

© Коллектив авторов, 2013
УДК 611.018.5:612.015.6:599.742.1

*Л. Б. Узенбаева, И. В. Баишникова, А. Г. Кижина, Т. Н. Ильина, В. А. Илюха
и Н. Н. Тютюнник*

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПЕСЦОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ ВИТАМИНОВ А И Е В РАЗЛИЧНЫХ ДОЗАХ

Лаборатория экологической физиологии животных (зав. — д-р. биол. наук В. А. Илюха), Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск; кафедра молекулярной биологии, биологической и органической химии (зав. — чл.-кор. РАН Н. Н. Немова), Петрозаводский государственный университет

Цель настоящей работы — изучение влияния различных доз витаминов А и Е на морфометрические параметры и особенности поверхностной архитектоники лимфоцитов периферической крови у вуалевых песцов. При использовании световой микроскопии установлено, что в крови вуалевых песцов ($n=30$) большинство лимфоцитов имеют относительно гладкую поверхность и только у некоторых наблюдаются цитоплазматические выпячивания. Большие дозы витаминов А и Е, вводимые в их рацион, вызывают существенное снижение морфометрических параметров относительно гладких форм лимфоцитов, а витамин А — изменения микрорельефа их поверхности.

Ключевые слова: лимфоцит, морфометрические показатели, витамин А, витамин Е

Новейшие технологии значительно расширили рамки морфологических исследований в гематологии. В частности, определение морфометрических параметров — конфигурации и размеров клеточных структур имеет большое значение для оценки функциональной активности лейкоцитов и характера распределения популяций клеток при диагностике и мониторинге заболеваний и выявлении влияния факторов внешней среды на организм [5].

Как известно, биологически активные соединения, в том числе витамины, влияют на иммунную систему. На моделях с использованием животных и в культуре показано, что витамин А и родственные ретиноиды участвуют в регуляции пролиферации, дифференцировки и функций кровяных и иммунокомпетентных клеток [12, 15]. Установлено, что витамин Е является необходимым компонентом мембран клеток и субклеточных структур и, обладая антиоксидантной и антиапоптотической активностью, он в значительной степени обеспечивает их структурно-функциональную стабильность [10, 15].

Цель настоящей работы — изучение влияния различных доз витаминов А и Е на морфометрические параметры и особенности поверхностной архитектоники лимфоцитов периферической крови у вуалевых песцов.

Материал и методы. Исследования выполнены с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования Института биологии Карельского научного центра РАН. Работа проведена на 6-месячных самках песцов, содержащихся на звероводческой ферме Республики Карелия. Животные были разделены на 5 групп по 6 особей в каждой: контрольную, которая находилась на обычном рационе, и 4 подопытных, получавших дополнительно витамины А или Е. Животным 1-й подопытной группы добавляли в рацион 5000 МЕ, 2-й — 10000 МЕ масляного раствора витамина А (ретинола ацетата) в сутки. Животные 3-й и 4-й групп получали в сутки соответственно по 50 и 100 мг витамина Е [dl- α -токоферилацетат, кукусавит Е 50 (Lohman Animal Health, Германия)]. В звероводстве общепринятые дозы составляют: витамина А — 500 МЕ и витамина Е — 15 мг/сут. Кровь песцов брали без наркоза, утром натощак из плантарной вены, в объеме 3 мл. На мазках, окрашенных по Паппенгейму, исследовали морфологические особенности лимфоцитов и определяли их относительное содержание. В работе использовали световой микроскоп Axioscop 40 (Carl Zeiss, Германия) с цветной цифровой видеокамерой (Pixera 150ES) и компьютерной системой анализа изображений «Видеотест». Морфометрические параметры — площадь лимфоцита, доля площади, занимаемая ядром, фактор формы круга и фактор формы эллипса определены у 1454 относительно гладких форм лимфоцитов и 96 — с выростами и сфероидными образованиями у всех животных. Кроме морфологического анализа, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сыворотке крови определяли концентрацию ретинола и α -токоферола.

Полученные данные обрабатывали с использованием пакетов программ MS Excel и Statgraphics общепринятыми методами вариационной статистики. Оценку значимости

Сведения об авторах:

Узенбаева Людмила Борисовна, Баишникова Ирина Валерьевна (e-mail: iravbai@mail.ru), Кижина Александра Геннадьевна, Ильина Татьяна Николаевна, Илюха Виктор Александрович, Тютюнник Николай Николаевич, лаборатория экологической физиологии животных, Институт биологии Карельского научного центра РАН, 185910, Республика Карелия, Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

Таблица 1

Морфометрические параметры лимфоцитов периферической крови у вуалевых песцов при различных дозах витаминов А и Е в их рационе ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Исследованные лимфоциты	Параметры	Группа животных				
		Контрольная	5000 МЕ витамина А	10000 МЕ витамина А	50 мг/сут витамина Е	100 мг/сут витамина Е
С относительно гладкой поверхностью	Площадь клетки, мкм ²	70,8±0,9	64,9±1,0***	66,2±1,0***	65,6±1,0***	63,6±1,0***
	Фактор формы круга клетки, отн. ед	0,931±0,005	0,937±0,004	0,943±0,003*	0,926±0,003	0,936±0,003
	Фактор формы эллипса клетки, отн. ед.	0,9983±0,0004	0,9988±0,0004	0,9993±0,0002	0,9991±0,0002	0,9989±0,0002
	Площадь ядра, мкм ²	54,8±0,5	49,8±0,7***	50,4±0,5***	49,0±0,7***	48,0±0,6***
	Фактор формы круга ядра, отн. ед	0,922±0,004	0,922±0,003	0,932±0,003*	0,904±0,004**	0,9530±0,0020***
	Фактор формы эллипса ядра, отн. ед.	0,9976±0,0004	0,9976±0,0004	0,9984±0,0002	0,9969±0,0004	0,9986±0,0002*
	Доля площади, занимаемая ядром, %	78,6±0,4	77,6±0,4	77,4±0,4*	75,6±0,4***	76,8±0,5**
С выростами и сфероидными образованиями	Площадь клетки, мкм ²	90±6 ^{◊◊}	67,4±2,3	65,9±1,5	72±26	83±4 ^{◊◊◊}
	Фактор формы круга клетки, отн. ед	0,797±0,028 ^{◊◊◊}	0,806±0,014 ^{◊◊◊}	0,790±0,013 ^{◊◊◊}	0,790 ^{◊◊◊}	0,825±0,022 ^{◊◊◊}
	Фактор формы эллипса клетки, отн. ед.	0,990±0,003 ^{◊◊}	0,9890±0,0010 ^{◊◊◊}	0,9860±0,0020 ^{◊◊◊}	0,985±0,005 ^{◊◊}	0,9930±0,0020 ^{◊◊}
	Площадь ядра, мкм ²	62±4	50,1±1,4	48,6±1,0	46±17	58,0±2,6 ^{◊◊◊}
	Фактор формы круга ядра, отн. ед	0,918±0,016	0,897±0,009 ^{◊◊}	0,891±0,009 ^{◊◊◊}	0,945±0,005 ^{◊◊◊}	0,923±0,013 [◊]
	Фактор формы эллипса ядра, отн. ед.	0,9970±0,0020	0,9970±0,0010	0,9960±0,0010 [◊]	1,00 ^{◊◊◊}	0,9980±0,0010
	Доля площади, занимаемая ядром, %	68,7±1,5 ^{◊◊◊}	74,9±0,8 ^{◊◊}	74,1±0,9 ^{◊◊◊}	65,13±0,08 ^{◊◊◊}	70,3±1,6 ^{◊◊◊}

Примечание. Различия значимы: * при P<0,05; ** при P<0,01; *** при P<0,001 по сравнению с контрольной группой; ◊ при P<0,05; ◊◊ при P<0,01; ◊◊◊ при P<0,001 по сравнению с показателями у лимфоцитов с относительно гладкой поверхностью в каждой группе.

Таблица 2

Относительное содержание лимфоцитов в периферической крови у песцов при различных дозах витаминов А и Е в их рационе (%)

Исследованные показатели	Морфометрические показатели	Группа животных				
		Контрольная	5000 МЕ витамина А	10000 МЕ витамина А	50 мг/сут витамина Е	100 мг/сут витамина Е
Общее содержание лимфоцитов	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	54±5	49,8±2,5	55±4	44±6	51±6
	Lim	44–74	45–60	46–71	32–60	30–60
Содержание лимфоцитов с выростами и сфероидными образованиями	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	0,6±0,4	2,2±0,9	2,8±2,0	0,08±0,08	0,67±0,25
	Lim	0–2,5	0,5–6,5	0–12,5	0–0,5	0–1,5

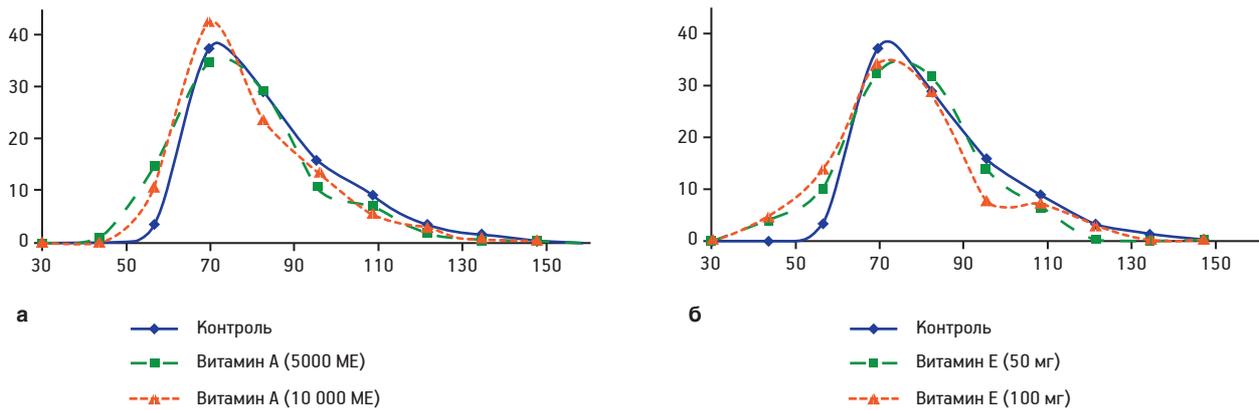


Рис. 1. Гистограмма распределения лимфоцитов по площади у вуалевых песцов при различных дозах витаминов А (а) и Е (б) в рационе их питания.

По оси абсцисс — площадь лимфоцита (мкм²); по оси ординат — частота встречаемости лимфоцитов с данной площадью (%)

различий показателей проводили с применением критериев Вилкоксона—Манна—Уитни и Стьюдента. Работа выполнена с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным.

Результаты исследования. Данные об относительном содержании и морфометрических параметрах лимфоцитов периферической крови песцов представлены в табл. 1, 2 и на рис. 1. Установлено, что лимфоцитарная популяция у вуалевых песцов состоит в основном из округлых и эллипсовидных клеток среднего размера, мелкие лимфоциты с широким ободком цитоплазмы и гранулами встречаются редко.

Большинство лимфоцитов имеют относительно гладкую поверхность (рис. 2, а) и только у некоторых наблюдаются едва видимые ворсинчатые образования (см. рис. 1, б) или различной величины выросты и сфероидные выпячивания (см. рис. 1, в–е). Лимфоциты с цитоплазматическими выпячиваниями приобретают пузырчатый вид с более отчетливо выраженной базофилией периферической части цитоплазмы.

Количество выростов и сфероидных образований колеблется от 1 до 6 на один лимфоцит, и они составляют в среднем от 0,73 до 8,95% от общей площади клетки. Размеры лимфоцитов с выростами и сфероидными образованиями, за незначительным исключением, больше, чем у относительно гладких форм. По величине параметров, характеризующих форму клеток, этот тип лимфоцитов близок к эллипсу, причем цитоплазматические выпячивания увеличивают неровность периметра. Фактор формы круга у них колеблется в среднем от 0,790 до 0,825 отн. ед., фактор формы эллипса — от 0,985 до 0,993 отн. ед.

Ядра лимфоцитов обычно округлые или овальные, иногда — с небольшой выемкой. Значительных различий формы и размера ядра в

зависимости от рельефа поверхности клетки не выявлено. Однако, как правило, за счет выростов изменяется ядерно-цитоплазматическое отношение в сторону увеличения площади цитоплазмы лимфоцитов и, соответственно, уменьшения доли площади, занимаемой ядром.

Дополнительный прием витамина А, как показал хроматографический анализ, вызывает существенное возрастание концентрации ретинола в сыворотке крови, при нагрузке витамином Е изменения в содержании токоферола отсутствуют. Добавка в рацион песцов больших доз витаминов А и Е приводит к изменению параметров лимфоцитов, но не влияет на их относительное содержание в периферической крови (см. табл. 2). Морфометрические параметры лимфоидных клеток и их ядер у всех подопытных животных в большинстве случаев меньше, чем в контроле. В крови песцов в содержании лимфоцитов со сфероидными образованиями значимых различий между исследованными группами не выявлено. Однако у животных, находящихся на рационе с добавкой витамина А, частота встречаемости их больше, и предел колебаний составляет от 0 до 12,5% (см. табл. 2). Возможно, это связано с повышением содержания ретинола в сыворотке крови. У животных из группы с витамином Е аналогичное изменение строения лимфоцитов наблюдается так же, как и у контрольных, в единичных случаях, а их количество колеблется от 0 до 1,5%. Лимфоциты у животных контрольной группы и содержащихся на рационах с витамином Е представлены преимущественно относительно гладкими формами, тогда как у получавших витамин А частота встречаемости клеток с выростами и сфероидными образованиями увеличена.

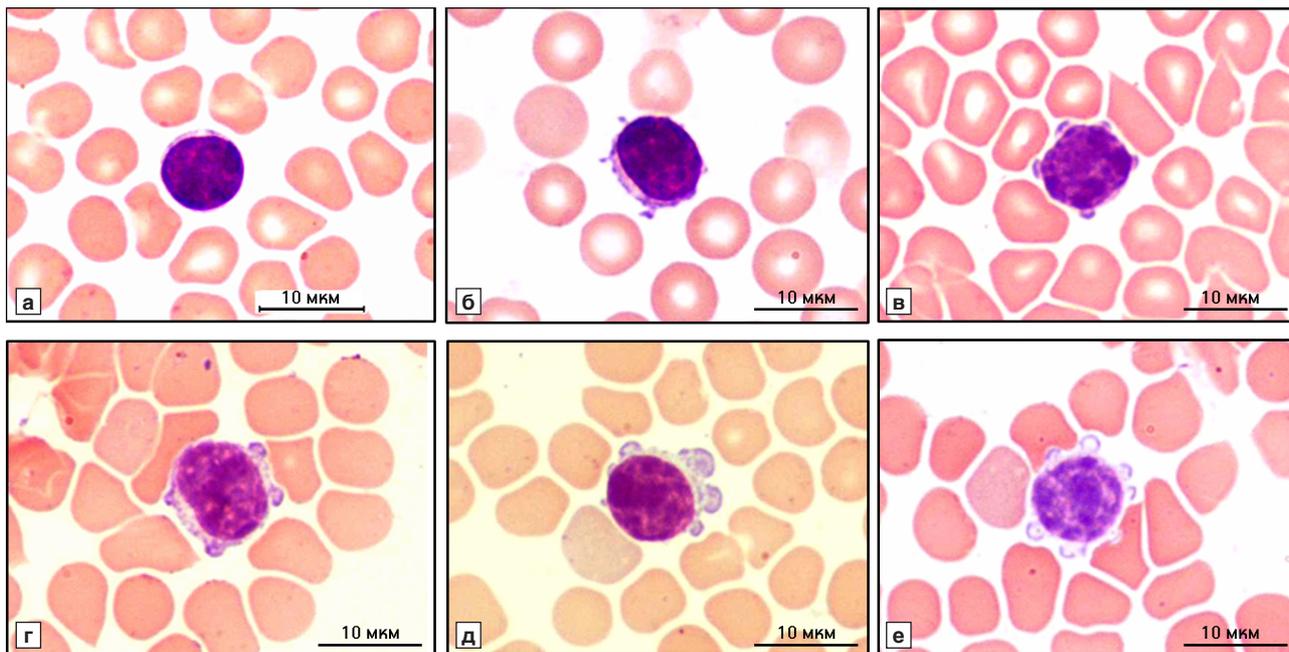


Рис. 2. Периферическая кровь вуалевого песца.

а — лимфоцит с относительно гладкой поверхностью; б — лимфоцит с тонкими нитевидными структурами на поверхности; в–е — лимфоциты с выростами и со сфероидными образованиями. Окраска по Паппенгейму

Обсуждение полученных данных. Известно, что лимфоциты имеют сферическую форму и различаются между собой по размерам и характеру клеточной поверхности. Параметры лимфоцитов у песцов, установленные нами на мазках крови, отличаются от таковых у других видов животных, что, по-видимому, обусловлено не только видовыми особенностями, но и, как показано в некоторых работах, способом фиксации и методами визуализации [1, 9, 11].

В настоящее время электронно-микроскопическими исследованиями выявлены полиморфизм клеточной поверхности форменных элементов крови, а также изменения ее при экспериментальных воздействиях и при различных физиологических состояниях организма и патологии [5, 7, 8]. В зависимости от микрорельефа поверхности, исследованном на электронно-микроскопическом уровне, лимфоциты подразделяют на несколько групп — относительно гладкие, с выростами (фибрилярными, ламеллярными, бульбарными) и углублениями [5, 7].

По результатам нашего исследования под световым микроскопом лимфоциты крови песцов в основном представлены относительно гладкими формами, реже — с цитоплазматическими выпячиваниями и в единичных случаях — с очень трудно различимыми нитевидными структурами. Согласно литературным данным, ворсинки не прокрашиваются и не видны на светооптическом уровне, но наблюдаются при исследовании

методами фазово-контрастной и атомно-силовой микроскопии [1, 2].

У песцов из общей популяции лимфоцитов по характеру рельефа выделяются клетки с одним или несколькими довольно большими цитоплазматическими выпячиваниями на поверхности. Исходя из морфологических признаков и по аналогии с электронно-микроскопическими исследованиями [5], мы отнесли их в группу лимфоцитов, содержащих выросты и сфероидные образования. Морфометрический анализ показал, что форма лимфоцитов со сложной конфигурацией поверхности в большей мере приближена к эллипсоидной, чем основного типа — относительно гладких. Цитоплазматические выросты, за некоторым исключением, приводят к увеличению размера лимфоцитов, что, возможно, отражает наличие запаса клеточного объема и возможности его регуляции [8, 9].

Плазмолемма является одной из наиболее чувствительных структур клетки и в значительной степени определяет её функциональную активность [5, 7]. Если в покое лимфоциты имеют относительно гладкую поверхность, то при активации и повреждении отмечено появление различных морфологических типов. Обнаружено, что архитектура лимфоцитов изменяется при патологии, причем при некоторых состояниях увеличивается количество клеток со сфероидными образованиями, что коррелирует с усилением Т-клеточного пролиферативного ответа [7].

Отсутствие влияния добавки в рацион песцов витаминов А и Е на общее количество лимфоцитов, возможно, связано преимущественно с регуляцией продукции и функций отдельных типов лейкоцитов. В частности, в некоторых экспериментах показано, что витамин А вызывает увеличение активности естественных киллеров и освобождение супероксид-аниона нейтрофилами, а витамин Е способствует редукции супероксид-аниона и ослаблению биоцидности лейкоцитов. Кроме того, выявлено, что действие витаминов зависит от ряда факторов, таких как состояние организма, наличие патологии, возраст, доза и продолжительность введения [15].

У животных, получавших витамины, смещение кривых распределения лимфоцитов по площади в сторону снижения отражает, по-видимому, изменение внутривидового соотношения лимфоцитов в крови. В некоторых работах отмечено стимулирующее влияние бета-каротина, являющегося предшественником витамина А, на рост тимуса и количество малых лимфоцитов [13]. Уменьшение площади и нарушение структуры плазмолеммы эритроцитов выявлено при экспериментальном гипервитаминозе А у самцов крыс линии Вистар [6].

Изменение строения лейкоцитов при действии ретиноидов было установлено в экспериментах с нейтрофилами человека. Обнаружено, что при их инкубации с транс-ретином и в меньшей степени с другими ретиноидами наблюдается образование многочисленных выростов клеточной поверхности и выделение супероксид-аниона [12].

Исходя из данных литературы, следует, что способность клетки сохранять определенную форму зависит от состояния и взаимодействия плазмолеммы и цитоскелета, изменения которых сопровождаются метаболическими и структурно-функциональными перестройками [3, 4]. Установлено, что формирование цитоплазматических очаговых вздутий, так называемый блеббинг, сопровождается апоптозом или некрозом [4]. В исследованных нами образцах крови песцов признаков апоптоза и отделения клеточных фрагментов в межклеточную среду, как правило, не наблюдалось.

Учитывая результаты наших исследований и имеющиеся данные литературы, можно предположить, что изменение рельефа клеточной поверхности лимфоцитов у животных, содержащихся на рационах с большими дозами витамина А, может быть связано с действием ретинола на плазмолемму. Проявлением мембранотропного действия является увеличение количества лизосомальных энзимов в сыворотке и лейкоцитах крови

кроликов после инъекций ретинола [14]. В наших экспериментах влияние витамина А на рельеф поверхности лимфоцитов обнаружено не у всех исследованных животных, что свидетельствует об индивидуальной чувствительности. Кроме индивидуальных, по-видимому, имеются и видовые различия, обусловленные особенностями метаболизма, соотношением про-, антиоксидантных и ряда других факторов, обеспечивающие адаптацию животных к среде обитания. В частности, имеются сведения о неодинаковой чувствительности к ретиноидам нейтрофилов у морской свинки и человека [12]. Реакция на добавки витаминов может определяться экологическими особенностями вида — дикого голубого песца, из которого была селекционирована вуалевая порода.

Таким образом, в периферической крови вуалевых песцов большинство лимфоцитов представлено относительно гладкими формами, и незначительное их количество имеют выросты и сферические образования. Большие дозы витаминов А и Е вызывают существенное снижение площади лимфоцитов с относительно гладкой поверхностью и их ядер. Частота встречаемости лимфоцитов с изменениями микрорельефа у животных, находящихся на рационах с добавлением витамина А, увеличивается по сравнению с таковой у контрольных и получавших витамин Е. Различия в строении и изменении параметров могут быть обусловлены влиянием больших доз витаминов А и Е на структурно-функциональное состояние мембран и зависеть от вида животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента НШ-1642.2012.4 и ФЦП ГК № 02.740.11.0700.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуцина Ю. Ю., Плескова С. Н. и Звонкова М. Б. Исследование различий морфологических параметров клеток крови человека методом сканирующей зондовой микроскопии. Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования, 2005, № 1, с. 48–53.
2. Демин С. Ю. Основные типы и жизненные формы периферических и ФГА-стимулированных лимфоцитов человека, выявляемые *in vitro*. Цитология, 2003, т. 45, № 6, с. 535–548.
3. Егорова А. Б., Успенская Ю. А., Михуткина С. В. и Ставицкая Е. Ю. Повреждение цитоскелета и клеточных мембран при апоптозе. Успехи соврем. биол., 2001, т. 121, № 5, с. 502–510.
4. Инжутова А. И., Салмина А. Б., Петрова М. М. и др. Регистрация блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови как экспресс-метод оценки тяжести состояния больных осложненными формами гипертонической болезни. Бюл. СО РАМН, 2007, т. 123, № 1, с. 6–10.
5. Козинец Г. И., Погорелов В. М., Шмаров Д. А. и др. Клетки крови — современные технологии их анализа. М., Триада фарм, 2002.

6. Минашкина Т. А. Морфологическая характеристика эритроцитов при экспериментальном гипервитаминозе А. *Морфология*, 2011, т. 139, вып. 2, с. 41–44.
7. Новицкий В. В., Наследникова И. О., Рязанцева Н. В. и др. Лимфоциты при хроническом вирусном гепатите С: поверхностная архитектура, микровязкость мембраны и функциональная активность. *Бюл. СО РАМН*, 2005, т. 117, № 3, с. 78–82.
8. Скоркина М. Ю., Федорова М. З. и Муравьев А. В. Цитоархитектоника лимфоцитов здоровых доноров в условиях активации и блокады β -адренорецепторов. *Ярославск. педагогическ. вестн.*, 2011, т. 3, № 3, с. 104–109.
9. Редчиц Е. Г. и Парфенов А. С. Реологические свойства лейкоцитов и их участие в микроциркуляции крови. *Гематол. и трансфузиол.*, 1989, т. 34, № 12, с. 40–45.
10. Утешев Д. Б., Сергеев А. В. и Утешев Б. С. Апоптоз: Фармакологические аспекты. *Эксперим. и клинич. фармакол.*, 1998, т. 61, № 4, с. 57–65.
11. 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, вып. 6, с. 1014–1018.
12. Badwey J. A., Robinson J. M., Curnutte J. T. et al. Retinoids stimulate the release of superoxide by neutrophils and change their morphology. *J. Cell. Physiol.*, 1986, v. 127, p. 223–228.
13. Chew B. P. and Park J. S. Carotenoid action on the immune response. *J. Nutr.*, 2004, v. 134, p. 257S–261S.
14. Schmidt M., Kolataj A., Bulla J. et al. Activity of some lysosomal enzymes in plasma and leucocytes of rabbits exposed to effect of retinol and hydrocortisone. *Horm. Metab. Res.*, 1992, v. 24, p. 21–25.
15. Webb A. L. and Villamor E. Update: effects of antioxidant and non-antioxidant vitamin supplementation on immune function. *Nutr. Rev.*, 2007, v. 65, № 5, p. 181–217.

Поступила в редакцию 16.03.2013

**MORPHOLOGICAL PECULIARITIES
OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES
IN ARCTIC FOXES AFTER ADMINISTRATION
OF VARIOUS DOSES OF VITAMINS A AND E**

*L. B. Uzenbayeva, I. V. Baishnikova, A. G. Kizhina,
T. N. Ilyina, V. A. Ilyukha and N. N. Tyutyunnik*

The aim of this work was to study the effect of various doses of vitamins A and E on the morphometric parameters and surface architectonics peculiarities of peripheral blood lymphocytes in veiled Arctic foxes. Using light microscopy, it was found that in the blood of veiled Arctic foxes (n=30) most of the lymphocytes had relatively smooth surface, and only in some cells cytoplasmic protrusions were observed. Large doses of vitamins A and E that were introduced into animal diet, caused significant reduction of morphometric parameters in relatively smooth forms of lymphocytes, while vitamin A changed the microrelief of their surface.

Key words: *lymphocyte, morphometric parameters, vitamin A, vitamin E*

Laboratory of Ecological Physiology of Animals, Institute of Biology Karelian RAS Research Center, Petrozavodsk; Department of Molecular Biology, Biological and Organic Chemistry, Petrozavodsk State University