

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕМОЦИТОВ АСЦИДИИ *HALOCYNTHIA AURANTIUM*

© А. Н. Сухачев,<sup>1</sup> И. С. Дьячков,<sup>1</sup> Д. С. Романюк,<sup>1</sup> В. В. Кумейко,<sup>3, 4</sup>  
В. Ф. Синицина,<sup>2</sup> Е. Д. Королькова,<sup>2</sup> А. Д. Харазова,<sup>2</sup> А. В. Полевщикова<sup>1—3, \*</sup>

<sup>1</sup> Институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург,

<sup>2</sup> С.-Петербургский государственный университет,

<sup>3</sup> Дальневосточный федеральный университет

и <sup>4</sup> Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток;

\* электронный адрес: alexpol512@yandex.ru

Работа посвящена изучению состава популяций циркулирующих гемоцитов асцидий как примера специализации циркулирующих клеток у низших хордовых. Работа выполнена на одиночных асцидиях *Halocynthia aurantium* Японского моря. С использованием световой микроскопии и стандартных методов окрашивания показано наличие пяти популяций циркулирующих гемоцитов, типичных для асцидий: гемобластов, гранулоцитов, гиалиновых амебоцитов, макрофагоподобных и морулярных клеток. Не выявлено присутствия пигментных клеток. Анализируются возможные схемы дифференцировки циркулирующих клеток гемолимфы.

Ключевые слова: асцидии, гемоциты, морфологический анализ.

Асцидии занимают промежуточное положение между позвоночными и беспозвоночными животными, поэтому исследованиям их циркулирующих клеток традиционно уделяется значительное внимание. Планомерное изучение состава популяций гемоцитов оболочников началось еще в XX в. (Заварзин, 1953) и продолжается по сей день (Rowley, 1981; Smith, Peddie, 1992; Shiraе, Saito, 2000; Fuke, 2001; Parrinello et al., 2003). Однако, несмотря на значительное количество работ, многие проблемы биологии этих клеток остаются неясными. Так, до сих пор нет единой классификации гемоцитов асцидий, поэтому разные исследователи выделяют от 4 до 9 различных клеточных типов (Rowley, 1981; Smith, Peddie, 1992; Shiraе, Saito, 2000; Hirose et al., 2003; Parrinello et al., 2003, 2007).

Первую современную классификацию клеточных типов асцидий в 1981 г. предложил Роули, который описал циркулирующие клетки одиночной асцидии *Ciona intestinalis* (Rowley, 1981). В дальнейшем спектр изученных видов оболочников существенно расширился. Так, у асцидии *Halocynthia roretzi* было выделено 9 морфотипов гемоцитов (Fuke, Fukumoto, 1993), в то время как у *C. intestinalis* было показано существование только шести морфотипов циркулирующих клеток (Smith, Peddie, 1992). В других исследованиях, выполненных на *C. intestinalis*, тоже было выделено 6 типов клеток, которые, однако, получили совершенно другие определения по сравнению с исходной работой Роули (Parrinello et al., 2007). Морфологические исследования были проведены и на 9 видах колониальных оболочников рода *Botryllus*. При этом выделено 5 основных клеточных морфотипов, которые присутствуют у всех этих видов, но в разных соотношениях (Hirose et al., 2003). К числу наиболее часто

встречающихся клеточных типов можно отнести такие, как фагоциты (макрофагоподобные клетки, гиалиновые амебоциты), гранулоциты, морулярные клетки двух типов, пигментные клетки и стволовые клетки.

Целью данной работы было проведение морфологического анализа циркулирующих гемоцитов одиночной асцидии Японского моря *Halocynthia aurantium* и сравнение выделенных популяций клеток с уже описанными ранее для других асцидий.

### Материал и методика

Объектом исследования служил вид одиночной асцидии *H. aurantium* (Urochordata; Ascidiaceae; Stolidobranchia; Pyuridae; Halocynthia). Сбор животных производили в июле—августе 2007—2010 гг. на базе биостанции «Восток» Института биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН. Всего в работе было использовано более 120 животных. Гемолимфу с циркулирующими клетками получали путем пункции субэпидермального синуса, вытекающую жидкость собирали в пробирки объемом 15 мл (Sarstedt, США). Для предотвращения коагуляции клеток в пробирки добавляли 30 mM раствора ЭДТА (Нева-Реактив, Россия), приготовленного на фильтрованной морской воде (ФМВ). Полученную клеточную суспензию центрифугировали при 100 g в течение 10 мин при 4 °C, отмывали раствором Дальбекко, содержащим 34 г/л NaCl (в соответствии с его содержанием в воде Японского моря) и не содержащим Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, pH 6.0, и ресуспенировали в этом растворе.

Исследование морфологии гемоцитов с помощью световой микроскопии. По 0.5 мл сус-

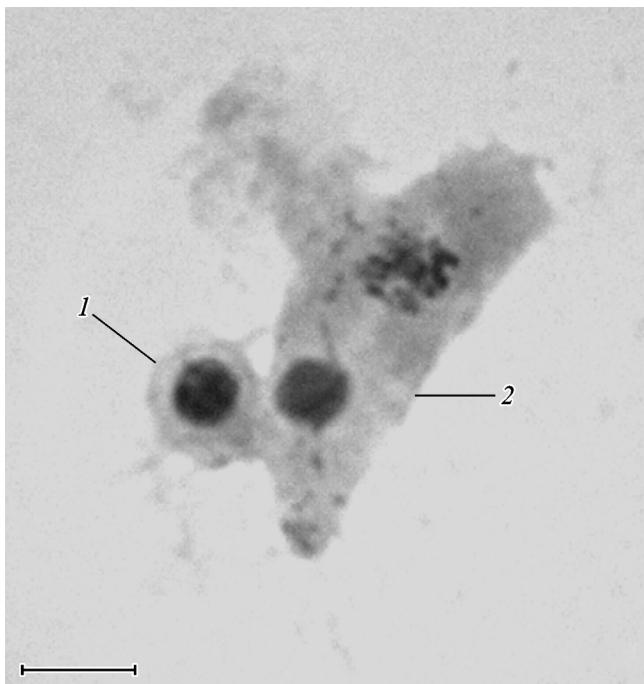


Рис. 1. Гемобласт асцидии *Halocynthia aurantium*, окрашенный гематоксилином-эозином.

1 — гемобласт, 2 — макрофагоподобная клетка. Здесь и на всех рисунках: об. 100×; масштабный отрезок — 5 мкм.

пензии гемоцитов наносили на стекла Culture Slides BD Falcon™ (Becton Dickinson, США) и инкубировали во влажной камере 1.5 ч при 4 °C. Затем избавлялись от неосевших клеток путем отмычки в искусственной морской воде. Осевшие клетки фиксировали 4%-ным формалином (Нева-Реактив, Россия), отмывали в дистиллированной воде и высушивали. Препараты окрашивали по Май-Грюнвальду, Гейденгайну, Маллори, толуидиновым синим и гематоксилином-эозином. Окрашивание проводили по стандартным методикам с небольшими модификациями (Пирс, 1962; Лилли, 1969).

Для окраски по методу Мая-Грюнвальда препараты помещали в 0.3%-ный раствор эозин-метиленового синего на метиловом спирте (ОАО Реактив, Россия) на 1 мин. Затем раствор разбавляли в 2 раза дистиллированной водой и окрашивали еще 20 мин с последующей отмычкой, высушиванием и заключением в Даммарлак.

При окраске по методу Гейденгайна препараты помещали в 0.1%-ный водный раствор азокармина на 15 мин при 58 °C, затем вынимали и давали остыть в течение 15 мин при комнатной температуре. После охлаждения и споласкивания в дистиллированной воде проводили дифференцировку в анилиновом спирте (0.1 мл анилинового масла на 100 мл 90%-ного спирта) до четкого выявления

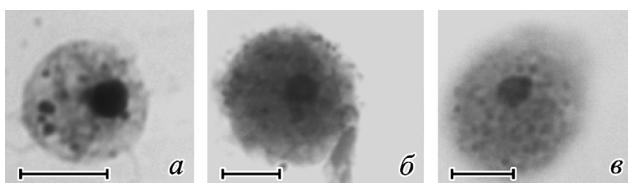


Рис. 2. Гранулоциты асцидии *Halocynthia aurantium*, окрашенные по Май-Грюнвальду (а), Гейденгайну (б) и гематоксилином-эозином (в).

ядер. Затем препараты промывали в 1%-ном уксуснокислом спирте для прекращения дальнейшей дифференцировки и инкубировали в 5%-ном водном растворе фосфорно-вольфрамовой кислоты в течение 2 ч. После споласкивания дистиллированной водой приступали к окраске анилиновым синим оранжем в 1%-ной уксусной кислоте, которую проводили при комнатной температуре в течение 45 мин. По завершении окрашивания производили быстрое споласкивание в дистиллированной воде и дифференцировку в 96%-ном спирте с последующей проводкой через изобутиловый спирт, ксилол и заключали в Даммарлак.

При окраске по методу Маллори использовали 3 основных раствора: 0.1%-ный водный раствор кислого фуксина, 1%-ный раствор фосфорно-молибденовой кислоты и смесь, состоящую из 0.5 г анилинового синего, 2 г оранжа, 2 г щавелевой кислоты и 100 мл дистиллированной воды. Сначала препараты помещали в раствор кислого фуксина на 5 мин, затем промывали в дистиллированной воде и переносили в раствор фосфорно-молибденовой кислоты на 5 мин. После споласкивания препараты переносили в смесь растворов анилинового синего и оранжа на 10 мин. По завершении окрашивания препараты промывали дистиллированной водой и дифференцировали в 96%-ном спирте.

Для окраски толуидиновым синим препараты помещали на 5 мин в 0.1%-ный раствор толуидинового синего на 30%-ном этаноле. По завершении окрашивания дифференцировали в 30%-ном спирте и переносили в 2%-ный водный раствор молибдата аммония на 5 мин. Затем препараты промывали в дистиллированной воде в течение 2 мин и проводили через гистологическую батарею, включавшую в себя 70 и 96%-ный этанол, изобутиловый спирт и ксилол, с последующим заключением в Даммарлак.

При окрашивании гематоксилином-эозином препараты помещали в раствор гематоксилина Майера на 10 мин, промывали в проточной воде 10 мин, окрашивали 0.1%-ным водным раствором эозина 5 мин, обезвоживали и заключали в Даммарлак.

Полученные препараты просматривали в световом микроскопе Leica DM 6000B, фотографировали с помощью фотокамеры Leica DFC. Для каждого препарата фотографировали более 20 полей зрения при увеличении объектива 40× или 100× с масляной иммерсией.

## Результаты

Установлено, что у асцидии *Halocynthia aurantium* в циркулирующей жидкости встречается 5 основных популяций гемоцитов. К ним относятся гемобlastы, гранулоциты, гиалиновые амебоциты, макрофагоподобные и моруллярные клетки. Сферические гемобlastы представляют собой наименее дифференцированные клетки с крупным ядром и небольшим количеством резко базофильной цитоплазмы (рис. 1). Они не окрашиваются витальными красителями и, судя по морфологии, не проявляют амебоидной активности. Лишь изредка можно наблюдать клетки с псевдоподиями, которыми они прикрепляются к субстрату или к другим клеткам.

К гранулоцитам *H. aurantium* были отнесены сравнительно мелкие клетки диаметром около 8 мкм (рис. 2). Они характеризуются светлой цитоплазмой и содержат круглые или овальные гранулы размером около 0.5 мкм.

У части клеток материал гранул резко азурофилен и окрашивается по Май-Грюнвальду в темно-малиновый цвет. При окрашивании по Гейденгайну часть клеток приобретает интенсивное синее окрашивание цитоплазмы с более многочисленными и мелкими гранулами. При окрашивании гематоксилином-эозином при центральном положении ядра в цитоплазме выявляется множество мелких эозинофильных гранул. Дифференциальное окрашивание гранулоцитов разными красителями указывает как минимум на гетерогенность их гранул либо на гетерогенность самой популяции гранулоцитов. В клетках с небольшим числом гранул, вероятно представляющих собой более молодые формы, ядра крупные и более светлые, чем в других, более зрелых клетках, в которых мелкие ядра часто лежат ацентрически и содержат конденсированный хроматин.

Гиалиновые амебоциты — многочисленный тип клеток гемолимфы асцидий (рис. 3). Они обладают компактным ядром и значительным объемом цитоплазмы, занимающим большую площадь при распластывании клетки. Живые клетки в циркулирующей гемолимфе имеют шаровидную форму, однако *ex vivo* они быстро активируются и выпускают длинные тонкие псевдоподии (рис. 3, а). Оседая на стекло, они принимают веретеновидную или отростчатую форму и переходят к амебоидному движению (рис. 3, б). Гиалиновые амебоциты, вероятно, могут передвигаться, выпуская широкую псевдоподию с волнистым ведущим краем (рис. 3, а). Цитоплазма этих клеток окрашивается базофильно при использовании метода Май-Грюнвальда. При окраске по методу Маллори цитоплазма окрашивается голубым цветом, и в ней выделяются небольшие гранулы фиолетового цвета. По форме, размерам и окраске эти гранулы очень сходны с гранулами, найденными у макрофагоподобных клеток (рис. 4). Наличие переходных форм, сходство гранулярных включений и высокая амебоидная активность этих клеток являются основанием для предположения о том, что гиалиновые амебоциты представляют собой начальные этапы развития макрофагоподобных клеток.

Макрофагоподобные клетки являются основными фагоцитами асцидий (рис. 4). Они характеризуются наличием разноразмерных фагосом и псевдоподий, часто способных сильно вытягиваться, формируя фестончатый край (рис. 4, в). Количество и размер фагосом очень варьирует между клетками. Нередко фагоциты содержат в фагосомах другие гемоциты (рис. 4, в). В некоторых случаях в одном фагоците может содержаться сразу несколько гемоцитов. В фагоцитах часто находят круглые гранулы, расположенные главным образом перинуклеарно (рис. 4, а, б). Гранулы могут быть как видоизмененными лизосомами, так и остатками переваренного материала. При использовании метода окраски по Маллори эти гранулы видны гораздо отчетливее и окрашиваются в фиолетовый цвет. Если фагосомы маленького размера, а их общее количество невелико, фагоцит обычно хорошо распластывается на стекле.

Морулярные клетки — последний морфотип гемоцитов, обнаруженный у *H. aurantium*, — обычно округлой формы и содержат несколько больших вакуолей (рис. 5). Размер и количество вакуолей, по-видимому, зависят от стадии созревания морулярной клетки, которая практически не способна к распластыванию, чemu препятствуют большой размер и плотность вакуолей. Однако часть морулярных клеток, скорее всего, освобождается от содержимого вакуолей и приобретает умеренную спо-

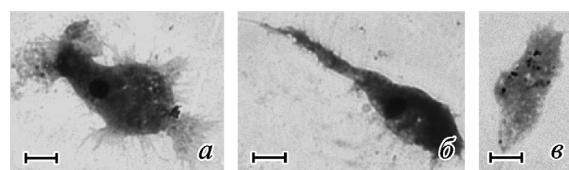


Рис. 3. Гиалиновые амебоциты асцидии *Halocynthia aurantium*, окрашенные по Май-Грюнвальду (а, б) и Маллори (в).

собность распластываться на стекле. При каждой использованной окраске (рис. 5) выявлялись как морулярные клетки с плотными вакуолями, так и клетки со светлым или прозрачным содержимым. На рис. 5, а, б представлены морулярные клетки, окрашенные по Май-Грюнвальду. Ядро окрашивается базофильно и чаще всего лежит ацентрично. Содержимое вакуолей окрашено резко окси菲尔но, при этом на рис. 5, а видно, что часть вакуолей при выделении и сопровождающей активации теряет свое содержимое и становится бесцветной. При окраске по Гейденгайну (рис. 5, в, г) также выявляются как частично распластанные клетки с прозрачными вакуолями, так и совсем нераспластанные морулярные клетки с плотным содержимым вакуолей. При окрашивании толуидиновым синим вакуоли приобретают зеленый цвет. На рис. 5, е изображена морулярная клетка с одной-единственной вакуолью. Некоторые исследователи выделяют такие клетки в отдельный тип, называя их перстневидными клетками. Причины зеленого окрашивания морулярных клеток остаются не вполне ясными. Представляется вероятным, что зеленое окрашивание содержимого гранул является следствием так называемой зеленой метахромазии, характерной для структур с высокой концентрацией *o*-дифенольных соединений, например тунихрома (Ramalingam, Ravindranath, 1970; Чага, 1998а).

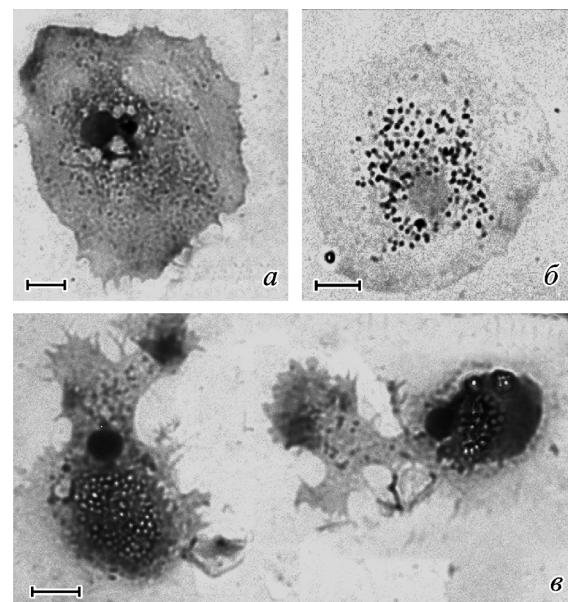


Рис. 4. Макрофагоподобные клетки асцидии *Halocynthia aurantium*, окрашенные по Май-Грюнвальду (а, в) и Маллори (б).

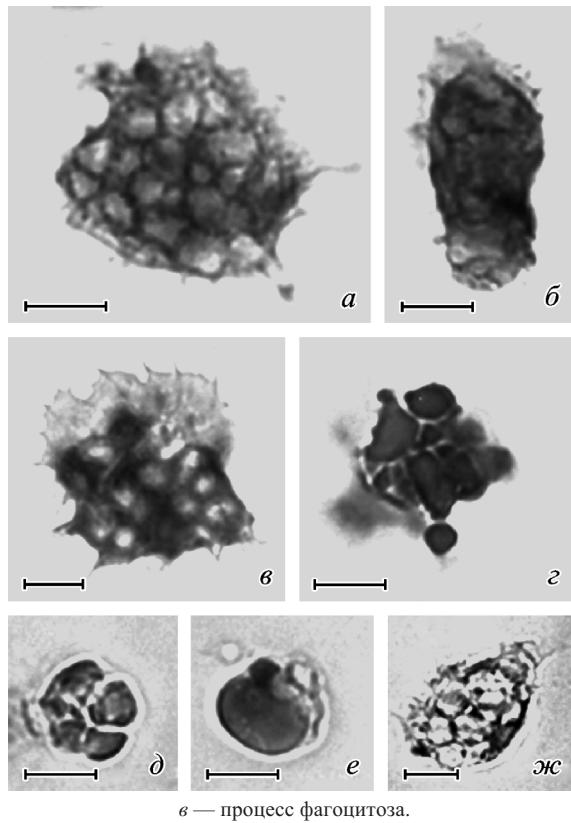


Рис. 5. Морулярные клетки асцидии *Halocynthia aurantium*, окрашенные по Май-Грюнвальду (а, б), Гейденгайнут (в, г) и толуидиновым синим (д—ж).

## Обсуждение

В результате проведенного исследования гемоцитов асцидии *Halocynthia aurantium* показано присутствие как минимум пяти основных типов клеток, которые морфологически совпадали с типами гемоцитов других видов асцидий: гемобластами, гранулоцитами, гиалиновыми амебоцитами, макрофагоподобными и морулярными клетками (Smith, Peddie, 1992; Shirae, Saito, 2000; Fuke, 2001; Hirose et al., 2003; Parrinello et al., 2007). В ходе работы у *H. aurantium* не было обнаружено пигментных клеток, присутствие которых характерно для колониальных асцидий (Hirose et al., 2003). При этом фагоциты *H. aurantium* были представлены двумя различными популяциями — гиалиновыми амебоцитами и макрофагоподобными клетками. Не исключено, что эти популяции могут представлять собой один тип клеток, но на разных стадиях развития (Горышнина, Чага, 1990).

Гемобlastы асцидии *H. aurantium* морфологически почти не отличаются от гемобластов других видов асцидий: высокое ядерно-цитоплазматическое отношение и маленькие размеры, редко превышающие 5 мкм, что является характеристикой гемобластов всех оболочников (Hirose et al., 2003). Нельзя не обратить внимания на морфологическое сходство гемобластов асцидий с лимфоцитами млекопитающих, многие авторы даже называют гемобласты именно лимфоцитоподобными клетками (Fuke, 2001; Khalturin et al., 2003). Однако остается неясным, ограничивается ли их сходство только морфологическими характеристиками. На вероятную камбиальную функцию гемобластов асцидий в своих работах указывал За-

варзин (1953). При этом Заварзин чаще использовал термин «гемоцитобласт» для описания оседлых клеток, собранных в узелки или тяжи, которые располагаются на соединительной ткани в различных участках тела. Вопрос о пролиферации циркулирующих потомков гемоцитобластов до настоящего времени не решен. Чага (1998а, 1998б) доказывал возможность пролиферации циркулирующих гемоцитов асцидий *Molgula citrina* и *Styela rustica* с использованием метода авторадиографии после введения животным тимидиновой метки. В своих работах он указывал, что гемобласти являются единственными активно пролиферирующими клетками. Однако результаты использования метода авторадиографии в свете современных данных не могут использоваться в качестве решающего аргумента для доказательства пролиферации циркулирующих клеток у беспозвоночных и низших хордовых. Фактически речь идет о попытке обнаружения циркулирующих стволовых клеток у асцидий — животных с низким уровнем тканевой дифференцировки и вторично незамкнутой кровеносной системой — на основании результатов использования авторадиографии. Вопрос о наличии циркулирующих стволовых клеток у беспозвоночных и низших хордовых не решен до настоящего времени (Одинцова, 2001).

В то же время Максимов еще в 1909 г. приписал клеткам с морфологией лимфоцитов камбиальную функцию для всех клеток крови, расширяя ее также на все соединительные ткани и фактически ставя знак равенства между лимфоцитами и стволовыми клетками (Maximow, 1909). Тем не менее пролиферация циркулирующих клеток, не связанных с субстратом, представляется неочевидной и требует подтверждения с использованием более современных методов. Не исключено, что оболочки являются как раз той самой уникальной группой, на примере которой возможно проведение анализа становления системы циркулирующих стволовых клеток хордовых, механизмы функционирования которой у асцидий могут не вполне соответствовать результатам исследований, полученных на млекопитающих.

Размеры гранулоцитов *H. aurantium* мало отличаются от размеров гранулоцитов других видов асцидий. Однако содержание гранул в гранулоцитах *H. aurantium* относительно небольшое по сравнению с колониальной асцидией *Botryllus primigenus*, у которой вся цитоплазма этих клеток заполнена гранулами (Hirose et al., 2003). Что касается размера самих гранул, то у *H. aurantium* он не превышает 0.5 мкм, у других видов асцидий гранулы также малы и варьируют в своих размерах от 0.4 мкм в диаметре у *B. primigenus* до 1 мкм у *B. fuscus*. Также стоит отметить, что гранулы у асцидии *H. aurantium* круглой формы, тогда как в гранулоцитах других видов встречаются гранулы эллипсоидной формы (Hirose et al., 2003). Полученные результаты также позволяют предполагать либо разнородный состав гранул этих клеток, либо неоднородность самой популяции гранулоцитов, которые могут быть как разными линиями дифференцировки клеток с различными функциями, так и стадиями созревания единой популяции гранулоцитов у асцидии *H. aurantium*.

Морулярные клетки являются основным типом циркулирующих клеток. Клетки содержали как заполненные плотным содержимым, так и оптически-пустые, светлые вакуоли. Наличие пустых вакуолей представляется не до конца понятным. Тем не менее имеются данные об участии содержимого вакуолей в защитных реакциях, так как морулярные клетки в своих вакуолях содержат компо-

ненты фенолоксидазной системы (Lipari et al., 1995; Cammarata et al., 1997). В целом морулярные клетки *H. aurantium* подходят под общее описание этого морфотипа клеток у всех асцидий: их размер обычно не превышает 15 мкм в диаметре, а большие вакуоли в среднем имеют около 2 мкм в диаметре. Существенно, что при окраске толуидиновым синим вакуоли именно морулярных клеток формировали нехарактерное для данного красителя зеленое окрашивание (рис. 5). Эта метахромазия может иметь двоякую природу. С одной стороны, возможно сложение синего цвета красителя с желто-песочным цветом пигмента, содержащегося в вакуолях, с переходом к видимому зеленому цвету. Однако более вероятной природой этого эффекта представляется формирование зеленой окраски под влиянием фенольных соединений типа танинхрома, входящих в состав субстрата для развития фенолоксидазной реакции (Ramalingam, Ravindranath, 1970; Чага, 1998а). Последнее предположение представляется более вероятным, принимая во внимание несомненное участие морулярных клеток в reparации поврежденной туники, механическая прочность и жесткость которой обеспечиваются как раз реакцией фенольного задубливания, очень характерной для всех беспозвоночных и низших хордовых животных.

К морулярным клеткам по ходу работы были отнесены перстневидные клетки, которые некоторыми исследователями выделяются в отдельный тип клеток (Smith, Peddie, 1992; Parinello et al., 1996; Brown et al., 2009). Однако представляется более вероятным, что перстневидные клетки являются разновидностью либо ранней стадией развития морулярных клеток, содержащих одну большую вакуоль. Это положение подтверждается как зеленой метахромазией при окрашивании толуидиновым синим, так и результатами проточной цитометрии, согласно которым перстневидные клетки всегда входили в состав облака морулярных клеток, не давая никаких оснований для отделения этой группы клеток в самостоятельную популяцию (даные не приведены).

К фагоцитам у асцидии *H. aurantium* можно отнести 2 типа клеток — гиалиновые амебоциты и макрофагоподобные клетки (рис. 3, 4). Однако наличие переходных форм, сходство гранул по размерам, окрашиванию и составу (последнее — на основании данных из литературы (Ballarin, Cima, 2005)), равно как и высокая амебоидная активность этих клеток, являются вескими основаниями для гипотезы о единстве популяций гиалиновых амебоцитов и макрофагоподобных клеток.

На основании полученных в настоящей работе и литературных данных можно предполагать, что гиалиновые амебоциты являются промежуточной стадией между гемобластами и макрофагоподобными клетками. С этой гипотезой хорошо согласуются данные, согласно которым лимфоцитоподобные клетки (гемобlastы) являются клетками-предшественниками для гиалиновых амебоцитов и гранулярных амебоцитов (гранулоцитов). При этом гиалиновые амебоциты могут давать начало макрофагоподобным клеткам, а гранулярные амебоциты — морулярным клеткам (Ballarin, Cima, 2005). Однако второе предположение является весьма спорным, поскольку структура гранул морулярных клеток и гранулоцитов не имеет ничего общего (рис. 2, 5).

В работах Чаги (1998а, 1998б), выполненных на одиночной асцидии Белого моря *Styela rustica*, также выдвигается гипотеза о родстве гиалиновых амебоцитов и макрофагоподобных клеток и предполагается, что макрофаго-

подобные клетки являются конечной стадией жизненного цикла гиалиновых амебоцитов. Высокая амебоидная подвижность и фагоцитарная активность этих клеток дают основание полагать, что гиалиновые амебоциты и макрофаги — это самостоятельные линии клеток, специализированных на распознавании и поглощении инородных частиц (Чага, 1998а). Тем не менее вопрос о гистогенезе циркулирующих гемоцитов асцидий, о наличии циркулирующих камбиальных элементов и возможности их пролиферации у интактных животных и в ответ на тканевое повреждение остается открытым.

Таким образом, у одиночной асцидии Японского моря *H. aurantium* установлено наличие пяти морфотипов циркулирующих гемоцитов, сходных с типами гемоцитов, описанных для других одиночных и колониальных оболочников: гемобластов, гранулоцитов, гиалиновых амебоцитов, макрофагоподобных и морулярных клеток. Если для гемобластов есть основания предполагать их камбиальную функцию, то гистогенетическое родство гиалиновых амебоцитов и макрофагоподобных клеток, анализ их функций, а также другие аспекты происхождения и дифференцировки гемоцитов асцидий как относительно простой модели гемопоэза у низших хордовых требуют проведения дальнейших исследований с использованием новых методических подходов.

Работа выполнена при финансовой поддержке С.-Петербургского государственного университета (проект 1.38.80.2012) и ДВО РАН (проект 12-І-П7-05) и грантом Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских учреждениях высшего профессионального образования № 11.G34.31.0010.

## Список литературы

- Горышина Е. Н., Чага О. Ю. 1990. Сравнительная гистология тканей внутренней среды с основами иммунологии. М.: Изд-во Ленинград. ун-та. 320 с.
- Заварзин А. А. 1953. Очерки эволюционной гистологии крови и соединительной ткани. Избр. труды. М.; Л.: Изд-во АН СССР. 4. 720 с.
- Лилли Р. 1969. Патологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир. 648 с.
- Одинцова Н. А. 2001. Основы культивирования клеток морских беспозвоночных. Владивосток: Дальнаука. 162 с.
- Пирс Э. 1962. Гистохимия. М.: Изд-во иностр. лит-ры. 964 с.
- Чага О. Ю. 1998а. Клетки крови асцидии *Styela (Goniocarpa) rustica*. I. Гистологический анализ. Цитология. 40 (1): 31—44.
- Чага О. Ю. 1998б. Клетки крови асцидии *Styela (Goniocarpa) rustica*. II. Цитохимический анализ. Цитология. 40 (1): 45—57.
- Ballarin L., Cima F. 2005. Cytochemical properties of *Botryllus schlosseri* haemocytes: indications for morpho-functional characterization. Eur. J. Histochem. 49 : 255—264.
- Brown F. D., Keeling E. L., Le A. N., Swalla B. J. 2009. Whole body regeneration in a colonial ascidian, *Botrylloides violaceus*. J. Exp. Zool. 312 : 885—900.
- Cammarata M., Arizza V., Parrinello N. 1997. Phenoloxidase-dependent cytotoxic mechanism in ascidian (*Styela plicata*) hemocytes active against erythrocytes and K562 tumor cells. Eur. J. Cell Biol. 74 : 302—307.
- Fuke M. 2001. Cell types involved in allogeneic contact reactions of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. Zool. Sci. 18 : 195—205.

- Fuke M., Fukumoto M. 1993. Correlative fine structural, behavioral and histochemical analysis of ascidian blood cells. *Acta Zool.* 74 : 61—71.
- Hirose E., Shirae M., Saito Y. 2003. Ultrastructures and classification of circulating hemocytes in 9 Botryllid ascidians (Chordata: Ascidiacea). *Zool. Sci.* 20 : 647—656.
- Khalurin K., Becker M., Rinkevich B., Bosch T.C. 2003. Urochordates and the origin of natural killer cells: identification of a CD94/NKR-P1-related receptor in blood cells of *Botryllus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 : 622—627.
- Lipari L., Cammarata M., Arizza V., Parrinello D. 1995. Cytotoxic activity of *Styela plicata* hemocytes against mammalian cell targets: I. Properties of the *in vitro* reaction against erythrocytes. *Anim. Biol.* 4 : 131—137.
- Maximow A. 1909. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. (Demonstrationsvortrag, gehalten in der ausserordentlichen Sitzung der Berliner Hamatologischen Gesellschaft am 1. Juni 1909). *Folia Haematologica.* 8 : 125—134.
- Parrinello N., Arizza V., Cammarata M., Giaramita F., Pergolizzi M., Vazzana M. 2007. Inducible lectins with galectin properties and human IL1 $\alpha$  epitopes opsonize yeasts in the ascidian *Ciona intestinalis* inflammatory response. *Cell Tissue. Res.* 329 : 379—390.
- Parrinello N., Arizza V., Chinnici C., Parrinello D., Cammarata M. 2003. Phenoloxidases in ascidian hemocytes: characterization of the prophenoloxidase activating system. *Comp. Biochem. Physiol. B* 135 : 583—591.
- Parinello N., Cammarata M., Arizza V. 1996. Univacuolar refractile hemocytes from the tunicate *Ciona intestinalis* are cytotoxic for mammalian erythrocytes *in vitro*. *Biol. Bull.* 190 : 418—425.
- Ramalingam K., Ravindranath M. 1970. Histochemical significance of green metachromasia to toluidine blue. *Histochemie.* 24 : 322—327.
- Rowley A. F. 1981. The blood cells of the sea squirt, *Ciona intestinalis*: morphology, differential counts and *in vitro* phagocytosis activity. *J. Invert. Pathol.* 37 : 91—100.
- Shirae M., Saito Y. 2000. A comparison of hemocytes and their phenoloxidase activity among botryllid ascidians. *Zool. Sci.* 17 : 881—891.
- Smith V. J., Peddie C. M. 1992. Cell cooperation during host defense in the solitary tunicate *Ciona intestinalis* (L.). *Biol. Bull.* 183 : 211—219.

Поступила 30 VIII 2012

#### MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF HEMOCYTES OF ASCIDIAN *HALOCYNTHIA AURANTIUM*

A. N. Sukhachev,<sup>1</sup> I. S. Dyatchkov,<sup>1</sup> D. S. Romanyuk,<sup>1</sup> V. V. Kumeyko,<sup>3, 4</sup> V. F. Sinitina,<sup>2</sup>  
E. D. Korolkova,<sup>2</sup> A. D. Kharazova,<sup>2</sup> A. V. Polevschikov<sup>1—3,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Experimental Medicine of North-West Branch of RAMS, St. Petersburg,

<sup>2</sup> Department of Cytology and Histology, St. Petersburg State University,

<sup>3</sup> Biomedical School, Far Eastern Federal University

and <sup>4</sup> A. V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology RAS, Vladivostok

\* e-mail: alexpiol512@yandex.ru

The current paper is devoted to the investigation of ascidian circulating hemocytes populations which are used as an example of blood cell specialization in the lower Chordates. Work has been performed on a solitary ascidian *Halocynthia aurantium* from the Japanese Sea. Using light microscopy and histiochemistry, we have identified five main populations of circulating hemocytes (hemoblasts, granulocytes, hyaline amoebocytes, macrophage-like and morula cells), which are typical of all tunicates. Pigment cells were not revealed. The possible pathway of circulating cells differentiation is assumed.

**Key words:** ascidia, hemocytes, morphological analysis.