

УДК 591.111.1

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ И ФИЗИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОЦИТОВ И ПОЛИМОРФНО-ЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ *Carassius gibelio* (Bloch)

© 2018 г. С. Д. Чернявских^{1,*}, До Хыу Куэт¹, Во Ван Тхань²

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, 308015 Белгород, ул. Победы, 85

²Педагогический университет, Хошимин, ул. Ан Зыонг Вьонг, д. 280, район 5, квартал 4, Вьетнам

*e-mail: chernyavskikh@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 11.01.2016 г.

Методом атомно-силовой микроскопии изучена динамика морфометрических и физических свойств гемоцитов серебряного карася *Carassius gibelio* (Bloch) при действии температурного фактора в опытах *in vitro*. Установлено, что при пониженной температуре инкубации (5 °С) по сравнению с комнатной температурой (20 °С) изменяются морфометрические показатели у эритроцитов, при повышенной температуре (40 °С) – у полиморфно-ядерных лейкоцитов. Низкая температура инкубации уменьшает адгезию и упругость полиморфно-ядерных лейкоцитов и эритроцитов *C. gibelio*, высокая температура инкубации приводит к снижению адгезии у полиморфно-ядерных белых клеток крови.

Ключевые слова: эритроциты, лейкоциты, адгезия, упругость, температура.

DOI: 10.7868/S0320965218010126

ВВЕДЕНИЕ

Температура – один из важнейших абиотических факторов среды, адаптация живых организмов к которому осуществляется через реализацию различных физиолого-биохимических механизмов [10, 27]. Есть немало работ по изучению влияния температурного фактора на организм представителей *Teleostei*, в целом, и на кровь животных этого надотряда, в частности: изучены изменения их теплоустойчивости, динамики роста и жизненного цикла [3, 11, 18], в опытах *in vitro* выявлены особенности физиологических и физико-химических свойств клеток крови под действием повышенной и пониженной температуры инкубации [14, 15]. Однако не изучены вопросы, связанные с ключевыми аспектами действия температурного фактора на ряд других параметров гемоцитов у представителей костистых рыб.

Цель работы – оценить динамику морфометрических и физических показателей эритроцитов и полиморфно-ядерных лейкоцитов серебряного карася *Carassius gibelio* при действии температурного фактора в опытах *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены в начале осеннего периода. В работе использовали периферическую кровь серебряного карася *C. gibelio* (32 особи) в возрасте 12 мес, массой 165 ± 15 г. Объектами изучения служили эритроциты и полиморфно-ядерные лейкоциты (ПМЯЛ). До взятия крови рыба находилась в водной среде при комнатной температуре (20 °С). Забор крови у *C. gibelio* проводили из хвостовой вены. Полученную кровь центрифугировали 10 мин при 400 об/мин. Суспензии эритроцитов и лейкоцитов разбавляли изотоническим раствором (0.65% NaCl) [5], далее их инкубировали в течение 2 ч, используя параллельно три варианта температурного режима: комнатный (20 °С), пониженный (5 °С) и повышенный (40 °С). По завершению периода инкубации клеток делали мазки. Из каждой серии пробоподготовки методом АСМ исследовали по 20–25 эритроцитов и лейкоцитов. Гемоциты сканировали на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА Вита (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71). Морфометрические параметры клеток определяли в режиме полуконтактного сканирования [12] с частотой развертки

0.6–0.8 Гц, используя кантилевер серии NSG03 с жесткостью 1.1 Н/м и радиусом закругления 10 нм [9]. На полученных сканах измеряли площадь (S , мкм²), периметр (P , мкм), объем (V , мкм³), большой (D , мкм) и малый (d , мкм) диаметры клеток. Эти данные использовали для построения кривых профиля сканированных клеток с помощью программного обеспечения “Nova” (NT MDT, Зеленоград, 2009). По кривым оценивали адгезию (нН) клеток. Упругость (модуль Юнга, кПа) эритроцитов и ПМЯЛ измеряли с применением программы “Image Analysis 3.5.0.2070”.

Экспериментальные данные обработаны методами вариационной статистики с использованием специальных программ на персональном компьютере. Цифровые данные представлены средней арифметической (M) и стандартным отклонением ($\pm m$). Достоверность различий полученных результатов оценивали с использованием U -критерия Уилкоксона–Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сканы эритроцитов *Carassius gibelio*, инкубированных в условиях разных температур, показаны на рисунке А. Поверхность плазмалеммы эритроцитов серебряного карася в условиях экспозиции при температуре 5 °С шероховатая, выпуклая над

ядром. Средние величины большого и малого диаметров красных клеток крови различаются незначительно, отношение $D:d$ равно $11.2 \pm 0.2: 9.1 \pm 0.4$. После инкубации при температуре 20 °С эритроциты имеют эллиптическую форму, для них характерно преобладание большого диаметра 15.6 ± 1.7 над малым 9.2 ± 0.4 (и наличие шероховатости на поверхности клетки. При повышенной температуре инкубации (40 °С) клетки также эллиптической формы, значение $D:d$ составляет $13.2 \pm 1.0: 8.9 \pm 0.2$, а поверхность плазмалеммы эритроцитов приобретает более выраженный шероховатый вид.

Сканы полиморфно-ядерных лейкоцитов рыб, инкубированных при температурах 5 °С и 20 °С, округлой формы с близкими размерами $D:d$, и шероховатой поверхностью плазматической мембраны (см. рисунок Б, а–б). Значение показателей $D:d$ у ПМЯЛ при пониженной и комнатной температурах инкубации – $6.9 \pm 0.6: 6.8 \pm 0.2$ и $7.2 \pm 0.8: 6.1 \pm 0.1$, соответственно. При температуре инкубации 40 °С значительно увеличивается объем клеток при сохранении формы, значение $D:d$ – $11.2 \pm 1.2: 9.7 \pm 0.7$. Следует отметить, что поверхность плазмалеммы лейкоцитов, так же как и у эритроцитов, при данной температуре инкубации приобретает более выраженный шероховатый вид по сравнению с инкубацией клеток при температурах 5 °С и 20 °С. (см. рисунок Б, в).

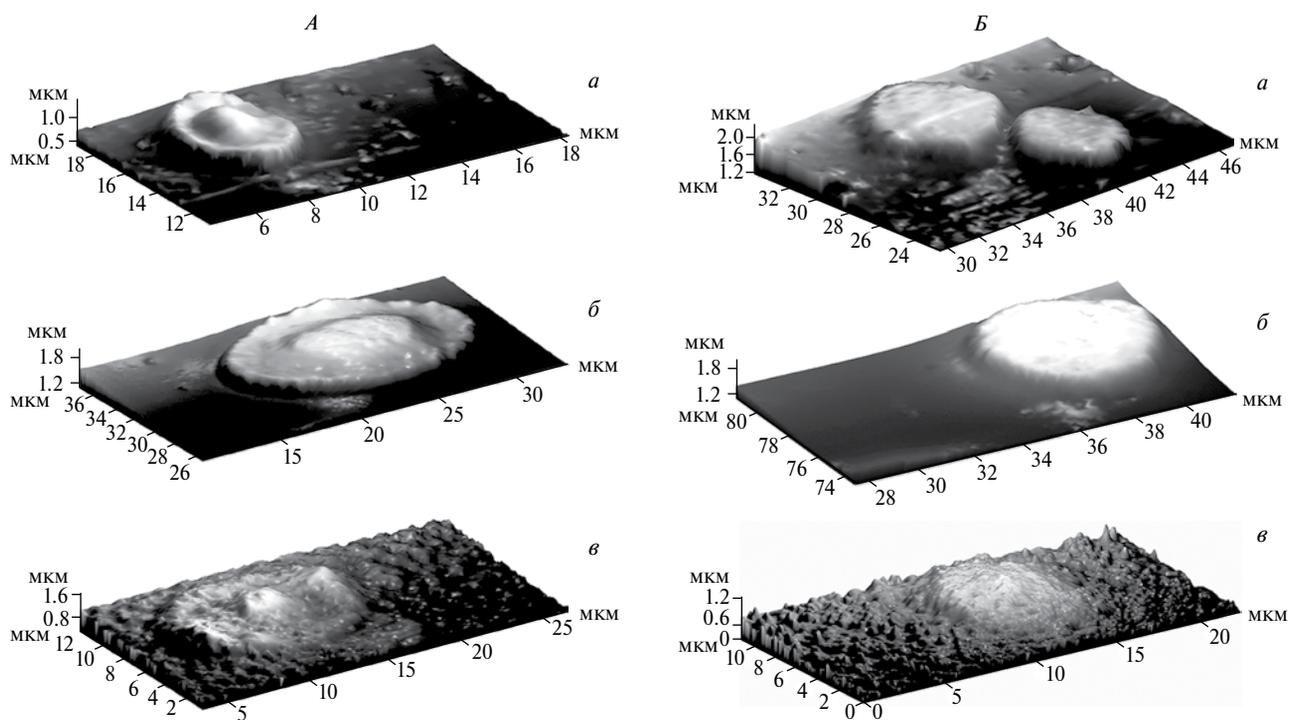


Рисунок. Эритроциты (А, мкм) и полиморфно-ядерные лейкоциты (Б, мкм) серебряного карася *Carassius gibelio* после инкубации при температуре 5 °С (а), 20 °С (б) и 40 °С (в).

Таблица 1. Морфометрические характеристики клеток крови *Carassius gibelio* при действии различных температур инкубации

Показатель	5 °С	20 °С	40 °С
Площадь, мкм ²	$74.2 \pm 3.8^{**}$ $26.9 \pm 5.0^*$	103.5 ± 19.1 37.6 ± 7.3	95.2 ± 6.5 $80.0 \pm 15.4^*$
Объем, мкм ³	$167.7 \pm 46.1^*$ 45.6 ± 14.9	108.7 ± 23.0 36.1 ± 7.4	104.2 ± 34.0 $66.6 \pm 22.5^*$
Периметр, мкм	$36.6 \pm 1.6^{**}$ 21.3 ± 2.5	45.0 ± 5.1 22.0 ± 1.9	$37.2 \pm 6.9^*$ $45.6 \pm 7.0^*$

Примечание. Здесь и в табл. 2 над чертой – эритроциты, под чертой – полиморфно-ядерные лейкоциты.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

Таблица 2. Изменение физических показателей гемоцитов у *Carassius gibelio* при действии температурного фактора

Показатель	5 °С	20 °С	40 °С
Адгезия, нН	$18.9 \pm 4.1^*$ $15.6 \pm 1.9^*$	25.4 ± 2.6 25.2 ± 2.6	23.8 ± 5.0 $20.3 \pm 5.0^*$
Упругость, кПа	$15.8 \pm 2.9^*$ $15.7 \pm 2.4^*$	43.5 ± 2.9 40.5 ± 3.1	41.7 ± 6.5 41.8 ± 8.3

* $p \leq 0.05$.

Морфометрические показатели эритроцитов и лейкоцитов *Carassius gibelio*, полученные после инкубации при разных значениях температуры, представлены в табл. 1.

У эритроцитов при снижении температуры инкубации с 20 °С до 5 °С на фоне уменьшения площади и периметра на 28.3% и 18.7% наблюдается увеличение объема на 54.3%, а повышение температуры инкубации с 20 °С до 40 °С способствует снижению периметра красных клеток крови на 17.3%.

У полиморфно-ядерных лейкоцитов при пониженной температуре инкубации изменяется только площадь (уменьшается на 28.5%), при повышенной – увеличиваются все изученные морфометрические показатели: площадь (на 112.8%), объем (на 84.7%), периметр (на 106.8%).

Показатели, характеризующие сдвиги физических свойств эритроцитов и полиморфно-ядерных лейкоцитов после инкубации при разных температурах, представлены в табл. 2.

Пониженная температура инкубации вызывает снижение физических показателей гемоцитов по сравнению с комнатной температурой: адгезия красных и белых клеток крови уменьшается на 25.6% и 38.1%, упругость – на 63.7% и 61.2%, соответственно.

Повышенная температура инкубации (40 °С) вызывает снижение адгезии ПМЯЛ на 19.4% и не оказывает влияния на другие изучаемые физические показатели клеток крови.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сравнительная оценка результатов исследования позволила обнаружить особенности влияния температурного фактора на морфометрические и физические свойства гемоцитов серебряного карася *Carassius gibelio* в опытах *in vitro*.

Экспериментально установлено, что при охлаждении клеток до температуры 5 °С и при комнатной температуре (20 °С) поверхность плазмалеммы эритроцитов и полиморфно-ядерных лейкоцитов шероховатая, что характерно для клеток крови низших позвоночных животных [9, 17]. При повышенной температуре инкубации (40 °С) поверхность клеток крови *Carassius gibelio* приобретает более выраженный шероховатый вид. Проявление шероховатости на поверхности гемоцитов связано с дезорганизацией элементов цитоскелета и формированием актинсвязывающих доменов в подмембранном пространстве, определяющих образование на плазмалемме впячиваний или выступов [8, 20, 21, 25].

Анализ морфометрических показателей эритроцитов *Carassius gibelio* позволил выявить, что эти параметры у красных клеток крови серебряного карася изменяются и при повышенной, и при пониженной температурах инкубации, что характерно также для животных других видов, в частности для млекопитающих животных и человека, эритроциты которых безъядерные [6, 7].

В отличие от эритроцитов, как уже было сказано, у полиморфно-ядерных лейкоцитов при пониженной температуре инкубации уменьшается только площадь, тогда как при повышенной – увеличиваются все изученные морфометрические показатели. Известно, что инкубация клеток в условиях повышенной температуры (40 °С) вызывает стремительную экспрессию белков теплового шока (БТШ), которые выполняют множество важных защитных функций в клетке [4, 16, 22, 23, 26], в том числе препятствуют стресс-индуцированной денатурации других белков [19, 24]. Экспрессия БТШ обычно запускается через несколько минут после начала действия тепловой нагрузки на клетки [27], при этом некоторые БТШ связаны с белками цитоскелета [28]. Данная связь предполагает вовлечение БТШ в организацию цитоскелета в процессе и/или после тепловой нагрузки [1].

По-видимому, подобные реакции восстановления белковой фракции клетки способны повлечь за собой увеличение ее морфометрических показателей по истечении даже незначительного периода времени после окончания влияния экзогенного перегрева.

Снижение адгезии и упругости эритроцитов и полиморфно-ядерных лейкоцитов при пониженной температуре инкубации по сравнению с комнатной температурой косвенно свидетельствует о включении адаптивных механизмов, направленных на существенное уменьшение функциональной активности клеток и замедление процессов метаболизма, как механизмов выживания в условиях, неблагоприятных для жизнедеятельности гемоцитов. Учитывая, что ведущие факторы, вызывающие изменения физических и физиологических свойств клеток крови, — свойства плазмалеммы [13, 15], можно предположить, что снижение показателей ее адгезии и упругости после инкубации эритроцитов серебряного карася при температуре 5 °С в течение 120 мин происходит вследствие изменения микровязкости билипидного слоя, фазового распределения в нем липидов, микроокружения белков, белок-липидных взаимодействий и ряда других особенностей структурной организации мембраны [15], проявляющихся шероховатостью на поверхности.

Стабильность параметров упругости у красных и белых клеток крови, а также адгезии у эритроцитов при температуре инкубации 40 °С согласуется с литературными данными, согласно которым [2], серебряный карась относится к группе наиболее теплолюбивых рыб. Верхняя летальная температура этих рыб 37–41 °С. При предварительной акклиматизации серебряного карася к температуре >30 °С его верхняя летальная граница жизнедеятельности увеличивается до 43.4 °С [1]. Кроме того, в условиях инкубации при повышенной температуре (40 °С) отклонения значений адгезии и упругости клеток крови от их средних значений в 2 раза выше, чем при 20 °С, что свидетельствует о значительных колебаниях физических свойств эритроцитов и ПМЯЛ серебряного карася, подтверждая их высокую функциональную активность в условиях, оптимально благоприятных для жизнедеятельности данного вида рыб.

Выводы. При повышенной температуре инкубации (40 °С) поверхность плазматической мембраны эритроцитов и полиморфно-ядерных лейкоцитов *Carassius gibelio* приобретает более выраженный шероховатый вид по сравнению с клетками, инкубированными при комнатной

(20 °С) и пониженной (5 °С) температурах. У эритроцитов *Carassius gibelio* морфометрические показатели изменяются при пониженной температуре инкубации (5 °С), у полиморфно-ядерных лейкоцитов — при повышенной (40 °С) по сравнению с комнатной температурой (20 °С). При температуре инкубации 5 °С уменьшается адгезия и упругость полиморфно-ядерных лейкоцитов и эритроцитов *Carassius gibelio*, при температуре 40 °С снижаются показатели адгезии у полиморфно-ядерных белых клеток крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Голованов В.К. Разнообразие температурных требований у морских и пресноводных рыб // Биоразнообразие и роль животных в экосистемах: Матер. VI Междунар. науч. конф. Днепропетровск: Изд-во Днепропетр. нац. ун-та, 2011. С. 67–69.
2. Голованов В.К. Экспериментальная оценка верхней температурной границы жизнеобитания у молоди пресноводных видов рыб // Тр. Мордов. гос. природ. заповед. им. П.Г. Смидовича. 2013. № 11. С. 125–132.
3. Голованов В.К., Капшай Д.С., Голованова И.Л. Влияние высокой температуры акклиматации на термоустойчивость молоди рыб // Физиология и биохимия гидробионтов: Вестн. Астрахан. гос. техн. ун-та. Сер. Рыб. хоз-во. 2012. № 1. С. 125–128.
4. Евдонин А.Л., Медведева Н.Д. Внеклеточный белок теплового шока 70 и его функции // Цитология. 2009. Т. 51. № 2. С. 130–137.
5. Иванов А.А. Физиология рыб. М.: Мир, 2003. 279 с.
6. Козлов Н.Б. Термоустойчивость гомеотермного организма: биохимические механизмы, пути повышения. Смоленск: Изд-во Смоленск. гос. мед. ин-та, 1992. 115 с.
7. Мороз В.В., Голубев А.М., Афанасьев А.В. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях // Общая реаниматология. 2012. Т. 3. № 1. С. 52–60.
8. Скоркина М.Ю., Федорова М.З., Муравьев А.В. Мембранный резерв лимфоцитов в условиях кальциевой нагрузки // Ярослав. пед. вестн. Естеств. науки. 2012. Т. 3. № 2. С. 109–114.
9. Скоркина М.Ю., Федорова М.З., Чернявских С.Д. и др. Сравнительная оценка морфофункциональных характеристик нативных и фиксированных эритроцитов // Цитология. 2011. Т. 53. № 1. С. 17–21.
10. Смирнов Л.П., Богдан В.В. Температурная преадаптация эктотермных организмов разной организации: роль жирно-кислотного состава липидов // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2006. Т. 42. № 2. С. 110–115.

11. *Сорвачев К. Ф.* Основы биохимии питания рыб. М.: Легк. и пищ. пром-сть, 1982. 247 с.
12. *Федорова М.З., Павлов Н.А., Зубарева Е.В и др.* Использование атомно-силовой микроскопии для оценки морфометрических показателей клеток крови // *Биофизика*. 2008. Т. 53. № 6. С. 555–559.
13. *Харакоз Д.П.* О возможной физиологической роли фазового перехода “жидкое–твердое” в биологических мембранах // *Успехи биол. химии*. 2001. Т. 41. С. 333–364.
14. *Чернявских С.Д., Нгуен Тхи Тьук, То Тхи Бик Тхуи.* Изменение локомоционной активности и относительной микровязкости мембраны эритроцитов сазана при действии температурного фактора // *Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов: Матер. Всерос. конф. с междунар. участием. Борок, 2012. С. 372–374.*
15. *Чернявских С.Д., Недопекина С.В.* Сезонные колебания относительной микровязкости, полярности и сорбционной способности эритроцитарных мембран *Cyprinus carpio* и *Rana ridibunda* // *Науч. ведомости БелГУ. Сер. Естеств. науки*. 2013. Т. 146. № 3. Вып. 22. С. 99–103.
16. *Beck S.C., De Maio A.* Stabilization of protein synthesis in thermotolerant cells during heat shock // *Biol. Chem*. 1994. V. 269. № 34. P. 21803–21811.
17. *Bhattacharyya K., Guha T., Bhar R. et al.* Atomic force microscopic studies on erythrocytes from an evolutionary perspective // *Anat. Rec*. 2004. V. 279. № 1. P. 671–675.
18. *Dolomatov S., Zukov W., Brudnicki R.* Role of temperature in regulation of the life cycle of temperature fish // *Rus. J. Mar. Biol*. 2013. V. 39. № 2. P. 81–91.
19. *Feder M.E., Hofmann G.E.* Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology // *Ann. Rev. Physiol*. 1999. V. 61. P. 243–282.
20. *Insall R.H., Machesky L.M.* Actin dynamics at the leading edge: From simple machinery to complex networks // *Dev. Cell*. 2009. V. 17. P. 310–322.
21. *Itoh T., Takenawa T.* Mechanisms of membrane deformation by lipid-binding domains // *Prog. Lipid. Res*. 2009. V. 48. P. 298–305.
22. *Kregel K.C.* Invited review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance // *J. Appl. Physiol*. 2002. V. 92. № 5. P. 2177–2186.
23. *Li G.C., Mivechi N.F., Weitzel G.* Heat shock proteins, thermotolerance, and their relevance to clinical hyperthermia // *Int. J. Hyperthermia*. 1995. V. 11. № 4. P. 459–488.
24. *Makarevich A.V., Olexikova L., Chrenek P. et al.* The effect of hyperthermia *in vitro* on vitality of rabbit preimplantation embryos // *Physiol. Res*. 2007. V. 56. P. 789–796.
25. *McMahon H.T., Gallop J.L.* Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling // *Nature*. 2005. V. 438. P. 590–596.
26. *Murapa P., Gandhapudi S., Skaggs H.S. et al.* Physiological fever temperature induces a protective stress response in T lymphocytes mediated by heat shock factor-1 (HSF1) // *J. Immunol*. 2007. V. 179. P. 8305–8312.
27. *Sonna L.A., Fujita J., Gaffin S.L., Lilly C.M.* Invited review: effects of heat and cold stress on mammalian gene expression // *J. Appl. Physiol*. 1997. V. 83. № 5. P. 1413–1417.
28. *Wiegant F.A.C., van Bergen en Henegouwen P.M.P., van Dongen G., Linnemans W.A.M.* Stress-induced thermotolerance of the cytoskeleton of mouse neuroblastoma N2A cells and rat reuber H35 hepatoma cells // *Cancer Res*. 1987. V. 47. P. 1674–1680.

Effect of Temperature on the Morphometric and Physical Parameters of Erythrocytes and Polymorphonuclear Leucocytes in *Carassius gibelio* (Bloch)

S. D. Chernyavskikh^{1,*}, Do Huu Quyet¹, and Vo Van Thanh²

¹Belgorod State National Research University, 308015 Belgorod, ul. Pobeda, 85, Russia

²Ho Chi Minh City University of Education, 280 An Duong Vuongst., Ward 4, Dist. 5, Ho Chi Minh city, Vietnam

*e-mail: chernyavskikh@bsu.edu.ru

In vitro experiments have been conducted to estimate the effect of temperature on morphometric and physical properties of hemocytes in the Prussian carp *Carassius gibelio* by atomic-force microscopy. The results show that at a low temperature (5 °C) morphometric properties of erythrocytes change compared to room temperature (20 °C), a high temperature (40 °C) causes changes of the morphometric properties of polymorphonuclear leucocytes. The low temperature may reduce adhesion and elasticity of polymorphonuclear leucocytes, and erythrocytes in *Carassius gibelio*, whereas the high temperature of incubation results only in the reduction of adhesion of polymorphonuclear white blood cells.

Keywords: erythrocytes, leukocytes, adhesion, elasticity, temperature.