

УДК 591.111.1:595.76

Гребцова Е.А.

**ВЛИЯНИЕ ОСМОТИЧЕСКОЙ
НАГРУЗКИ НА
МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ
ПАРАМЕТРЫ И МИКРОРЕЛЬЕФ
ГЕМОЦИТОВ
*BLABERUS CRANIIFER*****Гребцова Елена Александровна,**

аспирант кафедры экологии, физиологии и биологической эволюции
Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия
E-mail: shtirlitz009@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Целью данной работы является изучение влияния гипо- и гиперосмотической нагрузки на морфометрические параметры форменных элементов гемолимфы *Blaberus craniifer*. Применение методов атомно-силовой микроскопии позволило оценить такие параметры гемоцитов, как микрорельеф клеточной поверхности, линейные размеры клеток, включая высоту. Описаны изменения топографии поверхности гемоцитов при контактных взаимодействиях с твердым субстратом и при воздействии сред, отличных от физиологически нормальной.

Ключевые слова: гемоциты; микрорельеф поверхности; гипо- и гиперосмотическая нагрузка.

UDC 591.111.1:595.76

*Grebtsova E.A.***THE EFFECT OF THE OSMOTIC
STRESS ON MORPHOLOGICAL
PARAMETERS AND
MICRORELIEF OF BLABERUS
CRANIIFER HEMOCYTES**

Grebtsova Elena Alexandrovna, *Post-graduate Student*
Belgorod State National Research University,
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia
E-mail: shtirlitz009@mail.ru

ABSTRACT

The purpose of this study is the investigation of the effect of hypo- and hyperosmotic stress on morphometric parameters of the formed elements of the *Blaberus craniifer* hemolymph. Application of methods of atomic force microscopy allowed us to estimate such hemocytes parameters as microrelief of cell surface, the linear dimensions of cells, including height. The article describes the variation of the cell surface topography during the interaction with substrate and under the action of medium that differs from physiological solution.

Keywords: hemocytes; microrelief of cell surface; hypo- and hyperosmotic stress.

Рельеф, или топография клеточной поверхности, является весьма мобильной характеристикой: она изменяется в зависимости от функционального состояния клетки [2; 6; 8]. Шероховатость поверхности представляет собой совокупность неровностей, образующих микро рельеф [7]. Количественная оценка шероховатости поверхности мембран имеет важное практическое значение, так как позволяет выявить влияние гомогенности или гетерогенности поверхности на процессы захвата инородных объектов и устойчивость к гипо- и гиперосмотическим нагрузкам [9; 10].

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили гемоциты *Blaberus craniifer*, предварительно классифицированные по морфофункциональным особенностям на 7 типов [1]. Отбор гемолимфы у насекомых осуществляется из поперечного разреза лапки. Полученную гемолимфу делили на три части, каждую из которых помещали в отдельную чашку Петри. К каждой части гемолимфы добавляли 10 мкл раствора NaCl определенной концентрации (гипотонический – 0,45 % NaCl, изотонический раствор – 0,9 % NaCl, гипертонический – 1,35%). Инкубацию проводили в течение 1 минуты. Каплю гемолимфы помещали на стекло и делали мазки. Исследования проведены с использованием сканирующего зондового микроскопа Интегра Вита NT-MDT в режиме атомно-силовой спектроскопии при наложении нагрузки в 25 локальных участках клеточной поверхно-

сти. Обработку полученных АСМ-изображений осуществляли с помощью программного обеспечения Image analysis 3.5 [3]. Был проведен анализ следующих амплитудных среднестатистических параметров шероховатости поверхности в соответствии с международными стандартами: Средняя квадратическая шероховатость S_q (nm); Высота самого высокого пика S_p (nm); Глубина самой глубокой впадины S_v (nm); Асимметрия S_{sk} – характеризует скошенность распределения профиля, когда один спад крутой, а другой – пологий; Эксцесс S_{ku} характеризует протяженность распределения профиля; S_z – параметр, характеризующий толщину поверхностного, возмущенного слоя, не полностью заполненного материалом, в котором происходит изменение рельефа. Так же были определены значения одного из функциональных параметров, характеризующих рельеф в локальной области и степень гладкости поверхности – плотность вершин (пиков) S_{ds} ($1/\mu m^2$). Данный показатель демонстрирует количество вершин на единицу площади [4; 5; 9].

Результаты исследования и их обсуждение

Прогемоциты. На поверхности нативных клеток преобладают микровозвышения, не превышающие 187 nm. Снижение осмотического давления вело к незначительному увеличению объема клеток. На сканограммах гемоциты имели близкую шарообразную форму и гладкую, практически лишенную складок, мембрану (рис. 1).

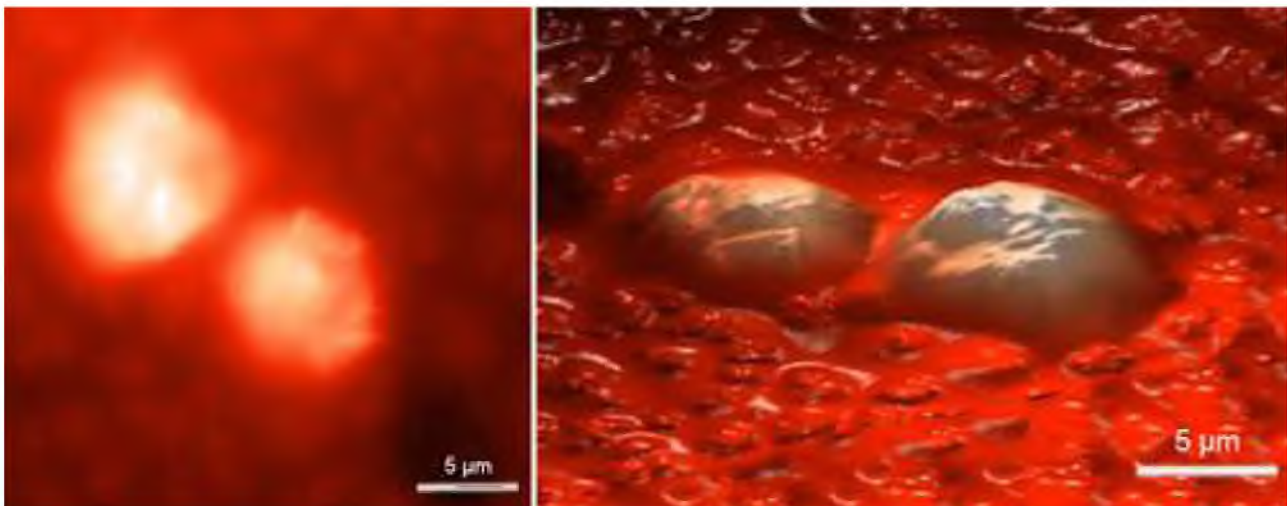


Рис. 1. 2D и 3D – сканограмма прогемоцитов *Blaberus craniifer*
Fig. 1. 2D and 3D – scanogramm of *Blaberus craniifer* prohemocytes

В гипертонических условиях показатели среднеквадратичной шероховатости поверхности повышаются с 53,7 до 68,8, но уменьшается расстояние между возвышениями. Происходит увеличение высоты пиков и глубины впадин (табл. 1). В условиях понижения

осмотического давления отмечено сглаживание рельефа. Изменений в симметричности распределения различных структур рельефа при изменении осмотического давления не наблюдали.

Таблица 1

Показатели шероховатости топографии поверхности прогемоцитов в условиях измененного осмотического давления

Table 1

Parameters of microrelief of prohemocytes surface under conditions of different osmolarity

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/ μm^2	Sz, nm
Гипотоническая среда	26,54 \pm 1,1	100,23 \pm 0,8	52,12 \pm 0,3	0,68	152,35 \pm 1,4
Изотоническая среда	28,41 \pm 0,5	105,00 \pm 1,2	52,45 \pm 0,9	0,70	157,45 \pm 0,3
Гипертоническая среда	29,04 \pm 0,4	104,12 \pm 0,2	55,14 \pm 0,5	0,70	159,26 \pm 0,3

Плазмоциты. Нативные гемоциты отличаются формой, близкой к дисковидной (рис. 2). Высота клеток около 1,2 μm . Наружная плазматическая мембрана формирует гребневидные складки на периферии. В условиях пониженного осмотического давления наблюдали значительное распластывание гемоцитов, экстремальные перепады профиля по высоте отсутствовали, чем объясняется значение показателя sk_u , равное 2,88.

По периферии формировался широкий обод ламеллоплазмы. Рельеф мембраны приобрел большее количество микровозвышений и микровпадин в гипертонической среде, о чем свидетельствует увеличение показателя плотности пиков на единицу поверхности (табл. 2). Инкубация гемоцитов в гипотонической среде не вызвала существенного изменения по данному параметру.

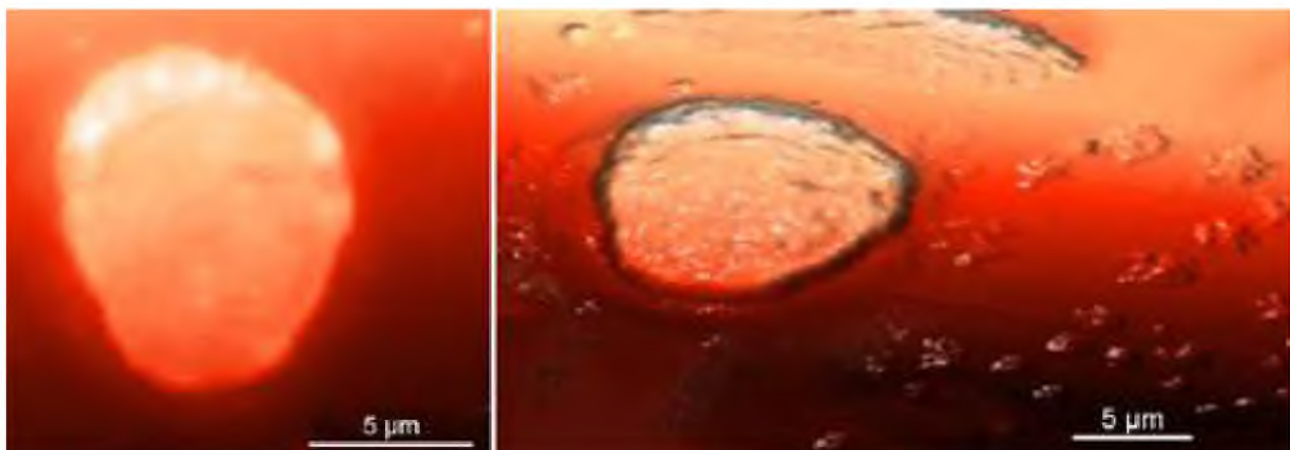


Рис. 2. 2D и 3D – сканограмма плазмоцита *Blaberus craniifer*
Fig. 2. 2. 2D and 3D – scanogram of *Blaberus craniifer* plasmatocyte

Толщина возмущенного слоя (sz) нативных клеток составила $546,52 \pm 0,4$ nm. У гемоцитов, инкубированных в среде с повышенной осмолярностью, этот показатель увеличился до $562,32 \pm 0,8$ nm, а в гипотонической снизился до $409,36 \pm 1,2$ nm. Таким образом,

происходит уменьшение толщины возмущенного слоя в условиях пониженного осмотического давления с сохранением или увеличением числа микровозвышений на единицу площади.

Таблица 2

Показатели шероховатости топографии поверхности плазмоцитов в условиях измененного осмотического давления

Table 2

Parameters of microrelief of plasmatocytes surface under conditions of different osmolarity

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, $1/\mu\text{m}^2$	Sz, nm
Гипотоническая среда	$50,12 \pm 0,6$	$308,21 \pm 0,2$	$101,15 \pm 0,5$	0,87	$409,36 \pm 1,2$
Изотоническая среда	$50,82 \pm 1,2$	$428,80 \pm 0,8$	$117,72 \pm 1,1$	0,89	$546,52 \pm 0,4$
Гипертоническая среда	$56,88 \pm 0,4$	$430,21 \pm 0,3$	$132,11 \pm 0,6$	1,12	$562,32 \pm 0,8$

Гранулоциты. Нативные клетки характеризуются правильной округлой или овальной формой (рис. 3). Поверхность неровная, отмечено выпячивание гранул. Профиль гемоцитов этого типа имеет углубление в нуклеарной области. Высота клеток около $1,5 \mu\text{m}$, в области ядра данный параметр может быть ниже – около $1,1-1,2 \mu\text{m}$. В гипотониче-

ской среде микрорельеф поверхности принимает более однородный характер, показатели шероховатости для этого типа гемоцитов значительно снизились (табл. 3). В условиях повышенного осмотического давления микровозвышения на поверхности гемоцитов приобретали угловатые очертания.

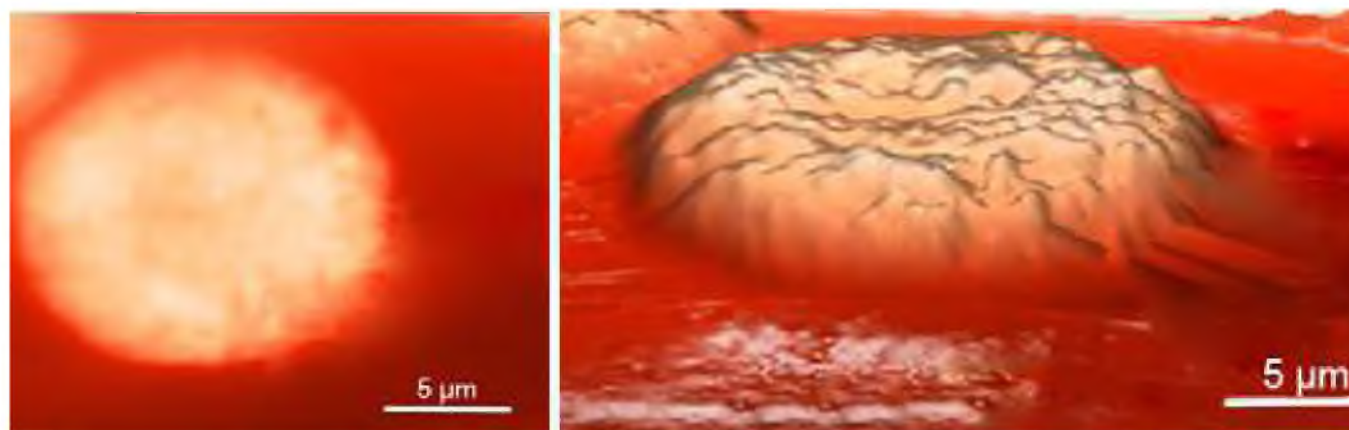


Рис. 3. 2D и 3D – сканограмма гранулоцита *Blaberus craniifer*
Fig. 3. 2D and 3D – scanogram of *Blaberus craniifer* granulocyte

Сферулоциты – шарообразные или яйцевидные гемоциты. Ядро хорошо заметно на сканограмме, имеет правильную круглую форму, расположено в центре или может быть немного смещено к краю. От ядра к периферии в виде лучей отходят радиальные

тяжи с поперечными отростками, формирующими ячейки – здесь происходит накопление сферических включений (рис. 4). В области ядра высота клетки не превышает 1,0 μm , в то время как профиль остальной части гемоцита достигает 1,8-2 μm .

Таблица 3

Показатели шероховатости топографии поверхности гранулоцитов в условиях измененного осмотического давления

Table 3

Parameters of microrelief of granulocytes surface under conditions of different osmolarity

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/ μm^2	Sz, nm
Гипотоническая среда	47,90 \pm 0,8	130,26 \pm 1,2	21,34 \pm 0,5	0,52	151,60 \pm 1,4
Изотоническая среда	48,63 \pm 0,7	296,48 \pm 0,9	29,42 \pm 1,0	0,70	325,90 \pm 1,6
Гипертоническая среда	59,96 \pm 0,2	296,80 \pm 0,6	31,44 \pm 0,3	0,83	328,24 \pm 1,2

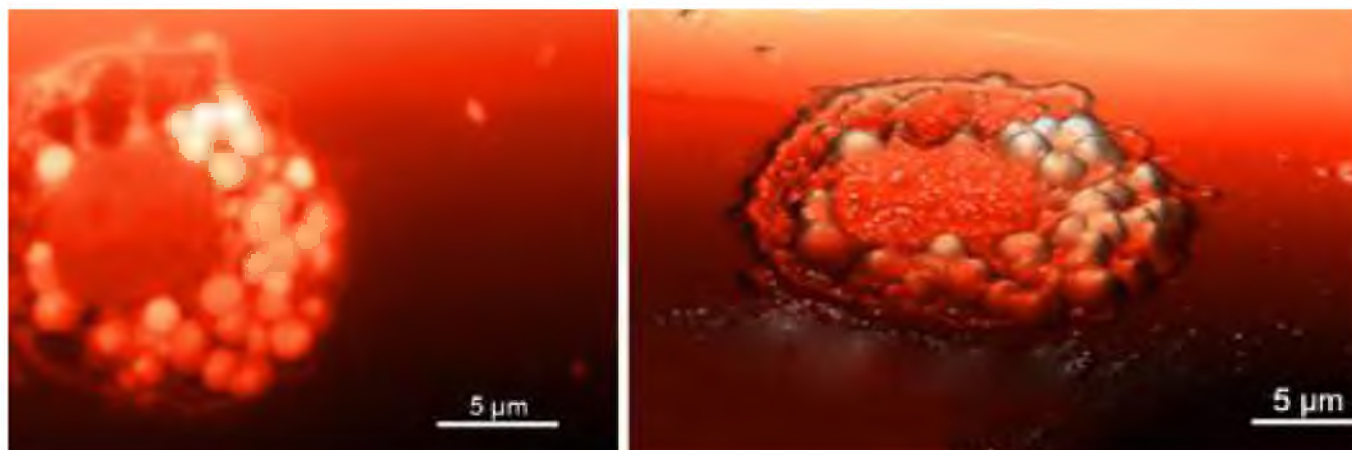


Рис. 4. 2D и 3D – сканограмма сферулоцита *Blaberus craniifer*
Fig. 4. 2D and 3D – scanogram of *Blaberus craniifer* spherulocyte

В среде, отличной от физиологически нормальной, клетки демонстрируют стабильность – это касается как формы, так и параметров, характеризующих особенности микрорельефа поверхности (табл. 4). Иногда

инкубация в гипертонических условиях приводила к более сильной инвагинации участков мембраны между сферическими включениями.

Таблица 4

Показатели шероховатости топографии поверхности сферулоцитов в условиях измененного осмотического давления

Table 4

Parameters of microrelief of spherulocytes surface under conditions of different osmolarity

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/ μm^2	Sz, nm
Гипотоническая среда	155,02 \pm 0,3	620,89 \pm 0,3	175,14 \pm 0,7	0,64	796,03 \pm 1,5
Изотоническая среда	155,71 \pm 1,1	624,03 \pm 0,3	178,52 \pm 0,6	0,64	802,55 \pm 1,4
Гипертоническая среда	156,12 \pm 0,2	624,38 \pm 0,8	179,00 \pm 1,1	0,66	803,38 \pm 0,8

Веретеновидные плазмоциты. Характер поверхности отличается меньшим морфологическим разнообразием, по сравнению с простыми плазмоцитами. Данный тип клеток лучше сохраняет форму, в том числе при

инкубации в средах, отличных от физиологической. Крупное овальное ядро, расположенное центрально, едва заметно. Высота гемоцитов не имеет достоверных отличий в области ядра и на периферии клетки (рис. 5).

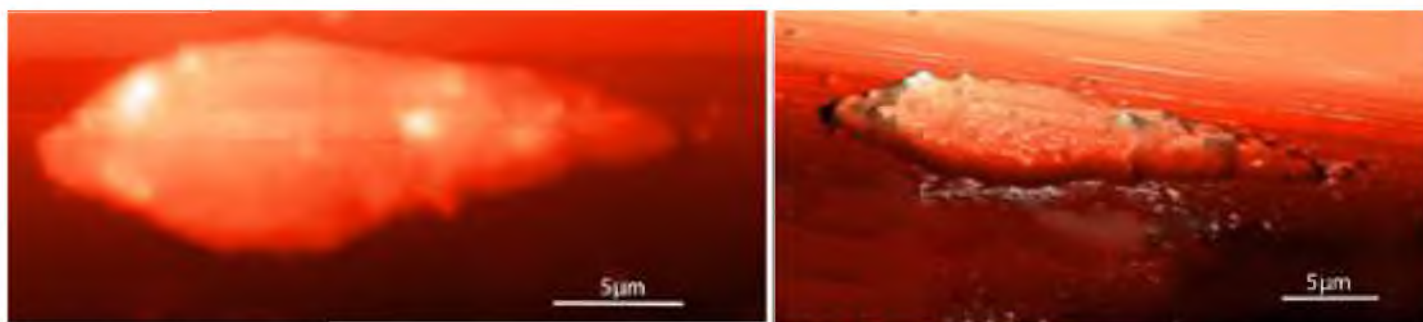


Рис. 5. 2D и 3D – сканограмма веретеновидного плазмоцита *Blaberus craniifer*
Fig. 5. 2D and 3D – scanogramm of *Blaberus craniifer* vermicyte

Мембрана формирует полусферические микровозвышения, которые после инкубации гемоцитов в гипертонической среде приобретают угловатые очертания. Повышение и понижение осмолярности среды оказывает достоверное обратное пропорциональное влияние на изменение линейных размеров

клеток только по короткой оси. Воздействие гипотонического раствора влечет за собой небольшое уменьшение толщины возмущенного слоя (табл. 5). Изменение условий не привело к существенным деформациям поверхности гемоцитов данного типа.

Таблица 5

Показатели шероховатости топографии поверхности веретеновидных плазмоцитов в условиях измененного осмотического давления

Table 5

Parameters of microrelief of vermicytes surface under conditions of different osmolarity

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/ μm^2	Sz, nm
Гипотоническая среда	52,73 \pm 0,4	481,69 \pm 0,2	92,34 \pm 0,3	0,96	574,03 \pm 0,6
Изотоническая среда	54,95 \pm 0,6	494,78 \pm 0,8	110,02 \pm 0,7	0,96	604,80 \pm 1,6
Гипертоническая среда	59,37 \pm 0,4	497,25 \pm 0,4	113,78 \pm 0,5	1,08	611,03 \pm 0,9

Коагулоциты. Мембрана формирует множество складок, что определяет способность коагулоцитов сохранять целостность при ин-

кубации в гипотонической среде, используя мембранный резерв. Четко различима центральная приподнятая область ядра (рис. 6).

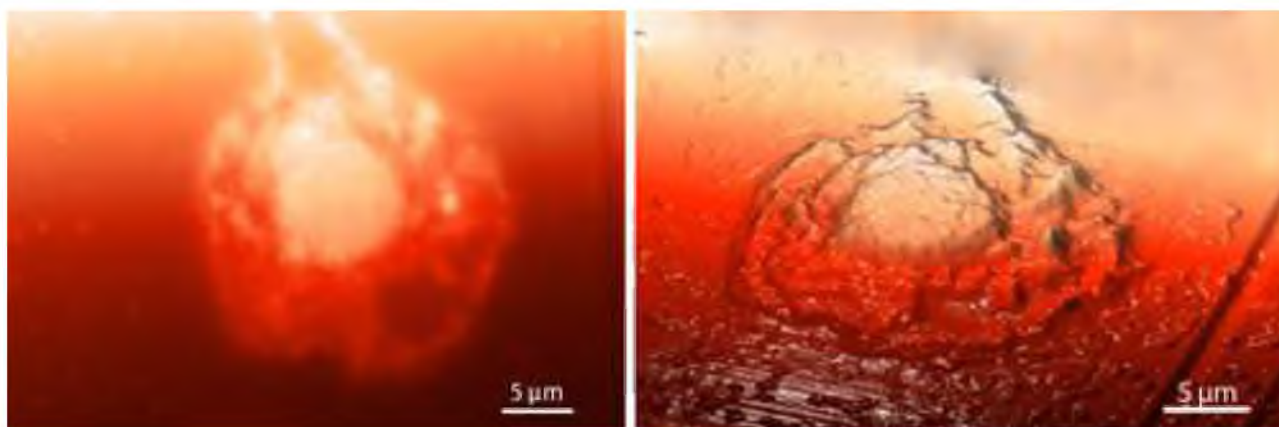


Рис. 6. 2D и 3D – сканограмма коагулоцита *Blaberus craniifer*
Fig. 6. 2D and 3D – scanogram of *Blaberus craniifer* coagulocyte

Во всех условиях тонкий слой цитоплазмы по направлению от околядерного пространства к периферии гемоцита находился практически вровень с подложкой. Таким образом, высота клеток в области ядра составляла 1,6 μm , а остальная часть клетки не превы-

шала 0,9 μm . В условиях гипертонии поверхность приобретала максимальную плотность распределения борозд и гребней, а также демонстрировала высокие значения средней квадратической шероховатости (табл. 6).

Таблица 6

Показатели шероховатости топографии поверхности коагулоцитов в условиях измененного осмотического давления

Table 6

Parameters of microrelief of coagulocytes surface under conditions of different osmolarity

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/ μm^2	Sz, nm
Гипотоническая среда	142,25 \pm 0,5	600,03 \pm 1,2	42,56 \pm 0,8	0,74	642,59 \pm 1,5
Изотоническая среда	142,17 \pm 0,8	610,67 \pm 0,9	52,04 \pm 1,4	0,76	558,63 \pm 1,7
Гипертоническая среда	164,36 \pm 0,7	612,96 \pm 0,6	61,34 \pm 1,2	0,98	674,3 \pm 0,8

Эноцитоиды. Поверхность эноцитоидов характеризуется наличием глубоких инвагинаций мембраны в периферической области, что подтверждается отрицательным значением эксцесса (-0,81). Величина данного параметра уменьшилась до -0,76 после инкубации клеток в среде с повышенной солёностью. При этом возросла частота встречаемости микровозвышений на единице площади,

особенно в области ядра (табл. 7). На сканах заметны гребни с поперечными ответвлениями, тянущиеся от центра к краям клетки (рис. 7). Область ядра приподнята относительно остальной части гематоцита. В целом микро-рельеф поверхности эноцитоидов отличался наибольшим разнообразием, что отразилось в показателях шероховатости.

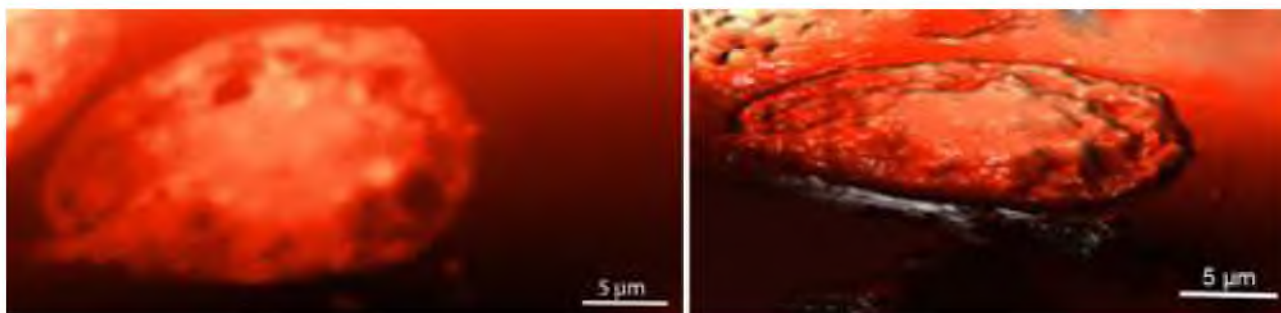


Рис. 7. 2D и 3D – сканограмма эноцитоида *Blaberus craniifer*
Fig. 7. 2D and 3D – scanogram of *Blaberus craniifer* enocytoides

Таблица 7

Показатели шероховатости топографии поверхности эноцитоидов
в условиях измененного осмотического давления

Table 7

Parameters of microrelief of enocytoides surface under conditions of different osmolarity

Условия инкубации	Параметры				
	Sq	Sp, nm	Sv, nm	Sds, 1/µm ²	Sz, nm
Гипотоническая среда	98,63±0,7	350,17±1,1	162,63±0,7	0,62	512,80±1,8
Изотоническая среда	102,67±1,4	363,62±0,5	179,60±1,1	0,62	543,22±1,4
Гипертоническая среда	119,12±1,2	364,65±1,3	197,16±1,5	0,71	561,81±1,5

У всех типов форменных элементов, при инкубации в средах с различной осмолярностью значения эксцесса (sku) находились в диапазоне от 0 до 3, что говорит об отсутствии экстремальных пиков и впадин. Визуальный анализ сканов показал, что для микро-рельефа коагулоцитов и эноцитоидов характерно преобладание инвагинаций – это подтверждают и отрицательные значения ssk (-0,48 и -0,81 соответственно для двух типов клеток). Данный параметр у остальных типов гематоцитов принимает значения, близкие к нулю, что связано с приблизительно равным соотношением впадин и выступов плазматической мембраны.

Заключение

Описаны изменения топографии поверхности гематоцитов при контактных взаимо-

действиях с твердым субстратом и при воздействии сред, отличных от физиологически нормальной. Для клеток, выполняющих фагоцитарную функцию характерно уменьшение/увеличение толщины возмущенного слоя в гипотонической и гипертонической средах соответственно с сохранением или увеличением числа микровозвышений на единицу площади. У гематоцитов с обильным содержанием гранул отмечено преобладание инвагинаций при попадании в условия с повышенным осмотическим давлением. Коэффициент шероховатости у всех типов клеток в данной среде повышается, однако это не всегда связано с увеличением числа микровозвышений – значимую роль также играет углубление впадин и увеличение высоты элементов микро-рельефа.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Гребцова Е.А., Присный А.А. Определение мембранного резерва гемоцитов *Periplaneta americana* и *Blaberus craniifer* и изучение влияния гипоосмотической нагрузки на объем клеток // «Научные достижения 40 биологии, химии, физики»: материалы международной заочной научно-практической конференции. Новосибирск: Изд. «Сибирская ассоциация консультантов». 2012. 114 с.
2. Гущина Ю.Ю., Плескова С.Н., Звонкова М.Б. Исследование различий морфологических параметров клеток крови человека методом Сканирующей Зондовой Микроскопии. Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2005; 1: 48-53.
3. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии М.: Техносфера, 2004.
4. Новак А.В., Новак В.Р. Шероховатость пленок аморфного, поликристаллического кремния и поликристаллического кремния с полусферическими зернами. Письма в ЖТФ, 2013, том 39, вып. 19, С. 32-40.
5. Плескова С.Н., Гущина Ю.Ю., Звонкова М.Б. Использование метода сканирующей зондовой микроскопии в биомедицинских исследованиях // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Серия Биология. Выпуск 1 (7). Электромагнитные поля и излучения в биологии и медицине. – Н. Новгород: Изд-во ННГУ. – 2004. – с. 127 – 134.
6. Bagge U. Amundson B, Lauritzen C. Blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock. // Acta Physiol Scand – 1980. – V. 108(2). – PP. 159–163.
7. Bagge U. Skalak R, Attefors R. Granulocyte rheology. Experimental studies in an in vitro microflow system. // Adv Microcirc. – 1977. – PP. 29–48.
8. Deng Z. Applications of atomic force microscopy in biophysical chemistry of cells / Z. Deng, V. Lulevich, F.T. Liu, G.Y. Liu // The journal of physical chemistry. B. – 2010. – Vol.114. – No.18. – P.5971-5982.
9. Hörber J.K. Investigation of living cells in the nanometer regime with the scanning force microscope / J.K. Hörber, W. Hiiberle, F. Ohnesorge, G. Binnig, H.G. Liebich, C.P. Czermy, H. Mahnel, and A. Mayr // Scanning Microsc. – 1992. – Vol.6. – P.919-929.
10. Ushiki T. Atomic force microscopy in histology and cytology / T. Ushiki, J. Hitomi, S. Ogura, T. Umemoto, M. Shigeno // Archives of histology and cytology. – 1996. – Vol.59. – No.5. – P.421-423.

REFERENCES:

1. Grebtsova E.A., Prisky A.A. Determination of membrane reserve of *Periplaneta americana* and *Blaberus craniifer* hemocytes and research of the effect of hypoosmotic reassure on cell volume // «Scientific developments of biology, chemistry, physics»: materials of international distance scientific-practical conference. Novosibirsk: «Siberian consultant association ». 2012. P.114.
2. Guschina Y.Y., Pleskova S.N., Zvonkova M.B. Research of distinctions of morphological parameters of blood cells of the individuals by method of the Scanning Probe Microscopy. Surface. X-ray, sinkhrotronny and neutron researches. 2005; 1: 48-53.
3. Mironov V.L. Fundamentals of the scanning probe microscopy. M.: Technosphere, 2004.
4. Novak A.V., Novak V.R. Roughness of films of amorphous, polycrystalline silicon and polycrystalline silicon with hemispherical grains. Letters in JTPH, 2013, V. 19, P. 32-40.
5. Pleskova S.N., Guschina Y.Y., Zvonkova M.B. Using of the method of the scanning probe microscopy in biomedical researches // Newspaper of Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod . Biology. Volume 1 (7). Electromagnetic fields and radiations in biology and medicine. – N. Novgorod : NNSU. – 2004. - P. 127 – 134.
6. Bagge U. Amundson B, Lauritzen C. Blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock. // Acta Physiol Scand – 1980. – V. 108(2). – PP. 159–163.
7. Bagge U. Skalak R, Attefors R. Granulocyte rheology. Experimental studies in an in vitro microflow system. // Adv Microcirc. – 1977. – PP. 29–48.
8. Deng Z. Applications of atomic force microscopy in biophysical chemistry of cells / Z. Deng, V. Lulevich, F.T. Liu, G.Y. Liu // The journal of physical chemistry. B. – 2010. – Vol.114. – No.18. – P.5971-5982.
9. Hörber J.K. Investigation of living cells in the nanometer regime with the scanning force microscope / J.K. Hörber, W. Hübler, F. Ohnesorge, G. Binnig, H.G. Liebich, C.P. Czerny, H. Mahnel, and A. Mayr // Scanning Microsc. – 1992. – Vol.6. – P.919-929.
10. Ushiki T. Atomic force microscopy in histology and cytology / T. Ushiki, J. Hitomi, S. Ogura, T. Umemoto, M. Shigeno // Archives of histology and cytology. – 1996. – Vol.59. – No.5. – P.421-423.