



УДК 576.322: 591.111.1

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,
То Тхи Бик Тхун

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

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

Изучена миграционная активность и резистентность ядерных эритроцитов у представителей классов Рыбы, Земноводные и Птицы в опытах *in vitro*. Установлено, что в ряду рыба-птица резистентность эритроцитов к гипертермии увеличивается. Показано, что при повышенной температуре увеличение времени инкубации ведет к снижению локомоционной активности красных клеток крови у всех подопытных животных. У наземных позвоночных, независимо от терморегуляторных особенностей, при температуре 42°C наблюдается фазовый характер разрушения клеток: первоначально быстрый гемолиз эритроцитов сменяется временной его инактивацией с дальнейшим нарастанием процесса разрушения клеток по мере увеличения длительности инкубации.

Ключевые слова: миграционная активность, ядерные эритроциты, резистентность эритроцитов, температурный фактор, температурный гемолиз.

Введение

В настоящее время достаточно полно описана общая картина изменений, происходящих в организме млекопитающих животных и человека при остром перегревании [1-4]. Имеются работы, в которых сообщается о положительном влиянии высокой температуры на факторы неспецифической резистентности и иммуногенез [5]. Стимулирующий эффект высокой внешней температуры проявляется, главным образом, при кратковременном воздействии на организм, то есть отсутствии глубоких нарушений механизмов терморегуляции [3]. Для холоднокровных животных температура окружающей среды также является одним из важнейших факторов, воздействующих на иммунологические процессы. Установлено, что изменение температуры воды до уровня, находящегося выше оптимального, понижает фагоцитарную активность лимфоцитов рыб [6-9]. У низших позвоночных защитную функцию наряду с лейкоцитами выполняют ядерные эритроциты [10]. В современной клеточной биологии активно исследуются цитофизиологические особенности устойчивости эритроцитов к коллоидно-осмотическому лизису, отмечены изменения резистентности клеток в условиях гипоксии и гиперкапнии у представителей различных филогенетических групп животных [11]. Многочисленными экспериментами установлена зависимость между стойкостью красных клеток крови к гемолитикам разного генеза и физиологическим состоянием организма [12-14]. Вместе с тем, в научной литературе практически отсутствуют сведения об устойчивости вышеназванного пула клеток к температурному фактору. Еще менее изученным является вопрос о влиянии температуры и длительности инкубации на один из этапов реализации защитных функций ядерных эритроцитов – локомоционную активность.

Объекты и методы исследования

В опытах *in vitro* изучали влияние температуры и длительности инкубации на миграционную активность и резистентность ядерных эритроцитов у представителей классов Рыбы, Земноводные и Птицы.

В работе использовали периферическую кровь, взятую у наркотизированных эфиром животных: сазана *Cyprinus carpio* (30 особей), лягушки озёрной *Rana ridibunda* (30 особей) и курицы домашней *Gallus domesticus* (11 особей). У рыб кровь брали из хвостовой вены, у земноводных – из сердца, у птиц – путем венопункции. В качестве антикоагулянта использовали гепарин в количестве 10 ед./мл. Кровь центрифугировали 4 мин при 400 г, отбирали эритроциты и подсчитывали в камере Горяева.



В тесте миграции под агарозой изучали спонтанную локомоционную активность красных клеток крови. За основу был взят классический метод, описанный в многочисленных работах [15-17] в модификации [18]. В лунки, вырезанные в агарозном геле, нанесенном на предметное стекло, помещали по 3 мкл суспензии эритроцитов, разведенной изотоническим раствором, содержащей около 1 млн. клеток (у Земноводных, имеющих больший размер эритроцитов – около 300 тыс. клеток). Стекла с эритроцитами сазана и лягушки инкубировали в среде с 5% содержанием CO_2 при комнатной (22°C) и повышенных температурах (37°C и 42°C). Клетки крови курицы инкубировали при аналогичных температурах, а также при температуре 45°C , рассматривая ее как повышенную. Длительность инкубации клеток составляла 2, 4, 6 и 8 часов. По окончании инкубационного периода эритроциты фиксировали в течение часа глутаровым альдегидом и окрашивали азур-эозином. Площадь спонтанной миграции клеток измеряли с помощью анализатора изображений «Видео тест-Размер» 5.0 (ООО «Микроскоп-Сервис», г. Санкт-Петербург).

Методом микроскопии определяли резистентные и разрушенные эритроциты. На окрашенных препаратах выбирали участок площадью $0,1 \text{ мм}^2$, подсчитывали процент гемолизированных клеток.

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики с использованием специальных программ на персональном компьютере. Достоверность различий определяли по t -критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

У представителей класса Рыбы при температуре 22°C площадь миграции эритроцитов практически не изменяется, за исключением показателя, полученного при 6-часовой инкубацией клеток по сравнению с 4-часовой, где наблюдается его снижение (табл. 1). При этом в течение всего изучаемого периода инкубации разрушения эритроцитов при данной температуре не наблюдается (рис. 1 а).

Можно предположить, что при 6-часовой инкубации в условиях комнатной температуры происходят изменения микровязкости и других характеристик структурной организации мембраны эритроцита сазана, приводящие к инактивации клеточной подвижности [19], через 8 часов инкубации – включаются компенсаторные механизмы [20].

Таблица 1

Показатели площади миграции эритроцитов рыбы, мм^2

Температура инкубации, $^\circ\text{C}$	Продолжительность инкубации, ч			
	2	4	6	8
22	2.49 ± 0.18	2.59 ± 0.20	$2.43 \pm 0.09 \bullet$	2.54 ± 0.19
37	2.61 ± 0.24	$2.45 \pm 0.15^*$	$2.41 \pm 0.16''$	$2.39 \pm 0.19''$
42	$2.38 \pm 0.21^\circ$	2.45 ± 0.19	2.40 ± 0.13	2.31 ± 0.09

Примечание: здесь и в табл. 2-3: достоверность различий по t -критерию Стьюдента ($p < 0.05$):

* – по сравнению с температурой 22°C ,

$^\circ$ – по сравнению с температурой 37°C ,

'' – по сравнению с клетками, инкубированными 2 часа,

\bullet – по сравнению с клетками, инкубированными 4 часа.

При температуре 37°C у сазана отмечается однонаправленная динамика: чем продолжительнее период инкубации, тем ниже показатели площади миграции и резистентность эритроцитов. По сравнению с 2 часами инкубации через 6-8 часов локомоционная активность снижается на 7.7-8.4%, доля разрушенных клеток увеличивается от 22% до 90-93% (рис. 1 б).

При температуре 42°C у эритроцитов рыбы уже после 2-часовой инкубации регистрируется 100% термический гемолиз (рис. 1 в).

У земноводных самый высокий показатель площади локомоций выявлен при инкубации клеток в течение 4 часов при температуре 22°C , разница по сравнению с 2-х часовой инкубацией составила 9.1% (табл. 2). Через 6 и 8 часов изучаемый показатель при вышеназванной температуре снижается по сравнению с 4 часами инкубации. При разной длительности инкубации в условиях комнатной температуры гемолиза эритроцитов у лягушек не наблюдается (рис. 2 а).

При 37°C увеличение времени инкубации клеток до 4 и 8 часов ведет к разрушению клеток (рис. 2 б) и снижению площади миграции на 5.5% и 8.9% соответственно по сравнению с 2-часовой инкубацией. Через 4 часа после начала инкубации было разрушено 64% клеток, через 8 часов – 67%.

Таблица 2

Показатели площади миграции эритроцитов земноводных, мм²

Температура инкубации, °С	Продолжительность инкубации, ч			
	2	4	6	8
22	2.60±0.23	2.86±0.36 ^в	2.52±0.20●	2.41±0.18●
37	2.68±0.22	2.54±0.21 ^{вв}	2.56±0.17*	2.46±0.22 ^{вв}
42	2.58±0.20	2.37±0.16 ^{вв*о}	2.54±0.14*●	2.50±0.17

Инкубация клеток при температуре 42°С приводит к фазовым изменениям показателей площади миграции и температурного гемолиза эритроцитов. Через 4 часа после начала инкубации по сравнению с 2 часами площадь локомоций снижается на 8.9% и регистрируется гемолиз эритроцитов (87%) (рис. 2 в). Через 6 часов инкубации первоначально быстрое разрушение эритроцитов сменяется временной инактивацией процесса гемолиза и увеличением площади локомоций на 6.7% по сравнению с 4 часами. Возможно, при 6-часовой инкубации у животных этого вида происходит временная активация высокостойких клеток [11], обусловленная температурной компенсацией метаболизма [20]. Дальнейшее увеличение длительности инкубации (до 8 часов) сопровождается тенденцией к снижению показателей площади миграции и увеличению процента разрушенных клеток.

У кур при температурах 22°С и 37°С, независимо от длительности инкубации, активность миграции клеток крови изучаемого пула примерно одинакова (табл. 3). Разрушенных эритроцитов не выявлено (рис. 3 а, б).

Таблица 3

Показатели площади миграции эритроцитов птицы, мм²

Температура инкубации, °С	Продолжительность инкубации, ч			
	2	4	6	8
22	2.63±0.16	2.66±0.11	2.76±0.21	2.79±0.28 ^{вв}
37	2.80±0.22*	2.76±0.33	2.72±0.21	2.72±0.19
42	2.61±0.17	2.49±0.11 ^{вв*о}	2.67±0.15●	2.58±0.21*

Можно было бы предположить, что температура 42°С, соответствующая температуре тела птиц, будет оптимальной для миграции клеток. Однако выявленные у кур изменения показателей площади локомоции эритроцитов при 42°С оказались аналогичными земноводным: через 4 часа инкубации по сравнению с 2 часами площадь миграции снижается на 4.6%, через 6 часов повышается на 7.2% по сравнению с 4 часами, через 8 часов отмечается тенденция к снижению. Через 4-8 часов гемолиз составил 25-54%. Можно предположить, что при 6-часовой инкубации у кур происходит временное включение компенсаторных механизмов [20]. Согласно исследованиям некоторых авторов [19, 21], повышение функциональной активности клеток при гипертермии происходит вследствие увеличения активности интегральных мембранных ферментов Na⁺/K⁺ - АТФазы и Ca²⁺/Mg²⁺ - АТФазы.

При повышении температуры до 45°С увеличение времени инкубации эритроцитов птиц до 4-8 часов способствует снижению площади локомоций на 1.2-4.0% по сравнению с 2 часами. По результатам микроскопии у эритроцитов кур через 4 часа после начала инкубации при температуре 45°С регистрируется температурный гемолиз клеток (95%) (рис. 3 в), ведущий к необратимым структурно-функциональным преобразованиям как плазматической мембраны, так и клетки в целом.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что с увеличением температуры инкубации снижается резистентность и локомоционная активность эритроцитов у всех подопытных животных. У рыбы и курицы при повышении температуры уменьшается время, затрачиваемое на разрушение эритроцитов и инактивацию их локомоционной активности. В ряду рыба-птица устойчивость эритроцитов к действию гипертермии повышается, что может косвенно указывать на совершенствование терморегуляторных механизмов в процессе эволюции.

Список литературы

1. Ажаев А.Н. Физиолого-гигиенические аспекты действия высоких и низких температур // Проблемы космической биологии. – М.: Наука, 1979. – Т.38. – 264 с.
2. Козлов Н.Б. Гипертермия: биохимические основы патогенеза, профилактики, лечения. – Воронеж: Изд-во Воронежского университета, 1990. – 102 с.
3. Васильев Н.В. и др. Система крови и неспецифическая резистентность в экстремальных климатических условиях / Н.В. Васильев, Ю.М. Захаров, Т.И. Коляда. – Новосибирск: Наука, 1992. – 257 с.

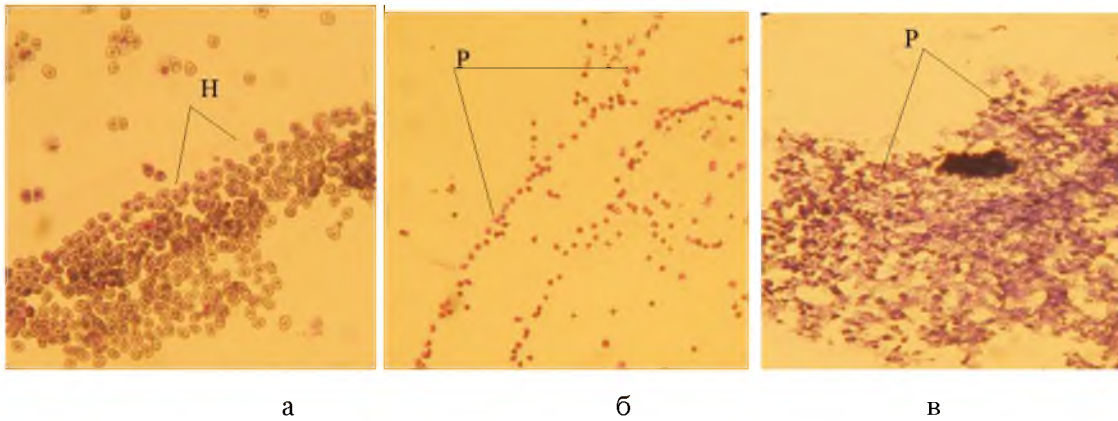


Рис. 1. Эритроциты сазана ($\times 400$), инкубированные при температуре а – 22°C , б – 37°C , в – 42°C .
Здесь и на рис. 2-3: Н – неразрушенные, Р – разрушенные эритроциты

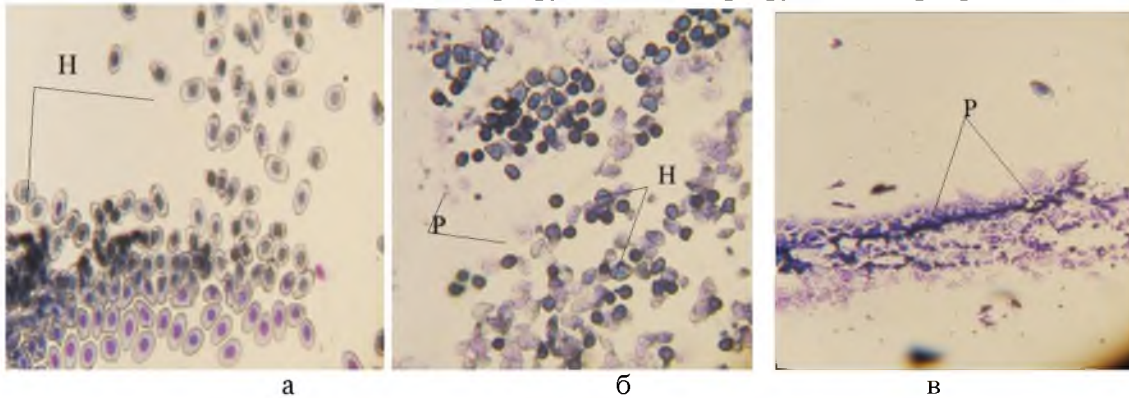


Рис. 2. Эритроциты лягушки ($\times 400$), инкубированные при температуре а – -22°C , б – -37°C , в – -42°C

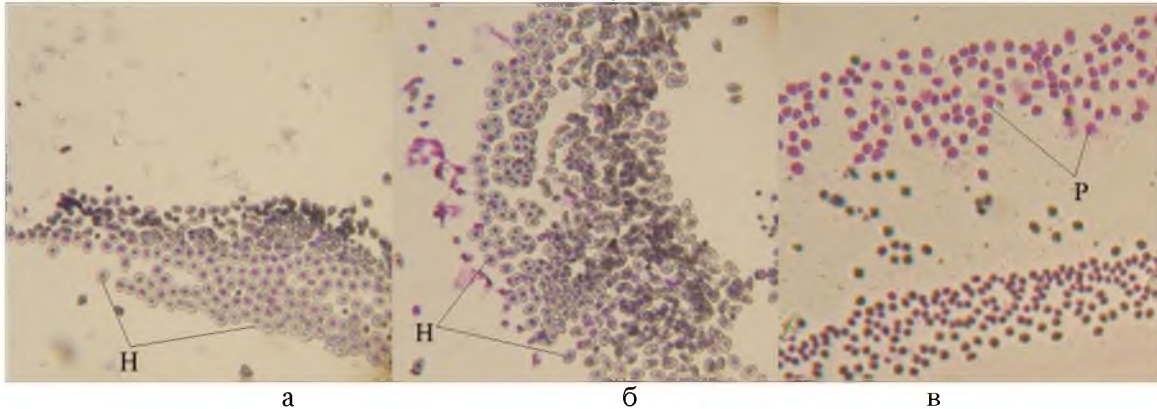


Рис. 3. Эритроциты курицы ($\times 400$), инкубированные при температуре а – 22°C , б – 37°C , в – 45°C

4. Федорова М.З. Функциональные свойства и реактивность лейкоцитов крови при измененных условиях организма, вызванных факторами различной природы: Автореф. дис... д-ра. биол. Наук: 03.00.13; 14.00.16. – М., 2002. – 32 с.

5. Прокопенко Л.Г., Яхонтов Ю.Я. Механизм стимуляции иммунного ответа при действии на организм высокой температуры // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1981. – №6. – С. 62-66.

6. Степанова В.М. Влияние температуры на антигенреагирующие клетки карпа (*Cyprinus carpio* L.) // Биология внутренних вод. – 2002. – Вып. 4. – С. 80-83.

7. Avtalion R.R., Weiss E., Moalem T. Regulatory effects of temperature upon immunity in ectothermic vertebrates // Comparative immunology. N.Y.: Blackwell Scient. Publ. Oxford, 1976. – P. 227-238.

8. Ainsworth A.J. 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. – V. 100 A. – P. 907-912.

9. 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. – V. 9. – P. 241-250.
10. Prunesco H. Natural and experimental phagocytosis by erythrocytes in Amphibians // *Nature. New Biol.* – 1971. – V. 231, № 22. – P. 143-144.
11. Лицунова Е.А., Скоркина М.Ю. Физиология крови. – Белгород: Изд-во БелГУ, 2007. – 324 с.
12. Субботина Т.Н. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. John I. Gallin, Paul G. Quie. *Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology and Clinical Implication* // Raven Press. – New York. – 1978. – v. XIII, № 9. – P. 429.
17. Дуглас С.Д., Куи П.Г. Исследование фагоцитоза в клинической практике: Пер. с англ. – М.: Медицина, 1983. – 112 с.
18. 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.
19. Выборнова И.И. Механизмы воздействия температурных условий и антропогенных химических факторов на функционирование биологических мембран / И.И. Выборнова, А.Н. Гольцов, С.Ю. Епифанов и др. // *Физиология человека.* – 1994. – Т.20, №6. – С. 124-136.
20. Хочачка П., Сомеро Д. Стратегия биохимических адаптаций. – М., Мир, 1977. – 398 с.
21. Рустамов Ф.А., Горанчук В.В. Влияние гипертермии на активность Na, К-АТФазы в эритроцитах человека // *Тезисы докладов XVII съезда Всерос. физиол. общества им. И.П. Павлова.* – Ростов-на-Дону, 1998. – С. 169-169.

INFLUENCE OF INCUBATION TEMPERATURE AND LENGTH ON MIGRATORY ACTIVITY AND RESISTANCE OF FISH, FROGS AND BIRDS NUCLEAR ERYTHROCYTES

S.D. Chernyavskikh,
M.Z. Fedorova,
Nguyen Thi Chuc,
To Thi Bich Thuy

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

E-mail: Chernyavskikh@bsu.edu.ru

Nuclear erythrocytes migratory activity and resistance of Fish, Frogs and Birds specimens have been studied in vitro experiments. The increase in erythrocytes resistance to hyperthermia has been determined in Fish-Bird chain. The increase of incubation time at high temperature leads to the decrease of locomotion activity of red blood cells among all of the experimental animals. Terrestrial vertebrates demonstrate the phase way of blood cells collapse at 42°C regardless of thermoregulatory features: the swift initial haemolysis of red blood cells is changed by its temporary inactivation followed by the growth of cells collapse with the increase of incubation time.

Keywords: migratory activity, nuclear erythrocytes, erythrocytes resistance, temperature factor, temperature haemolysis.