

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 599.74:591.111.1:577.16

**СРАВНИТЕЛЬНО-ВИДОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ
ВИТАМИНОВ А И Е НА ЛЕЙКОЦИТАРНУЮ ФОРМУЛУ И
МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЛИМФОЦИТОВ
У ХИЩНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ (CARNIVORA)****И.В. Баишникова*, Л.Б. Узенбаева, В.А. Илюха, А.Г. Кижина,
Э.Ф. Печорина, Т.Н. Ильина**

*Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», Россия, 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11
e-mail: iravbai@mail.ru

Исследовали влияние витаминов А и Е на количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу и морфометрические параметры лимфоцитов у трех видов отряда Carnivora – американских темно-коричневых норок (*Neovison vison*, Mustelidae), вуалевых песцов (*Vulpes lagopus*, Canidae) и серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes*, Canidae). Самое высокое количество лейкоцитов, а также наибольшая площадь поверхности лимфоцитов и их ядер наблюдались в периферической крови у норок, наименьшие показатели выявлены у лисиц. Дополнительное введение в рацион витаминов А и Е в течение 14 сут практически не повлияло на количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу, лишь снизилось относительное содержание эозинофилов и моноцитов у лисиц, получавших витамин Е. Действие витаминов в основном проявилось в изменении морфометрических параметров лимфоцитов. Добавки витамина А у норок и лисиц, а витамина Е – только у норок привели к увеличению площади поверхности лимфоцитов, а в ряде случаев и их ядер, что у норок сопровождалось повышением размеров цитоплазмы. У песцов обнаружен противоположный характер изменений – оба витамина вызвали уменьшение площади поверхности лимфоцитов и их ядер. Наблюдаемые изменения могут быть связаны с иммуномодулирующим действием витаминов А и Е, а обнаруженные различия – с особенностями морфофункциональной организации лимфоцитов и иммунного статуса исследованных видов хищных млекопитающих.

Ключевые слова: витамин А, витамин Е, лейкоциты, лимфоциты, морфометрические параметры, хищные млекопитающие

Наиболее исследуемыми нутриентами, влияющими на иммунитет, являются витамины А и Е. Установлено, что как недостаток, так и избыток витамина А ухудшают иммунную функцию и устойчивость к инфекции, а дополнительное его введение в рацион приводит к изменениям неспецифического и специфического иммунитета [1]. Это частично связано с влиянием на пролиферацию и дифференцировку лейкоцитов, а также на продукцию иммуноглобулинов [2]. Витамин Е является основным жирорастворимым антиоксидантом, участвующим в защите от окислительных повреждений полиненасыщенных жирных кислот, которые в значительных количествах присутствуют в мембранах иммунных клеток [3]. Тем самым обеспечивается стабильность

мембран, что в свою очередь влияет на функционирование рецепторов, активность ферментов и межклеточные взаимодействия [4]. Кроме того, витамин Е регулирует иммунную функцию, ингибируя продукцию иммуносупрессивных компонентов, таких как простагландин Е₂, и стимулируя продукцию интерлейкина 2, участвующего в дифференцировке Т- и В-лимфоцитов [3, 5].

Применение витаминов А и Е в дозах, превышающих рекомендуемый уровень, улучшает иммунные функции у лабораторных и сельскохозяйственных животных [1, 3]. Сведения о влиянии этих витаминов на состав крови и морфофункциональное состояние лейкоцитов у хищных млекопитающих встречаются крайне редко. Интересными объектами для исследования являются

разводимые в условиях зоокультуры пушные звери, у которых устойчивость к внешним факторам и иммунореактивность сформировались в различных экологических условиях.

Американская норка (*Neovison vison*), один из наиболее популярных объектов клеточного пушного звероводства, адаптирована к обитанию вблизи водоемов и употреблению пищи с высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот. Для этого вида характерны высокое поверхностно-весовое отношение и более интенсивный метаболизм, чем у других млекопитающих со сходной массой тела [6]. Вуалевый песец является мутантной формой дикого голубого песца (*Vulpes lagopus*), эндемика Арктики, приспособленного к низким температурам окружающей среды и недостатку пищи в холодный период года. Серебристо-черная порода лисиц создана на основе диких красных лисиц (*Vulpes vulpes*), хорошо адаптированных к разнообразным условиям обитания и имеющих самое широкое географическое распространение среди представителей отряда Carnivora.

В настоящее время, несмотря на большое количество исследований, по-прежнему актуальным является изучение иммунно-регуляторных функций витаминов А и Е. Для оценки состояния иммунитета могут быть использованы лейкоцитарная формула, являющаяся чувствительным индикатором гомеостаза, и морфометрические параметры лимфоцитов, которые обеспечивают основу специфических иммунных реакций. Морфофункциональная организация лимфоцитов периферической крови, зависящая от ряда факторов, в частности, возраста, степени дифференцировки, энзиматического спектра, а также таких процессов, как пролиферация, миграция и др., достаточно полно отражает изменение состояния лимфоидной системы.

Цель работы заключалась в исследовании влияния витаминов А и Е в разных дозах на количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу и морфометрические параметры лимфоцитов у трех видов хищных млекопитающих – норок, песцов и лисиц, разводимых в условиях зоокультуры.

Материалы и методы

Исследования выполнены с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук». Состав периферической крови и морфометрические параметры лимфоцитов определяли у 6–7-месячных темно-коричневых норок, вуалевых песцов и серебристо-черных лисиц. Все животные получали основной рацион (ОР) звероводства, животным экспериментальных групп дополнительно к основному рациону добавля-

ли разные дозы витаминов А (масляный раствор ретинола ацетата, Россия – песцам и лисицам, «Lutavit А 1000 Plus», Германия – норкам) или Е («Сухавит Е 50», Германия) из расчета на голову в сутки в течение 14 сут в ноябре. Экспериментальные группы формировались по принципу аналогов.

Норки содержались парами (самки и самцы). Животные были разделены на 4 группы, которые получали корм с разным уровнем витаминов: 1 – контроль (ОР, n = 6), 2 – ОР + 500 МЕ витамина А (n = 9), 3 – ОР + 4 мг витамина Е (n = 10), 4 – ОР + 20 мг витамина Е (n = 10). Самки песцов были разделены на 5 групп (n = 6): 1 – контроль (ОР), 2 – ОР + 5000 МЕ витамина А, 3 – ОР + 10000 МЕ витамина А, 4 – ОР + 50 мг витамина Е, 5 – ОР + 100 мг витамина Е. Самок лисиц разделили на 3 группы (n = 6): 1 – контроль (ОР), 2 – ОР + 10000 МЕ витамина А, 3 – ОР + 100 мг витамина Е. ОР для норок содержал 200 МЕ витамина А и 2 мг витамина Е на голову в сутки, для песцов и лисиц – 15 мг витамина Е на голову в сутки, что является нормой для зверей осенью. Забор крови (без антикоагулянта) осуществляли утром натощак у норок из кончика хвоста, у песцов и лисиц – из плантарной вены.

Общее число лейкоцитов подсчитывали общепринятым методом в камере Горяева. Определение относительного содержания и исследование морфологических особенностей лимфоцитов проводили на мазках периферической крови, окрашенных по Паппенгейму. В работе использовали световой микроскоп Axioscop 40 (Carl Zeiss, Германия) с цветной цифровой видеокамерой (Pixera 150ES, Pixera Corporation, США) и компьютерной системой анализа изображений «ВидеоТест-Морфология» (ВидеоТест, Россия). Морфометрические параметры – размеры лимфоцитов (ядра и клетки), а также доля площади, занимаемой ядром, определены у 1031 лимфоцита норок, 699 лимфоцитов лисиц, а также у 1550 лимфоцитов песцов.

Полученные данные обрабатывали с использованием пакетов программ MS Office Excel 2007 и Statgraphics 5.0 общепринятыми методами вариационной статистики. Характер распределения полученных результатов проверяли по критерию хи-квадрат. Оценку достоверности 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 и обсуждение

Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о различиях в содержании лейкоцитов

Таблица 1

Количество лейкоцитов и состав лейкоцитарной формулы периферической крови темно-коричневых норок, вуалевых песцов и серебристо-черных лисиц при различных дозах витаминов А и Е

Группы животных	Показатели	Лейкоциты 10 ⁹ /л	Лейкоцитарная формула					
			Л	М	П	С	Э	Б
Норки								
Контроль	M±m	7,47±1,40	36,17±3,70	6,67±1,05	1,67±0,61	54,50±3,65	0,83±0,40	0,17±0,17
	Медиана (min-max)	7,28 (3,90-12,90)	38,00 (21-48)	6,50 (3-10)	1,00 (0-4)	55,00 (40-68)	0,50 (0-2)	0 (0-1)
Витамины: А 500 МЕ	M±m	6,75±0,66	35,22±4,23	7,00±1,03	2,11±0,48	54,22±4,47	1,22±0,40	0,22±0,15
	Медиана (min-max)	6,45 (4,65-11,03)	32,00 (20-57)	7,00 (2-12)	2,00 (0-5)	58,00 (28-68)	1,00 (0-3)	0 (0-1)
Е 4 мг	M±m	7,50±1,02	32,30±3,54	9,20±1,40	4,30±1,07	52,60±3,77	1,30±0,68	0,30±0,21
	Медиана (min-max)	7,30 (3,75-14,35)	30,50 (21-53)	9,00 (2-17)	4,00 (1-12)	55,00 (34-74)	0,50 (0-7)	0 (0-2)
Е 20 мг	M±m	5,92±1,01	28,00±4,12	9,78±0,89	2,33±0,58	59,11±4,15	0,67±0,29	0,11±0,11
	Медиана (min-max)	5,55 (3,40-13,15)	31,00 (4-46)	10,00 (5-14)	2,00 (1-6)	54,00 (42-82)	0 (0-2)	0 (0-1)
Песцы								
Контроль	M±m	5,87±0,43	53,33±4,90	7,50±0,88	3,33±0,21	32,67±4,26	3,00±0,86	0,17±0,17
	Медиана (min-max)	5,55 (4,95-7,95)	48,50 (44-73)	7,00 (5-11)	3,00 (3-4)	34,00 (15-44)	2,50 (1-6)	0 (0-1)
Витамины: А 5000 МЕ	M±m	6,66±0,44	49,67±2,32	10,00±1,26	6,50±1,38	29,33±3,30	4,33±1,26	0,17±0,17
	Медиана (min-max)	6,55 (5,25-7,70)	47,00 (44-60)	10,50 (8-15)	8,00 (5-11)	28,00 (20-35)	4,50 (1-9)	0 (0-1)
А 10000 МЕ	M±m	7,68±0,26	53,83±3,36	8,50±2,00	5,33±1,33	29,00±3,13	3,33±1,56	0
	Медиана (min-max)	7,85 (7,05-8,45)	51,00 (46-69)	7,00 (3-17)	5,50 (2-10)	27,50 (21-41)	2,00 (1-11)	0
Е 50 мг	M±m	5,25±0,52	43,50±5,37	7,33±1,41	5,83±1,11	38,17±3,56	5,17±1,17	0
	Медиана (min-max)	5,08 (3,90-6,75)	38,50 (29-60)	9,00 (2-12)	5,00 (3-10)	40,50 (25-49)	5,50 (1-9)	0
Е 100 мг	M±m	6,18±0,55	51,67±5,04	7,50±1,95	3,33±0,49	35,67±3,80	1,83±0,70	0
	Медиана (min-max)	5,83 (4,35-8,15)	52,00 (31-66)	6,50 (1-15)	3,50 (2-5)	35,00 (25-50)	2,00 (0-4)	0
Лисицы								
Контроль	M±m	5,20±0,24	36,17±8,06	9,83±1,17	8,17±1,38	40,33±6,24	5,50±0,56	0
	Медиана (min-max)	5,35 (4,05-5,80)	33,50 (16-67)	9,50 (7-13)	8,00 (4-12)	41,50 (18-58)	6,00 (3-7)	0
Витамины: А 10000 МЕ	M±m	5,27±0,51	45,67±5,08	7,33±1,28	5,33±1,31	37,33±3,08	4,33±1,09	0
	Медиана (min-max)	5,25 (3,85-7,00)	43,00 (29-62)	7,50 (3-11)	5,50 (0-9)	38,50 (29-49)	3,50 (1-8)	0
Е 100 мг	M±m	4,94±0,33	40,00±1,86	6,67±0,99*	7,83±1,14	42,83±2,55	2,67±0,61*	0
	Медиана (min-max)	4,80 (4,05-6,15)	40,50 (32-45)	6,50 (4-11)	8,00 (5-11)	43,00 (34-52)	2,00 (1-5)	0

Пояснения: Л – лимфоциты, М – моноциты, П – палочкоядерные нейтрофилы, С – сегментоядерные нейтрофилы, Э – эозинофилы, Б – базофилы. * – различия достоверны по сравнению с контрольной группой (p < 0,05)

и их отдельных типов в периферической крови у исследуемых видов животных. Количество лейкоцитов находилось в диапазоне, обнаруженном у других видов хищных, разводимых в условиях зоокультуры [7]; у норок оно было выше, чем у песцов и лисиц. На светомикроскопическом уровне межвидовых различий в морфологии лейкоцитов, за исключением эозинофилов, не наблюдалось. У лисиц и песцов гранулы в эозинофилах крупнее и количество их меньше, чем у норок. Проведенные нами микроскопические исследования подтверждают данные о видовых особенностях эозинофилов среди млекопитающих [8].

У хищных млекопитающих в естественной среде обитания выявлена корреляция между количеством лейкоцитов и некоторыми экологическими и поведенческими характеристиками, которые влияют на риск заражения. В частности, у некоторых видов обнаружена связь между моногамией и сравнительно низким уровнем лейкоцитов, тогда как повышенное содержание этих клеток выявлено у полигамных животных [9]. В основе сравнительно низкого количества лейкоцитов могут быть большая эффективность и/или более низкий

уровень базального метаболизма [10].

Лимфоциты периферической крови млекопитающих визуально обычно подразделяют на малые, средние и большие или узко- средне- и широкоцитоплазменные. У норок, песцов и лисиц наблюдаются лимфоциты разного размера с относительно гладким рельефом клетки. Морфометрический анализ показал наличие различий в параметрах лимфоцитов между исследованными видами (табл. 2, рис. 1). Самая большая площадь поверхности лимфоцитов и их ядер выявлена у норок, значительно меньшая – у лисиц, песцы по этим показателям занимают промежуточное положение. Гистограммы распределения лимфоцитов по площади у всех видов унимодальные, асимметричные с незначительным отклонением в сторону больших величин (рис. 2).

У норок площадь поверхности около 90 мкм² имели 48% лимфоцитов, при этом в популяции присутствовало незначительное количество клеток с площадью до 200 мкм². У лисиц и песцов большая часть лимфоцитов имела площадь около 70 мкм², причем у лисиц их доля достигала примерно 67%, а у песцов – только 50%. Как видно

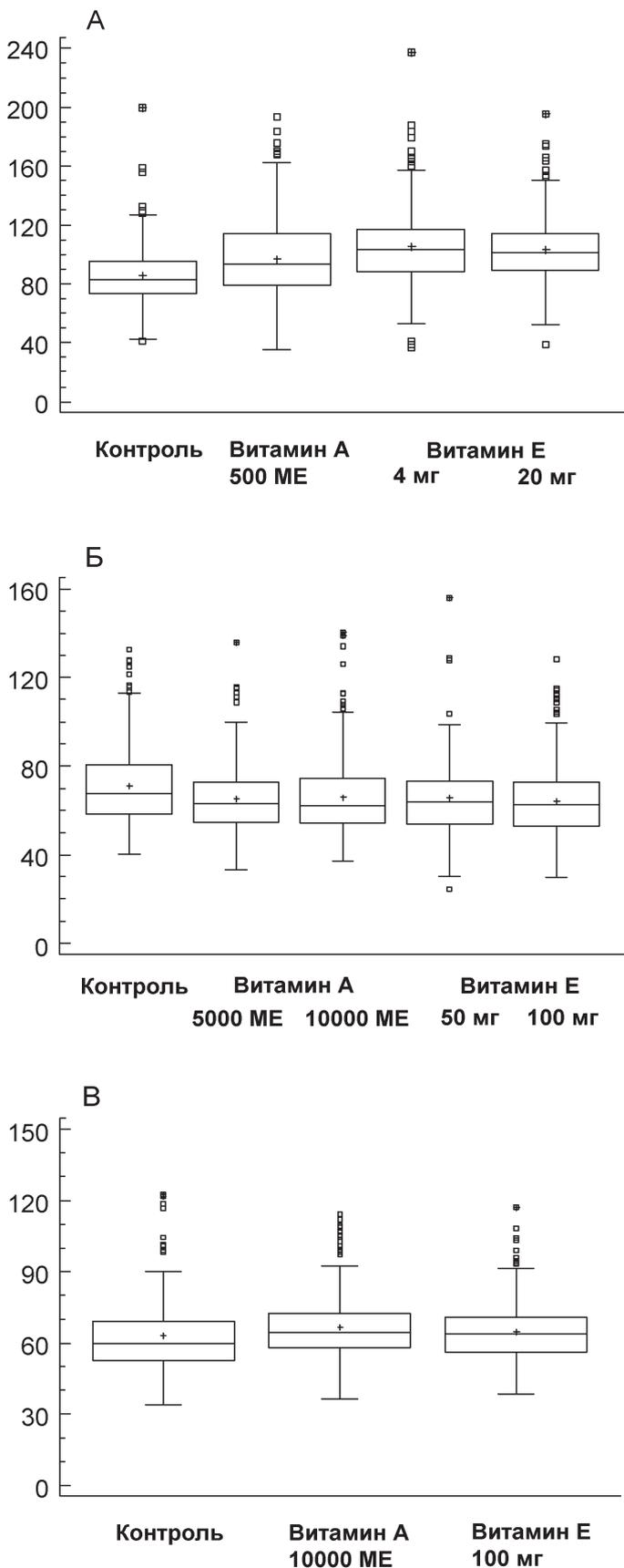


Рис. 1. Площадь поверхности лимфоцитов периферической крови у темно-коричневых норок (А), вуалевых песцов (Б) и серебристо-черных лисиц (В) при различных дозах витаминов А и Е. По оси абсцисс – группы животных; по оси ординат – площадь поверхности, мкм². + – среднее, — — медиана, □ – 25%–75%, I – статистический диапазон, ◻ – выпадающие варианты.

из гистограмм, лимфоциты норок по сравнению с лимфоцитами лисиц и песцов сильно варьируют по величине площади поверхности, у них особенно увеличена доля больших клеток. Среди них лимфоциты с азурофильными гранулами, относящиеся к естественным киллерам (NK-клетки), встречались крайне редко. Исходя из данных витальной компьютерной морфометрии, степень увеличения диаметра, периметра и площади при снижении фазовой высоты соответствует уровню активности внутриклеточных процессов, а величины фазовой высоты и объема ядерных структур – отражает увеличение пролиферативного потенциала клетки [11].

Известно, что популяция лимфоцитов гетерогенна по многим параметрам – иммунологическим, цитохимическим, морфометрическим и др. Исходя из морфологических наблюдений, нельзя сделать заключение об их субпопуляционном составе. Однако, учитывая понятие функциональной морфологии, можно предположить, что установленные у трех видов хищных млекопитающих различия в величине лимфоцитов могут отражать особенности их морфофункционального состояния. Увеличенное количество лимфоцитов большого размера у норок, по-видимому, связано со спецификой иммунореактивности этого вида. Норки при одомашивании кроме селекции по поведению, подверглись сильному стрессу, связанному со сменой среды обитания – от полуводного образа жизни к условиям зверофермы. При клеточном содержании у норок, а не у их диких предков или других разводимых в зоокультуре видов хищных распространилась алеутская болезнь (вирусный плазмозитоз). Это медленно развивающаяся инфекция, характеризующаяся увеличением количества цитотоксических Т-клеток – CD8-положительных лимфоцитов [12].

В реакции исследуемых видов животных на дополнительное введение в рацион витаминов А и Е имелись некоторые особенности. На общее содержание лейкоцитов витамины А и Е существенно не повлияли (табл. 1), лейкоцитарный профиль у норок и песцов также не изменился. У лисиц, получавших витамин Е в дозе 100 мг, обнаружено снижение ($p < 0,05$) относительного содержания моноцитов, являющихся источником тканевых макрофагов и активных форм кислорода, и эозинофилов, которые играют важную роль при аллергическом воспалении. Это может быть результатом участия α -токоферола в механизме регуляции адгезии моноцитов к эндотелию, а также трансэндотелиальной миграции эозинофилов при аллергии [4].

Под влиянием витаминов значительно изменились параметры лимфоцитов (табл. 2, рис. 1, А–В). У норок и лисиц витамин А вызвал уве-

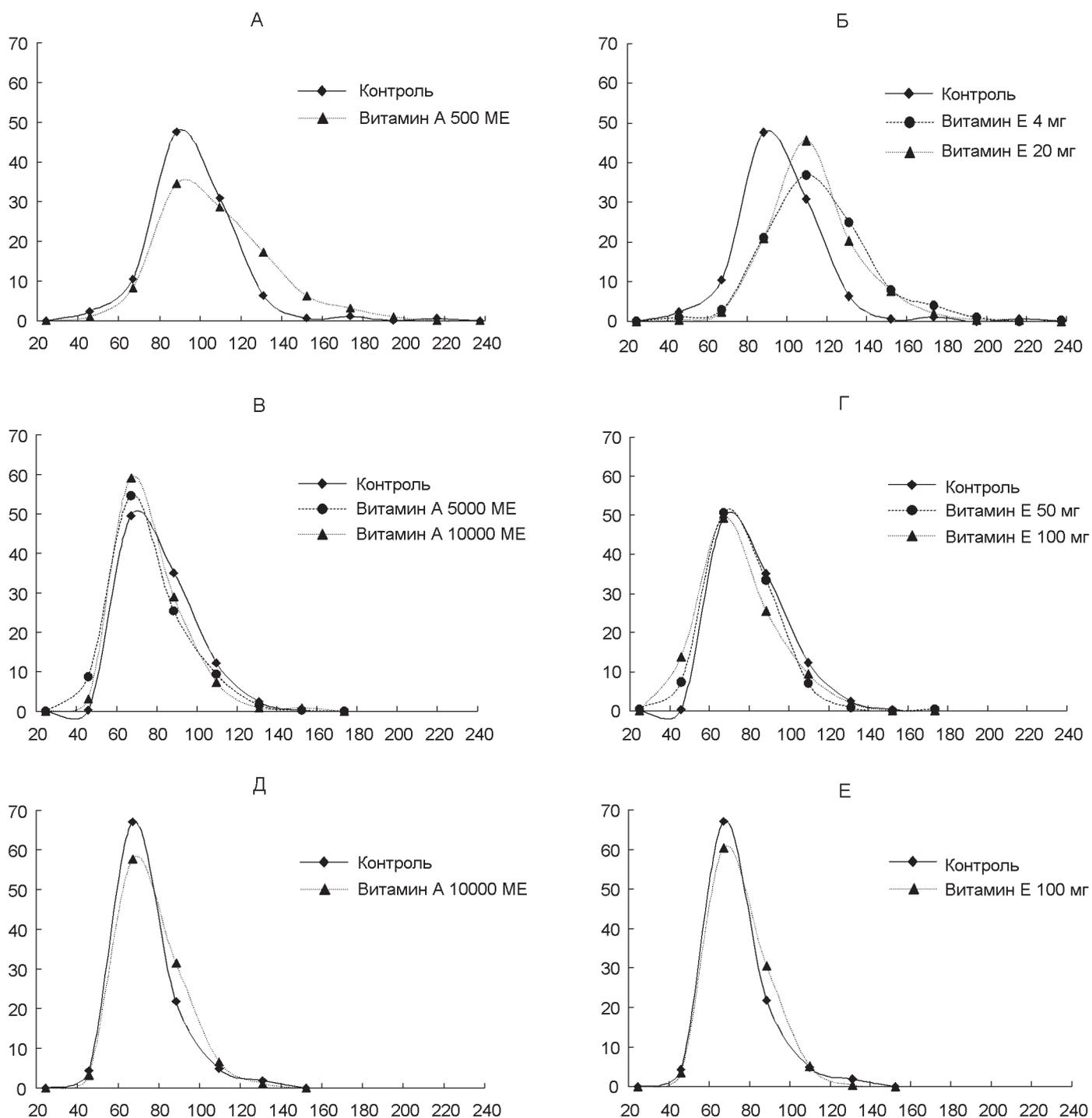


Рис. 2. Гистограммы распределения лимфоцитов периферической крови по площади у темно-коричневых норок (А, Б), вуалевых песцов (В, Г) и серебристо-черных лисиц (Д, Е) при различных дозах витаминов А и Е. По оси абсцисс – площадь поверхности, мкм²; по оси ординат – частота встречаемости, %.

личение площади поверхности клеток ($p < 0,05$). Особенно отчетливо это было выражено у норок за счет появления широкоцитоплазмных лимфоцитов и снижения доли средних, что на гистограмме совпадает с усилением асимметрии в сторону больших величин (рис. 2, А). У лисиц в условиях добавок витамина А при аналогичных изменениях площади поверхности лимфоцитов обнаружено также достоверное увеличение размера ядер.

Витамин Е у норок вызвал сходные изменения морфометрических параметров лимфоцитов. При использовании двух доз витамина Е – 4 и 20 мг – наблюдалось существенное повышение площади поверхности клеток, а при дозе 4 мг – и их ядер (табл. 2). На гистограмме видно, что в подопытных группах кривые распределения лимфоцитов по площади смещены вправо, так как в популяции повысилось количество более крупных клеток, среди которых большая часть имела раз-

мер около 110 мкм², и уменьшилась доля малых лимфоцитов (рис. 2, Б). У лисиц, получавших дополнительный витамин Е, не обнаружено достоверных изменений параметров лимфоцитов, хотя, как следует из гистограммы, наблюдались незначительные сдвиги в количестве клеток среднего размера (рис. 2, Е).

У песцов реакция на витамины А и Е отличалась от наблюдаемой у норок и лисиц и заключалась в снижении площади поверхности лимфоцитов и их ядер (табл. 2). На гистограммах это

ципы, даже у близкородственных видов имеются отличия в организации иммунной системы. Следует отметить, что изменения морфометрических параметров лимфоцитов у песцов и лисиц, в отличие от норок, происходили на фоне значительного увеличения в крови уровня ретинола, а в группах лисиц и песцов, получавших 5000 МЕ витамина А, и снижения концентрации α -токоферола [14, 15].

Учитывая чувствительность лимфоцитов к иммуноактивным препаратам, а также характер

Таблица 2

Морфометрические параметры лимфоцитов периферической крови темно-коричневых норок, вуалевых песцов и серебристо-черных лисиц при различных дозах витаминов А и Е

Группы животных	Показатели	Площадь клетки, мкм ²	Площадь ядра, мкм ²	Площадь, занимаемая ядром, %
Норки				
Контроль (n=172) Витамины: А 500 МЕ Е 4 мг (n=317) Е 20 мг (n=252)	M±m	85,80±1,58	61,26±0,91	72,53±0,67
	Медиана (min-max)	82,70 (40,64-199,46)	60,46 (31,26-113,34)	72,51 (46,62-97,02)
	M±m	96,84±1,54***	62,08±0,69	66,16±0,63***
	Медиана (min-max)	93,56 (35,13-193,64)	61,08 (30,20-115,07)	67,33 (39,65-92,03)
	M±m	105,12±1,44***	66,13±0,72***	64,21±0,53***
Медиана (min-max)	103,21 (36,70-237,58)	65,44 (20,48-113,97)	64,63 (37,59-90,71)	
M±m	102,98±1,40***	61,36±0,64	60,86±0,60***	
Медиана (min-max)	100,91 (38,67-195,24)	60,86 (26,71-93,85)	61,76 (36,45-96,01)	
Песцы				
Контроль (n=325) Витамины: А 5000 МЕ Е 50 мг (n=260) Е 100 мг (n=298)	M±m	71,10±0,93	54,94±0,54	78,37±0,37
	Медиана (min-max)	67,20 (40,18-132,51)	53,17 (35,78-91,96)	79,10 (56,97-97,86)
	M±m	65,22±0,92***	49,87±0,60***	77,30±0,35
	Медиана (min-max)	62,74 (33,04-135,63)	48,50 (24,40-106,72)	77,60 (55,54-94,24)
	M±m	66,15±0,86***	50,20±0,49***	77,02±0,36*
Медиана (min-max)	66,15±0,86***	48,83 (30,04-101,25)	77,89 (50,11-91,28)	
M±m	65,61±1,04***	49,02±0,68***	75,54±0,42***	
Медиана (min-max)	63,92 (24,54-155,85)	48,02 (20,75-124,90)	76,02 (50,70-92,71)	
M±m	64,40±1,01***	48,38±0,58***	76,58±0,45**	
Медиана (min-max)	62,49 (29,81-128,06)	47,25 (25,57-77,65)	76,29 (56,63-96,77)	
Лисицы				
Контроль (n=207) Витамины: А 10000 МЕ Е 100 мг (n=235)	M±m	63,10±1,03	47,60±0,56	76,64±0,54
	Медиана (min-max)	59,93 (33,89-122,33)	47,34 (25,67-76,14)	76,78 (48,89-96,66)
	M±m	66,53±0,87*	49,52±0,47**	75,44±0,46
	Медиана (min-max)	64,27 (36,66-114,14)	48,79 (29,97-75,46)	75,52 (50,46-94,50)
	M±m	64,63±0,82	48,80±0,49	76,30±0,46
Медиана (min-max)	63,65 (38,59-116,99)	48,28 (30,84-71,69)	77,05 (53,88-94,71)	

Пояснения: n – количество лимфоцитов, параметры которых измерены. *, **, *** – различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$).

соответствует повышению доли относительно мелких клеток площадью около 45 мкм² преимущественно в группах, получавших витамин Е, и средних – при дополнительных дозах витамина А. При этом количество крупных лимфоцитов площадью 88 мкм² и более также уменьшалось (рис. 2, В, Г). Большинство малых лимфоцитов принадлежит к иммунологически зрелым, в основном длительно живущим клеткам, которые постоянно мигрируют между кровью и лимфой, обеспечивая высокий защитный потенциал организма [13]. Выявленные у песцов особенности, по-видимому, отражают видовую специфику изменения иммунного статуса, так как, несмотря на общие прин-

изменений морфометрических параметров, можно предположить, что они обусловлены иммуномодулирующим действием исследуемых витаминов. Установлено важное значение витамина А для развития и поддержания иммунной системы и его влияние на процессы пролиферации, дифференцировки, а также апоптоз иммунокомпетентных клеток [16, 17]. Действие ретиноевой кислоты, активного метаболита витамина А, на популяционный состав связано с ускорением дифференцировки В-лимфоцитов [2], участием в развитии Т-хелперов (Th) и увеличением продолжительности жизни активированных Т-клеток [16].

В отношении витамина Е также продемон-

стрирована иммуномодулирующая и противовоспалительная эффективность. По мнению некоторых авторов, он относится к иммуно-гомеостатическим факторам [4] и способен регулировать функционирование сигнальных систем клетки и модулировать транскрипцию генов [18]. Выявлено, что влияние витамина Е на лимфоциты связано с воздействием на экспрессию генов, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла, а также баланса между субпопуляциями Th [5]. В высоких дозах α -токоферол активирует кластеры генов, участвующих в T-клеточном иммунном ответе [19].

Полученные результаты свидетельствуют об определенном сходстве в действии витаминов А и Е, а также о межвидовых различиях в характере вызываемых ими изменений морфометрических параметров лимфоцитов. У норки и лисиц, как правило, в циркуляции увеличивалось количество клеток более крупного размера, а у песцов – мелких и средних. По-видимому, изменения в соотношении лимфоцитов разного размера у животных, получавших витамины, отражают процесс преобразования структуры популяции. В результате этого в группах песцов и лисиц, получавших витамины А и Е, средние размеры лимфоцитов стали равными. По некоторым данным, изменение диаметра, периметра и площади лимфоцитов может быть связано с популяционной перестройкой в иммунной системе и появлением групп клеток с иными размерами, характеризующими состояние внутриклеточного метаболизма и содержание белкового вещества в клетке [11].

На функции иммуннокомпетентных клеток витамины могут влиять, регулируя текучесть биологических мембран [20]. В предыдущем исследовании нами было установлено, что добавки витамина А в рацион песцов приводят у небольшой части лимфоцитов периферической крови к изменению поверхностной архитектоники – формированию сфероидных выпячиваний [21]. В определенной степени это может зависеть как от активационных, так и апоптотических процессов, а также структурных особенностей мембран лимфоцитов, в том числе и их липидного спектра. Было показано, что у исследуемых видов имеются различия в липидном составе клеточных мембран некоторых клеток. Так, у лисиц гепатоциты

и сперматозоиды отличаются большим содержанием ряда полиненасыщенных жирных кислот, а сперматозоиды также более высоким соотношением ненасыщенных и насыщенных жирных кислот, чем у песцов [22, 23]. Надо отметить, что при сходном кормлении внутренний жир песка содержит большее количество насыщенных жирных кислот, чем у норки [24], а способность песка к накоплению витамина Е в организме превосходит таковую лисиц [25].

Сопоставить результаты нашего исследования с данными иммунологической идентификации лимфоцитов не представляется возможным в виду недостаточной изученности структурно-функциональной организации иммунокомпетентной системы у различных видов млекопитающих (кроме лабораторных животных). Согласно последним данным, эффект влияния витаминов, продемонстрированный *in vitro*, не всегда применим к ситуации *in vivo* [18].

Таким образом, лимфоциты периферической крови трех видов хищных млекопитающих, разводимых в условиях зоокультуры, различались по морфометрическим параметрам и чувствительности к витаминам А и Е. Дополнительное введение в рацион витамина А у норки и лисиц и витамина Е только у норки вызывало увеличение площади поверхности лимфоцитов и их ядер. У песцов изменения носили противоположный характер – при добавках витаминов А и Е наблюдалось снижение морфометрических параметров. Действие витаминов А и Е привело к изменению распределения в периферической крови лимфоцитов по размеру, а возможно, и их морфофункционального состояния и, соответственно, иммунного статуса исследованных видов животных.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (тема № 0218-2019-0073).

Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Этической комиссией Института биологии КарНЦ РАН. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ross A.C., Chen Q., Ma Y. Vitamin A and retinoic acid in the regulation of B-cell development and antibody production // *Vitam. Horm.* 2011. Vol. 86. N 5. P. 103–126.
2. Chen X., Esplin B.L., Garrett K.P., Welner R.S., Webb C.F., Kincaid P.W. Retinoids accelerate B lineage lymphoid differentiation // *J. Immunol.* 2008. Vol. 180. N 1. P. 138–145.

3. Pekmezci D. Vitamin E and immunity // Vitam. Horm. 2011. Vol. 86. N 8. P. 179–215.
4. Galli F., Azzi A., Birringer M., Cook-Mills J.M., Eggersdorfer M., Frank J., Cruciani G., Lorkowski S., Özer N.K. Vitamin E: Emerging aspects and new directions // Free Radic. Biol. Med. 2017. Vol. 102. P. 16–36.
5. Han S.N., Adolfsson O., Lee C.-K., Prolla T.A., Ordovas J., Meydani S.N. Vitamin E and gene expression in immune cells // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2004. Vol. 1031. N 1. P. 96–101.
6. Korhonen H.T., Huuki H. Effect of carotenoid supplement on production performance in mink (*Neovison vison*) // Open J. Vet. Med. 2015. Vol. 5. N 4. P. 73–79.
7. Berestov V., Brandt A. Erythrocytes and leucocytes // Haematology and clinical chemistry of fur animals / Ed. A. Brandt. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy, 1989. P. 22–33.
8. Salakij C., Salakij J., Narkkong N.A., Prihirunkit K., Kamolnorrath S., Apibal S. Haematology, cytochemical and ultrastructural characteristics of blood cells in leopard (*Panthera pardus*) // Comp. Clin. Pathol. 2009. Vol. 18. N 2. P. 153–161.
9. Nunn C.L., Gittleman J.L., Antonovics J. A comparative study of white blood cell counts and disease risk in carnivores // Proc. R. Soc. Lond. B. 2003. Vol. 270. N 1513. P. 347–356.
10. Scanes C.G. Allometric and phylogenetic comparisons of circulating leukocyte concentrations between and within birds and mammals // Int. J. Vet. Health Sci. Res. 2016. Vol. 4. N 4. P. 116–122.
11. Валов А.Л., Василенко И.А., Ватазин А.В., Троянский И.В., Метелин В.Б., Цалман А.Я., Вишенская Т.В. Витальная компьютерная морфометрия лимфоцитов как неинвазивный метод диагностики острого отторжения почечного аллотрансплантата // Альманах клин. мед. 2009. № 20. С. 77–82.
12. Aasted B. Mink infected with Aleutian disease virus have an elevated level of CD8-positive T-lymphocytes // Vet. Immunol. Immunopathol. 1989. Vol. 20. N 4. P. 375–385.
13. Алмазов В.А., Афанасьев Б.В., Зарицкий А.Ю., Мамаев Н.Н., Рудакова Т.Л., Фрейдлин И.С., Цвейбах А.С., Шишков А.Л. Физиология лейкоцитов человека. Л.: Наука, 1979. 232 с.
14. Узенбаева Л.Б., Баишникова И.В., Кижина А.Г., Ильина Т.Н., Илюха В.А., Тютюнник Н.Н. Морфометрические параметры лимфоцитов периферической крови лисиц (*Vulpes vulpes* L.) и песцов (*Alopex lagopus* L.) при влиянии различных доз витаминов А и Е // Труды КарНЦ РАН, 2014. № 5. С. 78–85.
15. Baishnikova I., Sergina S., Ilyina T. Effect of vitamin E supplementation on α -tocopherol status and tissue antioxidants in American minks (*Neovison vison*) // Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2018. Vol. 42. N 6. P. 642–648.
16. Engedal N., Ertesvag A., Blomhoff H.K. Survival of activated human T lymphocytes is promoted by retinoic acid via induction of IL-2 // Int. Immunol. 2004. Vol. 16. N 3. P. 443–453.
17. Hall J.A., Grainger J.R., Spencer S.P., Belkaid Y. The role of retinoic acid in tolerance and immunity // Immunity. 2011. Vol. 35. N 1. P. 13–22.
18. Azzi A. Many tocopherols, one vitamin E // Mol. Aspects Med. 2018. Vol. 61. P. 92–103.
19. Zingg J.-M., Han S.N., Pang E., Meydani M., Meydani S.N., Azzi A. In vivo regulation of gene transcription by alpha- and gamma-tocopherol in murine T lymphocytes // Arch. Biochem. Biophys. 2013. Vol. 538. N 2. P. 111–119.
20. Viti V., Cicero R., Callari D., Guidoni L., Billitteri A., Sichel G. Effect of lipophilic vitamins on the erythrocyte membrane. ^{31}P NMR and fluorescence studies // FEBS Lett. 1983. Vol. 158. N 1. P. 36–40.
21. Узенбаева Л.Б., Баишникова И.В., Кижина А.Г., Ильина Т.Н., Илюха В.А., Тютюнник Н.Н. Морфологические особенности лимфоцитов периферической крови песцов при введении витаминов А и Е в различных дозах // Морфология. 2013. № 3. С. 39–44.
22. Miller R.R. Jr., Cornett C.L., Waterhous K.E., Farstad W. Comparative aspects of sperm membrane fatty acid composition in silver (*Vulpes vulpes*) and blue (*Alopex lagopus*) foxes, and their relationship to cell cryopreservation // Cryobiology. 2005. Vol. 51. N 1. P. 66–75.
23. Rouvinen K. Dietary effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on body fat composition and health status of farm-raised blue and silver foxes // Acta Agric. Scand. 1991. Vol. 41. N 4. P. 401–414.
24. Rouvinen K., Kiiskinen T. Influence of dietary fat source on the body fat composition of mink (*Mustela vison*) and blue fox (*Alopex lagopus*) // Acta Agric. Scand. 1989. Vol. 39. N 3. P. 279–288.
25. Пина Т.Н., Баишникова И.В. Species-specific features of tocopherol content in carnivorous mammals in autumn // J. Evol. Biochem. Phys. 2015. Vol. 51. N 1. P. 41–47.

Поступила в редакцию 14.01.2019 г.
После доработки 14.03.2019 г.
Принята в печать 22.03.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

COMPARATIVE RESEARCH OF THE EFFECT OF VITAMINS A AND E ON THE DIFFERENTIAL LEUCOCYTE COUNT AND THE MORPHOMETRIC PARAMETERS OF LYMPHOCYTES IN CARNIVOROUS MAMMALS (CARNIVORA)

I.V. Baishnikova*, L.B. Uzenbaeva, V.A. Ilyukha, A.G. Kizhina, E.F. Pechorina, T.N. Ilyina

Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Pushkinskaya St. 11, Petrozavodsk, 185910, Russia

*e-mail: iravbai@mail.ru

The study of the effect of vitamins A and E on total and differential leukocyte count as well as morphometric parameters of lymphocytes in three carnivorous species – dark-brown American mink (*Neovison vison*, Mustelidae), blue fox (*Vulpes lagopus*, Canidae) and silver fox (*V. vulpes*, Canidae) was conducted. The highest total leukocyte count (WBC) and the largest surface area of lymphocytes and their nuclei in the peripheral blood were observed in mink, the lowest indices were found in silver fox. Supplementation with vitamins A and E for 14 days had no effect on the WBC and differential leukocyte count with the exception of decreasing in relative eosinophils and monocytes content in silver fox receiving vitamin E. The action of vitamins was mainly manifested in changes in the morphometric parameters of lymphocytes. Additional vitamin A in mink and silver fox and vitamin E only in mink led to an increase in the surface area of lymphocytes, and in some cases their nuclei, which was accompanied by a rise in the size of cell cytoplasm in mink. In blue fox, on the contrary, both vitamins brought about a decrease in the surface area of the lymphocytes and their nuclei. The observed changes may be related to the immunomodulatory effects of vitamins A and E, the found differences may be associated with the features of the morpho-functional organization of lymphocytes and the immune status of the studied species of carnivorous mammals.

Keywords: *vitamin A, vitamin E, leukocytes, lymphocytes, morphometric parameters, carnivorous mammals*

Сведения об авторах

Баишникова Ирина Валерьевна – канд. биол. наук, науч. сотр. Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-142-57-31-07; e-mail: iravbai@mail.ru

Узенбаева Людмила Борисовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-142-57-31-07; e-mail: uzenb@bio.krc.karelia.ru

Илюха Виктор Александрович – докт. биол. наук, директор Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-142-57-31-07; e-mail: ilyukha@krc.karelia.ru

Кижина Александра Геннадьевна – канд. биол. наук, науч. сотр. Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-142-57-31-07; e-mail: golubewa81@yandex.ru

Печорина Эльвира Филипповна – гл. биолог Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-142-57-31-07; e-mail: elvi1955@yandex.ru

Ильина Татьяна Николаевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-142-57-31-07; e-mail: ilyina@bio.krc.karelia.ru