



СЕЗОННЫЕ КОЛЕБАНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФАГОЦИТОЗА ЭРИТРОЦИТОВ И ПОЛИМОРФНОЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

С.Д. Чернявских
М.Э. Федорова
Е.В. Масленникова

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

E-mail:
Chernyavskikh@bsu.edu.ru

Изучены сезонные изменения показателей фагоцитоза клеток крови у некоторых представителей позвоночных животных. Установлено, что фагоцитарная активность ядерных эритроцитов аналогична полиморфноядерным лейкоцитам рыб, земноводных и птиц практически ко всем изучаемым объектам фагоцитоза. Показано, что в весенний период у рыб и земноводных самая высокая фагоцитарная активность к клеткам дрожжей, самая низкая – к сенной палочке. Фагоцитами птиц изучаемые объекты поглощаются одинаково активно. Отмечено снижение весной среднего числа поглощенных частиц фагоцитами у представителей всех изучаемых классов животных ко всем объектам фагоцитарной реакции в сравнении с осенью.

Ключевые слова: позвоночные животные, эритроциты, лейкоциты, фагоцитарная активность, фагоцитарный индекс.

Введение

Согласно современным представлениям сезонные ритмы являются одной из форм приспособительных реакций организма к циклическим изменениям окружающей среды и присущи всем уровням биологической организации [1, 2]. Циркануальные колебания выявлены и описаны для многих показателей системы крови и иммунитета у млекопитающих животных и человека [3-5]. Вместе с тем, в хронобиологических исследованиях практически отсутствуют сведения о сезонных изменениях фагоцитарной активности эритроцитов и лейкоцитов у представителей низших позвоночных животных. Необходимость такого рода исследований обусловлена как теоретическим, так и практическим интересом [6]. Целью проведенной работы было изучение показателей фагоцитоза эритроцитов и лейкоцитов рыб, земноводных и птиц в осенний (октябрь-ноябрь) и весенний (апрель-май) периоды.

Объекты и методы исследования

В работе использовали периферическую кровь, взятую у наркотизированных эфиром животных: курицы домашней (*Gallus domesticus*) (10 особей), лягушки озёрной (*Rana ridibunda*) (30 особей) и сазана (*Cyprinus carpio*) (30 особей). Забор крови у курицы осуществляли из крупных вен крыла, у лягушки и сазана – из сердца. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (10 ед./мл.). Полученную кровь центрифугировали 4 мин. при 1500 об./мин., собирали слой лейкоцитов и обогащенную ими часть плазмы. В пробирке оставляли суспензию эритроцитов.

В опытах *in vitro* изучали один из основных показателей фагоцитоза – поглотительную способность клеток крови. Суспензии лейкоцитов и эритроцитов с объектами фагоцитарной реакции в соотношении 1:50 помещали в пробирки и инкубировали в течение 30 мин. Подсчитывали процент фагоцитирующих клеток (фагоцитарную активность) и среднее число поглощенных частиц (фагоцитарный индекс) [7]. При подсчете использовали иммерсионное увеличение – объектив ×90МИ, окуляр ×15. В качестве объектов фагоцитоза использовали инертные откалиброванные частицы агломерированного латекса (НИИМСК, Ярославль) диаметром 0.8 мкм, дрожжевые клетки (*Saccaromyces cerevisiae*) и сенную палочку (*Bacillus subtilis*) [8-12].

Статистическую обработку полученных числовых материалов и все виды анализа результатов проводили с помощью редактора *Microsoft Excel* и программы «Statistica» (версия 6.0). Достоверность различий определяли по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Сравнительный анализ данных, полученных при изучении поглотительной способности эритроцитов низших позвоночных животных в весенний и осенний периоды, показал наличие сезонных колебаний показателей фагоцитарной активности и фагоцитарного индекса красных клеток крови (таблица 1).

Таблица 1

Показатели поглотительной способности эритроцитов

Объект фагоцитоза	Показатели поглотительной способности, ед. изм.	Период исследования	Вид животного		
			<i>C. carpio</i>	<i>R. ridibunda</i>	<i>G. domesticus</i>
Частицы латекса	ФА, %	Осенний	67.40±2.90	53.30±4.60 ^б	23.00±2.50 ^{б#}
		Весенний	39.00±1.00 [*]	22.50±1.50 ^{*б}	25.50±1.50 ^б
	ФИ, отн. ед.	Осенний	1.60±0.01	2.80±0.08 ^б	0.60±0.02 ^{б#}
		Весенний	0.41±0.01 [*]	0.24±0.03 ^{*б}	0.26±0.01 ^б
Дрожжи	ФА, %	Осенний	72.40±2.30	48.80±4.10 ^б	31.00±0.50 ^{б#&}
		Весенний	43.50±1.50 ^{*&}	45.00±1.00 ^{&}	32.50±2.50 ^{б#&}
	ФИ, отн. ед.	Осенний	1.40±0.02 ^{&}	1.80±0.06 ^{б&}	0.31±0.01 ^{б#&}
		Весенний	0.45±0.03 [*]	0.49±0.02 ^{*&}	0.33±0.02 ^{б#&}
Сенная палочка	ФА, %	Осенний	14.50±1.00 ^{&@}	29.00±5.00 ^{б&@}	19.75±1.25 ^б
		Весенний	18.80±2.20 ^{&@}	18.70±1.70 [@]	24.70±1.30 ^{*б#&@}
	ФИ, отн. ед.	Осенний	0.30±0.06 ^{&@}	0.60±0.06 ^{б&@}	0.20±0.05 ^{&@}
		Весенний	0.23±0.05 ^{&@}	0.19±0.02 ^{*@}	0.26±0.08

Примечание: здесь и далее ФА – фагоцитарная активность; ФИ – фагоцитарный индекс; достоверность различий: * – весеннего периода с осенним, ^б – в сравнении с рыбой, [#] – в сравнении с лягушкой, [&] – в сравнении с частицами латекса, [@] – в сравнении с клетками дрожжей по *t*-критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

Осенью самый высокий процент фагоцитирующих эритроцитов к частицам латекса отмечается у сазана. По мере повышения уровня организации животных, значения этого показателя снижаются на 21% и 66% у лягушек и птиц, соответственно. Весной самая высокая ФА к латексу регистрируется также у рыб. При сравнении данных весеннего периода с осенним, фагоцитарная активность эритроцитов у рыб и земноводных к данному объекту фагоцитоза снижается примерно вдвое, у птиц этот показатель практически не изменяется. В весенние месяцы установлено снижение среднего числа поглощенных частиц латекса у всех изучаемых видов животных, особенно выраженное у земноводных.

Фагоцитарная активность эритроцитов опытных животных к клеткам дрожжей аналогична частицам латекса, за исключением процента фагоцитирующих клеток земноводных весной, у которых этот показатель в сравнении с осенью практически не изменяется и, таким образом, незначительно превышает аналогичный параметр у рыб.

ФИ к клеткам дрожжей как в осенний, так и в весенний периоды у лягушек самый высокий, у птиц – самый низкий.

Сезонные изменения процента фагоцитирующих эритроцитов и среднего числа поглощенных ими частиц к клеткам дрожжей у рыб, а также фагоцитарного индекса у земноводных происходят аналогично частицам латекса. Фагоцитарная активность эритроцитов у земноводных к дрожжевым клеткам, а также изучаемые показатели фагоцитоза у птиц относительно стабильны в течение года.

Сенную палочку осенью хорошо фагоцитируют эритроциты лягушки и курицы. Весной у птиц фагоцитарная активность к этому объекту превышает аналогичный по-



казатель рыб и лягушек. Осенью ФИ у рыб выше, чем у лягушек и птиц в 2 и 3 раза соответственно, весной эта разница нивелируется.

У птиц весной ФА красных клеток крови к сенной палочке увеличивается на 25% ($p < 0.05$), у лягушек снижается ФИ на 68% ($p < 0.05$), у рыб отмечаются незначительные сезонные колебания, проявляющиеся как тенденции к увеличению процента фагоцитирующих клеток и снижению среднего числа поглощенных частиц.

У эритроцитов рыб к частицам латекса и клеткам дрожжей ФА осенью примерно одинакова, весной дрожжи красными клетками крови фагоцитируются быстрее. Фагоцитарная активность эритроцитов сазана к сенной палочке как весной, так и осенью в несколько раз ниже, чем к частицам латекса и клеткам дрожжей.

У земноводных процент фагоцитирующих эритроцитов при использовании полистерольного латекса и клеток дрожжей примерно одинаков, весной лягушка дрожжи поглощают более чем в 2 раза быстрее, чем латекс. Сенная палочка фагоцитируется эритроцитами лягушки значительно медленнее, чем латекс и дрожжи как весной, так и осенью.

Эритроциты курицы активнее всего как весной, так и осенью поглощают дрожжевые клетки.

Белые клетки крови рыб, земноводных и птиц частицы латекса фагоцитируют аналогично красным (таблица 2). Процент фагоцитирующих полиморфноядерных лейкоцитов весной снижается у рыб на 45% ($p < 0.05$), у земноводных – на 70% ($p < 0.05$) в сравнении с осенью, у птиц изучаемый показатель в течение года не изменяется. Среднее число поглощенных лейкоцитами частиц латекса понижается у всех изучаемых классов животных весной в сравнении с осенью: у рыб – на 75% ($p < 0.05$), у земноводных – на 94% ($p < 0.05$), у птиц – на 65% ($p < 0.05$).

Таблица 2

Показатели поглотительной способности полиморфноядерных лейкоцитов

Объект фагоцитоза	Показатели поглотительной способности, ед. изм.	Период исследования	Вид животного		
			<i>C. carpio</i>	<i>R. ridibunda</i>	<i>G. domesticus</i>
Частицы латекса	ФА, %	Осенний	61.60±2.60	44.30±4.90 ^б	23.00±3.05 ^{б#}
		Весенний	34.00±1.00 [*]	13.50±1.50 ^{*б}	22.00±1.00 ^{б#}
	ФИ, отн. ед.	Осенний	1.50±0.05	2.50±0.60	0.66±0.02 ^{б#}
		Весенний	0.37±0.01 [*]	0.14±0.02 ^{*б}	0.23±0.01 ^{*б#}
Дрожжи	ФА, %	Осенний	73.60±3.50 ^к	41.80±4.20 ^б	23.30±3.05 ^{б#}
		Весенний	37.00±1.00 [*]	24.50±1.50 ^{*бк}	28.00±3.00 ^б
	ФИ, отн. ед.	Осенний	1.30±0.10	1.90±0.07	0.66±0.02 ^{б#}
		Весенний	0.37±0.01 [*]	0.26±0.02 ^{*бк}	0.29±0.02 ^{*бк}
Сенная палочка	ФА, %	Осенний	14.25±6.75 [@]	4.50±0.50 ^{б&@}	18.50±0.13 ^{б#}
		Весенний	12.20±2.00 ^{*к&@}	11.80±0.50 ^{*@}	19.20±0.50 ^{*б#&@}
	ФИ, отн. ед.	Осенний	0.99±0.06 ^{к&@}	0.12±0.02 ^{к&@}	0.35±0.19 ^б
		Весенний	0.14±0.03 ^{*к&@}	0.45±0.07 ^{*б&@}	0.20±0.08 [#]

У опытных животных поглотительная способность лейкоцитов к клеткам дрожжей аналогична частицам латекса, за исключением ФА и ФИ у лягушек весной. Активность этих клеток в отличие от эритроцитов в весенний период у земноводных ниже, чем у рыб.

ФА лейкоцитов к клеткам дрожжей в весенний период ниже у сазана на 99% ($p < 0.05$), у лягушки – на 41% ($p < 0.05$), чем в осенний, у курицы не регистрируется сезонных колебаний по этому показателю. Весной в сравнении с осенью у всех изучаемых классов животных установлено также существенное снижение среднего числа поглощенных лейкоцитами частиц при использовании в качестве объекта фагоцитоза

клеток дрожжей: у рыб на 72% ($p < 0.05$), у земноводных – на 86% ($p < 0.05$), у птиц – на 56% ($p < 0.05$).

К сенной палочке ФА лейкоцитов у птиц самая высокая, у земноводных самая низкая как весной, так и осенью, ФИ изменяется незакономерно.

Показатели ФА и ФИ лейкоцитов при использовании сенной палочки в весенний период у рыб понижаются аналогично эритроцитам на 14% ($p < 0.05$) и 89 % ($p < 0.05$), у лягушек, напротив, повышаются примерно в 3-4 раза в сравнении с осенью. У птиц весной в сравнении с осенью ФА белых клеток крови, также как и красных, увеличивается на 42% ($p < 0.05$).

У лейкоцитов рыб фагоцитарная активность к изучаемым объектам фагоцитоза идентична эритроцитам, за исключением весеннего повышения поглотительной способности к клеткам дрожжей.

Лейкоциты земноводных одинаково эффективно фагоцитируют частицы латекса и клетки дрожжей, особенно осенью, а объект фагоцитоза – сенная палочка – белыми клетками крови лягушек поглощается менее активно.

ФА лейкоцитов кур весной и осенью к изучаемым объектам фагоцитоза практически одинакова, при этом – несколько ниже к сенной палочке.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что фагоцитарная активность красных клеток крови аналогична белым. Согласно исследованиям некоторых авторов [13], для эритроцитов рыб, лягушек и птиц характерна складчатость плазматической мембраны, что позволяет этим клеткам осуществлять фагоцитоз.

Несмотря на то, что у рыб и земноводных в весенний период идет активизация гемопоэза, фагоцитарная активность гемоцитов практически ко всем объектам фагоцитоза, за исключением дрожжей, у этих животных ниже, чем в осенний. Можно предположить, что это происходит вследствие усиления гемопоэза у сазана и лягушки весной, которое ведет к повышенному содержанию незрелых клеток крови [14-17].

Более высокая фагоцитарная активность к дрожжевым клеткам в сравнении с латексом у лягушки и сазана, возможно, связана с наличием у этих животных видового иммунитета, так как одним из мест обитания дрожжевых клеток являются природные воды [18], являющиеся средой обитания рыб и в несколько меньшей степени – земноводных. У птиц фагоцитарная активность к частицам латекса и клеткам дрожжей ниже, чем у рыб и лягушек, но стабильна в течение года. Общеизвестно, что дрожжевые клетки также распространены на поверхности плодов и листьев, что может быть причиной приобретенного иммунитета у птиц, так как рацион этих животных содержит растительные компоненты.

Значительное снижение фагоцитарной активности к сенной палочке у рыб и земноводных может быть следствием нескольких причин. Во-первых, для сенной палочки, несмотря на ее широкую распространенность в природе (в почве, на растительном сырье, в воздушной пыли, на поверхности пищевых продуктов и т. п.) [11], водоемы не являются средой обитания. Во-вторых, данный микроорганизм синтезирует антибиотик субтилин [19], который, возможно, у рыб и земноводных ингибирует процессы фагоцитоза.

У птиц сенная палочка поглощается с одинаковой дрожжам и латексу активностью. Это может быть следствием того, что антитела, вырабатываемые гомойотермными позвоночными, характеризуются более высокой аффинностью и достаточной иммунологической памятью по сравнению с антителами у пойкилотермных позвоночных. То есть, только у птиц (также как и у млекопитающих) существует механизм повышения аффинитета антител в ходе адаптивного иммунного ответа – последнее из наиболее серьезных приобретений иммунной системы на пути ее совершенствования в процессе филогенеза [20].



Заключение

Фагоцитарная активность ядерных эритроцитов рыб, земноводных и птиц аналогична полиморфноядерным лейкоцитам у этих видов животных ко всем изучаемым объектам фагоцитоза.

У сазана и лягушки весной ФА практически ко всем использованным объектам фагоцитарной реакции ниже, чем осенью, у курицы сезонные различия незначительны.

Более высокая фагоцитарная активность весной к клеткам дрожжей в сравнении с латексом у земноводных и, особенно, у рыб, возможно, связана с наличием у животных этих видов врожденного иммунитета к этим микроорганизмам. К сенной палочке в сравнении с клетками дрожжей и частицами латекса у рыб и земноводных регистрируется снижение фагоцитарной активности, у птиц этот объект поглощается с одинаковой дрожжам и латексу активностью.

Весной в сравнении с осенью отмечено снижение ФИ у животных всех изучаемых классов вне зависимости от объекта фагоцитарной реакции.

Список литературы

1. Агаджанян Н.А. Биологические ритмы. – М.: Медицина, 1967. – 120 с.
2. 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.
3. 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.
4. Житенева Л.Д., Макаров Э.В., Рудницкая О.А. Эволюция крови. – Ростов-на-Дону: АЗНИИРХ, 2001. – 113 с.
5. Кузьмин П.Н. Сезонные биоритмы иммунобиологической реактивности организма в условиях Западной Сибири // Климато-медицинские проблемы и вопросы медицинской географии Сибири. – Томск, 1974. – Т.1. – С. 120-122.
6. Федорова М.З. Реактивность лейкоцитов крови при различных функциональных нарушениях. – Москва-Ярославль, 2001. – 68 с.
7. Метод вычисления абсолютных показателей фагоцитоза / М.Т. Александров, А.И. Кудрявицкий, Е.Г. Румянцева, Л.А. Климова, М.В. Ларская // Лабораторное дело. – 1988. – №9. – С. 30-32.
8. Потапова С.Г., Хрустик В.С., Демидова Н.В., Козинец Г.И. Изучение поглотительной способности нейтрофилов крови с использованием инертных частиц латекса // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1977. – Т. XXII, №9. – С. 58-59.
9. Учитель И.Я. Макрофаги в иммунитете. – М.: Медицина, 1978. – 200 с.
10. Eeden S.F., Klut M.E., Walker B.A.M., Hogg J.C. The use of flow cytometry to measure neutrophil function // J. of Immun. Meth., 1999. – Vol. 232. – P. 23-43.
11. Глик Б., Пастернак Д. Молекулярная биотехнология. – М.: Мир, 2002. – С. 27.
12. Воробьев А.А., Кривошеник Ю.С., Быков А.С. и др. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии. – М.: Мастерство, 2001. – 221 с.
13. Головкин С.И., Федорова М.З., Чернявских С.Д. Мембранный резерв клеток крови позвоночных животных // Тез. докл. VI Сибирского Физиол. съезда. – Барнаул, 2008. – С. 25.
14. Гаврилов О.К., Козинец Г.И., Черняк И.Б. Клетки костного мозга и периферической крови. – М.: Медицина, 1987. – 274 с.
15. Заварзин А.А. Очерки эволюционной гистологии крови и соединительной ткани. – М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1953. – 716 с.
16. Хамидов Д.Х., Акилов А.Т., Труднева А.А. Кровь и кроветворение у позвоночных животных. – Ташкент: Фан, 1978. – 160 с.
17. Медведев Ж.А. О некоторых особенностях эритропоэза и старения эритроцитов лягушки // Цитология. – 1973. – Т. XV, № 8. – С. 963-975.

18. Жизнь растений. Энциклопедия в шести томах. Том 2. Грибы. — Просвещение, 1976. — 480 с.
19. Янгирова З.З. Разработка и изучение иммунологических свойств нового лекарственного средства – бактиспоринпласта. Дисс. ... канд. биол. наук. – Уфа, 2005. – 132 с.
20. Фримель Х., Брок Й. Основы иммунологии. – М.: Мир, 1986. – 254 с.

SEASONAL FLUCTUATIONS OF PHAGOCYTOSIS PARAMETERS OF ERYTHROCYTES AND POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES OF VERTEBRATES

S.D. Chernyavskikh
M.Z. Fedorova
E.V. Maslennikova

*Belgorod State National Research
 University
 Pobedy St. 85, Belgorod,
 308015, Russia
 E-mail: Chernyavskikh@bsu.edu.ru*

Seasonal changes of blood cells phagocytosis parameters of some Vertebrates have been studied. It has been established that phagocytic activity of nuclear erythrocytes is almost similar to fish, amphibia and birds polymorphonuclear leukocytes activity in aspect of all studied object of phagocytosis. It has been approved that there is the most intensive phagocytic activity of fish and amphibia for yeast in spring, the lowest one is for grass bacillus, this object is also absorbed by the birds phagocytes with the same activity for both yeast and grass bacillus. The reduction of the average amount of absorbed particles of all phagocytic objects has been noted for all Vertebrates in spring in comparison with the autumn.

Key words: the Vertebrates, erythrocytes, leukocytes, phagocytic activity, phagocytic ratio.