



УДК 591.111.4:591.111.7

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ И ЛЕЙКОЦИТОВ *CYPRINUS CARPIO* И *RANA RIDIBUNDA* В УСЛОВИЯХ УМЕРЕННОЙ ГИПОТОНИИ

В.В. Адамова, С.Д. Чернявских

Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет,
Россия, 308015, г. Белгород,
ул. Победы, 85

E-mail: Chernyavskikh@bsu.edu.ru

Изучены изменения морфометрических показателей, способность к осморегуляции и фагоцитарная активность ядерных эритроцитов и лейкоцитов сазана (*Cyprinus carpio*) и лягушки озёрной (*Rana ridibunda*) в условиях умеренной гипотонии. Показано, что при умеренной гипосмотической нагрузке с увеличением длительности инкубации линейные размеры гемоцитов увеличиваются, за исключением гранулоцитов, которые проявляют осморегуляторную способность. В среде с пониженной осмолярностью фагоцитарная активность лейкоцитов *C. carpio* и *R. ridibunda* выше по сравнению с эритроцитами. У опытных животных отмечена более высокая поглотительная способность гемоцитов в отношении *Saccaromyces cerevisiae* и *Bacillus subtilis* по сравнению с латексом.

Ключевые слова: ядерные эритроциты, лейкоциты, морфофункциональные особенности, умеренная гипотония

Введение

При экстремальных или патологических воздействиях могут происходить различные нарушения водного обмена, ведущие к существенным изменениям осмолярности внутренней среды организма [1]. Способность гемоцитов регулировать свой объем и форму влияет на их функционирование, в частности, на фагоцитарную активность [2]. В поддержании функциональной активности форменных элементов крови большое значение имеет система саморегуляции объема клеток [3]. Изучение механизмов, позволяющих клеткам крови изменять и регулировать объем, в последние годы находится в зоне особого внимания исследователей [4]. Многочисленными экспериментами установлена зависимость между физиологическим состоянием организма и стойкостью эритроцитов к гемолитикам разного генеза, не исключая метаболиты. Наиболее полно явление осмотической устойчивости эритроцитов изучено у млекопитающих животных и человека [5]. В научной литературе имеются данные об осмотической резистентности ядерных эритроцитов некоторых видов рыб [6], лягушек [4]. Показано, что ядерные красные клетки крови, несмотря на четкую функциональную специализацию, сохраняют такие архаичные признаки, как способность к фагоцитозу [7] и миграционная активность [8]. Способность к осморегуляции, а также морфометрические показатели у ядерных эритроцитов и лейкоцитов холоднокровных животных в условиях гипотонии изучены недостаточно, а работ по изучению фагоцитарной активности ядерных гемоцитов *Cyprinus carpio* и *Rana ridibunda* при умеренной гипосмотической нагрузке не проводилось.

Объекты и методы исследования

В работе использовали периферическую кровь, взятую у наркотизированных эфиром сазана (*C. carpio*) (30 особей) и лягушки озёрной (*R. ridibunda*) (30 особей). Объектами исследования служили ядерные эритроциты и лейкоциты. Забор крови у сазана осуществляли из хвостовой вены, у лягушки – из сердца. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (10 ед./мл). Полученную кровь центрифугировали 10 мин. при 400 г, собирали слой лейкоцитов и обогащённую ими часть плазмы. В пробирке оставляли суспензию эритроцитов.

С целью получения данных по морфометрическим показателям красные и белые клетки крови инкубировали с изотоническим (0.6% для лягушки и 0.8% для сазана) и умеренно-гипотоническим (0.3% для лягушки и 0.4% для сазана) растворами NaCl в течение 60 с. По истечении времени инкубации готовили мазки. Линейные размеры клеток определяли с помощью анализатора изображений «Видео Тест» [9]. У лейкоцитов, имеющих форму шара, измеряли диаметр, а у эритроцитов, имеющих эллипсоидную форму, – большую и малую оси. Об осморегуляторных реакциях клеток судили по кинетике набухания (60 с в умеренно-гипотоническом растворе) и способности восстанавливать исходный объем после 30-минутной экспозиции в этом же растворе.



Для исследования поглотительной способности гемоцитов использовали клетки дрожжей (*Saccaromyces cerevisiae*), сенную палочку (*Bacillus subtilis*) и агломерированные частицы латекса диаметром 0.8 мкм [10–14]. Отдельно смесь лейкоцитов и эритроцитов разбавляли умеренно гипотоническим раствором (0.3 и 0.4% раствор NaCl для лягушки и карпа соответственно) в соотношении 1:10. К полученным суспензиям добавляли объекты фагоцитоза в соотношении 1:50 и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин., встряхивая пробирку с гемоконцентратом через каждые 5 мин. По окончании инкубации делали мазки, фиксировали клетки этанолом, окрашивали азур-эозином по Романовскому. Подсчитывали процент фагоцитирующих эритроцитов и лейкоцитов (фагоцитарная активность) [15]. Во избежание неточностей при подсчете поглощенных частиц, связанных с затруднениями в определении их локализации (внутри или на поверхности клетки), использовали иммерсионное увеличение – объектив $\times 100$.

Статистическую обработку результатов выполняли с применением пакета программ «Statistica 7.0». Цифровые данные в таблицах при условии, что все величины имеют нормальное распределение, представляли средней арифметической (M) и ошибкой средней (m). Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента ($p < 0.05$).

Результаты и их обсуждение

Анализ морфометрических показателей ядерных гемоцитов подопытных животных показал, что у эритроцитов сазана после 60 с инкубации в умеренно-гипотоническом растворе диаметр большой полуоси увеличился на 21%, малой – на 18% по сравнению с аналогичными показателями, полученными при инкубации в изотоническом растворе (табл. 1). После 30-минутной экспозиции в условиях пониженной осмолярности среды линейные размеры красных клеток крови *S. carpio* также превышали значения, полученные при инкубации в условиях изотонии: размер большой полуоси на 23%, малой – на 19%.

Таблица 1

Морфометрические показатели эритроцитов, мкм

Раствор, время инкубации	Большая полуось	Малая полуось
<i>Cyprinus carpio</i>		
Изотонический, 60 с	10.46 \pm 0.13	7.51 \pm 0.14
Умеренно-гипотонический, 60 с	12.65 \pm 0.14*	9.17 \pm 0.13*
Умеренно-гипотонический, 30 мин	12.81 \pm 0.18*	8.94 \pm 0.14*
<i>Rana ridibunda</i>		
Изотонический, 60 с	20.86 \pm 0.10	14.08 \pm 0.11
Умеренно-гипотонический, 60 с	22.79 \pm 0.20*	14.70 \pm 0.20*
Умеренно-гипотонический, 30 мин	24.17 \pm 0.37*	16.73 \pm 0.31*

Примечание. Здесь и в табл. 2 представлены значения $M \pm m$; * – достоверность различий по сравнению с изотоническим раствором по t-критерию Стьюдента ($p < 0.05$).

После 60 с пребывания в умеренно гипотоническом растворе показатель большой полуоси эритроцитов лягушки превышал показатель, полученный при инкубации в изотоническом растворе, на 9%, малой – на 4%. После 30 мин. инкубации в гипоосмотической среде большая полуось красных клеток крови *R. ridibunda* увеличилась на 16%, малая – на 19% (см. табл. 1).

Диаметр лимфоцитов сазана и лягушки после 60 с инкубации в умеренно-гипотоническом растворе увеличился на 37 и 4%, после 30 минут – на 44 и 18% соответственно по сравнению с инкубацией в условиях изотонии (табл. 2).

Таблица 2

Диаметр лейкоцитов, инкубированных в растворах различной осмолярности

Вид животного	Раствор, время инкубации		
	Изотонический	Умеренно-гипотонический, 60 с	Умеренно-гипотонический, 30 мин
Лимфоциты			
<i>S. carpio</i>	4.34 \pm 0.08	5.93 \pm 0.11*	6.25 \pm 0.11*
<i>R. ridibunda</i>	10.43 \pm 0.09	10.88 \pm 0.19*	12.27 \pm 0.19*
Гранулоциты			
<i>S. carpio</i>	10.06 \pm 0.14	10.87 \pm 0.15*	10.17 \pm 0.16
<i>R. ridibunda</i>	15.18 \pm 0.10	17.40 \pm 0.18*	16.54 \pm 0.27*



После 60 с инкубации в среде с пониженной осмолярностью диаметр гранулоцитов сазана увеличился на 9% по сравнению с инкубацией в изотонии, а через 30 мин. – отмеченное повышение изучаемого показателя нивелировалось. У лягушки показатели диаметра гранулоцитов при гипотонии увеличились на 15% после 60 с инкубации и на 9% после 30 мин. по сравнению с изотонией (см. табл. 2).

В условиях пониженной осмолярности среды фагоцитарная активность лейкоцитов *S. carpio* к *S. cerevisiae* была на 40% выше по сравнению с эритроцитами (табл. 3).

Таблица 3

Показатели фагоцитарной активности гемоцитов к клеткам дрожжей в условиях гипотонии, %

Объект фагоцитоза	Эритроциты	Лейкоциты
<i>Cyprinus carpio</i>		
Дрожжи	9.40±1.86	15.67±1.45 ^o
Сенная палочка	10.31±2.08	9.28±1.00*
Латекс	4.75±1.03**	6.51±2.53**
<i>Rana ridibunda</i>		
Дрожжи	5.50±1.19	11.25±2.02 ^o
Сенная палочка	4.33±0.88	9.67±0.33 ^o
Латекс	2.10±0.03**	8.01±0.01** ^{oo}

Примечание: * – по сравнению с дрожжами, ** – по сравнению с сенной палочкой, ^o – ФА эритроцитов по сравнению с лейкоцитами по t-критерию Стьюдента (p≤0.05).

К клеткам дрожжей и сенной палочке ФА красных клеток крови сазана была на 50 и 54%, белых – на 58 и 30% соответственно выше, чем к частицам латекса. В свою очередь, поглощательная способность лейкоцитов сазана к *S. cerevisiae* была на 41% выше по сравнению с *B. subtilis*.

Поглощательная способность белых клеток крови *R. ridibunda* в отношении дрожжевых клеток, сенной палочки и латекса была на 51, 55 и 74% выше, чем у красных (см. табл. 3). Эритроцитами лягушки дрожжи и сенная палочка поглощались на 62 и 52% активнее, чем частицы латекса, лейкоцитами – на 28 и 17% соответственно.

Заключение

Таким образом, согласно полученным результатам, с увеличением длительности инкубации в умеренно-гипотоническом растворе (до 30 мин.) линейные размеры эритроцитов и лимфоцитов подопытных животных увеличиваются. Гранулоциты сазана и, в несколько меньшей степени, клетки данного пула лягушки более устойчивы к умеренной гипоосмотической нагрузке. После 30 мин. инкубации в условиях умеренной гипотонии гранулоциты опытных животных практически возвращаются к размерам, полученным при инкубации в изотонии. Последнее допустимо рассматривать как результат действия осморегуляторных механизмов, направленных на сохранение нормальных параметров и функциональной активности клетки. По-видимому, именно благодаря гранулоцитам, у опытных животных отмечается более высокая фагоцитарная активность лейкоцитов по сравнению с эритроцитами. В свою очередь, более высокая ФА гемоцитов подопытных животных к *Saccharomyces cerevisiae* и *Bacillus subtilis* по сравнению с латексом может быть обусловлена присутствием на поверхности клеточной стенки дрожжей таких белков как галактоманнан, зимозан и других, которые могут связываться с рецепторами мембран лейкоцитов [16], а также наличием у *Cyprinus carpio* и *Rana ridibunda* видового иммунитета к сенной палочке, которая широко распространена в естественной среде обитания изучаемых видов животных [10].

Список литературы

1. Гинецинский А.Г. Физиологические механизмы водно-солевого равновесия. – М.–Л.: Изд-во АН СССР, 1963. – 428 с.
2. Галкин А.А. Локомоторные свойства нейтрофилов и механизмы регуляции их движения // Успехи совр. биологии. – 1997. – Т. 117. – Вып. 6. – С. 690–703.
3. Орлов С.Н., Новиков К.Н. Регуляция объема клеток: механизмы, сопряженные клеточные реакции и патофизиологическое значение // Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 1996. – Т. 82, № 8–9 – С. 1–15.
4. Липунова Е.А., Скоркина М.Ю., Зеленцова А.С. Влияние гипоосмотической нагрузки на устойчивость эритроцитарных мембран // Современные наукоемкие технологии. – 2004. – № 1 – С. 94–95.
5. Липунова Е.А., Скоркина М.Ю. Физиология крови. – Белгород: Изд-во БелГУ, 2007. – 324 с.



6. Андреева А.М., Рябцева И.П., Ламаш Н.Е. Сравнительный анализ осмотической резистентности эритроцитов различных по экологии TELEOSTEI // Материалы Всеросс. конференции с междунар. участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптации гидробионтов». – Борок, 2012. – С. 15–19.
7. Prunesco P. Natural and Experimental Phagocytosis by Erythrocytes in Amphibians // *Naturte New Biology*. – 1971. – P. 143–144.
8. Миграционная активность гемоцитов позвоночных животных при различной температуре / С.Д. Чернявских, М.З. Федорова, Д.Х. Кует и др. // *Научные ведомости БелГУ.* – 2011. – № 3(98). Сер. «Естественные науки». Вып. 14. – С. 150–154.
9. Клетки крови – современные технологии их анализа / Г.И. Козинец, В.М. Погорелов, Д.А. Шмаров и др. – М.: Триада-фарм, 2002. – 200 с.
10. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии / А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеник, А.С. Бьков и др. – М.: Мастерство, 2001. – 221 с.
11. Глик Б., Пастернак Д. Молекулярная биотехнология. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
12. Изучение поглотительной способности нейтрофилов крови с использованием инертных частиц латекса / С.Г. Потапова, В.С. Хрустиков, Н.В. Демидова, Г.И. Козинец // *Проблемы гематологии и переливания крови.* – 1977. – Т. XXII. № 9. – С. 58–59.
13. Учитель И.Я. Макрофаги в иммунитете. – М.: Медицина, 1978. – 200 с.
14. The use of flow cytometry to measure neutrophil function / S.F. Edeen, M.E. Klut, V.A.M. Walker, J.C. Hogg // *J. of Immun. – Meth.*, 1999. – Vol. 232. – P. 23–43.
15. Меньшиков И.В., Бедулаева Л.В. Основы иммунологии. Лабораторный практикум. – Ижевск: Изд. дом «Удмуртский университет», 2001. – 136 с.
16. Черношей Д.А., Кирильчик Е.Ю., Канашкова Т.А. Распознавание в системе врожденного иммунитета: учеб.-метод. пособие. – Минск.: БГМУ, 2009. – 66 с.

MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF NUCLEATED ERYTHROCYTES AND LEUKOCYTES OF *CYPRINUS CARPIO* AND *RANA RIDIBUNDA* UNDER MODERATE HYPOTENSION

**V.V. Adamova,
S.D. Chernyavskikh**

*Belgorod State National Research
University, 85, Pobedy St., Belgorod,
308015, Russia*

E-mail: Chernyavskikh@bsu.edu.ru

Changes in morphological and functional characteristics, ability to osmoregulation and phagocytic activity of nucleated erythrocytes and leukocytes of carp (*Cyprinus carpio*) and marsh frog (*Rana ridibunda*) under moderate hypotension have been studied. It has been shown that haemocytes increase in their linear dimensions with growth of incubation time in moderate hypotonic conditions, granulocytes showed their ability to osmoregulation as an exception. In a medium with low osmolarity the phagocytic activity of leukocytes of fish and amphibian has been more intensive than one of erythrocytes. In the experimental animals the highest phagocytic activity of haemocytes has been noted for *Saccaromyces cerevisiae* and *Bacillus subtilis* than one for latex.

Keywords: nucleated erythrocytes, leukocytes, linear dimensions, osmoregulation, phagocytic activity, moderate hypotension.