

УДК: 591.111.7:636.5.034:615.33

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2025.3.188

## МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЦЫПЛЯТ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭНРОФЛОКСАЦИНА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*: ДОЗАЗАВИСИМЫЙ ЭФФЕКТ

Присный А.А.\* – д-р биол. наук, гл. науч. сотр. Белгородского филиала ВИЭВ (ORCID 0000-0001-5229-4576); Гребцова Е.А. – канд. биол. наук, доц. каф. биологии НИУ «БелГУ» (ORCID 0009-0007-0768-0490); Скворцов В.Н. – д-р ветеринар. наук, руководитель Белгородского филиала ВИЭВ (ORCID 0000-0002-9629-0000); Юрин Д.В. – канд. ветеринар. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-9380-4136)

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

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

\*andreyprisny@gmail.com

**Ключевые слова:** цыплята, кровь, эритроциты, энрофлоксацин, морфометрия.

**Key words:** chickens, blood, red blood cells, enrofloxacin, morphometry.

Поступила: 31.07.2025

Принята к публикации: 26.08.2025

Опубликована онлайн: 15.09.2025



### РЕФЕРАТ

Фторхинолоновые препараты могут оказывать влияние на клетки организма млекопитающих и птиц. Одним из ключевых механизмов такого воздействия является способность фторхинолонов индуцировать окислительный стресс за счет генерации активных форм кислорода, что приводит к повреждению клеточных структур. В представленном исследовании изучено влияние различных концентраций энрофлоксацина на морфометрические параметры эритроцитов цыплят кросса «Хайсекс Браун» *in vitro*. Энрофлоксацин, представитель фторхинолонов, обладает не только антибактериальными свойствами, но и способен индуцировать окислительный стресс, приводя к повреждению клеточных структур. Отбор крови проводили методом внутрисердечной пункции. Отобранные пробы стабилизировали с использованием гепарина. Инкубацию эритроцитов в растворах осуществляли в течение 60 секунд, после чего изготавливали мазок на обезжиренном стекле. В мазках, окрашенных по Романовскому-Гимзе, оценены размеры длинной и короткой осей клеток и их ядер. Оценены изменения объема, площади поверхности эритроцитов, а также ядерно-цитоплазматического отношения под действием энрофлоксацина в концентрациях 0,05%, 50 мкл/л, 5 мкл/л, 0,5 мкл/л и 0,3 мкл/л. Контрольные группы включали эритроциты в аутологичной плазме и изотоническом растворе (0,93% NaCl) без добавления антимикробного препарата. Энрофлоксацин вызывает дозозависимые изменения морфологии

эритроцитов. Наибольшее увеличение объема (более 20%) и площади поверхности (14%) зафиксированы при концентрациях 5 мкл/л и 0,05%. При терапевтической дозе (0,3 мкл/л) изменения были менее выражены (увеличение объема на 11%, площади на 7%). Парадоксальное снижение эффекта при увеличении концентрации до 50 мкл/л обусловлено нелинейной зависимостью токсичности фторхинолонов от дозы. Уменьшение ядерно-цитоплазматического на 23% в группах с 0,1% и 10 мкл/л обусловлено преимущественно набуханием клетки.

## ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Помимо антибактериального действия, фторхинолоновые препараты могут оказывать влияние и на клетки организма млекопитающих и птиц. Одним из ключевых механизмов такого воздействия является способность фторхинолонов индуцировать окислительный стресс за счет генерации активных форм кислорода, что приводит к повреждению клеточных структур, включая липиды и белки мембран, а также ДНК [1].

Способность антимикробных препаратов к взаимодействию с липидными бислоями ведет к изменению проницаемости и текучести мембран. Данный эффект сопровождается нарушением осмотического баланса. В большинстве клеток осмотический стресс вызывает выраженное повышение уровня ионов кальция в цитоплазме [2], что оказывает существенное влияние на работу ионных каналов, а обмен осмолитов во время регуляции объема изменяет химическое окружение цитоскелета. Дестабилизация цитоскелета ведет к снижению устойчивости клеток к деформации.

Несмотря на значительное количество исследований, посвященных влиянию фторхинолонов на клетки млекопитающих, их воздействие на эритроциты птиц изучено недостаточно. В дополнение к примембранной сети из спектрина и актина, эритроциты птиц обладают цитоплазматическим цитоскелетом, который плотно соединяет их плазматическую мембрану с ядром, что делает данные клетки уникальной моделью для изучения механизмов действия антимикробных препаратов [3, 4, 5, 6, 7].

Целью данного исследования является изучение влияния различных концентраций энрофлоксацина на морфометрические параметры эритроцитов цыплят в

условиях *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Исследованы морфометрические параметры эритроцитов цыплят кросса «Хайсекс Браун» под влиянием энрофлоксацина в дозировках 0,05%, 50 мкл/л, 5 мкл/л, 0,5 мкл/л, 0,3 мкл/л. Концентрация 0,3 мкл/л была выбрана как соответствующая уровню исследуемого антимикробного препарата в плазме крови при его применении в терапевтической дозе. Контрольными группами служили клетки аутологичной плазмы, и эритроциты, инкубированные в изотоническом растворе (0,93% NaCl) без добавления энрофлоксацина.

Отбор крови проводили методом внутрисердечной пункции. Отобранные пробы стабилизировали с использованием гепарина. Инкубацию эритроцитов в растворах осуществляли в течение 60 секунд, после чего изготавливали мазок на обезжиренном стекле.

В мазках, 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  $\varepsilon$  – коэффициент эксцентриситеты эритроцита,  $a$  – величина длинной полуоси эритроцита,  $b$  – величина короткой полуоси эритроцита;

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

где  $V$  – объем эритроцита ( $\mu\text{m}^3$ );

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

где  $S$  – площадь поверхности эритро-

цита ( $\mu\text{m}^2$ ).

Проведен сравнительный анализ ядерно-цитоплазматического отношения (ЯЦО) интактных эритроцитов и подвергшихся воздействию энрофлоксацина. ЯЦО определяли по формуле:

$$\text{ЯЦО} = \frac{S_{\text{я}}}{S_{\text{ц}}},$$

где  $S_{\text{я}}$  – площадь ядра,  $S_{\text{ц}}$  – площадь цитоплазмы.

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

Объем и площадь поверхности эритроцитов в аутологичной плазме и изотоническом растворе не имели статистически значимых отличий (таблица 1). Инкубация клеток в растворах с концентрацией энрофлоксацина 0,3 мкл/л и 0,5 мкл/л характеризовалась идентичными эффектами – увеличением объема на 11%, а площади на 7%.

Примечательно, что в растворах энрофлоксацина 5 мкл/л и 0,05% зафиксирован максимальный рост показателей объема эритроцитов (более, чем на 20%) и площади поверхности эритроцитов (на 14%). Эффект раствора с промежуточной концентрацией энрофлоксацина 50 мкл/л, аналогичен терапевтической дозе. Фторхинолоны могут проявлять парадоксальное действие, при котором при увеличении концентрации препарата выше определенного порога его эффективность снижается [1, 9]. Это может быть причиной более мощного влияния на морфометрические показатели эритроцитов дозировки энрофлоксацина 5 мкл/л по сравнению с раствором 50 мкл/л.

Вероятно, что разные концентрации фторхинолонов имеют разные механизмы действия на эритроциты. Важно отметить, что быстрое повышение токсичности происходит после достижения заданной концентрации фторхинолонового препарата,

которая лишь немного превышает терапевтическую [10]. Существует пороговая концентрация, при которой клетки начинают активно реагировать на воздействие антимикробного препарата. Так при концентрации, соответствующей терапевтической, фторхинолон может влиять на клетки через один механизм, – например, через умеренное нарушение осмотического баланса. Существенное повышение выработки активных форм кислорода, которое способно привести к серьезным последствиям, начинается при концентрациях, примерно в 10 раз превышающих терапевтические [10]. При концентрации 5 мкл/л этот критический порог может быть достигнут, что приведет к активации другого механизма – окислительного стресса, ведущего к повреждению цитоскелета.

Исследованиями F. Sachs (2010) показано, что цитоскелет принимает на себя значительную часть осмотического давления и только лишь небольшая часть приходится на мембрану. В свою очередь, дестабилизация цитоскелета, отделение его от мембранного липидного бислоя приводит к формированию пузырьков между плазмалеммой и цитоскелетом, и, соответственно, к потере формы и увеличению объема клетки [11].

Объем ядра клеток в аутологичной плазме составил  $17,7 \pm 0,43 \mu\text{m}^3$ , а площадь поверхности –  $39,1 \pm 0,54 \mu\text{m}^2$ . Во всех остальных растворах, включая инкубацию в изотоническом растворе без добавления энрофлоксацина, отмечено уменьшение размеров ядра на 13%. Статистически значимые изменения, вызванные добавлением энрофлоксацина зафиксированы только в растворе 0,5 мкл/л. Поскольку ядро меньше по размерам, его площадь поверхности относительно объема будет больше, чем у всей клетки. Это связано с тем, что для малых объектов отношение площади к объему увеличивается.

Статистически значимое снижение ядерно-цитоплазматического отношения энрофлоксацин вызвал в двух концентрациях: 0,1% и 10 мкл/л (рис. 1).

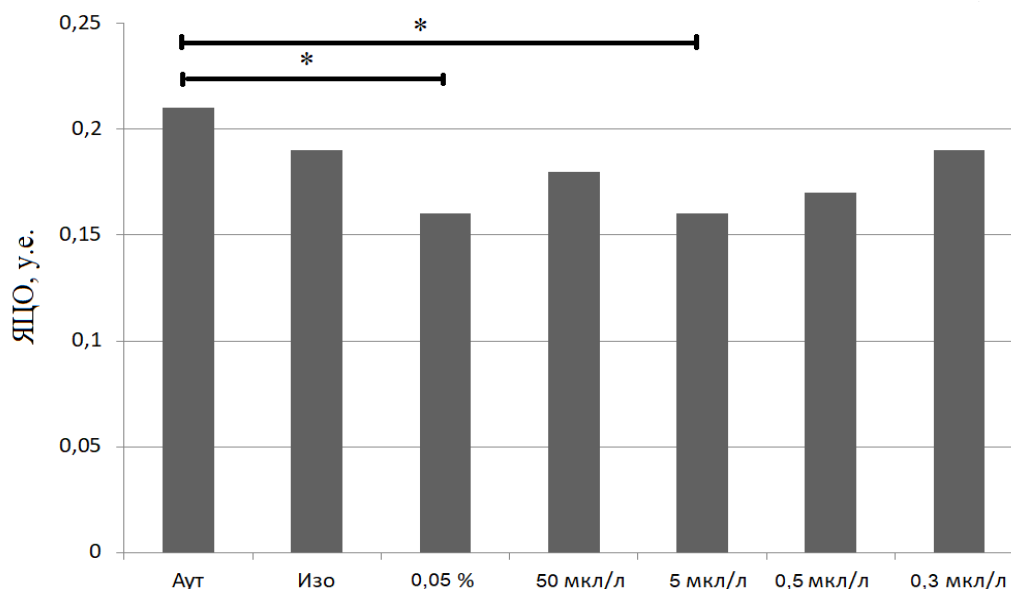
Показатель снизился на 23%, при этом, основной вклад в данное изменение внесло именно увеличение размеров цитоплазмы, а не уменьшение размеров яд-

ра. Терапевтическая доза энрофлоксацина производит эффект, аналогичный изотоническому раствору.

**Таблица 1 – Морфометрические параметры эритроцитов цыплят в растворах энрофлоксацина различной концентрации**

Раствор	Объём эритроцита, $\mu\text{m}^3$	Площадь поверхности эритроцита, $\mu\text{m}^2$	Объём ядра эритроцита, $\mu\text{m}^3$	Площадь поверхности ядра эритроцита, $\mu\text{m}^2$
Аутологичная плазма	247,8 $\pm$ 3,43	229,6 $\pm$ 2,06	17,7 $\pm$ 0,43	39,1 $\pm$ 0,54
Изотонический раствор	248,6 $\pm$ 3,57	228,9 $\pm$ 2,15	15,3 $\pm$ 0,31	35,6 $\pm$ 0,46
0,05 % раствор энрофлоксацина	306,1 $\pm$ 2,83*	262,8 $\pm$ 1,58*	15,9 $\pm$ 0,29	36,6 $\pm$ 0,43
50 мкл/л	275,7 $\pm$ 3,31*	245,7 $\pm$ 1,92*	15,7 $\pm$ 0,26	36,2 $\pm$ 0,39
5 мкл/л	300,1 $\pm$ 3,32*	260,0 $\pm$ 1,88*	15,7 $\pm$ 0,26	36,3 $\pm$ 0,39
0,5 мкл/л	273,9 $\pm$ 2,83*	245,1 $\pm$ 1,62*	14,8 $\pm$ 0,24	34,8 $\pm$ 0,36
0,3 мкл/л	272,8 $\pm$ 2,83*	244,7 $\pm$ 1,65*	16,9 $\pm$ 0,27	38,3 $\pm$ 0,39

Примечание: \* – статистически достоверные различия между значениями параметров клеток в изотоническом растворе и растворах энрофлоксацина по U-критерию Манна-Уитни при  $p < 0,05$ .



**Рисунок 1 – Влияние различных концентраций энрофлоксацина на ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) эритроцитов цыплят.**

## ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Результаты исследования демонстрируют, что энрофлоксацин оказывает значительное влияние на морфометрические параметры эритроцитов цыплят в условиях *in vitro*. Увеличение объема и площади поверхности клеток в группе с 0,05 % энрофлоксацином может быть связано с повреждением плазмалеммы под действием препарата, нарушением осмотического баланса и дестабилизацией цитоскелета. Это согласуется с данными о том, что антимикробные препараты, могут индуцировать окислительный стресс и повреждать липидный бислой мембран [12].

Фторхинолоны могут проявлять парадоксальное действие, при котором при увеличении концентрации препарата выше определенного порога его эффективность снижается. Это объясняет причину более мощного воздействия раствора с концентрацией 5 мкл/л по сравнению с 50 мкл/л. Наибольший вклад в снижение показателя ядерно-цитоплазматического отношения вносило, в первую очередь, набухание клетки.

## MORPHOMETRIC PARAMETERS OF CHICKEN ERYTHROCYTES UNDER THE INFLUENCE OF ENROFLOXACIN *IN VITRO* CONDITIONS: DOSE-DEPENDENT EFFECT

**Prisnyi A.A.\*** – Dr. Biol. Sci., Principal Researcher FGBNU "Federal Scientific Centre VIEV" (ORCID 0000-0001-9380-4136); **Grebtsova E.A.** – Kand. Biol. Sci., associate professor "Belgorod State National Research University" (ORCID 0009-0007-0768-0490); **Skvortsov V.N.** – Dr. Vet. sci., Head of Belgorod Department of FGBNU "Federal Scientific Centre VIEV" (ORCID 0000-0002-9629-0000); **Yurin D.V.** – Leading Researcher (ORCID 0000-0001-9380-4136)

FGBNU "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"

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

\*andreyprisny@gmail.com

## ABSTRACT

Fluoroquinolone drugs can affect the cells of the mammalian and avian body. One of the key mechanisms of this effect is the ability of fluoroquinolones to induce oxidative stress by generating reactive oxygen species, which can lead to damage to cellular structures. The study investigated the effects of various concentrations of enrofloxacin on morphometric parameters of erythrocytes from «Hisex Brown» chickens *in vitro*. Enrofloxacin, a fluoroquinolone antibiotic, exhibits not only antibacterial properties but can also induce oxidative stress leading to cellular structural damage. Blood samples were collected via cardiac puncture and stabilized with heparin. Erythrocytes were incubated in test solutions for 60 seconds, followed by preparation of blood smears on degreased slides. Romanowsky-Giemsa stained smears were used to measure major and minor axes of cells and their nuclei. Changes in erythrocyte volume, surface area, and nuclear-cytoplasmic ratio were evaluated following exposure to enrofloxacin at concentrations of 0.05%, 50 µl/l, 5 µl/l, 0.5 µl/l, and 0.3 µl/l. Control groups included erythrocytes in autologous plasma and isotonic saline (0.93% NaCl) without enrofloxacin. Enrofloxacin induced dose-dependent alterations in erythrocyte morphology. The most significant increases in cell volume (>20%) and surface area (14%) were observed at concentrations of 5 µl/l and 0.05%. The therapeutic dose (0.3 µl/l) produced less pronounced changes (11% increase in volume, 7% in surface area). The paradoxical reduction of effect at higher concentration (50 µl/l) may be attributed to the nonlinear dose-response toxicity characteristic of fluoroquinolones. The 23% decrease in nuclear-cytoplasmic ratio observed at 0.1% and 10 µl/l concentrations was primarily due to cellular swelling.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Dönmez, F. Investigation of the Effects of Three Different Generations of Fluoroquino-



lone Derivatives on Erythrocyte Fragility and Hematological Parameters in Rats / F. Dönmez, A. Doğan // *Van Sağlık Bilimleri Dergisi*. – 2023. – V. 16(3). – P. 237-243. doi: 10.52976/vansaglik.1330882.

2. Niggel, J. Mechanically induced calcium movements in astrocytes, bovine aortic endothelial cells and C6 glioma cells / J. Niggel, W. Sigurdson, F. Sachs // *The Journal of Membrane Biology*. – 2000 – V. 174. – P. 121-134. doi: 10.1007/s002320001037.

3. Кильдеева, А.Г. Белковый состав цитоскелета эритроцитов голубя / А. Г. Кильдеева // XLVII Огарёвские чтения: Материалы научной конференции: в 3 частях, Саранск, 06–13 декабря 2018 года. Том Часть 2. – Саранск: Научно-исследовательский институт регионологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва", 2019. – С. 119-124.

4. Li, J. Cytoskeletal dynamics of human erythrocyte / J. Li, G. Lykotrafitis, M. Dao, S. Suresh // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007 – V. 104 (12). – P. 4937-4942. doi: 10.1073/pnas.0700257104.

5. Paarvanova, B. Thermal dielectroscopy study of submembrane spectrin network in animal erythrocytes / B. Paarvanova, T. Slavov, V. Ivanov, I. Ivanov // *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. – 2014. – V. 17 (3). – P. 165–172.

6. Sloboda, R.D. Structure and composition of the cytoskeleton of nucleated erythrocytes I. The presence of microtubule-associated protein 2 in the margin-al band / R.D. Sloboda, K. Dickersin // *The Journal of cell biology*. – 1980. – V. 87 (1). – P. 170–179.

7. Watts, C. Protein and lipid components of the pigeon erythrocyte membrane / C. Watts, K.P. Wheeler // *Biochemical Journal*. – 1978. – V. 173 (3). – P. 899–907.

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. Drlica, K. Fluoroquinolones: Action and Resistance / K. Drlica, M. Malik // *Current topics in medicinal chemistry*. – 2003 – V. 3 – P.249-282. doi: 10.2174/1568026033452537.

10. Michalak, K. Treatment of the Fluoroquinolone-Associated Disability: The Pathobiochemical Implications / K. Michalak, A. Sobolewska-Włodarczyk, M. Włodarczyk, J. Sobolewska, P. Woźniak, B. Sobolewski // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2017 – 8023935. doi: 10.1155/2017/8023935.

11. Sachs, F. Stretch-activated ion channels: what are they? / F. Sachs // *Physiology (Bethesda)*. – 2010. – V. 25. – № 1. – P. 50-56. doi: 10.1152/physiol.00042.2009.

12. 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. 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. doi: 10.52976/vansaglik.1330882.

2. Niggel, J. Mechanically induced calcium movements in astrocytes, bovine aortic endothelial cells and C6 glioma cells / J. Niggel, W. Sigurdson, F. Sachs // *The Journal of Membrane Biology*. – 2000 – V. 174. – P. 121-134. doi: 10.1007/s002320001037.

3. Kildeyeva, A.G. Protein Composition of the Cytoskeleton of Pigeon Red Blood Cells / A. G. Kildeyeva // XLVII Ogarev Readings: Materials of the Scientific Conference: in 3 parts, Saransk, December 06–13, 2018. Volume Part 2. – Saransk: Research Institute of Regional Studies of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education Mordovian State University named after N.P. Ogarev,

2019. – P. 119-124. (In Russ.)
4. Li, J. Cytoskeletal dynamics of human erythrocyte / J. Li, G. Lykotrafitis, M. Dao, S. Suresh // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007 – V. 104 (12). – P. 4937-4942. doi: 10.1073/pnas.0700257104.
5. Paarvanova, B. Thermal dielectroscopy study of submembrane spectrin network in animal erythrocytes / B. Paarvanova, T. Slavov, V. Ivanov, I. Ivanov // *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. – 2014. – V. 17 (3). – P. 165–172.
6. Sloboda, R.D. Structure and composition of the cytoskeleton of nucleated erythrocytes I. The presence of microtubule-associated protein 2 in the margin-al band / R.D. Sloboda, K. Dickersin // *The Journal of cell biology*. – 1980. – V. 87 (1). – P. 170–179.
7. Watts, C. Protein and lipid components of the pigeon erythrocyte membrane / C. Watts, K.P. Wheeler // *Biochemical Journal*. – 1978. – V. 173 (3). – P. 899–907.
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. Drlica, K. Fluoroquinolones: Action and Resistance / K. Drlica, M. Malik // *Current topics in medicinal chemistry*. – 2003 – V. 3 – P.249-282. doi: 10.2174/1568026033452537.
10. Michalak, K. Treatment of the Fluoroquinolone-Associated Disability: The Pathobiochemical Implications / K. Michalak, A. Sobolewska-Włodarczyk, M. Włodarczyk, J. Sobolewska, P. Woźniak, B. Sobolewski // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2017 – 8023935. doi: 10.1155/2017/8023935.
11. Sachs, F. Stretch-activated ion channels: what are they? / F. Sachs // *Physiology (Bethesda)*. – 2010. – V. 25. – № 1. – P. 50-56. doi: 10.1152/physiol.00042.2009.
12. 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.