

БОЛЕЗНИ ПРОМЫСЛОВЫХ ГИДРОБИОНТОВ

УДК 619:616.9:597.5

**ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ И СЕЛЕЗЕНКЕ РАДУЖНОЙ
ФОРЕЛИ (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) ПОД ВЛИЯНИЕМ ВИРУСА
ИНФЕКЦИОННОГО ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА (IPN)**

© 2013 г. Н.Н. Матвиенко

Институт рыбного хозяйства НААН Украины, г.Киев, 03164

Статья поступила в редакцию 06.03.2013 г.

Окончательный вариант получен 25.03.2013 г.

Выяснение механизмов адаптаций рыб к различным заболеваниям, определение нормы и патологии в современных условиях является важным научным аспектом. В статье представлена информация об патологических изменениях в органах и тканях радужной форели под влиянием вируса инфекционного панкреатического некроза. При развитии вирусной инфекции в первую очередь поражается печень, о чем свидетельствует смещение определенной функции клеток, сопровождающееся соответствующими сдвигами цитологических характеристик.

Ключевые слова: вирус, патология, лосось, гистология, органы, ткани

Инфекционный некроз поджелудочной железы – высококонтагиозная вирусная болезнь, поражающая молодь культивируемых лососевых рыб как пресноводной, так и морской аквакультуры. Возбудитель болезни — вирус, который относится к РНК-содержащим вирусам. В соответствии с современной систематикой этот вирус принадлежит к роду *Aquabirnavirus* семейства *Birnaviridae* (Ahne, Kelly, 1989). Воротами инфекции являются жабры, плавники, кожные покровы, откуда вирус разносится по всему организму. При этом происходит системное поражение внутренних органов (Головина, Бауэр, 2007). На сегодняшний момент наиболее полно изучена структура печени и кроветворных органов рыб разных экологических групп, как в норме, так и при воздействии патогенов (Козий, 2009). Результаты таких исследований имеют, как теоретическое значение для выяснения механизмов действия вируса, так и практическое с целью разработки методов профилактики заболеваний вирусного происхождения, представляющих наибольшую опасность для аквакультуры. В литературных источниках многие вопросы, касающиеся вируса инфекционного панкреатического некроза и его влияния на организм рыб, освещены недостаточно полно. Целью наших исследований было изучение изменений в тонких тканевых структурах и возникающие внутриклеточные перестройки в организме радужной форели под действием вируса инфекционного панкреатического некроза

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Для воспроизведения экспериментальной инфекции проводили биопробу. В эксперименте использовали радужную форель, выращенную на экспериментальной базе ИРГ НААН. Рыба тестируется на наличие инфекционных заболеваний. Опыты по искусственному заражению рыб проводились в лабораторных условиях ИРГ НААН в ваннах объемом 40 дм³

Температура воды – 9°C. Для биопробы сформировали две группы сеголеток радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) – опытную и контрольную – в количестве 5 экз. в каждой (вес рыбы 15 г). После первичной адаптации рыбы проводили ее

заражение вирусом панкреатического некроза (штамм AQUABIRNA VIRUS OF SALMON IMB V-6), методом внутривентральной инъекции. В качестве источника вируса использовали вирусосодержащую жидкость, зараженной вирусом IPN культуры клеток RTG-2, которая имела признаки ярко выраженного ЦПД (поражение 75-100% монослоя, титр вируса не ниже 10⁶ ТЦД 50/мл). Доза введения – от 0,05 мл до 1 мл. Контрольным рыбам вводили такое же количество культуральной жидкости, не зараженной вирусом культуры клеток. После заражения вели ежедневное наблюдение за рыбой. Ежедневно регистрировали отклонения в поведении рыбы, при развитии заболевания – клинические, патологоанатомические изменения и суточную смертность рыб. Материал для гистологических исследований отбирали от рыбы с ярко выраженными клиническими проявлениями на 10 день, после заражения. Материал для гистологического анализа отбирали в медиальной части печени и селезенки.

Камеральную обработку гистологических проб осуществляли в условиях лаборатории ихтиопатологии ИРХ НААН согласно рекомендациям и при помощи разработанного специального оборудования (Козий, 2009; Лесников, Чимарева, 1987).

Светооптические исследования клеток и тканей проводили в проходящем свете, с помощью оборудования «Violar-RU PZO» (Польша), галогенного осветителя «Linvatec-2» (США) номинальной мощностью 10-240 Вт.

Контрастирование микропрепаратов выполняли с помощью мультиформного фильтра «ФГПМ-2,5^X», а также корректирующего фильтра «MONOCHROM 2,5^X» (Россия).

Общие морфометрические исследования тканевых структур выполнены при помощи встроенного окуляр-микрометра. Коэффициент сжатия ткани при гистологической обработке составлял для селезенки 15%, а для печени 14%. Количество подсчитанных клеточных структур для каждой ткани у каждой рыбы составляло 100 клеток с каждого органа у каждой рыбы.

Расчет клеточных соотношений производили по формуле: $X = d^2/dk^2$. Расчет производился как соотношение площадей равновесных окружностей. Оценка диаметра клеток и ядер производилась как среднее между вертикальным и горизонтальным диаметром (Воробьев, 1960).

Микрофотографирование гистологических срезов выполняли цифровой камерой «Nikon D-60» (Австрия), с применением тринокулярной насадки 1,6^x (Россия) и компьютерного определителя экспозиции съемки «Minolta-EK» (Япония).

Корректирующая обработка полученных микроснимков была проведена с помощью компьютерных программ «Adobe Photochop CS 2», «Microsoft Office Picture Manager», «F S Viewer».

Биометрические исследования тканей выполнены согласно общепринятым методикам (Автандилов, 1980)

Полученный материал обрабатывали методом вариационной статистики с акцентом внимания на ошибки средних величин, а также при помощи пакета прикладных программ «Microsoft Excel».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гистологическими исследования органов отобранных от здоровой рыбы было установлено, что печень радужной форели снаружи покрыта тонкой соединительнотканной капсулой, от которой отходят перегородки, делящие орган на компартаменты. Долька печени образована балками, сформированными двумя рядами полигональных гепатоцитов, отходящих от центральной вены радиальными тяжами.

Как видно из рисунка 1, цитоплазма гепатоцитов умеренно ацидофильная, ориентированная преимущественно на периферии клеток.

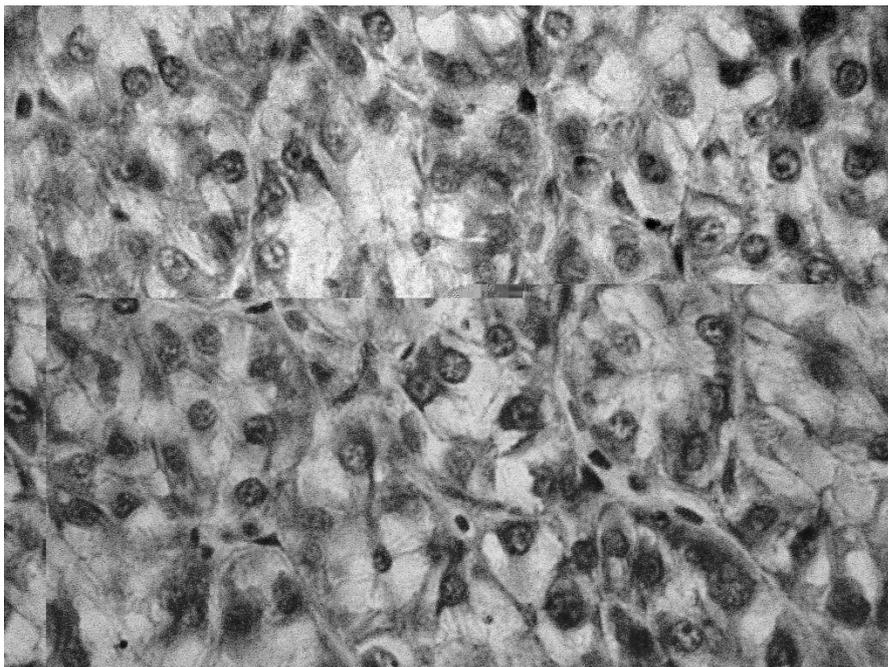


Рис. 1. Тонкая структура медиальной зоны печени радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*). Гематоксилин Эрлиха, фукселин Харта (в модификации). Ок.15×об.40; а) цитоплазма гепатоцитов; б) ядра гепатоцитов; в) синусоиды.

Fig. 1. Fine structure of the medial area of the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Hematoxylin Ehrlich fukselin Hart (as modified). Ok.15×ob.40; a) the cytoplasm of hepatocytes; b) hepatocyte nuclei; c) sinusoids.

В центральной области рисунка отчетливо заметно, что печеночные балки тесно перебиваются с синусоидными капиллярами, имеющими вид щелей между тяжами гепатоцитов. Ядра эндотелия синусоидов вытянутые, местами выступают в просвет сосуда, причем гепатоциты обращены одной стороной к синусоидам, другой – к желчным капиллярам. Клетки кажутся пустыми, их цитоплазма оптически однородная или содержит незначительное количество зернистых включений, что соответствует различным фазам липидной аккумуляции. Наряду с этим, обнаруживается неравномерность вакуолизации цитоплазмы, что, несомненно, свидетельствует о каскадном характере метаболических процессов. На рисунке показано также, что ядра гепатоцитов округлые, либо эллиптические, с отчетливо различимыми нуклеолами и глыбками гетерохроматина. Междольковые желчные протоки, вместе с разветвлениями воротной вены и печеночной артерии образуют между дольками триады.

На основании вышесказанного представляется очевидным, что внешний вид гепатоцитов и сосудистых элементов соответствует их функциональному назначению и отражает нормальное состояние органа.

При гистологическом анализе органов пораженных вирусом было экспериментально доказано, что при воздействии вирусной инфекции на организм происходит смещение определенной функции клеток, сопровождающееся соответствующими сдвигами цитологических характеристик (табл. 1).

Таблица 1. Динамика изменения цитоструктуры печени радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) в норме и патологии ($M \pm n$, $n=3$).

Table 1. Dynamics of changes in cytostructure of liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in normal and disease ($M \pm n$, $n = 3$).

Состояние органа	Показатели				
	диаметр клеток, мкм	диаметр ядра, мкм	ядерно-плазменное отношение	отношение диаметра ядрышко/ядро	количество внутриклеточных полостей, %
норма	10,16 \pm 2,41	4,86 \pm 0,98	0,48 \pm 0,71	0,44 \pm 0,35	9,60 \pm 3,25
патология	7,63 \pm 1,17**	3,40 \pm 0,05	0,44 \pm 0,43	0,47 \pm 0,50	1,37 \pm 0,77***

Примечание: ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Note: ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Анализируя данные представленной таблицы, можно заключить, что уменьшение диаметра клеток в 1,33 раза (что статистически достоверно) соответственно приводит к уменьшению диаметра их ядер (в 1,42 раза), что показывает изменение характера внутриклеточного метаболизма. Прежде всего это выражается в ощутимом снижении (в 7 раз), практически, затухании липостатической функции гепатоцитов.

Если учитывать, что в продолжение заболевания рыб содержание липидов и гликогена в пределах одной взятой зоны органа подвержено частым, высокоамплитудным колебаниям (см. табл. I), можно утвердительно констатировать, что неадекватность отдельных сторон метаболизма индуцирует последовательность делений, что является специфическим ответом ткани на состояние органа и организма в целом (рис. 2).

Отсутствие во многих ядрах нуклеол, а также специфический вид самих ядер свидетельствует о пребывании клеток в состоянии профазы, или же средней телофазы.

Говоря о гистологических особенностях печеночных клеток рыб, следует отметить, что к числу весьма специфических их качеств можно отнести редкое и одновременное присутствие в отдельных ядрах двух нуклеол. Данное явление, фиксируемое у радужной форели, не является свидетельством патологии.

Определенным образом, отклонения в метаболизме после реактивного периода адаптации к заболеванию могут вызывать появление различных аномалий васкулярного русла (рис. 3).

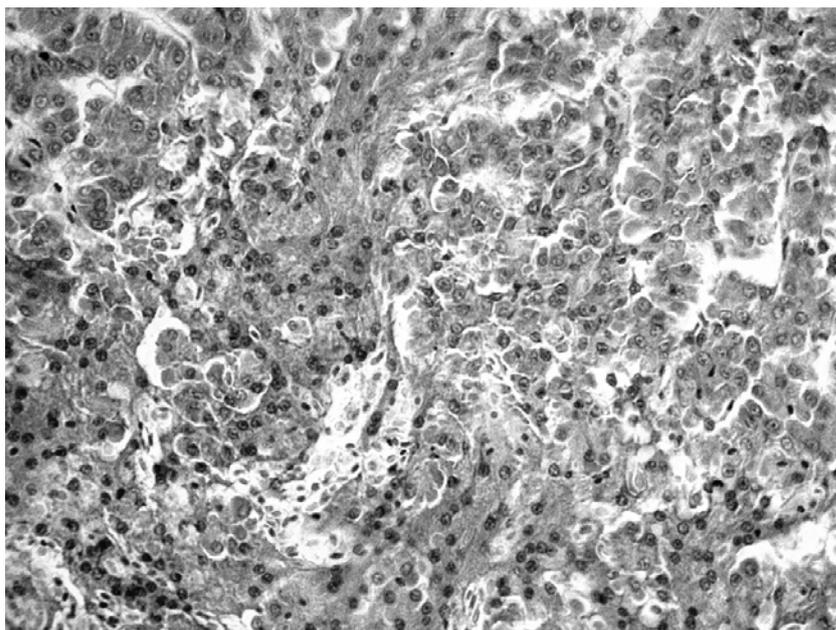


Рис. 2. Микроструктура медиальной зоны печени радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) при экспериментальном инфицировании вирусом IPN, Ок.10×об.20; а) гепатоциты, б) ядра гепатоцитов.

Fig. 2. Microstructure of the medial area of the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in an experimental infection of virus IPN. Cell proliferation. Hematoxylin Ehrlich, fukselin Hart (as modified). Ok.10×ob.20; a) hepatocytes, b) core hepatocytes.

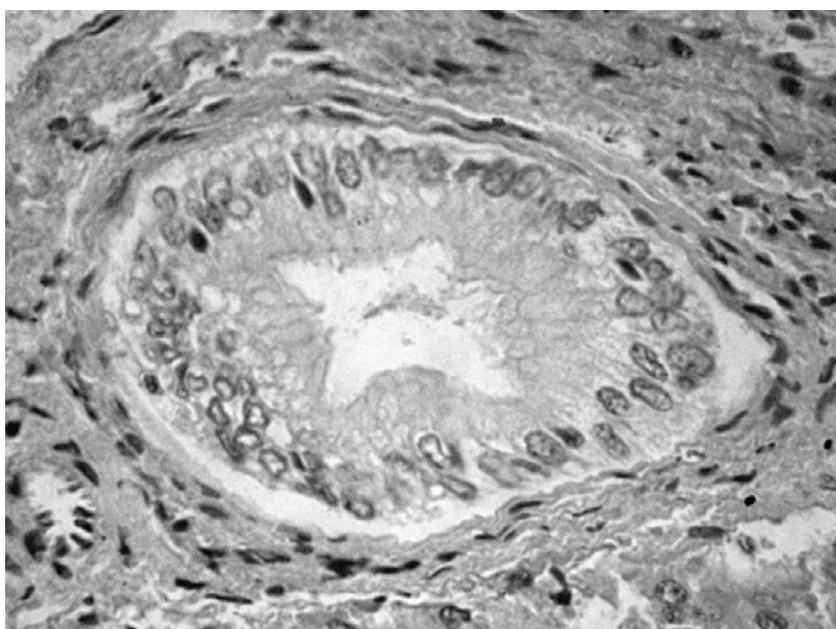


Рис. 3. Микроструктура желчного протока радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) при экспериментальном инфицировании вирусом IPN. Гематоксилин Эрлиха, фукселин Харта (в модификации). Иммерсия. Ок.15×об. 90. а) гепатоциты; б) эпителиоциты; с) просвет протока; д) интима; е) адвентиция.

Fig. 3. Microstructure of the bile duct of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in an experimental infection of virus IPN. Hematoxylin Ehrlich, fukselin Hart (as modified). Immersion. Ok.15×ob. 90. a) hepatocytes; b) epithelial cells; c) clearance flow; d) dating; e) adventitia.

Как показывает рисунок, в желчном протоке присутствуют следующие дегенеративные изменения:

1. контакт «якорных» элементов адвентиции и гепатоцитов местами нарушен или отсутствует;
2. при сохранении связи с адвентицией, медиа отслоена от интимы;
3. призматический эпителий интимы полностью утратил характерные признаки – горизонтальную анизоморфность, щеточную каемку, умеренную ацидофильность цитоплазмы;
4. эпителиоциты находятся в состоянии помутнения и набухания, в связи с чем просвет протока значительно сужен.

Примечательно, что микроаномалии, возникающие в паренхиме печени вследствие воздействия вирусной инфекции, не свойственны структурам селезенки

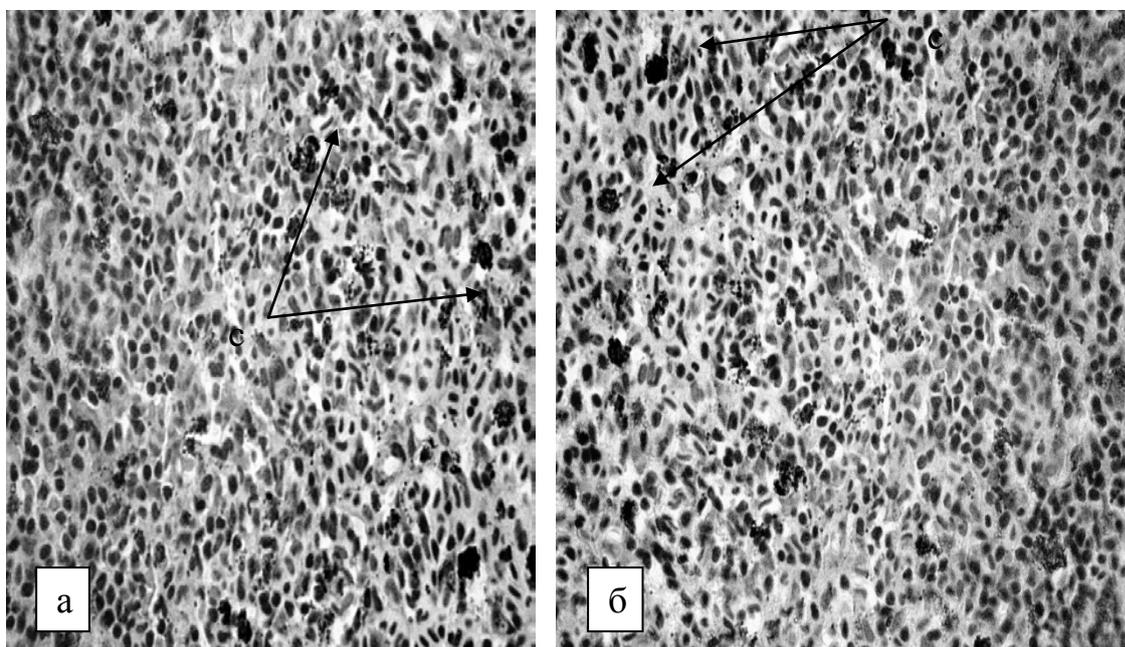


Рис. 4. Микроструктура селезенки радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*): а) интактная группа; б) экспериментальная группа. Гематоксилин Эрлиха, фукселин Харта (в модификации). Ок.10×об.20. с) мелано-макрофагиальные центры.

Fig. 4. Microstructure of the spleen of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a) an intact group, b) an experimental group. Hematoxylin Ehrlich, fukselin Hart (as modified). Ок.10×об.20. с) melano-makrofagialnye centers.

Как видно из рисунка 4, в состав органа входят волокна гладкой мышечной и соединительной ткани. Пульпа селезенки разделяется на белую и красную, причем белая пульпа, в виде аморфных лимфоидных узелков, расположена вокруг мелких кровеносных сосудов, красная – находится в промежутках между белой. Видно также, что выраженное развитие получает ретикулярный синцитий, или «гильзовый симпласт», располагающийся по ходу кровеносных сосудов – основную его массу составляют форменные элементы крови.

Примечательно, что у радужной форели разделение органа на дольки, содержащие красную и белую пульпу, прослеживается довольно неотчетливо, что, по-всей вероятности, может быть отнесено к категории частных видовых признаков.

На рисунке показано, что в состав селезенки рыб входят особые структуры – мелано-макрофагиальные центры, выполняющие иммунную функцию. Эти специфические образования содержат большое количество гемосидерина и меланина, расположение их в паренхиме органа носит беспорядочный характер.

Анализ содержания фрагментов рисунка «А» и «Б» показывает: микроанатомическая картина селезеночной паренхимы практически идентична. Исключением можно считать небольшой сдвиг в сторону увеличения количества моноцитов и местной отечности плоского эпителия капсулы органа.

ВЫВОДЫ

1. Гистологическими исследованиями были установлены патологические изменения в тканях печени радужной форели экспериментально инфицированной вирусом инфекционного панкреатического некроза. Эти изменения позволяют отнести печень к органу, который в первую очередь поражает вирус.

2. Изменения в тканях и клетках печени однозначно свидетельствует о негативном воздействии вирусной инфекции. При этом происходит уменьшение диаметра клеток в 1,33 раза, соответственно уменьшается диаметр их ядер (в 1,42 раза), изменяется характер внутриклеточного метаболизма, который приводит к затуханию липостатической функции гепатоцитов.

3. Селезенка не относится к категории «органов-мишеней», находящихся в диапазоне поражения вируса IPN из-за отсутствия в ее микроструктуре видимых патологических сдвигов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Автандилов Г.Г. Введение в количественную и гистологическую морфометрию. Москва: Медицина.1980. 216 с., С. 5-27.

Воробьев В.И. Структура дезоксирибонуклеотидного протеида // Метаболизм клеточного ядра и ядерных цитоплазматических соотношений. Тезисы докладов. Киев. 1960. С. 124-125.

Головина Н. А. , Бауер О. Н. . Ихтиопатология . Москва : Мир, 2007. 448 с.

Козий М.С. Оценка современного состояния гистологической техники и пути совершенствования изучения ихтиофауны. Херсон: Олди-плюс, 2009. 310 с.

Лесников В.А, Чимарева Т.В. Патолого-гистологический анализ состояния рыб при полевых и экспериментальных токсикологических исследованиях. В кн. Методы ихтиологических исследований. Москва: Наука, 1987. С. 80-81.

Ahne W., Kelly R.K. Factors affecting the transmission and outbreak of infectious pancreatic necrosis (IPN). In: Lillelund, K., Rosenthal, H. (Eds.), Fish Health Protection Strategies. Federal Ministry for Research and Technology, Hamburg/Bonn, 1989. P. 19-67.

**PATHOLOGICAL CHANGES IN ORGANS AND TISSUES OF RAINBOW TROUT
(ONCORHYNCHUS MYKISS) DUE TO VIRUS INFECTION PANCREATIC
NECROSIS (IPN)**

© 2013 y. N.N. Matvienko

Institute of Fisheries NAAS of Ukraine, Kiev

Elucidation of the mechanisms of adaptation of fish to disease, the definition of the norm and pathology in modern conditions is an important scientific aspect. The article provides information about pathological changes in the organs and tissues of rainbow trout under the influence of infectious pancreatic necrosis virus. With the development of viral infection in the first place affects the liver, as demonstrated shift of certain cell functions, accompanied by a corresponding shift of cytologic characteristics.

Key words: virus, pathology, salmon, histology, organs, tissues.