

УДК (591.85+591.436):597.8

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА КОЛИЧЕСТВА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МАКРОФАГОВ И ПИГМЕНТНЫХ КЛЕТОК В ПЕЧЕНИ БЕСХВОСТЫХ АМФИБИЙ

Н. М. Акуленко

Институт зоологии НАН Украины, ул. Б. Хмельницкого, 15, 252601 Киев-30, ГСП, Украина

Получено 11 августа 1997

Сезонная динамика количества и функциональной активности макрофагов и пигментных клеток в печени бесхвостых амфибий. Акуленко Н. М. — В статье рассматривается сезонная динамика макрофагов и пигментных клеток в печени лягушки озерной. Делается вывод, что их численность в течение года изменяется. Изменение количества пигментных клеток более выражено, максимум — в июне (в 11 раз больше, чем зимой и осенью); изменение количества макрофагов в течение активного периода менее выражено, осенью и зимой их численность снижается в 3 раза. Функциональная активность макрофагов осенью и зимой снижается незначительно. Делается вывод, что снижение численности макрофагов и пигментных клеток во время оцепенения происходит благодаря уменьшению количества молодых дифференцирующихся клеток.

Ключевые слова: макрофаги, пигмент, печень, амфибии.

The Seasonal Dynamics of the Quantity and Functional Activity of the Macrophages and Pigment Cells in the Anuran Liver. Akulenko N. M. — The seasonal dynamics of the macrophages and pigment cells in the liver of the *Rana ridibunda* was considered in this article. The conclusion about their number changes during the year was done. The pigment cells quantity is increasing more prominent and show maximum in the June (11 times elevation in comparison with autumn and winter). Change of the macrophages number is less distinguished (3 times decreasing during autumn and winter). The macrophages functional activity decreases during autumn and winter, but not significantly. We do the conclusion that macrophages and pigment cells diminution is depending on the decreasing of the young differentiating cells number.

Key words: macrophages, pigment, liver, amphibia.

Введение

В условиях умеренного климата кроветворение пойкилотермных позвоночных неравномерно в течение года. Оно активизируется весной, летом его активность несколько уменьшается, и наконец в период оцепенения (осень, зима и часть весны) кроветворение почти не происходит. В это время незрелые эритроидные клетки крайне редки на мазках и отпечатках; слой миелоидной ткани на внутренней поверхности костномозговой полости становится тонким, доля базофильных миелоцитов снижается. Митозы в кроветворных органах (костный мозг, печень, селезенка) не обнаруживаются (Хамидов, 1978). Механизмы, обеспечивающие сезонное угнетение кроветворения у амфибий, практически не изучены (Горышина, Чага 1990).

В регуляции кроветворения у млекопитающих участвует строма кроветворных органов. Стромальные элементы млекопитающих — стабильная популяция и регуляция интенсивности кроветворения происходит за счет изменения их активности и функционального состояния (Старостин, Мичурина, 1977). Но у млекопитающих не бывает продолжительных периодов почти полного угнетения кроветворения. Показано, что у немногих млекопитающих, впадающих в зимнее оцепенение, тело во время спячки периодически разогревается, и во время “разогрева” все обменные процессы, включая кроветворение, активизируются (Алексеева, Юнкер, 1979). У амфибий роль стромальных элементов в регуляции гемопоза, в частности при его угнетении или активизации, не изучалась.

Макрофаги, исходя из их функциональных свойств, относятся к стромальным элементам, создающим кроветворное микроокружение, но по происхождению, в отличие от ретикулярных клеток,

они принадлежат к интенсивно обновляющейся популяции со свободно мигрирующими клетками-предшественниками (Старостин, Мичурина, 1977), поэтому их численность способна изменяться быстро. В печени лягушки озерной многочисленные макрофаги обеспечивают фагоцитоз клеток крови и экзогенных частиц. Эта вторая функция играет едва ли не ключевую роль в защитных реакциях организма, которые тоже изменяются в зависимости от температуры тела (Купер, 1980). Что касается происхождения и функции пигментных клеток, то в предыдущих работах (Акуленко, 1994, 1996) нами показано, что они представляют собой самостоятельную линию дифференцировки, не способны к фагоцитозу и находятся в постоянном функциональном взаимодействии с макрофагами, которые заняты реутилизацией пигментов из пигментных клеток. Все эти процессы — фагоцитоз, образование запасов пигментов и их последующая реутилизация — имеют значение в обеспечении гемопоэза и процессов неспецифической (т. е. осуществляемой макрофагами без участия лимфоцитов) защиты. Целью нашей работы было изучение численности и функционального состояния макрофагов и пигментных клеток в течение года.

Материал и методы

В исследовании было использовано 35 половозрелых самцов лягушки озерной (*Rana ridibunda*) (длина тела 8–10 см, вес 45–60 г), которых отлавливали в окр. г. Киева. Материал забирали через несколько часов после отлова. Интервалы между заборами животных составляли от двух недель (весной) до месяца (во время зимнего оцепенения). Даты отлова приведены в таблице 1.

Печень для гистологического исследования фиксировали по Буэну и окрашивали гематоксилином—эозином, паноптическим методом, по Малори. Отпечатки печени окрашивали по Паппенгейму. На гистологических срезах определяли в процентах от общей площади среза удельную площадь, занятую меланомакрофагальными скоплениями и пигментными клетками. Для этого у каждого животного на гистологических срезах в 35 полях зрения (ув. 200) с помощью окулярной сетки подсчитывалось количество квадратов, занятых меланомакрофагальными центрами и непосредственно пигментными отложениями (соответственно А и В). Затем определялись их доли (%) от общей площади среза по формулам:

$$\frac{A \times 100\%}{35 \times n} \text{ и } \frac{B \times 100\%}{35 \times n},$$

где n — общее количество квадратов окулярной сетки (n=16).

На отпечатках печени каждого животного описывалось по 50 клеток с признаками макрофагов или пигментных клеток; отмечались следующие параметры: размеры, форма и структура ядра, наличие вакуолей и включений, характер включений, содержание пигмента в баллах (подробнее см. Акуленко, 1994). По результатам описаний ряда признаков каждой клетки для каждого животного вычислялся ряд показателей. Среднее содержание пигмента на одну клетку определялось полуколичественным методом по Соколовскому (Кононский, 1976), подсчитывался процент молодых пигментных клеток (т. е. клеток с небольшим количеством пигмента и рыхлым ядром) и молодых макрофагов (макрофагов с

Таблица 1. Деление животных на группы в зависимости от времени отлова

Table 1. Groups of the animals depending on capture date

Группа	Даты отлова	Всего животных	Физиологическое состояние
1 март — начало апреля	27.03, 8.04, 15.04	6	окончание зимовки
2 конец апреля — май	22.04, 29.04, 6.05, 20.05	8	размножение
3 июнь	3.06, 24.06	4	время наибольшей активности
4 июль — август	17.07, 5.08, 26.08	6	подготовка к зимовке
5 осень	23.09, 21.10, 25.11	5	время оцепенения
6 зима	25.12, 22.01, 19.02	6	то же

рыхлым ядром и без фагоцитарных включений). Для каждого животного определялось отношение количества пигментных клеток к количеству макрофагов, процент макрофагов с фагоцитарными включениями, в том числе отдельно — с фагоцитированным пигментом и с остатками фагоцитированных эритроцитов. Для пигментных клеток подсчитывалось количество клеток с признаками депигментации, т. е. со “старыми” (вдавленными и перфорированными) ядрами и с низким содержанием пигмента (подробнее о дифференцировке и старении пигментных клеток см. Акуленко, 1994).

Непосредственно подсчитать количество пигментных клеток на срезах не всегда удается из-за наличия большого количества пигмента, маскирующего ядра и границы клеток. Поэтому количество пигментных клеток в пределах одной измерительной сетки мы вычисляли, разделив площадь, занятую пигментными клетками, на определенную нами среднюю площадь пигментной клетки на срезе ($32,4 \pm 5,97 \text{ мкм}^2$). Затем рассчитывали среднее количество пигментных клеток в пределах одной окулярной сетки для каждой группы. Разделив это значение на минимальную величину, характерную для осени и зимы, мы получили коэффициент V , характеризующий колебание численности пигментных клеток в печени в течение года. Далее, разделив среднее количество пигментных клеток в пределах одной окулярной сетки на отношение пигментные клетки/макрофаги, которое мы определяли по результатам подсчетов на мазках, мы получили среднее количество макрофагов в пределах одной окулярной сетки. Снова разделив полученные значения на минимальное, характерное для осени, мы получили коэффициент R , определяющий колебание численности макрофагов в течение года. Затем мы применили полученные коэффициенты, чтобы вывести ряд показателей. Так, умножив долю макрофагов с включениями на R , мы получили показатель, характеризующий изменение интенсивности фагоцитоза в печени; подобным же образом мы определили изменение интенсивности фагоцитоза эритроцитов и пигмента. Эти показатели учитывают как процент макрофагов с соответствующими включениями, так и изменение численности макрофагов в печени в зависимости от сезона. Подобным образом, умножив долю пигментных клеток с признаками дегрануляции на V , мы получили изменение интенсивности дегрануляции пигментных клеток в печени; аналогичным способом был получен показатель “общее количество молодых пигментных клеток” (доля молодых пигментных клеток умножалась на V), “общее количество молодых макрофагов” (доля молодых макрофагов умножалась на R). Для каждой из 6 групп подсчитывалась численность отдельных фракций макрофагов и пигментных клеток. Кроме того, определялось среднее значение площади, занятой меланомacroфагальными скоплениями и, отдельно, пигментными клетками для холодного (осень, зима, март—начало апреля) и теплого (конец апреля—август) времени года.

Результаты и обсуждение

Полученные нами данные показали высокую лабильность макрофагов и пигментных клеток в печени в течение года. Эта лабильность выражается в изменении размеров и количества меланомacroфагальных скоплений, структуру и клеточный состав которых мы описали в предыдущих работах (Акуленко, 1996, 1997). Динамика изменения удельной площади, занимаемой меланомacroфагальными скоплениями на срезах печени, показана в таблице 2. В течение осени и зимы эта площадь резко уменьшается (рис. 1). Несмотря на значительный размах индивидуальных вариаций, различие между теплым (2, 3, 4 группы) и холодным (1, 5, 6 группы) сезоном достоверно ($3,98 \pm 0,98\%$ и $0,63 \pm 0,10\%$, $p < 0,05$ для площади меланомacroфагальных скоплений и $2,21 \pm 0,39\%$ и

Таблица 2. Некоторые показатели сезонной динамики пигментных клеток

Table 2. Some indices of the pigment cells seasonal dynamic

Показатели	март—начало апреля	конец апре- ля—май	июнь	июль— август	осень	зима
Удельная площадь, занятая на срезах пигментными клетками (%)	0,70	1,90	3,87	0,91	0,34	0,34
Удельная площадь, занятая на срезах меланомакрофагальными скоплениями (%)	0,74	3,13	8,16	1,01	0,53	0,41
Среднее количество пигментных клеток в поле 1 окулярной сетки S, общее количество пигментных клеток в печени (у. е.)	3,5	8,5	19,2	4,5	1,7	1,7
Содержание пигмента на 1 клетку (баллы)	2,04	5,6	11,4	2,7	1,0	1,0
Доля молодых среди пигментных клеток печени (% от общего числа)	2,88	2,56	2,26	2,31	2,96	2,95
Количество молодых пигментных клеток в печени (у. е.)	12,55	14,8	12,5	6,4	1,3	2,9
Клетки с признаками дегрануляции (% от общего числа)	19,69	67,75	109,6	13,29	1	2,23
Объем дегрануляции в печени (у. е.)	3,1	7,1	17,0	21,0	3,8	7,6
Отношение макрофаги с пигментными включениями: пигментные клетки	1,66	10,46	53,4	35,37	1	2
	1,24	0,65	0,32	1,07	1,19	1,84

0,52±0,07%, $p < 0,001$ для площади, занятой непосредственно пигментными клетками).

Соответственно, в течение года количество как макрофагов, так и пигментных клеток существенно изменяется (табл. 2, 3). В теплое время года их значительно больше, чем в холодное. Однако динамика изменения численности этих двух популяций отличается. Количество пигментных клеток, стабильно низкое осенью и зимой, увеличивается весной, дает пик в июне и снова снижается к осени (изменения коэффициента V). Параллельно с увеличением количества пигментных клеток падает содержание пигмента на одну клетку (табл. 2), что отражает преобладание молодых форм над “старыми” клетками с максимальным содержанием пигмента. Количество макрофагов на протяжении весны и лета изменяется меньше и остается стабильно высоким, а на время осенне-зимнего оцепенения падает втрое (изменения коэффициента R). В среднем макрофагов значительно больше, чем пигментных клеток, но у отдельных животных их соотношение сильно варьирует (показатель пигментные клетки/макрофаги изменяется от 0,042 до 9,09). Если судить по количеству включений, функциональная активность макрофагов во время зимнего оцепенения снижается незначительно. Соответствующие данные приведены в таблице 1 в графе “доля макрофагов с включениями”. Чтобы судить об изменении интенсивности фагоцитоза в печени в течение года, надо учитывать изменение численности макрофагов в зависимости от сезона, т. е. коэффициент R. Из соответствующей графы видно, что интенсивность фагоцитоза зимой и осенью снижается почти исключительно за счет резкого уменьшения численности макрофагов.

Фагоцитоз эритроцитов максимален в конце лета, очевидно в это время старые и дефектные эритроциты активно убираются из кровотока. После этого, осенью, фагоцитоз эритроцитов минимален. По нашим наблюдениям, в августе на отпечатках печени обнаруживается довольно много незрелых эритроидных клеток; очевидно, одновременное разрушение дефектных эритроцитов обеспечивает эритропоэз с точки зрения реутилизации железа. Весной, после спячки,

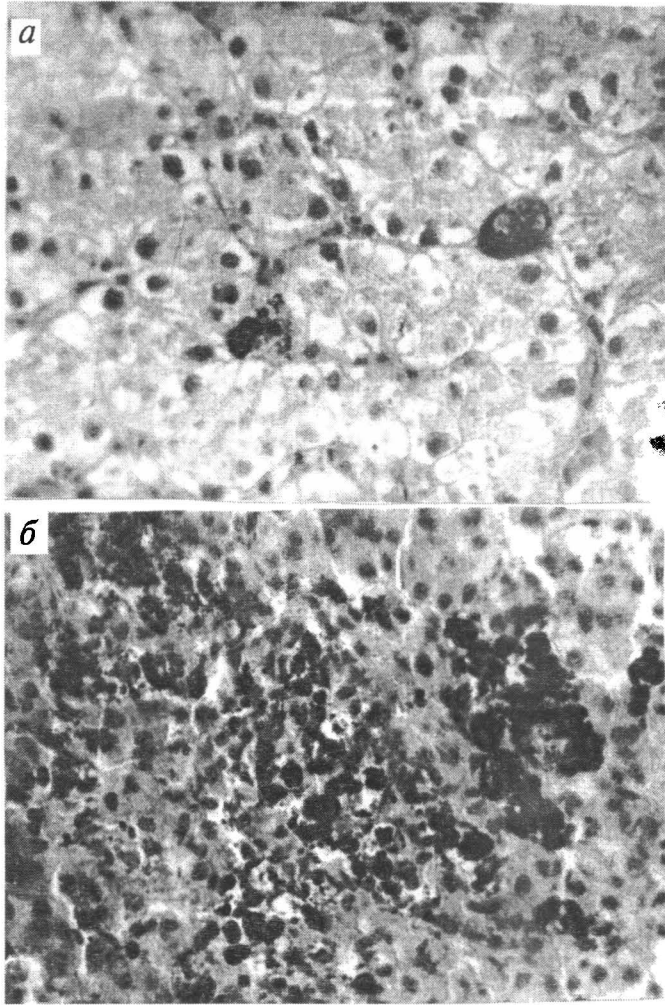


Рис. 1. Одиночные пигментные клетки в печени лягушки озерной, забитой в январе (а) и меланомакрофагальные скопления в печени лягушки озерной, забитой в июне (б). Микрофото. Окраска гематоксилином Майера-эозином. Ув. 200.

Fig. 1. The lone pigment cell in the liver of the *Rana ridibunda*, that was killed in the January (a) and the melanomacrophage aggregation in the liver of the *Rana ridibunda*, that was killed in the June (б). Micrograph. Haematoxylin @ eosin. X200.

эритропоз тоже резко активизируется (Хамидов и др., 1978), но усиленного фагоцитоза эритроцитов не происходит, потому что, по нашим наблюдениям, значительное количество эритроцитов разрушается в кровотоке, что видно по наличию “теней”, то есть ядер разрушенных эритроцитов. Можно предположить, что ядра и вышедший из клеток в сыворотку гемоглобин улавливаются макрофагами (гемоглобин, возможно, — и пигментными клетками), когда кровь профильтровывается через меланомакрофагальные скопления. На срезах видно, что весной и в конце лета у многих животных меланомакрофагальные скопления “выпячиваются” в расширенные просветы синусоидов и приобретают рыхлую структуру за счет большого количества коллагеновых волокон и расширенных межклеточных пространств (рис. 2).

Интенсивность фагоцитоза пигмента макрофагами максимальна в начале весны, а осенью минимальна. Таким образом, сезонные различия в количестве пигментных клеток зависят не от скорости их реутилизации, а от интенсивности

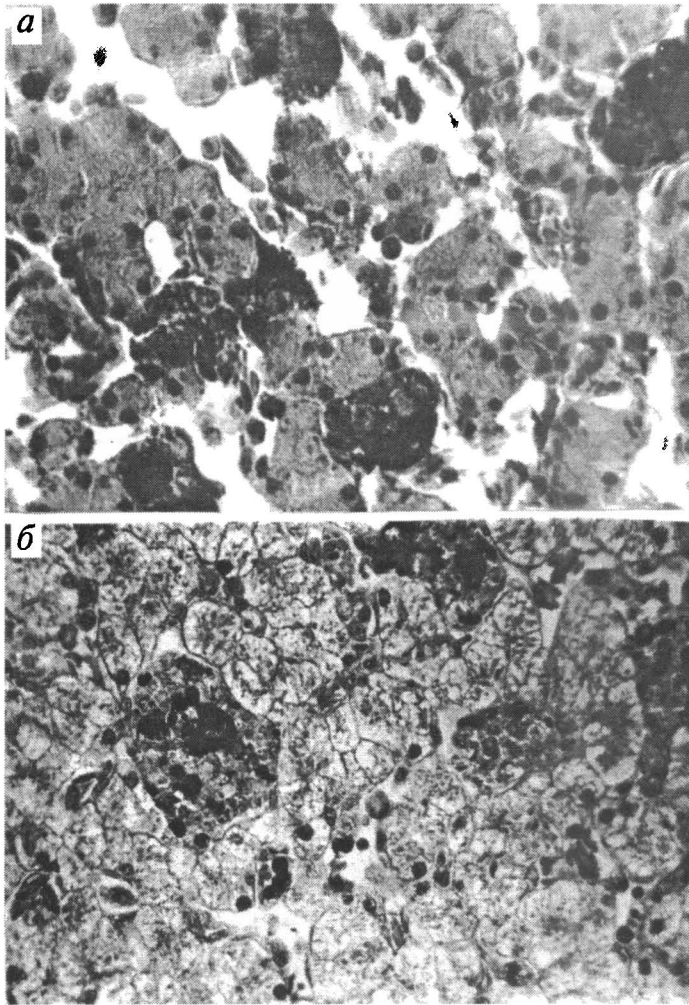


Рис. 2. Печень лягушки озерной, забитой в апреле. Видны расширенные синусоиды, внутри которых лежат меланомacroфагальные скопления. Микрофото. Окраска гематоксилином Майера-эозином (а), по Маллори (б). Ув. 200.

Fig. 2. Liver of the *Rana ridibunda*, that was killed in the april. There are seen enlarged sinusoids with melanomacrophage aggregations within. Micrograph. Haematoxilyn @ eosin (a), Mallory dying (б). X200.

пополнения их популяции. Из таблицы 2 видно, что весной и в начале лета резко увеличивается доля молодых пигментных клеток в популяции, и еще значительно (более, чем в 100 раз по сравнению с осенью) увеличивается их общая численность. На 1 пигментную клетку приходится только 0,32 макрофага с пигментными включениями. Поэтому задействован другой механизм гибели и реутилизации пигментных клеток, а именно: происходит активная дегрануляция старых клеток (табл. 2). Мы ранее описали это явление, как один из обычных способов старения и гибели пигментных клеток (Акуленко, 1994). Из настоящих данных видно, что дегрануляция обычна в течение лета, в период активного метаболизма, а осенью и зимой наблюдается очень редко.

Обновление популяции макрофагов, как видно из таблицы 3, носит более постоянный и равномерный характер. Общее количество молодых макрофагов в печени нарастает с марта по август, резко падает осенью, а зимой, как и следовало ожидать, оказывается минимальным. Эти наблюдения полностью соответ-

ствуют данным Е. Н. Горышиной (1980), показавшей с помощью радиоавтографии, что зимой эритроидные и миелоидные клетки *Rana temporaria* (в том числе и макрофагальной линии) не участвуют в синтезе ДНК и не делятся.

Осенью и зимой значительно увеличивается фракция макрофагов с компактными ядрами, промежуточная между молодыми клетками с рычлыми ядрами и старыми, у которых ядра вдавленные или перфорированные (Акуленко, 1994). Однако осенью эта фракция увеличивается на фоне снижения численности старых клеток, а зимой, напротив, уменьшена фракция молодых. Таким образом, можно констатировать, что в холодное время года скорость "старения" макрофагов замедляется, но при достаточно высокой функциональной активности в течение осени и зимы популяция макрофагов все же заметно "стареет" и к весне нуждается в обновлении.

На осенние и зимние месяцы приходится минимальные значения практически всех показателей, которые относятся к обновлению популяций пигментных клеток и макрофагов, к скорости реутилизации пигмента и к функциональной активности макрофагов, однако изменение численности этих клеточных популяций, судя по нашим данным, выражено значительно, чем изменение функциональной активности входящих в их состав клеток.

Интересные и во многом парадоксальные данные получили итальянские исследователи (Corsago et al., 1990) на местной популяции *Rana esculenta*. Количество пигмента в печени возрастало при понижении температуры (зимой) и уменьшалось летом. При этом у выловленных зимой лягушек при содержании в тепле количество пигмента в печени, напротив, повышалось. Авторы объясняют этот результат влиянием голодания, которое, по их мнению, вызывает увеличение пигментных отложений. Нам это заключение кажется сомнительным. Отложения пигмента не являются накоплением балластных веществ, а активно участвуют в метаболизме и постоянно пополняются. Однако количество пигментных клеток в печени зависит от двух процессов: интенсивности дифференцировки пигментных клеток и интенсивности их реутилизации. При температурах, близких к 0°C, клеточные дифференцировки тормозятся, однако на южной границе ареала, где животные не впадают в глубокую спячку, скорость дифференцировки зимой может снижаться меньше, чем скорость реутилизации пигмента.

Полученные нами данные подтверждают предварительный вывод о том, что

Таблица 3. Некоторые показатели функциональной активности макрофагов в зависимости от сезона

Table 3. Some indices of the macrophages activity depending on season

Показатели	март—начало апреля	конец апреля—май	июнь	июль— август	осень	зима
Среднее количество макрофагов в поле 1 окулярной сетки	10,0	12,0	10,48	8,76	3,6	3,2
R (изменение количества макрофагов в печени, у. е.)	3,10	3,75	3,25	2,70	1,13	1,0
Доля макрофагов с включениями (% от общего числа макрофагов)	58,68	58,54	59,73	66,6	52,22	46,77
Изменение интенсивности фагоцитоза в печени (у. е.)	3,92	4,66	4,18	3,87	1,26	1,00
Изменение интенсивности фагоцитоза эритроцитов в печени (у. е.)	7,79	6,94	6,92	11,15	1,0	1,23
Отношение фагоцитоз пигмента: общий фагоцитоз	53,9	63,96	62,43	40,88	48,66	61,08
Изменение интенсивности фагоцитоза пигмента в печени (у. е.)	1,54	1,34	1,31	1,13	1,0	1,19
Молодые макрофаги (% от общего числа)	18,4	16,0	16,6	19,1	17,6	5,7
Общее количество молодых макрофагов в печени (у. е.)	7,71	8,11	7,30	6,96	2,69	1
Моноциты (% от общего числа)	11,2	9,6	13,6	9,0	10,7	5,1

пигментные клетки являются особой формой запасующих клеток, функционирующих в тесном взаимодействии с макрофагами (Акуленко, 1994). Помимо накопления и реутилизации ферритина, они запасают меланин, который, в частности, может реутилизироваться макрофагами в ходе синтеза пероксидазы (Горышина, Чага, 1990). Учитывая, что защитные реакции, опосредованные лимфоцитами, являются температурнозависимыми и при низких температурах тела осуществляться не могут (Купер, 1980), макрофаги, по-видимому, имеют первостепенное значение во время зимней спячки, когда температура тела животного близка к 0°C. Очевидно, в это время из-за замедления собственного синтеза макрофаги особенно нуждаются во внешнем источнике пероксидазы и используют меланин из пигментных клеток.

Таким образом, полученные нами данные показывают, что меланомакрофагальные скопления являются лабильными образованиями, которые летом занимают значительную часть объема печени, а осенью и зимой резко уменьшаются или даже исчезают. Соответственно изменяется численность входящих в их состав пигментных клеток и макрофагов. Осенне-зимнее уменьшение численности пигментных клеток и макрофагов происходит за счет снижения интенсивности их репродукции, что видно по уменьшению количества молодых форм. В течение всего периода оцепенения животного макрофаги сохраняют функциональную активность, а пигментные клетки продолжают взаимодействовать с макрофагами, по-видимому поставляя им меланин и гемосидерин.

- Акуленко Н. М. Пигмент-содержащие клетки в печени лягушки озерной // Цитология и генетика. — 1994. — № 6. — С. 80.
- Акуленко Н. М. Скопления пигмент-содержащих клеток в печени амфибий // Актуальні питання морфології. — Тернопіль, 1996. — Т. 1. — С. 37–39.
- Акуленко Н. М. Топография и структура скоплений пигмент-содержащих клеток в печени лягушки озерной // Вестн. зоологии. — 1997. — № 3. — С. 49–53.
- Алексеева Г. В., Юнкер В. М. Кровь и кроветворение // Экологическая физиология животных. — Л.: Наука, 1979. — Ч. 1. — С. 205–214.
- 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.
- Горышина Е. Н., Чага О. Ю. Сравнительная гистология тканей внутренней среды с основами иммунологии. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1990. — 320 с.
- Кононский А. И. Гистохимия. — Киев: Вища школа, 1976. — 278 с.
- Купер Э. Сравнительная иммунология. — М.: Мир, 1980. — 422 с.
- Старостин В. И., Мичурина Т. В. Строма кроветворных органов и ее взаимоотношения со стволовой кроветворной клеткой // Соединительная ткань и кровь. — М., 1977. — Т. 7. — С. 59–110. — (Итоги науки и техники. Морфология человека и животных. Антропология).
- Хамидов Д. Х., Акилов А. Т., Турдыев А. А. Кровь и кроветворение у позвоночных животных. — Ташкент: Фан, 1978. — 166 с.
- Corsaro C. et al. Circannual rhythm of the melanin content in frog liver (*Rana esculenta* L.) // Pigment Cell Res. — 1990. — 3(2). — P. 120–122.

ЗАМЕТКА

Новый для фауны Украины вид стафилинид (Coleoptera, Staphylinidae) из Закарпатья [A New Species of Staphylinidae (Coleoptera) from Transcarpathian]. — *Ontholestes haroldi* (Eppelsheim, 1884) ♀ и ♂, «Закарпатская обл., Тячевский р-н, окр. с. Усть-Черной, берег р. Тересвы, пастбище, коровий помет, 17.07.1983 (Петренко)2»; 4 ♂, «Рахов, управление заповедника, грибы-трутовики на пнях ивы, 24.06.1990, (Петренко)». Ранее вид был известен из ФРГ, Швейцарии, Австрии, Болгарии, Румынии, Чехии, Словакии и Польши. — А. А. Петренко (Институт зоологии НАН Украины, Киев).