

УДК 574.3.591

## МИЕЛОГРАММА ОЗЕРНЫХ (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*) И ТРАВЯНЫХ ЛЯГУШЕК (*RANA TEMPORARIA*) НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

Романова Е. Б., Шаповалова К. В.

*Нижегородский госуниверситет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, e-mail: romanova@ibbm.unn.ru, kristin.shapovalova@gmail.com*

Проведен анализ клеточного состава костного мозга выборок из популяций травяных и озерных лягушек, обитающих на территории Нижегородской области, в разной степени подверженной действию урбанизации и загрязнения. У озерных лягушек, обитающих в загрязненном городском водоеме, наблюдался сдвиг миелограммы в сторону возрастания числа клеток эритроидного ряда (эритробластов, пронормоцитов и базофильных нормоцитов) по сравнению с аналогичными показателями лягушек природоохранной зоны. Миелограмма травяных лягушек урбанизированной территории отличалась небольшой активацией миелоидного ростка гемопоэза. Полученные результаты свидетельствовали о разных возможностях гемопоэтической системы двух видов при загрязнении среды обитания. Выявленные изменения в миелограммах изученных видов определялись как онтогенетическими особенностями, так и спецификой среды обитания, накладывающей отпечаток на физиологическое состояние амфибий.

Ключевые слова: амфибии, миелограмма, миелоидный и эритроидный ряд клеток.

## MYELOGRAMS OF MARSH (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*) AND GRESS FROGS (*RANA TEMPORARIA*) OF THE NIZHNY NOVGOROD REGION

Romavova E. B., Shapovalova K. V.

*Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, e-mail: romanova@ibbm.unn.ru, kristin.shapovalova@gmail.com*

The analysis of cellular composition of myeloid and erythroid marrow samples from populations of grass and marsh frogs living in the Nizhny Novgorod region with varying degrees of urbanization and pollution. At the lake frogs living in the polluted urban reservoir shift of a myelogram towards increase of number of cells of an erythroid row (erythroblast, pronormocyt and the basophilic of normocyt) in comparison with similar indicators of frogs of a nature protection zone were observed. Myelograms of grass frogs of the urbanized territory differed in small activation of a myeloid sprout of a hemapoesis. The results showed the different possibilities of the hematopoetic system with two types of pollution habitat. The revealed changes in myelograms species studied were defined as developmental peculiarities and specifics of the environment, affects the physiological state of the amphibians.

Keywords: amphibians, myelogram, myeloid and erythroid sprout of cells.

Костный мозг является центральным органом гемопоэза и иммунной системы позвоночных животных [4, 10]. Впервые костный мозг, выполняющий дополнительную функцию очага кроветворения, появляется у бесхвостых амфибий (Anura) [10]. Вместе с печенью и лимфоидными узлами костномозговая ткань у амфибий, имеющая в своем составе плазматические клетки, выполняет функцию поставщика стволовых кроветворных элементов для формирования Т- и В-клеточных популяций [2]. Основную часть костного мозга у амфибий составляют жировые клетки – адипоциты (60 %), пигментные клетки и морфологически распознаваемые клетки, начиная с бластных (миелобластов, эритробластов и др.) [4]. Сравнительное изучение клеточного состава костномозговой продукции позволяет оценить не только тканевые взаимоотношения в костном мозге позвоночных животных, но и

оценить ответные индивидуальные и популяционные реакции на условия окружающей среды.

**Цель** работы – оценка клеточного состава миелоидного и эритроидного рядов костного мозга озерных (*Pelophylax ridibundus*) и травяных (*Rana temporaria*) лягушек, обитающих в водоемах урбанизированной территории Нижегородской области.

### **Материалы и методы**

Объект исследования – выборки из популяций озерных (*Pelophylax ridibundus*) и травяных (*Rana temporaria*) лягушек территории г. Н. Новгорода и Нижегородской области, в разной степени подверженной действию урбанизации и загрязнения. Сбор материала осуществлялся в полевой сезон 2015 года.

1-ая точка сбора – оз. Свято (Нижегородская область, Арзамасский район). Водоем находится на территории Пустынского заказника, входит в систему Пустынских озер бассейна реки Серёжа.

2-ая точка сбора – оз. Парковое (г. Н. Новгород, Автозаводский район). Создано искусственно на месте выемки песка для жилого массива. Расположено в парковой зоне и находится под воздействием рекреационной нагрузки. Водоохранная зона хорошо озеленена. Вода озера мало минерализованная, относится к гидрокарбонатному классу. Класс качества воды III (умеренно-загрязненная) [3]. Количественный химический анализ пробы воды, отобранной в период сбора лягушек, был выполнен в Отделе мониторинга за состоянием окружающей среды (нач. отдела Д. Л. Губанов) Комитета охраны окружающей среды и природных ресурсов г. Нижнего Новгорода.

3-ья точка – территория дачного пос. Афонино (г. Нижний Новгород, Нижегородский район). Территория подвержена интенсивной антропогенной нагрузке, находится на территории коллективных садов.

Дифференцированный подсчет клеток костного мозга (в %) проводили по окрашенным по Романовскому – Гимзе препаратам, под микроскопом с иммерсионной системой при общем увеличении  $\times 1500$ . Дополнительно для каждой особи рассчитывали интегральный индекс миелограммы, как отношение суммы клеток миелоидного ростка (миелобласты + промиелоциты + миелоциты + метамиелоциты) к сумме клеток эритроидного ростка (эритробласты + пронормоциты + нормоциты базофильные + нормоциты полихроматофильные). Проверка данных на соответствие нормальному распределению проводилась с применением критериев Колмогорова – Смирнова, Лиллиефорса и Шапиро-Уилко. Первичные данные не соответствовали нормальному распределению, поэтому дальнейший статистический анализ осуществляли с помощью непараметрических критериев Крускала – Уоллиса и Данна. Критический уровень значимости ( $p$ ) принимали = 0,05.

## Результаты и их обсуждение

Известно, что общее количество клеток паренхимы костного мозга составляет 98–99%, причем в их число входят как морфологически нераспознаваемые родоначальные элементы, так и морфологически распознаваемые, начиная с бластных (миелобластов, эритробластов и др.) и кончая зрелыми клетками. Все ростки кроветворения начинаются с бластных элементов, продолжают промежуточными формами созревания и заканчиваются зрелыми клетками [9].

Среди клеток миелоидного ряда в приготовленных мазках дифференцировали: миелобласты, промиелоциты, миелоциты и метамиелоциты. Миелобласты – это родоначальные клетки гранулоцитарного ряда, чаще круглой, реже полигональной формы, отличаются нежной структурой ядер. Ядро содержит 2–5 ядрышек, окрашенных в синий или голубой цвет. Голубая цитоплазма окружает ядро небольшим пояском, содержит умеренное количество неспецифической азурофильной зернистости, имеющей переходные оттенки от красного до фиолетового цвета (рис. 1а). Промиелоциты – ядро фиолетовое, круглое или овальное с эксцентричным или центральным положением, тонкая ядерная мембрана. Цитоплазма голубая. Гранулы азуро-, эозинофильные (рис. 1б). Миелоциты – ядро красно – фиолетовое, овальное или с небольшой выемкой с эксцентричным положением. Неотчетливая ядерная мембрана. Голубовато-розовая цитоплазма (рис. 1в). Метамиелоциты – ядро фиолетовое, толстое, подковообразное или с выемкой с эксцентричным или центральным положением. Ядерная мембрана присутствует (рис. 1г).

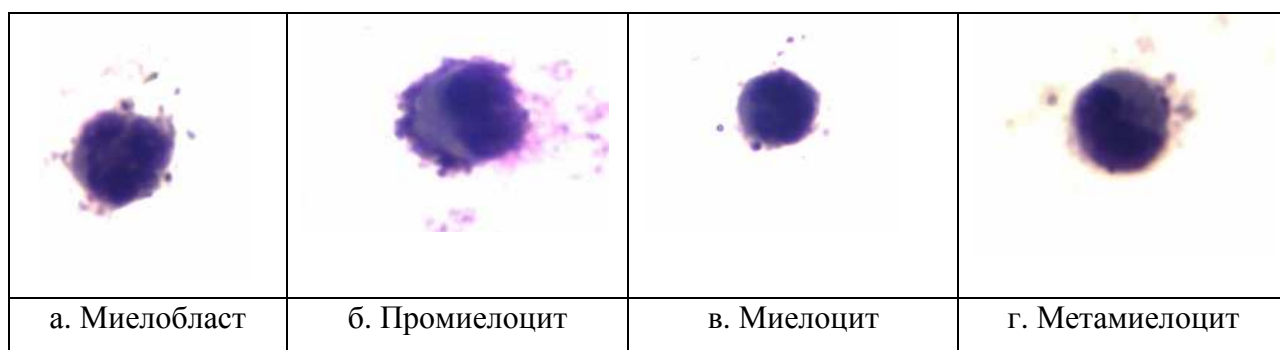
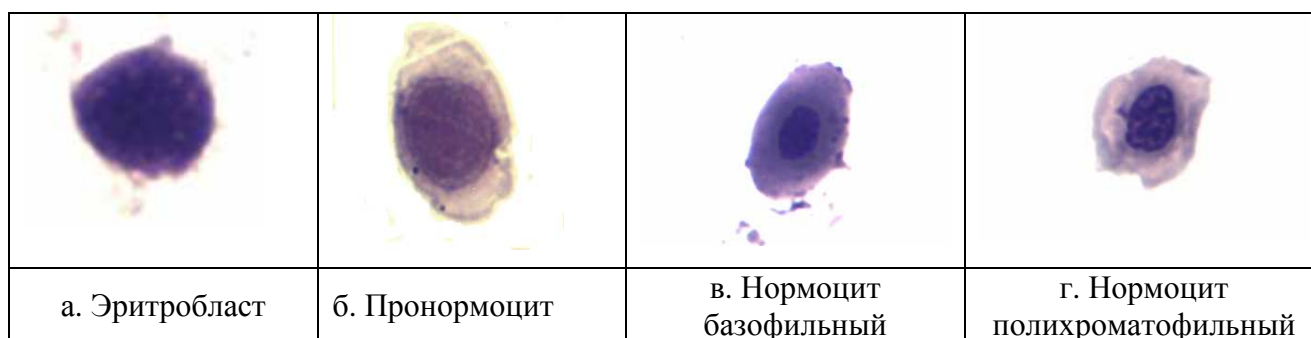


Рис. 1. Клетки миелоидного ростка костного мозга (а, б, в, г)

Среди клеток эритроидного ряда в приготовленных мазках дифференцировали: эритробласты, пронормоциты, базофильные и полихроматофильные нормоциты.

Эритробласты – являются морфологически различными родоначальными клетками элементов эритроидного ростка. Это большие круглые клетки диаметром 15–25 мкм или около 20 мкм и более, имеют большое овальное или круглое ядро, занимающее большую часть клетки, окрашивающееся в темный красно-фиолетовый цвет. Цитоплазма имеет различные размеры, насыщенно-синий цвет с фиолетовым оттенком, с зоной просветления

вокруг ядра в некоторых клетках (рис. 2а). Пронормоциты – морфологически близки к эритробластам, но отличаются от них меньшей величиной (12–18 мкм), более грубой структурой ядра. Форма клетки круглая или овальная. Цитоплазма значительной величины, базофильная, окрашивается в синий цвет (рис. 2б). Базофильные нормоциты обычно имеют размеры 10–18 мкм. Ядро круглое, плотное, не содержит нуклеол. Структура ядра более грубая, чем у пронормоцита, с четким разделением на базихроматин и оксихроматин, в результате чего ядро имеет колесовидную структуру. Цитоплазма базофильная, темно- или светло-синяя (рис. 2в). Полихроматофильные нормоциты по размеру меньше базофильных – 9–12 мкм. Форма круглая или овальная. Ядро плотное. Цитоплазма клеток, накапливая гемоглобин, воспринимает кислые краски и в зависимости от степени насыщения гемоглобином при окрашивании приобретает цвет от серовато-синего до серовато-розового – полихроматофилия (рис. 2г).



*Рис 2. Клетки эритроидного ростка костного мозга (а, б, в, г)*

При дифференцированном анализе миелограмм выявлено изменение долей клеток разных ростков костного мозга в зависимости от вида лягушек и места их обитания (табл. 1). Так, у озерных лягушек, обитающих в оз. Парковое (г. Н. Новгород, Автозаводский район) наблюдался сдвиг миелограммы в сторону возрастания числа клеток эритроидного ряда (табл.1), что выражалось в увеличении количества незрелых предшественников эритроцитов в 1,7 раз ( $Z_{1-2}=2,37$ ,  $p=0,05$ ), пронормоцитов – почти в 2 раза ( $Z_{1-2}=2,77$ ,  $p=0,017$ ), базофильных нормоцитов – в 2,2 раза ( $Z_{1-2}=3,03$ ,  $p=0,007$ ) по сравнению с особями, обитающими в оз. Свято Пустынского заказника. Известно, что главным поставщиком незрелых эритроидных клеток у амфибий является костный мозг [1]. И с ростом урбанизации у амфибий наблюдается увеличение в периферической крови незрелых форм эритроцитов, что свидетельствует об активации процессов кроветворения [7], обеспечивающего выживание амфибий при постоянном обитании в загрязненной среде.

Таблица 1

### **Миелограмма амфибий урбанизированной территории**

Показатели, %	<i>Pelophylax ridibundus</i>		<i>Rana temporaria</i>	Статистические показатели: кр. Крускала – Уоллиса (H), кр. Данна (Z)
	1. Оз. Парковое (г.Н. Новгород, Автозаводский район)	2. Оз. Свято (Нижегородская обл., Арзамасский район)	3. Пос. Афонино (г. Н.Новгород, Нижегородский район)	
<i>Клетки миелоидного ряда</i>				
Миелобласты	15,00 ± 2,31	28,50 ± 2,84	19,20 ± 2,90	H=20,78, p<0,001; <b>Z<sub>1-2</sub>=4,50, p=0,00002;</b> Z <sub>1-3</sub> =1,41, p=0,47; <b>Z<sub>2-3</sub>=3,23, p=0,0036</b>
Промиелоциты	6,13 ± 1,12	9,30 ± 1,71	7,00 ± 0,81	H=5,24; p=0,72; Z <sub>1-2</sub> =2,26, p=0,70; Z <sub>1-3</sub> =0,91, p=1,00; Z <sub>2-3</sub> =1,45, p=0,44
Миелоциты	12,13 ± 1,22	19,70 ± 3,09	29,06 ± 2,57	H=27,73, p<0,001; Z <sub>1-2</sub> =1,93; p=0,158; <b>Z<sub>1-3</sub>=5,24, p&lt;0,001;</b> <b>Z<sub>2-3</sub>=2,75, p=0,018;</b>
Метамиелоциты	8,53 ± 0,63	11,50 ± 2,90	9,66 ± 0,87	H=5,38, p=0,67; Z <sub>1-2</sub> =2,30, p=0,065; Z <sub>1-3</sub> =1,28, p=0,76; Z <sub>2-3</sub> =1,14, p=0,60;
<i>Клетки эритроидного ряда</i>				
Эритробласты	21,20 ± 2,54	14,20 ± 1,92	20,80 ± 1,80	<b>H=6,37, p=0,04;</b> <b>Z<sub>1-2</sub>=2,37, p=0,05;</b> Z <sub>1-3</sub> =0,31, p=1,00; Z <sub>2-3</sub> =2,10, p=0,10;
Пронормоциты	12,93 ± 1,21	6,7 ± 0,32	4,67 ± 0,61	H=22,7, p<0,001; <b>Z<sub>1-2</sub>=2,77, p=0,017;</b> <b>Z<sub>1-3</sub>=4,64, p&lt;0,00001;</b> Z <sub>2-3</sub> =1,38, p=0,5;
Нормоциты базофильные	17,33 ± 1,46	7,7 ± 0,67	6,53 ± 0,44	H=16,61, p=0,0002; <b>Z<sub>1-2</sub>=3,03, p=0,007;</b> <b>Z<sub>1-3</sub>=3,78, p=0,0005;</b> Z <sub>2-3</sub> =0,35, p=1,00;
Нормоциты полихроматофильные	4,20 ± 0,56	2,3 ± 0,12	2,33 ± 0,12	H=2,51; p=0,285; Z <sub>1-2</sub> =1,33, p=0,55; Z <sub>1-3</sub> =1,32, p=0,56; Z <sub>2-3</sub> =0,15, p=1,00;
Интегральный индекс миелограммы	0,81 ± 0,41	2,40 ± 1,17	2,01 ± 1,17	H=24,87; p<0,001; <b>Z<sub>1-2</sub>=4,52, p=0,000018;</b> <b>Z<sub>1-3</sub>=3,89; p=0,00029;</b> Z <sub>2-3</sub> =1,03, p=0,89.

Преобладающими по численности клетками в миелограммах озерных лягушек оз. Свято оказались наименее дифференцированные клетки миелоидного ряда – миелобласты, доля которых возростала в 1,9 раза ( $Z_{1-2}=4,50$ ,  $p=0,00002$ ) по сравнению с озерными лягушками оз. Парковое. Сдвиг миелограммы амфибий в сторону миелоидного роста мог быть вызван либо паразитарными инвазиями, характерными для естественных мест обитаний [7], либо интегральной ответной реакцией организма на особенности водного режима оз.

Свято: природного карстового происхождения, непроточного, с высоким содержанием гуминовых кислот.

Статистически значимые различия в клеточном составе миелограмм выявлены у лягушек исследованных видов, обитающих на городской территории. Так, в эритроидном ростке костного мозга озерных лягушек количество пронормоцитов ( $Z_{1-3}=4,64$ ,  $p=0,00001$ ) и базофильных нормоцитов ( $Z_{1-3}=3,78$ ,  $p=0,0005$ ) почти в 3 раза превышало численность аналогичных клеток в костном мозге травяных лягушек, что свидетельствовало об усилении процессов кроветворения у особей озерных лягушек, обитающих в оз. Парковое (г. Н. Новгород, Автозаводский район). Результаты количественного химического анализа вод оз. Парковое в период отлова лягушек подтвердили превышение ПДК для водоемов рыбохозяйственного назначения по содержанию железа (1,98 ПДК) и марганца (2,22 ПДК), меди (2,7 ПДК), нефтепродуктов (6,6 ПДК). Полученные данные свидетельствовали о специфике адаптивных реакций амфибий двух видов к интегральному воздействию окружающей среды: природным и антропогенным факторам (рис. 3).

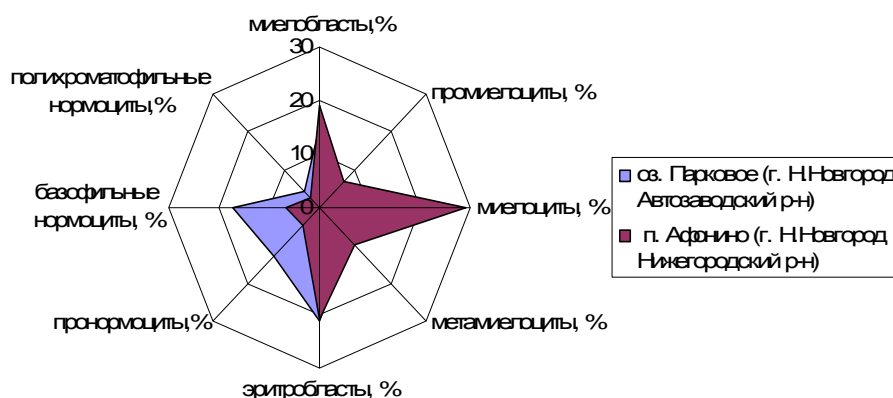
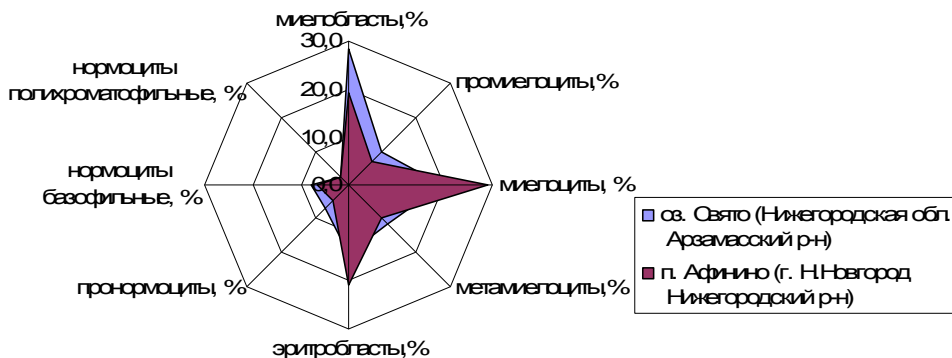


Рис. 3. Различия клеточного состава миелоидного и эритроидного рядов костного мозга озерных и травяных лягушек урбанизированной территории

Миелограммы травяных лягушек урбанизированной территории отличались и от миелограммы озерных лягушек природоохранной зоны, изменением соотношения клеток миелоидного ряда. Так, если у озерных лягушек (оз. Свято) отмечена большая доля миелобластов, то у травяных этот показатель в 1,5 раза ниже ( $Z_{2-3}=3,23$ ,  $p=0,0036$ ). И, наоборот, если озерные лягушки природоохранной территории характеризовались небольшой долей миелоцитов в составе костного мозга, то для травяных урбанизированной территории этот показатель был в 1,7 раза выше ( $Z_{2-3}=2,75$ ,  $p=0,018$ ) (рис. 4). Рядом работ показано [6, 7], что высокий уровень миелоцитов и клеток эритроидного ряда обуславливает

усиление адаптивного потенциала и устойчивость амфибий к условиям урбанизированных ландшафтов, а также способствует освоению новых мест обитаний за пределами естественного ареала.



*Рис. 4. Различия клеточного состава миелоидного и эритроидного рядов костного мозга озерных лягушек природоохранной зоны и травяных лягушек урбанизированной территории*

Интегральный индекс миелограммы свидетельствовал о напряженности компенсаторных процессов в организме амфибий. Снижение этого показателя могло быть связано в самом простом случае с активацией эритроидного ростка гемопоэза, а повышение – с возрастанием доли незрелых клеточных элементов миелоидного ростка. Установлено, что данный показатель имел наименьшее значение у популяции озерных лягушек, обитающих в загрязненном городском оз. Парковое, статистически значимо отличаясь от аналогичного показателя озерных лягушек оз. Свято ( $Z_{1-2}=4,52$   $p=0,000018$ ) и травяных урбанизированной территории пос. Афоино ( $Z_{1-3}=3,89$   $p=0,00029$ ) (рис. 5). Полученные результаты свидетельствуют о разных возможностях гемопоэтической системы двух видов при загрязнении среды обитания.

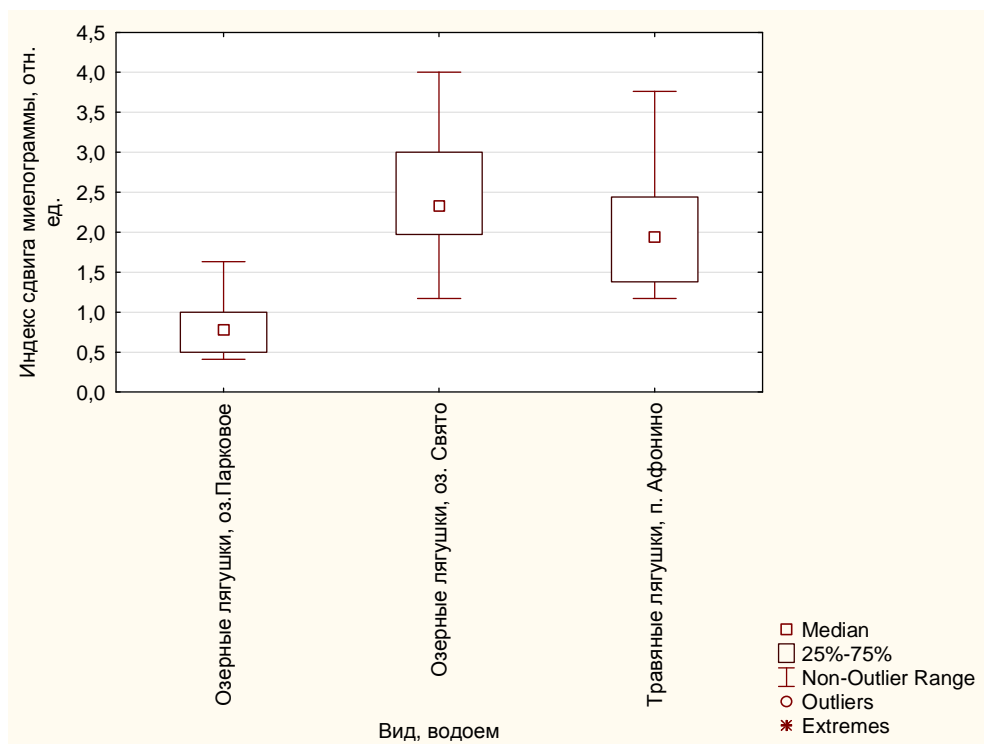


Рис. 5. Интегральные индексы миелограмм амфибий

Подводя итог проведенным исследованиям, можно заключить, что костный мозг, являясь органом гемопоэза и иммунной системы амфибий, активно реагирует на изменение качества условий среды, активацией клеток миелоидного (травяные лягушки) и эритроидного (озерные лягушки) рядов. Выявленные изменения в миелограммах изученных видов определялись как онтогенетическими особенностями, так и спецификой среды обитания, накладывающей отпечаток на физиологическое состояние амфибий.

### Список литературы

1. Акуленко Н. М. Сезонная динамика эритропоэза и его топографическое распределение у лягушки озерной // Вестник Запорожского национального университета. – 2008. – № 2. – С. 5–9.
2. Галактионов В. Г. Эволюционная иммунология: учебное пособие. – М.: Академкнига, 2005. – С. 408.
3. Гелашвили Д. Б., Охупкин А. Г., Доронина А. И. и др. Экологическое состояние водный объектов Нижнего Новгорода: монография. – Нижний Новгород: Изд-во ННГУ, 2005. – С. 414.
4. Грушко М. П. Красный костный мозг озерной лягушки (*Rana ridibunda*) и прыткой ящерицы (*Lacerta agilis*) // Морфология. – 2010. – Т. 137, № 1. – С. 31-34.



5. Пескова Т. Ю. Адаптационная изменчивость земноводных в антропогенно загрязненной среде // Известия высших учебных заведений. Северокавказский регион // Естественные науки. – 2005. – № 3. – С.66 – 70
6. Романова Е. Б., Фадеева Г. А., Вершинина К. С., Николаев В. Ю. Изменение лейкоцитарной формулы крови озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) при гельминтозах // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. – 2013. – № 5(1). – С. 141–147.
7. Силс Е. А. Популяционные особенности гематологических показателей периферической крови сеголеток *Rana ridibunda* Pall. в условиях урбанизации // Экология. – 2010. – № 2. – С. 158–160.
8. Скрипченко Е. В. Структурный состав стромы костного мозга бесхвостых амфибий // Вестник зоологии. – 2009. – № 3. – С.68–71.
9. Хамидов Д. Х., Акилов А. Т., Турдыев А. А. Кровь и кроветворение у позвоночных животных. – Ташкент: Изд-во «Фан» УзССР, 1978. – С. 168.
10. Cooper E. L. Immunity mechanisms // Physiology of the amphibian / Ed. B. Lofts. Academic Press, Inc, 1976. V. 3. P. 163- 272.