



УДК 591.111.7:591.128.1

## ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ИНКУБАЦИИ НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ *CYPRINUS CARPIO* И *RANA RIDIBUNDA*

**С.Д. Чернявских<sup>1</sup>, До Хыу Куэт<sup>1</sup>,  
Во Ван Тхань<sup>2</sup>, Ю.В. Леонтьева<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

<sup>2</sup> Педагогический университет г. Хошимина, Вьетнам, г. Хошимин, район 5, квартал 4, ул. Ан Зыонг Вьонг, д. 280

E-mail: Chernyavskikh@bsu.edu.ru

Изучено влияние температуры и продолжительности инкубации на фагоцитарную активность ядерных эритроцитов сазана (*Cyprinus carpio*) и лягушки озерной (*Rana ridibunda*). Установлено, что при 2–8 часовой инкубации красные клетки крови сазана и лягушки озерной проявляют поглотительную способность в отношении *Saccharomyces cerevisiae* при температурах 20 и 40°C. С увеличением температуры (от 20 до 40°C) и продолжительности инкубации (от 2-х до 8 часов) поглотительная способность красных клеток *Cyprinus carpio* и *Rana ridibunda* снижается, за исключением фагоцитарной активности эритроцитов лягушки при 4-х часовой инкубации в условиях комнатной температуры.

Ключевые слова: ядерные эритроциты, фагоцитарная активность, температурный фактор.

### Введение

Для холоднокровных животных температура окружающей среды является одним из важнейших факторов, воздействующих на иммунологические процессы [1]. Установлено, что изменение температуры воды до уровня, находящегося выше оптимального, понижает фагоцитарную активность лимфоцитов рыб [2–5]. Известно, что у низших позвоночных защитную функцию наряду с лейкоцитами выполняют ядерные эритроциты [6, 7].

В современной клеточной биологии активно изучается взаимосвязь между устойчивостью эритроцитов к гемолитикам разного генеза и физиологическим состоянием организма [8–10]. Вместе с тем, в литературе практически отсутствуют сведения об устойчивости вышеназванного пула клеток к температурному фактору. Еще менее изученным является вопрос о влиянии температурного фактора на фагоцитарную активность ядерных эритроцитов низших позвоночных.

Целью исследования было изучение влияния температуры и продолжительности инкубации на фагоцитарную активность эритроцитов *Cyprinus carpio* и *Rana ridibunda*.

### Объекты и методы исследования

В работе использовали периферическую кровь сазана (*Cyprinus carpio*) (30 особей) и лягушки озёрной (*Rana ridibunda*) (30 особей). Объектами исследования служили ядерные эритроциты. Опыты были проведены в летний период.

Животных предварительно наркотизировали эфиром. Забор крови у сазана проводили из хвостовой вены, у лягушки – из сердца. Для предотвращения свёртывания крови использовали гепарин в количестве 10 ед. на 1 мл крови. Полученную кровь центрифугировали 4 мин. при 400g. Далее удаляли слой лейкоцитов и обогатённую ими часть плазмы. В пробирке оставляли эритроцитарную массу. Красные клетки крови инкубировали при комнатной (20°C) и повышенной (40°C) температурах в течение 2, 4, 6 и 8 часов. После инкубации к эритроцитам добавляли объекты фагоцитарной реакции (клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*) в соотношении 1:50 и инкубировали при вышеназванных температурах еще 30 мин. Затем делали мазки, фиксировали клетки метанолом, окрашивали азур-эозином по-Романовскому. На каждой мазке было просчитано не менее 100 клеток, определен процент фагоцитирующих эритроцитов (фагоцитарный показатель) и среднее число объектов фагоцитоза, поглощенных одним фагоцитом (фагоцитарный индекс). Во избежание неточностей при подсчете поглощенных частиц, связанных с затруднениями в определении их локализации (внутри или на поверхности клетки), использовали иммерсионное увеличение 100× [11–16].

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 разли-



чий между значениями признаков сравниваемых групп. За уровень статистически значимых принимали различия при  $p < 0.05$ .

### Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что при 2–8 часовой инкубации красные клетки крови сазана проявляют фагоцитарную активность как при комнатной, так и при повышенной до 40°C температурах инкубации. Полученные результаты поглотительной способности красных клеток крови *Cyprinus carpio* к клеткам *Saccharomyces cerevisiae* представлены в таблице 1.

Таблица 1

Поглотительная способность эритроцитов *Cyprinus carpio* в отношении *Saccharomyces cerevisiae*

Время инкубации, ч	Исследуемые показатели, ед. изм.	Температура инкубации, °C	
		20	40
2	ФП, %	41.00±0.73	28.50±1.40 <sup>&amp;</sup>
	ФИ, отн. ед.	1.11±0.03	1.09±0.07
4	ФП, %	41.47±1.20	21.71±1.17 <sup>*&amp;</sup>
	ФИ, отн. ед.	1.14±0.04	1.03±0.03 <sup>&amp;</sup>
6	ФП, %	35.17±1.16 <sup>*</sup>	19.44±1.15 <sup>*#&amp;</sup>
	ФИ, отн. ед.	1.06±0.03 <sup>*</sup>	1.00±0.02 <sup>*&amp;</sup>
8	ФП, %	24.09±1.04 <sup>*#@</sup>	15.38±1.05 <sup>*#@&amp;</sup>
	ФИ, отн. ед.	1.15±0.02 <sup>*@</sup>	1.00±0.01 <sup>*#@&amp;</sup>

Примечание (здесь и в таблице 2): ФП – фагоцитарный показатель, ФИ – фагоцитарный индекс. Достоверность различий: \* – по сравнению с 2 часами инкубации, # – по сравнению с 4 часами инкубации, @ – по сравнению с 6 часами инкубации, & – по сравнению с температурой 20°C по t-критерию Стьюдента ( $p < 0.05$ ).

Как видно из таблицы, увеличение температуры инкубации до 40°C способствовало снижению фагоцитарного показателя красных клеток крови сазана через 2, 4, 6 и 8 часов на 30.5%, 47.7%, 44.7% и 36.2% соответственно по сравнению с инкубацией при температуре 20°C. Уменьшение фагоцитарного индекса эритроцитов *Cyprinus carpio* через 4, 6 и 8 часов инкубации при повышенной температуре по сравнению с комнатной температурой составило 9.7%, 5.7% и 13.0% соответственно.

При температуре 20°C увеличение продолжительности инкубации до 6 и 8 часов также способствовало снижению фагоцитарного показателя эритроцитов сазана на 14.2% и 41.2% по сравнению с 2-мя часами, при этом фагоцитарный индекс при 6 часовой инкубации снизился на 4.5%, при 8 часовой инкубации увеличился на 3.6% по сравнению с 2-х часовой инкубацией. При комнатной температуре 8-ми часовая инкубация привела к снижению фагоцитарного показателя эритроцитов сазана на 41.9% по сравнению с 4-х часовой инкубацией и на 31.5% по сравнению с 6-ти часовой инкубацией, фагоцитарный индекс при 8-ми часовой по сравнению с 6-ти часовой инкубацией, напротив, увеличился на 8.5%.

При температуре 40°C с увеличением длительности инкубации также наблюдали динамичное снижение фагоцитарного показателя и фагоцитарного индекса эритроцитов сазана. Так, при данной температуре увеличение продолжительности инкубации до 4-х, 6-ти и 8-ми часов способствовало снижению фагоцитарного показателя красных клеток крови сазана на 23.8%, 31.8% и 46.0% по сравнению с 2-х часовой инкубацией. Через 6 и 8 часов инкубации по сравнению с 4 часами уменьшение вышеназванного показателя составило 10.1% и 29.2%, через 8 часов по сравнению с 6 часами – 20.9%. При температуре 40°C через 6 часов инкубации фагоцитарный индекс красных клеток крови сазана снизился на 8.3% по сравнению с 2 часами, через 8 часов – на 8.3% и 2.9% по сравнению с 2-мя и 4-мя часами соответственно.

Эритроциты лягушки также проявляли фагоцитарную активность в отношении *Saccharomyces cerevisiae* как при температуре 20°C, так и при температуре 40°C в течение 2-8 часовой инкубации. Полученные результаты фагоцитарной активности эритроцитов *Rana ridibunda* в отношении клеток дрожжей представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы, при увеличении температуры инкубации до 40°C по сравнению с температурой 20°C фагоцитарный показатель ядерных эритроцитов лягушек через 4 и 8 часов инкубации снижается на 25.5% и 9.5% соответственно. Через 6 часов инкубации при темпе-



ратуре 40°C по сравнению с температурой 20°C также произошло уменьшение среднего числа поглощенных одним эритроцитом *Rana ridibunda* частиц (на 10.7%).

Таблица 2

**Поглотительная способность эритроцитов *Rana ridibunda* в отношении *Saccharomyces cerevisiae***

Время инкубации, ч	Исследуемые показатели, ед. изм.	Температура инкубации, °C	
		20	40
2	ФП, %	57.16±3.70	55.29±1.70
	ФИ, отн. ед.	1.33±0.02	1.26±0.08
4	ФП, %	66.65±0.66 *	49.66±2.86 *&
	ФИ, отн. ед.	1.32±0.03	1.24±0.06
6	ФП, %	50.92±2.73 *	47.84±1.47 *
	ФИ, отн. ед.	1.31±0.04	1.17±0.07 &
8	ФП, %	40.29±1.13 *	36.45±2.10 *@&
	ФИ, отн. ед.	1.23±0.04 *#	1.20±0.03

При комнатной температуре увеличение продолжительности инкубации ядерных эритроцитов лягушки до 4-х часов способствовало повышению фагоцитарного показателя на 16.6%, до 6-ти и 8-ми часов - снижению на 10.9% и 29.5% соответственно по сравнению с 2-мя часами. При вышеназванной температуре через 8 часов инкубации снизилось среднее число объектов фагоцитоза, поглощенных одним эритроцитом лягушки на 7.5% по сравнению с 2-мя часами и на 6.8% по сравнению с 4-мя часами инкубации.

При температуре 40°C увеличение длительности инкубации способствовало динамичному снижению фагоцитарного показателя у ядерных эритроцитов лягушки. Через 4, 6 и 8 часов инкубации по сравнению с 2-мя часами фагоцитарный показатель красных клеток крови *Rana ridibunda* при температуре 40°C снизился на 10.2%, 13.5% и 34.1% соответственно. Через 8 часов инкубации при данной температуре также наблюдалось снижение фагоцитарного показателя у эритроцитов лягушки на 23.8% по сравнению с 6 часами инкубации.

**Заключение**

В результате проведенных исследований установлено, что ядерные эритроциты сазана и лягушки проявляют фагоцитарную активность в отношении *Saccharomyces cerevisiae* при комнатной (20°C) и повышенной до 40°C температурах при 2-8 часовой инкубации. У ядерных эритроцитов сазана с увеличением температуры от 20°C до 40°C и продолжительности от 2-х до 8 часов инкубации поглотительная способность снижается. У красных клеток крови лягушки с увеличением продолжительности инкубации от 2-х до 8 часов поглотительная способность ядерных эритроцитов также снижается, за исключением 4-х часовой инкубации при комнатной температуре. Повышение температуры инкубации от 20 до 40°C способствует инактивации фагоцитарного показателя и фагоцитарного индекса эритроцитов *Rana ridibunda*.

Согласно исследованиям некоторых авторов, ведущими факторами, вызывающими изменения физиологических свойств гематоцитов, являются свойства мембраны [17, 18]. Последние определяются фазовыми переходами билипидного слоя плазмалеммы с разной критической точкой у представителей теплокровных и холоднокровных животных [17]. Значимость температуры окружающей среды для клеточных мембран как пойкилотермных, так и гомойотермных организмов обусловлена тем, что она определяет так называемые «слабые» взаимодействия между молекулами [19]. Можно предположить, что при инкубации красных клеток крови сазана и лягушки в условиях повышенной температуры происходит нарушение регуляции микровязкости билипидного слоя, фазового распределения липидов, микроокружения белков, белок-липидных взаимодействий, а также других характеристик структурной организации мембраны [18], при этом уменьшается резистентность и локомоционная активность эритроцитов [1], приводящие к снижению фагоцитарной активности.

**Список литературы**

1. Влияние температуры и длительности инкубации на миграционную активность и резистентность ядерных эритроцитов рыб, лягушек и птиц / С.Д. Чернявских, М.З. Федорова, Нгуен Тхи Тьук и др. // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Естественные науки. – Белгород, 2012. – №21 (140). Вып. 21. – С. 89–93.
2. Степанова В.М. Влияние температуры на антигенреагирующие клетки карпа (*Cyprinus carpio* L.) // Биология внутренних вод. – 2002. – Вып. 4. – С. 80–83.
3. Avtaliop R.R., Weiss E., Moalem T. Regulatory effects of temperature upon immunity in ectothermic vertebrates // Comparative immunology. N.Y.: Blackwell Scient. Publ. Oxford, 1976. – Pp. 227–238.



4. Effect of temperature on the immune system of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). I. Leucocyte distribution and phagocyte function in the anterior kidney at 10°C / A.J. Ainsworth, C. Dexiang, P.R. Waterstrat, T. Greenway // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1991. – Vol. 100 A. – Pp. 907–912.
5. Scott A.L., Rogers W.A., Klesius P.N. Chemiluminescence by peripheral blood phagocytes from channel catfish: function of opsonin and temperature // *Dev. Comp. Immunol.* 1985. – Vol. 9. – Pp. 241–250.
6. Prinesco H. Natural and experimental phagocytosis by erythrocytes in Amphibians // *Nature. New Biol.* – 1971. – №22. Vol. 231. – Pp. 143–144.
7. Поглощительная способность ядерных гемоцитов *Cyprinus carpio* L. и *Rana ridibunda* Pall. в разные сезоны года / И.С. Буковцова, С.Д. Чернявских, До Хыу Куэт и др. // *Научные ведомости БелГУ. Сер. «Естественные науки»*. – Белгород, 2013. – №7 (160). Вып. 24. – С. 86–91.
8. Перекисное окисление липидов и проницаемость мембран эритроцитов у детей и подростков с сахарным диабетом типа 1 / Т.Н. Субботина, Н.М. Титова, А.А. Савченко и др. // *Клин. лаб. диагн.* – 2004. – №5. – С. 20, 33–35.
9. Новицкий В.В. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма: контуры проблемы / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая др. // *Бюл. сибирской медицины*. – 2006. – №2. – С. 62–69.
10. Коробко В.Б., Гунина Л.М., Кабан А.П. Клинические и биохимические особенности статуса больных раком желудка, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения в результате аварии на ЧАЭС // *Врачеб. дело*. – 1995. – №5–6. – С. 19–22.
11. Чернявских С.Д., Федорова М.З., Масленикова Е.В. Сезонные колебания показателей фагоцитоза эритроцитов и полиморфноядерных лейкоцитов позвоночных // *Научные ведомости БелГУ. Сер. «Естественные науки»*. – Белгород, 2011. – №15 (110). Вып. 16. – С. 68–73.
12. Адамова В.В., Чернявских С.Д. Морфофункциональные особенности ядерных эритроцитов и лейкоцитов *Cyprinus carpio* и *Rana ridibunda* в условиях умеренной гипотонии // *Научные ведомости БелГУ. Сер. «Естественные науки»*. – Белгород, 2013. – №10 (153). Вып. 23. – С. 103–106.
13. Поглощительная способность ядерных гемоцитов *Cyprinus carpio* L. и *Rana ridibunda* Pall. в разные сезоны года / И.С. Буковцова, С.Д. Чернявских, Д.Х. Куэт и др. // *Научные ведомости БелГУ. Сер. «Естественные науки»*. – Белгород, 2013. – №7 (160). Вып. 24. – С. 86–91.
14. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии / А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеник, А.С. Быков и др. – М.: Мастерство, 2001. – 221 с.
15. Глик Б., Пастернак Д. Молекулярная биотехнология. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
16. Изучение поглощительной способности нейтрофилов крови с использованием инертных частиц латекса / С.Г. Потапова, В.С. Хрустиков, Н.В. Демидова, Г.И. Козинец // *Проблемы гематологии и переливания крови*. – 1977. – Т. XXII; №9 – С. 58–59.
17. Харакоз Д.П. О возможной физиологической роли фазового перехода «жидкое-твердое» в биологических мембранах // *Успехи биологической химии*. – 2001. – Т. 41. – С. 333–364.
18. Чернявских С.Д., Недопекина С.В. Сезонные колебания относительной микровязкости, полярности и сорбционной способности эритроцитарных мембран *Cyprinus carpio* и *Rana ridibunda* // *Научные ведомости БелГУ. Сер. «Естественные науки»*. – Белгород, 2013. – №3 (146). Вып. 22. – С. 99–103.
19. 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 INFLUENCE OF TEMPERATURE AND INCUBATION TIME ON PHAGOCYTTIC ACTIVITY OF NUCLEATED ERYTHROCYTES OF *CYPRINUS CARPIO* AND *RANA RIDIBUNDA*

**S.D. Chernyavskikh<sup>1</sup>,  
Do Huy Kyet<sup>1</sup>, Vo Van Thanh<sup>2</sup>,  
Y.V. Leontyeva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Belgorod State National Research University, 85 Pobeda St, Belgorod, 308015, Russia*

<sup>2</sup> *Ho Chi Minh City University of Education, 280 An Duong Vuong St, Ward 4, Dist. 5, Vietnam*

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

The influence of temperature and incubation time on phagocytic activity of nucleated erythrocytes of *Cyprinus carpio* and *Rana ridibunda* has been studied. It has been demonstrated that the phagocytic activity of red blood cells of carp and frog to *Saccharomyces cerevisiae* is shown after 2-8 hours of incubation, at the temperature 20 and 40°C. Phagocytic activity of erythrocytes of *Rana ridibunda* has been registered after 2 hours of incubation, at the temperature 40°C. Phagocytic activity of red blood cells of *Cyprinus carpio* and *Rana ridibunda* decreased with the increase of temperature from 20 to 40°C and incubation time of from 2 to 8 hours except phagocytic activity of frog erythrocytes after 4 hours incubation at room temperature conditions.

**Key words:** nucleated erythrocytes, phagocytic activity, temperature factor.