные клетки до начала разрушения и обладают округлой формой и крупными размерами (20—60 мкм, ядро 15—20 мкм). Для них характерны плотная гладкая мембрана без выростов и округлое или слегка неправильное ядро с одним очень крупным и группой мелких ядрышек (рис. 5, б). Стабильные гиалиновые клетки являются наиболее заметными и многочисленными у питающихся личинок и могут составлять до половины всей популяции гемоцитов (рис. 4). Доля их в общей популяции с возрастом несколько уменьшается в связи с увеличением количества прогемоцитов и переходом клеток в фазу протромбоцитоида и соответственно с началом формирования совершенно нового типа гемоцитов — тромбоцитоида.

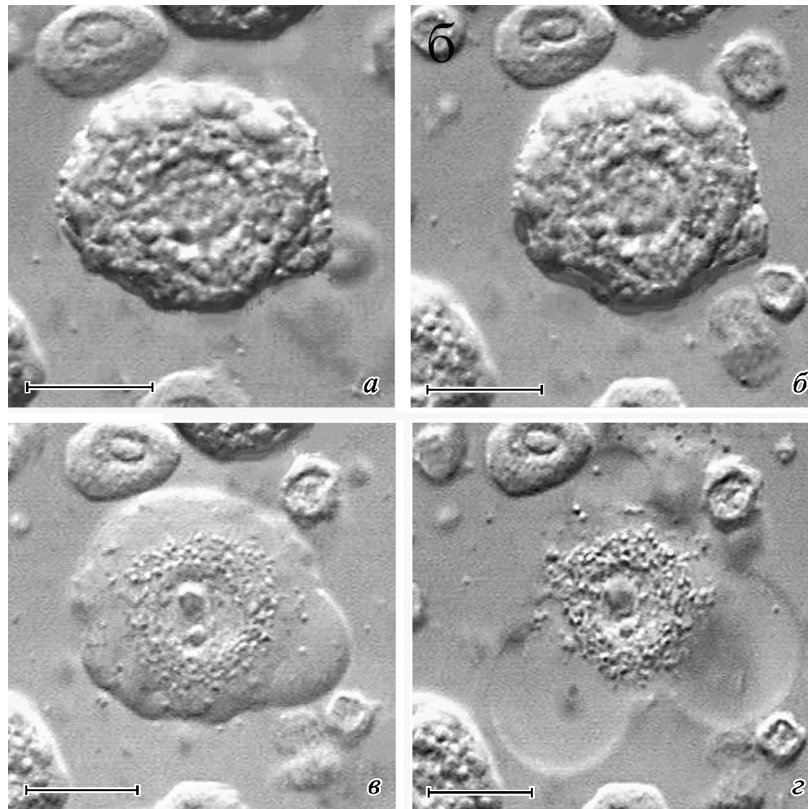


Рис. 3. Распад нестабильных гиалиновых клеток и выделение профенолоксидазы у питающейся личинки *Sarcophaga carnaria* (оптика Номарского).

a — начало наблюдения, *б* — через 1, *в* — через 5, *г* — через 10 мин.

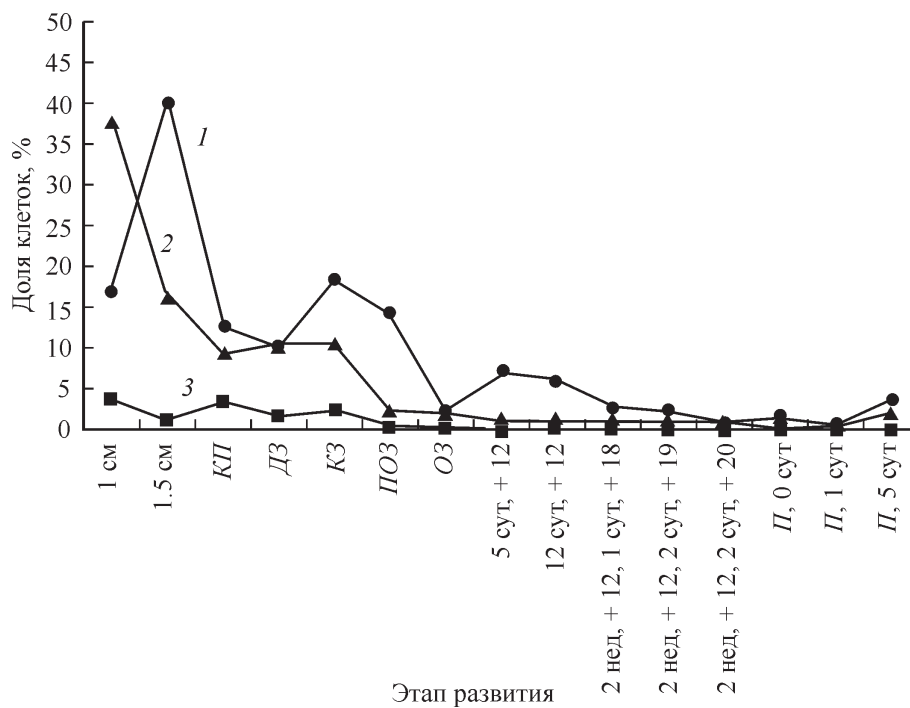


Рис. 4. Гемоцитарная формула стабильных и нестабильных гиалиновых клеток при развитии личинок *Calliphora vicina*. 1 — нестабильные гиалиновые клетки, 2 — стабильные гиалиновые клетки, 3 — тромбоциты. Обозначения по горизонтали: КП — конец питания, ДЗ — длинный зуб, КЗ — короткий зуб, ПОЗ — почти опустошенный зуб, ОЗ — опустошенный зуб, П — pupарий, +12, +18, +19, +20 — при температурах 12, 18, 19, 20 °С соответственно.

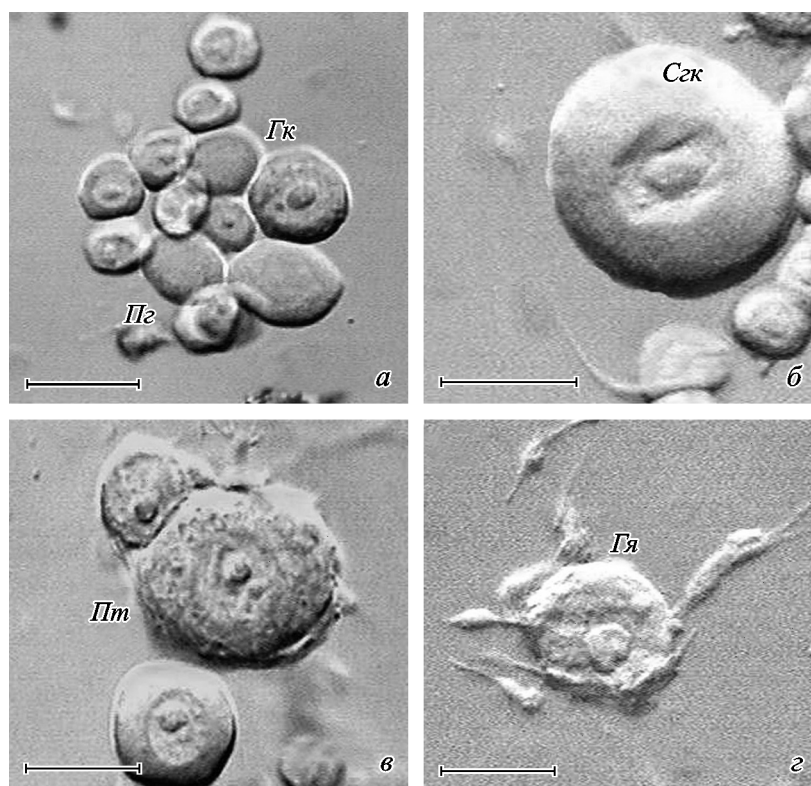


Рис. 5. Формирование тромбоцитоидов в гемолимфе опустошающих зоб личинок *Calliphora vicina* (оптика Номарского).

а — начало дифференцировки гиалиновых клеток в пределах кластера прогемоцитов; *б* — стабильная гиалиновая клетка; *в* — отслоение от протромбозитоида периферического слоя цитоплазмы; *г* — сформировавшийся тромбоцитоид с «голым» ядром, окруженным тонким слоем цитоплазмы и отдельно лежащими веретеновидными фрагментами. *Гк* — гиалиновая клетка, *Гя* — «голое» ядро, *Пг* — прогемоцит, *Пт* — протромбозитоид, *Сгк* — стабильная гиалиновая клетка. Масштабные отрезки — 20 мкм.

Образование тромбоцитоидов можно хорошо проследить на сериях временных препаратов гемолимфы питающихся и начавших опустошение зоба личинок, где хорошо видны последовательные этапы этого процесса (рис. 5). Мембрана стабильных гиалиновых клеток разрыхляется, от ее поверхности начинают либо отслаиваться пласты цитоплазмы (рис. 5, *в*), либо отпочковываться округлые небольшие фрагменты. Эти слои или фрагменты отделяются от протромбозитоидов, приобретают веретеновидную форму и на первых этапах лежат в непосредственной близости к ядру (рис. 5, *г*), а затем равномерно распределяются по гемолимфе, оставляя «голые» ядра, покрытые тонким слоем цитоплазмы (Zachary, Hoffmann, 1973). Трансформация протромбозитоидов в тромбоцитоиды сопровождается резким повышением их адгезивной способности. В считанные минуты после выделения гемолимфы они сливаются в синцитии с различным количеством ядер, тяжи и сети и прилипают к предметному стеклу или любым чужеродным поверхностям.

После пуаризации в гемолимфе появляется еще один тип гиалиновых клеток — веретеновидные клетки, небольшие вытянутые гемоциты с гомогенной цитоплазмой. Преобладают одноядерные клетки, но могут встречаться дву- и даже трехъядерные. Цитоплазма свежвыделенных клеток при исследовании методом Номарского является гомогенной, но через 20—30 мин содержания *in vitro* в ней могут появляться небольшие вакуоли. Ряд авторов (Crossley, 1964; Whitten, 1964; Каауа, Ratcliffe, 1982) выделяют эти клетки в совершенно особый тип, никак не связанный с тромбоцитоидами. Действительно, они не обладают способностью распадаться на ядра и

фрагменты цитоплазмы и обладают значительно более стабильной формой, чем тромбоцитоиды. Однако эти клетки способны к быстрой седиментации на стекле, при этом полярные выросты сильно расширяются на концах, приобретая веерообразную форму. Появляющиеся дополнительные выросты цитоплазмы и наблюдаемое иногда слияние двух и более веретеновидных клеток с образованием цитоплазматической сети также свидетельствуют о том, что они если не идентичны, то по крайней мере очень близки к тромбоцитоидам. В это же время вновь становятся видны округлые гиалиновые клетки, которые отличаются от таковых у ранних личинок периферическим расположением ядра и его бобовидной формой.

Гиалиновые клетки — как нестабильные, так и стабильные — не обладают способностью адгезировать или фагоцитировать чужеродные элементы, будь то бактерии, грибки, яйца паразитов или просто неорганические частицы. Однако особенностью стабильных гиалиновых клеток *Calliphora* является их возможность преобразовываться в протромбозитоиды, а затем в тромбоцитоиды, для которых характерно драматическое повышение адгезивной и фагоцитарной способности. Изменение функциональных свойств мембраны можно иногда отметить у еще округлых гиалиновых клеток, до образования свободно плавающих фрагментов цитоплазмы. Тромбоцитоиды, основной функцией которых, с легкой руки ряда авторов (Zachary et al., 1975; McKenzie, Preston, 1992), считается исключительно инкапсуляция крупных чужеродных объектов, по нашим данным, в состоянии поглощать значительно более мелкие частицы, по своим размерам сравнимые с бактериями, эритроцитами или спорами грибов.

В период питания у небольших (до 1 см в длину) личинок III возраста общая фагоцитарная активность почти незаметна, свободные частицы угля сохраняются в гемолимфе 1—2 ч после инъекции. Тромбоцитоподобные фрагменты не захватывают частиц угля, и только через 1—2 ч появляются отдельные агглютинаты в виде толстых тяжей с немногочисленными частицами. У личинок, достигших длины 1.5 см, реакция гемоцитов на чужеродные частицы значительно повышается. Уже через 1—2 мин первые частицы можно обнаружить в небольших фрагментах цитоплазмы тромбоцитоподобных, однако процесс агглютинации последних идет относительно медленно. Лишь через 10—20 мин после инъекции начинают образовываться округлые агглютинаты, содержащие умеренное количество дисперсно расположенных частиц. У кончающих питание и начавших опустошение зоба личинок активность тромбоцитоподобных резко возрастает. Их реакция на чужеродные частицы наблюдается в первые же минуты после попадания этих частиц в гемолимфу. При этом филаменты объединяются в тяжи, и при прижизненном наблюдении хорошо заметны появление и движение периферических выростов этих тяжей. А еще через 1 мин в маленьких агглютинатах и тяжах обнаруживаются достаточно многочисленные чужеродные частицы.

В дальнейшем тромбоцитоподобные с захваченными чужеродными элементами принимают округлую форму и напоминают мешки величиной $(25—80) \times (30—90)$ мкм, заполненные поглощенными частицами. Они обладают плотной мембраной и гомогенной периферической цитоплазмой с отдельными, иногда длинными филоподиями. Округлая форма тромбоцитоподобных агглютинатов сохраняется в течение 1 ч. В более поздние сроки они превращаются в клубки довольно тонких тяжей с относительно небольшим количеством поглощенных частиц.

У закончивших питание личинок в период опустошения зоба происходит дальнейшее повышение клеточной активности тромбоцитоподобных, количество которых достигает максимума. Уже через 1 мин после инъекции частицы угля прилипают к коротким фрагментам их цитоплазмы, и становятся заметными первые признаки агглютинации. Через 3—5 мин фрагменты сливаются в тяжи и заполняются частицами, а через 5—10 мин тяжи, как и на более ранней стадии, превращаются в довольно крупные — $(30—100) \times (25—80)$ мкм — округлые мешковидные, часто многоядерные агглютинаты, плотно забитые поглощенным чужеродным материалом. Подобная картина сохраняется на протяжении первых 2—3 ч после инъекции. В более поздние сроки происходит распад плотных агглютинатов на длинные тяжи цитоплазмы и уменьшение количества поглощенных частиц. Через 5—6 ч вновь появляются пустые мелкие фрагменты тромбоцитоподобных, а размеры агглютинатов продолжают сокращаться. В этот период они представлены короткими тяжами с умеренным количеством дисперсно расположенных частиц. В дальнейшем, через 1 и 2 сут, состояние тромбоцитоподобных практически не меняется.

Инъекция угля в только что опустошивших зоб личинок показывает, что функция удаления чужеродных элементов почти полностью осуществляется тромбоцитоподобными. При этом поглощение как крупной, так и мелкой фракций угля идет с высокой интенсивностью. Реакция на инъекцию суспензии угля начинается через 2—3 мин слиянием фрагментов цитоплазмы тромбоцитоподобных в тонкие тяжи и прилипанием, а затем и поглощением чужеродных частиц (рис. 9). Через 5 мин образуются не-

большие агглютинаты с короткими выростами, содержащие довольно много угля. Они быстро увеличиваются в размерах, и через 10—15 мин после инъекции гемолимфа полностью очищается от введенного вещества, которое оказывается сконцентрированным в различной величины округлых агглютинатах.

Эти образования становятся значительно стабильнее, чем на более ранних этапах онтогенеза, и сохраняют четко выраженную округлую компактную форму в течение продолжительного времени. Лишь спустя 4—5 ч у них появляются толстые или тонкие выросты, а через 12—24 ч плотные гладкие агглютинаты преобразуются в тяжи и клубки тяжей, содержащих более рыхло расположенные поглощенные частицы. Одновременно вновь обнаруживаются в возрастающем количестве небольшие фрагменты цитоплазмы тромбоцитоподобных, свободные от фагоцитированных частиц, что говорит о продолжении дифференцировки. Исходя из изложенных данных можно прийти к выводу о том, что активность тромбоцитоподобных повышается в процессе питания личинок и достигает максимума при опустошении зоба. Общие принципы образования тромбоцитоподобных агглютинатов отражены на схеме (рис. 6).

В ряде случаев агглютинаты могут образовываться не только вокруг чужеродных частиц, но и путем слияния отдельных филаментов. Так, после инъекции суспензии с низкой концентрацией частиц угля возникают толстые тяжи слоистой цитоплазмы с немногочисленными включениями, состоящие почти исключительно из тромбоцитоподобных агглютинатов. Это наводит на мысль, что появление чужеродных элементов вызывает общее повышение адгезивной активности не только по отношению к инвайдерам, но и по отношению к соседним изолированным участкам цитоплазмы, чего никогда не наблюдается в естественных условиях.

Первичная реакция тромбоцитоподобных на органические частицы (эритроциты) в принципе ничем не отличается от таковой на частицы угля. Красные кровяные тельца быстро захватываются сливающимися тромбоцитоподобными филаментами, в результате чего образуются вначале крупные округлые агглютинаты, а позже — тяжи с четко образно расположенными эритроцитами. Некоторые авторы, наблюдавшие подобные агглютинаты, называли их нодулами (McKenzie, Preston, 1992b), однако это совершенно неправомерно, так как нодулами, согласно установленной классификации, являются скопления бактерий, окруженные плазматочитами (Ratcliffe, Rowley, 1983; Lavine, Strand, 2002; Ottaviani, 2005), а не находящиеся внутри синцитиальной массы частицы.

У личинок *C. vicina* захват эритроцитов практически не приводит к изменению их структуры. Даже через 3—4 ч после образования агглютинатов форма и плотность красных кровяных телец остаются неизменными. Только в зонах контакта с ювенильными плазматочитами можно наблюдать фрагментацию эритроцитов и их распад на мелкие осколки. Идентичные закономерности обнаружены и у другого представителя каллифорид, мухи *C. vomitoria* (Кинд, 2007). Реакция тромбоцитоподобных на органические чужеродные частицы, эритроциты, ничем принципиально не отличается от таковой на частицы угля. У опустошающих зоб личинок на первых этапах образуются плотные округлые агглютинаты, заполненные эритроцитами, а затем — система тромбоцитоподобных тяжей (рис. 6).

Иные процессы происходят внутри агглютинатов *C. vomitoria*. Помимо изоляции эритроцитов в тромбоци-

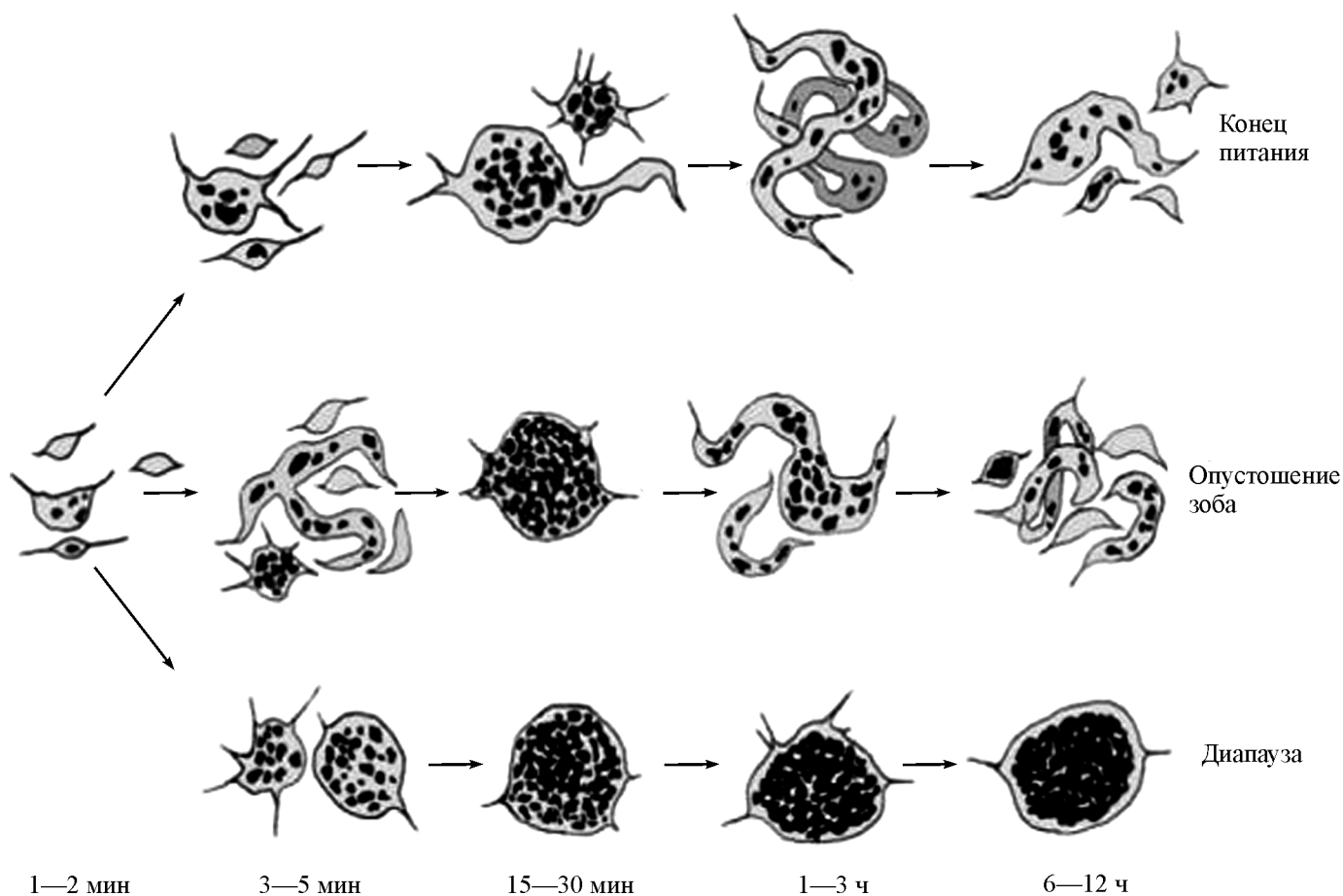


Рис. 6. Изменение морфологии тромбоцитоидных агглютинатов после инъекции частиц угля личинкам *Calliphora vicina* различного возраста.

тоидных агглютинатах на более поздних этапах наблюдаются отчетливые картины деструкции эритроцитов с образованием либо плотных бесструктурных образований, либо групп фрагментов, особенно отчетливых по периферии агглютинатов. Через 2—3 ч после инъекции все эритроциты становятся в той или иной степени деструктурированными. В отличие от *C. vicina* (агглютинаты которой играют в основном изолирующую функцию, и деструкция эритроцитов наблюдается большей частью в зонах контакта с ювенильными плазматоцитами) у *C. vomitoria* распад красных кровяных телец происходит вне зависимости от плазматоцитов. Можно сделать вывод о том, что у *C. vomitoria* тромбоцитоиды являются значительно более агрессивными, чем у ранее исследованной *C. vicina*.

В связи со значительными изменениями морфологии тромбоцитоидов во время реакции на чужеродные элементы было высказано предположение (Кинд, 2005, 2007) о том, что эти изменения коррелируют с изменениями их адгезивной активности — способности к распознаванию и поглощению новых партий чужеродных частиц. В связи с этим было проведено исследование, помогающее выяснить, изменяется ли соответственно в процессе агглютинации рецептивность уже образовавшихся структур. Для этого на разных этапах формирования агглютинатов проводили дополнительную инъекцию контрастных абиотических частиц — угля. Оказалось, что последовательная инъекция эритроцитов и частиц угля приводит к адгезии угля сначала к поверхности агглютинатов, а затем и к проникновению в более глубокие

слои цитоплазмы, в промежутки между эритроцитами. При этом возраст агглютината, сопровождающийся изменением его морфологии, никакого влияния на интенсивность реакции с абиотическими частицами не оказывает. Агглютинаты даже после заполнения эритроцитами способны к дополнительному поглощению абиотических инвайдеров.

Инъекция в гемоцель чужеродных частиц имеет результатом не только их фагоцитоз или изоляцию иммунными клетками, но и оказывает значительное последствие на становление форменных элементов гемолимфы, в частности на новообразование гиалиновых клеток (Кинд, 2008а, 2008б). В норме гиалиновые клетки в конце периода опустошения зоба перестают выявляться в гемолимфе. В отличие от контрольных личинок у опустошивших зоб личинок, предварительно инъецированных суспензиями угля или эритроцитов, количество стабильных гиалиновых клеток на протяжении следующих 24 ч не только не уменьшается, но даже несколько возрастает, и их доля в общей популяции гемоцитов увеличивается с 3 до 15 % (рис. 7, а). При этом в пределах кластеров прогемоцитов появляются первые небольшие гиалиновые клетки с очень крупными ядрышками в ядрах и гомогенной цитоплазмой.

В последующие дни количество стабильных гиалиновых клеток у инъецированных личинок продолжает увеличиваться как за счет небольших клеток в пределах кластеров, так и за счет крупных, свободно плавающих в гемолимфе. Видно превращение некоторых крупных гиали-

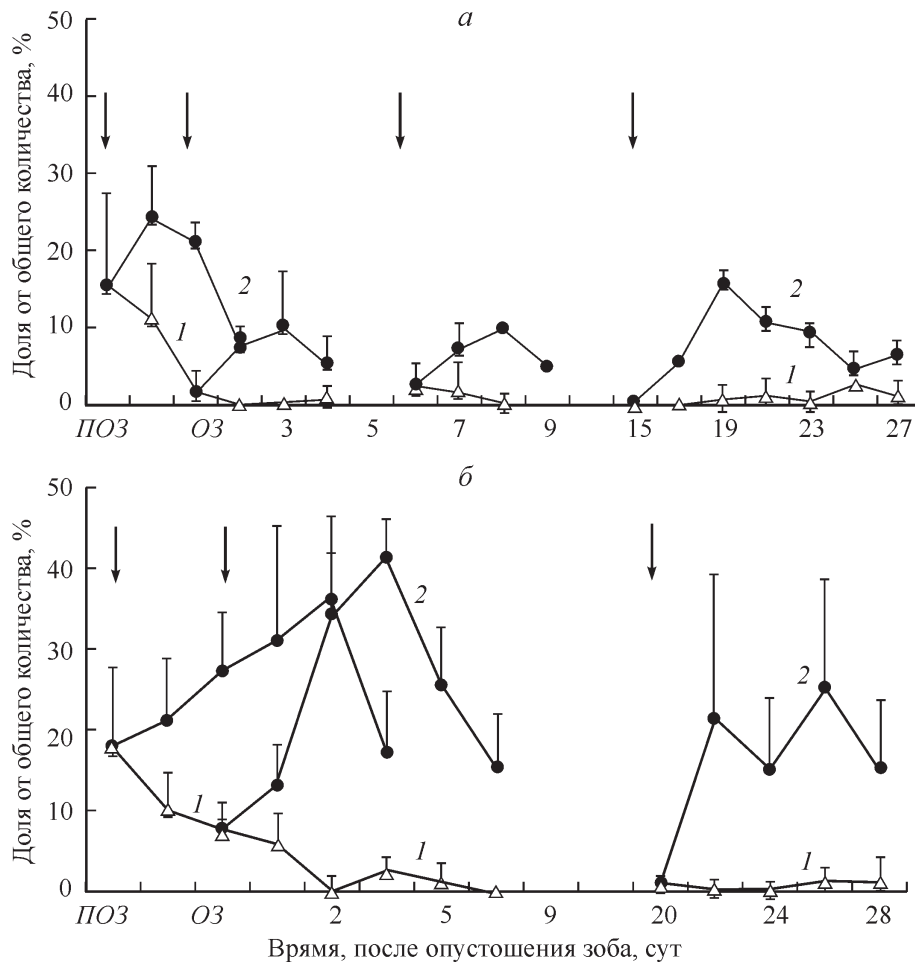


Рис. 7. Влияние инъекции угля на продукцию стабильных гиалиновых клеток у личинок *Calliphora vicina* (а) и *C. vomitoria* (б) разного возраста.

Стрелками обозначены инъекции. 1 — контроль, 2 — инъекция угля. Опустошение зуба происходило при 12 °С ПОЗ — полуопустошенный зуб, ОЗ — опустошенный зуб.

линовых клеток в протромбоцитозиды. Клетки при этом теряют округлую форму и распадаются на удлинённые цитоплазматические фрагменты и «голые» ядра с периферическим ободком цитоплазмы. Ещё более отчетливо выражено влияние инъекции чужеродных частиц на формирование гиалиновых клеток у другого вида каллифорид — *C. vomitoria* (Кинд, 2008б). У опустошающих зоб личинок *C. vomitoria* доля гиалиновых клеток после инъекции угля или эритроцитов может возрастать до 40 % (рис. 7, б). Очевидно, это объясняется различиями в динамике смены популяций плазматочитов у двух видов.

Параллельно с ростом стабильных гиалиновых клеток увеличивается и количество протромбоцитозидов и тромбоцитозидов (рис. 3). При избыточных инъекциях и начавшейся гибели личинок от инфекции исследование гемолимфы показывает, что перед гибелью практически все форменные элементы представлены гиалиновыми клетками в связи с переключением дифференцировки прогемоцитов на производство тромбоцитозидов и переизбыточным формированием этого типа клеток в ущерб остальным типам гемоцитов. Поэтому очевидно, что хотя образование гиалиновых клеток является закономерным ответом на появление в гемолимфе чужеродных элементов, оно функционально лишь до тех пор, пока не нарушает общего баланса защитных реакций.

Аналогом стабильных гиалиновых клеток — тромбоцитозидов — являются ламеллоциты и, возможно, подоциты другого представителя высших двукрылых — *Drosophila melanogaster*. Эти клетки отвечают за инкапсуляцию яиц паразитических наездников (Rizki, Rizki, 1992; Dearolf, 1999; Lanot et al., 2001; Meister, Lagueux, 2003). Ламеллоциты являются иммуоактивными клетками, непосредственно участвующими в образовании капсул, но не способными к фагоцитозу. Между ламеллоцитами и стабильными гиалиновыми клетками имеется несомненное сходство как в функциональных параметрах, так и в принципах индукции их дифференцировки. Ламеллоциты, в нормальных условиях составляющие лишь ничтожную часть общей популяции гемоцитов, появляются в массе лишь в ответ на заражение яйцами наездников или введение в гемодель посторонних частиц. Они дифференцируются в передних, а позже — и в задних долях лимфатических желез из прогемоцитов, хотя не исключается и их частичное образование из плазматочитов как в пределах лимфатических желез, так и в гемолимфе (Shrestha, Gateff, 1982; Rizki, Rizki, 1984; Lanot et al., 2001; Holz et al., 2003; Ribeiro, Breherlin, 2006).

Основные различия между двумя этими типами клеток проявляются в динамике их появления в процессе развития. Ламеллоциты *Drosophila* практически не выяв-

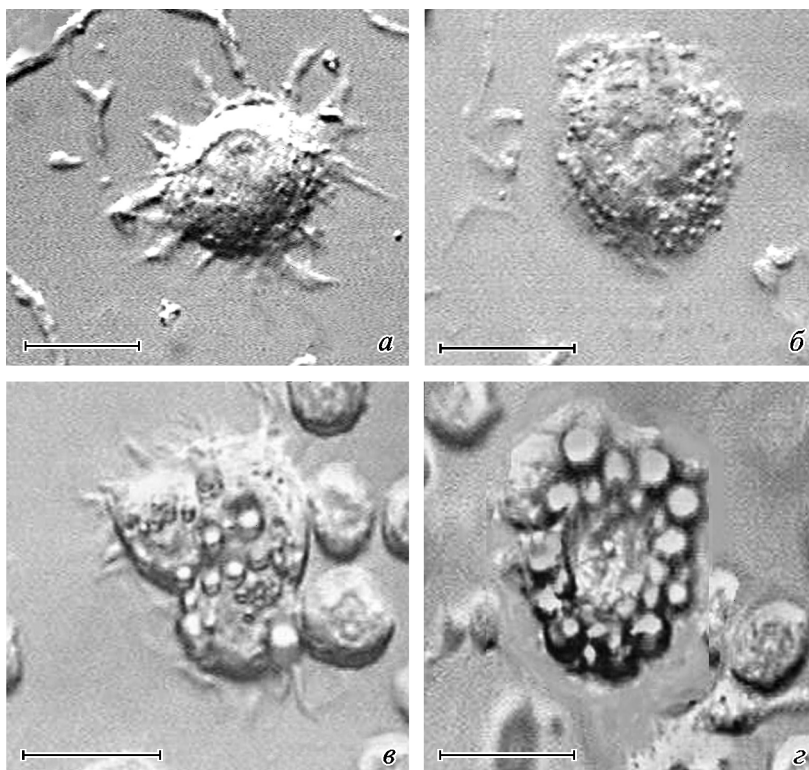


Рис. 8. Ювенильные плазматоциты *Calliphora* (оптика Номарского).

а, б — оканчивающие питание личинки *C. vicina*; *в, г* — опустошающие зоб личинки *C. vomitoria*.

Масштабные отрезки — 20 мкм.

ляются в гемолимфе вплоть до запуска пупаризации, а инициация их дифференцировки невозможна у личинок моложе конца III возраста (Rizki, Rizki, 1992; Lanot et al., 2001; Sorrentino et al., 2002). Напротив, гиалиновые клетки *Calliphora* наиболее многочисленны именно у молодых личинок, а после опустошения зоба практически исчезают из гемолимфы. Вновь они могут появляться только непосредственно перед метаморфозом (Кинд, 2010а, 2010б).

Плазматоциты. Маленькие солдаты иммунитета

Плазматоциты являются наиболее распространенными и наиболее известными типами гемоцитов, участвующих в фагоцитозе. Наиболее исследованы в этом плане представители чешуекрылых, но и двукрылые, особенно дрозофилы и медицински значимые мухи и комары, не обойдены вниманием. Это нашло отражение в ряде недавних обзорных статей, посвященных клеточной защитной реакции насекомых (Lavine, Strand, 2002; Meister, Lagueux, 2003; Ribeiro, Breherlin, 2006). Среди всех изученных видов *Calliphora* пока является единственным представителем, у которого выявлены два типа плазматоцитов, которые резко различаются морфологией, временем нахождения в гемолимфе и характером реакции на чужеродные элементы. Это, во-первых, ювенильные плазматоциты. Они образуются из прогемоцитов у питающихся личинок и исчезают после опустошения зоба. Вторым типом являются плазматоциты I–IV, которые тоже возникают из прогемоцитов незадолго до опустоше-

ния зоба или сразу после его опустошения (Кинд, 2003, 2007; Тулин, Чага, 2003).

Перед окончанием питания личиночные плазматоциты представлены довольно крупными округлыми, реже овальными (рис. 8) клетками (диаметр клетки 15–20 мкм, ядра 8–10 мкм) с цитоплазмой, содержащей умеренное количество включений, и явственно видимыми у живых клеток при исследовании в фазовом или интерференционном контрасте многочисленными тонкими выростами-ворсинками (рис. 8, *а, в*). Эти выросты-ворсинки дали Тулину и Чаге (2003) вполне резонное основание назвать ювенильные плазматоциты «опушенными клетками». Время существования личиночных плазматоцитов непродолжительно. Их очень немного у питающихся личинок в начале III возраста, пик количества достигается у особей перед окончанием питания, и они почти полностью исчезают из гемолимфы после опустошения зоба (рис. 9). Лишь у личинок, содержавшихся при пониженной температуре (12–15 °C), этот тип гемоцитов сохраняется в гемолимфе в течение 1 сут после полного очищения кишечника. У опустошающих зоб личинок ювенильные плазматоциты заполняются катаболическими включениями, количество и величина филоподий существенно сокращаются (рис. 8, *в, г*), однако фагоцитарная активность остается на достаточно высоком уровне.

Фагоцитоз инъецированных чужеродных частиц (угля) ювенильными плазматоцитами происходит в несколько более поздние сроки, чем у тромбоцитодов. На протяжении первых 10 мин после инъекции фагоцитоза не наблюдается. Видны лишь отдельные прилипшие к поверхности плазматоцитов частицы. Однако в дальнейшем

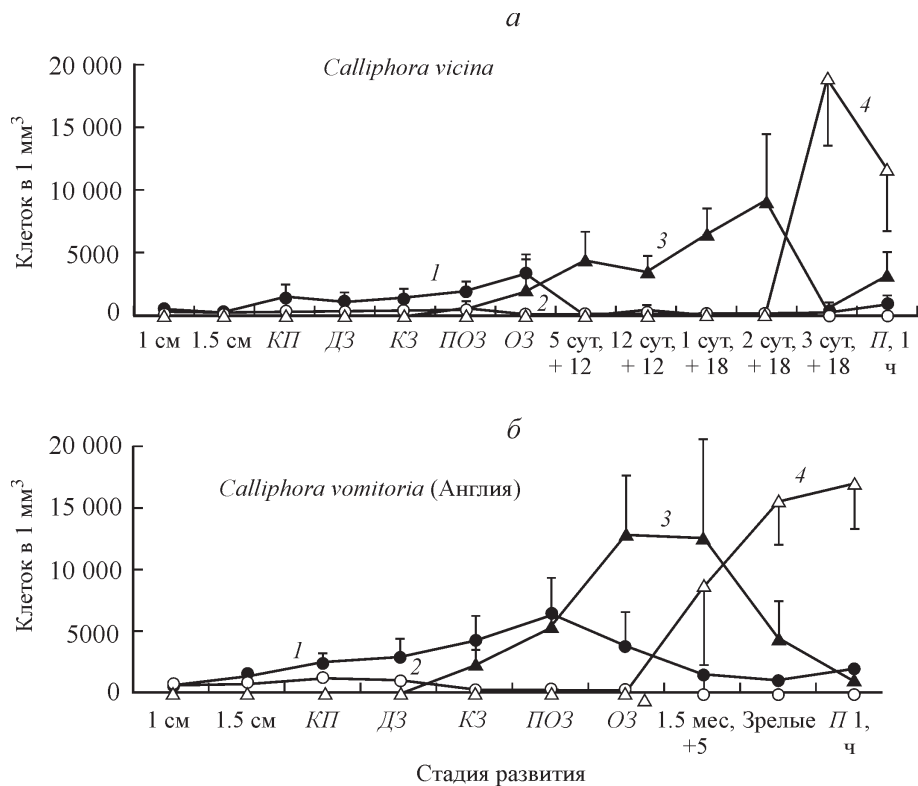


Рис. 9. Динамика количества прогемоцитов (1), ювенильных плазматочитов (2), плазматочитов I (3) и плазматочитов II—III (4) в гемолимфе личинок двух видов *Calliphora*.

a — *C. vicina*; б — *C. vomitoria*. Обозначения по горизонтали те же, что и на рис. 4.

плазматочиты начинают накапливать уголь, через 2—3 ч многие содержат по 5—15 частиц, а через 5 ч часто становятся буквально забитыми фагоцитированным материалом (рис. 10). Значительно активнее происходит фагоцитоз частиц ювенильными плазматочитами близкого вида *C. vomitoria*. Уже через 1 мин после инъекции происходит прилипание частиц к филоподиям клеток, через 5 мин — их проникновение в цитоплазму, а в более поздние сроки частицы полностью заполняют весь объем плазматочитов.

У заканчивающих опустошение зоба личинок количество ювенильных плазматочитов сокращается, а оставшиеся клетки полностью заполняются включениями различной величины (рис. 8). Только у *C. vomitoria* ювенильные плазматочиты могут сохраняться при пониженной температуре содержания еще на протяжении 1—2 сут, вплоть до запуска пупаризации. После опустошения зоба этот тип клеток сменяется новой популяцией поздних плазматочитов — плазматочитами I—IV, которые представляют собой последовательные этапы дифференцировки одной клеточной линии. Эти плазматочиты у опустошивших зоб блуждающих, диапаузирующих и зрелых личинок, а также у молодых пупариев становятся основными клеточными элементами и составляют до 90 % всей популяции гемоцитов. От ювенильных плазматочитов они отличаются значительно меньшей величиной (12—15 мкм), равномерным характером включений и менее выраженными филоподиями.

У блуждающих и диапаузирующих личинок эти клетки остаются небольшими и содержат малое количество катаболических включений, а с началом подготовки к метаморфозу они резко увеличиваются в размерах (до

15—17 мкм) и плотно заполняются жиробелковыми капельками, которые маскируют ядро. У молодых пупариев размеры плазматочитов еще более возрастают. Катаболические капельки лежат более рыхло (стадия III). Впоследствии, у куколок, плазматочиты принимают участие в утилизации и переносе фрагментов апоптотных тканей, превращаясь в очень крупные плазматочиты IV (макрофаги).

В целом на протяжении жизни личинок и молодых пупариев можно проследить две волны дифференцировки гемоцитов. Одна осуществляется у питающихся и опустошающих зоб личинок и характеризуется преимущественным образованием различного типа гиалиновых клеток, тромбоцитоидов и ювенильных плазматочитов, а вторая начинается после опустошения зоба и отличается массовой продукцией плазматочитов I—III (рис. 4).

К моменту опустошения зоба начинают чрезвычайно отчетливо проявляться видовые и популяционные различия в количестве плазматочитов I. У исследованных нами видов с личиночной диапаузой нарастание числа плазматочитов заметно только после опустошения зоба. У *C. vicina* это число быстро поднимается до $5 \cdot 10^3$ кл./мм³ и сохраняется на этом уровне на протяжении всего периода покоя. Второй пик дифференцировки плазматочитов у *C. vicina* приходится на начало запуска пупаризации, когда их количество увеличивается до $10 \cdot 10^3$ — $12 \cdot 10^3$ кл./мм³. Как у диапаузирующих, так и у развивающихся (при 18—20 °C) личинок этого вида уже в кластерах прогемоцитов наблюдается начало дифференцировки в плазматочиты I, и появляются первые катаболические включения. Плазматочиты I являются основной формой и на начальных этапах постдиапаузного раз-

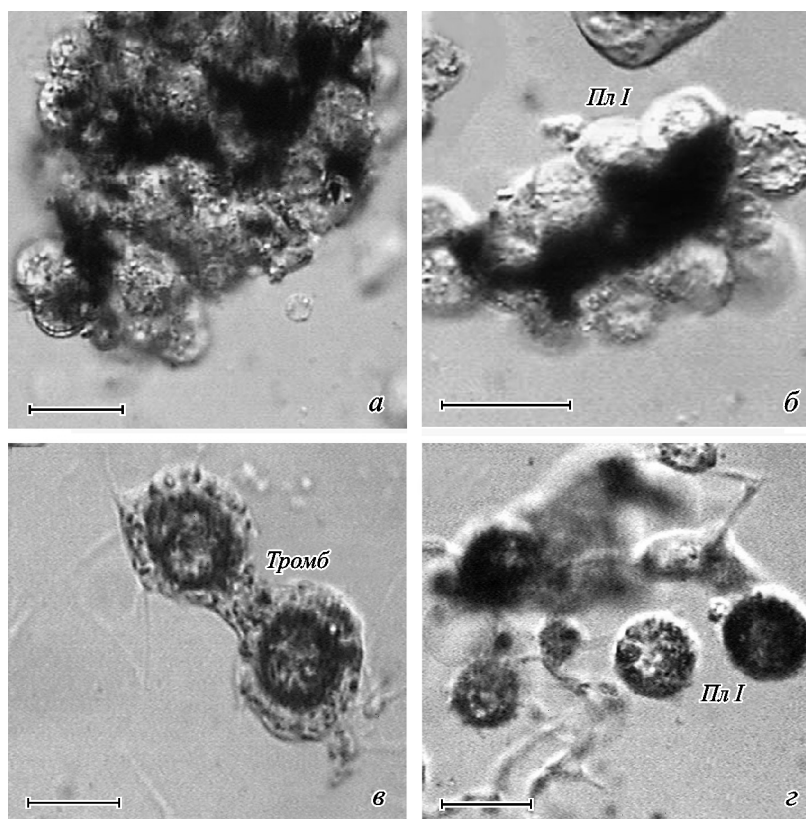


Рис. 10. Фагоцитоз частиц угля плазматоцитами I (Пл I) у диапаузирующих личинок *Calliphora vicina* (оптика Номарского).

а, б — через 30 мин после инъекции: *а* — скопление плазматоцитов I, окруженных частицами угля (морула), *б* — тромбоцитонидный агглютинат (тромб), заполненный углем, окружен слоем плазматоцитов I (капсула), проникновения частиц в плазматоциты не заметно; *в* — через 2 сут после инъекции: плазматоциты, окруженные слоем цитоплазмы агглютината, заполняются частицами угля; *г* — через 3 сут после инъекции: плазматоциты лежат в гемолимфе поодиночке и заполнены частицами угля. Масштабные отрезки — 20 мкм.

вития. Только за несколько часов до образования пупария намечается их переход в фазу плазматоцитов II—III (рис. 9, *а*).

В то же время у бездиапаузной *C. vomitoria* (особенно английской популяции) нарастание количества поздних плазматоцитов происходит еще до окончания полного опустошения зоба (рис. 9, *б*). Их концентрация у личинок с коротким зобом увеличивается до $6 \cdot 10^3$ — $8 \cdot 10^3$ кл./мм³, а сразу после опустошения — до $13 \cdot 10^3$ — $15 \cdot 10^3$ кл./мм³. При этом кластеры прогемоцитов состоят из множества слегка полигональных клеток, полностью лишенных включений. Свободно лежащие в гемолимфе плазматоциты также практически не дифференцированы, не обладают катаболическими включениями и во многом напоминают прогемоциты, отличаясь от них только несколько большими размерами и округлой формой. Окончательная дифференцировка плазматоцитов происходит вне кластеров в более поздние сроки, после полного опустошения зоба, т. е. в тот же период, что и у обладающих диапаузой видов. В отличие от *C. vicina* у английской популяции *C. vomitoria* на последней стадии опустошения зоба уже присутствуют две популяции плазматоцитов: перегруженные включениями ювенильные и слабодифференцированные плазматоциты I.

Постоянно присутствуют в гемолимфе личинок и молодых пупариев только два типа клеток. Это прогемоциты, в течение всего развития, хотя и с разной степенью интенсивности, выбрасываемые из гемопоэтических органов, и тромбоцитониды, наличие которых даже в перио-

ды отсутствия дифференцировки *de novo*, очевидно, объясняется большей продолжительностью существования. Остальные типы гемоцитов строго приурочены к определенным фазам онтогенеза.

Плазматоциты I активно фагоцитируют чужеродные частицы, однако их реакция заметно отличается от реакции плазматоцитов ювенильных. Адгезия и фагоцитоз происходят значительно позднее. Через 40—60 мин можно заметить адгезированные на поверхности наиболее крупных клеток частицы, а через 2—3 ч в плазматоцитах обнаруживается фагоцитированный уголь. Только через 12—15 ч многие (10—20 %) клетки содержат значительное количество фагоцитированного материала, а через 1—2 сут заполняются им (рис. 10, *в*). Через 2—3 сут большинство плазматоцитов I содержат варьирующее количество фагоцитированного материала, и лишь в 15—20 % клеток не удастся обнаружить признаков фагоцитоза. Очевидно, это связано со степенью дифференцировки плазматоцитов, потому что наиболее заполненными являются самые крупные клетки.

У окончивших диапаузу или активных личинок незадолго до запуска пупаризации заметно интенсифицируется формирование комплексов тромбоцитонидов с плазматоцитами I. Отдельные плазматоциты начинают контактировать с агглютинатами уже через 5—10 мин после инъекции (рис. 10, *б*). Со временем количество примкнувших клеток увеличивается, и через 30—60 мин многие тромбоцитонидные агглютинаты становятся почти полностью или полностью окруженными слоем плазматоцитов.

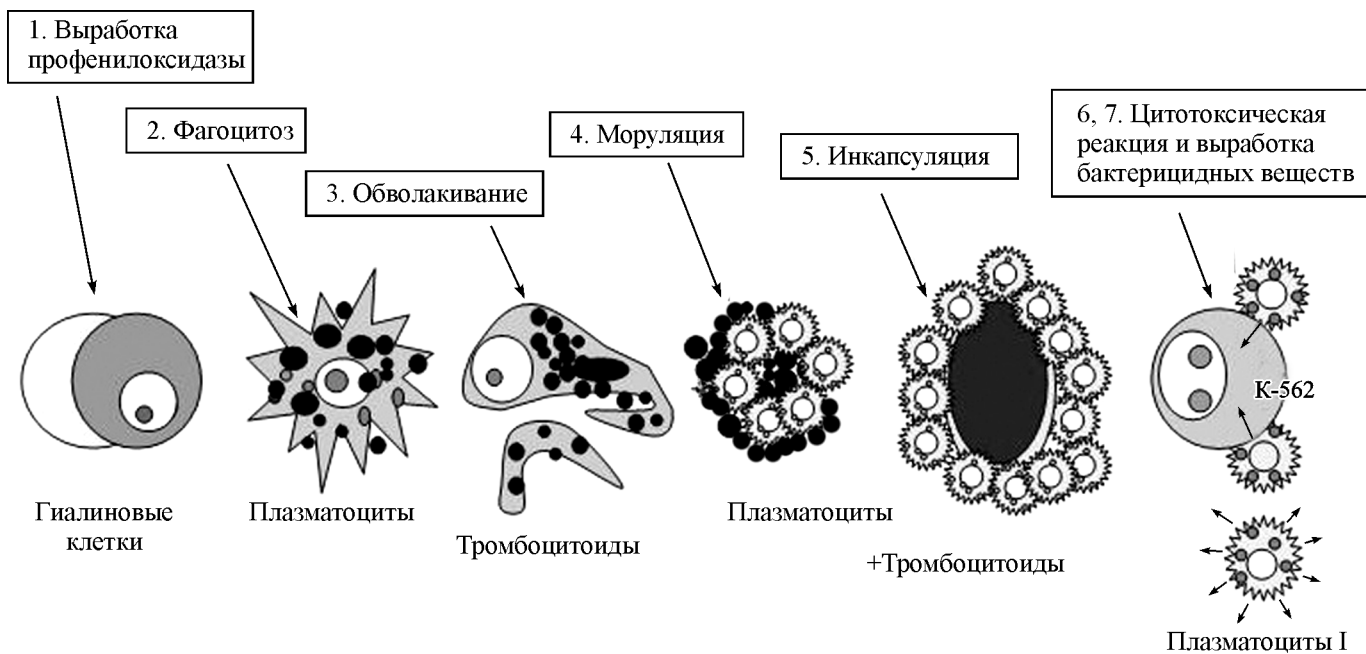


Рис. 11. Схема различных вариантов клеточной защитной реакции, осуществляемой гемоцитами личинок *Calliphora*.

В результате формируются своего рода капсулы с агглютинатами внутри (рис. 10, б). В этот же период впервые наблюдается отчетливая адгезия угля к плазматоцитам I. Такие клетки с налипшими частицами угля впоследствии объединяются в морулообразные скопления. Адгезия угля и образование скоплений с чужеродными частицами между гемоцитами происходят очень быстро, через несколько минут после инъекции, но не сопровождаются немедленным фагоцитозом.

Позднее, уже после распада капсул и морул, плазматоциты могут входить в более тесный контакт с тромбоцитойдами, которые обволакивают отдельно лежащие клетки и, вероятно, передают им ранее накопленные частицы. Через 1—2 ч, т. е. приблизительно в тот же период, что и у диapaузирующ их личинок, в цитоплазме плазматоцитов, особенно контактирующих с тромбоцитойдными агглютинатами, становятся видимыми первые признаки фагоцитоза. Количество поглощенных частиц постепенно нарастает, и через 4—5 ч они заполняют около 20 % клеток, а через 24—48 ч — от 50 до 80 %. Заполненные углем плазматоциты I становятся неспособными к накоплению катаболических включений и у готовых к пуаризации особей не переходят в стадии плазматоцитов II и III.

Таким образом, существуют два типа тропизма между гемоцитами. Оба этих типа являются временными, и как тромбоцитойдно-плазматоцитные комплексы (капсулы), так и комплексы плазматоцитов, окруженных чужеродными частицами (морулы), распадаются за период от десятка до нескольких десятков минут. В то же время контакт между тромбоцитойдами и плазматоцитами, очевидно, имеет очень важное значение для процесса фагоцитоза, так как именно в местах контактов и, возможно, щелевидных связей между клетками наблюдается переход ранее захваченных тромбоцитойдами частиц в цитоплазму плазматоцитов I (Кинд, 2005).

Гетерогенность популяции плазматоцитов. Эндоцитоз и экзоцитоз

Следует отметить, что популяция плазматоцитов I в отличие от тромбоцитойдов и ювенильных плазматоцитов, которые синхронно и униформно реагируют на чужеродные частицы, является гетерогенной, и в контакт с инвайдерами вступают от 20 до 80 % клеток (Кинд, 2010а, 2010б). В то же время при подготовке к метаморфозу все плазматоциты изменяются практически одновременно, накапливая катаболические включения и переходя от стадии I к стадиям II, III и далее — к макрофагам. Поэтому предположительно рецепция и поглощение растеримых метаболитов осуществляется в гораздо более широкой гамме, чем фагоцитоз (или межклеточный транцитоз). В то же время заполнение плазматоцитов катаболическими включениями приводит к прекращению фагоцитоза чужеродных частиц, а забитые частицами плазматоциты соответственно становятся неспособными к пиноцитозу и образованию жиробелковых включений.

Еще одним типом плазматоцитарной реакции, подробно исследованной Чернышем и соавторами (Chernysh et al., 2004), является цитотоксическая активность. При контакте с чужеродными клетками плазматоциты *C. vicina* способны выделять вещества, приводящие к нарушению целостности мембраны и распаду этих клеток. Кроме того, наряду с клетками жирового тела они предположительно обладают способностью к выработке и выделению антимикробных пептидов (Dimarcq et al., 1990, 1997; Lowenberger, 2001). Таким образом, плазматоциты I являются единственным полифункциональным типом гемоцитов, способных как к эндо-, так и к экзоцитозу (рис. 11).

Защитная реакция гемоцитов может осуществляться как по отношению к патогенным бактериям и грибкам, так и по отношению к нейтральным чужеродным объектам, таким как трансплантаты, эритроциты, латексные или электрофоретические шарики или просто частицы угля. Кандидатами на роль рецепторов, распознающих

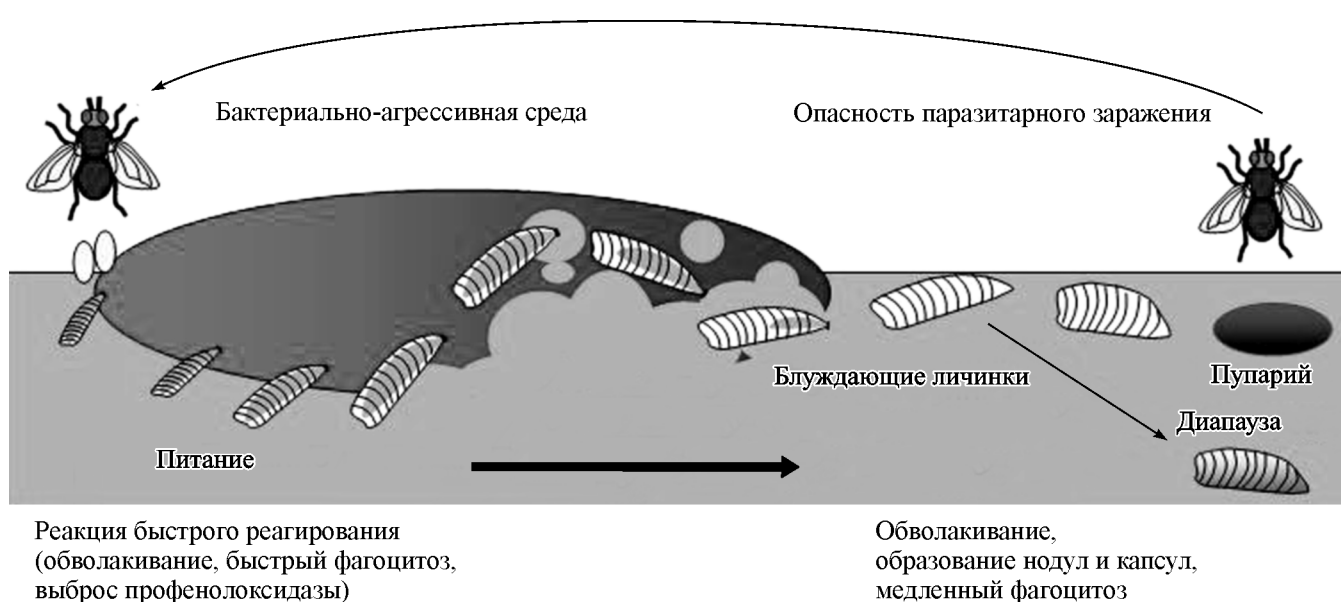


Рис. 12. Схема, показывающая изменение агрессивности среды на протяжении жизненного цикла мясных мух и соответствующие изменения защитных реакций гемоцитов.

мембранные структуры патогенов, считаются лектины, гемолин, ЛПС-связанный белок, белок, распознающий грамотрицательные бактерии, белок, распознающий пептидогликан и некоторые другие изолированные из насекомых вещества (Gillespie et al., 1997; Lavine, Strand, 2002; Takase et al., 2009). Кроме того, предполагается, что насекомые обладают рецепторами со смешанными способностями к связыванию, которые взаимодействуют с широким диапазоном молекул, в естественном состоянии не встречающихся в гемоцеле. Перед узнаванием чужеродные частицы обычно должны подвергнуться опсонизации — абсорбции определенных опсонин, распознаваемых рецепторами гемоцитов. Опсонины стимулируют прилипание (адгезию), поглощение частицы и ее разрушение фагоцитами. Роль опсонин у насекомых, в частности у личинок мух, могут играть определенные лектины, появляющиеся в гемолимфе перед началом метаморфоза (Richards, Ratcliffe, 1990; McKenzie, Preston, 1992).

Разнообразие патогенных и непатогенных мишеней, распознаваемых гемоцитами насекомых, и скорость проявления иммунной реакции могут быть отражением различных рецепторных механизмов, присущих как разным типам гемоцитов, так и одному типу на разных этапах онтогенеза. Инъекция в личинок *C. vicina* смеси органических и неорганических частиц (эритроцитов и угля) показывает, что, несмотря на очень близкие картины выведения эритроцитов и частиц угля из гемолимфы, рецепторные механизмы для распознавания отдельных классов чужеродных веществ не только могут различаться по своей природе, но и имеют различные места локализации в пределах одного типа защитных элементов — тромбоцитоидов. Эта раздельность возрастает в процессе онтогенеза и наиболее ярко выражена у диapaузирующих особей (Кинд, 2012а, 2012б).

Так как на протяжении развития личинок происходят весьма драматические изменения в гемоцитарном составе гемолимфы, неудивительно, что это отражается и в приуроченности к различным этапам тех или иных клеточных защитных реакций (рис. 12). На ранних стадиях

личиночного развития гемоцитов очень мало, уровень их активности не высок, но это компенсируется высокой степенью кутикулярной защиты. После завершения питания и с началом опустошения глотки в гемоцеле могут появляться элементы апоптотных тканей и бактериальное содержимое зоба. В этот период наблюдается заметная активация иммуноактивных клеточных элементов. Это особенно касается тромбоцитоидов, захватывающих чужеродные частицы немедленно после их появления в гемоцеле.

Предполагается, что на более поздних стадиях у *C. vicina* может происходить совершенно уникальное явление — передача захваченных тромбоцитоидами частиц ювенильным плазматоцитам, которые завершают уничтожение инвайдеров и параллельно освобождают тромбоцитоиды для следующей быстрой реакции при возможности вторичного вторжения. Столь быстрая реакция на чужеродные вещества самой разнообразной природы явно не требует гуморальных механизмов их специфического распознавания, опсонизации и наличия лектинов и осуществляется за счет неизвестных механизмов. Возможно, в этом процессе играет роль белок прилипания, вызывающий распластывание гемоцитов на предметном стекле (Clark et al., 1997). Выработка этих белков происходит в самих гемоцитах и опосредуется эйкозаноидами (Franssens et al., 2005). Параллельно с изоляцией происходят запуск гуморальных иммунных реакций, в котором, очевидно, принимает участие выброс профенолоксидазы из нестабильных гиалиновых клеток, а также стимуляция синтеза и секреции лектинов клетками жирового тела (Ratcliffe, Gotz, 1990; Gillespie et al., 1997).

Очевидно, столь оригинальный клеточный ответ на инвазию у питающихся и освобождающих зоб личинок обусловлен чрезвычайно быстрыми темпами развития мясных мух, когда период питания завершается всего за несколько дней и масса личинок увеличивается в сотни раз. В этот период медленно нарастающим защитным пептидам гуморального иммунитета трудно справиться с проникшими в гемоцель бактериями. На более поздних этапах развития, на стадии блуждающей личинки и осо-

бенно при диапаузе, количество гемоцитов значительно возрастает за счет интенсивной продукции плазматоцитов I. Менее активные, но более многочисленные гемоциты, играющие роль регулярных войск второй линии обороны, успешно справляются с задачей очистки гемолимфы от бактериального и паразитарного заражения.

Эти изменения в клеточной защите сочетаются с повышением у диапаузирующих личинок гуморальных иммунных механизмов защиты, заключающихся в интенсивной выработке антимикробных пептидов (Chernysh et al., 1995, 2000). После опустошения зоба и в период подготовки к пупаризации к быстрому ответу остаются способными только тромбоциты. Зато в этот период компенсаторно возникает новая защитная реакция — изоляция чужеродных элементов с помощью образования вокруг них нодул и капсул, которые, судя по многочисленным литературным данным (см. обзор: Lavine, Strand, 2002), являются характерным ответом как на бактериальную, так и на паразитарную инвазию. Нодулы и капсулы *C. vicina* и *C. uralensis* образуются многочисленными плазматоцитами I. Значительно реже в этом процессе принимают участие плазматоциты II и личиночные плазматоциты. При этом у видов, в жизненном цикле которых наличествует диапауза (т. е. у *C. vicina* и *C. uralensis*), образование морул и капсул значительно ярче выражено, чем у бездиапаузной, быстро проскакивающей период подготовки к пупаризации *C. vomitoria*.

Подобное изменение стратегии вполне соответствует изменению агрессивности окружающей среды на протяжении личиночного существования каллифорид, что демонстрирует схема на рис. 12. Обобщая полученные результаты, следует в заключение подчеркнуть, что личинки *Calliphora* обладают по крайней мере тремя уровнями защиты.

Первый уровень — это своего рода отряды быстрого реагирования, представленные тромбоцитами, профенолоксидазными клетками и фагоцитирующими ювенильными плазматоцитами. Реакция этих гемоцитов начинается в первые секунды после инвазии. Их деятельность наиболее востребована в период очищения зоба и апоптоза пищеварительной системы.

Второй уровень — это линия более глубокой клеточной обороны, вступающая в действие через минуты или десятки минут — нодуляция и инкапсуляция чужеродных объектов, а также медленный фагоцитоз, характерный для плазматоцитов I. Эти процессы актуальны для фазы бродажничества и повышенной опасности заражения.

И наконец, третий уровень глубокоэшелонированной обороны, возможно наиболее эффективный и глобальный, но и наиболее поздно проявляющийся, представлен гуморальными механизмами защиты — выработкой антибактериальных, антигрибковых и антивирусных веществ в основном пептидной природы.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ 3332. 2010.4).

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).

Кунд Т. В. 2003. Гемоциты мясной мухи *Calliphora vicina* и их динамика при развитии личинок и индукции метаморфоза. Цитология. 45 (1) : 14—25.

Кунд 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.

Кунд Т. В. 2007. Гемоциты с различными типами защитной реакции в онтогенезе трех видов мясных мух рода *Calliphora*. Тр. БиНИИ СПбГУ. 53 : 306—335.

Кунд Т. В. 2008a. Инъекция чужеродных частиц вызывает дифференцировку стабильных гиалиновых клеток в гемолимфе личинок мясной мухи *Calliphora vicina*. Цитология. 50(9) : 757—764.

Кунд Т. В. 2008b. Дифференцировка стабильных гиалиновых клеток в гемолимфе личинок мясной мухи *Calliphora vomitoria* в ответ на инъекцию чужеродных частиц. Цитология. 50 (9) : 765—772.

Кунд Т. В. 2010a. Агглютинация и фагоцитоз чужеродных абиотических частиц гемоцитами мясной мухи *Calliphora vicina* in vivo. II. Влияние бактериальной иммунной инъекции на гемоцитарную активность. Цитология. 52 (6) : 431—441.

Кунд Т. В. 2010b. Влияние иммунизации на активность гемоцитов по отношению к чужеродным абиотическим частицам у личинок мясной мухи *Calliphora vomitoria*. Цитология. 52 (6) : 442—450.

Кунд Т. В. 2012a. Реакция гемоцитов личинок мясной мухи *Calliphora vicina* на инъекцию абиотических и биотических чужеродных частиц. Цитология. 54 (3) : 236—243.

Кунд Т. В. 2012b. Роль гемоцитов личинок мясной мухи *Calliphora vomitoria* в распознавании и элиминации из гемолимфы эритроцитов человека и частиц угля. Цитология. 54 (3) : 244—250.

Тулин Д. В., Чага О. Ю. 2003. Гемоциты личинки *Calliphora vicina*. I. Гистологический анализ. Цитология. 45 (10) : 976—985.

Черныш С. И. 2004. Аллокины (цитокиноподобные пептиды насекомых) как модуляторы иммунного ответа человека и других млекопитающих. Russ. J. Immunol. 9 (1) : 36.

Черныш С. И., Сафронникова Н. П., Серебряная Н. Б. 2005. Новое в лечении герпесвирусных и папилломавирусных инфекций: терапевтические свойства Алломедина. Террамедика. 4 : 27—30.

Brehélin M., Zachary D. 1986. Insect haemocytes: a new classification to rule out the controversy. In: Immunity in Invertebrates. Berlin: Springer-Verlag. 36—48.

Chain B. M., Leyshon-Soland K., Siva-Jothy M. T. 1992. Haemocyte heterogeneity in the cockroach *Periplaneta americana* analyzed using monoclonal antibodies. J. Cell Sci. 103 : 1261—1267.

Charalambidis N. D., Foukas L. C., Zervas C. G., Marmaras V. J. 1996. Hemocyte surface phenoloxidase (PO) and immune response to lipopolysaccharide (LPS) in *Ceratitis capitata*. Insect Biochem. Mol. Biol. 26 : 867—874.

Charalambidis N. D., Zervas C. G., Lampropoulou M., Katsoris P. G., Marmaras V. J. 1995. Lipopolysaccharide-stimulated exocytosis of nonself recognition protein from insect hemocytes depend 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 peptide synthesis in the blowfly, *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera: Calliphoridae). Entomol. Sci. 3 : 139—144.

Chernysh S. I., Kim G., Bekker V. A., Pleskach N. A., Filatova V. B., Anikin V. G., Platonov Bulet Ph. 2002. Antiviral and antitumor peptides from insects. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 12 628—12 632.

Chernysh S. I., Simonenko N. P., Braun A., 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.
- Clark K. D., Pech L. L., Strand M. R. 1997. Isolation and identification of a plasmatocyte-spreading peptide from the hemolymph of the lepidopteran insect *Pseudoplusia includens*. J. Biol. Chem. 272 : 23 440—23 447.
- Crossley A. C. S. 1964. An experimental analysis of the origins and physiology of haemocytes in the blowfly *Calliphora erythrocephala* (Meig.). J. Exp. Zool. 157 : 375—398.
- Crossley A. C. 1975. The cytophysiology of insect blood. Adv. Insect Physiol. 11 : 117—221.
- Dearolf C. R. 1999. JAKs and STATs in invertebrate model organisms. Cell. Mol. Life Sci. 55 : 1578—1584.
- Dimarcq J. L., Imler J. L., Lanot R., Ezekowitz R. A., Hoffmann J. A., Janeway C. A., Lagueux M. 1997. Treatment of l(2)mbn *Drosophila* tumorous blood cells with the steroid hormone ecdysone amplifies the inducibility of antimicrobial peptide gene expression. Insect Biochem. Mol. Biol. 27 : 877—886.
- Dimarcq J. L., Zachary D., Hoffmann J. A., Hoffmann D., Reichhart J. M. 1990. The insect immunity: expression of the two major inducible antibacterial peptides, defensin and dipterin, in *Phormia terranova*. EMBO J. 9 : 2507—2515.
- Drif L., Brehélin M. 1983. The circulating hemocytes of *Culex pipiens* and *Aedes aegyptii*: cytology, histochemistry, hemograms and functions. Develop. Comp. Immunol. 7 : 687—690.
- Franssens V., Simonet G., Bronckaers A., Claeys I., De Loof A., Broeck J. V. 2005. Eicosanoids mediate the laminarin-induced nodulation response in larvae of the flesh fly, *Neobellieria bullata*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 59 : 32—41.
- Gardiner E. M. M., Strand M. R. 1999. Monoclonal antibodies bind distinct classes of hemocytes in the moth *Pseudoplusia includens*. J. Insect Physiol. 45 : 113—126.
- Gillespie J. P., Kanost M. R., Trenszyk T. 1997. Biological mediators of insect immunity. Ann. Rev. Entomol. 42 : 611—643.
- Gupta A. P. 1979. Hemocyte types. Their structure, synonymies, interrelationships and taxonomic significance. In: Insect hemocytes. Cambridge, England: Cambridge Univ. Press. 85—127.
- Hillyer J. F., Christensen B. M. 2002. Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Histochem. Cell Biol. 117 : 431—440.
- Holz A., Bossinger B., Strasser T., Janning W., Klapper R. 2003. The two origins of hemocytes in *Drosophila*. Development. 130 : 4955—4962.
- 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.
- Lanot R., Zachary D., Holder F., Meister M. 2001. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. Develop. Biol. 230 : 243—257.
- Lavine M. D., Strand M. R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem. Mol. Biol. 32 : 1295—1309.
- Lebestky T., Chang T., Hartenstein V., Banerjee U. 2000. Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. Science. 288 : 146—149.
- Leonard C., Ratcliffe N. A., Rowley A. F. 1985. The role of phenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells. J. Insect Physiol. 31 : 789—799.
- Lowenberger C. 2001. Innate immune response of *Aedes aegypti*. Insect Biochem. Mol. Biol. 31 : 219—229.
- Marmaras V. J., Charalambidis N. 1992. Certain hemocyte proteins of the medfly, *Ceratitis capitata*, are responsible for non-self recognition and immobilization of *Escherichia coli* in vitro. Arch. Insect Biochem. Physiol. 21 : 281—288.
- Marmaras V. J., Charalambidis N. D., Zervas C. G. 1996. Immune response in insects: the role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. Arch. Insect Biochem. Physiol. 31 : 119—133.
- Mavrouli M. D., Tsakas S. G., Theodorou L., Lampropoulou M., Marmaras V. J. 2005. MAP kinases mediate phagocytosis and melanization via prophenoloxidase activation in medfly hemocytes. Biochim. biophys. acta (BBA) — Mol. Cell Res. 1744 : 145—156.
- McKenzie A. N., Preston T. M. 1992. Biological characteristics of the *Calliphora vomitoria* agglutinin. Develop. Comp. Immunol. 16 : 85—93.
- Meister M., Lagueux M. 2003. *Drosophila* blood cells. Cell. Microbiol. 5 : 573—580.
- Mullet H., Ratcliffe N. A., Rowley A. F. 1993. The generation and characterization of anti-insect blood cell monoclonal antibodies. J. Cell Sci. 105 : 93—100.
- Ottaviani E. 2005. Insect immunorecognition. Review ISJ. 2 : 142—151.
- Ratcliffe N. A., Gotz P. 1990. Functional studies on insect hemocytes, including non-self recognition. Res. Immunol. 141 : 919—923.
- Ratcliffe N. A., Rowley A. E. 1983. Recognition factors in insect haemolymph. Develop. Comp. Immunol. 7 : 653—656.
- Ribeiro C., Breherlin M. 2006. Insect haemocytes: what type of cell is that? J. Insect Physiol. 52 : 417—429.
- Richards E. H., Ratcliffe N. A. 1990. Direct binding and lectin-mediated binding of erythrocytes to hemocytes of insect *Extatosoma triatum*. Develop. Comp. Immunol. 14 : 269—281.
- Rizki R. M., Rizki T. M. 1980. Hemocyte responses to implanted tissues in *Drosophila melanogaster* larvae. Wilhelm Roux's Arch. 189 : 207—213.
- Rizki T. M., Rizki R. M. 1959. Functional significance of the crystal cells in the larvae of *Drosophila melanogaster*. J. Biophys. Biochem. Cytol. 5 : 235—240.
- Rizki T. M., Rizki R. M. 1984. The cellular defense system of *Drosophila melanogaster*. In: King R. C., Akai H. (Eds.) New York: Plenum Publ. 579—604.
- Rizki T. M., Rizki R. M. 1992. Lamellocyte differentiation in *Drosophila* larvae parasitized by *Leptopilina*. Develop. Comp. Immunol. 16 : 103—110.
- Shrestha F., Gattef E. 1982. Ultrastructure and cytochemistry of the cell type in the larval «lymph glands» and haemolymph. Develop. Growth Differ. 24 : 65—82.
- Soldatos A. N., Metheniti A., Mamali I., Lampropoulou M., Marmaras V. J. 2003. Distinct LPS-induced signals regulate LPS uptake and morphological changes in medfly hemocytes. Insect Biochem. Mol. Biol. 3 : 1075—1084.
- Sorrentino R. P., Carton Y., Govind S. 2002. Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. Develop. Biol. 243 : 65—80.
- Strand M. R., Johnson J. A. 1996. Characterization of monoclonal antibodies to hemocytes of *Pseudoplusia includens*. J. Insect Physiol. 42 : 21—31.
- Takase H., Watanabe A., Yoshizawa Y., Kitami M., Sato R. 2009. Identification and comparative analysis of three novel C-type lectins from the silkworm with functional implications in pathogen recognition. Develop. Comp. Immunol. 33 : 789—800.
- Tsakas S., Marmaras V. J. 2010. Insect immunity and its signalling: an overview. Review ISJ. 7 : 228—238.
- Whitten J. M. 1964. Hemocytes and the metamorphosing tissues in *Sarcophaga bullata*, *Drosophila melanogaster* and other Cyclorrhaphous Diptera. J. Insect Physiol. 10 : 447—469.
- Willott E., Trenszyk T., Thrower L. W., Kanost M. R. 1994. Immunochemical identification of insect hemocyte populations: monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*. Eur. J. Cell Biol. 65 : 417—423.
- Zachary D., Brehélin 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 hemocytes of *Calliphora erythrocephala* (Meig.) (Diptera). Z. Zellforsch. Mikr. Anat. 141 : 55—73.

FUNCTIONAL MORPHOLOGY OF BLOWFLY *CALLIPHORA VICINA* HEMOCYTES

T. V. Kind

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

In the hemolymph of *Calliphora* seven types of hemocytes were revealed. These are prohemocytes, which are the stem cells, stable and unstable hyaline cells, thrombocytoids, spindle cells, juvenile plasmatocytes and plasmatocytes I—IV, which represent sequential stages of one cell line differentiation were registered. The margin between them is completion of the crop emptying and beginning of wandering stage. In the feeding and crop emptying larvae take place rising of hyaline cells, thrombocytoids and hyaline cells amount with parallel growth of their defense function. The second wave of hemogenesis occur in the end of crop emptying period. It is accompanied by burst of plasmatocyte I production with their subsequent differentiation to plasmatocytes II—IV. Production of stable hyaline cells and respectively prothrombocytoids may be regulated not only by hormonal background but also by inorganic or organic particles invaded into the hemocel. Three types of hemocytes are involved in loosing of hemolymph from alien particles, notably thrombocytoids, juvenile plasmatocytes and plasmatocytes I and II. Thrombocytoids are responsible for parasitic eggs encapsulation. In addition they can phagocytize tiny organic and inorganic particles. Juvenile plasmatocytes respond to alien invasion almost as quickly as thrombocytoids at the onset of invasion. Plasmatocytes I and II start phagocytosis more slowly, hours post invasion, frequently accumulating the particles previously caught by thrombocytoids. Plasmatocytes I can absorb foreign particles and group in morules and can also surround filled thrombocytoids forming distinctive capsules. Both morules and capsules are temporary structures and disintegrate some hours later. It is supposed the existence of three levels of immune defence: the fast response reaction of thrombocytoids and juvenile plasmatocytes and slow cellular reactions of plasmatocytes I. They are prerequisites for more extensive humoral response.

Key words: *Calliphora vicina*, defence reaction, hemocytes, phagocytosis, incapsulation, recognition.
