

ОСОБЛИВОСТІ ГІСТОАРХІТЕКТОНІКИ СЕЛЕЗІНКИ ЖАБИ ОЗЕРНОЇ (*RANA RIDIBUNDA P.*)

Житомирський національний агроекологічний університет (м. Житомир)

Oksana_Fd@ukr.net

Виконане дослідження є частиною наукової тематики кафедри анатомії і гістології факультету ветеринарної медицини Житомирського національного агроекологічного університету «Розвиток, морфологія та гістохімія органів тварин у нормі та при патології», № державної реєстрації 0113V000900.

Вступ. Морфофізіологічне дослідження філогенетичного напрямку дозволяє визначити механізми пристосування організму до умов існування, вплив на таксономічні групи тварин. Морфофізіологічні особливості організму тварин встановлюють екологічну обумовленість у характері розвитку близьких форм і поглиблюють їх характеристику. Важливими є дослідження екологічної оцінки якості довкілля, що одночасно дозволяють виявити ступінь і інтенсивність впливу забруднювачів, прослідкувати динаміку деградації екосистем в часі та просторі. Для такої інтегральної оцінки успішно використовується сучасний і перспективний метод біоіндикації, а виявлені природні реакції організму тварин часто екстраполюються на людину. Всім вимогам, що висуваються до біоіндикаторів, відповідає жаба озерна (*Rana ridibunda P.*) та має ряд переваг: широко розповсюджений вид амфібій в Європі, чіткі та зручні ознаки для дослідження, параметри організму відображають стан локального місцезнаходження. В якості біомаркерів виступають морфологічні показники, зокрема, відносна маса (ВМ) селезінки. Вже отримані результати наукових досліджень, які свідчать про достовірне зниження ВМ селезінки статевозрілих особин *R. ridibunda P.*, які мешкають у водотоках, забрудненими важкими металами [7]. 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 стоять на вищих ступенях становлення багатьох вузлових взаємозв'язків, які забезпечують особливості організації і збереження гомеостазу протягом індивідуального розвитку [5,10].

У безхвостих амфібій, до яких належить жаба озерна, органами кровотворення є кістковий мозок і селезінка. На ранніх етапах онтогенезу в гемопоезі бере участь нирка, що є рекапітуляцією прадавнього селезінково-ниркового типу. У деяких видів жаб (*Rana ripiens*) нирки не припиняють кровотворну діяльність і в зрілих тварин. Після спленектомії кровотворна тканина у жаб з'являється в нетипових місцях, в більшості тварин відновлюється гемопоез в нирках, інколи селезінка регенерує [3].

Враховуючи діагностичні можливості морфологічних та морфометричних показників, **метою дослідження** було проведення гістоморфометричної оцінки морфологічних структур селезінки амфібій – жаб озерної.

Об'єкт і методи дослідження. Для дослідження здійснювали відбір селезінки статевозрілих жаб озерних (*Rana ridibunda P.*) на території Житомирського району віком 2-3 роки, обох статей (співвідношення самки: самці становило 1:1) у фазі морфофункціональної зрілості органу загальною кількістю 108 особин. Визначали абсолютну, ВМ органу та лінійні розміри.

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» (№ 3446-IV від 21.02.2006 р., м. Київ).

Для гістологічних досліджень шматочки матеріалу фіксували в 10-12% охолодженому розчині нейтрального формаліну, з послідовним залиттям у парафін, целоїдин. Зрізи виготовляли на санному мікроскопі МС-2, товщиною не більше 10 мкм. Для вивчення морфології клітин і тканин при світловій мікроскопії застосовували фарбування гістопрепаратів гематоксиліном та еозином, за Ван-Гізона, азуром [2,6]. Морфометричні дослідження здійснювали за допомогою програми «Master of Morphology». Кількісні показники обробляли за допомогою програми «Statistic 6.0».

Результати досліджень та їх обговорення. Селезінка жаб озерної розташовувалась з лівої сторони тіла дорсально по відношенню до краніального кінця клоаки. Вона прикріплена до брижі між дванадцятипалою і товстою кишками та прилягає до тонкої кишки, приєднуючись до неї складкою мезентерію.

Це округлий, інколи сферичний або еліпсоїдний орган (**рис. 1**), темно-червоного кольору. Консистенція м'яка, пружна. Селезінкова артерія входить в ділянці хілуса, далі розгалужується в товщі селезінки. Анатомічні та топографічні особливості селезінки жаб озерної співпадають з дослідженнями Горышин Е.Н. (1985), Грушко М.П. (2010), Manning M. (1991) [3,4,10].

Згідно макрометричних показників: довжина органу становить $5,50 \pm 1,87$ мм; ширина – $4,12 \pm 1,72$ мм, висота – $3,39 \pm 1,66$ мм; співвідношення ширини до довжини становить 1:0,73, тому форма визначається як округла. Абсолютна маса селезінки становить $0,0770 \pm 0,0157$ г, відносна – $0,1170 \pm 0,0215\%$.

Селезінка жаби озерної сформована строною і паренхімою. Строма утворена капсулою і трабекулами, які разом формують опорно-скоротливий апарат селезінки. Зовні селезінка вкрита серозною оболонкою, яка зрослася з капсулою. Товщина капсули в різних ділянках органу неоднакова (рис. 2), найбільше вона розвинена у воротах і досягає значення 66,4 мкм.

Водночас потовщення зустрічалися по всій її поверхні і становлять від 33,2 до 51,6 мкм. На вісцеральній поверхні товщина найменша – 6,56 мкм. При цьому середнє значення товщини капсули селезінки жаб становить $19,37 \pm 4,45$ мкм.

При чому чітко сформована капсула трабекул не утворювала. Виявлялись лише пульпарні трабекули, які були представлені судинними і сполучними видами. Аналогічні результати отримала Горышина Е.Н. (1985) [3]. Значно частіше зустрічались судинні трабекули, яких було в 8,74 разів більше, ніж сполучних (89,73% і 10,27% відповідно). Судинні трабекули в більшості розташовувались в пульпі (66,1%), та в ділянці воріт (20,2%) і підкапсулярній зоні (13,7%). Вони мали різну форму: в основному видовжену та овальну (рис. 3).

У них виявлялись артеріоли та венули. Параметри судинних трабекул мали наступні розміри: довжина становить від 58,3 до 580,7 мкм, середнє значення – $179,83 \pm 16,34$, ширина від 24,9 до 83,2 мкм, середнє значення – $50,72 \pm 1,88$ мкм. У всіх трабекулах, крім сполучної тканини, виявлялись слабо розвинені пучки міоцитів. Відносна площа опорно-скоротливого апарату згідно морфометричних досліджень становила $3,97 \pm 1,90\%$. При цьому найбільшу частку його становить капсула (68,83%) і лише 31,17% займає трабекулярний апарат.

Основою пульпи селезінки є ретикулярна строма, яка складається з фіброblastів, макрофагів, колагенових і еластичних волокон. Колагенові волокна розташовуються навколо судин і майже відсутні в пульпі, еластичні знаходяться лише в капсулі і стінках великих судин. Пульпа сформована червоною і білою. Проте чіткої межі між ними у жаб немає.

Червона пульпа (ЧП) складається з пульпарних тяжів і просторів венозних синусів, заповнених вільними елементами крові. Зі сторони пульпи добре розрізняються адвентиціальні клітини (фіброblastи). Фіброblastична строма складає основу пульпарних тяжів. Виявлялись проеритроцити округлої форми з доволі великим округлим світлим ядром; базофільні еритроblastи з базофільною цитоплазмою і темним ядром; поліхроматофільні еритроblastи овальної форми; ацидофільні еритроblastи з темним ядром; еритроцити з паличкоподібним ядром. Клітини тромбоцитарного ряду були представлені тромбоцитами на різних стадіях дозрівання. Нейтрофільний ряд нараховував мієлоblastи, промієлоцити, мієлоцити, метамієлоцити. ЧП займала $80,67 \pm 6,53\%$ маси селезінки. Встановлений нами клітинний склад паренхіми селезінки співпадає з результатами досліджень Акуленко Н.М. (1998), Горышин Е.Н. (1985), Грушко М.П. (2010), Карапетян А.Ф. (2007), Bhattacharjee A. (2008), Bricker N.K. (2012), Manning M. (1991) [1,3,5,8,9,11].



Рис. 1. Типова форма селезінки жаби озерної.

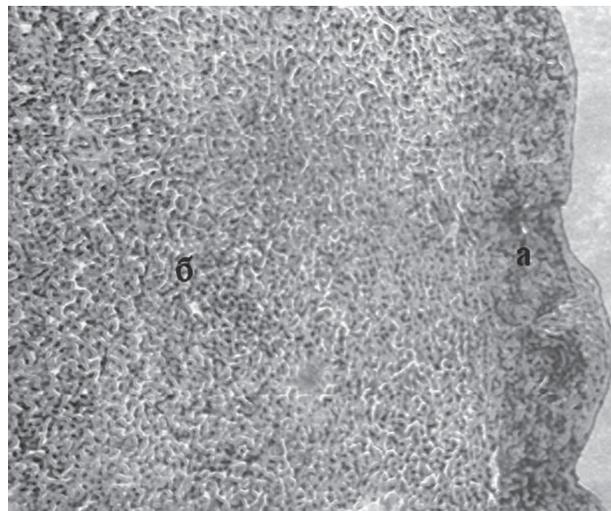


Рис. 2. Фрагмент мікроскопічної будови селезінки жаби озерної:
а – капсула; б – паренхіма.
Гематоксилін та еозин. Х56.

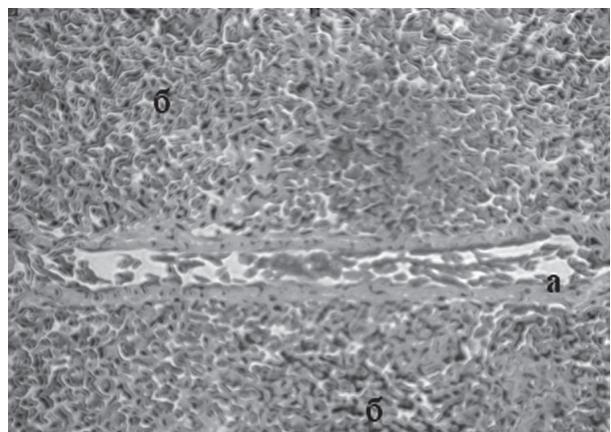


Рис. 3. Фрагмент мікроскопічної будови селезінки жаби озерної:
а – судинна трабекула; б – паренхіма.
Гематоксилін та еозин. Х56.

Біла пульпа представлена лімфоїдними вузликами (ЛВ) і тяжами за напрямком пульпарних артерій. Ділянки БП мали неправильну форму різних розмірів (рис. 4). В ретикулярній тканині БП відмічались клітини крові різного ступеня зрілості, які розташувались хаотично. В ЛВ світлий центр відсутній. Іноді між клітинами ЛВ зустрічаються міелоїдні елементи. В БП чітко диференціювались великі і малі лімфоцити; одноподібні і багатоядерні макрофаги, які містили включення гемосидерину внаслідок руйнування еритроцитів. Характерною особливістю БП селезінки жаб було щільне розташування клітин і волокон та наявність у ній дендритних макрофагів. Зустрічались лейкоцити, переважно еозинофільні. В окремих ділянках межа між ЧП і БП була сформована подвійним шаром дещо сплюснутих клітин ретикулярної тканини, крізь яку проникали відростки дендритних клітин. В центральній зоні селезінки, навколо великих судин (вени, артерії), зустрічаються скупчення макрофагів. Лімфоїдна тканина також розташовувалась в підкапсулярній зоні селезінки. Згідно морфометричних досліджень БП займала $15,36 \pm 5,71\%$ відносної площі селезінки. Співвідношення БП:ЧП становило 1:5,25, співвідношення опорно-скоротливого апарату до пульпи – 1:24,19. Відсутність в структурі лімфоїдних вузликів селезінки жаби озерної світлих центрів співпадає з дослідженнями Грушко М.П. (2010) [4]. Проте згідно даних Горышин Е.Н. (1985) відносна площа білої пульпи селезінки зазначається як 22% [3], за нашими даними – 15,36%, що пов'язано із породними і віковими відмінностями тварин; у працях Грушко М.П. (2010) частка білої пульпи складає 18%, що можна пояснити умовами утримання і вирощування.

В пульпі органу часто виявлялись численні судини, заповнені форменими елементами крові. Останні в ретикулярній тканині селезінки мали хаотичне розташування і знаходились на різних ступенях зрілості. Зрілі клітини часто знаходились поодинокі та невеликими групами з 2-3 клітин.

Особливістю пігментних клітин жаби озерної є значна кількість гемосидерину при незначній кількості меланіну. Типовим варіантом пігментної клітини є округла форма з круглим ядром і цитоплазмою, що заповнена численними дрібними гранулами. Клітини, котрі містять пігмент, в селезінці можуть знаходитись як в білій, так і в червоній пульпі. Такі пігментні клітини утворюють меланомacroфагальні скупчення (рис. 5).

Найчастіше меланомacroфагальні скупчення топографічно пов'язані з синусоїдами. Сумарна площа меланомacroфагальних скупчень на зрізах селезінки становить в середньому $1,82 \pm 0,42\%$.

Висновки

1. Селезінка статевозрілих жаб озерних має округлу, інколи сферичну або еліпсоїдну форму. Абсолютна маса селезінки становить $0,0770 \pm 0,0157$ г, відносна – $0,1170 \pm 0,0215\%$.

2. Мікроскопічна будова селезінки характеризується сформованою червоною, білою пульпами та опорно-скоротливим апаратом. Відносна площа білої пульпи селезінки становить $15,36 \pm 5,71\%$, опорно-скоротливого апарату – $3,97 \pm 1,90\%$, червоної

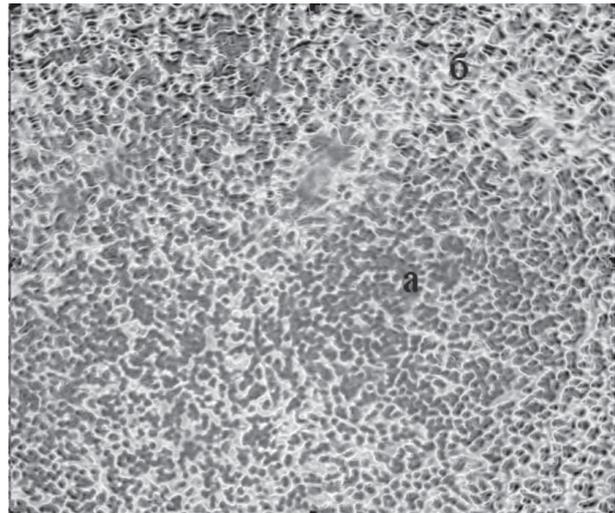


Рис. 4. Фрагмент мікроскопічної будови селезінки жаби озерної:
а – біла пульпа; б – червона пульпа.
Гематоксилін та еозин. Х56.

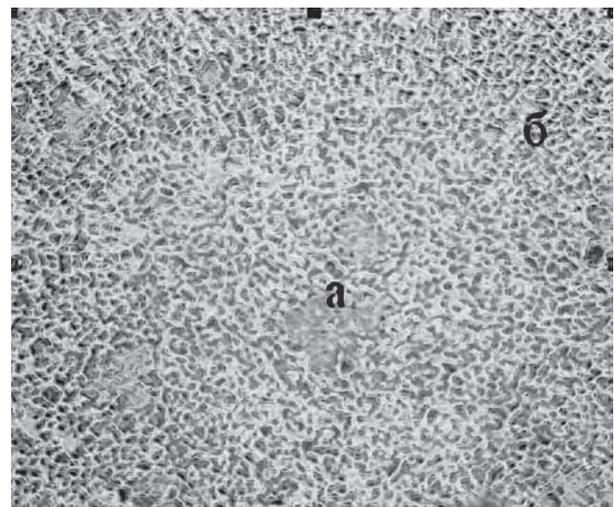


Рис. 5. Фрагмент мікроскопічної будови селезінки жаби озерної:
а – меланомacroфагальні скупчення; б – пульпа.
Гематоксилін та еозин. Х56.

пульпи – $80,67 \pm 6,53\%$. Співвідношення відносних площ опорно-скоротливого апарату та пульпи дорівнює 1:24,19.

3. Гістологічною особливістю селезінки жаби озерної є відсутність капсулярних трабекул, розвиненість лімфоїдної тканини, яка розташовується хаотично і представлена переважно лімфоїдними вузликами, в яких відсутні світлі центри. В пульпі пігментні клітини утворюють меланомacroфагальні скупчення.

Перспективи подальших досліджень вбачаємо у вивченні морфометричних особливостей селезінки жаби озерної з різних територій Житомирської області для визначення та розробки біомаркерів, що будуть використовуватися для моніторингу антропогенного впливу на біосистему.

Література

1. Акуленко Н.М. Пігментні клітини як характерний елемент гемопоетичної системи наземних пойкилотермних хребетних : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.08 "Зоологія" / Н.М. Акуленко. – К., 1998. – 25 с.
2. Горальський Л.П. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології: навч. посібник / Л.П. Горальський, В.Т. Хомич, О.І. Кононський. – Житомир: Полісся, 2005. – 288 с.
3. Горышина Е.Н. Кинетика обновления клеток крови и её сезонные изменения у травяной лягушки : автореф. дисс. на соискание науч. степени к. б. наук : спец. 03.00.11 «Эмбриология и гистология» / Е.Н. Горышина. – Л., 1985. – 27 с.
4. Грушко М.П. Клеточный состав кроветворных органов половозрелых самок представителей класса рыб, земноводных и пресмыкающихся : автореф. дисс. на соискание науч. степени доктора биол. наук : спец. 03.03.04 "Клеточная биология, цитология, гистология" / М.П. Грушко. – Астрахань, 2010. – 44 с.
5. Карапетян А.Ф. О некоторых морфофункциональных изменениях селезёнки озёрной лягушки *Rana ridibunda* при регенерации печени / А.Ф. Карапетян, К.А. Дживанян // Medline. Ru. Серия «Биология», 2007. – Т. 8. – № 2. – С. 56-66.
6. Патент на корисну модель № 100223 Україна. Спосіб фарбування гістологічних зрізів органів кровотворення для виявлення клітин крові при вивченні їх у нормі та при патології / Панікар І.І., Горальський Л.П., Дунаєвська О.Ф. [та ін.]; заявник і власник: Панікар І.І.; заявл. 05.03.2015; опубл. 10.07.2015, Бюл. № 13.
7. Спирина Е.В. Амфибии как биоиндикационная тест-система для экологической оценки водной среды обитания: автореф. дисс. на соискание науч. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.16 "Экология" / Е.В. Спирина. – Ульяновск, 2007. – 28 с.
8. Bhattacharjee A. Surface morphology of immunocompetent cells isolated from spleen of *Bufo himalayanus* (Gunther) / A. Bhattacharjee, K. Das, Kr. Sanjib // Indian J. of Experimental Biology (IJB). – 2008. – № 3. – P. 191-195.
9. Bricker N.K. Cytochemical and immunocytochemical characterization of blood cells and immunohistochemical analysis of spleen cells from 2 species of frog, *Rana* (*Aquarana*) *catesbeiana* and *Xenopus laevis* / Nelson K. Bricker, Rose E. Raskin, Christine L. Densmore // Veterinary Clinical Pathology. – 2012. – V. 41, Issue 3. – P. 353-361.
10. Conservation and divergence in the frog immunome: pyrosequencing and de novo assembly of immune tissue transcriptomes / Anna E. Savagea, Karen M. Kiemiec-Tyburczyk, Amy R. Ellisonb [et al.] // Gene. – 2014. – V. 542, Issue 2. – P. 98-108.
11. Manning M. Histological organization of the spleen: implication for immune functions in amphibians / M. Manning // Res. Immunol. – 1991. – V. 142. – № 4. – P. 355-359.

УДК 597.8:591.4/441**ОСОБЛИВОСТІ ГІСТОАРХІТЕКТОНІКИ СЕЛЕЗІНКИ ЖАБИ ОЗЕРНОЇ (*RANA RIDIBUNDA* P.)****Дунаєвська О. Ф.**

Резюме. Мікроскопічна будова селезінки жаб озерних характеризується сформованими червоною, білою пульпами та опорно-скоротливим апаратом. Відносна площа білої пульпи становить $15,36 \pm 5,71\%$, опорно-скоротливого апарату – $3,97 \pm 1,90\%$, червоної пульпи – $80,67 \pm 6,53\%$. Гістологічними особливостями є відсутність капсулярних трабекул, хаотичне розташування лімфоїдної тканини, відсутністю в лімфоїдних вузликах світлих центрів, утворення пігментними клітинами меланомакрофагальних скупчень.

Ключові слова: селезінка, морфологія, морфометрія, жаба озерна, капсула, трабекули, пульпа, лімфоїдний вузлик.

УДК 597.8:591.4/441**ОСОБЕННОСТИ ГИСТОАРХИТЕКТониКИ СЕЛЕЗЕНКИ ЛЯГУШКИ ОЗЕРНОЙ (*RANA RIDIBUNDA* P.)****Дунаевская О. Ф.**

Резюме. Микроскопическое строение селезёнки лягушки озёрной характеризуется сформованными красной, белой пульпами и опорно-сократительным аппаратом. Относительная площадь белой пульпы составляет $15,36 \pm 5,71\%$, опорно-сократительного аппарата – $3,97 \pm 1,90\%$, красной пульпы – $80,67 \pm 6,53\%$. Гистологическими особенностями является отсутствие капсулярных трабекул, хаотическое расположение лимфоидной ткани, отсутствие в лимфоидных фолликулах светлых центров, образование пигментными клетками меланомакрофагальных скоплений.

Ключевые слова: селезёнка, морфология, морфометрия, лягушка озёрная, капсула, трабекулы, пульпа, лимфоидный фолликул.

UDC 597.8:591.4/441**FEATURES OF THE HISTOLOGICAL ARCHITECTONICS OF THE LAKE FROG'S SPLEEN (*RANA RIDIBUNDA* P.)****Dunaievskia O. F.**

Abstract. Object and methods. For research were conducted selection of mature lake frog's spleen 2-3 years old of both sexes (ratio female: male was 1: 1). We determined the absolute, relative body mass. For histological studies pieces of material recorded in the 10-12 % refrigerated neutral formalin solution, with subsequent filling in paraffin. Paraffin sections were made at sled microtome MC-2, with thickness less than 10 microns. To study the morphology of cells and tissues used in light microscopy, hematoxylin and eosin staining by Van Ghisoni. Research results. Spleen frog lake is a rounded, sometimes spherical or ellipsoid body, dark red. Consistency is soft, elastic. Body length is $5,50 \pm 1,87$ mm; width – $4,12 \pm 1,72$ mm, height – $3,39 \pm 1,66$ mm. Absolute spleen weight is $0,0770 \pm 0,0157$ g, relative – $0,1170 \pm 0,0215\%$. Spleen are formed by stroma (capsule and trabeculae) and parenchyma (white and red pulp). The thickness of the capsule in different parts of the body are varies, most of it is developed at the gate and reaches a value is 66.4 mm, the average is $19,37 \pm 4,45$ mm. The capsular trabecu-

lae are available. The vascular trabeculae are found more, which was 8.74 times more than binding (89,73 % and 10,27 % respectively). The vascular trabeculae are most housed in the pulp (66,1 %), and in the gate area (20,2 %) and area under the capsule (13,7 %). The relative area of support-contractile apparatus was $3,97 \pm 1,90$ %. This is the largest share of its capsule (68,83 %) and only 31,17 % is the trabecular apparatus. The red pulp is consists of pulp bands and spaces venous sinuses, that filled with free blood elements. From the side of the pulp is well differ adventive cells (fibroblasts). The fibroblastic stroma is the basis of pulp strands. The proerythrocytes were proved which round shape with a rather large rounded bright nucleus; the basophilic erythroblast with basophilic cytoplasm and the nucleus dark; the polihromatofilni erythroblasts oval; the acidophilic erythroblasts with a dark core; the erythrocytes with rod-shaped core. Cells platelet number of platelets were presented at different stages of maturation. Neutrophilic series were consisted myeloblasts, promyelocytes, myelocytes, metamielocytes. Red pulp took $80,67 \pm 6,53$ % weight of the spleen. The white pulp had presented of the lymphoid nodules and strands in the direction of the pulp arteries. Its area had an irregular shape of different sizes. In lymphoid nodules center light was available. The large and small cells have differentiated clearly; the single core and multi macrophages that contained the inclusion hemosiderin due to destruction of red blood cells. A characteristic feature was dense arrangement of cells and fibers and the presence in it of dendritic macrophages. The lymphoid tissue is also located in the area under the capsule spleen. According morphometric studies, the white pulp took $15,36 \pm 5,71$ % relative area of the spleen. In the pulp are existing pigment cells. They feature is significant number of hemosiderin with small amounts of melanin pigment cells default option is a round shape with a round nucleus and cytoplasm, which is filled with numerous small granules. They are forming accumulation of macrophages.

Keywords: spleen, morphology, morphometry, lake frog`s, capsule, trabeculae, pulp, lymphoid follicles.

Рецензент – проф. Білаш С. М.

Стаття надійшла 19.03.2016 року