بررسی ریخت‌شناسی و فراوانی سلول‌های خونی عقرب *Mesobuthus eupeus* (Scorpiones, Buthidae)

هدیه جعفری*، بهزاد مسیحی پور و علیرضا فروزان

ایران، اهواز، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه جنوب غرب اهواز

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۵

چکیده

سلول‌های خونی شاخص مهم ایمنی بندپایان در برابر بیمارگرها و پارازیتوئیدها می‌باشند. با شناخت دقیق سلولهای خونی و واکنش آنها در برابر عوامل بیگانه‌ای که به همولنف وارد می‌شوند، بهتر می‌توان جنبه‌های دفاع سلولی حشره را بررسی کرد. باتوجه به تحقیقات بسیار اندک در بیولوژی عقرب‌ها دراین تحقیق، سلول‌های خونی *مزوبوتوس اپئوس* با استفاده از میکروسکوپ نوری موردمطالعه قرارگرفت. پنج نوع هموسیت در عقرب *مزوبوتوس اپئوس* شناسایی شد که شامل پروهموسیت-ها، گرانولوسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، ائونوسیت‌ها و اسفرولوسیت‌ها بودند. شمارش تفرقی سلول‌های خونی نشان داد که پلاسموسیت‌ها ۷۰/۲٪ – ۸۱/۲٪ و گرانولوسیت‌ها ۱۸/۶٪ –۲۹/۷٪ بیشترین و ائونوسیت‌ها ۲ درصد و اسفرولوسیت‌ها ۳ درصد کمترین فراوانی را نسبت به سایر سلول‌ها داشتند. سلول‌های پروهموسیت با ۵/۵–۷ میکرومتر کوچکترین و پلاسموسیت‌ها (۲۲/۷۵–۱۲/۵میکرومتر) بزرگترین سلول‌های همولنف عقرب *مزوبوتوس اپئوس* گزارش شدند. شناخت سلولهای خونی این عقرب برای اولین بار انجام‌شده است و فراوانی بالای سلول‌های پلاسموسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها می‌تواند زمینه مطالعه ایمنی این عقرب را در برابر عوامل پاتوژن و مقاومت آن در برابر شرایط محیطی آن فراهم کند.

واژه‌های کلیدی: عقرب، *مزوبوتوس اپئوس*، سلولهای همولنف

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۶۸۰۲۳۷۱۱، پست الکترونیکی: hedieh_jafari@yahoo.com

مقدمه

عقرب‌ها ازجمله بندپایان سمی می‌باشند که از اواخر دوره سیلورین بر روی کره زمین می‌زیستند و به‌عنوان فسیل زنده یاد می‌شوند. به دلیل بالا بودن طول عمر و مقاومت به شرایط متفاوت زیستی مانند تغییرات دمایی، گرسنگی و تغییرپذیری اندک ریخت‌شناسی نمونه‌های مناسبی جهت بررسی در شاخه‌های مختلف علوم زیستی، از فیزیولوژی تا اکولوژی تکاملی هستند. براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی، عملکرد و نوع فعالیت، چندین نوع سلول خونی در بندپایان شناسایی شده‌اند (۱و ۹). که به‌آسانی توسط میکروسکوپ نوری و فلورسنت قابل‌شناسایی می‌باشند (۱۱و ۱۲) سلول‌های خونی در بندپایان شامل پروهموسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها و اوئنوسیت‌ها اسفرولوسیت‌ها و سیانوسیدها هستند. سیستم ایمنی بندپایان یک سیستم ایمنی ذاتی است که بیشتر با تکیه‌بر واکنش‌های سلولی (مانند فاگوسیتوز، انکپسولاسیون و ندولاسیون) همراه است (۲و ۳). عوامل بیماریزای در بندپایان مانند باکتری‌ها، اسپور قارچ‌های بیماری‌زا و یا نماتدها به داخل همولنف بر شکل و تعداد سلول‌های خونی تأثیر دارد. این تغییرات ریختی سلول‌های خونی و همچنین تغییر در تعداد آنها در فواصل مختلف پس از ورود، در راستای ایمنی سلولی یعنی بیگانه‌خواری و گره زایی صورت می‌گیرد (۱۵). همچنین ریخت‌شناسی و سلول‌ها در مراحل رشدی یک‌گونه نیز تفاوت‌هایی نشان می‌دهد که به عوامل مختلفی مانند سن، جنسیت، گرسنگی،

پوست‌اندازی، دما و استرس‌های محیطی، وابسته است (۱۷ و ۱۸).

در عقرب‌ها، سلول‌های بنیادی تولیدکننده هموسیت‌ها در غدد لنفاوی قدام و جانبی، نزدیک به شریان انسدادی شکمی متمرکز است (۴). در بررسی انجام شده سلول‌های همولنف عقرب *Mesobathus tamulus phipsoni* پنج نوع سلول خونی شناسایی شد که به‌ترتیب فراوانی شامل سلول‌های پلاسموسیت، گرانولوسیت، اسفروسیت، پروهموسیت و ائونوسیت‌ها بودند (۱۶). باتوجه به تحقیقات اندک بر فیزیولوژی این بندپا، دراین بررسی سلول‌های همولنف عقرب *مزوبوتوس اپئوس* که دارای پراکندگی وسیعی در سراسر ایران می‌باشد موردبررسی قرارگرفت. به دلیل مقاومت عقرب به شرایط محیطی و زنده‌مانی در زیستگاه‌های مختلف و تغییرات تکاملی کم، شناخت سلولهای خونی و فراوانی آن‌ها در همولنف عقرب می‌تواند تا حدود زیادی روشن‌کننده مقاومت و سازگاری این بندپا به شرایط محیطی و یا عوامل بیگانه مانند باکتری‌ها و انگل‌ها باشد.

مواد و روشها

به‌منظور شناسایی سلول‌های خونی، بااستفاده از سرنگ انسولین از سطح پشتی مزوزومای ۱۰ عقرب *مزوبوتوس اپیوس* همولنف هر عقرب به‌صورت جداگانه جمع‌آوری شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از همولنف را روی یک لام گذاشته و با لام دیگر یک اسمیر تهیه شد. پس از خشک شدن، رنگ‌آمیزی گیمسا (محلول ۱:۹ گیمسا و آب مقطر) انجام شد، پس از گذشت ۲۰ دقیقه، لام در آب مقطر قرارگرفت تا محلول رنگی شسته شود. انواع سلول‌های خونی باتوجه به منابع موجود شناسایی شد (۲۰). جهت مشاهده و شناسایی سلول‌های خونی از بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری Olympus BH2 استفاده شد. قطر سلول‌ها بااستفاده از عدسی مجهز به میکرومتری چشمی محاسبه شد.

جهت شمارش کل سلول‌های خونی، پس از جمع‌آوری همولنف از عقرب *مزوبوتوس اپئوس* مقدار ۴ میکرولیتر از همولنف در ۲۰۰ میکرولیتر ماده ضد انعقاد اسیدسیتریک ۲/۶ مولار، سیترات سدیم ۰/۳ مولار، کلرید سدیم ۰/۴۵ مولار، گلوکز ۰/۱ مولار و EDTA ۰/۱ مولار با pH= ۴/۶ رقیق شد (۲۰). شمارش سلولهای خونی با استفاده از لام نئوبار و بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری انجام گرفت. شمارش کل با محاسبه میانگین تعداد سلول‌های خونی با استفاده از فرمول جونز ۱۹۵۹ محاسبه شد (۶).

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS (9.3) انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

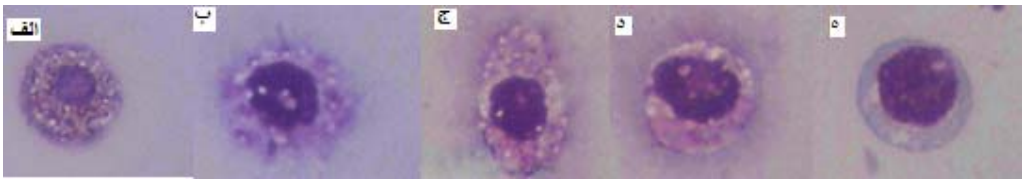
در تحقیق حاضر سلولهای همولنف عقرب *مزوبوتوس اپیوس* با تمرکز بر ویژگی‌های مورفولوژیکی مورد بررسی قرارگرفت. با استفاده از میکروسکوپ نوری سلولهای همولنف در حال گردش دراین عقرب توصیف شدند (جدول۱). دراین مطالعه ۵ نوع هموسیت مشاهده شد که عبارت بودند از: پروهموسیت، پلاسماتوسیت، گرانولوسیت، اسفرولوسیت و ائونوسیت. اشکال تقسیم میتوزی نیز در بین پلاسماتوسیت‌ها مشاهده شد. شمارش کل سلول‌ها مشخص شد که پلاسماتوسیت‌ها (۸۱/۲٪– ۷۰/۲٪) و گرانولوسیت‌ها (۲۹/۷٪– ۱۸/۶٪) بیشترین فراوانی را به خود اختصاص می‌دهند.

پروهموسیت‌ها کوچکترین سلول موجود در همولنف با فراوانی تقریبی ۵ درصد بودند این سلول‌ها دارای سیتوپلاسم بازوفیلیک و هسته در موقعیت مرکزی قرارگرفته است (شکل ۱–الف). پلاسموسیت‌ها بزرگترین و فراوانترین سلول همولنف عقرب مزوبوتوس اپئوس بودند و سیتوپلاسم با چندین شکل مورفولوژیکی دیده

شد. دراین سلول هسته تقریباً مرکزی و سیتوپلاسم بازوفیلیک مشاهده شد (شکل ۱–ج). گرانولوسیت‌ها بعد از پلاسموسیت‌ها دارای فراوانی بالایی بودند این سلول‌ها دارای سیتوپلاسم گرانوله و اسیدوفیلیک و هسته مرکزی و یا در حاشیه بودند (شکل ۱– ب). اسفرولوسیت‌ها با فراوانی تقریبی ۳ درصد دارای هسته در حاشیه و سیتوپلاسم اسیدوفیلیک دیده شد (شکل ۱– د). سلول‌های ائونوسیت‌ها دارای کمترین میزلن فراوانی (۲٪) بودند این سلول‌ها دارای سیتوپلاسم بازوفیلیک و موقعیت هسته غالباً در حاشیه گزارش شد (شکل ۱– ه).

جدول ۱– اندازه‌گیری‌های مورفومتریک سلول‌های همولنف عقرب

ماهیت سیتوپلاسم	موقعیت هسته	عرض(میکرومتر)	طول(میکرومتر)	نوع سلول
بازوفیلیک	مرکزی	۵–۹	۴–۷	پروهموسیت
بازوفیلیک	غالباً در مرکز	۹–۱۶	۱۸/۵–۲۷	پلاسموسیت
اسیدوفیلیک	مرکزی یا در حاشیه	۸–۱۲	۱۲–۱۸	گرانولوسیت
بازوفیلیک	غالباً در حاشیه	۸–۱۰	۱۱–۱۳	ائونوسیت‌ها
اسیدوفیلیک	حاشیه	۸–۱۰	۱۱–۱۳	اسفروسیت



شکل ۱– سلول‌های همولنف *مزوبوتوس اپیوس* رنگ‌آمیزی شده با گیمسا. الف– پروهموسیت، ب– گرانولوسیت، ج– پلاسموسیت، د– اسفرلوسیت، ه– ائونوسیت‌ها

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، سلول‌های خونی *مزوبوتوس اپئوس* با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد. پنج نوع سلول شناسایی شده شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اوئنوسیت‌ها و اسفرولوسیت‌ها بودند. بیشترین و کمترین فراوانی سلول‌های همولنف به ترتیب شامل پلاسموسیت، گرانولوسیت، پروهموسیت، اسفرولوسیت و ائونوسیت‌ها بود. مطالعات نشان داده است که طبقه‌بندی سلول‌های خونی، در حشرات مختلف و حتی در مراحل زیستی مختلف، متفاوت بود (۱).

پروهموسیت‌ها کوچک‌ترین سلول‌ها (۵/۵–۷ میکرومتر) با هسته مرکزی و مدور مشاهده شدند که سیتوپلاسم به شکل لایه‌ای نازک به کناره غشای سلول کشیده شده است تقریباً در تمام مطالعات ریخت‌شناسی سلول‌های همولنف، پروهموسیت‌ها چنین مشخصاتی داشته‌اند و در همولنف همه بندپایان گزارش‌شده‌اند. پلاسموسیت‌ها در همولنف اخذ شده عقرب *مزوبوتوس اپئوس* دارای بزرگترین اندازه (۲۲/۷۵–۱۲/۵میکرومتر) و بیشترین فراوانی بودند. این سلول در بندپایان به اشکال متفاوت و نامنظم دیده شده است (۱۳). زوائد سیتوپلاسمی و اشکال نامنظم به دلیل مشارکت این سلول در سیستم دفاعی بندپایان و بیگانه‌خواری عوامل پاتوژن می‌باشد (۱۴).

گرانولوسیت‌ها غالباً دایره‌ای شکل (۱۵–۱۰ میکرومتر) با هسته فشرده مشخص مرکزی یا کناری بوده و سطح سیتوپلاسم آنها از گرانول پرشده است. در تحقیق حاضر میزان فراوانی گرانولوسیت‌ها بعد از پلاسموسیت‌ها گزارش شد. در تحقیقات انجام شده بااستفاده از میکروسکوپ الکترونی بر روی گرانولوسیت‌ها وجود دو نوع گرانول

ترشحی در سیتوپلاسم این نوع سلول‌ها گزارش‌شده است. گرانول‌های بزرگ که در ترشح فاکتورهای انعقادی، پروتئین‌های قابل انعقاد، کواگولاژن، مهارکننده‌های پروتئیناز، لکتین و پروتئین‌های آنتی باکتریال نقش دارند. گرانول‌های کوچک دارای پروتئین‌های ضدمیکروبی با وزن کمتر از ۳۰ کیلو دالتون می‌باشند (۱۰). فراوانی گرانولوسیت‌ها به دلیل شرکت در فرایند دفاعی بندپایان بالا می‌باشد. به دلیل قابلیت تبدیل این سلول‌ها به اسفرولوسیت‌ها در ذخیره و انتقال هم شرکت دارند (۱۹).

ائونوسیت‌ها سلول‌های گرد بزرگتر از پروهموسیت‌ها ولی کوچکتر از پلاسموسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها (۱۲-۹ میکرومتر) با فراوانی ۲درصد مشاهده شدند. ائونوسیت‌ها یکی از منابع تولید آنزیم فنل اکسیداز، عامل ملانیزاسیون همولنف در بندپایان شناخته شده‌اند و در فاگوسیتوز عوامل بیگانه نقش دارند (۵و ۸). در بررسی ساختار ائونوسیت‌ها بااستفاده از میکروسکوپ الکترونی وجود پاهای کاذب بسیار کوچکی مشاهده شد (۷).

اسفرولوسیت‌ها سلول‌هایی با اندازه تقریبی (۱۲-۹ میکرومتر) که ۳درصد از سلول‌های همولنف عقرب مزوبوتوس اپئوس را تشکیل می‌دادند. سطح سیتوپلاسم این سلول‌ها دارای اسفرول‌های متعددی است نقش این سلول‌ها در بندپایان انتقالی است در واکنش‌های ایمنی فعالیتی ندارند (۱۳).

در بررسی سلول‌های همولنف عقرب *مزوبوتوس تامالوس* *تامالوس* میزان فراوانی پلاسموسیت‌ها ۷۱-۸۱٪، گرانولوسیت ۱۰-۳۱٪، اسفرلوسیت ۲-۴٪ و ائونوسیت ۷-۱۳٪ گزارش شد (۱۶). ازنظر درصد فراوانی سلول‌های خونی و تنوع سلول‌ها با تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد.

مطالعات بسیار اندکی در مورد سلول‌های همولنف در عقرب‌ها وجود دارد. با شناخت و بررسی سلول‌ها همولنف می‌توان جنبه‌های ایمنی این بندپا را با توجه به مقاومت بالای آن به شرایط مختلف محیطی و عوامل بیگانه مورد مطالعه قرارداد. در مطالعه حاضر فراوانی بالای سلول‌های دفاعی نظیر پلاسموسیت‌ها و گرانولوسیت در همولنف می‌تواند نشانگر مقاومت عقرب به شرایط مختلف محیطی باشد.

سپاسگزاری

از حمایت مالی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور- اهواز تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1- Brehélin, M., Drif, L., Baud, L., and Boemare, N., 1989. Insect haemolymph: Cooperation between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*. Insect Biochemistry, 19, PP: 301-307.

2- Cerenius, L., and Söderhäll, K., 2011. Coagulation in invertebrates. Journal of Innate Immunity, 3, PP: 3–8.

3- Cerenius, L., Jiravanichpaisal, P., Liu, H., and Söderhäll, I., 2010. In: Crustacean immunity. In: Söderhäll, K. (Ed.), Invertebrate Immunity. Springer Science Business Media, LLC, New York, PP: 239–253.

4- Farley, R. D., 1984. The ultrastructure of hemocytopoietic organs in the desert scorpion Paruroctonus. Tissue and Cell Journal, 16, PP: 577–588.

5- Fukuzawa, A. H., Vellutini, B. C., Lorenzini, D. M., Silva, P. I., Mortara, R. A., da Silva J. M., and Daffre, S., 2008. The role of hemocytes in the immunity of the spider Acanthoscurria gomesiana .Developmental and Comparative Immunology, 32, PP: 716–725.

6- Jones, J. C., 1959. A phase contrast study of the blood cells in *Prodenia* larvae (Lepidoptera). Quart. Journal of Microbial Science 100, PP: 17–23.

7- Gadelahk, G., 2005. Ultrastructure of hemocytes of the last larval instar of the red palm weevil, *Rhynchophorus Ferrugineusoliv*. (coleoptera:

curculionidae), Alexandria Journal of Agricultural Research, 50 (1), PP: 103 – 110.

8- Giulianini, P. G., Bertolo, F., Battistella, S., and Amirante, G. A., 2003. Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera: Scarabidae) involvement of both granulocytes and oenocytoids in vivo phagocytosis. Tissue Cell, 35, PP: 243-251.

9- Gupta, A. P., 1985. Cellular elements in the haemolymph. In: Kerkut, G. A., Gilbert, L. I., (Eds.), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Cambridge University Press, PP: 85-127.

10- Iwanaga, S., Lee, B.L., 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. J Biochemistry Molecular Biology, 38(2), PP: 128–50.

11- Lavine, M. D., and Strand, M. R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochemistry Molecular and Biology, 32, PP: 1295-1309.

12- Ling, E., and Yu, X., 2006. Hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta* have distinct functions in phagocytosis of foreign particles and self-deadcells. Immunology, 30, PP: 301-309.

13- Liu, F., Xu, Q., Zhang, Q., Lu, A., Beerntsen, B., and Ling, E., 2013. Hemocytes and hematopoiesis in the silkworm, *Bombyx mori*. Invertebrate Survival Journal, 10, PP: 102-109.

14- Lorenzini, D. M., Silva, J. R., Fogaca, A. C., Bulet, P., and Daffre, S., 2003. Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. Developmental and Comparative Immunology, 27(9), PP: 781–91.

15- Nahla, M., Hanan, Abd El-Aziz, A., and Awad, H., 2010. Changes in the haemocytes of *Agrotis ipsilon* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in relation to dimilin and *Bacillus huringiensis* infections. Micron, 41, PP: 203–209.

16- Patil, A., Shah, U., 2011. Types of hemocytes in scorpion *Mesobuthus tamulus tamulus*. Bioscan, 6, PP: 597–599.

17- Sanjayan, K. P., Ravikumar, T., and Albert, S., 1996. Changes in the haemocyte profile of *Spilostethus hospes* (Fab.) (Heteroptera: Lygaeidae) in relation to eclosion, sex and mating. Journal of Biochemistry, 21, PP: 781-788.

18- Sharma, P. R., Sharma, O. P., and Saxena, B. P., 2008. Effect of sweet flag rhizome oil (*Acorus calamus*) on hemogram and ultrastructure of hemocytes of the tobacco armyworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Micron, 39, PP: 544-551.

19- Yamashita, M., and Iwabuchi, K., 2001. *Bombix mori* prohemocytes division and differentiation in individual microcultures. Journal of Insect Physiology, 47, PP: 325-331.

20- Yeager, J., 1945. FThe blood picture of the southern armyworm (Prodenia eridania). Journal of Agricultural Research, 71, PP: 1-40.

Study on morphology and abundance of hemocytes in *Mesobuthus eupeus* (Scorpiones: Buthidae)

Jafari H., Masihipour B. and Forouzan A.

Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, I.R. of Iran.

Abstract

Arthropoda hemocytes are an important indicator of the safety of arthropoda against pathogens and parasitoids. Morphological characterization of hemocytes, is the first step to investigate the involvement of hemocytes in scorpion immunity and specific functions of cells. Due to limited researches on the biology of scorpion in this research the hemocytes of *Mesobuthus eupeus* were examined using light microscopy. Giemsa staining was used to identify these cells. Five identified types of hemocytes in this scorpion were; Prohemocyte, plasmatocyte granulocytes, spherulocytes, and oenocytoids. Two cell types are very common, plasmatocytes and granulocytes, Plasmatocytes constitute 70.2–81.2%, followed by granulocytes with 18.6–29.7% of the total cell population. Prohomocyte with 5-7 μm was the smallest and plasmocytes (12.25- 75.2 μm) were reported to be the largest hemolymph of *Mesobuthus eupeus*. Identification of blood cells of this scorpion for the first time and can provide a study of the immunity of scorpion against pathogens and its resistance to environmental conditions.

Key words: scorpion, *Mesobuthus eupeus*, hemocyte