

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

**ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОГО ФАКТОРА НА
МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОЦИТОВ И
ЛЕЙКОЦИТОВ ЗЕМНОВОДНЫХ**

Выпускная квалификационная работа
обучающегося по направлению подготовки 44.03.05 Педагогическое
образование профили Биология и химия
очной формы обучения, группы 02041307
Лариной Алины Юрьевны

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

БЕЛГОРОД 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.2 Морфофизиологическая характеристика гемоцитов Земноводных	5
1.2.1 Красные клетки крови лягушек	5
1.2.2 Белые клетки крови амфибий	13
1.3 Действие температурного фактора на плазматическую мембрану клеток крови	20
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	28
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	33
ВЫВОДЫ	43
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	44

ВВЕДЕНИЕ

Гемоциты являются универсальной моделью клеток, отражающей физиологические и патологические изменения в организме [5].

В современной мембранологии особое внимание уделяется структурной организации и функционированию биомембран, участвующих в интеграции регуляторных процессов и реакций клетки [13]. Дезорганизация клеточных мембран вследствие действия разных факторов может приводить к нарушению внутриклеточных синтетических процессов, созревания клеток и выходу в кровь неполноценных клеточных элементов, неспособных к выполнению своих функций [29].

В качестве простой и репрезентативной модели выбрана мембрана эритроцитов и лейкоцитов, так как их структура является достаточно лабильной и чувствительной к разнообразным внешним воздействиям и может реагировать множеством обратимых и необратимых перестроек в липидных и белковых компонентах [32]. Наиболее детально изучены морфофункциональные особенности мембраны красных клеток крови млекопитающих животных и человека [17]. Менее изученным является вопрос о структурно-функциональном состоянии цитоплазматической мембраны ядерных эритроцитов при воздействии температуры.

Цель работы: изучить действие температурного фактора на морфологические и физические показатели плазмалеммы гемоцитов Земноводных.

Объект исследования: гемоциты Амфибий.

Предмет исследования: влияние температурного фактора на клетки крови Земноводных.

Задачи исследования:

1. Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) оценить влияние температуры на показатели площади, объема, большого и малого диаметров у красных и белых клеток крови *Rana ridibunda Pall.*

2. Выявить изменения упруго-эластических и адгезионных показателей плазмалеммы гемоцитов лягушки озёрной под влиянием повышенной и пониженной температур инкубации.
3. Оценить морфометрические изменения клеток крови у представителей класса Земноводные под действием температурного фактора.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.2 Морфофизиологическая характеристика гемоцитов Земноводных

1.2.1 Красные клетки крови лягушек

Красные клетки крови лягушки имеют овальную форму с ядром, которое размещено по центру [33]. Средний диаметр эритроцитов у лягушки – $21,6 \times 14,6$ мкм, средний объем – 630 мкм³ [9].

Самый большой диаметр эритроцитов наблюдается у хвостатых амфибий, например, у амфиумы красные клетки крови достигают огромных размеров (70 мкм по длиной и 1 мкм по короткой оси эллипса). У протей размер эритроцита будет составлять 58×35 мкм. Среди конкретной группы животных отклонения в размерах эритроцитов наблюдаются в незначительных пределах [8].

Ядро красных кровяных телец довольно плотное, в котором хроматин расположен по периферии, а также в виде центральных скоплений. В цитоплазме из органелл имеются рибосомы, большое количество полисом, слабо развитая эндоплазматическая сеть, комплекс Гольджи, митохондрии, плотно прилегающие к ядру. Обеспечение формы ядерных эритроцитов осуществляют структуры в виде микротрубочек, также они выполняют опорную функцию [34].

Помимо ядерных эритроцитов в крови амфибий встречаются отдельные безъядерные эритроциты. А.А. Заварзин (1953), Д.И. Гольдберг и соавт. (1973) считают их наиболее старыми формами. Появление безъядерных форм также связывают с адаптацией организма к условиям недостатка кислорода, поскольку его потребление ядерными эритроцитами больше, нежели безъядерными. Образование этих телец происходит либо цитокинетически, либо путем почкования [1].

Продолжительность жизни эритроцитов земноводных колеблется от

700 до 1500 дней [33]. Продолжительную жизнь эритроцитов земноводных связывают с сохранением способности внутрисосудистого синтеза белков и РНК [22].

Ведущая функция эритроцитов – транспорт кислорода и углекислого газа, осуществление которого возможно благодаря наличию в них гемоглобина и происходит в крови путем простой диффузии [26]. С усложнением организации позвоночных происходит увеличение дыхательной поверхности эритроцитов [19]. У головастиков сходство белка гемоглобина к кислороду выше, чем у зрелых лягушек [42]. При увеличении температуры, кислороду проще отделиться от гемоглобина, в связи с ослабеванием связи. В то же время увеличивается интенсивность обменных процессов [39].

В транспорте газов ведущую роль играет мембрана эритроцита. Следует отметить, что она обладает высокой деформабельностью – поддержанию формы эритроцитов при прохождении их через капилляры и участие в агрегации клеток [37].

Как уже выше отмечалось, кровь лягушек преимущественно в весенне-летний период содержит незрелые формы, такие как эритробласты и нормобласты. Эритробласт амфибий – это клетка округлой формы с базофильной цитоплазмой, внушительно крупным ядром, содержащим ядрышки, имеющие как центральное, так и нецентральное расположение в ядре эритробласта. Нормобласты на протяжении своей жизни сохраняют способность к митотическому делению и накоплению белка гемоглобина. Ядро нормобласта приобретает более грубую структуру хроматина. Среди нормобластов встречаются как базофильные, так и полихроматофильные и оксифильные. Клетки, которые окрашиваются кислым красителем, приобретают овальную или эллипсоидную форму [34].

Немаловажно отметить, что среди клеток эритропоэтического ряда молодых эритроцитов встречалось относительно немного – около 2,8%. Среди них выявлены эритробласты, проэритробласты, полихроматофильные

эритробласты, которые встречались еще реже. На них приходилось по 0,4%, оксифильных эритробластов, было несколько больше – 1,6%. Зрелые эритроциты, которые содержат ядра, находились в преимущественном отношении – 81,4% [1].

В эволюции крови позвоночных животных с самого начала наблюдалось укрупнение размеров эритроцитов, после они становятся более мелкими, в то же время увеличивается и их концентрация в общем объеме [13]. Таким образом, амфибии обладают большим количеством крови и гемоглобина по сравнению с рыбами, но меньшим по сравнению с рептилиями, птицами и млекопитающими [19].

В 1 мм³ сосудистой крови у травяной лягушки содержится 408 тыс. эритроцитов [10].

Согласно данным Е.Д. Гольдберга (1989) у бесхвостых амфибий содержание эритроцитов составляет 324-640 тыс. в 1 мм³. Эритроциты лягушки имеют овальную форму с центрально расположенным ядром. Средний диаметр эритроцитов у лягушки – 21,6×14,6 мкм, средний объем – 630 мкм³ [9].

Уровень красных клеток крови у разных видов Земноводных широко варьирует. Наибольшее число эритроцитов в 1 мм³ содержится в крови *Nyctanolis arborea* – 674 тыс., наименьшее у *Salamandra atra* – 53 600, у травяной лягушки – 408 тыс.. Согласно исследований Е.Д. Гольдберга (1989), у амфибий концентрация эритроцитов составляет 324-640 тыс. в 1 мм³. Уровень гемоглобина в 100 мл крови составляет у них 6-10 г [19]. Красные клетки крови лягушки имеют овальную форму с ядром, которое размещено по центру [34]. Средний диаметр эритроцитов у лягушки – 21,6×14,6 мкм, средний объем – 630 мкм³ [8].

Число эритроцитов у всех животных может варьировать в зависимости от возраста, эмоциональной и мышечной нагрузки, действия экологических факторов. Как показали исследования, которые провели на самцах озерной лягушки, закономерность о количественном колебании клеток крови в

различные сезонные периоды подтвердилась. Так, количество эритроцитов в состоянии анабиоза составляло $0,29 \pm 0,01 \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$, а в отдельные периоды весенне-летней активации эритропоэза достигало $2,48 \pm 0,33 \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$ [32].

Однако следует отметить, что некоторые исследования показывают, что не все факторы, которые теоритически могли повлиять на эритропоэз лягушки озерной, действительно влияют. Необходимо отсеять несколько факторов, такие как пребывание в воде или на суше, двигательная активность животного. Температурный фактор, как может показаться странным, тоже не является решающим. С понижением температуры интенсивность эритропоэза во всех кроветворных локусах снижается, но перераспределения или полной остановки не происходит. Хотя в самые холодные месяцы года эритропоэз на самом низком уровне, нельзя сказать с полной уверенностью, что это вызвано охлаждением воды ниже какого-то контрольного критического уровня, или же дефицитом кислорода в воде под слоем льда. Возможно, именно недостаток кислорода вынуждает отказаться от энергетических затрат на клеточную пролиферацию и дифференцировку [12].

Более вероятным решающим фактором для активизации эритропоэза у *Rana riddibunda Pall.* является наличие пластических и энергетических запасов для построения клеток эритроидного ряда. После выхода из спячки (анабиоза) эритропоэз минимален, поскольку организм животного истощен зимовкой и те немногие оставшиеся ресурсы тратятся на физическую активность и гаметогенез. В середине-конце лета пищевые ресурсы находятся на максимальном уровне, а организм животного смог восстановиться после нереста, начинается активное обновление эритроидных клеток, которое продолжается и во время зимовки, но уже на более низкой скорости [27].

Большое влияние также оказывает топографическое распределение эритропоэза. При минимальном уровне эритропоэза кроветворную активность проявляет костный мозг. С конца весны-начала лета в процесс включаются печень и селезенка, с середины лета – периферическая кровь. Но

с наступлением осени, активность костного мозга и печени несколько снижается, активность кроветворения селезенки – совсем сходит на нет, однако, в периферической крови достаточно активный эритропоэз сохраняется в течение всей зимовки, кроме самых холодных месяцев. При этом эритропоэтическая активность костного мозга в течение всего года значительно выше по сравнению со всеми остальными очагами [34].

Ядро красных кровяных телец довольно плотное, в нем хроматин расположен как по периферии, так и в виде центральных скоплений. В цитоплазме имеются рибосомы, большое количество полисом, слабо развитый эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи, митохондрии, плотно прилегающие к ядру. Для того чтобы поддерживать форму эритроцита, в нем присутствуют микротрубочки. Они и выполняют опорную функцию [8].

Помимо ядерных эритроцитов в крови амфибий также встречаются отдельные безъядерные эритроциты. А.А. Заварзин (1953), Д.И. Гольдберг и соавт. (1973) считают их наиболее старыми формами. Появление безъядерных форм также связывают с адаптацией организма к условиям недостатка кислорода, поскольку его потребление ядерными эритроцитами больше, нежели безъядерными. Образование этих телец происходит либо цитокинетически, либо путем почкования [9].

Созревание и деление красных клеток крови осуществляется так же в периферическом русле. При этом молодые клетки встречаются в крови земноводных либо на всем протяжении онтогенеза, либо в определённые его периоды [33].

Эритроциты бесхвостых амфибий живут от 2 до 5 лет [34]. В связи с особенностями внутрисосудистого синтеза белков и РНК, наблюдается особо высокая продолжительность жизни красных клеток крови амфибий. В эритроцитах лягушек находится гемоглобин. При этом процессы оксигенации и дезоксигенации происходят благодаря наличию облегченной диффузии.

Эритроциты амфибий обладают округлой формой с центрально расположенным ядром [34]. Средний диаметр их составляет $21,6 \times 14,6$ мкм, средний объем – 630 мкм³ [9]. По данным Е.Д. Гольдберга (1989) у лягушек содержание красных кровяных телец составляет 324-640 тыс. в 1 мм³, концентрация белка гемоглобина – 1,9-10,0%, у молодых особей показатели крови несколько ниже, чем у зрелых особей. Согласно А.А. Заварзину (1953), на 1 мм³ сосудистой крови травяной лягушки приходится 408 тыс. эритроцитов [24].

В ядре эритроцитов находится сильно сконденсированный, практически неактивный хроматин. Молекулы белка гемоглобина имеют тетрамерное строение.

Для эритроцитов, содержащих ядро, характерно наличие достаточно хорошо выраженного цитоскелета, образованного микротрубочками, которые формируют опорное кольцо в субмембранной области клетки. Из органоидов в гиалоплазме находятся рибосомы, многочисленные полисомы, слабо развитый эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи, митохондрии, тесно прилегающие к ядру [9].

У лягушек эритроциты могут «отпочковывать» ядра и функционировать достаточно длительное время как безъядерные клетки. Они получили название эритропластиды. У некоторых видов Земноводных имеется небольшое количество безъядерных эритроцитов [19]. Существуют виды амфибий, у которых эритропластиды составляет 85% всех эритроцитов [9]. Согласно эксперименту, который провели достаточно недавно, Земноводные (хвостатые и бесхвостые) имеют возможность длительного существования у животных, лишенных эритроцитов при экспериментально вызванной анемии [16].

Жизнеспособность эритроцитов лягушек колеблется от 700 до 1500 дней [34]. Высокую продолжительность жизни эритроцитов Земноводных связывают с сохранением способности внутрисосудистого синтеза разнообразных белков и РНК [22].

Красные кровяные тельца крови лягушки представляют собой яркий пример промежуточного результата эволюционных преобразований. Изначально похожие клетки появляются у первичноротых животных, к которым относят лентовидные черви немертины, иглокожие и моллюски. У их самых древних представителей гемоглобин располагался непосредственно в плазме крови. С усложнением организации потребность животных в кислороде увеличивалась. В результате количество гемоглобина в крови возрастало, что позволило крови быть более вязкой, и немного затрудняло дыхание. Именно исходя из этого обстоятельства появились такие клетки крови, как эритроциты. Первые красные кровяные клетки представляли собой внушительные, крупные структуры, их большую часть занимает ядро. Естественно, содержание дыхательного пигмента – гемоглобина при таком строении, т.е. при крупном ядре, незначительно, ведь ему в действительности недостаточно места [24].

В дальнейшем эволюционные преобразования развивались в сторону уменьшения размеров эритроцитов, увеличении концентрации, умельчения ядра, а впоследствии и его исчезновения у млекопитающих. На данный момент у высокоорганизованных организмов двояковогнутая форма красных кровяных клеток является наиболее эффективной. Ученые доказали, что гемоглобин – один из самых древних пигментов. Он даже был замечен в клетках примитивных инфузорий. В современном органическом мире гемоглобин оставил за собой господствующее положение наряду с существованием других дыхательных пигментов, поскольку переносит наибольшее количество кислорода [9].

В артериальной крови одновременно в связанном состоянии может находиться только строго определенное количество газов, то есть его концентрация имеет достаточно четкие пределы. Этот показатель называют кислородной емкостью. Он зависит от ряда факторов. Перечислим некоторые из них. Прежде всего – это количество гемоглобина. Эритроциты лягушки в этом плане значительно уступают красным клеткам крови человека. Они

содержат сравнительно небольшое количество дыхательного пигмента и соответственно концентрация их невелика. Для сравнения: гемоглобин земноводных, содержащийся в 100 мл их крови связывает объем кислорода равный 11 мл, а у человека этот показатель достигает до 25 мл [25].

К факторам, повышающим способность гемоглобина присоединять кислород, относятся такие показатели как – повышение температуры тела (у хладнокровных влияет температура окружающей среды, которая обуславливает температуру тела животных), рН внутренней среды, концентрация внутриклеточного органического фосфата [13].

Форма эритроцита лягушки, как и его внутреннее строение, позволяет переносить только определенное количество кислорода. Это связано с тем, что земноводные не нуждаются в таком количестве этого газа, как млекопитающие или птицы. Объяснение этому очень простое. У земноводных дыхание осуществляется не только через легкие, но и через покровы (кожу). Данная группа животных является холоднокровными. Это значит, что температура их тела зависит от изменения этого показателя в окружающей среде. Этот признак посредственно зависит от строения их кровеносной системы животных. Так, между камерами сердца земноводных отсутствует перегородка. Поэтому в их правом предсердии венозная и артериальная кровь смешивается и уже в таком виде поступает к тканям и органам, где будет осуществляться газообмен. Наряду с особенностями строения эритроцитов, это делает их систему обмена кислорода на углекислый газ и наоборот не столь совершенной, как у теплокровных животных [24].

Красные кровяные тельца человека и земноводных имеют ряд существенных отличий. Они значительным и огромнейшим образом влияют и на выполнение их функций. Так, эритроциты человека не имеют ядра, что значительно повышает концентрацию дыхательных пигментов, и соответственно количество переносимого кислорода. Внутри их расположено особый белок – гемоглобин. Он состоит из белка и железосодержащей части

– гемма. Эритроциты лягушки также содержат данный дыхательный пигмент, но уже в значительно меньшем количестве. Эффективность газообмена также увеличивается благодаря двояковогнутой форме эритроцитов человека. Они достаточно мелкого размера, поэтому и концентрация кровяных телец больше. Главное сходство эритроцитов человека и лягушки, впрочем как и у всех позвоночных, заключается в осуществлении единой функции – дыхательной [28].

1.2.2 Белые клетки крови амфибий

Содержание лейкоцитов с мелкими гранулами в цитоплазме – 9-25%, эозинофилов – 6-26%, базофилов – до 15-23% [12].

Образование эозинофильных гранулоцитов, а также незернистых полинуклеаров и лимфоцитов происходит в лимфо-миелоидной ткани из первоначальных родоначальных клеток гетеропластическим путем. Помимо этого гетеропластическое развитие лейкоцитов совершается и в циркулирующей крови [15].

Дифференцировка и созревание гранулоцитов проходит в несколько стадий (лейкобласт, промиелоцит, миелоцит, метамиелоцит, зрелые гранулоциты). Созревание миелоидных элементов идет в двух направлениях: морфологические изменения ядра и формирование в цитоплазме специфической зернистости, обуславливающей некоторые функциональные свойства гранулоцитов [21].

Отсутствие специализированных лимфатических узлов у холоднокровных животных компенсируется многочисленными очагами лимфопоэза, где соответственно осуществляется образование лейкоцитов [12], которое также может происходить в циркулирующей крови путем деления клеток [15].

Сезонные флуктуации наиболее типичны для нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов; в весенне-летний период наиболее значимо нарастают эозинофилы и нейтрофилы. Количество лимфоцитов повышается

зимой. Летом преобладают главным образом зрелые гемоциты.

В костном мозге в весенний и ранний летний периоды возрастает количество миелобластов, промиелоцитов и миелоцитов. Повышается также число нейтрофилов разной степени зрелости, эозинофилов, клеток лимфоидного ряда и плазматических клеток. [14].

В подслизистой кишечника лягушки количество лимфоидных клеток на разных стадиях созревания в течение всего года значительно не меняется, но повышается содержание всех компонентов в периферической крови [28].

На зимний период костный мозг амфибий будет замещен жировой тканью и признаки кроветворения не получается выявить. Но в такие органах, как печень и селезенка присутствуют в основном зрелые лимфоидные элементы [24].

Классификация лейкоцитов – белых кровяных клеток земноводных затруднена, из-за того, что их строение может значительно варьировать у разнообразных видов, частично из-за отсутствия единой номенклатуры в литературе. Так, в некоторых источниках гранулоциты делятся на три группы – эозинофилы, азурофилы и нейтрофилы – в то время как в других только на две – эозинофилы и гетерофилы, или эозинофилы и нейтрофилы [23].

В целом, лейкоциты земноводных можно разделить на две достаточно большие группы: гранулоциты и мононуклеары (то есть имеющие сегментированное и несегментированное ядро). Гранулоциты также можно разделить на две группы – ацидофилы и базофилы – по цвету, в который окрашивается их цитоплазма в мазках крови по Романовскому. Ацидофилы, в свою очередь, делятся на гетерофилы и эозинофилы, которые отличаются друг от друга формой и цветом гранул. Базофилы, лимфоциты и моноциты крови рептилий схожи с таковыми у млекопитающих и птиц. Шестой тип клеток, азурофилы, часто описывается в литературе и считается моноцитами с азурофильными гранулами [18].

Также все клетки белой крови разделены на незернистые формы

(лимфоциты, моноциты) и зернистые гранулоциты (базофилы, эозинофилы и нейтрофилы) [20]. В 1 мм³ периферической крови лягушек содержится около 25 тысяч различных форм лейкоцитов. Кровь резко лимфоидная, то есть содержание лимфоцитов в крови преобладает над другими формами лейкоцитов. С возрастом лимфоидность несколько уменьшается: у молодых амфибий доля лимфоцитов составляет 82,6%, у более взрослых – 75,2%. В крови взрослых лягушек содержится 17,1% нейтрофилов, 5,7% эозинофилов, 1,9% базофилов, которые относятся к гранулоцитам [10].

Среди белых кровяных телец на гранулоциты приходилось около 20%, 80% – на агранулоциты. Лягушкам свойственно наличие лейкоцитов разнообразных стадий зрелости. Среди гранулоцитов были выявлены такие формы лейкоцитов как миелобласты (1,5%), промиелоциты (1,6%) и миелоциты (4,7%). Из палочкоядерных гранулоцитов на эозинофильные приходилось 3%, на нейтрофильные – 2% и на базофильные – 1%. Зрелых гранулоцитов было примерно 5%: сегментоядерные эозинофилы составляли около 1%, сегментоядерные нейтрофилы – 2 % и сегментоядерные базофилы – 1% [30].

Из клеток лимфоцитопозитического ряда лимфоциты были самыми многочисленными – 68,5%, также, но в немного меньшем количестве находились пролимфоциты – 6%, лимфобласты составляли 2%. Из клеток моноцитопозитического ряда отмечают монобласты (2,4%) и моноциты (1,6%) [31].

Нейтрофилы амфибий имеют сегментированное ядро с достаточно массивно конденсированным хроматином, который примыкает к биомембране. Светооптически в цитоплазме этих клеток плохо выявляется их специфическая (нейтрофильная) зернистость, хотя обнаруживаются одиночные голубоватые гранулки – остатки базофильной цитоплазмы юных форм [10]. Нейтрофилы на разных стадиях зрелости характеризуются по морфологической и по функциональной активности [11]. В гранулах нейтрофилов выявлены дизоксирибозокислотаза, фосфатаза,

глюкуронидаза, пероксидаза. В весенне-летний период в нейтрофилах земноводных увеличивается количество рибонуклеиновой кислоты, гликогена, липидов и возрастает активность ферментов, что соответственно говорит о повышении их физио-биологической активности [34]. Нейтрофилы выполняют в организме защитную функцию, которая осуществляется посредством фагоцитоза и высокой активности внутриклеточных ферментов [20].

Эозинофилы содержат ядро из нескольких сегментов, обычно их 2 или 3. Эти сегменты расположены в клетке эксцентрично [34]. Цитоплазма включает большое количество вакуолей с прозрачным жидким содержимым. Гранулы эозинофилов амфибий несколько более грубые, чем у млекопитающих [8]. Эти самые гранулы – гомогенные плотные образования, которые окружены одинарной мембраной, в которых выявлено присутствие пероксидазы, кислой фосфатазы и арилсульфатазы [33]. Эозинофилы обладают дезинфицирующей способностью в отношении продуктов белковой природы, а также участвуют в аллергических реакциях организма и процессах фагоцитоза [20].

Базофилы – округлые клетки с дольчатым, центрально расположенным ядром. Органоиды в цитоплазме менее развиты, чем в других гранулоцитах - нейтрофилах или эозинофилах. Специфические гранулы как правило крупные, их матрикс содержит плотно прилегающие друг к другу осмиофильные ламеллярные структуры; другая же часть матрикса заполнена мелкозернистым слабо окрашенным веществом [33]. Функция базофилов лягушек пока еще мало изучена. Наличие в базофильных гранулах гистамина предполагает возможное участие базофилов в аллергических и воспалительных реакциях, также их участие в обмене гистамина и гепарина не оспаривается [20].

Лимфоциты лягушек по строению мало отличаются от лимфоцитов других позвоночных и представлены различными размерами - большими, средними и малыми формами [14]. Ядро, как правило, овальной формы,

бывает что с небольшими инвагинациями. Хроматин в виде небольших скоплений расположен ближе к ядерной мембране, т.е. более центрально. Цитоплазма содержит небольшое число округлых, овальных и удлинённых энергетических органелл – митохондрий, канальцы и кармашки эндоплазматического ретикула [34]. Нередко в цитоплазме обнаруживаются мультивезикулярные тельца [8]. Ультраструктура лимфоцитов может быть двух типов. Первый тип включает крупное ядро, занимающее более половины от общего объема клетки, и обеднённую органоидами цитоплазму. Лимфоциты второго типа имеют меньшее ядро и относительно больший объем цитоплазмы с большим содержанием органелл [14].

Определённые типы лимфоцитов обеспечивают гуморальный иммунитет именно благодаря способности синтезировать антитела, играют роль фиксаторов токсинов в организме [20]; малые лимфоциты дают начало гемопоэтическим началам клеток [34].

В крови бесхвостых амфибий всегда обнаруживаются округлоядерные лейкоциты, клетки с бобовидным или характерным для метамиелоцита ядром, а также лимфоидные формы крупных размеров, которые напоминают лимфобласты [8].

Моноциты лягушек содержат бобовидное ядро, расположенное эксцентрически. Пестрый яркий вид гиалоплазме придают многочисленные вакуоли различного диаметра и другие цитоплазматические структуры. В цитоплазме содержатся аппарат Гольджи, расположенные по всему объёму митохондрии, многочисленные канальцы гранулярного эндоплазматического ретикула, мелкие азурофильные гранулы [33].

В гранулах выявлена кислая фосфатаза, сукцинатдегидрогеназа, пероксидаза, цитохромоксидаза, лизоцим. Основная функция моноцитов – фагоцитоз возбудителей инфекций и метаболитов клеточного распада, который обеспечивается способностью к самостоятельному передвижению [20].

Тромбоциты амфибий морфологически практически не отличаются от тромбоцитов других позвоночных (помимо млекопитающих), имеют удлиненно-овальную или веретенообразную форму, включают большое неоформленное ядро темно-фиолетового цвета, окруженное узкой каймой слабо базофильной цитоплазмы темно-бордового цвета [8].

Длина тромбоцитов земноводных 12-21 мкм, ширина 5-10 мкм; количество составляет $0,0085-0,0216 \cdot 10^{12} \text{л}^{-1}$. Клетки способны размножаться непрямым делением (митозом) [9].

Все клетки белой «защитной» крови делятся на незернистые формы (лимфоциты, моноциты) и зернистые гранулоциты (базофилы, эозинофилы и нейтрофилы) [20].

В 1 мм³ периферической крови лягушек обнаруживается около 25 тыс. лейкоцитов [10]. Лейкоцитарная формула носит лимфоидный характер – от 86% до 96% лимфоцитов. Среди клеток белой крови наряду с лимфоцитами также встречаются нейтрофилы разной степени зрелости, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоплазмоциты.

С возрастом лимфоидный характер крови амфибий несколько снижается: у молодых лягушек доля лимфоцитов составляет 83%, у взрослых – 75%. В крови взрослых лягушек содержится 17% нейтрофилов, 5,7% эозинофилов, 1,9% базофилов [10].

Также следует отметить, что в зависимости от того, в какой экосистеме находятся амфибии, лейкоцитарная формула будет изменяться. Увеличение количества малодифференцированных форм нейтрофилов и эозинофильных лейкоцитов у животных, находящихся в городской черте, можно рассматривать как развитие иммунных процессов и повышение защитной функции крови. В то же время резкое снижение числа общих лейкоцитов и эритроцитов свидетельствует об относительном угнетении процессов гемопоэза и низком адаптивном потенциале особей данного вида, что, по-видимому, и обуславливает постепенное исчезновение земноводных с территории города [14].

У моноцитов лягушек бобовидное ядро расположено ближе к периферии. В цитоплазме находятся многочисленные вакуоли различного диаметра, комплекс Гольджи, рассеянные митохондрии, большое количество канальцев шероховатого эндоплазматического ретикулума, мелкие азурофильные гранулы, в которых выявлена кислая фосфатаза, сукцинатдегидрогеназа, пероксидаза, цитохромоксидаза, лизоцим. Основная функция моноцитов (с выходом в ткани, уже макрофагов) – фагоцитоз возбудителей инфекций и продуктов клеточного распада, который обеспечивается способностью к самостоятельному передвижению. Макрофаги участвуют в захвате, переносе и представлении антигенов лимфоцитам при возникновении клеточных и гуморальных иммунных реакций [21].

У нейтрофилов Земноводных имеется сегментированное ядро с крупным скоплением хроматина, примыкающего к мембране. В их цитоплазме обнаруживаются одиночные синеватые гранулы – остатки базофильной цитоплазмы юных форм. В гранулах нейтрофилов выявлены ДНК-за, фосфатаза, глюкуронидаза, пероксидаза [31].

В гиалоплазме эозинофилов встречаются гранулы двух типов – специфические (эозинофильные) и неспецифические (азурофильные). Эозинофильные гранулы содержат эозинофильный катионный белок, эозинофильную пероксидазу, гистаминазу. Азурофильные гранулы включают кислую фосфатазу, арилсульфатазу [21]. Ядро у эозинофилов, как и у крупных клеток – моноцитов, расположено не по центру, но состоит из 2-3 сегментов [33].

Базофилы – овальные клетки с дольчатым центрально расположенным ядром. Цитоплазматические органеллы менее развиты, чем в нейтрофилах или эозинофилах. Специфические гранулы как правило достаточно крупные, их матрикс содержит плотно прилегающие друг к другу осмиофильные ламеллярные структуры, остальная часть матрикса заполнена мелкозернистым не особо окрашенным веществом [24].

В крови бесхвостых постоянно присутствуют круглоядерные лейкоциты, клетки с бобовидным или характерным для метамиелоцита ядром, а также лимфоидные формы крупных размеров, которые напоминают лимфобласты [8].

1.3 Действие температурного фактора на плазматическую мембрану клеток крови

Плазматическая мембрана окружает каждую клетку и определяет ее величину, обеспечивая сохранение существенных различий между клеточным содержимым и окружающей ее средой. Именно благодаря мембране, обеспечивается пространственное расположение всех органелл клетки и ядра. Плазматические мембраны также способствуют ограничению гиалоплазмы от клеточной оболочки и вакуоли. Внутри гиалоплазмы плазматические мембраны образуют эндоплазматический ретикулум (эндоплазматическую сеть) [4].

Все биомембраны представляют собой одно целое, состоящее из молекул белков и фосфолипидов, которые удерживаются с помощью нековалентных химических связей. Мембранные липиды представлены гидрофобными органическими молекулами, имеющими полярные гидрофильные «головки» и длинные неполярные гидрофобные «хвосты», которые представлены цепями жирных кислот. Большая часть липидов, входящая в состав мембран, представлена преимущественно фосфолипидами, содержащими остаток фосфорной кислоты. Неполярные хвосты молекул обращены друг к другу, а полярные головки располагаются снаружи, образуя гидрофильные, или олеофобные поверхности. Липидные и белковые молекулы образуют ровный непрерывный бислой толщиной 4-5 микрон. Липидный двойной слой является основной структурой мембраны, создающий относительно непроницаемый барьер для большинства водорастворимых и жирорастворимых молекул [7].

С липидными гидрофильными головками соединяются

соответствующие периферические мембранные белки, благодаря наличию электростатического взаимодействия. Часть белковых молекул погружена в слой липидов за счет взаимодействия с их неполярными хвостами (полуинтегральные белки), другая часть пронизывает липидный бислой насквозь, их называют интегральными белками [15].

Текучесть является одним из основных важных свойств цитоплазматических мембран. Мембраны клеток обычно представляют собой динамические подвижные структуры, их основная часть обладает способностью к достаточно быстрому перемещению в плоскости мембраны. В пределах слоя мембраны имеются своеобразные переходы, так называемые flip-flop-каналы. Важнейшую роль в переходах между отдельными слоями мембраны играют белки-транслокаторы [7].

Жидкая консистенция липидного двойного слоя плазмалеммы способствует простой диффузии мембранных белков и их взаимодействию между собой. Это в свою очередь способствует простому варианту транспорта компонентов плазмалеммы из мест возникновения в другие части клетки. Благодаря текучести мембраны способны сливаться друг с другом, причем способность к регуляции их проницаемости не утрачивается [2].

В состав большинства мембран входит стероидный липид холестерол (холестерин). Количество холестерола на протяжении жизни клетки варьирует. Этим в значительной мере обусловлена жидкость мембраны: чем больше холестерола, тем выше пластичность, эластичность. Степень жидкости мембраны зависит также от соотношения количества насыщенных и ненасыщенных остатков жирных кислот в липидных молекулах. Чем больше в мембране остатков ненасыщенных жирных кислот, тем выше степень её жидкости. Последняя оказывает влияние на активность мембранных ферментов [4].

Плазмалемма выполняет ряд специфических функций. Сущность барьерной функции заключается в том, что клеточная мембрана при помощи специализированных механизмов участвует в создании концентрационных

градиентов, препятствуя свободной (обратной) диффузии. При этом плазматическая мембрана участвует в механизмах электрогенеза. Она способствует созданию потенциала покоя, генерации потенциала действия, принимает активное участие в механизмах распространения биоэлектрических импульсов по возбудимым структурам [7].

Вместе с барьерной функцией, плазматическая мембрана принимает значительное активное участие в грамотной регуляции внутриклеточного содержимого, а также осуществлении внутриклеточных реакций, благодаря рецепции внеклеточных биологически активных веществ, что приводит к изменению активности ферментных систем мембраны и запуску механизмов вторичных «сообщителей информации» [16].

Рецепторная функция мембраны связана с местоположением на плазматической мембране специализированных структур, связанных со специфическим узнаванием химических или физических факторов. Многие рецепторные белки представляют собой гликопротеиды, с наружной стороны клетки содержат полисахаридные боковые цепочки. Часть таких гликопротеидов выполняет роль рецепторов-гормонов. При связывании гормона со своим определенным рецептором, изменяется структура гликопротеида, что приводит к запуску клеточного ответа. Открываются каналы, по которым специфические вещества поступают в клетку или выводятся из нее. Клеточная поверхность обладает большим набором рецепторов, делающих возможными специфические реакции с различными агентами. Роль многих клеточных рецепторов заключается в передаче сигналов снаружи внутрь клетки [35].

Разнообразные функции мембраны выполняются при помощи особенных белков. Благодаря этим структурным компонентам осуществляется молекулярный транспорт внутрь клетки или из нее. Часть белков выполняют ферментативную и каталитическую функцию, они ускоряют реакции, которые зависимы и связаны с мембраной клетки. Благодаря этим белкам осуществляется структурная связь цитоскелета с

внеклеточным содержимым, а также осуществляется реакция получения и преобразования химических сигналов из окружающей среды [3].

При фотосинтезе и дыхании в мембранах таких органелл как хлоропласты и митохондрии действуют системы переноса энергии, в которых тоже участвуют мембранные белки [6].

Плазматические мембраны обладают высокоизбирательным фильтром, который поддерживает разницу концентрационный градиент ионов по обе стороны, что позволяет питательным веществам проникать внутрь клетки, а продуктам выделения выходить наружу [5].

Биологические высокомолекулярные структуры, к которым относятся и плазматические клеточные мембраны, характеризуются высокой упорядоченностью расположения своих составных элементов в пространстве и большой степенью сложности.

Комплекс экспериментально полученных данных свидетельствует в пользу того, что структурный переход мембран при 17°C -20°C зарождается в липидных областях, которые не содержат холестерина. Поскольку при этом притрагивается целый ряд функций, связанных с белками, то такие области, скорее всего, включают в себя близкие липиды полифункциональных белковых систем, по всей видимости, внутримембранных частиц [33].

Существуют некоторые промежутки (области) температур, при которых плазматическая мембрана претерпевает ряд структурных изменений, ведущих к гемолизу.

Область температур 25-46°C. В этих областях наблюдаются структурные программные перестройки эритроцитарной мембраны, которые зарождаются в ее липидной фазе. При температуре гемолиза (разрушения) в эритроцитарной мембране имеются области фазоразделенных липидов, по границам которых образуются щелки, которые в последствии дадут начало гемолизу. Действие температуры связано с расплавлением липидов в разнообразных областях эритроцитарной мембраны. В эритроцитарной мембране в области физиологических температур наблюдаются два

температурно-индуцированных структурных перехода (при 28-36 и 42-46°C). Возможно также, что в данной области температур могут происходить переходы, зарождающиеся в белковых компонентах мембраны [30].

В области температур выше 46°C в мембранах происходят переходы, которые имеют необратимый характер, что взаимосвязано с потерей ряда функциональных свойств клеток. Структурные перестройки в мембранах эритроцитов при высоких температурах сопровождаются изменением формы и деформируемости эритроцитов, соответственно изменяется морфометрические показатели клеток. При нагревании клеток от 43 до 54 градусов наблюдается образование сфероцитов; а в области температур от 55 до 77 градусов на их поверхности образуются бугристость и зазубренности, и происходит разрушение эритроцитов [40].

Деформируемость эритроцитов, изменения по их фильтруемости после инкубации клеток в течение 20 минут при повышенных температурах, начинает постепенно уменьшаться при 45 градусах и достаточно резко исчезает в области 49-50 градусов. При этом происходит полная потеря деформируемости и это соответствует переходу к форме диск-сфера, наблюдаемому под микроскопом. Переход, наблюдаемый в мембране при 42-50 градусов, связан с изменением структуры входящего в ее состав белка спектрина. Также известно, что термоустойчивость белка спектрина в изолированных мембранах и в целых эритроцитах довольно различна: переход, который обусловлен денатурационными изменениями спектрина, происходит в изолированной мембране в области 46 градусов, в то время как в эритроцитах в области 50 градусов. Совпадение же температур, при которых нарушается структура спектрина в составе целых эритроцитов и наблюдаются морфофизиологические изменения клеток, дает основание думать, что между этими процессами существует причинно-следственная связь, причем зарождателем структурных перестроек в мембране является белок спектрин [43].

Если учитывать ведущую функцию эритроцитов – газообмен, следует

отметить влияние температуры на растворимость кислорода в крови и на сродство гемоглобина к кислороду [40].

Общеизвестно, что растворимость газов в воде уменьшается с увеличением температуры. Так, в воде, насыщенной воздухом при 38 градусов, 30 градусов и 20 градусов количество растворенного кислорода соответственно равно: 6.8, 7.36, 9.17 мг/л. При этом парциальное давление кислорода пропорционально составляет 148, 152 и 155 мм. рт. ст., то есть в данном диапазоне концентрация кислорода изменяется на 35% при почти неизменном его давлении [21].

После выдержке крови при температуре 5°C поверхность клетки выпуклая в центре (в зоне расположения ядра), ближе к краю она вогнутая, на периферии – с мелкими складками, клетка имеет круглую форму. При комнатной температуре (20°C) инкубации эритроциты округлой формы с выпуклой поверхностью в области ядра и складчатой поверхностью плазматической мембраны, что типично для красных кровяных телец низших позвоночных животных. В условиях увеличенной температуры инкубации, равной 40°C, количество складок все же меньше и выпуклость эритроцитов слабее по сравнению с температурой 20°C, форма клетки ближе к более круглой. Как всем известно, что для лейкоцитов характерно то, что любое колебание температуры инкубации также воздействует на их морфологию, а также и на физиологию [9].

Снижение температуры инкубации до 5°C не влияет на морфометрические и физиологические характеристики эритроцитов по сравнению с температурой 20°C. Повышение температуры до 40°C приводит к уменьшению объема где-то примерно на 30% и увеличению периметра клетки примерно на 6% красных кровяных телец по сравнению с комнатной температурой. При понижении температуры инкубации площадь, объем и большой диаметр возрастают приблизительно на 44%, 17% и 16% соответственно по сравнению с инкубацией при температуре 20°C.

Повышение температуры инкубации до 40°C также способствует

увеличению морфологических показателей – площади (на 60%), объема (на 130%), периметра (на 5%) по сравнению с комнатной комфортной температурой [12].

Было установлено, что при пониженной температуре инкубации (5°C) упругость (модуль Юнга) эритроцитов и лейкоцитов на 9% и 16% выше по сравнению с температурой 20°C. Повышенная температура увеличивает адгезионный показатель у эритроцитов на 20% , лейкоцитов – на 15%. Данные экспериментальные результаты соответствуют литературным источникам [2], согласно которым адаптация белковых молекул к снижению температуры осуществляется за счет их лабилизации, что, по всей видимости, ведет к увеличению упругости цитоплазматической мембраны [6].

Методом атомно-силовой микроскопии изучают действие температурного фактора на морфометрические и физиологические показатели красных и белых клеток крови. Известно, что при пониженной температуре инкубации (5°C) морфометрические показатели эритроцитов не изменяются, при повышении температуры – увеличивается большой диаметр, периметр красных клеток крови и уменьшается их объем. Снижение температуры инкубации (до 5°C) приводит к изменению, а именно увеличению большого диаметра, объема и площади лейкоцитов, повышение температуры (до 40°C) ведет к увеличению их периметра и снижению объема. Кроме этого, при снижении температуры инкубации увеличивается упругие свойства эритроцитов и лейкоцитов, а при повышении температуры инкубации повышается адгезия клеток [37].

Температурная травма клеток происходит под действием высоких температур и имеет специфические губительные и угнетающие механизмы. Действие повышенных температур ведет к термической денатурации (сворачиванию) веществ из состава цитоплазматической мембраны (белки) с исчезновением специфических функций каналов, ионных насосов, ферментов, антигенов, Вполне возможно также образование аутоантигенов с

последующей аутоиммунной реакцией. Денатурация веществ из гиалоплазмы и клеточных органелл имеет также соответствующие последствия для клетки [23].

Действие пониженных температур ведет к кристаллизации несвязанной воды в момент замораживания и размораживания, а образующиеся внутриклеточно кристаллы механическим образом разрушают цитоплазматическую мембрану, а также мембраны клеточных органелл с соответствующими последствиями [43].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на лягушках рода *Rana ridibunda*, отловленных из реки Везелка в черте г. Белгорода. Объектами исследования служили ядерные эритроциты и лейкоциты Земноводных.

Кровь для исследований после дачи легкого эфирного наркоза брали из сердца. В качестве антикоагулянта использовали гепарин в количестве 10 ед./мл. В работе использовали физиологический раствор (NaCl 0,65%).

Одним из современных методов исследования особенностей плазматической мембраны является метод атомно-силовой микроскопии [27].

Данный метод дает возможность получить сканограммы с разрешением от нанометра [43]. Преимуществом использования АСМ для биологов является то, что с помощью данного метода можно изучать непроводящие объекты в невакуумной среде без окрашивания и напыления препаратов [42].

В наших экспериментах использован полуконтактный режим работы атомно-силового микроскопа [30]. При данном режиме сканирования, во-первых, устранены латеральные силы, действующие на зонд со стороны поверхности, что упрощает интерпретацию получаемых изображений, во-вторых, сканирование плазматической мембраны клетки осуществляется колеблющимся кантилевером, что способствует существенному снижению его давления на поверхность образца (см. рисунок 1). Это позволяет работать с мягким и легко разрушающимся материалом, таким как живые клетки крови.

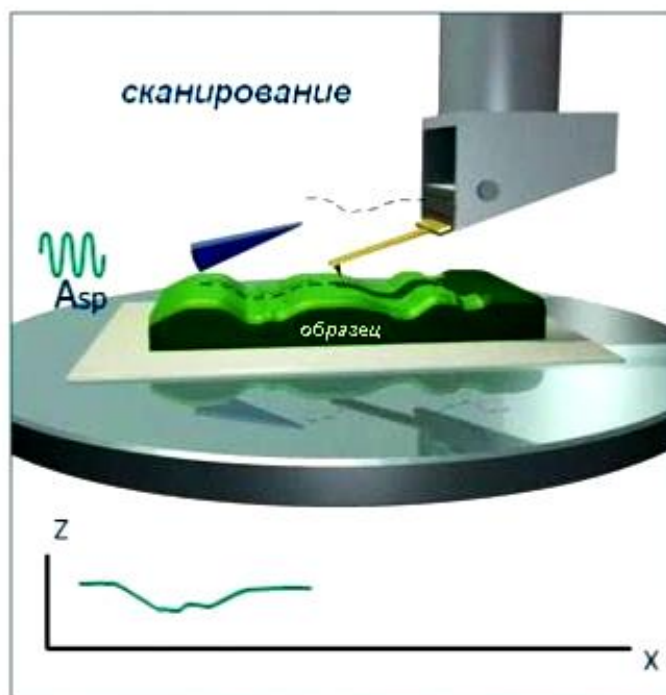


Рисунок 1 – Сканирование образца в полуконтактном режиме
(www.ntmdt.com)

Использование конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (Рис. 2) позволяет получить качественное информативное изображение как фиксированных объектов, так и живых клеток и тканей, окрашенных флуоресцентными красителями, а также восстановить трехмерную структуру объекта по сериям конфокальных оптических срезов [5]. Данный метод позволяет изучить внутриклеточные механизмы миграционной активности клеток крови земноводных, в том числе особенности перестройки актинового компонента цитоскелета при спонтанных локомоциях.



Рисунок 2 – C1 конфигурация конфокального лазерного сканирующего микроскопа

Методом атомно-силовой микроскопии изучали морфометрические показатели клеток крови *Rana ridibunda* и упруго-эластические и адгезионные свойства их плазмалеммы.

Полученную кровь центрифугировали 10 мин при относительной силе центрифугирования равной 400g. Суспензии эритроцитов и лейкоцитов разбавляли изотоническими растворами. Далее клетки крови инкубировали при комнатной (20°C), пониженной (5°C) и повышенной (40°C) температурах (t°C) в течение 2 ч. После инкубации гемоцитов делали мазки крови. Методом атомно-силовой микроскопии исследовали по 20-25 клеток в каждой из серий пробоподготовки. Сканирование клеток крови проводили на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА Вита (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71) (Рис. 3).

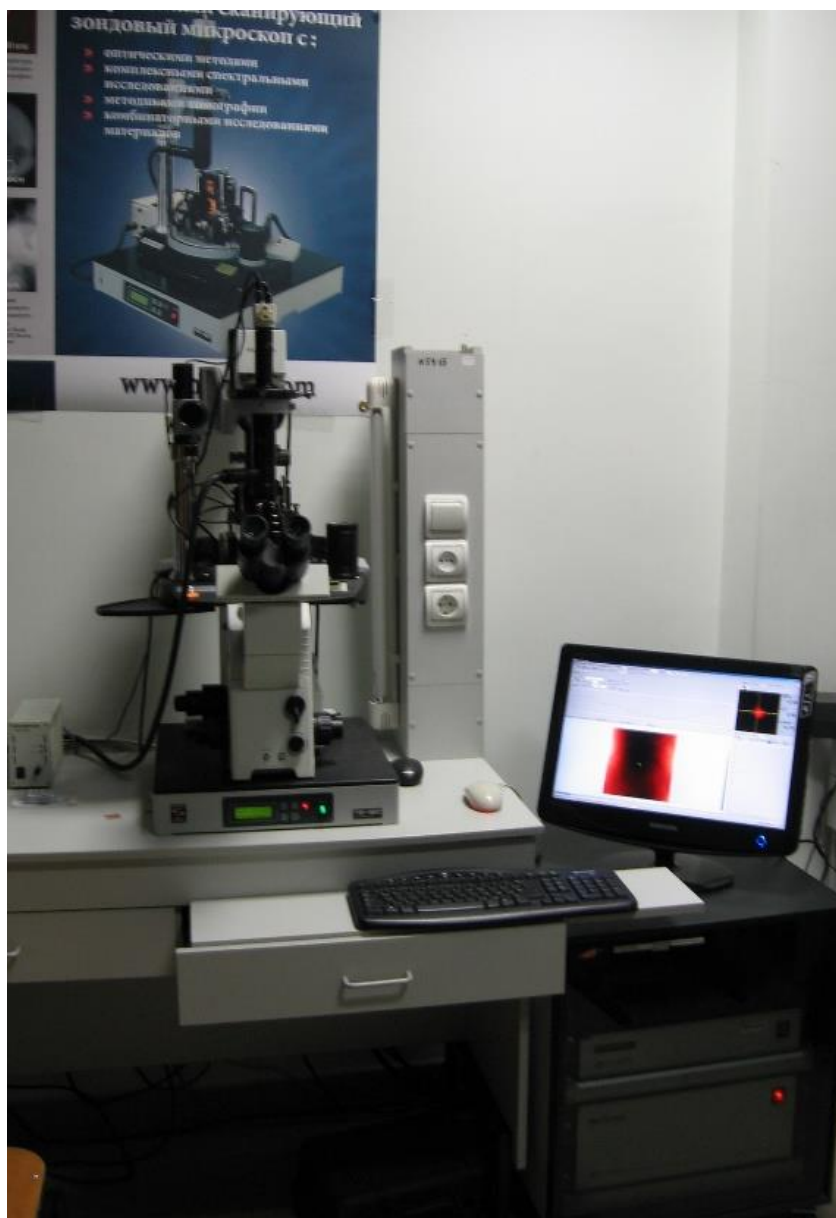


Рисунок 3 – Система зондового атомно-силового микроскопа

Морфометрические параметры клеток изучали в режиме полуконтактного сканирования (Федорова М.З. и соавт., 2008) с частотой развертки 0,6-0,8 Hz, используя кантилевер серии NSG03 с жесткостью 1,1Н/м и радиусом закругления 10 нм [27]. На сканах измеряли такие показатели как площадь (S , мкм^2), большой (D , мкм) и малый (d , мкм) диаметры, а также объем (V , мкм^3) клеток.

С помощью программного обеспечения «Nova» (NT MDT, Зеленоград, 2009) строили кривые профиля клеток крови, на которых определяли их адгезию к кантилеверу (нН) [32].

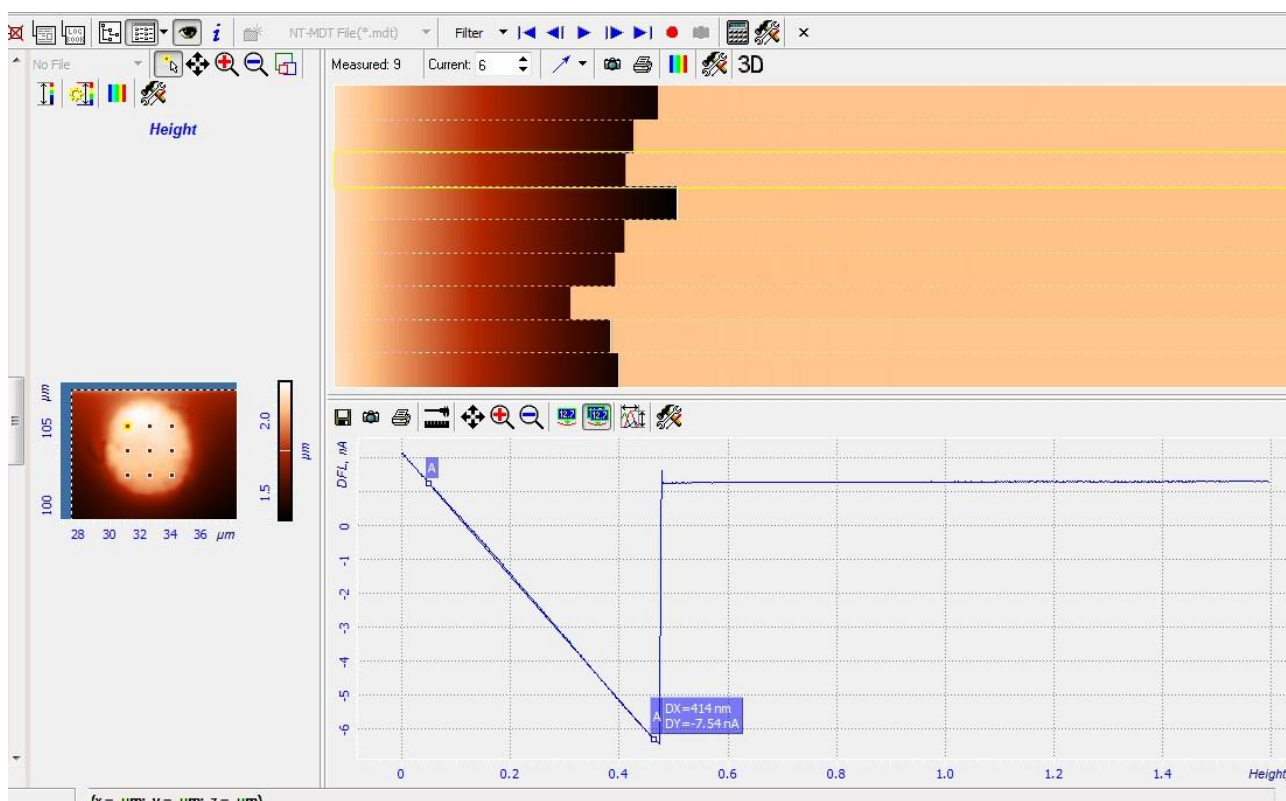


Рисунок 4 – Определение адгезии клетки крови с помощью программного обеспечения «Nova 1.0.26.1058»

Модуль Юнга, характеризующий упругость эритроцитов и ПМЯЛ измеряли на АСМ в режиме силовой спектроскопии. 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 (Рис. 5).

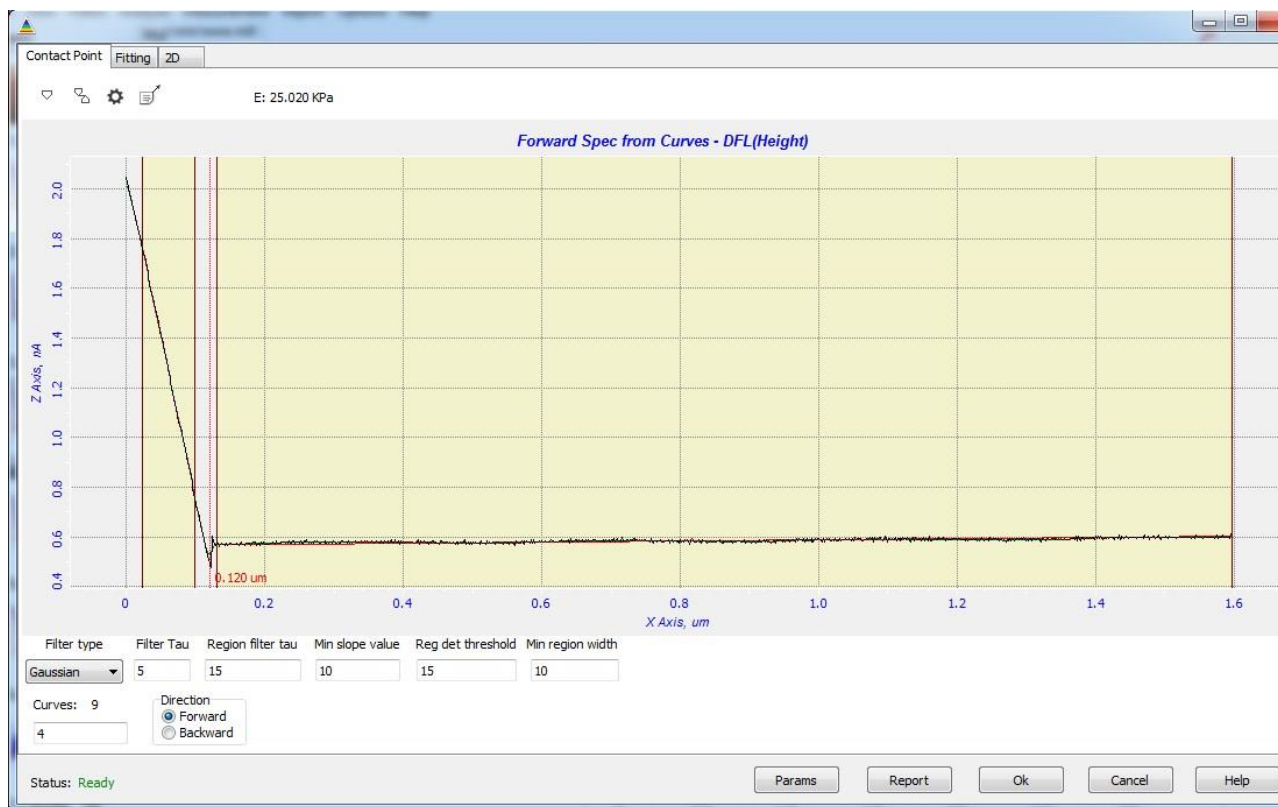


Рисунок 5 – Определение модуля Юнга (упругости) клеток крови с помощью программы «Image Analysis 3.5.0.2070»

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики. С помощью компьютерных программ Excel 7.0 и Statistica 6.0 вычисляли значение средней арифметической выборочной совокупности (M) и стандартной ошибки среднего значения (m). С помощью непарного (двухвыборочного) t -критерия Стьюдента определяли достоверность различий между значениями признаков сравниваемых групп. За уровень статистически значимых принимали изменения при $p < 0,05$.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные методом атомно-силовой спектроскопии морфометрические показатели эритроцитов лягушки озёрной, которые инкубировали при разной температуре, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Морфометрические параметры эритроцитов *Rana ridibunda* Pall.

Температура инкубации, °С	Показатели, ед. изм.			
	S, мкм ²	V, мкм ³	D, мкм	d, мкм
5°С	260,02±6,07*	445,04±4,91*	26,01±0,13*	15,63±0,15*
20°С	220,39±4,78	392,96±10,70	24,84±0,13	14,04±0,09
40°С	179,59±13,68*	363,72±14,36	22,02±0,15*	13,75±0,08*

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, увеличение и снижение температуры инкубации красных клеток крови лягушки способствовало изменению их площади. Так, при повышении температуры инкубации показатель площади эритроцитов снизился на 18,51%, при снижении температуры инкубации – увеличился на 17,98% по сравнению с контрольной температурой.

Показатель объема красных клеток крови при уменьшении температуры инкубации увеличился на 13,25% по сравнению с комнатной температурой, при повышении температуры инкубации значение данного показателя осталось на уровне контрольной группы.

Показатели, характеризующие большой и малый диаметр эритроцитов изменялись аналогично площади. Так, при повышении температуры инкубации показатель большого диаметра эритроцитов снизился на 11,35%, малого – на 2,07%, при снижении температуры инкубации большой диаметр увеличился на 4,71%, малый – на 11,32% по сравнению с контрольной температурой.

Полученные методом АСМ морфометрические показатели лейкоцитов лягушки озёрной представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Морфометрические параметры лейкоцитов *Rana ridibunda Pall.*

Температура инкубации, °С	Показатели, ед. изм.			
	S, мкм ²	V, мкм ³	D, мкм	d, мкм
5°С	121,32±4,4*	243,33±3,45*	10,85±0,15*	10,01±0,07
20°С	110,71±1,18	152,16±2,02	10,11±0,25	9,72±0,22
40°С	70,56±2,21*	99,09±1,41*	7,26±0,09*	6,58±0,16*

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, при снижении температуры инкубации показатели площади, объема и большого диаметра эритроцитов лягушки увеличились на 19,28%, 59,92% и 7,32% соответственно по сравнению с контрольной температурой. При увеличении температуры инкубации красных клеток крови наблюдали снижение показателей площади, объема, большого и малого диаметров на 36,27%, 34,88%, 28,19% и 32,30% соответственно по сравнению с аналогичными параметрами клеток, инкубированными при комнатной температуре.

Результаты исследований физических показателей красных клеток крови *Rana ridibunda Pall.*, инкубированных при разных температурах, представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Показатели адгезии и модуля Юнга эритроцитов *Rana ridibunda Pall.*

Температура инкубации, °С	Адгезия, нН	Модуль Юнга, кПа
5°С	27,81±1,44	11,91±0,01*
20°С	28,28±1,64	16,67±0,01
40°С	27,30±1,12	10,76±0,01*

Примечание: * - достоверное различие по сравнению с температурой 20°С при

условии $p < 0,05$ (t-критерий Стьюдента).

Показатели адгезии красных клеток крови при повышении и снижении температуры инкубации по сравнению с контролем практически не изменились. Упругость эритроцитов уменьшилась на 28,55% при снижении температуры инкубации и на 35,45% при повышении температуры инкубации по сравнению с контролем.

Данные физических показателей лейкоцитов *Rana ridibunda Pall.* представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Показатели адгезии и модуля Юнга лейкоцитов *Rana ridibunda Pall.*

Температура инкубации, °C	Адгезия, нН	Модуль Юнга, кПа
5°C	15,87±0,97*	12,25±0,01*
20°C	33,97±0,26	20,22±0,01
40°C	23,84±1,57*	15,48±0,01*

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

Показатели адгезии белых клеток крови при повышении и снижении температуры инкубации уменьшились на 29,82% и 53,28% соответственно по сравнению с контролем. Показатели упругости лейкоцитов уменьшилась на 39,42% при снижении температуры инкубации и на 23,44% при повышении температуры инкубации по сравнению с контролем.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено увеличение морфометрических показателей эритроцитов и лейкоцитов лягушек при снижении температуры инкубации и уменьшение аналогичных показателей при повышении температуры. При снижении и увеличении температуры инкубации снизились у эритроцитов показатели упругости, у лейкоцитов – адгезия и упругость плазмалеммы.

Можно предположить, что изменения морфометрических параметров

эритроцитов и лейкоцитов *Rana ridibunda Pall.* после инкубации в условиях повышенной и пониженной температур являются следствием структурной организации мембраны клеток крови [32]. Важная роль в акклиматизации отводится мембранным липидам. В условиях холодого действия для ответной реакции клетки характерно увеличение содержания в плазмалемме ненасыщенных жирных кислот, которые определяют её вязкость [41] функции [42] и, вероятно, изменения морфометрических параметров. Кроме этого, повышение и понижение температуры инкубации способствует изменению структурной композиции мембранных белков, а также их взаимодействию с липидами [38], что также может способствовать изменению морфометрических и физиологических показателей плазматической мембраны клеток.

Методом атомно-силовой микроскопии получены АСМ-изображения эритроцитов, которые были инкубированы в условиях повышенной, контрольной и пониженной температур (рис. 6-8).

Как видно на скане 6, после инкубации красных клеток крови *Rana ridibunda Pall.* при температуре 5°C, поверхность эритроцитов имеет выпуклый вид в центре, в области цитоплазмы наблюдается мелкая складчатость, характерная для эритроцитов низших позвоночных животных [11]. Форма клетки эллипсоидная.

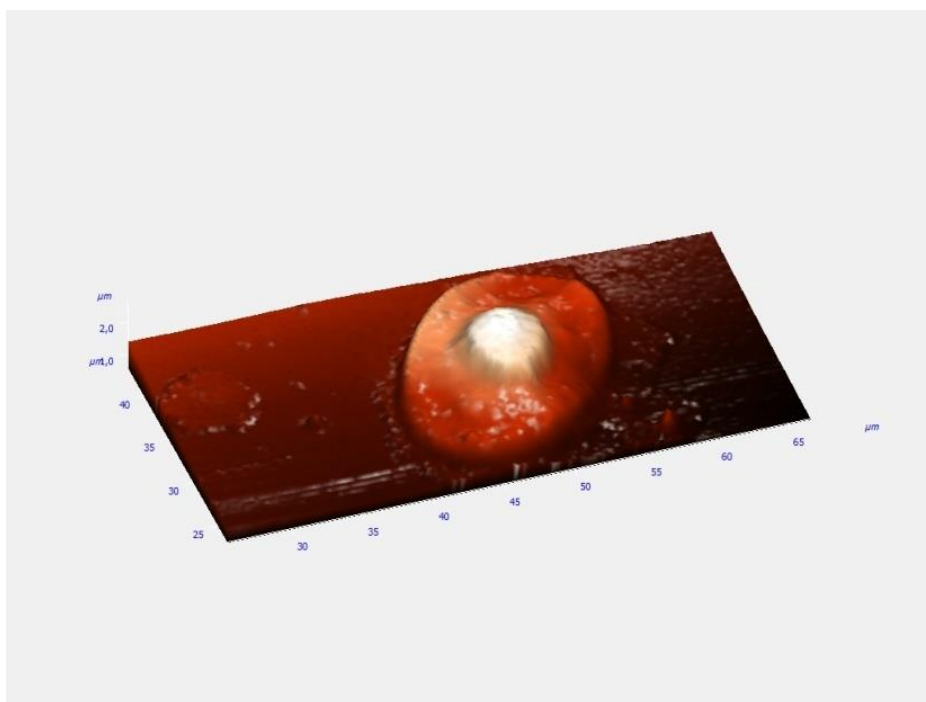


Рисунок 6 – АСМ-изображение эритроцитов *Rana ridibunda* Pall.
после инкубации при температуре 5°C.

При комнатной температуре инкубации эллиптическая форма клетки сохраняется, область локализации ядра становится более вогнутым, по сравнению с остальной частью клетки (см. рис.7).

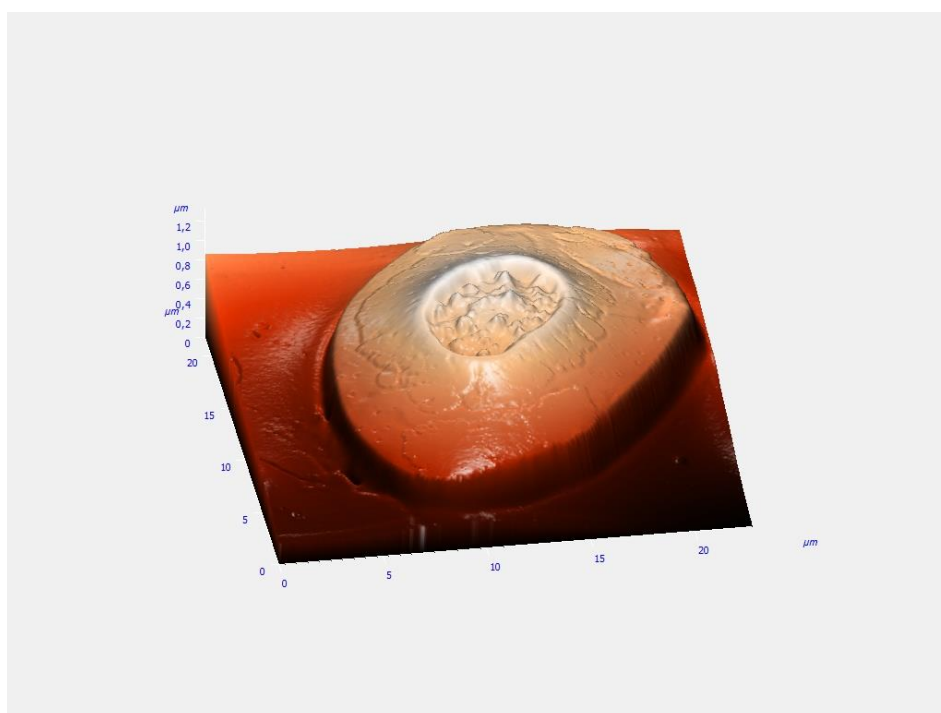


Рисунок 7 – АСМ-изображение эритроцитов *Rana ridibunda* Pall.

после инкубации при температуре 20°C.

При повышенной температуре инкубации (40°C), клетка поддерживает свою эллиптическую форму, однако поверхность плазмалеммы принимает более шероховатый вид.

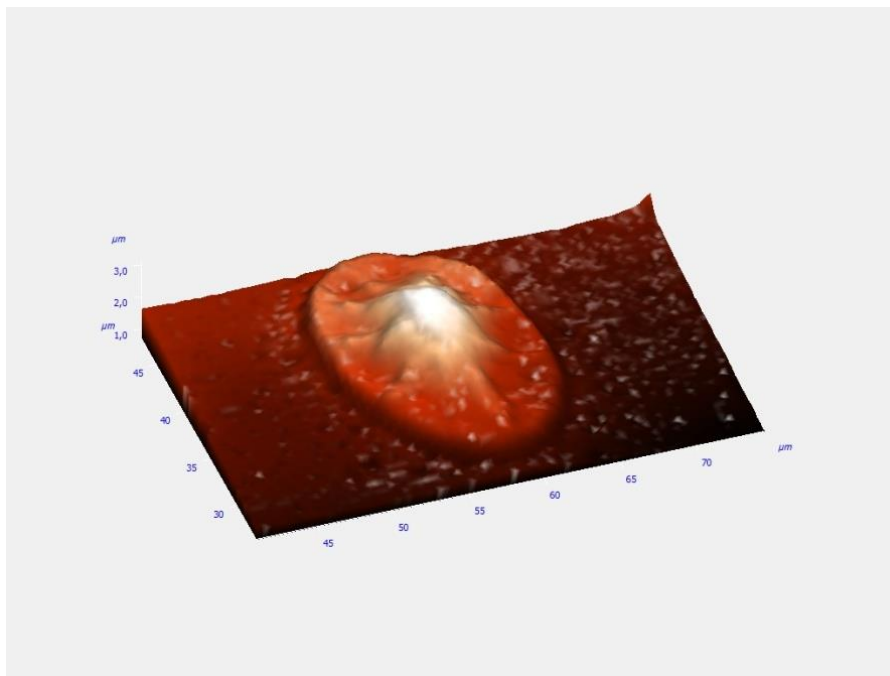


Рисунок 8 – АСМ-изображение эритроцитов *Rana ridibunda Pall.*

после инкубации при температуре 40°C.

Увеличение шероховатости поверхности клеток, вероятно, связано с дезорганизацией элементов цитоскелета и формированием актинсвязывающих доменов в подмембранном пространстве, которые способствуют формированию выпячиваний или выступов на плазмалемме [27].

На рисунках 9-11 представлены сканы лейкоцитов, инкубированные при разных температурах. Как видно из рисунков, полиморфноядерные лейкоциты округлой формы, поверхность клеток шероховатая, при этом при температурах инкубации 5°C и 40°C она незначительно вогнутая, а при температуре 20°C – слегка выпуклая. При повышенной и пониженной температурах инкубации шероховатость поверхности лейкоцитов более выражена по сравнению с клетками, инкубированными при комнатной

температуре.

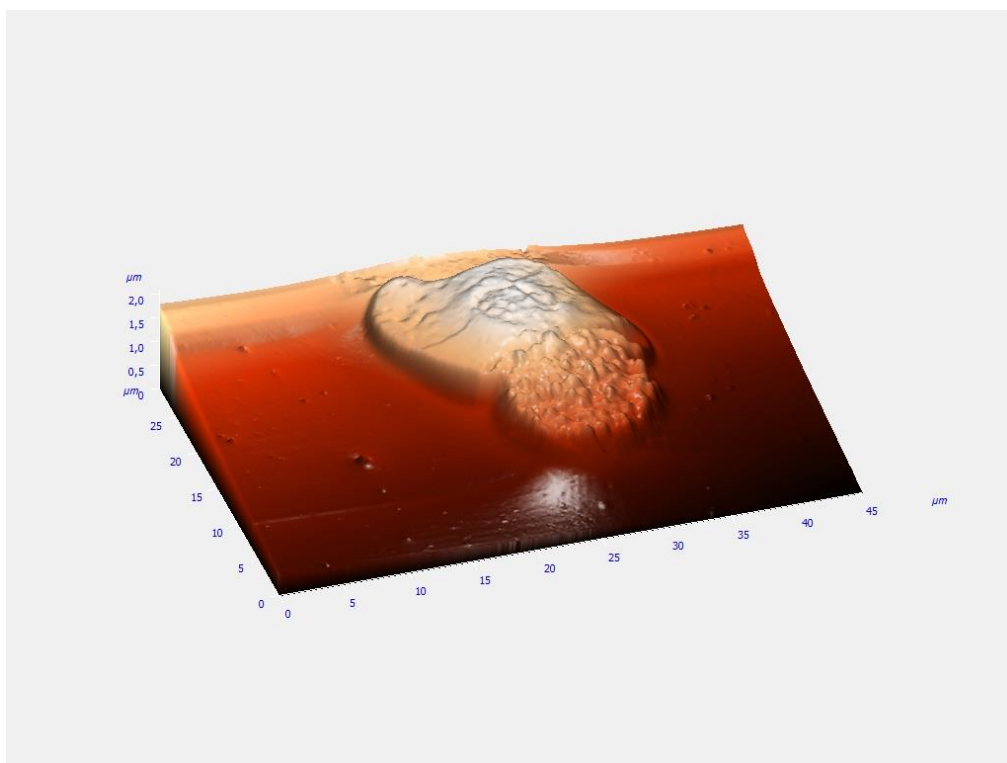


Рисунок 9 – АСМ-изображение лейкоцитов *Rana ridibunda* Pall.
после инкубации при температуре 5°C.

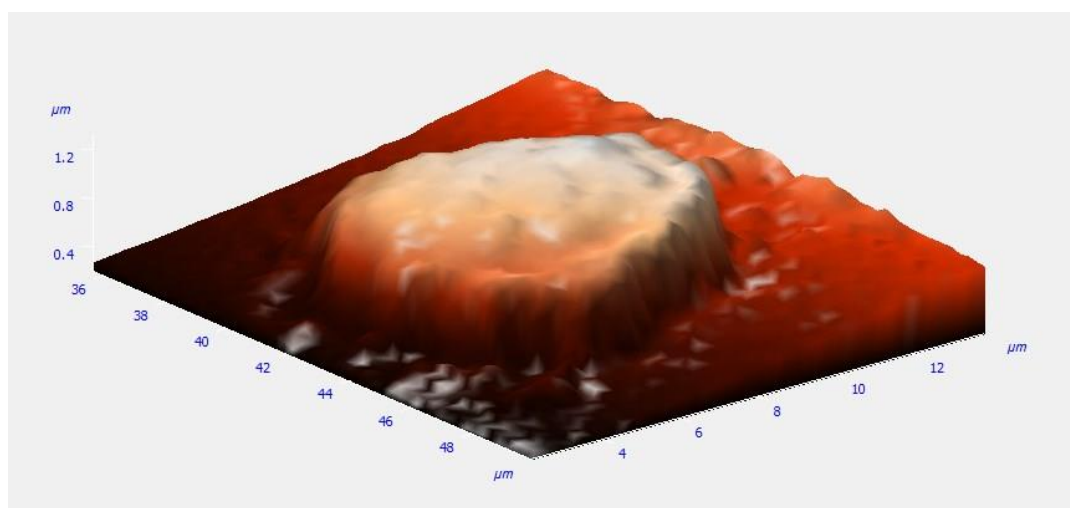


Рисунок 10 – АСМ-изображение лейкоцитов *Rana ridibunda* Pall.
после инкубации при температуре 20°C.

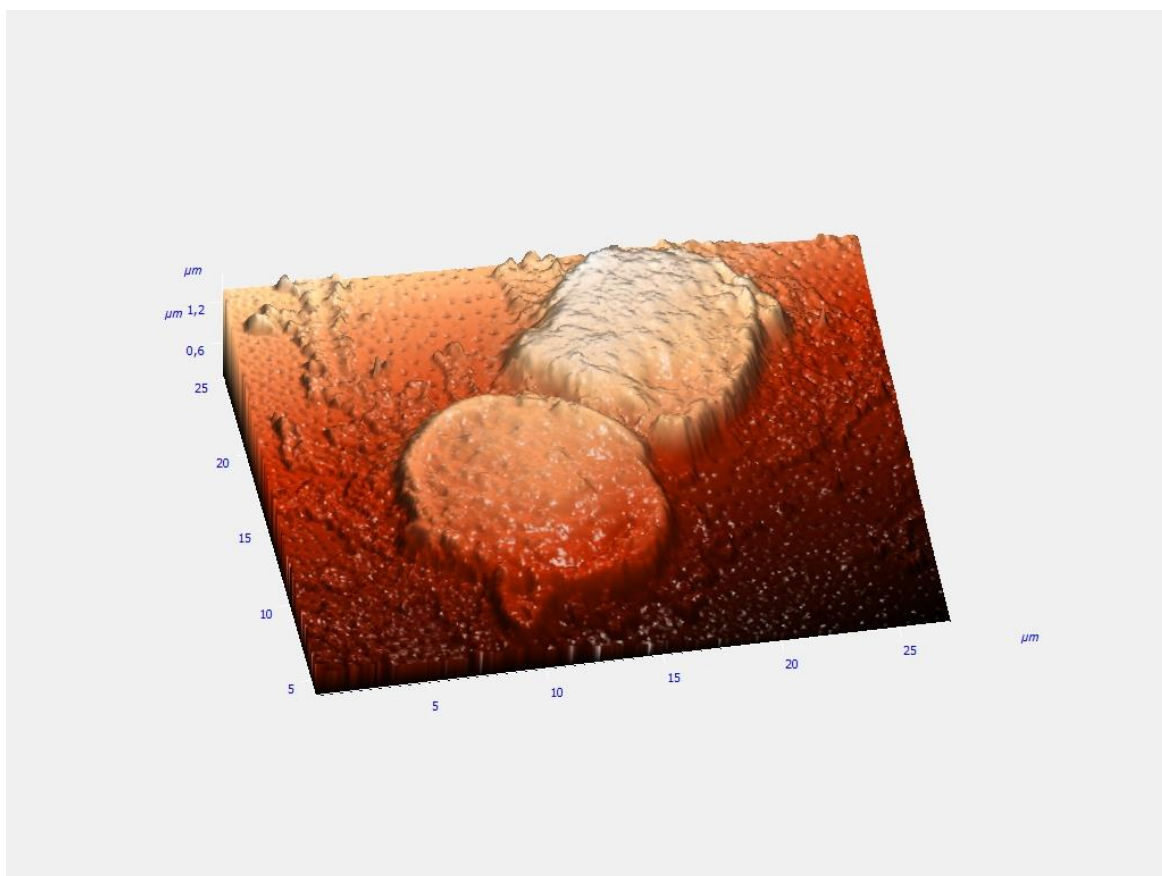


Рисунок 11 – АСМ-изображение лейкоцитов *Rana ridibunda* Pall.
после инкубации при температуре 40°C.

Таким образом, при инкубации красных и белых клеток крови представителей класса Земноводные в условиях пониженной и повышенной температур, шероховатость гемоцитов изменяется по сравнению с контрольной температурой.

ВЫВОДЫ

1. У красных и белых клеток крови *Rana ridibunda Pall* показатели площади, объема, большого и малого диаметров при повышении температуры инкубации (40° С) уменьшаются, при снижении температуры (5° С) увеличиваются.

2. При повышении и снижении температуры инкубации показатель адгезии у лейкоцитов уменьшился на 29,82% и 53,28% соответственно, у эритроцитов – не изменился. Упруго-эластические свойства плазмалеммы красных и белых клеток крови лягушки озёрной при снижении температуры инкубации уменьшаются на 28,55% и 39,42%, при повышении температуры – на 35,45% и 23,44% соответственно.

3. Температурный фактор оказывает влияние на морфометрические показатели клеток крови лягушки озёрной. При повышенной температуре инкубации увеличивается шероховатость поверхности гемоцитов *Rana ridibunda Pall*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ажаев А.Н. Физиолого-гигиенические аспекты действия высоких и низких температур // Проблемы космической биологии. М.: Наука , 1979. - Т.38. - 264 с
2. Болдырев А.А. Биологические мембраны и транспорт ионов. - М.: Изд-во МГУ, 1985. - 93 с.
3. Болдырев А.А., Кяйвяряйнен Е.И., Илюха В.А. Биомембранология: учебное пособие.– Петрозаводск: Изд-во Кар НЦ РАН, 2006. - 226 с.
4. Болдырев А.А. Введение в биомембранологию. – М.: Изд-во МГУ. - 1990. – 208 с.
5. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. - М.: Наука, 1980. - 320 с.
6. Владимиров Ю.А. Роль нарушений свойств липидного слоя мембран в развитии патологического процесса // Патол. физиология и эксперим. терапия. - 1989. - №4. - С.7-19.
7. Геннис Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функции. – М.: Мир. - 1997. - 624 с.
8. Гольдберг Д.И, Гольдберг Е.Д., Шубин Н.Г. Гематология животных. - Томск: Изд-во ТГУ, 1973. – 182 с.
9. Гольдберг Е.Д. Справочник по гематологии с атласом микрофотограмм / Том. гос. мед. ин-т, НИИ фармакологии Том. науч. центра АМН СССР. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1989. – 369 с.
10. Заварзин А.А. Очерки эволюционной гистологии крови и соединительной ткани. – М.: Изд-во АН СССР, 1953. – 716 с.
11. Иванов, А.А. Физиология рыб. – М.: Мир, 2003. – 284 с.
12. Иржак Л.И. Эволюция системы крови. – Л.: Наука, 1983. - 300 с.
13. Истанманова Т.С. Очерки функциональной гематологии. – Л.: Медгиз, 1963. – 231 с.

14. Ивков В.Г., Г.Н. Берестовский. Липидный бислой биологических мембран. – М.: Мир, 1981. – 341 с.
15. Кагава Я. Биомембраны. – М: Высшая школа, 1985. – 303 с.
16. Камкин А., Каменский А. Фундаментальная и клиническая физиология. – М. Издательский центр «Академия», 2004. – 1072 с.
17. Кармен Н.Б. Влияние плеторического введения перфторана на параметры структурно-функционального состояния мембран эритроцитов / Н.Б. Кармен, Н.П. Милютин, А.А. Орлов, Э.И. Асирян, И.Г. Мариничева, Е.И. Маевский // Перфторуглеродные соединения в медицине и биологии: материалы XII Международной конференции. – Пушино: Изд-во Наука, 2003. - С. 122.
18. Коржуев П.А. Эволюция дыхательной функции крови. – М.: Изд-во АН СССР, 1949. – 182 с.
19. Коржуев П.А. Гемоглобин. Сравнительная физиология. – М.: Наука, 1964. – 286 с.
20. Кудрявцев А. А., Кудрявцева Л. А., Привольнев Т. И. Гематология животных и рыб. - М.: Колос, 1969. – 320 с.
21. Липунова Е.А., Скоркина М.Ю. Физиология крови. – Белгород: Изд-во БелГУ, 2007. – 324 с.
22. Медведев Ж.А. О некоторых особенностях эритропоэза и старения эритроцитов лягушки. – М.: Мир, 1973. – 975 с.
23. Милакин С.Б. Структурное состояние мембран и функциональная активность лимфоцитов: Автореф. дис... канд. биолог, наук - Новосибирск, 1989. – 19 с.
24. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. – Томск: Изд. ТГУ, 2004. – 202 с.
25. Русин Е.В., Афонова Г.Б., Брюзгина Т.С., Белый А.В. Физиология человека // Междунар. симп. в рамках Междунар. выставки «Медицина и охрана здоровья. Медтехника и аптека». Тюмень. 1997. С. 116–118.

26. Рябов С. И. Основы физиологии и патологии эритропоэза. – Л.: Медицина, 1971. – 255 с.
27. Скоркина, М.Ю. Федорова М.З., Чернявских С.Д., Забиняков Н.А., Сладкова Е.А. Сравнительная оценка морфофункциональных характеристик нативных и фиксированных эритроцитов // Цитология. – 2011. – Т. 53, № 1. – С. 17-21.
28. Сторожок С.А., Санников А.Г., Захаров Ю.М. Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства. – Тюмень: Изд-во ТГУ, 1997. – 140 с.
29. Субботина Т.Н. Перекисное окисление липидов и проницаемость мембран эритроцитов у детей и подростков с сахарным диабетом типа 1. – М.: Наука, 2003. – 216 с.
30. Субботина Н.М., Титова А.А. Клинические лабораторные диагностики // Медицина - 2004. -№5. - С. 20, 33-35.
31. Терентьева Э.И. Атлас ультраструктуры клеток кроветворной ткани. - М.: Медицина, 1972. – 134 с.
32. 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.
33. Хамидов Д.Х., Акилов А.Т., Турдыев А.А. Кровь и кроветворение у позвоночных животных. – УзССР: Изд-во Фан, 1978. – 168 с.
34. Хамидов Д.Х. *Электронномикроскопический атлас элементов гемопоэза позвоночных животных.* – Ташкент: Фан, 1979. – 168 с.
35. Харакоз Д.П. О возможной физиологической роли фазового перехода «жидкое-твердое» в биологических мембранах // Успехи биологической химии. 2001. - С. 333–364.
36. Хейлоу Ф.Г., Кваглино Дж. Д. Гематологическая цитохимия. – М.: Медицина, 1983. – 319 с.

37. Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран. – Минск: Наука и техника, 1981. – 214 с.
38. Чернявских, С.Д., Недопекина С.В. Сезонные колебания относительной микровязкости, полярности и сорбционной способности эритроцитарных мембран *Cyprinus carpio* и *Rana ridibunda* // Научные ведомости БелГУ. Сер. «Естественные науки». – Белгород, 2013. – №3 (146). Вып. 22. – С. 99-103.
39. Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных. Приспособление и среда. – М.: Мир, 1982. – 412 с.
40. Шалабодов А.Д. Биологические мембраны и мембранный транспорт. – Тюмень: Изд-во Тюмен. гос. ун-та, 1999. – 156 с.
41. Johnston, P.V. Brain lipid fatty acids and temperature acclimation / P.V. Johnston, B.I. Roots // *Comparative Biochemistry and Physiology*. – 1964. – Vol. 11. – P. 303-310.
42. Roots, B.I. Phospholipids of goldfish (*Carassius auratus* L.) brain: The influence of environmental temperature / B.I. Roots // *Comparative Biochemistry and Physiology*. – 1968. – Vol. 25. – P. 457-466.
43. Knipprath, W.G. The effect of environmental temperature on the fatty acid composition and on the in uiuo incorporation of 1-¹⁴C-acetate in goldfish (*Carassius auratus* L.) / W.G. Knipprath, J.F. Mead // *Lipids*. – 1968. – Vol. 3. – P. 121-128.