

# Przypadek włókniaka u karasia złocistego

JOLANTA KEMPTER, JACEK SADOWSKI, JOANNA SZULC\*,  
REMIGIUSZ PANICZ, MACIEJ KIEŁPIŃSKI

Zakład Akwakultury, \*Zakład Anatomii i Embriologii Ryb Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa ZUT,  
ul. K. Królewicza 4, 71-550 Szczecin

Kempter J., Sadowski J., Szulc J., Panicz R., Kiełpiński M.

## Mesenchymal fibroma in goldfish. A case study

### Summary

The aim of this research was to explain the etiology of pathological changes that have occurred on the body of goldfish (*Carassius auratus*). All samples were obtained from a fish farm that utilizes cooling water from the power station Dolna Odra. Since 2008 a few such cases have been sporadically observed there. An excised part of the tissue was analyzed based on histological assays and also by means of a transmission electron microscope (TEM). Histological staining showed that the tumor originated from the mesenchymal tissue with many blood vessels in its structure. The conducted research showed neither pathological changes caused by oncogenic viruses nor viral particles in the tumor tissue. Nevertheless, the most probable reason for these kind of changes is a combination of environmental factors and In Poland specific breeding conditions (warmed waters).

**Keywords:** Goldfish (*Carassius auratus*), histology, TEM, fibroma

Geneza nowotworów u ryb nie sięga daleko. Najczęściej wszelkiego rodzaju opisy i klasyfikacja zmian onkogennych jest tworzona na podstawie informacji czerpanych z patologii człowieka. W dziedzinie ichtiopatologii istnieją dane, które przemawiają za faktem uznawania czynników genetycznych, jako odpowiedzialnych za powstawanie zmian nowotworowych u ryb (8). Ponadto można przyjąć, że wpływ na uszkodzenia DNA wiąże się też z bezpośrednim środowiskiem życia ryb. Jurczyk i wsp. (9) wskazują na istnienie ścisłej zależności pomiędzy obecnością genotoksyn w środowisku wodnym i powstającymi wskutek tego zmianami nowotworowymi. Mogą one obejmować tylko jedno pokolenie (nowotwory) albo też prowadzić do różnorodnych zmian w populacji, które mogą być bardzo niekorzystne i prowadzić np. do redukcji płodności. Wymagają one jednakże dłuższej ekspozycji ryb na działanie danego czynnika toksycznego.

Wśród nowotworów u ryb szczególnie często występują łagodne zmiany pochodzenia mezenchymatycznego, takie jak: mięśniaki, kostniaki, tłuszczaki, włókniaki, chrzęstniaki i naczylniaki. Z kolei u ryb bardzo rzadkie są zmiany nowotworowe złośliwe, wywodzące się z włókien mięśniowych poprzecznie prążkowanych lub gładkich (11). Badania na temat nowotworów wywodzących się z tkanki łącznej u ryb potwierdzają ich fibroblastyczną strukturę oraz możliwość makroskopowego stwierdzenia nadmiernego rozrostu tkanki, która przenika do najbliższego otoczenia guza. Autorzy

doniesień sugerują skłonność włókniaków do wnikańia w tkankę podskórną u ryb oraz częstą ich lokalizację w mięśniach grzbietowych czy płetwach piersiowych (8). Andrews (2) na podstawie badań przeprowadzonych w Ameryce Północnej stwierdził, iż częstotliwość występowania tumorów u ryb pochodzących z rzek skażonych przemysłowo szacowana jest na 5% w porównaniu do 1% u ryb odłowionych z rzek określonych jako „czyste”. Sugeruje to istnienie korelacji pomiędzy obecnością związków z grupy kancerogennych a częstotliwością występowania zmian zwyrodnieniowych lub nowotworowych u ryb. Należy zaznaczyć, że do wspomnianej grupy zalicza się nie tylko czynniki egzogenne (fizyczne, chemiczne czy biologiczne), obecne w wodzie, ale także czynniki z grupy endogennych, których obecność wynika przykładowo z zakłócenia równowagi hormonalnej u ryb (8).

Celem badań było ustalenie etiologii rozrostowych zmian skórnych występujących u karasi złocistych hodowanych przemysłowo w sadzach zlokalizowanych w podgrzanej wodzie pochłodniczej.

### Materiał i metody

Karase złociste (*Carassius auratus*) stanowiące materiał do badań pochodziły z hodowli zlokalizowanej na wodach pochłodniczych elektrowni Dolna Odra. Ryby w wieku 3+ pochodziły ze sztucznego tarła przeprowadzonego wiosną 2006 r. w Rybackiej Stacji Doświadczalnej w Nowym Czarnowie. Po tarle wylęg przetransportowano do stawów ziem-

nych, w których podchowiwane były do września 2006 r. Następnie zostały przeniesione do sadzów hodowlanych zlokalizowanych na wodach kanału zrzutowego przy elektrowni. Pierwsze przypadki guzów, które pojawiły się na pojedynczych osobnikach zaobserwowano w 2008 r. Do 2009 r. w kilkutyśnej populacji karasi obserwowano kolejne przypadki ryb ze zmianami nowotworowymi, których wielkość w proporcji do ciała ryb przedstawiono na ryc. 1.

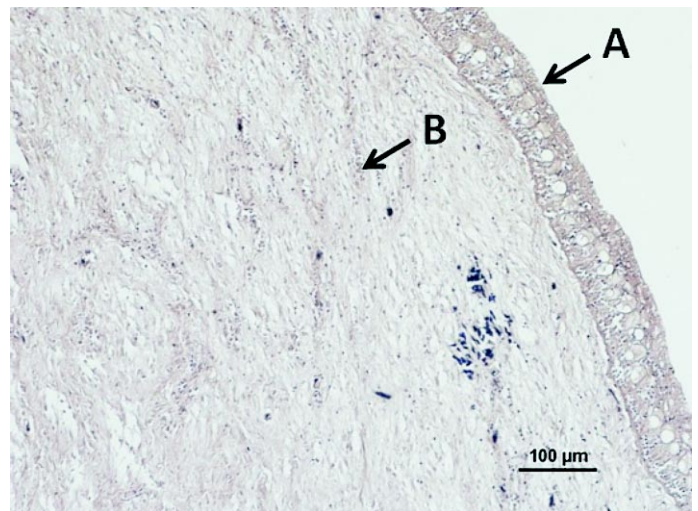
Do badań histologicznych pobrano wycinek tkanki pochodzący bezpośrednio z guza (cięcie w przekroju poprzecznym) i utrwalono w roztworze formaliny. Następnie próbki odwadniano w etanolu i prześwietlano w chloroformie. Tak przygotowane tkanki zatapiano w bloczki parafinowe. Gotowy preparat krojono przy użyciu mikrotomu rotacyjnego (HM 310) na skrawki o grubości 5  $\mu\text{m}$ . Do barwienia używano hematoksyliny i eozyny, stosując standardową metodykę dla tkanek miękkich (3, 4, 14). Zdjęcia preparatów histologicznych wykonywano przy użyciu mikroskopu Nikon ECLIPSE TE 2000-S, zaś dokumentację fotograficzną sporządzono stosując oprogramowanie NIS Elements. Dalszą analizę wykonano za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego. W tym celu materiał w postaci skrawków o grubości 1 mm utrwalano w 4°C (przez 4 h) poprzez umieszczenie ich w 2,5% aldehydzie glutarowym rozcieńczonym w 0,1 M buforze kakodylanowym (pH 7,2-7,4). Następnie w tych samych warunkach temperaturowych dwukrotnie (po 1 h) płukano skrawki w 0,1 M buforze kakodylanowym (pH 7,2-7,4) i utrwalano 1% roztworem czterotlenku osmu ( $\text{OsO}_4$ ) rozpuszczonym w 0,1 M buforze kakodylanu. Kolejne etapy polegały na odwadnianiu preparatów 2  $\times$  15 min. w szeregu acetonowym (30, 50, 70, 80 i 90%) oraz inkubacji przez 12 godzin w mieszaninie acetonu z żywicą epoksydową (1 : 1). Spolimeryzowane bloczki uzyskane po inkubacji materiału w mieszaninie żywic (Epon 812, DDSA, MNA, akcelerator BDMA) krojono ultramikrotomem na preparaty półcienkie o grubości około 1,5-2  $\mu\text{m}$ , po czym barwiono przez 5 min. w 0,1% błękitie toluidyny i oceniano w mikroskopie świetlnym. Wyselekcjonowane preparaty półcienkie poddano kolejnemu skrawaniu ultramikrotomem do grubości 50-80 nm, po czym nanoszono je na siatkę z błoną, którą z kolei barwiono w octanie uranylu i cytrynianie sodu Reynoldsa.

## Wyniki i omówienie

Analiza makroskopowa guzów pozwoliła określić ich wielkość (3  $\times$  2,5  $\times$  2,7 cm) i lokalizację (część grzbietowa za głową oraz linia naboczna). Powierzchnia obserwowanych guzów była gładka, struktura przypominała substancję galaretowatą o kolorze od blad różowego aż do sinoczerwonego (ryc. 1). Sekcja guzów wykazała połączenie ich z układem krwionośnym ryby. Z samej definicji nowotworu, jako zespołu komórek wymykających się spod kontroli organizmu jako całości, wynika, że widoczne na fotografiach guzy mają charakter tumorów. Jak podaje Jara (8), diagnoza nowotworu opiera się na badaniu histologicznym, w którym szczególną uwagę zwraca się na lokalizację nowotworu i jego charakter. W analizowanym przypadku guzy zlokalizowane były na zewnątrz, ale wyrastały z tkanki łącznej ryby, stąd według klasyfikacji Amlachera (1) zdiagnozowano je jako włókniak (*fibroma*). Ze wzglę-



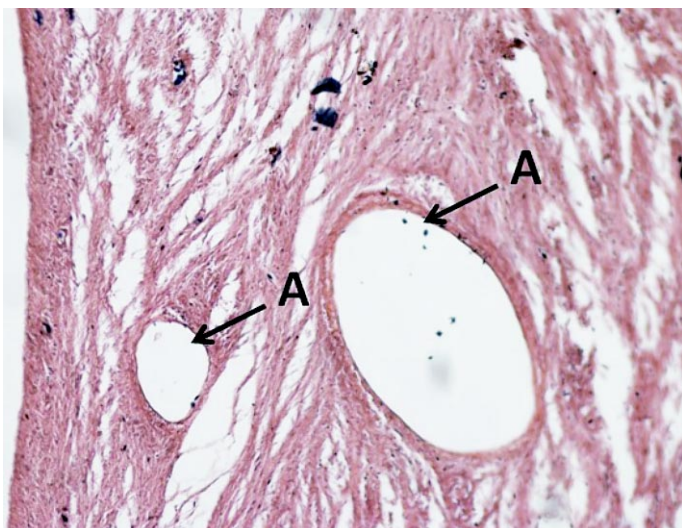
Ryc. 1. Guzy wywodzące się z tkanki łącznej u karasia złociwego (lokalizacja, proporcje wielkości w stosunku do ciała karasia)



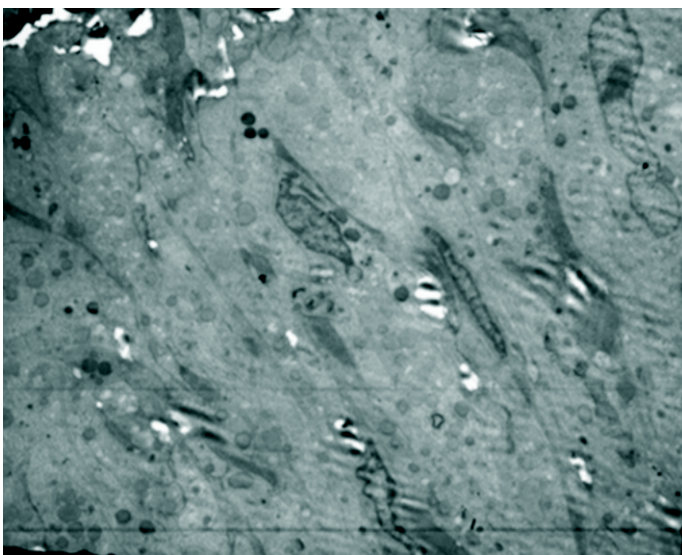
Ryc. 2. Przekrój przez skórę (A) i mięsz (B) guza

du na strukturę zewnętrzną (gładką i gąbczastą) określa się je mianem włókniaków miękkich (*fibroma molle*). W obrazie histologicznym guz okrywa skórą, pod którą znajduje się mięsz, zbudowany z tkanki łącznej i niewielkiej ilości znajdujących się pomiędzy nim komórek tłuszczowych (ryc. 2). Struktura guza jest nieuporządkowana. Widoczne są pasma włókien kolagenowych, sprężystych i siateczkowych, przebiegających wielokierunkowo i bezładnie. Duży udział fibrocytów decyduje o niskiej spistości struktury wewnętrznej guza. Widoczne są także charakterystyczne zmiany wsteczne (rozpad), występujące zwykle podczas powstawania torbieli oraz znaczne rozszerzone naczynia krwionośne (ryc. 3) (5).

Zmiany chorobowe występujące u ryb dotyczą zarówno osobników bytujących w środowisku naturalnym, jak i przetrzymywanych w warunkach hodowlanych. Zwrócić należy szczególną uwagę na fakt, iż występowanie chorób w systemach hodowlanych (obiekty sadzowe i baseny) jest stosunkowo częste, gdyż oprócz czynników biotycznych ważną rolę odgrywają nieko-



Ryc. 3. Rozszerzone naczynia krwionośne (A)



Ryc. 4. Włóknista i nieuporządkowana struktura guza pozabawiona cząstek wirusów (mikroskop elektronowy)

rzystne warunki środowiskowe, urazy mechaniczne czy nieodpowiednie żywienie. Zwiększony stopień zachowalności jest także tłumaczony zachwianiem ewolucyjnie wypracowanej stabilności ekologicznej występującej w układzie czynników chorobowych i ryb (11).

Objawy chorobowe (włókniak) opisane na podstawie przeprowadzonych badań obserwowane są stosunkowo rzadko u ryb w naturalnym środowisku. Znacznie częściej występują u ryb przetrzymywanych w akwariach bądź hodowanych w obiegach zamkniętych. Czynniki etiologiczne tych zmian są niezwykle trudne do zdiagnozowania. Generalnie uważa się, że najczęściej są one powodowane przez niektóre substancje chemiczne występujące w wodzie (np. detergenty, insektycydy), infekcje wirusowe, ucisk, drażnienie czy urazy mechaniczne (8, 12). Na podstawie analizy preparatów przy wykorzystaniu transmisyjnej mikroskopii elektronowej (ryc. 4) nie zaobserwowano zmian w strukturze badanych tkanek, które wskazywałyby na obecność wirusa lub występowania zmian poinfekcyjnych.

Za uznane powszechnie schorzenia nowotworowe wywołane przez czynniki wirusowe uznaje się, między innymi, hiperplazję nabłonka sandacza (*Sander lucioperca*), ospę płoci (*Rutilus rutilus*) wywołowaną wirusem z rodzaju *Herpes* lub brodawczycę węgorza atlantyckiego (*Anguilla vulgaris*) (7, 10, 13). U ryb akwariowych przykładem wirusa onkogenego jest *lymphocystivirus* (*Iridoviridae*) powodujący limfocystozę. Może on ulegać transmisji poziomej (poprzez ocieranie) na inne gatunki współbytujących ryb, głównie należących do rodzin pielęgnicowatych (*Cichlidae*) oraz guramiowatych (*Osphronemidae*) (2). U badanego gatunku karasia, pochodzącego z wód Turcji (6) zaobserwowano guzy zlokalizowane na części głowowej. Sekcja oraz badania mikroskopowe wskazują, że guz ten wywodzi się z mięśni gładkich.

Wykluczając obecność onkogennych wirusów, za najbardziej prawdopodobną przyczynę pojawienia się włókniaka uznaje się w tym przypadku połączenie czynników środowiskowych oraz warunków hodowlanych. Otarcia bądź urazy mechaniczne powstałe w wyniku prowadzonej selekcji początkowo mogły doprowadzić do uszkodzenia tkanki łącznej, co zwykle jest widoczne w postaci miejscowego, drobnego obrzęku. Osobniki mające uszkodzenia ciała tego typu, bytując w jednym zbiorniku, mogły, ocierając się (np. podczas karmienia), drażnić wrażliwe miejsce, powodując dalszy rozwój guza do postaci „owocu truskawki” bądź „różyczki kalafiora”. Włókniak powstały w ten sposób nie jest dziedziczony z pokolenia na pokolenie jako cecha nabyta (zgodnie z II prawem Lamarcka), w związku z czym nie powoduje znaczących gospodarczo strat w gospodarstwach hodowlanych. Ze względu na sporadyczność zmian nowotworowych u ryb, trudności w zdiagnozowaniu podłoża tych zmian oraz niewielkie straty są one przedmiotem badań nielicznych grup naukowców (2).

## Piśmiennictwo

1. Amlacher E.: Taschenbuch der Fischkrankheiten. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1986.
2. Andrews C., Exell A., Carrington N.: Manual of Fish Diseases. Firefly Books, Toronto 2003.
3. Bagiński S.: Technika mikroskopowa (Praktyczny poradnik mikroskopowy). PWN, Warszawa 1965.
4. Burck H. C.: Technika histologiczna. PZWL, Warszawa 1975.
5. Chodyniecki A.: Zarys patologii ogólnej ryb. PWN, Warszawa 1986.
6. Ciltas A., Hisar O.: Leiomyoma localized on the Head of goldfish (*Carassius auratus*). Turk. J. Anim. Sci. 2005, 29, 1077-1079.
7. Deys B. F.: Papillomas in the Atlantic eel *Anguilla vulgaris*. Nat. Cancer Inst. Monogr. 1969, 31, 187-194.
8. Jara Z., Chodyniecki A.: Ichtiopatologia. AR, Wrocław 1999.
9. Jurezyk Ł., Lewandowska R., Brzuzan P., Woźnicki P.: Zastosowane metody kometowej w wykrywaniu genotoksyczności substancji chemicznych u ryb. Kom. Ryb. 2003, 5, 20-23.
10. Mawdesley-Thomas L. E., Bucke D.: Fish pox in the roach (*Rutilus rutilus* L.). Vet. Rec. 1967, 81, 56.
11. Prost M.: Choroby ryb. PTNW, Lublin 1994.
12. Schäperclaus W.: Fish Diseases. CRC, Rotterdam 1992.
13. Walker R.: Lymphocystic warts and skin tumors of walleyed pike. Rennselaer Rev. Graduale Stud. 1958, 14, 1-5.
14. Zawistowski S.: Technika histologiczna, histologia oraz podstawy histopatologii. PZWL, Warszawa 1975.

Adres autora: dr Jolanta Kempter, ul. K. Królewicza 4, 71-550 Szczecin;  
e-mail: Jolanta.Kempter@zut.edu.pl