

УДК: 591.111.7:636.5.034:615.33
DOI: 10.52419/issn2072-2419.2025.2.105

МЕМБРАННЫЙ РЕЗЕРВ ЭРИТРОЦИТОВ УТЯТ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Присный А.А.^{1*} – д-р биол. наук, глав. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-5229-4576); Гребцова Е.А.² – канд. биол. наук, доц. каф. биологии (ORCID 0009-0007-0768-0490); Скворцов В.Н.¹ – д-р ветеринар. наук, руководитель (ORCID 0000-0002-9629-0000); Кравцова А.Р.¹ – мл. науч. сотр. (ORCID 0000-0003-1340-8024)

¹ ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно - исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН» Белгородского филиала ВИЭВ

² ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»)

*andreypisny@gmail.com

Ключевые слова: утята, кровь, эритроциты, стафилококк, ципрофлоксацин.

Key words: ducklings, blood, red blood cells, *Staphylococcus*, ciprofloxacin.

Поступила: 28.04.2025

Принята к публикации: 06.06.2025

Опубликована онлайн: 20.06.2025



РЕФЕРАТ

Изучено влияние ципрофлоксацина на мембранный резерв и устойчивость эритроцитов утят к действию гипотонической среды в условиях экспериментального стафилококкоза. Высокая проницаемость мембраны эритроцитов для ципрофлоксацина может приводить к изменению устойчивости красных клеток крови к условиям пониженной осмолярности. В исследовании было задействовано три группы, состоящие из утят башкирской породы в возрасте 21 суток. Птиц группы III в течение пяти суток выпаивали ципрофлоксацином в дозировке 200 мг/л. Через сутки после начала выпаивания препаратом осуществляли внутрибрюшинное заражение групп II и III культурой *Staphylococcus aureus* в концентрации 5McF. Отбор крови методом внутрисердечной пункции проводили на 1-е, 3-и, 6-е, 9-е, и 13-е сутки после заражения. Для оценки устойчивости эритроцитов к среде с пониженной осмолярностью инкубировали цельную кровь в изотоническом растворе (0,93% NaCl), в гипотоническом растворе (0,33% NaCl), в соотношении 1:1 в течение 30 секунд. В мазках крови определены линейные параметры эритроцитов, рассчитаны площадь поверхности и объем клеток, показатели мембранного резерва. Относительный мембранный резерв эритроцитов птиц контрольной группы в условиях гипотонии был наибольшим по срав-

нению с опытными группами. Это связано с изначальным увеличением размеров клеток птиц группы II и III под воздействием альфа-токсина *St. aureus*. Эритроциты интактных утят демонстрируют максимальную интенсивность использования относительного мембранного резерва в гипотонической среде – ииMR% находится в диапазоне между 19,4% и 33%. Во второй и третьей группе среднее значение ииMR% мембраны составляет 17%. Привлечение поверхностных резервов плазмалеммы к регуляции размеров эритроцитов, а также изменения, связанные с транспортом ионов и воды, предотвращают гемолиз. Использование внутриклеточного мембранного бассейна позволяет регулировать объем ядер при агрессивном действии альфа-гемолизина и ципрофлоксацина.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Исследования осмотической хрупкости эритроцитов применяются для оценки физиологического состояния крови человека и млекопитающих, однако этот показатель практически не изучен у птиц. Современное птицеводство не может существовать без применения антимикробных препаратов, и одной из часто применяемых групп являются фторхинолоны.

Взаимодействие ряда антибактериальных препаратов: адриамицина [1], мефенамовой кислоты [2], нистатина [3] с клеточной мембраной эритроцита вызывает реакции окисления липидов, белков и углеводов, тем самым разрушая клеточную мембрану и повреждая саму клетку. Нарушение целостности плазмалеммы эритроцитов объясняется образованием крупных неселективных перфораций, которые приводят к повышению проницаемости мембраны и коллоидно-осмотическому гемолизу [4].

В работе Aslam H. продемонстрировано, что окислительный стресс, вызванный левофлоксацином, приводит к экстериоризации фосфатидилсерина на поверхности мембраны эритроцитов – данное явление завершается гемолизом [5]. Ципрофлоксацин не вызывает сдвигов в лейкоцитарной формуле у цыплят [6], но распределение фторхинолонов – ципрофлоксацина и норфлоксацина – по эритроцитам происходит очень быстро, вероятно, из-за высокой проницаемости мембраны эритроцитов для этих препаратов [4, 7].

Существенные отличия в методике проведения испытаний, в подходе к интерпретации данных у разных исследователей зачастую приводят к результатам, которые могут не согласовываться друг с другом. Устойчивость эритроцитов к ги-

поосмотической нагрузке чаще всего определяют через спектрофотометрическую оценку гемолиза. Однако уделено мало внимания механизмам резистентности эритроцитов птиц: изменению ионного транспорта и мембранному резерву. Как поверхностные запасы, так и эндо-мембраны могут обеспечивать простой механизм поддержания натяжения мембран ниже литического уровня во время понижения осмолярности среды.

Цель данной работы – исследовать влияние ципрофлоксацина на мембранный резерв и устойчивость эритроцитов утят к действию гипотонической среды в условиях экспериментального стафилококкоза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Для проведения исследования были сформированы три группы утят башкирской породы в возрасте 21 суток. Группа I являлась интактным контролем. Птиц группы III в течение пяти суток выпаивали ципрофлоксацином в дозировке 200 мг/л. Через сутки после начала выпаивания препаратом осуществлено внутрибрюшинное заражение групп II и III культурой *Staphylococcus aureus* в концентрации 5McF. Отбор крови методом внутрисердечной пункции проводили на 1-е, 3-е, 6-е, 9-е, и 13-е сутки после заражения. Отобранные пробы крови стабилизировали гепарином.

Для оценки устойчивости эритроцитов к среде с пониженной осмолярностью проводили инкубацию цельной крови в изотоническом растворе (0,93% NaCl), в гипотоническом растворе (0,33% NaCl), в соотношении 1:1 в течение 30 секунд. Готовили три группы мазков: из цельной крови, суспензии с изотоническим и гипо-

тоническим растворами после инкубации. В мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе, оценены размеры длинной и короткой осей клеток и их ядер. Определены площадь поверхности и объем эритроцитов с помощью следующих формул [8]:

$$\varepsilon = \sqrt{1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2},$$

где ε – коэффициент эксцентricности эритроцита, a – величина длинной полуоси эритроцита, b – величина короткой полуоси эритроцита;

$$V = \frac{4}{3} \pi a b^2,$$

где V – объем эритроцита (μm^3);

$$S = 2\pi b \left(b + \frac{a}{\varepsilon} \arcsin \varepsilon\right),$$

где S – площадь поверхности эритроцита (μm^2).

Используя полученные значения площади и объема, вычисляли относительный мембранный резерв клеток в изотоническом и гипотоническом растворах:

$$MR = \frac{S_{г/изо} - S_{аут}}{V_{аут}},$$

где MR – относительный мембранный резерв (μm^{-1}), $S_{г/изо}$ – площадь поверхности эритроцита в гипотоническом или изотоническом растворах (μm^2), $S_{аут}$ – площадь поверхности эритроцита в аутологичной плазме (μm^2), $V_{аут}$ – объем эритроцита в аутологичной плазме (μm^3).

Интенсивность использования относительного мембранного резерва (иMR%) эритроцитами в гипотонической среде оценивали, вычисляя процент относительного мембранного резерва, используемого клеткой от абсолютного мембранного резерва, принимаемого за 100%.

Статистическая обработка числовых данных включала расчет среднего значения (M) и стандартной ошибки среднего (m) с помощью программного обеспечения Microsoft Excel. Статистическую значимость различий оценивали с применением непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Инкубация эритроцитов в синтетических средах, имеющих тоничность, как у плазмы крови, приводит к изменению транспорта ионов и воды через плазмалемму, прежде чем клетки стабилизируются на новом более низком уровне устойчивого состояния [9]. Поэтому в первую очередь относительный мембранный резерв был оценен у эритроцитов, находившихся в изотоническом растворе.

Среднее значение относительного мембранного резерва эритроцитов контрольной группы равно 0,09. У клеток группы II показатель в первые сутки близок к контрольному, однако уже на 3-й день по мере развития инфекционного заболевания $MR_{отн(изо)}$ падает до 0 и не повышается до 9 суток. Такие изменения вызваны действием бактериального альфа-гемолизина на мембрану эритроцитов [10]. К девятому дню мембранный резерв возвращается к прежним значениям.

Выпаивание птиц группы III ципрофлоксацином могло вызвать увеличение размеров эритроцитов, это повлияло на поведение клеток в изотонической среде – их объем более не повышался, что выражается в нулевом значении мембранного резерва с первого по девятый день. К 13-м суткам размер эритроцитов вернулся к прежним значениям и мембранный резерв после инкубации в изотоническом растворе достиг 0,09.

Показатель относительного мембранного резерва эритроцитов птиц контрольной группы в условиях гипотонии был наибольшим по сравнению с опытными группами и равен 0,23.

У клеток группы II значение $MR_{отн}$ в гипотонической среде составляет в среднем 0,15, однако на третьи сутки его значение падает до 0,05. Это связано с увеличением размера эритроцитов под действием альфа-токсина, выделяемого *St. aureus*. Изначально крупные клетки в меньшей степени реагируют на действие гипотонической среды, что выражается в минимальных значениях $MR_{отн}$.

Относительный мембранный резерв эритроцитов группы III также составляет

в среднем 0,15, однако минимальные значения показателя зафиксированы на 9-е сутки после отмены препарата. В первые сутки $MR_{отн}$ ниже по сравнению с показателями контрольной группы на 42%, это может быть связано с действием антимикробного препарата. Ранее в экспериментах на эритроцитах человека было показано, что нахождение клеток в течение двух суток в присутствии ципрофлоксацина приводит к повышению размеров эритроцитов на 11% [11].

В заключительные экспериментальные сутки $MR_{отн}$ эритроцитов группы III и контроля уже не имел статистически значимых отличий и составлял 0,25 и 0,27 соответственно. У группы II данный параметр по-прежнему был ниже – 0,13, что связано с увеличенной площадью эритроцитов.

Эритроциты интактных утят демонстрируют максимальную интенсивность

использования относительного мембранного резерва в гипотонической среде – ииMR% находится в диапазоне между 19,4% и 33%. Во второй и третьей группе среднее значение ииMR% мембраны составляет 17%. При этом минимум – 5% зафиксирован для клеток группы II на 3-и сутки, а для группы III 4% на 9-й день.

Пребывание клеток в изотонической среде не привело к изменению мембранного резерва ядер по сравнению с аутологичной плазмой во всех экспериментальных группах.

Анализ значений $MR_{отн(гипо)}$ в парах «клетка-ядро» показал асинхронную реакцию этих двух элементов (рис. 1): увеличение мембранного резерва клетки сопровождалось нулевыми значениями данного показателя для ядра в первые, шестые и тринадцатые сутки. И, наоборот: на 3-й и 9-й день мембранный резерв клетки понижался, а у ядра увеличивался.

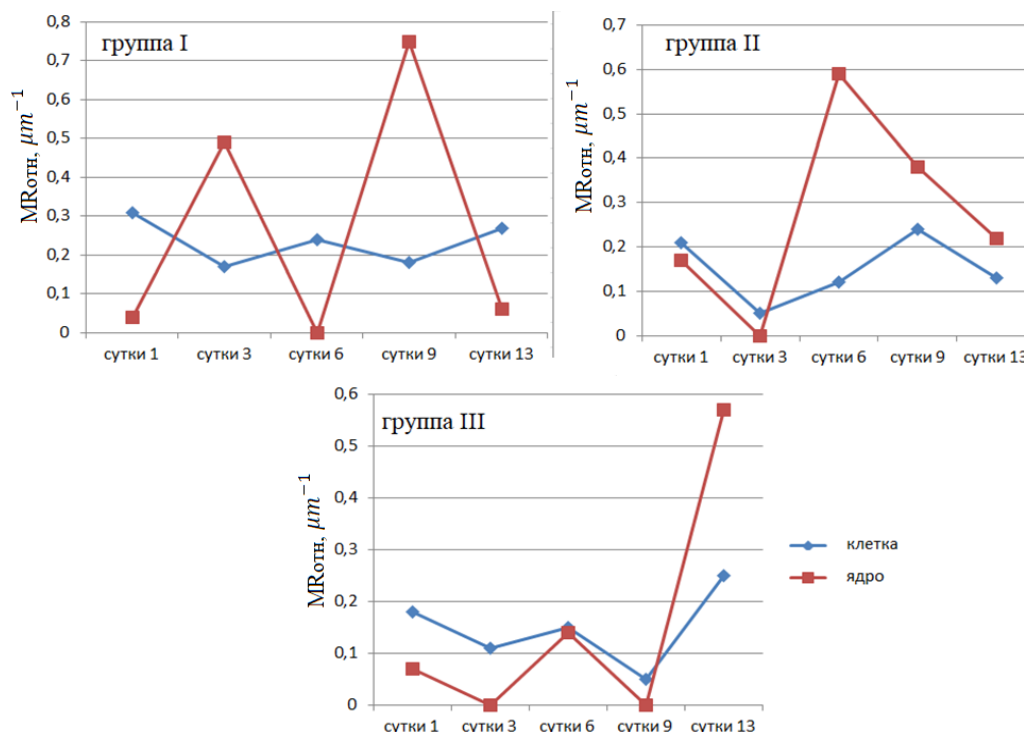


Рисунок 1 – Динамика относительного мембранного резерва клеток и ядер в гипотонической среде.

Эритроциты групп II и III характеризуются синхронной реакцией клетки и ядра в изменении $MR_{отн}$ в условиях гипотонической среды. Вероятно, альфа-токсин и ципрофлоксацин вызывают одновременные изменения в транспорте ионов и воды, как через наружную плазматическую мембрану, так и через кариолемму.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Выпаивание птиц группы III ципрофлоксацином приводит к уменьшению мембранного резерва по сравнению с контролем уже на первые сутки испытаний, а к девятому дню $MR_{отн}$ и вовсе достигает нулевых значений. Это может быть связано с совместным влиянием препарата и инфекционного заболевания. К 13-му дню значения $MR_{отн}$ (гипо) аналогичны контрольным.

В группе II также наблюдали постепенное снижение относительного мембранного резерва в гипотонической среде в условиях экспериментальной стафилококковой инфекции. На 9-е сутки значения $MR_{отн}$ (гипо) снова выросли до 0,24.

Привлечение поверхностных резервов плазмалеммы к регуляции размеров эритроцитов, а также изменения, связанные с транспортом ионов и воды, предотвращают гемолиз. Использование внутриклеточного мембранного бассейна позволяет регулировать объем ядер при агрессивном действии альфа-гемолизина и ципрофлоксацина.

THE MEMBRANE RESERVE OF DUCKLINGS' ERYTHROCYTES UNDER THE INFLUENCE OF CIPROFLOXACIN IN CONDITIONS OF EXPERIMENTAL STAPHYLOCOCCAL INFECTION

Prisnyi A.A.^{1*} – Dr. Biol. Sci., Principal Researcher FGBNU "Federal Scientific Centre VIEV" (ORCID 0000-0001-9380-4136); **Grebtsova E.A.**² – Kand. Biol. Sci., associate professor "Belgorod State National Research University" (ORCID 0009-0007-0768-0490); **Skvortsov V.N.**¹ – Dr. Vet. sci., Head of Belgorod Department of FGBNU "Federal Scientific Centre VIEV" (ORCID 0000-0002-9629-0000); **Kravtsova A.R.**¹ – Junior Researcher (ORCID 0000-0003-1340

-8024)

¹FGBNU "Federal Scientific Centre — All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko of Russian Academy of Sciences"

²Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Belgorod State National Research University»

*andreyprisny@gmail.com

ABSTRACT

The effect of ciprofloxacin on the membrane reserve and resistance of ducklings' erythrocytes to hypotonic environment in experimental staphylococcosis was studied. The high permeability of the erythrocyte membrane to ciprofloxacin can lead to a change in the resistance of red blood cells to conditions of reduced osmolarity. The study involved three groups consisting of Bashkir ducklings aged 21 days. Group III birds were treated with ciprofloxacin at a dosage of 200 mg/l for five days. A day after the start of antibiotic treatment, intraperitoneal infection of groups II and III with *Staphylococcus aureus* culture at a concentration of 5McF was performed. Intracardiac puncture blood sampling was performed on the 1st, 3rd, 6th, 9th, and 13th days after infection. To assess the resistance of red blood cells to hypoosmotic pressure, blood was incubated in an isotonic solution (0.93% NaCl), in a hypotonic solution (0.33% NaCl), in a ratio of 1:1 during 30 seconds. Linear parameters of erythrocytes were determined in blood smears, surface area and volume, and indicators of membrane reserve were calculated. The relative membrane reserve of erythrocytes in birds of the control group in conditions of hypoosmolarity was the highest compared with the experimental groups. This is due to the initial increase in the size of bird cells of groups II and III under the influence of alpha-toxin *St. aureus*. The erythrocytes of intact ducklings demonstrate the maximum intensity of use of the relative membrane reserve in a hypotonic environment – iuM-R% is in the range between 19.4% and 33%. In the second and third groups, the average

value of iuMR% of the membrane is 17%. The involvement of surface plasmalemma reserves in the regulation of red blood cell size, as well as changes associated with ion and water transport, prevent hemolysis. The use of an intracellular membrane pools makes it possible to regulate the volume of nuclei under the aggressive action of alpha-hemolysin and ciprofloxacin.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Malarkodi, K.P. Effect of lipoic acid on the oxidoreductive status of the red blood cells in rats subject to oxidative stress by chronic administration of adriamycin / K.P. Malarkodi, R. Siva Prasad, P. Varalakshmi // *Human and Experimental Toxicology*. – 2004. – V. 23. – P.129-135.
2. Ahmad, I Protective role of vitamin E on mefenamic acid-induced alterations in erythrocytes / I. Ahmad, M. Suhail // *Biochemistry*. – 2002. – V. 67. – P. 945-948.
3. Nagasawa, T. Coil planet centrifugal and capillary tube centrifugal analysis of factors regulating erythrocyte osmotic fragility and deformability / T. Nagasawa, S. Kojima, E. Kimura // *Japanese Journal of Physiology*. – 1982. – V. 32. – P. 25-33.
4. Colino, C.I. A comparative study of ofloxacin and ciprofloxacin erythrocyte distribution / C.I. Colino, A. García Turiño, A. Sanchez Navarro A., J.M. Lanao // *Biopharmaceutics and Drug Disposition*. – 1998. – V. 19(2). – P. 71-77.
5. Aslam, H.M. Levofloxacin induces erythrocyte contraction leading to red cell death / H.M. Aslam, A. Sohail, A. Shahid, M.A.B. Khan, M.U. Sharif, R. Kausar, M. Rasheed // *Drug Target Insights*. – 2024. – V. 18. – P. 78. <https://doi.org/10.33393/dti.2024.3060>.
6. Присный, А.А. Сравнительный анализ влияния фторхинолонов на лейкограмму крови цыплят / А.А. Присный, А.А. Моисеева, В.Н. Скворцов // *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*. – 2020. – № 2. – С. 11-24.
7. Dönmez, F. Investigation of the Effects of Three Different Generations of Fluoroquinolone Derivatives on Erythrocyte Fragility and Hematological Parameters in Rats / F. Dönmez, A. Doğan // *Van Sağlık Bilimleri Dergisi*. – 2023. – V. 16(3). – P. 237-243. <https://doi.org/10.52976/vansaglik.1330882>.
8. Патент С1 2350952 Российская федерация, МПК G01N 33/48. Способ определения реактивности эритроцитов крови / Липунова Е.А., Никитин В.М., Скоркина М.Ю. Заявитель и патентообладатель Белгородский гос. ун-т. – №2007124991/15, заявл. 03.09.2007. Опубликовано: 27.03.2009 – С. 1-12.
9. Kregenow, F.M. The Response of Duck Erythrocytes to Nonhemolytic Hypotonic Media / F.M. Kregenow // *Journal of General Physiology*. – 1971. – Vol. 58, № 4. – P. 372-395.
10. Berube, B. Staphylococcus aureus alpha-Toxin: nearly a century of intrigue / B. Berube, J. Wardenburg // *Toxins*. – 2013. – V. 5. – P. 1140-1166. doi:10.3390/toxins5061140.
11. Kashif, S. Triggering of erythrocyte membrane blebbing by ciprofloxacin / S. Kashif, J. Kashif, Z. Mohanad, A. Al-Farga, R. Muhammad, M.A. Shaikh, B. Ismat, I. Muhammad, A. Asma, A. Muhammad // *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. – 2019. – Vol. 76. – № 5. – P. 110772.

REFERENCES

1. Malarkodi, K.P. Effect of lipoic acid on the oxidoreductive status of the red blood cells in rats subject to oxidative stress by chronic administration of adriamycin / K.P. Malarkodi, R. Siva Prasad, P. Varalakshmi // *Human and Experimental Toxicology*. – 2004. – V. 23. – P.129-135.
2. Ahmad, I Protective role of vitamin E on mefenamic acid-induced alterations in erythrocytes / I. Ahmad, M. Suhail // *Biochemistry*. – 2002. – V. 67. – P. 945-948.
3. Nagasawa, T. Coil planet centrifugal and capillary tube centrifugal analysis of factors regulating erythrocyte osmotic fragility and deformability / T. Nagasawa, S. Kojima, E. Kimura // *Japanese Journal of Physiology*. – 1982. – V. 32. – P. 25-33.
4. Colino, C.I. A comparative study of ofloxacin and ciprofloxacin erythrocyte distribution / C.I. Colino, A. García Turiño, A. Sanchez Navarro A., J.M. Lanao // *Biopharmaceutics and Drug Disposition*. – 1998. – V.

- 19(2). – P. 71-77.
5. Aslam, H.M. Levofloxacin induces erythrocyte contraction leading to red cell death / H.M. Aslam, A. Sohail, A. Shahid, M.A.B. Khan, M.U. Sharif, R. Kausar, M. Rasheed // *Drug Target Insights*. – 2024. – V. 18. – P. 78. <https://doi.org/10.33393/dti.2024.3060>.
6. Prisnyi, A.A. Comparative analysis of the effect of fluoroquinolones on the blood leukogram of chickens / A.A. Prisnyi, A.A. Moiseeva, V.N. Skvortsov // *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*. – 2020. – № 2. – P. 11-24. (In Russ.)
7. Dönmez, F. Investigation of the Effects of Three Different Generations of Fluoroquinolone Derivatives on Erythrocyte Fragility and Hematological Parameters in Rats / F. Dönmez, A. Doğan // *Van Sağlık Bilimleri Dergisi*. – 2023. – V. 16(3). – P. 237-243. <https://doi.org/10.52976/vansaglik.1330882>.
8. Patent C1 2350952 Russian Federation, IPC G01N 33/48. Method for determining the reactivity of red blood cells / Lipunova E.A., Nikitin V.M., Skorkina M.Yu. Applicant and patent holder Belgorod State University – № 2007124991/15, application 03.09.2007. Published: 03/27/2009 – P. 1-12. (In Russ.)
9. Kregenow, F.M. The Response of Duck Erythrocytes to Nonhemolytic Hypotonic Media / F.M. Kregenow // *Journal of General Physiology*. – 1971. – Vol. 58, № 4. – P. 372-395.
10. Berube, B. Staphylococcus aureus alpha-Toxin: nearly a century of intrigue / B. Berube, J. Wardenburg // *Toxins*. – 2013. – V. 5. – P. 1140-1166. doi:10.3390/toxins5061140.
11. Kashif, S. Triggering of erythrocyte membrane blebbing by ciprofloxacin / S. Kashif, J. Kashif, Z. Mohanad, A. Al-Farga, R. Muhammad, M.A. Shaikh, B. Ismat, I. Muhammad, A. Asma, A. Muhammad // *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. – 2019. – Vol. 76. – № 5. – P. 110772.