



(597.8+568.113.6):616.41

Н. М. Акуленко

Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена
НАН Украины, ул. Б. Хмельницкого, Киев, 15,01601 Украина
E-mail: akden@i.ua

ОСОБЕННОСТИ КОСТНОМОЗГОВОГО КРОВЕТВОРЕНИЯ У НАЗЕМНЫХ ПОЙКИЛОТЕРМНЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ И «ТЕОРИЯ НИШИ»

Гемопоэтическая система бесхвостых амфибий и рептилий состоит из нескольких отделов. Часть из них связана со скелетными образованиями (костный мозг), часть не связана (печень, кровеносное русло). Наши данные показывают, что эти отделы функционально неравноценны. Соседство с костью и хрящом стимулирует пролиферацию клеток и дифференцировку ранних предшественников миелопоэза и, частично, эритропоэза. Это согласуется с «теорией ниши», ранее доказанной для представителей млекопитающих. Стимулирующая активность скелетных тканей (кости и хряща) зависит от времени года.

К л ю ч е в ы е с л о в а: амфибии, рептилии, костная ткань, гемопоэз.

Введение

В ходе эволюции наземных позвоночных появляются изменения, обуславливающие повышенные требования к процессам гемопоэза. Животные с ороговевающим кожным эпителием (рептилии, птицы, млекопитающие) не имеют развитого газообмена через кожу. Теплокровные позвоночные поддерживают в организме более высокий уровень метаболизма в течение всего года. Эти два обстоятельства являются причиной повышенных требований к интенсивности эритропоэза. Эти же изменения: усиление барьерной роли кожных покровов, переход к жизни в воздушной среде, возникновение эндотермии – изменяют требования к защитным механизмам. Вместо мощных неспецифических механизмов, основанных на фагоцитозе и химическом окислении и расщеплении патогенного материала, основной упор делается на более точные и избирательные механизмы специфического иммунитета.

В связи с выходом на сушу и переходом к теплокровности большую роль приобретает костномозговое кроветворение. В исследованиях на млекопитающих показано, что на поверхности кости существуют «ниши», в которых созданы особо благоприятные условия для пролиферации наименее дифференцированных предшественников кроветворения (Arai et. al., 2005; Forsberg, Smith-Berdan, 2009 и др.). Анализ источников, описывающих топографическое распределение очагов кроветворения у представителей различных эволюционных ветвей позвоночных, показывает, что соседство кроветворных образований с костью и хрящом является устойчивой тенденцией, которая выражается в создании различных кроветворных органов, связанных со скелетом (Акуленко, 2008). «Теория ниши» потенциально может объяснить, каким образом функционально

© Н. М. АКУЛЕНКО, 2015

обусловлены контакты между костью, хрящом и гемопоэтическими тканями. Однако, помимо костномозгового кроветворения (т. н. медуллярное кроветворение), у пойкилотермных тетрапод обнаруживается экстрамедуллярное кроветворение в печени, почках, селезенке. При этом, хотя локализация сколько-нибудь заметных скоплений миелоидной ткани у множества представителей амфибий и рептилий описана достаточно подробно еще в прошлом веке (Jordan, 1938; Andrew, 1965; Хамидов и др., 1978) и к этим исследованиям трудно добавить принципиально новые данные (de Abreu et al., 2009), неясных вопросов остается более, чем достаточно (Васильев, 2005; Allender, Fry, 2008). В частности, исследования, посвященные конкретным механизмам регуляции гемопоэза у амфибий и рептилий, до сих пор остаются единичными (Tanizaki et al., 2015). На амфибиях показано, что кровеносное русло при определенных условиях функционирует как полноценный отдел гемопоэтической системы (Маслова, Тавровская, 1993; Акуленко, 2011), но конкретные механизмы такой стимуляции также не исследованы. Наиболее очевидный вопрос, возникающий в связи с наличием множества кроветворных локусов, – насколько функционально равноценны различные отделы гемопоэтической системы амфибий и рептилий? Существуют ли у пойкилотермных тетрапод специфические механизмы стимуляции гемопоэза, связанные со скелетными тканями? Целью настоящего исследования была проверка данного предположения.

Материалы и методы

Количественные исследования гемопоэтической активности в различных кроветворных очагах производились на 46 самцах лягушки озерной (*Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771)), которые забирались (по 2 экз.) с интервалом от 1 недели до 1 месяца (зимой) в течение года. Все животные были половозрелыми (8–10 см, 45–50 г.) из популяций г. Киева и окрестностей. Подсчеты миелограмм и лейкограмм осуществлялись на мазках-отпечатках костного мозга, печени и периферической крови, окрашенных по Паппенгейму. На основании результатов для каждого животного вычислялся ряд специальных показателей (см. табл. 1). Затем были выделены 2 группы по 14 животных (весна и осень–зима) и одна из 18 (лето). Для каждой группы определялись средние, стандартная ошибка, достоверность различий с использованием критерия Стьюдента.

Для сравнительного исследования использовались: жаба зеленая (*Bufo viridis* (Laurenti, 1768) 2 экз.), шпорцевая лягушка (*Xenopus laevis* (Daudin, 1802) 2 экз.), краснобрюхая жерлянка (*Bombina bombina* (Linnaeus, 1761), 2 экз.), ящерица прыткая (*Lacerta agilis* (Linnaeus, 1758) 8 экз.), ящурка разноцветная (*Eremias arguta* (Pallas, 1773) 8 экз.), геккон каспийский (*Tenuidactylus caspius* (Eichwald, 1831) 5 экз.), слепозмейка (*Typhlops vermicularis* (Merrem, 1820) 4 экз.), уж водяной (*Natrix tessellata* (Laurenti, 1768) 2 экз.), полоз разноцветный (*Hemorrhois ravergieri* (Ménétries, 1832) 1 экз.). Полоз разноцветный был представлен материалом из коллекции, собранной до 1990 г.

Качественное гистологическое определение массивов миелоидной ткани в органах у озерных лягушек и у животных, взятых для сравнительного исследования, производилось на гистологических препаратах бедренной кости (ящерицы и лягушки), позвонков и нижней челюсти (у змей), а также печени. Материал для гистологического исследования фиксировался и декальцинировался в жидкости Буэна, заливался в парафин. Для изготовления препаратов парафиновые срезы толщиной 5 мкм, окрашивались по Паппенгейму, гематоксилином Майера-эозином, по Маллори, заключались в бальзам с использованием стандартных гистологических методик.

Результаты и их обсуждение

Как мы отмечали (Акуленко, 2012), костный мозг представляет собой центральную часть гемопоэтической системы бесхвостых амфибий. В полостях костей происходит пролиферация и дифференцировка клеток-предшественников всех ростков кроветворения. В периферической части – печени, селезенке и кровеносном русле – может выборочно активизироваться дифференцировка различных ростков кроветворения в зависимости от сезона и потребности организма. Кроме того, в костном мозге амфибий и рептилий всегда обнаруживаются «запасы» зрелых эозинофилов и нейтрофилов. Поэтому можно заключить, что костный мозг служит также для депонирования гранулоцитов.

Внутри костномозговых полостей у рассмотренных нами представителей амфибий и рептилий можно выделить несколько типов микроокружения: участки, прилежащие к

Таблица 1. Некоторые показатели миелограмм и лейкограмм (в %) и некоторые специальные показатели кроветворения в различных частях гемопоэтической системы лягушки озерной в зависимости от времени года

Table 1. Some parameters of myelograms and leukograms (in %) and some special indicators of hematopoiesis in various parts of the hematopoietic frog lake system, depending on the season

показатель	Костный мозг		печень		Периферическая кровь		Достоверность различий		
	М	m	М	m	М	m	печень: костный мозг	костный мозг: кровь	печень: кровь
весна									
Эритробласты	2,6	0,3	1,5	0,4	0,4	0,2	p < 0,05	p < 0,001	p < 0,01
миелобласты	3,1	0,8	1,9	0,4	0,6	0,4	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05
Эритробласты: нормобласты полихромные	0,4	0,1	0,4	0,1	0,1	0,0		p < 0,01	p < 0,01
гранулоциты незрелые:	2,1	0,5	0,6	0,1	0,2	0,1	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01
зрелые									
Все бласты	11	1,3	11	1,7	3,5	0,8		p < 0,001	p < 0,01
Митотический индекс	1	0,3	0,3	0,1	0,3	0,1	p < 0,05	p < 0,05	
лето									
Эритробласты	3,7	0,6	2,1	0,4	2,7	0,4			
миелобласты	2,6	0,3	0,6	0,2	0,1	0,1	p < 0,001	p < 0,05	p < 0,001
Эритробласты: нормобласты полихромные	0,6	0,2	0,5	0,3	0,3	0,1			
гранулоциты незрелые:	1,6	0,2	0,3	0,1	0,1	0	p < 0,001	p < 0,001	
зрелые									
Все бласты	10	1,5	6,2	0,7	3,8	0,7	p < 0,05	p < 0,001	p < 0,05
Митотический индекс	1,5	0,3	0,2	0,1	0,3	0,2	p < 0,001	p < 0,01	
Осень-зима									
Эритробласты	2,5	1,4	2,2	0,5	1,2	0,3			p < 0,05
миелобласты	2,5	0,7	0,6	0,2	0,1	0,1	p < 0,05	p < 0,01	p < 0,05
Эритробласты: нормобласты полихромные	0,4	0,2	0,5	0,1	0,5	0,3			
гранулоциты незрелые:	1,1	0,4	0,3	0	0,1	0	p < 0,05	p < 0,01	p < 0,05
зрелые									
Все бласты	8,8	2	6,7	1,4	2,9	0,8		p < 0,05	p < 0,05
Митотический индекс	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1			

костной ткани, участки, прилежащие к хрящевой ткани, и участки в центре костномозговой полости, в которых возможны только контакты с фибробластоподобными стромальными клетками, большая часть которых накапливает жировые включения. Кроме того, эндостальная поверхность костномозговой полости в бедренной кости амфибий в течение весны и лета подвергается значительным перестройкам (рис. 3, 4). Это обстоятельство может стимулировать процессы гемопоэза в прилежащих участках костного мозга.

У всех исследованных животных участки, прилежащие к кости или хрящу, были заполнены миелоидной тканью. Это в равной степени относилось и к бесхвостым амфибиям (рис. 1, 3, 4), и к рептилиям (рис. 2, 5, 7). При этом в диафизе бедренной кости ящерицы прыткой и ящурки разноцветной слой активного костного мозга был ощутимо шире, чем у амфибий и гекконов, клетки лежали более плотно, включения жировой ткани ограничивались отдельными клетками (рис. 1, 2). В центре костномозговой полости у лягушки озерной, шпорцевой и геккона обнаруживается обширная зона, почти не имеющая включений активного костного мозга (рис. 6). (При этом нужно помнить, что общий объем костномозговых полостей у ящериц и гекконов значительно меньше.) Таким образом, если сравнивать участки в середине диафиза, в которых перестройки и ростовые процессы происходят менее активно, некоторые различия между отдельными видами обнаруживаются. Когда мы сравнивали метаэпифизарные участки, в которых кость и хрящ летом подвергаются достаточно активным перестройкам, картина меняется. Ощутимых различий в активности костного мозга в метафизе между лягушкой озерной, лягушкой шпорцевой, зеленой жабой, прыткой ящерицей, ящуркой разноцветной и гекконом не обнаруживается. Точно так же у каждого из рассмотренных животных нет ощутимых различий в составе активного костного мозга, контактирующего с костью или с хрящом (рис. 1–5). И у ящериц и у лягушек, в метафизе наличие костно-хрящевых балок создает сложную трехмерную структуру, за счет которой общая площадь контакта с костью значительно увеличивается и, соответственно, возрастает количество активного костного мозга. Дифференцировка эритроцитов у рассмотренных нами животных обнаруживается также в центральной части костномозговой полости. Эритроидное кроветворение у пойкилотермных позвоночных происходит интраваскулярно, но в центре костномозговой полости оно топографически связано с довольно крупными сосудами, имеющими соединительнотканную оболочку (рис. 6). Возможно, организация вокруг сосудов отчасти поясняет наличие в костном мозге «эритроидных кластеров» (Грушко, 2009, 2010.)

Наконец, нами были рассмотрены включения гемопоэтической ткани в костях змей, внутри нижней челюсти и в телах позвонков. Существенных отличий от костного мозга ящериц не обнаруживается. Стоит только отметить, что у слепозмейки (длина тела взрослого животного около 15 см) костный мозг не содержит жировых включений, в отличие от более крупных змей: водяного ужа и разноцветного полоза (рис. 7). Особого внимания заслуживают включения миелоидной ткани в печени зеленой жабы и краснобрюхой жерлянки, у которой нет активного костного мозга. Слои миелоидной ткани расположены под капсулой органа и вокруг крупных вен (рис. 8). Капсула печени и оболочки вен представляют собой довольно массивные соединительнотканые образования, поэтому можно констатировать наличие контакта между гемопоэтической тканью и фиброзной. На отпечатках печени зеленых лягушек и рептилий обнаруживается значительное количество незрелых клеток эритроидного и гранулоцитарных рядов в процессе дифференцировки, митозы (Akulenko, 2012), но выраженных скоплений миелоидной ткани не наблюдается.

Детальный анализ процессов кроветворения в печени и костном мозге нами был проведен раньше (Akulenko, 2012). Однако для сравнения активности самых ранних стадий кроветворения стоит рассмотреть некоторые специальные показатели миелограмм печени и костного мозга и лейкограмм периферической крови лягушки озерной (таблица). Наличие достоверных количественных различий между миелограммами печени и костного мозга показывает, что контакт миелоидной ткани с костью и хрящом действительно стимулирует некоторые этапы кроветворения. Причем весной и летом, когда в кости происходят активные перестройки, этот эффект выражен значительно сильнее. В костном мозге в течение всего года доля самых ранних предшественников миелопоэза (миелобластов) достоверно выше, чем в печени. Достоверно более высокое отношение «гранулоциты незрелые: зрелые» показывает, что контакт с опорными тканями стимулирует также и последующую дифференцировку эозинофильных и нейтрофильных миелоцитов.

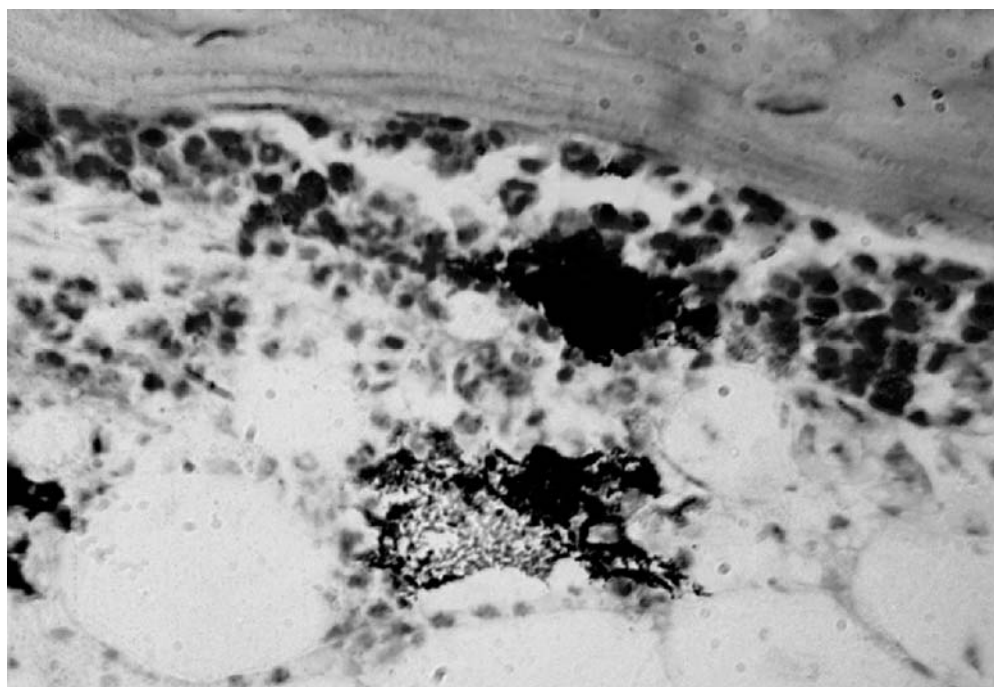


Рис. 1. Слой зрелых эозинофилов и недифференцированных кроветворных клеток прилегает к костной поверхности диафиза в костном мозге лягушки озерной. Микрофото. Гематоксилин-эозин. Ув. 200.

Fig. 1. The layer of mature eosinophils and undifferentiated hematopoietic cells adjoins to the bone surface of the diaphysis in the bone marrow of the lake frog. Microphoto. Hematoxylin-eosin. X 200.

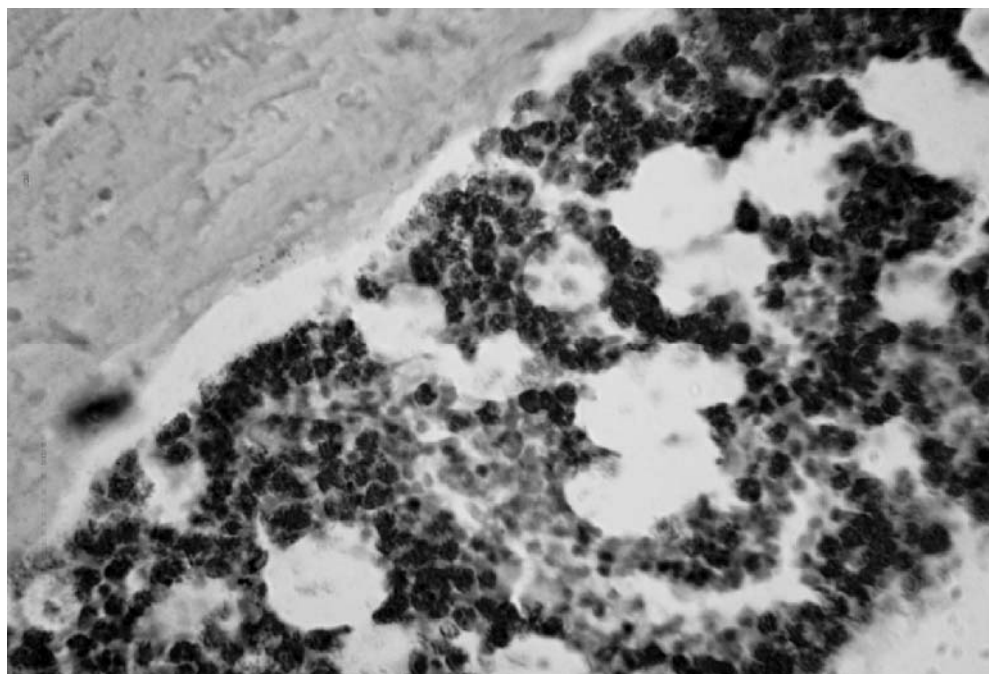


Рис. 2. Слой миелоидной ткани в диафизе бедренной кости ящерицы прыткой. Микрофото. Гематоксилин-эозин. Ув. 200.

Fig. 2. Layer of myeloid tissue in the femoral diaphysis of the sand lizard. Microphoto. Hematoxylin-eosin. X 200.

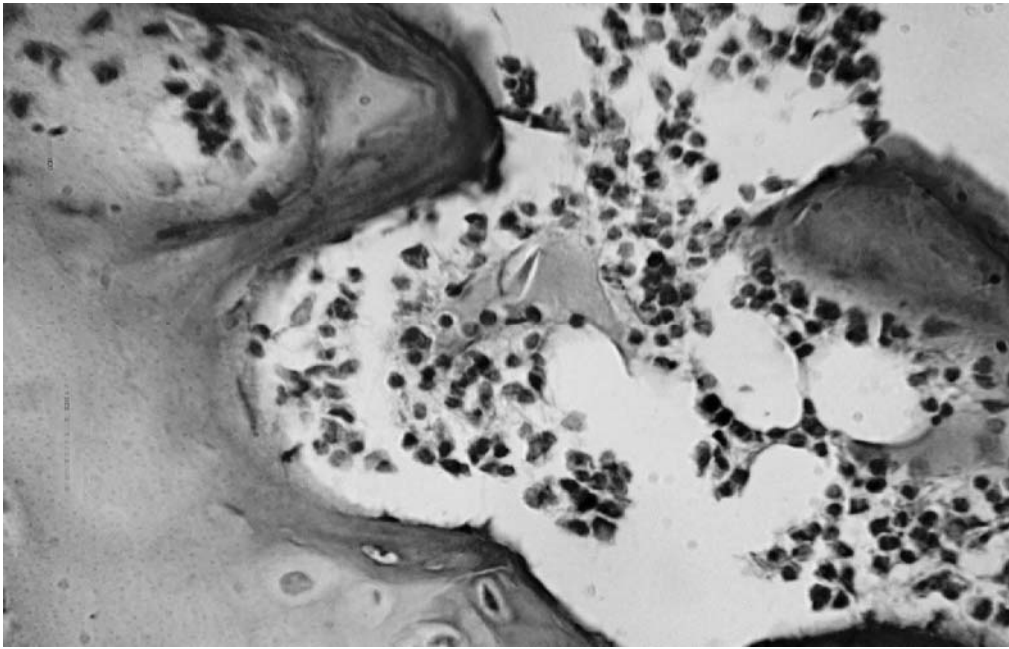


Рис 3. Шпорцевая лягушка. Участки резорбции хряща и костные балкообразные образования в эпифизе. Лакуны заполнены миелоидной тканью. Микрофото. Гематоксилин-эозин. Ув. 200.

Fig. 3. Clawed frog. Areas of cartilage resorption and bone beam-like formations in the epiphysis. The

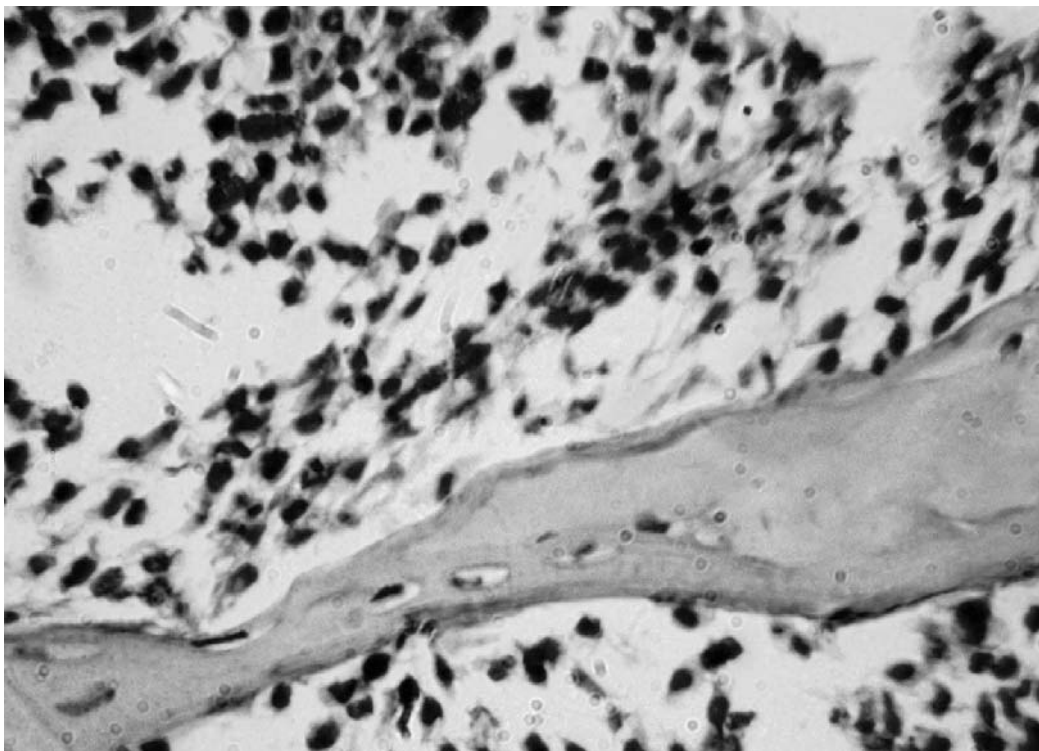


Рис. 4. Недифференцированные кроветворные клетки окружают костную балку с элементами хряща в метафизе лягушки озерной. Микрофото. Гематоксилин-эозин. Ув. 200.

Fig. 4. Undifferentiated hematopoietic cells surround the bone beam with cartilage elements In the metaphysis of the lake frog. Microphoto. Hematoxylin-eosin. X 200.

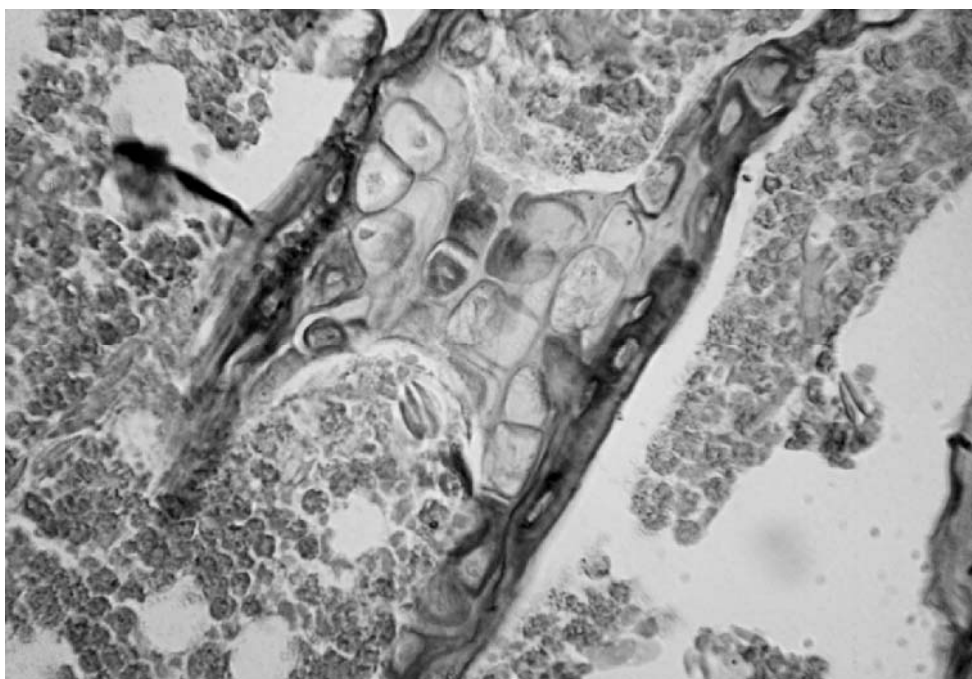


Рис. 5. Резорбция хряща и синтез кости в метафизе бедренной кости ящерицы прыткой. Видны включения миелоидной ткани в лакунах резорбции и возле слоя костной ткани. Микрофото. Окраска по Маллори. Ув. 200.

Fig. 5. Cartilage resorption and bone synthesis in the metaphyse of the sand lizard femur. There are inclusions of myeloid tissue in resorption lacunae and near the layer of bone tissue. Microphoto. Coloring

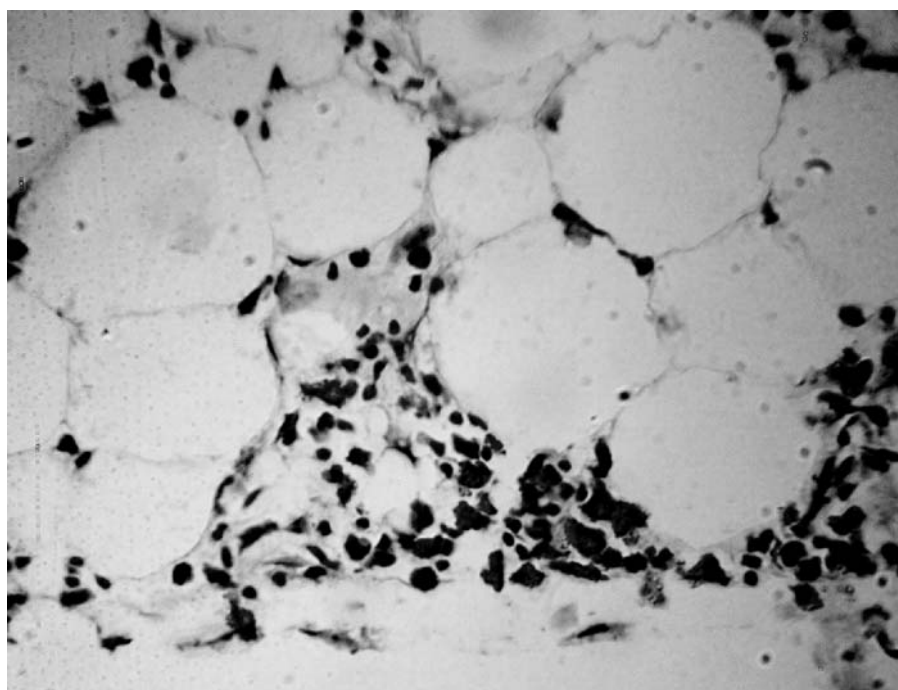


Рис. 6. Геккон каспийский. Участок миелоидной ткани в центре диафиза, возле крупного сосуда. Микрофото. Гематоксилин-эозин. Ув. 200.

Fig. 6. *Cyrtopodion caspius*. Section of myeloid tissue in the center of the diaphysis, near a large vessel. Microphoto. Hematoxylin-eosin. X 200.

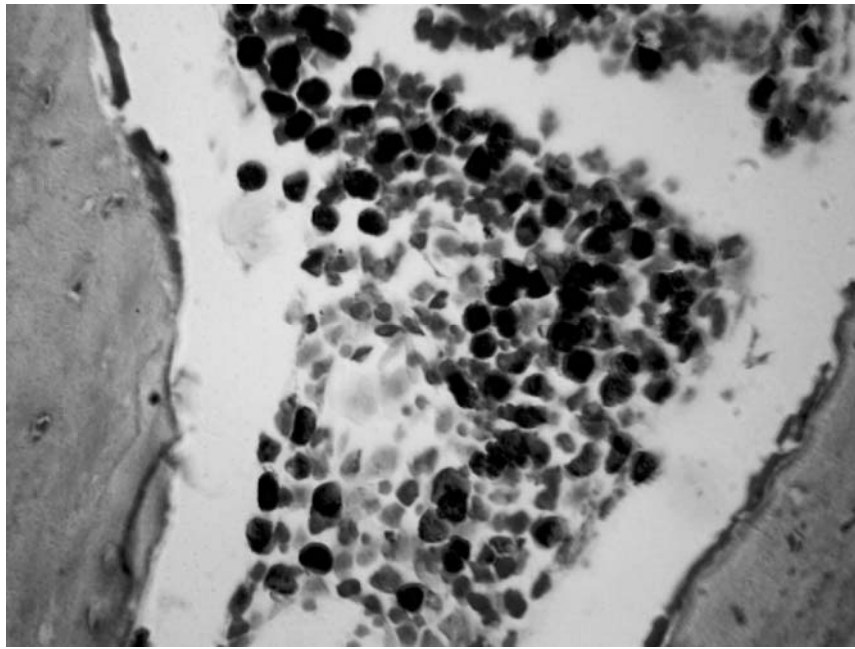


Рис. 7. Включения кроветворной ткани в позвонках водяного ужа. Микрофото. Гематоксилин-эозин. Ув. 200.

Fig. 7. Inclusions of the hematopoietic tissue in the vertebrae of the tessellated water snake. Microphoto. Hematoxylin-eosin. X 200.

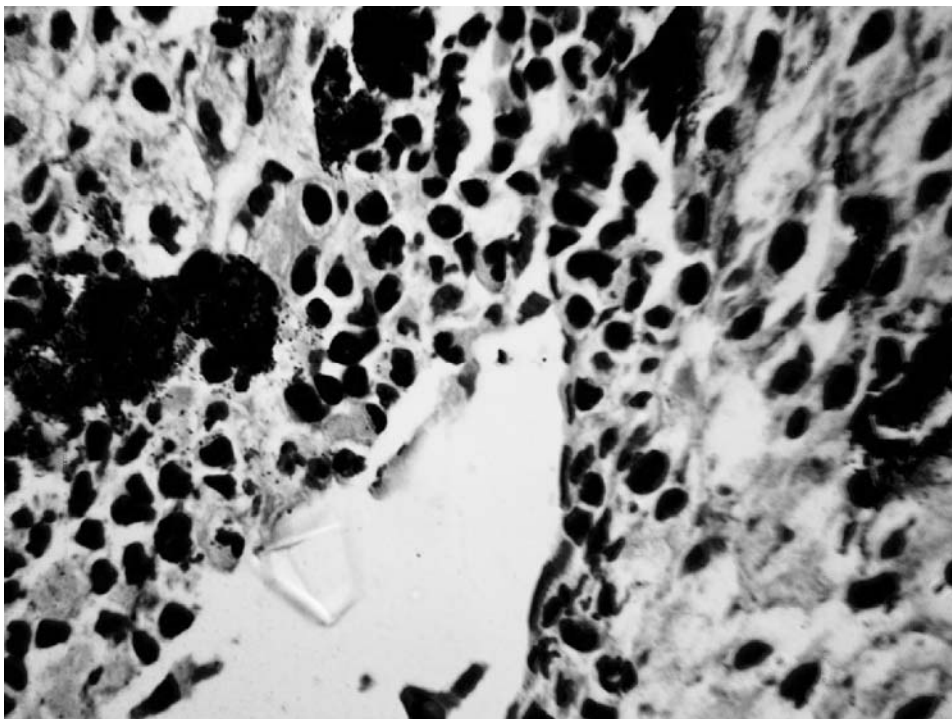


Рис 8. Дифференцированные гранулоциты и их недифференцированные предшественники в слое кроветворной ткани, расположенном вокруг крупной вены, в печени краснобрюхой жерлянки. Микрофото. Гематоксилин-эозин. Ув. 200.

Fig. 8. Differentiated granulocytes and their undifferentiated precursors in the layer of the hematopoietic tissue located around the large vein in the liver of the fire-bellied toad. Microphoto. Hematoxylin-eosin. X 200.

Кроме того, весной и летом контакт с костью и хрящом стимулирует общую митотическую активность кроветворных клеток. Однако на общее количество наиболее ранних предшественников (показатель «все бласты») соседство с костью существенно не влияет. Для более поздних стадий эритропоэза контакт с опорными тканями, очевидно, тоже не существенен, поэтому скорость дифференцировки эритроцитов в печени и в костном мозге практически совпадает (см. показатель «Эритробласты: нормобласты полихромные»). На активизацию самых ранних стадий эритропоэза, т. е. дифференцировку эритробластов, воздействие костной ткани весной влияет значительно больше, чем летом или в холодное время года. Летом различия в количестве эритробластов между костным мозгом и периферической частью кроветворной системы не достоверны, а осенью и зимой они практически отсутствуют. Очевидно, летом стимуляция эритропоэза происходит на уровне всего организма, как мы уже отмечали ранее (Акуленко, 2011.)

Выводы

Таким образом, у амфибий и рептилий топографическая связь между гемопоэтически активной частью костного мозга и опорными структурами (кость, хрящ, соединительнотканые оболочки) оказывается функционально значимой. При этом значительных различий между исследованными видами бесхвостых амфибий и чешуйчатых рептилий не обнаружено. Контакт с костной и хрящевой тканью стимулирует начальные этапы кроветворения, в частности, пролиферацию клеток и ранние стадии миелопоэза. Очевидно, в паренхиматозных органах эту же роль могут выполнять соединительнотканые образования (оболочки крупных сосудов, капсула органа), стимулирующая роль которых существенно слабее. Стимуляция ранних этапов кроветворения в процессе контактов со скелетными образованиями объясняет статистически доказанную (Akulenko, 2012) функциональную неравноценность двух отделов кроветворной системы наземных пойкилотермных позвоночных, а именно: центрального отдела, который включает костный мозг, и ее периферической части, состоящей из паренхиматозных органов и кровотока.

- Акуленко Н. М., 2008. Эволюция кроветворной системы позвоночных. Приложимы ли к ней классические концепции эволюционной биологии? *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки*, **1**: 6–12.
- Акуленко Н. М., 2011. Сосудистое русло как часть гемопоэтической системы бесхвостых амфибий. *Вестник зоологии*, **45**, 4: 359–366.
- Васильев Д. Б., 2005. Ветеринарная герпетология: ящерицы. М.: Проект-Ф: 1–480.
- Грушко М. П., 2009. Особенности некоторых кроветворных органов прыткой ящерицы (*Lacerta agilis*). *Естественные науки: журнал фундаментальных и прикладных исследований*, **2** (27): 108–113.
- Грушко М. П., 2010. Красный костный мозг озерной лягушки (*Rana kidibunda*) и прыткой ящерицы (*Lacerta agilis*). *Морфология*, **1**: 50–65.
- Маслова М. Н., 1993. Тавровская Т. В. Сезонная динамика эритропоэза лягушки озерной *Rana temporaria*. *Ж. эвол. биох. и физиол.*, **29**, 2: 211–214.
- Хамидов Д. Х., Акилов А. Т., Турдыев А. А., 1978. Кровь и кроветворение у позвоночных животных. Ташкент, «Фан»: 1–168.
- Akulenko N. M., 2012. Haemopoietic system of the anurans: the role of bone marrow and liver. *Vestnik zoologii*, **46**, 4: 347–354.
- Allender M. C, Fry M. M., 2008. Amphibian hematology. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.*, **11**, 3: 463–480.
- Andrew W., 1965. Comparative Hematology. New York, London: 1–188.
- Arai F, Hirao A, Suda T., 2005. Regulation of hematopoiesis and its interaction with stem cell niches. *Int. J. Hematol.*, **82**, 5: 371–376.
- de Abreu Manso P. P, de Brito-Gitirana L, Pelajo-Machado M., 2009. Localization of hematopoietic cells in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Cell Tissue Res*, **337**, 2: 301–312.
- Forsberg E. C., Smith-Berdan S., 2009. Parsing the niche code: the molecular mechanisms governing hematopoietic stem cell adhesion and differentiation. *Haematologica*, **94**, 11: 1477–1481.
- Jordan H. E., 1938. Comparative hematology. *Handbook of hematology*. New-York Medical book department of Harper and brothers: 700–862.

Tanizaki Y, Ichisugi M, Obuchi-Shimoji M, Ishida-Iwata T, Tahara-Mogi A, Meguro-Ishikawa M, Kato T., 2015. Thrombopoietin induces production of nucleated thrombocytes from liver cells in *Xenopus laevis*. *Sci Rep*, **5**: 18519. doi: 10. 1038/srep18519.

H. M. Акуленко

ОСОБЛИВОСТІ КІСТКОВОМОЗКОВОГО КРОВОТВОРЕННЯ У НАЗЕМНИХ ПОЙКІЛОТЕРМНИХ ХРЕБЕТНИХ І «ТЕОРІЯ НІШІ»

Гемопоетична система безхвостих амфібій і рептилій складається з декількох відділів. Частина з них пов'язана зі скелетними утвореннями (кістковий мозок), частина не пов'язана (печінка, кровоносне русло). Наші дані показують, що ці відділи функціонально нерівноцінні. Сусідство з кісткою і хрящем стимулює проліферацію клітин і диференціювання ранніх попередників мієлопоезу і, частково, еритропоезу. Це узгоджується з «теорією ніші», раніше доведеною для представників ссавців. Стимулююча активність скелетних тканин (кістки і хряща) залежить від пори року.

К л ю ч о в і с л о в а: амфібії, рептилії, кісткова тканина, гемопоез.

N. M. Akulenko

FEATURES OF BONE MARROW HEMOPOIESIS IN THE GROUND POIKILOthermic VERTEBRATES AND THEORY OF NICHES.

Hematopoietic system tailless amphibians and reptiles consists of several departments. Part of them is connected with skeletal formations (bone marrow), the part is not connected (liver, bloodstream). Our findings show that these divisions are functionally unequal. The proximity of the bone and cartilage cells stimulates the proliferation and differentiation of early progenitor of the myelopoiesis and partially erythropoiesis. This is consistent with the "niche theory" proved earlier for the representatives of mammals. Stimulating activity of skeletal tissue (bone and cartilage) depends on the time of year.

К е у w o r d s: amphibians, reptiles, bone, hematopoiesis.