

КЛЕТОЧНАЯ ЗАЩИТНАЯ СИСТЕМА ЛИЧИНОК НЕКОТОРЫХ СИНАНТРОПНЫХ МУХ, ОБИТАЮЩИХ В БАКТЕРИАЛЬНО-АГРЕССИВНОЙ СРЕДЕ

© Т. В. Кинд

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

Исследованы гемоцитарный состав и защитная реакция гемоцитов 4 семейств мух — *Tabanidae*, *Syrphidae*, *Muscidae* и *Sarcophagidae*, личинки которых обитают в бактериально-агрессивной среде. Наименьшее количество типов гемоцитов выявлено у *Tabanidae* и *Syrphidae* — прогемоциты, плазматоциты и профенолоксидазосодержащие нестабильные гиалиновые клетки (эноцитойды). У *Sarcophaga crassipalpis* и *Musca domestica* к этому набору добавляются еще тромбоцитоиды или подоцитоподобные клетки. На стадии пупария у *Sarcophaga* в гемолимфе выявляется новое поколение прогемоцитов, формирующих небольшие округлые и веретенновидные гиалиновые клетки. Характерных для *Calliphoridae* ювенильных плазматоцитов ни у одного из представителей исследованных семейств не обнаружено. Среди гемоцитов одного типа также имеют место значительные вариации. Особенно это касается нестабильных гиалиновых клеток. У *Sarcophagidae* и *Tabanidae* они заполнены крупными глыбками, но если у личинок серых мясных мух глыбки после выделения гемолимфы быстро распадаются и содержимое клеток выходит в гемолимфу, то у слепней они могут оставаться неизменными на протяжении нескольких часов. У *Muscidae* и *Syrphidae* выброс профенолоксидазы происходит еще раньше, и клетки обладают пикнотическими ядрами и сетью мелких гранул в очень светлой жидкой цитоплазме.

Тромбоцитоиды у комнатной мухи представлены крупными плоскими часто безъядерными клетками, «голыми» ядрами и фрагментами цитоплазмы, а на стадии опустошения зоба — крупными безъядерными клетками с веерообразными выростами. Плазматоциты у всех исследованных видов являются клетками с филоподиями. У личинок они содержат катаболические включения, а у куколок — фрагменты апоптотных тканей. Очищение гемолимфы от чужеродных частиц у *Sarcophagidae* и *Muscidae* осуществляется тромбоцитоидами, а у *Tabanidae* — плазматоцитами при помощи образования нодул. Особое место занимает защитная реакция личинок *Syrphidae*, когда инъекция частиц угля приводит к полному исчезновению всех типов гемоцитов. Таким образом, представители различных семейств высших двукрылых могут успешно использовать различные механизмы клеточного иммунитета.

Ключевые слова: *Sarcophagidae*, *Muscidae*, *Tabanidae*, *Syrphidae*, клеточный иммунитет, гемоциты, фагоцитоз, инкапсуляция, нодуляция.

Двукрылые являются одним из самых преуспевающих, распространенных и быстро эволюционирующих отрядов насекомых. Подобно успеху способствует и высокоорганизованная защитная система неспецифического иммунитета, защищающая двукрылых от бактериальных и паразитических инвазий. Личинки двукрылых могут обитать в чрезвычайно бактериально-агрессивной среде, такой как фекалии, разлагающиеся животные и растительные остатки, гниющий мусор. Естественно, существует очень эффективный первый уровень защиты в виде кутикулы и перитрофической мембраны, не позволяющий инфекции проникнуть в полость тела. Однако при начале пупаризации и запуске апоптоза тканей кишечника многие бактерии способны попадать непосредственно в гемолимфу. Для их элиминации могут быть задействованы две системы врожденного иммунитета — гуморальная и клеточная. В клеточные механизмы входят фагоцитоз, образование нодул, морул и инкапсуляция. Фагоцитоз, считающийся первым барьером против пато-

генов, очищает гемолимфу от многих биологических (Ratcliffe, Rowley, 1979; Götz, Boman, 1985; Ratcliffe et al., 1985; Ratcliffe, 1986) и небактериальных (Slovák et al., 1991; Wiesner, 1991, 1992) агентов. Если в гемолимфу проникает значительное количество чужеродных частиц, они изолируются скоплениями гемоцитов, называемых нодулами, иногда меланизированными (Ratcliffe, Rowley, 1979; Lackie, 1980). Инкапсуляция осуществляется в том случае, если чужеродный материал слишком велик для фагоцитоза. В реакции инкапсуляции задействованы как клеточный, так и гуморальный факторы (Götz, Vey, 1987; Götz et al., 1987; Rizki, Rizki, 1987). Для гемоцитов, осуществляющих фагоцитоз и нодуляцию, могут быть проведены тесные параллели между представителями различных отрядов насекомых (Gupta, 1979; Ribeiro, Brehelein, 2006). Что же касается клеток, участвующих в инкапсуляции чужеродных частиц, их морфология и динамика заметно различаются не только у представителей различных отрядов, но и у подотрядов длинноусых и ко-

роткоусых двукрылых и более того, у видов, относящихся к высшим круглошовным мухам. Так, у личинок *Drosophila*, являющихся модельным объектом для исследования различных аспектов иммунитета насекомых, основным клеточным элементом для образования капсул служат ламеллоциты, уплощенные клетки, формирующие монослой вокруг яиц паразитических перепончатокрылых или иных чужеродных объектов (Eslin, Prevost, 1998; Meister, Lagueux, 2003). В то же время у многих мух в гемолимфе обнаружены тромбоцитоиды — уникальные клетки, цитоплазма которых распадается на небольшие безъядерные фрагменты и «голые» ядра. Они выполняют ту же функцию, что и ламеллоциты у *Drosophila*, а именно инкапсулируют чужеродные объекты (Zachary, Hoffmann, 1973; Zachary et al., 1975; Кинд, 2003, 2007, 2012). Но этим значение тромбоцитоидов не ограничивается. Они способны поглощать и более мелкие объекты (величиной менее 1 мкм), что говорит об их участии не только в изоляции яиц паразитических перепончатокрылых, но и в фагоцитозе (Кинд, 2005). На всех этапах развития тромбоцитоиды были выявлены только у *Calliphora*. У других видов мух (*Stomoxys calcitrans*, *Lucilia sericata*, *Glossina austeni* и *G. morsitans*) тромбоцитоиды обнаружены на единственно исследованной стадии — имаго (Каауа, Ratcliffe, 1982). В то же время у личинок и молодых пупариев мухи *Sarcophaga bullata* из близкого к калифоридам семейства саркофагид под названием многоядерных гранулярных гемоцитов описаны, судя по иллюстрациям, именно эти клетки (Whitten, 1964). Для уточнения распространенности тромбоцитоидов среди разных семейств двукрылых и их роли в защитной реакции личинок мух было проведено исследование гемоцитарного состава гемолимфы личинок серой мясной мухи *Sarcophaga crassipalpis* (*Sarcophagidae*), домашней мухи *Musca domestica* (*Muscidae*), слепня-дождевки *Haematopota pluvialis* (*Tabanidae*) и журчалки *Helophilus trivittatus* (*Syrphidae*).

Материал и методика

Условия выращивания. Личинки серой мясной мухи *S. crassipalpis* петергофской популяции выкармливали на свиных почках при 15 °С. После прекращения питания блуждающие личинки переносили на опилки, где и происходила пупаризация. Диапаузируют пупарии, продолжительность реактивации порядка 3 мес при 5 °С, вылетевшие имаго созревают через 10—15 сут при 25 °С на углеводно-белковой диете. Откладку личинок проводили на кусочки почки.

Личинки комнатной (домашней) мухи *M. domestica* выкармливали на увлажненном гранулированном корме для форели при 25 °С вплоть до пупаризации. Для исследования фагоцитарной активности гемоцитов личинки переносили с целью замедления развития в 20 °С.

Для разведения слепней-дождевок *H. pluvialis* использовали емкости с водой, в которую были добавлены конский навоз и срезанные сорняки. Самки слепней откладывали яйца на помещенные сверху листья лопуха. Возраст личинок определяли при периодическом взятии проб гниющего настоя.

Культуру журчалок *H. trivittatus* вели по той же методике, но без добавления навоза. Перед пупаризацией личинки дождевок и журчалок покидают воду и перебираются на стенки емкостей или лежащие сверху листья.

Пробы гемолимфы исследовали под микроскопом с использованием дифференциально-интерференционного контраста (ДИК) по Номарскому (объектив 40×). Эта методика позволяет получить прижизненные барельефные полихромные изображения клеток и ряда клеточных структур, включая ядра, ядрышки и вакуоли. Она очень удобна для распознавания отдельных типов гемоцитов и для анализа их состояния в процессе функционирования. В каждом варианте использовали по 2 временных препарата гемолимфы. Капли гемолимфы, взятые после прокола в передних сегментах 2—5 личинок, смешивали на предметном стекле и немедленно исследовали под микроскопом Jenamed (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Изображения монослоя гемоцитов получали с использованием цифровой видеокамеры Digital CDSP, программ iuVCR и Adobe Photoshop.

Для изучения реакции гемоцитов на посторонние частицы проводили инъекции отстоянной взвеси мелкорастертого активированного угля в физиологическом растворе. Через различное время после инъекции (от 1 мин до 48 ч) пробы гемолимфы исследовали под микроскопом с использованием ДИК. Применение этой методики позволяет наиболее корректно оценивать морфологию гемоцитов у разных видов и сравнивать их защитную реакцию на появление чужеродных частиц.

Результаты

В гемолимфе питающихся личинок *Sarcophaga crassipalpis* (*Sarcophagidae*) видны кластеры (иногда очень крупные) прогемоцитов диаметром 8—9 мкм (рис. 1, а). Гиалиновые клетки представлены в основном стабильными клетками (протромбоцитоидами) со слабо выраженным ядром и гомогенной или слабогранулированной цитоплазмой, в ряде случаев отслаивающейся по периферии (рис. 1, б). В свободной гемолимфе присутствуют также тромбоцитоиды в виде филаментов или длинных цитоплазматических тяжей. Вторым типом гиалиновых клеток являются крупные (35×60 мкм) округлые или овальные нестабильные клетки с заполненной глыбками цитоплазмой (профенолоксидазосодержащие клетки) (рис. 1, в). Нестабильные гиалиновые клетки после выделения гемолимфы быстро распадаются с выбросом цитозола в гемолимфу. От клетки после распада остается только «скелет» или «тень» (рис. 1, а). Помимо вышеуказанных, иных типов гемоцитов в гемолимфе не обнаруживается. Ювенильные плазматочиты, столь характерные для *Calliphora* (Кинд, 2003; Тулин, Чага, 2003), отсутствуют. Перед окончанием питания начинается подготовка к дифференцировке плазматочитов. Кластеры разрыхляются, и прогемоциты, отделяясь от них, выходят в гемолимфу. После прекращения питания в плазматочитах становятся заметными липидные или липопротеиновые катаболические включения (рис. 1, в, з). По мере опустошения зоба плазматочиты увеличиваются в размерах и число включений в них заметно возрастает. Параллельно наблюдается выброс в гемолимфу новых кластеров прогемоцитов, что приводит к значительному увеличению общего количества клеток. У зрелых блуждающих личинок, готовящихся к пупаризации, происходит дальнейшая дифференцировка плазматочитов, и они переходят в фазу II, увеличиваясь в размерах до 15—20 мкм и заполняясь включениями, которые маскируют ядро (рис. 2, д). Количество крупных гиалиновых клеток резко сокращается,

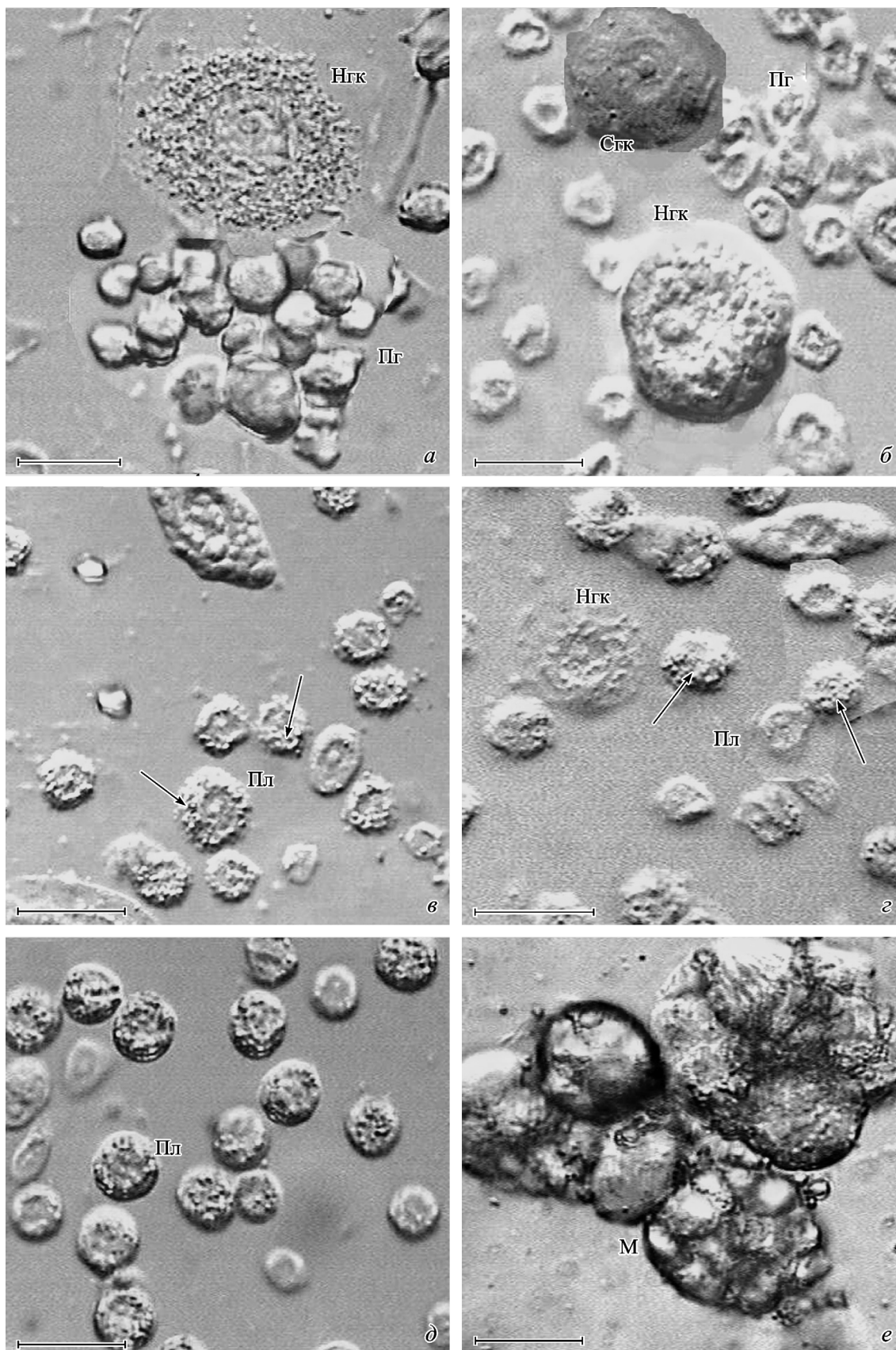


Рис. 1. Гемоциты в гемолимфе личинок и молодых пупариев *Sarcophaga crassipalpis*.

a — питающиеся личинки; видны крупный кластер прогемоцитов и распающаяся нестабильная гиалиновая клетка. *б* — гемоциты личинки в конце периода питания; видны прогемоциты в кластере и свободно лежащие в гемолимфе стабильная и нестабильная гиалиновые клетки. *в* — гемоциты опустошившей зоб личинки; в плазматоцитах начинают накапливаться катаболические включения (*стрелки*). *г* — блуждающая личинка через 2 сут после опустошения зоба; нестабильная гиалиновая клетка и плазматоциты с катаболическими включениями (*стрелки*). *д* — личинка перед началом пупаризации; плазматоциты составляют подавляющее большинство гемоцитов. *е* — через 1 сут после пупаризации; плазматоциты превратились в макрофаги, заполненные остатками апоптотных тканей. М — макрофаг, Нгк — нестабильная гиалиновая клетка, Пг — прогемоцит, Пл — плазматочит, Сгк — стабильная гиалиновая клетка. Масштабные отрезки — 20 мкм.

они почти полностью исчезают из гемолимфы, но на их место приходят веретенновидные клетки, небольшие, вытянутые или остроконечные с гомогенной цитоплазмой.

После пупаризации плазматоциты переходят в стадию III, возрастая в размерах до 20—25 мкм. Включения располагаются гораздо более рыхло, делая ядра вновь видимыми, а через 1 сут плазматоциты достигают фазы макрофагов, заполняясь крупными фрагментами апоптозных тканей (рис. 1, е). Среди плазматоцитов появляется новое поколение прогемоцитов, формирующих небольшие округлые и веретенновидные гиалиновые клетки.

У питающихся личинок элиминация чужеродных частиц из гемолимфы происходит с очень большой интенсивностью и только за счет тромбоцитоидов. Уже через 1 мин после инъекции частички туши начинают заполнять небольшие агглютинаты (рис. 2, а), а еще через 1 мин свободные частицы полностью исчезают из гемолимфы. Через 10—30 мин небольшие тромбоцитоидные агглютинаты сливаются в более крупные и плотные округлые «мешки», часто с длинными цитоплазматическими выростами — филоподиями (рис. 2, б).

В период опустошения зоба, несмотря на появление значительного количества плазматоцитов, функция фагоцитоза все равно осуществляется за счет тромбоцитоидов, которые, как и на более ранних этапах развития, начинают поглощать чужеродные частицы в первые минуты после инъекции и образуют крупные округлые плотно забитые частицами агглютинаты в последующие 10—30 мин. При этом плазматоциты могут прилипать к агглютинатам, образуя капсулы, но не показывая никаких признаков фагоцитоза (рис. 2, в). Интересно, что адгезия частиц может наблюдаться еще до формирования полноценных тромбоцитоидов, на этапе гиалиновой клетки (рис. 2, в).

Перелом в активности плазматоцитов наступает только у блуждающих личинок. Плазматоциты становятся способными реагировать на появление частиц угля, адгезировать их на своей поверхности и фагоцитировать (рис. 2, д). Но это происходит только через несколько десятков минут. У зрелых личинок незадолго до пупаризации плазматоциты заполняются включениями. В ответ на инъекцию частиц угля они активно прилипают к агглютинатам и часто образуют вокруг них капсулы. Первые угольные частицы могут переходить из агглютинатов в плазматоциты через 20—30 мин после инъекции, однако заметное количество угля обнаруживается в них только через 1 сут, когда агглютинаты приобретают тяжеобразную форму и частично освобождаются от поглощенных ранее частиц (рис. 2, е).

Морфология и динамика гемоцитов личинок комнатной мухи *Musca domestica* (Muscidae) имеют целый ряд общих черт с соответствующими параметрами у каллифорид и саркофагид, но обладают уникальными, присущими только им особенностями.

У питающихся и недавно окончивших питание личинок с длинным зобом и вплоть до почти полного опустошения зоба гемоциты представлены в основном многочисленными гиалиновыми клетками и тромбоцитоидами разной величины округлой или неправильной формы, а также округлыми мелкими фрагментами цитоплазмы тромбоцитоидов — пластинками и «голыми» ядрами. Прогемоцитов и гиалиновых клеток очень мало или нет вообще, кластеров и личиночных плазматоцитов также не выявляется. Несмотря на то что некоторые тромбоцитоиды звездчатой формы с длинными филопо-

диями (рис. 4, б, в) могут напоминать ювенильные плазматоциты *Calliphora*, они отличаются очень слабо выраженным ядром и отсутствием катаболических включений.

После окончания питания плазматоцитов по-прежнему не видно. Много относительно крупных тромбоцитоидов округлой или неправильной формы, с грубогранулярной цитоплазмой (20—35 мкм), отдельных фрагментов цитоплазмы и «голых» ядер. В процессе опустошения зоба наряду с многочисленными небольшими и крупными тромбоцитоидами, округлыми фрагментами и «голыми» ядрами появляются крупные кластеры прогемоцитов, сразу дифференцирующихся в плазматоциты I (рис. 3, е). Изредка видны нестабильные гиалиновые клетки, вернее их остатки (рис. 4, в). У тромбоцитоидов опустошивших зоб личинок часто можно наблюдать многочисленные филоподии различной длины, пронизывающие окружающее клетку гало из слабоконтрастной цитоплазмы (рис. 3, в, е). Подобные образования напоминают вуалеобразные или веерообразные выросты, обнаруженные у гемоцитов взрослых мух (Whitten, 1964; Kaaya, Rattriff, 1982; Lanot et al., 2001). Еще более отчетливо «веера» или «плавники» выявляются у заполненных частичками угля тромбоцитоидов после его инъекции (рис. 4, е). Как тромбоцитоиды (клетки и фрагменты), так и плазматоциты очень быстро расплываются на стекле. В этот же период появляются первые прогемоциты.

Личинки домашних мух достаточно термофильны. Уже при 18—20 °С развитие замедлено, и первые пупарии появляются не ранее чем через 1 нед после опустошения зоба. Через 2—3 сут после опустошения появляются крупные кластеры прогемоцитов, дифференцирующихся в плазматоциты. Количество включений в цитоплазме дисперсных плазматоцитов I значительно увеличивается. Довольно часто встречаются нестабильные гиалиновые клетки, в том числе и на стадии выброса пузырей, с мелкими округлыми частицами внутри. Эти частицы осуществляют интенсивное броуновское движение. Тромбоцитоиды представлены небольшими округлыми и крупными неправильными клетками с пучками длинных филоподий. На одном препарате видно отпочковывание округлых фрагментов от стабильной гиалиновой клетки. Таким образом, даже у зрелых личинок образование и функционирование тромбоцитоидов отнюдь не снижаются.

Незадолго до начала пупаризации количество плазматоцитов и степень их заполненности включениями значительно увеличиваются. По своей морфологии в этот период они соответствуют плазматоцитам II—III *Calliphora* (рис. 4, б, в). После образования пупария размеры плазматоцитов II—III возрастают до 18—20 мкм, а через 6—8 ч они переходят в стадию макрофагов, заполняясь фрагментами апоптозных тканей (рис. 4, в, д). В это же время, т. е. после пупаризации, в гемолимфе появляются новые стабильные гиалиновые клетки веретенновидной формы (рис. 4, д).

Инъекцию угля проводили только в опустошивших зоб личинок. Уже через 10—15 мин все частицы были сконцентрированы в крупных тромбоцитоидах с веерообразными выростами (рис. 4, е).

Таким образом, у личинок комнатной мухи можно выделить 5 типов гемоцитов — прогемоциты, плазматоциты (от плазматоцитов I до макрофагов), стабильные и нестабильные гиалиновые клетки, тромбоцитоиды и веретенновидные гиалиновые клетки. По предварительным

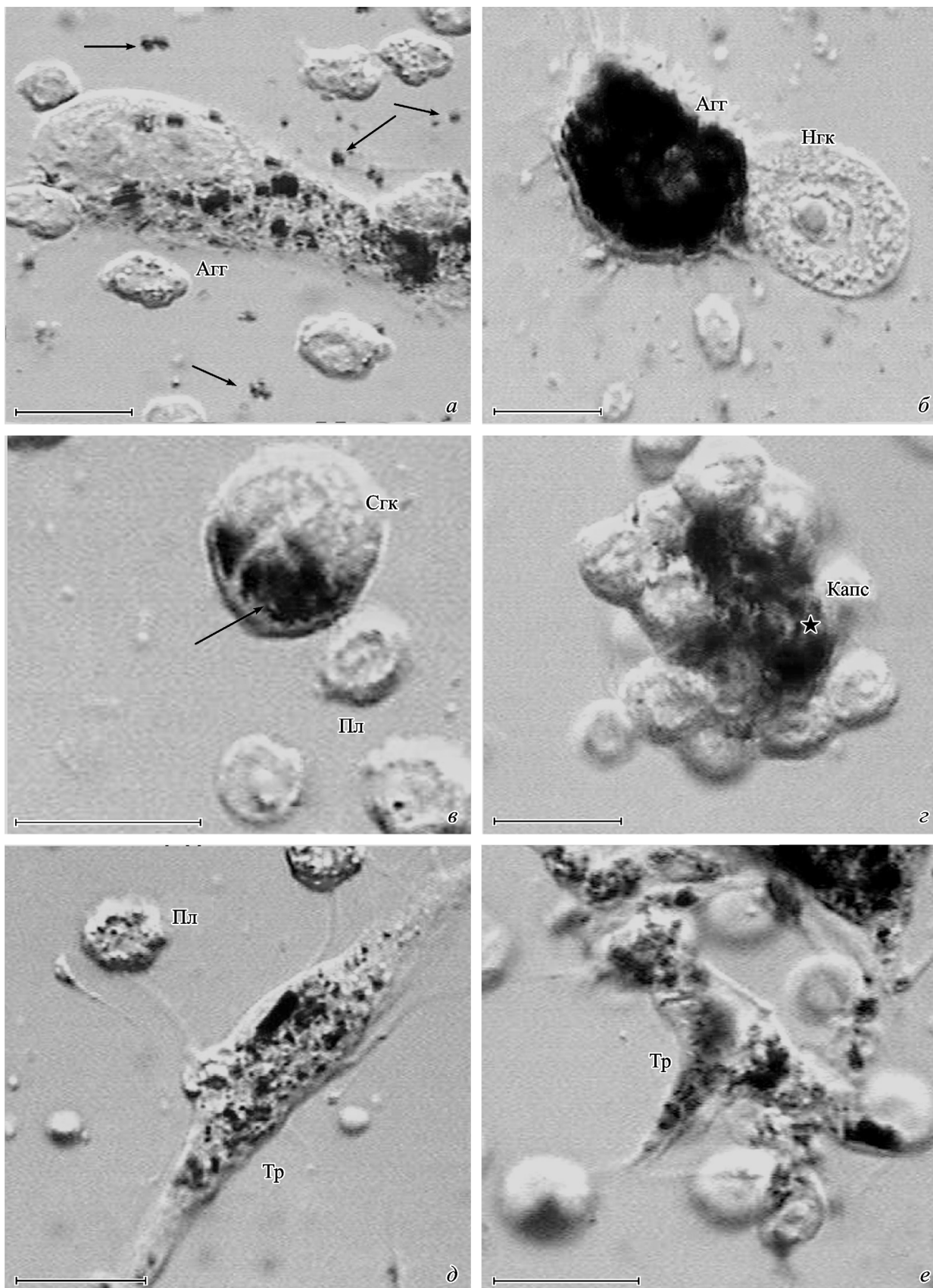


Рис. 2. Реакция гемоцитов на инъекцию угля в личинки *Sarcophaga crassipalpis*.

a — через 1 мин после инъекции угля в кончающую питание личинку; частицы начинают заполнять агглютинат, но довольно много их еще свободно плавает в гемолимфе (*стрелки*). *б* — через 30 мин после инъекции; тромбоцитонидный агглютинат заполнен частицами угля. *в* — личинка, опустошившая зоб; стабильная гиалиновая клетка с адгезированным на поверхности углем (*стрелка*). *г* — капсула из плазматочитов, окруживших заполненный углем тромбоцитонидный агглютинат (*звездочка*). *д* — через 4 ч после инъекции; агглютинаты теряют округлую форму и разрыхляются. *е* — через 1 сут после инъекции; агглютинаты превращаются в систему тяжей. Агг — агглютинат, Капс — капсула, Нгк — нестабильная гиалиновая клетка, Пл — плазматочит, Сгк — стабильная гиалиновая клетка, Тр — тромбоцитонид. Масштабные отрезки — 20 мкм.

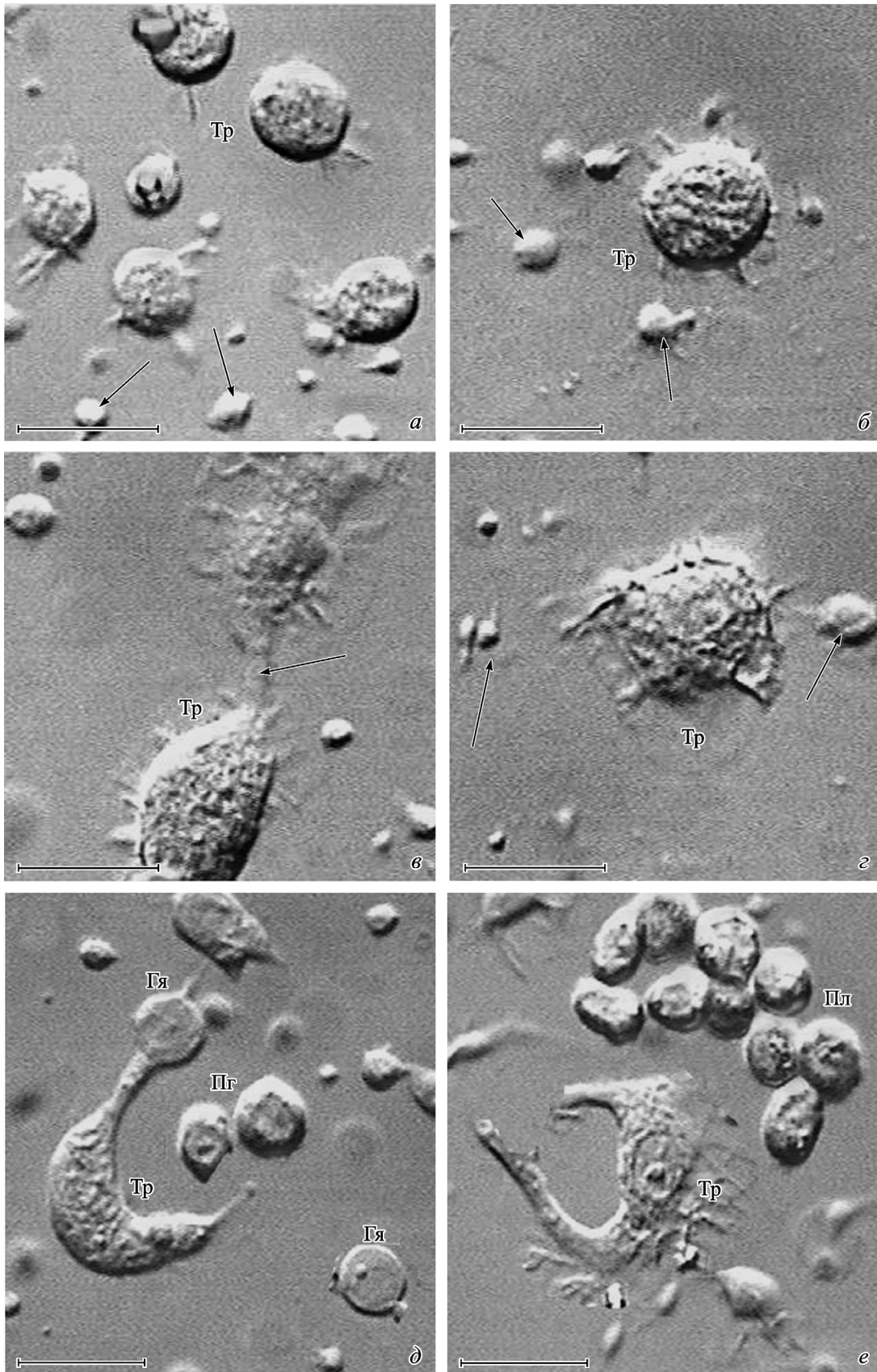


Рис. 3. Гемоциты в гемолимфе питающихся (а–с) и опустошающих зоб (д, е) личинок *Musca domestica*.

а, б — округлые безъядерные тромбоциты и фрагменты их цитоплазмы (стрелки). в — два тромбоцита с перемычкой между ними (стрелка). г — крупный тромбоцит и фрагменты цитоплазмы (стрелки). д, е — неправильной формы тромбоциты, «голые» ядра и прогемоциты. Гя — «голое» ядро, Пг — прогемоцит, Пл — плазматочит, Тр — тромбоцит. Масштабные отрезки — 20 мкм.

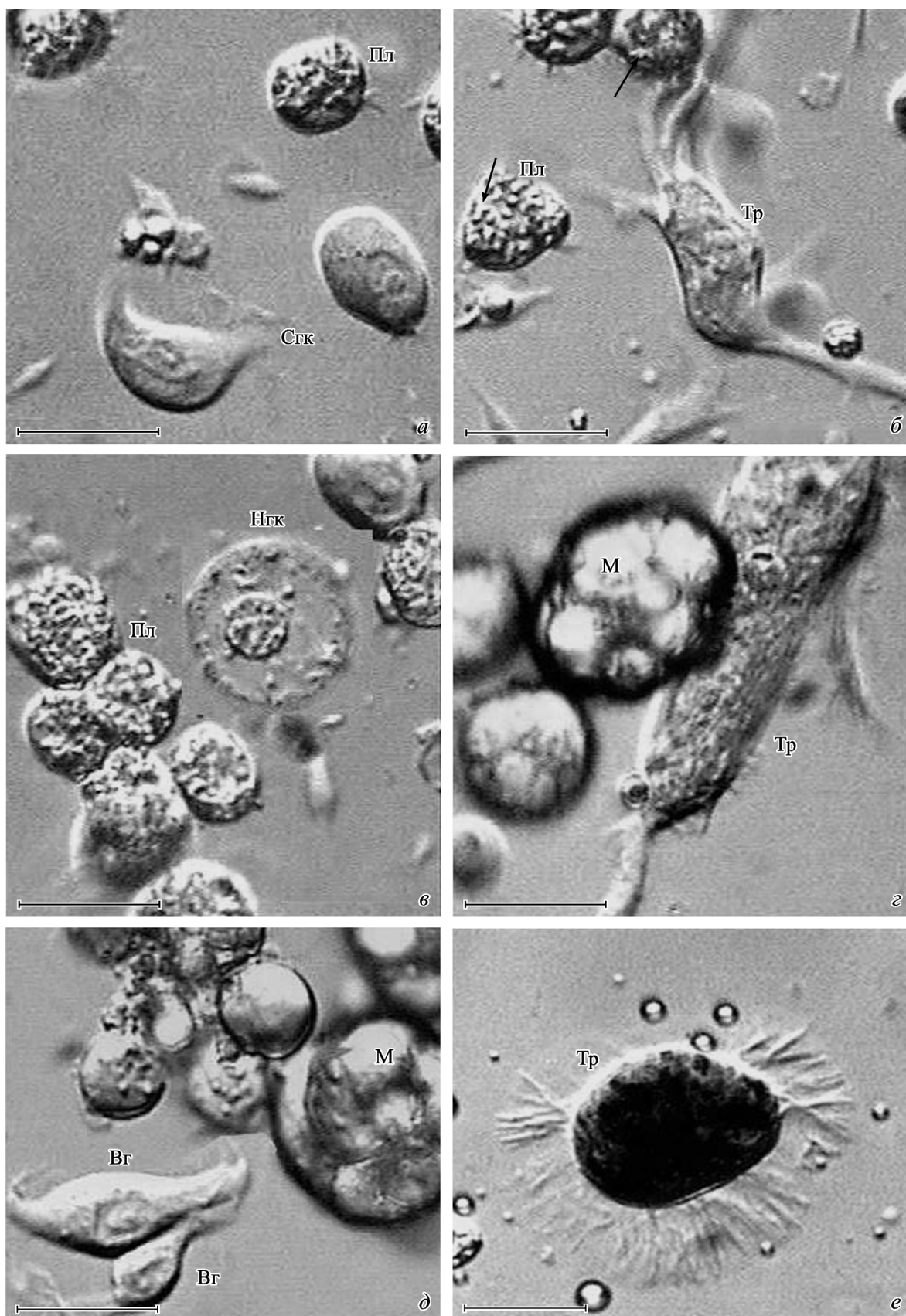


Рис. 4. Гемоциты в гемолимфе блуждающих личинок перед пупаризацией (а—в) и молодых пупариев (г—е) *Musca domestica*. а — плазматочит и стабильные гиалиновые клетки. б — заполненные включениями (стрелки) плазматочиты и неправильной формы тромбоциты. в — заполненные включениями плазматочиты и нестабильная гиалиновая клетка. г — макрофаги и вытянутый тромбоцит через 10 мин после инъекции в опустошившую зоб личинку. д — макрофаги и веретеновидные гиалиновые клетки, М — макрофаг, Нгк — нестабильная гиалиновая клетка, Пл — плазматочит, Сгк — стабильная гиалиновая клетка, Тр — тромбоцит. Масштабные отрезки — 20 мкм.

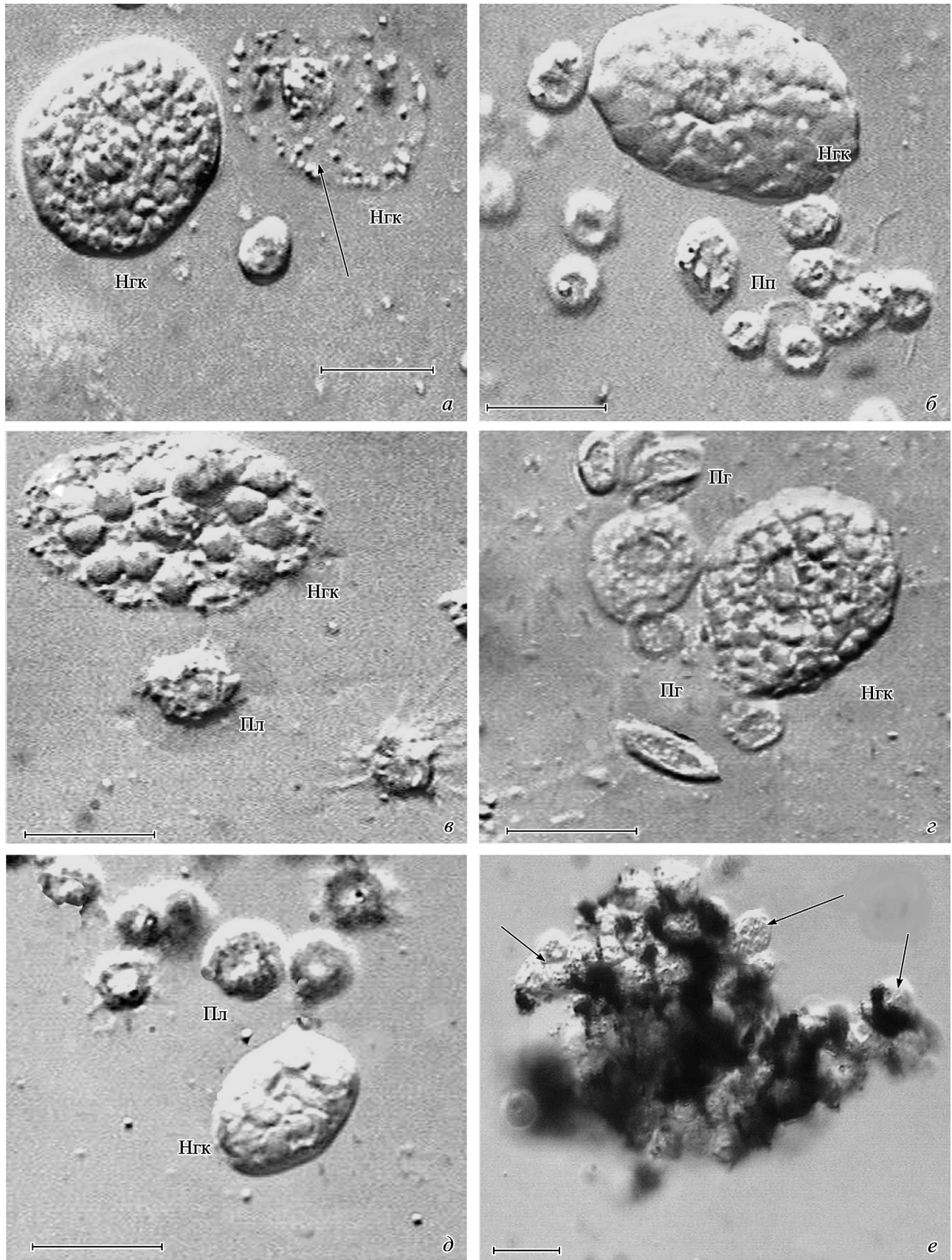


Рис. 5. Гемоциты и реакция на инъекцию угля у личинок *Haematopota pluvialis*.

a — две нестабильные гиалиновые клетки, одна из которых выбросила содержимое (стрелка). *б* — нестабильная гиалиновая клетка и рыхлый кластер прогемоцитов. *в* — часть нестабильной гиалиновой клетки и мелкие плазматоциты. *г* — прогемоциты и образование гиалиновой клетки. *д* — плазматоциты и небольшая гиалиновая клетка. *е* — через 5 мин после инъекции взвеси частиц угля; нодула из скопления частиц, окруженных плазматоцитами (стрелки). Нгк — нестабильная гиалиновая клетка, Пп — прогемоцит, Пл — плазматоцит. Масштабные отрезки — 20 мкм.

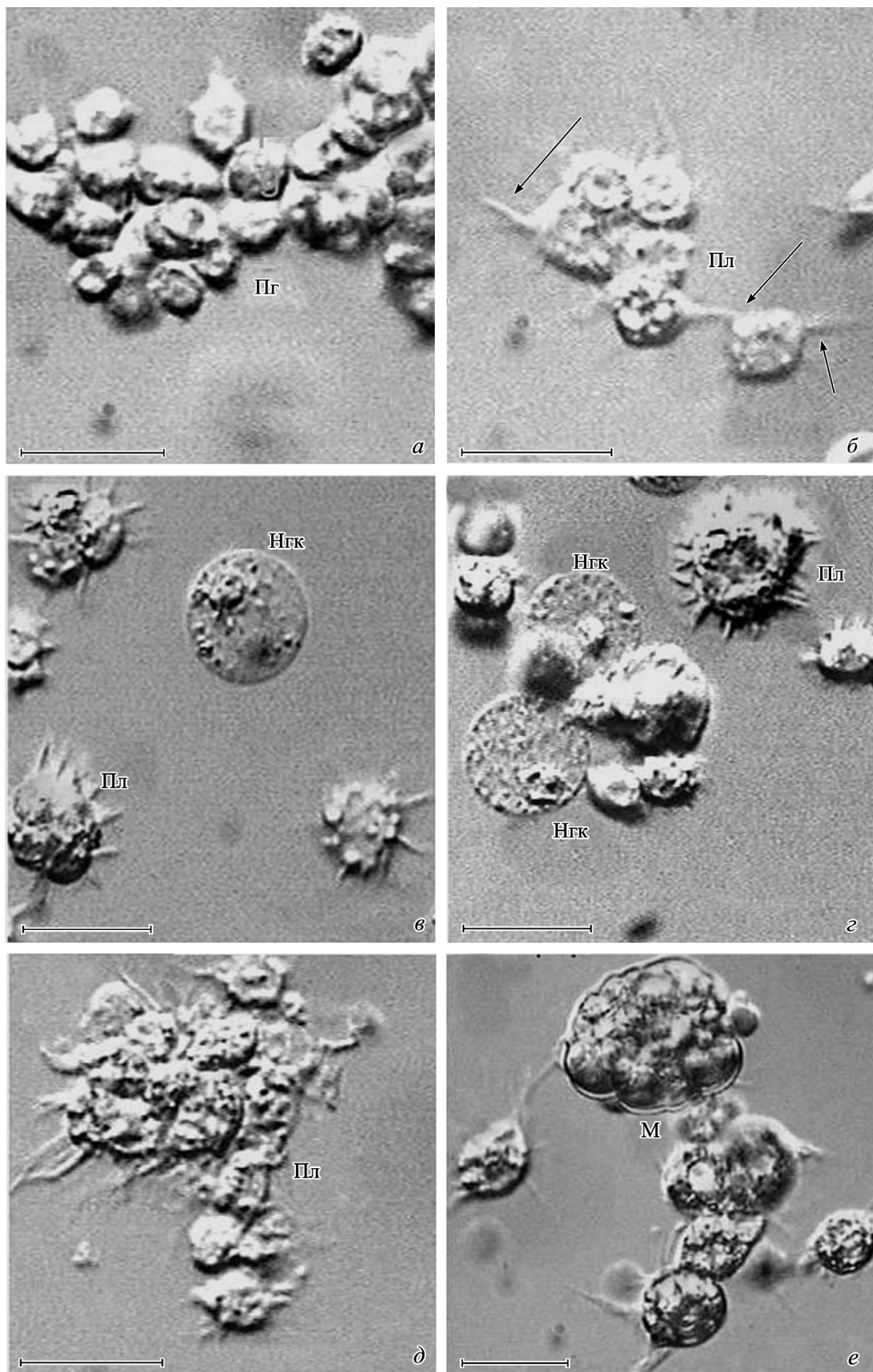


Рис. 6. Гемоциты личинок *Helophilus trivittatus*.

a — кластер прогемоцитов в гемолимфе питающейся личинки. *б* — небольшие плазматоциты с отдельными звездчатыми выростами (стрелки). *в* — нестабильная гиалиновая клетка и звездчатые плазматоциты. *г* — нестабильные гиалиновые клетки на стадии опустошения, крупный звездчатый плазматоцит и несколько прогемоцитов. *д* — мелкие дифференцирующиеся плазматоциты в гемолимфе личинок перед пупаризацией. *е* — макрофаги через 1 сут после пупаризации. М — макрофаг, Нгк — нестабильная гиалиновая клетка, Пг — прогемоцит, Пл — плазматоцит. Масштабные отрезки — 20 мкм.

данным, основную роль в удалении из гемолимфы чужеродных частиц играют именно тромбоцитоиды.

При исследовании гемолимфы *Haematopota pluvialis* (Tabanidae) были использованы личинки слепней-дождевок, живущие в навозно-травяном настое. После окончания питания блуждающие личинки покидают воду и, не развиваясь, концентрируются на плавающих листьях или стенках сосуда.

Для питающихся личинок характерно наличие всего трех типов гемоцитов: прогемоцитов — мелких округлых клеток с относительно крупным ядром и гомогенной цитоплазмой (рис. 5, з), небольших (10—12 мкм) округлых или веретеновидных плазматоцитов с незначительным количеством включений и отдельными филоподиями (рис. 5, в, г) и очень крупных (20—30 × 30—40 мкм) гиалиновых клеток, заполненных угловатыми глыбками. Последние чрезвычайно похожи на нестабильные клетки *Sarcophaga*. Некоторые из этих клеток почти сразу после выделения гемолимфы претерпевают значительные изменения. Глыбки распадаются на округлые небольшие частицы и выделяются за пределы клеток. От клетки же остается только пустой остов с центральным расположенным пикнотическим ядром (рис. 5, а). В то же время соседние клетки могут оставаться неизменными на протяжении как минимум нескольких десятков минут.

Стабильные гиалиновые клетки становятся заметными только у блуждающих взрослых личинок, но в очень малом количестве, а тромбоцитоидов не выявляется вообще. У взрослых личинок, содержавшихся более 1 мес при 5 °С, основную массу гемоцитов составляют плазматоциты с небольшим количеством кatabолических включений, соответствующие плазматоцитам I *Calliphora vicina*, и отдельные гиалиновые клетки. В этот период инъекция угля приводит к быстрой агрегации плазматоцитов вокруг частичек. Через 5 мин образуются классические нодулы с углем между клетками (рис. 5, е). Через 10 мин после инъекции нодулы сохраняются, но через 20 практически исчезают. Гиалиновые клетки при этом остаются неизменными.

У кончающих и окончивших питание личинок журчалок *Helophilus trivittatus* (Syrphidae) гемоциты в основном представлены плазматоцитами — небольшими (8—10 мкм), большей частью округлыми, реже овальными клетками с немногочисленными, умеренно контрастными включениями (рис. 6, б). В свежесекретированной гемолимфе поверхность клеток гладкая, однако уже через 20—30 с начинают образовываться многочисленные выросты, придающие плазматоцитам «ежевидную» форму (рис. 6, в, г). Плазматоциты очень быстро адгезируют и распластываются на стекле. Помимо плазматоцитов изредка встречаются нестабильные гиалиновые клетки, крупные (около 20 мкм), округлые, с множеством небольших частиц в пузырьковидном перинуклеарном пространстве, испытывающих активное броуновское движение. Через несколько минут после начала наблюдения виден выход округлых частиц в гемолимфу (рис. 6, в, г).

У зрелых личинок, готовых к метаморфозу, появляются крупные кластеры прогемоцитов с дифференцирующимися плазматоцитами (рис. 6, а, д), количество плазматоцитов и нестабильных клеток заметно увеличивается. Тромбоцитоидов не наблюдали ни на одной из исследованных стадий.

После пупаризации плазматоциты быстро переходят на стадию макрофагов, заполняясь фрагментами лизиро-

ванных тканей (рис. 6, е). Очень часто они находятся в контакте с распадающимися клетками жирового тела.

При формировании фартных имаго в гемолимфе появляются вновь образованные плазматоциты почти без включений. В этот же период можно изредка обнаружить очень крупные эноциты, свободно плавающие в гемолимфе.

После инъекции взвеси угля в кончающих и окончивших питание личинок происходит совершенно неожиданная реакция, не наблюдавшаяся ни у одного из изученных ранее видов. Уже через 1—3 мин гемолимфа полностью лишается свободно плавающих гемоцитов. Очевидно, это связано с седиментацией гемоцитов на гиподермальных тканях стенки полости тела.

Обсуждение

Исследование морфофункциональных особенностей гемоцитов у представителей различных семейств круглошовных мух показывает значительную вариабельность клеточной защитной реакции. Это касается как гемогенного состава, так и особенностей механизмов элиминации чужеродных элементов из гемолимфы.

Однако прежде чем переходить к сравнительному анализу клеточной защитной реакции личинок мух, необходимо определиться с классификацией гемоцитов, предложенной различными авторами, и привести эту классификацию к единому знаменателю. После основополагающих работ, посвященных морфологии и дифференцировке гемоцитов двукрылых (Crossley, 1964; Whitten, 1964; Zachary, Hoffmann, 1973; Brehelin et al., 1978; Gupta, 1979; Ratcliffe, Rowley, 1979; Kaaya, Ratcliffe, 1982; Natori et al., 1993), было установлено 4 основных типа гемоцитов со специфическими функциями — прогемоциты (стволовые клетки), плазматоциты (фагоцитирующие гемоциты), тромбоцитоиды (образующие капсулы вокруг крупных чужеродных объектов) и секретирующие профенолоксидазу крупные гиалиновые клетки. Помимо этих могут присутствовать и дополнительные типы, такие как эноциты, дающие начало профенолоксидазным клеткам и тромбоцитоидам. Для модельного рода *Drosophila* общепринято использование некоторых специфических терминов. Так, капсулообразующие клетки (протромбоцитоиды и тромбоцитоиды) носят название подоциты/ламеллоциты, а профенолоксидазосодержащие — кристаллические клетки (Rizki, Rizki, 1984, 1992; Lavine, Strand, 2002; Meister, Lagueux, 2003).

Основная ошибка во многих работах, посвященных физиологическим и морфофункциональным исследованиям клеточной защитной системы двукрылых (Rivers et al., 2002; Silva et al., 2002; Faraldo, Lello, 2003; Abozenadah, 2010), — неправильная идентификация типов гемоцитов. Особенно это касается гранулярных гемоцитов (которых у мух как таковых не имеется) и плазматоцитов. Судя по описаниям, «гранулярные гемоциты» являются плазматоцитами, заполненными кatabолическими жировыми или жирно-белковыми включениями, а плазматоциты — разными формами подоцитов и тромбоцитоидов.

У исследованных как в настоящей работе, так и ранее (Кинд, 2003, 2007, 2012) личинок двукрылых наблюдается значительная вариабельность как параметров клеток, так и клеточной защитной реакции. Наименьшее количество типов гемоцитов отмечается у личинок журчалок и слепней. У них выявляется всего 3 типа гемоцитов —

прогемоциты, плазматоциты и профенолоксидазосодержащие нестабильные гиалиновые клетки (эноцитойды). У *S. crassipalpa* и *M. domestica* к этому набору добавляются еще тромбоцитоиды. А наибольшее количество типов гемоцитов выявляется у каллифорид — *Calliphora* и *Lucilia*, где в дополнение к обычным предметаморфозным плазматоцитам добавляются очень крупные ювенильные плазматоциты, а число типов гиалиновых клеток возрастает за счет веретенновидных клеток и клеток с ацентрическими бобовидными ядрами соответственно перед и в начале пуларизации. Наиболее постоянными элементами гемоцитарной системы являются, таким образом, прогемоциты, плазматоциты и нестабильные гиалиновые клетки, вырабатывающие профенолоксидазу.

Морфология гемоцитов одного типа достаточно сильно варьирует в зависимости от систематической принадлежности двукрылых, за исключением прогемоцитов, которые всегда остаются мелкими, округлыми недифференцированными клетками с крупным ядром и узким ободком гомогенной цитоплазмы. Плазматоциты на ранних стадиях дифференцировки также достаточно униморфны, округлые, с немногочисленными филоподиями и небольшим количеством катаболических включений. При запущенной метаморфоза количество включений значительно увеличивается, а после пуларизации плазматоциты переходят в стадию макрофагов. В то же время у личинок журчалок плазматоциты могут образовывать длинные выросты (филоподии) и приобретать ежевидную форму.

Пожалуй, наибольшую вариабельность у личинок мух демонстрируют тромбоцитоиды и нестабильные профенолоксидазосодержащие гиалиновые клетки. Известно, что у *Drosophila* аналогами тромбоцитоидов являются подоциты/ламеллоциты, плоские амебоидные или вытянутые клетки, участвующие в образовании капсул (Rizki, Rizki, 1984, 1992; Meister, Lagueux, 2003). На другом конце шкалы изменчивости лежат тромбоцитоиды каллифорид, представленные многочисленными мелкими фрагментами цитоплазмы и «голыми» ядрами (Zachary, Hoffmann, 1973; Zachary et al., 1975; Кинд, 2003, 2005, 2007, 2012; Тулин, Чага, 2003). Тромбоцитоиды *Musca* занимают промежуточное положение, существуя как в виде фрагментов цитоплазмы у питающихся личинок, так и в виде значительно более крупных безъядерных цитоплазматических образований с «голыми» ядрами, либо контактирующими с фрагментами цитоплазмы, либо лежащими изолированно в гемолимфе. И наконец, у личинок журчалок и дождевок тромбоцитоидных элементов не выявлено вообще. Это не значит, что тромбоцитоидов или подоцитов/ламеллоцитов в гемолимфе вышеупомянутых семейств нет, как это имеет место у длинноусых двукрылых. Возможно, на исследованном этапе развития их очень мало и их дифференцировка стимулируется только после появления в гемолимфе чужеродных элементов. Подробный сравнительный анализ гемоцитов дрозофилы и чешуекрылых показал, что гранулярные клетки чешуекрылых соответствуют плазматоцитам дрозофилы, а плазматоциты — подоцитам/ламеллоцитам (Ribeiro, Brehelin, 2006). Эти клетки, несомненно, соответствуют тромбоцитоидам. Следующим этапом эволюционного развития этого типа иммуоцитов являются, по нашему мнению, тромбоцитоиды комнатной мухи, которые у питающихся личинок представлены как плоскими округлыми клетками, так и округлыми безъядерными фрагментами цитоплазмы, а в период опустошения зоба — круп-

ными неправильными элементами, иногда с веерообразными выростами и «голыми» или прилегающими ядрами. И наконец, у каллифорид фрагменты превращаются в мелкие удлиненные многочисленные филаменты.

Последний из основных типов гемоцитов, играющих важную роль в защитной реакции — профенолоксидазные нестабильные гиалиновые клетки. Они выявляются у всех изученных нами мух, но чрезвычайно вариабельны по своей морфологии. У *Drosophila* — это так называемые кристаллические клетки, содержащиеся в цитоплазме, хотя и не у всех видов, паракристаллоидные включения; у *Calliphoridae* — нестабильные гиалиновые клетки с бесструктурной цитоплазмой, содержимое которых выбрасывается с образованием периферических пузырей. После этого от клеток остается «скелет» с редкими гранулами и пикнотическим ядром. У *Sarcophaga* и *Haematopota pluvialis* в нестабильных клетках обнаруживается масса крупных глыбок, распадающихся у серых мясных мух после выделения гемолимфы, но сохраняющихся долгое время у слепней. И наконец, у журчалок профенолоксидазные клетки изначально очень похожи на разрушенные клетки мясных мух. Они обладают пикнотическим ядром и крупными хаотически движущимися гранулами в очень прозрачной цитоплазме.

Механизмы элиминации чужеродных частиц из гемолимфы также разнятся у представителей различных двукрылых. У слепня-дождевки *H. pluvialis* наблюдаются скопления частиц угля, окруженных плазматоцитами, т. е. образование типичных нодул без всякого участия тромбоцитоидов. У *S. crassipalpis*, напротив, основную роль играют тромбоцитоиды, состоящие из мелких цитоплазматических филаментов и «голых» ядер. Сливаясь в агглютинаты, они поглощают чужеродные частицы. Вокруг агглютинатов могут скапливаться плазматоциты, образуя своеобразную капсулу. Не менее отчетливо роль тромбоцитоидов проявляется у *M. domestica*, где крупные тромбоцитоидные образования, окруженные системой длинных филоподий, объединенных веерообразной мембраной, очень быстро притягивают и захватывают все чужеродные частицы, освобождая от них гемолимфу. Наиболее непонятной остается клеточная защитная система личинок журчалки *Helophilus trivittatus*, у которых гемолимфа за считанные минуты очищается как от чужеродных частиц, так и от гемоцитов.

Какую из систем клеточной защитной реакции можно считать самой упрощенной, а какую самой прогрессивной, сказать очень трудно, поскольку все они прекрасно выполняют свою роль. Наиболее привлекательной кажется гипотеза, согласно которой эффективнее всего клеточная защита осуществляется у видов с наличием максимального разнообразия специализированных гемоцитов и клеточных реакций, но у подобной системы есть свои слабые стороны. Очевидно одно — мухи виртуозно справляются с опасностью инфекционных и паразитарных вторжений, используя находящиеся в их распоряжении механизмы защитных реакций.

Список литературы

- Кинд Т. В. 2003. Гемоциты мясной мухи *Calliphora vicina* и их динамика при развитии личинок и индукции метаморфоза. Цитология. 45 (1): 14—25. (Kind T. V. 2003. Hemocytes of blowfly *Calliphora vicina* and their dynamics in the development of larvae and induction of metamorphosis. Tsitologiya. 45 (1): 14—25.)

- Kind T. V. 2005. Agglutination and phagocytosis of xenogenous abiotic particles by hemocytes of blowfly *Calliphora vicina* in vivo. I. Динамика фагоцитарной активности гемоцитов в онтогенезе личинок. Цитология. 47 (7) : 609—622. (Kind T. V. 2005. Agglutination and phagocytosis of xenogenous abiotic particles by hemocytes of blowfly *Calliphora vicina* in vivo. I. The dynamics of the phagocytic activity of hemocytes in the ontogeny of the larvae. Tsitologiya. 47 (7) : 609—622.)
- Kind T. V. 2007. Гемоциты с различными типами защитной реакции в онтогенезе трех видов мясных мух рода *Calliphora*. Тр. БиНИИ СПбГУ. Вып. 53 «Стратегии адаптаций наземных членистоногих к неблагоприятным условиям среды». 306—335. (Kind T. V. 2007. Hemocytes demonstrating different types of protective response in the ontogeny of three species of blowfly genus *Calliphora*. БиНИИ St. Petersburg State University Proceedings. Vol. 53 «Strategies for adaptation of terrestrial arthropods to adverse environmental conditions». 306—335.)
- Kind T. V. 2012. Функциональная морфология гемоцитов мясной мухи *Calliphora vicina*. Цитология. 54 (11) : 806—822. (Kind T. V. 2012. Functional morphology of blowfly *Calliphora vicina* hemocytes. Tsitologiya. 54 (11) : 806—822.)
- Тулин Д. В., Чага О. Ю. 2003. Гемоциты личинки *Calliphora vicina*. I. Гистологический анализ. Цитология. 45 (10) : 976—985. (Tulin D. V., Chaga O. Yu. 2003. Hemocytes of the larvae *Calliphora vicina*. I. Histological analysis. Tsitologiya. 45 (10) : 976—985.)
- Abozenadah N. Y. A. 2010. Physiological studies on the house fly *Musca domestica vicina* Muscidae, Diptera. JKAU Sci. 22 : 27—38.
- Brehelin M., Zachary D., Hoffmann J. A. 1978. A comparative ultrastructural study of blood cells from nine insect orders. Cell Tissue Res. 195 : 45—57.
- Crossley A. C. 1964. An experimental analysis of the origins and physiology of haemocytes in the bluefly *Calliphora erythrocephala* (Meig.). J. Exp. Zool. 157 : 375—398.
- Eslin P., Prevost G. 1998. Hemocyte load and immune resistance to *Asobara tabida* are correlated in species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. J. Insect Physiol. 44 : 807—816.
- Faraldo A. C., Lello E. 2003. Defense reactions of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) larval hemocytes. Biocell. 27 (2) : 197—203.
- Götz P., Boman H. G. 1985. Insect immunity. In: Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Oxford: Pergamon Press. 454—485.
- Götz P., Enderlein G., Roettgen I. 1987. Immune reactions of *Chironomus* larvae (Insecta: Diptera) against bacteria. J. Insect Physiol. 3 : 993—1004.
- Götz P., Vey A. 1987. Humoral encapsulation in insect. In: Hemocytic and humoral immunity in arthropods. New York: Wiley Intersci. 407—430.
- Gupta A. P. 1979. Insect hemocytes: development, forms, functions, and techniques. New York: Cambridge Univ. Press. 614 p.
- Kaaya G. P., Ratcliffe N. A. 1982. Comparative study of hemocytes and associated cells of some medically important dipterans. J. Morphol. 173 : 351—365.
- Lackie A. M. 1980. Invertebrate immunity. Parasitology. 20 : 393—412.
- Janot 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.
- Meister M., Lagueux M. 2003. *Drosophila* blood cells. Cell. Microbiol. 5 (9) : 573—580.
- Natori S., Shiraiishi H., Hori S., Kobayashi A. 1999. The roles of *Sarcophaga* defense molecules in immunity and metamorphosis. Develop. Comp. Immunol. 23 : 317—328.
- Ratcliffe N. A. 1986. Insect cellular immunity and the recognition of foreignness. Symp. Zool. Soc. London. 56 : 21—43.
- Ratcliffe N. A., Rowley A. F. 1979. Role of insect hemocytes against biological agents. In: Insect hemocytes: development, forms, functions, and techniques. New York: Cambridge Univ. Press. 31—414.
- Ratcliffe N. A., Rowley A. F., Fitzgerald S. W. et al. 1985. Invertebrate immunity, basic concepts and recent advances. Int. Rev. Cytol. 97 : 183—196.
- Ribeiro C., Breherlin M. 2006. Insect haemocytes: what type of cell is that? J. Insect Physiol. 52 : 417—429.
- Rivers D. B., Ruggiero L., Hayes M. 2002. The ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) differentially affects cells mediating the immune response of its flesh fly host, *Sarcophaga bullata* Parker (Diptera: Sarcophagidae). J. Insect Physiol. 48 : 1053—1064.
- Rizki T. M., Rizki R. M. 1984. The cellular defense system of *Drosophila melanogaster*. In: Insect ultrastructure. New York: Plenum Publishing. 579—604.
- Rizki T. M., Rizki R. M. 1992. Lamellocyte differentiation in *Drosophila* larvae parasitized by *Leptopilina*. Develop. Comp. Immunol. 16 : 103—110.
- Silva J. E. B., Bjelleli I. C., Sumoes Z. L. P. 2002. Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. Braz. J. Biol. 62 : 689—699.
- Slovak M., Kazimirova M., Bazlikova M. 1991. Haemocytes of *Mamestra brassicae* (L.) (Lepidoptera, Noctuidae) and their phagocytic activity. Acta Entomol. Bohemoslov. 88 : 161—172.
- 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.

Поступила 16 IX 2013

CELLULAR DEFENSE SYSTEM OF SOME SYNANTHROPIC DIPTERANS INHABITANT OF BACTERIALLY AGGRESSIVE ENVIRONMENT

T. V. Kind

Department of Entomology, St. Petersburg State University;
e-mail: tatiana.kind@mail.ru

The hemocytic count and defense reaction within 4 families of higher Diptera: *Tabanidae*, *Syrphidae*, *Muscidae* and *Sarcophagidae*, whose larvae inhabit bacterially aggressive environment, were investigated. The least hemocytes types (3) were revealed in *Tabanidae* and *Syrphidae* larvae — prohemocytes, plasmatocytes and prophenoloxydase-containing unstable hyaline cells (oenocytoids). In *Sarcophaga crassipalpis* and *Musca domestica* stable hyaline cells and thrombocytoids or podocytoid-like cells can be added to this set. At the time of

pupariation in *Sarcophaga*, new generation of prohemocytes is segregated into the hemolymph, which form small round or spindle-shaped hyaline cells. So, the number of plasmatocyte types in *Sarcophaga* increase to six. Typical to *Calliphoridae* juvenile plasmatocytes in the members of investigated families are absent. Among the one hemocyte type morphology also can vary, especially in unstable prophenoloxydase hyaline cells. In *Drosophila* there are crystal cells containing in the cytoplasm paracrystalloidal inclusions. In *Calliphoridae* there are big hyaline cells with homogenous cytoplasm producing circumferential bubbles. Both in *Sarcophaga* and *Tabanidae* they contain in their cytoplasm big globules. However in *Sarcophaga* they rapidly disintegrate, while in *Tabanidae* are maintained unchanged during hours. In *Muscidae* and *Syrphidae* prophenoloxydase extrusion occurs very early and these cells obtain pycnotic nuclei and very liquid cytoplasm with strings of granules. Thrombocytoids in *Musca* larvae are represented by big flattened anucleated irregular cytoplasm and «naked» nuclei and cytoplasmic fragments often with fan-like projections. Plasmatocytes in all species studied are the cells with pronounced phylopodies. In larvae they contain cytoplasmic catabolic inclusions and in pupa — fragments of apoptotic tissues. Clearance of hemolymph from alien particles in *Sarcophagidae* and *Muscidae* occur by thrombocytoides, while in *Tabanidae* by plasmatocyte nodulation. A differing case is *Syrphidae* where charcoal injection produce depletion of hemolymph both from particles and all types of hemocytes. So the specimen of different higher Diptera families can use different schemes of cellular defense reaction.

Key words: *Sarcophagidae*, *Muscidae*, *Tabanidae*, *Syrphidae*, cellular immunity, hemocytes, phagocytosis, encapsulation, nodulation.
