

**Автономная некоммерческая общеобразовательная
организация «Физтех-лицей»
(АНОО «Физтех-лицей» им. П.Л.Капицы)**

XX научно-практическая конференция

«Старт в инновации»

**Регуляция объёма эритроцитов
Syrrinus carpio в условиях гипотонии *in vitro***

Выполнили:
Дубровская Дарья, 8Б класс
Кобылкина Валерия, 8Б класс
Руководитель:
Головко Сергей Иванович

Московская область, г.Долгопрудный

2021 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1. Строение и функции эритроцитов карпа.....	5
1.2. Ионные механизмы регуляции объема эритроцитов.....	7
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ.....	9
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	10
3.1. Опыт 1. Разбавление крови на 10%	10
3.2. Опыт 2. Разбавление крови на 20%	12
ВЫВОДЫ.....	14
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	15

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Относительное постоянство объёма и формы клеток является необходимым условием осуществления ими своих функций.

Эритроциты позвоночных являются удобным объектом для изучения механизмов волюморегуляции, т.к. их легко получать в виде однородных суспензий [1]

Эритроциты должны иметь оптимальное соотношение линейных размеров, а также площади поверхности и объёма для наиболее эффективного газообмена при осуществлении дыхательной функции и в связи с гемодинамикой. Так, оптимальная ширина эритроцитов позвоночных в среднем на 25% больше, чем диаметр капилляров; ширина ядра эритроцитов составляет ~80% от величины диаметра капилляров [7]. Однако в норме эритроциты подвергаются деформации при прохождении через микроциркуляторное русло.

В настоящее время в связи с потребностями медицины достаточно хорошо изучены механизмы стабилизации объёма эритроцитов человека. Осморегуляторные реакции изучались у различных позвоночных животных, в том числе рыб [5]. Известно, что главная роль в них принадлежит механизмам активного и пассивного транспорта ионов (в основном натрия и калия) через плазматическую мембрану. Однако, вызывает большой интерес изучение динамики и построение математических моделей этих процессов [8, 9].

Объект исследования – эритроциты карпа (*Cyprinus carpio*).

Предмет исследования – процесс регуляции объёма эритроцитов карпа (*Cyprinus carpio*).

Настоящее исследование относится к области физиологии эритрона (красной крови). Его **целью** является изучение изменения размеров эритроцитов карпа (*Cyprinus carpio*) в условиях гипотонии *in vitro*.

Для достижения данной цели было необходимо решить следующие **задачи**:

- 1) обобщить данные научной литературы о строении и функциях эритроцитов карпа, а также методах их исследования;
- 2) разработать методику исследования динамики размеров эритроцитов в условиях гипотонической нагрузки;
- 3) выявить зависимость изменения размеров эритроцитов от времени и силы гипотонического воздействия.

Гипотезой настоящего исследования является предположение о нелинейной зависимости изменения объёма эритроцита от времени гипоосмотического воздействия и

его силы. Установление характера этой зависимости позволит в дальнейшем подойти к разработке математической модели, описывающей стабилизацию объёма эритроцита карпа в гипоосмотических условиях, и к изучению его ионного гомеостаза с учётом имеющихся на настоящий момент данных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Строение и функции эритроцитов карпа

Морфология. В плоскости эритроциты костистых рыб обычно имеют овальную или дискообразную форму с компактным ядром [2]. В пространстве форма описывается как эллипсоидальная. Однако, из-за наличия ядерной выпуклости в центре и периферического кольцевидного утолщения она будет более сложной [4]. На рис. 1.1 представлено изображение эритроцитов *Surgunus carpio*, полученное с помощью зондового атомно-силового микроскопа.

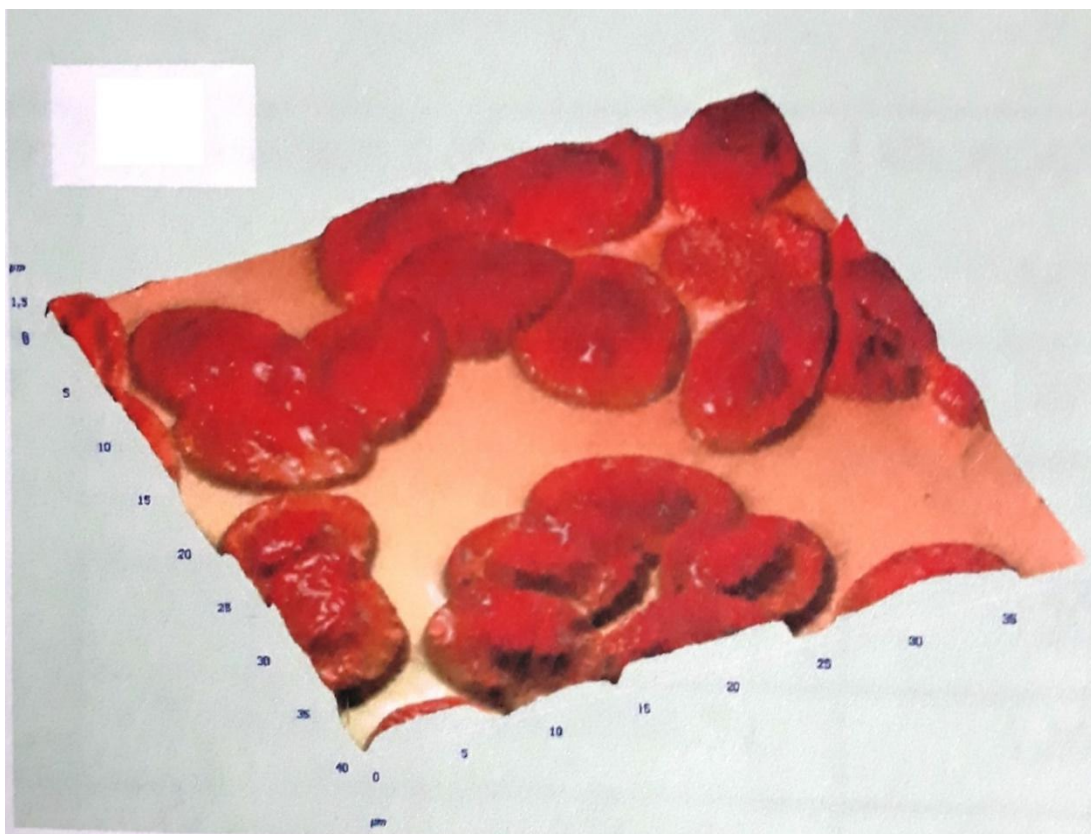


Рис. 1.1. Эритроциты карпа.

Средний размер (большая ось эллипсоида) эритроцитов костистых рыб 8-15 мкм [2]. Толщина в периферической части составляет ~ 1 мкм [4].

Эритроциты карпа достаточно крупные. Их размеры (большая ось × средняя ось) могут варьировать от 12,5 × 8,6 мкм до 13,4 × 10,2 мкм [3, 4].

Цитоскелет. Поддержание соответствующей формы эритроцитов обеспечивается цитоскелетом. Считается, что преимущества конструкции цитоскелета и эллипсоидального профиля клетки заключаются в улучшении текучести при циркуляции, а также в сопротивлении деформации.

Он состоит в основном из маргинальной полосы (МВ) микротрубочек и мембранного скелета (цитоскелета, связанного с клеточной поверхностью, SAC) (рис. 1.2) [6].

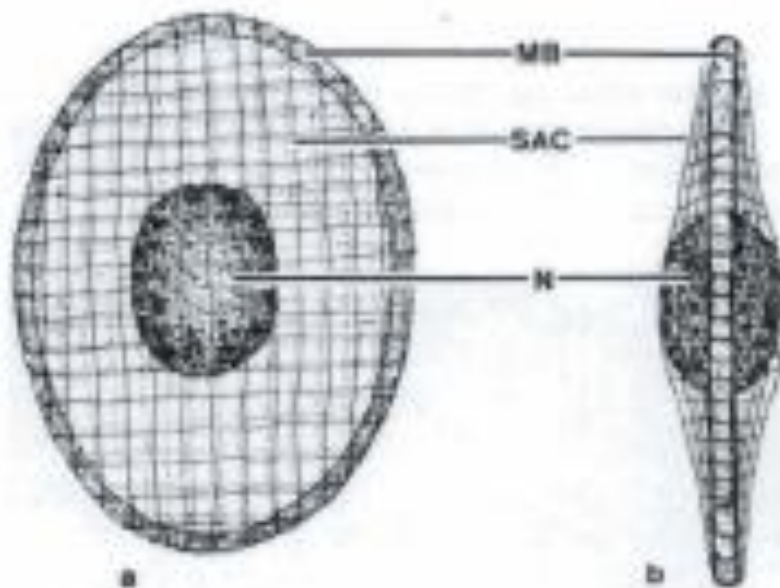


Рис. 1.2. Модель эритроцита с элементами цитоскелета.

Маргинальная полоса представляет собой пучок непрерывных субплазмалеммальных микротрубочек, которые окружают клетку, как пояс, в плоскости, параллельной плоской поверхности клетки. Мембранный скелет, в свою очередь, представляет собой нерегулярную сеть промежуточных филаментов (главные компоненты актин и спектрин), которые полностью охватывают ядро и маргинальную полосу.

Система маргинальных полос (marginal band system) – микротрубочки. Эта система (в совокупности с другими элементами цитоскелета) определяет форму эритроцитов и препятствует деформации при прохождении через капилляры.

Спектрин, актин и другие белки образуют сложный мембранный скелет, взаимодействуя с гемоглобином, белками мембранного транспорта и тубулином маргинальных полос.

Органоиды. Имеются основные органоиды: митохондрии, аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум, центриоли и др.

Метаболизм. Метаболизм эритроцитов генерирует энергию для поддержания формы клеток и транспорта веществ через клеточную мембрану. Натриевый насос и процессы фосфорилирования потребляют около 50% всей энергии. Эритроциты рыб метаболически более активны, чем эритроциты млекопитающих, и, подобно незрелым эритроцитам или ретикулоцитам млекопитающих, потребляют кислород путем дыхания. Гликолиз ограничен из-за низкой проницаемости для глюкозы.

Транспорт ионов через плазмалемму. Мембрана эритроцитов содержит транспортные белки как для анионов, так и для катионов. Na^+/K^+ -насос активируется ионами Mg^{2+} и Ca^{2+} , но не ионами Na^+ и K^+ . Он в 50-100 раз активнее, чем у млекопитающих.

Фермент карбоангидраза облегчает анионный обмен через мембрану эритроцитов. Однако у рыб анионная проницаемость эритроцитов различна. У некоторых костистых особей (каarp, *Cyprinus carpio*; судак, *Tizotiedion luciopecta*) анионный обмен эритроцитов происходит медленно.

1.2. Ионные механизмы регуляции объёма эритроцитов

Красные кровяные клетки (эритроциты) рыб обладают способностью к регуляции объёма при изменении осмолярности плазмы крови. В гипотонической среде (концентрация веществ ниже, чем в плазме крови) происходит их набухание. Но при этом с течением времени происходит регуляторное уменьшение объёма (RVD) за счёт оттока осмолитов из клеток (рис.1.3). Это сопровождается осмотически обязательной потерей воды, которая восстанавливает объём клеток к исходному значению.

Предыдущие исследования регулирования объема в эритроцитах рыб проводились по эвригалинным видам. У стеногалинных пресноводных видов, например, карпа, мало изучены степени регуляции объема клеток в ответ на осмотический стресс [1].

Регуляторное уменьшение (RVD) или увеличение объёма (RVI) клеток происходит в течение нескольких минут и более (для эритроцитов форели ~40 мин) [5].

При RVD происходит увеличение проницаемости для K^+ , Cl^- и органического осмолита таурина, которые, выходя из клетки, препятствуют поступлению в неё воды и обеспечивают удаление её избытка. При RVI происходит увеличение проницаемости для Na^+ , который поступает в клетку, обеспечивая поступление в неё воды.

При RVD ведущую роль играют K^+/Cl^- -котранспортёр и Cl^- - независимый переносчик K^+ , а также переносчик таурина. У карпа преобладают первый и третий механизмы [5].

При RVI механизмы значительно могут различаться у разных видов животных.

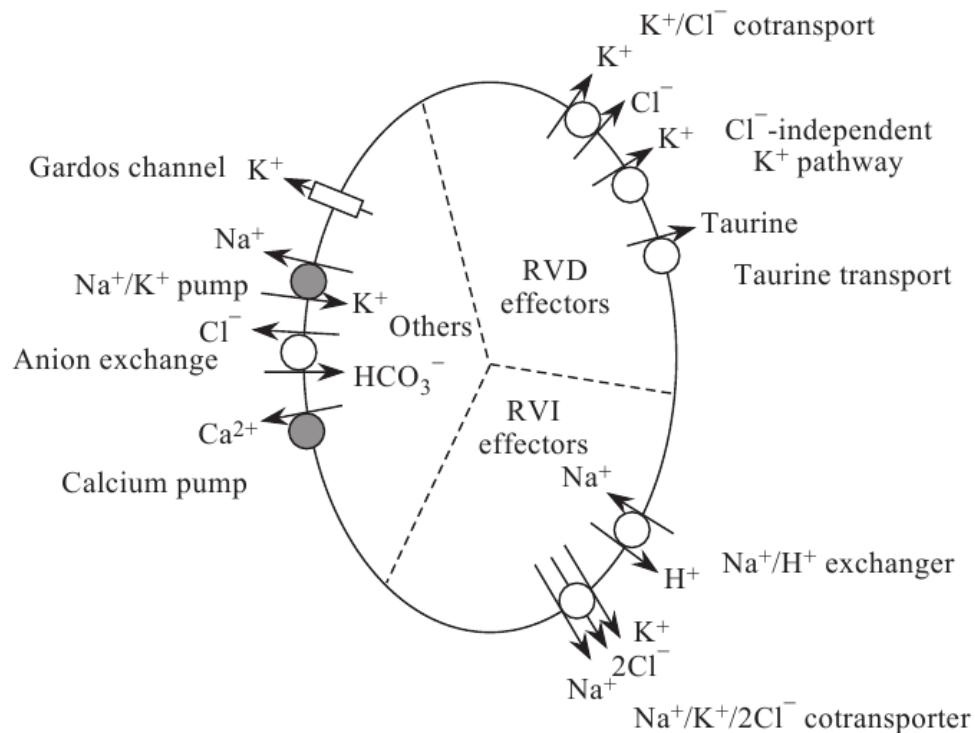


Рис. 1.3. Многообразие механизмов, обеспечивающих регуляцию объёма клеток.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования использовалась кровь карпа (*Cyprinus carpio*). Забор крови производили из хвостовой вены. С целью предотвращения свёртывания крови использовали антикоагулянт – гепарин (5000 ед). Для взятия крови использовали шприц объёмом 5 мл с инъекционной иглой.

Основной эксперимент заключался в проведении серии опытов по разбавлению крови дистиллированной водой. При этом достигалось понижение осмотического давления плазмы крови (на 10 и 20) и создание для эритроцитов гипоосмотической нагрузки. Кровь инкубировали в том же шприце, которым делали её забор. После разбавления крови с периодичностью 1 мин в течение 10 мин, а также дополнительно через 15, 30, готовили мазки крови, которые фиксировали и окрашивали. Фиксацию производили реагентом «Фиксатор цитологический» на основе изопропилового спирта. В качестве красителя использовали азур-эозин (по Романовскому).

На микрофотографиях, полученных с помощью окулярной камеры, производили измерения линейных размеров эритроцитов (большая и малая оси эллипсоида, или длина и ширина) (рис. 1.4). Для этого использовалась компьютерная программа ImageJ 1.44р. Для исследования не были важны абсолютные значения клеток. Поэтому единицей измерения был один пиксель. На основе этих данных осуществляли строили графики изменения размеров клеток от времени инкубации. На графики в MS Excel накладывали линии тренда для сглаживания данных и выявления характера зависимости.

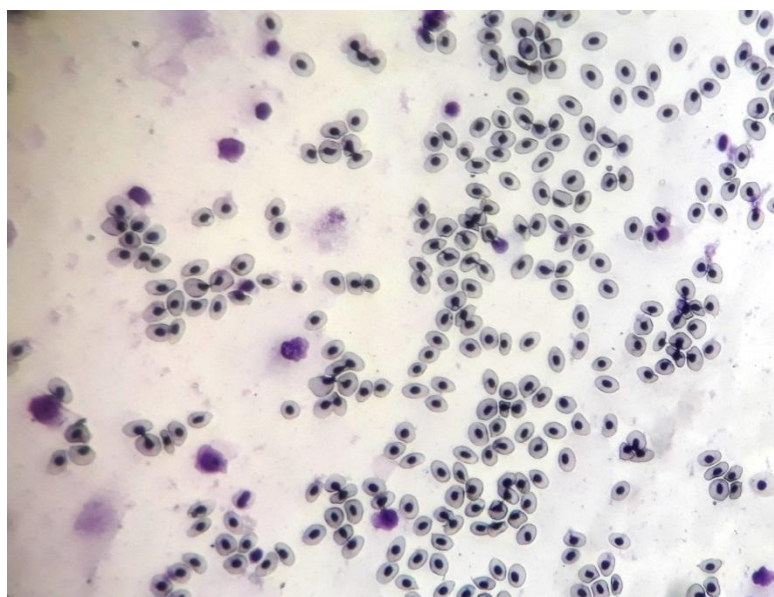


Рис. 1.4. Микрофотография мазка крови карпа ($\times 400$).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Опыт 1. Разбавление крови на 10%

При разбавлении крови на 10% наблюдали следующие изменения размеров эритроцитов (таблица 1). В течение первой минуты произошло увеличение размеров эритроцитов. В течение последующего времени размеры клеток стали уменьшаться. Но с 7-ой минуты произошло увеличение длины (L) эритроцитов, при том, что их ширина (H) продолжила уменьшаться.

Таблица 3.1.
Изменение размеров эритроцитов при разбавлении крови на 10%

	t	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	30
L	M	16,4 8	14,0 3	15,0 7	15,1 2	14,5 7	13,74 1	16,38 2	16,1 2	15,7 4	15,1 3	16,6 3	14,2 9
	Δ	0,54	0,82	0,93	0,61	0,80	0,79	0,54	0,89	0,67	0,69	0,71	0,63
H	M	11,5 7	9,35	11,6 8	9,71	10,5 5	10,20	11,11	12,5 2	10,4 9	10,1 1	11,4 1	8,77
	Δ	0,44	0,43	0,53	0,46	0,48	0,74	0,67	0,77	0,62	0,61	0,50	0,36

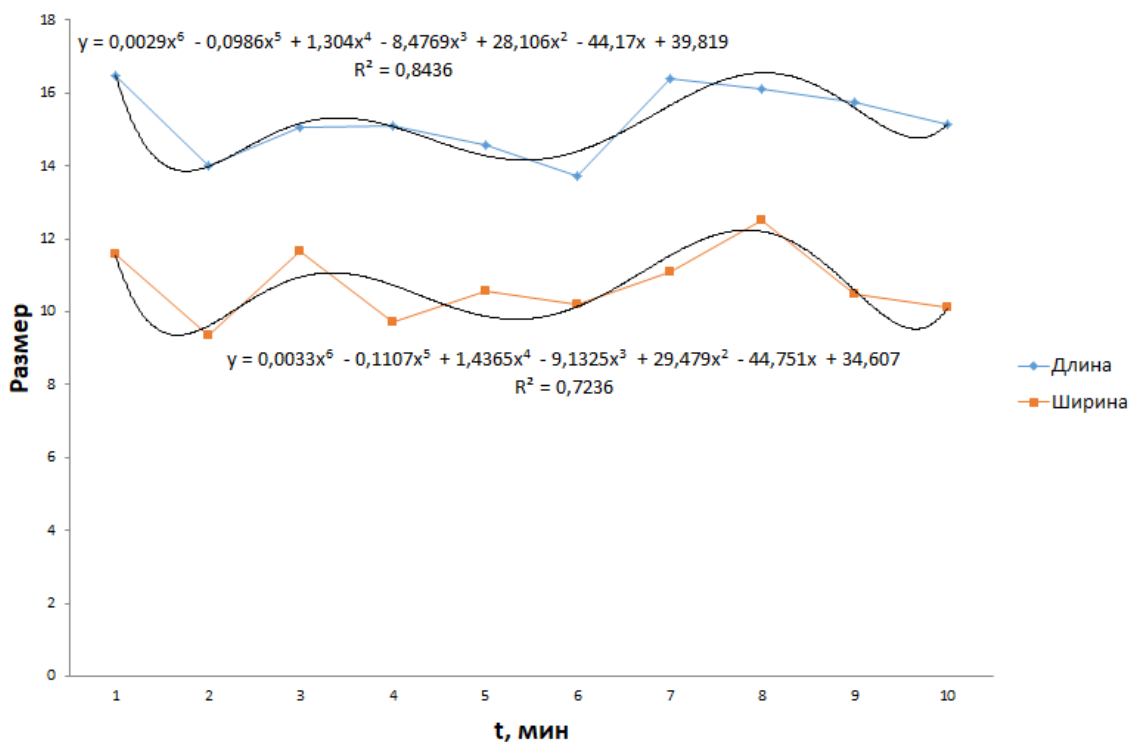


Рис. 3.1. Зависимость размеров эритроцитов от времени гипотонической нагрузки.

Однако, если построить по исходным данным график зависимости размеров эритроцитов от времени воздействия гипотонических условий, то получится несколько иная картина (рис. 3.1): возможно изменения размеров эритроцитов должны носить колебательный характер при сохранении некоторой средней величины.

Первый опыт был продублирован. Его результаты представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2.
Изменение размеров эритроцитов при разбавлении крови на 10% (повторный опыт)

	t	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	30
L	M	11,74	16,92	12,79	15,59	15,44	16,74	14,55	16,04	15,62	12,76	-	-
	Δ	0,94	0,82	0,57	0,79	0,68	0,93	0,86	0,89	0,65	0,59	-	-
H	M	7,79	11,53	8,55	11,46	11,09	11,11	9,92	11,38	10,99	8,85	-	-
	Δ	0,51	0,61	0,37	0,88	0,55	0,53	0,55	0,63	0,65	0,47	-	-

В повторном опыте также с помощью математической обработки удаётся распознать колебания размеров эритроцитов около некоторого среднего значения (рис. 3.2).

По всей видимости, это связано с периодическим характером работы волюморегуляторного механизма. В изученной литературе с подобным явлением не сталкивались. Данный вопрос подлежит дальнейшему изучению.

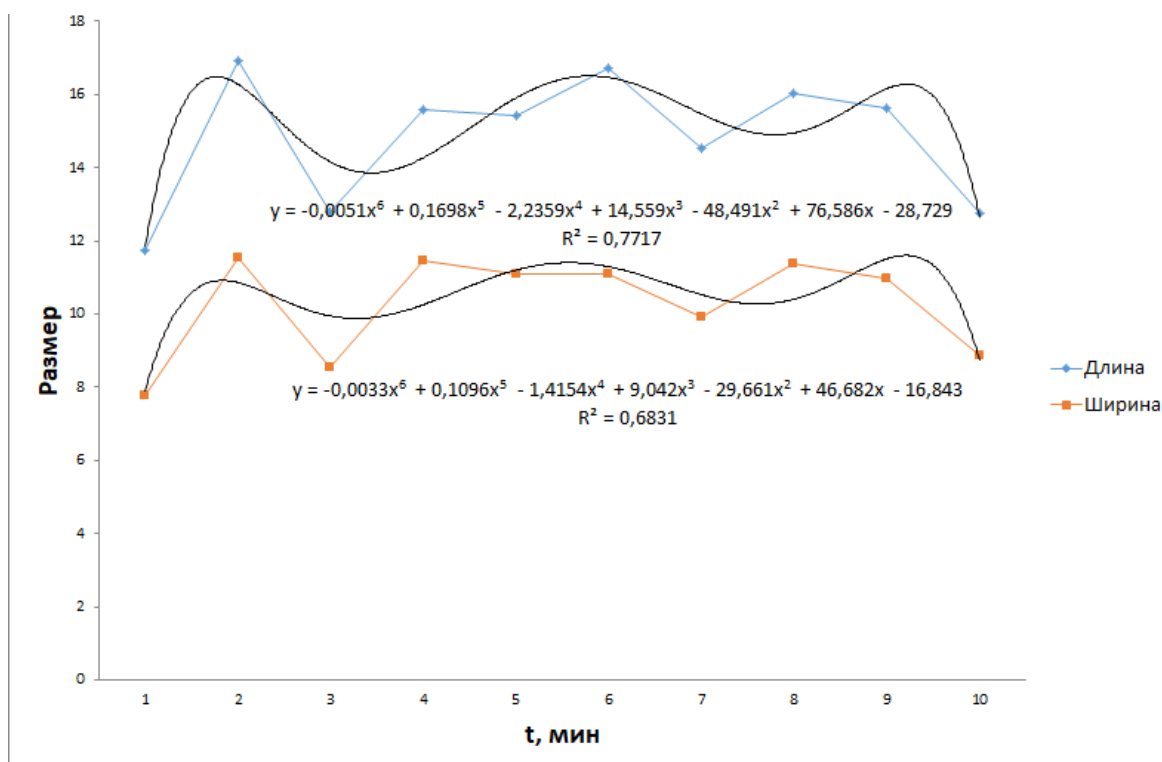


Рис. 3.2. Зависимость размеров эритроцитов от времени гипотонической нагрузки.

3.2. Опыт 2. Разбавление крови на 20%

При разбавлении крови на 20% наблюдали следующие изменения размеров эритроцитов (таблица 3.3). С первой минуты произошло увеличение размеров эритроцитов. В течение последующего времени размеры клеток продолжили увеличиваться. Но с 10-ой минуты произошло резкое уменьшение как длины (L) эритроцитов, так и их ширины (H).

Таким образом, в отличие от первого опыта, более сильная гипоосмотическая нагрузка привела к значительному увеличению размеров клеток: примерно в три раза. При этом клетки не разрушились. Данный опыт не был продублирован, что необходимо сделать для убедительности полученного факта.

Таблица 3.3.
Изменение размеров эритроцитов при разбавлении крови на 20%

	t	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	30
L	M	10,18	12,80	11,82	16,47	15,96	15,64	22,52	20,53	32,38	22,26	21,96	21,89
	Δ	0,81	0,65	0,48	0,87	0,65	0,99	1,33	0,54	1,37	1,17	0,91	0,68
H	M	6,35	7,98	7,83	12,41	12,60	12,20	17,46	15,75	20,80	15,55	15,69	16,51

	Δ	0,47	0,53	0,42	0,71	0,57	0,70	0,74	0,46	1,19	0,90	0,90	0,87
--	----------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

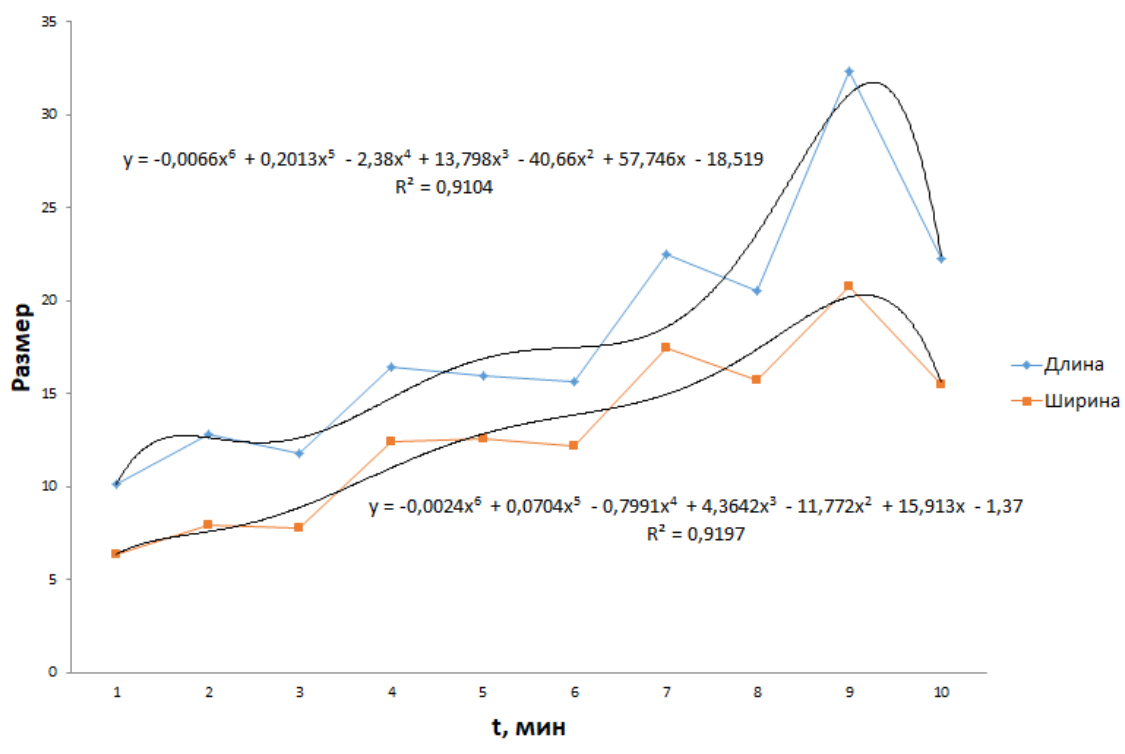


Рис. 3.3. Зависимость размеров эритроцитов от времени гипотонической нагрузки.

Если построить по исходным данным график зависимости размеров эритроцитов от времени воздействия гипотонических условий, то получится обнаружится следующее (рис. 3.3): предположительно, что увеличение размера клеток происходит не линейно, а имеет более сложную зависимость, колебательного характера, как и в первом опыте.

ВЫВОДЫ

1. В ходе работы изучили данные научной литературы о строении и функциях эритроцитов карпа. Это ядерные клетки плоскоэллипсоидной формы. Их форма поддерживается благодаря элементам цитоскелета, расположенным под плазмалеммой. Эритроциты имеют мембранные транспортёры, обеспечивающие ионный гомеостаз и регуляцию объёма при изменении осмолярности внутренней среды.

2. Особенности методики исследования динамики размеров эритроцитов в условиях гипотонической нагрузки были следующими. Во-первых, понижение осмотического давления крови достигалось её разбавлением дистиллированной водой в шприце, которым производился её забор у животного. Во-вторых, на основе полученных числовых данных строили графики, на которые накладывали в MS Excel линии тренда. Эти линии тренда обеспечивали сглаживание данных и выявление модельной зависимости динамики размеров клеток от времени инкубации.

3. Провели серию опытов по разбавлению крови дистиллированной водой. При 10%-ом разбавлении в течение нескольких минут эритроциты стали восстанавливать свои

размеры, проявив устойчивость к гипоосмотическим условиям. Математическая модель процесса указывает на колебательный характер волюморегуляции при данных условиях: размеры то увеличиваются, то уменьшаются с периодичностью в несколько минут.

При 20%-ом разбавлении наблюдали кратное и быстрое увеличение размеров эритроцитов. На 10-ой минуте набухание клеток обратилось вспять. Увеличение размеров носило волнообразный характер, что показано математически.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cossins A.R., Gibson J.S. Volume-sensitive transport systems and volume homeostasis in vertebrate red blood cells // *The Journal of Experimental Biology*. – 1997. – Vol. 200, iss. 2. – P. 343–352.
2. Fänge R. Fish Blood Cells // *Fish Physiology*. Volume 12, Part B, 1992, Pages 1-54
3. Imagava T., Hashimoto Y., Kitagawa H., Kon Y., Kudo N., Sugimura M. Morphology of Blood Cell in Carp (*Cyprinus carpio* L.) // 1989
4. Glomski C.A., Tamburlin J., Chainani M. The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. III. Fish, the lower vertebrate experience // *Histology and Histopathology*. – 1992. – Vol. 7 (3). – P. 501-528.
5. Jensen B.F. Regulatory volume decrease in carp red blood cells: mechanisms and oxygenation-dependency of volume-activated potassium and amino acid transport // *The Journal of Experimental Biology*. – 1995. – Vol. 198, iss. 2. – P. 155–165.

6. Joseph-Silverstein J., Cohen W.D. The Cytoskeletal System of Nucleated Erythrocytes. III . Marginal Band Function in Mature Cells // The Journal of Cell Biology. – 1984. – Vol. 98 (6). P. 2118-2125.
7. Snyder G.K., Sheafor B.A. Red Blood Cells: Centerpiece in the Evolution of the Vertebrate Circulatory System //American Zoologist, Volume 39, Issue 2, April 1999, Pages 189–198
8. Атауллаханов Ф.И., Корунова Н.О., Спиридонов И.С., Пивоваров И.О., Калягина Н.В., Мартынов М.В. Как регулируется объём эритроцита, или что могут и чего не могут математические модели в биологии // Биологические мембраны. - 2009. — Т. 26. - №3. – С. 163-179.
9. Калягина Н.В., Мартынов М.В., Алтуллаханов Ф.И. Математический анализ регуляции объёма эритроцита человека с учётом упругого воздействия оболочки эритроцита на обменные процессы // Биологические мембраны. – 2013. – Т. 30. - №2. – С. 115-127.
10. Иванов А.А. Физиология рыб. – Мир, 2003.
11. Пищенко Е.В. Гематология пресноводной рыбы: учебное пособие / Новосиб. гос. аграр. ун-т.- Новосибирск, 2002.