

# ПЕРЕСТРОЙКА АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ И ЛЕЙКОЦИТОВ У РЫБ, ЛЯГУШЕК И ПТИЦ ПРИ МИГРАЦИИ

*С.Д. Чернявских,<sup>1</sup> М.З. Федорова, Во Ван Тхань, До Хыу Кует*

*Белгородский государственный национальный исследовательский*

*университет; <sup>1</sup>электронный адрес: Chernyavskikh@bsu.edu.ru*

Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии изучены изменения пространственной организации актиновых филаментов ядерных эритроцитов и лейкоцитов у рыб, лягушек и птиц при миграции. Показано, что во время движения реорганизация микрофиламентов цитоскелета у эритроцитов происходит аналогично лейкоцитам. В процессе миграции у земноводных и птиц красные клетки крови образуют псевдоподии, заполненные пучками параллельно уложенных актиновых филаментов, у эритроцитов рыб псевдоподий не образуется. Изменение структуры актинового цитоскелета ядерных эритроцитов, аналогичное лейкоцитам, определяет способность красных клеток крови к реакциям миграции и фагоцитоза.

Ключевые слова: актиновый цитоскелет, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, ядерные эритроциты, лейкоциты, миграция клеток

Среди основных структур цитоскелета клетки большой интерес исследователей привлекает его актиновая составляющая как наиболее лабильная и быстро реагирующая на различные воздействия (Goldman, Knipe, 1972; Pollard, Weihing, 1974; Ткемаладзе, Чичинадзе, 2005; Пинаев, 2009). В научной литературе

имеется немало работ, посвященных изучению изменения пространственной организации актиновой части цитоскелета лейкоцитов млекопитающих при движении (Фултон, 1987; Bennett, Vaines, 2001; Землянских, Денисова, 2009). Вопрос о структурных преобразованиях цитоскелета ядерных эритроцитов, а также лейкоцитов низших позвоночных животных в процессе миграции изучен недостаточно.

Целью работы было изучение перестройки актинового компонента цитоскелета ядерных эритроцитов и полиморфноядерных лейкоцитов у рыб, лягушек и птиц при миграции.

### **Материал и методика**

В работе использовали периферическую кровь, взятую у наркотизированных эфиром животных: сазана (*Cyprinus carpio*), лягушки озёрной (*Rana ridibunda*) и курицы домашней (*Gallus domesticus*). Забор крови у лягушки осуществляли из сердца, у курицы – из крупных вен крыла, у сазана – из хвостовой вены. Объектами исследования служили эритроциты и лейкоциты. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (10 ед/мл.). Полученную кровь центрифугировали 4 мин при 400 g. Собирали нижнюю часть плазмы, богатую лейкоцитами и лейкоцитарное кольцо.

Для флуоресцентного анализа актинового цитоскелета проводили пробоподготовку гемоцитов. Предварительно были апробированы 3 способа фиксации: 4%-ным формальдегидом, 4%-ным параформальдегидом и 10%-ным глутаровым альдегидом. При фиксации формальдегида клетки деформировались

и меняли свою форму, а параформальдегид уже через 10 мин после начала фиксации вызывал гемолиз изучаемых клеток. Глутаровый альдегид, согласно нашим результатам, а также данным многих авторов, лучше других фиксаторов сохраняет структуру клеток и прижизненные размеры (Sabatini et al., 1963; Фрайштат, 1980; Дуглас, Куи, 1983).

Клетки фиксировали в течение 60 мин 10%-ным раствором глутарового альдегида на изотоническом растворе NaCl (0.8 % для сазана, 0.6 % для лягушки, 0.9 % для курицы). После фиксации гемоциты отмывали от глутарового альдегида с помощью буфера (PBS, pH 6.8). Фиксированные клетки обрабатывали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 на PBS в течение 20 мин, снова отмывали с помощью PBS и высушивали на воздухе. Полученные препараты окрашивали родамин-фаллоидином-R415 (Molecular Probes, США) в течение 15 мин в темноте.

Флуоресценцию актинового компонента цитоскелета клеток наблюдали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Nikon D-Eclipse Ti-E (Япония). В работе использовали программное приложение C1. Для получения изображения актиновых микрофиламентов ядерных эритроцитов и лейкоцитов использовали объектив с увеличением 60×. В работе применяли лазеры с длинами волн 488 нм (для возбуждения) и 514 нм (для регистрации свечения).

Изучение реорганизации микрофиламентов цитоскелета проводили на клетках, мигрирующих под агарозой (Федорова, Левин, 2001). В лунки, вырезанные в агарозном геле, нанесенном на предметное стекло, помещали по 3 мкл суспензии гемоцитов, содержащей около 1 млн. клеток (в случае лягушки, имеющей большой размер клеток, около 300 тыс. клеток). Стекла с гемоцитами

рыб и лягушек при температуре 8 °С и с клетками крови птиц при комнатной температуре инкубировали 1 сут в среде с 5%-ным содержанием CO<sub>2</sub>.

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики с использованием специальных программ на персональном компьютере. Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии определены изменения структуры актиновой части цитоскелета ядерных эритроцитов и лейкоцитов у рыб, лягушек и птиц при миграции. Полученные сканы эритроцитов, прикрепившихся к стеклянной подложке, представлены на рис. 1, *a—в*. В цитоплазме клеток хорошо видны актиновые стресс-фибриллы, радиально отходящие от плазмалеммы к ядру, в виде длинных пучков. На сканах эритроцитов четко выражена густая сеть актиновых микрофиламентов, находящаяся непосредственно под цитоплазматической мембраной клетки, и образующая «клеточный кортекс» (Broschat et.al., 1983; Дерябин, 2005). В красных клетках крови всех изученных видов животных выявлен ядерный актин. Актиновые филаменты располагаются непосредственно в ядре и вокруг ядра.

У лейкоцитов всех подопытных животных актин также выявлен в ядре и под наружной цитоплазматической мембраной (рис. 2, *a—в*). Ядерный актин представлен в виде крупных частиц.

Начало миграции эритроцитов лягушки по субстрату сопровождается перестройкой сформированной системы актиновых структур, в первую очередь

стресс-фибрилл (рис. 3). Основное влияние на динамику и архитектуру системы микрофиламентов оказывают лиганд-рецепторные комплексы, образующиеся при адгезионных контактах клетки с внеклеточным матриксом, устанавливающиеся с помощью специфических поверхностных рецепторов интегринов (Goldman et al., 1975; Yamada, Miyamoto, 1995; Пинаев, 2009).

На рис. 4 (a—e) видны изменения структуры актинового цитоскелета и формы клеток подопытных животных через 1 сут после начала миграции. Как в красных, так и в белых клетках крови, актин в цитоплазме выявляется в виде мелких частиц, что может свидетельствовать о том, что в данное время он находится в клетке в виде коротких олигомеров (Пинаев, 2009). Ядерный актин у мигрирующих эритроцитов и лейкоцитов не выявляется, возможно, он переходит в цитоплазму (Пинаев, 2009).

В процессе локомоций структура цитоскелета эритроцитов у рыб, лягушек и птиц становится аналогичной лейкоцитам.

В ряде случаев при движении эритроциты лягушек образуют на лидирующем крае длинные выросты – псевдоподии (ламеллоподии) различной формы (рис. 5 a--d), характерные обычно для лейкоцитов. В псевдоподиях расположены пучки параллельно уложенных актиновых филаментов. У птиц при миграции красные клетки крови формируют небольшие выросты (рис. 6), у рыб выпячиваний мембраны не наблюдается. Согласно данным, полученным Головкин (2010), у эритроцитов земноводных, по сравнению с клетками аналогичного пула рыб и птиц, более высокий показатель складчатости плазмалеммы и больший мембранный резерв, позволяющий образовывать длинные псевдоподии. В свою очередь, образование псевдоподий у ядерных эритроцитов лягушек и, в меньшей

степени у кур, дает возможность этим клеткам участвовать в реакциях миграции (Чернявских и др., 2008), осуществляя амебоидные движения, а также в процессах фагоцитоза (Prunesco, 1971), подобно лейкоцитам.

### Список литературы

*Головки С.И. 2010.* Сравнительная характеристика мембранного резерва ядерных клеток крови позвоночных животных. Автореф. канд дис. Ярославль, ЯГПУ. 20 с.

*Дерябин Д.Г. 2005.* Функциональная морфология клетки. М.: КДУ. 320 с.

*Дуглас С.Д., Куи П.Г. 1983.* Исследование фагоцитоза в клинической практике. М.: Медицина. 112 с.

*Землянских Н.Г., Денисова О.Н. 2009.* Изменения в мембранно-цитоскелетном комплексе эритроцитов, индуцированные диметилсульфоксидом, полиэтиленгликолем и низкой температурой. Биофизика. 54 (4) : 693--703.

*Пинаев Г.П. 2009.* Сократительные системы клетки: от мышечного сокращения к регуляции клеточных функций. Цитология. 51 (3) : 172-181.

*Ткемаладзе Дж. В., Чичинадзе К.Н. 2005.* Центриольные механизмы дифференцировки и репликативного старения клеток высших животных. Биохимия. 70 (11) : 1566--1584.

*Федорова М.З., Левин В.Н. 2001.* Спонтанная миграция нейтрофилов крови в смешанной популяции лейкоцитов и ее изменения под влиянием веществ аутоплазмы при различных функциональных состояниях организма. Клиническая лабораторная диагностика. 5 : 16--19.

*Фрайштат Д. М. 1980.* Реактивы и препараты для микроскопии. М. : Химия. 480 с.

*Фултон А. 1987.* Цитоскелет: архитектура и хореография клетки. М.: Мир. 120 с.

*Чернявских С.Д., Федорова М.З., Забияков Н.А., Трапезникова К.О. 2008.* Миграционная активность гемоцитов земноводных в различных условиях среды. Тезисы докладов VI Сибирского физиологического съезда. Барнаул. 2 : 52–53.

*Bennett V., Baines A.J. 2001.* Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol. Rev.* 81: 1353--1392.

*Broschat K.O., Stidwell P.R., Burgess D.R. 1983.* Phosphorylation controls brush border motility by regulating myosin structure and association with the cytoskeleton. *Cell.* 35 : 561--571.

*Goldman R. D., Knipe D. 1972.* Functions of cytoplasmic fibers in non-muscle cell motility. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37 : 523--534.

*Goldman R.D., Pollak R., Chang C.M., Bushnell R. 1975.* Properties of enucleated cells. Changes in cytoplasmic architecture of enucleated BHK cells following trypsinization and replating. *Exp. Cell Res.* 93 : 175--183.

*Pollard T.D., Weihing R.R. 1974.* Cytoplasmic actin and myosin and cell movement. *CRC. Critical Rev. Biochem.* 2 : 1--65.

*Prunesco H. 1971.* Natural and experimental phagocytosis by erythrocytes in Amfibians. *Nature. New Biol.* 231 : 143--144.

*Sabatini D.D., Bensch K., Barnett R. J. 1963.* Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *Cell Biol.* 17 : 19--58.

*Yamada K. M., Miyamoto S. 1995. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. Curr. Opin. Cell Biol. 7 : 681--689.*

Поступила 11 VII 2011

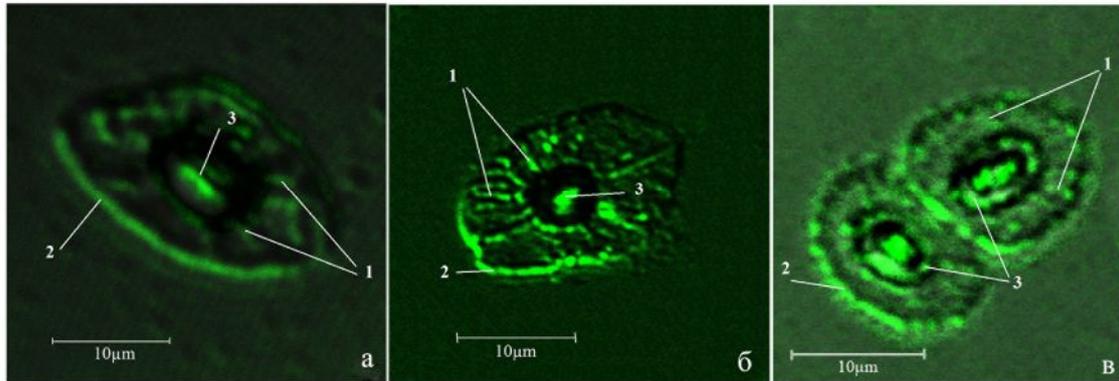


Рис. 1. Микрофотографии эритроцитов рыбы (*а*), лягушки (*б*) и птицы (*в*), распластанных на стеклянной подложке.

*1* – актиновые стресс-фибриллы, *2* – клеточный «кортекс», состоящий из актиновых филаментов, *3* – ядерный актин.

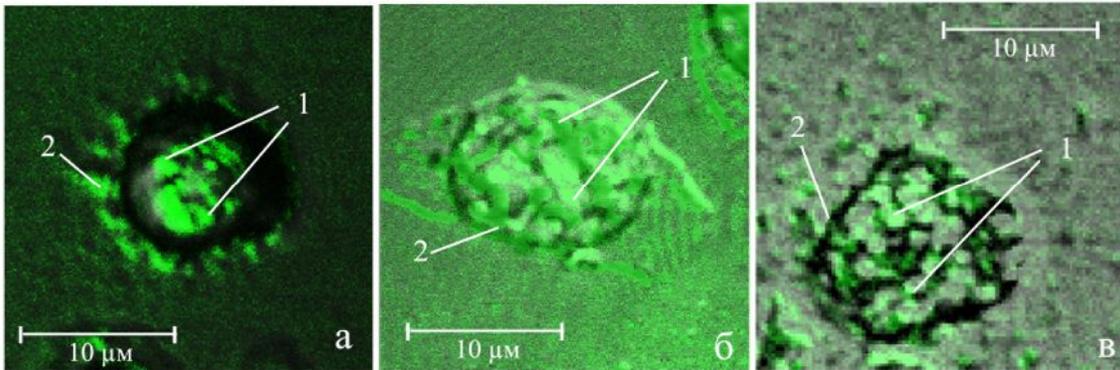


Рис. 2. Микрофотографии лейкоцитов рыбы (*а*), лягушки (*б*) и птицы (*в*), распластанных на стеклянной подложке.

*1* – ядерный актин, *2* – цитоплазматическая мембрана.

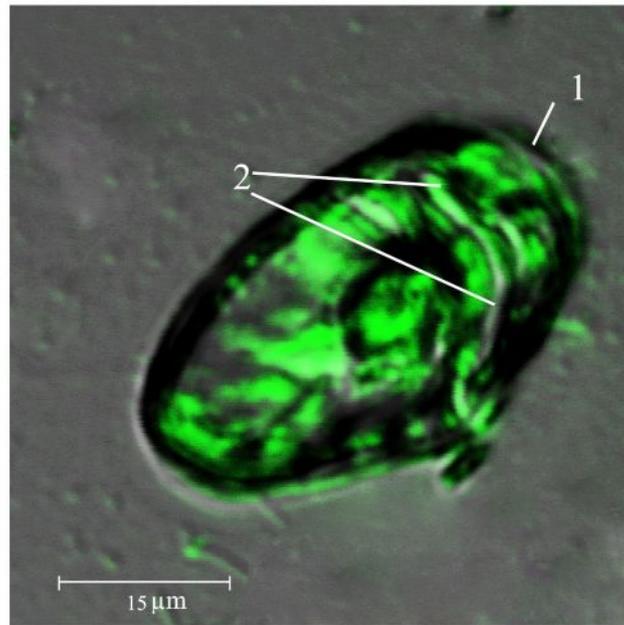


Рис. 3. Микрофотография мигрирующего эритроцита лягушки (начало движения по стеклу под агарозой).  
1 – лидирующий край клетки, 2 – стресс-фибриллы.

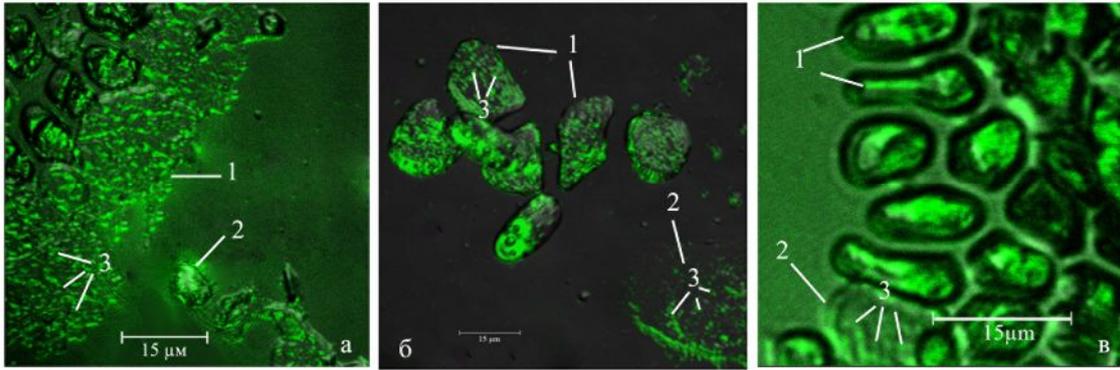


Рис. 4. Микрофотографии мигрирующих клеток крови рыбы (а), лягушки (б) и птицы (в).

1 – эритроциты, 2 – лейкоциты, 3 – актин в виде мелких частиц.

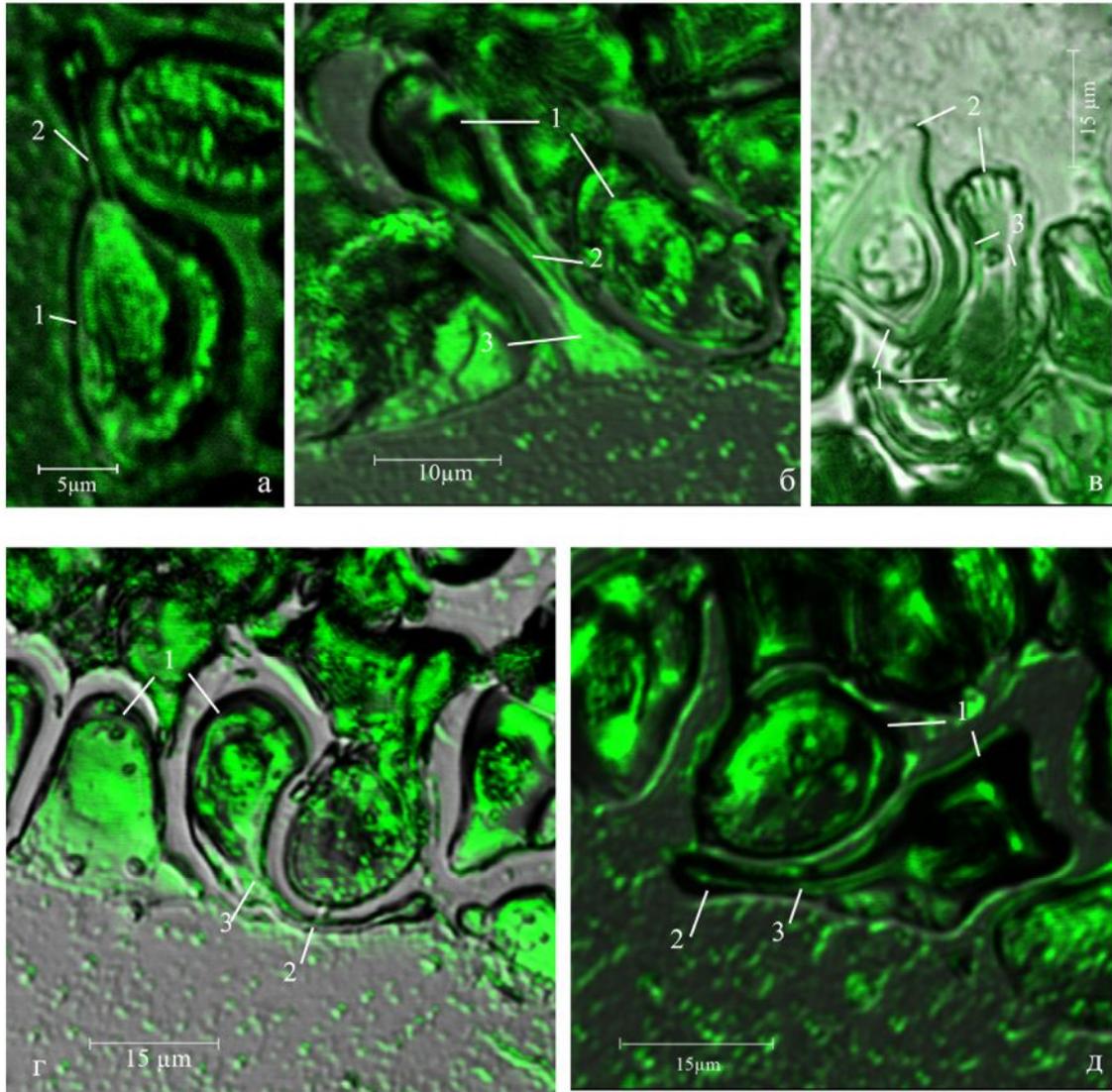


Рис. 5. Микрофотографии мигрирующих эритроцитов лягушки (а—д).  
 1 – эритроциты, 2 – псевдоподии, 3 – пучки актиновых микрофиламентов.

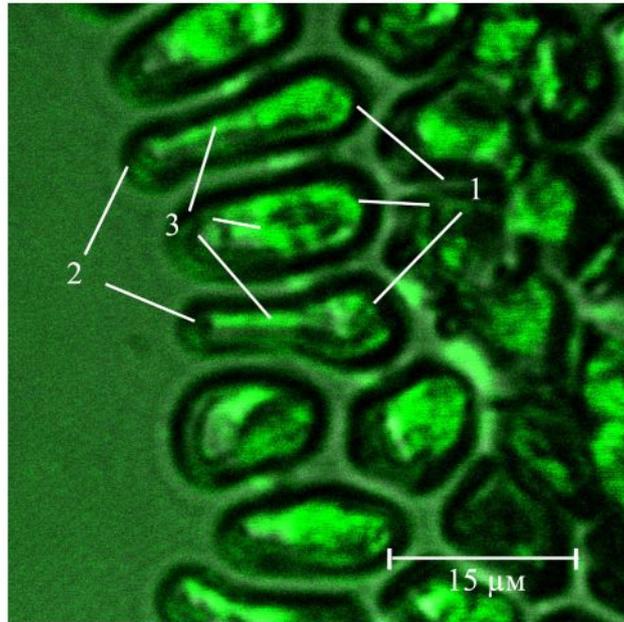


Рис. 6. Микрофотография мигрирующих эритроцитов птиц.  
*1* – эритроциты, *2* – псевдоподии, *3* – пучки актиновых микрофиламентов.