



## МИГРАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕМОЦИТОВ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

**С.Д. Чернявский**  
**М.З. Федорова**  
**Д.Х. Куэт**  
**В.В. Тхань**  
**Н.А. Забияков**

Белгородский  
государственный  
университет

Россия, 308015, г.Белгород,  
ул. Победы, 85

E-mail: Chernyavskikh@bsu.edu.ru

Изучены особенности миграционной активности гемоцитов у представителей разных классов позвоночных животных при различной температуре инкубации в опытах *in vivo* и *in vitro*. Установлено, что ядерные эритроциты низших позвоночных являются клетками, способными к локомоциям. Показано, что в условиях экзогенной гипертермии спонтанная миграционная активность лейкоцитов млекопитающих увеличивается, гемоцитов земноводных – снижается. Повышение температуры инкубации клеток крови в опытах *in vitro* у земноводных и птиц способствует увеличению локомоционной активности, у рыб и млекопитающих – уменьшению изучаемого показателя. У птиц площадь миграции увеличивается за счет лейкоцитов, у рыб – снижается за счет эритроцитов, у земноводных доминирование активности клеток разных пулов в реакциях локомоций нивелируется.

Ключевые слова: миграция, эритроциты, лейкоциты, рыбы, земноводные, птицы, млекопитающие.

### Введение

В научной литературе имеется немало работ, посвященных изучению основных этапов фагоцитарного процесса белых клеток крови. Изучены особенности спонтанной и стимулированной разными веществами миграции лейкоцитов при измененных функциональных и патологических состояниях организма [1-4]. Известно, что эритроциты низших позвоночных животных способны к поглощению чужеродных частиц [5]. Насколько выраженными у ядерных эритроцитов являются реакции миграции на сегодняшний день точно не установлено. Необходимость такого рода исследований обусловлена как теоретическим (анализ и сравнительная оценка механизмов приспособительных реакций организма к экстремальным факторам среды), так и практическим (выявление информативных критериев поэтапных нарушений на клеточном уровне, разработка эффективных мер повышения адаптационных возможностей организма) интересом [6].

Целью исследования было изучение особенностей миграционной активности гемоцитов (эритроцитов и лейкоцитов) у представителей разных классов позвоночных животных при температурных воздействиях в опытах *in vivo* и *in vitro*.

### Объекты и методы исследования

Проведено 4 серии опытов. В первой, предварительной, – изучали способность ядерных эритроцитов низших позвоночных к локомоциям. Во второй серии опытов определяли миграционную активность лейкоцитов млекопитающих и смешанной популяции гемоцитов земноводных в условиях теплового воздействия на организм. В третьей серии оценивали локомоции клеток крови животных четырех классов (Рыбы, Земноводные, Птицы, Млекопитающие) при разной температуре инкубации (22°C, 37°C, 42°C) в условиях *in vitro*. В четвертой серии, также в опытах *in vitro*, уточняли вклад отдельных пулов клеток в реакции миграции при повышенной температуре инкубации эритроцитов и лейкоцитов.

Кровь для исследований после дачи эфирного наркоза у рыб и земноводных брали из сердца, у птиц – путем венопункции, у млекопитающих – путем декапитации. В качестве антикоагулянта использовали гепарин в количестве 10 ед./мл. Полученную кровь центрифугировали 4 мин. при 1500 об./мин. Собирали нижнюю часть

плазмы, богатую лейкоцитами и лейкоцитарное кольцо. Отмытые и ресуспендированные лейкоциты, а также эритроциты подсчитывали в камере Горяева.

Локомоторную активность оценивали по площади миграции клеток под агарозой. Ареал спонтанного распространения лейкоцитов и эритроцитов служил критерием самопроизвольной миграции. За основу был взят классический метод, описанный в многочисленных работах [7-9] в модификации М.З. Федоровой и В.Н. Левина [10]. В лунки, вырезанные в агарозном геле, нанесенном на предметное стекло, помещали по 3 мкл суспензии гемоцитов, разведенной изотоническим раствором, содержащей около 1 млн. клеток (у земноводных, имеющих большой размер клеток – около 300 тыс. клеток). Стекла с гемоцитами инкубировали в бескислородной среде при разных температурах. Через сутки клетки фиксировали в течение часа глутаровым альдегидом и окрашивали азур-эозином. На малом увеличении микроскопа с помощью окуляра-микрометра определяли площадь спонтанной миграции смешанной популяции гемоцитов или отдельных пулов клеток в зависимости от схемы опыта.

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики с использованием специальных программ на персональном компьютере.

### Результаты и их обсуждение

В первой серии опытов было показано, что ядерные эритроциты низших позвоночных являются клетками, способными к локомоции. После 24-х часов инкубации при температуре 22°C эритроциты земноводных мигрировали за края лунки более активно, чем лейкоциты (рис. А, Б).

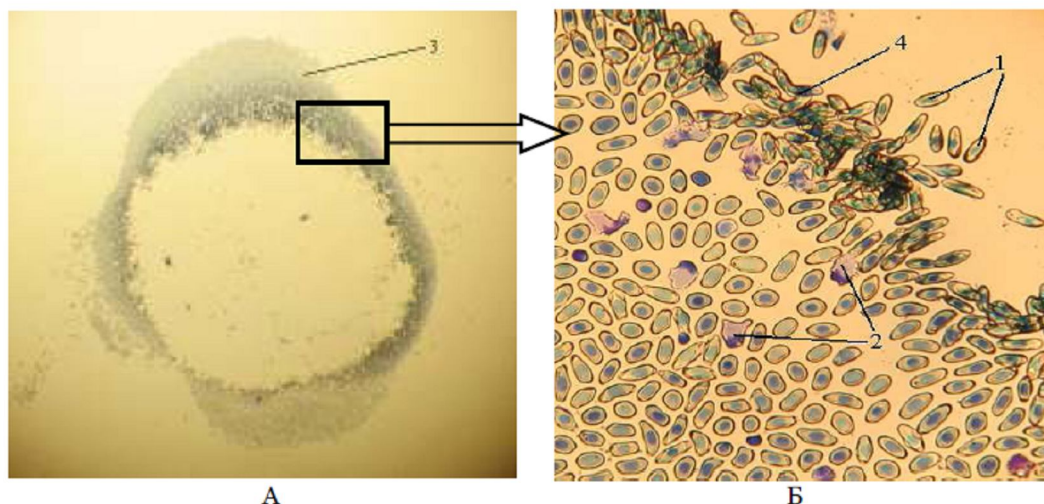


Рис. Распределение клеток крови Земноводных через сутки после инкубации: А – малое увеличение ( $\times 40$ ), Б – большое увеличение ( $\times 400$ ); 1 – эритроциты, 2 – лейкоциты, 3, 4 – края лунки

Во второй серии опытов было установлено, что у земноводных повышение температуры окружающей среды до 37°C и 42°C способствует снижению площади спонтанной миграции клеток крови на 11% и 13% в сравнении с животными, находящимися в естественных условиях микроклимата. У Млекопитающих, напротив, высокая внешняя температура вызывала повышение спонтанной миграции лейкоцитов: 20 мин. перегревания – на 17%, 75 мин. – 37%, 120 мин. – 43% по сравнению с аналогичными показателями интактных животных. При проведении эксперимента были взяты во внимание результаты исследований [11, 12], согласно которым в ряде случаев обнаруживается в известных пределах независимость функционирования тканей пойкилотермных животных от температуры среды. В большом обзоре [13] сделана попытка описать механизмы, лежащие в основе такой независимости (неподчинение закону



Вант-Гоффа-Аррениуса) и получившие название температурной компенсации метаболизма. Хотя само явление температурной компенсации метаболизма было установлено для многих пойкилотермных организмов, как на уровне целого организма, так и на тканевом уровне, однако сведения об изменениях температурной компенсации для реакций клеток крови крайне ограничены. Исходя из этого, изучение миграционной активности гемоцитов холоднокровных, в сравнении с аналогичным показателем теплокровных, представляло интерес. Данные о влиянии температурного фактора на локомоционную активность клеток крови в условиях *in vitro* были получены в третьей серии опытов. Кровь для исследований брали у животных 4-х классов (табл. 1).

Таблица 1

Площадь спонтанной миграции клеток крови холоднокровных и теплокровных животных при разной температуре инкубации (мм<sup>2</sup>)

Температура инкубации	Класс животных			
	рыбы	земноводные	птицы	млекопитающие
22°C	3.31±0.19	3.73±0.09	3.00±0.07	3.63±0.61
37°C	3.18±0.23	4.41±0.18*	3.13±0.10*	3.21±0.06*
42°C	2.43±0.07* <sup>o</sup>	4.05±0.13* <sup>o</sup>	3.58±0.08* <sup>o</sup>	2.69±0.12* <sup>o</sup>

Примечания: \* – достоверность различий по сравнению с температурой 22°C по критерию Вилкоксона ( $p < 0,05$ ); \*<sup>o</sup> – достоверность различий с температурой 37°C по критерию Вилкоксона ( $p < 0,05$ ).

Как видно из таблицы, наибольшие значения площади миграции гемоцитов зарегистрированы для представителей класса земноводных. Вероятной причиной этого являются большие размеры эритроцитов животных этого класса. Средний объем клеток, рассчитанный из параметров, определенных на зондовом сканирующем микроскопе *Nano Educator* ~400 мкм<sup>3</sup>. Аналогичные показатели для эритроцитов рыб ~120 мкм<sup>3</sup>; птиц ~200 мкм<sup>3</sup>; лейкоцитов млекопитающих ~100-150 мкм<sup>3</sup> [14].

При увеличении температуры инкубации гемоцитов до 37°C в опытах с изолированными клетками у представителей классов земноводных и птиц наблюдается увеличение площади локомоций на 18% и 4%, у Млекопитающих снижение на 12% в сравнении с температурой 22°C. Повышение температуры до 42°C способствует увеличению площади миграции гемоцитов земноводных и птиц на 9% и 19% и снижению изучаемого показателя у рыб и млекопитающих на 27% и 26% по сравнению с комнатной температурой. Наиболее высокие значения площади распространения клеток при температуре 42°C зарегистрированы у птиц, что, вероятнее всего, обусловлено высокой температурой тела этой группы животных.

Динамика спонтанной миграционной активности, зарегистрированная в условиях *in vitro*, как для лейкоцитов крови млекопитающих, так и для гемоцитов земноводных, противоположна сдвигам этого показателя, полученного при экзогенной гипертермии. Разнонаправленная динамика изменений спонтанной миграционной активности у представителей теплокровных и холоднокровных животных в опытах *in vivo* и *in vitro* может быть обусловлена неодинаковой средой обитания, эволюционным следствием которых являются разные механизмы температурной адаптации на клеточном уровне, а также влиянием гуморальных факторов в условиях целостного организма.

Согласно некоторым исследованиям [15], можно предположить, что ведущими факторами, вызывающими изменения физиологических свойств гемоцитов, являются свойства мембраны. Последние определяются фазовыми переходами билипидного слоя плазмалеммы с разной критической точкой у представителей теплокровных и холоднокровных животных. 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 [16].



Полученные результаты нацелили на дальнейшее изучение функциональных свойств гемоцитов с участием клеточной мембраны при более высоких (для класса Птицы) и более низких (для пойкилотермных животных) температурах. При этом оценивали локомоции по отдельности для эритроцитов и лейкоцитов у рыб, земноводных и птиц. У млекопитающих в данной серии опытов использовали только лейкоциты. Результаты проведенных исследований представлены в табл. 2.

Таблица 2

**Площадь спонтанной миграции эритроцитов и лейкоцитов различных представителей позвоночных животных при разной температуре инкубации (мм<sup>2</sup>)**

Температура инкубации	Класс животных		
	рыбы	земноводные	птицы
эритроциты			
22°C	4.01±0.13	3.14±0.24	2.60±0.06
37°C	3.65±0.11*	3.32±0.13	-
45°C	-	-	2.71±0.05*
лейкоциты			
22°C	3.46±0.11	3.15±0.20	2.67±0.07
37°C	2.81±0.09	3.32±0.22*	-
45°C	-	-	2.95±0.08*

Примечание: \* – достоверность различий по сравнению с комнатной температурой по критерию Вилкоксона ( $p < 0,05$ ).

При повышении температуры инкубации клеток крови у рыб площадь спонтанной миграции эритроцитов снижается на 9%, у птиц – увеличивается на 4%. Миграция лейкоцитов увеличивается при повышении температуры инкубации у земноводных на 5%, у птиц на 10%. Таким образом, можно предположить, что у птиц площадь миграции увеличивается за счет лейкоцитов, у рыб – снижается за счет эритроцитов, у земноводных роль разных пулов клеток в реакциях локомоций равнозначна.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что усиление спонтанных локомоций клеток является следствием активации плазмалеммы, вызванной термическим фактором. Косвенным подтверждением этому является работа [17], 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. Ряд авторов [18], изучая механизмы влияния на организм термического фактора, показали, что при тепловом воздействии происходит повышение проницаемости лизосомных мембран и выход в кровотоки протеолитических ферментов. Некоторые из этих ферментов обладают свойствами модифицировать структуру поверхностной мембраны эритроцитов, что стимулирует их активацию.

### Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что ядерные эритроциты низших позвоночных являются клетками, способными к локомоциям. Экзогенная гипертермия тормозит спонтанную миграционную активность гемоцитов земноводных и стимулирует эту реакцию у лейкоцитов млекопитающих. При увеличении температуры инкубации гемоцитов *in vitro* у представителей классов земноводных и птиц наблюдается увеличение площади локомоций, у рыб и млекопитающих – снижение. Площадь миграции у птиц повышается за счет лейкоцитов, у рыб – уменьшается за счет эритроцитов, у земноводных активность клеток разных пулов в реакциях локомоций идентична.

### Список литературы

1. Ерюхин И.А., Белый В.Я., Вагнер В.К. Воспаление как общебиологическая реакция: на основе модели острого перитонита. – Л.: Наука, 1989. – 262 с.
2. Маянский А.Н. Фагоцитоз: проблемы и перспективы // Вестник РАМН. – 1993. – №4. – С. 52-55.



3. Козинец Г.И., Высоцкий В.В., Погорелов В.М. и соавт. Кровь и инфекция. – М.: Триада-фарм, 2001. – 456 с.
4. Fedorova M.Z., Chernyavskikh S.D., Zabinyakov N.A., Pavlov N.A., Zubareva E.V. Comparative evaluation of the locomotion activity of vertebrates blood cells // *Biological motility. Achievements and perspectives.* – Pushchino, 2008. – P. 212-213.
5. Prunesco H. Natural and experimental phagocytosis by erythrocytes in Amphibians // *Nature. New Biol.* – 1971. Vol. 231. – № 22. – P. 143-144.
6. Федорова М.З. Реактивность лейкоцитов крови при различных функциональных нарушениях. – Москва-Ярославль, 2001. – 68 с.
7. 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.
8. Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology and Clinical Implication / John I. Gallin, Paul G. Quie. // Raven Press. – New York. – 1978. – Vol. 13. – № 9. – P. 429.
9. Дуглас С.Д., Куи П.Г. Исследование фагоцитоза в клинической практике. – М.: Медицина, 1983. – 112 с.
10. 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. – №5. – С. 16-19.
11. Newell R. C. Environmental factors affecting the acclamatory responses of ectotherms. In: *Effects of temperature on ectothermic organisms* (Ed. W. Wieser), Springer-Verlag. – Berlin, Heidelberg, New York, 1973. – P. 151-164.
12. Precht H., Christophersen J., Hensel H., Larcher W. *Temperature and Life* (Ed. H. Precht), Springer-Verlag. – Berlin, Heidelberg, New York, 1973. – P. 779.
13. Хочачка П., Сомеро Д. Стратегия биохимических адаптаций. – М.: Мир, 1977. – 398 с.
14. Федорова М.З., Павлов Н.А., Зубарева Е.В., Надеждин С.В., Симонов В.В., Забияков Н.А., Тверитина Е.С. Использование атомно-силовой микроскопии для оценки морфометрических показателей клеток крови // *Биофизика.* – 2008. – Т. 53, № 6. – С. 555-559.
15. Харакоз Д.П. О возможной физиологической роли фазового перехода «жидкое-твердое» в биологических мембранах // *Успехи биологической химии.* – 2001. – Т. 41 – С. 333-364.
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.
17. Маянский А.Н. Механизмы рекогносцировочных реакций нейтрофила // *Успехи современной биологии.* – 1986. – Т. 102, вып. 3(6). – С. 360-376.
18. 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.

## MIGRATION ACTIVITY OF BLOOD CELLS OF VERTEBRATE ANIMALS AT DIFFERENT TEMPERATURES

**S.D. Chernyavskikh**  
**M.Z. Fedorova**  
**D. H. Quyet**  
**V. V. Thanh**  
**N.A. Zabinyakov**

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

*E-mail: Chernyavskikh@bsu.edu.ru*

The paper concerns the characteristics of hemocyte migration activity of vertebrate animals at different temperatures of incubation in vivo and in vitro tests. It is ascertained that nuclear erythrocytes of lower vertebrates have the ability to locomotion. It is shown that at exogenous hyperthermia conditions spontaneous migration activity of the Mammals' leucocytes is increased and the Amphibian's one is decreased. The temperature growth of blood cells incubation of the Amphibians and the Birds favours the increasing of their locomotion activity. The temperature growth of blood cells incubation of the Fishes and the Mammals favours the decreasing of this indicator. Leucocytes play the main role in cells migration in the experiments with the Birds. The fishes' cells migration is decreased due to the erythrocyte activity. The dominance of the cells activity of different pools in the locomotion reactions is leveled at the Amphibians.

Key words: migration, erythrocytes, leucocytes, the Fishes, the Amphibians, the Birds, the Mammals.