

УДК. 57.082.13:597.2/.5:576.31

А. Ю. Андреева, В. С. Муханов

МЕТОД ПРИЖИЗНЕННОЙ МОРФОМЕТРИИ ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ РЫБ

Разработан метод прижизненной морфометрии эритроцитов рыб с использованием витальных красителей. Для окраски ядер клеток применен флюорохром SYBR Green I. Сделаны фотографии эритроцитов в толстой капле, снимки проанализированы в компьютерной программе ImageJ 1.44р. Полученные значения длин большой и малой оси ядра и клетки усреднены и сопоставлены с результатами измерений на мазках крови, окрашенных по Паппенгейму. Различия не превышали 2%.

Ключевые слова: ядерные эритроциты, морфометрические показатели, прижизненные красители, SYBR Green I.

Костистые рыбы относятся к группе низших позвоночных, кровь которых содержит ядерные эритроциты [13, 14, 19]. Оценка морфометрических характеристик данных клеточных форм обычно проводится на мазках крови, которые предварительно фиксируются и окрашиваются по методике Романовского-Гимзе или Паппенгейма [1, 4, 15], что требует определенного времени. При этом происходит обезвоживание клеток, что допускает изменение их реальных размеров. Измерить же толщину эритроцита, важную для расчета объемных характеристик клетки, можно только с применением поляризационной микроскопии, что существенно осложняет морфометрический анализ клеток красной крови в целом.

При работе с нативными препаратами возможно использование витальных красителей, особенностью которых является способность взаимодействовать с различными структурами клеток, не влияя на их жизнедеятельность и физиологическую активность. SYBR Green I относится к современному поколению прижизненных флюорохромов повышенной яркости, специфичных к нуклеиновым кислотам (двухцепочечной нити ДНК) [8, 11]. Он имеет широкое применение в различных видах полимеразной цепной реакции [6, 10], электрофорезе [12, 20], а также для визуализации ДНК в клетках эукариот [9, 18]. Для окраски ядер клеток крови традиционно применяется бромистый этидий [3, 5], тогда как SYBR Green I никогда не использовался в этих целях.

В представленной работе разработан метод прижизненной морфометрии эритроцитов рыб с использованием витального красителя SYBR Green I.

© Андреева А. Ю., Муханов В. С., 2012

Материал и методика исследований. Исследование проводили на эритроцитах крови *Scorpaena porcus* Linnaeus. Кровь получали из хвостовой артерии путем отсечения хвостового стебля с применением гепарина («Рихтер», Венгрия) для предотвращения свертывания. Эритроциты центрифугировали при 3,5 тыс. об·мин⁻¹ в течение 15 мин и трижды отмывали от плазмы крови в эквивалентном объеме среды (128 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 1,5 мМ CaCl₂, 1,5 мМ MgCl₂, 15 мМ л Трис, 2,2 мМ D-глюкозы [17]).

Для идентификации ядер эритроцитов был использован прижизненный краситель SYBR Green I (Molecular Probes, США), который, связываясь с двухцепочечной нитью ДНК, флуоресцировал зеленым цветом в видимой части спектра. Исходя из ограниченного числа данных об окрашивании ядер клеток крови SYBR Green I, концентрацию красителя подбирали в ходе эксперимента, и суммарное разведение флуорохрома составило 10 000 раз. Окрашивание проводили в течение 20 мин.

После окрашивания эритроциты фотографировали на лабораторном инвертированном микроскопе для светлого поля и флуоресценции Nikon Eclipse TS100, оборудованном камерой Ikegami ICD-848P, в световом (светлое и темное поле) и люминесцентном режиме (набор светофильтров для возбуждения в синей области спектра для SYBR Green I). Фотографии эритроцитов в толстой капле делали после оседания клеток на поверхность предметного стекла. Съемку проводили в двух вариантах: на освещенном и затемненном полях микроскопа. При освещении поля микроскопа наблюдали клетки, а при затемнении — ядра. Дальнейшую обработку фотографий осуществляли в графическом редакторе Adobe® Photoshop® CS3 EXTENDED version 10.0. Морфометрию ядерных эритроцитов проводили в программе ImageJ 1.44r [7]. Были измерены следующие характеристики: длина большой и малой оси клетки (C_1 и C_2), длина большой и малой оси ядра (N_1 и N_2) (рис. 1).

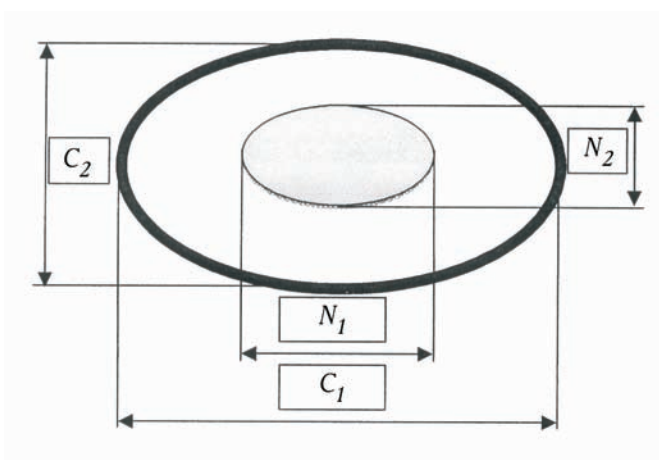
Нормальность распределения проверяли, используя критерий Пирсона. Достоверность отличий оценивали при помощи t -критерия Стьюдента при уровне значимости $p \leq 0,02$. Результаты представляли в виде $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$.

Результаты исследований и их обсуждение

В результате окрашивания эритроцитов *S. porcus* красителем SYBR Green I были получены клетки с флуоресцирующими зеленым цветом ядрами (рис. 2, а).

Яркая интенсивность окрашивания ядер эритроцитов SYBR Green I объясняется его более высоким сродством к двухцепочечной нити ДНК по сравнению с другими аналогичными красителями [16]. Однако флуоресцирующие ядра видны только при затемнении предметного поля микроскопа, когда границы эритроцитов неразличимы. При освещении капли эритроцитов наблюдали обратную ситуацию. Такая фотография позволяет измерить длину большой и малой оси клетки, а также, если клетка расположена торцом, и третью величину — толщину эритроцита (см. рис. 2, б), чего нельзя сделать на фиксированных мазках.

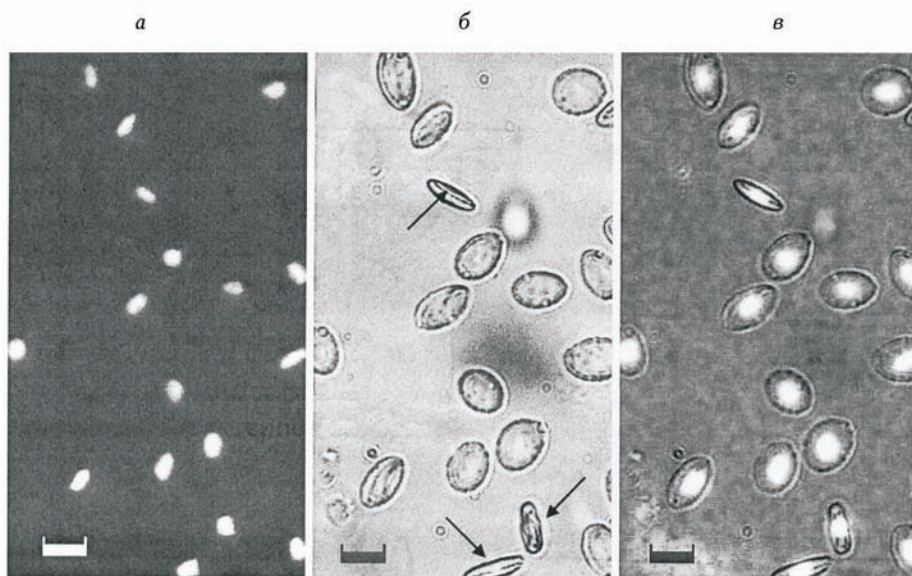
Фотографии совмещали в графическом редакторе наложением освещенной фотографии на затемненную и установкой прозрачности верхнего слоя (светлый снимок) на уровне 20—40%. По окончании обработки снимков были получены фотографии клеток с флуоресцирующими ядрами, что позволило вычислить длину большой и малой оси ядра и клетки (см. рис. 2, в).



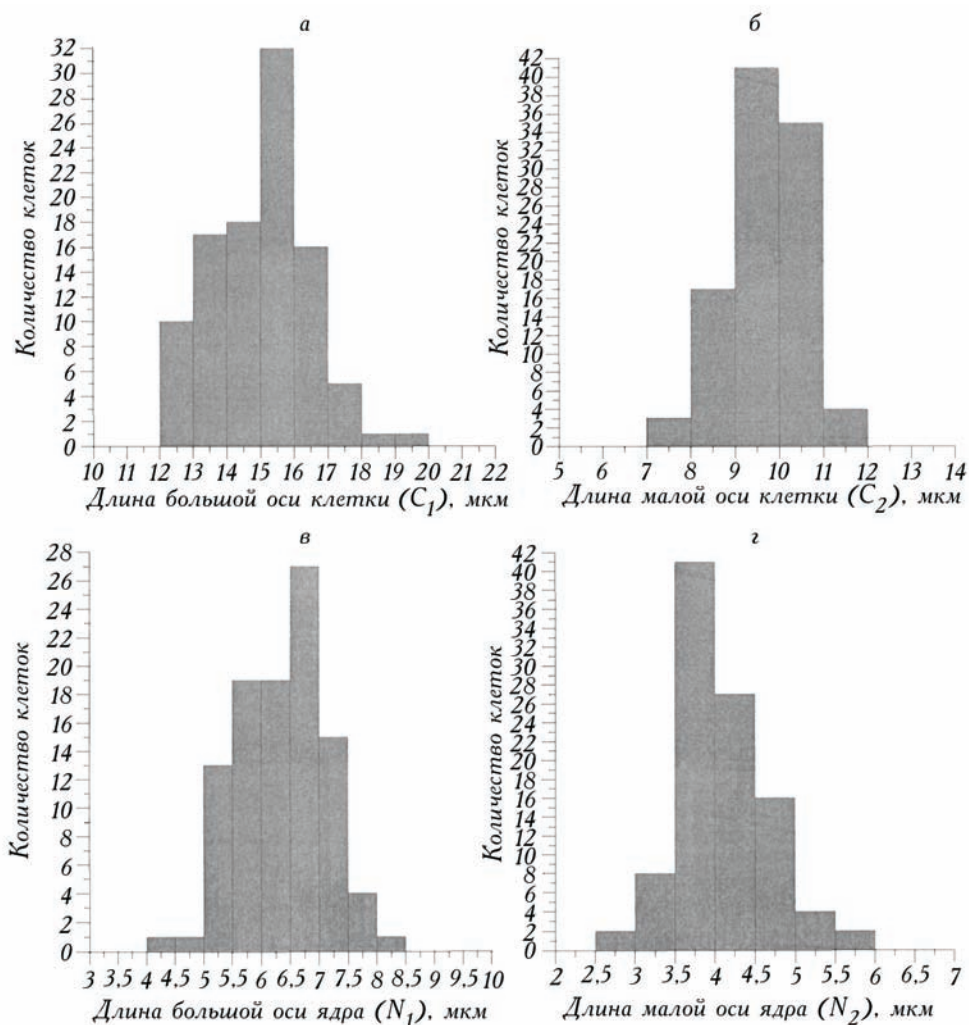
1. Размерные характеристики эритроцитов: C_1 — большая ось клетки; C_2 — малая ось клетки; N_1 — большая ось ядра; N_2 — малая ось ядра.

Размерные показатели эритроцитов *S. porcus* измеряли при помощи программы ImageJ®, которая предназначена для анализа клеток на фотографии. На графиках показано распределение длины большой и малой оси ядра и клетки, определены максимумы выборок (рис. 3).

Расчет величины критерия Пирсона показал, что данные подчиняются нормальному закону распределения. Далее длины C_1 , C_2 , N_1 , N_2 усредняли.



2. Микрофотографии ядерных эритроцитов *S. porcus* в толстой капле: а — люминесцентный режим; б — световой режим; в — совмещенный снимок. Стрелками указаны клетки, расположенные торцом. Линейка 10 мкм.



3. Характер распределения длины большой (а) и малой (б) оси клетки и большой (в) и малой (г) оси ядра эритроцитов *S. rogicus*.

Средние значения сопоставляли с результатами измерения этих показателей на мазках крови [2] (табл. 1).

При сравнении результатов были выявлены достоверные статистические различия в показателях, однако расхождение составляет не более 2%. Этот факт позволяет предположить, что методики фиксации приводят к изменению клеток, а именно — их уменьшению, что, по всей вероятности, связано с дегидратацией эритроцитов при фиксации метанолом.

Заключение

Анализ результатов проведенных исследований и последующее сравнение их с литературными данными свидетельствует о том, что предложенный метод при-

1. Морфометрические показатели ядерных эритроцитов *S. porcus*

Показатели	Литературные данные [2]		Собственные данные	
	<i>N</i>	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$
<i>C</i> ₁ , мкм	800	13,99 ± 0,15	100	15,00 ± 0,14*
<i>C</i> ₂ , мкм	800	8,64 ± 0,20	100	9,68 ± 0,09*
<i>N</i> ₁ , мкм	800	5,31 ± 0,13	100	6,37 ± 0,07*
<i>N</i> ₂ , мкм	800	3,73 ± 0,13	100	4,08 ± 0,06*

* Достоверно при $p \leq 0,02$.

жизненной морфометрии красных клеток крови может быть применен для изучения размеров ядерных эритроцитов рыб.

**

Розроблено метод прижиттєвої морфометрії еритроцитів риб із використанням вітальних барвників. Для забарвлення ядер клітин було використано флуорохром SYBR Green I. Було зроблено фотографії еритроцитів в товстій краплі, фотографії проаналізовано в комп'ютерній програмі ImageJ 1.44p. Отримані довжини великої та малої вісі ядра та клітини було усереднено та співставлено з величинами, які було виміряно на мазках крові, забарвлених за Паппенгеймом. Похибка не перевищувала 2%.

**

The method of living morphology of fish erythrocytes with vital dyes using was designed. SYBR Green I was used for cells nuclei dying. The photos of erythrocytes in thick drop was made, pictures were analyzed with computer program ImageJ 1.44p. Received data of length of large and small axes of nuclei and cells were averaged and compared with the results which were measured on blood slides and dyed by Pappenheim method. Differences didn't evaluate 2%.

**

1. Корниенко Г.Г., Бойко Н.Е., Бугаев Л.А. и др. Физиолого-биохимические и генетические исследования ихтиофауны Азово-Черноморского бассейна. Методическое руководство. — Ростов-н/Д: Эверест, 2005. — 105 с.
2. Новицкая В.Н., Парфенова И.А. Гематологические и морфометрические характеристики зрелых эритроцитов *S. porcus* в условиях экспериментальной гипоксии // Водные биоресурсы и аквакультура: Тез. докл., Киев, 2010. — Киев: ДИА, 2010. — С. 290—292.
3. Christofolletti C.A., David J.A.O., Fontanetti C. S. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): a methodological comparison // Genet. Mol. Biol. — 2009. — Vol. 32, N 1. — P. 155—158.
4. Dove A.D.M., Arnold J., Clauss T.M. Blood cells and serum chemistry in the world's largest fish: the whale shark *Rhincodon typus* // Aquat. Biol. — 2010. — Vol. 9, N 2. — P. 177—183.
5. Galindo B.A., Troilo G., Colus I.M.S. et al. Genotoxic effects of aluminum on the neotropical fish *Prochilodus lineatus* // Water Air Soil Pollut. — 2010. — Vol. 212. — P. 419—428.

6. *Giglio S., Monis P.T., Saint C.P.* Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR // *Nucleic Acids Res.* — 2003. — Vol. 31, N 22. — e 136.
7. *Girish V., Vijayalakshmi A.* Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ // *Ind. J. Cancer.* — 2004. — P. 41—47.
8. *Kiltie A.E., Ryan A.J.* SYBR Green I staining of pulsed field agarose gels is a sensitive and inexpensive way of quantitating DNA double-strand breaks in mammalian cells // *Nucleic Acids Res.* — 1997. — Vol. 25, N 14. — P. 2945—2946.
9. *Lee J.* The distribution of cytoplasm and nuclei within the extra-radical mycelia in *Glomus intraradices*, a species of arbuscular mycorrhizal fungi // *Mycobiology.* — 2011. — Vol. 39, N 2. — P. 79—84.
10. *Lekanne Deprez R.H., Fijnvandraat A.C., Ruijter J.M., Moorman A.F.M.* Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green 1 depends on cDNA synthesis condition // *Anal. Biochem.* — 2002. — Vol. 307. — P. 63—69.
11. *Marie D., Partensky F., Jacquet S., Vaultot D.* Analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. Enumeration and cell cycle // *App. Environ. Microbiol.* — 1997. — Vol. 63, N 1. — P. 186—193.
12. *Skeidsvoll J., Magne Ueland P.* Analysis of double-stranded DNA by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection using the monomeric dye SYBR Green I. // *Anal. Biochem.* — 1995. — Vol. 231. — P. 359—365.
13. *Soengas J., Moon T.W.* Uptake and metabolism of glucose, alanine and lactate by red blood cells of the american eel *Anguilla rostrata* // *J. Exp. Biol.* — 1995. — Vol. 198. — P. 877—888.
14. *de Souza P.C., Bonilla-Rodriguez G.O.* Fish hemoglobins // *Braz. J. Med. Biol. Res.* — 2007. — Vol. 40, N 6. — P. 769—778.
15. *Strunjak-Perovic I., Lisicic D., Coz-Rakovac R. et al.* Evaluation of micronucleus and erythrocytic nuclear abnormalities in Balkan whip snake *Hierophis gemonensis* // *Ecotoxicology.* — 2010. — Vol. 19. — P. 1460—1465.
16. *Suzuki T., Fujikura K., Higashiyama T., Takata K.* DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy // *J. Histochem. Cytochem.* — 1997. — Vol. 45, N 1. — P. 49—53.
17. *Tiihonen K., Nikinmaa M.* Short communication substrate utilization by carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes // *J. Exp. Biol.* — 1991. — Vol. 161. — P. 509—514.
18. *Vitová M., Hendrychová J., Cepák V., Zachleder V.* Visualization of DNA-containing structures in various species of Chlorophyta, Rhodophyta and Cyanophyta using SYBR Green I dye // *Folia Microbiol.* — 2005. — Vol. 50, N 4. — P. 333—340.
19. *Wanga T., Cossins A.R., Nielsen O.B.* Metabolism of trout red blood cells: correlation between cation transport and oxygen uptake following adrenergic stimulation // *Aquaculture.* — 1999. — Vol. 177, N 1. — P. 267—275.
20. *Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum F.* Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications // *Nucleic Acids Res.* — 2004. — Vol. 32, N 12. — P. 103.