

© Т.А. Минашкина, 2011  
УДК 611.018.52:611.391:599.323.4

*Т.А. Минашкина*

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГИПЕРВИТАМИНОЗЕ А

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — чл.-кор. РАМН проф. С.Л. Кузнецов),  
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, e-mail: tatyana\_80\_80@inbox.ru

Цель работы — проанализировать форму и морфоденситометрические параметры эритроцитов крыс при экспериментальном гипервитаминозе А. В течение 11 сут крысам-самцам линии Вистар ежедневно вводили per os 0,64 мг/г (1167 МЕ/г) ретинола пальмитата (РП) в масляном растворе. Контролем служили крысы, получавшие масляную основу, а также интактные животные. Первые признаки гипервитаминоза А (снижение массы тела, локальные эритемы и геморрагии) появились на 5–6-е сутки эксперимента. В сравнении с контрольными группами у крыс с гипервитаминозом А площадь эритроцитов снижалась по мере введения РП. Соотношение числа дискоцитов, сфероцитов и стоматоцитов также динамично менялось: прогрессивно снижалась доля дискоцитов и увеличивалось содержание сфероцитов и стоматоцитов. Эти результаты показывают, что при повышенном содержании витамина А структура мембраны эритроцитов нарушается. У крыс, получавших РП, а также масляную основу, интегральная оптическая плотность цитоплазмы эритроцитов была ниже, чем у интактных животных, что может являться косвенным признаком уменьшения содержания в ней гемоглобина. Обнаруженные изменения эритроцитов у крыс, получавших РП, могут служить дополнительным критерием оценки тяжести гипервитаминоза А.

**Ключевые слова:** эритроциты, микроцитоз, сфероцитоз, стоматоцитоз, гипервитаминоз А

Изменения, возникающие в организме человека и животных при гипервитаминозе А, изучены и описаны достаточно подробно [3, 4, 10]. В этих условиях отмечают нарушение эритропоэза [11], падение содержания гемоглобина в эритроцитах [4, 5], снижение их осмотической резистентности, гемолиз и анемию [4, 6, 12]. Данные о влиянии витамина А на строение эритроцитов немногочисленны и получены в эксперименте *in vitro* [8]. Цель настоящей работы — проанализировать форму и морфоденситометрические параметры эритроцитов периферической крови крыс в динамике развития экспериментально вызванного гипервитаминоза А.

**Материал и методы.** В работе использовали 30 крыс-самцов линии Вистар с исходной средней массой 120 г. В течение 11 сут 12 крысам (группа 1) вводили per os масляный раствор (500 000 МЕ/мл) ретинола пальмитата (РП) (ФНПП «Ретиноиды», Россия) в объемах, соответствующих дозе 0,64 мг/г (1167 МЕ/г). В результате животные этой группы получали ежедневно в среднем от 140 000 МЕ — в начале до 175 000 МЕ — в конце эксперимента. Контролем служили 12 крыс (группа 2), получавших per os масляную основу в тех же объемах, что и РП, а также 6 интактных крыс (группа 3). В течение эксперимента животные потребляли стандартный брикетированный корм и воду без ограничений. Кровь для приготовления мазков получали из вены хвоста, предварительно обработанного этанолом. Мазки высушивали на воздухе, фиксировали 10 мин в 96% этаноле, окрашивали по методу Лейшмана и заключали в полистирол. У каждого животного при об. 100 (иммерсия) и ок. 10 оценивали форму 200 эритроцитов и рассчитывали доли дискоцитов, диско-сфероцитов, сфероцитов, стоматоцитов и овалоцитов. Типы

эритроцитов дифференцировали визуально по характеру и степени выраженности более светлой центральной части цитоплазмы: в дискосфероцитах эта часть занимает не более трети общей площади клетки, в сфероцитах она отсутствует, в стоматоцитах — имеет неправильную форму. К овалоцитам относили эритроциты эллиптической формы (рис. 1). Площадь (площадь проекции на плоскость), фактор формы круга и интегральную оптическую плотность измеряли в эритроцитах-дискоцитах (не менее 30 в мазке), используя методику компьютерной морфоденситометрии [1], реализованную в автоматизированной системе анализа изображений DiaMorph (ЗАО «ДиаМорф», Россия). Измерения проводили на оцифрованных полутоновых изображениях клеток. При статистической обработке результатов измерений вычисляли среднее арифметическое значение параметров, его стандартное отклонение и ошибку.

**Результаты исследования.** Введение РП в указанной дозе привело к возникновению у крыс признаков гипервитаминоза А. Так, на 5-е сутки наблюдения зафиксированы снижение двигательной активности и начало падения массы тела по сравнению с таковыми в контрольных группах. С 6-х суток эксперимента у части крыс (16,7%) появлялись эритематозные изменения и геморрагии на конъюнктиве век, позже геморрагии наблюдались также на коже вокруг носа. К 8-м суткам эти симптомы гипервитаминоза А были характерны для 58,3% животных, а на 10-е сутки — для всех крыс, получавших РП. С 7-х суток у экспериментальных животных отмечено размягчение и ослизнение кала с возникновением в последующем диареи. Эти симптомы были

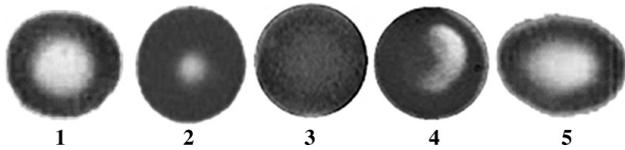


Рис.1. Типы эритроцитов, выявляемых в мазках крови крыс на светооптическом уровне.

1 — дискоцит; 2 — дискосфероцит; 3 — сфероцит; 4 — стоматоцит; 5 — овалоцит. Окраска по Лейшману. Об. 100, ок. 10.

характерны на 8-е сутки для 41,7%, а на 11-е сутки — для 91,7% крыс. На 8-е сутки в 33,3%, а к концу эксперимента в 100% случаев наблюдалась хромающая походка, свидетельствующая о развитии костно-суставных изменений.

До начала введения РП в крови животных преобладали дискоциты — 65,7% и дискосфероциты — 25,2%. Доли атипичных форм эритроцитов были минимальны: сфероцитов — 3,1%, стоматоцитов — 4,0 % и овалоцитов — 2,0%. В первые сутки эксперимента существенных изменений в соотношении эритроцитов разных типов у крыс 1-й группы по сравнению с животными контрольных групп не наблюдалось. Начиная с 4–5-х суток, т.е. с момента появления первых признаков гипервитаминоза А, и до конца эксперимента доля дискоцитов у крыс 1-й группы прогрессивно снижалась, а доля сфероцитов — увеличивалась (таблица). Между 8-ми и 11-ми сутками наблюдения имело место также увеличение доли стоматоцитов. Количество овалоцитов на протяжении

эксперимента мало отличалось от показателей в контрольных группах. У крыс 2-й группы отклонения от значений, характерных для интактных животных, были незначительными.

Морфоденситометрический анализ, проведенный перед началом введения РП, показал, что площадь дискоцитов у крыс характеризовалась индивидуальной изменчивостью. Коэффициент вариабельности этого параметра у большинства животных находился в пределах 15%, а у некоторых крыс — превышал 20%. Подобная вариабельность сохранялась как у экспериментальных животных, так и у крыс контрольных групп. Вместе с тем, у крыс, получавших РП, имела место очевидная тенденция к снижению площади дискоцитов. Статистически значимые отличия данного морфометрического параметра от показателей у животных 3-й группы появились на 8-е сутки, а от показателей у крыс 2-й группы — на 9-е сутки эксперимента (рис. 2). Значения фактора формы дискоцитов у крыс всех групп варьировали на протяжении эксперимента от 0,92 до 0,93. Значимые различия величин данного параметра у крыс трех исследованных групп отсутствовали.

По сравнению с интактными животными у крыс 1-й группы имело место снижение интегральной оптической плотности цитоплазмы дискоцитов. Статистически значимые различия параметра были выявлены раньше (с 6-х суток эксперимента), чем отмеченные выше изменения площади эритроцитов. Следует указать, что у животных 2-й группы изменения интегральной оптической

Относительное содержание (%) эритроцитов разных типов у крыс экспериментальной (1-й) и контрольных (2-, 3-й) групп

Типы эритроцитов	Группы животных	Сроки эксперимента (сутки)					
		2-е	3-и	4-е	5-е	8-е	11-е
Дискоциты	1-я	60,8	60,3	57,3	49,7	44,8	36,2
	2-я	65,4	62,4	63,7	57,4	58,9	61,1
	3-я	62,9	68,5	68,2	63,5	61,1	65,3
Дискосфероциты	1-я	25,3	25,9	29,3	30,6	34,3	29,3
	2-я	22,8	28,3	25,9	31,5	31,3	28,9
	3-я	27,2	21,8	21,3	27,1	28,6	26,8
Сфероциты	1-я	3,4	3,7	7,3	12,9	11,1	18,8
	2-я	3,8	3,5	3,0	3,9	2,5	5,8
	3-я	2,7	1,8	4,4	5,0	5,8	2,6
Стоматоциты	1-я	7,7	6,8	3,6	3,9	7,5	11,3
	2-я	5,3	3,3	5,3	4,6	4,3	2,7
	3-я	6,0	5,5	4,8	1,8	2,4	2,7
Овалоциты	1-я	2,8	3,3	2,7	2,9	2,3	4,4
	2-я	2,7	2,6	2,1	2,6	3,0	1,5
	3-я	1,3	2,5	1,3	2,7	2,2	2,7

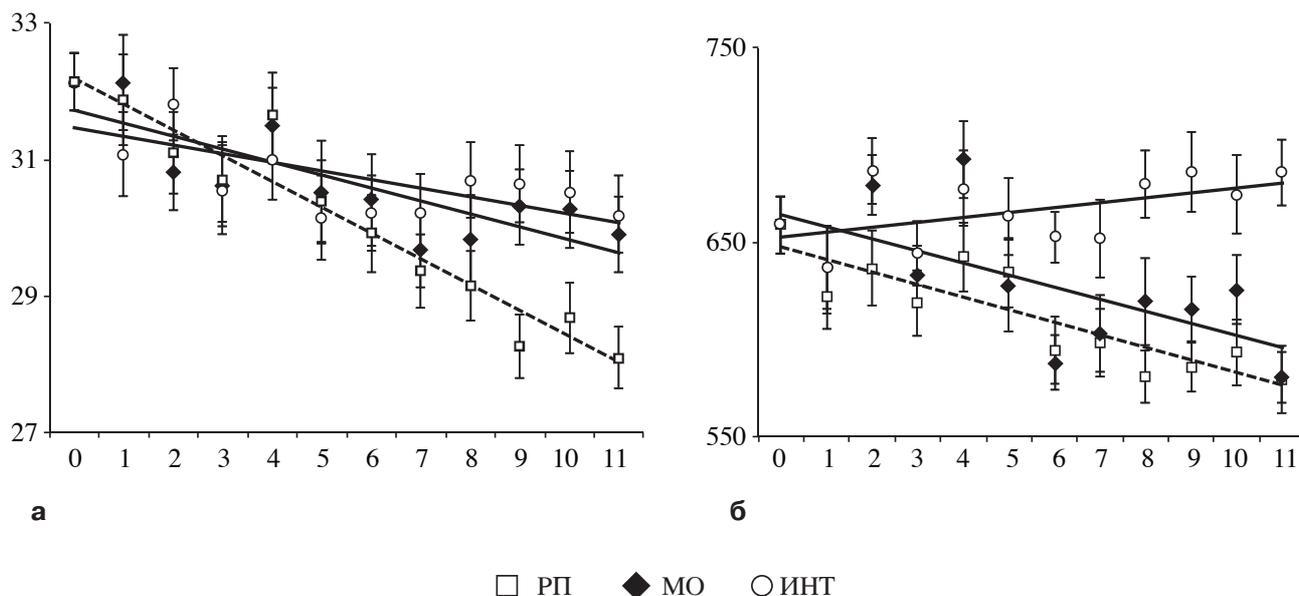


Рис. 2. Динамика изменений площади (а) и интегральной оптической плотности (б) дискоцитов крыс 1-й группы, получавших масляный раствор ретинола пальмитата (РП), 2-й группы, получавших масляную основу (МО) и 3-й группы — интактных (ИНТ).

По оси абсцисс — сроки наблюдения (сут); по оси ординат — исследованные показатели: а — площадь ( $\mu\text{м}^2$ ); б — усл. ед. Вертикальные отрезки соответствуют 2 ошибкам среднего арифметического. Пунктир — линия регрессии для 1-й группы.

плотности были аналогичными по направленности и срокам возникновения (см. рис. 2).

**Обсуждение полученных данных.** Проявления острой и хронической токсичности витамина А зависят от дозы, длительности употребления, способа введения, возраста, вида животных [2–4, 10]. У крыс, ежедневно получавших РП в дозе 0,64 мг/г, характерные признаки гипервитаминоза А возникли уже в 1-ю неделю эксперимента. Столь быстрое развитие гипервитаминоза объясняется использованием в работе молодых, растущих животных. Показано, что при приеме ретинола в повышенных дозах гипервитаминоз у детей, а также у молодых животных, возникает, как правило, раньше, чем у взрослых [2, 3, 10, 11].

Наряду с внешними проявлениями токсического действия, избыток РП вызвал у экспериментальных животных изменения формы и площади эритроцитов, совокупность которых свидетельствует о развитии микроцитоза, сфероцитоза и стоматоцитоза. Способность эритроцитов к изменению размера и формы определяется состоянием их плазмолеммы. Нарушение структуры, состава белков цитоскелета и липопротеинового комплекса мембраны обуславливает появление атипичных форм эритроцитов [7, 9]. Можно полагать, что выявленные в работе морфологические перестройки эритроцитов связаны с повреждаю-

щим действием РП на их плазмолемму, что соответствует представлениям о мембранотропных эффектах витамина А [2, 4, 8].

Интегральная оптическая плотность рассчитывается как сумма значений пикселей в пределах площади объекта. Измерение данного денситометрического показателя в эритроцитах используется для косвенной оценки концентрации гемоглобина в их цитоплазме [1]. Снижение данного параметра при введении РП согласуется с указанием на низкое содержание гемоглобина при гипервитаминозе А [4, 5]. Вместе с тем, факт уменьшения интегральной оптической плотности цитоплазмы у крыс не только 1-й, но и 2-й группы является основанием для дополнительного изучения зависимости содержания гемоглобина в эритроцитах от действия РП и/или масляной основы, в которой он растворен.

Таким образом, ежедневное пероральное введение РП в дозе 0,64 мг/г вызывает у крыс микроцитоз и увеличение числа атипичных форм эритроцитов — сфероцитов и стоматоцитов. Представляется, что соотношение различных форм эритроцитов в периферической крови, а также динамика изменений морфоденситометрических параметров дискоцитов могут служить одним из критериев оценки тяжести гипервитаминоза А.

*Работа выполнена при финансовой поддержке ЗАО ФНПП «Ретиноиды».*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Жукоцкий А.В. Телевизионная компьютерная морфоденситометрия нормальных и патологических структур клеток и тканей: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1992.
2. Коколина В.Ф., Картелищев А.В., Альбанова В.И и др. Технологии системной ретинолотерапии в педиатрической практике (методические рекомендации № 10). М., изд. ЗАО «Ретиноиды», 2007.
3. Alarcyn-Corredor O.M. La hipervitaminosis A: una enfermedad multisistémica. Rev. Fac. Farmacia, 2006, v. 48, № 2, p. 13–20.
4. Hathcock J.N., Hattan D.G., Jenkins M.Y. et al. Evaluation of vitamin A toxicity. Am. J. Clin. Nutr., 1990, v. 52, № 2, p. 183–202.
5. Karar P.K., Manavalan R. and Rajagopal G. Erythrocyte, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in hypervitaminotic A rats and their modification by dietary protein. Indian J. Exp. Biol., 2002, v. 40, № 11, p. 1250–1253.
6. Kartha V.N. and Krishnamurthy S. Effect of hypervitaminosis A on hemolysis and lipid peroxidation in the rat. J. Lipid Res., 1978, v. 19, № 3, p. 332–334.
7. Mohandas N. and Gallagher P.G. Red cell membrane: past, present, and future. Blood, 2008, v. 112, № 10, p. 3939–3948.
8. Murphy M.J., Jr. Effects of vitamin A on the erythrocyte membrane surface. Blood, 1973, v. 41, № 6, p. 893–899.
9. Park Y.K., Best C.A., Badizadegan K. et al. Measurement of red blood cell mechanics during morphological changes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010, v. 107, № 15, p. 6731–6736.
10. Penniston K.L. and Tanumihardjo Sh.A. The acute and chronic toxic effects of vitamin A. Am. J. Clin. Nutr., 2006, v. 83, № 2, p. 191–201.
11. Perrotta S., Nobili B., Rossi F. et al. Infant hypervitaminosis A causes severe anemia and thrombocytopenia: evidence of a retinol-dependent bone marrow cell growth inhibition. Blood, 2002, v. 99, № 6, p. 2017–2022.
12. Schindler R., Gorny C. and Feldheim W. Serum lipoproteins protect isolated erythrocytes against retinol-induced haemolysis. Int. J. Vitam. Nutr. Res., 1985, v. 55, № 3, p. 253–262.

Поступила в редакцию 18.02.11  
Получена после доработки 15.03.11

## MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC OF ERYTHROCYTES IN EXPERIMENTAL HYPERVITAMINOSIS A

*T.A. Minashkina*

This investigation was aimed at the analysis of the shape and morpho-densitometric parameters of the erythrocytes in rats with experimental hypervitaminosis A. Male Wistar rats received 0.64 mg/g (1167 IU/g) of retinol palmitate (RP) in oil solution orally for 11 consecutive days. Rats fed oil alone and intact animals were used as control groups. At days 5 and 6 of the experiment, the first manifestations of hypervitaminosis A were observed (body mass loss, localized erythema and hemorrhages). In contrast to control groups, in rats with hypervitaminosis A, the area of erythrocyte cytoplasm decreased gradually in response to RP administration. Discocyte/spherocyte/stomatocyte ratio also changed dynamically: the proportion of discocytes progressively decreased, while the amount of spherocytes and stomatocytes increased. These results show that excess of the vitamin A alters the erythrocyte membrane structure. Integral optical density of erythrocyte cytoplasm in RP-treated rats as well as in oil-fed rats was lower than in intact animals. This may be an indirect evidence of the fall in erythrocyte hemoglobin content. The changes observed in erythrocytes of RP-treated rats may serve as an additional criterion for evaluation of hypervitaminosis A severity.

**Key words:** *erythrocytes, microcytosis, spherocytosis, stomatocytosis, hypervitaminosis A*

Department of Histology, Cytology and Embryology, I.M. Sechenov 1<sup>st</sup> Moscow State Medical University