

Присный А.А.

Кандидат биологических наук, доцент,

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

**МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ И МИКРОРЕЛЬЕФ ГЕМОЦИТОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ
HIRUDO MEDICINALIS (LINNAEUS, 1758) В УСЛОВИЯХ ОСМОТИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ**

Аннотация

Целью данной работы является изучение влияния гипо- и гиперосмотической нагрузки на морфометрические параметры форменных элементов гемолимфы медицинской пиявки. 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.

Prisny A.A.

PhD in Biology, Belgorod State National Research University

**THE EFFECT OF THE OSMOTIC STRESS ON MORPHOLOGICAL PARAMETERS AND MICRORELIEF
OF *HIRUDO MEDICINALIS* (LINNAEUS, 1758) HEMOCYTES**

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 *Hirudo* 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 микрорельеф [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- гиперосмотическим нагрузкам [9, 10].

Материалы и методы исследования. Объектами исследования служили гемоциты *Hirudo medicinalis* (Linnaeus, 1758), предварительно классифицированные по морфофункциональным особенностям на 4 типа [1]. 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 – 0,4 % NaCl, изотонический раствор – 0,8 % NaCl, гипертонический – 1,2 %). Инкубацию проводили в течение 1 минуты. Исследования проведены с использованием сканирующего зондового микроскопа Интегра Вита NT-MDT в режиме атомно-силовой спектроскопии при наложении нагрузки в 25 локальных участках клеточной поверхности. 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. Меняясь под воздействием факторов среды, микрорельеф поверхности клеток отражает особенности их функционального статуса. Использование изображений, полученных при помощи атомно-силового микроскопа, позволило оценить характер изменения микрорельефа поверхности гемоцитов *H. medicinalis* после инкубации в растворах различной концентрации.

Снижение осмотического давления ведет к значительному увеличению объема всех типов клеток. На сканограммах гемоциты имеют шарообразную форму и гладкую, лишенную складок, мембрану. Преобладают микровозвышения поверхности, а крупных возвышений и понижений не отмечали.

В гипертонической среде поверхность клеток крови медицинской пиявки значительно меняется. Наблюдали выпячивание гранул цитоплазмы и фибрилл цитоскелета через плазматическую мембрану, микровозвышения отсутствуют. Амебоциты расслаиваются по подложке. Все клетки проявляют тенденцию к образованию вакуолей.

Анализ шероховатостей поверхности демонстрирует сглаживание микро возвышений и микро впадин на мембране клетки в ряду изотонические условия – гипотонические условия – гипертонические условия (таб. 1).

Таблица 1 – Показатели неоднородности микрорельефа поверхности гемоцитов *H. medicinalis*

Показатели	БА	СА	НА
Изотоническая среда			
Sq, nm	91,89±7,54	67,25±5,16	125,43±34,56
Sa, nm	69,82±9,65	51,82±2,84	105,53±10,71
Sp, nm	676,51±43,87	653,67±4,67	776,97±63,92
Sv, nm	237,64±23,19	279,95±9,58	212,93±31,28
Sds, 1/um·um	39,65±6,51	45,13±6,83	10,97±2,13
Ssc, nm	37,02±3,22	25,87±4,92	16,48±3,41
Гипотоническая среда			
Sq, nm	57,19±8,93*	65,18±7,22	0,11±0,01*
Sa, nm	45,92±4,48*	53,08±7,48	0,09±0,01*
Sp, nm	713,56±12,04	859,18±73,11*	1,18±0,01*
Sv, nm	400,83±21,28*	487,74±90,08*	0,65±0,01*
Sds, 1/um·um	79,11±6,39*	79,48±10,61*	1,53±0,05*
Ssc, nm	38,99±2,97	26,70±3,34	3,72±0,15*
Гипертоническая среда			
Sq, nm	29,48±4,68*	20,02±2,57*	62,31±3,93*
Sa, nm	23,14±2,71*	16,22±1,42*	50,71±3,92*
Sp, nm	279,56±4,09*	196,26±5,45*	356,33±7,79*
Sv, nm	104,53±11,95*	60,81±6,81*	45,59±6,27*
Sds, 1/um·um	20,47±2,31*	36,82±2,25	14,86±0,56*
Ssc, nm	8,89±2,11*	14,39±3,68*	10,88±2,10*

Примечание: БА – большие амебоциты; СА – средние амебоциты; НА – не амебоциты; * – достоверность различий между значениями параметров в изотонических условиях и в условиях измененного осмотического давления ($p < 0,05$); достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

В гипертонических условиях в несколько раз снижаются показатели среднеквадратичной и средней шероховатости поверхности, но уменьшается расстояние между возвышениями. В гипотонической среде происходит увеличение высоты пиков и глубины впадин, в условиях повышения осмотического давления наблюдается сглаживание рельефа. Изменений в симметричности распределения различных структур рельефа при изменении осмотического давления не наблюдали. Вся клеточная поверхность равномерно трансформируется при воздействии нехарактерной солености. Под влиянием гипотонических условий микрорельеф МА имеет более гладкое строение, невысокие пики и впадины располагаются удаленно друг от друга.

Заключение

Описаны изменения топографии поверхности гемоцитов при контактных взаимодействиях 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 гемоцитов 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 микрорельефа.

Литература

1. Присный А.А. Исследование элементов клеточного иммунитета беспозвоночных животных. Аллергология и иммунология. – 2014. – Т. 15. – №3. – С. 225.
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. 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.

References

1. Prisny A.A. Issledovanie jelementov kletocznego immuniteta bespozvonocnyh zhivotnyh. *Allergologija i immunologija.* – 2014. – T. 15. – №3. – S. 225.
2. Gushhina Ju.Ju., Pleskova S.N., Zvonkova M.B. Issledovanie razlichij morfologicheskikh parametrov kletok krovi cheloveka metodom Skanirujushhej Zondovoj Mikroskopii. *Poverhnost'. Rentgenovskie, sinhrotronnye i nejtronnye issledovanija.* 2005; 1: 48-53.
3. Mironov V.L. *Osnovy skanirujushhej zondovoj mikroskopii* M.: Tehnosfera, 2004.
4. Novak A.V., Novak V.R. Sherohovatosť plenok amorfnogo, polikristalliche- skogo kremnija i polikristallicheskogo kremnija s polusfericheskimmi zernami. *Pis'ma v ZhTF,* 2013, tom 39, vyp. 19, S. 32-40.
5. Pleskova S.N., Gushhina Ju.Ju., Zvonkova M.B. Ispol'zovanie metoda skanirujushhej zondovoj mikroskopii v biomedicinskih issledovanijah // *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo. Serija Biologija.* Vypusk 1 (7). *Jelektromagnitnye polja i izluchenija v biologii i medicine.* – N. Novgorod: Izd-vo NNGU. – 2004. – S. 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. 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.