

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
ЛЕЙКОЦИТОВ ЛЯГУШЕК *RANA RIDIBUNDA* PALL.**

Выпускная квалификационная работа
обучающейся по направлению подготовки 06.03.01 Биология
очной формы обучения, группы 07001418
Жидоморовой Екатерины Вадимовны

Научный руководитель
д.б.н., профессор
Скоркина М.Ю.

БЕЛГОРОД 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1. Морфофункциональные особенности клеток крови лягушек	8
1.2. Особенности физиологии и экологии лягушек в различные сезонные периоды	12
1.3. Динамика состава крови и кроветворения у лягушек	16
1.4. Изменения качественного и количественного состава крови под влиянием иных факторов	19
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	23
2.1. Организация эксперимента	23
2.2. Манипуляции с животными	24
2.3. Основные методики	25
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	28
3.1. Сезонная динамика числа лейкоцитов и их форм у <i>R. ridibunda</i> Pall.....	28
3.2. Миграционная активность лейкоцитов <i>R. ridibunda</i> Pall. в различные сезонные периоды	30
3.3. Сезонная динамика фагоцитарной активности лейкоцитов <i>R. ridibunda</i> Pall.....	31
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
ВЫВОДЫ	36
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	37

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИСЛ – индекс сдвига лейкоцитов;

ПД – пекарские дрожжи;

ФИ – фагоцитарный индекс;

ФЧ – фагоцитарное число.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В наземных биоценозах земноводные являются одной из доминирующих групп позвоночных животных и удобным объектом биомониторинга территорий, подверженных антропогенному воздействию [Леонтьева, Семенов, 1997]. Из множества различных методов оценки состояния животных, особое внимание уделяется гематологическому подходу, который позволяет оценить воздействие постоянно меняющихся условий среды на организм [Чернышова, Старостин 1994; Романова, 2003, Пескова, 2004б; Минеева, Минеев, 2011; Романова, Шаповалова, 2016]. Однако физиологическое состояние системы крови амфибий изменяется не только под влиянием загрязнения окружающей среды, но и в ходе годового цикла [Грушко, 2010в; Акуленко, 2012]. Подобные изменения следует учитывать при исследованиях в сфере биоиндикации для более точной оценки влияния изменения окружающей среды на организм модельного объекта.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время в научных работах рассмотрены морфофункциональные характеристики клеток крови амфибий [Лобода, 1997; Coico et al., 2003; Campbell, Ellis, 2007], их качественный и количественный состав [Лабораторные животные ..., 1983; Романова, 2005; Гомеостаз внутренней среды ..., 2013], доказана фагоцитарная активность не только лейкоцитов, но и эритроцитов низших позвоночных [Головки и др., 2008; Чернявских и др, 2011б; Адамова, Чернявских, 2013; Поглодительная способность ..., 2013].

Значительная часть работ посвящена изучению эколого-физиологических особенностей лягушек в различные сезоны. Рассмотрен годичный цикл активности земноводных в общем и лягушек в частности, изучено влияние температурного фактора на двигательную и трофическую активность лягушек [Пасанен, 1980; Определитель земноводных ..., 1977; Файзулин, 2008; Воронин, Ермохин, 2016]. Кроме того, в некоторых работах уделено внимание различным физиологическим изменениям в организме лягушек, которые вызваны сменой сезонов или же воздействием высоких или

низких температур [Некоторые морфофункциональные показатели ..., 1979; Львова, Магомедова, 1991]. Отдельно рассматривается воздействие температурных факторов на функциональную активность клеток крови [Rothstein et al., 1975; Чернявских и др., 2011а; Влияние температурного фактора ..., 2012; Влияние температуры ..., 2012; Гомеостаз внутренней среды ..., 2013; Сезонные колебания ..., 2014].

В настоящее время изучены механизмы кроветворения у амфибий [Campbell, Ellis 2007; Грушко, 2008, 2010а, 2010б, 2010в] и влияние смены сезонов на данный процесс [Акуленко, 2008, 2012]. Оценена динамика количественного состава крови в целом [Нишанбаева, 1971] и для некоторых типов клеток в частности [Гребникова, 1980; Акуленко, 1997, 2008, 2012], однако эти данные немногочисленны и разрозненны.

В последнее время наибольший интерес представляет ценность амфибий как объекта биоиндикации [Чернышова, Старостин, 1994; Пескова, 2004а; Романова, 2010; Минеева, Минеев, 2011]. Изменения качественного и количественного состава крови [Пескова, 2003, 2005; Романова, 2010], а также динамика функциональной активности клеток под влиянием различных загрязнителей и паразитов являются предметом исследования многих научных работ [Романова, Николаев, 2014а]. При этом рассматривается не только общий уровень загрязнения территорий [Пескова, 2003, 2005; Романова, Николаев, 2014б; Романова, Шаповалова, 2016], но и воздействие отдельных типов загрязнителей [Пескова, Вафис, 2007; Кармазин, Пескова, 2010] или паразитических организмов [Вершинин, 2004; Изменение лейкоцитарной формулы ..., 2013].

Однако представленных в литературе данных недостаточно для того, чтобы получить понимание о воздействии смены сезонов на функциональную активность лейкоцитарной системы лягушек. В связи с этим **целью** работы явилось изучить сезонную динамику функциональной активности лейкоцитарной системы лягушек вида *Rana ridibunda* (Pallas, 1771).

Для достижения поставленной цели были сформулированы и решены следующие **задачи**:

- 1) оценить изменения числа лейкоцитов и лейкоцитарный профиль в течение трёх сезонов;
- 2) проанализировать изменения миграционной активности лейкоцитов в течение трёх сезонов;
- 3) выявить динамику фагоцитарной активности лейкоцитов в течение трёх сезонов;
- 4) установить тенденции сезонной динамики функциональной активности лейкоцитарной системы на основе полученных данных.

Объектом исследования явилась периферическая кровь лягушек вида *R. ridibunda*.

Предмет исследования – сезонная динамика функциональной активности лейкоцитов лягушек вида *R. ridibunda*.

Методы исследования. В работе использованы методы подсчета числа лейкоцитарных клеток и их отдельных типов, а также методики определения миграционной и фагоцитарной активности лейкоцитов. Статистическая обработка экспериментальных данных выполнена методами вариационной статистики.

Теоретическая и практическая значимость. Выполненное исследование содержит сведения о сезонных изменениях качественного и количественного состава лейкоцитов лягушек, их миграционной и фагоцитарной активности. Полученные данные дополняют современные представления фундаментальной физиологии о сезонной активности системы гемопозеза земноводных. Полученные данные имеют важное практическое значение, связанное с учётом влияния смены сезонов при работе с лягушками вида *R. ridibunda* и анализе получаемых результатов при проведении исследований в сфере биоиндикации. Полученные данные необходимо учитывать в экспериментальной практике при работе с лягушками вида *R. ridibunda*. в качестве модельного объекта.

Структура работы. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, выводов, списка сокращений, списка литературы. Работа изложена на 46 страницах машинописного текста, включает 4 таблицы и 2 рисунка. Список литературы включает в себя 82 наименования, из которых 61 отечественный и 21 иностранный источник.

По результатам исследования опубликована **1 научная работа:**

1. Жидоморова Е.В. Сезонная динамика фагоцитарной активности лейкоцитов у лягушки озёрной // Биология – наука XXI века: 22-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Пущино, 2018. С. 345.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Морфофункциональные особенности клеток крови лягушек

Клеточный состав крови у земноводных сходен с таковым у прочих позвоночных. У всех представителей этого класса присутствуют ядродержащие эритроциты, три типа гранулоцитов (нейтрофильные, эозинофильные, базофильные), моноциты, лимфоциты и тромбоциты.

На уровне световой микроскопии морфология клеток была описана ещё в 19–20 веках. Исследования, проведённые с использованием электронной микроскопии, позволяют дополнить эти сведения.

Эритроциты – ядродержащие клетки овальной формы. У лягушек, как и у прочих земноводных, размеры эритроцита превышают размеры таковых у млекопитающих. Диаметр эритроцитов в среднем составляет 23–28 мкм, содержание эритроцитов в 1 мм³ примерно 0,46 млн [Зеленые лягушки ..., 1997]. Длительность жизни эритроцитов велика по сравнению с таковыми у теплокровных животных. Для разных представителей рода *Rana* срок жизни эритроцитов различается в диапазоне 100–200 суток [Cline, Waldemann, 1962].

Эритроциты лягушек также способны к фагоцитарной активности, которая разнится в зависимости от сезона и объекта фагоцитоза. Эритроциты *R. ridibunda* проявляют большую активность в осенне-зимний период, при этом они активнее поглощают клетки *Saccharomyces cerevisiae*, чем клетки *Bacillus subtilis* и частицы латекса. Количество поглощённых частиц не испытывает значительных колебаний в течение года [Буковцова и др., 2013]. Полагают, что фагоцитарная активность красных клеток крови аналогична белым. Согласно исследованиям некоторых авторов [Головко и др., 2008] для эритроцитов лягушек характерна складчатость плазматической мембраны, что позволяет этим клеткам осуществлять фагоцитоз [Чернявских и др., 2011б].

Лейкоциты делятся на гранулоциты, содержащие гранулы (зёрна) и агранулоциты, которые гранул не имеют. К гранулоцитам относят эозинофи-

лы, нейтрофилы, базофилы, к агранулоцитам – моноциты и лимфоциты. Общее количество лейкоцитов в 1 мм^3 крови составляет 6–25 тыс. Они имеют внешнее сходство с аналогичными клетками крови человека, курицы и лошади, способны к фагоцитозу.

Нейтрофилы имеют сегментированное ядро, состоящее из 3–4 сегментов, и бледную цитоплазму, в которой лежат мелкие розовые зерна, неразличимые при наблюдении в световой микроскоп. По ферментному составу они соответствуют азурофильным гранулам млекопитающих [Kelenyi, 1972]. В нейтрофилах отмечается высокое содержание гликогена, умеренная активность кислой фосфатазы, пероксидазы и эстеразы, наибольшее количество липидных гранул [Лобода, 1997]. Нейтрофилы помогают подавить микробное вторжение и участвуют в развитии воспалительной реакции. Содержание нейтрофилов от общего числа лейкоцитов составляет 12–17% [Романова, 2005; Гомеостаз внутренней среды ..., 2013].

Эозинофилы встречаются реже, чем нейтрофилы. Эти клетки имеют правильную круглую форму, содержат отдельно лежащие в цитоплазме зерна. Цитоплазма интенсивно голубого цвета [Гомеостаз внутренней среды ..., 2013]. Эти клетки имеют двулопастное или сегментированное на 2–3 сегмента ядро. Цитоплазма заполнена гранулами яркого кирпичного цвета, которые имеют удлинённую форму и кристаллические включения в гомогенном матриксе [Campbell, Ellis, 2007]. В этих клетках отмечается умеренное содержание гликогена, высокое содержание липидов, высокая активность катионных белков, пероксидазы, щелочной фосфатазы, следовые количества кислой фосфатазы и эстеразы [Лобода, 1997]. Эозинофильные гранулоциты являются наиболее функционально активными элементами крови у амфибий, обеспечивая защитные реакции организма к гельминтофауне [Малютина, 2008; Шевкопляс, Лопатин, 2008; Изменение лейкоцитарной формулы ..., 2013; Johnson, Fonte, 2013]. Полагают, что защитная функция эозинофильных гранулоцитов связана со способностью продуцировать пероксид и супероксидные радикалы [Coico et al., 2003]. Общее количество эозинофилов – пример-

но 3–7% от всех лейкоцитов [Романова, 2005; Гомеостаз внутренней среды ..., 2013].

Базофилы встречаются редко, их не больше 1–2% от общего количества [Романова, 2005]. Эти клетки отличаются небольшим размером и большим ядром, содержат крупные ярко-фиолетовые зерна различного размера в пределах 0,2–0,9 мкм. Также в этих клетках выявлены следовые количества гликогена [Лобода, 1997]. На мембранах базофилов экспрессированы Fc-рецепторы для специфических иммуноглобулинов. При поступлении антигена базофилы дегранулируют и происходит высвобождение гистамина, зависящее от концентрации антигена и температуры. У бесхвостых амфибий выделяют две популяции базофильных клеток. Одна популяция содержится в соединительной ткани и представлена отростчатыми клетками, которые имеют удлинённое ядро и сферические или палочковидные гранулы различного размера в пределах 0,2–0,9 мкм [Coico et al., 2003]. Гранулы имеют плотное или зернистое строение, дают метахромазию при окраске азуром А (pH=3). Вторая популяция представлена округлыми тучными клетками, которые локализованы в крови и селезёнке. Эти клетки имеют округлое ядро и плотные гранулы, которые не дают метахромазии с азуром А (pH=3). Единственный орган, в котором обнаружены обе популяции тучных клеток – это тимус. Вероятно, тимус участвует в генезе обеих популяций клеток, тогда как селезёнка участвует только в производстве второго типа клеток [Кара, Csaba, 1975].

Опыты с лейкоцитами показывают, что клетки проявляют различную фагоцитарную активность по отношению к разным типам частиц. Лейкоциты лягушки быстрее реагируют на живые бактерии, чем на те, что были убиты при помощи высокой температуры. Затем выяснили, что реакция лейкоцитов активнее в отношении сибиреязвенных бацилл, чем инертных веществ, таких как волокна ваты [Мечников, 2001]. Эти данные подтверждают современными работами: лейкоциты лягушек активнее фагоцитируют дрожжи и сенную палочку, чем частицы латекса [Адамова, Чернявских, 2013]. Лейкоциты оце-

пневших лягушек обладали пониженной активностью, но после нагревания их до 30°C они обнаруживали ту же активность, что и до охлаждения [Мечников, 2001].

Самый многочисленный класс лейкоцитов – лимфоциты, которые составляют до 19–50% от общего количества клеток [Лабораторные животные ..., 1983], однако их доля может достигать 80–96% [Гомеостаз внутренней среды ..., 2013]. Имеют морфологию, типичную для лимфоцитов позвоночных, способны образовывать небольшие псевдоподии – выросты цитоплазмы, с помощью которых они передвигаются. На препарате их выделяют за счет крупного ядра и узкого слоя цитоплазмы, окрашенной в светло-голубой цвет, могут иметь азурофильные гранулы. Для малых лимфоцитов характерно округлое ядро, узкий ободок цитоплазмы, которая располагается неравномерно вокруг ядра. Средние лимфоциты имеют более крупное ядро, относительно широкий слой цитоплазмы. Большие лимфоциты – наиболее крупные, с рыхлым ядром, обильной цитоплазмой, невысоким ядерно-цитоплазматическим отношением [Лобода, 1997]. Лимфоидная система амфибий, как и у млекопитающих, содержит популяции Т- и В-лимфоцитов [Bleicher, Cohen, 1981]. Процентное распределение В-клеток в различных органах лягушек различно: большая их часть сосредоточена в югулярных телах (50%), в костном мозге (14%), крови (14%) и селезёнке значительно меньше (10%), меньше всего их в тимусе (1%). Основным источником В-клеток у лягушек, как и у млекопитающих, является костный мозг. У амфибий В-клетки обладают фагоцитарной активностью [Katsura, 2002; Li et al., 2006].

Моноциты редки, составляют около 0–0,5% от всех лейкоцитов крови лягушки. Моноциты являются фагоцитами, которые презентируют антигены и высвобождают цитокины [Coico et al., 2003; Zimmerman et al., 2010]. По морфологии не отличаются от моноцитов других позвоночных – крупные клетки, имеют базофильную вакуолизированную цитоплазму, окрашенную в неяркие серый (при окраске по Паппенгейму) или сиреневый цвета. Ядро бобовидной формы, может иметь выросты или, наоборот, вдавленные участки.

В крови также встречаются их производные – макрофаги, которые могут содержать гранулы меланина и продукт распада гемоглобина – гемосидерин [Freidsohn, 1910].

Тромбоциты – ядерные клетки, схожие с тромбоцитами курицы. В отличие от тромбоцитов млекопитающих, они представляют собой цельные клетки веретенообразной формы, имеют палочковидное ядро, сходное по форме с ядром эритроцитов. Цитоплазма тромбоцитов делится на эндоплазму, содержащую органеллы и включения в виде гранул, и гиалиновую эктоплазму, лишённую органелл [Charlemagne, 1972]. Форма клетки поддерживается пучками микротрубочек, сложенных в шестиугольную или квадратную сетку в субмембранном слое цитоплазмы. В поверхностном слое имеется множество структур, которые на срезах выглядят как светлые вакуоли, однако в отдельных местах сообщаются с внешней средой. Цитоплазма тромбоцитов содержит митохондрии, комплекс Гольджи, рибосомы. Находящиеся в цитоплазме гранулы имеют, окрашиваются по Райту в красно-фиолетовый цвет гомогенную структуру [Campbell, Ellis, 2007]. При контакте с инородными частицами, они расплываются на её поверхности, цитоплазма вакуолизируется, появляются длинные нити фибрина, клетки разрушаются [Feu, 1966].

1.2. Особенности физиологии и экологии лягушек в различные сезонные периоды

Бесхвостые амфибии в целом и лягушки в частности являются консументами I, II и III порядков. Они включены во многие звенья сложной трофической сети, а также выполняют функцию связующего звена между трофическими цепями водных и наземных экосистем.

Активность пойкилотермных животных средних широт подчинена сезонному ритму изменений условий внешней среды. Основное приспособление амфибий, проживающих в местах с суровым климатом – зимнее оцепенение. В связи с этим годовой цикл многих амфибий делится на две части:

активную, в ходе которой животное питается, размножается и готовится к зиме, и пассивную, в которой животные находятся в состоянии спячки.

Более подробная классификация фаз годового цикла была дана для *Rana temporaria* С. Пасаненом [1980]. Он выделил следующие этапы жизненного цикла.

1. Уход в места зимовки (сентябрь–октябрь).
2. Зимовка (до апреля у половозрелых особей и до мая у неполовозрелых).
3. Период перед выходом, когда животные мигрируют из зимовочных ям по дну водоёма и могут активно плавать (апрель у половозрелых особей и май у неполовозрелых).
4. Выход на сушу (соответственно начало мая и середина мая).
5. Нерест.
6. Кормёжка.

У лягушек разных регионов сроки начала отдельных фаз несколько отличаются от приведённых выше, среднее время выхода лягушек на сушу происходит в период с 2 апреля по 2 мая.

На севере ареала озёрная лягушка уходит на дно водоёма на зимовку в сентябре–октябре, в южных районах – в ноябре–декабре. Обычно двигательная активность прекращается при $+5...+9^{\circ}\text{C}$. Выходят из зимовки с конца февраля, до начала июня, в зависимости от местности, когда температура достигает $+10^{\circ}\text{C}$. Между выходом из зимовки и первым икрометанием проходит от недели до месяца, откладка икры начинается при температуре воды $+15,6...+18,6^{\circ}\text{C}$ [Определитель земноводных ..., 1977].

В более тёплых южных регионах лягушки сохраняют двигательную активность до конца октября – начала ноября. Лягушки могут также сохранять активность и в зимний период, если на дне водоёма присутствует обильная растительность, или же если водоём не замерзает зимой. В таких условиях они могут проявлять акустическую, двигательную и трофическую активность,

которая выражена в охоте на мальков рыб, смене дислокации [Воронин, Ермахин, 2016].

Как правило, лягушки зимуют большими скоплениями на дне непромерзающих водоёмов с чистой водой. Во время зимовки и икрометания они обычно не питаются, либо употребляют немногочисленных пауков и моллюсков [Файзулин, 2008]. По этой причине за короткий летний период они должны запасти достаточное количество питательных веществ, которые позволили бы им обходиться без пищи около 6 месяцев.

К октябрю-ноябрю у лягушек происходит максимальное накопление гликогена в печени и жира в жировых телах [Некоторые морфофункциональные показатели ..., 1979], при этом у животных, обитающих в северных широтах, концентрация гликогена выше [Пасанен, 1980]. Первая половина зимовки проходит за счёт расходования запасов жира, которые практически полностью истощаются к апрелю-маю. Гликоген используется организмом в последнюю очередь, на последних этапах зимовки и во время брачного периода [Некоторые морфофункциональные показатели ..., 1979].

Описанные изменения метаболизма лягушек не следуют прямо за изменениями условий внешней среды, а имеют более устойчивый ритм, который сохраняется и при постоянных условиях. При содержании лягушек в лаборатории при постоянной температуре и освещённости наблюдается значительное увеличение концентрации гликогена в печени в начале зимы и уменьшение в конце. Накопление гликогена происходит у животных, которые не получают пищу [Пасанен, 1980]. В те же сроки достоверно изменяется содержание глюкозы в тканях печени и мозга, кератинфосфата в тканях мозга. Осенью, перед зимней спячкой, наблюдается снижение интенсивности глюконеогенеза в печени [Львова, Магомедова, 1991]. Такому же ритму подчинены и некоторые другие процессы в организме лягушки, такие как интенсивность синтеза ферментов в печени и почках, овуляция, икрометание, интенсивность газообмена.

Отмечено влияние температурного фактора на миграцию клеток крови земноводных. Повышение температуры окружающей среды до 37°C и 42°C способствует снижению площади спонтанной миграции клеток крови в сравнении с животными, находящимися в естественных условиях микроклимата [Чернявских и др, 2011a; Влияние температурного фактора ..., 2012]. У зеленой лягушки при температуре +20° С скорость движения лейкоцитов составляет около 0,13 мкм в секунду [Гомеостаз внутренней среды ..., 2013]. В осенний и зимний сезоны повышение температуры вызвало уменьшение площади миграции эритроцитов и лейкоцитов лягушки. Снижение температуры инкубации клеток до 5°C способствует увеличению миграционной активности клеток весной и летом. Вероятно, у функционально активных животных понижение температуры является фактором активации защитных функций, в частности усиления реакции локомоции гемоцитов [Влияние температуры ..., 2012; Сезонные колебания ..., 2014].

Влияние сезонных факторов на интенсивность пролиферации тканей бесхвостых амфибий изучались на примере хрусталика *Rana pipiens* в период с октября по апрель. Исследования показали, что при температуре воды +4–+9С° митоз отсутствует. Усиление митотической деятельности происходит резко в апреле-июне. В роговице зимой проходят отдельные митозы, в весенний период пик активности не так выражен, как в тканях хрусталика. Исследования других тканей, таких как эпителий почки, кожи, языка, показал сходную динамику пролиферативной активности [Rothstein et al., 1975].

Большинство исследований по кинетике репродукции клеток амфибий проводятся при температуре +18...+23С°. Различия температуры может оказывать существенное влияние на результаты, так как показано, что от температуры зависит длительность, структура митотических циклов и количество пролиферирующих клеток [Rothstein et al., 1975].

Температура имеет большое влияние на скорость и интенсивность клеточной пролиферации у амфибий. С другой стороны, пролиферативная активность тканей лягушки, взятых в разные сезоны, имеет также различия,

независящие от температуры. В ходе регенерации *R. temporaria* зимой первые митозы начинаются через 8 суток после его удаления, а летом при тех же условиях содержания – через 2 суток [Сахарова, Голиченков, 1968].

1.3. Динамика состава крови и кроветворения у лягушек

Продукция клеток крови и кроветворных органов у лягушек также обнаруживает сезонную цикличность. Морфологически это выражается в изменении строения костного мозга, лимфомиелоидных и жировых тел.

Несмотря на различия в количестве клеток крови у амфибий [Hutchison, Szarski, 1965], в изменении количественного состава крови у многих видов можно наблюдать сезонную закономерность. Сезонная динамика изменения числа лейкоцитов у амфибий и других хладнокровных изучена не так подробно как для эритроцитов, как правило, без рассмотрения отдельных типов клеток. У *R. ridibunda* отмечается наибольшее количество лейкоцитов в весенний период, а наименьшее – в зимний [Нишанбаева, 1971]. Число нейтрофилов в крови с наступлением весеннего периода увеличивается примерно вдвое [Гребникова, 1980]. Отмечается накопление в тканях тучных клеток к зиме [Hjeltnan, Wegelius, 1956]. Выявлено увеличение ядерной сегментации нейтрофилов и эозинофилов при наступлении зимнего периода, а также увеличение продолжительности жизни периферических клеток крови вследствие снижения метаболической активности и замедления гемопоэза [Nano et al., 1991].

Причиной количественного колебания состава крови может быть изменение скорости разрушения клеток в течение года. Большая часть форменных элементов крови поглощается макрофагами печени и селезёнки, которые имеют характерный пигментированный вид из-за скоплений в фаголизосомах гемосидерина и зёрен меланина. Количество пигментосодержащих клеток изменяется в течение года: в июне и количество в 11 раз превышает осенне-

зимние показатели, а функциональная активность в зависимости от сезона варьирует не так сильно [Акуленко, 1997].

Кроветворение у амфибий активизируется весной, летом его активность понижается и практически останавливается в период зимнего оцепенения. В костном мозге изменяется общее количество недифференцированных предшественников, но соотношение эритроидных и гранулоцитарных предшественников остаётся стабильным [Акуленко, 2008, 2012].

Селезёнка принимает участие в гемопоэзе, созревающие лимфоцитарные предшественники в ней располагаются как поодиночке, так и небольшими группами по 2–3. На клетки гранулоцитопоэтического ряда приходится 2,54%, агранулоцитопоэтического ряда приходится 82,21%, и всего 14,7% на клетки эритроцитопоэтического ряда. Селезёнка земноводных – универсальный орган кроветворения, но основной процент формирующихся клеток приходится в ней на клетки лимфоцитопоэтического ряда [Грушко, 2010а, 2010в].

В тимусе земноводных происходит главным образом развитие и дифференцировка лимфоцитов. В мозговом веществе тимуса доля лимфобластов составляет 5–10%, пролимфоцитов – 11–22%, доля зрелых лимфоцитов – 49–78%. Здесь же обнаружены плазматические клетки – плазмобласты, проплазмоциты, зрелые плазмоциты, которые располагаются хаотично. В корковом веществе лимфобластов и пролимфоцитов несколько больше, чем в мозговом веществе, в то время как зрелые лимфоциты на 25% меньше, чем в мозговом слое. Из плазматических клеток в корковом веществе отмечают [Грушко, 2008, 2010а, 2010в].

Пищеварительный тракт также участвует в гемопоэзе: на протяжении всего пищеварительного канала отмечаются скопления лимфоидных элементов в виде диффузной лимфоидной ткани, или одиночных лимфоидных образований. Эти образования имеют округлую форму и располагаются в слизистой оболочке кишечника. Основу лимфоидных образований составляют ретикулярные клетки, среди которых находятся созревающие лимфоциты, плазмоциты и гранулоциты [Грушко, 2010а].

В весенне-летний период около 40% ткани красного костного мозга составляют развивающиеся клетки крови эритропоэтического, грануло- и агранулоцитопоэтического, тромбоцитопоэтического рядов. Клетки разных рядов группируются, образуя гемопоэтические островки, что особенно выражено у клеток эритропоэтического ряда. Среди всех формирующихся клеток наиболее многочисленными являются клетки эритропоэтического ряда. Менее многочисленны клетки гранулоцитопоэтического ряда, причем среди них преобладают нейтрофильные гранулоциты. Ещё меньше формирующихся лимфоцитов и клеток моноцитопоэтического ряда. Меньше всего – тромбоцитопоэтического [Грушко, 2010б]. Гемопоэтическая активность печени имеет более выраженные сезонные колебания [Акуленко, 2012]. Митоз в кроветворных органах (костный мозг, печень, селезёнка) не обнаруживается [Хамидов, 1978].

Существование стволовой клетки у амфибий не доказано, однако её наличие можно предполагать, исходя из общности организации кроветворных органов и всей системы клеток крови у позвоночных [Горышкина, 1985]. Клетки, не имеющие видимых признаков дифференцировки, дающие начало зрелым элементам крови, обозначали как гемоцитобласты, среди которых могут быть как полипотентные, так и унипотентные предшественники. Их морфология характерна клеткам, активным в пролиферативном отношении. Они имеют крупное ядро с одним или несколькими ядрышками, деспирализованный хроматин и базофильную цитоплазму, чей объём невелик [Maximow, 1927]. Полустволовые клетки пролиферируют активно, хотя среди них могут быть также и те, что находятся в покое [Чертков, Фриденштейн, 1977]. Дифференцировка разных типов клеток идёт неравномерно: у эритроцитов она более выражена в летний и осенний периоды, а дифференцировка гранулоцитов – в весенний и летний [Акуленко, 2008, 2012].

При описании созревания гранулоцитов амфибий авторы чаще всего придерживаются номенклатуры, принятой для млекопитающих: миелобласт, промиелоцит, миелоцит, метамиелоцит [Charlemagne, 1972; Campbell, Ellis

2007]. В костном мозге миелопоэз идёт всегда экстравазкулярно [Jordan, 1919], без видимой закономерности в расположении клеток разных стадий.

Созревание нейтрофила морфологически выражается в постепенной сегментации ядра, потере ядрышка, конденсации хроматина и накоплении в цитоплазме гранул и скоплений гликогена. Форма клетки становится неправильной, возрастает способность к образованию псевдоподий, исчезает базофилия цитоплазмы. Образование гранул активнее всего идёт на стадии миелоцита [Campbell, Ellis, 2007]. Митоз редко проходит на стадии миелобласта, но часто на стадии промиелоцита [Charlemagne, 1972].

Морфологические ряды эозинофильного и базофильного миелопоэза подразделяются на те же стадии, что и нейтрофильный ряд. Созревание выражается в накоплении специфических гранул. У эозинофилов ядро претерпевает сегментацию и конденсацию хроматина, как у нейтрофилов, в то время как у базофилов ядро остаётся округлым. Созревание эозинофилов у бесхвостых амфибий идёт в костном мозгу [Campbell, Ellis, 2007].

1.4 Изменения качественного и количественного состава крови под влиянием иных факторов

В последние годы изучение батрахиофауны и изменений её состояния имеет экологическую направленность, рассматривается влияние загрязнений, различных биотических, абиотических и антропогенных факторов на физиологию амфибий. В связи с этим лягушки часто используются как объект биоиндикации.

В подобных работах отмечается, что в условиях возрастания средового стресса происходит изменение числа лейкоцитов в периферической крови амфибий [Чернышова, Старостин, 1994; Пескова, 2004а; Романова, 2010; Минеева, Минеев, 2011]. В одних работах указывается снижение числа лейкоцитов [Романова, 2010], в других говорится о разной степени выраженности лейкоцитоза [Пескова, 2003, 2005]. Вероятно, такое расхождение связано

с различиями в адаптивной стратегии разных видов при антропогенных трансформациях среды [Жукова, Пескова, 1999; Вершинин, 2004; Силс, 2008; Романова, Николаев, 2014a]. Так у *R. ridibunda* в ответ на действие высокотоксичных отравляющих веществ установлено развитие в периферической крови реакции нейтрофильного типа, в то время как у *Bufo viridis* реакция лимфатического типа [Конешова и др., 2001]. Также для оценки влияния среднего стресса информативными показателями являются индекс сдвига лейкоцитов [Минеев, 2007] и ядерный индекс сдвига нейтрофилов, который позволяет количественно оценить соотношение незрелых и зрелых форм нейтрофилов [Шаповалова, Марьин, 2016]. У животных из опытных групп, в сравнении с контролем, величина ИСЛ сильно завышена, достигая уровня патологии [Минеева, Минеев, 2011, 2014].

Согласно данным исследования, в котором было выполнено сравнение лейкоцитарного состава периферической крови прудовых лягушек, обитающих в озерах городской территории с популяцией, обитающей за пределами городской черты, установлено увеличение доли нейтрофильных гранулоцитов на фоне снижения числа моноцитов, выполняющих фагоцитарную функцию, при этом доля эозинофилов и базофилов не менялась [Романова, Николаев, 2014б]. В работах по изучению особенностей крови озёрных лягушек доказаны наиболее выраженные в процентном соотношении характерные сдвиги в числе эозинофилов и лимфоцитов по сравнению с условным контролем [Минеева, Минеев, 2011]. Отмечается, что сокращение доли эритроцитов может компенсироваться повышением процента молодых форм палочкоядерных нейтрофилов, которые обладают сходной активностью [Дробот и др., 2011].

Достаточно много внимания уделяется изучению изменения состава крови популяций, обитающих в загрязнённых водоёмах. Когда концентрация загрязнителя не превышает своего критического значения, лейкограмма меняется в сторону увеличения доли палочко-ядерных нейтрофилов. При повышенных дозах токсиканта возникает нейтропения в сочетании с моноцито-

зом и эозинофилией или лимфоцитозом. Нейтропения резко снижает возможности выживания амфибий, хотя появление незрелых форм свидетельствует о компенсаторной стимуляции нейтрофильного гранулоцитопоэза [Пескова, 2003; Пескова, 2005]. У *R. ridibunda*, обитающих в загрязненных городских водоемах, наблюдается сдвиг миелограммы в сторону возрастания числа клеток эритроидного ряда (эритробластов, пронормоцитов и базофильных нормоцитов) по сравнению с аналогичными показателями лягушек природоохранной зоны [Романова, Шаповалова, 2016]. Снижение числа лимфоцитов и возрастание доли эозинофилов считают типичной стрессовой реакцией земноводных в условиях действия комплекса неблагоприятных факторов, в том числе различных загрязнителей (солей тяжелых металлов, пестицидов) [Szubartowska, 1990; Moran et al., 1992; Скоркина, Липунова, 2009]. Также у лягушек загрязнённых территорий наблюдается повышенное число моноцитов на фоне резкого понижения числа базофилов [Zhelev, 2007].

Отдельно рассматривается влияние некоторых загрязняющих веществ на организм животных. Так в опытах по воздействию бензина на фоне общего лейкоцитоза в лейкограмме выявлена нейтропения (главным образом, за счет уменьшения палочко-ядерных нейтрофилов), единичны базофилы и эозинофилы. Эти изменения лейкограммы подобны изменениям белой крови лягушек в условиях интенсивного радиационного загрязнения [Пескова, Вафис, 2007]. В опытах по исследованию воздействия нефти установлено, что по мере увеличения концентрации нефти возрастает число лейкоцитов, в основном за счет нейтрофилов, при стабильном количестве лимфоцитов и очень сильной вариабельности (вплоть до полного отсутствия) числа эозинофилов и базофилов [Кармазин, Пескова, 2010].

На изменение клеточного состава крови могут повлиять и биотические факторы. Отмечается, что у естественных популяций гораздо выше процент эозинофилов по сравнению с городскими популяциями, что связывают с гельминтными инвазиями, которые более характерны для естественных популяций [Вершинин, 2004]. Также отмечается снижение доли моноцитов,

возрастание доли лимфоцитов у озерных лягушек, зараженных гельминтами. Повышение относительного содержания в периферической крови незрелых нейтрофильных клеток объясняется токсическим и аллергенным действием чужеродных белков гельминтов [Изменение лейкоцитарной формулы ..., 2013].

Меньше в таких работах уделяется внимания изменению фагоцитарной активности. Отмечено снижение фагоцитарной активности лейкоцитов у популяций озерных лягушек городских водоемов по сравнению с популяцией, находящейся за пределами городской черты [Романова, Николаев, 2014а].

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Организация эксперимента

Исследования выполнены на базе лаборатории «Физиологии адаптационных процессов» кафедры биологии НИУ БелГУ.

Объект исследования – периферическая кровь половозрелых особей лягушек вида *R. ridibunda* (рис. 1), отловленных из р. Везелка в черте г. Белгорода.

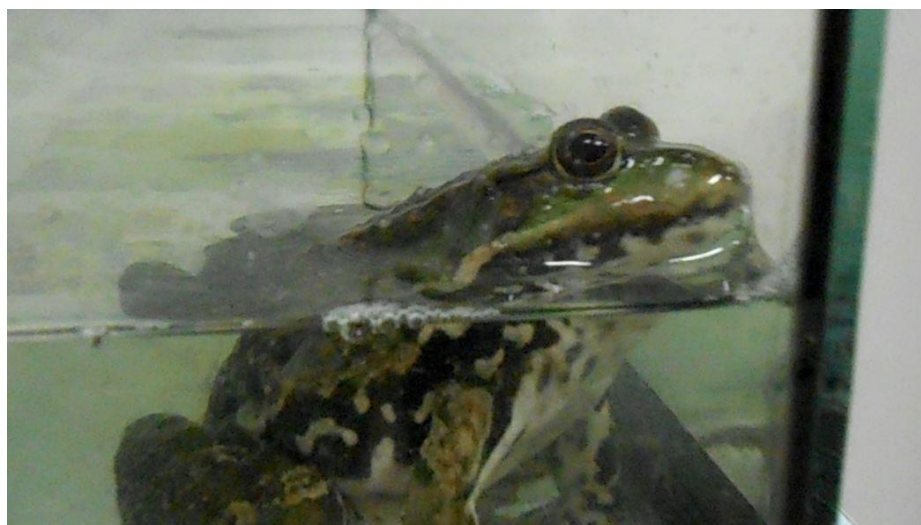


Рис. 1. Лягушка озерная (*R. ridibunda*)

План исследования предусматривал изучение лейкоцитарной системы лягушек в физиологических условиях в различные сезонные периоды. Экспериментальная часть работы выполнена в два этапа: I серия июнь–июль 2017 г. (n=22); II серия сентябрь–октябрь 2017 г. (n=40). В ходе проведения II серии эксперимента формировали две группы лягушек по 20 особей в каждой: опытную и контрольную. Одну группу содержали при комнатной температуре в аквариумах объёмом ~30–40 литров, определяя не более семи особей в один аквариум. Смену воды проводили каждые трое суток. Животных содержали под искусственным освещением, кормление производили раз в трое суток мотылём или личинками мух.

Вторую группу ввели в искусственный анабиоз, путем содержания при низких температурах, порядка +4°C. Лягушек содержали в ёмкостях объёмом

3 литра, определяя не более четырёх особей в одну ёмкость. Смену воды проводили каждые пять суток.

2.2. Манипуляции с животными

Все манипуляции и исследования с лягушками выполнены с соблюдением всех требований Хельсинкской декларации по гуманному обращению с животными (Хельсинкская декларация этических принципов, 2008) и директивами Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях.

Исследования крови в летний и осенний периоды осуществляли через 7 дней после отлова, таким образом, выдержав адаптационный период лягушек после изменения условий среды и выборки животных из естественного водоема. В зимний период забор крови у животных осуществляли после их пребывания в состоянии анабиоза, в холодильнике при температуре порядка +4°C в течение 2 месяцев.

Животных усыпляли при помощи хлороформа, применяя его ингаляционным способом. После усыпления каждую особь взвешивали и определяли её пол по внешним морфологическим признакам: у самцов на внутренней стороне большого пальца имеется шершавое на ощупь утолщение, окрашенное темнее, чем остальная кожа и дымчато-серые резонаторы в углах рта [Определитель земноводных ..., 1977]. При необходимости животное отмывали под проточной водой от излишков слизи, затем фиксировали на восковой подложке и проводили вскрытие с целью открытия доступа к сердцу. Кровь забиралась путём пункции сердца в пробирку, обработанную антикоагулянтом цитратом натрия (3,8 г на 100 мл дистиллированной воды). Иглу, которой проводилась пункция, также обрабатывали антикоагулянтом. С полученной кровью проводили ряд исследований, описанных ниже.

2.3. Основные методики

В крови проводили подсчет лейкоцитов. Лейкоцитарную массу отделяли путём двукратного центрифугирования при 1500 об/мин. Подсчёт лейкоцитарных клеток проводился в камере Горяева при разведении суспензии клеток изотоническим раствором (0,6%) в 20 раз. Число форменных элементов на 1 мм³ крови рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{a * 250 * c}{b},$$

где X – число лимфоцитов в крови;

a – число лимфоцитов в больших квадратах;

b – разведение крови (20);

c – число посчитанных квадратов (100).

Мазки для подсчёта лейкоформулы готовили на обезжиренных стёклах общепринятыми методами. Фиксацию мазков проводили на воздухе. Окраску мазков выполняли по Романовскому-Гимзе. Подсчёт лейкоформулы на окрашенных мазках осуществляли на микроскопе Микромед 2 (Россия, 2009). Оценивали соотношение различных типов лейкоцитов, просчитывая не менее 200 лейкоцитов с каждого мазка.

Миграционную активность лейкоцитов изучали в прямом капиллярном тесте [Новиков и др., 2006]. В качестве среды для миграции использовали агарозу. Сухую агарозу (0,5 г) растворяли в 5 мл дистиллированной воды. Взвесь агарозы нагревали на водяной бане и кипятили в течение 20 минут. После этого в агарозу вводили 5 мл среды RPMI 1640, которую выдерживали в термостате при 37°C в течение 20 минут. Агарозу тщательно перемешивали при помощи пипетки Пастера и разливали по 0,5 мл в лунки, из расчёта по пять лунок на одну пробу крови. После застывания агарозы взвесь лейкоцитов разводили средой RPMI 1640 в 20 раз. Суспензией клеток (0,1 мл) заполняли капилляры, которые с одного края тщательно герметизировали. Капилляры устанавливали в агарозу вертикально, а сами планшеты помещали в эк-

сикатор. Планшеты инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 часов. Собирали жидкость со дна лунок и подсчитывали число мигрировавших лейкоцитов в камере Горяева по описанной ранее методике. Процент мигрировавших клеток рассчитывали как отношение числа мигрировавших лейкоцитов к количеству лейкоцитов числу клеток до миграции, умноженное на 100.

Фагоцитарную активность лейкоцитов изучали согласно способу А. Х. Коган [1999]. В качестве объекта фагоцитоза использовали взвесь пекарских дрожжей, окрашенных 10% раствором трипанового синего. В работе не проводили опсонизацию взвеси ПД плазмой IV группы крови человека. Лейкоцитарную массу и взвесь ПД смешивали в равных пропорциях и инкубировали в термостате при 37°C в течение 1 часа. Мазки готовили на обезжиренных стёклах общепринятыми способами. Окраску мазков проводили по Романовскому-Гимзе. Подсчет числа клеток, вступивших в фагоцитоз, и общее число фагоцитов осуществляли на микроскопе Микромед 2 (Россия, 2009). Оценивали фагоцитарную активность лейкоцитов на основании фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа. Фагоцитарный индекс рассчитывали как процент клеток, вступивших в фагоцитоз, от общего числа фагоцитов (рис. 2). Фагоцитарное число рассчитывали как среднее число частиц, поглощённых фагоцитами.

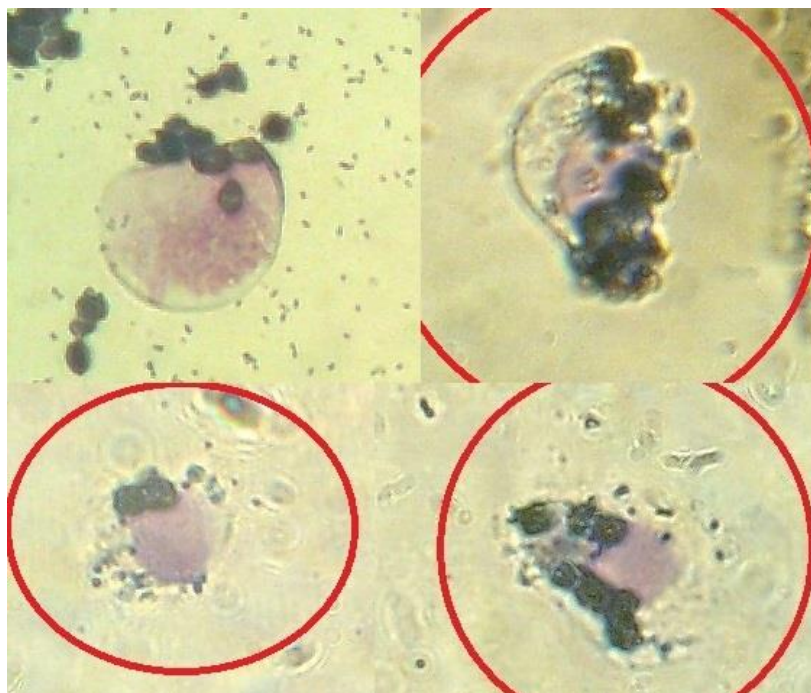


Рис. 2. Фагоциты, захватившие клетки дрожжей

Результаты экспериментальных исследований обрабатывали методами вариационной статистики. Достоверность различий между контрольными и опытными пробами определяли с использованием t критерия Стьюдента $p < 0,05$ в случае нормального распределения признака и U -критерия Манна-Уитни при $p < 0,05$ – для непараметрических данных.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Сезонная динамика числа лейкоцитов и их форм у *R. ridibunda* Pall.

В результате выполненных экспериментов установлена сезонная динамика в изменении численности лейкоцитов (табл. 1).

Таблица 1

Средние показатели числа лейкоцитов *R. ridibunda*
в различные сезоны

Сезоны	Число лейкоцитов в 1 мкл	Показатели нормы **
Лето	10909,09±1010,034	20500±2050
Осень	5862±736,315*	12500±3550
Зима	3780±967,599*	9000±3250

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с результатами измерений в пробе летнего периода по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$). ** – показатели нормы приведены по данным литературы [Романова, Романова, 2003].

В осенний период установлено снижение числа лейкоцитов на 46% ($p < 0,05$), в зимний – на 65% ($p < 0,05$) по сравнению с летним периодом. В зимний период по сравнению с осенним число лейкоцитов снижено на 35% ($p < 0,05$). В течение всего времени исследования число лейкоцитов ниже нормальных значений для данного показателя.

В выполненном исследовании проанализированы изменения лейкоформулы в различные сезонные периоды (табл. 2).

Таблица 2

Лейкоформула крови *R. ridibunda* в различные сезоны

Сезоны	Гранулоциты, %					Агранулоциты, %	
	нейтрофилы			базофилы	эозинофилы	лимфоциты	моноциты
	палочкоядерные	сегментоядерные	всего				
Норма **	0,2±0,1	17,6±0,5	18,3±1,5	2,5±0,2	7,2±0,9	70,9±1,3	1,1±0,2
Лето	0,1±0,1	11,1±0,8	11,2±0,9	0,7±0,1	7,5±0,7	74,7±0,7	5,9±0,4
Осень	0,2±0,1	21,2±1,1*	21,4±1,1*	1,4±0,2*	6,3±0,4	61,2±0,9*	9,7±0,5*
Зима	0,1±0,1	27,1±1,1*	27,2±1,0*	1,2±0,2*	4,9±0,4*	58,1±1,0*	8,6±0,4*

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с результатами измерений в пробе летнего периода по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$); ** – показатели нормы приведены по данным литературы [Романова, 2005].

В осенний период процент нейтрофилов, базофилов и моноцитов повысился соответственно на 48%, 51% и 39% ($p < 0,05$) по сравнению с летним сезоном. Процент палочко-ядерных нейтрофилов изменился незначительно, в то время как процент сегментоядерных нейтрофилов практически соответствовал общему числу нейтрофилов. Процент лимфоцитов снизился на 18% ($p < 0,05$) по сравнению с летним. Процент эозинофилов снизился незначительно.

В зимний период процент нейтрофилов повысился на 59% ($p < 0,05$) по сравнению с летним и на 21% ($p < 0,05$) по сравнению с осенним сезоном. Процент эозинофилов и лимфоцитов снизился соответственно на 34% и 22% ($p < 0,05$) по сравнению с летним сезоном, и соответственно на 22% и 5% ($p < 0,05$) по сравнению с осенним сезоном. В зимний период процент базофилов и моноцитов незначительно снизился по сравнению с осенним сезоном.

3.2. Миграционная активность лейкоцитов *R. ridibunda* в различные сезонные периоды

В результате экспериментов установлено снижение миграционной активности лейкоцитов при переходе от весенне-летнего к зимнему сезону (табл. 3).

Таблица 3

Миграционная активность лейкоцитов *R. ridibunda* в различные сезоны

Сезон	Число лейкоцитов до миграции, в 1 мкл	Число лейкоцитов после миграции, в 1 мкл	% мигрировавших клеток
Лето	10909,1±1010,03	3628,9±303,6	32,9±1,1
Осень	5862,0±736,3*	465,0±37,4*	11,1±1,8*
Зима	3780,0±967,6*	377,5±37,3*	17,7±2,9*

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с результатами измерений в пробе летнего периода по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$).

В осенний и зимний периоды наблюдали снижение числа мигрировавших клеток соответственно на 87% и 86% ($p < 0,05$) по сравнению с летним. При переходе к анабиозу, число мигрирующих клеток снижается незначительно по сравнению с осенним периодом.

В осенний период миграционная активность снижена на 66% ($p < 0,05$), а в зимний – на 46% ($p < 0,05$) по сравнению с летним периодом. Зимой наблюдали незначительное повышение миграционной активности по сравнению с осенью.

Таким образом, на основе представленных данных, можно говорить о достоверном снижении уровня миграционной активности в осенний и зимний период.

3.3. Сезонная динамика фагоцитарной активности лейкоцитов

R. ridibunda

С изменением сезонной активности интенсивности кроветворения изменилась функциональная активность лейкоцитов. В частности, установлено снижение фагоцитарной активности клеток при переходе от весны к зиме (табл. 4).

Таблица 4

Средние показатели фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа лейкоцитов *R. ridibunda* в различные сезоны

Сезон	Фагоцитарный индекс, %	Фагоцитарное число, шт
Лето	39,2±1,8	2,2±0,1
Осень	28,2±1,6*	1,7±0,1
Зима	29,4±2,6*	2,1±0,1

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с результатами измерений в пробе летнего периода по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Фагоцитарный индекс в осенний период снизился на 39% ($p < 0,05$) по сравнению с летним сезоном. Во время перехода к анабиозу ФИ снизился на 33% ($p < 0,05$) по сравнению с летними показателями, однако наблюдается незначительное повышение в сравнении с осенним.

Достоверных изменений в фагоцитарной активности лейкоцитов в сезонной динамике не установлено. Однако установлена тенденция снижения фагоцитарной активности лейкоцитов на 22% по сравнению с летним сезоном. С переходом к анабиозу ФЧ снижено на 3% по сравнению с летним сезоном, однако эти показатели выше на 19% в сравнении с осенним периодом.

Таким образом, анализируя результаты проведенных исследований, можно говорить о снижении активности иммунной системы в связи с сезонным затуханием гемопоэза и подготовкой организма к переходу в состояние анабиоза.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В выполненном исследовании изучена сезонная динамика функциональной активности лейкоцитов лягушек рода *R. ridibunda*. Установлено, что активность гемопоэза тесно связана с изменением температуры окружающей среды и ходом годового цикла. Так, в зимний период при затухании гемопоэза, наблюдали наименьшее число лейкоцитов в 1 мкл крови, в то время как в летний период – число лейкоцитов было максимальным. Такая динамика в численности белых клеток крови связана с повышенной активностью кроветворных органов в весенний период и постепенным снижением интенсивности гемопоэза при переходе к осенне-зимнему периоду [Акуленко, 2008, 2012]. Кроме того, нельзя исключать высокий уровень антропогенного воздействия среды в летний период, который неизбежно приводит к увеличению напряженности иммунитета и увеличению числа лейкоцитов [Пескова, 2003, 2005].

Параметры лейкоцитарной формулы, также изменяются при смене сезонов. Наблюдается достоверное увеличение процента нейтрофилов и моноцитов в осенний период, на фоне снижения процента лимфоцитов. Это может свидетельствовать об интенсификации в осенний период механизмов врожденного иммунитета, так как нейтрофилы и моноциты являются профессиональными фагоцитами [Coico et al., 2003; Zimmerman et al., 2010; Гомеостаз внутренней среды ..., 2013] и отвечают за неспецифическую иммунную реакцию организма.

Снижение процента эозинофилов вероятнее всего объясняется уменьшением воздействия на лягушек различных паразитических инвазий в осенний и зимний сезоны [Вершинин, 2004; Изменение лейкоцитарной формулы ..., 2013]. В пробах крови неоднократно были найдены круглые черви и различные простейшие, однако в летний сезон их встречаемость была гораздо выше, чем в осенне-зимний период. С другой стороны показатели, полученные в осенний и зимний сезоны, значительно ниже нормы. На фоне всего

вышеперечисленного отмечается достоверное повышение доли базофилов, однако данный показатель на протяжении всего времени исследования оставался ниже нормальных значений. В совокупности с понижением числа эозинофилов это может говорить как о снижении интенсивности гемопоза, так и о возрастании антропогенного воздействия на водоём в месте отлова [Пескова, Вафис, 2007]. Однако в этом отношении данные литературы неоднозначны: одни типы загрязнителей, такие как соли тяжёлых металлов и пестициды, могут вызвать повышение доли эозинофилов [Szubartowska, 1990; Moran et al., 1992; Скоркина, Липунова, 2009], а другие, такие как бензин и прочие нефтепродукты, приводят к снижению доли эозинофилов [Пескова, Вафис, 2007; Кармазин, Пескова, 2010].

Миграционная активность клеток также изменялась в зависимости от сезона. Число мигрирующих клеток с наступлением осени и зимы достоверно снизилось. Полученные данные не представляется возможным соотнести с литературными источниками, так как в существующих работах рассматривается только влияние температурного фактора на миграционную активность лейкоцитарных клеток лягушек, а не смена сезонов [Чернявских и др, 2011а; Влияние температурного фактора ..., 2012; Влияние температуры ..., 2012; Сезонные колебания ..., 2014].

Фагоцитарная активность лейкоцитов изменялась по сезонам. Фагоцитарный индекс заметно снизился с наступлением осени и незначительно повысился зимой. Не исключено, что снижение фагоцитарной активности лейкоцитов в осенне-зимний период компенсируется эритроидным звеном. Так как согласно данным ряда работ эритроциты *R. ridibunda* проявляют более высокую фагоцитарную активность а осенне-зимний период. Фагоцитарное число лейкоцитов в течение трёх сезонов изменяется незначительно, но наблюдается определённая тенденция к снижению данного показателя, что характерно также и для эритроцитов лягушки [Поглотительная способность ..., 2013].

Всё вышеперечисленное даёт основание говорить о некоторых сезонных изменениях функциональной активности лейкоцитарной системы лягушек рода *R. ridibunda*, которые выражаются в снижении числа лейкоцитов и сдвиге лейкоформулы в сторону повышения числа нейтрофилов, базофилов и моноцитов на фоне снижения числа лимфоцитов и эозинофилов. Кроме того отмечено снижение миграционной и фагоцитарной активности в осенне-зимний период по сравнению с летним сезоном.

ВЫВОДЫ

1. С наступлением периода затухания активности гемопоэтической ткани в организме лягушек число лейкоцитов снижается, лейкоформула крови сдвигается в сторону повышения процента полиморфно-ядерных форм и моноцитов на фоне снижения числа эозинофилов и лимфоцитов.
2. В осенне–зимний период миграционная активность лейкоцитов снижена по сравнению с периодом весенне–летней вспышки гемопоэза.
3. В период затухания гемопоэза установлена тенденция снижения фагоцитарной активности лейкоцитов по сравнению с летним периодом.

Список использованных источников

1. Адамова В. В., Чернявских С. Д. Морфофункциональные особенности ядерных эритроцитов и лейкоцитов *Cyprinus carpio* и *Rana ridibunda* в условиях умеренной гипотонии // Научные ведомости БелГУ. 2013. № 10 (153). Серия: Естественные науки. Вып. 23. С. 103–106.
2. Акуленко Н. М. Сезонная динамика количества и функциональной активности макрофагов и пигментных клеток в печени бесхвостых амфибий // Вестник зоологии. 1997. № 32 (4). С. 86–93.
3. Акуленко Н. М. Сезонная динамика эритропоэза и его топографическое распределение у лягушки озерной // Вестник Запорожского национального университета. 2008. № 2. С. 5–10.
4. Акуленко Н. М. Гемопоэтическая система бесхвостых амфибий: роль костного мозга и печени // Вестник зоологии. 2012. Т. 46, № 4. С. 347–354.
5. Вершинин В. Л. Гемопоз бесхвостых амфибий – специфика адаптациогенеза видов в современных экосистемах // Зоол. журн. 2004. Т. 83, № 11. С. 1367–1374.
6. Влияние температурного фактора на сезонные колебания локомоторной активности гемоцитов лягушек *Rana ridibunda* Pall. / С. Д. Чернявских, До Хыу Куэт, Во Ван Тхань, И. С. Буковцова. Научные ведомости БелГУ. 2012. №15 (134). Серия: Естественные науки. Вып. 20. С. 111–114.
7. 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 Тхуи. Научные ведомости БелГУ. 2012. №21 (140). Серия: Естественные науки. Вып. 21. С. 89–93.
8. Воронин М. Ю., Ермохин М. В. О зимней активности озёрной лягушки *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) в водоёме-охладителе Балаковской АЭС // Современная герпетология. 2016. Т. 16, вып. 1/2. С. 61–62.

9. Головки С. И., Фёдорова М. З., Чернявских С. Д. Мембранный резерв клеток крови позвоночных животных // Тез. докл. VI Сибирского Физиол. съезда. Барнаул, 2008. С. 25.
10. Гомеостаз внутренней среды гидробионтов: видовые особенности хладнокровных / А. А. Иванов, Г. И. Пронина, Н. Ю. Корягина, А. О. Ребякин. Известия ТСХА. 2013. Вып. 3. С. 75–88.
11. Горышкина Е. Н. Кинетика обновления клеток крови и ее сезонные изменения у травяной лягушки: Автореф. дисс. ... канд биол. наук. Ленинград, 1985. 27 с.
12. Гребенникова С. И. Сезонные изменения нейтрофильных гранулоцитов и их реакция на повторное кровопускание у взрослых озерных лягушек // Информ. материалы ин-та экол. раст. и жив. Отчетная сессия зоол. лаб. Свердловск, 1980. С. 5–36.
13. Грушко М. П. Структурно-функциональные особенности тимуса лягушки (*Rana ridibunda*) // Вестник АГТУ. 2008. № 6 (47). С. 224–225.
14. Грушко М. П. Клеточный состав кроветворных органов половозрелых самок представителей класса рыб, земноводных и пресмыкающихся: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Астрахань, 2010а. 44 с.
15. Грушко М. П. Особенности гемопоэза в красном костном мозге озерной лягушки (*Rana ridibunda*) // Известия вузов. Северокавказский регион. Естественные науки. 2010б. № 4. С. 87–89.
16. Грушко М. П. Особенности гистологической организации некоторых органов кроветворения озерной лягушки (*Rana ridibunda*) // Вестник АГТУ. 2010в. № 1 (49). С. 78–80.
17. Дробот Г. П., Мальцева Н. Л., Ведерников А. А. Ответная реакция некоторых тканей лягушки озерной (*Rana ridibunda* Pallas, 1771) на антропогенную нагрузку // Вестник ОГУ. 2011. № 12 (131). С. 65–67.
18. Жукова Т. И., Пескова Т. Ю. Реакция крови бесхвостых амфибий на пестицидные загрязнения // Экология. 1999. № 4. С. 288–292.

19. Зеленые лягушки Ивановской области / Н. М. Окулова, Л. Ю. Бокин, А. С. Богданов, А. Ю. Гусева. Достижения в исследованиях амфибий в бывшем Советском Союзе. 1997. Т. 2. С. 71–94.
20. Изменение лейкоцитарной формулы крови озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus* (Pallas 1771) при гельминтозах / Е. Б. Романова, Г. А. Фадеева, К. С. Вершинина, В. Ю. Николаев. Вестн. Нижегород. ун-та им. Н. И. Лобачевского. 2013. № 5. С. 141–147.
21. Кармазин А. П., Пескова Т. Ю. Использование гематологических показателей озёрной лягушки *Rana ridibunda* (Pallas, 1771) для определения зоны токсического действия нефти // Современная герпетология. 2010. Т. 10, вып 1/2. С. 3–7.
22. Конешова Е. Ю., Шляхтин Г. В., Конешов С. А. Действие сильнотоксичных веществ на форменные элементы крови амфибионтов // Фундаментальные и прикладные аспекты функционирования водных экосистем. 2001. Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, С. 90–92.
23. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Зазария, Б. В. Западнюк. Киев: Виша школа, 1983. 383 с.
24. Леонтьева О. А., Семенов Д. В. Земноводные как биоиндикаторы антропогенных изменений среды // Успехи современной биологии. 1997. Т. 117, вып. 6. С. 726–736.
25. Лобода Е. И. Морфофизиологические и цитохимические особенности клеток белой крови у представителей некоторых видов холоднокровных позвоночных // Вестник зоологии. 1997. № 32 (3). С. 54–57.
26. Львова С. П., Магомедова М.Х. Интенсивность глюкогенеза в ткани печени лягушки при искусственной гипотермии и зимней спячке // Проблемы криобиологии. Киев: Наукова думка, 1991. № 4. С. 40–43.
27. Малютина Т. А. Взаимоотношения в системе паразит – хозяин: биохимические и физиологические аспекты адаптации (ретроспективный обзор) // Рос. паразитол. журн. 2008. № 1. С. 1–17.

28. Мечников И. И. Лекции о сравнительной патологии воспаления / И.И. Мечников. СПб.: Adamant Media Corporation, 2001. 160 с.
29. Минеев А. К. Морфологический анализ и патологические изменения структуры клеток крови у рыб Саратовского водохранилища // Вопросы ихтиологии. 2007. № 1. С. 93–100.
30. Минеева О. В., Минеев А. К. Нарушения лейкоцитарной формулы крови озёрной лягушки Саратовского водохранилища // Вестн. Нижегород. ун-та им. Н. И. Лобачевского. 2011. № 2 (2). С. 94–97.
31. Минеева О. В., Минеев А. К. Особенности гематологических параметров озерной лягушки *Rana ridibunda* Pallas, 1771 Саратовского водохранилища // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. 2014. Т. 23, № 2. С. 178–184.
32. Некоторые морфофункциональные показатели зимующих травяных лягушек / В. А. Ушаков, И. А. Коваленко, С. Ю. Малова, Е. М. Тарасова, Н. М. Травина. Герпетология. 1979. С. 9–19.
33. Нишанбаева М. А. Кровь и кроветворение амфибий в различные сезоны года и под влиянием облучения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ташкент, 1971. 37 с.
34. Новиков Д. К. Иммунокоррекция, иммунопрофилактика, иммунореабилитация. Витебск: ВГМУ. 2006. 198 с.
35. Определитель земноводных и пресмыкающихся фауны СССР / А. Г. Банников, И. С. Даревский, В. Г. Ищенко, А. К. Рустамов, Н. Н. Щербак. Москва: Просвещение, 1977. 416 с.
36. Пасанен С. Эколого-физиологические адаптации травяной лягушки (*Rana temporaria* L.) к зимним условиям // Адаптация животных к зимним условиям. М.: Наука, 1980. С. 84–87.
37. Патент России № 2143693. Способ определения фагоцитарной активности лейкоцитов / А. Х. Коган, А. А. Стремоухов, И. Ю. Гадаев, О. Н. Лаптева. Патент РФ № 99107424/14, дата приоритета 06.04.1999.

38. Поглотительная способность ядерных гемоцитов *Cyprinus carpio* L. и *Rana ridibunda* Pall. в разные сезоны года / И. С. Буковцова, С. Д. Чернявских, До Хыу Кует, Во Вань Тхань. Научные ведомости. Серия: Естественные науки. 2013. № 7 (160). Вып. 24. С. 86–91.
39. Пескова Т. Ю. Действие смесей солей тяжелых металлов на головастики бесхвостых земноводных // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2003. Т. 5, № 1. С. 157–164.
40. Пескова Т. Ю. Адаптационная изменчивость земноводных в антропогенно загрязненной среде: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Тольятти, 2004а. 36 с.
41. Пескова Т. Ю. Морфологические и морфофизиологические изменения земноводных при обитании в условиях загрязнения // Известия вузов. Северо-кавказский регион. Естественные науки. 2004б. № 1. С. 60–64.
42. Пескова Т. Ю. Адаптационная изменчивость земноводных в антропогенно загрязненной среде // Известия вузов. Северокавказский регион. Естественные науки. 2005. № 3. С. 66–70.
43. Пескова Т. Ю., Вафис А. А. Влияние бензина на гематологические показатели озерной лягушки // Научный вестник Ужгородского университета. Серия Биология. 2007. № 21. С. 100–104.
44. Романова Е. Б., Романова О. Ю. Особенности лейкоцитарной формулы периферической крови зеленых лягушек в условиях антропогенной нагрузки // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2003. Т. 39, № 4. С. 384–387.
45. Романова Е. Б. Гематологические аспекты механизмов адаптации природных популяций зелёных лягушек в условиях антропогенного средового стресса // Актуальные проблемы герпетологии и токсикологии: Сб. науч. тр. Вып 8. Тольятти, 2005. С. 169–176.
46. Романова Е. Б. Мониторинг состояния иммунной системы зеленых лягушек рода *Rana* в условиях антропогенной трансформации городской

среды // Вестн. Нижегород. ун-та им. Н. И. Лобачевского. 2010. № 1. С. 131–134.

47. Романова Е. Б., Николаев В. Ю. Иммунофизиологические характеристики популяций зеленых лягушек урбанизированной территории // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2014а. Т. 16, № 5 (1). С. 616–622.

48. Романова Е. Б., Николаев В. Ю., Гелашвили Д. Б. Экологические аспекты организации иммунной системы амфибий // Современная герпетология. 2014б. Т. 14, вып. 3/4. С. 126–133.

49. Романова Е.Б., Шаповалова К.В. Миелограмма озерных лягушек (*Pelophylax ridibundus*) и травянистых лягушек (*Rana temporaria*) Нижегородской области // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 2. С. 323–330.

50. Сахарова Н. Ю., Голиченков И. А. Сезонные изменения регенераторной способности эпителия хрусталика лягушки // Цитология. 1968. Т. 10. С. 896–899.

51. Сезонные колебания миграционной активности ядерных гемоцитов позвоночных животных при разных температурах инкубации / С. Д. Чернявских, До Хыу Куэт, Во Ван Тхань, И. С. Буковцова. Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2014. Т.50, №3. С. 226–232.

52. Силс Е. А. Сравнительный анализ гематологических показателей остромордой (*Rana arvalis*, Nilsson 1842) и озёрной (*Rana ridibunda*, Pallas 1771) лягушек городских популяций // Вестн. Оренбург. гос. ун-та. 2008. № 10 (92). С. 230–235.

53. Скоркина М. Ю., Липунова Е. А. Система крови как скрининг-тест экологического состояния окружающей среды // Проблемы региональной экологии. 2009. № 1. С. 147–150.

54. Файзулин А. И. Сезонная динамика трофической ниши популяции озерной лягушки *Rana ridibunda* Pallas, 1771 (Anura, Amphibia) в среднем Поволжье // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2008. Т. 10, № 2. С. 452–455.

55. Хамидов Д. Х., Акилов А. Т., Турдыев А. А. Кровь и кроветворение у позвоночных животных. Ташкент: Фан. 1978. 166 с.
56. Чернышова Э. В., Старостин В. И. Периферическая кровь лягушек рода *Rana* – тест-система для оценки окружающей среды // Изв. РАН. Сер. биол. 1994. № 4. С. 656–660.
57. Чернявских С. Д., Федорова М.З., Кует Д. Х., Тхань В. В., Забияков Н. А. Миграционная активность гемоцитов позвоночных животных при различной температуре // Научные ведомости БелГУ. 2011а. № 3 (98). Серия: Естественные науки. Вып. 14. С. 150–154.
58. Чернявских С. Д., Федорова М. З., Масленникова Е. В. Сезонные колебания показателей фагоцитоза эритроцитов и полиморфно-ядерных лейкоцитов позвоночных животных // Научные ведомости БелГУ. 2011б. № 5 (110). Серия: Естественные науки. Вып. 16. С. 68–73.
59. Чертков И.Л., Фриденштейн А.Я. Клеточные основы кроветворения. М: Медицина, 1977. 274 с.
60. Шаповалова К. В., Марьин И. А. Изменения лейкоцитарного состава крови озерных лягушек условно-фоновых и антропогенно трансформированных территорий Нижегородской области // Шаг в будущее: теоретические и прикладные исследования современной науки: Материалы XII молодежной международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных. 2016. С. 41–46.
61. Шевкопляс В. Н., Лопатин В. Г. Влияние гельминтозов на течение иммунологических процессов у животных // Рос. паразитол. журн. 2008. № 4. С. 94–101.
62. Bleicher P. A., Cohen N. Monoclonal anti-IgM can separate T-cell from B-cell proliferative responses in the frog *Xenopus laevis* // Immunol. 1981. № 127. P. 1549–1555.
63. Campbell T. W., Ellis, C. K. Hematology of amphibians. Avian and exotic animal hematology and cytology. Blackwell Publishing, Ames (IA), 2007. Pp. 83–91.

64. Charlemagne J. Aspects morphologiques de la differenciation des elements sanguins chez l'Axolotl, *Ambystoma mexicanum* // *Zellforsch.* 1972. Vol. 123, № 2. Pp. 224–239.
65. Cline M.J., Walcmann T.A. Effect of temperature on erythropoiesis and red cell survival in the frog. *Amer.J. Physiol.* 1962. Vol. 203. Pp. 401–403.
66. Coico R., Sunshine G., Benjamini E. *Immunology. A Short Course.* Hoboken: Wiley-Liss Publications, 2003. P. 237.
67. Fey F. Vergleichende Hamozytologie niederer Vertebraten. Thrombocyten // *Haematol.* 1966. Bd. 85. Pp. 205–217.
68. Freidsohn E. Zur Morphologie des Amphibienbluteis // *Archi. f. mikr. Anat.* 1910. Bd. 75, № 3. Pp. 445–472.
69. Hjelmman G., Wegelius O. Uber die Einwirkung niedriger Temperatur auf die Mastzeelen der Herzmuskulatur und dear Leber, bei der Krote und dem Frosche // *Comment. Biol. Soc. Sci. Fenn.* 1956. Vol. 15, № 9. Pp. 21–26.
70. Hutchison V. H., Szarski H. Number of erythrocytes in some amphibians: and reptiles // *Copeia.* 1965. Vol. 3. Pp. 373–375.
71. Johnson P. T., La Fonte B. E. Experimental infection dynamics: using immunosuppression and in vivo parasite tracking to understand host resistance in an amphibian-trematode system // *J. Experimental Biology.* 2013. Vol. 216. Pp. 3700–3708.
72. Kapa E., Csaba G. A hizosejtfeilodes szabalyozsanak osszehasonlito vizsgalata halakban (Cyprinidae) es kateltuekben (*Rana* sp.) // *Biologia.* 1975. Vol. 23, № 1. Pp.77–82.
73. Katsura Y. Redefinition of lymphoid progenitors // *Nature Reviews Immunology.* 2002. Vol. 2. Pp. 1–6.
74. Kelenyi G. Phylogenesis of the azurophil leucocyte granules in vertebrates // *Experientia.* 1972. Vol. 28. Pp. 1094–1096.
75. Li J., Barreda D. R., Zhang Y., Boshra H., Gelman A. E., LaPatra S., Tort L., Sunyer J. O. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic

and microbicidal abilities // Nature Immunology. 2006. Vol. 7, № 10. Pp. 1116–1124.

76. Maximow A.A. Bindegewebe und blutbildende Gewebe // Handbuch der mikr. Anatomie des Menschen. 1927. Bd. 2, T. 1. Pp. 232–583.

77. Moran J.L., Bennett M.F., Rigm F. The effects of a low frequency electro-magnetic force on the distribution of leukocytes in red spotted newts, *Notoptthalmus viridescence* // Amer. zool. 1992. Vol. 31, № 5. P. 59.

78. Nano R., Griffini P., Barni S. Morphohistochemical changes of the blood cells in the Hibernating frog (*Rana esculenta* L.) // Comparative Haematology International. 1991. №1. Pp. 220–223.

79. Rothstein H., Van Buskirk R.G., Gordon S.R., Worgul B.V. Seasonal variations in mitosis in the frog: a field study // Experientia. 1975. Vol. 31, № 8. P. 939.

80. Szubartowska E. Changes in the blood of the frog (*Rana temporaria*) after different doses of ekatin // Ann. UMCS. 1990. Vol. 45. Pp. 67–78.

81. Zhelev Z. M. Investigation on the blood differential formula in *Rana ridibunda* (Anura Amphibia) from the area of the Maritza-Iztok 1 steam power plan // Actazoologia bulgarica. 2007. № 59 (2). Pp. 181–190.

82. Zimmerman L. M., Vogel L. A., Bowden R. M. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective // J. of Experimental Biology. 2010. Vol. 213. Pp. 661–671.