

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
**БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**
(НИУ «БелГУ»)

ФАКУЛЬТЕТ МАТЕМАТИКИ И ЕСТЕСТВЕННОНАУЧНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
КАФЕДРА ИНФОРМАТИКИ, ЕСТЕСТВЕННОНАУЧНЫХ ДИСЦИПЛИН И МЕТОДИК
ПРЕПОДАВАНИЯ

**ДЕЙСТВИЕ ТЕМПЕРАТУРНОГО ФАКТОРА НА
МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ И ФИЗИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
ГЕМОЦИТОВ РЕПТИЛИЙ**

Выпускная квалификационная работа
обучающегося по направлению подготовки 44.03.05 Педагогическое
образование профили Биология и химия
очной формы обучения, группы 02041307
Мининник Анастасии Анатольевны

Научный руководитель
к.б.н., доцент
Чернявских С.Д.

БЕЛГОРОД 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1 Структурно-функциональные характеристики клеток крови Рептилий.....	5
1.1.1 Эритроциты Пресмыкающихся	5
1.1.2 Лейкоциты Пресмыкающихся	9
1.2 Морфофункциональные особенности плазматической мембраны гемоцитов	13
1.3 Действие температурного фактора на плазматическую мембрану клеток крови	18
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	22
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	28
ВЫВОДЫ	35
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	36

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Система крови, как одна из соединительных тканей внутренней среды организма является совокупностью специализированных клеток, которые активно участвуют в физиологических функциях организма. Она защищает организм от воздействия негативных факторов окружающей среды, поэтому кровь быстро реагирует на внешние раздражители [30]. Изучение реакций, происходящих в организме в ответ на внешние раздражители, таких как изменение длины светового дня, содержания кислорода, температуры окружающей среды и т.д., позволяет оценить как физиологическое состояние организма в конкретный период развития, так и его адаптивный потенциал.

В интеграции регуляторных процессов и реакций клетки принимают участие биологические мембраны, поэтому в работах, посвященных их изучению, наибольшее внимание уделяется структурной организации и функционированию биомембран [23, 37]. Одной из актуальных проблем клеточной физиологии является изучение процессов адаптации организма к действию именно температурного фактора [1, 39, 52, 53, 59].

В современной литературе представлено достаточно работ, в которых описаны результаты исследования морфофункциональных особенностей биологических мембран клеток крови млекопитающих животных и человека [2, 12, 14, 21, 25, 34, 35]. Структурно-функциональное состояние цитоплазматической мембраны гемоцитов других позвоночных животных менее изучено. Физиологические свойства плазматической мембраны, тесно связанные с морфометрическими параметрами красных и белых клеток крови рептилий, в ответ на колебания температурного фактора также требуют исследования.

С учетом всего вышесказанного были определены объект и предмет исследования, сформулирована цель и поставлены основные задачи.

Объект исследования: красные и белые клетки крови ящерицы обыкновенной *Lacerta agilis*.

Предмет исследования: влияние температурного фактора на клетки крови ящерицы обыкновенной *Lacerta agilis*.

Цель исследования: изучить действие температурного фактора на морфометрические и физические показатели гемоцитов рептилий.

Для достижения цели решали следующие **задачи:**

1. Оценить влияние температурного фактора на морфометрические параметры красных клеток крови ящерицы обыкновенной.

2. Изучить изменения морфометрических показателей белых клеток крови *Lacerta agilis* под действием температурного фактора.

3. Определить адгезионные и упруго-эластические свойства плазмалеммы эритроцитов и лейкоцитов ящерицы обыкновенной при снижении и повышении температуры инкубации клеток.

4. Изучить действие температурного фактора на морфологические показатели гемоцитов *Lacerta agilis*.

Структура и объем работы. Выпускная квалификационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 42 страницах печатного текста, включает 6 таблиц и 11 рисунков. Список использованных источников состоит из 61 наименования: 47 отечественных и 14 иностранных источников.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Структурно-функциональные характеристики клеток крови Рептилий

1.1.1 Эритроциты Пресмыкающихся

Как и у высших хордовых состав клеток крови пресмыкающихся представлен тремя типами клеток: эритроцитарным, тромбоцитарным, лейкоцитарным. По мере их дифференцировки становится все более заметна существенная разница в их морфофункциональных различиях по сравнению с другими классами позвоночных животных. На сегодняшний день такие авторы как Д.Б. Васильев и А. Johnson пришли к единому выводу, что клеточный состав периферической крови рептилий представлен разновидностями клеток эритроцитарного, лейкоцитарного и тромбоцитарного рядов [5, 24, 54].

Эритроцитарный ряд пресмыкающихся состоит из зрелых эритроцитов, нормобластов в процессе пролиферации или митоза, и випроцитов (специфические клетки данного ряда, присущие не всем представителям класса). Эритроциты рептилий имеют тупоконечный эллипсоидный вид, слегка сплющены, в области ядра их форма слегка выпуклая, в цитоплазме центрально располагается одно ядро. В клетках крови рептилий содержится большое количество гемоглобина. По количественным показателям крови и гемоглобина представители класса Рептилии сходны с представителями класса Амфибии. Например, гемоглобин черепахи составляет 4,4 г %, а ужа – до 10,5 г % (у земноводных значение данного показателя в среднем составляет 5,6 г %). При окраске красителями у различных представителей класса Рептилии цитоплазма окрашивается по-разному. У змей и ящериц она принимает различные оттенки желтого или кирпичного цвета, а у черепах и крокодилов при окрашивании она становится зеленой или голубой [17].

Размеры красных кровяных клеток могут изменяться у разных видов рептилий. По данным некоторых исследователей, у ящериц наиболее мелкие эритроциты среди всего класса Рептилий. У различных видов ящериц могут наблюдаться отличия в мазках крови. Средние показатели размеров эритроцитов черепаха, ящериц и змей представлены в таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Размеры эритроцитов некоторых видов рептилий

Рептилии		Лс, мкм	Wс, мкм	Sc, мкм
Ряд черепахи	вид Testudo graeca	18,2 – 19,8	9,1 – 10,3	130,6 – 163,0
Подряд ящерицы	вид Anatolacerta sappadocica	12,0 – 15,8	6,5 – 8,8	70,2 – 102,0
Подряд змеи	вид Natrix natrix	14,5 – 19,0	9,3 – 12,0	111,9 – 154,0

Примечание: Лс – длина клетки; Wс – ширина клетки, Sc – площадь клетки.

Наиболее мелкие эритроциты ящерицы способствуют большему насыщению крови кислородом, т.к. имеют большую площадь поверхности по отношению к объему клетки по сравнению с эритроцитами черепахи или змеи. Это оказывается важным при связывании кислорода воздуха и выделении углекислого газа. У прыткой ящерицы эритроциты самцов крупнее эритроцитов самок. Многие авторы отмечают наличие характерной зависимости между объемом и количеством клеток: чем больше эритроцитов в крови, тем меньше их объем. Среднее количество красных клеток крови у пресмыкающихся составляет $1 \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$, а средний объем эритроцита – 355 мкм^3 . По сравнению с амфибиями среднее количество крови у рептилий менее вариативно и составляет от 4,5 до 8,3 в процентах к массе тела (у земноводных – от 3,0 до 9,1%) [16, 33].

Также для подотряда ящериц типично наибольшее количество эритроцитов среди представителей класса – у большинства видов до 1 млн/мкл, иногда цифра доходит до 2 млн.

У рептилий в отличие от птиц ядра находятся в функционирующем состоянии. Своеобразной чертой большой доли эритроцитов пресмыкающихся является наличие множества инвагинаций и выростов ядра, которые порой распадаются на сегменты. При окрасе по Романовскому-Гимзе хроматин в ядре расположен в виде лежащих близко друг к другу мелких пятен на сине-голубом фоне. Иногда в цитоплазме эритроцитов обнаруживаются различного рода включения в виде гранул, о происхождении которых спорят различные исследователи [4].

Что касается випроцитов, то в основном их морфологические особенности описывают российские ученые. Первое упоминание о данных клетках встречается у А.А. Перевалова в описании крови ядовитых и неядовитых змей. Некоторые ученые проводили исследования на наличие випроцитов в крови у других представителей класса. Клетки данного рода были обнаружены также и у других рептилий: у разноцветной ящурки, прыткой ящерицы и у болотной черепахи. Существует теория, связывающая наличие данных форменных элементов крови с токсичностью слюны некоторых представителей данного класса [41, 42].

Сходной чертой с земноводными является наличие у пресмыкающихся безъядерных эритроцитов или эритропластид. Также у рептилий часто можно встретить свободные ядра эритроцитов, им дали название – гематогоны. Функциональное значение данных форменных элементов не было установлено. Для большинства видов пресмыкающихся характерной нормой являются умеренные анизоцитоз и пойкилоцитоз. Эти физиологические изменения в большей мере проявляют себя при регенеративных анемиях. Однако некоторые авторы считают, что появление на мазках крови эритроцитов неправильной формы (веретеновидной, грушевидной, округлой и др.) обычно является артефактом, т.к. аномальные формы эритроцитов наиболее выражены по краям препарата. Наличие истинного микросфероцитоза или сфероцитоза – важный клинический симптом,

сопровождаящий некоторые аутоиммунные заболевания высших позвоночных [18, 31].

При частой кровопотере или при недостаточном содержании железа в организме в стадии ремиссии в крови рептилий появляются гипохромные эритроциты. Для молодых особей характерно наличие незрелых эритроцитов. Также число юных форм красных клеток крови возрастает у рептилий в период линьки, при кровопотере и различного рода анемиях. Иногда красные клетки крови могут становиться сегментоядерными, двухядерными или митотически активными. Это может являться следствием как регенеративных процессов, происходящих в организме особи, так и наблюдаться в начале весеннего периода. Изменение формы ядер эритроцитов также может быть связано с истощением, воспалением или алиментарной дистрофией [60].

Исследователями определен только единственный фактор, который стимулирует эритропоэз пресмыкающихся – это различного рода анемия. Зарубежные исследователи отмечают, что недостаток кислорода и высокогорные условия не вызывают изменения величины гемоглобина или гематокрита у черепах и ящериц [48, 51]. Однако у игуан в крови появляется четко выраженная регенеративная реакция эритроцитов в случае метастатической минерализации легких, или в меньшей степени почек. Данный факт связывают с гиперпродукцией эритропоэтина или гипоксией [57].

Для красных клеток крови рептилий характерна самая большая продолжительность жизни среди высших хордовых. У черепах данный промежуток достигает 11 месяцев. В тоже время, исследователи говорят о том, что митозы в эритроцитах рептилий – обычное явление, которое практически не связано с онкологическими образованиями [4, 8].

1.1.2 Лейкоциты Пресмыкающихся

Лейкоцитарный ряд Рептилий представлен гранулоцитами (гетерофилы, базофилы, эозинофилы) и мононуклеарными лейкоцитами (лимфоциты, моноциты, азурофилы). Гетерофилы или псевдоэозинофилы рептилий сходны с нейтрофилами млекопитающих, но имеют некоторые морфологические отличия [24].

Классификация белых клеток крови Рептилий затруднительна, так как в литературе отсутствует единая номенклатура, а исследования клеточного состава проводятся по различным, несогласованным методикам. На рисунке 1.1 представлена наиболее часто встречающаяся в литературе классификация лейкоцитов Пресмыкающихся.



Рисунок 1.1 – Классификация клеток лейкоцитарного ряда крови рептилий.

Лимфоциты рептилий схожи с таковыми у птиц и млекопитающих. Это округлые клетки различного размера от маленьких (5-10 мкм) до крупных (более 15 мкм), могут иметь неровные края, если обтекают прилегающие клетки. Ядро округлое или неправильной формы, расположено по центру или слегка смещено. У зрелых лимфоцитов хроматин ядра собран в глыбки. Цитоплазма у нормальных лимфоцитов однородная, не содержит гранул и

вакуолей, окрашивается слегка базофильно (в светло-голубой цвет). В цитоплазме некоторых клеток обнаруживаются небольшие азурофильные гранулы. У крупных лимфоцитов объем цитоплазмы больше, чем у мелких, и ядро окрашивается бледнее. В целом для лимфоцитов характерно большое значение отношения объема ядра к цитоплазме [24].

Моноциты пресмыкающихся напоминают клетки птиц и млекопитающих и являются самыми крупными лейкоцитами в периферической крови (часто превышают размер эритроцитов в 1,5-2 раза). Форма может различаться от округлой до амебообразной. Ядро также не имеет характерной формы, бывает округлое, овальное или дольчатое (бобовидное). Ядерный хроматин менее концентрирован и окрашивается бледнее, чем в лимфоцитах. Цитоплазма обильная, окрашивается в бледный серо-голубой цвет, может иметь вспененный вид и содержать мелкие эозинофильные или азурофильные гранулы, фагоцитированные частицы и вакуоли.

У чешуйчатых имеется также уникальный тип лейкоцитов – азурофилы. Азурофилы описаны как клетки нерегулярной формы, несколько меньшего размера, чем моноциты. Они несут в себе морфологические черты моноцита и гранулоцита. Ядро несегментированное, имеет неправильную округлую, овальную или двудольчатую форму. Хроматин ядра имеет зернистый вид. Цитоплазма выраженно базофильная, темнее, чем у моноцитов, окрашивается в ярко-синий цвет, в ней присутствует небольшое количество матовых азурофильных гранул. Вакуоли и фагоцитированный материал может присутствовать в цитоплазме, край клетки иногда формирует псевдоподии [41].

Некоторые авторы считают азурофилы уникальными для пресмыкающихся, поскольку они часто обнаруживаются в небольшом количестве в крови черепах, ящериц и крокодилов, и в большом количестве – в крови змей [41].

Гетерофилы рептилий – это крупные (10-23 мкм) округлые клетки с бесцветной цитоплазмой, содержащей эозинофильные (оранжевые) преломляющие свет палочко- или веретенообразные гранулы. Края клеток могут быть неровными, иногда можно даже наблюдать псевдоподии (ложноножки). Ядро зрелого гетерофила располагается эксцентрично, имеет овальную или округлую форму с глыбками концентрированного хроматина. Помимо тинкториальных особенностей, отличительной особенностью гетерофилов от эозинофилов может служить различие в форме гранул: гетерофилы имеют более продолговатые (эллипсоидные) гранулы. Для некоторых видов ящериц (например, зеленых игуан) характерны гетерофилы с дольчатым ядром. Токсические изменения характеризуются окрашиванием цитоплазмы в синий цвет и наличием в ней фиолетовых гранул и вакуолей. Гетерофилы рептилий функционально аналогичны нейтрофилам млекопитающих, но действуют подобно гетерофилам птиц, уничтожая фагоцитированные микроорганизмы с использованием механизмов, не требующих участия кислорода [24].

Эозинофилы рептилий – это крупные (11-17 мкм) округлые клетки со светло-синей цитоплазмой, округлым или овальным ядром (у некоторых видов ящериц оно может быть дольчатым), расположенным эксцентрично, и большим количеством округлых эозинофильных цитоплазматических гранул [24]. Эти гранулы у некоторых видов рептилий (например, у зеленых игуан) окрашиваются в синий цвет по Романовскому-Гимзе и имеют положительную пероксидазную реакцию, что позволяет отличить их от гетерофилов. Размер эозинофилов может варьировать: у змей эти клетки самые крупные, а у ящериц – самые мелкие среди рептилий.

Базофилы рептилий – это маленькие (8-15 мкм) округлые клетки (обычно меньше гетерофилов и эозинофилов), которые содержат большое количество базофильных (темно-синих или фиолетовых) цитоплазматических гранул. Ядро часто заслоняется гранулами, недольчатое, расположено эксцентрично. Лучшим способом окрашивания базофилов у

рептилий является окраска по Романовскому с фиксацией этанолом, так как красители на водной основе разрушают эти клетки. Размер базофилов отличается у разных видов рептилий, у ящериц он меньше, чем у крокодилов и черепах [24].

Размеры клеток лейкоцитарного ряда крови некоторых видов рептилий представлены в таблице 1.2.

Отметим количественное содержание лейкоцитов в 1 мкл крови, у черепах он составляет $4,7-9,3 \times 10^3/\text{мкл}$, у ящериц – $7,7 \times 10^3/\text{мкл}$, у змей – $3,8 \times 10^3/\text{мкл}$.

Таблица 1.2 – Размеры лейкоцитов некоторых видов рептилий

Рептилии		Параметры	Лейкоциты					
			Л	М	Г	Э	Б	
Ряд черепахи	вид Testudo graeca	Лс, мкм	8,35-11,01		13,72-16,05	14,51-16,55	13,52-15,06	11,81-12,99
		Wс, мкм	7,04-9,52		9,51-11,64	11,93-14,47	8,21-17,96	11,55-12,71
		Sc, мкм	47,99-85,31		99,90-148,1	138,67-194,6	107,61-132,6	107,91-30,2
Подряд ящерицы	вид Anatalacerta sarradicica	d, мкм	б 14,36	м 7,88	12,7	–	11,9	10,3
Подряд змеи	вид Natrix natrix	d, мкм	б 10,68	м 7,73	11,3	10,4	10,1	9,70

Примечание: Лс – длина клетки; Wс – ширина клетки; Sc – площадь клетки; d – диаметр клетки; б – большой диаметр; м – малый диаметр; Л – лимфоциты; М – моноциты (в том числе азурофилы); Г – гетерофиллы; Э – эозинофилы; Б – базофилы.

Что касается тромбоцитарного ряда, то в крови рептилий обнаружены овальные или веретенообразные тромбоциты, содержащие центрально расположенные ядра. Ядра кровяных пластинок вытянуты, цитоплазма повторяет форму ядра и большая ее часть концентрируется на полюсах клетки [16].

Главной функцией тромбоцитов, безусловно, является защитная (остановка кровотечений). Однако установлено, что тромбоциты, также как и лимфоциты, при функциональном контакте с красными клетками крови, способствуют уничтожению неполноценных эритроцитов (незрелых, старых, неправильной формы, с недостаточным содержанием дыхательных пигментов крови и т. д.). Выделяют причастность овальных тромбоцитов к процессу дыхания. Также отмечено, что тромбоциты принимают участие в обеспечении иммунной реактивности организма [29].

1.2 Морфофункциональные особенности плазматической мембраны гемоцитов

Биологические мембраны – это функциональные структуры клеток толщиной в несколько молекулярных слоев, ограничивающие цитоплазму от клеточной оболочки и вакуоли, структурирующие положение в пространстве всех органелл, а также образующие единую внутриклеточную систему канальцев, складок и замкнутых полостей. Плазматическая мембрана окружает каждую клетку, определяя ее величину и обеспечивая сохранение существенных различий между клеточным содержимым и окружающей средой [3].

Биологические мембраны в основном состоят из молекул белков и липидов, связанных друг с другом нековалентными силами. В состав мембран также входят углеводы, которые находятся в связанном состоянии или с белками, или с липидами, однако доля таких соединений невелика (10 – 15%). Мембранные липиды имеют две составляющие: полярную гидрофильную «головку» и неполярные гидрофобные «хвосты», состоящие из цепей жирных кислот. Гидрофобные хвосты молекул обращены друг к другу, а гидрофильные головки располагаются снаружи, образуя билипидный слой. Мембрана – динамическое образование, благодаря

жидкокристаллической структуре она является двухслойным раствором, в котором липиды способны диффундировать как параллельно поверхности мембраны, так и из одного монослоя в другой. Билипидный слой является основной структурой мембраны, создающей относительно непроницаемый барьер для большинства водорастворимых молекул [9].

В зависимости от прочности связи с липидным бислоем различают периферические и интегральные белки. Благодаря наличию электростатического взаимодействия, с головками липидов соединяются периферические мембранные белки. Интегральные белки или погружены в слой липидов за счет взаимодействия с их неполярными хвостами, или пронизывают липидный бислой насквозь [22].

Эритроцит представляет собой пластичную структуру, которая способна изменять форму при прохождении по капиллярам организма. Плазматическая мембрана эритроцита – важный органоид клетки. Она играет роль механической оболочки, которая избирательно регулирует проницаемость для различных веществ. Также плазмалемма способствует генерации и проведению биопотенциалов. Благодаря строго определенному расположению белков и ориентации их относительно друг друга, мембрана выполняет матричную функцию. Мембранные белки осуществляют молекулярный транспорт внутрь клетки или из нее. Часть белков выполняют ферментативную и каталитическую функцию. Они катализируют реакции, которые связаны с мембраной клетки. Благодаря белкам осуществляется структурная связь цитоскелета с внеклеточным содержимым, а также осуществляется рецепция получения и преобразования химических сигналов из окружающей среды. Мембрана эритроцита координирует работу клетки в соответствии с поступающими к ней физическими и химическими сигналами [23].

Плазматические мембраны служат высокоизбирательным фильтром, поддерживающим разницу концентраций ионов по обе стороны, что

позволяет питательным веществам проникать внутрь клетки, а продуктам выделения выходить наружу [7].

Исследователями была установлена зависимость уровня физиологической активности и биоэнергетики от различных физико-химических свойств мембран [6]. Физико-химическое состояние мембраны эритроцита обуславливает процесс активного транспорта ионов, характер взаимодействия клетки со средой, функционирование мембран ассоциированных ферментов, поддержание оптимальной газообменной функции, формы двояковогнутого диска, сохранение ионного гомеостаза [45].

Мембранные липиды эритроцитов представлены тремя классами: нейтральные липиды, гликолипиды и фосфолипиды в соотношении 3:1:6. В химическом составе мембран преобладают фосфолипиды и холестерол [22]. Между молекулами фосфолипидов расположены молекулы холестерола. Основными компонентами внешней поверхности мембраны являются фосфотидилхолин и сфингомиелин, внутренней – фосфотидилэтаноламин и фосфотидилсерин. Важную роль в процессах разрушения эритроцитов и образования везикул играет миграция в мембрану молекул фосфолипидов, их избирательный гидролиз, а также фосфорилирование небислойных липидных фаз в определенных участках мембраны. На цитоплазматической поверхности липидного бислоя сосредоточено большинство молекул белка [22].

Белки мембраны эритроцита по расположению в мембранных липидах подразделяются на периферические, интегральные и полуинтегральные. По выполняемым функциям мембранные полипептиды красных клеток крови делятся на две группы: белки, участвующие в формировании скелета мембраны (спектрин, анкирин, белки полосы 4.1, 4.2, 4.9 и актин) и полипептиды, обеспечивающие метаболизм и ионный гомеостаз (белок полосы 3, гликофорин, аддуцин, Na^+ -, K^+ -, Ca^{2+} -АТФаза, белки полосы 4.5, белок фракции 6 и др.) [30, 36].

При нарушении определенной организации липидов эритроцитарной мембраны клетка теряет способность регулировать ионный и антиоксидантный гомеостаз, что ведет к нарушению активности мембранных ферментов и метаболизма, происходят необратимые изменения структуры и физиологических функций эритроцита [22]. При этом нарушаются относительная микровязкость мембраны, подвижность углеродных атомов в углеродной цепи, степень насыщенности жирных кислот и т.д. [3].

Все физиологические и особенно патологические изменения в организме полностью отражаются на красных клетках крови [30].

Доказано, что выраженная гипоксия, асфиксия, кровопотеря при травмах и операционных вмешательствах нарушают структуру мембраны эритроцитов. В этих случаях на поверхности мембраны возникают дефекты в виде несквозных пор, которые приводят к нарушению функционального состояния клетки, путем изменения транспорта электролитов [19].

Учеными была обнаружена различная устойчивость белков и липидов эритроцитарных мембран к атакам свободными радикалами при хроническом пиелонефрите и хроническом гломерулонефрите, а также различная степень реальной и потенциальной пластичности эритроцитов в зависимости от характера почечной патологии [35].

При наличии онкологического процесса в организме происходят изменения морфофункционального состояния плазмалеммы, в том числе эритроцитарных мембран, обуславливающих различные патофизиологические и клинические проявления онкологии. При длительном воздействии продуктов аномального обмена, происходит изменение белково-фосфолипидного бислоя плазматической мембраны, ее уплотнение на фоне резкого снижения межмембранной транспортной функции, происходит формирование так называемой «жесткой мембраны». При воздействии мембраноповреждающих агентов (например, токсических метаболитов) также отмечается появление дополнительных транспортных каналов, которые увеличивают трансмембранный перенос субстратов и электролитов

в клетку и из нее. При развитии злокачественной опухоли происходит активация перекисного окисления липидов с уплотнением гликокаликса и нарушением функционального состояния мембраны эритроцита. При этом изменяется проницаемость мембраны эритроцита и его объем, значительно повышается степень аномальных эритроцитов, что сопровождается уменьшением количества гемоглобина в красных клетках крови и развитием анемии [11].

В следствие уменьшения степени плотности упаковки липидного бислоя происходит изменение в текучести эритроцитарных мембран. Одним из факторов, активизирующих данное явление, является запуск перекисного окисления липидов в эритроцитарных мембранах [35].

Также при активации процессов перекисного окисления липидов и белков наблюдается накопление высокотоксичных первичных и вторичных метаболитов, что приводит к повышению вязкости цитозоля, особенно в примембранных слоях – гликокаликсе. Это способствует увеличению степени деформируемости эритроцитов и приводит к уменьшению скорости транспорта кислорода к клеткам и тканям. Снижение уровня гемоглобина в красных клетках крови является еще одним фактором изменения насыщенности тканей кислородом, что негативно сказывается на результатах лечения [11].

Анализируя сорбционную емкость эритроцитов, возможно получить информацию о состоянии восстановительной способности эритроцитов, изменение которой происходит в результате смены барьерных свойств плазмалеммы. При уменьшении сорбционной емкости наблюдается дефицит энергии в красных клетках крови. Повышение сорбционной емкости эритроцитов свидетельствует о повреждениях плазмалеммы и структурно-функционального нарушения клетки в целом [40].

1.3 Действие температурного фактора на плазматическую мембрану клеток крови

Температура является физическим параметром, влияющим на все биологические функции, поэтому реакции на ее изменения и приспособления к этим изменениям носят многосторонний характер. Температура тела животных зависит от соотношения ряда факторов, влияющих на тепловой баланс организма противоположным образом.

Также температурный фактор является ведущим в процессах адаптации и формировании сезонных биоритмов живых. Животные вынуждены сохранять постоянство температуры тела, а это достигается балансированием теплоотдачи и теплообразования [44].

В процессе прохождения сезонных циклов рептилии периодически обитают в разных температурных диапазонах. В связи с этим они сталкиваются с температурами, неодинаково влияющими на процессы их жизнедеятельности.

При приспособлении организмов к условиям высоких температур происходят изменения химической терморегуляции, которая находится под влиянием нейроэндокринной системы: при адаптации к холоду меняется субстратное обеспечение энергетического метаболизма [44] и водный баланс организма [38].

Показано, что при низкотемпературном воздействии активность отдельных ферментативных систем изменяется по-разному, так как каждая система тормозится при достижении своего температурного порога активности. При этом происходит нарушение регуляции обменных процессов и накопление продуктов обмена [28].

Криповреждения мембран возможны под действием различных физико-химических факторов, формирующихся в зоне действия низких температур. Основной мишенью воздействия низких температур является липидный компонент. При этом изменяется нормальное

жидкокристаллическое состояние липидов, которое оказывает существенное влияние на структуру и функцию белков. Проведенные исследования, позволяют предположить, что следствием воздействия низких температур на мембрану является фазовый переход липидов из жидкокристаллического состояния в гелеобразное. Так как липиды, а именно фосфолипиды, участвуют в осуществлении транспортных, энергетических, защитных функций мембраны, то действие низких температур в условиях *in vitro*, может рассматриваться как причинный фактор повреждения плазматических мембран, приводящий к гибели клеток [28].

Проведенные на рыбах исследования доказали, что при снижении температуры инкубации крови по сравнению с комнатной температурой у сазана регистрируется уменьшение микровязкости мембраны красных клеток крови, а у толстолобика, амура и карася – увеличение данного показателя [46].

Такая же зависимость наблюдается и у земноводных: у озерной лягушки и краснобрюхой жерлянки при пониженной температуре инкубации микровязкость мембран эритроцитов увеличивается. Некоторые авторы указывают на схожие результаты и у представителей класса Пресмыкающиеся.

При снижении или повышении температуры инкубации у представителей класса Пресмыкающиеся регистрируется снижение проницаемости мембран красных клеток крови с увеличением концентрации мочевины по сравнению с оптимальной температурой. У представителей надкласса Рыбы и Земноводные значение изучаемого показателя изменяется в зависимости от порядка разведения и вида животного. Изменение проницаемости мембран эритроцитов может быть объяснено уменьшением плотности упаковки липидного бислоя мембран, что связано с активацией перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов. Накопление избыточно окисленных ненасыщенных фосфолипидов вследствие образования перекисных кластеров, между которыми образуются каналы

ионной проводимости также приводит к увеличению проницаемости и нарушению свойств мембраны [30].

Увеличение микровязкости мембраны в зонах белок-липидных контактов и липидного бислоя опытных животных свидетельствует о снижении текучести, изменении вязкоэластичных свойств мембраны. В клинической практике такое состояние называют «жесткостью» эритроцитов, т.е. снижается или полностью утрачивается степень их деформируемости. Помимо утраты эритроцитами способности к продвижению в сосудах микроциркуляторного русла, снижается их осмотическая резистентность и повышается гемолиз [23].

Воздействие высоких температур также отражается на морфологии мембран эритроцитов. Так, при повышенной температуре, происходит изменение диаметра эритроцитов, уменьшается эластичность клеточной мембраны и ухудшается газообмен тканей, происходит значительное увеличение показателя гематокрита [19].

У эритроцитов некоторых представителей надкласса Рыбы и классов Земноводные и Пресмыкающиеся при пониженной и повышенной температурах инкубации сорбционная способность эритроцитарных мембран повышается по сравнению с комнатной температурой. Повышение изучаемого показателя красных клеток крови изучаемых животных, способствует улучшению адсорбции и удалению токсинов, продуктов метаболизма, иммунных комплексов, что может быть косвенным свидетельством подготовки организма к анабиозу. Полученные данные согласуются с функциональной активностью животных.

Установлено, что компенсаторные реакции плазматической мембраны эритроцитов у рыб зависят от температурного диапазона их жизнедеятельности. Устойчивость красных клеток крови сазана и белого толстолобика к действию температурного фактора выше, чем у белого амура и серебряного карася, имеющих более узкий температурный диапазон [13].

Что касается упруго-эластичных свойств мембраны эритроцитов и лейкоцитов рыб, то при повышении и снижении температуры инкубации, по сравнению с комнатной температурой у сазана, белого толстолобика и серебряного карася эти показатели снижаются на 5-64%, а у белого амура увеличиваются на 9-16% [13].

Установлено приспособительное снижение спонтанной миграционной активности эритроцитов и лейкоцитов сазана за пределами физиологического температурного оптимума, сопряженное с уменьшением упруго-эластических и адгезионных свойств их плазматической мембраны. Так снижение (до 5°C) и увеличение (до 40°C) температуры инкубации клеток способствует уменьшению площади их спонтанных локомоций на 7-27%, упругости – на 5-8%, адгезии – на 24-49% [13].

При непродолжительной тепловой нагрузке лейкоцитов происходит умеренное повышение их функциональной активности: возрастают показатели миграции, адгезии и фагоцитоза, и значительно снижается сопротивляемость средам с измененной осмолярностью. Через 120 мин гипертермии количественные характеристики функциональных свойств (миграция, адгезия, фагоцитоз) и реактивности лейкоцитов (сопротивляемость средам с высокой и низкой осмолярностью) достигают максимальных значений. Такие изменения являются одной из компенсаторных реакций организма, стимулируемых тепловым раздражителем [19].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент был проведен на кафедре биологии Белгородского государственного национального исследовательского университета в 2016 году. В работе было выполнено исследование периферической крови представителей класса Рептилии – ящерицы обыкновенной *Lacerta agilis* в условиях *in vitro*.

Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) изучали особенности компенсаторно-приспособительных реакций плазматической мембраны эритроцитов и полиморфоядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) у ящерицы обыкновенной *Lacerta agilis* в условиях воздействия различных температур. Данный метод полностью удовлетворяет требованиям для изучения изменений формы клеток крови и строения их мембран. Во-первых, применение метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) дает возможность исследовать биологические объекты, не используя сложных методов фиксации. Во-вторых, можно изучать нативные клетки, не прибегая к травмирующей клетки фиксации.

Объекты исследования: ядерные эритроциты и полиморфноядерные лейкоциты *Lacerta agilis*. Данный выбор объектов основывался на том, что у эритроцитов мембрана является достаточно чувствительной к разнообразным внешним воздействиям [9], а циркулирующие в крови гранулоциты относятся к числу основных неспецифических видов защиты организма [39].

У рептилий кровь брали из вентральной копчиковой вены. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (10 ед./мл). Полученную кровь центрифугировали 10 мин при относительной силе центрифугирования 400g. Суспензии эритроцитов и лейкоцитов разбавляли изотоническим раствором (0.8 % NaCl). Полученные клетки крови рептилий инкубировали в течение 2 часов при комнатной (20°C), пониженной (5°C) и повышенной (40°C) температурах [10]. После инкубации делали мазки крови, которые готовили на предметном стекле стандартным для клинической лаборатории методом.

Сканирование клеток крови проводили на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА Вита (см. рисунок 2.1).

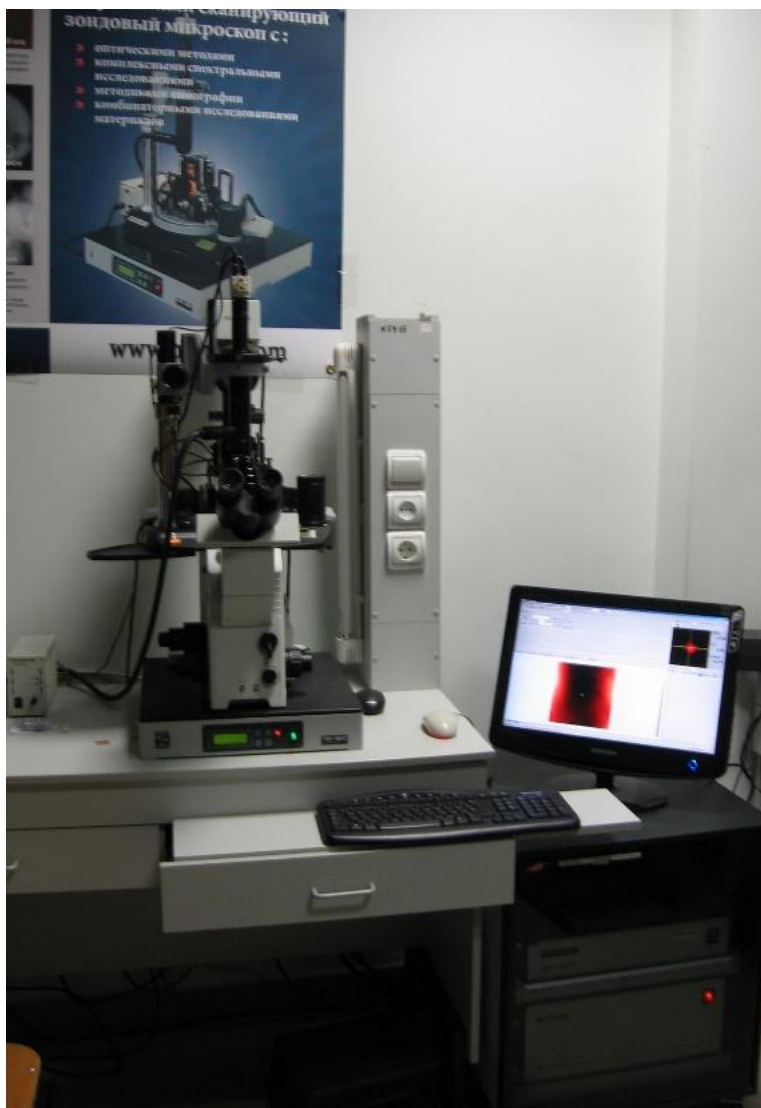


Рисунок 2.1 – Система зондового атомно-силового микроскопа.

При выполнении эксперимента соблюдали все директивы Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, а также требования Хельсинкской декларации по гуманному обращению с животными.

Как было сказано выше, при проведении исследования использовали метод атомно-силовой микроскопии. Данный метод является одним из современных методов исследования особенностей плазматической мембраны [39]. Он дает возможность получить сканограммы с разрешением от

нанометра до ангстрема. Нельзя полагаться на разработанные на настоящий момент способы фиксации при изучении морфометрических показателей клеток крови. Преимуществом для биологов является еще и то, что с помощью этого метода можно изучать непроводящие объекты в невакуумной среде без напыления и окрашивания препаратов [49].

Атомно-силовая микроскопия позволяет получать изображения объектов с разрешением, сопоставимым с уровнем рентгеноструктурного анализа, в условиях, при которых макромолекулы не подвергаются жесткой обработке и проявляют свою нативность. Более того, АСМ дает возможность не только визуализировать объекты на молекулярном уровне (возможность 3D изображения), но и изучать свойства индивидуальных макромолекул [27].

При использовании метода атомно-силовой микроскопии критериями для определения полиморфноядерных белых клеток крови служили такие параметры, как размеры и поверхностный рельеф (2D или 3D изображения). Использование в качестве объектов исследования эритроцитов и полиморфноядерных лейкоцитов рептилий необходимо для оценки механизмов функциональной реакции их плазматической мембраны на воздействие температурного фактора.

В экспериментах был использован полуконтактный режим работы атомно-силового микроскопа [26]. Так как при данном режиме сканирования существенно снижено давление кантилевера на поверхность образца (см. рисунок 2.2). Это позволяет работать с пластичным и легко разрушающимся материалом, таким как живые гемоциты.

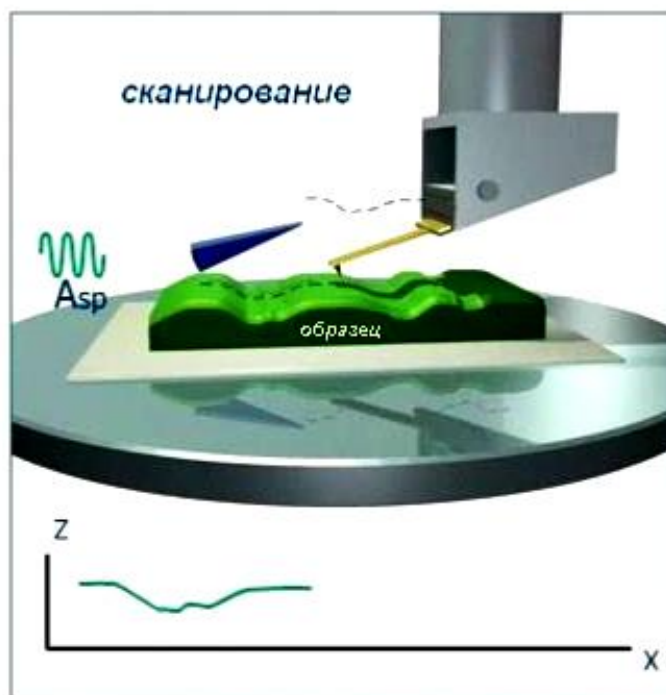


Рисунок 2.2 – Сканирование образца в полуконтактном режиме.

Методом атомно-силовой микроскопии изучали морфометрические показатели клеток крови ящерицы обыкновенной *Lacerta agilis* и упруго-эластические и адгезионные свойства их плазмалеммы.

Морфометрические параметры гемоцитов изучали в режиме полуконтактного сканирования с частотой развертки 0,6-0,8 Hz, используя кантилевер серии NSG03 с жесткостью 1,1Н/м и радиусом закругления 10 нм (Скоркина М.Ю. и соавт., 2011). На сканограммах измеряли следующие показатели: площадь (S , мкм²), большой (D , мкм) и малый (d , мкм) диаметры, а также объем (V , мкм³) клеток.

Адгезию клеток крови к кантилеверу (нН) определяли с помощью программного обеспечения «Nova 1.0.26.1058», путем построения кривых профиля клеток крови (см. рисунок 2.3).

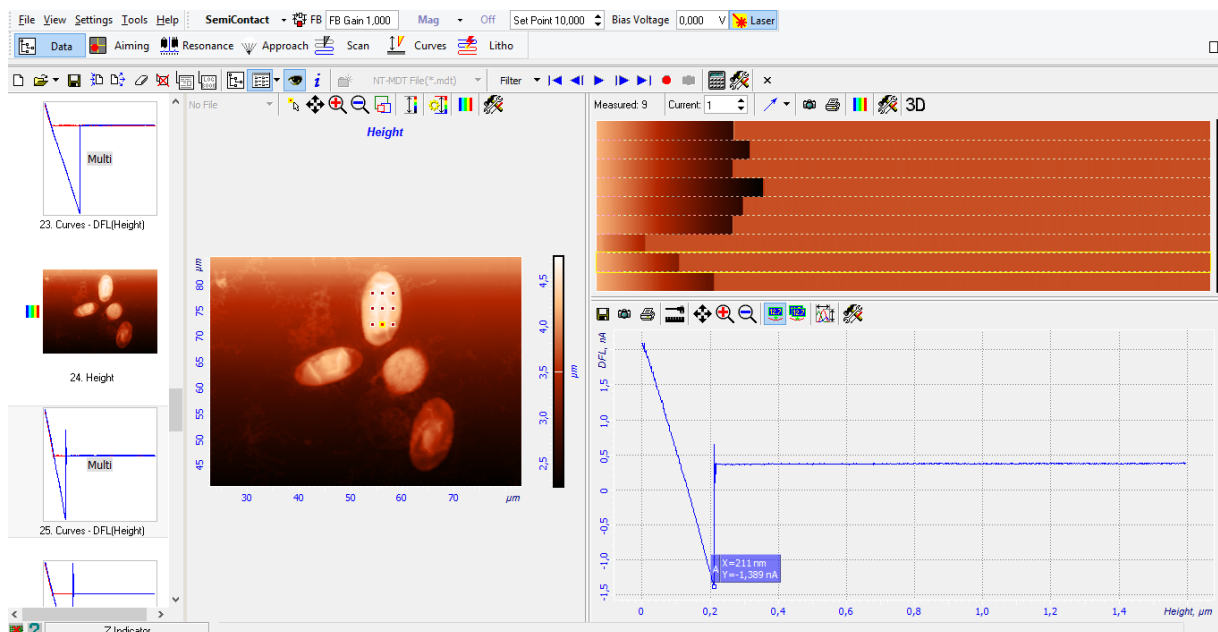


Рисунок 2.3 – Определение адгезии гемцитов с помощью программного обеспечения «Nova 1.0.26.1058».

Упругость красных и белых клеток крови рептилий, которую характеризует модуль Юнга, измеряли на атомно-силовом микроскопе в режиме силовой спектроскопии. Использовали контактный метод, который дает возможность получить изображение в режиме латеральных сил или сил трения и позволяет измерить упругость объекта в режиме снятия силовых кривых. Данный режим используется исследователями для более полного воспроизведения рельефа. Для этого в контактном режиме сканирования регистрировали кривые подвода и отвода, которые обрабатывали с помощью программного обеспечения «Image Analysis 3.5.0.2070» и рассчитывали модуль Юнга (кПа; см. рисунок 2.4).

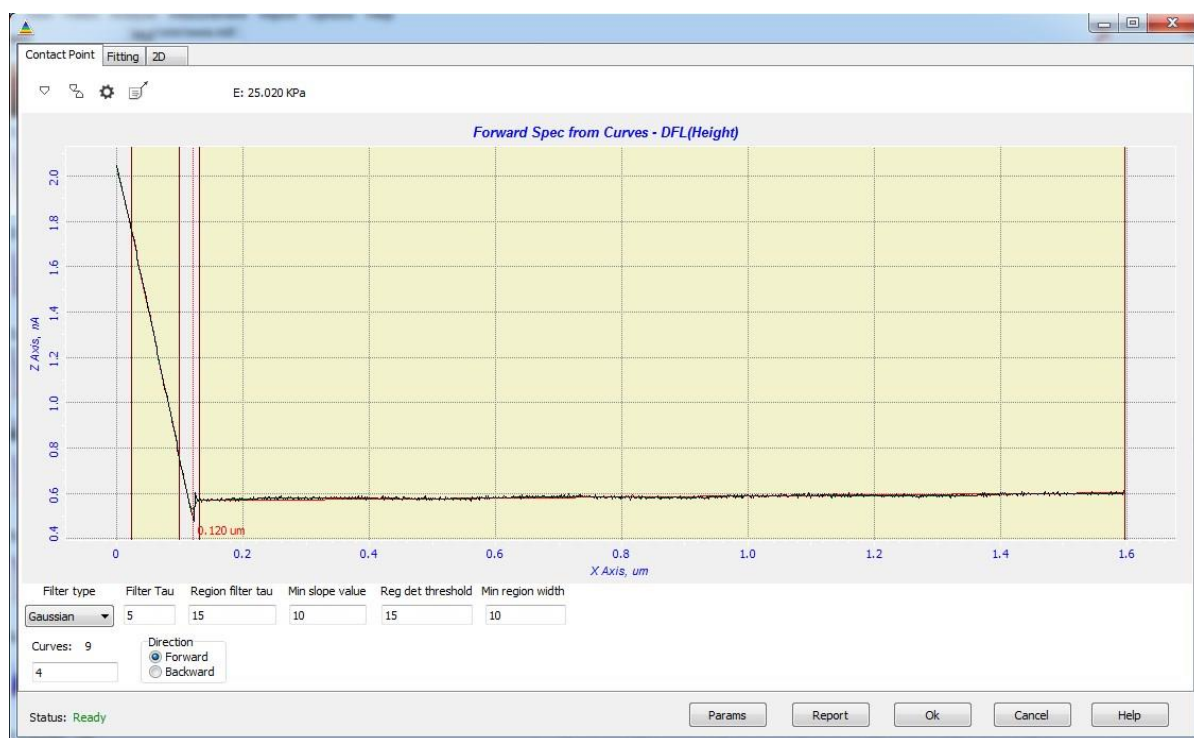


Рисунок 2.4 – Определение модуля Юнга гемцитов с помощью программы «Image Analysis 3.5.0.2070».

Статистическая обработка данных была проведена с помощью программы IBM SPSS Statistics 20. Полученные данные представлены значениями средней арифметической выборочной совокупности (M), стандартным отклонением (среднее квадратическое отклонение, SD). Для оценки различий непараметрических выборок использовали U-критерий Уилкоксона-Манна-Уитни (*, $p < 0,05$). Для оценки различий параметрических выборок использовали t-критерий Стьюдента (*, $p < 0,05$).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований морфометрических показателей красных клеток крови ящерицы, инкубированных при разных температурах, представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Морфометрические показатели эритроцитов ящерицы обыкновенной после инкубации при разных температурных условиях

Температура инкубации, °С	Показатели, ед. изм.			
	S, мкм ²	V, мкм ³	D, мкм	d, мкм
5°С	89,70 ± 2,97	163,37 ± 12,35	13,25 ± 0,30	8,10 ± 0,53
20°С	91,88 ± 2,74	164,38 ± 9,03	13,04 ± 0,23	8,82 ± 0,29
40°С	87,12 ± 2,90	87,30 ± 2,56*	13,88 ± 0,40	7,89 ± 0,20*

Примечание: S – площадь, V – объем, D – большой диаметр, d – малый диаметр; * - достоверность различий по сравнению с температурой 20°С при условии $p < 0,05$ (t-критерий Стьюдента).

Как видно из таблицы, показатели площади эритроцитов при снижении и повышении температуры достоверно не изменялись по сравнению с контрольной температурой. Тенденция к уменьшению данного показателя при повышенной температуре инкубации составила 5,18%, при пониженной – 2,37% по сравнению с контролем.

Показатели, характеризующие объем эритроцитов при пониженной температуре инкубации были на уровне аналогичных данных, полученных в контрольной группе. При повышенной температуре инкубации данные объема красных клеток крови были на 46,89% ниже ($p \leq 0,05$), чем клетки, инкубированные при температуре 20°С.

Показатели большого диаметра эритроцитов не изменялись при снижении и повышении температуры инкубации по сравнению с инкубацией при комнатной температуре.

Малый диаметр у эритроцитов ящерицы при пониженной температуре инкубации был на уровне аналогичного показателя клеток контроля, при повышенной температуре – снизился на 10,54% ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем.

Результаты исследований физических показателей красных клеток крови ящерицы, инкубированных при разных температурах, представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Показатели адгезии и модуля Юнга эритроцитов у ящерицы обыкновенной при действии температурного фактора

Температура инкубации, °С	Адгезия, нН	Модуль Юнга, кПа
5°С	10,47±0,23*	26,96±1,07*
20°С	15,89±0,56	37,73±1,48
40°С	15,38±0,34	34,97±1,60

Примечание: * - достоверное различие по сравнению с температурой 20°С при условии $p < 0,05$ (t-критерий Стьюдента).

Как видно из таблицы, показатели, характеризующие адгезию эритроцитов к кантилеверу, при повышенной температуре инкубации были на уровне аналогичных данных, полученных в контрольной группе. При пониженной температуре инкубации данные адгезии у красных клеток крови были на 34,11% ниже ($p \leq 0,05$), чем клетки, инкубированные при температуре 20°С.

Аналогичное влияние температуры было зарегистрировано также на показатели упругости эритроцитов. Так, при увеличении температуры инкубации показатели модуля Юнга были на уровне аналогичных данных, полученных в контрольной группе. При уменьшении температуры инкубации данные упругости у красных клеток крови были на 28,54% ниже ($p \leq 0,05$), чем у клеток, инкубированных при температуре 20°C.

На рисунках 3.1 – 3.3 представлены сканы эритроцитов ящерицы обыкновенной, инкубированные в условиях пониженной, комнатной и повышенной температур.

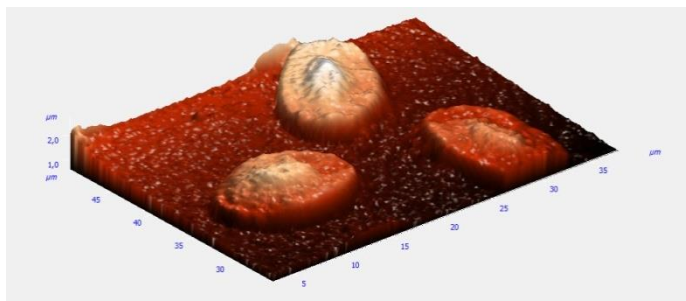


Рисунок 3.1 – АСМ-изображение эритроцитов *Lacerta agilis* после инкубации при температуре 5°C.

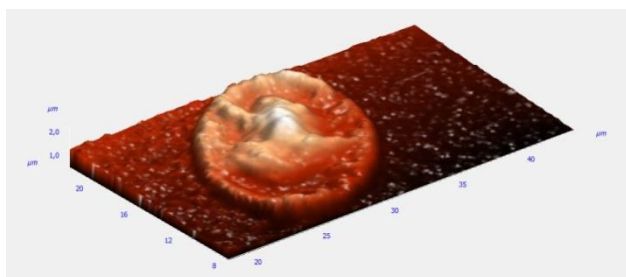


Рисунок 3.2 – АСМ-изображение эритроцитов *Lacerta agilis* после инкубации при температуре 20°C.

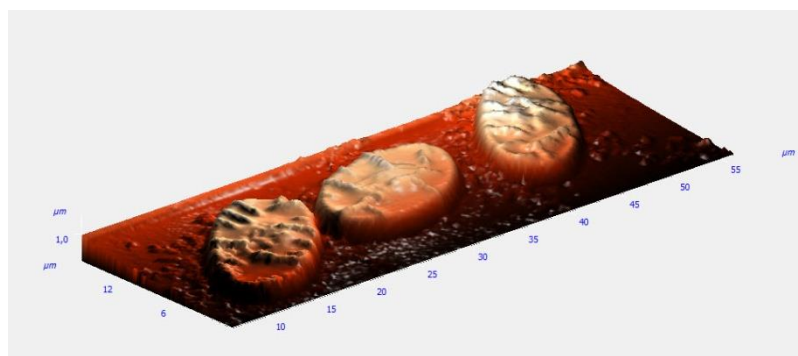


Рисунок 3.3 – АСМ-изображение эритроцитов *Lacerta agilis* после инкубации при температуре 40°C.

Вне зависимости от температуры инкубации, красные клетки крови овальной формы, их поверхность в зоне ядра выпуклая, по всей поверхности регистрируется складчатость плазмалеммы.

Результаты исследований морфометрических показателей белых клеток крови ящерицы, инкубированных при разных температурах, представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Морфометрические показатели лейкоцитов ящерицы обыкновенной после инкубации при разных температурных условиях

Температура инкубации, °С	Показатели, ед. изм.			
	S, мкм ²	V, мкм ³	D, мкм	d, мкм
5°C	44,64 ± 3,87*	77,07 ± 7,58	7,39 ± 0,04*	6,68 ± 0,39
20°C	61,65 ± 4,70	57,84 ± 7,96	9,75 ± 0,50	7,75 ± 0,37
40°C	34,26 ± 3,99*	39,36 ± 4,87	7,24 ± 0,51*	6,17 ± 0,35*

Примечание: S – площадь, V – объем, D – большой диаметр, d – малый диаметр; * - достоверность различий по сравнению с температурой 20°C при условии $p < 0,05$ (t-критерий Стьюдента).

У белых клеток крови ящерицы как снижение, так и повышение температуры инкубации способствовало уменьшению показателя площади. Так, при температуре инкубации равной 5°C данный показатель снизился на 27,59% ($p \leq 0,05$), при температуре инкубации 40°C – на 55,57% ($p \leq 0,05$), по сравнению с показателем, полученным в условиях инкубации при контрольной температуре (20°C).

Показатели, характеризующие объем лейкоцитов, не изменялись при снижении и повышении температуры инкубации по сравнению с инкубацией при комнатной температуре.

Большой диаметр у белых клеток крови ящерицы при пониженной и повышенной температуре инкубации снизился на 24,21% ($p \leq 0,05$) и 25,74% ($p \leq 0,05$) соответственно по сравнению с контролем.

Показатель малого диаметра у лейкоцитов ящерицы при пониженной температуре инкубации был на уровне аналогичного показателя клеток контроля, при повышенной температуре – данный показатель снизился на 20,39% ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем.

Данные физических показателей лейкоцитов ящерицы представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Показатели адгезии и модуля Юнга лейкоцитов у ящерицы обыкновенной при действии температурного фактора

Температура инкубации, °C	Адгезия, нН	Модуль Юнга, кПа
5°C	11,78±0,41*	26,04±2,13*
20°C	15,18±0,59	37,67±1,75
40°C	15,96±0,39	37,47±1,67

Примечание: * - достоверное различие по сравнению с температурой 20°C при условии $p < 0,05$ (t-критерий Стьюдента).

Как видно из таблицы, уменьшение температуры инкубации способствовало снижению показателя адгезии у лейкоцитов ящерицы на 22,40% ($p \leq 0,05$), по сравнению с контролем. Увеличение температуры инкубации не оказало влияния на данный показатель.

При увеличении температуры инкубации показатели модуля Юнга были на уровне аналогичных данных, полученных в контрольной группе. При уменьшении температуры инкубации данные упругости у белых клеток крови были на 30,87% ниже ($p \leq 0,05$), чем у клеток, инкубированных при температуре 20°C.

Сканы лейкоцитов ящерицы обыкновенной, полученные после инкубации в условиях разных температур, представлены на рисунках 3.4 – 3.6.

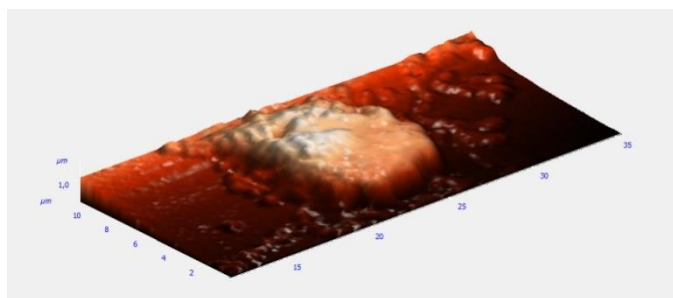


Рисунок 3.4 – АСМ-изображение лейкоцитов *Lacerta agilis* после инкубации при температуре 5°C.

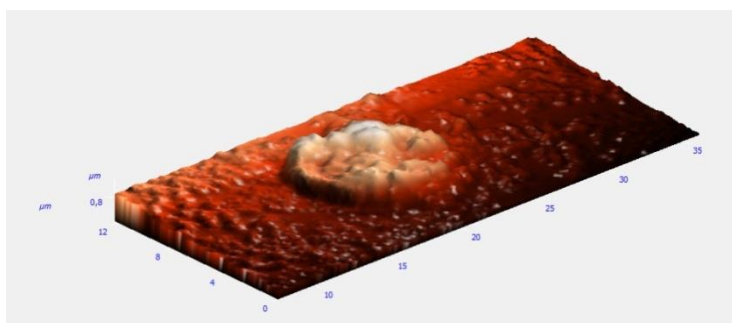


Рисунок 3.5 – АСМ-изображение лейкоцитов *Lacerta agilis* после инкубации при температуре 20°C.

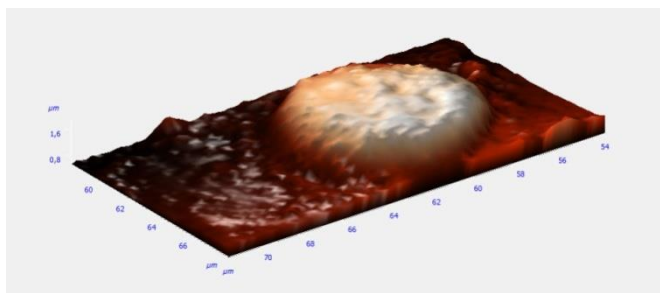


Рисунок 3.6 – АСМ-изображение лейкоцитов *Lacerta agilis* после инкубации при температуре 40°C.

Белые клетки крови вне зависимости от температуры инкубации округлой формы, их поверхность имеет шероховатый вид.

Снижение морфометрических показателей у красных и белых клеток крови при повышенной температуре инкубации может быть связано со стремительной экспрессией белков теплового шока (БТШ) [15, 50, 55, 56, 58], запуск которой обычно происходит в течение нескольких минут после начала действия тепловой нагрузки на поверхность клеток. Известно, что ряд белков теплового шока связано с белками, образующими цитоскелет клетки [61]. Можно предположить, что эта взаимосвязь ведет к вовлечению БТШ в структуру цитоскелета в ходе и/или по окончании тепловой нагрузки [61]. Вероятно, такого рода реакции способствуют изменению морфометрических показателей клеток крови после их экзогенного перегревания.

Уменьшение морфометрических показателей, адгезионных и упруго-эластических свойств мембраны эритроцитов и лейкоцитов испытуемых животных в условиях пониженной температуры инкубации по сравнению с контролем может быть обусловлено тем, что при данной температуре происходит нарушение регуляции микровязкости билипидного слоя, фазового распределения липидов, микроокружения белков, белок-липидных взаимодействий, а также других характеристик структурной организации мембраны [43].

ВЫВОДЫ

1. Температурный фактор оказывает влияние на морфометрические показатели, упругоэластические и адгезионные свойства плазмалеммы эритроцитов и лейкоцитов ящерицы обыкновенной.

2. У красных клеток крови *Lacerta agilis* при повышенной температуре инкубации (40°C) по сравнению с контролем объем клетки снизился на 46,89%, малый диаметр – на 10,54%.

3. Показатели площади, большого и малого диаметра у белых клеток крови ящерицы обыкновенной при повышенной температуре снижаются на 55,57%, 25,74% и 20,39% соответственно по сравнению с контролем. При пониженной температуре инкубации показатель площади лейкоцитов снизился на 27,59%, показатель большого диаметра – на 24,21% по сравнению с аналогичным показателем контроля.

4. У красных и белых клеток крови *Lacerta agilis* при пониженной температуре инкубации уменьшается адгезия на 34,11% и 22,40%, упругость – на 28,54% и 30,87% соответственно по сравнению с аналогичными показателями контроля.

5. Вне зависимости от температуры инкубации, красные клетки крови овальной формы, их поверхность в зоне ядра выпуклая, по всей поверхности регистрируется складчатость плазмалеммы. Белые клетки крови ящерицы обыкновенной при повышенной, пониженной и комнатной температурах инкубации округлой формы, их поверхность имеет шероховатый вид.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абатчикова О.А., Костеша Н.Я. Физиологические механизмы адаптации при холодном методе выращивания телят // Вестник ТГПУ. – 2010. – № 3(93). – С. 44-49.
2. Белково-липидный спектр мембраны эритроцитов у больных острым панкреатитом различной этиологии до и после лечения / А.Л. Локтионов, А.И. Конопля, С.А. Долгарева [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 11. – С. 316-319.
3. Болдырев А.А. Введение в биомембранологию. – М.: Изд-во МГУ. – 1990. – 208 с.
4. Васильев Д.Б. Ветеринарная герпетология: ящерицы. – М.: Проект-Ф, 2005. – 480 с.
5. Васильев Д.Б. Теоретические и методологические основы ветеринарной герпетологии: автореф. дис... докт. вет. наук. – М., 2007. – 38 с.
6. Взаимосвязь процессов эритропоэза, эритродиереза и перекисного окисления липидов мембран эритроцитов / А.Г. Марачев, А.В. Корнев, Г.Н. Дегтева [и др.]. // Вестник АМН СССР. – 1983. – №11. – С. 65-74.
7. Владимиров Ю.А. Роль нарушений свойств липидного слоя мембран в развитии патологического процесса // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1989. – №4. – С.7-19.
8. Ганщук С.В., Воробьева А.С. Сравнительная характеристика периферической крови двух видов ящериц Камского Предуралья // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. – 2009. – Т.18, № 1. – С. 47-50.
9. Геннис Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функции. – М.: Мир, 1997. – 624 с.
10. Голованов В.К. Экспериментальная оценка верхней температурной границы жизнеобитания у молоди пресноводных видов рыб // Труды

Мордовского государственного природного заповедника имени П.Г. Смидовича. Саранск, Пушта. – 2013а. – Вып. XI. – С. 125-132.

11. Гунина Л.М., Кабан А.П., Коробко В.Б. Роль изменений структурно-функционального состояния мембраны эритроцита в развитии анемии у больных раком желудка // Онкология. – 2000. – Т.2, №4. – С. 247-249.

12. Даваа Я.Х., Шубина М.В., Терещенко С.Ю. Связь структурно-функционального состояния мембран эритроцитов новорожденных с параметрами их физического развития // Сибирское медицинское обозрение. – 2011. – № 1. – С. 25-28.

13. До Хыу Кует Компенсаторно-приспособительные реакции эритроцитов и лейкоцитов рыб на действие температурного фактора: дис... канд. биол. наук. – Белгород, 2016. – 129 с.

14. Добротина Н.А., Копытова Т.В., Щелчкова Н.А. Характеристика функционального состояния мембран эритроцитов при эндогенной интоксикации у больных хроническими распространенными дерматозами // Успехи современного естествознания. – 2010. – № 2. – С. 39-43.

15. Евдонин А.Л., Медведева Н.Д. Внеклеточный белок теплового шока 70 и его функции // Цитология. – 2009. – № 51(2). – С. 130-137.

16. Житенева Л.Д., Макаров Э.В., Рудницкая О.А. Основы ихтиогематологии (в сравнительном аспекте). – Ростов н/Д: Эверест, 2004. – 312 с.

17. Житенева Л.Д., Макаров Э.В., Рудницкая О.А. Эволюция крови. – Ростов-на-Дону: АзНИИРХ, 2001. – 113 с.

18. Захаров Ю.М., Рассохин А.Г. Эритробластический островок. – М.: Медицина, 2002. – 280 с.

19. Изменения структуры поверхности мембран эритроцитов при длительном хранении донорской крови / Мороз В.В., Голубев А.М., Афанасьев А.В. [и др.]. // Общая реаниматология – 2012. – № 1 – С. 5-12.

20. Использование атомно-силовой микроскопии для оценки морфометрических показателей клеток крови / М.З. Федорова, Е.В. Зубарева, С.В. Надеждин [и др.] // Биофизика. – 2008. – Т. 53, № 6. – С. 555-559.

21. Ишутина Н.А. Перекисное окисление липидов и микровязкость мембран эритроцитов у женщин с обострением герпес-вирусной инфекции // Дальневосточный медицинский журнал. – 2012. – № 1. – С. 59-61.

22. Кагава Я. Биомембраны / под ред. В.Е. Кагана. – М: Высшая школа, 1985. – 303 с.

23. Липунова Е.А., Скоркина М.Ю. Физиология крови. – Белгород: Изд-во БелГУ, 2007. – 324 с.

24. Лисничая Е.Н., Ефимов В.Г. Особенности исследования морфологического состава крови рептилий // Науково-технічний бюлетень НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК. – 2014. – № 1. – С. 61-74.

25. Луценко М.Т., Андриевская И.А., Ишутина Н.А. Изменение микровязкости мембран эритроцитов периферической крови при обострении герпес-вирусной инфекции у беременных // Информатика и системы управления. – 2010. – № 2 (24). – С. 98-100.

26. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. – Нижний Новгород, 2004. – 110 с.

27. Нагорнов Ю.С. Изучение биологических объектов методами атомно-силовой микроскопии. – Тольятти: ТГУ, 2012. – 67 с.

28. Оценка резистентности организма к воздействию низких температур / И.В. Пухтеева, Н.В. Герасимович, Н.В. Прокопенко [и др.]. // Доклады БГУИР. – 2016. – № 7. – С 122-127.

29. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды / Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А. [и др.]. – М.: Наука, 2001. – 154 с.

30. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Типовые нарушения молекулярной организации мембраны эритроцита при соматической и психической патологии // Успехи физиологических наук. – 2004. – Т. 35, №1. – С. 53-65.

31. Селезнев С.Б. Филогенез иммунной системы. – М.: РУДН, 2000. – 203 с.

32. Силс Е.А. Сравнительный анализ гематологических показателей остромордой (*Rana arvalis*, Nilsson, 1842) и озерной (*Rana ridibunda*, Pallas, 1771) лягушек городских популяций // Вестник ОГУ. – 2008. – № 10 (92). – С. 230-235.

33. Соколина Ф.М., Павлов А.В., Юсупова Р.Х. Гематология пресмыкающихся. – Казань: КГУ, 1997. – 31 с.

34. Состояние мембран эритроцитов при экспериментальном желчном перитоните / А.А. Боташев, О.А. Терещенко, В.В. Иванов [и др.] // Кубанский научный мед. вестник. – 2010. – № 3-4 (117-118). – С. 36-39.

35. Сравнительная характеристика функциональных параметров эритроцитов крови больных хроническим пиелонефритом и гломерулонефритом / Л.Е. Муравлёва, В.Б. Молотов-Лучанский, Д.А. Ключев [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 2. – С. 30-34

36. Сторожок С.А., Санников А.Г., Захаров Ю.М. Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства. – Тюмень: Изд-во ТГУ, 1997. – 140 с.

37. Структурно-функциональные параметры клеток крови в норме и при патологии у детей в условиях Севера / В.Т. Манчук, В.П. Терещенко, С.Ю. Терещенко [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2003. – № 2 (108). – С. 12-16.

38. Султанов Ф.Ф., Фрейнк А.И. Метод ускоренной адаптации человека к работе в аридных условиях. – Ашхабад: Ылым, 1981. – 25 с.

39. Федорова М.З. Функциональные свойства и реактивность лейкоцитов крови при измененных условиях организма, вызванных

факторами различной природы: автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Москва, 2002. – 32 с.

40. Физико-химические особенности мембран эритроцитов у жителей Среднего Приобья / Н.В. Веснина, Л.М. Леонова, Э.А. Кашуба [и др.]. // Медицинская наука и образование Урала. – 2008. – №1. – С. 72-73.

41. Хайрутдинов И.З., Павлов А.В., Соколина Ф.М. Сравнительная морфология крови двух видов рептилий // Вопросы герпетологии: материалы Третьего съезда Герпетологического общества им. А.М. Никольского (Пушино, 9-13 октября 2006 г.). – СПб, 2008. – С. 415-422.

42. Хайрутдинов И.З., Соколина Ф.М. Характеристика крови рептилий и ее связь с условиями среды обитания. – Казань: Казанский университет, 2010 – 44 с.

43. Харакоз Д.П. О возможной физиологической роли фазового перехода «жидкое-твердое» в биологических мембранах // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 333-364.

44. Хаскин В.В. Энергетика теплообразования и адаптация к холоду. – Новосибирск: Наука, 1975. – 200 с.

45. Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран. – Минск: Наука и техника, 1981. – 214 с.

46. Чернявских С.Д., До Хыу Куэт, Во Ван Тхань Действие температурного фактора на морфометрические и физические показатели эритроцитов и полиморфоядерных лейкоцитов *Stenopharyngodon idella* // Научный результат. Сер. Физиология. – 2015. – Т. 1 № 3(5). – С. 18-25.

47. Чернявских С.Д., Недопекина С.В. Сезонные колебания относительной микровязкости, полярности и сорбционной способности эритроцитарных мембран *Syrninus caprio* и *Rana ridibunda* // Научные ведомости БелГУ. Сер. «Естественные науки». – 2013. – №3 (146). – С. 99-103.

48. Altland P.D., Thompson E.C. Some factors affecting blood formation in turtles // *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. – 1958. – № 99. – P. 456-459.

49. Atomic force microscopy in histology and cytology / T. Ushiki, J. Hitomi, S. Ogura et al. // *Archives of Histology and Cytology*. – 1996. – Vol. 59. – P. 421-431.

50. Beck S.C., De Maio A. Stabilization of protein synthesis in thermotolerant cells during heat shock // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1994. – Vol. 269(34). – P. 21803-21811.

51. Dessaeur H.C. Blood chemistry of reptiles: physiological and evolutionary aspects // *In Biology of the Reptilia*. Eds. Q. Gans, T.C. Parsons. – Vol. 2. – New York: Academic Press, 1970. – P.1-4.

52. Hansen P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress // *Animal Reproduction Science*. – 2004. – Vol. 82-83. – P. 349-360.

53. Hochachka P.W. Biochemical adaptation. Mechanism and process in physiological evolution. – N.Y.: Oxford Univ. Press, 2002. – 466 p.

54. Johnson A. Avian and Reptile Hematology Laboratory for Technicians // 80th Western Veterinary Conference. – 2011. URL: http://www.omnibooksonline.com/data/papers/2008_HO-26.pdf (дата обращения: 18.02.2018).

55. Kregel K.C. Molecular biology of thermoregulation. Invited review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance // *Journal of Applied Physiology*. – 2002. – Vol. 92. – P. 2177-2186.

56. Li G.C., Mivechi N.F., Weitzel G. Heat shock proteins, thermotolerance, and their relevance to clinical hyperthermia // *International Journal of Hyperthermia*. – 1995. – Vol. 11(4). – P. 459-488.

57. Pathology of suspected fenbendazole intoxication in three Fea's vipers (*Azemiops feae*) / M.M. Garner, T.P. Alvarado, K.C. Gamble et a al. // *Zoo Biology*. – 2001. – № 20. – P. 169-183.

58. Physiological fever temperature induces a protective stress response in T lymphocytes mediated by heat shock factor-1 (HSF1) / Murapa P., Gandhapudi S., Skaggs H.S. et a al. // *The Journal of Immunology*. – 2007. – Vol. 179. – P. 8305-8312.

59. Pörtner H.O., Lucassen M., Storch D. Metabolic biochemistry: Its role in thermal tolerance and in the capacities of physiological and ecological function // *Fish Physiology*. – 2005. – Vol. 22. – P. 79-154.

60. Stein G. Hematologic and blood chemistry values in reptiles // In: Mader D.R. (ed.): *Reptile Medicine and Surgery*. – Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996. – P. 473-483.

61. Stress-induced thermotolerance of the cytoskeleton of mouse neuroblastoma N2A cells and rat reuber H35 hepatoma cells / Wiegant F.A.C., Van Bergen en Henegouwen P.M.P., Van Dongen G. et a al. // *Cancer Research*. – 1987. – Vol. 47. – P. 1674-1680.