

УДК 591.111.1

DOI: 10.18413 /2409-0298-2015-1-3-18-25

До Хыу Куэт,
Чернявских С.Д.,
Во Ван Тхань

**ДЕЙСТВИЕ ТЕМПЕРАТУРНОГО
ФАКТОРА НА МОРФОМЕТРИ-
ЧЕСКИЕ И ФИЗИЧЕСКИЕ
ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОЦИТОВ
И ПОЛИМОРФНОЯДЕРНЫХ
ЛЕЙКОЦИТОВ
STENOPHARYNGODON IDELLA**

До Хыу Куэт, аспирант

ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный
исследовательский университет»,
ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия
E-mail: dhquyet@mail.ru

Чернявских Светлана Дмитриевна, доцент кафедры информатики,
естественнонаучных дисциплин и методик преподавания,
кандидат биологических наук, доцент,

ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный
исследовательский университет»,
ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Россия
E-mail: chernyavskikh@bsu.edu.ru

Во Ван Тхань, преподаватель

Педагогический университет г. Хошимина,
ул. Ан Зыонг Выонг, д.280, г. Хошимин, 700000, Вьетнам
E-mail: thanhvo@hcmup.edu.vn

АННОТАЦИЯ

Проведена оценка влияния температурного фактора на морфометрические и физические показатели эритроцитов и полиморфноядерных лейкоцитов белого амура *Stenopharyngodon idella* методом атомно-силовой микроскопии. Установлено, что морфометрические показатели полиморфноядерных лейкоцитов изменяются как при пониженной (5°C), так и при повышенной (до 40°C) температурах инкубации, у эритроцитов только при повышенной температуре. При снижении температуры инкубации увеличивается упругость красных и белых клеток крови, при повышении температуры инкубации повышается их адгезионный показатель.

Ключевые слова: общий анализ крови; рак молочной железы; абраксан.

UDC 591.111.1

DOI: 10.18413 /2409-0298-2015-1-3-18-25

*Do Huu Quyet,
Chernyavskikh S.D.,
Vo Van Thanh*

***EFFECT OF TEMPERATURE
ON MORPHOMETRIC AND
FUNCTIONAL PECULIARITIES
OF ERYTHROCYTES AND
POLYMORPHONUCLEAR
CTENOPHARYNGODON IDELLA
LEUCOCYTES***

Do Huu Quyet, *Postgraduate Student*
Belgorod State National Research University
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia
E-mail: dhquyet@mail.ru

Chernyavskikh Svetlana Dmitrievna, *PhD in Biology, Associate Professor,*
Belgorod State National Research University,
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia
E-mail: chernyavskikh@bsu.edu.ru

Vo Van Thanh, *Teacher*
Ho Chi Minh City Pedagogical University
280 An Dương Vương Str., Ward 4, District 5, Ho Chi Minh City, 700000, Vietnam
E-mail: thanhvo@hcmup.edu.vn

ABSTRACT

In vitro experiments were conducted to estimate the effect of temperature on morphometric and physical peculiarities of erythrocytes and polymorphonuclear *Ctenopharyngodon idella* leucocytes. The results of the present study show that the morphometric peculiarities of polymorphonuclear leukocytes were both changed at low (50C) and high (400C) temperatures, the change of morphometric parameters of erythrocytes was found only at elevated temperature. When the temperature of incubation was decreased, the elasticity of red and white blood cells increased. When the temperature of incubation was increased, the cells' adhesive indices increased..

Key words: erythrocyte, polymorphonuclear leukocytes, morphometric, elasticity, adhesion, AFM, temperature.

В научной литературе достаточно полно описана общая картина изменений, происходящих в организме млекопитающих животных и человека при остром перегревании [1, 8, 4, 14]. Имеется много работ, в которых подробно описано влияние разных факторов на морфологические характеристики гемоцитов рыб [3, 7, 12]. Вместе с тем, вопрос о действии температурного фактора на морфометрические показатели эритроцитов и полиморфноядерных лейкоцитов рыб исследован недостаточно. Еще менее изученными являются физические показатели красных и белых клеток крови рыб в условиях действия пониженной и повышенной температур инкубации.

Цель работы: оценка влияния температурного фактора на морфометрические и физические показатели, в частности, адгезию и упругость *Stenopharyngodon idella* в условиях *in vitro*.

Материалы

и методы исследования

В работе использовали периферическую кровь белого амура *Stenopharyngodon idella*. Объектами исследования служили ядерные эритроциты и полиморфноядерные лейкоциты (ПМЯЛ).

Забор крови у рыб проводили из хвостовой вены. Для предотвращения свертывания крови использовали гепарин в отношении 10 ед. гепарина на 1 мл крови. Полученную кровь центрифугировали 10 мин при относительной силе центрифугирования равной 400g. Суспензии эритроцитов и лейкоцитов разбавляли изотоническим раствором (0.6% NaCl) [7]. Красные и белые клетки крови инкубировали при комнатной (20°C), пониженной (5°C) и повышенной (40°C) температурах (t°C) в течение 2 часов. После инкубации клеток делали мазки крови. Методом АСМ исследовали по 20-25 клеток в каждой из серий пробоподготовки. Сканирование клеток крови проводили на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА Вита (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71).

Изучение морфометрических параметров выполняли в режиме полуконтактного

сканирования [13] с частотой развертки 0,6-0,8 Hz, используя кантилевер серии NSG03 с жесткостью 1,1Н/м и радиусом закругления 10 нм [11]. На полученных сканах измеряли площадь (S, μm^2), периметр (P, μm), большой (D, μm) и малый (d, μm) диаметры, а также объем (V, μm^3) клеток. С помощью программного обеспечения «Nova» (NT MDT, Зеленоград, 2009) строили кривые профиля клеток крови, на которых определяли их адгезию (нН), с помощью программы «Image Analysis 3.5.0.2070» измеряли упругость (кПа) эритроцитов и ПМЯЛ (модуль Юнга). Полученные экспериментальные данные были статистически обработаны. Достоверность различий полученных результатов оценивали с использованием U-критерия Уилкоксона-Манна-Уитни (*, $p \leq 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение

На рис. 1 представлены сканы эритроцитов *Stenopharyngodon idella*, полученных при АСМ-сканировании мазков после инкубации в условиях разных температур.

Как видно на рисунке 1а, после инкубации при температуре 5°C поверхность клетки выпуклая в центре (в зоне ядра), ближе к краю она вогнутая, на самом крае – с мелкими складками, клетка имеет круглую форму.

При комнатной (20°C) температуре инкубации (см. рис. 1б) эритроциты эллиптической формы с выпуклой поверхностью в области ядра и складчатостью плазматической мембраны, что типично для красных клеток крови низших позвоночных животных [6, 5].

В условиях повышенной температуры инкубации (см. рис. 1в), равной 40°C, количество складок меньше и выпуклость эритроцитов слабее по сравнению с температурой 20°C, форма клетки ближе к округлой.

Общеизвестно, что для лейкоцитов, в том числе ПМЯЛ, которые являются клетками с высокой активностью [10], характерно то, что любое изменение температуры инкубации также воздействует на их морфологию [7, 9].

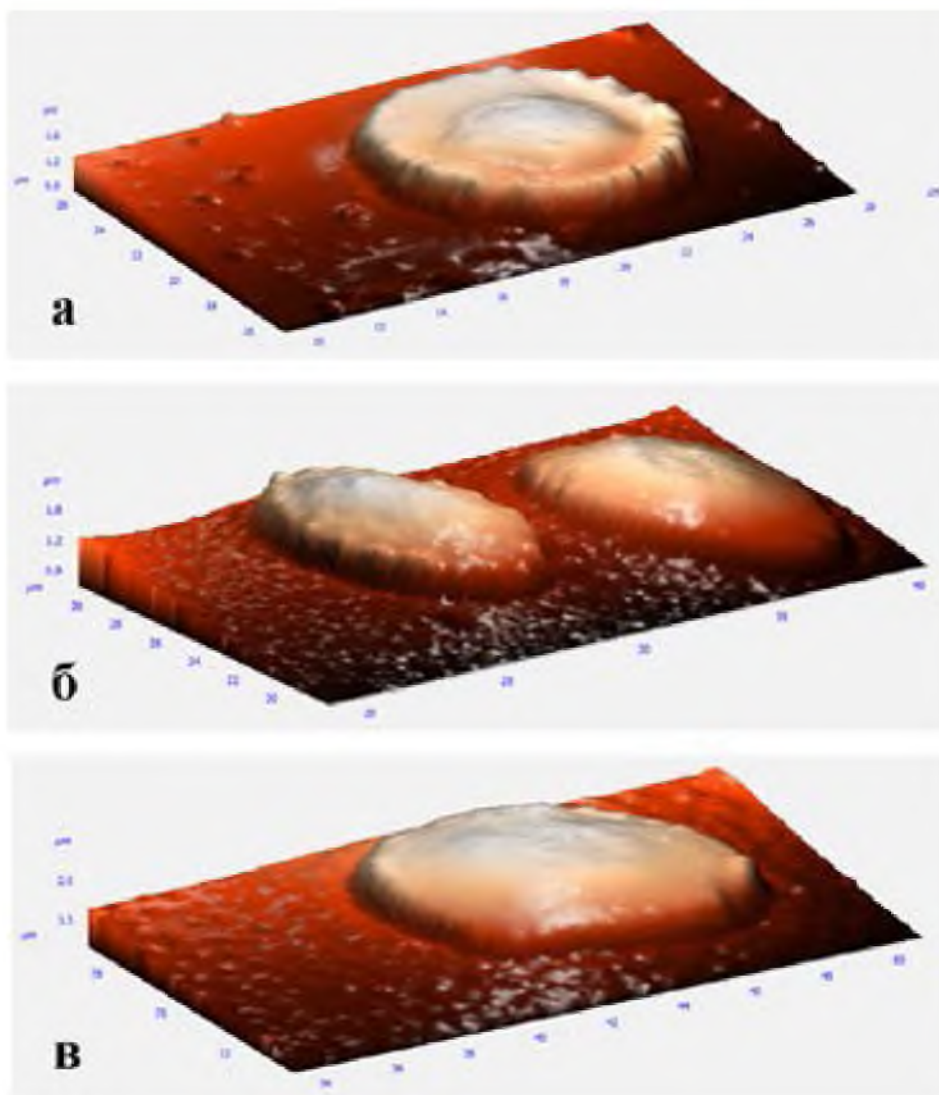


Рис. 1. Эритроцит белого амура *Stenopharyngodon idella* после инкубации при температуре: а -5°C ; б -20°C ; в -40°C .

Fig. 1. Erythrocytes *Stenopharyngodon idella* after incubation at temperature of: а -5°C ; б -20°C ; в -40°C .

На рис. 2 представлены сканы полиморфноядерных лейкоцитов белого амура, полученные при разных температурах инкубации. Как видно из рисунков, по внешнему виду ПМЯЛ не сильно различаются. Все клетки имеют шероховатую форму, характерную для гранулоцитов [7].

В таблице 1 представлены морфометрические показатели эритроцитов и ПМЯЛ *Stenopharyngodon idella*, полученные после инкубации при разных температурах.

Как видно из таблицы, снижение температуры инкубации до 5°C не влияет на морфометрические характеристики эритроцитов по сравнению с температурой 20°C . Повыше-

ние температуры до 40°C приводит к уменьшению объема на 28,1% ($p \leq 0,05$) и увеличению периметра на 5,4% ($p \leq 0,05$) красных клеток крови по сравнению с комнатной температурой.

При пониженной температуре инкубации площадь, объем и большой диаметр ПМЯЛ возрастают на 43,5%, 17,3% и 15,9% соответственно по сравнению с инкубацией при температуре 20°C . Повышение температуры инкубации до 40°C также вызывает увеличение морфологических показателей полиморфноядерных лейкоцитов – площади (на 62,3%), объема (на 129,3%), периметра (на 5,4%) по сравнению с комнатной температурой.

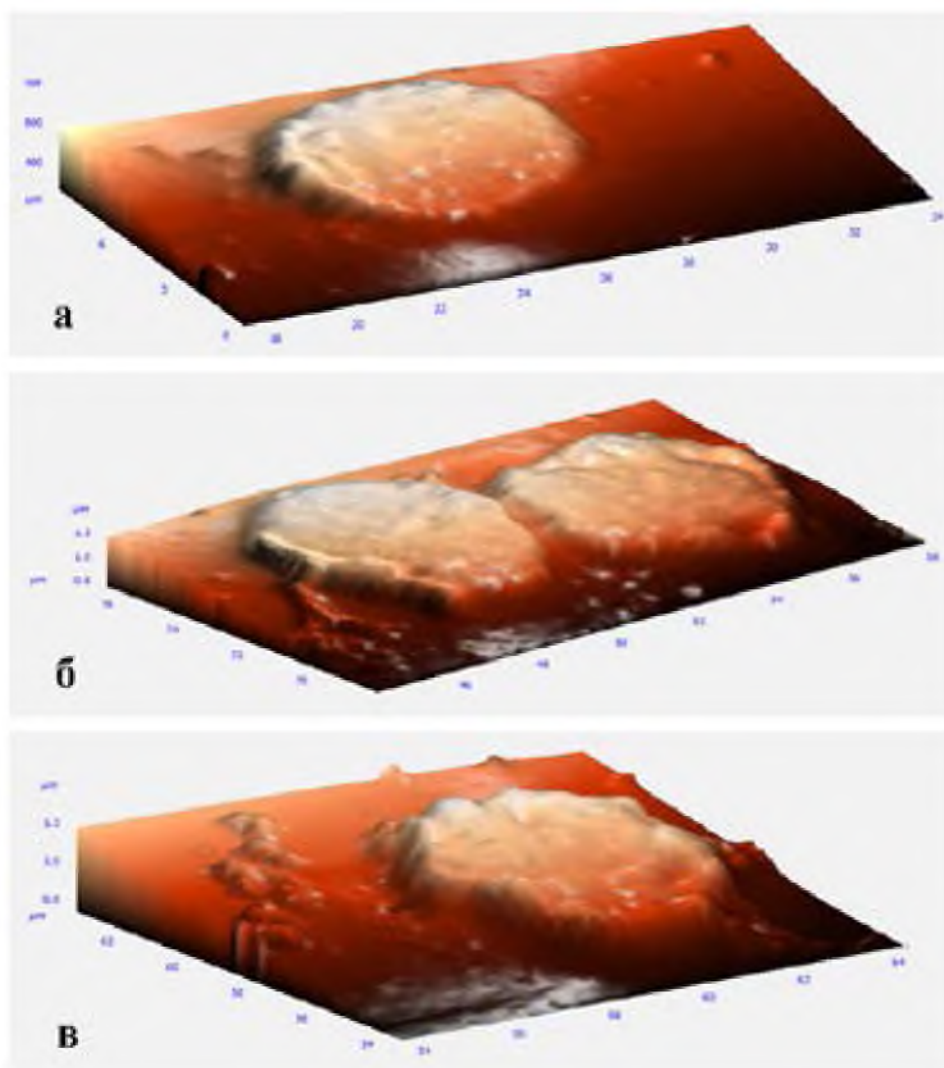


Рис. 2. Полиморфноядерные лейкоциты белого амура *Stenopharyngodon idella* после инкубации при температуре: а – 5°C; б – 20°C; в – 40°C.

Fig. 2. Polymorphonuclear leukocytes of *Stenopharyngodon idella* after incubation at temperature of: а – 5°C; б – 20°C; в – 40°C.

Имеются разные литературные данные о толерантности к температуре у *Stenopharyngodon idella*. Согласно исследованиям Vovk P.S. (1979) и Svedentsov E. P. (2006), fry и мальки белого амура выдерживают температуру воды от 0 до 40°C. Chilton E.W. II. и Muneke M.I. (1992) установили, что верхний летальный диапазон температур для молоди находится в пределах 33-41°C, а для двухлеток – 35-36°C. Bettoli и другие (1985) документировали, что верхняя граница температуры для *Stenopharyngodon idella* – 39,3°C,

а оптимальная температура – 25,3°C. В нашем эксперименте установлено, что низкая температура инкубации 5°C, находящаяся в зоне толерантности, не оказывает влияния на морфометрические показатели красных клеток белого амура, хотя их внешняя форма отличается от клеток, инкубированных при комнатной температуре. При температуре 40°C, являющейся критической, наблюдаем изменение морфологических показателей эритроцитов.

Таблица 1

Морфометрические показатели клеток крови *Stenopharyngodon idella* при действии температурного фактора

Table 1

The morphometric parameters of blood cells *Stenopharyngodon idella* under the influence of the temperature factor

т°С	Типы клеток	S	V	P	D x d
5°С	Э	60,138 ± 3,389	55,183 ± 12,694	33,510 ± 1,149	9,952 ± 0,576 x 7,950 ± 0,411
	ПМЯЛ	42,658 ± 2,054*	17,728 ± 1,583*	25,161 ± 1,503	7,786 ± 0,316* x 6,354 ± 0,313
20°С	Э	56,890 ± 5,723	67,361 ± 12,922	32,047 ± 1,154	9,805 ± 0,607 x 7,593 ± 0,381
	ПМЯЛ	29,722 ± 3,467	15,259 ± 3,224	25,306 ± 1,658	6,716 ± 0,349 x 6,098 ± 0,577
40°С	Э	61,384 ± 4,179	48,433 ± 6,552*	33,765 ± 0,700*	11,088 ± 0,895* x 7,968 ± 0,301
	ПМЯЛ	29,524 ± 4,419	11,988 ± 2,690*	29,345 ± 1,766*	6,610 ± 0,171 x 5,882 ± 0,161

Известно, что морфология клеток крови тесно связана со структурно-механическими свойствами клеточных поверхностей, которые характеризуются упруго-эластическими свойствами [11]. В таблице 2 представлены показатели, характеризующие функциональную активность эритроцитов и ПМЯЛ *Stenopharyngodon idella* под влиянием температурного фактора.

Таблица 2

Показатели адгезии и упругости гемцитов у *Stenopharyngodon idella* при действии температурного фактора

Table 2

Indicators of adhesion and elasticity of hemocytes in *Stenopharyngodon idella* under the influence of the temperature factor

т°С	Типы клеток	Адгезия (нН)	Упругость (кПа)
5°С	Э	25,451 ± 5,553	32,209 ± 4,164 *
	ПМЯЛ	28,601 ± 5,250	33,611 ± 2,083 *
20°С	Э	24,887 ± 2,928	29,580 ± 2,567
	ПМЯЛ	26,651 ± 3,109	29,079 ± 3,282
40°С	Э	29,593 ± 2,465 *	30,664 ± 2,885
	ПМЯЛ	29,776 ± 3,416 *	30,441 ± 2,961

Установлено, что при пониженной температуре инкубации (5°С) упругость эритроцитов и ПМЯЛ белого амура на 8,9% ($p \leq 0,05$) и 15,6% ($p \leq 0,05$) выше по сравнению с температурой 20°С. Повышенная температура увеличивает показатель адгезии у эритроцитов на 18,9% ($p \leq 0,05$), полиморфноядерных

лейкоцитов – на 11,7% ($p \leq 0,05$). Полученные результаты соответствуют литературным данным [2], согласно которым адаптация белковых молекул к снижению температуры осуществляется за счет их лабилизации, что, по-видимому, ведет к увеличению упругости цитоплазматической мембраны.

Заключение

Методом атомно-силовой микроскопии изучено действие температурного фактора на морфометрические и физические показатели эритроцитов и полиморфноядерных лейкоцитов *Stenopharyngodon idella*. Установлено, что при пониженной температуре инкубации (5°C) морфометрические показатели эритроцитов белого амура не изменяются, при повышенной температуре – увеличивается большой диаметр, периметр красных клеток крови

и уменьшается их объем. Снижение температуры инкубации (до 5°C) приводит к увеличению большого диаметра, объема и площади ПМЯЛ *Stenopharyngodon idella*, повышение температуры (до 40°C) ведет к увеличению их периметра и снижению объема. Кроме этого, при снижении температуры инкубации увеличивается упругость эритроцитов и ПМЯЛ, при повышении температуры инкубации повышается адгезионный показатель клеток.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ажаев А.Н. Физиолого-гигиенические аспекты действия высоких и низких температур. М.: Наука, 1979. 264 с.
2. Александров В.Я. Клетки, макромолекулы и температура. Л. Наука, 1975. 330 с. (с.172)
3. Анисимова И. М., Лавровский В. В. Ихтиология: учебное пособие. М.: Высшая школа, 1983. 255 с.
4. Васильев Н.В., Захаров Ю.М., Коляда Т.И. Система крови и неспецифическая резистентность в экстремальных климатических условиях. Новосибирск: Наука, 1992. 257 с.
5. Головки С.И., Федорова М.З., Чернявских С.Д. Мембранный резерв клеток крови позвоночных животных // Тез. Докл. VI Сибирского Физиол. съезда. Барнаул, 2008. С. 25.
6. Гольдберг Д.И., Гольдберг Е.Д., Шубин Н.Г. Гематология животных. Томск: Изд-во ТГУ, 1973. 182 с.
7. Иванов А. А. Физиология рыб: Учеб. пособие. М.: Мир, 2003. 284 с.
8. Козлов Н.Б. Гипертермия: биохимические основы патогенеза, профилактики, лечения. Воронеж: Изд-во Воронежского Университета, 1990. 103 с.
9. Меньшиков, И.В., Бедулева Л.В. Основы иммунологии. Лабораторный практикум. Ижевск: Изд. Дом «Удмуртский университет», 2001. 136 с.
10. Сигорская Ю. О чем расскажет капля крови // Журнал «Наука и жизнь». 2003. №5. С. 71-73.
11. Сравнительная оценка морфофункциональных характеристик нативных и фиксированных эритроцитов / Скоркина М.Ю., Федорова М.З., Чернявских С.Д., Забияков Н.А., Сладкова Е.А. // Цитология. 2011. Т. 53. №1. С. 17-21.
12. Строганов Н. С. Экологическая физиология рыб. М.: Высшая школа. 1962. 441 с.
13. Использование атомно-силовой микроскопии для оценки морфометрических показателей клеток крови / М. З. Федорова, Н. А. Павлов, Е. В. Зубарева, С. В. Надеждин, В. В. Симонов, Н. А. Забияков, Е. С. Тверитина // Биофизика. 2008. Т. 53. №6. С. 555-559.
14. Федорова М.З. Функциональные свойства и реактивность лейкоцитов крови при измененных условиях организма, вызванных факторами различной природы: Автореф. дис... д-ра. биол. наук. Москва, 2002. 32 с.
15. Bettoli P.W., Neill W.H. and Kelsch S.W. Temperature preference and heat resistance of grass carp, *Stenopharyngodon idella* (Valenciennes), bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis* (Gray), and their F₁ hybrid // Journal of Fish Biology, 1985. Vol. 27. P. 239-247.
16. Chilton, E. W. II. and Muoneke M. I. Biology and management of grass carp (*Stenopharyngodon idella*, Cyprinidae) for vegetation control: A North American perspective // Reviews in Fish Biology and Fisheries, 1992. Vol. 2. P. 283-320.
17. Conservation leukocytes in the conditions of cryoanabiosis (-40°C) / Svedentsov E.P., Chitcheglova O.O., Tumanova T.V., Solomina O.N. // Journal of stress physiology & biochemistry, 2006. Vol. 2, № 1. P. 28-34.
18. Vovk P.S. Temperature and food adaptation of the Far East herbivorous fishes: Pacific Science Congress Proceedings, 1979. P. 41-42.

REFERENCES:

1. Azhaev A.N. Physiologic and Hygienic Aspects of Exposure to High and Low Temperatures. M. Nauka, 1979. 264 p.
2. Aleksandrov V.Ya. Cells, Macromolecules and Temperature. L. Nauka, 1975. 330p. (p.172).
3. Anisimova Y.M., Lavrovskii V.V. Ichthyology: Study Guide. M. Vysshaja shkola, 1986. 255 p.
4. Vasiliev N.V., Zakharov Yu.M., Kolyada T.I. The Blood System and Nonspecific Resistance under Extreme Climatic Conditions. Novosibirsk: Nauka, 1992. 257 p.
5. Golovko S.Y., Fedorova M.Z., Chernyavskikh S.D. Membrane Reserve of Blood Cells of Vertebrates // Thesis dokl. VI Sibirskovo Phiziol. s'ezda. Barnaul, 2008. P.25.
6. Goldberg D.I., Goldberg E.D., Shubin N.G. Animal Hematology. Tomsk. Izd-vo TGU, 1973. 182 p.
7. Ivanov A.A. Fish Physiology: Study Guide. M. Mir, 2003. 284 p.
8. Kozlov N.B. Hyperthermia: Biochemical Basis of Pathogenesis, Prevention, Treatment. Voronezh: Izd-vo Voronezhskogo Universiteta, 1990. 103 p.
9. Menshikov I.V., Beduleva L.V. The Fundamentals of Immunology. Laboratory workshop. Izhevsk: Izd. dom "Udmurtskii Universitet", 2001.136 p.
10. Sigorskaya Iu. What does a Blood Drop Tell Us? // Zhurnal "Nauka i zhizn", 2003.N5. Pp. 71-73.
11. Comparative Assessment of Morphological and Functional Characteristics of Native and Fixed Erythrocytes. Skorkina M.Yu., Fedorova M.Z., Chernyavskikh S.D. Zabinyakov N.A., Sladkova E.V. // Cytology. 2011. Vol.53. N1. Pp. 17-21.
12. Stroganov N.S. Ecological Physiology of Fish. M.: Vysshaja shkola, 1962. 441 p.
13. Using Atomic Force Microscopy to Assess the Morphometric Parameters of Blood Cells. M.Z. Fedorova, N.A. Pavlov, E.V. Zubareva, S.V. Nadezhdin, V.V. Simonov, N.A. Zabinyakov, E.S. Tveritina // Biophysics, 2008. Vol. 53. N6. Pp. 555-559.
14. Fedorova M.Z. Functional Properties and Reactivity of White Blood Cells in the Changed Conditions of the Body, Caused by Factors of a Different Nature: Doctoral Thesis Abstract. Moscow, 2002. 32 p.
15. Bettoli P.W., Neill W.H. and Kelsch S.W. Temperature preference and heat resistance of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes), bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis* (Gray), and their F₁ hybrid // Journal of Fish Biology, 1985. Vol. 27. Pp. 239-247.
16. Chilton, E. W. II. and Muoneke M. I. Biology and management of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, Cyprinidae) for vegetation control: A North American perspective // Reviews in Fish Biology and Fisheries, 1992. Vol. 2. Pp. 283-320.
17. Conservation leukocytes in the conditions of cryoanabiosis (-40°C) / Svedentsov E.P., Chtcheglova O.O., Tumanova T.V., Solomina O.N. // Journal of stress physiology & biochemistry, 2006. Vol. 2, № 1. Pp. 28-34.
18. Vovk P.S. Temperature and food adaptation of the Far East herbivorous fishes: Pacific Science Congress Proceedings, 1979. Pp. 41-42.