

Беломорская биологическая
станция имени Н.А. Перцова

**Отчет по практике студентов
2 курса кафедры клеточной
биологии и гистологии**

2017г.

Ткани внутренней среды

Докладывают:

Мазина Людмила

Соломатина Евгения

Цели:

- Освоить методику приготовления отпечатков и мазков тканей внутренней среды беспозвоночных животных.
- Рассмотреть и проанализировать мазки и отпечатки паренхимы и гемолимфы, провести сравнение между классами.
- Проанализировать качественно-количественный состав интерстициальных тканей беспозвоночных, попытаться определить функцию клетки по ее морфотипу.

Объекты исследования:

- *Arenicola marina*
- *Ophelia limacina*
- *Asterias rubens*
- *Gasterosteus aculeatus*



Ход работы:

- Подготовка мазков гемолимфы и целомической жидкости: с помощью шприца на предметное стекло наносилась капля пробы, после чего покровным стеклом капля растягивалась тонким слоем;
- Высушивание образцов в течение 30 минут;
- Фиксация: стекла помещались в кюветы Колпина, заливались фиксатором на 20 минут, после чего были извлечены и высушены
- Отмывка от фиксатора: с помощью кювет Колпина образцы отмывались с помощью буфера Серенсена - раствор заливался в кювету на 10 минут три раза;
- Окрашивание: краситель заливался в кюветы на 1,5 часа;
- Отмывка дистиллятом от красителя.

Тип клеток	Название, найденное в литературе	Функции и дополнения
O1	базофильный незернистый амёбоцит	взрослая форма
O2	базофильный незернистый амёбоцит	взрослая форма
O4	базофильный незернистый амёбоцит	взрослая форма
A6	эозинофильный лейкоцит	ранняя стадия дифференцировки
A7	клетка с вакуолями (базофильный полостной амёбоцит)	Старая дегенерирующая форма базофильного незернистого амёбоцита
A8	Базофильный незернистый амёбоцит	самый мелкий представитель, вероятнее всего наименее дифференцированная форма
O9	амёбоцит веретенчатой формы	Дифференцированная стадия развития полостного амёбоцита, активный фагоцитоз и движения.
O10	бактероидная клетка	включение содержит продукты обмена меланина
A11	Гемамёбоцит	похожи на мелкие базофильные незернистые амёбоциты, делятся митозом
E12	крупный зернистый амёбоцит	поздняя стадия дифференцировки
E13	незернистый амёбоцит	активные фагоциты
E14.1	незернистый амёбоцит	активные фагоциты
E14.2	незернистый амёбоцит	активные фагоциты
E14.3	незернистый амёбоцит	вероятно, самая молодая форма
E15	возможно экскреторная клетка, возможно трофическая (аналог эдеоцита)	накапливает продукты обмена в целомах и выходит из организма. Или же запасает



Результаты и обсуждение:

Gasterosteus aculeatus

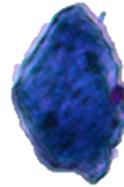
	Кол-во, %	Особенности/Функции
Эозинофильный амебоцит	3,2	Способны к фагоцитозу, иммунорегуляторы
Нейтрофильный гранулярный амебоцит	1,3	Имеются гранулы (фиолетовой окраски), способны к фагоцитозу, главные участники неспецифической защиты
Макрофаг	11,4	Способен к движению (распластанная форма), защитная функция - фагоцитоз патогенов
Эритроциты	76,7	Перенос O_2 и CO_2
Базофил	5,4	Секреция факторов, определяющих функционирование других клеток
Лимфоцит	1	Осуществляют реакции специфического иммунитета



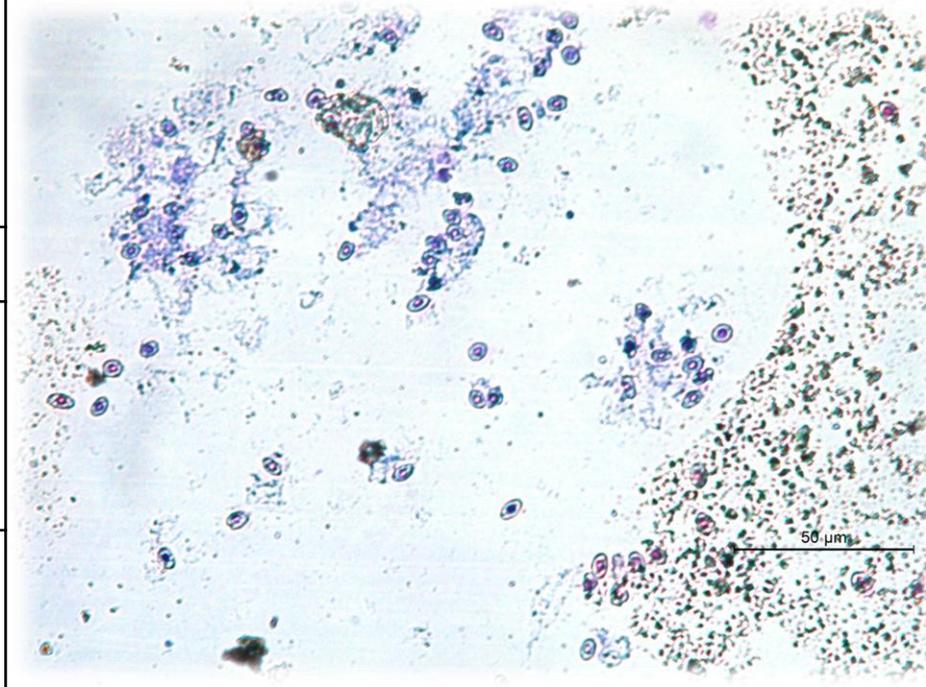
- эритроцит



- эозинофильный амебоцит

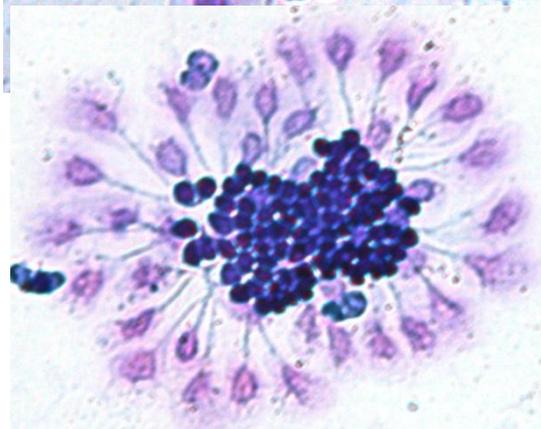
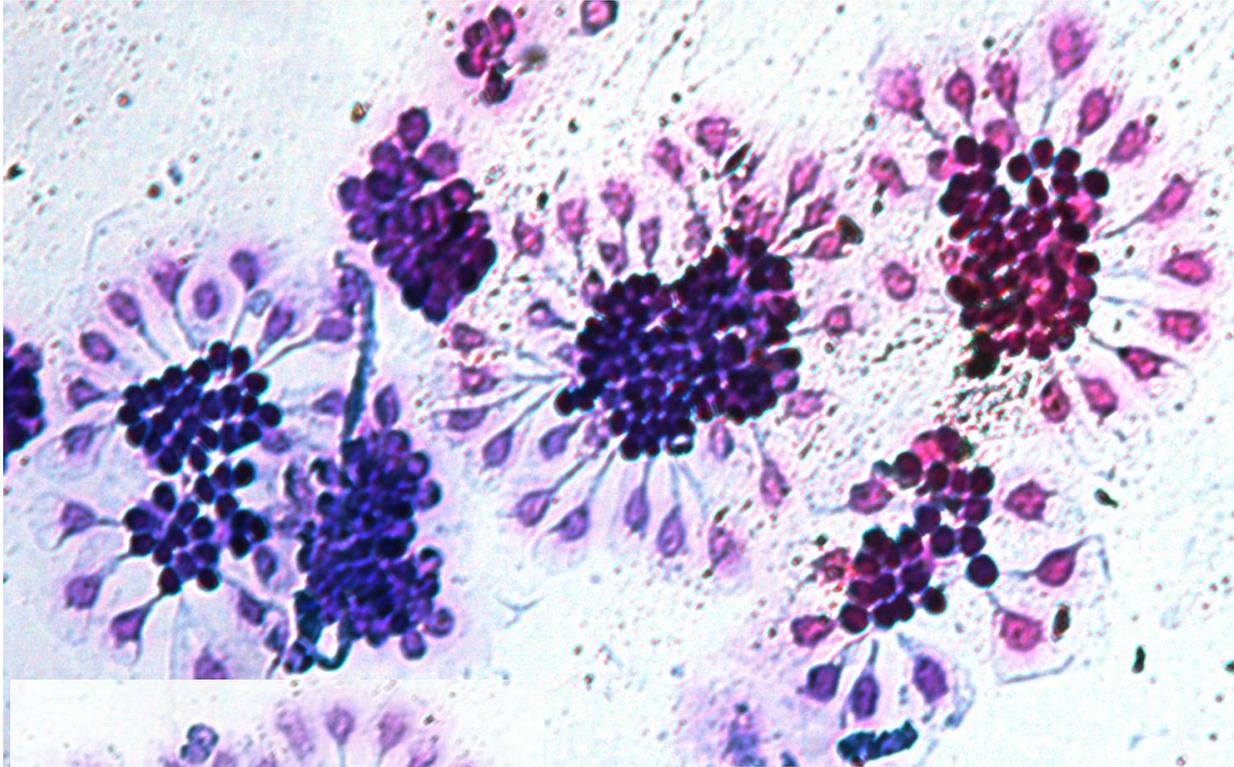


- макрофаг

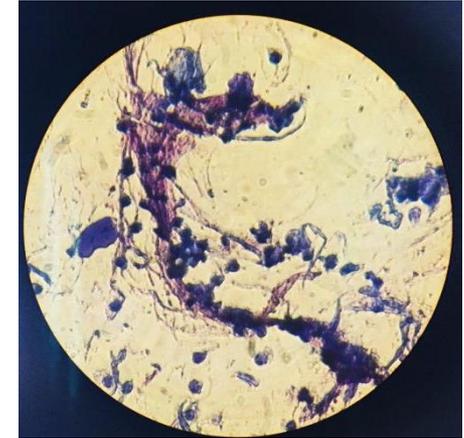


Arenicola marina

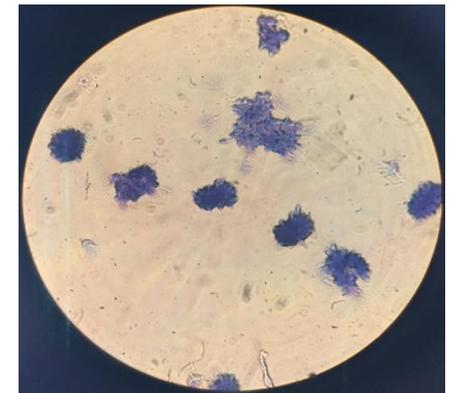
- Гемолимфа.



скопление
нейтрофильных
амебоцитов, по
периферии расположены
эозинофильные
гранулярные амебоциты



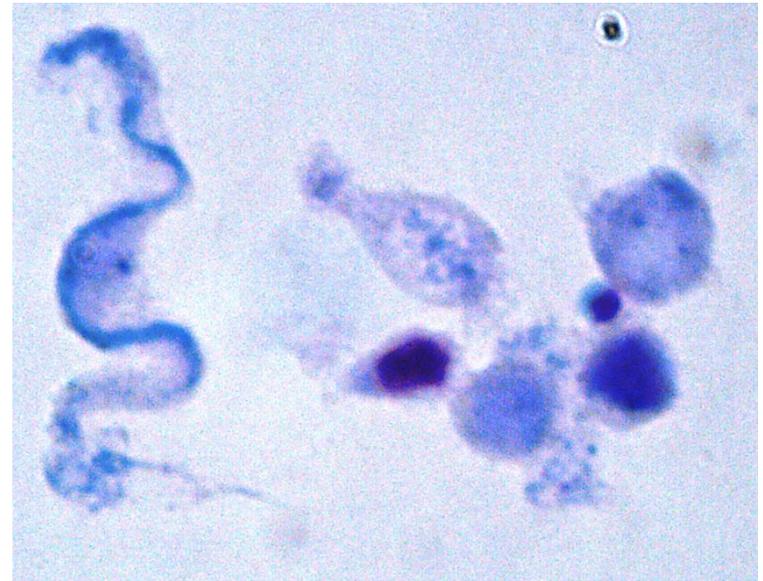
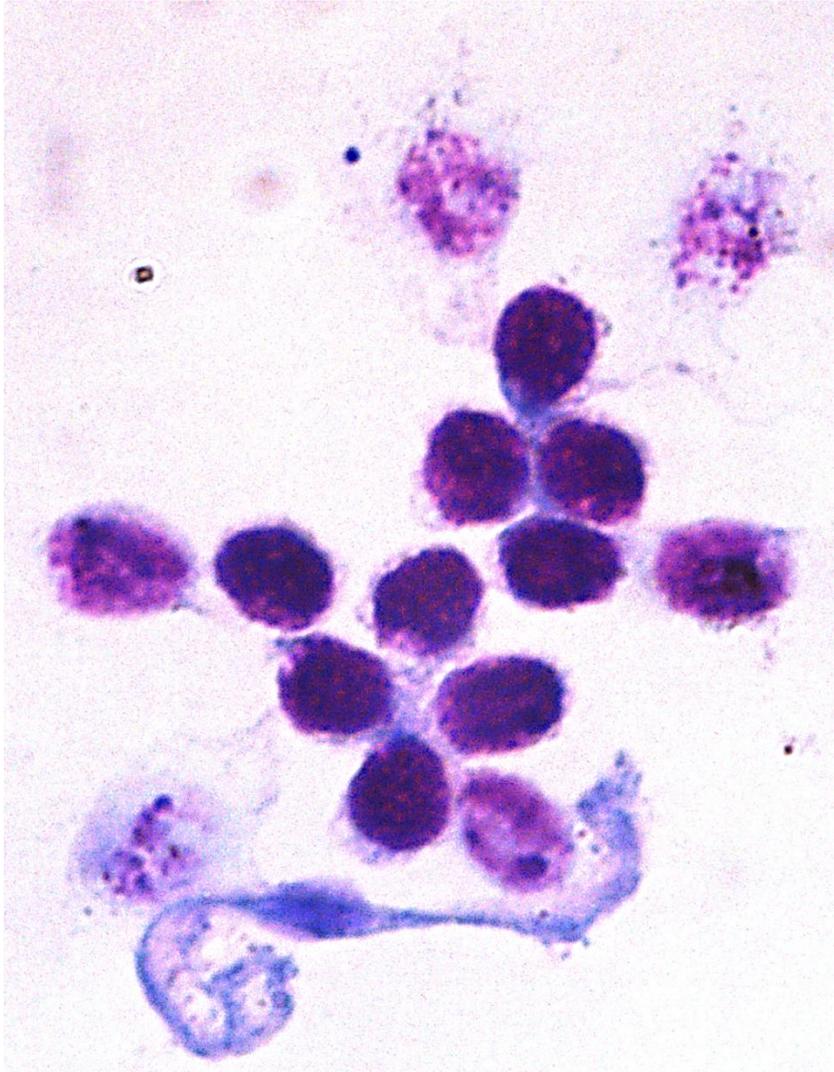
Иностранное включение и скопления
базофильных амёбоцитов



скопления
базофильных амёбоцитов

Arenicola marina

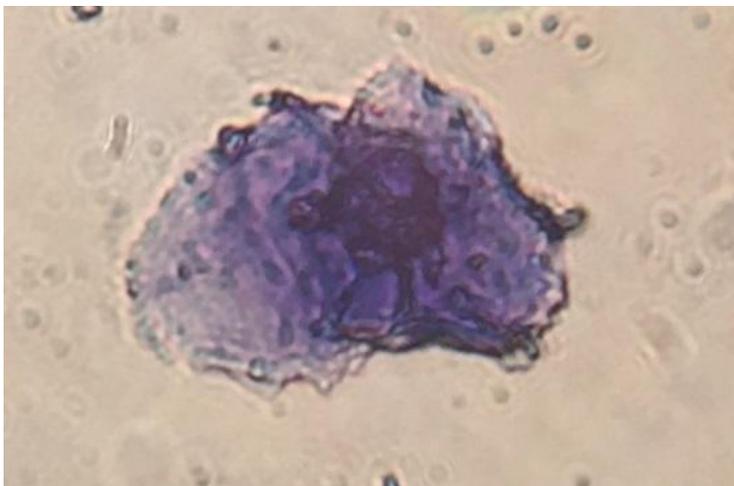
- Гемолимфа.



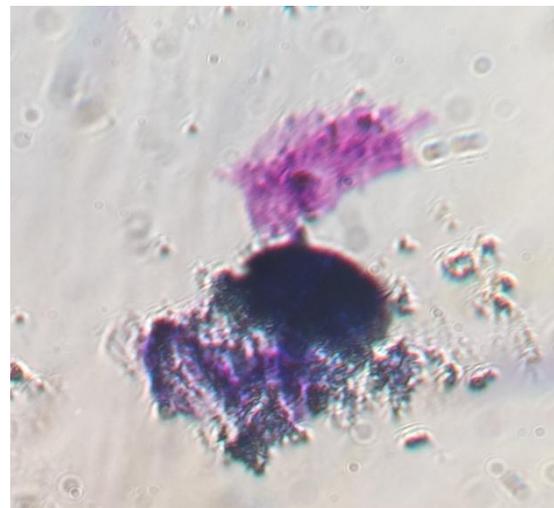
Arenicola marina

- Целомическая жидкость.

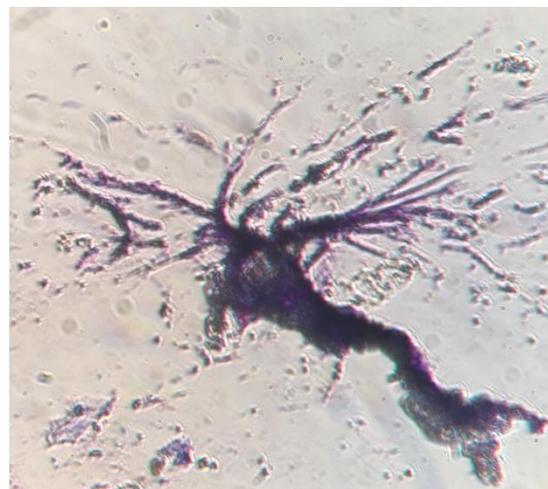
Название клетки	Кол-во, %	Особенности/Функции
Базофильные негранулярные амебоциты	76,7	Способны к фагоцитозу, осуществляют реакции клеточного иммунитета
Нейтрофильные амебоциты	16,7	Слабо фиолетовое окрашивание цитоплазмы
Эозинофильные амебоциты	6,6	Осуществляют реакции гуморального иммунитета



базофильный незернистый амебоцит



«волосатая» клетка



инородное включение

Ophelia limacine

- Гемолимфа.



веретеновидные базофилы



базофильные амебоциты



нейтрофильные
амебоциты



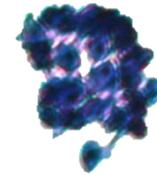
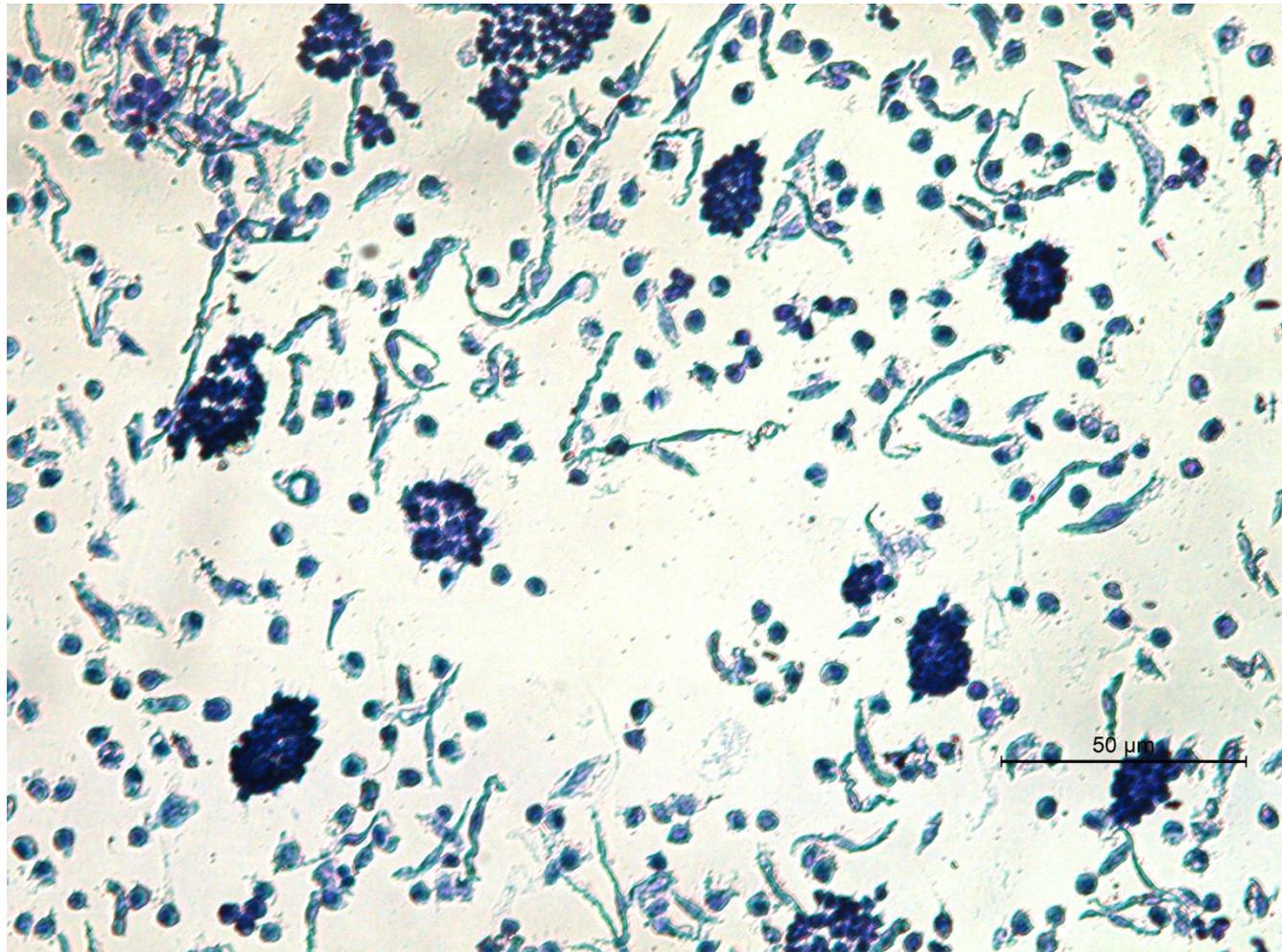
Эозинофильные
амебоциты



«клетка-палка»

Asterias rubens

- Гемальная жидкость.



и скопления
- базофильных
амёбоцитов



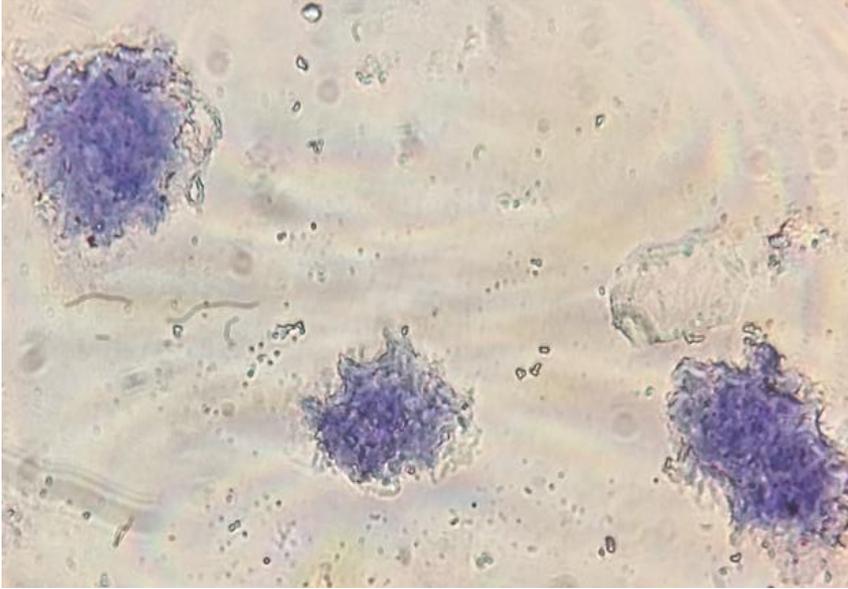
- веретеновидные
базофилы



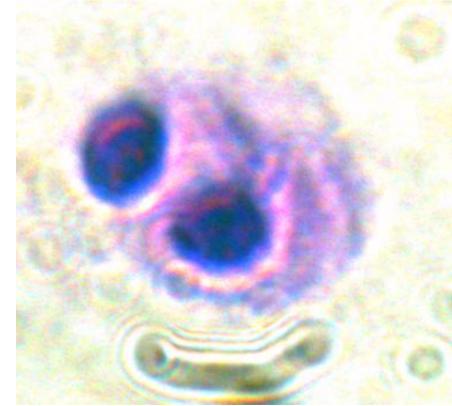
- камбиальные
базофильные
амебоциты

Asterias rubens

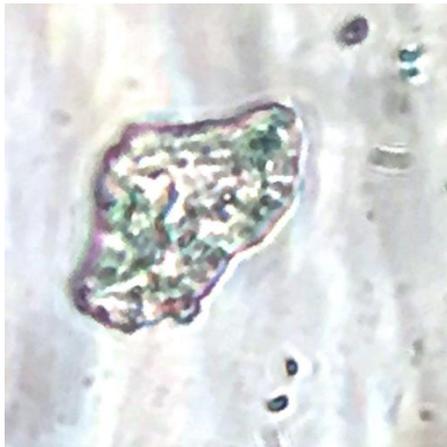
- Амбулакральная жидкость



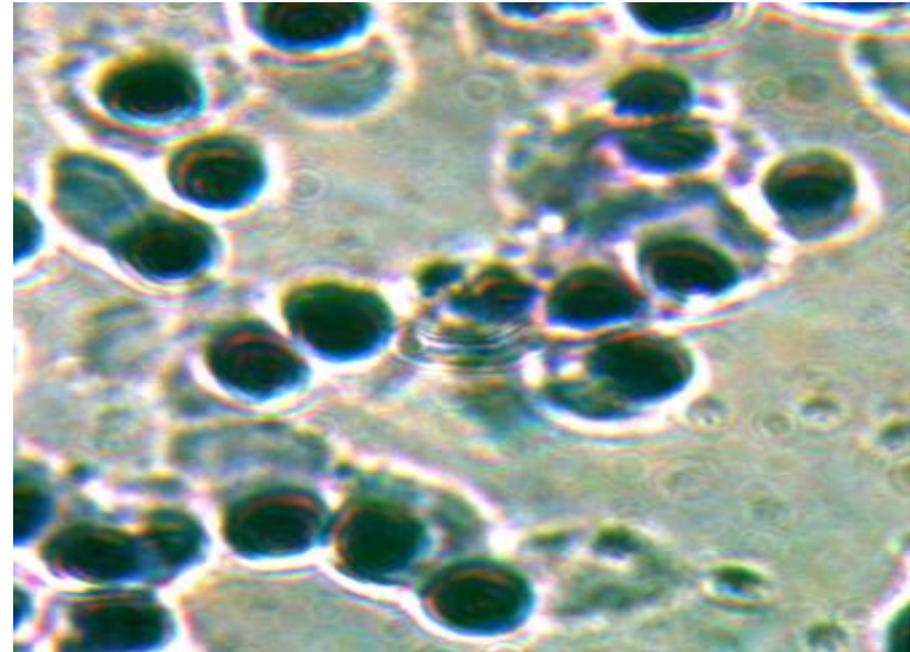
базофильные амебоциты



эозинофильные амебоциты



экскреторная клетка



базофильные агранулярные мигрирующие амебоциты

Выводы:

- Самые качественные мазки были получены у *Arenicola marina*.
- При сравнении препаратов гемолимфы разных видов многощетинковых червей было установлено, что:
 - число базофильных амёбоцитов на препарате гемолимфы *Arenicola marina* значительно выше
 - в крови *Arenicola* были обнаружены эозинофильные амёбоциты, которых не было найдено у *Orphelia limacin*
 - У *Orphelia limacina* были обнаружены нейтрофильные амёбоциты, не упоминавшиеся в литературе ранее
- Найдено два типа клеток («волосатая клетка» и «клетка-палка») функциональное назначение которых требует дальнейшего изучения.
- У *Asterias rubens* найдены специализированные экскреторные клетки, которых не было найдено в гемолимфе у других объектов.
- Количественный и качественный состав отдельных типов тканей внутренней различается в зависимости от вида беспозвоночного. Различие в составе разных типов тканей одного вида обусловлено дифференцировкой в процессе эмбриогенеза.



**Асептическое воспаление в
тканях *Asterias rubens* и
*Halosynthia pyriformis***

Докладывают:
Иванова Анастасия,
Красина Марина
Устименко Анна

20 μm

Цель работы:

- ✓ Описать клетки, участвующие в асептическом воспалении у беспозвоночных.
- ✓ Сравнить состав и морфологию клеток в культуре и в очаге асептического воспаления.

Объекты исследования

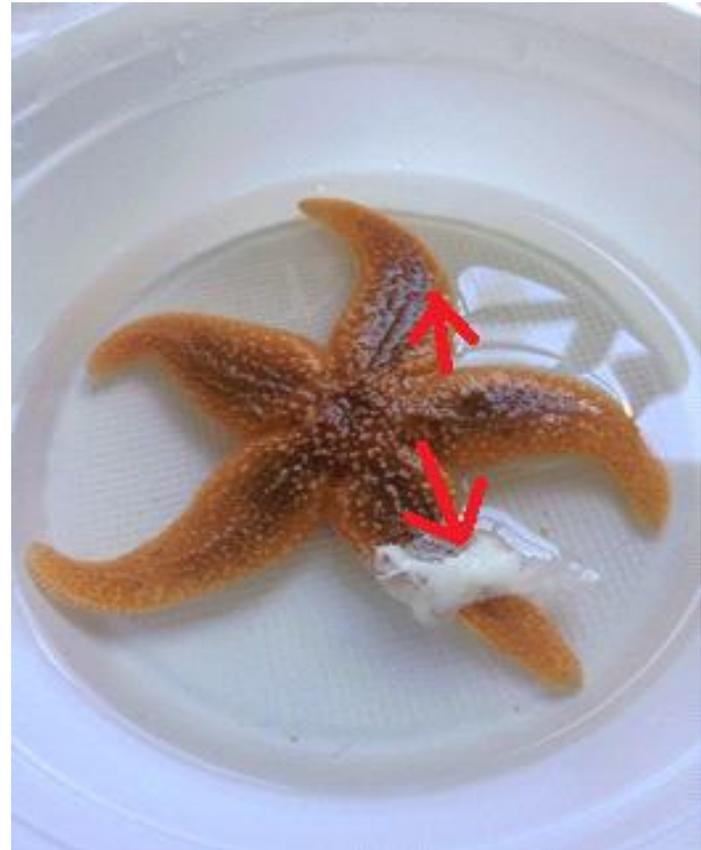
- ✓ *Asterias rubens*
- ✓ *Halocynthia pyriformis*
- ✓ *Mytilus edulis* (контрольный препарат)

Ход работы



Анестетик для
облегчения
проведения
операции

A. rubens после
операции

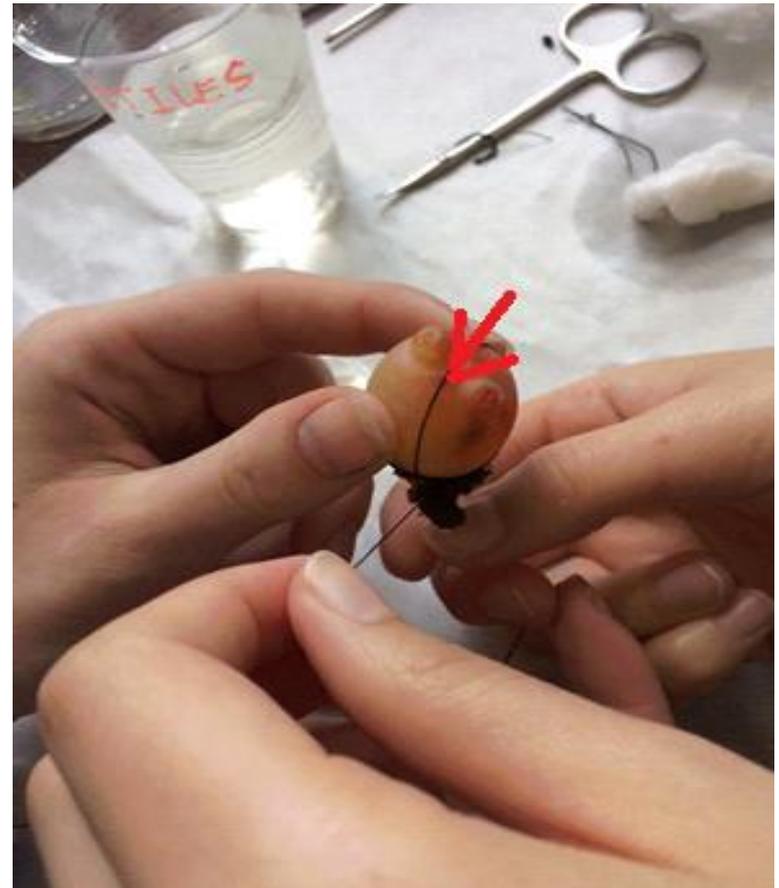


Ход работы



Проведение операции
H. pyriformis

Закрепление стекол
с помощью ниток

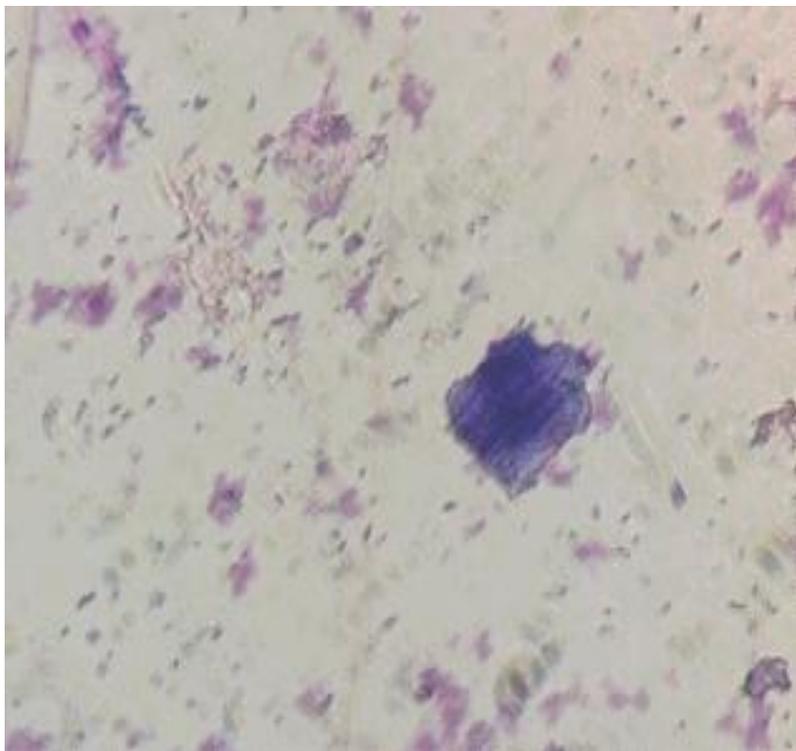


Используемые реактивы

1. Раствор антибиотика гентамицина (25 мкл на 50 мл дистиллированной воды) для дезинфекции
2. Раствор $MgCl_2$ (5 мл 0,1М р-ра на 100 мл фильтрованной морской воды)
3. 100-200 мкл лидокаина для анестезии
4. 3% перекись водорода для дезинфекции
5. Фиксатор: 4% ПФА на PBS.
6. Краситель: азур–эозин (1 мл готового красителя на 100 мл дистиллята с рН=7, добавить 50 мкл 40% NaOH до рН 7.4-7.6)
7. Глицерин и мовиол для заключения препаратов

Полученные результаты

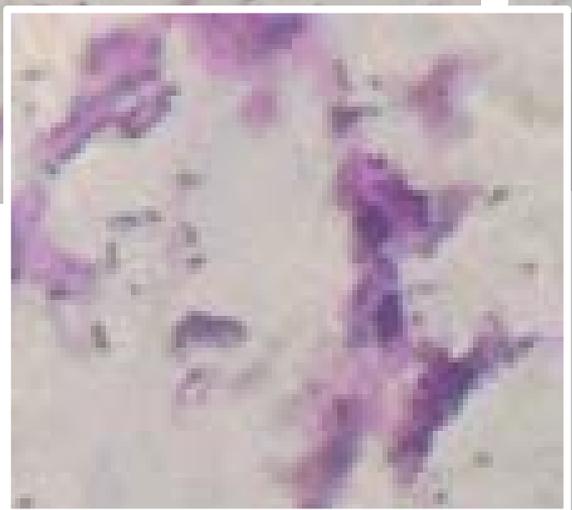
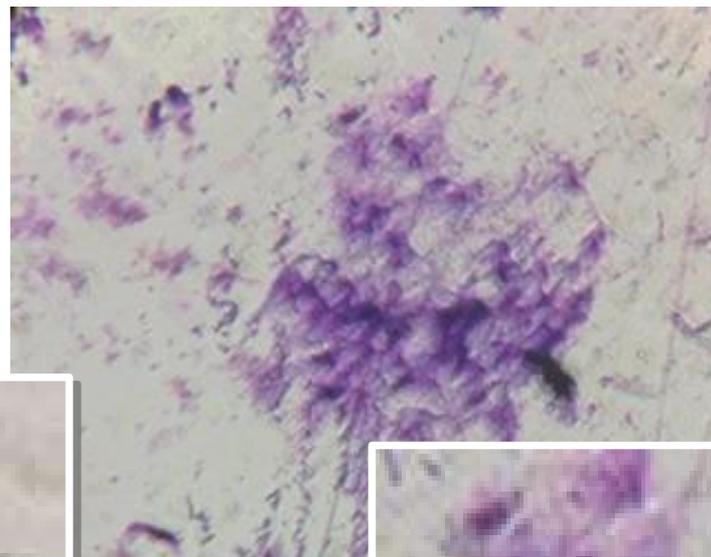
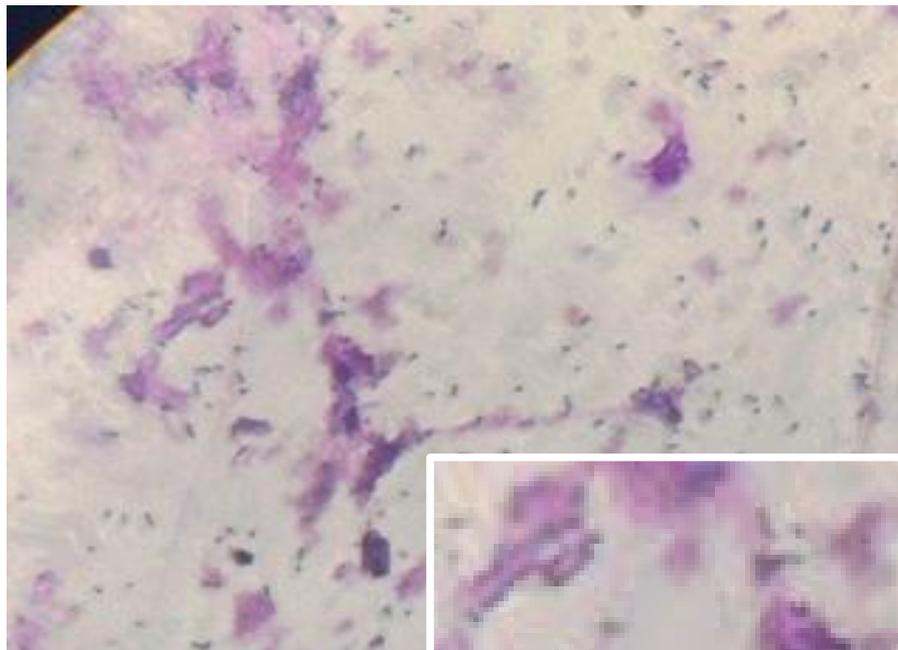
Asterias rubens (2-е сутки воспаления)



Крупные базофильные клетки. (40x)

Полученные результаты

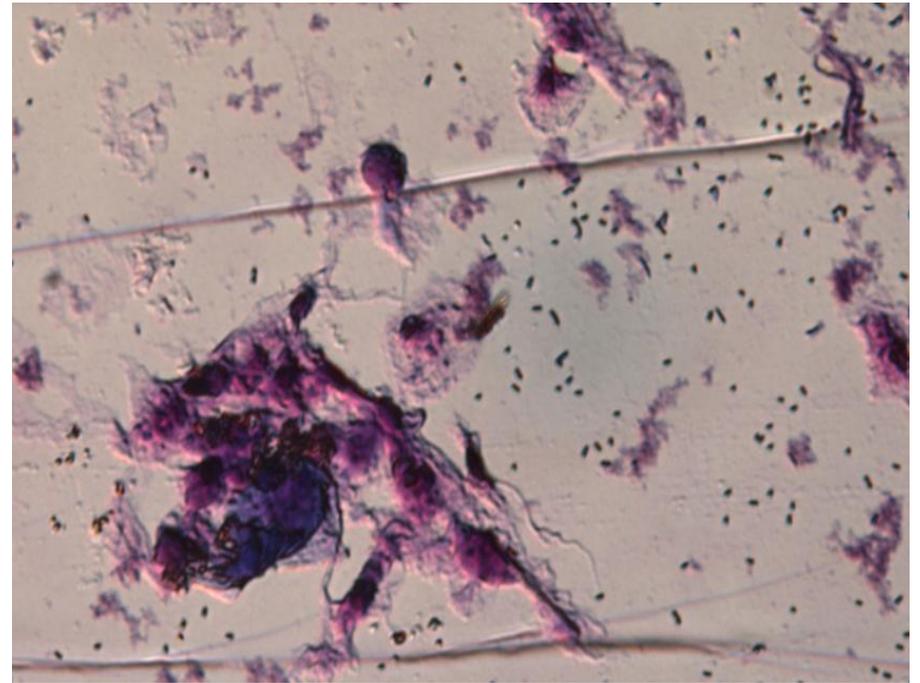
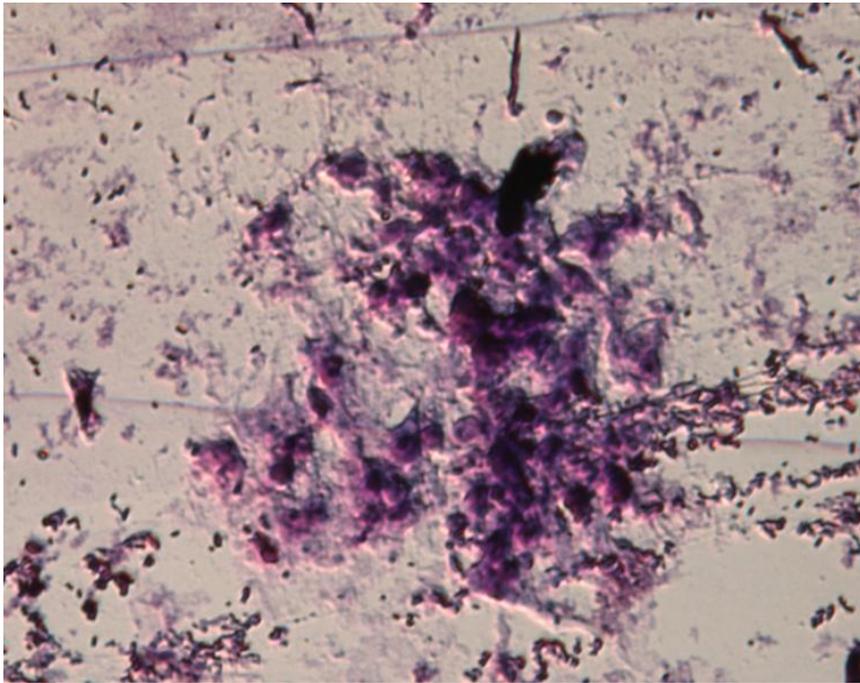
Asterias rubens (2-е сутки воспаления)



Скопления нейтрофильных амебоцитов с отростками. (40x)

Полученные результаты

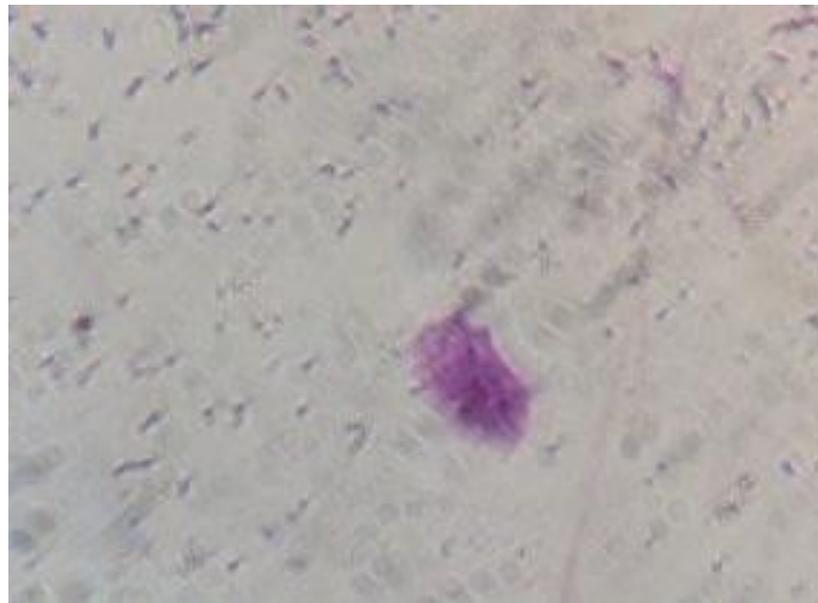
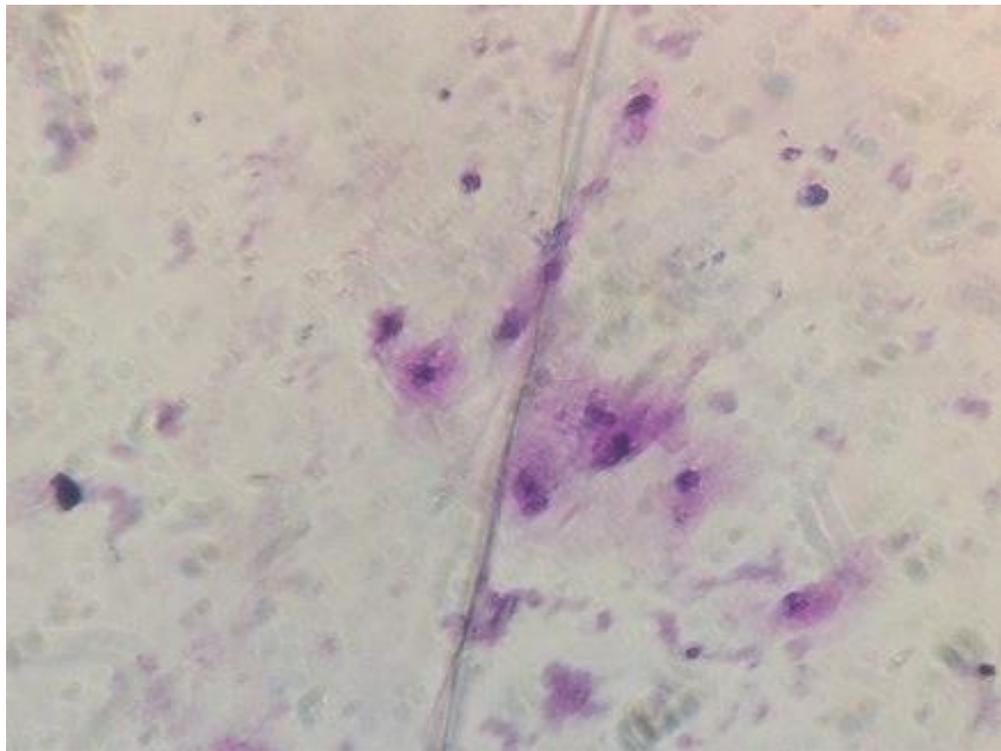
Asterias rubens (2-е сутки воспаления)



Скопления нейтрофильных амебоцитов с отростками. (40x)

Полученные результаты

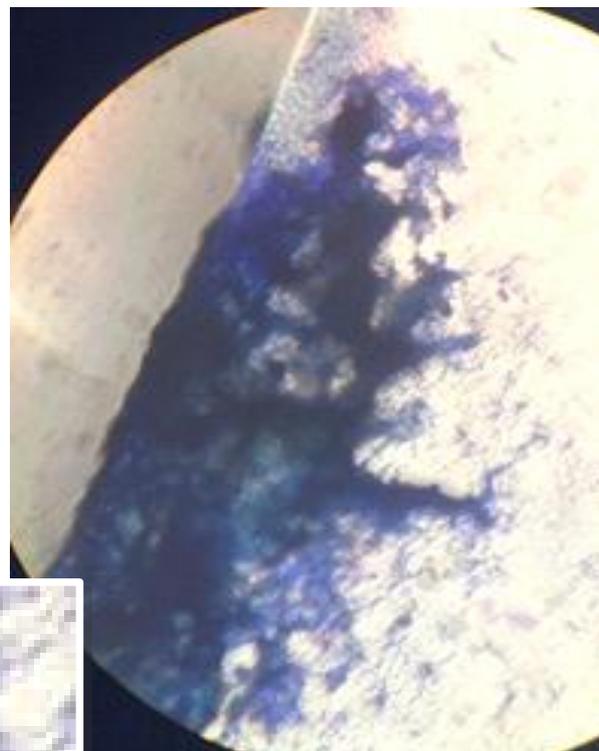
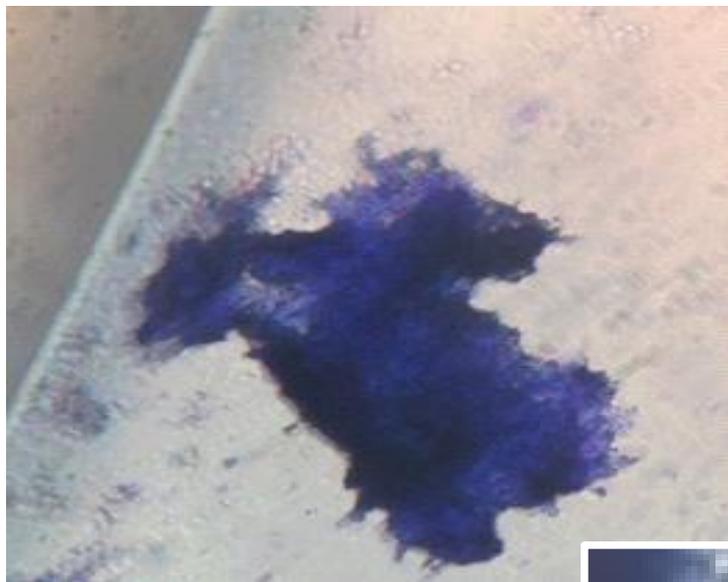
Asterias rubens (2-е сутки воспаления)



Эозинофильные амебоциты. (40x)

Полученные результаты

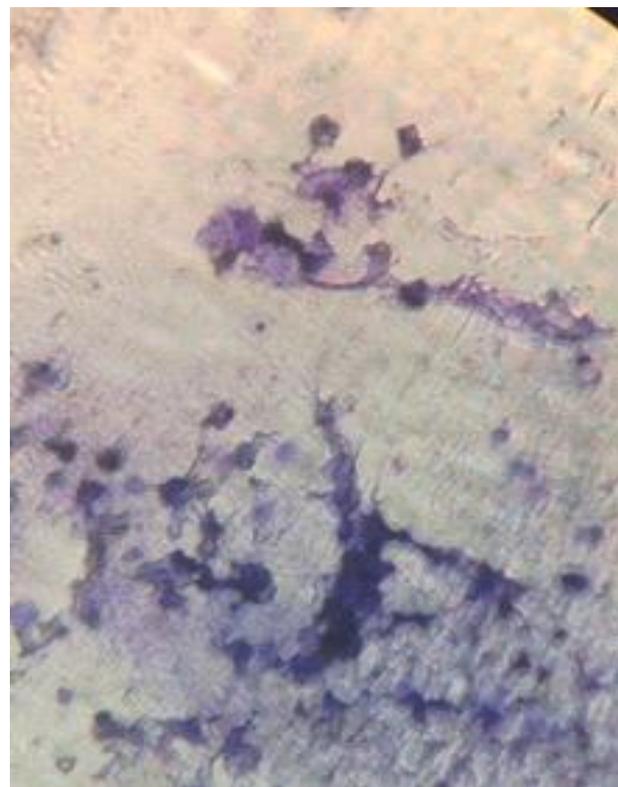
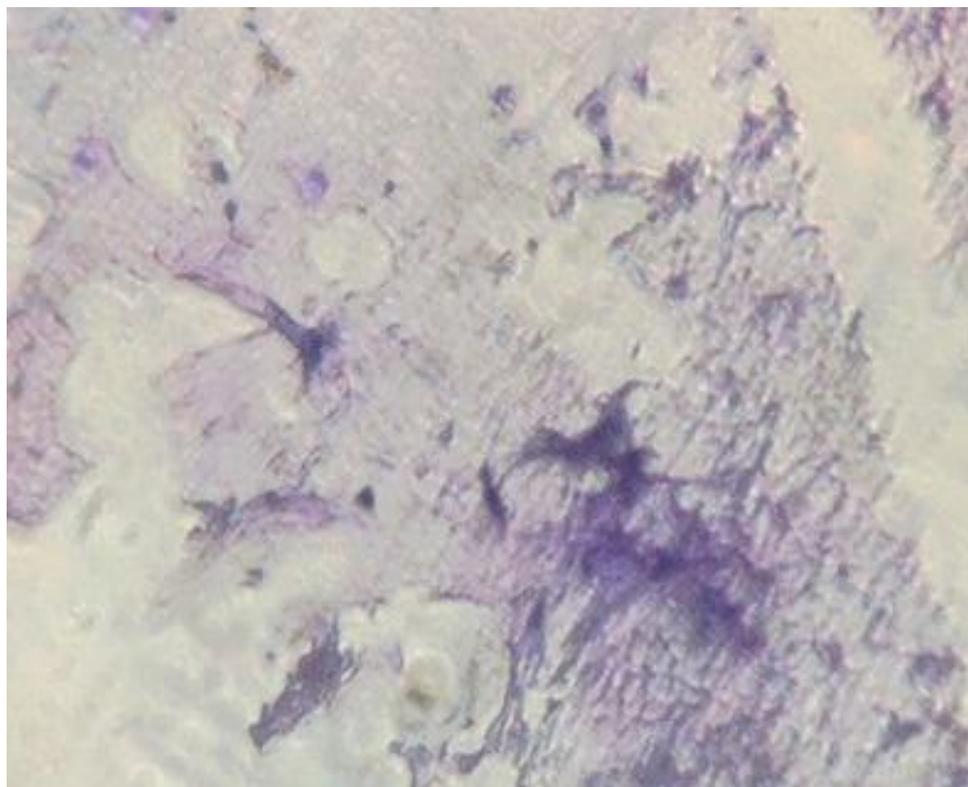
Halocynthia pyriformis (2-е сутки воспаления)



Крупные базофильные клетки с отростками. (10x)

Полученные результаты

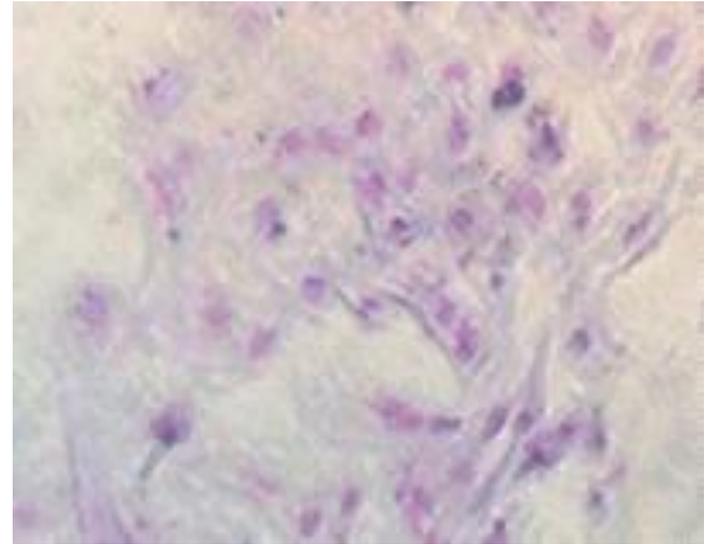
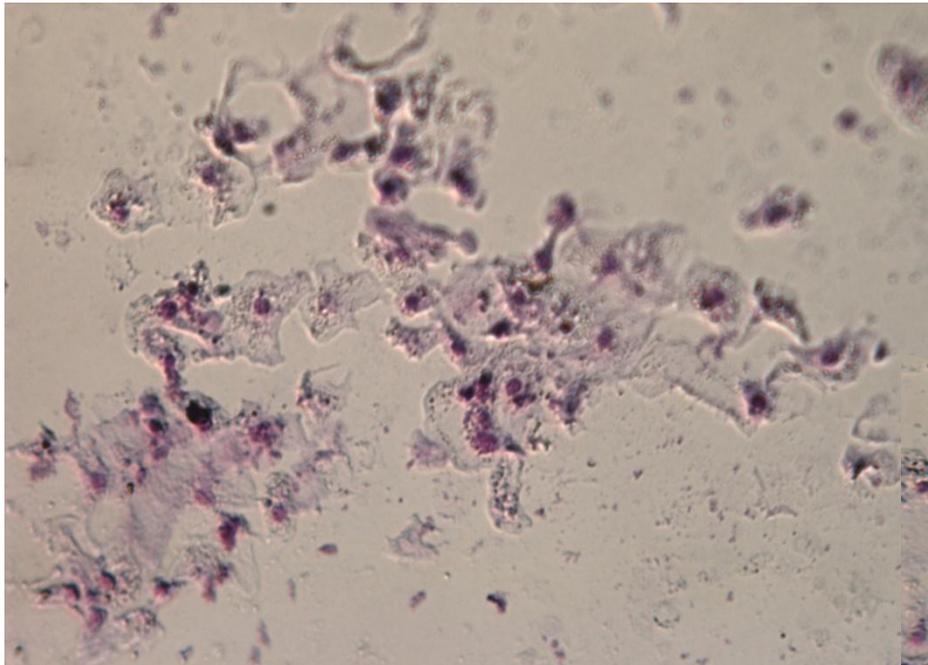
Halocynthia pyriformis (2-е сутки воспаления)



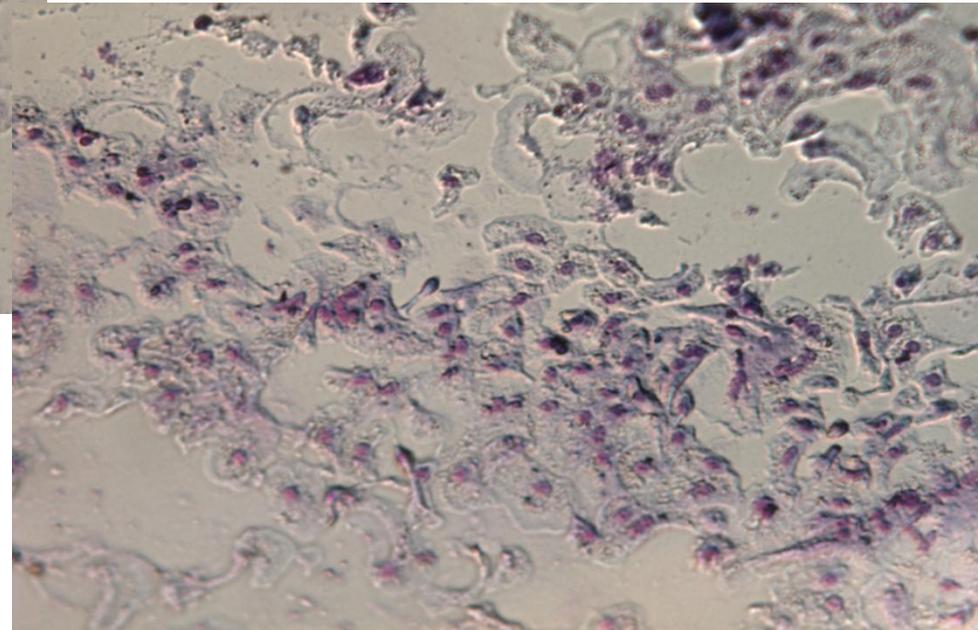
Нейтрофильные амебоциты с большим количеством выростов. (40x)

Полученные результаты

Halosynthia pyriformis
(2-е сутки воспаления)

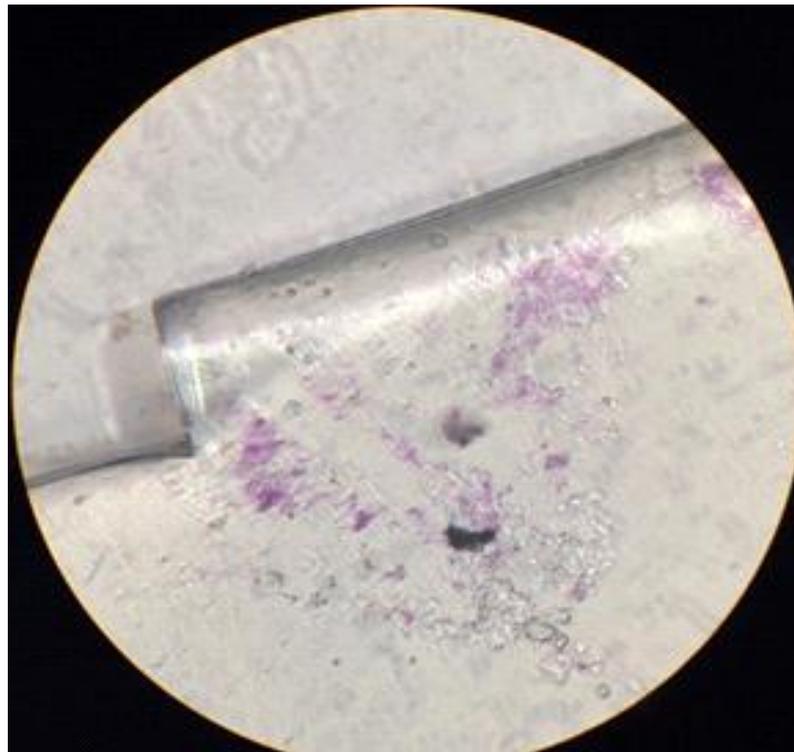
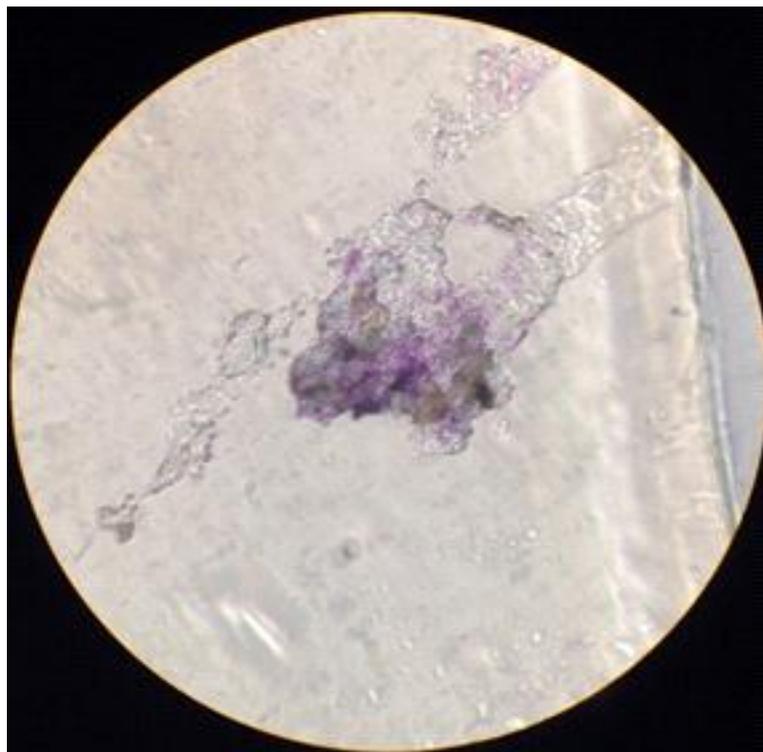


*Мелкие эозинофильные
клетки. (40x)*



Полученные результаты

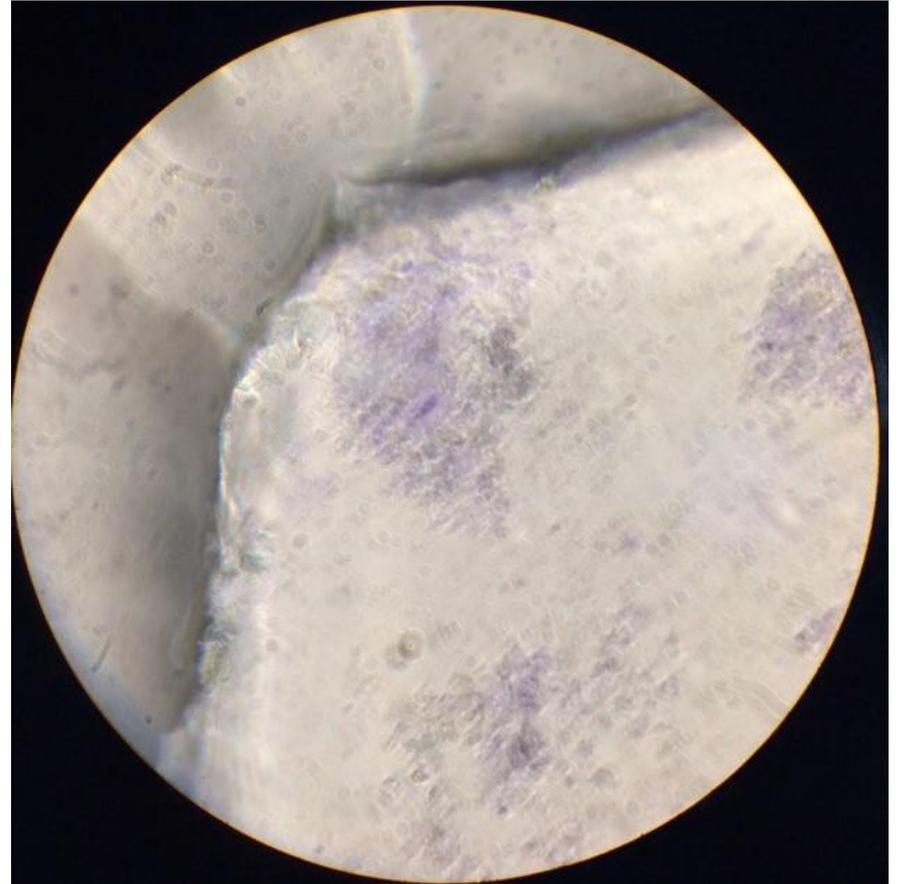
Asterias rubens (3-и сутки воспаления)



Остаточные клеточные структуры. (10x)

Полученные результаты

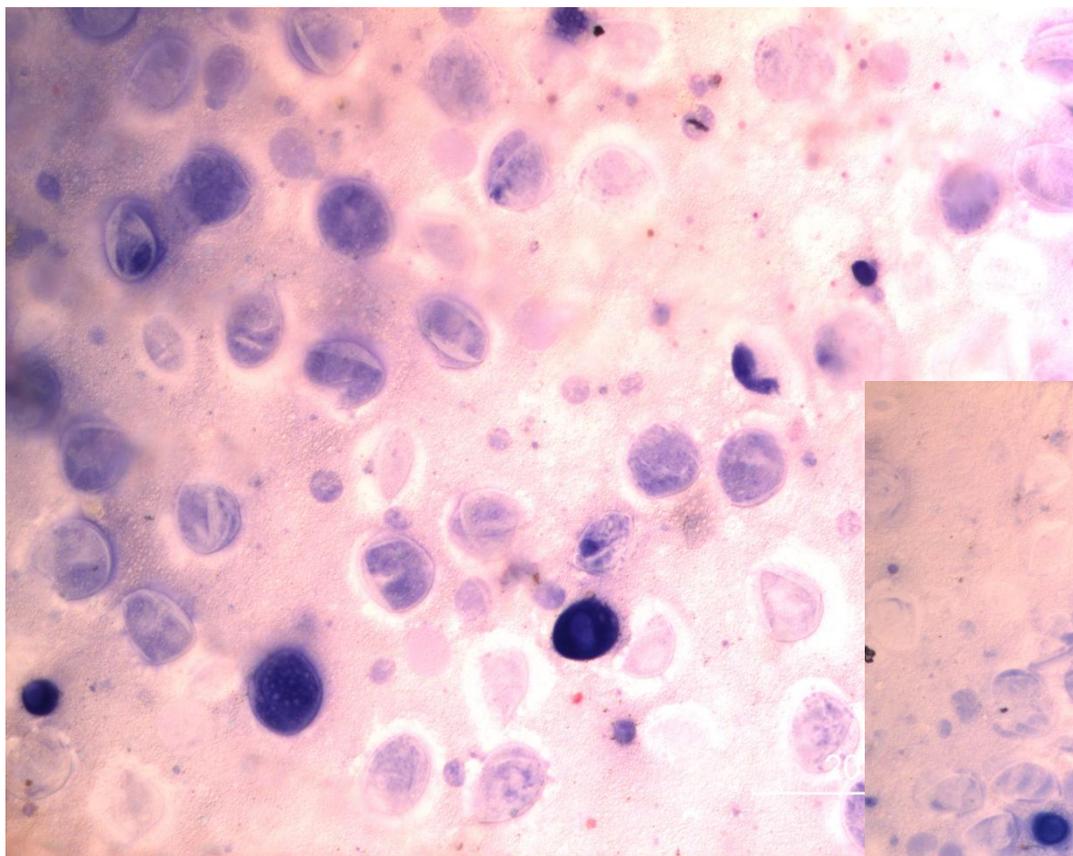
Halocynthia pyriformis (3-и сутки воспаления)



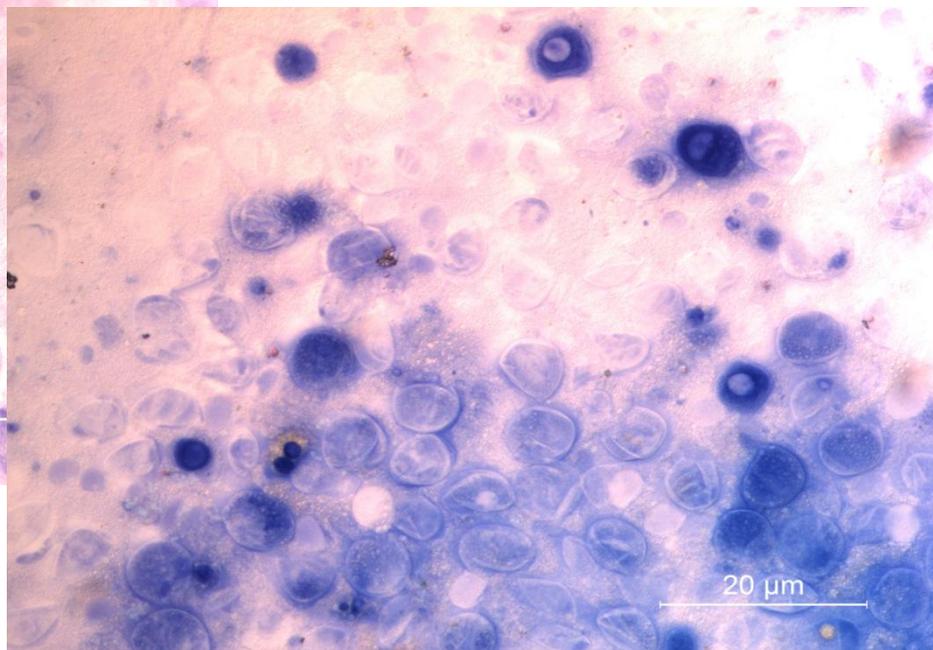
Остаточные клеточные структуры. (10x)

Полученные результаты

Mithilus edulis

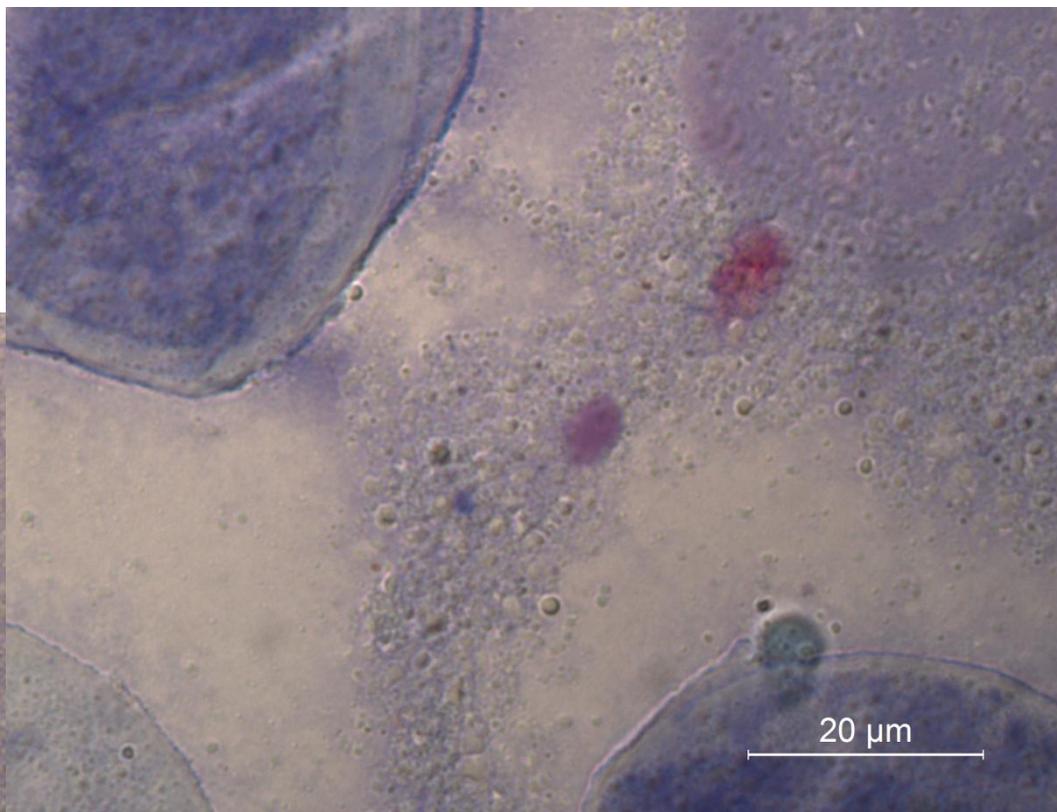
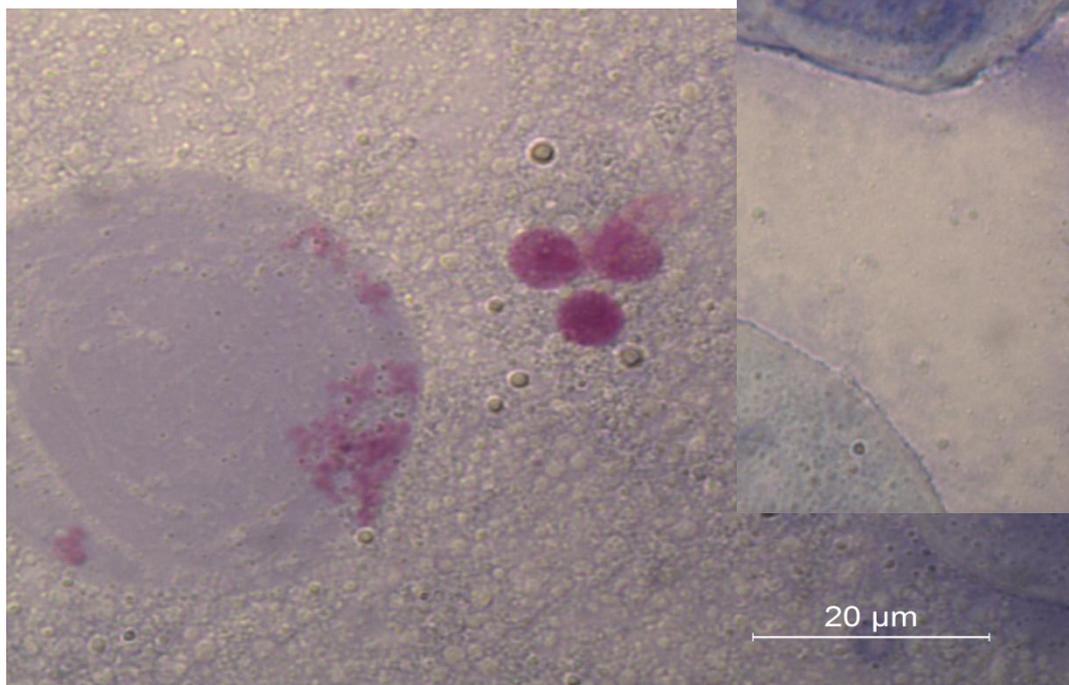


Поврежденные
яйцеклетки.



Полученные результаты

Mithilus edulis



Яйцеклетки, окруженные нейтрофильными и эозинофильными амебоцитами. (40x)

Полученные результаты:

Asterias rubens

*Halocynthia
pyriformis*

Mithilus edulis

Крупные
базофильные
амебоциты

Базофильные
клетки с
отростками

Единичные
базофильные
амебоциты

Скопления
нейтрофильных
амебоцитов

Нейтрофильные
амебоциты с
отростками

Нейтрофильные
амебоциты

Эозинофильные
амебоциты

Эозинофильные
амебоциты

Эозинофильные
амебоциты

Выводы

- Было зафиксировано различие в клеточном составе участников воспаления у различных видов беспозвоночных.
- У беспозвоночных воспалительный процесс начинается с фагоцитоза, который осуществляют базофильные и нейтрофильные клетки, и завершается дегрануляцией эозинофильных амебоцитов.
- Через трое суток после внедрения стекол мы не обнаружили на них различимых клеток, лишь слабо окрашенные остаточные клеточные структуры.



**Дробление оплодотворенных
ооцитов *Gammarus duebeni* и
Mytilus edulis.**

Докладывают:

К. Дёмина

М. Мамаева

Е. Клещенко

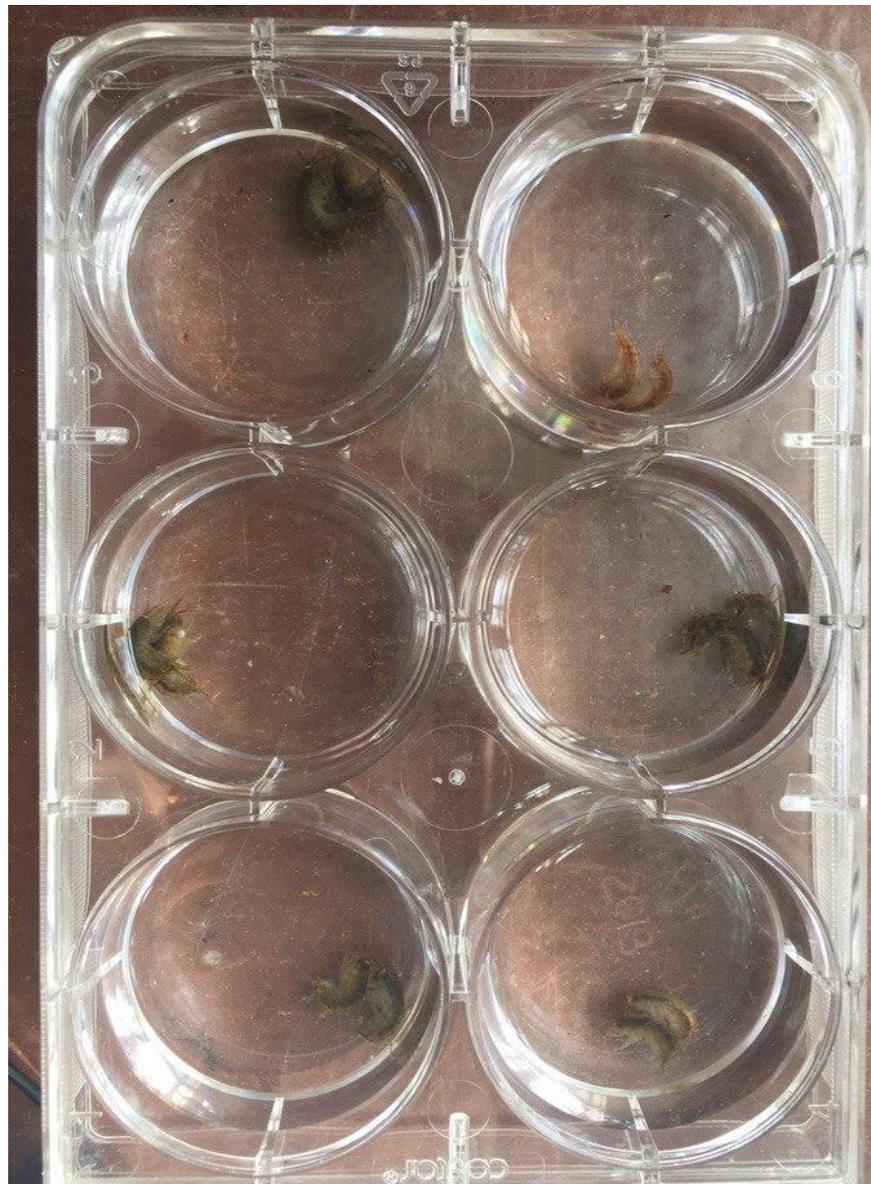
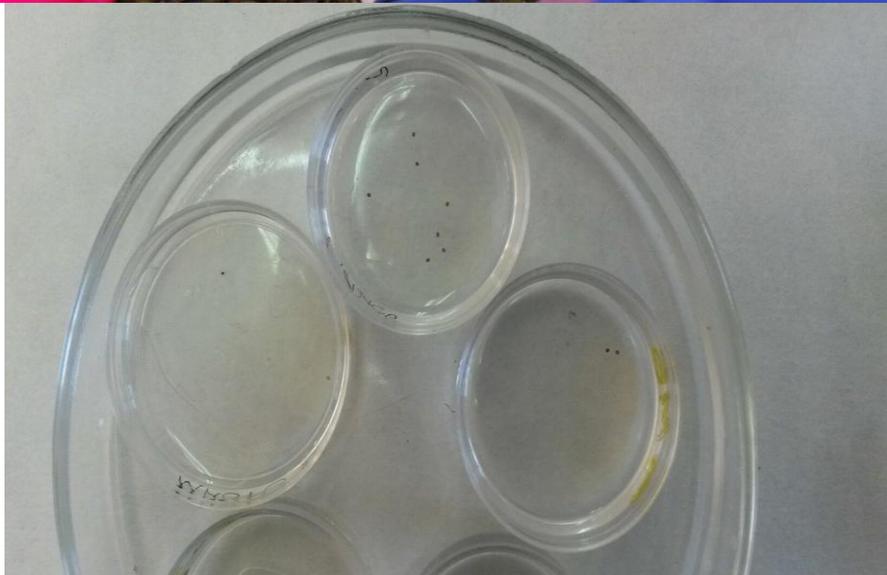
28 июня-1 июля 2017

- *Дробление* – ряд последовательных митотических делений оплодотворенного или инициированного к развитию яйца.
- Дробление – самая первая стадия онтогенеза всех многоклеточных животных.
- Мы изучали дробление ракообразных (*Gammarus duebeni*) и моллюсков (*Mytilus edulis*)

Цель работы

- Проследить дробление зигот *Gammarus duebeni* и *Mytilus edulis*, получить изображения начальных стадий (2 – 32 бластомера), сравнить процессы дробления у двух видов беспозвоночных.

Ход работы



Ход работы: подготовка образцов

- Отловили несколько десятков объектов, отсадили совокупляющиеся пары в лунки планшета.
- После оплодотворения (самка полиняла) отсадили самца, вскрыли яйцевую сумку и отобрали яйца.
- Определяли стадию дробления яиц, часть яиц фиксировали в 4% ПФА на PBS в течение 30 минут и отмывали в PBS, часть яиц оставляли для дальнейшего развития.

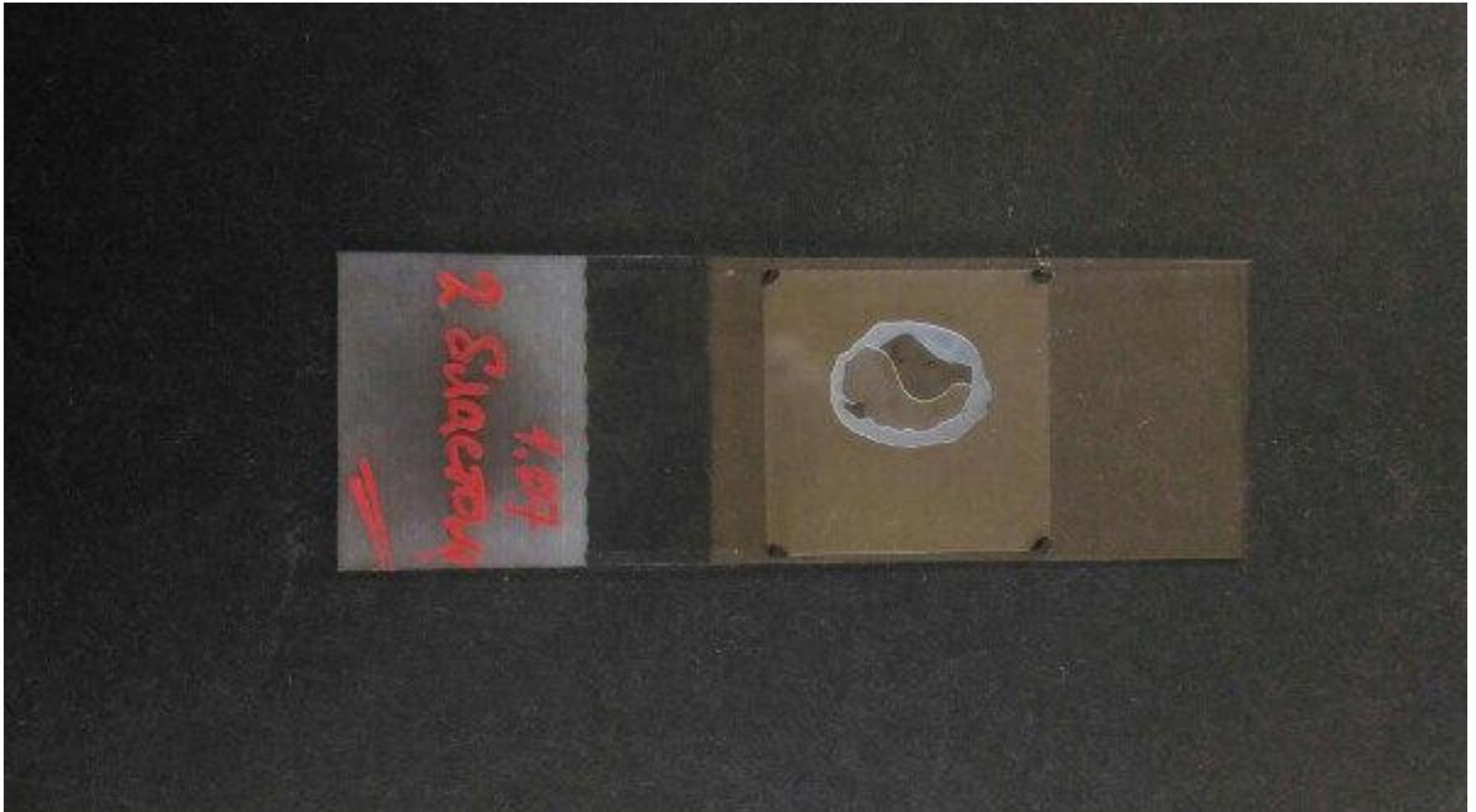
Παρά *Gammarus duebeni*



Ход работы: окраска

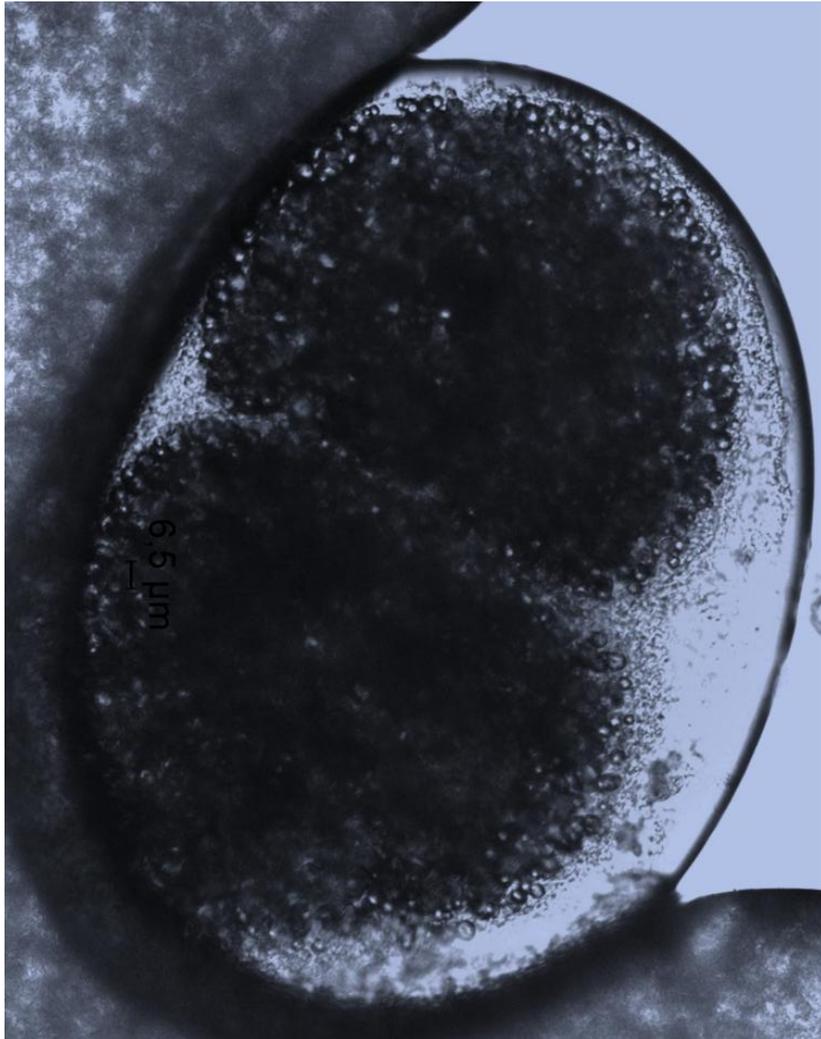
- антитела к тубулину, 1 к 200. Оставили в темноте и холоде на ночь.
- Фаллоидин 1 к 100, 1 час.
- DAPI 1 к 100, 20 минут.
- После каждого окрашивания мы отмывали препараты 3 раза по 10 минут в буфере PBS.

Ход работы: приготовление препаратов

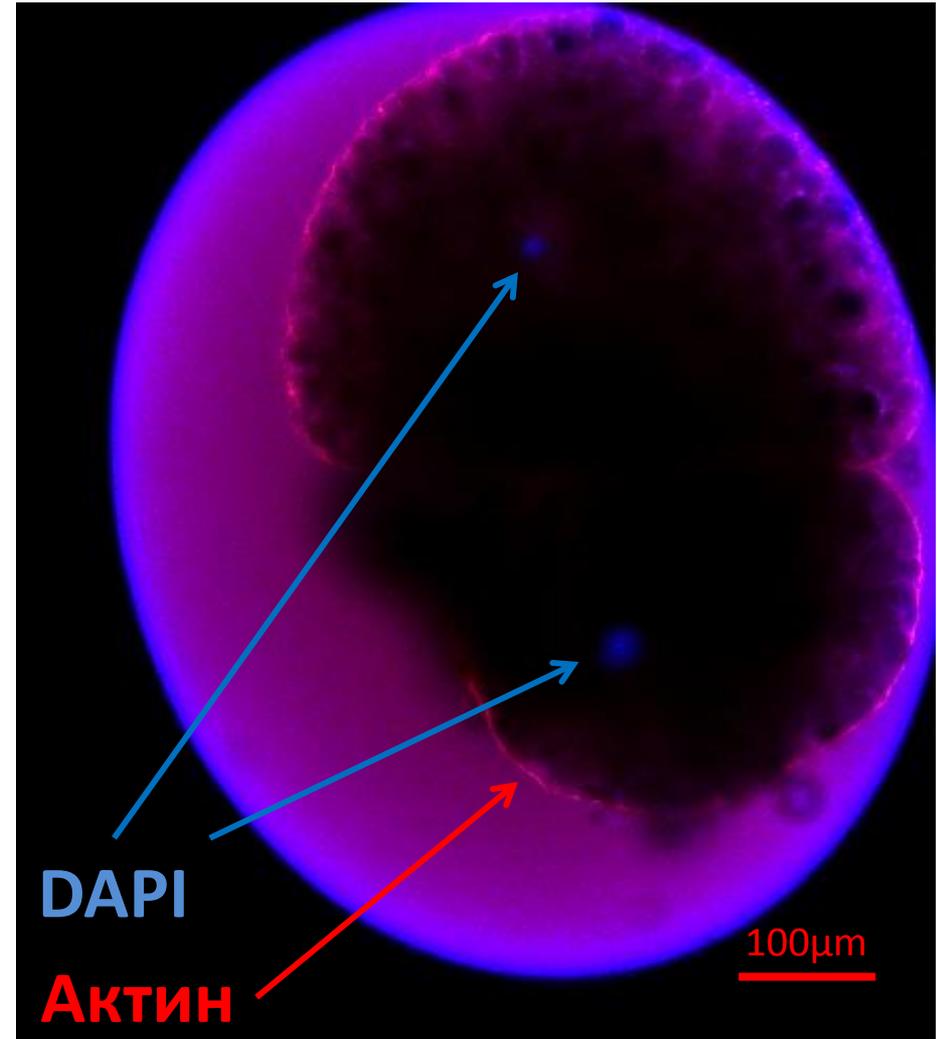


Стадия 2 бластомеров

Световой микроскоп x20



Конфокальный микроскоп x20



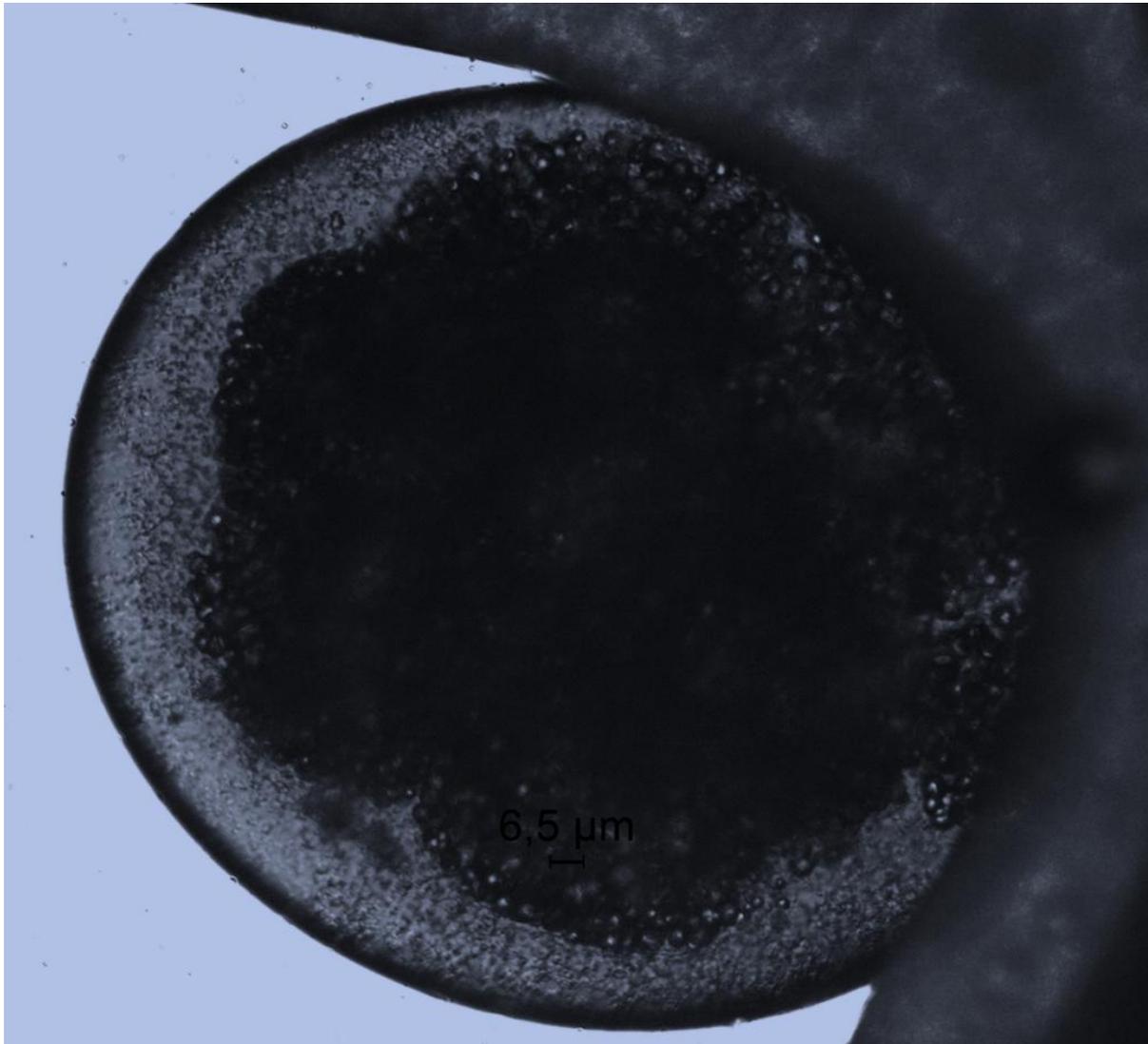
Стадия 4 бластомеров

Световой микроскоп



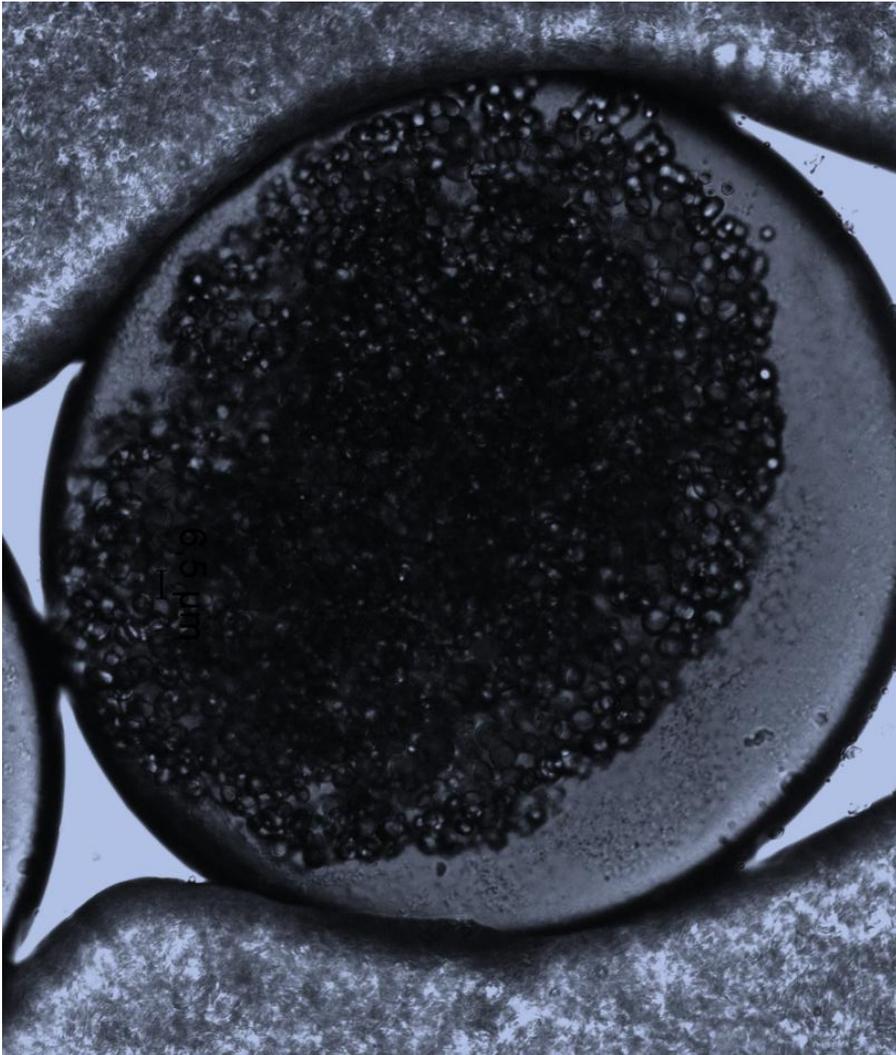
Стадия 8 бластомеров

Световой микроскоп

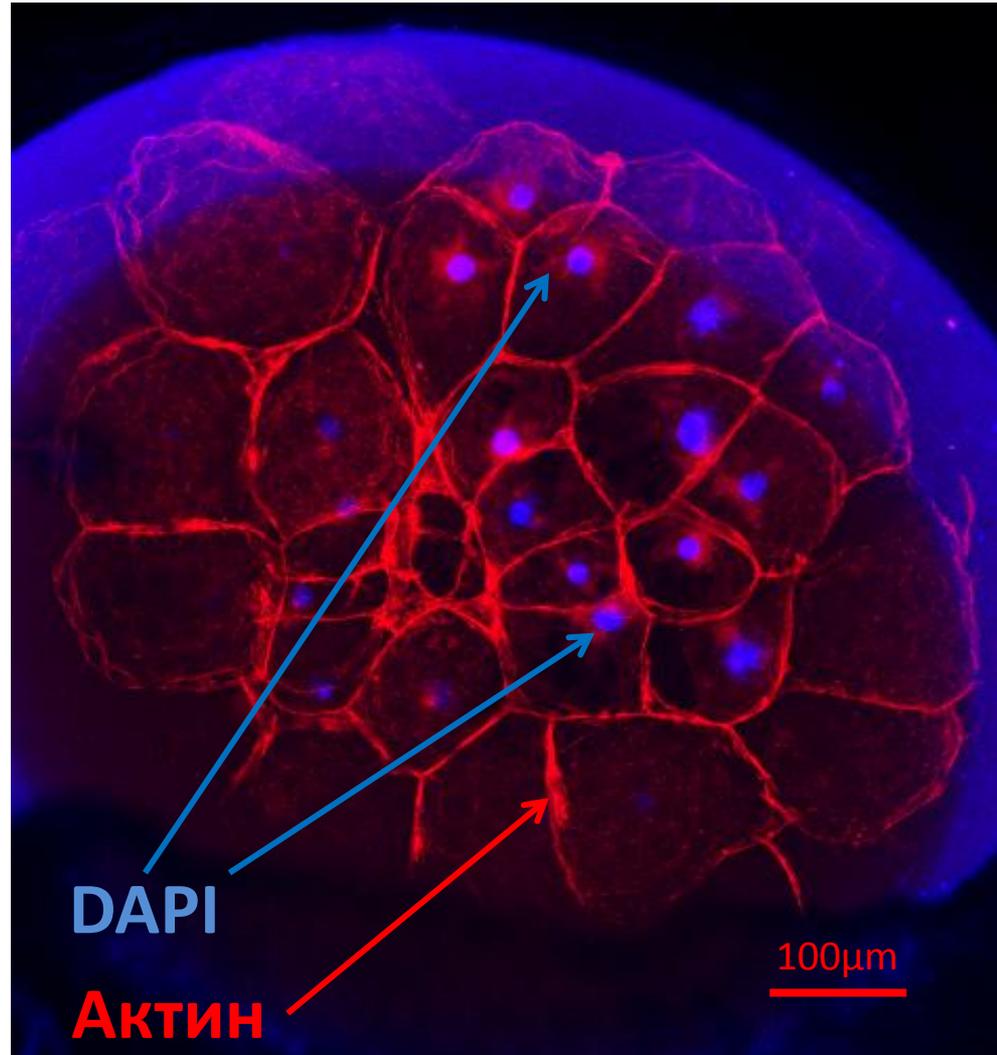


Стадия 32 бластомеров

Световой микроскоп



Конфокальный микроскоп



Обсуждение

- Первая партия препаратов не окрасилась антителами к тубулину и DAPI. Мы предположили, что красители не прошли через мембрану. Вторую партию мы окрашивали, добавив в PBS детергент Triton-X100. Наше предположение подтвердилось лишь частично, потому что на этот раз препараты окрасились DAPI, но не окрасились антителами.

Вывод

- У *Gammarus duebeni* полное (голобластическое) дробление, что не характерно для видов с полилецитальными яйцеклетками, но не противоречит литературным данным.
- Этот вид способен к размножению не только в естественной среде обитания, но и в лабораторных условиях.

Работа с *Mytilus edulis*.



Ход работы: подготовка образцов

- К собранным мидиям добавили KCl для стимуляции выброса половых продуктов.
- Яйцеклетки заливали морской водой и верхний слой воды со сперматозоидами удаляли.
- Яйца отбирали и фиксировали 4% ПФА на PBS 20 минут и отмывали в PBS 3 раза по 10 минут.

Ход работы: окраска

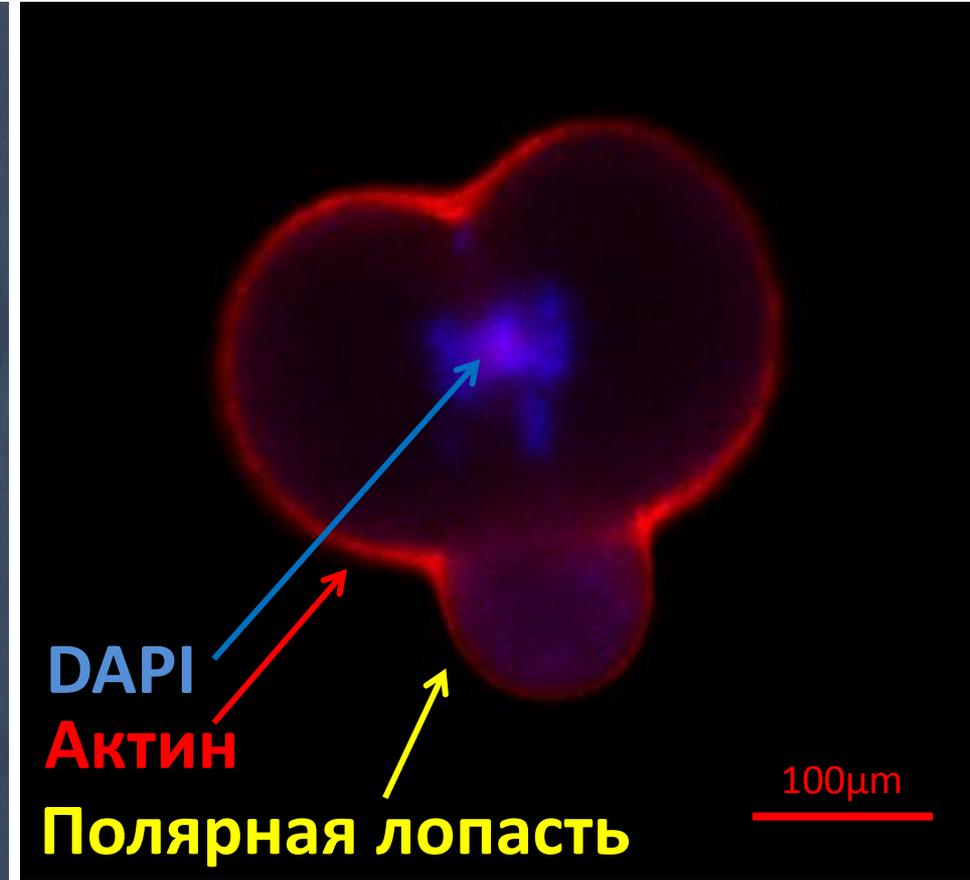
- Антитела к тубулину 1 к 100 в течение часа.
- Фаллоидин 1,5 к 100 в течение 1-2 часов .
- DAPI 1 к 100, в течение 20 минут.
- Заключили в мовиол, используя покровное стекло, вазелин и пластилиновые ножки(см. выше).
- Препараты смотрели при увеличении объектива x40

Стадия 2 бластомеров

Световой микроскоп

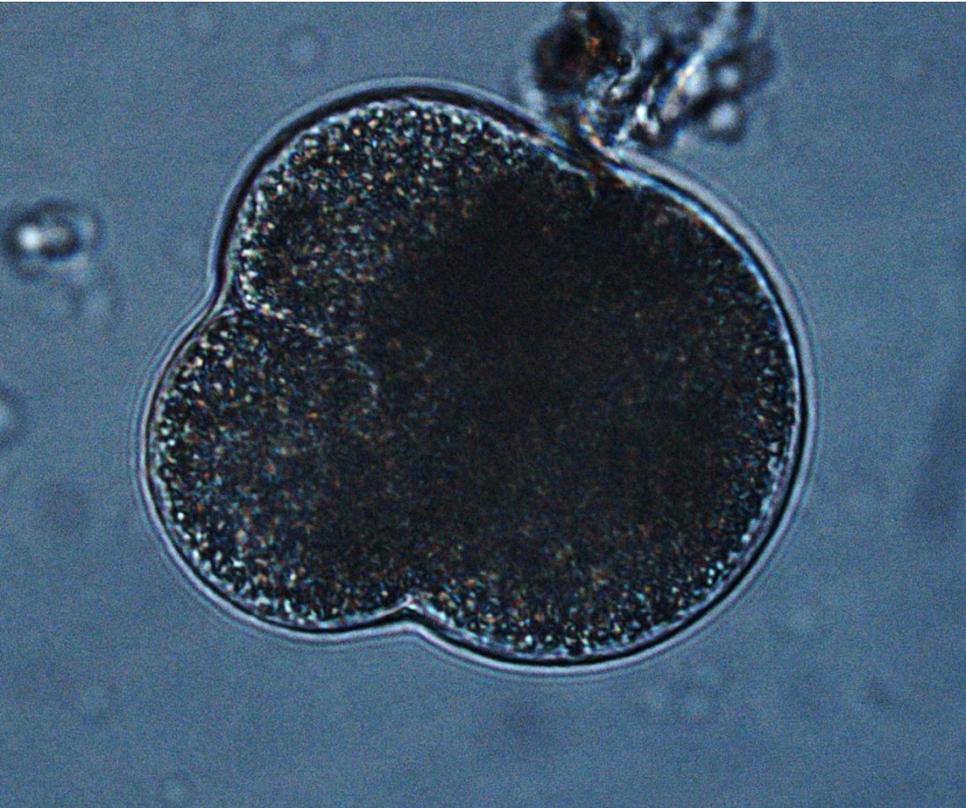


Конфокальный микроскоп

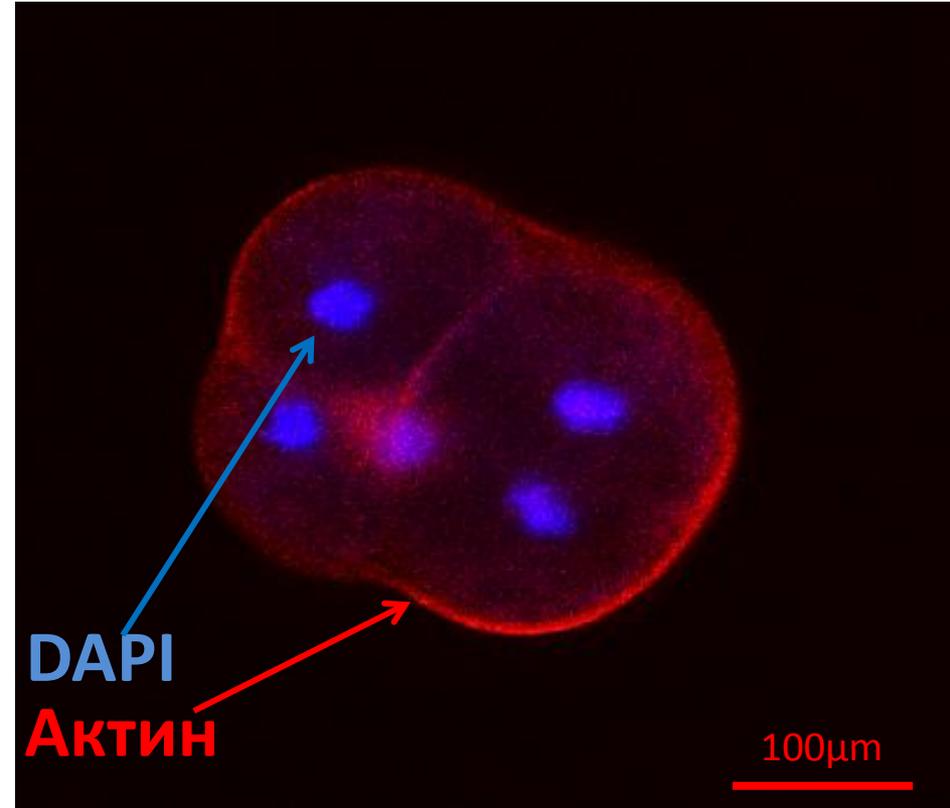


Стадия 4 бластомеров

Световой микроскоп

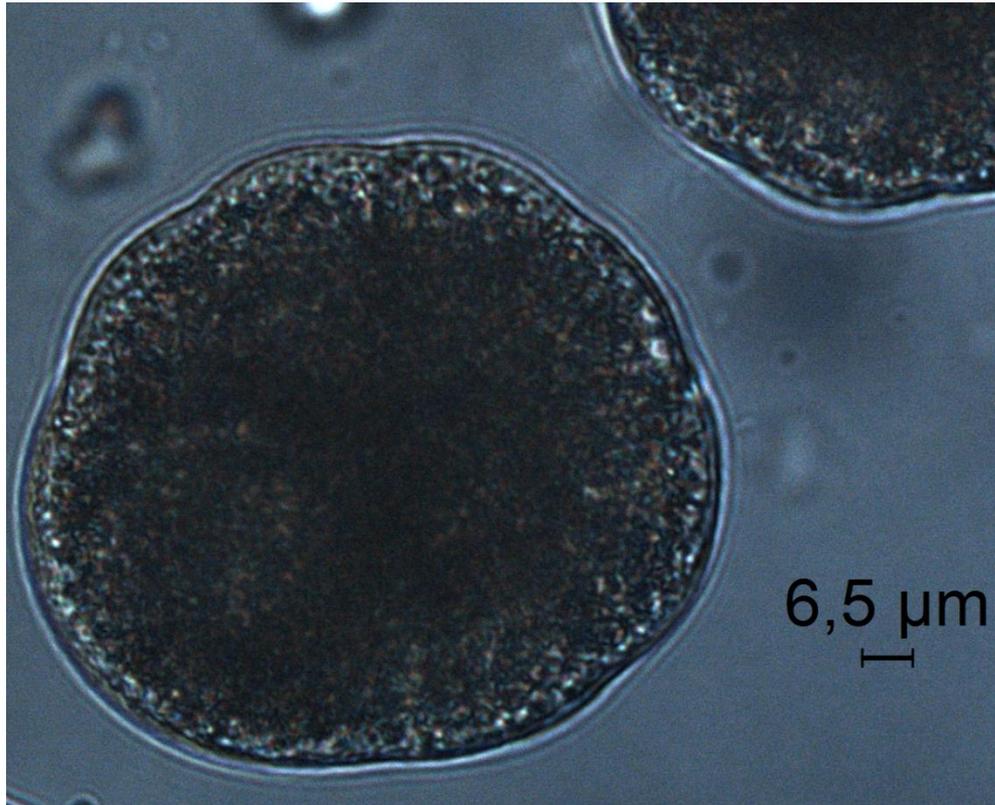


Конфокальный микроскоп

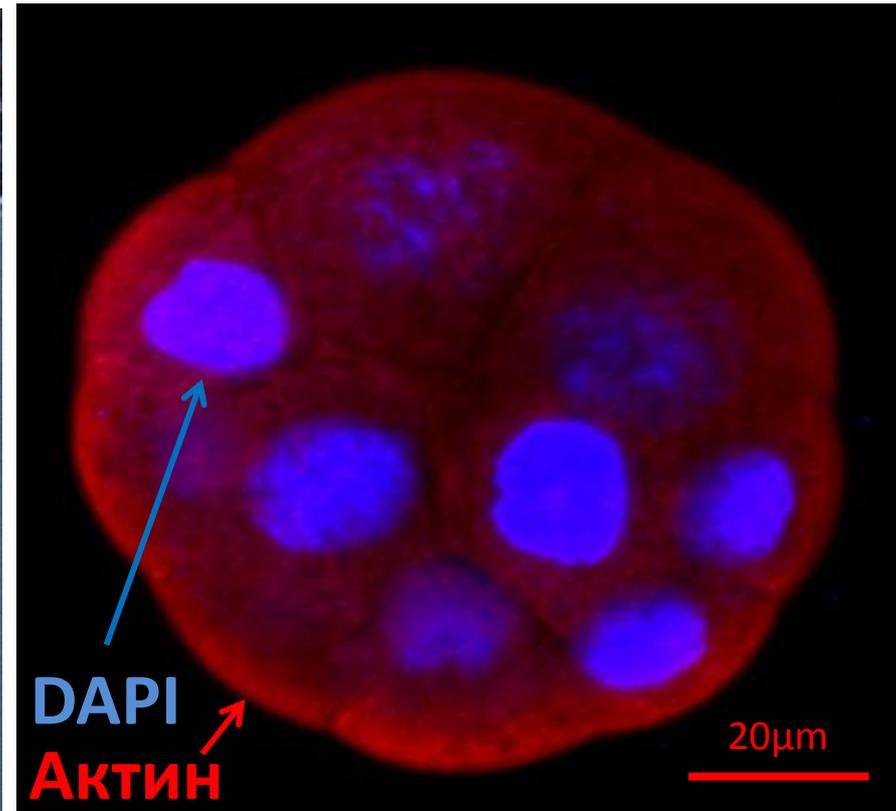


Стадия 16 бластомеров

Световой микроскоп



Конфокальный микроскоп



Обсуждение

- У мидии в процессе дробления образуется полярная лопасть, это видно на фотографии стадии двух бластомеров с конфокального микроскопа. Полученные данные согласуются с литературой.

Выводы

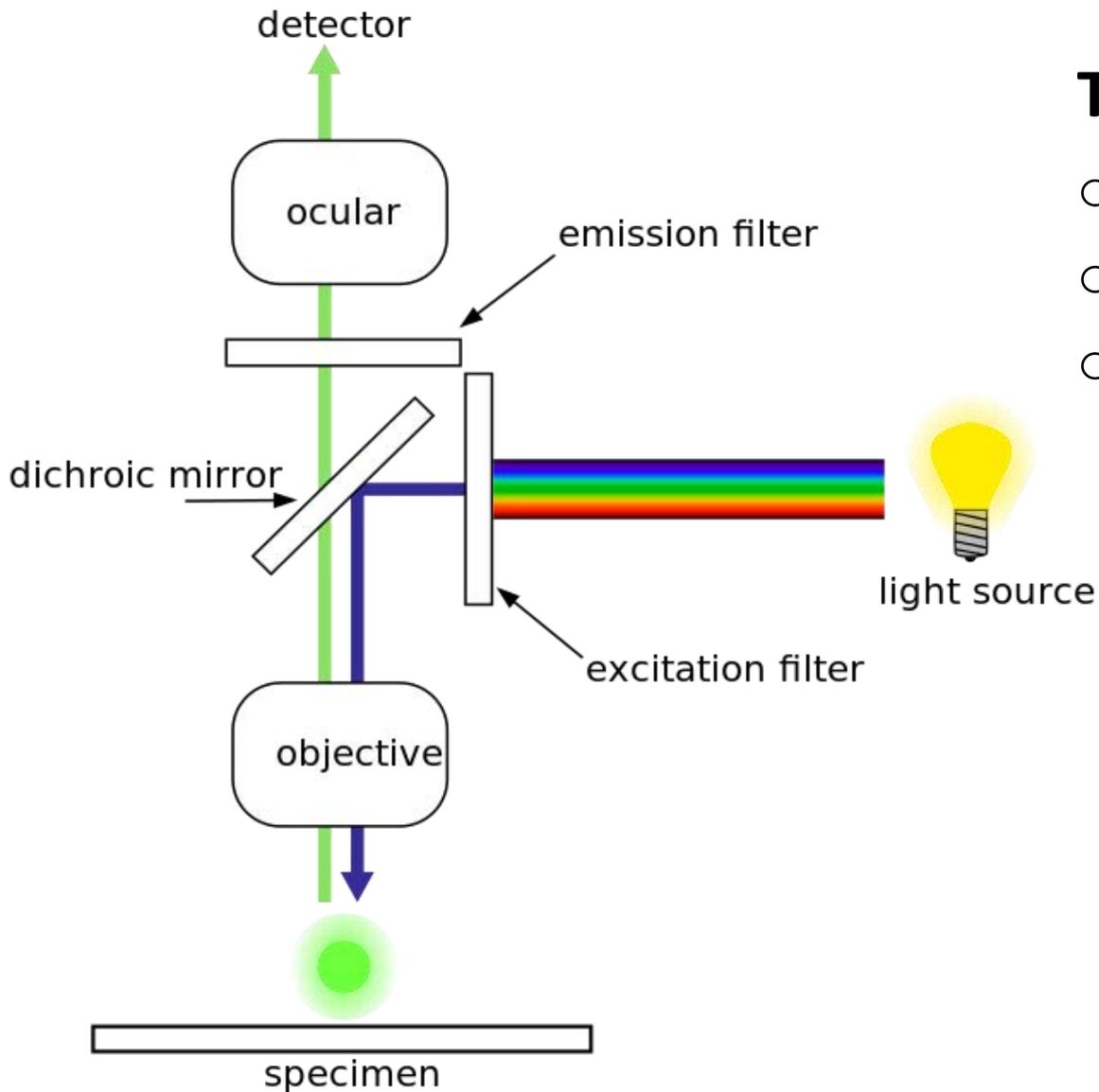
- Оба исследуемых вида способны размножаться и проходить ранние стадии развития в лабораторных условиях, в чашке Петри.
- У *Mytilus edulis* дробление на ранних стадиях выглядит как неравномерное, но точнее сказать нельзя, так как зародыши не развились до достаточной степени. Дробление *Gammarus* равномерное.
- Яйца *Mytilus* меньше по размеру, чем яйца *Gammarus*, зато они менее чувствительны к температурному режиму и делятся быстрее.
- У *Gammarus* в процессе дробления не возникает полярной лопасти, в отличие от *Mytilus edulis*.

Аутофлуоресценция у гидроидных полипов

Цель: сравнить картину аутофлуоресценции
разных видов гидроидных полипов.

Докладывают:
Харыбина Екатерина
Швыркова Анастасия

Стандартный флуоресцентный микроскоп



Термины:

- люминесценция (био-)
- флуоресценция (ауто-)
- люциферин
люцифераза



Отлов объектов



Определение видовой принадлежности объектов

Obelia longissima

Clava multicornis

Dynamena pumila

Obelia flexuosa

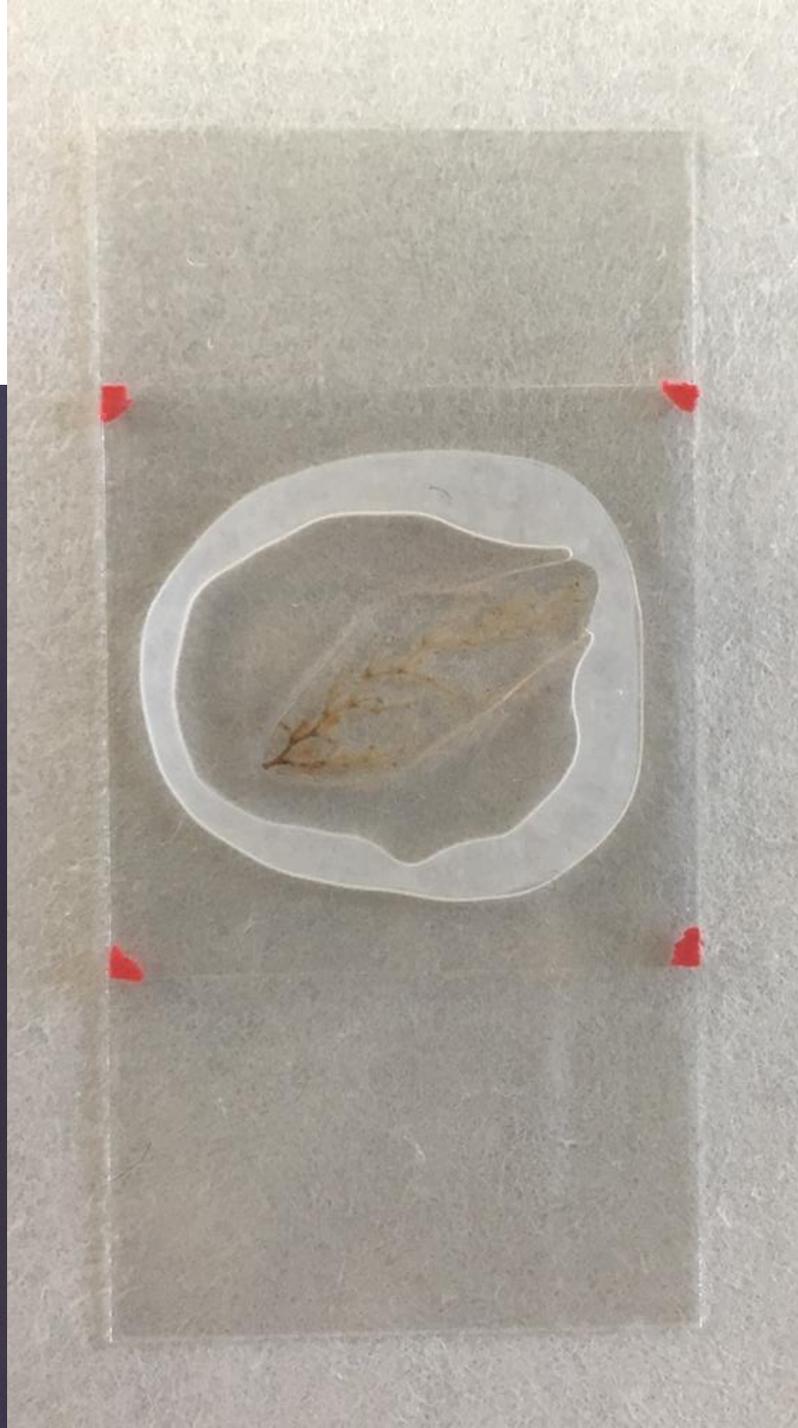
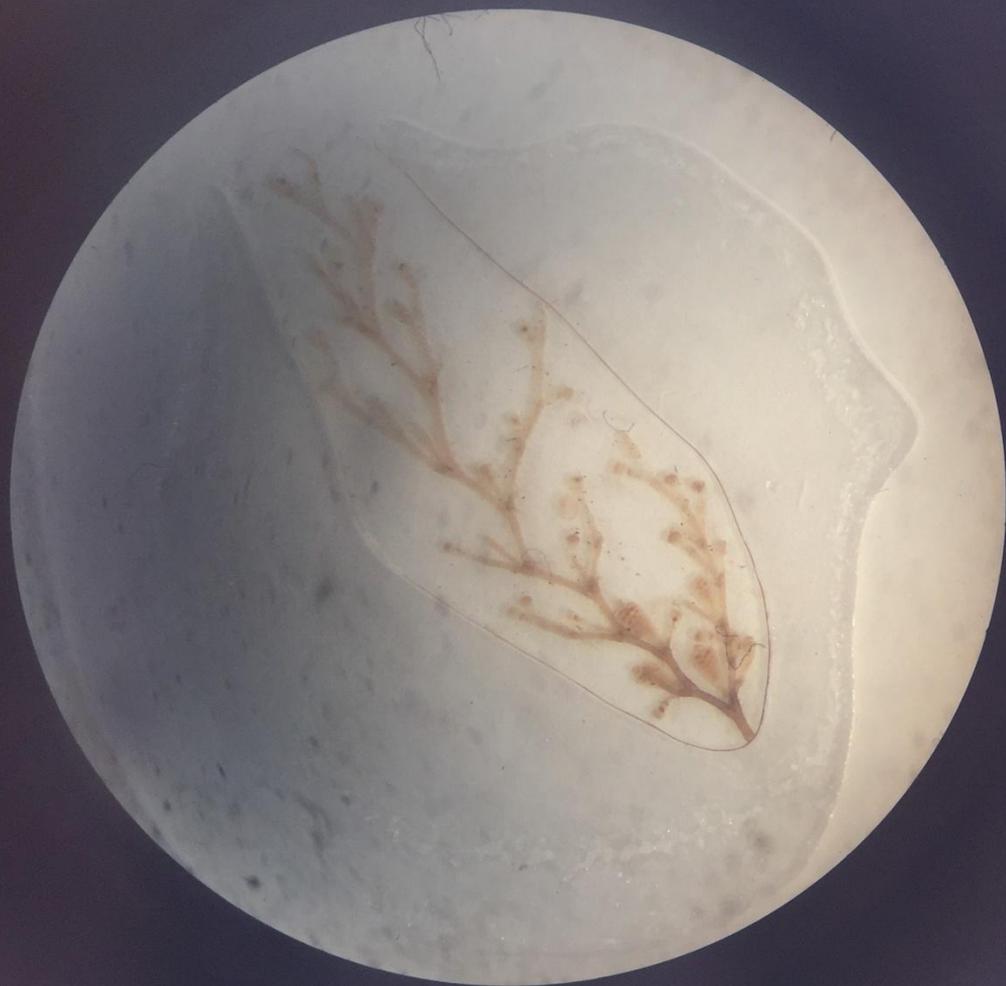


Obelia flexuosa



Clava multicornis

Приготовление препаратов

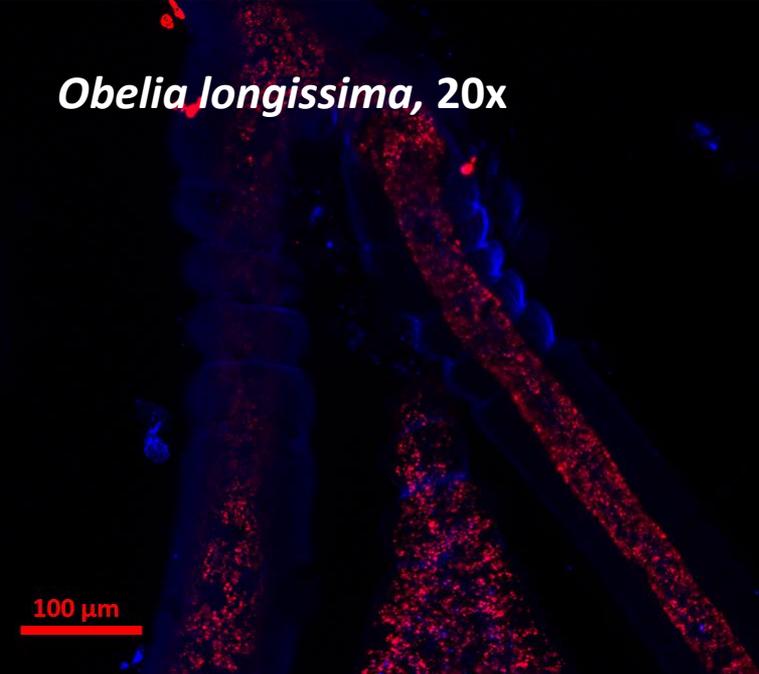


Использованные лазеры

Название лазера	Цвет	$\lambda_{\text{возб}}$, нм	$\lambda_{\text{эмисс}}$, нм
DAPI	синий	405	450
TRITC	красный	561	595
FITC	зеленый	488	525



Obelia longissima, 20x

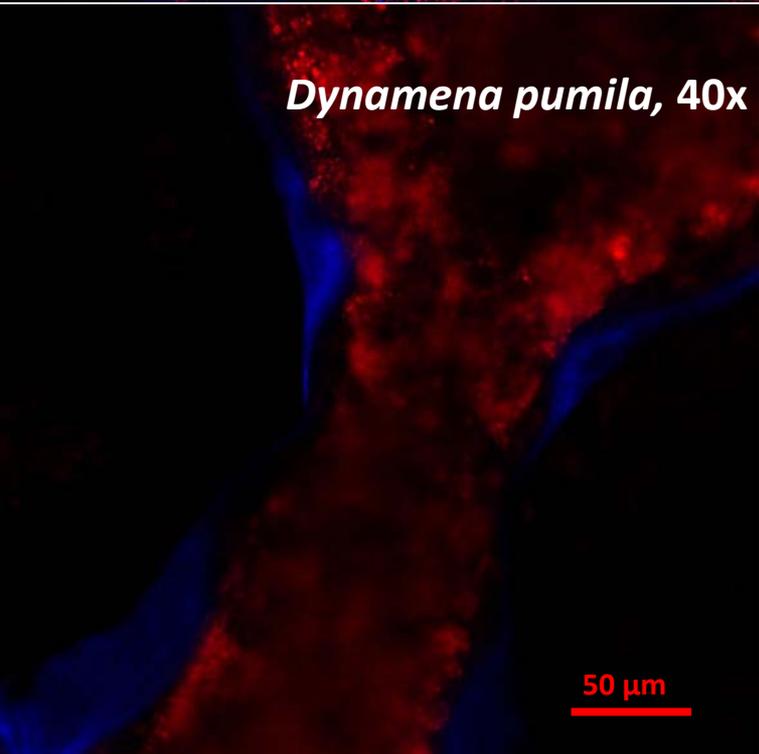


Микрофотографии побегов

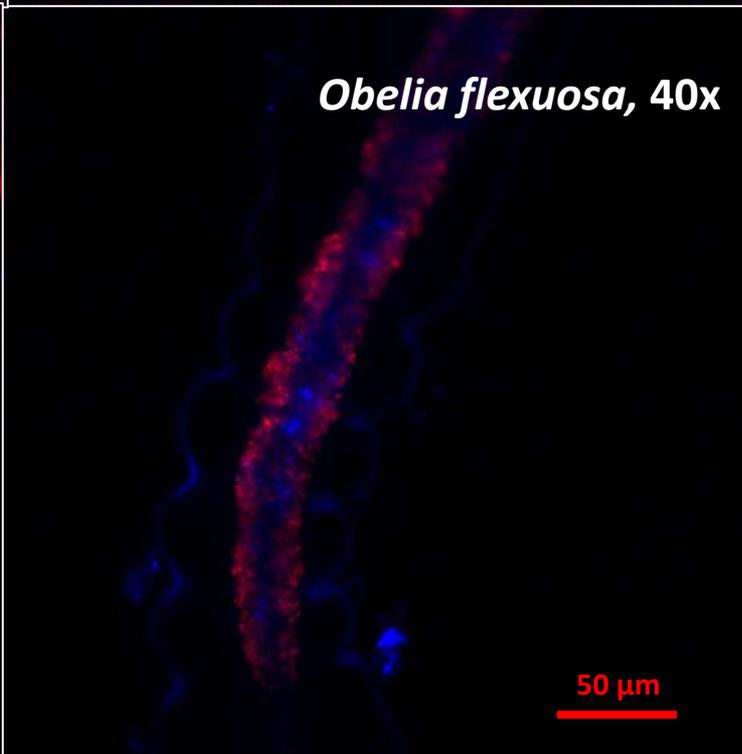
Clava multicornis, 40x



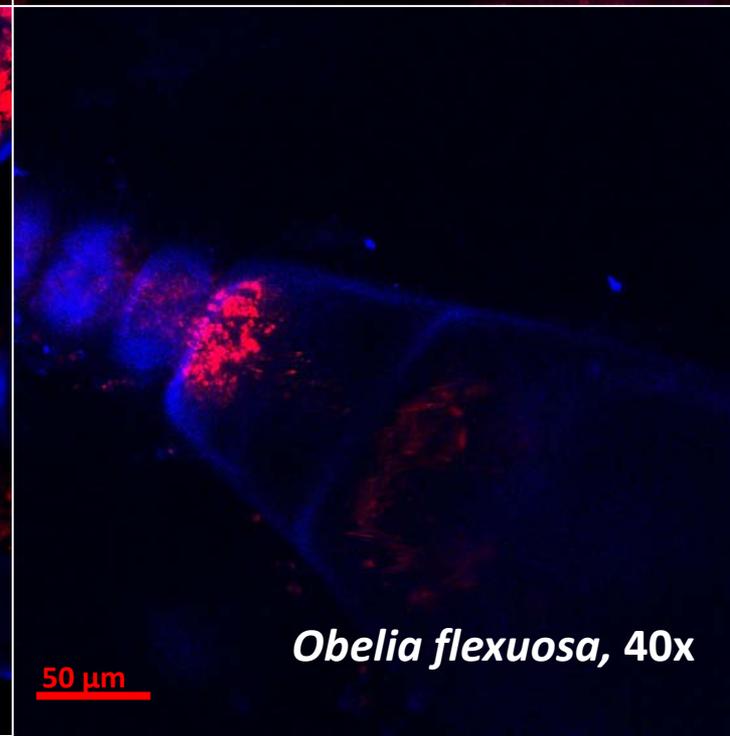
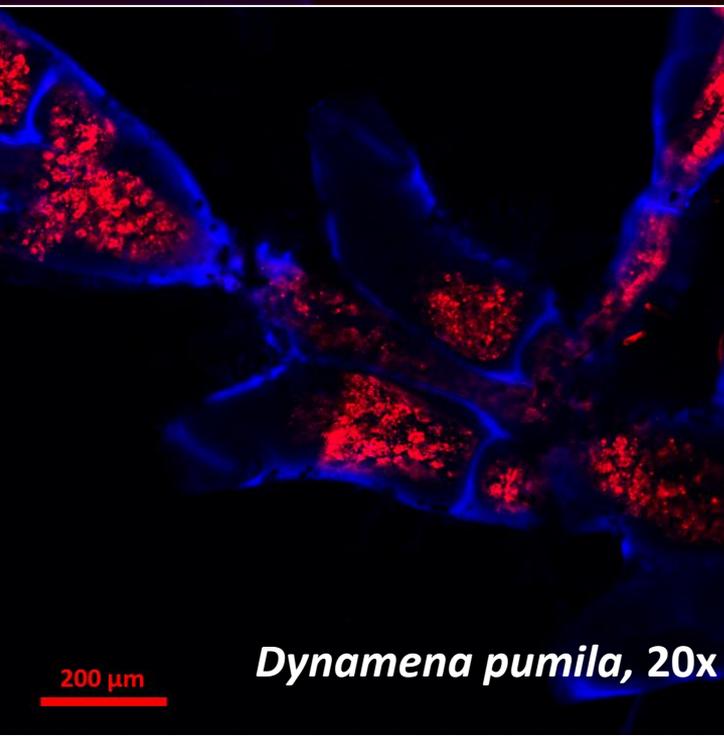
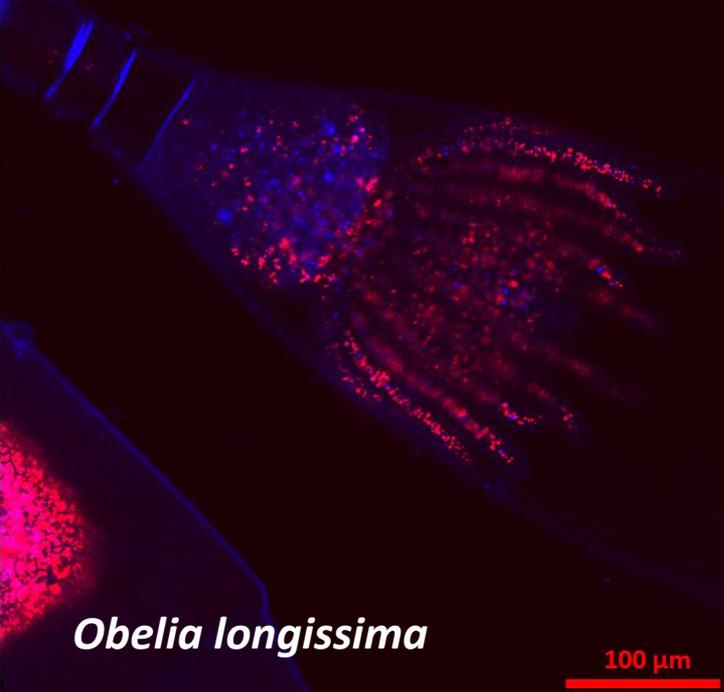
Dynamena pumila, 40x



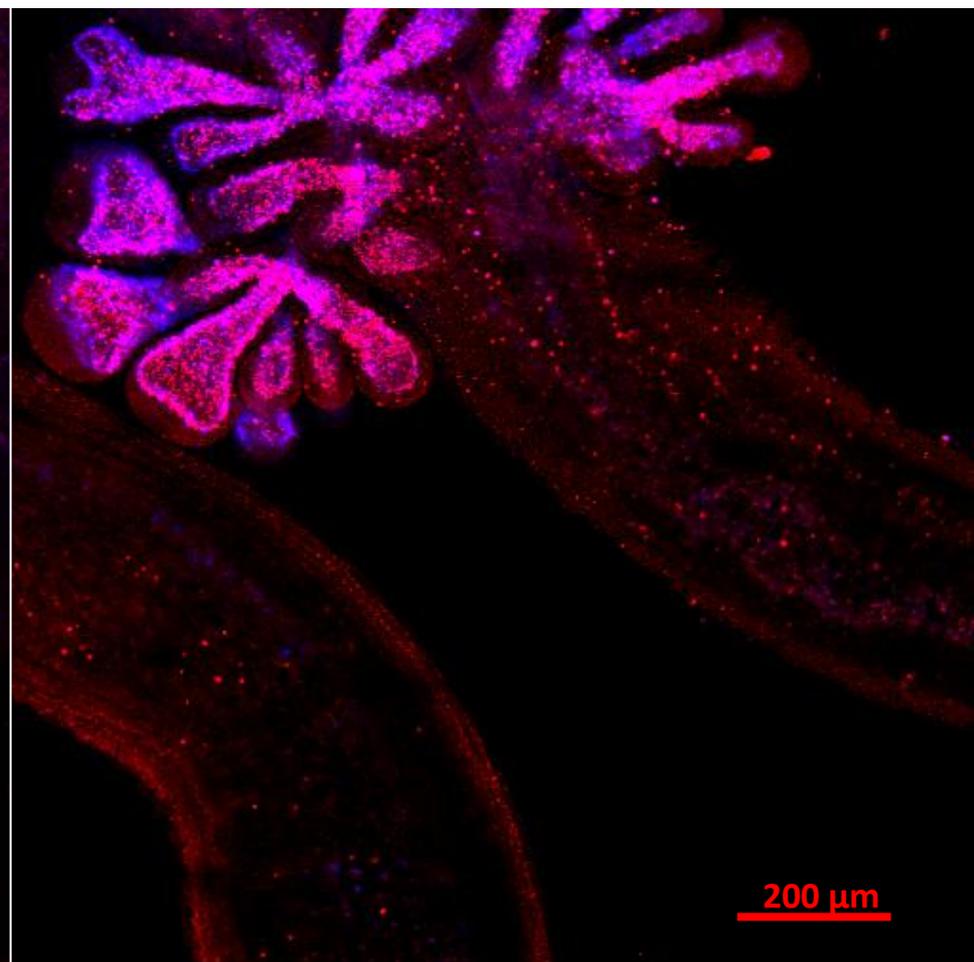
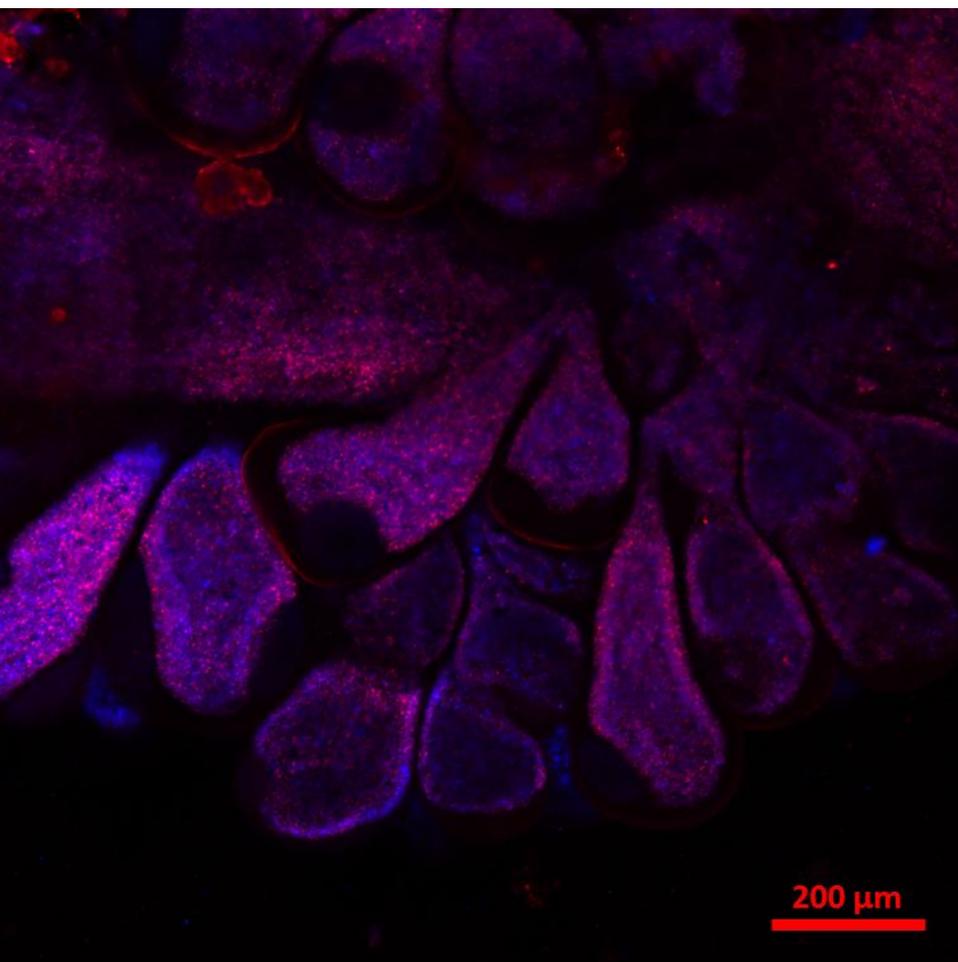
Obelia flexuosa, 40x



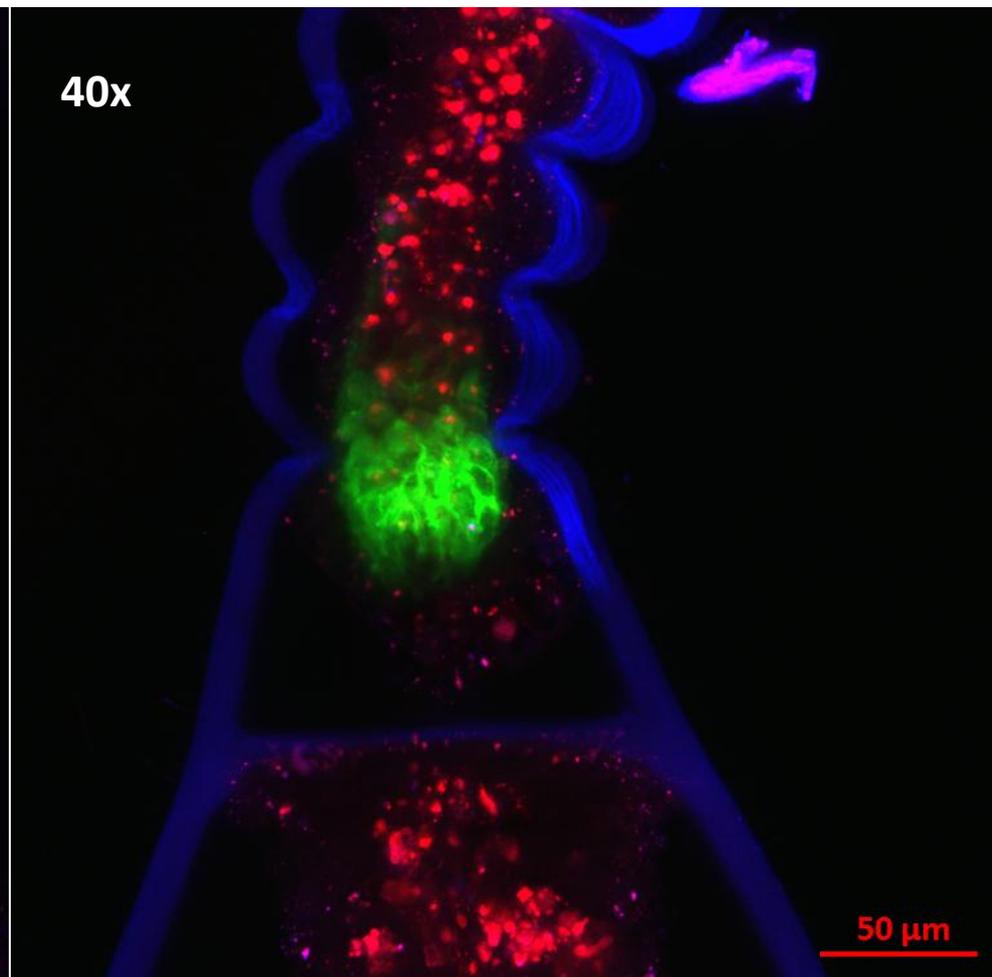
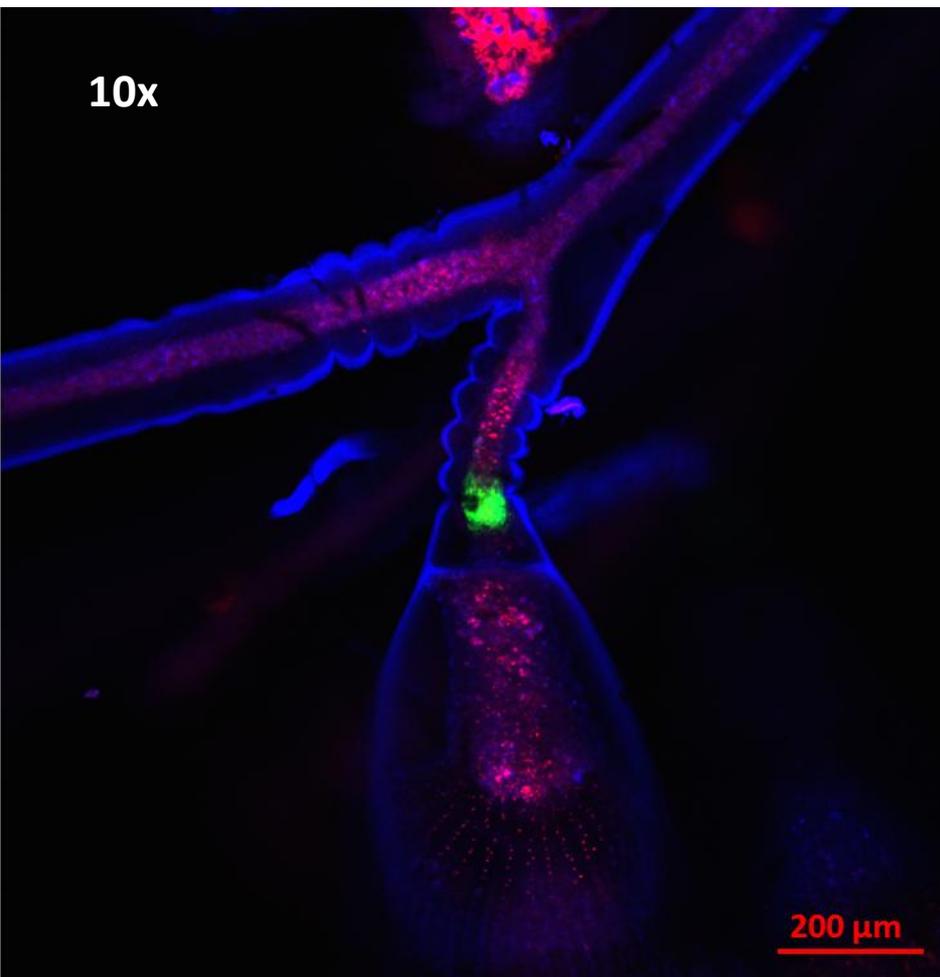
Микрофотографии
гидрантов



Микрофотографии столона *Clava multicornis*, 10x



Микрофотографии ножки гидранта *Obelia longissima* с фотофором



Выводы

- Все рассмотренные виды способны к аутофлуоресценции;
- Синий спектр флуоресценции вызван взаимодействием люциферина и люциферазы, зеленый – белком из семейства обелинов, красный – аутофлуоресценция перевариваемого субстрата;
- Объекты имеют сходную картину флуоресценции;
- Фотоциты были обнаружены только у *Obelia longissima*, которые, предположительно, принимают участие в привлечении добычи.



