

# PATOLOGIA I TERAPIA

MICHAŁ STOSIK, WIESŁAW DEPTUŁA \*

## Trombocyty ryb

Wojewódzkie Laboratorium Weterynaryjne, ul. Olbrychta 1, 65-356 Zielona Góra,  
\* Katedra Mikrobiologii Wydziału Biologii i Nauk o Morzu Uniwersytetu Szczecińskiego,  
ul. Felczaka 3a, 71-417 Szczecin

Cechy morfologiczne i funkcje czynnościowe płytek krwi stosunkowo dobrze poznane zostały u zwierząt wyższych i ludzi. Biorą one udział w procesach fizjologicznych i patologicznych, a wśród nich między innymi w hemostazie, uszczelnianiu naczyń krwionośnych, zakrzepach, stanach zapalnych oraz procesach immunologicznych (4—7, 22—26, 31—33, 38, 45, 46 oraz cyt. 16, 20, 21). Udział trombocytów, zaliczanych obecnie do komórek układu immunologicznego (36), w reakcjach obronnych organizmów wyższych jest bardzo szeroki. Współdziałają one między innymi z neutrofilami, monocytami i makrofagami, białkami ostrej fazy, systemem komplementarnym, a także z immunoglobulinami (cyt. 5). Szczególną uwagę zwraca zdolność tych komórek do fagocytozy i rola, jaką spełniają one w mechanizmach obronnych organizmów (1, 5, 6, 22—25, 33 oraz cyt. 16, 21), głównie w schorzeniach zakaźnych (7, 16, 21).

Właściwości morfologiczne i cytochemiczne oraz funkcje czynnościowe trombocytów ryb poznane są w bardzo małym stopniu. Piśmiennictwo dotyczące znaczenia i roli tych komórek u ryb jest nader skromne i odnosi się przede wszystkim do ich właściwości morfologicznych i cytochemicznych.

### Metody izolowania trombocytów

Najczęściej wykorzystywaną metodą dla pozyskania odpowiednio licznej i „czystej” frakcji trombocytów jest wirowanie krwi nawarstwionej na hipertoniczny płyn o nazwie Percoll (2, 15, 34) lub stosowany tylko w warunkach doświadczalnych Gradisol (40). Gradient gęstości, w którym możliwe jest izolowanie płytek krwi zarówno z krwi pełnej (15, 37), jak i z zawiesiny komórek przednercza ryb kostnoszkieletowych (2, 34, 44), wynosi od 1,055 do 1,087. Płytki krwi tworzą w tej metodzie frakcję wspólną głównie z limfocytami (15, 34, 40, 44) oraz czasami z makrofagami/monocytami (2). Przydatność diagnostyczna trombocytów odzyskiwanych na Percollu lub Gradisolu jest jednak dyskusyjna. Metoda ta powoduje zmiany morfologiczne płytek krwi, które są prawdopodobnie następstwem uruchomienia procesów czynnościowych, między innymi agregacji i sekrecji, w odpowiedzi na niekorzystne (fizyczne i chemiczne) warunki środowiska (40).

Ostatnio opracowanym sposobem izolowania trombocytów karpia jest metoda dwukrotnego wirowania krwi rozcieńczonej w płynie ACD (Acid citrate dextrose) (40). Pozwala ona z jednej strony na oddzielenie i skumulowanie trombocytów w homologicznym osoczu, a więc w ich naturalnym środowisku, z drugiej zaś na uzyskanie populacji komórek pozbawionych zmian morfologicznych. Płyn ACD zapobiega bowiem syntezie tromboksanu przez trombocyty, a w związku z tym agregacji i sekrecji tych komórek oraz następstw z tym związanych (cyt. 22).

### Liczba trombocytów

Według wielu autorów (cyt. 11) trombocyty rozwijają się z „stem cell”. Najbardziej licznie, poza krwią, występują one w śledzionie, która może być również miejscem powstawania tych komórek u ryb (11).

Bez względu na łączną liczbę limfocytów i trombocytów u gładzicy (*Pleuronectes platessa*) mieści się w przedziale od 65 tys. do 125 tys. w 1 mm<sup>3</sup> (10), a ich stosunek liczbowy ma się jak 1 : 1,4. Podobne proporcje występują w limfie tego gatunku ryb, chociaż tutaj ich ogólna ilość stanowi około 20% liczby znajdującej się w krwiobieg (10). Trombocyty u sumika (*Ictalurus punctatus*) tworzą 51,4% populacji leukocytów (12), zaś u pstrąga tęczowego (*Salmo gairdneri*) (9) od 19,0 do 34,4%, co odpowiada 6,0 do 11,0 tys. komórek w 1 mm<sup>3</sup>. Liczba płytek krwi u karpia (*Cyprinus carpio*) wynosi według Rijkersa i wsp. (3) 32 tys. w 1 mm<sup>3</sup>, zaś według badań własnych (40) 29,72 (±6,83) tys. w 1 mm<sup>3</sup>.

Bez względu na liczbę trombocytów wśród ryb jednego gatunku lub między gatunkami, jak wynika z danych piśmiennictwa, jest bardzo zróżnicowana i zależy najprawdopodobniej od wielu czynników wewnętrznych i zewnętrznych. Badania przeprowadzone u łososia atlantyckiego (*Salmo salar*) (37) wykazały, że liczba trombocytów może wahać się od 9,9 tys. do 81,0 tys. w 1 mm<sup>3</sup>. Poddanie pstrąga tęczowego wpływowi jonów miedzi w dawkach wywołujących ostre zatrucie powoduje istotny statystycznie wzrost proporcji trombocytów do poziomu 60,3%, w porównaniu z 34,4% u ryb przebywających w normalnych warunkach środowiskowych (9). Zmiana ta nie korelowała jednak z bezwzględną liczbą płytek krwi, która w rzeczywistości zmalała. Natomiast chroniczne oddziaływanie jonów miedzi na organizm ryby wywołuje w odniesieniu do liczb bezwzględnych obraz odwrotny. W obu przypadkach nie były to różnice statystycznie istotne (9). Żadnych zmian w proporcji limfocytów i trombocytów nie powoduje u karpia inwazja *Trypanoplasma borreli* (39) oraz działająca immunosupresyjnie oksytetracyklina (35), a u sumika stres wywołany transportem (12).

Zdaniem niektórych autorów (9, 18, 29), mimo tak różniących się danych, stosunki ilościowe trombocytów odzwierciedlają nie tylko stan zdrowia ryb, ale także — pośrednio — niekorzystne zmiany zachodzące w środowisku wodnym. Wątpliwości budzi jednak duża rozpiętość liczby trombocytów, która — jak się wydaje — może wynikać między innymi z błędów metodycznych wskutek uznawania limfocytów, zwłaszcza małych, za płytki krwi. Według Temmink i Bayne (44) trombocyty pod wieloma względami podobne są do małych limfocytów. Różni je tylko, z morfologicznego punktu widzenia, obecność mikrokanalików, pseudopodiów oraz małych pęcherzyków ułożonych w centrum płytki.

### Formy morfologiczne trombocytów

Wśród trombocytów gładzicy, izolowanych bezstresowo z krwi, możliwe jest według Ellisa (10) rozróżnienie czterech form morfologicznych:

— forma spiczasta (spiked form) — najczęściej występująca w preparatach krwi, posiadająca owalne jądro i cytoplazmę rozciągniętą w jednym kierunku w postaci słupka lub kolca, barwiąca się na jasnoszaro-niebieski kolor,

— forma wrzecionowata (spindle form) — druga co do liczebności, która posiada cytoplazmę rozciągającą się w przeciwnych kierunkach od jądra,

— forma owalna (ovoid form) — występuje znacznie rzadziej niż formy poprzednie, jest kształtu wrzecionowo-podobnego, jednak zdecydowanie krótsza,

— forma jądrzasta (lone-nucleus) — postać najrzadziej spotykana, występuje właściwie tylko w krwi ryb poddanych stresowi, posiadająca jądro zagęszczone, czasami otoczone ciemnym, szaro-niebieskim rąbkciem cytoplazmy.

Opinie nt. występowania u ryb różnych form morfologicznych trombocytów nie są zgodne. Wyniki badań własnych (40) prowadzonych u karpia wykazały, że występują one w postaci pięciu różnych form morfologicznych. Natomiast Temmink i Bayne (44) u karpia, Morrow i Plusford (30) u rekina psiego (*Scyliorhinus canicula*) oraz Ferguson (13) u gładzicy, stwierdzili tylko jeden typ płytek krwi. Parish i wsp. (32) u rekina rozróżnili dwa typy tych komórek.

### Właściwości cytochemiczne

Bayne (2) wykazał, że trombocyty przednercza karpia są negatywne w barwieniu na peroksydazę i fosfatazę kwaśną. Natomiast Ellis (10) u gładzicy stwierdził, poza ujemną reakcją na peroksydazę, także podobny wynik barwienia czarnym sudanem B i fosfatazą zasadową. Jednocześnie wykazał w pojedynczych granulach cytoplazmy płytek krwi dodatnią reakcję PAS oraz, zwłaszcza w formach spiczastych, dodatnią reakcję na fosfatazę kwaśną. Ujemna reakcja w barwieniu czarnym sudanem B oraz peroksydazą występuje również w płytkach krwi troci (*Salmo trutta*) (3). Trombocyty tego gatunku ryb są poza tym, podobnie jak u karpia, PAS-ujemne (2, 3).

Hine i wsp. (19) w badaniach nad właściwościami cytochemicznymi leukocytów u węgorzy wykazali, że trombocyty u tych ryb różnią się od innych krwinek białych brakiem ANBE (L-naphthyl butyrate esterase) i AS-D (naphthol AS-D chloroacetate esterase). Stwierdzono także (19) heterogeniczność cytochemiczną trombocytów wśród węgorzy w obrębie jednego gatunku oraz między gatunkami węgorzy (*Anguilla australis*, *Anguilla dieffenbachii*, *Anguilla anguilla*), zwłaszcza w odniesieniu do fosfatazy kwaśnej i zasadowej oraz esterazy. Trombocyty *Anguilla australis* i *Anguilla dieffenbachii* (19, 27) oraz *Anguilla anguilla* (19) pozbawione są oprócz innych enzymów, także peroksydazy.

### Funkcja obronna trombocytów

Największe zdolności fagocytarne wśród elementów krwi u ryb mają przede wszystkim granulocyty obojętnochłonne i makrofagi/monocyty (cyt. 41). Według McKinney i wsp. (28) u niszczuka (*Lepisosteus platyrhincus*) komórkami o zdecydowanych właściwo-

ściach fagocytarnych są makrofagi, które zależnie od rodzaju antygeny uczestniczą w procesie pochłaniania w liczbie od 13,5 do 52%. Trombocyty w tych samych warunkach doświadczalnych były zaangażowane najwyżej w liczbie odpowiadającej 1,7% populacji tych komórek. Ponadto najwyższą aktywność fagocytarną przejawiały one wobec *Candida sp.* (28). Zdolności fagocytarne trombocytów u innych gatunków ryb wykazali także Ferguson (13) u gładzicy, Ferrii (14) u ariusa (*Arius maculatus* lub *Pimelodus maculatus*), Daimon i wsp. (8) u karpia oraz Yokoyama (47) u okonia amerykańskiego (*Perca flavescens*). Obserwacje te potwierdzają także wstępne wyniki badań własnych (40) prowadzonych u karpia.

Zdolność pochłaniania antygeny przez płytki krwi ryb nie dla wszystkich badaczy jest oczywista (2, 11, 20). Według Ellisa (11) funkcja ta jest mało prawdopodobna, a pochłanianie przypuszczalnie odbywa się na drodze mechanicznej, co ułatwia kontakt mikrokanalików cytoplazmy ze środowiskiem zewnętrznym. Dodać jednakże należy, że rola płytek krwi w procesie obronnym prawdopodobnie również u ryb jest bardzo istotna, już tylko ze względu na ich udział w łańcuchu przemian prostaglandyn — prostacyklin (5, 32, cyt. 41, 42), dla których to substancji, u zwierząt wyższych (16, 17, 20, 21) występują swoiste receptory na typowych komórkach obronnych. Również pamiętać trzeba, że tzw. droga prostaglandynowa u zwierząt i ludzi jest ściśle skorelowana np. z produkcją IL-1, substancją oddziaływującą na limfocyty T i pośrednio na limfocyty B oraz produkty limfocytów T i B (17, 33). Według Walewskiej (cyt. 33) płytki krwi uczestniczą w reakcjach immunologicznych jako „niewinni świadkowie” za pośrednictwem nie w pełni jeszcze określonych receptorów błonowych, które najprawdopodobniej czekają na swoje odkrycie, w naszym przekonaniu także na trombocytach ryb. Zdaniem wielu autorów (cyt. 16) u ludzi „chwytnikami” tymi są najprawdopodobniej receptory, dla Fc Ig, endotoksyn bakteryjnych, dopełniacza oraz prostaglandyn.

### Uwagi końcowe

Właściwości morfologiczne i cytochemiczne trombocytów krwi ryb, jak dowodzi tego piśmiennictwo, rzeczywiście poznane są w bardzo małym stopniu. Również słabo poznane są ich funkcje czynnościowe, zwłaszcza obronne, mimo stosunkowo licznych badań, głównie w ostatnich latach, z zakresu immunologii ryb (cyt. 41, 42, 43). Funkcje obronne trombocytów u ryb dotychczas nie były przedmiotem szczegółowych badań. Wstępne wyniki badań własnych (40) nad płytkami krwi u karpia pozwalają przypuszczać, że aktywność fagocytarna tych komórek może okazać się jedną z silniejszych barier obronnych przed infekcją u ryb.

Trombocyty ryb wymagają zatem bardzo wnikliwych badań prowadzących do gruntownego poznania ich właściwości i roli, jaką spełniają w organizmie tych zwierząt.

### Piśmiennictwo

1. Arroa D. K., Ajello L., Mukerji K. G.: Handbook of Applied Mycology, Marcel Dekker, Inc. New York 1991.
2. Bayne Ch.: Vet. Immunol. Immunopathol. 12, 141, 1986.
3. Blaxhall P. C., Daisley K. W.: J. Fish Biol. 5, 771, 1973.
4. Buczyński A., Dziedzicak-Buczyńska M., Kędziera H., Kędziera J., Buchalik J., Tkaczewski W.: Pol. Tyg. lek. 23, 548, 1989.
5. Burton S. A., Honor D. J.: The Compendium, Small Animal 13, 1129, 1991.
6. Cawley J. C.: Hematology. William Heinemann Med. Books Ltd, London 1984.
7. Clinkenbeard K. D., Upton M. L.: Am. J. vet. Res. 52, 453, 1991.

8. Daimon T., Mizuhira V., Takahashi I., Uchida K.: Cell Tissue Res. 203, 335, 1979.
9. Dick P. T., Dixon D. G.: J. Fish Biol. 26, 475, 1985.
10. Ellis A. E.: J. Fish Biol. 8, 143, 1976.
11. Ellis A. E.: J. Fish Biol. 11, 453, 1977.
12. Ellsaesser C. F., Clem L. W.: J. Fish Biol. 28, 511, 1986.
13. Ferguson H. W.: J. Fish Biol. 8, 139, 1976.
14. Ferri S.: Gegenbaurs morph. Jb. 126, 168, 1982.
15. Finco-Kent D., Thune R. L.: J. Fish Biol. 31 (Supp. A), 41, 1987.
16. Górski J.: Zaburzenia funkcji płytki krwi oraz zmiany w glikoproteinach płytkowych u pacjentów z chorobami mieloproliferacyjnymi i chłoniakami złośliwymi. Praca hab., AM Gdańsk, 1987.
17. Halliwell R. E. W., Gorman N. T.: Veterinary Clinical Immunology W. B. Saunders Comp., 1989.
18. Hickey C. R.: N. Y. Fish Game J. 23, 170, 1976.
19. Hine P. M., Wain J. M., Boustaed N. C., Dunlop D. M.: Fish Biol. 29, 721, 1986.
20. Komarnicki M.: Zaburzenia agregacji krwinek płytkowych u chorych z przewlekłą mocznicą. Praca hab., AM Poznań 1987.
21. Kotelba-Witkowska B.: Krwinki płytkowe. PZWL, Warszawa 1984.
22. Kemona H.: Udział płytek krwi w odporności nieswoistej, badania doświadczalne i kliniczne. Praca hab., AM Białystok, 1987.
23. Kemona H.: Diagn. Lab. 2, 75, 1989.
24. Kemona H., Wysocka J., Mantur M., Prokopowicz J.: Diag. Lab. 2, 201, 1989.
25. Ledwożyna A., Stolarczyk H.: Acta vet. hung. 39, 197, 1991.
26. Maślanka K.: Immunologia Pol. 14, 5, 1991.
27. McArthur C. P.: N. Z. J. Zool. 4, 5, 1977.
28. McKinney E. Ch., Smith S. B., Haines H. G.: J. Reticuloendoth. Soc. 21, 89, 1977.
29. McLeay D. L., Gordon M. R.: J. Fish Res. Bd Can. 34, 2164, 1977.
30. Morrow W. J. W., Pulsford A.: J. Fish Biol. 17, 461, 1980.
31. Myśliwiec M., Myśliwiec B.: Pol. Tyg. lek. 23, 681, 1982.
32. Parish N., Wrathmell A., Harris J. E.: Phagocytic Cells in the Dogfish (Scylliorhinus canicula L.), w: Fish Immunology, red. M. J. Manning, M. F. Tatner, Academic Press, London 1985, s. 71.
33. Pawełski S.: Diagnostyka laboratoryjna w hematologii, PZWL, Warszawa 1990.
34. Plytycz B., Flory C. M., Galvan I., Bayne Ch. J.: Dev. Comp. Immunol. 13, 217, 1989.
35. Rijkers G. T., Teunissen A. G., van Oosterom R., van Muiswinkel W. B.: Aquaculture 19, 177, 1987.
36. Roitt I., Brostoff J., Male D.: Immunology. Grower Med. Publ. London, New York, 1989.
37. Rooney S. C., Roberts F. L., Dexter R. P.: Progressive Fish-culturist. 34, 152, 1972.
38. Safai-Kutti S.: Studies on platelet kinetic, immunology and release reaction. Praca dokt., Univ. Göteborg 1981.
39. Steinhagen D., Kruse P., Körting W.: J. Fish Dis. 13, 157, 1990.
40. Stosik M.: Morfologia i aktywność fagocytarna trombocytów karpia, *Cyprinus carpio* L. Medycyna Wet. 1992, (oddana do druku).
41. Stosik M., Deptuła W.: Post. Mikrobiol. 29, 91, 1990.
42. Stosik M., Deptuła W.: Post. Mikrobiol. 30, 209, 1991.
43. Stosik M., Deptuła W.: Narządy limfoidalne ryb. Medycyna Wet. 1992 (oddana do druku).
44. Temmink J. H. M., Bayne C. J.: Dev. Comp. Immunol. 11, 125, 1987.
45. Wachowicz B., Krajewski T.: Acta hem. pol. 17, 27, 1986.
46. Xu F. N., Shen W. P., Xi Q. K. Y.: Animal Husbandry Vet. Med. 17, 244, 1985.
47. Yokoyama H. O.: Wildl. Dis. 6, 1, 1960.

Adres autora: dr Michał Stosik, ul. Ogrodowa 1a/4, 66-600 Krosno Odrzańskie

ADAM STEC, ELIGIUSZ MADEJ, ANDRZEJ MILCZAK

## Wpływ Coferanu produkcji ZPB Biowet na rozwój niedokrwistości, przyrosty masy ciała i zdrowotność prosiąt w okresie postnatalnym

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR,  
ul. Gięboka 30b, 20-612 Lublin

### Summary

#### The influence of Coferan (ZPB Biowet) on the course of anaemia, body weight gains and healthy state of piglets at a postnatal period

Clinical and laboratory examinations were done on the effect of Coferan, a preparate containing iron dextran, copper chloride and vitamin B12, on body weight gains, healthy state and anaemia in piglets at a postnatal period. Piglets ageing from 3 days into 5 weeks were injected im or sc 2–3 ml of the preparate. Coferan when injected into 3–9 days old piglets protected them against anaemia and increased all the parameters of the red blood cell system. Irrespectively of the age of injected piglets Coferan increased body weight gains, decreased incidence of diarrhoea and losses of piglets at a postnatal period.

Jedną z głównych przyczyn niedokrwistości u prosiąt jest niedobór żelaza, a o jego prawidłowym przyswajaniu, poza odpowiednią ilością w karmie, decydują również inne uwarunkowania i związki mineralne, w tym odpowiedni poziom miedzi w organizmie (1, 2, 8, 11, 15, 20). Uzupełnienie niedoborów żelaza, powszechnie występujących u prosiąt z anemią, zwiększa efektywność produkcji i przyrostyienne o 7–13%, wykorzystanie paszy o 6–9% oraz obniża procent zachorowań i padnięć z 45 do 6% (17).

W Polsce, poza preparatami Ferrodex-Polfa, Suiferovit-Biovet, Bioferron-Biovet, szeroko stosowanymi w uzupełnianiu poziomu żelaza i zapobieganiu anemii u nowo narodzonych zwierząt, brak jest innych alternatywnych specyfików do stosowania parenteralnego, co wydaje się być bardzo niekorzystne w stosunku do innych krajów, które posiadają szeroką gamę tego typu

preparatów (7). Pomimo, że Ferrodex, jak i pozostałe preparaty odznaczają się korzystnymi właściwościami (2, 3, 7), poszukuje się nadal nowych dróg i preparatów, skuteczniejszych, bardziej bezpiecznych i o szerszym spektrum działania (6, 16).

Celem podjętych badań była ocena nowego preparatu Coferan produkcji ZPB Biowet, będącego połączeniem dextranu żelaza, chlorku miedziowego i witaminy B<sub>12</sub>, w zapobieganiu niedokrwistości, a pośrednio jego wpływu na przyrosty masy ciała i stan zdrowia prosiąt. Postanowiono również porównać wpływ stosowania preparatu żelazowego Ferrodex-vet Polfa z wynikami iniekcji Coferanu u prosiąt w okresie rozwoju postnatalnego.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono ogółem na 144 prosiątach rasy wbp z 13 miotów, pochodzących z 5 gospodarstw średnio- i wielkotowarowych.

W gospodarstwie „S” preparat zastosowano w dwóch miotach (porody 6 i 7 stycznia) liczących ogółem 22 prosięta. Każdy miot podzielono na dwie grupy, kontrolną i doświadczalną, a prosięta w ww. grupach nie różniły się istotnie pod względem masy ciała i kondycji. Prosięta grupy doświadczalnej w 3 dniu życia otrzymywały po 2 ml Coferanu, połowa zwierząt podskórnie, a druga połowa domięśniowo. U wszystkich prosiąt przed podaniem preparatu dokonano pomiaru masy ciała i pobrano krew do badań hematologicznych i biochemicznych. Następne kontrole masy ciała i pobrania krwi wykonywano w 7 i 14 dniu po podaniu preparatu. W całym okresie badań prowadzono dokładną obserwację kliniczną. Maciory żywione były paszą treściwą PT-2 w ilości od 3 do 5 kg/szt./dzień oraz miały wolny dostęp do wody.

W gospodarstwach „K” i „Kr” badania przeprowadzono łącznie na 98 prosiątach z 10 miotów (wyproszenia od 9 do 21 stycznia). Każdy miot dzielono na dwie grupy, kontrolną i doświadczalną, według wcześniej podanych zasad.