

## РЕАКЦИЯ ГЕМОЦИТОВ ЛИЧИНОК МЯСНОЙ МУХИ *CALLIPHORA VICINA* НА ИНЪЕКЦИЮ АБИОТИЧЕСКИХ И БИОТИЧЕСКИХ ЧУЖЕРОДНЫХ ЧАСТИЦ

© Т. В. Кинд

Биологический институт С.-Петербургского государственного университета;  
электронный адрес: [tatiana.kind@mail.ru](mailto:tatiana.kind@mail.ru)

Инъекция эритроцитов человека в полость тела окончивших питание личинок мясной мухи *Calliphora vicina* приводит к их быстрому связыванию тромбоцитоидными фрагментами и образованию агглютинатов. Фрагментации эритроцитов и их лизиса в пределах агглютинатов почти не наблюдается даже после изменения формы тромбоцитоидов и образования системы тяжей. Исключение представляют зоны контакта агглютинатов с ювенильными плазматоцитами, где виден распад эритроцитов. Последовательная инъекция эритроцитов и частиц угля приводит сначала к адгезии угля к поверхности агглютинатов, а затем и к его 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. Ювенильные плазматоциты фагоцитируют частицы угля вне зависимости от их концентрации и продолжительности предварительного контакта с эритроцитами. При инъекции в окончившие питание личинки смеси абиотических и биотических частиц уголь и эритроциты в основном образуют самостоятельные скопления в пределах изолированных агглютинатов. В то же время плазматоциты образуют морулы, состоящие из временных скоплений клеток, окруженных слоем нефагоцитируемых угольных частиц. Эти данные свидетельствуют о том, что рецепторы, предположительно лектиновые, которые ответственны за распознавание чужеродных абиотических и биотических объектов, очень близки, но не идентичны у разных типов гемоцитов. Они могут быть специфичными для определенного типа клеток (плазматоцитов), а также могут комплексно располагаться на мембране одного типа (тромбоцитоидов).

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

У личинок *Calliphora vicina* основными элементами клеточного иммунитета являются три типа гемоцитов. Из них два принадлежат к плазматоцитам, широко распространенному типу клеток, участвующих в элиминации путем фагоцитоза бактерий, проникших в гемоцель (Crosley, 1964; Whitten, 1964; Zachary, Hoffmann, 1973; Ratcliffe, Rowley, 1979; Faraldo, Lello, 2003). Это крупные ювенильные гемоциты, характерные для питающихся и опустошающих зоб личинок, и плазматоциты I—III, основные клетки гемолимфы особей, завершивших опустошение зоба и приступивших к пупаризации. Третьим типом защитных гемоцитов являются уникальные для взрослых двукрылых клетки — тромбоцитоиды, присутствующие в гемолимфе в виде небольших вытянутых фрагментов цитоплазмы и «голых» ядер. Им присуща способность инкапсулировать крупные инвайдеры типа яиц паразитических перепончатокрылых (Zachary et al., 1975). Но они могут осуществлять и заглатывание более мелких объектов величиной от 0.1 до 5 мкм (Кинд, 2005, 2007).

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 мембранные структуры патогенов, считаются такие факторы, как лектины, гемолин, ЛПС-связанный белок, белок, распознающий грамотрицательные бактерии, белок, распознающий пептидогликан, и некоторые другие изолированные из насекомых вещества (Gillespie, Kanost, 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 опсонов, распознаваемых рецепторами гемоцитов. Опсоны стимулируют прилипание (адгезию), поглощение частицы и ее разрушение фагоцитами. Роль опсонов у насекомых, в частности у личинок мух, могут играть определенные лектины, появляющиеся в гемолимфе перед началом метаморфоза (Richards, Ratcliffe, 1990; McKenzie, Preston, 1992b). 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.

В процессе фагоцитоза и (или) инкапсуляции тромбоциты каллифорид испытывают ряд характерных структурных изменений. Периферическая зона становится менее плотной, мембрана более тонкой. Изменяется и форма агглютинатов. Ранее округлые, агглютинаты становятся сначала неправильными, а затем приобретают вид тяжей. Ранее предполагалось, что морфологические изменения сопровождаются функциональными, и агглютинаты разной формы обладают различной способностью к рецепции и присоединению новых партий инъецированных частиц (Кинд, 2005, 2007).

Эритроциты неоднократно использовались в качестве объектов, провоцирующих защитную клеточную реакцию гемолимфы насекомых (Boman, Hultmark, 1987; El Deeb et al., 1990; Richards, Ratcliffe, 1990; McKenzie, Preston, 1992b). При исследовании судьбы эритроцитов, инъецированных в гемоцель личинок другого вида мясных мух, *Sarcophaga peregrina* (Komano, Natori, 1985), была установлена связь их деградации именно с лектинами. Однако привязка лектинов к какому-либо типу гемоцитов почти не осуществлялась. Только у *S. vomitoria* и *S. peregrina* была четко установлена корреляция лектинов с плазматоцитами, а тромбоциты их не содержат или почти не содержат (McKenzie, Preston, 1992a; Fujita et al., 1998). Это заставляет предполагать наличие различных механизмов защитной реакции со стороны разных клеточных элементов гемолимфы.

До настоящего времени отчасти исследованы только биохимическая составляющая реакции абсорбции и динамика лизиса эритроцитов после их инъекции в полость тела личинок мух, а функциональная морфология как гемоцитов в процессе распознавания и изоляции эритроцитов, так и самих эритроцитов после адгезии остается неизученной. Поэтому в настоящей работе была сделана попытка с использованием двойных инъекций эритроцитов и частиц угля выяснить, имеется ли разница в распознавании органических и неорганических чужеродных частиц, а также проследить динамику рецептивности разных типов гемоцитов к появлению новых порций инвайдеров.

## Материал и методика

Для работы была использована природная популяция *Calliphora vicina* из Петергофа со значительной склонностью к диапаузе. Личинок выращивали на свиных почках при 12 °C и 12-часовом световом дне (условия, провоцирующие диапаузу). После окончания питания личинки покидали мясо, начинали опустошать зоб и переходили к стадии бродяжничества и диапаузы. В личинок на различных этапах опустошения зоба и в первые дни после его полного очищения от остатков пищи с помощью тонкой инъекционной иглы вводили по 10 мкл суспензии эритроцитов в физиологическом растворе (0.65 г NaCl, 0.014 г KCl, 0.012 г CaCl<sub>2</sub> и дистиллированная вода до 100 мл) с концентрацией 2000 или 8000 эр/мм<sup>3</sup>.

В качестве вторичной инъекции ранее инъецированным личинкам через 10, 30 и 120 мин после первой инъекции вводили по 10 мкл стерильной 2—5%-ной суспензии мелко растертого медицинского активированного угля с величиной частиц 0.1—1 мкм в физиологическом растворе. В каждой серии использовали по 50—100 особей. Через различное время после инъекции (от 3 мин до 4 ч) пробы гемолимфы исследовали под микроскопом с использованием дифференциально-интерференционного конт-

раста (ДИК) по Номарскому и объектива 40×. Эта методика позволяет получить барельефные полихромные изображения клеток и ряда клеточных структур, включая ядра, ядрышки, вакуоли и катаболические включения. Она очень удобна для распознавания отдельных типов гемоцитов и для анализа их состояния в процессе функционирования. В каждом варианте использовали по 2 прижизненных временных препарата гемолимфы. Капли гемолимфы, взятые после прокола в передних сегментах 5 личинок, смешивали на предметном стекле и немедленно исследовали под микроскопом. Изображения монослая гемоцитов были получены с использованием цифровой видеокамеры Digital CDSF, установленной на микроскопе Jenamed. Их обрабатывали с помощью программы iuVCR и редактировали в Adobe Photoshop (v. 7).

## Результаты и обсуждение

Реакция на эритроциты. Реакция гемоцитов опустошающих зоб личинок *S. vicina* на введение в гемоцель суспензии эритроцитов человека становится заметной через 2 мин после инъекции. В более ранние сроки (0.5—1 мин) эритроциты, очевидно, только равномерно распределяются в гемолимфе и не вступают в контакт ни с одним типом клеток. Начиная с 3—4 мин после инъекции эритроциты начинают более или менее плотно заполнять округлые агглютинаты с четко выраженной мембраной. Эритроциты внутри агглютинатов отличаются округлой формой, равномерной плотностью и не показывают никаких признаков деградации. Только через 15—30 мин наблюдаются первые признаки фагоцитоза эритроцитов в некоторых агглютинатах и распад их на фрагменты. Одновременно с этим виден переход фрагментов в примыкающие ювенильные плазматоциты (рис. 1, а). Заполненные плотно утрамбованными эритроцитами агглютинаты сохраняют вид «мешков» вплоть до 1 ч после инъекции. В более поздние сроки они теряют выраженную мембрану и распадаются на сложную систему тяжей, в которых рыхло лежат красные кровяные клетки, частью сохранившие свою морфологию, частью разрушенные. Эти осколки активно фагоцитируются ювенильными плазматоцитами (рис. 1, б).

После опустошения зоба реакция тромбоцитоза остается практически неизменной; в то же время в связи с исчезновением из гемолимфы ювенильных плазматоцитов их роль в фагоцитозе эритроцитов снижается до нуля. До определенной степени функции ювенильных плазматоцитов выполняют плазматоциты I. Они могут поглощать остатки эритроцитов, но только в более поздние сроки после инъекции — через 1 ч и более. У диапаузирующих личинок защитная реакция гемоцитов замедляется. Через 3—4 мин после инъекции тромбоцитозные агглютинаты только начинают формироваться, и многие эритроциты лежат свободно в гемолимфе. Более поздние этапы гемоцитарной реакции также наступают с задержкой — разрыхление тромбоцитозных агглютинатов и начало формирования тяжей становятся заметными не ранее чем через 2—3 ч после инъекции (рис. 2).

В целом можно выделить 3 этапа реакции тромбоцитоза на введение эритроцитов в гемоцель личинок: 1) захват фрагментами тромбоцитозных эритроцитов, начало их слияния и первые этапы образования агглютинатов; 2) формирование агглютинатов, плотно заполненных чужеродными частицами («мешков») с отчетливо видной

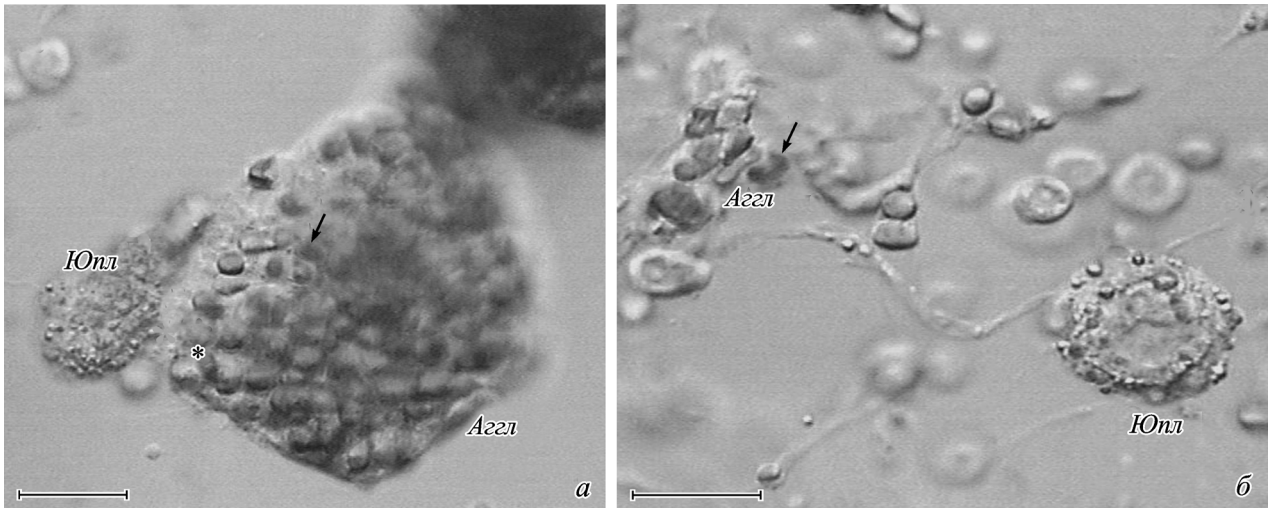


Рис. 1. Реакция гемоцитов у опустошающих зоб личинок *Calliphora vicina* на инъекцию суспензии гемоцитов человека (8000 эр/мм<sup>3</sup>).

*а* — 30 мин после инъекции: видны крупный тромбоцитоидный агглютинат (*Аггл*), заполненный эритроцитами (*стрелка*), и примкнувший к нему ювенильный плазматочит (*Юпл*); рядом с местом контакта заметна деструкция эритроцитов (*звездочка*). *б* — 3 ч после инъекции: видны небольшой агглютинат, рыхло заполненный внешне неизменными эритроцитами, и отдельно лежащий крупный *Юпл*. Дифференциально-интерференционный контраст по Номарскому. На всех рисунках *стрелки* указывают на эритроциты, *двойные стрелки* — на частицы угля. Масштабные отрезки — 20 мкм.

мембраной; 3) разрыхление агглютинатов и образование в итоге системы тяжей, заполненных отдельно лежащими эритроцитами на разных этапах деструкции. Было высказано предположение (Кинд, 2005, 2007) о том, что морфологические изменения тромбоцитоидных агглютинатов коррелируют с изменениями их адгезивной активности —

способности к распознаванию и поглощению новых партий чужеродных частиц.

Поэтому были проведены эксперименты с последовательной инъекцией контрастных биотических и абиотических частиц (эритроциты—уголь и уголь—эритроциты) через различные временные промежутки, а именно через

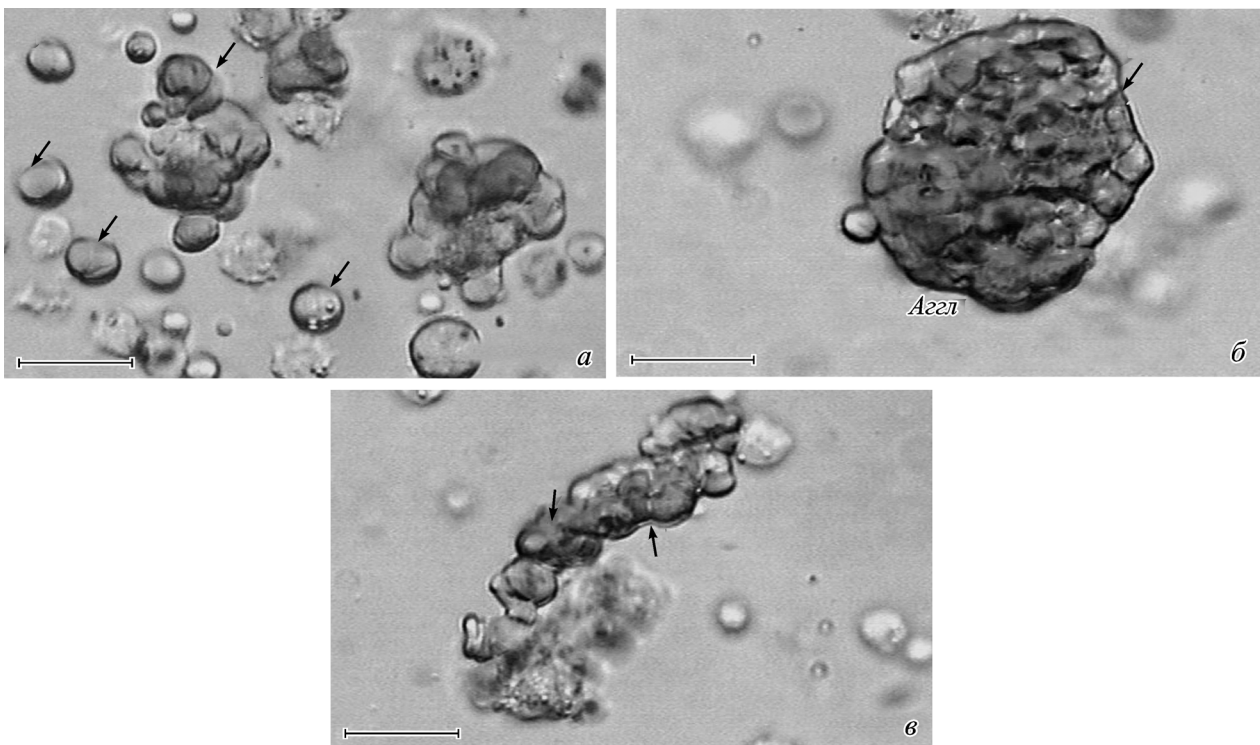


Рис. 2. Реакция гемоцитов диапаузирующих личинок *Calliphora vicina* на инъекцию суспензии эритроцитов человека (8000 эр/мм<sup>3</sup>).

*а* — через 3—4 мин после инъекции: видны отдельные эритроциты и небольшие скопления эритроцитов (отмечены *стрелками*). *б* — через 15 мин после инъекции: виден округлый агглютинат (*Аггл*) с плотно упакованными эритроцитами и отчетливой мембраной; никаких признаков деструкции эритроцитов не заметно. *в* — через 2 ч после инъекции: агглютинат с эритроцитами потерял округлую форму и стал вытянутым, мембрана заметна слабо, следов деструкции эритроцитов по-прежнему не видно.

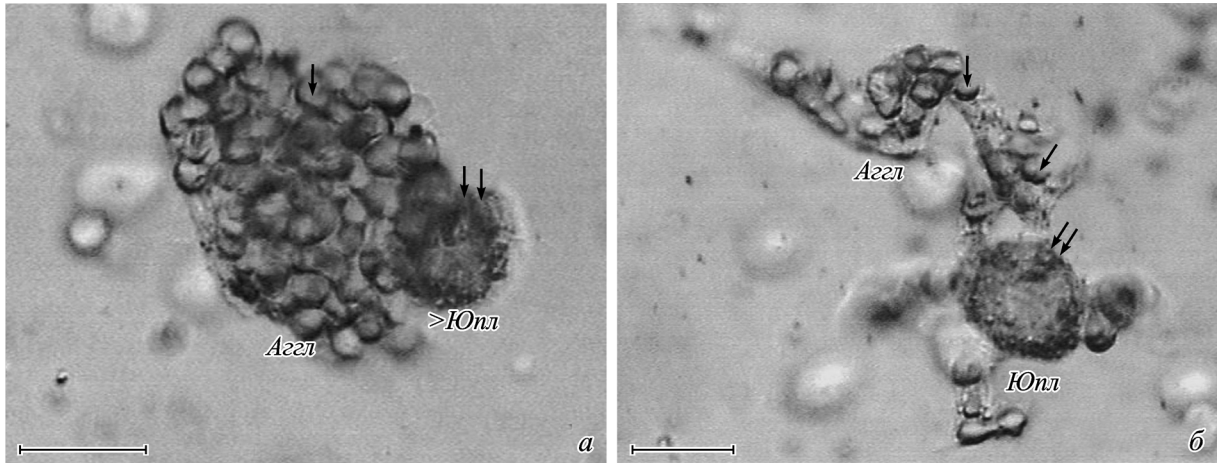


Рис. 3. Реакция гемоцитов у опустошающих зоб личинок *Calliphora vicina* на двойную инъекцию эритроцитов (8000 эр/мм<sup>3</sup>) и частиц угля (малая концентрация частиц).

*a* — через 15 мин после первичной инъекции и через 15 мин после вторичной инъекции; *б* — через 150 мин после первичной инъекции и через 15 мин после вторичной инъекции: адгезии частиц угля к тромбоцитонидным агглютинатам не заметно, виден только фагоцитоз угля ювенильными плазматочитами (двойные стрелки).

15 мин (формирование плотных агглютинатов) и через 2—3 ч (распад агглютинатов на тяжи) после первичной инъекции. Картины реакции исследовали через 7, 15, 30 и 60 мин после вторичной инъекции.

Двойная инъекция: эритроциты и уголь. Суспензия с малой концентрацией частиц угля. Через 15 мин после первичной инъекции эритроцитов (8000 эр/мм<sup>3</sup>) в опустошающих зоб личинок они, как уже указывалось выше, находятся внутри плотных агглютинатов с гладкой мембраной и хорошо заметной периферической плотной цитоплазмой. Никаких признаков деструкции в это время не заметно. Довольно многочисленные ювенильные плазматочиты заполнены небольшими катаболическими включениями, но определить, содержатся ли среди них продукты фагоцитоза деструктурированных эритроцитов, не представляется возможным.

После вторичной инъекции угля его частицы ни через 15, ни через 30, ни через 60 мин не присоединяются к агглютинатам и сначала плавают свободно в гемолимфе, а

затем, в более поздние сроки (30 и 60 мин), начинают фагоцитироваться ювенильными плазматочитами, постепенно заполняя их цитоплазму (рис. 3, *a*).

В том случае, если после первичной инъекции эритроцитов прошло не менее 2 ч, начинается образование рыхлых агглютинатов или тяжей. Предполагалось, что на этой стадии агглютинаты восстанавливают способность к захватыванию частиц угля после вторичной инъекции. Однако и в этот период вторичная инъекция суспензии угля демонстрирует слабую его адгезию как к уже образовавшимся свежим и старым агглютинатам, так и к плазматочитам. Только через 30 мин после инъекции частицы угля исчезают из гемолимфы и либо прилипают к мембране агглютинатов, либо образуют самостоятельные скопления. При этом тяжезобразная конфигурация агглютинатов остается практически неизменной (рис. 3, *б*).

Могут быть как минимум две причины столь слабой адгезивной реакции угля к тромбоцитоидам. Во-первых, это уже существующее к моменту появления в гемолимфе

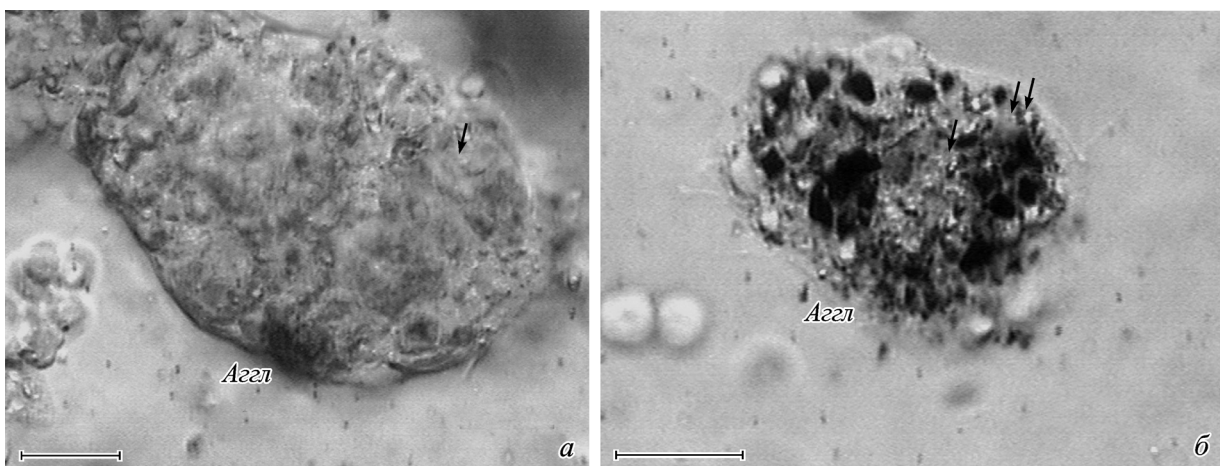


Рис. 4. Реакция гемоцитов у опустошающих зоб личинок *Calliphora vicina* на двойную инъекцию эритроцитов (2000 эр/мм<sup>3</sup>) и частиц угля.

*a* — через 15 мин после первичной инъекции и через 15 мин после вторичной инъекции: крупный тромбоцитонидный агглютинат (Аггл) с отдельными поглощенными эритроцитами и очень плотной мембраной: адгезии угольных частиц не наблюдается. *б* — тромбоцитонидный агглютинат после тех же воздействий, поглотивший как эритроциты (стрелка), так и частицы угля (двойная стрелка).

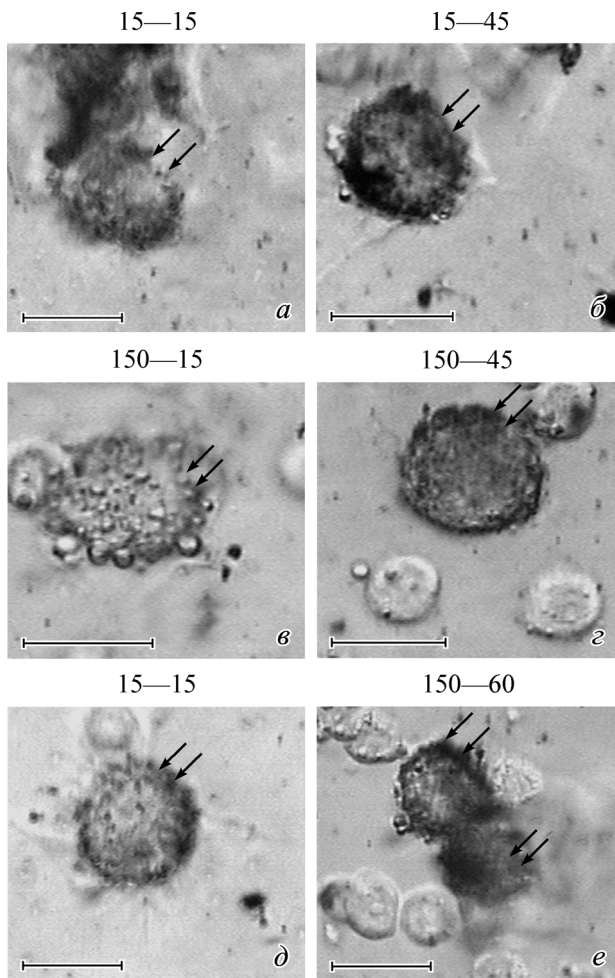


Рис. 5. Ювенильные плазматочиты личинок *Calliphora vicina* на разных этапах опустошения зоба после различных сроков первичной и вторичной инъекций.

*a—c* — личинки в начале опустошения зоба; *d, e* — личинки перед завершением опустошения зоба. Продолжительность (в мин) после первичной инъекции эритроцитов и вторичной инъекции угля проставлена над фотографиями.

дополнительных абиотических чужеродных частиц полное насыщение тромбоцитоидов ранее поступившими биотическими частицами. Во-вторых, степень захвата может зависеть от качества частиц, используемых для вторичной инъекции. Для проверки первого предположения было использовано применение двух концентраций эритроцитов при первичной инъекции — 2000 и 8000 красных кровяных клеток на  $1 \text{ мм}^3$  физиологического раствора.

В случае инъекции в опустошающих зоб личинок разбавленной суспензии эритроцитов ( $2000 \text{ эр/мм}^3$ ) они быстро выводятся из гемолимфы и концентрируются в тромбоцитоидных агглютинатах, вначале округлых, а затем тяжеобразных. Однако в отличие от опытов с более высокой концентрацией эритроциты могут располагаться в агглютинатах очень рыхло, оставляя крупные участки цитоплазмы незаполненными. Малое количество инъецированных эритроцитов не увеличивает рецептивной активности агглютинатов. Более того, в некоторых случаях образовавшиеся агглютинаты с малым количеством захваченных частиц обладают настолько плотной мембраной, что лишаются способности к адгезии (рис. 4, *a*). Так что более правильным кажется второе предположение об ослабленной реактивной способности использованной

суспензии частиц угля. Уголь при поздней вторичной инъекции хотя и прилипает активно к старым тяжеобразным агглютинатам, исчезает из гемолимфы нескоро, через 45—60 мин. При этом агглютинаты могут становиться как округло-компактными, так и сохранять вытянутую тяжеобразную форму.

Реакция гемоцитов на инъекцию эритроцитов человека при концентрации  $8000 \text{ эр/мм}^3$  остается стандартной с образованием вначале плотных агглютинатов, а затем тромбоцитоидных тяжей, но выраженность адгезии при последующей инъекции угля выглядит несравненно более сильной. Уже через 15 мин после вторичной инъекции частицы угля прилипают к агглютинатам, часто полностью маскируя ранее поглощенные эритроциты, или образуют собственные вновь образовавшиеся изолированные скопления. Ювенильные плазматочиты опустошающих зоб личинок через 15 мин после вторичной инъекции угля начинают накапливать его в периферической зоне цитоплазмы, а через 100—120 мин заполняются целиком. Этот процесс происходит идентично вне зависимости от продолжительности предшествующей экспозиции эритроцитов (рис. 5). Только после опустошения зоба, при наступлении дегенеративных изменений ювенильных плазматочитов, они теряют способность к фагоцитозу.

После образования тяжей с эритроцитами уголь при вторичной инъекции также активно оседает на тяхах и фагоцитируется ювенильными плазматочитами. Таким образом, изменение морфологии тромбоцитоидных агглютинатов не приводит к увеличению их адгезивных способностей по отношению к новым порциям чужеродных частиц.

Более тщательный анализ ранних стадий захвата частиц тромбоцитоидными фрагментами дает возможность сделать вывод о том, что появление чужеродных частиц не приводит к образованию множества мелких тромбоцитоидных агглютинатов, состоящих из частицы и обволакивающей ее цитоплазмы фрагмента, которые потом сливаются воедино. Скорее, биотическая или абиотическая частица, опознанная тромбоцитоидом, является затравкой для хемотаксического стягивания вместе и объединения множества фрагментов с прилипшими или не прилипшими к ним частицами в крупные плотные тромбоцитоидные образования, описываемые некоторыми авторами под названием нодул (McKenzie, Preston, 1992b). Они окружены отчетливой мембраной и иногда могут полностью терять способность к адгезии новых частиц. Количество частиц в агглютинате может варьировать в зависимости от концентрации инъецированной суспензии, но этот фактор никак не влияет на последующие опознавание и захват новых партий инвайдера. На поздних этапах опустошения зоба и сразу после его опустошения как агглютинаты, так и ювенильные плазматочиты становятся несколько более рецептивными к дополнительно появившимся в гемолимфе частицам угля. Если с момента первичной инъекции прошло немного времени (15—30 мин), вторично инъецированный уголь может скапливаться в периферической зоне агглютинатов и фагоцитироваться ювенильными плазматочитами, а через 1 ч после вторичной инъекции уголь в значительных количествах не только скапливается в периферической зоне агглютинатов, но и проникает в их центральную часть.

После опустошения зоба из гемолимфы личинок практически исчезают ювенильные плазматочиты. Их замещают более мелкие и многочисленные плазматочиты I. Эти клетки адгезируют как эритроциты, так и уголь:

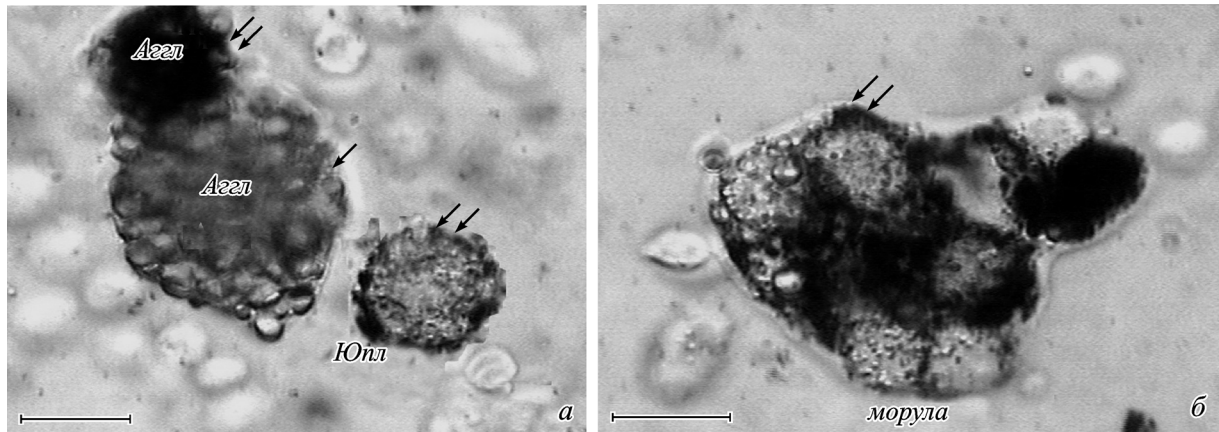


Рис. 6. Реакция гемоцитов у опустошивших зоб личинок *Calliphora vicina* на двойную инъекцию эритроцитов (через 150 мин) и частиц угля (через 15 мин).

*а* — самостоятельная агглютинация частиц угля и образование их скопления вне прежде существовавшего тромбоцитоидного агглютината; рядом с агглютинатом — крупный *Юпл* с прилипшими к мембране частицами угля; *стрелка* — скопление эритроцитов, *двойная стрелка* — скопление угля. *б* — образование морулы (*морула*) из скопления плазматоцитов I с седиментированными частицами угля.

сначала они окружаются небольшими капельками эритроцитного происхождения, а затем, после вторичной инъекции угля, адгезируют по периферии его мелкие частицы и образуют морулы (рис. 6). Морулы являются временными образованиями. Они становятся заметными через 15—20 мин после инъекции и исчезают через 40—60 мин. Прилипшие к плазматоцитам I частицы в дальнейшем не фагоцитируются. Основной фагоцитоз происходит значительно позже, только через 1—2 ч после инъекции и, судя по всему, осуществляется не напрямую, а через предварительное поглощение и передачу тромбоцитоидами (Кинд, 2005). Это говорит об отложенной опсонизации или об участии иных механизмов рецепции у этого вида гемоцитов по сравнению с ювенильными плазматоцитами. Следует отметить, что популяция плазматоцитов I в отличие от тромбоцитоидов и ювенильных плазматоцитов является гетерогенной, и в контакт с чужеродными элементами вступает только около 20 % клеток (Кинд, 2010).

Как и на более ранних стадиях развития, тромбоцитоиды вне зависимости от концентрации эритроцитов активно поглощают вначале эритроциты, а затем — угольные частицы. Частицы угля могут располагаться между захваченными ранее эритроцитами или образовывать

крупные отдельно лежащие скопления (рис 6, *а*). Изменения плотности и формы агглютинатов, а также образование тяжей, как и в предыдущих вариантах, не приводят к изменению их адгезивных способностей. Очевидно, должна существовать корреляция между изменением морфологии агглютинатов и функциями этих образований, однако в настоящей работе установить ее оказалось невозможно.

Двойная инъекция: уголь и эритроциты. Эффект обратной последовательности инъекций угля и эритроцитов был исследован значительно более фрагментарно. Однако основные закономерности адгезии угля и эритроцитов сохраняют прежний характер, особенно у не закончивших опустошение зоба личинок. Эритроциты включаются в состав агглютинатов с уже поглощенными частицами угля, что говорит о сохранившейся чувствительности к биотическим объектам. В то же время фагоцитировавшие уголь ювенильные плазматоциты теряют свои адгезивные способности. Довольно сильно изменяются картины реакции после наступления диапаузы. В этот период вторично инъекцированные эритроциты, вместо того чтобы прилипнуть к поверхности агглютинатов с углем, а затем и проникать внутрь, начинают распо-

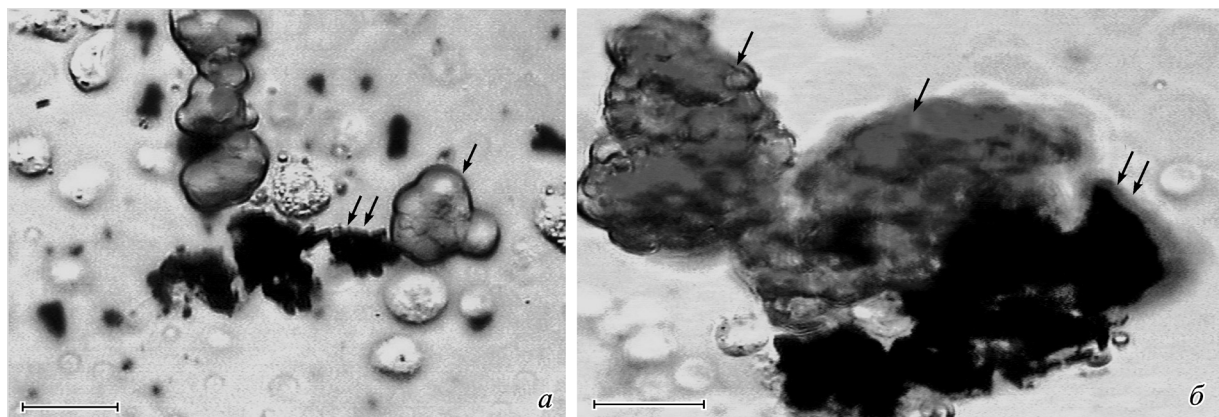


Рис. 7. Реакция гемоцитов диапазирующих личинок *Calliphora vicina* на инъекцию смеси эритроцитов и частиц угля через 3—4 мин (*а*) и 60 мин (*б*) после инъекции.

Хорошо заметна специфичность агглютинации биотических (*стрелки*) и абиотических (*двойные стрелки*) частиц.

лагаться небольшими равномерными скоплениями. Эти скопления со временем увеличиваются в величине и плотности, чаще контактируют с заполненными углем агглютинатами, но не сливаются с ними.

Инъекция смеси угля с эритроцитами. Наличие подобных изолированных скоплений наводит на мысль о существовании вновь возникших рецепторных зон, специфически распознающих биотические и абиотические чужеродные частицы. Поэтому было проведено дополнительное исследование реакции гемоцитов на инъекцию смеси эритроцитов и частиц угля. У личинок, опустошающих зоб, уже в ранние сроки после инъекции образуются агглютинаты, заполненные как эритроцитами, так и частицами или небольшими скоплениями частиц угля. Иногда уголь и эритроциты занимают отдельные небольшие зоны, но в целом они располагаются вперемешку. После опустошения зоба и запуска диапаузы ситуация меняется. Зональность расположения эритроцитов и угля становится более выраженной. Некоторые небольшие агглютинаты альтернативно заполняются или одним, или другим чужеродным элементом. В первую минуту после инъекции реакция гемоцитов еще слабо выражена и большинство частиц угля и эритроцитов свободно лежит в гемолимфе. Но уже через 5 мин образуются отчетливые агглютинаты, причем преимущественно накапливающие либо уголь, либо эритроциты (рис. 7). В дальнейшем разделение зон с углем и с эритроцитами сохраняется, хотя нередко заметны и образования, в которых абиотические и биотические частицы лежат вперемешку.

Раздельная адгезия органических и неорганических частиц свидетельствует о том, 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 — тромбоцитоилов. Эта раздельность возрастает в процессе онтогенеза и наиболее ярко выражена у диапаузирующих особей.

Что же касается плазматоцитов, они, как нам кажется, способны фагоцитировать только мелкие частицы, в настоящем случае — частицы угля. При этом ювенильные плазматоциты осуществляют быструю прямую реакцию адгезии и фагоцитоза опсонизированных частиц, а плазматоциты I и II становятся способными к их захвату только на поздних этапах защитной реакции — после контакта с тромбоцитоидами. На ранних же стадиях могут образовываться только морулы — временные образования, состоящие из плазматоцита и слоя нефагоцитируемых частиц вокруг него (рис. 6, б). Учитывая гетерогенность популяции плазматоцитов I, следует признать, что только часть их может распознавать чужеродные элементы, а остальные выполняют иные, пока неизвестные функции.

Таким образом, учитывая многочисленные, хотя и косвенные факты, касающиеся адгезии чужеродных частиц биотического и абиотического происхождения к гемоцитам личинок мух, можно прийти к выводам о том, что рецепторная система является достаточно разнородной и включает в себя как лектины, так и вещества иной природы. Причем локализация этих веществ может определяться стадией развития и типом гемоцитов. В то же время даже для одного типа — тромбоцитоилов — возможно мозаичное расположение рецепторов, что приво-

дит к появлению локальных зон агглютинации эритроцитов и частиц угля.

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

### Список литературы

- Кинд Т. В. 2005. Агглютинация и фагоцитоз чужеродных абиотических частиц гемоцитами мясной мухи *Calliphora vicina* in vivo. I. Динамика фагоцитарной активности гемоцитов в онтогенезе личинок. Цитология. 47 (7) : 609—622.
- Кинд Т. В. 2007. Гемоциты с различными типами защитной реакции в онтогенезе трех видов мясных мух рода *Calliphora*. Тр. БиНИИ СПбГУ. 53 : 306—335.
- Кинд Т. В. 2010. Агглютинация и фагоцитоз чужеродных абиотических частиц гемоцитами мясной мухи *Calliphora vicina* in vivo. II. Влияние септической иммунной индукции на гемоцитарную активность. Цитология. 52 (6) : 431—441.
- Boman H. G., Hultmark D. 1987. Cell-free immunity in insects. Ann. Rev. Microbiol. 41 : 103—126.
- Crossley A. V. S. 1964. An experimental analysis of the origins and physiology of haemocytes in the blow-fly *Calliphora erythrocephala* (Meig.). J. Exp. Zool. 157 : 375—398.
- El Deeb S. O., Hassan T. H., Cooper E. L., Abdel Hakim M. 1990. Characterization of diverse hemolymph lectins in the cotton caterpillar *Spodoptera littoralis*. Comp. Biochem. Physiol. Part B. Comp. Biochem. 97 : 321—325.
- Faraldo A. V., Lello E. 2003. Defense reactions of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) larval hemocytes. Biocell. 27 : 197—203.
- Fujita Y., Kurata S., Homma K., Natori S. 1998. A novel lectin from *Sarcophaga*, its purification, characterization and cDNA cloning. J. Biol. Chem. 273 : 9667—9672.
- Gillespie J. P., Kanost M. R. 1997. Biological mediators of insect immunity. Ann. Rev. Entomol. 42 : 611—643.
- Komano H., Natori S. 1985. Participation of *Sarcophaga* peregrine hormonal lectin in the lysis of sheep red blood cells injected into the abdominal cavity of larvae. Develop. Comp. Immunol. 81 : 171—175.
- 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.
- Ratcliffe N. A., Rowley A. F. 1979. Role of hemocytes in defense against biological agents. In: Insect hemocytes. Cambridge: Cambridge Univ. Press. 331—414.
- 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.
- 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.
- Whitten J. M. 1964. Haemocytes and the metamorphosing tissues in *Sarcophaga bullata*, *Drosophila melanogaster*, and other Cyclorrhaphous Diptera. J. Insect Physiol. 10 : 447—469.
- Zachary D., Brehelin M., Hoffmann J. A. 1975. Role of the «thrombocytoids» in capsule formation in the dipteran *Calliphora erythrocephala*. Cell Tissue Res. 162 : 343—348.
- Zachary D., Hoffmann J. A. 1973. The haemocytes of *Calliphora erythrocephala* (Meig.) (Diptera). Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 141 : 55—73.

RESPONSE OF *CALLIPHORA VICINA* LARVAL HEMOCYTES TO ABIOTIC AND BIOTIC FOREIGN PARTICLES INJECTION

T. V. Kind

Biological Institute of St. Petersburg State University;  
e-mail: tatiana.kind@mail.ru

Human erythrocytes injection into the body cavity of *Calliphora vicina* postfeeding larvae results to their fast binding by thrombocytoidal fragments with agglutinates formation. There were almost none sites of lysis and degradation of erythrocytes in agglutinates even after shape modification and strands generation. Exceptions are zones of agglutinates with juvenile hemocytes, where destruction of erythrocytes is seen. The sequential injection of erythrocytes and charcoal particles leads to charcoal adhesion at first to agglutinates periphery and later to more deep stratum of cytoplasm between the erythrocytes. Under such conditions agglutinate formation period is accompanied with morphology variations which do not influence the intensity of agglutinating reaction. Juvenile plasmatocytes phagocytized the charcoal particles regardless of their concentration and duration of previous contact with erythrocytes. When mixture of abiotic and biotic particles was injected into post feeding larvae, erythrocytes and charcoal generate independent aggregations in the range of separate agglutinates. At the same time plasmatocytes form nodules consisting of temporary cell aggregations covered with cores of non phagocytized charcoal particles. These data testified that presumably lectin receptors responsible for foreign biotic and abiotic particles recognition are very near but not identical for different types of hemocytes. They may be specific (for plasmatocytes) or integrated to different parts of cellular membrane (in thrombocytoids).

Key words: *Calliphora vicina*, immunity, hemolymph, hemocytes, phagocytosis, recognition.

---