

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ НОРОК (*MUSTELA VISON* SCHREBER, 1777) РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ

Л.Б. Узенбаева, А.Г. Голубева, В.А. Илюха, Н.Н. Тютюнник

Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия,
e-mail: ilyukha@bio.krc.karelia.ru

У норок, обладающих сапфировой окраской меха (*a/a p/p*), по сравнению с норками серебристо-голубой окраски (*p/p*) и стандартными (+/+) отмечены особенности субклеточной структуры лейкоцитов, заключающиеся в формировании аномально крупных гранул. Показано, что степень выраженности нарушений в отдельных лейкоцитах и у отдельных особей различна. Рассматривается вопрос о взаимосвязи аномальной структуры лейкоцитов с пониженной жизнеспособностью сапфировых норок.

Введение

Первым результатом одомашнивания животных всегда является взрыв изменчивости по сравнению с их исходными дикими предками. В дикой природе большинство возникших *de novo* мутантов маложизнеспособно и потому не имеют шансов для распространения в популяции. А вот у домашних животных, развивающихся и размножающихся под охраной человека, многие мутанты не только выживают, но даже сознательно распространяются. Все это дает возможность выбора форм для их дальнейшей одомашнивания и последующего искусственного отбора, поскольку человек держит под своим контролем лишь те признаки, которые для него наиболее хозяйственно ценные.

Важным признаком одомашнивания пушных зверей является наследственное изменение дикой окраски их мехового покрова. Попав под защиту человека, пушные звери освободились от влияния многих неблагоприятных средовых факторов, от конкурентов и хищников дикой природы, человек обеспечивает их кормом, защищает от болезней вакцинами. Это повлекло за собой ослабление влияния естественного отбора, который существовал в дикой природе, и возможность более свободного распространения и накопления самых разнообразных наследственных изменений.

В итоге исторического одомашнивания аме-

риканской норки были получены результаты, которые не могли быть достигнуты в природной обстановке. Для норки в условиях одомашнивания на промышленных зверофермах чрезвычайно большую роль приобретает окраска меха, и к настоящему времени уже зарегистрировано 35 окрасочных новшеств рецессивной, доминантной и полудоминантной природы. Такого окрасочного разнообразия у американских норок до периода одомашнивания не было в течение всей их предыдущей эволюционной истории как вида. Возникшие *de novo* мутации окраски волосяного покрова настолько сильно затронули особенности физиологии, жизненно важные функции, биохимические показатели мутантных норок, что проживание их на специализированных зверофермах – единственное условие их дальнейшей одомашнивающей истории. Например, для успешного разведения глухих норок белых-хедлюнд, карельских пестрых норок, норок шéдоу, несущих летальные и сублетальные гены, затрагивающие окраску волосяного покрова, требуется использование специальных программ разведения. В итоге снижающие жизнеспособность мутации окраски меха в условиях, создаваемых человеком, могут быть вполне жизнеспособными, более того, они намеренно сохраняются и приобретают значение породных признаков.

Некоторые мутации окраски меха плеiotропно приводят к появлению нежелательных

признаков, изменению устойчивости к заболеваниям и снижению плодовитости. В частности, норки, несущие эффект сублетальной алеутской окраски (*a/a*), имеют повышенную чувствительность к вирусному плазмодитозу и низкую воспроизводительную способность, вследствие чего получили в хозяйствах незначительное распространение. Анализ литературы свидетельствует, что для лейкоцитов норок этого окрасочного генотипа характерно нарушение цитоплазматического гранулярного аппарата (Leader *et al.*, 1963), в котором сосредоточено большое количество биологически активных соединений, обеспечивающих их функциональную активность. Данный дефект, по-видимому, является одной из причин дисфункции лейкоцитов, ослабления резистентности и иммунореактивности организма.

В связи с тем, что роль различных факторов в механизмах устойчивости по-прежнему не ясна, нами проведено исследование морфологии лейкоцитов крови у норок трех генотипов: норки стандартной темно-коричневой окраски (+/+) и мутантных: рецессивных серебристо-голубых (*p/p*) и дирецессивных сапфировых (*a/a p/p*). Особое внимание было обращено на изучение морфофункциональной организации лейкоцитов норок сапфировой окраски – ценного, но трудного для разведения объекта звероводства. Сапфировая норка является комбинативной формой, в генотипе которой в гомозиготном состоянии присутствуют мутантные гены серебристо-голубой (*p/p*) и алеутской (*a/a*) окрасок. Она, как и алеутская норка, отличается от исходной стандартной темно-коричневой и большинства других мутантных форм не только окраской меха, но и низкой жизнеспособностью. Для нее, как и для алеутской норки, но в меньшей степени, характерна генетически обусловленная чрезвычайная чувствительность к вирусным инфекциям, особенно к вирусному плазмодитозу, а также снижение репродуктивной функции.

Материалы и методы

Исследование было проведено в ноябре, в период забоя на шкурку, на десяти норках (самки и самцы) каждого генотипа: стандартных (+/+), серебристо-голубых (*p/p*) и сапфировых (*a/a*

p/p), разводимых в одном из звероводческих хозяйств республики Карелия. Общепринятым способом подсчитывали количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу и относительное содержание аномальных лейкоцитов в мазках крови, окрашенных по Паппенгейму-Крюкову (Справочник..., 1975). Морфометрию гранул в эозинофилах и нейтрофилах сапфировых норок осуществляли при световой микроскопии с помощью компьютерной системы анализа изображений с цветной цифровой видеокамерой и программным обеспечением «Видеотест». Определяли количество гранул, их длину, ширину, площадь, в том числе и суммарную, а также факторы формы круга и эллипса. Обработку цифрового материала проводили общепринятыми методами вариационной статистики (Ивантер, Коросов, 2004).

Результаты и обсуждение

В результате исследования установлено, что изменения субклеточной структуры лейкоцитов по сравнению со стандартным типом окраски (+/+) наблюдаются только у сапфировых норок (*a/a p/p*). Они заключаются в формировании в различных типах лейкоцитов аномально больших гранул, которые по размеру и количеству, а иногда и форме существенно отличаются от таковых не только стандартных норок, но и других видов млекопитающих (рис. 1).

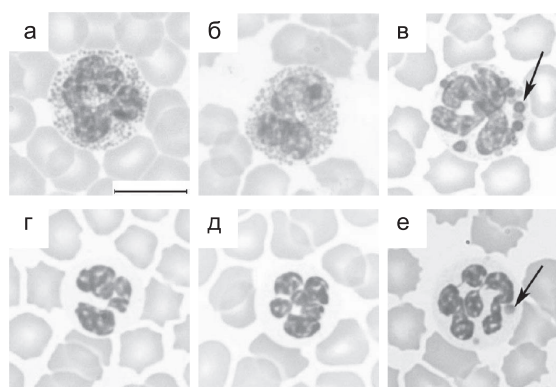


Рис. 1. Эозинофилы (а–в) и нейтрофилы (г–е) крови стандартных (а, г), серебристо-голубых (б, д) и сапфировых (в, е) норок.

Стрелкой указаны аномально большие гранулы в лейкоцитах крови норок сапфировой окраски. Об. 100, ок. 10. Масштаб 10 мкм.

Данные о составе лейкоцитарной формулы и относительном содержании аномальных лейкоцитов в крови сапфировых норок представлены на рис. 2. Ненормально большие гранулы чаще всего встречаются в эозинофилах, нейтрофилах, базофилах и редко моноцитах и лимфоцитах. В отличие от сапфировых норок (*a/a p/p*) в лейкоцитах норок серебристо-голубой окраски (*p/p*) подобных отклонений обнаружено не было (рис. 1б, д). По-видимому, особенности организации лейкоцитов у норок сапфировой окраски (*a/a p/p*) в значительной степени определяются именно гомозиготным состоянием гена алеутской окраски (*a/a*). Подтверждаются данные других авторов о дефектности клеток гранулоцитарного ряда у норок, гомозиготных по рецессивному гену алеутской окраски (Leader *et al.*, 1963).

В характере влияния гена алеутской окраски на морфологическую структуру лейкоцитов и меланосом наблюдаются общие черты. В работах Л.П. Зверевой с соавт. (1976) показано, что у сапфировых норок, так же, как и у алеутских, нарушена ультраструктура меланоцитов и функция меланосом, что обуславливает формирование чрезвычайно вариабельных по размеру и форме гранул и соответственно особенности пигментации волоса у норок такой окраски. В то же время у серебристо-голубых норок отмечены только изменения конфигурации меланоцитов (Зверева, Беляев, 1976).

Выявленные особенности внутриклеточной структуры лейкоцитов у сапфировых норок имеют сходство с врожденной патологией – синдромом Чедиака-Хигаши (СЧХ), который обна-

ружен у человека (Роговин и др., 1977; Масчан и др., 1997) и некоторых видов животных. В их числе крупный рогатый скот (Yamakuchi *et al.*, 2000), кошки (Kahraman, Prieur, 1989), крысы (Ozaki *et al.*, 1994), мыши (Лизосомы ..., 1984) и пушные звери (Meyers *et al.*, 1979; Bell *et al.*, 1980; Fagerland *et al.*, 1987; Sjaastad *et al.*, 1990). Электронно-микроскопические и цитохимические исследования подтвердили присутствие при этом заболевании в лейкоцитах «гигантских» включений, содержащих пероксидазу и кислую фосфатазу (Роговин и др., 1977). Некоторыми авторами также установлено, что при СЧХ дефект в лейкоцитах сочетается с ослаблением пигментации кожи, волос и глаз, которое прогрессирует с возрастом.

Согласно литературным данным, у разводимых в неволе пушных зверей, в частности у лисиц и песцов, основные признаки синдрома не отличаются от таковых у человека и других видов животных (Meyers *et al.*, 1979; Fagerland *et al.*, 1987; Sjaastad *et al.*, 1990). На первый план выступают изменения структурной организации лейкоцитов. Также затрагиваются функции тромбоцитов вследствие недостаточности плотных гранул, на чем основано включение этого заболевания в группу с общим названием «синдром дефекта пула хранения».

Исследования, проведенные нами с использованием анализатора микроскопических изображений, показали, что у сапфировых норок укрупненные, разной величины гранулы характерны для всех эозинофилов (рис. 1в). В них за редким исключением нарушается принцип

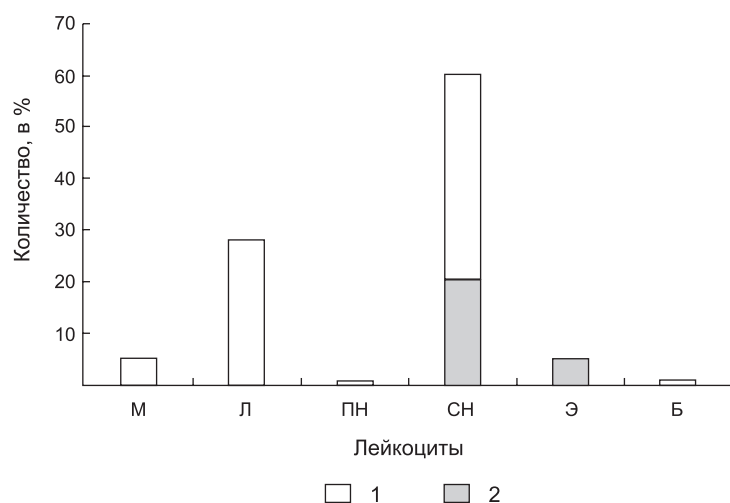


Рис. 2. Лейкоцитарная формула и относительное содержание аномальных лейкоцитов в крови норок сапфировой окраски (*a/a p/p*).

М – моноциты, Л – лимфоциты, ПН – палочкоядерные нейтрофилы, СН – сегментоядерные нейтрофилы, Э – эозинофилы, Б – базофилы, 1 – нормальные клетки, 2 – лейкоциты с дефектом гранул.

равномерного распределения специфических гранул, возможно, обусловленный отклонениями в структуре мембран или микротубулярного аппарата (Лизосомы..., 1984; Клиническая иммунология..., 1990). Степень гранулярного расстройства в эозинофилах у отдельных особей и в различных клетках одного животного не одинакова. Лишь единичные из эозинофилов имеют равномерно расположенные, в том числе и достаточно крупные гранулы. По расположению и другим свойствам, в частности, отсутствию видимых в световом микроскопе морфологических признаков слияния гранул такие клетки ближе всего к нормальным. Это свидетельствует о том, что не все гранулы дефектны, часть из них сохраняет небольшие размеры.

Количество гранул в эозинофилах сапфировой норки, исходя из результатов компьютерной морфометрии, изменяется в широких пределах: от 1 до 43, составляя в среднем 14,6 на один эозинофил (табл. 1). Они чрезвычайно варьируют по величине, а иногда и по форме. В частности, ширина гранулы колеблется от 0,23 до 3,38 мкм, длина – от 0,27 до 6,55 мкм. Различия настолько велики, что максимальная площадь превышает минимальную более чем в 250 раз. Для сравнения укажем, что в эозинофилах человека определяется до 20 гранул с диаметром 0,5–1,0 мкм, лошади 25–50 гранул, диаметр которых равен преимущественно 1 мкм. В эозинофилах крыс насчитывается до 400 гранул,

диаметр каждой около 0,2 мкм (Последние достижения..., 1983).

Видоизмененные, укрупненные гранулы, окрашенные в розово-оранжевый цвет, встречаются также в нейтрофилах сапфировых норок, но не во всех (рис. 1е). Относительное содержание нейтрофильных лейкоцитов в лейкоформуле у норок этого генотипа составляло в среднем 60,1 %. Из них 19,2 % содержали дефектные гранулы, которые хорошо выделяются на фоне почти прозрачной цитоплазмы и отличаются от едва заметной пылевидной зернистости, характерной для нейтрофилов стандартных и серебристо-голубых норок. Количество их в нейтрофильных лейкоцитах по сравнению с эозинофилами невелико и колеблется от 1 до 6 мкм², составляя в среднем 2,2 мкм², а занимаемая ими суммарная площадь равняется в среднем 2,06 мкм².

Менее существенные отклонения зафиксированы в лимфоцитах, в которых очень редко определяются единичные гранулы. В моноцитах не удалось установить специфических для синдрома нарушений, хотя согласно литературным данным все клетки крови аномальны (Fagerland *et al.*, 1987). Оценка дефекта базофилов затруднительна ввиду незначительного количества их в крови. Базофилы у сапфировых норок содержат довольно крупные, округлой формы, близкие по размеру гранулы, имеющие различную окраску – от фиолетовой до почти черной.

Таблица 1

Параметры гранул лейкоцитов крови норок сапфировой окраски

Исследуемые параметры	Эозинофильные лейкоциты			Сегментоядерные лейкоциты		
	M ± m	min	max	M ± m	min	max
Всего, шт.	761			379		
Количество в одной клетке, шт.	14,63 ± 1,40	1,00	43,00	2,15 ± 0,09	1,00	6,00
Площадь одной гранулы, мкм ²	1,33 ± 0,05	0,04	11,14	0,96 ± 0,03	0,16	5,85
Площадь суммарная, мкм ²	19,42 ± 1,05	3,89	36,14	2,06 ± 0,08	0,32	5,85
Длина, мкм	1,44 ± 0,03	0,27	6,55	1,14 ± 0,02	0,46	3,25
Ширина, мкм	1,06 ± 0,02	0,23	3,38	0,94 ± 0,02	0,36	2,62
Фактор формы круга, отн. ед.	0,93 ± 0,00	0,31	1,00	0,99 ± 0,00	0,55	1,00
Фактор формы эллипса, отн. ед.	0,98 ± 0,00	0,01	1,00	0,99 ± 0,00	0,10	1,00
Округлость, отн. ед.	0,71 ± 0,01	0,16	1,00	0,84 ± 0,01	0,29	1,00
Удлиненность, отн. ед.	1,36 ± 0,01	0,62	4,13	1,22 ± 0,01	0,99	3,12

Создается впечатление, что аномальные цитоплазматические включения формируются за счет агрегации гранул и последующего слияния, причем в некоторых случаях хорошо видны границы между ними, в других они отсутствуют. В литературе высказывается предположение, что патология внутриклеточных органелл возникает вследствие ненормального гранулогенеза на уровне аппарата Гольджи или эндоплазматической сети (Роговин и др., 1977). По некоторым данным, у лис с признаками патологического синдрома относительный клеточный объем, занимаемый аномальными гранулами, не отличается от такового в норме, несмотря на их объединение в конгломераты (Fagerland *et al.*, 1987).

На рис. 3 продемонстрированы изменения величины гранул эозинофильных лейкоцитов у сапфировых норок. Площадь одной гранулы в среднем существенно не изменяется, если внутриклеточное содержание их больше 10 и существенно возрастает, если меньше 10, т. е. при аномальном укрупнении (рис. 3а). Суммарная же площадь, несмотря на объединение

гранул, при максимальной степени дефекта уменьшается (рис. 3б). Возможно, что формирование «гигантских гранул» сопровождается сложными метаболическими превращениями. По мнению В.В. Роговина и др. (1977), в основе нарушений может быть гиперавтофагия, приводящая к расстройству работы клеточных органелл и их секреторной активности.

Литературные данные свидетельствуют, что аномальная структура гранул приводит к дисфункции лейкоцитов (Учитель, 1978). Это подтверждает факт ослабления у сапфировых норок хемотаксического ответа на стимул, по-видимому, вследствие их ригидности (Clark *et al.*, 1972). Как известно, кровь является только транспортной системой для большинства лейкоцитов, которые способны скапливаться в пограничных областях контакта с микрофлорой: в клетках кожи, легких, желудочно-кишечного тракта, матки (Роговин и др., 1977). Жесткая структура, связанная с наличием «гигантских гранул», может усложнить продвижение клеток в ткани, где осуществляется их основная, метаболическая, функция.

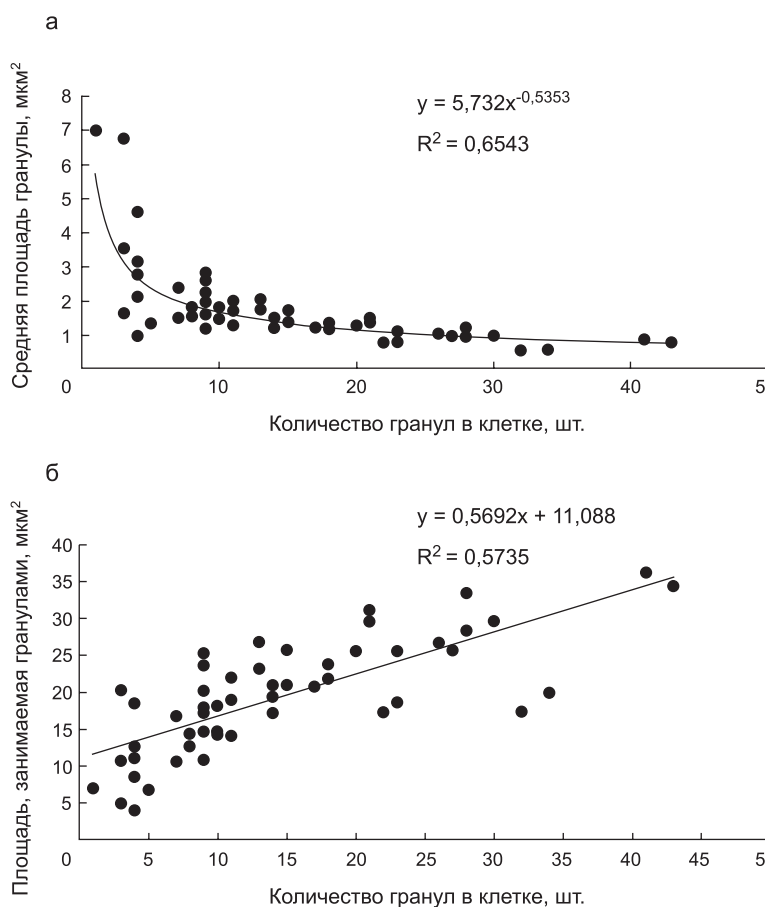


Рис. 3. Зависимость между количеством гранул и средней площадью одной гранулы (а) и занимаемой ими суммарной площадью (б) в эозинофильных лейкоцитах крови норок сапфировой окраски.

На рисунке приведены соответствующие уравнения регрессии.

У человека и животных с СЧХ наблюдается снижение устойчивости к инфекции. Установлено, что хотя процесс поглощения патогенов происходит нормально, дефектные гранулы не сливаются с фагоцитарной вакуолью. Вопрос о повышенной восприимчивости сапфировых и алеутских норок к вирусному плазмодитозу и ее зависимости от повреждения лейкоцитов остается невыясненным. Отрицательное влияние сублетального гена алеутской окраски на иммунореактивность выявлено и для других цветовых форм. Кроме сапфировой (*a/a p/p*) и алеутской норки (*a/a*), известны и другие комбинативные окрасочные формы норки, содержащие в гомозиготном состоянии ген алеутской окраски, лейкоциты которых содержат аномальные гранулы. К ним относятся норки: лавандовая (*m/m a/a*), голубой ирис (*a/a ps/ps* или *a/a p/ps*), фиолетовый (*m/m a/a p/p*), зимняя голубая (*b/b a/a p/p*), хоуп (*r/r a/a p/p*), жемчужная, или перл тройной (*k/k a/a p/p*) и др. (Padgett *et al.*, 1964).

Норки этих генотипов отсутствуют в природе, отличаются малыми размерами тела, низкими репродуктивными качествами, высокой эмбриональной смертностью и, как правило, очень трудно разводятся в неволе. Если пониженную антиинфекционную устойчивость можно объяснить дисфункцией лейкоцитов, то остальные аспекты этой проблемы можно рассматривать с точки зрения системного поражения клеточных органелл. Имеющиеся данные показывают, что при этом синдроме не только в клетках крови, но в других паренхиматозных тканях печени, почек, щитовидной железы обнаружены аномальные секреторные гранулы (Роговин и др., 1977). Например расстройство регуляции транспорта лизосом у так называемых транспортных депигментированных мутантных мышей вызывает существенное снижение экскреции лизосомальных ферментов и аккумуляции их в почках (Лизосомы..., 1984; Ozaki *et al.*, 1994).

Таким образом, у норки сапфировой окраски (*a/a p/p*) по сравнению со стандартными темно-коричневыми (+/+) и серебристо-голубыми (*p/p*) выявлены особенности субклеточной структуры лейкоцитов, заключающиеся в формировании аномально крупных гранул. Патология гранулярного аппарата наблюдается в эозинофилах, значительной части нейтрофилов

и реже в лимфоцитах и моноцитах. Степень выраженности нарушений в отдельных лейкоцитах и у отдельных особей различна. С этим генетическим дефектом может быть связано снижение жизнеспособности и устойчивости сапфировых норок к ряду заболеваний, в частности к вирусному плазмодитозу. Полученные данные свидетельствуют о том, что некоторые мутации генов, определяющих окраску кожных покровов, могут изменять морфофункциональные особенности лейкоцитов.

Литература

- Зверева Л.П., Беляев Д.К. Фенотипический анализ пигментации у мутантов американской норки (*Mustela vison* Schr.). Сообщение I. Эффект мутаций стальной-голубой, серебристо-голубой и их компаунда на распределение пигмента в волосе // Генетика. 1976. Т. XII. № 2. С. 97–103.
- Зверева Л.П., Беляев Д.К., Привалова Г.Н. Фенотипический анализ пигментации у мутантов американской норки (*Mustela vison* Schr.). Сообщение II. Эффект мутации алеутская и взаимодействия генов алеутской и серебристо-голубой окраски в генотипе сапфировых норок. Влияние фактора «стюарт» на пигментацию волоса // Генетика. 1976. Т. XII. № 2. С. 104–109.
- Ивантер Э.В., Коросов А.В. Введение в количественную биологию. Петрозаводск, 2004. 303 с.
- Клиническая иммунология и аллергология / Под ред. Л. Йегера. М.: Медицина, 1990. Т. 1. С. 381–382.
- Лизосомы и лизосомные болезни накопления / Под ред. Дж.В. Каллахана, Дж.А. Лоудена. М.: Медицина, 1984. С. 21–22.
- Масчан А.А., Богачева Н.Ю., Куликова О.В. и др. Гемофагоцитарный лимфогитиоз при синдроме Чедиака-Хигаси // Гематология и трансфузиология. 1997. Т. 42. № 2. С. 44–47.
- Последние достижения в клинической иммунологии / Под ред. Р.А. Томпсона. М.: Медицина, 1983. С. 159–200.
- Роговин В.В., Пирузян Л.А., Муравьев Р.А. Пероксидазосомы. М.: Наука, 1977. С. 108–110.
- Справочник по клиническим лабораторным методам / Под ред. Е.А. Кост. М.: Медицина, 1975. С. 38–46.
- Учитель И.Я. Макрофаги и иммунитет. М.: Медицина, 1978. С. 36.
- Bell T.G., Padgett G.A., Patterson W.R. *et al.* Prolonged bleeding time in Aleutian mink associated with a cyclooxygenase – independent aggregation defect and nucleotide deficit in blood platelets // Am. J. Vet. Res. 1980. V. 41. № 6. P. 910–914.

- Clark R.A., Kimball H.R., Padgett G.A. Granulocyte chemotaxis in the Chediak-Higashi syndrome of mink // *Blood*. 1972. V. 39. № 5. P. 644–649.
- Fagerland J.A., Hagemoser W.A., Ireland W.P. Ultrastructure and stereology of leukocytes and platelets of normal foxes and a fox with a Chediak-Higashi-like syndrome // *Vet. Pathol.* 1987. V. 24. № 2. P. 164–169.
- Kahraman M.M., Prieur D.L. Chediak-Higashi syndrome: prenatal diagnosis by fetal blood examination in the feline model of the disease // *Am. J. Med. Genet.* 1989. V. 32. № 3. P. 325–329.
- Leader R.W., Padgett G.A., Gorham J. R. Studies of abnormal leukocyte bodies in the mink // *Blood*. 1963. V. 2. № 4. P. 477–484.
- Meyers K.M., Holmsen H., Seachord C.L. *et al.* Characterization of platelets from normal mink and mink with the Chediak-Higashi syndrome // *Am. J. Hematol.* 1979. V. 7. № 2. P. 137–146.
- Ozaki K., Maeda H., Nishikama T. *et al.* Chediak-Higashi syndrome in rats: light and electron microscopical characterization of abnormal granules in beige rats // *J. Comp. Pathol.* 1994. V. 110. № 4. P. 369–379.
- Padgett G.A., Leader R.W., Gorham J.R., O'Mary C.C. The familial occurrence of the Chediak-Higashi syndrome in mink and cattle // *Genetics*. 1964. № 49. P. 505–512.
- Sjaastad O.V., Blom A.K., Stormorken H., Nes N. Adenine nucleotides, serotonin, aggregation properties of blue foxes (*Alopex lagopus*) with the Chediak-Higashi syndrome // *Am. J. Med. Genet.* 1990. V. 35. № 3. P. 373–378.
- Yamakuchi H., Agaba M., Hirano T. *et al.* Chediak-Higashi syndrome mutation and genetic testing in Japanese black cattle (Wagyu) // *Animal Genet.* 2000. № 31. P. 13–19.

THE SPECIFICITIES OF BLOOD LEUKOCYTE STRUCTURE IN THE MINKS WITH VARIOUS GENOTYPES

L.B. Uzenbaeva, A.G. Golubeva, V.A. Ilukha, N.N. Tutuyunnik

Institute of Biology, Karelian Scientific Center of RAS, Petrozavodsk, Russia,
e-mail: ilyukha@bio.krc.karelia.ru

Summary

The specificities of leukocyte subcellular structure in the sapphire minks (*a/a p/p*) are the formation of abnormal giant granules in comparison with silver blue (*p/p*) and standard deep-brown minks (*+/+*). The considerable variety of abnormality degree in different leukocyte and between individuals was established. The article considers the problem of interaction between abnormal structure and reduced viability in sapphire minks.