



УДК 591.111.7

**О СПОСОБНОСТИ К ФАГОЦИТОЗУ И ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ  
ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ ХОЛОДНОКРОВНЫХ (НА ПРИМЕРЕ  
*RANA RIDIBUNDA* И *CYPRINUS CARPIO*)**

**ABOUT ABILITY TO PHAGOCYTOSIS AND PHAGOCYTIC ACTIVITY IN  
POIKILOTHERM ANIMALS' NUCLEAR ERYTHROCYTES (WITH REFERENCE  
TO *RANA RIDIBUNDA* AND *CYPRINUS CARPIO*)**

**С.Д. Чернявских<sup>1</sup>, До Хью Куэт<sup>1</sup>, И.С. Буковцова<sup>1</sup>, Во Ван Тхань<sup>1,2</sup>  
S.D. Chernyavskikh<sup>1</sup>, Do Huu Quyet<sup>1</sup>, I.S. Bukovtsova<sup>1</sup>, Vo Van Thanh<sup>1,2</sup>**

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

<sup>2</sup> Педагогический университет г. Хошмина, Вьетнам, 70000, г. Хошимин, район 5, квартал 4,  
ул. Ан Зыонг Вьонг, 280

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

<sup>2</sup> Ho Chi Minh city University of Education, 280 An Duong Vuong St, Ward 4, Dist. 5, Ho Chi Minh City, 70000, Vietnam

E-mail: thanhvo@hcmup.edu.vn

**Аннотация.** Методами растровой электронной и световой микроскопии выявлена способность ядерных эритроцитов холоднокровных к фагоцитозу микроорганизмов. Установлена более высокая фагоцитарная активность красных клеток крови лягушки озерной к *Saccaromyces cerevisiae* по сравнению с *Bacillus subtilis* и *Clostridium pasteurianum*. Показано, что фагоцитарный индекс и фагоцитарное число в отношении дрожжевых клеток у ядерных эритроцитов *Rana ridibunda* выше, чем у *Cyprinus carpio*.

**Resumé.** By scanning electron and light microscopy, the ability of nuclear erythrocytes to phagocytose microorganisms in poikilotherms was revealed. It's been established the highest ability of *Rana ridibunda* red blood cells to phagocytose *Saccaromyces cerevisiae* in comparison with *Bacillus subtilis* and *Clostridium pasteurianum*. It's been shown that phagocytic index and phagocytic number of digested yeast cells is higher for nuclear red blood cells of *Rana ridibunda* than *Cyprinus carpio*.

**Ключевые слова:** ядерные эритроциты, адгезия, поглощение, фагоцитоз, фагоцитарная активность.

**Key words:** nuclear red blood cells, adhesion, absorption, phagocytosis, phagocytic activity.

## Введение

Согласно представлениям общей и эволюционной физиологии, распределение функций между клетками крови сводится к тому, что эритроциты обеспечивают транспорт кислорода, а лейкоциты играют защитную роль [Заварзин, 1953; Исабаева, Пономарева, 1981; Иржак, 1983; Ерюхин и др., 1989; Федорова, 2001]. Неспецифическая защита против чужеродных агентов осуществляется фагоцитирующими клетками – макрофагами и полиморфноядерными лейкоцитами [Friemel, Brock, 1986].

Для реализации фагоцитарной функции у белых клеток крови имеется мембранный резерв, заложенный в складчатости плазмалеммы [Головко, 2010]. Резерв плазмалеммы используется макро- и микрофагами на образование фагосом, формирование псевдоподий при амёбoidalном движении [Каппуччинелли, 1982; Bagge, Braide, 1982; Gennis, 1989] и другие функции.

Одним из основных этапов фагоцитарного процесса является миграция фагоцитов [Ерюхин и др., 1989; Федорова, Левин, 2001; Fedorova et al., 2008]. В литературе имеется немало работ, посвященных оценке локомоционной активности белых клеток крови [Маянский, Маянский, 1983; Козинец и др., 2001]. Изучены особенности спонтанной и стимулированной разными веществами миграции лейкоцитов при изменённых и патологических состояниях организма [Федорова, Левин,



2001]. При этом важную роль при движении клеток вышеназванного пула играет перестройка структурных компонентов актинового цитоскелета [Fulton, 1983; Bennett, Vaines, 2001; Землянских, Денисова, 2009].

Исследованиями С.И. Головки [2010] и M.Z. Fedorova et al. [2012] установлено, что у ядерных эритроцитов сазана и лягушки также имеется мембранный резерв. Выявлена способность красных клеток крови холоднокровных к спонтанным локомоциям [Чернявских и др., 2011]. Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии определены изменения пространственной организации актиновых филаментов у ядерных эритроцитов при миграции. Показано, что во время движения реорганизация микрофиламентов цитоскелета у красных клеток крови рыб и лягушек сходна с аналогичными процессами белых клеток [Chernyavskikh et al., 2012]. Исходя из вышеизложенного, сделано предположение, что ядерные эритроциты холоднокровных являются способными к фагоцитозу клетками.

Целью работы было определение способности к фагоцитозу и оценка фагоцитарной активности ядерных эритроцитов холоднокровных (на примере *Cyprinus carpio* и *Rana ridibunda*).

### Объекты и методы исследования

В работе использовали периферическую кровь, взятую у наркотизированных эфиром сазана (*C. carpio*) (30 особей) и лягушки озёрной (*R. ridibunda*) (30 особей). Объектами исследования служили ядерные эритроциты. Забор крови у сазана осуществляли из хвостовой вены, у лягушки – из сердца. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (10 ед./мл).

Полученную кровь центрифугировали 4 мин. при 400 g, удаляли плазму и лейкоциты. Эритроциты разбавляли изотоническим раствором NaCl (0.8% для сазана и 0.6% для лягушки) в соотношении 1:200.

Суспензию красных клеток крови с объектами фагоцитарной реакции (1:50) помещали в пробирки и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. В качестве объектов фагоцитоза использовали микроорганизмы: бактерии *Bacillus subtilis* и *Clostridium pasteurianum*, а также грибы *Saccharomyces cerevisiae* [Воробьев, 2001; Глик, Пастернак, 2002; Сиротин, 2004].

Методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) определяли адгезию микроорганизмов к ядерным эритроцитам. Полученные суспензии наносили на стеклянные подложки с углеродным напылением. Оценку поверхности клеток крови и объектов фагоцитоза проводили на сканирующем электронном микроскопе *Quanta 200* в режиме низкого вакуума.

Методом световой микроскопии определяли способность ядерных эритроцитов к поглощению и перевариванию микроорганизмов. С этой целью по окончании инкубации на стеклянные подложки наносили полученные суспензии (высота слоя составляла около 1 мм) и высушивали на воздухе в течение 45–60 мин. Клетки с микроорганизмами фиксировали метанолом и окрашивали азур-эозином по Романовскому.

Для оценки фагоцитарной активности эритроцитов на полученных препаратах подсчитывали процент фагоцитирующих клеток (фагоцитарный индекс) и среднее число поглощенных частиц (фагоцитарное число) [Меньшиков, Бедулева, 2001]. При подсчете использовали объектив с увеличением  $\times 100$ .

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

### Результаты исследования

Методом РЭМ выявлены адгезионные контакты микроорганизмов (*S. cerevisiae*, *C. pasteurianum* и *B. subtilis*) с ядерными эритроцитами *C. carpio* и *R. ridibunda*. На рисунке 1 показана адгезия *S. cerevisiae* к красной клетке крови сазана.

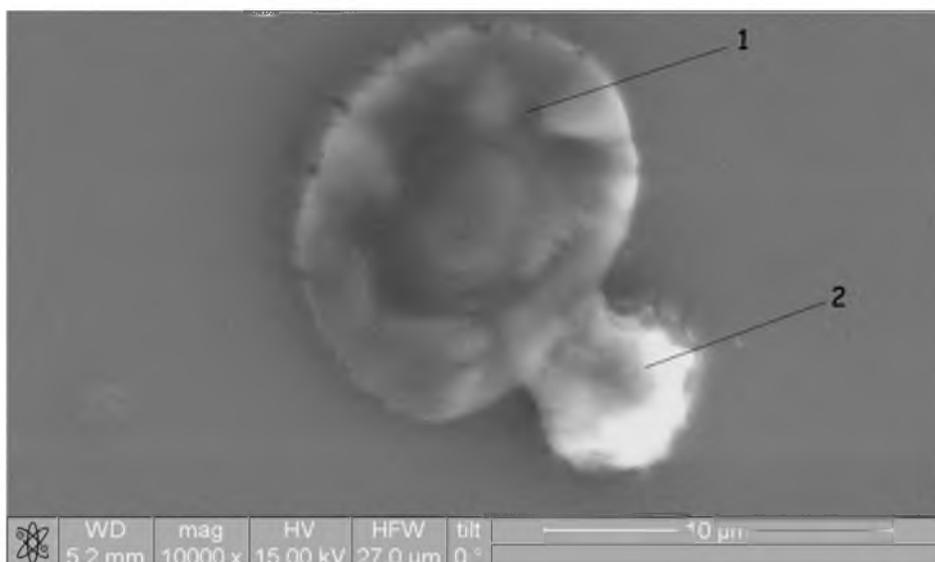


Рис. 1. Электронная микрофотография адгезирующего к *Saccharomyces cerevisiae* эритроцита сазана: 1 – эритроцит, 2 – *S. cerevisiae*

Fig. 1. Electron micrograph of adhering to the *Saccharomyces cerevisiae* carp erythrocyte: 1 – erythrocyte, 2 – *S. cerevisiae*

Методом световой микроскопии установлено, что ядерные эритроциты сазана и лягушки способны не только к адгезии, но и к поглощению, а также перевариванию микроорганизмов (рис. 2 а–в, 3).

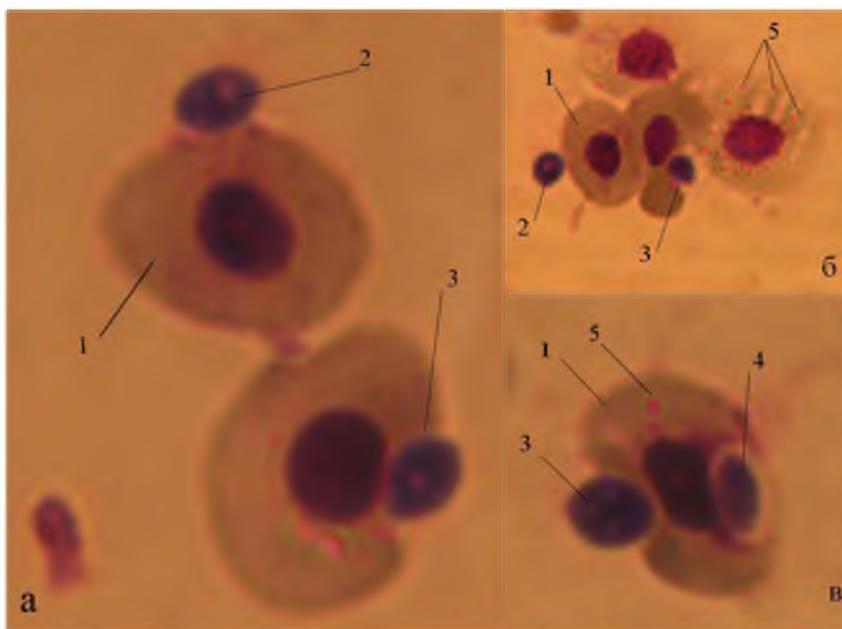


Рис. 2. Фагоцитоз *Saccharomyces cerevisiae* эритроцитами сазана (увеличение  $\times 100$ ): 1 – эритроцит; 2 – *S. cerevisiae*; 3 – образование фагосомы; 4 – фагосома; 5 – частично переваренные объекты фагоцитоза

Fig. 2. Phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae* by carp's erythrocytes (zoom  $\times 100$ ): 1 – erythrocytes; 2 – *S. cerevisiae*; 3 – phagosome formation; 4 – phagosome; 5 – partially digested sites of phagocytosis

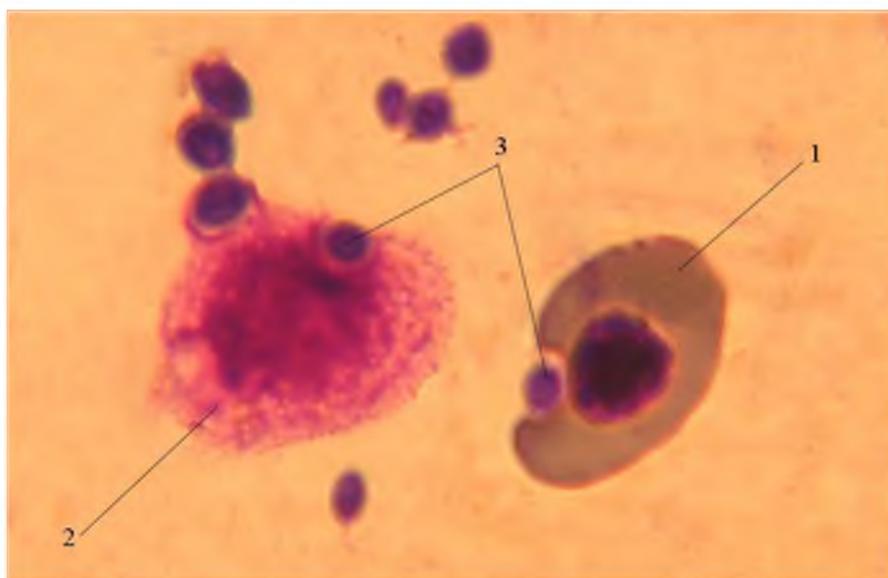


Рис. 3. Фагоцитоз *Saccaromyces cerevisiae* эритроцитом и лейкоцитом лягушки:  
 1 – эритроцит; 2 – лейкоцит; 3 – *S. cerevisiae*  
 Fig. 3. Phagocytosis of *Saccaromyces cerevisiae* by frog's erythrocytes and leukocytes:  
 1 – erythrocyte; 2 – leukocyte; 3 – *S. cerevisiae*

Мембрана эритроцита *C. carpio* в месте контакта с *S. cerevisiae* втягивается и объект погружается вглубь клетки (см. рис. 2а). Этот процесс соответствует началу стадии поглощения, так как непрерывность плазматической мембраны над инвагинационным каналом еще не восстановлена. Показано образование обособленной от наружной мембраны вакуоли, содержащей фагоцитированную частицу (см. рис. 2в).

У эритроцита лягушки также происходит образование фагоцитарной вакуоли (см. рис. 3). В цитоплазме некоторых эритроцитов выявляются мелкие частицы (см. рис. 2б).

В таблице представлены результаты фагоцитарной активности ядерных эритроцитов подопытных холоднокровных.

Таблица

Фагоцитарная активность ядерных эритроцитов *Cyprinus carpio* и *Rana ridibunda*

Table

Phagocytic activity of nuclear erythrocytes in *Cyprinus carpio* and *Rana ridibunda*

Вид животного	Исследуемый показатель, ед. изм.	Объект фагоцитоза		
		<i>Clostridium pasteurianum</i>	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Cyprinus carpio</i>	Фагоцитарный индекс, %	33.60±1.76	38.66±1.85	32.50±2.50
	Фагоцитарное число, отн. ед.	1.04±0.03	1.10±0.02	1.06±0.03
<i>Rana ridibunda</i>	Фагоцитарный индекс, %	34.50±1.64	49.75±2.39 <sup>а,б</sup>	36.00±2.00 <sup>в</sup>
	Фагоцитарное число, отн. ед.	1.01±0.04	1.24±0.02 <sup>а,б</sup>	1.01±0.02 <sup>в</sup>

Примечание: <sup>а</sup> – статистически достоверные различия по сравнению с *Cyprinus carpio*; <sup>б</sup> – статистически достоверные различия по сравнению с *Clostridium pasteurianum*; <sup>в</sup> – статистически достоверные различия по сравнению с *Bacillus subtilis* ( $p < 0.05$ ).

При сравнительном анализе полученных данных установлено, что эритроциты *R. ridibunda* наиболее активно поглощают *S. cerevisiae*. Фагоцитарный индекс красных



клеток крови лягушек в отношении *C. pasteurianum* и *B. subtilis* ниже на 30.7 и 27.6%, фагоцитарное число – на 18.5 и 18.5% по сравнению с дрожжевыми клетками. В свою очередь, у сазана по сравнению с лягушкой процент фагоцитирующих эритроцитов в отношении *S. cerevisiae* ниже на 22.3, среднее число поглощенных частиц – на 11.3%.

### Обсуждение результатов

Выявленные методом РЭМ реакции рецепции объекта с плазмалеммой, согласно И.И. Мечникову [1954], соответствуют стадии аттракции, т. е. тесного сближения фагоцитирующей клетки и располагающегося на ее поверхности объекта фагоцитоза. В более поздних исследованиях вышеуказанные явления относят к стадии адсорбции, которая характеризуется специфическим взаимодействием частицы с рецептором или электростатической или хемотаксической аттракцией [Алов и др., 1969; Федорова, 2001].

Образование фагоцитарной вакуоли у эритроцита лягушки (см. рис. 3), связано с транслокацией плазматической мембраны в соответствии с размером и формой поглощаемой частицы [Федорова, Левин, 2001]. Выявленные в цитоплазме некоторых эритроцитов мелкие частицы (см. рис. 2б), предположительно могут быть частично переваренными объектами фагоцитоза [Галактионов, 2005].

Таким образом, начавшаяся при адгезионном контакте чужеродной частицы и фагоцита активация плазматической мембраны завершается процессом поглощения микроорганизма и его перевариванием, что доказывает способность ядерных эритроцитов холоднокровных к фагоцитозу.

Более высокая фагоцитарная активность к дрожжевым клеткам у эритроцитов лягушки по сравнению с красными клетками крови сазана может быть связана, во-первых, с наличием у Земноводных видовой иммунитета, так как основными местами обитания дрожжевых клеток является почва, поверхность плодов и листьев и в меньшей степени – природные воды [Воробьев и др., 2001; Глик, Пастернак, 2002], являющиеся средой обитания рыб. Во-вторых, ядерные эритроциты лягушки – более крупные клетки [Головко, 2010] с большим мембранным резервом [Fedorova et al., 2012], который, как было сказано выше, может использоваться фагоцитами на образование фагосом.

Известно, что взаимодействие между фагоцитом и объектом фагоцитоза имеет гидрофобный характер [Меньшиков, Бедулева, 2001]. Поэтому некоторые микроорганизмы, к числу которых относятся *C. pasteurianum* и *B. subtilis*, в качестве механизма защиты имеют полисахаридную капсулу [Лысак, 2005], которая снижает гидрофобность и эффективность адгезии [Меньшиков, Бедулева, 2001]. Этим может быть обусловлена более низкая фагоцитарная активность ядерных эритроцитов лягушки к бактериям по сравнению с дрожжевыми клетками.

### Выводы

1. Ядерные эритроциты холоднокровных животных, в частности *Cyprinus carpio* и *Rana ridibunda*, являются способными к фагоцитозу клетками.
2. Фагоцитарная активность красных клеток крови лягушки озерной выше к *Saccharomyces cerevisiae* по сравнению с *Bacillus subtilis* и *Clostridium pasteurianum*.
3. Фагоцитарный индекс и фагоцитарное число в отношении дрожжевых клеток у ядерных эритроцитов *R. ridibunda* выше, чем у *C. carpio*.

### Список литературы References

1. Алов И.А., Брауде А.И., Аспиз М.Е. 1969. Основы функциональной морфологии клетки. М., Медицина, 344.
2. Alov I.A., Braude A.I., Aspiz M.E. 1969. Osnovy funkcional'noj morfologii kletki [Basics of functional morphology of cells]. Moscow, Medicina, 344. (in Russian)
3. Воробьев А.А., Кривошеник Ю.С., Быков А.С. 2001. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии. М., Мастерство, 221.



- Vorob'ev A.A., Krivoshenik Ju.S., Bykov A.S. 2001. *Osnovy mikrobiologii, virusologii i immunologii* [Fundamentals of Microbiology, Virology and Immunology]. Moscow, Masterstvo, 221. (in Russian)
3. Галактионов В.Г. 2005. Эволюционная иммунология. М., Академкнига, 408.  
Galaktionov V.G. 2005. *Jevoljucionnaja immunologija* [Evolutionary immunology]. Moscow, Akademkniga, 408. (in Russian)
4. Глик Б., Пастернак Д. 2002. Молекулярная биотехнология. М., Мир, 585.  
Glik B., Pasternak D. 2002. *Molekuljarnaja biotehnologija* [Molecular biotechnology]. Moscow, Mir, 585. (in Russian)
5. Головки С.И. 2010. Сравнительная характеристика мембранного резерва ядерных клеток крови позвоночных животных. Дис. ... канд. биол. наук. Ярославль, ЯГПУ, 120 с.  
Golovko S.I. 2010. *Sravnitel'naja harakteristika membrannogo rezerva jadernyh kletok krovi pozvonocnyh zivotnyh* [Comparative characteristics of the membrane reserve in nuclear blood cells of vertebrates]. Dis. ... cand. biol. sciences. Jaroslavl', JaGPU, 120. (in Russian)
6. Ерюхин И.А., Белый В.Я., Вагнер В.К. 1989. Воспаление как общебиологическая реакция: на основе модели острого перитонита. Л., Наука, 262.  
Erjulhin I.A., Belyj V.Ja., Vagner V.K. 1989. *Vospalenie kak obshhebiologicheskaja reakcija: na osnove modeli ostrogo peritonita* [Inflammation as a general biological reaction: based on the model of acute peritonitis]. Leningrad, Nauka, 262. (in Russian)
7. Заварзин А.А. 1953. Очерки эволюционной гистологии крови и соединительной ткани. Избранные труды. Л., Изд-во АН СССР, 717.  
Zavarzin A.A. 1953. *Oчерki jevoljucionnoj gistologii krovi i soedinitel'noj tkani. Izbrannye trudy* [Essays in Evolutionary histology of blood and connective tissue]. Leningrad, AN SSSR, 717. (in Russian)
8. Землянских Н.Г., Денисова О.Н. 2009. Изменения в мембранно-цитоскелетном комплексе эритроцитов, индуцированные диметилсульфоксидом, полиэтиленгликолем и низкой температурой. Биофизика, 54 (4): 693–703.  
Zemlianskikh N.G., Denisova O.N. 2009. *Changes in erythrocyte membrane-cytoskeleton complex, induced by dimethyl sulfoxide, polyethylene glycol, and low temperature. Biofizika* [Biophysics], 54 (4): 693–703. (in Russian)
9. Иржак Л.И. 1983. Эволюция системы крови. В кн.: Руководство по физиологии. Эволюционная физиология. Ч. 2. Л., Наука: 262–300.  
Irzhak L.I. 1983. *Evolution of the blood system. In: Rukovodstvo po fiziologii. Ch. 2. Jevoljucionnaja fiziologija* [Guide on Physiology. P. 2. Evolutionary physiology]. Leningrad, Nauka: 262–300. (in Russian)
10. Исабаева В.А., Пономарева Т.А. 1981. Кровь и её функции в адаптации. В кн.: Экологическая физиология животных. Ч. 2. Физиологические системы в процессе адаптации и факторы среды обитания. Л.,: 5–67.  
Isabaeva V.A., Ponomareva T.A. 1981. *The blood and its functions in the adaptation. In: Jekologicheskaja fiziologija zivotnyh. Ch. 2. Fiziologicheskie sistemy v processe adaptacii i faktory sredy obitanija* [Environmental physiology of animals. P. 2. Physiological systems in the process of adaptation and environmental factors]. Leningrad: 5–67. (in Russian)
11. Каппуччинелли П. 1982. Подвижность живых клеток. М., Мир, 126.  
Kappuchchinelli P. 1982. *Podvizhnost' zhivyh kletok* [Mobility of living cells]. Moscow, Mir, 126. (in Russian)
12. Козинец Г.И. и др. 2001. Кровь и инфекция. М., Триада-фарм, 456.  
Kozinec G.I. i dr. 2001. *Krov' i infekcija* [Blood and infection]. Moscow, Triada-farm, 456. (in Russian)
13. Лысак В.В. 2005. Микробиология. Мн., БГУ, 261.  
Lysak V.V. 2005. *Mikrobiologija* [Microbiology]. Minsk, BGU, 261. (in Russian)
14. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. 1983. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск, Наука, 256.  
Majanskij A.N., Majanskij D.N. 1983. *Oчерki o nejtrofile i makrofage* [Essays on neutrophils and macrophages]. Novosibirsk, Nauka, 256. (in Russian)
15. Меньшиков И.В., Бедулева Л.В. 2001. Основы иммунологии. Лабораторный практикум. Ижевск, 136.  
Men'shikov I.V., Beduleva L.V. 2001. *Osnovy immunologii. Laboratornyj praktikum* [Fundamentals of Immunology. Laboratory practical work]. Izhevsk, 136. (in Russian)
16. Мечников И.И. 1954. Лекции по сравнительной патологии воспаления. М.



Mechnikov I.I. 1954. Lekcii po sravnitel'noj patologii vospaleniya [Lectures in comparative pathology of inflammation]. Moscow. (in Russian)

17. Сиротин А.А. 2004. Практикум по микробиологии. Белгород, Изд-во БелГУ, 78.

Sirotin A.A. 2004. Praktikum po mikrobiologii [Practical work on microbiology]. Belgorod, Izd-vo BelGU, 78. (in Russian)

18. Федорова М.З. 2001. Реактивность лейкоцитов крови при различных функциональных нарушениях. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ярославль, 68.

Fedorova M.Z. 2001. Reaktivnost' lejkocitov krovi pri razlichnyh funkcional'nyh narushenijah [The reactivity of leukocytes in various functional disorders]. Abstract. dis. ... cand. biol. sciences. Jaroslavl', 68. (in Russian)

19. Федорова М.З., Левин В.Н. 2001. Спонтанная миграция нейтрофилов крови в смешанной популяции лейкоцитов и ее изменения под влиянием веществ аутоплазмы при различных функциональных состояниях организма. Клиническая лабораторная диагностика, 5: 16–19.

Fedorova M.Z., Levin V.N. 2001. Spontaneous migration of neutrophils in the mixed population of white blood cells and its changes under the influence of substances of autoplasm at various functional conditions of the organism. Klinicheskaja laboratornaja diagnostika [Clinical Laboratory Diagnostics], 5: 16–19. (in Russian)

20. Чернявских С.Д., Федорова М.З., Куэт Д.Х., Тхань В.В., Забиняков Н.А. 2011. Миграционная активность гемоцитов позвоночных животных при различной температуре. Научные ведомости БелГУ. Естественные науки, 14 (3): 150–154.

Chernyavskikh S.D., Fedorova M.Z., Do Huu Quyet, Vo Van Thanh, Zabinyakov N.A. 2011. Migration activity of blood cells of vertebrate animals at different temperatures. Nauchnye vedomosti BelGU. Estestvennye nauki [Belgorod State University Scientific Bulletin. Natural sciences], 14 (3): 150–154. (in Russian)

21. Bagge U., Braide M. 1982. Leukocyte plugging of capillaries in vivo. *In*: White Blood Cells. Morphology and Rheology as Related to Function. The Hague, Martinus Nijhoff: 89–94.

22. Bennett V., Baines A.J. 2001. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiological Reviews*, 81 (3): 1353–1392.

23. Fedorova M.Z. et al. 2008. Comparative evaluation of the locomotion activity of vertebrates' blood cells. *Biological motility. Achievements and perspectives*, Pushchino, 212–213.

24. Fedorova M.Z., Golovko S.I., Chernyavskikh S.D. 2012. Comparative evaluation of morphofunctional organization of vertebrate nuclear blood cells. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 48 (2): 177–181.

24. Friemel H., Brock J. 1976. *Grundlagen der Immunologie*. Academic-Verlag, Berlin, 177.

25. Fulton A. B. 1984. *The Cytoskeleton: Cellular Architecture and Choreography*. Springer, 80.

26. Gennis R.B. 1989. *Biomembranes, Molecular structure and function*. Springer Verlag, New York, 533.

27. Chernyavskikh S.D., Fedorova M.Z., Vo Van Thanh, Do Huu Quyet. 2012. Reorganization of actin cytoskeleton of nuclear erythrocytes and leukocytes in fish, frogs, and birds during migration. *Cell and Tissue Biology*, 54 (5): 412–416.