



УДК 594.38-155.7

© 2010

В. К. Ракочий, Л. М. Хлус, М. М. Марченко

Міжвидові морфометричні відмінності гемоцитів моллюсків родини Helicidae (Gastropoda)

(Представлено академіком НАН України В. І. Монченком)

Досліджено морфометричну мінливість гемоцитів шести видів моллюсків: *Helix pomatia* L., *H. lutescens* Rssm., *H. lucorum* L., *Arianta arbustorum* L., *Eobania vermiculata* Mull. (родина Helicidae) та *Bradybaena fruticum* Mull. (родина Bradybenidae). Виявлено видоспецифічність комплексу морфометричних характеристик гемоцитів моллюсків родини Helicidae.

Дослідження закономірностей змін загальних розмірів та форми (пропорцій) як організму в цілому, так і окремих його складових залежно від умов існування є основною метою екологічної морфології. Детальний аналіз дозволяє не лише оцінити величину мінливості будь-якої морфологічної структури, але й виявити напрям її змін у процесі дивергенції та виокремити найбільш значущі з них [1]. Розміри гемоцитів, їх морфологічні параметри та рівень активності, як інформативні характеристики біосистем суборганізменних рангів, останніми роками все частіше використовують у біомоніторингових дослідженнях для оцінки стану організму хребетних тварин різних таксономічних груп та їх реакції на зміни оточуючого середовища; водночас дослідження крові безхребетних нечисленні.

Гемоцити (амебоцити) моллюсків, частка яких становить 1–2% загального об'єму гемолімфи [2], представлені кількома типами клітин; їх номенклатура не уніфікована, а гістогенетичні зв'язки майже не досліджені [3]. Вважається, що у гемолімфі представників класу Gastropoda присутній, як правило, лише один тип клітин — гранулоцити, які, на думку деяких дослідників, типологічно ближчі до гіаліноцитів Bivalvia, ніж до гранулоцитів останніх [4].

А. П. Стадніченко з урахуванням класифікації клітинних елементів гемолімфи червононогих моллюсків, запропонованої Z. Vostal [5], серед гемоцитів Lymnaeidae та Acroloxidae розрізняє прогемоцити, еозинофільні мікрогранулоцити, базофільні гранулоцити [6]. Крім згаданих типів клітин, виділяють ще плазмодії — великі багатоядерні елементи, утворення яких вважають результатом злиття амебоцитів, можливо, у процесі реалізації захисної функції [7]. А. Adamowicz та М. Bolaczek, здійснивши стислий огляд стану вивченості клітинних елементів гемолімфи Gastropoda та підкресливши відсутність їх уніфікованої та

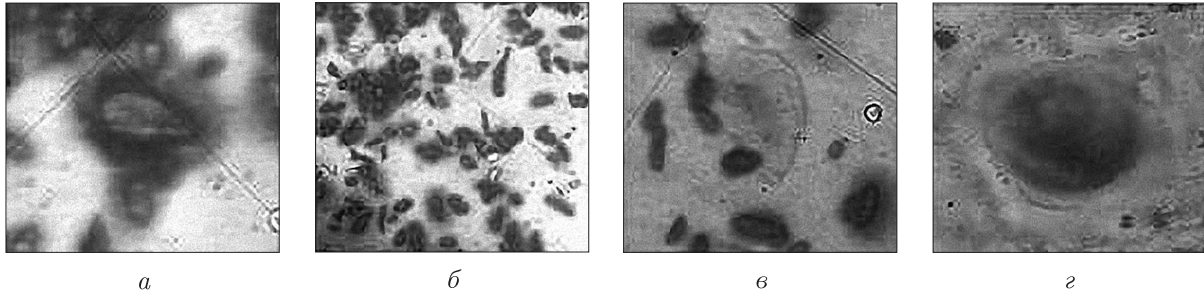


Рис. 1. Основні типи гемоцитів *H. pomatia*: а — десмобласти ($\times 1000$); б — група десмобластів ($\times 400$); в — еозинофільні гранулоцити ($\times 600$); з — базофільні гранулоцити ($\times 1000$)

задовільної класифікації і номенклатури, ідентифікували у *Helix aspersa maxima* Mull. два типи гемоцитів: тип I (Ia та Ib) морфологічно близький до гранулоцитів і тип II — до гіаліноцитів [8].

Таким чином, будова, розміри та функції різних типів клітин гемолімфи наземних молюсків залишаються маловивченими. Водночас вони можуть бути інформативними показниками стану популяцій як у природному, так і в антропогенно трансформованому середовищі та використовуватися в біомоніторингових дослідженнях та біоіндикації довкілля.

Мета нашого дослідження полягала у виявленні міжвидових відмінностей основних розмірних параметрів гемоцитів молюсків родини Helicidae методами багатовимірної статистики.

Матеріали та методи. Досліджували цитологічні елементи гемолімфи семи видів родини Helicidae з двох підродин та чотирьох родів: *Helix pomatia* L. — 30 особин, *H. lutescens* Rssm. — 30 особин, *H. lucorum* L. — 32 особини, *H. albescens* Rssm. — 41 особина, *Arianta arbustorum* L. — 10 особин, *Cepaea vindobonensis* Fer. — 25 особин та *Eobania vermiculata* Mull. — 28 особин). Для порівняння використовували гемоцити 25 особин *Bradybaena fruticum* Mull. (Bradybaenidae). Аналізували гемолімфу статевозрілих молюсків, зібраних у період активної життєдіяльності з різних популяцій у межах західної та південної України. Отримання гемолімфи та забарвлення мазків здійснювали як описано раніше [9]. Аналізували по 2–3 мазки гемолімфи кожної тварини (усього 560 мазків). Морфологію гемоцитів досліджували за допомогою мікроскопа Біолам та мікрометра окулярного гвинтового АМ-9–2. Форму клітин оцінювали планіметрично (за вимірами їх осей на мазках). Вимірювали довжину та ширину клітини, а також довжину та ширину ядра. Для кожного показника розраховували середнє зі 100 вимірювань. Для тривимірної реконструкції морфометричних ознак гемоцитів за отриманими даними розраховували об'єм і площу поверхні клітини та ядра за формулами для відповідних стереометричних тіл (кулі та витягнутого сфероїда). Використовували загальноновживані методи варіаційної статистики [10]. Класифікаційні процедури здійснювали деревовидною кластеризацією нестандартизованого масиву середньовибіркових значень морфометричних параметрів, ординаційні — із застосуванням дискримінантного аналізу з визначенням статистики Уїлкса (λ) за допомогою прикладних статистичних програм Excel 2003 та Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., 2001, США).

Результати дослідження та їх обговорення. Аналіз мазків гемолімфи за допомогою світлової мікроскопії показав наявність багатоядерних утворень — плазмодіїв та п'яти типів гемоцитів, описаних нами раніше [9]: десмобластів (ДБ, рис. 1, а, б); базофільних гранулоцитів (БГ, рис. 1, з); еозинофільних гранулоцитів (ЕГ, рис. 1, в); мікроцитів базо-

фільних (МЦ_Б) та еозинофільних (МЦ_Е). У досліджуваних видів ДБ є основною фракцією гемоцитів, їх частка в гемограмах становить 87–100%. Частка БГ становить 0–10%. ЕГ та МЦ можна вважати мінорними фракціями клітин гемолімфи: ЕГ присутні практично на всіх мазках, проте в невеликих кількостях (0–26 клітин у розрахунку на 100 клітин мазка), кількість МЦ коливається в межах 0–15 на 100 клітин.

Попереднє дослідження показало відсутність внутрішньовидових (індивідуальних та популяційних) відмінностей морфометричних параметрів гемоцитів згаданих видів [9, 11]. Парне порівняння метричних характеристик клітин та ядер ДБ, БГ та ЕГ досліджуваних видів за *t*-критерієм Стюдента виявило вірогідні міжвидові відмінності в їх розмірах. Найменшими виявились усі типи клітин *B. fruticum*, найбільшими — більшість типів гемоцитів *H. lucorum* (лише БГ у *H. pomatia* не менші, а за окремими параметрами — вірогідно переважають відповідні клітини *H. lucorum*). Так, за даними аналізу параметрів ДБ (табл. 1), досліджувані види формують такий ряд поступового зростання розмірів клітин та ядер (< — різниця вірогідна не менше ніж за п'ятьма з восьми досліджуваних показників; = — вірогідної різниці немає; ≤ — різниця вірогідна за чотирма з восьми досліджуваних показників):

$$\begin{array}{ccccccc}
 B. \textit{fruticum} < & H. \textit{pomatia} < & C. \textit{vindobonensis} \leq & E. \textit{vermiculata} < & H. \textit{lucorum} \\
 & \parallel & & \parallel & \\
 & H. \textit{albescens} & & A. \textit{arbustorum} & \\
 & & & \parallel & \\
 & & & H. \textit{lutescens} &
 \end{array}$$

Отже, застосування *t*-статистики не дає однозначної відповіді на питання щодо можливої видоспецифічності комплексу морфометричних характеристик гемоцитів. З метою виявлення стійких відмінностей за розмірними характеристиками клітин по всьому комплексу кількісних показників шести видів було проведено лінійний дискримінантний аналіз, який дозволив визначити внесок кожної ознаки у видоспецифічність форми. Значення R_{Rao} — трансформованого багатовимірного аналога *F*-критерію ($R_{Rao} = 15,1, p \ll 0,001$), показало високу значущість впливу незалежної змінної “належність виду” на стійкість міжвидових відмінностей. У ході аналізу було визначено п'ять дискримінантних функцій, що мають вірогідну значущість. Значення λ Уїлкса для всіх функцій коливалися в межах 0,010–0,015, що свідчить про хороший рівень дискримінації (досліджені угруповання достатньо гетерогенні й ознаки, що здійснюють максимальний внесок у розділення об'єктів, визначені), а значення коефіцієнта канонічної кореляції *r*, навпаки, знижувалось від 0,89 у першій функції до 0,40 — у п'ятій. Усі визначені функції мають достатньо дискримінуючу здатність.

У відповідності зі значеннями групових середніх (табл. 2), вони послідовно виділяють: 1-ша функція — вид *E. vermiculata* з усієї сукупності об'єктів ($R_{1E.vermiculata} = -3,43$; максимальне значення *F*1); 2-га — види *B. fruticum* ($R_{2B.fruticum} = 2,52$) та, меншою мірою, *H. lucorum* ($R_{2H.lucorum} = -1,86$); 3-тя — види *H. pomatia* та *H. lucorum* ($R_{3H.pomatia} = -1,77$, $R_{3H.lucorum} = 1,79$); 4-та — *A. arbustorum* ($R_{4A.arbustorum} = -2,19$). Вид *H. albescens* виділяється 5-ю дискримінантною функцією ($R_{5H.albescens} = -1,19$).

Графічні приклади розділення об'єктів за допомогою дискримінантних функцій наведені на рис. 2, де всі шість видів розділені в просторі значень перших двох (а) та третьої і четвертої (б) дискримінантних функцій.

Аналіз стандартизованих коефіцієнтів канонічних функцій свідчить про те, що більшість показників є зв'язаними з дискримінантними функціями. Так, наприклад, найбіль-

Таблиця 1. Розміри десмобластів досліджуваних видів молюсків ($x \pm Sx$)

Вид	Довжина клітини, мкм	Ширина клітини, мкм	Об'єм клітини, мкм ³	Площа поверхні клітини, мкм ²	Довжина ядра, мкм	Ширина ядра, мкм	Об'єм ядра, мкм ³	Площа поверхні ядра, мкм ²
<i>A. arbustorum</i>	16,53 ± 0,35	11,03 ± 0,16	1169,03 ± 15,24	531,86 ± 15,24	9,99 ± 0,28	3,86 ± 0,12	86,64 ± 5,11	103,31 ± 4,35
<i>E. vermiculata</i>	17,63 ± 0,36	12,20 ± 0,25	630,13 ± 22,86	630,13 ± 22,86	9,22 ± 0,26	4,06 ± 0,08	88,40 ± 5,53	101,95 ± 4,05
<i>B. fruticum</i>	12,29 ± 0,30	8,78 ± 0,17	313,11 ± 13,24	313,11 ± 13,24	7,12 ± 0,23	3,67 ± 0,09	55,15 ± 3,64	72,29 ± 3,52
<i>C. vindobonensis</i>	16,12 ± 0,45	11,05 ± 0,25	529,44 ± 27,70	529,44 ± 27,70	9,33 ± 0,35	4,23 ± 0,08	100,16 ± 5,96	108,75 ± 5,17
<i>H. albescens</i>	14,33 ± 0,19	10,05 ± 0,20	427,01 ± 10,73	427,01 ± 10,73	7,83 ± 0,18	3,71 ± 0,09	62,35 ± 3,16	79,87 ± 2,92
<i>H. lucorum</i>	19,25 ± 0,35	14,43 ± 0,32	902,30 ± 23,75	902,30 ± 23,75	8,17 ± 0,21	3,96 ± 0,12	77,75 ± 4,01	90,63 ± 3,36
<i>H. lutescens</i>	16,47 ± 0,31	11,85 ± 0,37	607,90 ± 31,51	607,90 ± 31,51	8,38 ± 0,14	4,19 ± 0,07	104,08 ± 2,07	102,80 ± 2,01
<i>H. pomatia</i>	14,29 ± 0,44	9,21 ± 0,25	388,04 ± 21,63	388,04 ± 21,63	8,64 ± 0,31	3,65 ± 0,11	71,42 ± 6,57	86,69 ± 5,02

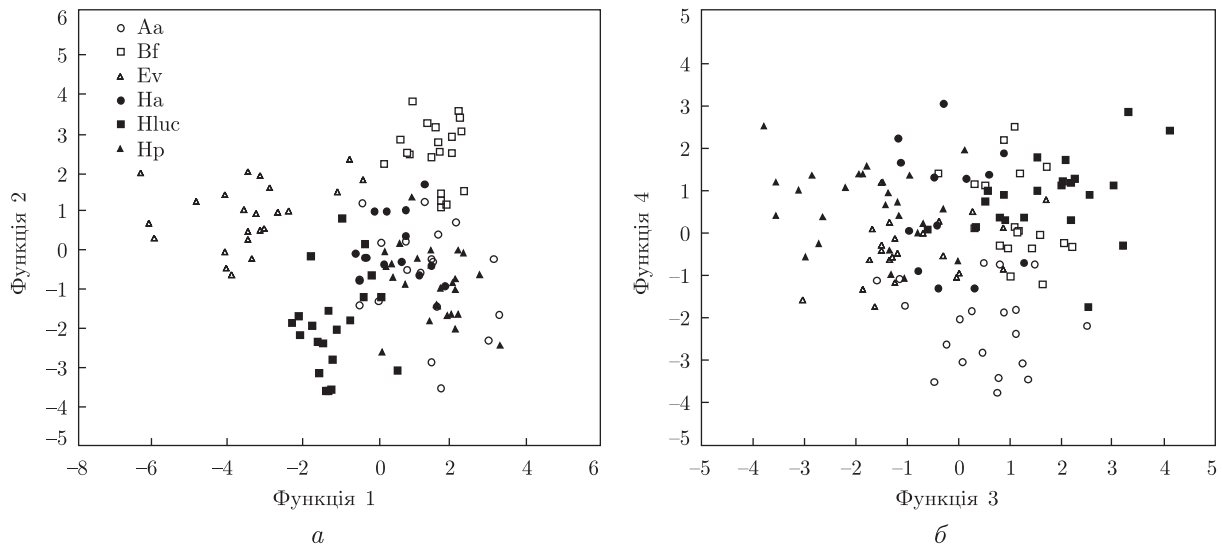


Рис. 2. Розділення досліджуваних видів у просторі дискримінантних функцій: *a* — першої і другої; *б* — третьої та четвертої (Aa — *A. arbustorum*, Bf — *B. fruticum*, Ev — *E. vermiculata*, Ha — *H. albescens*, Hluc — *H. lucorum*, Hp — *H. pomatia*)

ший внесок у першу дискримінантну функцію здійснюють показники довжини клітини і ядра ДБ ($\beta = -1,18$ та $\beta = 1,28$ відповідно). Кожна наступна дискримінантна функція виявляється зв'язаною з кількома специфічними для неї параметрами, значення стандартизованих коефіцієнтів яких коливається в межах $|0,74| - |1,98|$. Середня ефективність визначення видової специфічності при використанні дискримінантних функцій, побудованих за 15 параметрами для шести видів, досягає 88,6%.

Проведений за досліджуваними метричними параметрами кластерний аналіз виявив наявність двох кластерів (відстань між ними становить близько 22 евклідових одиниць) (рис. 3). У перший об'єдналися види роду *Helix* та *E. vermiculata* (представники підродини Helicinae), у другий — *A. arbustorum* (підродина Ariantinae) та *B. fruticum*. Види другого кластеру характеризуються близькими біотопічними перевагами: заселяють переважно достатньо вологі місцезнаходження (чагарники, ліси, узлісся).

На відстані 12 евклідових одиниць види першого кластеру утворюють два менших, в один з яких об'єдналися *H. pomatia* та *H. albescens*, а в інший — *H. lutescens* та *H. lucorum* з *E. vermiculata*. Можливо, близький характер морфометричної структури гемоцитів видів другого малого кластеру (*H. lutescens*, *H. lucorum*, *E. vermiculata*) сформувався як адапта-

Таблиця 2. Внутрішньогрупові середні значення канонічних дискримінантних функцій

Вид	Значення функцій				
	1	2	3	4	5
<i>A. arbustorum</i>	1,28	-0,65	0,43	-2,19	-0,05
<i>B. fruticum</i>	1,58	2,52	1,11	0,50	0,23
<i>E. vermiculata</i>	-3,43	0,94	-0,86	-0,39	0,08
<i>H. albescens</i>	0,43	0,16	-0,19	0,70	-1,19
<i>H. lucorum</i>	-1,12	-1,86	1,79	0,83	0,15
<i>H. pomatia</i>	1,53	-0,84	-1,77	0,63	0,26

Примітка. Напівжирним шрифтом виділені максимальні (дискримінуючі) значення функцій.

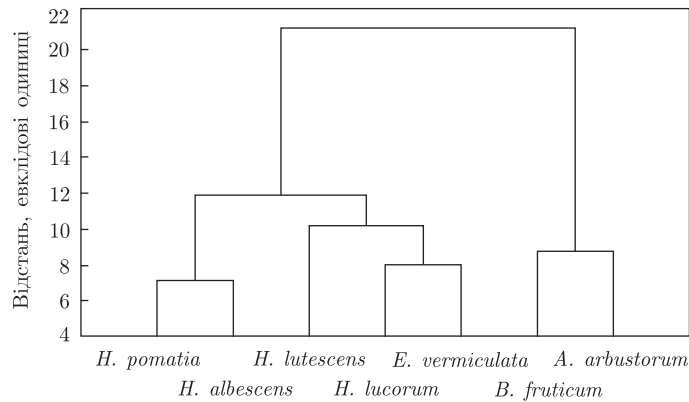


Рис. 3. Дендрограма подібності морфометричних характеристик гемоцитів досліджуваних видів молосків

ція до близьких ландшафтно-біотопічних умов (насамперед, ксеротермності місцеіснувань). З іншого боку, з видів, що об'єдналися у другий малий кластер, *H. pomatia* є мезофілом, а *H. albescens* — ксеромезофільним видом. В урбанізованих ландшафтах східного Криму у спільних поселеннях зустрічаються *H. albescens* та *E. vermiculata*, але щільність популяцій кожного з видів варіює залежно від мікрокліматичних особливостей: перший переважає у відносно вологіших місцеіснуваннях (парки, палісадники тощо), другий — у більш сухих (схили з трав'янисто-рідкочагарниковою рослинністю).

Аналіз дендрограми дозволяє також припустити, що, крім видової, існує, вірогідно, певна специфічність досліджуваних параметрів на рівні більш високих таксонів, проте наявні дані не дозволяють однозначно виявити таксономічний рівень цієї специфічності.

Таким чином, на прикладі шести видів з двох підродин доведено видоспецифічність комплексу морфометричних характеристик гемоцитів наземних червононогих молосків родини Helicidae.

1. Куликов А. М., Мельников А. И., Горностаев Н. Г. и др. Морфометрический анализ половых органов самцов видов-двойников *Drosophila virilis* L // Генетика. – 2004. – 40, № 1. – С. 1–15.
2. Киричук Г. Є., Стадніченко А. П. Вплив іонів міді на везикулярні клітини гемолімфи *Planorbarius purpura* (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata: Bulinidae) у нормі та за інвазії трематодами // V Всеукр. наук.-практ. інтернет-конф. “Сучасна наука в мережі інтернет, режим доступу до ресурсу”: <http://intkonf.org/kbn-kirichuk-ge-dbn-stadnichenko-ap-vplivioniv-midi-na-vezikulyarni-klitini-gemolimfi-planorbarius-purpura-mollusca-gastropoda-pulmonatabulinidae-u-normi-i-za-invaziyi-trematodami/>.
3. Исаева В. В., Подгорная О. И. Поведение гемоцитов моллюска *Patinopecten yessoensis* в первичной культуре // Цитология. – 1984. – 26, № 10. – С. 1151–1155.
4. Яковлева Н. В. Морфо-функциональная характеристика гемолимфы *Littorina littorea* (Gastropoda: Prosobranchia) в норме и при инвазии паргенидами трематод: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.25. – Ст.-Петербург, 2005. – 167 с.
5. Vostal Z. Príspevok k cytologii hemocytov ulitnikov (Gastropoda) // Biologia (Bratislava). – 1969. – 24, No 5. – P. 384–391.
6. Стадніченко А. П. Прудовиковые и чашечковые (Lymnaeidae, Acroloxidae) Украины. – Киев: Центр учеб. лит., 2004. – 327 с.
7. Заварзин А. А. Основы сравнительной гистологии. – Ленинград: Изд-во Ленинград. ун-та, 1985. – 400 с.
8. Adamowicz A., Bolaczek M. Blood cells morphology of the snail *Helix aspersa maxima* (Helicidae) // Zool. Pol. – 2003. – 48/1, No 4. – P. 93–101.
9. Грив О. К., Хлус Л. М. Цитологічна характеристика гемолімфи *Helix albescens* Rssm. та *Eobania vermiculata* Mull. // Наук. вісн. Чернівець. ун-ту: Зб. наук. праць. – 2007. – Вип. 343: Біологія. – С. 34–41.

10. Лакін Г. Ф. Биометрия. – Москва: Высш. шк., 1990. – 352 с.
11. Хлус Л. М. Цитологічна характеристика гемолімфи *Helix lutescens* Rssm. та *Helix albescens* Rssm. у різних фізіологічних станах // Клініч. та експерим. патологія. – 2003. – 2, № 1. – С. 89–92.

Чернівецький національний університет
ім. Юрія Федьковича

Надійшло до редакції 24.12.2009

V. K. Rakochij, L. M. Khlus, M. M. Marchenko

**Interspecies morphometric variations of hemocytes of mollusks family
Helicidae (Gastropoda)**

The morphometric variability of hemocytes of 6 land snails species: Helix pomatia L., H. lutescens Rssm., H. lucorum L., Arianta arbustorum L., Eobania vermiculata Mull (Family Helicidae), and Bradybaena fruticum Mull. (Family Bradybenidae) is investigated. The species-specificity of a morphometric hemocytes characteristics complex of family Helicidae is revealed.