

СЕЗОННЫЕ КОЛЕБАНИЯ МИГРАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ЯДЕРНЫХ ГЕМОЦИТОВ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ РАЗНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ ИНКУБАЦИИ

© С. Д. Чернявских, До Хью Куэт, Во Ван Тхань, И. С. Буковцова

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия
E-mail: Chernyavskikh@bsu.edu.ru

Резюме

В тесте миграции под агарозой установлено, что ядерные эритроциты *Suvarinus carpio*, *Rana ridibunda* и *Gallus domesticus* способны к спонтанным локомоциям. Процесс миграции у красных клеток крови лягушки сопряжен с образованием длинных псевдоподий, у сазана и курицы — коротких протрузий. Показано, что миграционная активность ядерных эритроцитов и лейкоцитов у *Rana ridibunda* и *Gallus domesticus* при действии температурного фактора в условиях *in vitro* носит сезонный характер, у *Suvarinus carpio* не зависит от сезона года. У лягушки и курицы циркануальные колебания площади миграции клеток крови сопряжены с функциональной активностью организма, у сазана — нет.

Ключевые слова: миграционная активность, ядерные гемоциты, позвоночные животные.

Введение

Согласно представлениям общей и эволюционной физиологии, в организме животных эритроциты реализуют дыхательную функцию, а лейкоциты — иммуннокомпетентную [1—3]. В то же время известно, что клетки крови могут выполнять дублирующие функции, усиливая гарантию жизнеобеспечения и целостности организма [4, 5]. Фагоцитирующие клетки реализуют свои защитные функции за счет способности к процессу миграции [6]. В научной литературе имеется немало работ, посвященных механизмам локомоционной активности белых клеток крови млекопитающих животных и человека [7, 8]. Изучены особенности как спонтанной, так и стимулированной факторами различной природы миграции лейкоцитов в функционально измененных и патологических состояниях организма [9]. Известно, что эритроциты низших позвоночных животных способны к поглощению чужеродных частиц [10—12]. Однако, несмотря на широкий спектр выполненных к настоящему моменту исследований, охватывающих проблему фагоцитоза [13—15], остается неизученным ряд вопросов, связанных с определением ключевых аспектов осуществления фагоцитарной реакции клетками крови низших позвоночных и птиц. У данных групп животных недостаточно изучена миграционная активность лейкоцитов и нет данных по ее проявлению у ядерных эритроцитов, не исследованы механизмы проявления ком-

пенсаторных реакций ядерных гемоцитов в условиях гипо- и гипертермии. В хронобиологических исследованиях имеются единичные данные о сезонных изменениях миграционной активности ядерных клеток крови у представителей низших позвоночных животных и птиц, обусловленных действием температурного фактора. Это определило цель проведенного исследования — изучить особенности циркануальных колебаний миграционной активности ядерных гемоцитов при разных температурах инкубации.

Материал и методика

В соответствии с поставленной целью проведены две серии опытов. В первой серии решали вопрос о наличии физиологической способности к спонтанным локомоциям у ядерных эритроцитов сазана *Suvarinus carpio*, лягушки озерной *Rana ridibunda* и курицы домашней *Gallus domesticus*. Во второй серии оценивали влияние температурного фактора на миграционную активность ядерных эритроцитов и лейкоцитов сазана, лягушки и курицы в условиях *in vitro* с учетом естественной физиологической активности животных в течение календарного года в четырех вариантах — весенний (апрель), летний (июль), осенний (октябрь) и зимний (январь). Перед началом каждой серии и вариантов опытов животных выдерживали в течение суток при комнатной температуре (20 °C).

После легкого эфирного наркоза проводили забор крови: у сазана — из хвостовой вены, у лягушки — из сердца, у курицы — путем венепункции. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (10 ед./мл). Стабилизированную кровь центрифугировали 4 мин при 400 *g*, собирали нижнюю часть плазмы, богатую лейкоцитами, и лейкоцитарное кольцо. В камере Горяева подсчитывали эритроциты, а также отмытые и ресуспендированные лейкоциты.

В качестве критерия самопроизвольной миграции использовали площадь ареала спонтанного распространения эритроцитов и лейкоцитов, полученного в тесте под агарозой. За основу был взят классический метод, описанный в многочисленных работах [16—18], в модификации [19, 20]. В лунки, вырезанные в агарозном геле, нанесенном на предметное стекло, помещали по 3 мкл суспензии гемоцитов, разведенной изотоническим раствором (0.8, 0.6 и 0.9 % соответственно для сазана, лягушки и курицы). В таком объеме суспензии в среднем находилось около 1 млн клеток крови сазана и курицы и около 300 тыс. гемоцитов лягушек. Стекла с гемоцитами сазана и лягушки инкубировали сутки в среде с 5%-ным содержанием CO₂ в трех вариантах по отношению к температурному фактору — при комнатной (20 °C), пониженной (5 °C) и повышенной (40 °C) температурах. Клетки крови ку-

рицы инкубировали в тех же условиях, а также при температуре 45 °C (четвертый вариант), рассматривая температуры 5 и 20 °C как пониженные, 40 °C как оптимальную и 45 °C как повышенную. По завершении периода инкубации гемоциты фиксировали в течение часа глутаровым альдегидом и затем окрашивали азур-эозином. Площадь спонтанной миграции отдельных пулов клеток регистрировали и измеряли с помощью анализатора изображений «Видео тесТ-Размер» 5.0 (ООО «Микроскоп-Сервис», г. Санкт-Петербург).

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики. Цифровые данные, представленные средней арифметической (*M*) и ошибкой средней ($\pm m$), вносили в таблицы лишь при условии, что они имеют нормальное распределение. Достоверность различий определяли по *t*-критерию Стьюдента ($p < 0.05$).

Результаты и обсуждение

Результаты первой серии опытов позволяют однозначно утверждать, что красные клетки крови сазана, лягушки озерной и курицы домашней способны к спонтанным локомоциям. Рис. 1—3 свидетельствуют, что после 24-часовой инкубации клеток крови при

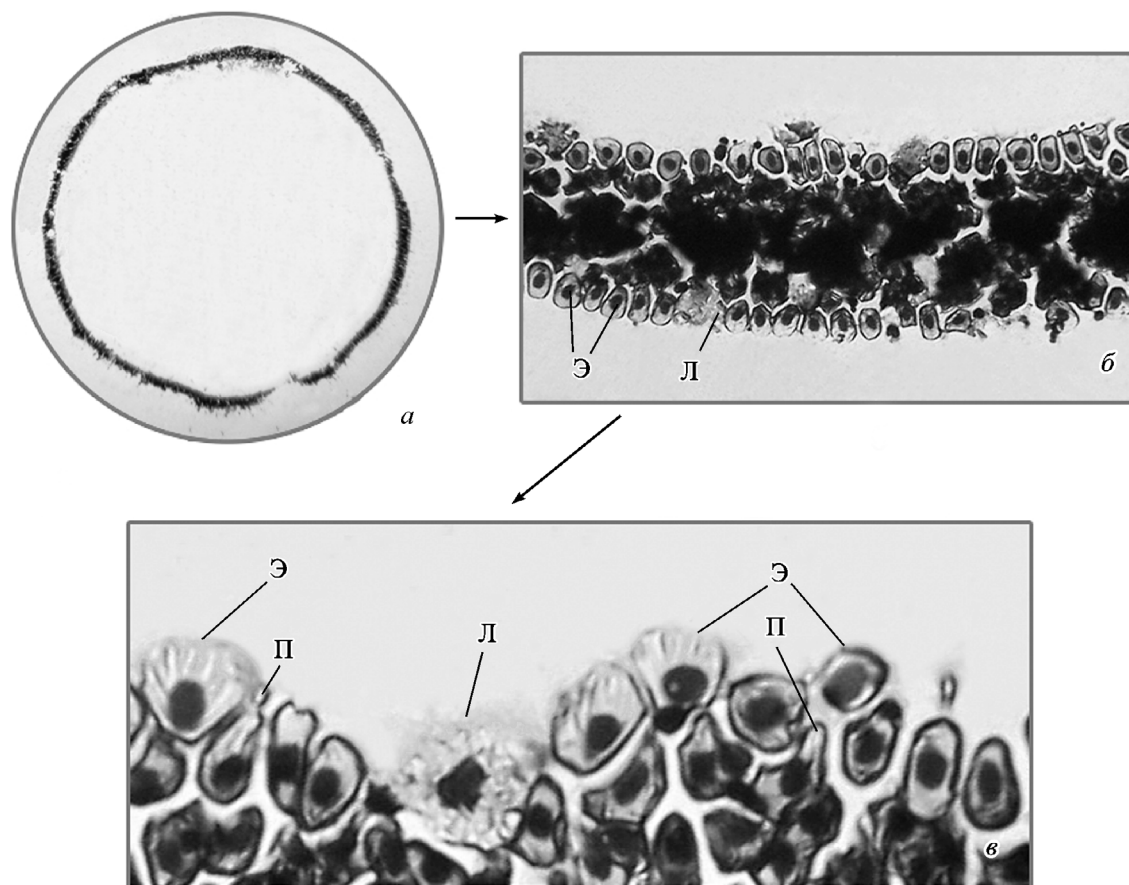


Рис. 1. Распределение клеток крови *Sarginus sagrio* в лунке через сутки после инкубации.

a — малое увеличение ($\times 40$), *б* — большое увеличение ($\times 400$), *в* — большое увеличение ($\times 2000$), Э — эритроциты, Л — лейкоциты, П — псевдоподии.

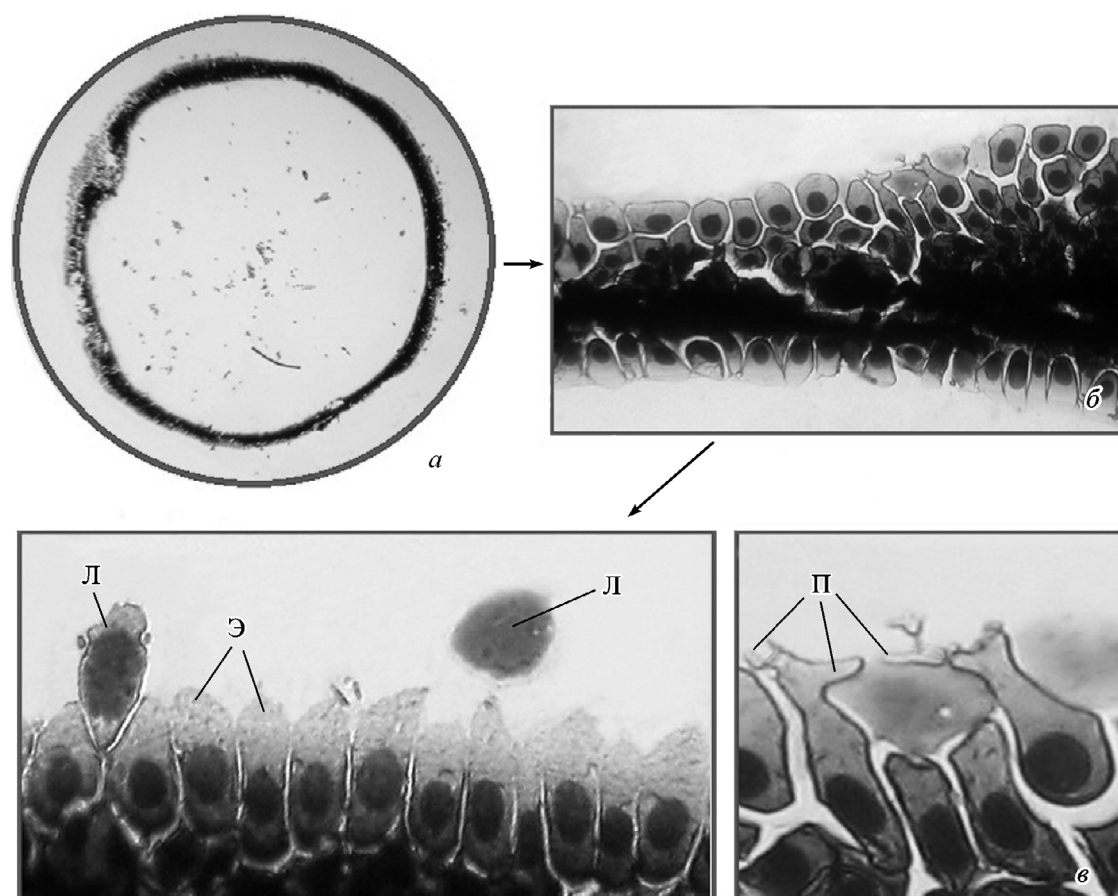


Рис. 2. Распределение клеток крови *Rana ridibunda* в лунке через сутки после инкубации.

a — малое увеличение ($\times 40$), *б* — большое увеличение ($\times 400$), *в* — большое увеличение ($\times 2000$), Э — эритроциты, Л — лейкоциты, П — псевдоподии.

комнатной температуре за края лунки мигрировали как лейкоциты, так и эритроциты подопытных животных.

Установлено, что процесс спонтанных локомоций у красных клеток крови лягушек сопряжен с образованием на лидирующем крае длинных выростов — псевдоподий (ламеллоподий) различной формы, обычно характерных для лейкоцитов (рис. 2). У сазана (рис. 1) и курицы (рис. 3) в основе миграции эритроцитов лежит формирование коротких протрузий. Согласно данным некоторых авторов [21], у ядерных эритроцитов *Rana ridibunda* по сравнению с клетками аналогичного пула *Syrpinus carpio* и *Gallus domesticus* более высокий показатель складчатости плазмалеммы и соответственно больший мембранный резерв, позволяющий образовывать длинные псевдоподии. Образование длинных псевдоподий у ядерных эритроцитов лягушки и менее коротких протрузий у курицы и сазана позволяет клеткам данного пула участвовать в реакциях миграции. Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей [22], согласно которым способность клетки к локомоциям во многом определяется ее формой. При этом динамика переднего края клетки вносит основной вклад в скорость миграции [6].

Данные, полученные во второй серии опытов, позволили выявить обусловленные разным температур-

ным режимом инкубации видовые особенности миграционной активности ядерных эритроцитов и лейкоцитов *Syrpinus carpio*, *Rana ridibunda* и *Gallus domesticus* в условиях *in vitro*.

Установлено, что локомоционная активность клеток крови сазана, инкубируемых при 5 и 20 °С, сохраняется на одном уровне в любое время года (табл. 1). Учитывая, что в умеренных широтах температура воды в течение года колеблется в пределах от 0 до 20 °С [23], можно предположить, что именно в этом температурном диапазоне реализуются врожденные механизмы клеточной адаптации, определяя стабильность миграционной активности гемоцитов. Повышение температуры инкубации до 40 °С — верхней границы выживаемости карповых [24] — против 20 °С вызывает уменьшение площади локомоций эритроцитов *Syrpinus carpio* во все периоды года, лейкоцитов — в весенний и летний сезоны. Полагаем, что высокая температура инкубации клеток крови в опыте против оптимального температурного диапазона негативно влияет на физиологический статус рыб. По данным литературы, температура 40 °С способна вызывать у рыб развитие не только температурного стресса, но даже и температурного шока [24, 25].

У амфибий снижение температуры инкубации клеток до 5 °С способствует увеличению миграционной

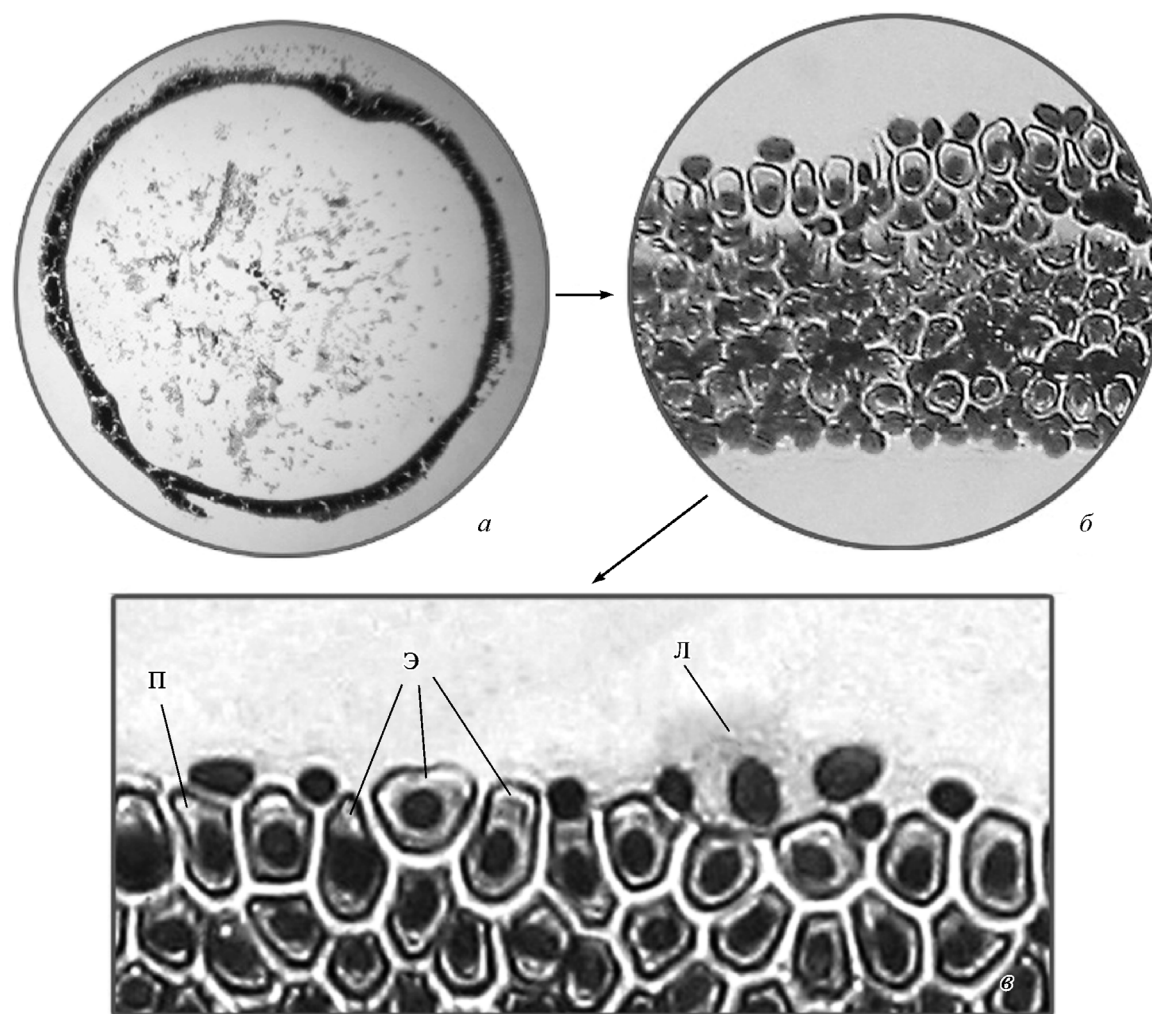


Рис. 3. Распределение клеток крови Gallus domesticus курицы в лунке через сутки после инкубации. а — малое увеличение (×40), б — большое увеличение (×400), в — большое увеличение (×2000), Э — эритроциты, Л — лейкоциты, П — псевдоподии.

активности эритроцитов на 14.9 и 13.7 %, лейкоцитов — на 16.4 и 12.6 % весной и летом соответственно (табл. 2). Можно предположить, что у функционально активных животных понижение температуры является фактором активации защитных функций, в частности усиления реакции локомоции гемоцитов. Повышение температуры инкубации (до 40 °С) в осенний и зимний

сезоны вызвало уменьшение площади миграции эритроцитов лягушки на 17.7 и 16.0 %, лейкоцитов — на 7.8 и 16.3 % соответственно. Этот результат согласуется с известными данными о том, что у земноводных снижена температура тела и резко ограничена двигательная активность как во время зимовки, так и в период между сезоном размножения и уходом на зимовку

Таблица 1

Показатели площади спонтанной миграции гемоцитов *Cyprinus carpio* (мм²)

Температура инкубации, °С	Сезон года							
	весенний		летний		осенний		зимний	
	Э	Л	Э	Л	Э	Л	Э	Л
5	2.66 ± 0.12	2.77 ± 0.21	3.06 ± 0.13*	3.20 ± 0.24	3.15 ± 0.15	3.64 ± 0.60	3.08 ± 0.18	3.13 ± 0.12
20	2.80 ± 0.20	2.86 ± 0.22	3.39 ± 0.32	3.45 ± 0.38	3.27 ± 0.25	3.47 ± 0.25	3.12 ± 0.40	3.18 ± 0.50
40	2.44 ± 0.18*	2.24 ± 0.34*	2.48 ± 0.37*	2.58 ± 0.35*	2.97 ± 0.26*	3.31 ± 0.23	2.65 ± 0.16*	2.98 ± 0.43

Примечание. Э — эритроциты, Л — лейкоциты; * — достоверность различий по сравнению с температурой 20 °С по *t*-критерию Стьюдента ($p < 0.05$).

Таблица 2

Показатели площади спонтанной миграции гемоцитов *Rana ridibunda* (мм²)

Температура инкубации, °С	Сезон года							
	весенний		летний		осенний		зимний	
	Э	Л	Э	Л	Э	Л	Э	Л
5	3.24 ± 0.15*	3.13 ± 0.15*	3.16 ± 0.27*	3.05 ± 0.19*	2.95 ± 0.47	3.14 ± 0.47	3.13 ± 0.16	3.04 ± 0.22
20	2.82 ± 0.11	2.69 ± 0.13	2.78 ± 0.48	2.71 ± 0.23	3.16 ± 0.32	3.08 ± 0.30	3.07 ± 0.22	3.01 ± 0.22
40	2.79 ± 0.17	2.74 ± 0.19	2.72 ± 0.51	2.85 ± 0.36	2.60 ± 0.15*	2.84 ± 0.22*	2.58 ± 0.30*	2.52 ± 0.29*

Примечание. Э — эритроциты, Л — лейкоциты; * — достоверность различий по сравнению с температурой 20 °С по *t*-критерию Стьюдента ($p < 0.05$).

[26]. Полагаем, что уменьшение миграционной активности лейкоцитов лягушек, находящихся в состоянии анабиоза, обусловлено двумя факторами. Возможно, что столь высокая температура инкубации клеток крови оказалась для них дополнительной физиологической нагрузкой либо суточный период инкубации был недостаточным для активации биохимических процессов, стимулирующих функции клеток.

До начала проведения эксперимента предполагалось, что температура инкубации 40 °С, соответствующая температуре тела птиц, будет оптимальной для миграции клеток. Однако результаты данного варианта опытов показали, что у курицы при температуре инкубации, равной 20 против 40 °С, площадь спонтанной миграции эритроцитов в весенний и летний периоды увеличивается на 11.9 и 19.3 %, лейкоцитов — на 5.0 и 26.9 % соответственно (табл. 3). В осенний период миграционная активность эритроцитов и лейкоцитов *Gallus domesticus* повышается не только при комнатной (20 °С) (на 6.8 и 6.8 %), но и при более низкой температуре инкубации (5 °С) (на 4.8 и 8.4 %) по сравнению с температурой 40 °С. Увеличение в осенний период локомоционной активности клеток крови при температурах инкубации 5 и 20 °С, возможно, связано с тем, что при вышеназванных условиях птицей тратится меньше энергии на работу морфофизиологических механизмов усиления теплоотдачи [27]. Уменьшение площади спонтанных локомоций гемоцитов курицы в зимнем варианте опытов при пониженной температуре инкубации, по-видимому, обусловлено снижением уровня основного обмена. Известно, что у

ряда видов птиц и млекопитающих умеренной зоны основной обмен зимой несколько понижается в целях более экономного энергетического баланса в этот период года [27].

При повышенной температуре инкубации (45 °С) миграционная активность эритроцитов и лейкоцитов курицы летом увеличивается на 23.6 и 21.0 %, зимой снижается на 9.4 и 9.1 % соответственно против температуры 40 °С. Эти данные позволяют предположить, что усиление спонтанных локомоций клеток крови птицы в условиях *in vitro* в летний период является следствием активации их плазмалеммы термическим фактором. Косвенным подтверждением этому является работа [28], в которой указывается, что увеличение 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. Модификация мембран при тепловой нагрузке ведет к образованию липидных доменов и упругих деформаций. При этом состав и структура белковых макромолекул не изменяются, что обеспечивает сохранность и активизацию мембранных функций в связи со снижением порога активации [29, 30].

Считаем, что разнонаправленная динамика спонтанной миграционной активности клеток крови подопытных животных в опытах *in vitro* обусловлена средой их обитания и соответственно действием на клеточном уровне эволюционно разных механизмов температурной адаптации, обусловленных различны-

Таблица 3

Показатели площади спонтанной миграции гемоцитов *Gallus domesticus* (мм²)

Температура инкубации, °С	Сезон года							
	весенний		летний		осенний		зимний	
	Э	Л	Э	Л	Э	Л	Э	Л
5	2.74 ± 0.20	2.84 ± 0.13	2.77 ± 0.35	2.90 ± 0.20*	3.26 ± 0.08*	3.21 ± 0.11*	3.02 ± 0.16*	3.06 ± 0.13*
20	3.00 ± 0.17*	2.94 ± 0.16*	3.03 ± 0.15*	3.02 ± 0.17*	3.32 ± 0.12*	3.16 ± 0.13*	3.06 ± 0.13*	3.04 ± 0.11*
40	2.68 ± 0.23	2.80 ± 0.18	2.54 ± 0.38	2.38 ± 0.27	3.11 ± 0.18	2.96 ± 0.10	3.17 ± 0.21	3.17 ± 0.16
45	2.63 ± 0.20	2.52 ± 0.33*	3.14 ± 0.32*	2.88 ± 0.21*	3.24 ± 0.15	2.92 ± 0.14	2.87 ± 0.17*	2.88 ± 0.15*

Примечание. Э — эритроциты, Л — лейкоциты; * — достоверность различий по сравнению с температурой 40 °С по *t*-критерию Стьюдента ($p < 0.05$).

ми свойствами плазматической мембраны. При этом свойства мембраны определяются фазовыми переходами билипидного слоя плазмалеммы с разной критической точкой у представителей теплокровных и холоднокровных животных [31]. Значимость температуры окружающей среды для клеточных мембран как пойкилотермных, так и гомойотермных организмов обусловлена тем, что она 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 [32].

Список литературы

- [1] *Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.* Иммунология. М.: Мир, 2000. С. 12—17.
- [2] *Хаитов Р. М.* Физиология иммунной системы. М., 2001.
- [3] *Литинова Е. А., Скоркина М. Ю.* Физиология крови. Белгород: Изд-во БелГУ, 2007.
- [4] *Житенева Л. Д., Макаров Э. В., Рудницкая О. А.* Эволюция крови. Ростов-на-Дону: АзНИИРХ, 2001.
- [5] *Федорова М. З., Надеждин С. В., Головки С. И., Зубарева Е. В.* Сравнительная оценка «мембранного резерва» клеток крови земноводных и млекопитающих // Ж. эвол. биохим. и физиол. 2007. Т. 43. С. 419—422.
- [6] *Кудряшова Т. В., Руткевич П. Н., Шевелев А. Я., Власик Т. Н., Воронников А. В.* Кальдесмон изменяет структуру актина на лидирующем крае и подавляет миграцию клеток // Биофизика. 2008. Т. 53. № 6. С. 978—985.
- [7] *Федорова М. З.* Реактивность лейкоцитов крови при различных функциональных нарушениях. Москва—Ярославль, 2001.
- [8] *Тяпкина А. Д., Горичева В. Д., Пизов А. В.* Изменение функциональной активности лейкоцитов при воздействии неблагоприятных экологических факторов на организм // Материалы Всерос. научн. конф. с междунар. участием «Физиолого-гигиенические проблемы экологии человека». Белгород: Изд-во БелГУ, 2007. С. 126—128.
- [9] *Зубарева Е. В., Павлов Н. А.* Морфофункциональные изменения лейкоцитов при адаптации организма к экзогенной гипертермии // Мед. акад. журнал. 2010. Т. 10. № 5. С. 14.
- [10] *Чернявских С. Д., Федорова М. З., Забияков Н. А., До Хью Куэт, Во Ван Тхань.* Локомоционная активность клеток крови некоторых видов пойкило- и гомойотермных животных // XXI съезд Физиол. общества им. И. П. Павлова. Москва—Калуга, 2010. С. 675.
- [11] *Chernyavskikh S. D., Fedorova M. Z., Zabinyakov N. A., Vo Van Than, Do Huu Kuet.* Blood cells migration activity of some specimens' vertebrates of different taxons // Biological motility: from fundamental achievements to nanotechnologies. Pushchino, 2010. P. 65—67.
- [12] *Prunescu H.* Natural and experimental phagocytosis by erythrocytes in amphibians // Nature. New Biol. 1971. V. 231. N 22. P. 143—144.
- [13] *Маянский А. Н.* Фагоцитоз: проблемы и перспективы // Вест. РАМН. 1993. № 4. С. 52—55.
- [14] *Дерябин Д. Г.* Функциональная морфология клетки. М.: КДУ, 2005.
- [15] *Овсянников В. Г., Алексеев В. В., Кутузова А. А.* Особности лейкоцитарной реакции и фагоцитоза у крыс разного возраста при острой соматической боли // Вест. СПбГУ. 2008. Сер. 11. Вып. 1. С. 44—49.
- [16] *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. V. 115. P. 1650—1656.
- [17] *Gallin J. I., Quie P. G.* Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology and Clinical Implication // Raven Press. New York. 1978. V. XIII. N 9. P. 429.
- [18] *Дуглас С. Д., Куи П. Г.* Исследование фагоцитоза в клинической практике. М.: Медицина, 1983.
- [19] *Фёдорова М. З., Левин В. Н.* Метод комплексного исследования геометрии, площади поверхности, резервных возможностей мембраны и осморегуляции лейкоцитов крови // Клинич. лаб. диагностика. 1997. № 11. С. 44—46.
- [20] *Фёдорова 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 // Клинич. лаб. диагностика. 2001. № 5. С. 16—19.
- [21] *Головки С. И.* Сравнительная характеристика мембранного резерва ядерных клеток крови позвоночных животных: Автореф. канд. дис. Ярославль: ЯГПУ, 2010.
- [22] *Ломкина М. З., Александрова А. Ю.* Изменение морфологии и характера миграции фибробластов в результате трансформации вирусом SV-40 // Цитология. 2010. Т. 52. № 3. С. 261—262.
- [23] *Сорвачев К. Ф.* Основы биохимии питания рыб (эколого-биохимические аспекты). М.: Лег. и пищ. промышленность, 1982. С. 247.
- [24] *Голованов В. К., Микряков Д. В.* Терморегуляционное поведение и температурные границы жизнедеятельности у инфицированной молодежи некоторых видов пресноводных рыб // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Расш. матер. III Междунар. конф. Борок. М., 2011. С. 201—204.
- [25] *Исаева Н. М., Козиненко И. И.* Иммуномодулирующее действие бактерий (их продуктов) на рыб // Вопр. ихтиологии. 1999. Т. 39. № 4. С. 527—534.
- [26] *Акуленко Н. М.* Сезонная динамика эритропоза и его топографическое распределение у лягушки озерной // Вест. Запорож. нац. ун-та. 2008. № 2. С. 5—10.
- [27] *Проссер Л.* Сравнительная физиология животных. М.: Мир, 1977. Т. 2.
- [28] *Маянский А. Н.* Механизмы рекогносцировочных реакций нейтрофила // Усп. совр. биол. 1986. Т. 102. Вып. 3(6). С. 360—376.
- [29] *Милакин С. Б.* Структурное состояние мембран и функциональная активность лимфоцитов: Автореф. канд. дис. Новосибирск, 1989. 19 с.
- [30] *Выборнова И. И., Епифанов С. Ю., Каданцев В. Н., Кононенко К. М.* Исследование механизмов влияния температурного и химических факторов на функционирование биологических мембран // Физиология человека. 1997. Т. 23. № 1. С. 70—80.
- [31] *Харакоз Д. П.* О возможной физиологической роли фазового перехода «жидкое—твердое» в биологических мембранах // Усп. биол. хим. 2001. Т. 41. С. 333—364.
- [32] *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.

SEASONAL FLUCTUATIONS OF MIGRATORY ACTIVITY OF VERTEBRATE
NUCLEAR HEMOCYTES AT DIFFERENT INCUBATION TEMPERATURES

S. D. Chernyavskikh, Do Huu Quyet, Vo Van Thanh, and I. S. Bukovtsova

Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

ABSTRACT

Agarose migration test has shown that nuclear erythrocytes of *Cyprinus carpio*, *Rana ridibunda*, and *Gallus domesticus* are capable for spontaneous locomotions. The migration of red blood cells from frogs is associated with formations of long pseudopodia, whereas that from carps and hens — with short protrusions. It has been shown that migratory activity of nuclear erythrocytes and leukocytes from *Rana ridibunda* and *Gallus domesticus* under effect of temperature in vitro had seasonal nature, while that from *Cyprinus carpio* did not depend on the year season. In frogs and hens the circadian oscillations of blood cell migration area are coupled with the organism functional activity, whereas no such associations is present in carps.

Key words: migratory activity, nuclear hemocytes, vertebrates.