

¹О.Ф. Дунаєвська, ¹Л.П. Горальський, ²Л.О. Стеченко, ¹М. І. Колеснік, ²О.І. Кривошеєва
¹Житомирський національний агросекологічний університет, Житомир
²Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ

ОСОБЛИВОСТІ УЛЬТРАМІКРОСКОПІЧНОЇ БУДОВИ СЕЛЕЗІНКИ ЖАБИ ОЗЕРНОЇ І ЖАБИ СТАВКОВОЇ

E-mail: Oksana_fd@ukr.net

Світлова мікроскопія та морфометрія не виявляють відмінностей у гістоструктурі селезінки жаб озерної і ставкової. Важливо було це з'ясувати на ультрамікроскопічному рівні для обрання біоіндикаторів у моніторингу довкілля. Це дозволить забезпечити отримання екологічно чистої та безпечної продукції харчування на територіях рибних господарств. У білій та червоній пульпі селезінки жаб виявлено функціонально активні та неактивні нейтрофільні гранулоцити. Ідентифіковано характерні для селезінки клітини та складові: макрофаги, еритроцити, еозинофіли, кровоносні та лімфатичні капіляри тощо. У жаби ставкової спостерігали дещо більше жирових включень, кількість яких корелює із збільшенням каналців незернистої ендоплазматичної сітки. Пропонуємо використовувати жабу озерну та жабу ставкову у якості біоіндикаторів геосистем.

Ключові слова: ультрамікροструктура, селезінка, жаба ставкова і озерна, адипоцит, нейтрофіл, біоіндикація, біомаркер, еозинофіл, ендотеліоцити.

Виконане дослідження є частиною НДР «Розвиток, морфологія та гістохімія органів тварин у нормі та при патології», державна реєстрація за № 0113V000900.

Селезінка – вагомий орган кровотворення у амфібій, зокрема вона приймає участь в еритропоезі [1]. Основна маса клітин, що в ній формується, належить до лімфопоетичного ряду [3], це дозволяє віднести її до периферичних імунних органів. Морфофункціональні особливості організації системи імунітету у амфібій є не до кінця з'ясованими. Дане питання має великий теоретичний інтерес, тому що амфібії представляють важливу сходинку в еволюції хребетних тварин і практичне значення, оскільки морфофункціональні зміни селезінки можуть бути відображені на рівні експресуючого транскриптому для виявлення інфекційного процесу та змін навколишнього середовища [13].

Важливими є дослідження екологічної оцінки якості довкілля, що одночасно дозволяють виявити ступінь і інтенсивність впливу забруднювачів, прослідкувати динаміку деградації екосистем в часі та просторі [9]. Для інтегральної оцінки успішно використовується сучасний і перспективний метод біоіндикації, а виявлені природні реакції організму тварин часто екстраполюються на людину [4]. Метод морфологічних індикаторів успішно використовують для оцінки впливу урбанізованих територій на стан популяцій [11]. Всім вимогам, що висуваються до біоіндикаторів, відповідає жаба озерна (*Rana ridibunda* P.), т. я. це широко розповсюджений вид амфібій в Європі, має чіткі та зручні ознаки для дослідження [9], параметри організму відображають стан локального місцезнаходження [10]. Безхвості амфібії швидко реагують навіть на незначний антропогенний вплив [8] та вразливі до нього [6]. В якості біомаркерів виступають морфологічні показники, зокрема, селезінки. Наукові дослідження свідчать про достовірне зниження відносної маси селезінки статевозрілих особин *R. ridibunda* P., які мешкають у водотоках, забрудненими важкими металами [8] та збільшення відносного об'єму білої пульпи селезінки і пігментних клітин [7]. У якості біомаркерів пропонують використовувати не лише *Rana ridibunda*, а й інші види жаб, зокрема, *R. lessonae* C. [6].

Метою дослідження було вивчити ультрамікроскопічні особливості селезінки озерної та ставкової жаб. Отримані результати будуть використані для обрання біоіндикаторів у моніторингу довкілля. Це особливо важливо для забезпечення отримання екологічно чистої та безпечної продукції харчування, зокрема, рибних господарств.

Матеріали і методи дослідження. Для дослідження здійснювали відбір селезінки статевозрілих жаб озерних (*Rana ridibunda* P.) і жаб ставкових (*Rana lessonae* C.) обох статей (співвідношення самки: самці становило 1:1) у фазі морфофункціональної зрілості органу (вік 2-3 роки). Кількість проб становила 14 кожного виду. Жаби були вилучені в Ружинському районі Житомирської області на території СВАТ «Житомирський рибгосп», який нараховує 15 водойм.

Для електронномікроскопічного дослідження селезінки забір матеріалу проводили негайно після розтину черевної порожнини. Довжина відібраних зразків не перевищувала 1 мм. Матеріал переносили пастерівською піпеткою і фіксували 2,5 % розчином глутарового альдегіду на

фосфатному буфері з дофіксацією у 1 % розчині чотирьохоксиду осмію за Колфільдом. Потім матеріал зневоднювали у спиртах зростаючої міцності (70 °, 80 °, 90 °, 100 °) та ацетоні, заливали у суміш епон-аралдит, згідно загальноприйнятої методики [2]. Ультратонкі зрізи виготовляли на ультратомі Reihart (Австрія), контрастували 2 % розчином ураніацетату та цитратом свинцю і досліджували на електронному мікроскопі ПЕМ-125К при збільшеннях в 4–20 тисяч разів.

Обробка даних. Морфометричні дослідження проводили на напівавтоматичному пристрої обробки графічних досліджень за допомогою програми «Органела». При цьому вивчали клітинний склад, його особливості та основні морфометричні характеристики.

При проведенні досліджень дотримувались основних правил належної лабораторної практики GLP (1981 р.), положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених І Національним конгресом з біоетики (м. Київ, 2001 р.). Уся експериментальна частина дослідження була проведена згідно з вимогами міжнародних принципів «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експерименті та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986 р.) та відповідного Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.).

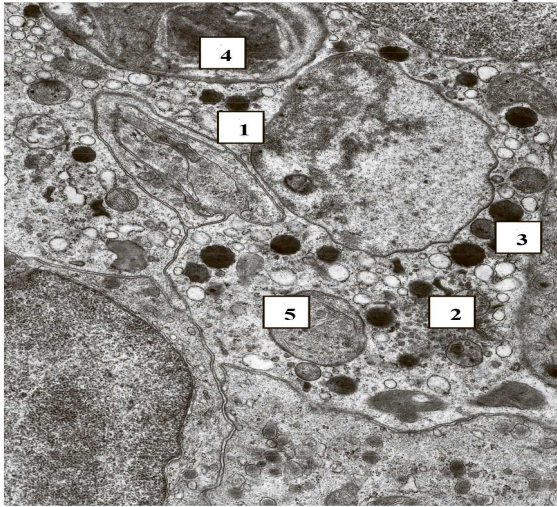


Рис. 1. Мікрофотографія селезінки жаби озерної. Макрофаг (1), аутофагосома (2), лізосома (3), залишкове тільце (4), мітосоми (5). $\times 6000$.

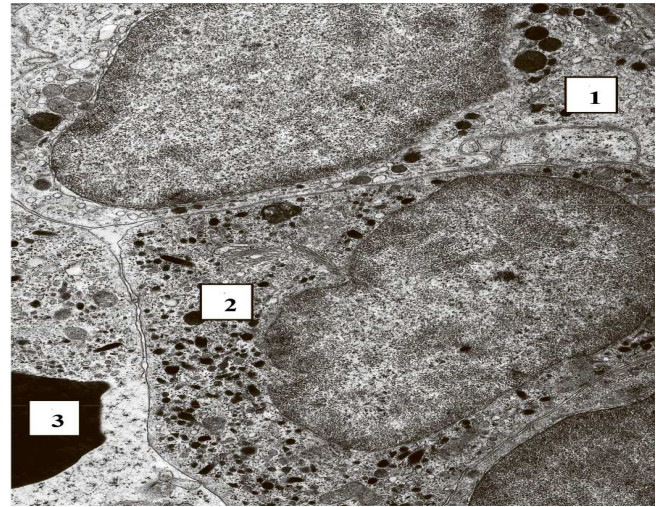


Рис. 2. Мікрофотографія селезінки жаби озерної. Макрофаг (1), нейтрофіл (2), еритроцит (3). $\times 4000$.

Результати дослідження та їх обговорення. У білій пульпі селезінки жаби озерної наявні лімфобласти, які не мають великих виражених ядерців. Нейтрофільні гранулоцити мали округлу або овальну форму. Цитоплазматичний матрикс був помірно електроннощільним, в ньому розташовувались органели. Нейтрофіли характеризувались великою кількістю гранул, добре контурувались як первинні, так і вторинні гранули. У деяких з них була лізована плазматична мембрана і ділянки цитоплазми разом з дрібними гранулами знаходились у просвіті венозних синусів (рис. 1, 2). У зрілих нейтрофілів велика площа цитоплазми, насиченої гранулами (рис. 2). Бачили невелику кількість мітохондрій і слабо розвинений апарат Гольджі при збільшенні в 10 000 разів. Макрофаги містили велику кількість первинних лізосом, що мали не активовані ферменти. Краї у макрофагів звивистої форми, мітохондрії добре розвинуті, з гранулами, ядерця розташовувались ексцентрично. Виявлялись аутофагосоми, мітосоми, фагосоми, залишкові та апоптозні тільця (рис. 1, 2). Аутофагосоми мали подвійну мембрану, утворені ендоплазматичною сіткою і, як правило, містили аномальні білки. Залишкове тільце утворюється в результаті перетравлення ферментами матеріалу, що вноситься в клітину фагосомами. Перетравлення відбувається у вторинній лізосомі. Залишкове тільце (рис. 1) частіше мало неправильну форму. Воно може бути сформоване вторинними і первинними лізосомами. Апоптозні тільця утворюються у процесі деструкції. Вони мали сферичну, овоїдну або неправильну форму. На поверхні апоптичної клітини знаходилась велика кількість пухирців. Якщо клітина достатньо велика, то вони розпадаються на оточені мембранами фрагменти – апоптозні тільця. Тільця містили залишки органел, цитоплазми, хроматину, цитолемі. Деякі з них нараховували виключно один фрагмент: або цитоплазми, або ядра. У червоній пульпі поряд з кровоносними капілярами виявлялися і лімфатичні. Капіляри характеризувалися стоншеним ендотеліальним вистеленням, що утримується колагеновими, еластичними волокнами та основною речовиною, до якої прилягають форменні елементи крові. Плазмоцити мали нерівні, звивисті контури, з ексцентрично розташованим ядром, добре помітним ядерцем. Цитоплазма плазмоцитів містила великий набір

органел, серед яких комплекс Гольджі з розширеними цистернами і мішечками. Кровоносні капіляри значно менших розмірів і вистелені товщим ендотелієм.

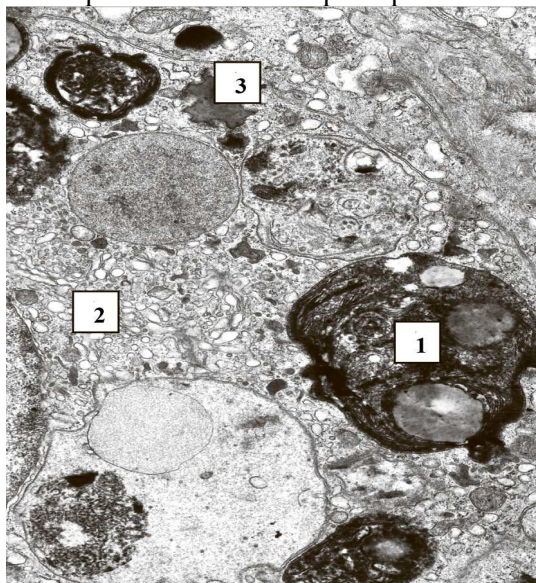


Рис. 3. Мікрофотографія селезінки жаби ставкової. Апоптозне тільце (1), макрофаг (2), жирові включення (3). $\times 7000$.

У периферичних зонах кількість мікропіноцитозних пухирців невелика. Периваскулярне оточення таке ж як і у лімфатичних капілярах. Посткапілярні вени мали високий ендотелій, з'єднаний як простими контактами, так і фокальними вздовж контактуючих поверхонь ендотеліоцитів. Ендотелій складається з ендотеліальних клітин. Місця їх зеднання між собою мають неправильні контури. Ядро оточено цитоплазмою з усіх сторін. В ній є піноцитозні міхурці. Капіляри відкривались на своєму венозному кінці в посткапілярні венули, для яких характерною ознакою є збільшення кількості перицитів. Венули мали зовнішню оболонку з фіброblastів і колагенових волокон. Жирові включення присутні у більшості клітин, але найбільша їх кількість трапляється у ретикулярних клітинах та у макрофагах (рис. 3). Виявлялися нейтрофіли, велика кількість макрофагів.

Нейтрофіли ідентифіковувались як функціонально активні, так і ті, що мали цитоплазму бідну на органели. Клітини без морфологічних ознак мембранної активності мали ядро, як правило, з 3-4 сегментів, чітко обмежених мембраною. В ядрі домінував гетерохроматин, який широкими смугами прилягав до внутрішнього листка каріолеми. Невеликі ділянки еухроматину локалізувались в центрі каріоплазми. Частина нейтрофілів знаходилась у стадії перетравлювання еритроцитів. Вивчення ультраструктурної організації селезінки ставкової жаби показало, що її будова така ж, як і у озерної жаби. Візуально спостерігали дещо більше жирових включень, кількість яких корелює із збільшенням каналців незернистої ендоплазматичної сітки (рис. 3). Жирові включення (адипоцити) характерні для пухкої сполучної тканини. В таких клітинах відбувалося збільшення числа краплин жиру, які зливалися між собою і утворювали одну велику краплину. Вона ставала настільки великою, що її цитоплазма відтіснялася до периферії у вигляді тонкого шару, ядро ставало дещо сплюснутим (рис. 3). Діаметр адипоцита може сягати 120 мкм. Між клітинами знаходилися прошарки сполучної тканини. В структурі адипоциту є вільні рибосоми, ендоплазматичний ретикулум, апарат Гольджі, мітохондрії. Найбільше помітні були мітохондрії, які мають вигляд паличок. Макрофаги переповнені продуктами аутолізу (аутофагосомами, мітосомами, фагосомами, залишковими тільцями).

У нейтрофілах наявні апоптозні тільця (рис. 3). Капіляри червоної пульпи переходили в вени. Їх стінки вистелені ендотеліальними клітинами (ендотеліоцитами) (рис. 4,а). Ендотеліоцити розташовувалися повздовж судинної стінки. За формою вони довгі та вузькі. Мали легке випинання в ділянці ядра. Цитоплазма мала вигляд цитоплазматичних відростків, які були відокремлені один від одного. Ці відстані ще називають повздовжніми щілинами. Ендотеліоцити підтримуються обручами з ретикулярних волокон, які сполучаються з базальною мембраною. Ретикулярні волокна складаються з ретикулярних клітин (рис. 4,б), вони поступово переходили в колагенові волокна трабекул. Відростки ретикулярних волокон утворюють сітку, в якій вміщувались окремі клітини. Відростки – це видовження цитоплазми клітин. Сітка може знаходитися статично у трьохвимірному просторі або зв'язуватися цитоплазматичними відростками. У посткапілярних венулах у ендотелії також визначалася велика кількість лізосом на різних стадіях формування (від первинних до залишкових тілець). У просвіті венозних синусів спостерігалися всі форменні елементи крові. В ядрі еозинофілу було видно декілька часток, в них вздовж ядерної оболонки розташовується конденсований хроматин. Центральна частина ядра була світліша, оскільки там знаходився еухроматин. В цитоплазмі розрізняли мітохондрії, слабо розвинений апарат Гольджі, розкидані гранули глікогену. В кожному еозинофілі таких гранул може бути до 200 шт. За нашими попередніми дослідження світломікроскопічним методом було показано, що мікроскопічна будова селезінки жаб характеризується сформованою червоною, білою пульпами та опорно-скоротливим апаратом [5]. Відносна площа білої пульпи селезінки жаб

озерних становила $15,36 \pm 5,71$ %, опорно-скоротливого апарату – $3,97 \pm 1,90$ %, червоної пульпи – $80,67 \pm 6,53$ % [4].

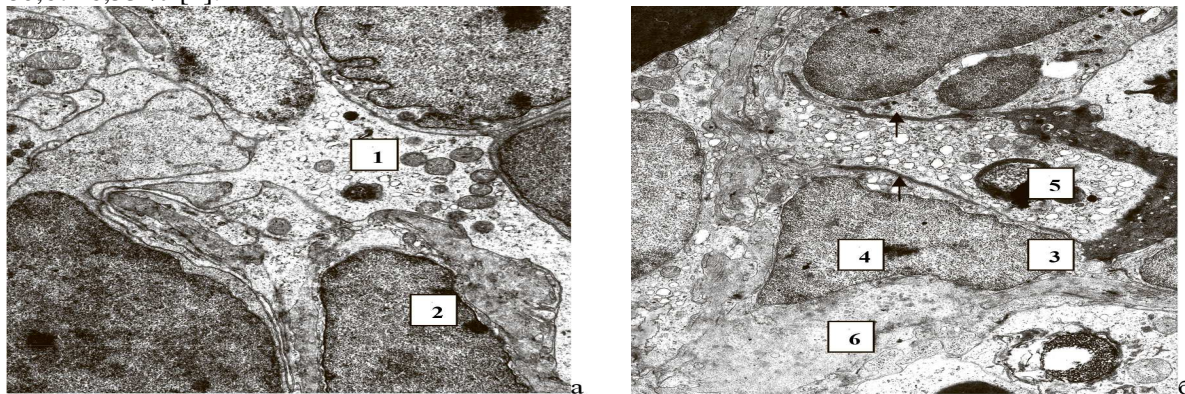


Рис. 4. Мікрофотографія селезінки жаби ставкової: а – просвіт посткапілярної венули (1), ендотеліоцит (2); б – ретикулярна клітина (3) з відростками (), ядром (4), фагосомою (5), трабекула (6). $\times 4000$.

У жаб ставкових аналогічні показники дорівнювали $14,83 \pm 3,74$ %; $4,12 \pm 1,87$ %; $81,05 \pm 4,36$ %. Різниця між ними була достовірно не значимою. Клітинний склад селезінки, описаний нами, не заперечує результатів інших науковців [3,12]. Електронномікроскопічні дослідження підтвердили нашу гіпотезу про тотожність будови селезінки жаби ставкової і озерної, незначну різницю в кількості адипоцитів ми пояснюємо особливостями середовища існування.

Висновок

У жаб ставкової та озерної не існує суттєвих відмінностей у цитологічній характеристиці селезінки за винятком незначної різниці у кількості адипоцитів, яка корелює із збільшенням каналців незернистої ендоплазматичної сітки. Пропонуємо вважати жабу озерну та жабу ставкову рівноцінними у якості біоіндикаторів у системі біомоніторингу довкілля. Перспективними і доцільними вважаємо імуногістохімічні дослідження селезінки жаб, які поглиблять існуючу морфологічну характеристику.

Список літератури

1. Akulenko NM. Sosudistoye ruslo kak chast gemopoeticheskoy sistemy bezkhvostikh amfibiyy. Vestnik zoologii. 2011; 45(4) : 359-366. [in Russian]
2. Horalskiy LP., Khomych VT., Kononskiy OI. Osnovy histologichnoy tekhniki i morfofunktsionalni metody doslidzhen u normi ta pry patolohiyi: navch. posibnyk. Zhytomyr: Polissya, 2012. 288 s. [in Ukrainian]
3. Grushko MP. Kletochnyi sostav krovotvornykh organov polovozrelykh samok predstaviteley klassa ryb, zemnovodnykh i presmykayushchikhsya [avtoreferat]. Astrakhan: Astrakhanskiy gos. tekhnicheskii un-t; 2010. 44 s. [in Russian]
4. Dunayevska OF. Osoblyvosti histoarkhitektoniky selezynki zhaby ozernoy (Rana ridibunda P.). Visnyk Problem biolohiyi i medytsyny. Poltava. 2016; 1 (2) 127: 43-7. [in Ukrainian]
5. Dunayevska OF. Vyznachennya indeksu Kernohana dlya sudyn selezynki poykilotermnykh tvaryn. Ukrainian Journal of Ecology. Melitopol'. 2017; 7(4): 25-9. doi: 10.15421/2017_82 [in Ukrainian]
6. Fayzulin AI., Chikhlyayev IV, Kuzovenko AYe. Osobennosti polimorfizma prudovoy lyagushki Pelophylax lessonae (Camerano, 1882) urbanizirovannykh territoriy srednego Povolzhya. Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk. 2013; 15 (3): 158-163. [in Russian]
7. Karapetyan AF, Grigoryan AV, Dzhivanyan KA. O morfofunktsionalnykh osobennostyakh pecheni i selezynki ozernoy lyagushki (Rana ridibunda), obitayushchey u reki Razdan. Biological Journal of Armenia. 2011; 63 (1): 14-7. [in Russian]
8. Lada GA, Levin AN, Artemova LV, Rybkina NS. Ob otsenke sostoyaniya okruzhayushchey sredy po urovnyu fluktuiruyushchey asimmetrii u beskhvostykh amfibiyy na primere ozernoy lyagushki (Rana ridibunda). Printsipy ekologii. 2012; 1 (3): 82-8. [in Russian]
9. Spirina YeV. Otsenka stabilnosti razvitiya v populyatsiyakh Rana ridibunda Pall. V Ulyanovskoy oblasti. Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta. 2010; 5 (67): 171-3. [in Russian]
10. Zaks MM, Yermakov OA. Mezhpopyulyatsionnaya izmenchivost zvukovogo signala oziornoy lyagushki Pelophylax (Rana ridibundus v srednem Povolzhye. Izvestiya Penzenskogo ped. un-ta imeni V. G. Belinskogo. 2012; 9: 213-5. [in Russian]
11. Zaripova FF, Fayzulin AI. Kharakteristika morfofiziologicheskikh pokazateley populyatsiy oziornoy lyagushki Rana ridibunda (Anura, Amphibia) urbanizirovannykh territoriy respubliky Bashkorstan. Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk. 2012; 14 (5): 145-9. [in Russian]
12. Bricker NK, Raskin RE, Densmore CL. Cytochemical and immunocytochemical characterization of blood cells and immunohistochemical analysis of spleen cells from 2 species of frog, Rana (Aquarana) catesbeiana and Xenopus laevis. Veterinary Clinical Pathology. 2012; 41 (3): 353-361. doi: 10.1111/j.1939-165X.2012.00452.x.
13. Savagea AE, Kiernec-Tyburczyb KM, Ellisonb KM, Fleischer RC, Zamudio KR. Conservation and divergence in the frog immunome: pyrosequencing and de novo assembly of immune tissue transcriptomes. Gene. 2014; 542 (2): 98–108. doi.org/10.1016/j.gene.2014.03.051.

Реферати

**СЕЛЕЗІНКИ ЛЯГУШКИ ОЗЁРНОЇ
И ЛЯГУШКИ ПРУДОВОЙ ОСОБЕННОСТИ
УЛЬТРАМИКРОСКОПИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ**

Дунаевская О.Ф., Горальский Л.П., Стеченко Л.А., Колесник Н.Л.
Кривошея О.И

Световая микроскопия и морфометрия не выявляют различий в гистоструктуре селезёнки лягушек озерной и прудовой. Наличие или отсутствие их важно было выяснить на ультрамикроскопическом уровне для выбора биоиндикаторов в мониторинге окружающей среды. Это позволит обеспечить получение экологически чистой и безопасной продукции питания на территориях рыбных хозяйств. В белой и красной пульпе селезёнки лягушек обнаружено функционально активные и неактивные нейтрофильные гранулоциты. Идентифицировано характерные для селезёнки клетки и составляющие: макрофаги, эритроциты, эозинофилы, кровеносные и лимфатические капилляры и тому подобное. У лягушки прудовой наблюдали несколько больше жировых включений, количество которых коррелирует с увеличением канальцев незернистой эндоплазматической сети. Предлагаем использовать лягушку озерную и лягушку прудовую в качестве биоиндикаторов геосистем.

Ключевые слова: ультрамикроструктура, селезёнка, лягушка прудовая и озерная, адипоциты, нейтрофилы, биоиндикация, биомаркер, эозинофилы, эндотелиоциты.

Стаття надійшла 10.05.18р.

**FEATURES OF ULTRAMICROSCOPIC
STRUCTURES OF THE SPLEEN IN MARSH
AND POOL FROGS**

Dunayevska O.F., Goralskyi L.P., Stechenko L.O., Kolesn
N.L., Krivosheyeva O. I.

Light microscopy and morphometry do not reveal differences in the histological structure of the spleen in lake and pond frogs. Their presence or absence was important to be clarified at the ultramicroscopic level to select bioindicators for monitoring the environment. This will ensure obtaining environmentally friendly and safe food products in the fishery areas. In the white and red pulp of the frog spleen, functionally active and inactive neutrophil granulocytes were detected. Spleen cells and components were identified: macrophages, erythrocytes, eosinophils, blood and lymphatic capillaries and the like. In the pond frog, some more fat inclusions were observed, the number of which correlates with the increase in the tubules of the smooth endoplasmic reticulum. We suggest using the lake frog and the pond frog as bioindicators of geosystems.

Key words: ultra microstructure, spleen, pond and lake frog, adipocytes, neutrophils, bioindication, biomarker, eosinophils, endotheliocytes

Рецензент Єрошенко Г.А.

DOI 10.26724 / 2079-8334-2018-2-64-198-203

УДК 612.014, 636.4.

Л.М. Кузьменко, А.А. Поліщук, С.О.Усенко, А.М. Шоста, *В.Г. Стояновський,
В.І. Карповський, *С.М. Білан

Полтавська державна аграрна академія, м. Полтава

*Львівський національний університет ветеринарної медицини і біотехнологій імені С.З.Гижинського

**Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

***ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

**ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ ГОМЕОСТАЗ У ТКАНИНАХ МАТКИ СВИНІ
ЗАЛЕЖНО ВІД ПЕРІОДІВ ВІДТВОРЮВАЛЬНОГО ЦИКЛУ**

E-mal: sveta_usenko@ukr.net

Висвітлено результати досліджень про особливості формування прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу у тканинах матки свинок у різні періоди статевого циклу та поросності. У досліді за принципом аналогів використано 40 клінічно здорових свинок великої білої породи віком 8 місяців та масою тіла 125–130 кг. Тварин утримували в станках, групами по 10–11 свинок. Холостих і поросних свиноматок годували згідно з нормами з урахуванням їх фізіологічного стану. Встановлено, що у тканинах рогів матки свинок стан прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу є лабільним і залежить від періоду відтворювального циклу. Виявлено, що в ендометрії і міометрії із настанням періоду еструса – відбувається зростання активності каталази ($p < 0,001$), супероксиддисмутазу і рівня дієнових кон'югатів ($p < 0,01$), при підвищеному використанні аскорбінової і дегідроаскорбінової кислот, що відображає посилення інтенсивності процесів вільнорадикального пероксидного окиснення в зв'язку з процесом запліднення та другої половини поросності. Такі змін спрямовані на забезпечення оптимальних умов для запліднення і початку розвитку ембріонів. Виявлено, що у матці свинок існує значна міжтканинна диференціація у формуванні прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу у ендометрії – вищий рівень каталази та кількості неферментних антиоксидантів порівняно із міометрієм майже у всі досліджувані періоди відтворювального циклу.

Ключові слова: свинки, відтворювальний цикл, ендометрій, міометрій, каталаза, аскорбінова кислота, вітамін А, вітамін Е.

Робота є фрагментом НДР «Розробити технологію інтракорпорального штучного осіменіння свинок» (№ державної реєстрації 0116U005011).

Упродовж останніх десятиріч накопичено значну кількість експериментальних даних щодо регулюючої дії активних форм Оксигену на основні процеси життєдіяльності тварин, які перебувають під динамічним контролем прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу [13].

Дослідженнями Y. Zhang [14], M. C. Gomez-Cabrera [9] і Pereira R.D. [12] розкрито