

Адаптация эритроцитов периферической крови *Polypterus senegalus* к кратковременному тепловому воздействию

В. А. Тютин, Е. Г. Евдокимов

Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова,
ул. Советская, 14, Ярославль, 150003

E-mail: victor.t.2002@mail.ru

В работе исследовано влияние температурного фактора на адаптационные возможности эритроцитов *Polypterus senegalus*. Методом световой микроскопии получены количество красных клеток в периферической крови, их размерные характеристики и рассчитаны морфометрические параметры эритроцитов. В ходе исследования было выявлено, что при увеличении температуры происходит увеличение площади поверхности и объёма клеток крови и приближение их формы к шарообразной.

Ключевые слова: многоперы; эритроциты; периферическая кровь

Введение

Рыбы представляют большой интерес в сравнительно-эволюционном плане становления защитных и гомеостатических механизмов, так как они занимают промежуточное положение между низшими и высшими позвоночными. В этом аспекте актуально исследование древних групп рыб, к которым относится отряд Многопёрообразные (*Polypteriformes*), в состав которого входит только одно семейство – Многопёровые (*Polypteridae*) [6].

Они филогенетически относятся к представителям базального семейства класса Лучепёрых (*Actinopterygii*). Многопёровые обладают многими примитивными признаками, которые не свойственны современным костистым рыбам [Там же]. К таким относится, например, наличие своеобразного «легкого», открывающегося в кишечник с брюшной стороны и участвующего в воздушном дыхании [1]. Типичный представитель этого семейства – сенегальский полиптерус (*Polypterus senegalus* Cuvier, 1829). Обитает он в заводях рек и лагунах озёр Африки и Индии. Данные по физиологии этих рыб немногочисленны и разрозненны [6].

Кровь полиптеруса имеет выраженный лимфоидный профиль [Там же]. Про морфологические особенности эритроцитов Многопёровых известно очень мало. Предположительно, они имеют много общего с морфологией эритроцитов хряще-костных и хрящевых рыб. Имеются все возрастные стадии: эритробласты, базофильные, полихроматофильные и оксифильные нормобласты и зрелые эритроциты. Форма эритроцитов эллипсоидная; цитоплазма преимущественно бесструктурная, оранжево-красного цвета; ядро плотное, красно-фиолетового цвета [2]. Размеры красных клеток и их ядер больше, чем у большинства костистых рыб [3].

Как правило, у пойкилотермных организмов наблюдается прямая связь между температурой среды и кислородной ёмкостью крови. При увеличении температуры происходит рост концентрации гемоглобина и количества эритроцитов в крови [4], а также рост морфометрических показателей за счёт набухания клеток и повышении значений гематокрита [7]. При понижении температуры наблюдается противоположная картина [4]. Это необходимо для устойчивости организма рыб к крайним вариантам гипоксии, которая, в свою очередь, сопровождается изменением количества гемоглобина, числа клеток и размера клеток. Если снижение содержания кислорода в воде не достигает крайних значений, то изменение приведённых выше показателей может быть либо слабо выражено, либо отсутствовать совсем [7].

Цель работы – определить динамику морфометрических показателей периферической крови *P. senegalus* при адаптации к высоким температурам.

Материалы и методы. Отбор проб

Для каждого варианта опыта было отобрано по 3 половозрелых преднерестовых женских особи *Polypterus senegalus*, которые находились в состоянии физиологического покоя. Особи имели следующие размерные показатели: длина тела $12,19 \pm 0,69$ см, вес тела $11,65 \pm 1,45$ г. Рыба была приобретена у специалистов по содержанию (ИП Дегтярев Интернет-магазин «Амигофиш», Россия). В Россию рыба доставлялась из республики Нигер. Транспортировка осуществлялась в специальных контейнерах с принудительной аэрацией, температура воды составляла 23°C .

В лаборатории в течение двух недель проводили акклимацию в аэрируемых, проточных стационарных аквариумах объёмом 200 л и температурой воды 23°C. Суточный пищевой рацион составлял не более 10 % от массы тела. Кормление проводили коммерческим кормом – «Экокорм» (ООО «Любимчик», Россия).

Проведение эксперимента

Повышение температуры проходило в течение двух часов с температуры акклимации 23°C до температуры 28°C без принудительной аэрации и с постоянным перемешиванием. При достижении целевой температуры исследуемые особи изымались из аквариума для отбора периферической крови.

Исследование морфометрических особенностей эритроцитов

В момент изъятия особей из аквариума применяли анестетик бензокаин (Merck Life Science LLC). Проводили морфометрический анализ рыб, измеряя вес и длину всей рыбы. После разрушали головной мозг, получали пункцию крови и проводили вскрытие рыбы.

Кровь получали пункцией хвостовой артерии. Кровь собирали в пластиковые пробирки с различным напылением на стенках. В пробирки с антикоагулянтом, в качестве которого был использован ЭДТА (Shandong Chengwu Medical Products Factory, Китай), собирали кровь для проведения подсчёта общего количества клеток крови, изготовления мазков крови и определения количества гемоглобина.

Подсчёт общего количества эритроцитов проводили с помощью камеры Горяева и светооптического микроскопа «Микмед-6» (ЛОМО, Россия), стандартная методика [8].

Мазки крови изготавливали и окрашивали по методу Романовского – Гимзы [Там же]. На зафиксированных мазках крови и отпечатках почки идентифицировали стадии зрелости эритроцитов. Светооптическим микроскопом «Микмед-6», оборудованным дополнительно цифровой камерой МС-5 (ЛОМО, Россия), фотографировали мазки. Внутри каждой повторности отдельно в периферической крови измеряли по 200 эритроцитов. Таким образом, всего было измерено около 800 клеток. Линейные размеры эритроцитов определяли по фотографиям с помощью программы JMicroVision [10].

Измеряли длинную и короткую ось эритроцита (D_l и D_s соответственно) и ядра (d_l и d_s соответственно). Полученные линейные размеры использовали для расчёта ряда характеристик эритроцитов по формулам [5]. Показатель формы (MS) клетки определялся как соотношение длинной и короткой оси:

$$MS = \frac{D_l}{D_s}$$

Объём клетки (V_c) рассчитывали с учетом толщины (h) и объёма ядра (V_n) по следующим формулам:

$$V_c = 0.7012 \times \left(\frac{D_l + D_s}{2} \right)^2 \times h + V_n, \quad V_n = \frac{\pi \cdot d_l \cdot d_s^2}{6}$$

$$h = 1.8 + 0.0915 \times (D_l - 7.5)$$

Также рассчитывали площадь поверхности клетки (S_c):

$$S_c = 2\pi a^2 b + \frac{2\pi a b \sin(\arcsin \frac{b}{a})}{\arcsin \frac{b}{a}}, \quad e = \frac{\sqrt{a^2 - b^2}}{a}$$

$$a = \frac{D_l + D_s}{4}, \quad b = 0.67h$$

На основании полученных значений объёма клетки и объёма ядра определяли ядерно-цитоплазматическое отношение (NCR):

$$NCR = \frac{V_n}{V_c}$$

Полученные значения площади поверхности и объёма клетки позволили рассчитать удельную поверхность эритроцитов (SS_c):

$$SS_c = \frac{S_c}{V_c}$$

Статистическая обработка данных

Данные в работе представлены в виде средних значений и их стандартных ошибок ($\bar{m} \pm s_{\text{д}}$). Для определения статистической значимости различий средних двух выборок применяли двусторонний T-test Student. За нулевую гипотезу принимали отсутствие статистически значимых различий в выборочных средних. Альтернативная гипотеза говорила об обратном: выборочные средние статистически значимо различаются.

Для оценки параметров, дающих наибольшую вариацию эритроцитов, был проведен факторный анализ. Полученные доли объясненной дисперсии позволили выявить ключевые факторы и описать параметры, формирующие их.

Критический уровень значимости принимали равным 0,05 ($p \leq 0,05$). Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения: MSOffice, Statistica 10, IPython 7.29.0.

Этические особенности проведения экспериментов

Условия транспортировки соответствовали EU Directive 2010/63/EU для перевозки животных и Федеральному закону от 11.06.2021 N 52-ФЗ «О животном мире».

Уход за экспериментальными животными и их использование соответствовали руководящим принципам ARRIVE и проводились в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/EU об экспериментах на животных и законами Российской Федерации о защите животных. Работа прошла этическую экспертизу и одобрена локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова» (заключение от 01.10.2019).

Результаты

В периферической крови *Polypterus senegalus* контрольного варианта опыта общее количество клеток красной крови составило $1,13 \pm 0,02$ млн кл./мл, а в опытном варианте – $1,32 \pm 0,26$ млн кл./мл.

Морфометрические параметры клеток опытных вариантов эксперимента статистически значимо отличались от контрольных значений (табл. 1).

Таблица 1

Морфометрические параметры эритроцитов периферической крови *Polypterus senegalus* в опыте и контроле

| Параметр эритроцита | Вариант эксперимента | |
|---|----------------------|-------------------------|
| | Контроль | Опыт 2 часа |
| Объём ядра, мкм ³ | $33,33 \pm 18,98$ | $48,49 \pm 15,52^{**}$ |
| Объём клетки, мкм ³ | $272,87 \pm 65,04$ | $317,04 \pm 49,9^{**}$ |
| Площадь поверхности клетки, мкм ² | $383,71 \pm 85,98$ | $428,53 \pm 67,06^{**}$ |
| Полезный объём, мкм ³ | $239,54 \pm 55,82$ | $268,55 \pm 43,63^{**}$ |
| Ядерно-цитоплазматическое отношение | $0,12 \pm 0,05$ | $0,15 \pm 0,04^{**}$ |
| Показатель формы клетки | $1,54 \pm 0,27$ | $1,49 \pm 0,25^*$ |
| Удельная поверхность клетки, мкм ² /мкм ³ | $1,41 \pm 0,08$ | $1,35 \pm 0,06^{**}$ |

Примечание: * – уровень значимости p-value $\leq 0,01$,

** – уровень значимости p-value $\leq 0,001$.

При воздействии двухчасового нагревания наблюдается увеличение объёма ядра клетки и объёма эритроцитов. Также отмечено увеличение площади клеточной поверхности, полезного объёма и ядерно-цитоплазматического соотношения клетки. При этом отмечено снижение удельной поверхности клеток в опытном варианте эксперимента по сравнению с контрольным.

В то же время в опытных измерениях отмечено изменение формы эритроцитов в сторону более округлой по сравнению с контрольной группой клеток.

В ходе исследования был проведен факторный анализ, указывающий на переменные, объясняющие основной вклад в наблюдаемую дисперсию среди исследуемых клеток (табл. 2).

Распределение объяснённой дисперсии по выделенным факторам

| Параметр дисперсии | Факторы | | | | |
|--------------------------------------|---------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Сумма квадратов нагрузок (дисперсия) | 4,016 | 3,397 | 1,969 | 0,752 | 0,273 |
| Пропорциональная дисперсия | 0,365 | 0,309 | 0,179 | 0,068 | 0,025 |
| Совокупная разница | 0,365 | 0,674 | 0,853 | 0,921 | 0,946 |

Наибольший вклад в формирование совокупной дисперсии имеют 1–3 факторы. Для выявления факторных нагрузок на морфометрические параметры было получено распределение дисперсии исследуемым показателям (табл. 3).

Таблица 3

Распределение факторных нагрузок на морфометрические параметры эритроцитов

| Параметр клеток | Факторы | | | | |
|---|---------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Объём ядра, мкм ³ | -0,112 | 0,683 | -0,009 | 0,108 | 0,483 |
| Объём клетки, мкм ³ | 0,846 | 0,172 | -0,089 | 0,052 | 0,089 |
| Площадь клетки, мкм ² | 1,045 | -0,044 | -0,106 | 0,022 | -0,066 |
| Полезный объём, мкм ³ | 1,047 | -0,043 | -0,102 | 0,022 | -0,069 |
| Ядерно-цитоплазматическое отношение | -0,134 | 0,964 | 0,028 | 0,116 | -0,057 |
| Показатель формы клетки | 0,260 | -0,010 | 0,966 | 0,003 | 0,010 |
| Удельная поверхность клетки, мкм ² /мкм ³ | -0,002 | -0,961 | -0,026 | -0,117 | 0,056 |

Примечание: жирным шрифтом выделены наибольшие значения в факторных нагрузках.

Наибольшую долю дисперсии среди эритроцитов определяют такие параметры, как объём клетки, площадь клетки и полезный объём клетки. Во втором факторе выделяется в качестве ведущего параметра ядерно-цитоплазматическое отношение. В третьем факторе основную роль играет показатель формы клетки.

Обсуждение

Общее количество эритроцитов в периферической крови лучеперых рыб варьирует от 0,5 млн. кл. / мл до 3 млн. кл. / мл [7]. Многоперовые имеют низкие значения данного показателя, так как они ведут придонный образ жизни [7; 9].

Изменение морфометрических параметров эритроцитов, как правило, связано с реакцией на изменения внешних условий среды: содержание кислорода и температуры. Ухудшение данных показателей для организма вызывает увеличение пролиферативной активности в очагах эритропоэза рыб и увеличение количества циркулирующих эритроцитов [7], что и было отмечено у *P. senegalus* при увеличении температуры.

При этом при увеличении пролиферации у лучеперых отмечается изменение качественного состава, циркулирующего в периферическом русле пула эритроцитов. В этом случае увеличивается доля молодых форм эритроцитов [4; 7]. Из-за увеличения доли молодых форм происходит смещение морфометрических параметров клеток, что вызывает увеличение площади, объёма и полезного объёма клетки. Неравномерное увеличение объёма и площади клетки приводит к изменению её формы в сторону шарообразной.

Заключение

Температурные изменения окружающей среды вызывают нарушения в постоянстве внутренней среды организма, из-за чего происходит запуск компенсаторных механизмов, стремящихся вернуть систему к равновесию. Одной из остро реагирующих систем является система крови. В случае увеличения температуры происходит увеличение пролиферации клеток эритроидного ряда и выход молодых форм эритроцитов в периферическую кровь. Выход молодых форм эритроцитов приводит к смещению средних морфометрических показателей красных клеток крови. Смещение идёт в сторону увеличения площади поверхности и объёма клетки и приближения их к шарообразной форме.

Финансирование: Работа выполнена в научно-образовательной лаборатории «Молекулярная генетика и биотехнология» в рамках программы развития ЯрГУ до 2030 г. (№ 123042800011-6), грант ЯрГУ № GL-2023-03.

Литература

1. Иванов А. О., Черепанов Г. О. Ископаемые низшие позвоночные. СПб.: СПбГУ. 2007. 228 с.
2. Иванова Н. Т. Атлас клеток крови рыб (сравнительная морфология и классификация форменных элементов крови рыб). М.: Легкая и пищевая промышленность. 1982. 184 с.
3. Исследование размерных характеристик и морфологических особенностей эритроцитов у некоторых черноморских рыб разного эволюционного положения и экологической специализации / Ю. А. Силкин, Е. Н. Силкина, В. Н. Черняева, А. Е. Василец // Вопросы ихтиологии. 2019. Т. 59. № 1. С. 87–93.
4. Кухарева Т. А. Клеточный состав крови и гемопоэтических органов у некоторых видов донных рыб (Севастопольская бухта, Чёрное море). Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН, 2019. 150 с.
5. Кухарева Т. А., Солдатов А. А. Функциональная морфология эритроидных элементов крови *Neogobius melanostomus* P. в процессе клеточной дифференцировки // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2016. Т. 52. № 3. С. 233–238.
6. Лапирова Т. Б., Флерова Е. А. Характеристика иммунофизиологического статуса сенегальского полиптеруса (*Polypterus senegalus* Cuvier, 1829) // Биология внутренних вод. 2018. № 4. С. 100–106.
7. Солдатов А. А. Особенности организации и функционирования системы красной крови рыб // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2005. Т. 41. № 3. С. 217–223.
8. Тимакова Т. К., Флерова Е. А., Заботкина Е. А. Методы световой и электронной микроскопии в биологии и ветеринарии: учебно-методическое пособие. Ярославль: ЯГСХА, 2014. 72 с.
9. Expression patterns and quantitative assessment of neurochemical markers in the lung of the gray bichir, *Polypterus senegalus* (Cuvier, 1829) / E. R. Lauriano, J. M. Icardo, D. Zaccone, M. Kuciel, L. Satora, A. Alesci, M. Alfa, G. Zaccone // Acta histochemica. 2015. Т. 117. № 8. С. 738–746.
10. Roduit N. J. MicroVision Image analysis toolbox for measuring and quantify in gcomponents of high-definition images. 2019 (<https://jmicrovision.github.io> Version 1.3.1.).

Adaptation of peripheral blood erythrocytes of *Polypterus senegalus* to short-term heat exposure

V. A. Tyutin, E. G. Evdokimov

P. G. Demidov Yaroslavl State University,
14 Sovetskaya str., Yaroslavl, 150003

E-mail: victor.t.2002@mail.ru

The effect of temperature factor on the adaptive capacity of erythrocytes of *Polypterus senegalus* was studied. The number of red cells in peripheral blood, their dimensional characteristics, and morphometric parameters of erythrocytes were obtained by light microscopy. The study revealed that with increasing temperature the surface area and volume of blood cells increased and their shape approached a spherical shape.

Keywords: Polypteriformes; red blood cells; peripheral blood

Funding: The research was carried out in the scientific educational laboratory “Molecular genetics and biotechnology” under YarSU’s development program framework for 2030 (№ 123042800011-6), YarSU grant № GL-2023-03.