

УДК (591.111.1+57.034):597.8

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ЭРИТРОПОЭЗА И ЕГО ТОПОГРАФИЧЕСКОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ У ЛЯГУШКИ ОЗЕРНОЙ

Акуленко Н.М., к.б.н., ст. научный сотрудник

Институт зоологии НАН Украины

Эритропоэтическая активность у лягушки озерной (*Rana ridibunda*) выявляется в костном мозге (на протяжении всего года, в печени, селезенке и периферической крови (в зависимости от степени активизации эритропоэза). Наибольшая эритропоэтическая активность приходится на июль-август. Вероятно, это зависит от наличия пластических и энергетических ресурсов для соответствующих синтезов и, в меньшей мере, от температуры среды.

Ключевые слова: Амфибии, эритропоэз, костный мозг, печень.

Акуленко Н.М. СЕЗОННА ДИНАМІКА ЕРИТРОПОЕЗА ТА ЙОГО ТОПОГРАФІЧНИЙ РОЗПОДІЛ У ЖАБИ ОЗЕРНОЇ / Інститут зоології НАН України, Україна

Еритропоетична активність у жаби озерної (*Rana ridibunda*) виявляється в кістковому мозку (протягом всього року), у печінці, селезінці та периферичній крові (залежно від ступеня активізації еритропоезу). Найбільша еритропоетична активність припадає на липень-серпень. Вірогідно, це залежить від наявності пластичних та енергетичних ресурсів для відповідних синтезів і, меншою мірою, від температури довкілля.

Ключові слова: амфібії, еритропоез, кістковий мозок, печінка

Akulenko N.M. THE SEASONAL DYNAMIC OF THE ERYTHROPOIESIS OF THE FROG (RANA RIDIBUNDA) AND IT'S TOPOGRAPHICAL ALLOCATION / Institute of zoology NAS of Ukraine, Ukraine

The erythropoietic activity of the frog (*Rana ridibunda*) is manifested in the bone marrow (during the whole year), in liver, spleen and peripheral blood (it depends upon a degree of erythropoietic activity). The climax of erythropoietic activity takes place in July-August. Probably it depends upon presence of plastic and energetic resources for corresponding synthesis, and to some extent upon the environmental temperature.

Key words: amphibia, erythropoiesis, bone marrow, liver.

ВСТУПЛЕНИЕ

В последние годы бесхвостые амфибии используются рядом исследователей как модельный объект для изучения тонких межклеточных и внутриклеточных взаимодействий при эмбриональной и дефинитивной инициации эритропоэза [22, 23]. При этом, несмотря на наличие множества высокотехнологических исследований, многие специфические для данной группы особенности кроветворения остаются так и не проясненными. В частности, распределение гемопоэтической активности между различными звеньями кроветворной системы у амфибий изучается более ста лет, однако с огромным количеством потенциального материала работало немного авторов, поэтому, помимо положительных знаний, накопилось много вопросов и противоречий [16, 12]. Сама локализация эритропоэза у бесхвостых амфибий после метаморфоза является одним из спорных моментов. Одни авторы считают костный мозг лягушек лимфо-гранулоцитопоэтическим [16, 17], другие описывают в нем эритропоэз [12]. Существуют разночтения относительно наличия и удельного веса эритропоэза в селезенке у бесхвостых амфибий и рептилий [4]. Наконец, далеко не все авторы, исследующие гемопоэз у этих групп животных, в принципе учитывают эритропоэтическую активность печени [10].

Особый вопрос – является ли у амфибий кровеносное русло полноправной частью гемопоэтической системы? С одной стороны, наличие незрелых клеток, в частности эритроидных, в циркуляции никто не отрицает. Однако часть авторов считает, что клетки бесхвостых амфибий в кровеносном русле не синтезируют ДНК и не делятся [5]. Ответы на эти вопросы необходимы, чтобы прояснить специфику регуляции эритропоэза у амфибий. Поэтому целью нашей работы было количественное изучение эритропоэтической активности во всех звеньях гемопоэтической системы у бесхвостых амфибий на примере *Rana ridibunda* с учетом годовой динамики этого процесса.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Годовая динамика эритропоэтической активности в различных кроветворных очагах у бесхвостых амфибий изучалась на 46 самцах лягушки озерной (*Rana ridibunda*), которых забирали (по 2 экз. с паузами от 2-х недель до 1 месяца) в течение 2-х лет.

Все животные были половозрелыми (8-10 см, 45-50 г.), отловленными в экологически чистых местах. Мазки и отпечатки фиксировались и окрашивались по Паппенгейму.

Эритропоэтическую активность определяли путем подсчета на мазках периферической крови и мазках-отпечатках костного мозга, печени и селезенки доли незрелых клеток эритроидного ряда. Подсчет производился в 15 полях зрения. Таким способом охватывалось от 150 (при высоком проценте незрелых эритроцитов) до 500 клеток эритроидного ряда. Объективность метода подтверждается тем, что при повторных определениях эритропоэтической активности у одного и того же животного (на втором препарате) различие составляло десятые доли процента. Определение среднего, ошибки, достоверности различий между выборками производилось стандартными методами с применением критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как отмечалось многими исследователями [12, 4], у пойкилотермных позвоночных интенсивность эритропоэза сильно зависит от времени года. Поэтому, чтобы оценивать вклад того или иного очага, нужно иметь, прежде всего, результаты по сезонной динамике хотя бы на одном модельном объекте. В качестве такового мы выбрали лягушку озерную по ряду причин, среди которых, не в последнюю очередь, учитывалось наличие двух фаз в ее годовом цикле: если в активном состоянии она ведет полуводный образ жизни, то зимует исключительно в воде, которая является гипогравитационной средой [9]. Кроме того, во время зимовки снижена температура тела и резко ограничена двигательная активность. Мы предполагали, что эти факторы могут обусловить существенные различия в локализации эритропоэза.

Однако, судя по приведенным данным (табл. 1, 2), это предварительное предположение не подтвердилось. Группы 1, 2 и 3 забирались во время активной, относительно “сухопутной” фазы годового цикла, группы 4 и 5 – во время зимовки в воде. Видно, что два эти периода ни по каким признакам нельзя объединить между собой или противопоставить друг другу (табл. 2). Напротив, есть явное сходство группы 1 (выход из зимовки) и 5 (самый холодный период зимовки). Большое сходство есть и между группой 3 (период между сезоном размножения и уходом на зимовку) и группой 4 (относительно теплый период зимовки).

Таблица 1 – Доля незрелых эритроцитов в различных гемопоэтических очагах у лягушки озерной в различное время года и у тритона гребенчатого (в %).

Группы по времени забора	Кол-во животных	Периферическая кровь	Печень	Селезенка	Костный мозг	Печень, приведен. значение	Селезенка, приведен. значение	Костный мозг, приведен. значение
1 (апрель – начало мая)	12	0,118±	0,786±	0,106±	4,672±	0,596±	-0,07±	4,575±
		0,124	0,355	0,115	0,745	0,4	0,211	0,752
2 (середина мая – июнь)	14	0,125±	2,496±	1,895±	9,409±	2,371±	1,758±0,5	9,284±
		0,072	0,727	0,855	2,848	0,684	27	2,862
3 (июль – август)	8	6,338±	9,918±	9,164±	28,45±	3,58±	3,045±2,0	22,12±
		1,481	1,556	2,046	5,506	1,584	43	4,666
4 (сент. – март, без декабря и января)	8	3,704±	6,58±	2,98±	12,28±	2,476±	-0,22±	6,457±
		1,217	1,703	0,811	2,044	1,503	1,082	2,659
5 (декабрь и январь)	4	0±0	0,858±	0,775±	3,29±	0,858±	0,388±	3,29±
			0,91	0,645	3,871	0,91	0,456	3,871

Таким образом, наши результаты позволяют отсеять несколько факторов, которые не являются определяющими для эритропоэза – например, пребывание в воде/на суше или двигательная активность животного. Температурный фактор тоже не является решающим. С понижением температуры (различие между группами 3 и 4) интенсивность эритропоэза во всех локусах снижается, но перераспределения или полной остановки не происходит.

Хотя в самые холодные месяцы (группа 5) эритропоэз минимален, нет уверенности, вызвано ли это ли охлаждением воды ниже какого-то критического уровня, или дефицитом кислорода в воде подо льдом. Возможно, именно недостаток кислорода вынуждает отказаться от энергетических затрат на клеточную пролиферацию и дифференцировку.

Таблица 2 – Достоверность различий между группами особей лягушки озерной, выделенными в зависимости от времени отлова (см. табл. 1)

Сравниваемые группы	Периферическая кровь	Печень	Селезенка	Костный мозг	Печень, приведенное значение	Селезенка, приведенное значение	Костный мозг, приведенное значение
1 – 2	—	p<0,05	p<0,05	—	p<0,05	p<0,01	—
1 – 3	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p=0,001	p<0,10	—	p<0,005
1 – 4	p<0,01	p<0,005	p<0,005	p<0,005	—	p=0,05	—
1 – 5	—	—	—	—	—	—	—
2 – 3	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,01	—	—	p<0,05
2 – 4	p<0,01	p<0,05	—	—	—	p<0,01	—
3 – 4	—	—	p<0,05	p<0,05	—	—	p<0,01
3 – 5	p=0,001	p<0,001	p<0,005	p<0,005	—	—	p=0,01
4 – 5	p<0,05	p<0,05	p<0,1	—	p<0,05	—	—

Таким образом, наши результаты позволяют отсеять несколько факторов, которые не являются определяющими для эритропоэза – например, пребывание в воде/на суше или двигательная активность животного. Температурный фактор тоже не является решающим. С понижением температуры (различие между группами 3 и 4) интенсивность эритропоэза во всех локусах снижается, но перераспределения или полной остановки не происходит. Хотя в самые холодные месяцы (группа 5) эритропоэз минимален, нет уверенности, вызвано ли это ли охлаждением воды ниже какого-то критического уровня, или дефицитом кислорода в воде подо льдом. Возможно, именно недостаток кислорода вынуждает отказаться от энергетических затрат на клеточную пролиферацию и дифференцировку.

По нашему мнению, решающим фактором для активизации эритропоэза у лягушки озерной является наличие пластических и энергетических запасов для построения эритроидных клеток. После выхода из спячки эритропоэз минимален (гр. 1), потому что организм животного истощен зимовкой и немногие оставшиеся ресурсы тратятся на физическую активность и гаметогенез. В середине-конце лета пищевые ресурсы максимальны, а организм животного успел восстановиться после нереста. Начинается активное обновление эритроидных клеток, которое более низкими темпами продолжается и во время зимовки.

Заслуживает внимания также топографическое распределение эритропоэза. При минимальном его уровне (группы 5 и 1) эритропоэтическую активность проявляет только костный мозг. С середины мая в процесс вовлекается печень и селезенка, с июля – периферическая кровь. С осени, однако, активность костного мозга и печени снижается, селезенки – сходит на нет, зато в периферической крови достаточно заметный эритропоэз сохраняется в течение всей зимовки, кроме самых холодных месяцев. При этом эритропоэтическая активность костного мозга в течение всего года достоверно выше по сравнению со всеми остальными очагами (табл. 3).

Таблица 3 – Достоверность различий в эритропоэтической активности различных гемопоэтических очагов у лягушки озерной в течение года.

Сравнение внутри группы	Печень – периферическая кровь	Костный мозг – периферическая кровь	Печень – костный мозг	Печень – селезенка	Периферическая кровь – селезенка
1	p<0,10	p<0,0001	p<0,001	p<0,001	—
2	p<0,005	p<0,001	p<0,05	—	p<0,005

3	p=0,10	p<0,0001	p<0,01	—	—
4	—	p<0,001	p=0,05	—	—
5	—	—	—	—	—

Исследуя сезонные изменения гемопоэза у травяной лягушки, Горышина [4] для объяснения результатов предполагает наличие в организме амфибий неких “внутренних часов”, связанных с годовым циклом и не зависящих от температуры или состояния конкретного животного. Нам это представляется маловероятным, потому что у многих экземпляров эти гипотетические часы “спешат” или “отстают”. В частности, большие величины статистической погрешности вызваны тем, что внутри каждой из выделенных нами групп находятся 1-2 особи, которых по состоянию гемопоэза следовало бы отнести в соседние. Для хорошо изученных фаз в жизни амфибий – таких как выход из зимней спячки, икрометание, метаморфоз – известно, что их сроки изменчивы и во многом определяются экологическими факторами или конкретным физиологическим состоянием данной особи [7]. Нет повода сомневаться, что интенсивность эритропоэза определяется так же.

По материалам Нишанбаевой, приведенным в монографии Хамидова с соавт. [12], все процессы гемопоэза, включая эритропоэз, активизируются весной и затухают осенью.

По нашим данным, однако, эритропоэз максимален в конце лета и большую часть зимовки держится на довольно высоком уровне. Проще всего списать разницу на экологические различия между Киевом и Ташкентом, но некоторые нюансы заставляют усомниться в методических аспектах подсчетов Нишанбаевой. Так, по ее данным соотношение проэритробласты: нормобласты в зависимости от сезона колеблется почти в 7 раз; то же самое происходит с отношением миелобластов к промиелоцитам и миелоцитам.

К тому же в некоторых миелограммах показано значительное (в 2 раза) превышение количества ранних предшественников эритро- и гранулоцитопоэза по отношению к поздним. Все это выглядит маловероятным. С другой стороны, митотический индекс по тем же данным Нишанбаевой зимой значительно выше, чем летом (1,7 и 1,02), что показывает наличие большого пула делящихся клеток. Это может служить косвенным, но достаточно весомым подтверждением интенсивной дифференцировки эритроцитов во время зимовки.

Для того, чтобы говорить об относительном вкладе различных органов в эритропоэз, надо представлять себе не только долю созревающих эритроцитов, но и объем крови в каждом конкретном органе. В рамках данной работы об этом можно говорить только приблизительно, однако понятно, что общий объем крови в циркуляции (периферическая кровь) значительно больше, чем в любом из органов кроветворной системы. Соответственно, даже небольшой процент незрелых эритроцитов в циркуляции обеспечивает значительный вклад в эритропоэз, если они действительно проходят там все стадии созревания. Последнее, как упоминалось выше, признается не всеми авторами. Обзор противоположных утверждений дан в работе Горышиной [6]. Однако многие авторы описывают полноценный эритропоэз в периферической крови у различных групп амфибий [18]. Более того, можно предположить, что поддержание эритропоэза на организменном уровне возможно у многих рептилий [3] и даже примитивных птиц, потому что некоторое количество незрелых эритроцитов в циркуляции для них норма.

Печень амфибий значительно крупнее селезенки и совокупного объема костномозговых полостей. Поэтому даже если концентрация незрелых эритроцитов в печени в 2-3 раза меньше, чем в костном мозге, ее совокупный вклад в эритропоэз больше. Между тем, как мы отмечали выше, многие авторы попросту игнорируют печень в качестве эритропоэтического органа. Поэтому вопрос, насколько и за счет каких механизмов печень участвует в эритропоэзе представляется нам важным.

Козлов с соавторами [17] выделяют несколько уровней регуляции гемопоэза: гормональный (на уровне всего организма), гуморальный (примерно соответствует тканевому или внутриорганному) и клеточный. Как отмечалось, Sagavini [18] и другие экспериментальным путем показали, что у хвостатых амфибий первый – организменный уровень – регуляции в экспериментальных условиях обеспечивает полноценный эритропоэз в периферической крови. Однако хвостатые амфибии по организации гемопоэтической системы существенно отличаются от бесхвостых. Для зеленых лягушек можно предположить два механизма эритропоэза в печени: либо стимуляция эритропоэза происходит на организменном уровне, а печень представляет собой только удобный фрагмент общей циркуляции, состоящий из множества расширенных синусоидов, в которых задерживается большой объем крови [13, 12]. Либо, напротив, компоненты печени представляют собой активный участок кроветворного микроокружения и непосредственно стимулируют эритропоэз [14]. В пользу второй точки зрения существуют определенные экспериментальные подтверждения (самые свежие работы [22, 23]). Чтобы отчасти прояснить этот вопрос, мы ввели такие показатели, как доля незрелых эритроцитов в печени

(селезенке, костном мозге), приведенное значение, который определяется как разность доли незрелых эритроцитов в печени и периферической крови.

Если доля незрелых клеток в органе достоверно выше, чем в кровотоке, значит имеет место направленная стимуляция гемопоэза внутри органа, а его компоненты выполняют роль кроветворного микроокружения. С этой точки зрения был проанализирован сезонный материал по лягушке озерной (табл.3).

Данные в таблицах показывают, что для печени лягушки озерной могут быть справедливы обе точки зрения. Весной печень играет самостоятельную роль в эритропоэзе (Табл.1, 3) в связи с наличием запасов железа в пигментных клетках или реутилизации его сразу после фагоцитоза дефектных эритроцитов. В другое время эритропоэз в печени достоверно не превышает таковой в периферической крови. То же справедливо и для селезенки, однако, вероятно, активность селезенки зависит от иммунного статуса животного, поэтому индивидуальная вариабальность выше.

В костном мозге доля незрелых эритроцитов постоянно выше, чем в других участках гемопоэтической системы. Следовательно, строма костного мозга стимулирует эритропоэз даже во время зимовки, когда концентрация миелоидных клеток в органе резко снижена. Это интересно, так как подтверждает физиологическую активность ряда клеточных линий при очень низких литературах. В связи с большим сроком жизни эритроцитов бесхвостых амфибий [15, 19], для них вполне возможно сезонное обновление эритроидного ростка раз в году, перед зимовкой и отчасти во время ее.

ВЫВОДЫ

1. Активность эритропоэза у лягушки озерной и его распределение между звеньями гемопоэтической системы в течение года существенно изменяется.
2. Постоянный эритропоэз обнаруживается в костном мозге; при активизации в эритропоэзе участвуют печень, селезенка и периферическая кровь.
3. По-видимому, решающую роль в активизации эритропоэза играет наличие пластических и энергетических запасов для его обеспечения. В условиях Киева это означает его максимальную активность в конце лета и начале осени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акуленко Н.М. Сезонная динамика количества и функциональной активности макрофагов и пигментных клеток в печени лягушки озерной // Вестник зоологии, – 1998, – 32, №4. – С.86-93.
2. Акуленко Н.М. Сезонные изменения морфологии и клеточного состава кроветворных органов бесхвостых амфибий // Актуальні питання мофології. Фахові видання наукових праць 2-го з'їзду АГЕТ України. – Луганськ, 1998. – С. 7-9
3. Гольдберг Д.И., Гольдберг Е.Д., Шубин Н.Г. Гематология животных. – Томск: Изд-во Томского ун-та, 1973. – 188 с.
4. Горышина Е.Н. Изучение кинетики репродукции и дифференцировки клеток нейтрофильно-макрофагального ряда травяной лягушки в различные сезоны года // Цитология. – 1980. – 22, №7. – С. 765-773.
5. Горышина Е.Н. Авторадиографическое изучение скорости обновления нейтрофилов и тромбоцитов у летних и зимних лягушек. // Цитология. – 1984. – 26, №4. – С. 392-400.
6. Горышина Е.Н. Сравнительный анализ сезонных изменений процессов кроветворения в селезенке и периферической крови травяной лягушки. 11. Тромбоцитарный и нейтрофильный ряды. // Цитология. – 1986. – 25, №6. – С. 667-677.
7. Кузьмин С.Л. Земноводные бывшего СССР. – М.: Товарищество научных изданий КМК. – 1999 – 298с.
8. Козлов В.А., Колесникова С.М., Цирлова И.Г., Журавкин И.Н., Громыхакина Н. Ю. Уровни регуляции пролиферативными и дифференцировочными потенциями стволовых клеток. // Механизмы регуляции в системе крови. – Красноярск., 1978. – Ч1. – С. 39-40.
9. Коржув П.А. Гемоглобин. – М.: Наука. – 1964. – 287 с.
10. Сакута Г.А. Горышина Е.Н. Сравнительный анализ сезонных изменений процессов кроветворения в селезенке и периферической крови травяной лягушки. 1. Эритроидный ряд // Цитология. – 1982. – 24, №11. – С. 1291-1297.

11. Старостин В.И., Мичурина Т.В. Строма кроветворных органов и ее взаимоотношения со стволовой кроветворной клеткой // Соединительная ткань и кровь. Итоги науки и техники ВИНТИ. Т.7. Морфология человека и животных. Антропология. – М. – 1977, – с. 59-110.
12. Хамидов Д.Х., Акилов А.Т., Турдыев А.А. Кровь и кроветворение у позвоночных животных. – Ташкент: Фан, 1978. – 168с.
13. Хрущов Г.К. Эволюция кроветворных органов позвоночных // Лимфоидная ткань в восстановительных и защитных процессах. – М.: Наука, 1966. – С. 7-24.
14. Шалимов В.А. Эритропоэз в печени земноводных и млекопитающих – Киев: Институт зоологии НАН Украины, 1996 – 103 с.
15. Altland P.D., Brace K.C. Red cell life span in the turtle and toad // Am. J. Physiol. – 1962, 203, N6. – P. 1188-1190.
16. Andrew W. Comparative hematology. – New York.: Grune&Stratton, 1965 – 188 p.
17. Campbell F.R. Ultrastructure of the bone marrow of the frog. // Am. J. Anat. – 1970. – 129, N3. – P. 323-355.
18. Caravini C. The newt as a model studying dyserythropoiesis. // Naturwissenschaften. – 1981. – 68. N8. – P. 432-433.
19. Cline M.J., Waldmann T.A. Effect of temperature on erythropoiesis and red cell survival in the frog. // Am. J. Physiol. – 1962, 203, N3. – P. 401-403.
20. Frangioni G, Borgioli G Periodic changes in the organs involved in the erythropoiesis of anemic newts.// J Exp Zool. – 1987. – 243, N3. – P.409-416
21. Frangioni G, Borgioli G Sites and trend of erythropoiesis in anemic, normal, and splenectomized newts.// J Exp Zool. – 1988. 247, N3. – P. 244-250
22. Koibuchi N, Kaneda Y, Taniyama Y, Matsumoto K, Nakamura T, Ogihara T, Morishita R. Essential role of HGF (hepatocyte growth factor) in blood formation in *Xenopus*. //: Blood. – 2004, May 1; 103 (9) – P. 3320-3325.
23. Koibuchi N, Taniyama Y, Nagao K, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R. The effect of VEGF on blood vessels and blood cells during *Xenopus* development. //Biochem Biophys Res Commun. 2006 May 26; 344 (1). – P. 339-45.
24. Oyewale J. O. Further studies on osmotic resistance of nucleated erythrocytes during changes in temperature and pH.// J. Vet. Med. A. – 1994. – 41, N1. – P. 69-71.

УДК 615.831 : 616.8 – 009.12

ВЛИЯНИЕ БИОПТРОН-ЦВЕТОТЕРАПИИ НА СОСТОЯНИЕ БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Алексеенко М.В., к.мед.н., доцент, Голец В.А., к.б.н., доцент, Власенко К.Л., к.б.н., доцент,
Параева Е.Н., соискатель, Шкопинский Е.А., к.б.н., доцент

Запорожский национальный университет

Дополнение традиционных средств реабилитации больных гипертонической болезнью сеансами БИОПТРОН-цветотерапии значительно улучшает состояние здоровья данной категории. Отмечено положительное влияние на показатели гемокардиодинамики и их значения максимально приближены к показателям здоровых.

Ключевые слова: гипертоническая болезнь (ГБ), мужчины, реабилитация, БИОПТРОН-цветотерапия, показатели гемокардиодинамики.

Алексеенко М.В., Голец В.О., Власенко К.Л., Параева К.М., Шкопинський Є.О. ВПЛИВ БІОПТРОН-КОЛЬОРОТЕРАПІЇ НА СТАН ХВОРИХ ГІПЕРТОНІЧНОЮ ХВОРОБОЮ / Запорізький національний університет, Україна

Доповнення традиційних засобів реабілітації хворих гіпертонічною хворобою сеансами БІОПТРОН-кольоротерапії значно покращує стан здоров'я пацієнтів цієї категорії. Відмічено позитивний вплив на показники гемокардиодинаміки та їх значення максимально наближені до показників хворих.