



УДК 591.11.1:576.5:591.128.1

Влияние температурного фактора на сезонные колебания локомоционной активности гемоцитов лягушек *Rana ridibunda* Pall.

**С.Д. Чернявских,
Во Ван Тхань, До Хыу Куэт,
И.С. Буковцова**

Белгородский государственный
национальный
исследовательский
университет, Россия, 308015,
г. Белгород, ул. Победы, 85

E-mail: Chernyavs-
kikh@bsu.edu.ru

В тесте миграции под агарозой изучено влияние температурного фактора на сезонные колебания локомоционной активности ядерных эритроцитов и лейкоцитов лягушек рода *Rana ridibunda* Pall. Установлено, что в условиях разных температур инкубации изменяется площадь спонтанной миграции клеток крови в весенний и летний периоды и не изменяется в осенний и зимний сезоны. Показано, что миграционная активность гемоцитов увеличивается весной только при пониженной температуре инкубации, летом – как при пониженной, так и при повышенной температурах.

Ключевые слова: ядерные эритроциты, лейкоциты, локомоционная активность.

Введение

Для понимания различных физиологических состояний в клинической и научной практике широко используются показатели, связанные с важнейшей тканью организма позвоночных – кровью [1, 2, 3]. Правильное представление о системе крови помогает достаточно точно распознавать нормальные и патологические процессы в организме [4]. Для многих показателей системы крови и иммунитета у млекопитающих животных и человека выявлены и описаны сезонные колебания [5, 6], которые являются одной из форм приспособительных реакций организма к циклическим изменениям окружающей среды и присущи всем уровням биологической организации [7]. Циркануальные изменения многих функций организма определяют колебания температуры. Общая картина изменений, происходящих в организме млекопитающих животных и человека при остром перегревании, описана достаточно полно [8]. Имеются работы, в которых сообщается о положительном влиянии высокой температуры на факторы неспецифической резистентности и иммуногенез [9]. Вместе с тем, в хронобиологических исследованиях практически отсутствуют сведения о действии температурного фактора на сезонные изменения локомоционной активности лейкоцитов и совсем не изучена миграционная активность эритроцитов у представителей низших позвоночных животных. Определенный интерес представляет класс Земноводных, обитающих в разных средах, что, несомненно, отражается на функциональной активности их клеток крови [10].

Цель исследования: изучить влияние температурного фактора на сезонные колебания локомоционной активности гемоцитов у представителей класса Земноводные – лягушек *Rana ridibunda* Pall.

Объекты и методы исследования

Опыты проведены на лягушках рода *Rana ridibunda* Pall. (30 особей), отловленных из реки Везелка в черте г. Белгорода. Объектами исследования служили ядерные эритроциты и лейкоциты.

Кровь для анализов у лягушек брали из сердца после дачи легкого эфирного наркоза. В качестве антикоагулянта использовали гепарин в количестве 10 ед./мл. Полученную кровь центрифугировали 4 мин. при 400 g. Собирали нижнюю часть плазмы, богатую лейкоцитами и лейкоцитарное кольцо. Отмытые и ресуспендированные лейкоциты, а также эритроциты подсчитывали в камере Горяева. В работе использовали изотонический раствор (0.6%-ный раствор NaCl).

Спонтанную локомоционную активность гемоцитов оценивали в тесте миграции под агарозой. За основу был взят классический метод, описанный в многочисленных работах [11, 12] в модификации [8]. В лунки, вырезанные в агарозном геле, помещали по 3 мкл суспензии гемоцитов, содержащей около 300 тыс. клеток (разведенной изотоническим раствором). Стекла с эритроцитами и лейкоцитами инкубировали в бескислородной среде при температурах 8°C – в холодильнике, 37°C – в термостате, контрольные – при комнатной температуре (22°C). Через сутки клетки фиксировали в течение часа 10%-ным глутаровым альдегидом. Затем агарозу удаляли, гемоциты окрашивали азур-эозином. На малом



увеличении микроскопа с помощью окуляр-микрометра определяли площадь спонтанной миграции клеток крови.

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики. С помощью компьютерных программ Excel 7.0 и Statistica 6.0 вычисляли значение средней арифметической выборочной совокупности (M) и стандартной ошибки среднего значения (m). С помощью непарного (двухвыборочного) t -критерия Стьюдента определяли достоверность различий между значениями признаков сравниваемых групп. За уровень статистически значимых принимали изменения при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Сравнительный анализ данных, полученных при разных температурах инкубации клеток крови, выявил наличие сезонных колебаний миграционной активности эритроцитов *Rana ridibunda* Pall. (табл. 1).

Таблица 1

Показатели площади миграции эритроцитов лягушек

Период исследования	Температура инкубации		
	8°C	22°C	37°C
Весенний	3.24±0.15	2.82±0.11©	2.70±0.12©
Летний	3.16±0.27	2.78±0.48©	3.39±0.35*®
Осенний	2.95±0.47*	3.16±0.32*	3.02±0.17*#
Зимний	3.13±0.16	3.07±0.22*	3.11±0.20*#

Примечание: здесь и в табл. 2: достоверность различий по сравнению: * – с весенним периодом, # – с летним периодом, & – с осенним периодом, © – с температурой 8°C, ® – с температурой 22°C по t -критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

При пониженной температуре инкубации площадь миграции эритроцитов в осенний период на 9.0% ниже, чем в весенний. При комнатной температуре значения изучаемого показателя осенью и зимой на 10.8% и 8.1% выше, чем весной. При повышенной температуре локомоторная активность красных клеток крови в летний, осенний и зимний периоды на 20.4%, 10.6% и 13.2% соответственно выше по сравнению с весенним сезоном. Осенью и зимой при данной температуре показатели площади миграции эритроцитов на 10.9% и 8.3% ниже, чем летом. В весенний период самая высокая миграционная активность красных клеток крови отмечена при температуре 8°C, самая низкая – при температуре 37°C. Снижение показателей площади миграции эритроцитов весной при температурах 22 и 37°C по сравнению с температурой 8°C составило 13.0% и 16.7% соответственно. В летний сезон самая высокая миграционная активность красных клеток крови зарегистрирована при температуре 37°C, самая низкая – при температуре 22°C. Снижение площади миграции при температуре 22°C по сравнению с температурой 8°C летом составило 12.0%, увеличение значения данного показателя при повышенной температуре по сравнению с комнатной – 18.0%. В осенний и зимний периоды изменение температуры инкубации не оказало влияние на миграционную активность эритроцитов.

При пониженной температуре инкубации сезонных колебаний в показателях площади миграции лейкоцитов не наблюдали (табл. 2).

Таблица 2

Показатели площади миграции лейкоцитов лягушек

Период исследования	Температура инкубации		
	8°C	22°C	37°C
Весенний	3.13±0.15	2.69±0.13©	2.68±0.14©
Летний	3.05±0.19	2.71±0.23©	2.98±0.11*®
Осенний	3.14±0.47	3.08±0.30*#	2.74±0.28#
Зимний	3.04±0.22	3.01±0.22*#	3.14±0.16*#&

При комнатной температуре миграционная активность белых клеток крови в осенний и зимний периоды выше на 12.7% и 10.6%, чем в весенний и на 12.0% и 10.0%, чем в летний периоды. При повышенной температуре инкубации в летний и зимний периоды локомоторная активность лейкоцитов на 10.1% и 14.7% выше, чем в весенний сезон. Площадь миграции белых клеток крови при температуре 37°C осенью на 8.1% ниже, зимой – на 5.1% выше, чем летом. По сравнению с осенним периодом локомоторная активность в зимний сезон при повышенной температуре инкубации на 12.7% выше. В весенний период самые высокие значения показателей площади спонтанных локомоций лейкоцитов отмечены при температуре 8°C. Увеличение

температуры до 22 и 37°C способствовало снижению миграционной активности белых клеток крови на 14.1% и 14.4% по сравнению с пониженной температурой. В летний период при температуре 22°C показатель площади миграции лейкоцитов на 11.2% ниже, чем при пониженной температуре. При температуре 37°C данный показатель летом на 9.1% выше, чем при температуре 22°C. В осенний и зимний периоды изменение температуры инкубации белых клеток крови не оказало влияния на показатели площади миграции.

Известно, что у лягушки во время зимовки снижена температура тела и резко ограничена двигательная активность. Эти процессы наблюдаются не только в самый холодный период зимовки, но также и в период между сезоном размножения и уходом на зимовку [13]. Таким образом, полученные нами данные по миграционной активности клеток крови в осенний и зимний периоды согласуются с функциональной активностью животных. В весенний период увеличение температуры инкубации гемоцитов выше температуры тела животного является фактором, способствующим снижению функциональной активности клеток крови. В летний период средняя температура окружающей среды соответствует комнатной [14]. Увеличение или снижение температуры гемоцитов функционально активных животных способствует активации плазмалеммы и увеличению двигательной активности клеток. Косвенным подтверждением этому является работа [15], в которой указывается, что повышение активности гемоцитов происходит не только при воспалении, но может быть вызвано разными по природе агентами. Все стимуляторы, так или иначе, взаимодействуют с плазматической мембраной, меняя ее молекулярную топографию. Ряд авторов [9], изучая механизмы влияния на организм термического фактора, показали, что при тепловом воздействии происходит повышение проницаемости лизосомных мембран и выход в кровотока протеолитических ферментов. Некоторые из этих ферментов обладают свойствами модифицировать структуру поверхностной мембраны эритроцитов, что стимулирует их активацию. Температура окружающей среды определяет так называемые «слабые» взаимодействия между молекулами, регулируя микровязкость липидного бислоя, фазовое распределение липидов, микроокружение белков, белок-липидные взаимодействия и другие характеристики структурной организации мембраны [16].

Выводы

1. Локомоционная активность ядерных эритроцитов и лейкоцитов лягушек рода *Rana ridibunda* Pall. при пониженной (8°C) температуре инкубации увеличивается как в весенний, так и в летний периоды, при повышенной (37°C) – только летом.
2. В осенний и зимний сезоны при экспозиции клеток крови лягушек в условиях гипо- или гипертермии показатели площади спонтанной миграции не изменяются.

Список литературы

1. Заварзин А.А. Очерки эволюционной гистологии крови и соединительной ткани. – Л.: Изд-во АН СССР, 1953. – 716 с.
2. Коржув П.А. Гемоглобин. Сравнительная физиология. – М.: Наука, 1964. – 286 с.
3. Косов А.И., Ямщиков Н.В. Система крови: (организационные, морфофункциональные и геронтологические аспекты): Учеб.пособие для студентов и слушателей ин-та последип. образ. – Самара:Офорт, 2007. – 109 с.
4. Грушко М.П. Клеточный состав кроветворных органов половозрелых самок представителей класса рыб, земноводных и пресмыкающихся // Автореф. доктор дис. – Астрахань: АГУ. – 2010. – 73 с.
5. Малафеева Э.В. К регуляции сезонных изменений уровня некоторых гуморальных неспецифических факторов иммунитета // Климато-медицинские проблемы и вопросы медицинской географии Сибири. – Томск, 1974. – Т. 1. – С. 128-130.
6. Житенева Л.Д., Макаров Э.В., Рудницкая О.А. Эволюция крови. – Ростов-на-Дону: АзНИИРХ, 2001. – 113 с.
7. Агаджанян Н.А. Экологическая физиология: проблема адаптации и стратегия выживания // Материалы X Междунар. симпозиума «Эколого-физиологические проблемы адаптации». – М.: Изд-во РУДН, 2001. – С. 5-12.
8. Федорова М.З., Левин В.Н. Спонтанная миграция нейтрофилов крови в смешанной популяции лейкоцитов и ее изменения под влиянием веществ аутоплазмы при различных функциональных состояниях организма // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – Т. 5. – С 16-19.
9. Прокопенко Л.Г., Яхонтов Ю.А. Механизм стимуляции иммунного ответа при действии на организм высокой температуры // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 1981. - №6. - С. 62-66.
10. Хамидов Д.Х., Акилов А.Т., Турдыев А.А. Кровь и кроветворение у позвоночных животных. – УзССР: Изд-во Фан, 1978. – 168 с.
11. Дуглас С.Д., Куи П.Г. Исследование фагоцитоза в клинической практике // Пер. с англ. – М.: Медицина, 1983. – 112 с.
12. Nelson R.D., Quie P.G., Simmons R.L. Chemotaxis under agarose: a new and simple method for



measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes // *J. Immunol.* – 1975. – Vol.115. – P. 1650-1656.

13. Акуленко Н.М. Сезонная динамика эритропоэза и его топографическое распределение у лягушки озерной // *Вестник Запорожского национального университета.* – 2008, №2. – С. 5-10.

14. СНиП 23–01–99* «Строительная климатология». М., 2003.

15. Маянский А.Н. Механизмы рекогносцировочных реакций нейтрофила // *Успехи современной биологии.* – 1986. – Т. 102, Вып.3(6). – С. 360-376.

16. Горюнов А.С., Борисова А.Г., Суханова Г.А. Терморезистентность эритроцитов и гемоглобина при акклиматизации радужной форели *Salmo irideus* // *Ж. эвол. биохим. и физиол.* – 2001. –Т. 37. – С. 416-418.

THE TEMPERATURE FACTOR INFLUENCE ON SEASONAL LOCOMOTIONAL ACTIVITY FLUCTUATION OF RANA RIDIBUNDA PALL BLOOD CELLS

**S.D. Chernyavskikh,
Vo Van Thanh, Do Huy Kyet,
I.S. Bukovtsova**

*Belgorod State National Research
University,
Pobedy St., 85, Belgorod, 308015,
Russia*

E-mail: Chernyavskikh@bsu.edu.ru

We've studied the temperature effect on seasonal locomotional activity fluctuation of *Rana ridibunda* Pall nuclear red cells and white blood cells using the agarose test migration. It's been found that at different incubation temperatures the spontaneous migration area of blood cells changed in the spring and summer and did not during the autumn and winter. It's been shown that the migratory activity of blood cells increased at low temperature incubation in the spring only; in the summer - both at low and at high temperatures.

Key words: nuclear red cells, white cells, locomotional activity.