

Ю.С. Ших

к. б. н.

Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С.З. Гжицького

П.С. Сиса

проф. (Варшава, SGGW)

А.А. Гамота

к. вет. н.

О.В. Мисів

к. вет. н.

Ю.Я. Федик

к. вет. н.

Я.Б. Чолач

аспірант

Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С.З. Гжицького

ОСОБЛИВОСТІ ГІСТОЛОГІЧНОЇ ТА УЛЬТРАМІКРОСКОПІЧНОЇ БУДОВИ ПЕЧІНКИ ГУСЕЙ В ОНТОГЕНЕЗІ В УМОВАХ ПОСТІЙНОГО РАДІАЦІЙНОГО НАВАНТАЖЕННЯ МАЛИМИ ДОЗАМИ

Гістологічними та ультрамікроскопічними методами проведено дослідження печінки гусей у віковому аспекті, які утримувались у зоні підвищеної радіації. Встановлено, що дія радіації низьких рівнів суттєво впливає на структурні компоненти клітин печінки.

Постановка проблеми

В останні десятиріччя забруднення біосфери радіонуклідами на території України помітно зросло у зв'язку з аварією на Чорнобильській АЕС. Завдяки міграції довгоживучих радіонуклідів з пилом, переносом їх поверхневими і ґрунтовими водами, через рослини, корми, продукти харчування і господарської діяльності, це забруднення не лише підтримується, але й поширюється. Зважаючи на це, в останні роки значно розширилось коло досліджень, у т.ч. морфологічних, спрямованих, в першу чергу, на вивчення низьких рівнів радіації на організм тварин і людей, які проживають в районах постійного радіоактивного забруднення.

Аналіз останніх досліджень

Вивченню дії іонізуючої радіації на гістоморфологічні показники тканин і органів тварин, присвячені численні наукові роботи, значна кількість яких виконана на лабораторних тваринах з використанням штучних джерел

опромінення як зовнішньої, так і внутрішньої дії. Автори, які досліджували печінку ссавців при загальному і місцевому рентгенівському опроміненні в широкому діапазоні доз (від 25 до 2500 Р), відмічали її високу радіорезистентність. Суттєві радіаційні ефекти в печінці, такі як набухання ядер, конденсація хроматину під ядерною оболонкою, поява вакуолей в цитоплазмі виявлялись при застосуванні великих доз радіації. Поряд з цим є повідомлення про суттєві морфофункціональні зміни в клітинах тканин печінки при довготривалому низькодозованому радіаційному опроміненні [1, 2, 3, 4, 5]. Ультрамикроскопічними дослідженнями встановлено, що на клітинному рівні іонізуюче опромінення призводить до набряків клітин, вакуолізації її цитоплазми, деструктуризації мембранних компонентів, лізосом, мітохондрій [6, 7, 8]. В паренхімі органу під світловим мікроскопом спостерігали жирову і гідропічну вакуолізацію гепатоцитів, поліморфізм клітин, вогнищеві некрози поблизу центральних вен часточок, потовщення стінок центральних вен [9, 10, 11]. В доступній літературі є лише незначна кількість повідомлень про дію радіації на гістоморфологію тканин і органів птахів і майже відсутні дані про гусей.

Метою даної роботи було вивчення гістоморфології та ультраструктури печінки гусей в онтогенезі в умовах постійної дії низьких рівнів іонізуючої радіації. В даному випадку, на відміну від дії штучних джерел, дія радіації на організм викликана як зовнішнім (радіація ґрунтів, предметів догляду, будівельних конструкцій), так і внутрішнім опроміненням, яке виникало в результаті споживання корму, води, вдихання забрудненого радіонуклідами повітря. На думку деяких авторів така сумарна дія радіації має значно вищий вражаючий ефект [12].

Об'єкти та методика досліджень

Досліди проводили на гусях різного віку (24-денний ембріон, 1–10 днів, 1, 2, 5 місяців), які вирощувались в господарствах Дубровицького району Рівненської області (районна інкубаторна станція, с. Берестя, с. Залужжя), де рівень радіації становив 20–25 мкр/год і в дослідному господарстві НДІ сільськогосподарської радіології «Поліське» – Чорнобильська 30 км зона, рівень радіації 70–75 мкр/год. Контролем служили гуси, яких утримували в умовах, не забруднених радіонуклідами (Мостиська інкубаторна станція і с. Оброшине Львівської області) рівень радіації 7–8 мкр/год.

Шматочки печінки для гістоморфологічних досліджень фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну і фіксаторі Карнуа, заливали в парафін. Зрізи фарбували гематоксилін-еозином за загальноприйнятою методикою. Для електронно-мікроскопічних досліджень матеріал печінки фіксували в 2% розчині чотириокису осмію на 0.1 М фосфатному буфері (рН–7,36) протягом двох годин при температурі 0–2°C. Потім проводили промивання, зневоднювання і заливали в суміш епонарадїту за загальноприйнятою методикою. Ультратонкі зрізи, проконтрастовані в розчинах ураніл ацетату і цитрату свинцю, вивчали і фотографували за допомогою електронного мікроскопу УЕМВ-100К (Україна).

Результати досліджень

Проведені гістоморфологічні і ультрамікроскопічні дослідження свідчать, що в тканинах печінки наявні певні структурні відхилення, які не пов'язані із віковими особливостями становлення організму. Характер виявлених морфологічних змін в тканинах печінки не завжди однозначний і більшість структурних відхилень зумовлені постійним радіаційним впливом.

Гістоструктура печінки ембріонів гусей 24-добового віку в основному збережена. Виявляються слабо окреслені часточки, центральні вени і печінкові балки. Цитоплазма гепатоцитів профарбовується слабо, або зовсім не профарбовується. Ядра великі, округлої форми, з розкиданим у вигляді грудок хроматином. В окремих місцях спостерігається розпад ядерних оболонок і руйнування ядер (рис. 1).

Печінка гусенят 1–10-денного віку з Дубровицької зони представлена часточками, сформованими печінковими балками, гепатоцити яких мають вигляд пухирців. Ядра великі, округлої форми, з розпорошеним, у вигляді грудок, хроматином, однак в багатьох гепатоцитах ядра не виявлено. В ендотеліальних клітинах ядра часто в стані набряку, у них добре проглядаються грудки хроматину. Синусоїдальні капіляри наповнені форменими елементами крові, стінки міжчасточкових судин потовщені. У гусенят 10-денного віку з 30-км зони Чорнобиля в гепатоцитах спостерігали дрібну вакуолізацію цитоплазми, а в ряді венозних судин і синусоїдальних капілярів – гіперагрегати еритроцитів.

В печінці 1-місячних гусей в окремих часточках стінка центральних вен потовщена, іноді навколо них виявляються лише залишки паренхіми. В таких місцях балочна будова часточки дезорганізована, гепатоцити набряклі, з ядром відтиснутим на периферію. В інших місцях часточки, або в інших часточках гепатоцити нагадують пухирці, в яких добре збережена оболонка, а в цитоплазмі (на великому збільшенні світлового мікроскопа) проглядається по 2–3 вакуолі (рис. 2).

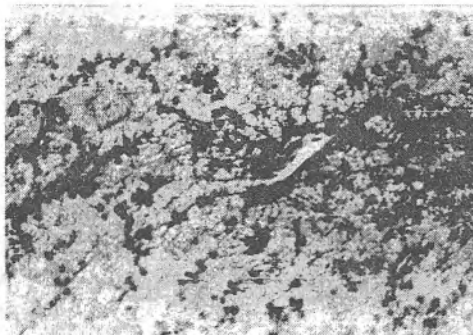


Рис. 1. Печінка 24-добового ембріона гусей. Центральна частина часточки. Радіаційна зона. Гематоксилін та еозин, $\times 200$

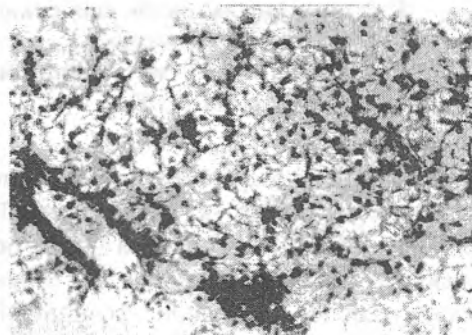


Рис. 2. Печінка 1-місячних гусенят. В окремих місцях гепатоцити нагадують пухирці. Збережена оболонка клітин. Гематоксилін та еозин, $\times 200$

Ядра гепатоцитів не завжди збережені. Виявлені ядра мають великі розміри і округлу форму з добре вираженою ядерною мембраною і розпорошеним, у вигляді численних грудок, хроматином. В печінці 1-місячних гусей Чорнобильської зони, поряд з описаними вище змінами у значній кількості гепатоцитів відмічали набряки і дрібнозернисту вакуолізацію цитоплазми. В ряді препаратів спостерігали клітинну інфільтрацію елементами крові, особливо, навколо центральних вен і в ділянках печінкових триад. Відмічено також потовщення стінки центральних вен за рахунок розростання волокнистих структур, а в окремих гепатоцитах – некробіотичні зміни (лізис, відсутність ядер) (рис. 3).

Морфологічні дослідження печінки гусей 2-місячного віку Дубровицької зони показали, що в часточках збережена балочна структура, синусоїдальні капіляри часто розширені, зі скупченням формених елементів крові. Цитоплазма гепатоцитів гомогенна, добре профарбовується, форма клітин відповідає класичній, границі між клітинами збережені, ядра округлої форми і добре виражені. В міжчасточковій сполучній тканині відмічена інфільтрація лімфоїдними елементами. Подібна картина спостерігалась і у 2-місячних гусей із 30-км зони Чорнобиля (рис. 4).

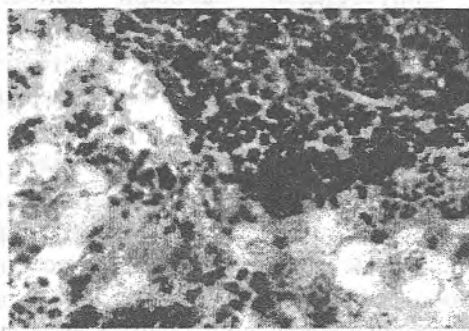


Рис. 3. Печінка 1-місячних гусенят. Клітинна інфільтрація, вакуольна дистрофія гепатоцитів. Радіаційна зона. Гематоксилін та еозин. × 100

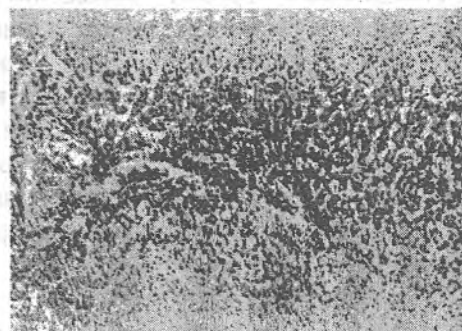


Рис. 4. Печінка гусей 2-місячного віку. Інфільтрація лімфоїдними елементами міжчасточкової сполучної тканини. Радіаційна зона. Гематоксилін та еозин. × 100

Більш виражені структурні зміни спостерігаються в печінці 5-місячних гусей. Балочна структура печінкової часточки в основному збережена, однак виявляються місця, де вона повністю або частково зруйнована. В часточках і навколо міжчасточкових судин наявна інфільтрація лімфоїдними елементами, синусоїдальні капіляри розширені, заповнені клітинами крові. Стінки капілярів нерідко зруйновані, міжчасточкова сполучна тканина з ознаками набрякання, виявляються вогнища дегенерації. Гепатоцити в балках вогнищево набряклі, їх цитоплазма дрібновакуолізована. В місцях лімфоїдної інфільтрації наявні залишки дезорганізованих гепатоцитів (рис. 5, 6).

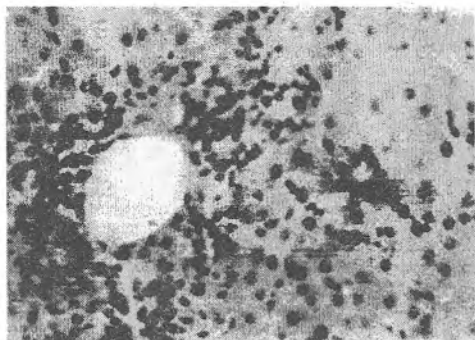


Рис. 5. Печінка гусей 5-місячного віку. Інфільтрація лімфоїдними елементами часточки, набухання гепатоцитів. Радіаційна зона. Гематоксилін та еозин. $\times 200$

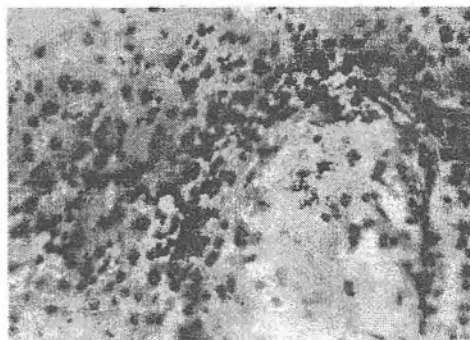


Рис. 6. Печінка гусей 5-місячного віку. Лімфоїдна інфільтрація і вогнищевий розпад еритроцитів. Радіаційна зона. Гематоксилін та еозин. $\times 400$

Вивчення ультратонких зрізів печінки гусей в онтогенезі за допомогою електронного мікроскопу показало, що у птахів, яких вирощували в умовах постійної дії низьких рівнів радіації в клітинних і неклітинних елементах органу виявляється ряд деструктивних змін.

В печінці гусей, починаючи вже з 24-го дня ембріонального розвитку до одноденного віку, деякі клітинні і неклітинні елементи органу піддані деструктивним змінам. Ультраструктура печінки цієї вікової групи гусей характеризувалась сформованими печінковими балками, що утворені гепатоцитами, між якими виявляються жовчні каналці. Балки своїми зовнішніми поверхнями прилягають до синусоїдних капілярів. Характерною особливістю цитоплазми гепатоцитів є значне насичення ліпопротеїдними краплями, аутофаголізосомами, залишковими тільцями, вакуолями та мієліноподібними структурами (рис. 7). У мітохондрії, хоча вони і насичують цитоплазму, кристи в ряді випадків розпушені. Ядра гепатоцитів вміщують одне-два, а іноді і більше ядерець. Синусоїдальний полюс цитоплазми гепатоцитів не завжди обмежений простором Діссе, а прямо контактує з плазмою крові капілярів. Однак в більшості місць стінка синусоїдних капілярів покрита ендотеліальними клітинами, які вміщують ядро великих розмірів, а цитоплазма насичена аутофаголізосомами. Просвіт синусоїдальних гемокапілярів наповнений плазмою крові з підвищеною електронною щільністю та еритроцитами, окремі із яких мають розпушені плазматичні мембрани, а також залишки клітинних органел.

В одноденному віці ультраструктура печінки характеризувалась гепатоцитами, які мали підвищену електронну щільність цитоплазми і вміщали великі ліпопротеїдні краплі (рис. 8). Жовчні каналці між гепатоцитами були розширені, а біліарний полюс цитоплазми клітини утворював велику кількість мікрворсинок. Спостерігали також гепатоцити із незначною електронною щільністю.

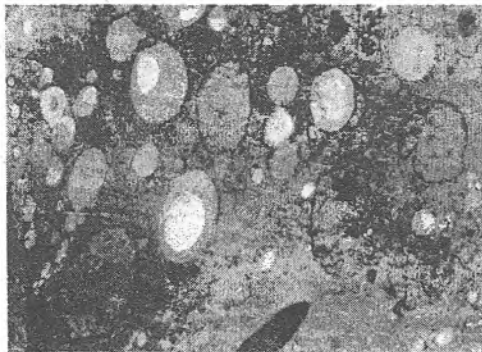


Рис. 7. Ультраструктура печінки 24-добового гусеняти. Заповнення гепатоцита гігантськими ліпопротеїдними краплями, аутофаголізосомами, залишковими тільцями, вакуолями. Радіаційна зона. × 3000

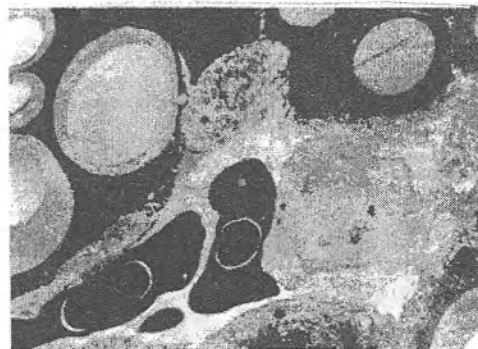


Рис. 8. Ультраструктура печінки 1-денного гусеняти. Гігантські ліпопротеїдні краплі. Радіаційна зона. × 5000

У «світлих» гепатоцитах ліпопротеїдні краплі були невеликих розмірів і вміщували в собі електроннощільні конгломерати, які характерні для аутофаголізосом і залишкових тілець. Гранулярний ендоплазматичний ретикулум у «світлих» клітинах розвинений слабо і частково вакуолізований. В гіалоплазмі в незначній кількості розміщені полісоми і рибосоми. Мітохондрії, що прилягають до комплексу Гольджі, мають розпушену зовнішню і внутрішню мембрани.

В гепатоцитах одномісячних гусенят виявляються ядра, насичені електроннощільними глибокими хроматину та дезорганізованим ядерцем. Цитоплазма цих клітин вміщує велику кількість електроннощільних аутофаголізосом невеликих розмірів і мітохондрій з пошкодженими кристами та просвітленим матриксом. Окремі скупчення крист проглядались, як преципітати та коагуляти. Гранулярний ендоплазматичний ретикулум дезорганізований. Стінка синусоїдних гемокапілярів місцями була перервана і утворювала сполучення із плазмою крові, де виявлялись скупчення пошкоджених органел. Ендотеліальні клітини часто своєю основною масою виступали в просвіт синусоїдального капіляру, а їх цитоплазма вміщувала велику кількість аутофаголізосом та мієлінових фігур (рис. 9).

У печінці гусенят двомісячного віку переважали гепатоцити із незначною електронною щільністю. Їх цитоплазма вміщувала велику кількість малих та гігантських аутофаголізосом. Плазматична мембрана у ряді клітин була розпушеною та десквамованою. Гепатоцити своїми білярними полюсами цитоплазми утворювали розширені жовчні каналці. Мітохондрії із дезорганізованими кристами локалізувались, як правило, недалеко від аутофаголізосом. Ядра гепатоцитів мали неправильні форми, невеликих розмірів ядерце, невелику кількість гетерохроматину, локалізованого на периферії ядра. Центральна частина ядра була просвітленою і вміщала

залишки хроматину. Синусоїдні капіляри мали дезорганізовану стінку, яка складалась із майже зруйнованих ендотеліальних клітин, ядра яких вміщали незначну кількість гетерохроматину. В цитоплазмі ендотеліоцитів виявлялись окремі мієліноподібні структури (рис. 10). Просвіти синусоїдальних гемокапілярів заповнені еритроцитами неправильної форми, еозинофільними гранулоцитами, обривками клітинних органел.

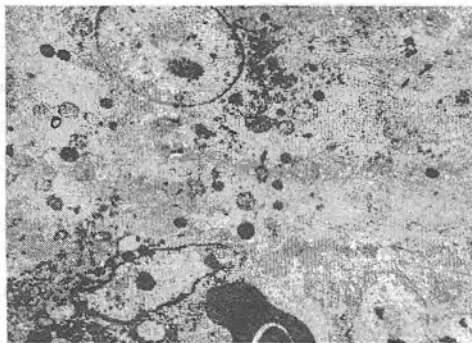


Рис. 9. Ультраструктура печінки 1-місячних гусенят. Дезорганізація синусоїдного капіляра. У просвіті Діссе обривки цитоплазматичних органел. Радіаційна зона. $\times 4000$

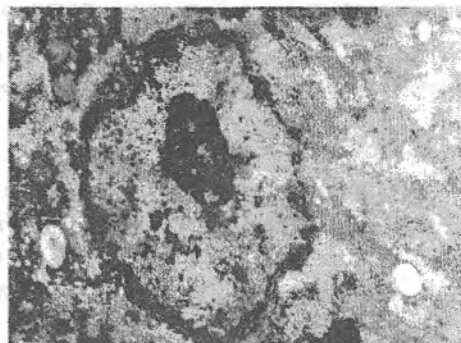


Рис. 10. Ультраструктура печінки 2-місячних гусенят. Мієлінові фігури в цитоплазмі гепатоцитів. Радіаційна зона. $\times 2400$

В 5-місячному віці ультраструктура печінки гусей характеризувалась гепатоцитами, які мали значну кількість аутофаголізосом. Основна маса мітохондрій гепатоцитів мала нечіткі контури і розпушені кристи. Простір Діссе звужений і дезорганізований, а цитоплазма синусоїдального полюсу деяких гепатоцитів лізована. В цитоплазмі виявляються розширені і дезорганізовані каналці агранулярної ендоплазматичної сітки. Ядра багатьох гепатоцитів неправильної форми, ядерця гіпертрофовані (рис. 11). У деяких гепатоцитів цитоплазма насичена великою кількістю гранул глікогену.

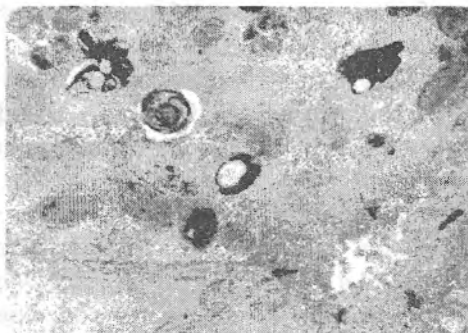


Рис. 11. Ультраструктура гепатоцита печінки 5-місячної гуски. Ядро неправильної форми, гіпертрофоване ядерце. Радіаційна зона. $\times 10000$

Висновки

Гістоморфологічними та ультрамікроскопічними дослідженнями встановлено, що вирощування гусей в умовах постійної дії низьких рівнів радіації приводить до виникнення деструктивних змін в клітинах печінки, які виявлялись у різних вікових групах птахів.

На перспективу плануємо провести гістохімічні дослідження на виявлення нуклеїнових кислот, білкових сполук, ліпідів та вуглеводів.

Література

1. *Москалев Ю.И. и др.* Основы радиационной биологии. – М., Наука, 1991. – С. 249–283.
2. *Токин И.В.* Проблемы радиационной медицины. – Л., 1974. – 256 с.
3. *Клемедсон К.Н., Нельсон Н.В.* Механизмы радиобиологического эффекта. / Пер. с англ., 1962, – С 82–87.
4. *Москалев Ю.И.* Радиобиология инкорпорированных радионуклидов. – М., Наука, 1989. – 356 с.
5. Морфологические исследования радиационного воздействия на экспериментальных животных в зоне аварии Чернобыльской АЭС / *В.Н. Ярыгин, Г.Г. Кругликов, А.Н. Мустафин и др.* // Тез. докл. I Всесоюзн. съезда радиобиологов. – М., 1989. – С. 560–561.
6. *Андрейченко С.В., Зражва Л.Е., Нурищенко Н.Е.* Общая характеристика ультраструктурных изменений гепатоцитов печени рыб из водоема-охладителя Чернобыльской АЭС. Тез. доклад. III Радиобиол. Съезда, Киев, 20-25 сентября 1993. Пушино – С. 18–19.
7. Морфологические и ультраструктурные изменения печени крыс / *В.Г. Пинчук, В.В. Никитченко, Б.Я. Гольдшмидт, Л.Н. Андрущак, Я.И. Серкис* // Радиобиология. – 1991. – Т. 31. – № 5. – С. 648–653.
8. Ультраструктурні зміни кровоносних мікросудин кори головного мозку ювенільних мишей під впливом малих доз іонізуючої радіації. / *В.І. Малюк, Т.П. Куфтирева, О.Д. Стеченко, І.В. Марченко* В кн.: Актуальні проблеми медицини, біологія, ветеринарії і сільського господарства. – Львів, 1996. – С. 70–71.
9. *Костеша Н.Я., Лопухова В.В.* Отдаленные эффекты у леченых собак перенесших острую лучевую болезнь. Морфологический анализ печени у разные сроки после облучения // Радиобиология. – 1991. – Т. 31. – № 4. – С. 491–494.
10. Действие ионизирующего облучения на морфологическое состояние внутренних органов овец / *Л.П. Горальський, М.С. Мандыгра, Л.П. Каминская, С.А. Белецкий, Р.А. Красников.* В кн.: «Общая эпизоотология: иммунологические, экологические и методологические проблемы». (Харьков 20-21 сентября 1995г) – Харьков, 1995. – С. 214–217.
11. *Серкіс Я.І.* Біологічна ефективність радіації в зоні аварії на ЧАЕС. Тез. докл. III Радиобиол. съезда, 1993. – С. 915–916.