

**KHẢO SÁT KHẢ NĂNG DI CƯ
VÀ THỰC BÀO CỦA HỒNG CẦU ÉCH ĐỒNG *RANA RUGULOSA*
WIEGMANN 1834 DƯỚI SỰ THAY ĐỔI NHIỆT ĐỘ
TRONG THÍ NGHIỆM *IN VITRO***

VÕ VĂN THANH*, ĐẶNG TRÌNH NGỌC DIỆU**,
NGUYỄN THANH THÙY**, TRƯƠNG VĂN TRÍ*

TÓM TẮT

*Kết quả khảo sát khả năng di cư và thực bào của hồng cầu ở Éch đồng *Rana rugulosa* cho thấy hồng cầu *Rana rugulosa* có khả năng di cư và thực bào tương tự như bạch cầu. Khi tăng hoặc giảm nhiệt độ nuôi ủ thì khả năng di cư của hồng cầu cũng tăng và giảm tương ứng. Khả năng thực bào của hồng cầu không những phụ thuộc vào những điều kiện nhiệt độ mà còn phụ thuộc vào đối tượng thực bào. Khi gặp phải điều kiện nhiệt độ bất lợi, khả năng thực bào của hồng cầu tăng lên đáng kể.*

Từ khóa: khả năng di cư, thực bào, hồng cầu.

ABSTRACT

Studying migratory and phagocytic abilities of frog *Rana rugulosa* Wiegmann 1834 erythrocytes under the change of the temperature in the in vitro experiment

*Results of the study of the migratory and phagocytic abilities of frog erythrocytes show that *Rana rugulosa* erythrocytes are capable of migration and phagocytosis as leukocytes. Raising and lowering the incubation temperature led to the increase and decrease of migratory activity, respectively. The phagocytic ability of erythrocyte depends on the incubation temperature and phagocytic objects. When encountering adverse temperature conditions, the phagocytic ability of erythrocytes increased significantly.*

Keywords: migratory ability, phagocytosis, red blood cells.

1. Mở đầu

Nghề nuôi cá nước ngọt như nghề nuôi cá tra, cá basa, tôm càng xanh, cá lóc, cá rô đồng, cá sặc rần đã và đang chiếm vị trí quan trọng [5]. Bên cạnh một số loài cá nước ngọt có giá trị kinh tế trên thì hiện nay một số hộ nông dân có xu hướng chuyển sang nuôi các loài thủy sản như lươn, ếch, rắn ri voi, ba ba... Trong đó, ếch đang là đối tượng được quan tâm nghiên cứu và nuôi nhiều nhất. Éch không những là thực phẩm ngon, bổ được nhiều người ưa thích mà còn là đối tượng hữu ích trong nông nghiệp như tiêu diệt côn trùng, các loài địch hại khác trong nông nghiệp. Ngoài ra, ếch còn góp phần quan trọng vào các thí nghiệm về thần kinh và sinh lí học. [2]

* ThS, Trường Đại học Sư phạm TP HCM

** SV, Trường Đại học Sư phạm TP HCM

Trong thực nghiệm và lâm sàng, việc nắm được các chỉ số sinh lí của máu có ý nghĩa rất lớn trong chẩn đoán các trạng thái sinh lí và bệnh lí của cơ thể. Những thay đổi về chỉ số máu thường dẫn đến những biến đổi sinh lí, thể hiện như một dạng đáp ứng lại những biến đổi của môi trường. Đối với động vật biến nhiệt, nhiệt độ môi trường xung quanh là một trong những yếu tố quan trọng tác động đến các quá trình miễn dịch. Đã có giả thiết cho rằng, tế bào hồng cầu có khả năng “hấp thụ” các hạt lạ [15]. Gần đây, nhóm nghiên cứu tại Trường Đại học Tổng hợp Nghiên cứu Quốc gia Belgorod đã có những bước khởi đầu chứng minh khả năng di cư của tế bào hồng cầu ở *Rana ridibunda*, *Cyprinus carpio* và *Gallus domesticus* dưới ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi ủ [10]. Tuy nhiên, đến nay vẫn chưa có nghiên cứu cụ thể nào về hoạt tính di cư cũng như chức năng thực bào của tế bào hồng cầu có nhân và việc nghiên cứu về ảnh hưởng của nhiệt độ đến các giai đoạn của quá trình thực bào của hồng cầu vẫn chưa được đề cập đến.

Mục tiêu nghiên cứu: Khảo sát khả năng di cư và thực bào của tế bào hồng cầu Ếch đồng *Rana rugulosa* dưới sự thay đổi nhiệt độ trong thí nghiệm *in vitro* và ảnh hưởng của một số đối tượng thực bào đến khả năng thực bào hồng cầu.

2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thu mẫu máu: Làm bất động ếch bằng phương pháp hủy tủy. Máu ếch được lấy ở tim bằng phương pháp tiêm hút. Để tránh đông máu, kim tiêm và ống nghiệm thu máu được ngâm dung dịch Natri Citrat nồng độ 0,05%.

Phương pháp tách hồng cầu: Máu ếch thu được được li tâm trong 5 phút với vận tốc 1500v/p. Hồng cầu được thu bằng pipetman ở lớp đáy ống nghiệm sau li tâm.

Phương pháp khảo sát đặc tính di cư: Khả năng di cư của tế bào hồng cầu được thực hiện dựa trên phương pháp kiểm định tính di cư của tế bào máu dưới agarose (M.Z. Fedorova, V.N. Levin, 2001) [8]. Gel agarose (A. V. Pizov và cs., 2000 [13]) được trải đều trên lam kính. Sau khi gel agarose nguội và đông lại, dùng ống đục lỗ để tạo các ô nuôi. Cho vào mỗi ô nuôi 4 μ L dung dịch hồng cầu được làm loãng bằng dung dịch sinh lí NaCl 0,65% (khoảng 400 ngàn tế bào [8]) được các mẫu. Các mẫu được nuôi ủ trong môi trường không có oxygen ở các nhiệt độ 20°C, 28°C, 37°C trong 24 giờ.

Mẫu sau khi ủ 24 giờ được cố định bằng dung dịch formaldehyde 10% trong 1 giờ. Sau khi cố định mẫu, tiến hành tách bỏ lớp gel. Nhuộm tiêu bản bằng thuốc nhuộm Giemsa trong 15 phút. Mẫu được quan sát và chụp hình bằng kính hiển vi đảo ngược Nikon Eclipse Ti-S. Xác định diện tích phân tán bằng phần mềm ImageJ 1.47v.



Hình 2.1. Mẫu được cố định bằng dung dịch formaldehyde 10%

Phương pháp khảo sát khả năng thực bào: Để khảo sát khả năng thực bào của tế bào hồng cầu Éch đồng, chúng tôi đã sử dụng các đối tượng thực bào *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*. Tế bào hồng cầu sau khi được tách từ dịch máu bằng phương pháp li tâm, được trộn với đối tượng thực bào theo tỉ lệ 1:50 [14]. Cho hỗn hợp thu được vào trong ống nghiệm dung tích 5ml và nuôi ủ trong thời gian 30 phút ở các nhiệt độ 20°C, 28°C (đối chứng), 37°C. Hỗn hợp được lắc nhẹ sau mỗi 5 phút. Sau khi ủ, tiến hành làm tiêu bản, cố định và nhuộm tiêu bản.

Phương pháp nhuộm tiêu bản: Tiêu bản máu được cố định và nhuộm màu theo phương pháp Romanowsky-Giemsa. Quan sát tiêu bản dưới kính hiển vi quang học và đếm số lượng hồng cầu đã tham gia thực bào và xác định chỉ số thực bào (PI - phagocytic index).

Chỉ số thực bào PI được xác định dựa trên số tế bào tham gia thực bào trên tổng số tế bào quan sát được:

$$PI = \frac{n}{N} \times 100$$

Chú thích: PI: Chỉ số thực bào

n: Số tế bào tham gia thực bào

N: Số tế bào quan sát (mỗi lam kính quan sát 200 tế bào)

Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu về diện tích phân tán của hồng cầu được xử lý thống kê. Giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (SD) được xác định bởi One-way analysis of variance (ANOVA) trên Minitab 16. Thí nghiệm ghi nhận kết quả có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.

Các số liệu về khả năng thực bào của hồng cầu được xử lý bằng các thuật toán thống kê trên máy vi tính bằng phần mềm Minitab 16.

Giá trị PI được trình bày ở dạng tỉ lệ và khoảng ước lượng với độ tin cậy 95%.

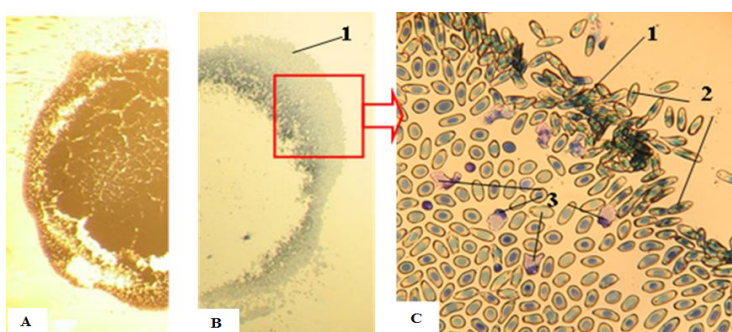
3. Kết quả và biện luận

3.1. Khả năng di cư tự phát của tế bào hồng cầu Éch đồng

Để khảo sát khả năng di cư tự phát của tế bào hồng cầu, thí nghiệm được tiến hành với dung dịch máu chưa tách hồng cầu (gồm hồng cầu và bạch cầu). Kết quả thí nghiệm cho thấy, trước khi di cư các tế bào chiếm toàn bộ diện tích ô nuôi (hình 3.1

A); sau 24 giờ nuôi ủ, các tế bào di chuyển tập trung ra phần rìa của ô nuôi (hình 3.1 B). Trong quá trình di cư, tế bào hồng cầu đã di cư tích cực và nhanh hơn tế bào bạch cầu (hình 3.1 C).

Theo kết quả của một nghiên cứu của S.I. Golovko (2010) [9], trong mối so sánh tương quan với tế bào hồng cầu của cá và chim, tế bào hồng cầu ếch có hàm lượng dự trữ tế bào chất và dự trữ màng cao hơn cho phép chúng hình thành chân giả dài hơn. Sự hình thành chân giả ở hồng cầu có nhân của ếch, cũng như ở cá và chim, cho phép chúng tham gia vào hoạt động di cư [6], thực hiện các chuyển động kiểu amip và tham gia vào quá trình thực bào [15], tương tự bạch cầu.



Hình 3.1. Sự phân bố của tế bào máu *Rana rugulosa* trong ô nuôi

Trước di cư: A – độ phóng đại x40; sau 24 giờ nuôi ủ: B – độ phóng đại x40, C – độ phóng đại x400; 1 – vùng rìa ô nuôi, 2 – hồng cầu, 3 – bạch cầu

3.2. Đặc tính di cư của tế bào hồng cầu Ếch đồng dưới sự thay đổi nhiệt độ trong thí nghiệm in vitro

Để khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến đặc tính di cư của tế bào hồng cầu, thí nghiệm được tiến hành trong các điều kiện nhiệt độ nuôi ủ 20°C (nhiệt độ thấp so với điều kiện bình thường), nhiệt độ phòng (đối chứng, khoảng 28°C), 37°C (nhiệt độ cao so với điều kiện bình thường). Đặc tính di cư của tế bào hồng cầu được đánh giá thông qua việc xác định diện tích phân tán của các tế bào hồng cầu trong ô.

Bảng 3.1. Diện tích phân tán của hồng cầu sau 24 giờ ủ trong các điều kiện nhiệt độ khảo sát

Nhiệt độ (°C)	Số mẫu	Giá trị trung bình (mm ²)
37	30	5,6561 ± 0,5004 ^a
28	30	5,1850 ± 0,9003 ^b
20	30	4,1672 ± 0,7440 ^c

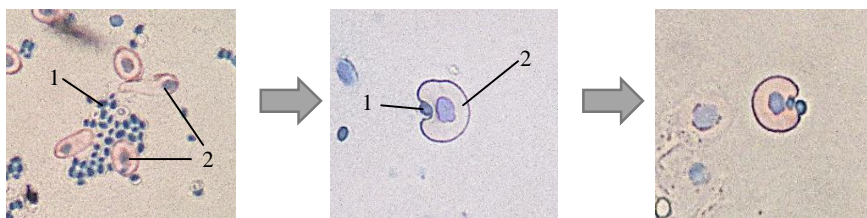
Chú thích: ^a, ^b, ^c: kết quả phân nhóm theo Tukey

Từ bảng 3.1, ta thấy diện tích phân tán của tế bào hồng cầu khi ủ ở 3 nhiệt độ khác nhau (20°C, 28°C, 37°C) là khác nhau và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Cụ thể, khi tăng nhiệt độ nuôi ủ lên đến 37°C, diện tích phân tán của tế bào hồng cầu tăng 0,4712mm² so với đối chứng (28°C), khoảng ước lượng 95% CI dao động trong khoảng 0,0198mm² đến 0,9225mm²; khi nhiệt độ nuôi ủ giảm xuống 20°C (so với đối chứng – 28°C), diện tích phân tán của tế bào hồng cầu giảm 1,0178mm², khoảng ước lượng 95% CI dao động trong khoảng 0,5664mm² đến 1,4692mm².

Ếch đồng *Rana rugulosa* sinh sống chủ yếu ở vùng nhiệt đới với khí hậu nóng ẩm quanh năm, biên độ nhiệt hẹp [4]. Thí nghiệm khảo sát đặc tính di cư được tiến hành ở ếch bắt trong tháng 3 năm 2014. Giai đoạn tháng 2-3-4, điều kiện nhiệt độ ở TP Hồ Chí Minh và khu vực lân cận dao động trong khoảng 27-28°C [1]. Khi hạ thấp nhiệt độ ủ xuống còn 20°C, đây là nhiệt độ không thuận lợi đối với Ếch đồng tại thời điểm này trong năm, do đó, hoạt động di cư tự phát của các tế bào hồng cầu giảm đi. Việc giảm hoạt động di cư tự phát nhằm tiết kiệm năng lượng của cơ thể trước điều kiện nhiệt độ môi trường hạ thấp, vì ếch là động vật biến nhiệt. Trong khi đó, việc tăng nhiệt độ ủ lên 37°C có tác động rất đáng kể lên việc thực hiện các chức năng của tế bào hồng cầu ếch [10] làm tăng hoạt động di cư tự phát của tế bào hồng cầu.

3.3. Khả năng thực bào của tế bào hồng cầu Ếch đồng

Kết quả thí nghiệm đã chỉ ra rằng, các tế bào hồng cầu có nhân có khả năng tham gia thực bào tương tự như bạch cầu. Tế bào hồng cầu khi nuôi ủ với các đối tượng thực bào (*S. cerevisiae*, *B. subtilis*, *E. coli*) đã tạo ra các chân giả để bao lấy các tế bào vi khuẩn (hình 3.2).



Hình 3.2. Quá trình thực bào ở hồng cầu *Rana rugulosa*
1 – tế bào nấm men, 2 – hồng cầu

Cơ chế này không khác so với cơ chế đã được biết đến rõ ở tế bào bạch cầu. Kết quả thí nghiệm đã khẳng định giả thiết của P. Prunesco (1971) [15], ông đã nêu ra rằng ngoài khả năng thực bào không chỉ có ở tế bào bạch cầu. Tế bào hồng cầu máu có khả năng tạo ra chân giả để di chuyển đến những nơi “cần thiết”, để thực hiện chức năng miễn dịch khi cơ thể có nhu cầu. Sự di cư này là một trong những giai đoạn của quá trình thực bào. [12]

Ngoài ra, để thực hiện chức năng miễn dịch của mình, ở các thể thực bào cần phải có sự hiện diện của “dự trữ màng” (membrane reserve) dưới dạng các “gấp” (folds) của màng tế bào. “Dự trữ màng” được các hồng cầu (trừ hồng cầu của động vật hữu nhũ),

bạch cầu và tiểu cầu sử dụng để tạo ra các chân giả trong việc di chuyển kiểu amip. Nhờ các “nếp gấp” trên màng, các thể thực bào có thể biến đổi hình dạng khi đi qua các tiểu mao mạch. Đại lượng “dự trữ màng” đã được nghiên cứu nhiều ở tế bào bạch cầu động vật hữu nhũ (đa số trên người). Ở tế bào hồng cầu ếch cũng đã phát hiện “dự trữ màng” giúp chúng thực hiện quá trình di cư và thực bào. [6]

3.4. Hoạt tính thực bào của hồng cầu Ếch đồng *Rana rugulosa*

Để đánh giá khả năng bào thực của tế bào hồng cầu, thí nghiệm được tiến hành với đối tượng thực bào *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* và *Escherichia coli* trong các điều kiện nhiệt độ nuôi ủ 20°C, nhiệt độ phòng (đối chứng, khoảng 28°C), 37°C.

Khả năng thực bào của tế bào hồng cầu được đánh giá thông qua chỉ số thực bào (PI – tỉ lệ phần trăm tế bào hồng cầu thực bào trong 30-120 phút đối với tổng số lượng tế bào quan sát). Kết quả thí nghiệm được thể hiện trong bảng 3.2.

Bảng 3.2. Chỉ số thực bào PI của tế bào hồng cầu đối với các đối tượng thực bào khác nhau trong các nhiệt độ nuôi ủ khác nhau (Prop. (%))

Nhiệt độ nuôi ủ (°C)	Đối tượng thực bào		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
20	36,95 ^{aA}	24,58 ^{aB}	36,78 ^{aA}
28	31,87 ^{bA}	31,02 ^{bA}	33,93 ^{bB}
37	36,03 ^{aA}	26,37 ^{cB}	33,52 ^{bC}

Chú thích: ^{a, b, c} – sự phân nhóm khác biệt theo cột

^{A, B, C} – sự phân nhóm khác biệt theo hàng

Từ bảng 3.2 ta thấy, khi thay đổi nhiệt độ ủ, chỉ số thực bào PI của tế bào hồng cầu đối với *S. cerevisiae* có sự thay đổi có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Khi hạ thấp nhiệt độ ủ từ 28°C xuống còn 20°C, chỉ số thực bào PI tăng 1,160 lần. Đồng thời, khi tăng nhiệt độ ủ đến 37°C, chỉ số thực bào PI tăng từ 1,131 lần.

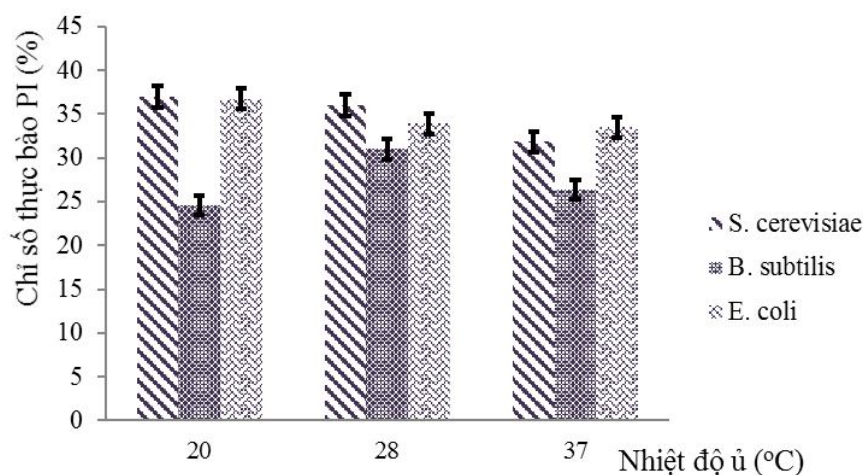
Ở nhiệt độ ủ là 28°C, chỉ số thực bào PI của tế bào hồng cầu thấp hơn chỉ số thực bào PI của tế bào hồng cầu ở nhiệt độ ủ 20°C và 37°C. Ếch là động vật biến nhiệt, các hoạt động sinh lí của ếch nhạy cảm với những thay đổi của nhiệt độ môi trường [11]. Khi nhiệt độ môi trường hạ thấp (20°C) hoặc tăng cao (37°C) khiến hệ thống miễn dịch của ếch nhạy cảm hơn [11], sự có mặt của nấm men (vật thể lạ) là tín hiệu làm tăng hoạt tính thực bào, từ đó, tỉ lệ thực bào ở 2 nhiệt độ ủ này cao hơn so với tỉ lệ thực bào ở nhiệt độ ủ đối chứng (28°C). [17]

Thí nghiệm tiến hành với đối tượng thực bào *B. subtilis*, chỉ số thực bào PI thu được có sự thay đổi ngược lại ($p < 0,05$). Khi hạ thấp nhiệt độ ủ từ 28°C xuống còn 20°C hoặc tăng lên đến 37°C, chỉ số thực bào PI đều giảm lần lượt là 1,262 lần và 1,073

lần tương ứng. *B. subtilis* là vi khuẩn ưa ấm, điều kiện nhiệt độ 37°C là điều kiện thuận lợi cho các hoạt động sinh trưởng, trao đổi chất, có thể *B. subtilis* đã thể tổng hợp được kháng sinh (antibiotic) sublinin [7]. Kháng sinh này đã kìm hãm quá trình thực bào của tế bào hồng cầu *Rana rugulosa*. Ở điều kiện nhiệt độ 20°C, đây là nhiệt độ thấp so với nhiệt độ tối ưu cho *B. subtilis* sinh trưởng. Có thể, khi ủ ở nhiệt độ này, *B. subtilis* bắt đầu chuyển sang tồn tại ở dạng bào tử [3], các tín hiệu hóa học hoạt hóa quá trình thực bào bị giảm đi, từ đó, làm giảm tỉ lệ thực bào của tế bào hồng cầu ếch.

Khảo sát chỉ số thực bào PI của hồng cầu Ếch đồng đối với *E. coli*, ta thấy được một xu hướng thay đổi khác. Cụ thể, khi hạ thấp nhiệt độ ủ từ 28°C xuống còn 20°C, chỉ số thực bào PI tăng 1,097 lần ($p < 0,05$), còn khi nhiệt độ ủ tăng lên đến 37°C thì chỉ số thực bào PI giảm từ 33,93% xuống 33,52%, tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). *E. coli* được xem như một “mẫu thử dễ dàng” trong các thí nghiệm về hệ thống miễn dịch tự nhiên [11], đồng thời, đây là một đối tượng kí sinh quen thuộc ở các loài động vật. Điều này có thể giải thích cho sự không khác biệt về chỉ số thực bào PI dưới sự thay đổi nhiệt độ từ 28°C lên 37°C [11]. Trong khi đó, nhiệt độ ủ 20°C có thể đã ảnh hưởng đến đồng thời cả *E. coli* lẫn hoạt động sinh lí của *Rana rugulosa*, trong đó, hệ miễn dịch có những phản ứng trả lời mạnh hơn [11] trong khi *E. coli* trở nên yếu hơn, dễ bị các tế bào thực bào tấn công hơn, từ đó, khi ủ ở nhiệt độ này đã làm tăng tỉ lệ thực bào của tế bào hồng cầu.

Từ bảng 3.2 và hình 3.3, ta thấy khả năng thực bào của hồng cầu Ếch đồng *Rana rugulosa* đối với những đối tượng thực bào khác nhau có sự khác biệt.



Hình 3.3. Biểu đồ thể hiện chỉ số thực bào của tế bào hồng cầu *Rana rugulosa* đối với *S. cerevisiae*, *B. subtilis* và *E. coli* trong các nhiệt độ nuôi ủ khác nhau

Từ hình 3.3 có thể thấy khả năng thực bào của tế bào hồng cầu *Rana rugulosa* đối với các đối tượng khác nhau là khác nhau. Trong đó, chỉ số thực bào PI đối với *S. cerevisiae* và *E. coli* luôn cao hơn so với *B. subtilis* ở tất cả các nhiệt độ khảo sát. Sự khác biệt này một phần là do *B. subtilis* có khả năng tổng hợp kháng sinh subtilin kìm hãm quá trình thực bào như đã đề cập ở trên. Mặc khác, sự khác biệt trên còn do tác động phức tạp của sự thay đổi nhiệt độ lên hoạt động của hệ miễn dịch. Sự thay đổi nhiệt độ có thể ảnh hưởng lên chức năng miễn dịch của lưỡng cư theo ba hướng: (1) gây ra phản ứng stress nhiệt; (2) tác động trực tiếp đến các tế bào miễn dịch hoặc hoạt động của các protein chức năng; (3) cho phép tác nhân gây bệnh thích nghi với môi trường nhiệt nhanh hơn vật chủ lưỡng cư mà nó kí sinh [16]. Sự khác biệt của chỉ số thực bào PI là kết quả của sự tương tác qua lại từ ba hướng tác động trên, phụ thuộc vào tín hiệu hóa học và hoạt tính sinh học của vật thể lạ (đối tượng thực bào), phụ thuộc vào cường độ, tốc độ ảnh hưởng của nhiệt độ lên đối tượng thực bào cũng như hoạt tính sinh lí, hệ miễn dịch của ếch.

4. Kết luận

Từ kết quả thực nghiệm, đề tài đã rút ra một số kết luận sau:

- Tế bào hồng cầu *Rana rugulosa* có khả năng di cư tự phát và tham gia thực bào. Trong quá trình di cư tự phát, hồng cầu *Rana rugulosa* hình thành chân giả với nhiều hình dạng khác nhau. Trong quá trình thực bào, hồng cầu tạo ra chân giả bao quanh đối tượng thực bào tương tự như ở bạch cầu.
- Sự tăng nhiệt độ nuôi ủ dẫn đến sự tăng hoạt tính di cư tự phát của tế bào hồng cầu *Rana rugulosa*.
- Khả năng thực bào của hồng cầu phụ thuộc vào điều kiện nhiệt độ và đối tượng thực bào. Trong đó, chỉ số thực bào PI đối với *S. cerevisiae* và *E. coli* luôn cao hơn so với *B. subtilis*. Chỉ số thực bào PI đối với *S. cerevisiae* tăng khi hạ nhiệt độ ủ (20°C) và tăng nhiệt độ ủ (37°C). Chỉ số thực bào PI đối với *B. subtilis* giảm khi hạ nhiệt độ ủ (20°C) và tăng nhiệt độ ủ (37°C). Chỉ số thực bào PI đối với *E. coli* tăng khi hạ nhiệt độ ủ (20°C) và thay đổi không đáng kể khi tăng nhiệt độ ủ (37°C).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Tài nguyên và Môi trường (2014), *Thông báo và dự báo khí hậu mùa 3 tháng III, IV, V năm 2014*, Trung tâm Nghiên cứu Khí tượng - Khí hậu, Viện Khoa học Khí tượng Thủy văn và Môi trường, Hà Nội, tr.7.
2. Nguyễn Hữu Đăng (2004), *Những động vật cho bài thuốc quý*, Nxb Trẻ TP Hồ Chí Minh, 70 trang, tr.13-14.
3. Nguyễn Thị Ngọc Huyền (2012), *Chọn hỗn hợp vi khuẩn Bacillus đối kháng Vibrio*, Luận văn Tốt nghiệp Đại học Ngành Bệnh học thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.
4. Trần Kiên và Nguyễn Thái Tự (1992), *Động vật có xương sống*, Nxb Giáo dục, 172 tr, tr.47-68.

5. Nguyễn Văn Long (2004), *Điều tra hiện trạng ương và nuôi cá rô đồng thương phẩm ở Cần Thơ*, Luận văn Tốt nghiệp Đại học, 44 tr.
6. Cherniavsky S.D., Fedorova M.Z., N.A. Zabinyako, Trapeznikova K.O. (2008), “Migratory Activity of hemocytes of amphibians in different Environments”, *Abstracts of the VI Congress of the Siberian Saline*, Barnaul., Vol. 2, pp.52-53.
7. Duglas S.D., Cue P.G. (1983), *Phagocytosis study in clinical practice*, Medicine, 112p.
8. Fedorov M.Z., Levin V. (2001), “Spontaneous migration of neutrophils in Blood A Mixed population of Leukocytes and ITS Changes Under the Influence of Substances autoplasm in different states of the Functional Organism”, *Clinical Laboratory Diagnostics*, Vol. , pp.16 -19
9. Golovko S.I. (2010), *Comparative characteristics of membrane Reserve Nuclear Blood cells of vertebrates*, Abstract. Ph.D. dis. Yaroslavl YAGPU.
10. Huu Hammers (2012), *Immigration activity of some blood vertebrates*, Thesis for the academic degree Master, Belgorod State National Research University, Belgorod.
11. Kimberly A. Terrell (2012), “Cryptic impacts of temperature variability on amphibian immune function”, *The Journal of Experimental Biology*, 216, pp.4204-4211.
12. Pessier A.P. (2007), *Cytologic diagnosis of disease in amphibians*, Vet Clin North Am Exot Anim Pract, Vol. 10, pp.187-206.
13. Pizov A.V., Levin V.N., Fedorova M.Z. (2000), “Migration activity of leukocytes in normal conditions and in diffuse connective tissue diseases”, *Pedagogical Bulletin No 3*, Yaroslavl: YAGPU, pp.52-54.
14. Prokopenko L. G., Yakhontov Y. Y. (1981), “The mechanism of stimulation of the immune response by the action of high temperature on the body”, *Pathological physiology and experimental therapy*, Vol. 6, pp.62-66.
15. Prunesco P. (1971), “Natural and Experimental Phagocytosis by Erythrocytes in Amphibians”, *Nature. New Biol.*, Vol. 231, pp.143–144.
16. Raffel (2006), “Negative effects of changing temperature on amphibian immunity under field conditions”, *Functional Ecology*, pp.819-828.
17. Singh K. (1977), “Hematology of the common Indian frog (*Rana tigrina*)”, *I. Erythrocytes*, Anat Anz, Vol. 141(3), pp. 280-284.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 25-7-2014; ngày phản biện đánh giá: 11-8-2014;
ngày chấp nhận đăng: 20-8-2014)