

ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЭОЗИНОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЕНОТОВИДНЫХ СОБАК *Nyctereutes procyonoides* (GREY, 1834)

© 2023 г. С. Н. Калинина¹ *, А. Г. Кижина¹, В. А. Илюха¹

¹Институт биологии Карельского научного центра РАН, ФИЦ “КарНЦ РАН”, Петрозаводск, 185910 Россия

*E-mail: cvetnick@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.02.2023 г.

После доработки 12.03.2023 г.

Принята к публикации 13.03.2023 г.

Цель исследования заключалась в анализе особенностей морфологии и морфометрических параметров эозинофилов и их гранул у енотовидных собак *Nyctereutes procyonoides* (Grey, 1834). На мазках крови, окрашенных по Паппенгейму, определяли состав лейкоцитарной формулы, оценивали особенности морфологии и морфометрические параметры эозинофилов и их гранул. Цитохимическими методами выявляли локализацию катионных белков, а также эозинофильной пероксидазы в эозинофилах. Для оценки влияния пола применяли ANOVA. В результате исследования установлено, что для енотовидных собак характерно высокое относительное содержание эозинофилов (7–10% от общей популяции лейкоцитов), а также наличие в них крупных секреторных гранул. На мазках крови, наряду с эозинофилами с типичной богатой зернистостью цитоплазмы, присутствовали более крупные клетки, содержавшие секреторные гранулы в небольшом количестве, а также в некоторых случаях вакуолеподобные гранулы. Влияние пола выразилось в более высокой доле эозинофилов с низким уровнем зернистости цитоплазмы у самцов по сравнению с самками, тогда как у самок обнаружены более высокие значения морфометрических показателей (числа и средней площади гранул в одной клетке, а также соотношения площади, занимаемой гранулами, к площади клетки). Поскольку причины появления эозинофилов с низким содержанием гранул, а также с вакуолизацией цитоплазмы у енотовидных собак не до конца ясны, существует необходимость в дальнейших исследованиях этого вопроса.

Ключевые слова: эозинофилы, гранулы, вакуоли, енотовидная собака

DOI: 10.31857/S0041377123040077, EDN: ZHIBRP

Эозинофильные гранулоциты представляют собой группу лейкоцитов, функции которых традиционно рассматриваются в связи с паразитарными и аллергическими (астматическими) иммунными реакциями (Rodrigo-Muñoz et al., 2021). Благодаря значительному распределению в тканях и способности вырабатывать ряд иммунных медиаторов, эозинофилы являются многофункциональными лейкоцитами, участвующими в поддержании гомеостаза и развитии воспаления (Rodrigo-Muñoz et al., 2021). За счет поверхностных рецепторов эозинофилы способны реагировать на различные стимулы, высвобождая содержимое специфических гранул (Melo, Weller, 2018; Fettelet et al., 2021).

Принятые сокращения: ВГ – вакуолеподобные гранулы; ВЭ – вакуолизованные эозинофилы; Г-1, Г-2 – типы гранул эозинофилов; КБ – катионные белки; ЭПО – эозинофильная пероксидаза; Э-I, Э-II – типы эозинофилов; CF null – мыши с дефицитом цистатина F; МВР-1 – главный щелочной белок (major basic protein 1).

Каждая гранула окружена мембраной и содержит катионные белки (КБ), среди которых главный щелочной белок МВР-1 (major basic protein 1) составляет кристаллоид (электронно-плотное вещество), а эозинофильный катионный протеин, эозинофильный нейротоксин и эозинофильная пероксидаза (ЭПО) являются компонентами менее плотного материала или матрикса, окружающего кристаллоид (Abu-Ghazaleh et al., 1992). МВР-1 содержит большое количество аргинина, что обуславливает эозинофилию гранул. Активация эозинофилов под влиянием разного рода стимулов может приводить к дегрануляции и изменениям морфологии клетки (размеры клетки, гранул, и т.п.) (Newsome, Ebeigbe, 1991; Melo, Weller, 2018).

Актуальность исследования продиктована недостаточной изученностью морфологии и физиологии эозинофилов млекопитающих (Узенбаева и др., 2007; Минзюк и др., 2015). Эозинофильные гранулоциты являются гетерогенной популяцией по плотностным характеристикам (Prin et al., 1983; Анаев, 2002; Бондарь и др., 2011). В клетках пониженной

плотности (активных) по сравнению с эозинофилами нормальной плотности число гранул значительно снижено, клетки вакуолизированы. Механизм синтеза и дифференцировки низкоплотностных эозинофилов неизвестен. В норме у человека доля эозинофилов низкой плотности (активных клеток) не превышает 10–20%, тогда как при патологических состояниях она увеличивается до 35–65–90% (Анаев, 2002). Низкое число эозинофилов (1–6% от общей популяции лейкоцитов) в периферической крови человека и млекопитающих является препятствием для исследований функций этих клеток.

Удачную экспериментальную модель в исследованиях морфологии и физиологии эозинофилов может представлять собой енотовидная собака *Nyctereutes procyonoides* (Grey, 1834) – всеядный хищник семейства псовых родом из Восточной Азии. Для этого вида животных по сравнению с таксономически близкими видами (лисица *Vulpes vulpes* и песец *V. lagopus* из семейства Canidae отряда хищников Carnivora) характерно довольно высокое число лейкоцитов, высокое относительное содержание эозинофилов, а также наличие в них крупных секреторных гранул (Узенбаева и др., 2007; Nowakowicz-Debek et al., 2013).

В связи с вышесказанным, цель исследования заключалась в анализе особенностей морфологии и морфометрических параметров эозинофилов и их гранул у енотовидных собак.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объекты исследования. В работе использовали неполовозрелых самцов ($n = 3$) и самок ($n = 3$) енотовидной собаки (*Nyctereutes procyonoides* Grey, 1834), содержащиеся в условиях звероводческой фермы. Животные получали рацион, согласно рекомендациям для этого вида, и воду *ad libitum*. Кровь брали в ноябре из бедренной вены в утренние часы до кормления животных.

Реактивы. Использовали краситель-фиксатор эозин-метиленовый синий Мая-Грюнвальда и краситель азур-эозин по Романовскому (Минимед, Россия); о-толидин (MP Biomedicals, США); перекись водорода, сульфосалициловую кислоту, бромфеноловый синий, борную кислоту и тетраборно-кислый натрий (НеваРеактив, Россия).

Окрашивание мазков крови по Паппенгейму. На свежеприготовленный и высушенный мазок крови наносили 10–15 капель готового красителя-фиксатора эозин-метиленового синего Мая-Грюнвальда (Минимед, Россия), через 3 мин по каплям наносили такой же объем воды и продолжали окрашивание еще 1 мин. Затем краситель смывали водой, а мазок высушивали на воздухе. Затем на высушенный мазок наливали свежеприготовленный раствор красителя Романовского (2 капли готового красителя азур-эозина по Романовскому (Минимед, Россия)

на 1 мл дистиллированной воды) на 12–13 мин, смывали водой и высушивали на воздухе.

Окрашивание мазков крови для выявления ЭПО (Хейхоу, Кваглино, 1983). Свежеприготовленные и высушенные мазки крови фиксировали 10%-ным раствором формалина в этаноле 30 с и промывали в двух сменах дистиллированной воды. Готовили инкубационную среду: 5 г о-толидина (MP Biomedicals, США) растворяли в 120 мл 96%-ного этанола и добавляли 80 мл дистиллированной воды, далее смесь фильтровали. В полученный фильтрат вносили 3%-ную перекись водорода (готовили из концентрированного раствора перед использованием) из расчета 0.02 мл перекиси на 10 мл фильтрата. Далее мазки инкубировали в течение 7 мин, промывали дистиллированной водой и высушивали.

Окрашивание мазков крови для определения КБ. Использовали описанную методику (Шубич, 1974). Свежеприготовленные и высушенные мазки фиксировали 5%-ным раствором сульфосалициловой кислоты (НеваРеактив, Россия) и промывали в двух сменах дистиллированной воды. Высушенные мазки окрашивали 2 мин в 0.1%-ном растворе бромфенолового синего (НеваРеактив, Россия) в 0.05 М боратном буфере (pH 8.2). После окраски мазки промывали в трех сменах 0.05 М боратного буфера (pH 8.2) по 1–2 мин в каждой и высушивали.

Микроскопия и анализ изображений. Препараты изучали с помощью светового микроскопа AxioScope 40 (Zeiss, Германия) с цветной цифровой видеокамерой и компьютерной системы анализа изображений “Видеотест 4.0” (Россия). Определяли состав лейкоцитарной формулы, оценивали особенности морфологии и морфометрические параметры эозинофилов ($n = 199$) и их гранул ($n = 3628$) (число и среднюю площадь в одной клетке, а также соотношение площади, занимаемой гранулами, к площади клетки).

Статистическая обработка данных включала оценку влияния фактора “пол” с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$. Поскольку число эозинофилов с низким уровнем грануляции цитоплазмы зависело от пола, тип эозинофила использовался как ковариата при анализе.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Состав лейкоцитов и морфология эозинофилов периферической крови. Результаты исследования представлены в таблицах 1–3. Анализ лейкоцитарной формулы вида показал, что животные обоих полов характеризовались нейтрофильным профилем крови (табл. 1). У енотовидных собак обнаружено достаточно высокое относительное содержание эозинофилов – 7–10%. Клетки имели сегментированное (2–3 доли) ядро с глыбкообразным зрелым хроматином и серо-голубую цитоплазму, содержащую ти-

пичную крупную эозинофильную (при окраске по Паппенгейму) зернистость (рис. 1а).

По морфологическим особенностям можно выделить 2 типа эозинофилов. Тип I (Э-I) составили клетки, в которых свободное от ядра пространство цитоплазмы было полностью занято гранулами (рис. 1а), а к типу II (Э-II) относились более крупные клетки со скудной зернистостью цитоплазмы (рис. 1б, в).

Гранулы эозинофилов визуальнo различались между собой. Одни (Г-1) равномерно окрашивались в розово-красный цвет при окраске по Паппенгейму, в желто-бурый (золотистый) цвет – при окраске на наличие ЭПО и в сине-голубой цвет – при окраске на наличие КБ (рис. 1). Другие гранулы (Г-2) не окрашивались использованными красителями или окрашивались частично (рис. 1в–д). Гранулы второго типа, вакуолеподобные (ВГ), представляли собой структуры округлой формы, сопоставимые по параметрам с типичными эозинофильными гранулами, и располагались в цитоплазме или над ядром (рис. 1в–д). Ядра эозинофилов были без признаков пикноза; мембраны, ограничивающие гранулы, которые не окрашивались использованными красителями, визуализировались (рис. 1в–д).

Влияние пола на лейкоцитарную формулу, на морфологию и морфометрические параметры эозинофилов и их гранул. Не обнаружено влияния пола на относительное содержание эозинофилов в лейкоцитарной формуле (ANOVA, $p < 0.05$). Однако количество клеток с низким уровнем грануляции цитоплазмы (Э-II) различалось между особями разного пола (табл. 1, 2): у самцов такие клетки составляли практически половину всех эозинофилов, тогда как у самок – 23%. Между особями разного пола наблюдали различия числа и средней площади гранул в одной клетке, а также соотношения площади, занимаемой гранулами, к площади клетки (табл. 2, 3). По сравнению с самцами, самки характеризовались более высокими показателями.

ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические особенности эозинофилов и их гранул. Одной из особенностей состава лейкоцитов периферической крови енотовидной собаки является высокое относительное содержание эозинофилов (7–10% от общего числа лейкоцитов), что отмечают и другие авторы (Узенбаева и др., 2007; Nowakowicz-Dębek et al., 2013). У человека повышение эозинофилов в крови (более 5%) является признаком эозинофилии и сопровождает многие инфекционные заболевания вирусной и бактериальной этиологии, глистные инвазии, а также аллергические, воспалительные и аутоиммунные процессы (Бондарь, Эльканова, 2014).

Уровень эозинофилов у енотовидной собаки зависит от сезона года (Mustonen et al., 2007), его высокое содержание осенью, возможно, является одной из адаптаций к зимним условиям и отражает усиление

Таблица 1. Лейкоцитарная формула крови у самцов и самок енотовидных собак

| Тип лейкоцитов | Доля лейкоцитов, % | |
|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | самцы ($n = 3$) | самки ($n = 3$) |
| Моноциты | 3.00 ± 1.00; 2 (2–5) | 6.00 ± 1.53; 5 (4–9) |
| Лимфоциты | 35.00 ± 6.43; 33 (25–47) | 30.00 ± 4.04; 27 (25–38) |
| Палочкоядерные нейтрофилы | 1.67 ± 0.67; 1 (1–3) | 1.67 ± 0.67; 1 (1–3) |
| Сегментоядерные нейтрофилы | 53.00 ± 4.51; 57 (44–58) | 54.00 ± 3.51; 57 (47–58) |
| Эозинофилы | 7.33 ± 0.88; 7 (6–9) | 8.33 ± 1.20; 9 (6–10) |
| Базофилы | 0 | 0 |

Примечание. Даны средние значения показателя и их ошибки, а также медиана и в скобках минимальное и максимальное значения.

Таблица 2. Морфометрические параметры эозинофилов (Э) и их гранул у енотовидных собак

| Показатель | Пол животных | |
|--|-------------------|-------------------|
| | самцы ($n = 3$) | самки ($n = 3$) |
| Общее число Э | 93 (100%) | 96 (100%) |
| I тип | 46 (49.46%) | 74 (77.08%) |
| II тип | 47 (50.54%) | 22 (22.92%) |
| Площадь Э, мкм ² (Sэ) | | |
| общая | 93.69 ± 1.76 | 97.81 ± 1.59 |
| I тип | 93.17 ± 2.34 | 95.74 ± 1.84 |
| II тип | 97.88 ± 2.06 | 105.36 ± 3.01 |
| Общее число гранул Г | 1619 (100%) | 2009 (100%) |
| 1 тип | 1405 (86.78%) | 1720 (85.61%) |
| 2 тип | 214 (13.22%) | 289 (14.39%) |
| Среднее число гранул в 1 Э: | | |
| общее | 18.70 ± 0.87 | 21.02 ± 0.78 |
| 1 тип | 16.35 ± 0.79 | 18.00 ± 0.71 |
| 2 тип | 3.57 ± 0.39 | 3.66 ± 0.30 |
| Средняя площадь гранул в 1 Э, мкм ² (Sг): | | |
| общее | 0.66 ± 0.03 | 1.13 ± 0.03 |
| 1 тип | 0.70 ± 0.03 | 1.21 ± 0.03 |
| 2 тип | 0.61 ± 0.04 | 0.98 ± 0.03 |
| Соотношение Sг/Sэ, %: | | |
| общее | 0.7 ± 0.04 | 1.2 ± 0.03 |
| 1 тип | 0.8 ± 0.04 | 1.3 ± 0.04 |
| 2 тип | 0.7 ± 0.04 | 1.0 ± 0.03 |

Примечание. Показаны средние значения показателя и их ошибки, а также доля (%) соответствующих клеток (гранул) в скобках.

Таблица 3. Результаты дисперсионного анализа (ANOVA): влияние пола и типа эозинофилов (Э) периферической крови енотовидных собак на исследуемые показатели

| Показатель | Фактор | Степень свободы, <i>df</i> | Дисперсия (средний квадрат, <i>MS</i>), <i>S</i> ² | Критерий, <i>F</i> | <i>p</i> |
|---|-------------------|----------------------------|--|--------------------|---------------|
| Наличие Э типа II | Пол | 1 | 3.60 | 16.76 | 0.0001 |
| Площадь Э | Пол | 1 | 788.33 | 3.20 | 0.075 |
| | Тип Э (ковариата) | 1 | 1849.45 | 7.50 | 0.0068 |
| Среднее число гранул Г 1 типа (Г-1) в одном Э | Пол | 1 | 121.50 | 2.53 | 0.114 |
| | Тип Э (ковариата) | 1 | 678.95 | 14.12 | 0.0002 |
| Среднее число гранул Г 2 типа (Г-2) в 1-ом Э | Пол | 1 | 0.037 | 0.01 | 0.912 |
| | Тип Э (ковариата) | 1 | 0.005 | 0.00 | 0.969 |
| Среднее число гранул обоих типов в 1-ом Э | Пол | 1 | 231.76 | 4.06 | 0.045 |
| | Тип Э (ковариата) | 1 | 766.94 | 13.43 | 0.0003 |
| Средняя площадь гранул 1 типа (Г-1) в 1-ом Э | Пол | 1 | 11.55 | 82.46 | 0.000 |
| | Тип Э (ковариата) | 1 | 0.32 | 2.32 | 0.13 |
| Средняя площадь гранул 2 типа (Г-2) в 1-ом Э | Пол | 1 | 3.94 | 37.28 | 0.000 |
| | Тип Э (ковариата) | 1 | 0.019 | 0.18 | 0.674 |
| Средняя площадь гранул обоих типов в 1-ом Э | Пол | 1 | 9.80 | 85.07 | 0.000 |
| | Тип Э (ковариата) | 1 | 0.04 | 0.35 | 0.55 |
| Соотношение площади гранул 1 типа (Г-1) к площади Э | Пол | 1 | 0.001 | 54.40 | 0.000 |
| | Тип Э (ковариата) | 1 | 0.000 | 0.00 | 0.98 |
| Соотношение площади гранул 2 типа (Г-2) к площади Э | Пл | 1 | 0.000 | 22.68 | 0.000 |
| | Тип Э (ковариата) | 1 | 0.000 | 1.76 | 0.19 |
| Соотношение площади гранул обоих типов к площади Э | Пол | 1 | 0.000 | 54.54 | 0.000 |
| | Тип Э (ковариата) | 1 | 0.000 | 0.66 | 0.42 |

Полужирным шрифтом выделены достоверно значимые результаты ($p < 0.05$).

ние иммунореактивности организма и, вероятно, другие изменения системы крови, связанные с зимним сном, характерным для этого вида животных (Узенбаева и др., 2007).

Наряду с высоким относительным содержанием эозинофилов, мы отметили особенности их морфологии. Помимо клеток (Э-I), в которых все свободное от ядра пространство занимали оксифильные гранулы, на мазках периферической крови также присутствовали более крупные эозинофилы (Э-II) с низким уровнем зернистости. Эозинофилы с не-

большим количеством гранул обнаруживаются у людей с транзиторной эозинофилией и рассматриваются как дегранулированные (Tai, Spry, 1976). У детей с эозинофилией инфекционно-аллергического генеза также изменяются морфометрические параметры эозинофилов: доминируют клетки меньших размеров с пикнотичным ядром, дегранулированной вакуолизированной цитоплазмой и низким содержанием КБ (Бондарь, Эльканова, 2014). Процесс дегрануляции эозинофилов является ключевым событием в патологии многих аллергических и неаллергиче-

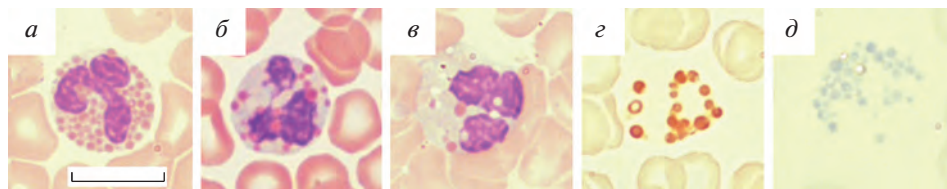


Рис. 1. Эозинофилы енотовидной собаки: *a* – эозинофил I типа (Э-I) с типичными окрашенными эозинофильными гранулами (Г-1), *б* – эозинофил II типа (Э-II) с небольшим количеством типичных эозинофильных гранул (Г-1), *в* – Э-II с типичными эозинофильными (Г-1) и вакуолеподобными (Г-2) гранулами, *г* – Э-II с пероксидазопозитивными (Г-1) и пероксидазонегативными (Г-2) гранулами, *д* – Э-II с позитивной и негативной окраской гранул на наличие КБ. Окрашивание: *a–в* – по Паппенгейму, *г* – на наличие ЭПО, *д* – на наличие КБ. Масляная иммерсия. Масштабная линейка: 10 мкм.

ских воспалительных процессов, при которых происходит высвобождение содержимого гранул во внеклеточное пространство после стимуляции эозинофилов (Fetretet et al., 2021). К настоящему времени определены четыре основных механизма дегрануляции в эозинофилах: фрагментарная дегрануляция, цитолиз, классический и сложный экзоцитоз.

Нами установлено, что в цитоплазме некоторых клеток с низким уровнем зернистости также присутствовали гранулы, которые не окрашивались использованными красителями. У енотовидных собак это зафиксировано впервые, подобный феномен ранее был обнаружен лишь у некоторых видов животных (кошка, собака (борзые, золотистые ретриверы)) и при эозинофилии у людей (Tai, Spry, 1976, 1981; Iazbik, Couto, 2005; Giori et al., 2011; Holmes et al., 2021). К эозинофилам, содержащим неокрашиваемые гранулы, из-за их сходства с вакуолями, применяют термин “серые” или “вакуолизованные” эозинофилы (ВЭ) (grey or vacuolated eosinophils) (Iazbik, Couto, 2005; Giori et al., 2011; Holmes et al., 2021).

Результаты исследований морфологических особенностей ВЭ свидетельствуют об аномалиях или отсутствии электронно-плотного вещества в ВГ (Denzler et al., 2000; Holmes et al., 2021). Поскольку главным компонентом кристаллоида специфических гранул является МВР-1, морфология ВГ может быть связана с полным отсутствием или низким содержанием этого белка (Melo, Weller, 2018; Holmes et al., 2021). У мышей, нокаутных по гену МВР-1 (МВР-1^{-/-}) гранулы эозинофилов не окрашиваются в характерный розово-красный цвет по методу Райт–Гимза (Wright–Giemsa) (Denzler et al., 2000; Matthews et al., 2016). Еще один белок, цистатин F, важен на этапах созревания эозинофилов, происходящих после высвобождения предшественников этих клеток из костного мозга (Matthews et al., 2016).

Цистатин F крайне необходим для правильного биогенеза гранул, он регулирует активность цистеиновых протеаз гранул, которые, в свою очередь, контролируют процессинг таких компонентов гранул, как МВР-1 и ЭПО. У мышей с дефицитом цистатина F (CF null) снижена продолжительность жизни эозинофилов, а количество нормальных гранул в 4 раза ниже, чем у животных дикого типа; кроме того, у мышей CF null присутствуют аномальные гранулы с электронно-прозрачными периферией и внутренним материалом, иногда конденсированным, но чаще аморфным и бесструктурным (Matthews et al., 2016). У этих животных также наблюдали вакуолеподобные структуры, которые, скорее всего, были либо пустыми гранулами, либо гранулами с недостаточным для обнаружения количеством электронно-плотного материала. В некоторых случаях профили гранул казались неполными, что свидетельствует о высвобождении содержимого гранул в цитозоль.

Гранулы без кристаллоида часто находятся в эозинофилах периферической крови и тканей в тех

случаях, когда наблюдается избыточное производство этих клеток, например, при гиперэозинофильном синдроме (Melo, Weller, 2018). Усиленная продукция эозинофилов может привести к высвобождению из костного мозга клеточной популяции, находящейся в процессе созревания (терминальной дифференцировки) и, следовательно, с заметным количеством незрелых гранул (Melo, 2018). У пациентов с транзиторной эозинофилией наличие вакуолей в эозинофилах достаточно распространено, но при снижении количества клеток до нормальных значений вакуоли не обнаруживаются (Tai, Spry, 1981).

Вакуолизация нормальных эозинофилов может быть индуцирована *in vitro* с помощью конканавалина А (Tai, Spry, 1981). Возможно, эозинофилы, которые содержат вакуоли *in vivo*, реагируют на присутствие мембраноактивирующих веществ.

Влияние пола на морфологические и цитохимические особенности эозинофилов и их гранул. Помимо участия в половой дифференцировке и размножении, половые стероиды (эстрадиол, прогестерон и тестостерон) могут оказывать воздействие на иммунную систему, по-разному влияя на функции практически всех типов иммунных клеток (Morales-Montor et al., 2011). Половые гормоны модулируют самые разные процессы, связанные с иммунным ответом, включая созревание тимоцитов, пролиферацию лимфоцитов, экспрессию молекул и рецепторов главного комплекса гистосовместимости класса II и продукцию цитокинов (Bebo et al., 2001). У самок нескольких видов животных по сравнению с самцами установлены более высокие уровни циркулирующих иммуноглобулинов и более выраженный гуморальный ответ на инфекции (Morales-Montor et al., 2011).

Под влиянием эстрадиола и прогестерона *in vivo* и *in vitro* отмечается усиление дегрануляции эозинофильных лейкоцитов (Tchernitchin et al., 1985), а тестостерон снижает адгезию и жизнеспособность эозинофилов человека (Hamano et al., 1998). В нашем исследовании впервые получены данные, свидетельствующие о половых различиях изученных показателей эозинофилов и их гранул у енотовидной собаки. Эти результаты в настоящее время не могут быть объяснены с точки зрения половых различий иммунной функции, в связи с чем необходимы дальнейшие исследования этого вопроса.

Предполагают, что иммунологическая чувствительность к гормонам могла развиваться в эволюции, как адаптация особей разного пола к инфекциям и для успешной борьбы с ними, но посредством разных механизмов, а также для решения специфических для пола проблем (например, беременность или конкуренция за территории или партнеров) (Morales-Montor et al., 2011). Давление отбора могло вызвать развитие диморфного иммунитета к инфекции и сбалансировать защиту особи от инфекции с успешным размножением и выживанием организма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Енотовидные собаки характеризовались высоким относительным содержанием эозинофилов в периферической крови. Эозинофильные лейкоциты различались морфологически: клетки с нормальным высоким, а также клетки с низким уровнем зернистости цитоплазмы. Последние в некоторых случаях содержали ВГ, что зафиксировано у енотовидной собаки впервые. Наличие ВГ связывают с полным отсутствием или значительным снижением содержания МВР-1, главного компонента кристаллоида специфических гранул. Вакуолизация гранул может быть обусловлена дефектами гена, кодирующего этот белок, аномалиями развития эозинофилов, процессами дегрануляции, влиянием мембраноактивирующих веществ, а также незрелостью гранул вследствие высвобождения из костного мозга клеточной популяции, находящейся в процессе созревания (терминальной дифференцировки). Зависимость от пола выражается в более высокой доле эозинофилов с низким уровнем зернистости цитоплазмы у самцов по сравнению с самками, тогда как у самок обнаружены более высокие значения морфометрических показателей (числа и средней площади гранул в одной клетке, соотношения площади, занимаемой гранулами, к площади клетки). Поскольку причины появления эозинофилов с низким уровнем грануляции цитоплазмы у енотовидных собак не до конца ясны, остается необходимость в дальнейших исследованиях этого вопроса.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность и глубокую признательность Л.Б. Узенбаевой (Институт биологии КарНЦ РАН, г. Петрозаводск) за ценные советы и рекомендации при обсуждении результатов исследования, а также Э.Ф. Печориной (Институт биологии КарНЦ РАН, г. Петрозаводск) за помощь в обработке данных.

Лабораторные исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (FMEN-2022-0003).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтического комитета ИБ КарНЦ РАН (протокол № 1 от 16.01.2023).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Анаев Э.Х.* 2002. Эозинофилы и эозинофилии. Атмосфера. Пульмонология, аллергология. Т. 6. № 3. С. 15. (*Anaev E.H.* 2002. Eozinofily i eozinofilii. Atmosfera. Pul'monologiya, allergologiya. V. 6. № 3. P. 15.)
- Бондарь Т.П., Ишкова Н.М., Эльканова А.Б.* 2011. Изучение денситометрических характеристик эозинофилов периферической крови при заболеваниях инфекционно-аллергической природы. Наука. Инновации. Технологий. Т. 74. С. 5. (*Bondar' T.P., Ishkova N.M., El'kanova A.B.* 2011. Izuchenie densitometricheskikh harakteristik eozinofilov perifericheskoj krovi pri zabolovanijah infekcionno-allergicheskoj prirody. Nauka. Innovacii. Tekhnologii. V. 74. P. 5.)
- Бондарь Т.П., Эльканова А.Б.* 2014. Механизм изменения морфофункционального состояния эозинофилов при эозинофилиях различного генеза у детей. Современные проблемы науки и образования. Т. 2. С. 345. (*Bondar' T.P., El'kanova A.B.* 2014. Mekhanizm izmeneniya morfofunkcional'nogo sostoyaniya eozinofilov pri eozinofilijah razlichnogo geneza u detej. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. V. 2. P. 345.)
- Минзюк Т.В., Кавцевич Н.Н., Светочев В.Н.* 2015. Новые данные о клеточном составе крови морского зайца. Доклады РАН. Т. 462. № 6. С. 727. (*Minzyuk T.V., Kavcevich N.N., Svetochev V.N.* 2015. Novye dannye o kletocnom sostave krovi morskogo zaitca. Doklady RAN. V. 462. № 6. P. 727.)
- Узенбаева Л.Б., Голубева А.Г., Илюха В.А., Тютюнник Н.Н., Коросов С.А.* 2007. Морфофункциональные особенности лейкоцитов млекопитающих, разводимых в неволе в условиях европейского севера. Труды Карельского научного центра Росс. академии наук. Т. 11. С. 109. (*Uzenbaeva L.B., Golubeva A.G., Ilyuha V.A., Tyutyunnik N.N., Korosov S.A.* 2007. Morfofunkcional'nye osobennosti leukocitov mlekopitayushchih, razvodimyh v nevole v usloviyah evropeiskogo severa. Trudy Karel'skogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk. V. 11. P. 109.)
- Хейхоу Ф.Г., Кваглино Д.* 1983. Гематологическая цитохимия. М.: Медицина. (*Heihou F.G., Kvaglino D.* 1983. Gematologicheskaya tsitohimija. M.: Medicina.)
- Шубич М.Г.* 1974. Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего. Цитология. Т. 16. № 10. С. 1321. (*Shubich M.G.* 1974. Vyyavlenie kationnogo belka v tsitoplazme leukocitov s pomoshch'yu bromfenolovogo sinego. Tsitologiya. V. 16. № 10. P. 1321.)
- Abu-Ghazaleh R.I., Dunnette S.L., Loegering D.A., Checked J.L., Kita H., Thomas L.L., Gleich G.J.* 1992. Eosinophil granule proteins in peripheral blood granulocytes. Journal of leukocyte biology. V. 52. № 6. P. 611.
- Bebo B.F.Jr., Fyfe-Johnson A., Adlard K., Beam A.G., Vandembark A.A., Offner H.* 2001. Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains. J. Immunol. V. 166. P. 2080.
- Denzler K.L., Farmer S.C., Crosby J.R., Borchers M., Cieslewicz G., Larson K.A., Cormier-Regard S., Lee N.A., Lee J.J.* 2000.

- Eosinophil major basic protein-1 does not contribute to allergen-induced airway pathologies in mouse models of asthma. *J. Immunol.* V. 165. P. 5509.
- Fettrelet T., Gigon L., Karaulov A., Yousefi S., Simon H.U. 2021. The enigma of eosinophil degranulation. *Int. J. Sci.* V. 22. P. 7091.
- Giori L., Gironi S., Scarpa P., Anselmi A., Gualtieri M., Paltrinieri S. 2011. Grey eosinophils in sighthounds: frequency in 3 breeds and comparison of eosinophil counts determined manually and with 2 hematology analyzers. *Vet. Clin. Pathol.* V. 40. P. 475.
- Hamano N., Terada N., Maesako K., Numata T., Konno A. 1998. Effect of sex hormones on eosinophilic inflammation in nasal mucosa. *Allergy Asthma Proc.* V. 19. P. 263.
- Holmes E., Raskin R., McGill P., Szladovits B. 2021. Morphologic, cytochemical, and ultrastructural features of gray eosinophils in nine cats. *Vet. Clin. Pathol.* V. 50. P. 52.
- Iazbik M.C., Couto C.G. 2005. Morphologic characterization of specific granules in Greyhound eosinophils. *Vet. Clin. Pathol.* V. 34. P. 140.
- Matthews S.P., McMillan S.J., Colbert J.D., Lawrence R.A., Watts C. 2016. Cystatin F ensures eosinophil survival by regulating granule biogenesis. *Immunity.* V. 44. P. 795.
- Melo R.C., Weller P.F. 2018. Contemporary understanding of the secretory granules in human eosinophils. *J. Leukocyte Biol.* V. 104. P. 85.
- Morales-Montor J., Togno-Pierce C., Munoz-Cruz S. 2011. Non-reproductive effects of sex steroids: their immunoregulatory role. *Current Topics Med. Chem.* V. 11. P. 1714.
- Mustonen A.M., Asikainen J., Aho J., Nieminen P. 2007. Selective seasonal fatty acid accumulation and mobilization in the wild raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*). *Lipids.* V. 42. P. 1155.
- Newsome F.V., Ebeigbe P. 1991. Blood eosinophil degranulation and vacuolation in helminthic infection. *Ann. Tropical Med. Parasitol.* V. 85. P. 239.
- Nowakowicz-Dębek B., Zoń A., Jakubczak A., Wnuk W. 2013. Hematological parameters of wild and farm mink, red fox and raccoon dog. *Med. Wet.* V. 69. P. 40.
- Prin L., Capron M., Tonnel A.B., Bletry O., Capron A. 1983. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils: variability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and the origin of hypereosinophilia. *International Archives of Allergy and Immunology.* V. 72. № 4. P. 336.
- Rodrigo-Muñoz J.M., Gil-Martínez M., Sastre B., del Pozo V. 2021. Emerging Evidence for pleiotropism of eosinophils. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 7075.
- Tai P.C., Spry C.J. 1976. Studies on blood eosinophils. I. Patients with a transient eosinophilia. *Clinical Exper. Immunol.* V. 24. P. 415.
- Tai P.C., Spry C.J.F. 1981. The mechanisms which produce vacuolated and degranulated eosinophils. *British J. Haematol.* V. 49. P. 219.
- Tchernitchin A.N., Barrera J., Arroyo P., Mena M.A., Vilches K., Grunert G. 1985. Degranulatory action of estradiol on blood eosinophil leukocytes *in vivo* and *in vitro*. *Agents Actions.* V. 17. P. 60.

Morphological Features and Morphometric Parameters of Peripheral Blood Eosinophiles in Raccoon Dogs *Nyctereutes procyonoides* (Grey, 1834)

S. N. Kalinina^a, *, A. G. Kizhina^a, and V. A. Ilyukha^a

^aInstitute of Biology of the Karelian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences", Petrozavodsk, 185910 Russia

*e-mail: cvetnick@yandex.ru

The aim of this work was to analyze the morphology and morphometric parameters of peripheral blood eosinophils and eosinophilic granules in raccoon dogs *Nyctereutes procyonoides* (Grey, 1834). On blood smears stained by Pappenheim, the composition of the leukocyte formula was determined, the morphological features and morphometric parameters of eosinophils and their granules were evaluated. Cytochemical methods revealed the localization of peroxidase and cationic proteins in eosinophils. ANOVA was used to assess the effect of sex. As a result of the study, it was found that raccoon dogs are characterized by a high relative content of eosinophils (7–10%), as well as the presence of large secretory granules in them. Along with the common eosinophils, there were cells with abnormal granularity (low number of secretory granules, the presence of vacuole-like granules that did not stain with the dyes used). The influence of sex was expressed in a higher proportion of eosinophils with abnormal granularity in males compared to females, while the latter had higher morphometric parameters (the number and average area of granules in one cell, the ratio of the area occupied by granules to the area of the cell). Since the causes of abnormally granular eosinophils in raccoon dogs are not completely clear, there is a need for further research into this issue.

Keywords: eosinophils, granules, vacuoles, raccoon dog