

## ВЛИЯНИЕ КАЛЬЦИЕВОЙ НАГРУЗКИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛЕЙКОЦИТОВ В ОПЫТАХ *IN VIVO* И *IN VITRO*<sup>1</sup>

С.Г. Михайлова<sup>1</sup>

Н.А. Павлов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского  
Россия, 150000, г. Ярославль,  
ул. Республиканская, 108

<sup>2</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет  
Россия, 308015,  
г. Белгород, ул. Победы 85

E-mail: ncpubl@gmail.com

Осуществлено изучение влияния концентрации ионов кальция на функциональные свойства лейкоцитов крови крыс. Установлено, что повышение концентрации ионов кальция в питьевой воде приводит к изменениям морфометрических характеристик белых клеток крови. В отличие от лимфоцитов, использование мембранного резерва нейтрофилами выражено сильнее. Осморегуляторные реакции лимфоцитов протекают эффективнее по сравнению с нейтрофилами. Непосредственное воздействие на лейкоциты крови ионов кальция приводит к увеличению объема клеток.

Ключевые слова: ионы кальция, лейкоциты, мембранный резерв, осморегуляция.

### Введение

Ионы кальция участвуют во многих физиологических реакциях, протекающих в организме. Имеются данные об участии ионов кальция в формировании клеточных адаптивных реакций [1, 2, 3, 4], перераспределении цитоскелета и перемещении центров адгезии на мембране [5]. Избыточное поступление ионов кальция и накопление его в клетке может вызывать изменения структуры и функций ряда органоидов [6, 7].

Целью данного исследования является изучение влияния нормальной и повышенной концентрации ионов кальция на морфофункциональные свойства лейкоцитов крови.

### Объекты и методы исследования

Эксперименты проведены на лабораторных крысах линии Вистар, которых делили на группы случайным образом. Для изучения влияния концентрации ионов кальция ( $Ca^{2+}$ ) на функциональные и морфометрические свойства лейкоцитов было проведено две серии опытов.

В первой серии изучали влияние концентрации  $Ca^{2+}$  на лейкоциты в опытах *in vivo*. Животных экспериментальной группы в течение 6 месяцев поили жесткой водой, концентрация  $Ca^{2+}$  составляла 66.5 мг/л, контрольная группа получала имитаты питьевой воды с концентрацией  $Ca^{2+}$  9.75 мг/л. Суспензию лейкоцитов, выделенную из крови животных экспериментальной и контрольной групп, использовали для оценки осморегуляторных реакций и мембранного резерва белых клеток крови при помощи комплексного метода [8].

Во второй серии изучали непосредственное влияние различных концентраций  $Ca^{2+}$  на лейкоциты в опытах *in vitro*. Для этого в суспензию лейкоцитов, разделенную на две части, добавляли раствор  $CaCl_2$ . Первая часть суспензии – контрольная (концентрация  $Ca^{2+}$  – 2.23 ммоль/л), вторая часть – экспериментальная (концентрация  $Ca^{2+}$  – 2.52 ммоль/л). Содержание  $Ca^{2+}$  в контрольной пробе соответствовало концен-

<sup>1</sup> Работа выполнена при поддержке Госконтракта 14.740.11.0956 от 29.04.2011 г. и федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы по теме: «Клеточный ответ на растворимые и нерастворимые (в форме наночастиц) металлы в опытах *in vivo* и *in vitro*» (шифр заявки «2010-1.3.2-203-002-010»).



трации этого иона в сыворотке крови крыс интактной группы в опытах *in vivo*, а в экспериментальной – концентрации  $Ca^{2+}$  в сыворотке крови животных, употреблявших жесткую воду. Контрольную и экспериментальную пробы инкубировали 30 мин в термостате при температуре  $+37^{\circ}C$ .

Для исследования степени влияния фиксатора на геометрические характеристики белых клеток крови суспензию лейкоцитов делили на три равные части – суспензия клеток № 1, суспензия клеток № 2 и суспензия клеток № 3. Первую после инкубации в изотоническом и сильно-гипотоническом растворах хлорида натрия помещали в камеру Горяева. Клетки второй суспензии сразу после инкубации фиксировали глутаровым альдегидом в лунке планшетки, после чего готовили мазок. Из клеток третьей суспензии после инкубации готовили мазки и затем фиксировали глутаровым альдегидом.

Для оценки использования мембранного резерва и осморегуляторных реакций клеток лейкоциты подвергали гипоосмотическим нагрузкам в 0.2% растворе  $NaCl$ . После всех экспозиционных нагрузок готовили мазки, которые фиксировали глутаровым альдегидом. Клетки сканировали на атомно-силовом микроскопе «ИНТЕГРА Вита» (НТ-MDT, Россия) полуконтактным методом с последующим определением морфометрических показателей (диаметра, высоты, объёма, площади поверхности клеток). По измеренным геометрическим характеристикам рассчитывали коэффициент уплотненности (КУ) – отношение площади эллипса (проекция в плоскости длинных осей) к их высоте – с последующей оценкой пластичности клеток.

### Результаты и их обсуждение

Установлено, что лейкоциты, не подвергавшиеся действию фиксатора, имели больший диаметр, чем клетки, фиксированные в лунке планшетки, что обусловлено незначительным гипертоническим сжатием клеток под влиянием раствора глутарового альдегида (таблица 1).

Таблица 1

**Диаметры лейкоцитов после инкубации в растворах кальция ( $Ca^{2+}$ )  
двух разных концентраций ( $M \pm m$ )**

Группа	Суспензия клеток № 1		Суспензия клеток № 2	
	$NaCl$ 0.9%	$NaCl$ 0.2%	$NaCl$ 0.9%	$NaCl$ 0.2%
Контроль	$8.80 \pm 0.09$	$10.51 \pm 0.15^*$	$5.99 \pm 0.05^{\circ}$	$6.23 \pm 0.07^{* \circ}$
Р-р кальция № 1	$8.49 \pm 0.15$	$11.16 \pm 0.10^{* a}$	$6.13 \pm 0.05^{\circ}$	$6.10 \pm 0.06^{\circ}$
Р-р кальция № 2	$9.71 \pm 0.25^{a b}$	$10.74 \pm 0.20^{* b}$	$5.97 \pm 0.07^{\circ}$	$6.04 \pm 0.05^{\circ a}$

Примечание:

\* – достоверность различий по сравнению с изотоническим раствором  $NaCl$  (критерий Стьюдента,  $p < 0.01$ );

$\circ$  – достоверность различий по сравнению с суспензией клеток № 1 (критерий Стьюдента,  $p < 0.01$ );

a – достоверность различий по сравнению с клетками контрольной группы животных (критерий Стьюдента,  $p < 0.01$ );

b – достоверность различий по сравнению с клетками, инкубированными в растворе кальция № 1 (критерий Стьюдента,  $p < 0.01$ ).

Общая картина изменений морфометрических показателей, а также использования мембранного резерва клеток, не подвергавшихся фиксации, была сходна с аналогичными показателями лейкоцитов, фиксированных на стекле. При фиксации клеток в лунке планшетки геометрические параметры и показатели относительного мембранного резерва отличались от таковых у нефиксированных клеток (рис. 1 и 2).

Следовательно, метод фиксации лейкоцитов, помещенных на стекло в виде мазка, является наиболее приемлемым для проведения подобных исследований.

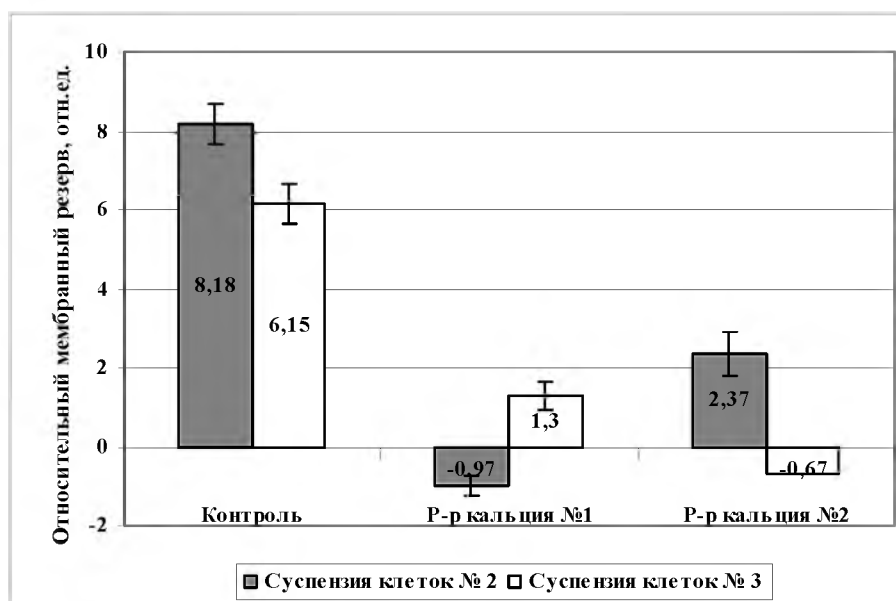


Рис. 1. Относительный мембранный резерв лейкоцитов (суспензия клеток № 1)

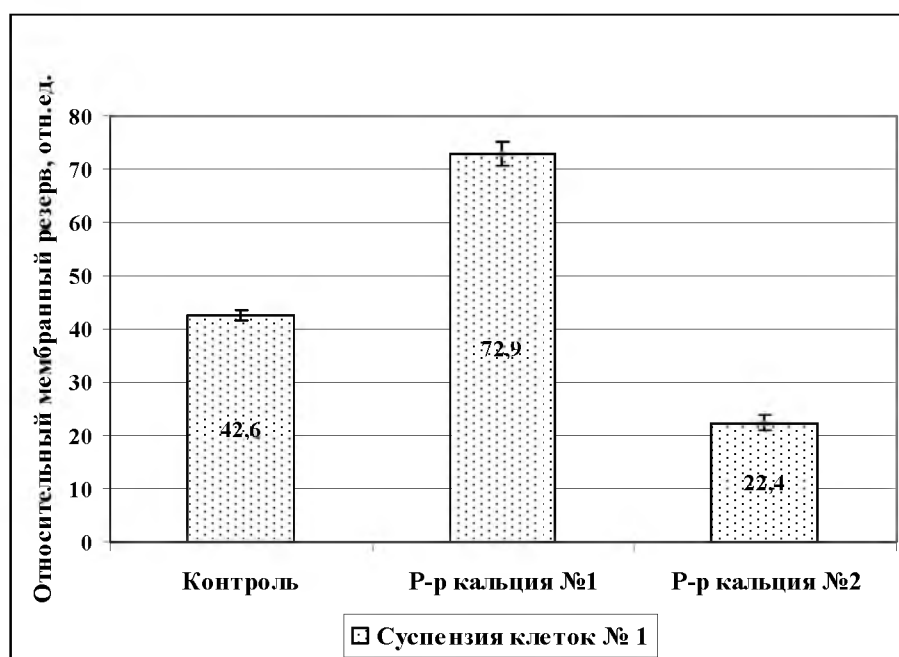


Рис. 2. Относительный мембранный резерв лейкоцитов (суспензия клеток № 2 и № 3)

В экспериментах *in vivo* по изучению влияния  $Ca^{2+}$  было выявлено, что мембранный резерв использовался лимфоцитами контрольной и опытной групп животных, употреблявших жесткую воду, примерно одинаково. Увеличение диаметра клеток после инкубации в 0.2% -ом растворе  $NaCl$  составляло 26.4% – контрольная группа и 25.4% – опытная группа. Мембранный резерв нейтрофилов в опытной группе использовался эффективнее, чем в контрольной группе животных. Увеличение диаметра гемоглобинов после инкубации в 0.2%-ом растворе  $NaCl$  составляло 24.1% в опытной группе и 20.7% в группе контроля (таблица 2).



Таблица 2

**Диаметры лейкоцитов в изотоническом и сильно-гипотоническом растворах хлорида натрия ( $M \pm m$ )**

Группа	NaCl 0.9 %		NaCl 0.2 %, 60 с	
	нейтрофилы, мкм	лимфоциты, мкм	нейтрофилы, мкм	лимфоциты, мкм
Контроль	9.2±0.06	6.7±0.04	11.1±0.06 *	8.4±0.05 *
Опыт	8.7±0.06	6.7±0.04	10.8±0.06 * <sup>a</sup>	8.4±0.04 *

Примечание:

\* — достоверность различий по сравнению с изотоническим раствором (0.9% NaCl) (критерий Стьюдента,  $p < 0.01$ );<sup>a</sup> — достоверность различий по сравнению с интактными животными (критерий Стьюдента,  $p < 0.01$ ).

ление исходного объёма было менее эффективным как у лимфоцитов, так и у нейтрофилов по сравнению с группой контроля.

Таблица 3

**Диаметры лейкоцитов в изотоническом и умеренно-гипотоническом растворах хлорида натрия при разном времени инкубации ( $M \pm m$ )**

Группа	Лейкоциты	NaCl 0.9%	NaCl 0.45%, время инкубации 60 секунд	NaCl 0.45% время инкубации 1 час
Контроль	лимфоциты	6.7±0.04	7.4±0.04 *	6.9±0.04
Опыт		6.7±0.04	7.6±0.05 * <sup>a</sup>	7.0±0.04 <sup>o</sup>
Контроль	нейтрофилы	9.2±0.06	9.9±0.07 *	9.5±0.08 <sup>o</sup>
Опыт		8.7±0.06	9.7±0.07 *	9.2±0.07 <sup>o</sup>

Примечание:

\* — достоверность различий по сравнению с 0.9% раствором NaCl (критерий Стьюдента,  $p < 0.01$ );<sup>a</sup> — достоверность различий по сравнению с контролем (критерий Стьюдента,  $p < 0.01$ );<sup>o</sup> — достоверность различий по сравнению с 0.45% раствором NaCl (время инкубации 60 с) (критерий Стьюдента,  $p < 0.01$ ).

В опытах *in vitro* было установлено увеличение объёма лейкоцитов в экспериментальной пробе при экспозиции в изо- и гипотоническом растворах NaCl по сравнению с контролем. Объём белых клеток крови составлял 80.8±10.3 мкм<sup>3</sup> (0.9% раствор NaCl) и 96.7±11.9 мкм<sup>3</sup> (0.2% раствор NaCl), а в контрольной пробе 54.9±9.2 мкм<sup>3</sup> и 87.4±44.7 мкм<sup>3</sup>, соответственно. В экспериментальной пробе при инкубации в 0.2% растворе NaCl объём увеличивается на 19.7%, тогда как в контрольной этот показатель составляет 59.0% ( $p < 0.05$ ).

Параметры высоты белых клеток экспериментальной пробы превышали значения, полученные в контроле, на 36.4%. Значения коэффициента уплощенности лейкоцитов экспериментальной пробы свидетельствуют о снижении распластанности белых клеток крови в результате воздействия повышенной концентрации ионов кальция на 23% (0.9% раствор NaCl) и на 41% (0.2% раствор NaCl) (табл. 4).

Таблица 4

**Показатели высоты лейкоцитов крови ( $M \pm m$ )**

Группа	Средняя высота клеток, мкм		Коэффициент уплощённости	
	NaCl - 0.9%	NaCl - 0.2%	NaCl - 0.9%	NaCl - 0.2%
Контроль	1.1±0.19	1.1±0.37	74.1±21.84	109.7±38.64 <sup>b</sup>
Ca <sup>2+</sup> 2.52 ммоль/л	1.5±0.13 <sup>a</sup>	1.5±0.23 <sup>a</sup>	56.9±10.26 <sup>a</sup>	64.8±11.28 <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> — достоверность различий по сравнению с контрольной группой (непарный критерий Вилкоксона,  $p < 0.05$ ).

<sup>b</sup> — достоверность различий по сравнению с изотоническим раствором (непарный критерий Вилкоксона,  $p < 0.05$ ).

## Заключение

При повышении концентрации ионов кальция в питьевой воде происходит изменение морфометрических характеристик лейкоцитов. Использование мембранного резерва нейтрофилами осуществляется эффективнее по сравнению с лимфоцитами. Осморегуляторные реакции реализуются лейкоцитами опытной группы менее выражено по сравнению с контролем. Восстановление исходного объема клеток происходит эффективнее у лимфоцитов по сравнению с нейтрофилами. Ионы кальция при непосредственном воздействии на лейкоциты способствуют увеличению объема клеток по сравнению с контролем. Рост показателей объема лейкоцитов после инкубации в растворе с повышенной концентрацией кальция осуществляется вследствие увеличения высоты белых клеток крови, а не за счет их распластанности на поверхности подложки.

## Список литературы

1. Александрова Е.А. Кальцийтранспортирующие системы и регуляция концентрации кальция в кардиомиоцитах // *Успехи физиологических наук*. – 2001. – Т. 32. – № 3. – С. 40-48.
2. Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г. Стресс-лимитирующие системы организма и новые принципы профилактической кардиологии // *Обзорная информация медицины и здравоохранения*. – М.: Союзмединформ, 1988. – 72 с.
3. Пшенникова М.Г., Хаспеков Г.Л., Татаренко А.О. Адаптация к физической нагрузке увеличивает экспрессию генов Са-АТФазы саркоплазматического ретикулума сердечной мышцы // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 1999. – Т. 128. – № 7. – С. 24-28.
4. Cheng H., Wei C., Wang X., Chen M., Ouyang K., Song L-S. Calcium flickers steer cell migration // *Nature*. – 2009. – Vol. 457. – №12. – P. 901-906.
5. Trump B.F., Berezedky I.K. Deregulation of cytoskeleton and Ca<sup>++</sup> regulation in cell injury // *Journal of Cell Biology*. – 1982. – Vol. 2. – P. 69-76.
6. Козловский В.Л. Регуляция кальциевого гомеостаза в нервных клетках // *Успехи физиологических наук*. – 1995. – Т. 26. – № 3. – С. 14-24.
7. Фёдорова М.З., Левин В.Н. Метод комплексного исследования геометрии, площади поверхности, резервных возможностей мембраны и осморегуляции лейкоцитов крови // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 1997. – № 11. – С. 44-46.
8. Григорьев А.И., Ларина И.М. Принципы организации обмена кальция // *Успехи физиологических наук*. – 1992. – Т. 23. – № 3. – С. 25-52.

## INFLUENCE OF CALCIUM LOADING ON FUNCTIONAL PROPERTIES OF LEUKOCYTES IN THE IN VIVO AND IN VITRO EXPERIMENTS

**S.G. Mihailova<sup>1</sup>**  
**N.A. Pavlov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Yaroslavl Pedagogical State University,  
Respublikanskaya St. 108, Yaroslavl,  
150000, Russia  
<sup>2</sup>Belgorod State National Research  
University,  
Pobedy St. 85, Belgorod, 308015, Russia  
E-mail: ncpubl@gmail.com

There has been held an investigation of calcium ions influence on functional properties of rats' blood leukocytes. The increase of calcium concentration in drinking water leads to changes of white blood cells' morphometric characteristics. In comparison with lymphocytes the usage of membrane reserve by neutrophils is higher. Blood cells' osmoregulation reactions are more effectively used by lymphocytes in contrast to neutrophils. The influence of calcium ions on leukocytes promotes growth of the cells' volume.

Key words: calcium ions, leukocytes, reserve of membrane, osmoregulation.