

СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ФОРМЫ ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ

© Ю. П. Петров,^{1,*} И. Э. Степанян²¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, и² Научный центр зоологии и гидроэкологии НАН Республики Армения, Ереван;

* электронный адрес: yure3ov@mail.ru

Общепринято считать, что форма ядерных эритроцитов некоторых позвоночных — эллипс. Тем не менее формального доказательства этому нет. В работе представлены экспериментальные данные и теоретические расчеты, позволяющие утверждать, что форма ядерных эритроцитов как математическое ожидание формы — действительно эллипс. Кроме этого, показано, каковы на практике допустимые пределы отклонения формы этих клеток от эллипса. На основании представленных данных предложен параметр для оценки соответствия реальной формы клетки правильному эллипсу, названный «коэффициентом эллипсовидности». Он численно равен соотношению реальной площади проекции эритроцита на подложку (A) и его расчетной площади (S), полученной путем прямого измерения большой (M) и малой (m) осей реального эритроцита. Предполагается, что этот параметр может быть использован в систематике позвоночных животных, имеющих ядерные эритроциты.

Ключевые слова: ядерный эритроцит, эллипс, коэффициент эллипсовидности.

В систематике для оценки видовой принадлежности животных используют морфологические, физиологические, биохимические, генетические, геномные и другие особенности организма. Однако видовые различия могут проявляться также и на клеточном уровне. В этом случае удобно использовать клетки крови, в частности эритроциты. По сравнению с другими клетками многоклеточных организмов эритроциты легко доступны для исследования, и их характеристики давно используют в систематике низших позвоночных животных (Hartman, Lessler, 1964; Jerrett, Mays, 1973; Varaquet et al., 2013). Эритроциты некоторых позвоночных животных (рыб, амфибий, рептилий) характеризуются, например, видоспецифичностью размеров (Mueller et al., 2008; Kozłowski et al., 2010).

Как известно, особенностью эритроцитов этой большой группы позвоночных животных кроме наличия ядра является форма, визуально оцениваемая как эллипс. Постоянство формы этих клеток, надо полагать, связано со стабильностью их внутреннего строения, в первую очередь подмембранного цитоскелета (Gratzer, 1981; Joseph-Silverstein, Cohen, 1984; Chakrabarti et al., 2006; Yau et al., 2012). Однако можно предположить и то, что устойчивое состояние клеточной формы эритроцитов может иметь индивидуальные особенности у каждой отдельной особи одного и того же вида. Прежде чем утверждать наличие индивидуальных особенностей эритроцитов отдельных особей, следует ответить на два вопроса. 1. Действительно ли форма ядерных эритроцитов — это геометрически правильный эллипс? 2. Можно ли оценивать эти эритроциты по степени отклонения их формы от правильного эллипса и каковы пределы этих отклонений? Дать ответ на эти вопросы — задача настоящей работы.

Материал и методика

В качестве объектов исследования были использованы эритроциты лягушек из рода *Pelophylax* Fitzinger, 1843 и рыб из рода *Capoeta* Valenciennes, 1842. Животные были отловлены в 2015 г. в Армении. Озерные лягушки (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) были собраны в окр. с. Дсех Лорийского р-на (2 особи), куринские храмули (*Capoeta capoeta* Gueldenstaedt, 1773) отловлены в том же районе из р. Дебед (3 особи).

Препараты эритроцитов готовили по обычной методике, делая мазок крови на обезжиренном предметном стекле. Препараты высушивали на воздухе, фиксировали 100%-ным метанолом, затем окрашивали 2%-ным красителем Гимза. Цифровые изображения клеток получали с помощью светового микроскопа, оборудованного фотокамерой CANON EOS 600D, объективом 20× и окулярной линзой 1.5× между объективом и фотонасадкой. Изображения получали в формате JPEG с разрешением 5184×3456 пикселей. Среднее число анализируемых эритроцитов на каждую особь составляло 300—400.

Сравнительный анализ клеток и статистическую обработку данных проводили с помощью программ ImageJ 1.48v (Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, США, <http://imagej.nih.gov/ij/>), Excel 2013 (MS Corporation, США) и Origin 6.1 (OriginLab Corporation, США). Параметры, используемые для анализа клеток: площадь проекции клетки на подложку (Area, A — площадь клетки) и соотношение длинной (M) и короткой (m) осей эллипса, рассчитываемых автоматически программой ImageJ при оконтуривании клеток. Это соотношение, ранее обозначенное нами как «коэффициент

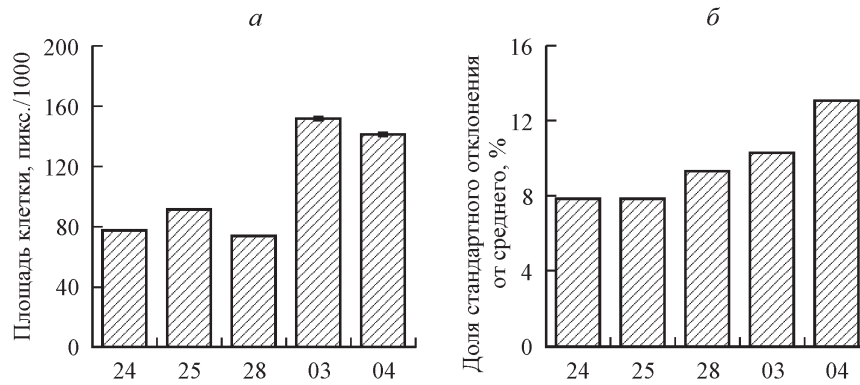


Рис. 1. Средняя площадь эритроцитов трех особей (24, 25 и 28) храмули и двух особей (03 и 04) лягушки (а) и доля стандартных отклонений от соответствующих средних значений (б).

Объяснение см. в тексте.

поляризации» (Петров, Цупкина, 2016), характеризует степень вытянутости клеток в культуре. Поляризация эритроцитов в отличие от культивируемых клеток (особенно фибробластоподобных) выражена в меньшей степени, поэтому для их характеристики удобнее использовать значения натурального логарифма соотношения M/m ($\ln(M/m)$). Поскольку для решения поставленной задачи не было необходимости анализировать абсолютные размеры клеток, а все цифровые изображения были выполнены при одном и том же разрешении, результаты измерения клеток оставлены в пикселях.

Результаты

Перед анализом эллипсоидной формы эритроцитов было проведено их сравнение по общепринятым параметрам. На рис. 1, а представлены средние значения площади эритроцитов. Видно, что эритроциты лягушек приблизительно в 1.5 раза крупнее эритроцитов рыб. Однако в данном случае более важным нам кажется то, что размер эритроцитов индивидуален у каждой особи ($p < 0.05$), о чем свидетельствует очень небольшая величина ошибки среднего значения данного параметра у отдельных особей.

Так как мы полагаем, что величина площади эритроцита описывается нормальным распределением, важно знать не только ее среднее значение, но и стандартное от-

клонение, характеризующее степень дисперсии выборки. Поскольку значение стандартного отклонения может расти с увеличением среднего значения, корректнее сравнивать относительные величины стандартных отклонений разных выборок. Рис. 1, б показывает, какую долю стандартные отклонения составляют от соответствующих средних значений площади, представленных на рис. 1, а. Таким образом, можно видеть, что дисперсия средних значений площади эритроцитов у лягушек выше, чем у рыб. Поскольку в данном случае численность выборок по видам (3 и 2 особи) недостаточна, говорить здесь о видовых различиях не имеет смысла.

Кроме площади для морфометрической характеристики эритроцитов используют соотношение их длинной и короткой осей — M/m . Средние значения этого параметра (взятые как натуральный логарифм) представлены на рис. 2, а. Видно, что и по этому параметру все пять особей индивидуальны. Следует обратить внимание, что в отличие от площади клетки дисперсия параметра M/m больше у эритроцитов рыб, чем у лягушек (рис. 2, б).

Несмотря на то что, согласно общепринятому мнению, форма ядерных эритроцитов считается эллипсоидной, нет работ, в которых было бы показано, действительно ли реальная форма этих клеток соответствует идеальному эллипсу. Можно предположить, что если существуют индивидуальные (видовые и т. д.) различия эритроцитов по их морфофункциональным или биохими-

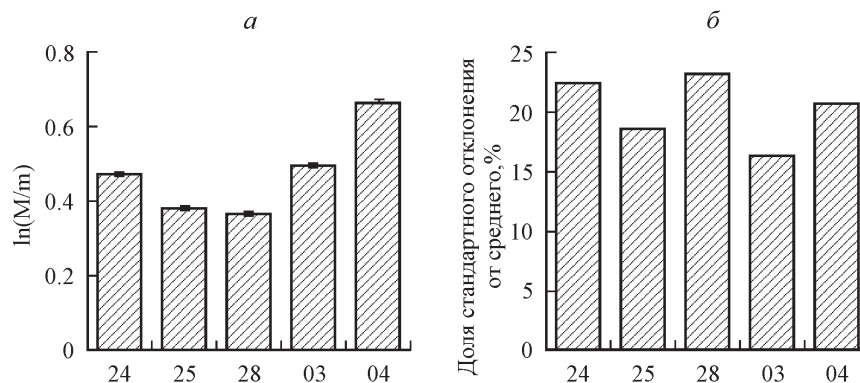


Рис. 2. Сравнение коэффициентов M/m трех особей (24, 25 и 28) храмули и двух особей (03 и 04) лягушки (а); доля стандартного отклонения от среднего значения (б).

Объяснение см. в тексте.

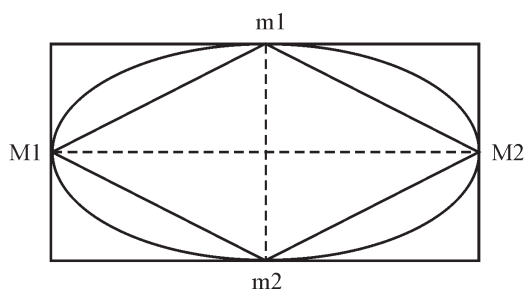


Рис. 3. Сравнение эллипса, прямоугольника и ромба с одинаковыми параметрами для расчета площади.

Объяснение см. в тексте.

ческим характеристикам, они в той или иной мере могут влиять на степень отклонения формы эритроцитов от геометрически правильного эллипса.

Для формализации морфологических особенностей эллипсоидных эритроцитов мы предлагаем ввести параметр, который можно обозначить как «коэффициент эллипсоидности». Формально он показывает соотношение реальной площади проекции эритроцита на подложку (A) и его расчетной площади (S), полученной путем прямого измерения большой (M) и малой (m) осей реального эритроцита. Таким образом, коэффициент эллипсоидности имеет вид A/S . Чтобы была понятнее суть этого коэффициента, поясним, какие предпосылки лежат в основе введения данного параметра.

Рассчитать значения A/S можно с помощью программы ImageJ. При оконтуривании клетки вручную программа автоматически измеряет (в пикселях) ее реальную площадь (A) и периметр (P). Одновременно по A и P она вычисляет значения длинной (M) и короткой (m) осей эллипса. Следовательно, эти величины являются производными (расчетными) от непосредственно измеренных величин площади (A) и периметра (P). Это стандартная процедура решения системы линейных уравнений с использованием математических формул для A и P эллипса. Нетрудно представить, что для клеток любой формы (даже не эллипсоидных), но равных по площади и периметру, расчетные значения осей эллипса будут одинаковыми. Чтобы получить реальные значения длин осей для данного эритроцита, их надо измерять (вручную) отдельно, после чего рассчитывать площадь эллипса S , а далее коэффициент A/S .

Отклонения формы клетки от геометрически правильного эллипса наглядно демонстрирует схема, представленная на рис. 3. Нетрудно заметить, что отрезки $M1M2$ и $m1m2$ численно равны не только длинной и короткой осям эллипса, но также сторонам прямоугольника и диагоналям ромба. При этом эллипс вписан в прямоугольник, а в сам эллипс — ромб. Очевидно, что площади данных фигур рассчитываются по разным формулам, но через одни и те же величины длин отрезков $M1M2$ и $m1m2$. Далее можно показать, что соотношение площадей данных ромба, эллипса и прямоугольника будет соответственно равно $0.64 : 1 : 1.27$, если за 1 взять площадь эллипса. Таким образом, чем ближе коэффициент A/S к 1, тем в большей степени форма реальной клетки соответствует правильному эллипсу. При уменьшении этого значения ниже 1 форма клетки будет напоминать ромб, при увеличении — прямоугольник.

Поскольку в настоящей работе впервые вводится понятие коэффициента эллипсоидности эритроцитов, следует уточнить дополнительные методические особенности его расчета. Несмотря на то что программа ImageJ, как и подобные ей программы, позволяет измерять площадь объектов в автоматическом режиме, мы предпочитаем оконтуривать клетки вручную. Конечно, это не только вносит элемент субъективности при получении данных, но и снижает их точность. Однако для использования автоматического режима оконтуривания необходимо иметь идеально выполненные препараты (без посторонних оптических включений, отсутствия градиента яркостей по периферии клетки, отличного от фона, и т. п.). В реальности достичь такого качества препаратов практически невозможно. Естественно, ручное измерение площади клеток вносит дополнительный «шум» в конечные значения средних величин. Обычно точность получаемых значений средних величин относительно их математических ожиданий можно повысить, увеличивая выборку. Однако это правило имеет и исключения. Нетрудно представить, что никакой размер выборки и никакая предельная аккуратность ручного оконтуривания не позволят получить средние значения, в точности равные величинам периметров (не площадей) любых геометрически правильных фигур, в частности эллипса. Получаемые значения всегда будут превышать(!) идеальные на некую предельную величину. Из этого следует, что расчетные значения M и m всегда будут выше реальных величин. Значением получаемой ошибки можно, конечно,

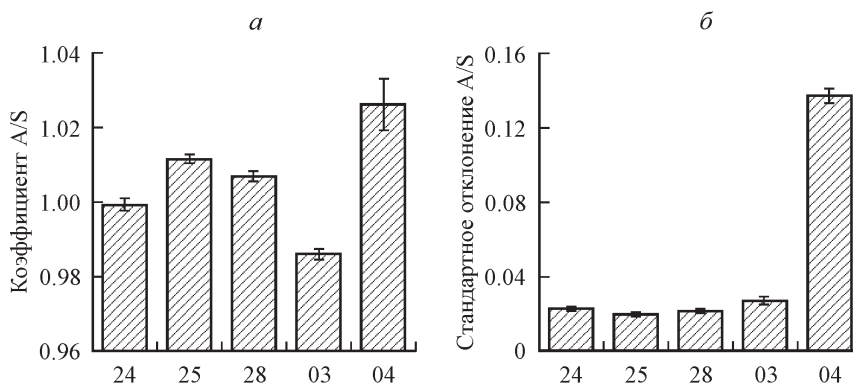


Рис. 4. Сравнение коэффициента эллипсоидности A/S (а) и его стандартного отклонения (б) трех особей (24, 25 и 28) храмули и двух особей (03 и 04) лягушек.

Представлены средние значения и их ошибки.

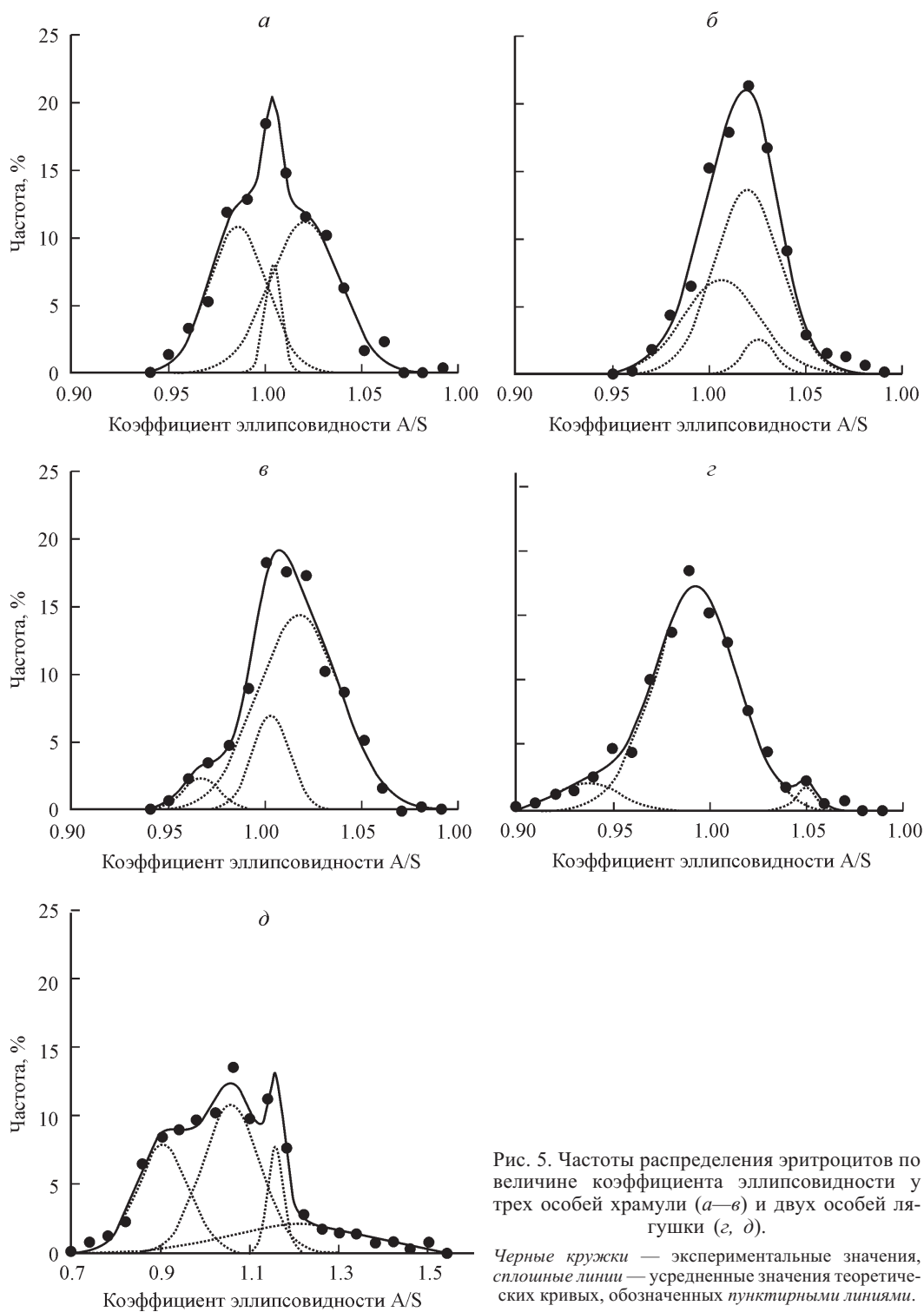


Рис. 5. Частоты распределения эритроцитов по величине коэффициента эллипсовидности у трех особей храмули (а—в) и двух особей лягушки (г, д).

Черные кружки — экспериментальные значения, сплошные линии — усредненные значения теоретических кривых, обозначенных пунктирными линиями.

пренебречь, если сравнивать форму клеток только между собой. Если же по тем или иным причинам (например, при сравнении с идеальной геометрической формой) подобный «шум», вносимый в расчеты, следует учитывать, то необходимо рассчитать, какова в реальности эта предельная ошибка разности между расчетным и идеальным значением данного параметра.

Для этого в одном из полей зрения с использованием программы ImageJ нами были нарисованы эллипсы (50 шт.) произвольного размера, но соизмеримые с разме-

ром эритроцитов. Одновременно с помощью указанной программы были определены площади и длины осей этих правильных геометрических фигур. Эти значения были взяты как математические ожидания. Затем эти эллипсы, как и эритроциты, были оконтурены вручную (получены значения площади A) и вручную же измерены оси M и m , значения длин которых были использованы для расчета площади эллипсов (S). В результате для данной (контрольной) выборки были получены средние значения площади идеальных эллипсов, равное 104 259 пикселей, пло-

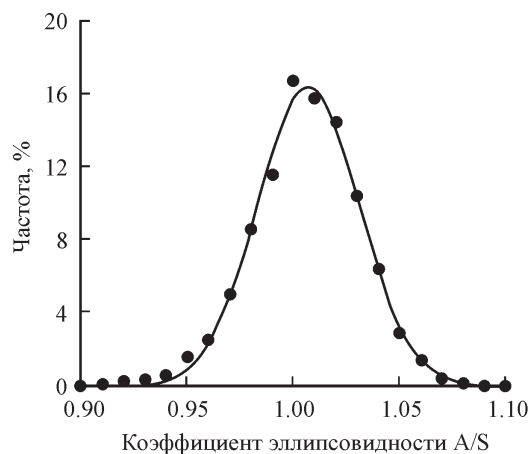


Рис. 6. Гистограмма частот распределения коэффициента эллипсовидности A/S, полученная при объединении экспериментальных данных, представленных на рис. 5, а—г.

Темные кружки — экспериментальные значения, сплошная линия — расчетные значения. Объяснение см. в тексте.

щади оконтуренных эллипсов (A), равное 104 645 пикселей, и площади расчетных эллипсов (S), равное 103 087 пикселей. Разделив значения идеальной площади на значения A и S, можно получить соответствующие поправочные коэффициенты — 0.9963 и 1.0114. Несмотря на казалось бы незначительные отличия этих коэффициентов от 1, нельзя не учитывать эти отклонения при анализе соответствия реальной формы эритроцитов идеальному эллипсу.

С использованием полученных поправочных коэффициентов значения A и S были скорректированы для каждого измеренного эритроцита, после чего вычислены их коэффициенты эллипсовидности A/S. Данные по средним значениям A/S представлены на рис. 4, а. Несмотря на весьма небольшие отличия коэффициентов A/S от 1, что само по себе указывает на очень близкое соответствие формы эритроцитов эллипсу, проанализированные клетки отличаются друг от друга по данному параметру ($p < 0.05$). Этот факт также указывает на индивидуальные особенности эритроцитов каждой особи. Представление о степени разброса значений коэффициента A/S дает рис. 4, б. Видно, что у одной из особей этот параметр характеризуется очень высокой дисперсией.

Более точное представление о дисперсии коэффициента эллипсовидности может дать построение гистограмм распределения. На рис. 5 представлены эти данные для каждой из проанализированных особей. Не анализируя детально каждую диаграмму, отметим главное. Форма каждой гистограммы индивидуальна, что можно расценивать как признак индивидуальности эритроцитов отдельных особей. Каждая диаграмма демонстрирует наличие не менее трех относительно автономных подгрупп эритроцитов. Такие группы отмечены *пунктирными линиями*, на основании которых построены обобщенные (суммарные) кривые распределения (*сплошные линии*).

Анализируя эти данные, можно заметить, что разброс значений по горизонтали на первых четырех графиках (рис. 5, а—г) примерно одинаков, что позволяет построить изображения в системе координат с одной и той же размерностью, тогда как на последнем (рис. 5, д) этот разброс более значителен (от 0.7 до 1.5). Формально это яв-

ляется результатом высокой дисперсии (см. рис. 4, б). Однако фактически подобный разброс значений не может соответствовать действительности, поскольку, как упоминалось выше, значения коэффициента эллипсовидности находятся только в пределах от 0.64 до 1.27. Это означает, что его изменения нелинейны. Тем не менее любую зависимость на коротких отрезках ее кривых всегда можно рассматривать как приблизительно линейную. Иными словами, чем ближе реальные значения A/S к 1, тем в большей степени они соответствуют величине математического ожидания коэффициента эллипсовидности. Поэтому более адекватно сравнивать только те данные, разброс которых не превышает возможных теоретических пределов (0.64—1.27) (рис. 5, а—г). Несмотря на то что они указывают на индивидуальность отдельных особей по параметру A/S, их можно объединить, поскольку они лежат в одних и тех же пределах горизонтальной оси (от 0.9 до 1.1). Если взять средние значения частот этих выборок, то получится гистограмма, изображенная на рис. 6.

Как видно, экспериментальные значения очень хорошо (коэффициент корреляции $R = 0.997$) описываются кривой нормального распределения с пиком, соответствующим значению коэффициента эллипсовидности 1.007 ± 0.012 . Поскольку это значение достоверно не отличается от 1, можно считать доказанным, что реальная форма среднего ядерного эритроцита действительно соответствует геометрически правильному эллипсу.

Обсуждение

История анализа размера эритроцитов позвоночных, в том числе и рыб, насчитывает более 100 лет (Hartman, Lessler, 1964). Измерение длины, ширины и их соотношения у ядерных эритроцитов — процедура рутинная. Эти параметры используются как отличительные признаки при сравнении эритроцитов с другими клетками крови (Radhakrishnam et al., 1976; Dove et al., 2010; Çiçek et al., 2015). Обычна и процедура сравнения объема (или площади) эритроцита и его ядра, рассчитанного после измерения их длины и ширины (Emiroglu et al., 2012). В ряде исследований показано различие между объемом ядер диплоидных и триплоидных эритроцитов (Woznicki, Kuzminski, 2002; Flajshans et al., 2011; Kizak et al., 2013). Размер эритроцита — чувствительный видовой параметр. Показано, например, что у некоторых рыб размеры эритроцитов могут быть различны у самцов и самок (Gayatri, Prafulla, 2014). Есть данные о видовых различиях эритроцитов рыб. В недавно проведенном исследовании были проанализированы размеры этих клеток у 11 видов морских рыб (Yilmaz et al., 2015). Авторы считают, что такие параметры эритроцитов, как длина, ширина и их соотношение, видоспецифичны, а форма этих клеток зависит от состояния гемоглобина. Однако в части случаев, приводимых авторами, данные по размеру эритроцитов не столь убедительны, скорее всего из-за недостаточной выборки.

Большинство работ, в которых проводятся различные скрининговые исследования, имеет прикладной характер, поэтому в них, как правило, используют небольшие выборки как особей, так и клеток, при этом акцент делается на анализ размера клетки. Мы в своей работе в большей степени ориентировались на анализ формы клеток, а также использовали большие выборки клеток для регистрации небольших различий между ними.

Размер ядерных эритроцитов принято характеризовать путем измерения их длины и ширины с последующим вычислением их площади (объема), априори полагая, что эти клетки имеют форму правильного эллипса. Строго говоря, это не очевидно и требует экспериментального подтверждения. Большая выборка и ее тщательный анализ с использованием предложенного нами коэффициента эллипсовидности A/S позволили доказать, что в идеале форма ядерных эритроцитов действительно соответствует геометрически правильному эллипсу. Отклонения от этой формы, напротив, специфичны для отдельных особей.

Высокая степень соответствия формы эритроцитов правильной геометрической фигуре (эллипсу) свидетельствует о том, что она должна поддерживаться высокоупорядоченными и стабильными клеточными структурами. В поддержании эллипсовидной формы ядерных эритроцитов участвуют микротрубочки (Joseph-Silverstein, Cohen, 1984). Известно, что подмембранный цитоскелет эритроцитов человека образует сеть, основными компонентами которой являются спектрин и короткие фрагменты полимерного актина (Gratzer, 1981; Chakrabarti et al., 2006; Yau et al., 2012). Эта сеть, связанная с плазматической мембраной, детерминирует форму эритроцитов. Немногочисленные данные о цитоскелете ядерных эритроцитов указывают, что его архитектура во многом сходна с упорядоченностью подмембранного цитоскелета эритроцитов человека (Joseph-Silverstein, Cohen, 1984; Centonze et al., 1986; Скоркина и др., 2011; Чернявских и др., 2012).

Так же как и в медицине, морфологическим особенностям эритроцитов уделяется большое внимание и в ветеринарии. Обычно в эритроцитах обнаруживают различные включения, но есть данные о том, что при некоторых патологиях ядерные эритроциты могут изменять свою форму с овальной на веретеновидную (Pendl, 2006). Согласно нашей терминологии, это означает сдвиг формы в сторону ромба. Надо полагать, что какими бы ни были причины (патологические или физиологические) этого явления, в конечном счете его можно рассматривать как естественную (типичную) реакцию эритроцитов. Иными словами, нельзя исключить, что на разнообразные воздействия эритроцит отвечает переходом от эллипсовидной формы к ромбовидной (веретеновидной).

Коэффициент эллипсовидности чувствителен к отклонениям от идеальной формы, поэтому может быть полезным в тех случаях, когда нет видимых изменений формы эритроцитов. Таким образом, можно надеяться, что предлагаемый методический подход для оценки формы эллипсовидных эритроцитов будет востребован при различных аналитических исследованиях этих клеток у представителей некоторых видов позвоночных животных.

Список литературы

- Петров Ю. П., Цупкина Н. В. 2016. Морфологические особенности клеток линии NCTC клон 929 через 1 сут после посева. Цитология. 58 (1) : 35—43. (Petrov Yu. P., Tsupkina N. V. 2012. Morphology of NCTC cells one days after reseeding. Tsitologiya. 58 (1) : 35—43.)
- Скоркина М. Ю., Федорова М. З., Чернявских С. Д., Забиняков Н. А., Сладкова Е. А. 2011. Сравнительная оценка морфофункциональных характеристик нативных и фиксированных эритроцитов. Цитология. 53 (1) : 17—21. (Skorkina M. Yu., Fedorova M. Z., Chernyavskiy S. D., Zabin'yakov N. A., Sladkova E. A. 2011. Comparative estimation of morphofunction characteristics alive and fixed erythrocytes. Tsitologiya. 53 (1) : 17—21.)
- Чернявских С. Д., Федорова М. З., Во Ван Тхань, До Хыу Куэт. 2012. Перестройка актинового цитоскелета ядерных эритроцитов и лейкоцитов у рыб, лягушек и птиц при миграции. Цитология. 54 (5) : 412—416. (Chernyavskiy S. D., Fedorova M. Z., Vo Van Thanh, Do Huu Quyet. 2012. The reorganization of the actin cytoskeleton of nuclear erythrocytes and leukocytes in fish, frogs and birds during cell migration. Tsitologiya. 54 (5) : 412—416.)
- Baraquet M., Grenat P. R., Salas N. E., Martino A. L. 2013. Intraspecific variation in erythrocyte sizes among populations of *Hypsiboas cordobas* (Anura: Hylidae). Acta Herpetologica. 8 : 93—97.
- Centonze V. E., Ruben G. C., Sloboda R. D. 1986. Structure and composition of the cytoskeleton of nucleated erythrocytes. III. Organization of the cytoskeleton of *Bufo marinus* erythrocytes as revealed by freeze-dried platinum-carbon replicas and immunofluorescence microscopy. Cell Motil. Cytoskeleton. 6 : 376—388.
- Chakrabarti A., Kelkar D. A., Chattopadhyay A. 2006. Spectrin organization and dynamics: new insights. Biosci. Rep. 26 : 369—386.
- Çiçek K., Arıkan H., Ayaz D. 2015. Blood cells morphology and erythrocytes count of two freshwater turtles, *Emys orbicularis* and *Mauremys rivulata*, from Turkey. Ecologia Balkanica. 7 : 21—27.
- Dove A. D. M., Arnold J., Clauss T. M. 2010. Blood cells and serum chemistry in the world's largest fish: the whale shark *Rhincodon typus*. Agual Biol. 9 : 177—183.
- Emiroglu O., Uyanoglu M., Baskurt S. 2012. Comparison of the erythrocyte sizes of *Carassius gibelio* and *Carassius carassius* species living together in Akgol (Adapazari/Turkey). Asian J. Anim. Veterin. Adv. 7 : 876—883.
- Flajshans M., Psenicka M., Rodina M., Tesitel J. 2011. Image cytometric measurements of diploid, triploid and tetraploid fish erythrocytes in blood smears reflect the true dimensions of live cells. Cell Biol. Int. 35 : 67—71.
- Gayatri A., Prafulla M. 2014. The morphometrical characterization of normal blood cells of two airbreathing fishes, *Clarias batrachus* and *Anabas testudineus*. Intern. Res. J. Biol. Sci. 3 : 37—41.
- Gratzer W. B. 1981. The red cell membrane and its cytoskeleton. Biochem. J. 198 : 1—8.
- Hartman F. A., Lessler M. A. 1964. Erythrocyte measurements in fishes, amphibia, and reptiles. Biol. Bull. 126 : 83—88.
- Jerrett D. P., Mays C. E. 1973. Comparative hematology of the hellbender, *Cryptobranchus alleganiensis* in Missouri. Copeia. 2 : 331—337.
- Joseph-Silverstein J., Cohen W. D. 1984. The cytoskeletal system of nucleated erythrocytes. III. Marginal band function in mature cells. J. Cell Biol. 98 : 2118—2125.
- Kızak K., Güner Y., Türel M., Kaym M. 2013. Comparison of growth performance, gonadal structure and erythrocyte size in triploid and diploid brown trout (*Salmo trutta fario* L., 1758). Turkish J. Fish. Aquatic Sci. 13 : 571—580.
- Kozłowski J., Czarnoleski M., François-Krassowska A., Maciak S., Pis T. 2010. Cell size is positively correlated between different tissues in passerine birds and amphibians, but not necessarily in mammals. Biol. Lett. 6 : 792—796.
- Mueller R. L., Gregory T. R., Gregory S. M., Hsieh A., Boore J. L. 2008. Genome size, cell size, and the evolution of enucleated erythrocytes in attenuate salamanders. Zoology (Jena). 111 : 218—230.
- Pendl H. 2006. Morphological changes in red blood cells of birds and reptiles and their interpretation. Israel J. Veterin. Medic. 61 : 1—12.
- Radhakrishnan S., Stephen M., Balakrishnan N. 1976. A study on the blood cells of a marine teleost fish, *Diodon hystrix*, together with a suggestion as to the origin of the lymphocytes. Proc. Indian Nat. Sci. Acad. 42 : 212—226.

Woznicki W., Kuzminski H. 2002. Chromosome number and erythrocyte nuclei length in triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Caryologia*. 55 : 295—298.

Yau T. W., Kuchel R. P., Koh J. M., Szekely D., Mirtschin P. J., Kuchel P. W. 2012. Cytoskeletal rearrangements in human red blood

cells induced by snake venoms: light microscopy of shapes and NMR studies of membrane function. *Cell Biol. Int.* 36 : 87—97.

Yilmaz M., Guven O., Mutaf B. F. 2015. Comparative morphometry of erythrocytes of different fish species. *J. Cell Mol. Biol.* 1 : 1—4.

Поступила 24 II 2016

A METHOD FOR THE QUANTITATIVE ASSESSMENT OF NUCLEAR ERYTHROCYTES SHAPE

Yu. P. Petrov,^{1,*} I. E. Stepanyan²

¹ Institute of Cytology RAS, St.Petersburg, 194064, and

² Scientific Center of Zoology and Hydroecology NAN Republic Armenia, Yerevan;

* e-mail: yupe3ov@mail.ru

It is generally accepted that nuclear erythrocytes of some vertebrates are shaped like ellipses. Nevertheless, the formal proof for this has not been presented. Here, the experimental data and theoretical calculations are presented to prove that the shape of nuclear erythrocytes, as a mathematical expectation, is really the ellipse. In addition, allowable limits of deviation of the erythrocytes shape from the ellipse were shown. On the basis of the presented data we have introduced a new parameter (named «ellipsoid coefficient») to evaluate how the real cell shape fits to the correct ellipse. The coefficient is the ratio of the real erythrocyte area (A) to the calculated area (S) obtained by a direct measurement of the erythrocyte major (M) and minor (m) axes. We assume that this parameter can be used in taxonomy of the vertebrate animals having nuclear erythrocytes.

Key words: nuclear erythrocyte, ellipse, ellipsoid coefficient.
