

MICHAŁ STOSIK

Morfologia i aktywność fagocytarna trombocytów karpia, *Cyprinus carpio* L.

Wojewódzkie Laboratorium Weterynaryjne, ul. Olbrychta 1, 65-356 Zielona Góra

Summary

Morphology and phagocytic activity of carp's thrombocytes

The purpose of the work was to adapt the methods of thrombocytes isolation from the peripheral blood, their absolute number determination and an attempt to evaluate their phagocytic activity. The elaborated technique of thrombocytes isolation in the ACD liquid enabled to separate in homologous plasma approximately 80 per cent of those cells, i.e. 23 850 in 1 mm³ of the plasma (± 7160). The above method allowed to preserve, like in the full blood, proper conditions for thrombocytes. It was found that the number of thrombocytes from healthy fish was $29\,720 \pm 6830$ in one mm³ and the value of phagocytic index and per cent of phagocytic cells were 1.48 ± 0.38 and 18.83 ± 4.13 , respectively. There was found 5 various forms of thrombocytes differing with the shape of the cell and nucleus, and the distribution and colour of the cytoplasm.

Właściwości morfologiczne i cytochemiczne oraz funkcje czynnościowe, zwłaszcza obronne, trombocytów ryb poznane są w niewielkim stopniu. Piśmiennictwo dotyczące tych zagadnień jest skromne i odnosi się przede wszystkim do właściwości morfologicznych i cytochemicznych tych komórek (cyt. 22). Badania przeprowadzone u ludzi i zwierząt wyższych wykazały, że ich trombocyty biorą udział w procesach fizjologicznych i patologicznych, a wśród nich także w stanach zapalnych i reakcjach immunologicznych (4, 10, 11, 16, 20, 24). Współdziałają one między innymi z granulocytami obojętnochłonnymi, monocytami i makrofagami, a także z białkami ostrej fazy oraz systemem dopełniacza (cyt. 5) i zalicza się je do komórek układu immunologicznego (19). Szczególne zainteresowanie wzbudza zdolność trombocytów do fagocytozy i rola, jaką spełniają te komórki w mechanizmach obronnych organizmu (1, 5, 8, 11, 12, 14), głównie w schorzeniach zakaźnych (6).

Badania własne miały na celu adaptowanie metody izolowania trombocytów z krwi obwodowej karpia, określenia ich liczby bezwzględnej i cech morfologicznych, a także przeprowadzenie próby oceny aktywności fagocytarnej tych komórek wobec wzorcowego szczepu bakterii.

Material i metody

Badania przeprowadzono na karpkach pochodzących ze środowiska spełniającego wszelkie wymagania hodowlane. Obserwacje objęły 111 ryb o średniej masie ciała 700 g, dostarczonych w 5 partiach (grupach). W czasie badań ryb nie stwierdzono u nich chorób infekcyjnych i inwazyjnych, co pozwalało uznać je za klinicznie zdrowe.

Badania hematologiczne obejmowały:

a) izolację trombocytów z krwi obwodowej i uzyskanie osocza bogatopłytkowego — metodą według Mantur i wsp. (15) — krew pobraną na antykoagulant z dodatkiem acid citrate dextrose (ACD) poddano dwukrotnemu wirowaniu przy 2000 rpm. Po pierwszym wirowaniu osocze zawierające trombocyty odciągano i po przeniesieniu do następnej probówki poddawano kolejnemu wirowaniu przez 10 minut. Po zakończonym wirowaniu i usunięciu części osocza oraz ponownym dodaniu płynu ACD, próbę mieszano na mie-

szadle, a następnie ustalano liczbę płytek krwi w 1 mm³ osocza bogatopłytkowego według metody Deissi (17),

b) oznaczanie bezwzględnej liczby trombocytów w 1 mm³ krwi obwodowej — metodą bezpośrednią według Deissi (17) przy użyciu roztworu błękitu brylantowo-krezolowego i cytrynianu sodu z dodatkiem formaliny,

c) ocenę morfologiczną trombocytów — na podstawie obserwacji tych komórek w rozmazach wykonanych z krwi obwodowej i osocza bogatopłytkowego, w mikroskopie świetlnym, według kryteriów własnych.

Badania aktywności fagocytarnej trombocytów obejmowały oznaczanie indeksu pochłaniania metodą według Mantur i wsp. (15) oraz procentu płytek krwi wykazujących zdolność pochłaniania bakterii. Substratem dla badanych „fagocytów” była zawiesina bakterii *Staphylococcus aureus* 209P, przygotowana z 18-godzinnej hodowli, o zagęszczeniu odpowiadającym ilości bakterii i płytek krwi w proporcji 1:1. Badania wykonywano wprowadzając do probówek 0,2 ml badanego osocza bogatopłytkowego i 0,2 ml przygotowanej hodowli *Staphylococcus aureus*. Próby inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Po zakończonej inkubacji z poszczególnych prób wykonano rozmaz barwiony metodą Pappenheima. Preparaty mikroskopowe odczytywano pod imersją, obliczając indeks pochłaniania (średnia liczba bakterii pochłonięta przez 100 trombocytów wykazujących te cechy) i procent komórek zdolnych do pochłaniania wzorcowego zarazka na 100 komórek występujących w polu widzenia.

Wyniki badań dotyczących bezwzględnej liczby trombocytów, indeksu pochłaniania i procentu komórek pochłaniających przedstawiono, łącznie dla wszystkich badanych ryb, w tab. 1 w postaci średnich arytmetycznych i odchyłeń standardowych. Wyniki badań dotyczących oceny morfologicznej trombocytów podano opisowo w tab. 2.

Wyniki i omówienie

Adaptowana metoda izolowania trombocytów karpia umożliwiła oddzielenie z krwi obwodowej około 80% ($\pm 12\%$) tych komórek tzn. 23,85 tys. w 1 mm³ osocza bogatopłytkowego ($\pm 7,16$ tys.). Uzyskiwana w czasie tej procedury frakcja trombocytów nie zmienionych morfologicznie charakteryzowała się dużym stopniem czystości, co wyrażało się obecnością jedynie od 13 do 19 leukocytów wśród 1000 płytek krwi. Zapewnia to użyty płyn konserwujący ACD, który jest powszechnie stosowany w procesie produkcji i konserwowania krwinek płytkowych wykorzystywanych w transfuzjologii. Wykazuje on zdolność obniżania pH osocza oraz przeciwdziałania syntezie tromboksanu przez te komórki, a tym samym zjawiskom agregacji i sekrecji trombocytów (10, 13). Zaletą adaptowanej metody izolowania trombocytów, z rozcieńczonej płynem ACD krwi obwodowej karpia, jest przede wszystkim możliwość oddzielenia i skumulowania tych komórek w homologicznym osoczu, będącym ich naturalnym środowiskiem. Metoda ta nie powoduje poza tym zmian morfologicznych

Tab. 1. Liczba i aktywność fagocytarna trombocytów u zdrowych karpia

Liczba badanych ryb	Liczba trombocytów w 1 mm ³ krwi (w tys.)	Indeks pochłaniania	Procent trombocytów pochłaniających
111	$29,72 \pm 6,83$	$1,48 \pm 0,38$	$18,83 \pm 4,13$

Tab. 2. Charakterystyka form morfologicznych trombocytów zdrowych karpia

Typ morfologiczny trombocytów	Kształt		Rozmieszczenie cytoplazmy	Barwa cytoplazmy
	trombocytów	jadra komórkowego		
A	wydłużony — owalny	owalny	rozciągnięta w postaci słupka w jednym kierunku wzdłuż osi długiej jądra	szaro-niebieska (słabo widoczna)
B	wydłużony	owalny	rozciągnięta w jednym kierunku wzdłuż osi dł. jądra, ostro zakończona	szaro-niebieska (słabo widoczna)
C	wydłużony — dwustronnie spiczasty	owalny	rozciągnięta w obu kierunkach długiej osi jądra, ostro zakończona	szaro-niebieska (słabo widoczna)
D	wydłużony — pałeczkowaty	pałeczkowaty	wys.ępuje w postaci rąbka na obu końcach jądra	szaro-niebieska (b. słabo widoczna)
E	kulisty	kulisty	otacza jądro jednorzędnie nie powodując zmiany kształtu komórki	ciemnoszaro-niebieska (dobrze widoczna)

trombocytów, które są najczęściej następstwem uruchomienia przez te komórki procesów czynnościowych, między innymi agregacji i sekrecji, w odpowiedzi na niekorzystne (fizyczne i chemiczne) warunki środowiska (13, 22).

Bezwzględna liczba trombocytów w 1 mm³ krwi obwodowej karpia wynosi 29,72 tys. (\pm 6,83 tys.) (tab. 1). Komórki te, jak wynika z przeprowadzonych badań, występują w pięciu różnych formach morfologicznych (tab. 2) i posiadają zdolność pochłaniania bakterii *Staphylococcus aureus* 209P. Stopień zaangażowania płytek krwi w procesie fagocytozy odzwierciedla określona w badaniach wartość indeksu pochłaniania — 1,48 (\pm 0,38) i procentu komórek pochłaniających — 18,83 (\pm 4,13) (tab. 1). Bezwzględna liczba krwinek płytkowych ryb, jak wynika z doniesień wielu autorów (cyt. 22), jest bardzo zróżnicowana, zarówno wśród ryb jednego gatunku, jak i między gatunkami. Uzyskane w badaniach własnych wartości dotyczące liczby trombocytów krwi obwodowej karpia są jednak zbliżone do liczby, jaką uzyskał u tego samego gatunku ryb Rijkers i wsp. (18). Analizując formy morfologiczne płytek krwi występujące u różnych gatunków ryb należy stwierdzić, że opinie co do ich różnorodności są rozbieżne (cyt. 22). Brak zgodności w tej mierze odnosi się także do trombocytów krwi obwodowej karpia. Temmink i Bayne (23) opisali u tego gatunku ryb tylko jeden typ płytek krwi, natomiast badania własne wykazały, że występują one w postaci pięciu różnych typów morfologicznych od A do E, różniących się kształtem komórki, kształtem jądra komórkowego oraz rozmieszczeniem i barwą cytoplazmy (tab. 2). Analizując te formy (tab. 2) wydaje się bardzo prawdopodobne, że u karpia występują zasadniczo jedynie dwa typy morfologiczne krwinek płytkowych typ A i E, natomiast typ B, C i D należą do form przejściowych. W badaniach nad trombocytami karpia może zatem mieć znaczenie określenie proporcji form owalnych trombocytów (typ A-D) do form kulistych (typ E), których powstawanie jest, najprawdopodobniej także u ryb, wynikiem przemian związanych z funkcjami czynnościowymi tych komórek, między innymi agregacji i reakcji uwalniania.

Oceniając wyniki badań z zakresu aktywności fagocytarnej trombocytów trzeba stwierdzić, że proces fagocytozy u ryb wiąże się, jak dotychczas, z rolą i funkcją komórek warunkujących odporność nieswoistą, do których zalicza się przede wszystkim makrofagi (monocyty i granulocyty obojętnochłonne) (cyt. 21). W badaniach własnych wykazano, że również

płytki krwi, w dość dużej liczbie (tab. 1), wykazują zdolność fagocytowania wzorcowego szczepu bakterii. Obserwacje te znajdują również potwierdzenie w badaniach innych autorów (cyt. 22), którzy wykazali tę właściwość trombocytów u gładzicy (*Pleuronectes platessa*), ariusa (*Pimelodus maculatus*), okonia amerykańskiego (*Perca flavescens*), karpia (*Cyprinus carpio*) i niszczuka (*Lepisosteus platyrhincus*). Dotychczasowe obserwacje zarówno własne, jak i innych autorów (cyt. 22) pozwalają na uznanie trombocytów ryb za komórki czynnie włączające się w proces obronny organizmu. Znaczenie tych komórek w procesach odpornościowych ryb, nawet pomimo niskiej wartości indeksu pochłaniania, jaką wykazano w prezentowanych badaniach, rekompensowanej stosunkowo wysokim odsetkiem trombocytów zaangażowanych w ten proces, nie powinno być nie zauważone. Aktywność fagocytarnej tych komórek u ryb może bowiem okazać się jedną z silniejszych barier obronnych przed infekcją. Przemawia za tym również analiza stopnia rozwoju filogenetycznego ryb, ich mechanizmów odporności nieswoistej w porównaniu z organizmami wyższymi (3). Pełna jednak i obiektywna ocena roli i funkcji trombocytów jako komórek odpornościowych w organizmie ryb wymaga, mimo, że są one obecnie uznane za komórki układu immunologicznego (19), ogromnego nakładu pracy badawczej nad tymi zagadnieniami.

Wnioski

1. Własna adaptacja metody izolowania trombocytów karpia rozszerza możliwości oceny ilościowej i jakościowej tych komórek.

2. Płytki krwi u karpia wykazują zdolność pochłaniania wzorcowego szczepu bakterii oraz cechują się stosunkowo dużym zróżnicowaniem morfologicznym.

Piśmiennictwo

- Arora D. K., Ajello L., Mukerji K. G.: Handbook of Applied Mycology, t. 2, Marcel Dekker, INC, New York 1991.
- Bayne Ch.: Vet. Immunol. Immunopathol. 12, 141, 1986.
- Beck G., Habicht G. S.: Immunology Today 12, 180, 1991.
- Buczyński A., Dziedziczak-Buczyńska M., Kędzióra H., Kędzióra J., Buchalik J., Tkaczewski W.: Pol. Tyg. lek. 44, 548, 1989.
- Burton S. A., Honor D. J.: The Compendium, Small Animal 13, 1129, 1991.
- Clänkenbeard K. D., Upton M. L.: Am. J. vet. Res. 52, 453, 1991.
- Ellis A. E.: J. Fish Biol. 11, 453, 1977.
- Hallitwell R. E. W., Gorman N. T.: Veterinary Clinical Immunology, W.B. Saunders Comp., Philadelphia 1989.
- Hine P. M., Wain J. M., Boustead N. C., Dunlop D. M.: J. Fish Biol. 29, 721, 1986.
- Kemona H.: Udział płytek krwi w odporności nieswoistej, badania doświadczalne i kliniczne. Praca hab., AM Białystok, 1987.

11. Kemona H.: *Diag. Lab.* 25, 75, 1989.
12. Kemona H., Wysocka J., Mantur M., Prokopowicz J.: *Acta hem. pol.* 20, 201, 1989.
13. Kotelba-Witkowska B.: *Krwinki płytkowe.* PZWL, Warszawa 1978.
14. Ledwożyw A., Stolarczyk H.: *Acta vet. hung.* 39, 197, 1991.
15. Mantur M., Wołosowicz N., Prokopowicz J., Kemona H.: *Folia haemat.* 113, 691, 1986.
16. Myśliwiec M., Myśliwiec B.: *Pol. Tyg. lek.* 37, 681, 1982.
17. Pinkiewicz E.: *Podstawowe badania laboratoryjne w chorobach zwierząt.* PWRiL, Warszawa 1971, s. 48–49.
18. Rijkers G. T., Teunissen A. G., van Oosterom R., van Muiswinkel W. B.: *Aquaculture* 19, 177, 1980.
19. Roitt I., Brostoff J., Male D.: *Immunology.* Gower Med. Publ., London, New York, 1989.
20. Safai-Kutti S.: *Studies on Platelet Kinetics Immunology, and Release Reaction.* Praca dokt., Univ. Goteborg 1981.
21. Stosik M., Deptuła W.: *Post. Mikrobiol.* 29, 41, 1990.
22. Stosik M., Deptuła W.: *Trombocyty ryb.* *Medycyna Wet.* 1992, (oddane do druku).
23. Temmink J. H. M., Bayne C. J.: *Dev. Comp. Immunol.* 11, 125, 1987.
24. Wachowicz B., Krajewski T.: *Acta hem. pol.* 17, 27, 1983.

Adres autora: dr Michał Stosik, ul. Ogrodowa 1A/4, 66-300 Krosno Odrzańskie

Z HISTORII WETERYNARII

MARIAN JELIŃSKI

Krajowe weterynaryjne pracownie diagnostyczne w służbie pszczelarstwa – rys historyczny od 1936 – 1962 r.

Zakład Chorób Owadów Użytkowych Instytutu Weterynarii, ul. Poznańska 35, 62-620 Swarzędz

Krajowe weterynaryjne pracownie diagnostyczne służące pszczelarstwu mają swoich prekursorów. Wśród nich należy wymienić Katedrę Botaniki na Uniwersytecie Lwowskim, którą kierował profesor Teofil Ciesielski (1846–1916). Badano tam materiał w kierunku chorób czerwia pszczelego (26). Laboratorium Pszczelarskie Pomorskiego Związku Towarzystw Pszczelarzy w Brodnicy w 1934 r. prowadziło badania w kierunku chorób pszczoł (4). Nie były to jednak pracownie weterynaryjne. Weterynaryjną placówką diagnostyczną był natomiast Poddział Chorób Pszczoł PINGW w Bydgoszczy (12), znany wcześniej (1936 r.) jako Weterynaryjna Pracownia Rozpoznawcza (1). Ministerstwo Rolnictwa i Reform Rolnych zarządziło wtedy bezpłatne badania w kierunku chorób pszczoł i czerwia pszczelego (1).

Pracownia w Bydgoszczy stanowiła organ państwowy do walki z chorobami pszczoł (12). Według Zulińskiego (cyt. 23) początek działalności Poddziału Chorób Pszczoł wiąże się z dniem 1 czerwca 1937 r., kiedy to Weterynaryjne Pracownie Rozpoznawcze weszły w skład Działu Rozpoznawczego Wydziału Weterynaryjnego Państwowego Instytutu Gospodarstwa Wiejskiego w Puławach (23). Kierownikiem Poddziału był dr Henryk Gołaszewski (23). Istnienie w 1937 r. bydgoskiej pracowni zajmującej się rozpoznawaniem chorób pszczoł potwierdza Kruszka (18). W 1935 r. dr Gołaszewski odbył specjalistyczną praktykę z zakresu zwalczania chorób pszczoł w Szwajcarii i Czechach i w okresie międzywojennym pracował w Bydgoszczy (6). Tak było chyba do początku II wojny światowej, gdyż publikacja, która ukazała się w 1939 r. podpisana jest: „Dr Henryk Gołaszewski — Bydgoszcz” (12).

Działania wojenne przerwały pracę pierwszego Poddziału Chorób Pszczoł w Polsce (23). Jednak podczas okupacji w Puławach istniał Krajowy Zakład Weterynaryjny (23). Przesyłano tam do badania próby plastrów i pszczoł (2), zgodnie z zarządzeniem administracyjnym o zwalczaniu zgnilca i choroby rotoczwowej pszczoł, które obowiązywało od 1 grudnia 1941 r. w Generalnym Gubernatorstwie poza Galicją (2). Rozpoznawaniem chorób pszczoł w Puławach w latach 1941–1942 zajmował się zapewne dr Gołaszewski (26). W późniejszych latach okupacji diagnostyka chorób tych owadów nie była prawdopodobnie prowadzona. Kirkor (16) informuje o ocalałej księdze badań za lata 1941–1942. Brak jest natomiast takich danych o latach 1943–44. Wydaje się, że w tym okresie niemieckiej okupacji w Krajowym Zakładzie Weterynaryjnym chorób pszczoł nie diagnozowano. Dr Gołaszewski w 1943 r. pracował w Poddziale Chorób Bydła w Puławach, który w 1944 r. zawiesił swoją działalność (23), a w 1945 r. został kierownikiem Wojewódzkiego Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Bydgoszczy (6).

Znacznie wcześniej, w 1942 r., we Francji, nad chorobami pszczoł pracował pod kierunkiem prof. Paillot dr Stanisław Kirkor (15). Po wojnie dzięki jego staraniom 15 sierpnia 1946 r. utworzono po raz pierwszy w Polsce Zakład Chorób

Pszczoł (16). Była to jedna z placówek Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach, który powstał zgodnie z dekretem z dnia 6 czerwca 1945 r. (31). Po swoich poprzednikach Zakład niewiele odziedziczył (16). Kirkor (16) stwierdza: „Wojna zniszczyła wiele śladów poprzedniej działalności kreowanego tuż przed wojną Zakładu prowadzonego przez dr Henryka Gołaszewskiego”.

Początkowa działalność Zakładu w okresie od 15 sierpnia do listopada 1946 r. była zapewne ściśle związana z siedzibą Instytutu w Puławach. 10 listopada 1946 r. odbyło się uroczyste otwarcie Filii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Gorzowie Wlkp. (n. Warta). Składała się ona z 6 zakładów, wśród których wymieniono Zakład Chorób Pszczoł (3). Zajmował on na początku jedno pomieszczenie „zniszczonego budynku dawnego niemieckiego Instytutu Bakteriologicznego” (16). Prócz mianowanego kierownika nie było żadnego przeszkolonego pracownika ani mikroskopu (16). Nieco później w jednym pokoju był kierownik, pomoc techniczna no i mikroskop (29).

Po upływie dłuższego czasu Zakład przeniesiono do obszernego budynku, który mieścił się w Gorzowie Wielkopolskim przy ulicy Bohaterów Warszawy 4 (7, 31). W tym okresie pełna nazwa placówki była następująca: Państwowy Instytut Weterynaryjny Oddział w Gorzowie Wlkp., Zakład Chorób Pszczoł (7).

W 1950 r. Zakład uzyskał w Paczkowie koło Poznania dzwastowany majątek rolny (23), w którym wcześniej funkcjonował Zakład Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych WZHW w Poznaniu (23). Założono tam sad i posadzone lipy, ale w 1953 r. majątek ten oddano spółdzielni produkcyjnej (29), natomiast Zakładowi Chorób Pszczoł w 1953 r. przekazano resztówkę majątku Nowa Wieś k. Swarzędza, którą później włączono do tego miasta (7, 23).

23 grudnia 1955 r., zgodnie z Zarządzeniem Nr 315 Ministra Rolnictwa, Zakład Chorób Pszczoł Państwowego Instytutu Weterynaryjnego z siedzibą w Gorzowie Wlkp. zostaje przemianowany na Zakład Chorób Owadów Użytkowych Instytutu Weterynarii (31). Przeniesienie Zakładu z Gorzowa do Swarzędza nastąpiło we wrześniu 1956 r. (17, 23). Jego nowa nazwa wiązała się z planowaną znaczną rozbudową (7). W 1956 r. prof. Kirkor zakładał, że przybędzie nowy Zakład Chorób Jedwabników (7). Tego planu nie udało się zrealizować. W zorganizowanym w Gorzowie Wlkp. Zakładzie prowadzono jednak nie tylko diagnostykę chorób pszczoł, ale także badania naukowe. Ich efektem były liczne publikacje pracowników tej placówki. Należy wspomnieć także o podręcznikach wydanych przez PWRiL. W 1953 r. ukazały się „Choroby pszczoł” autorstwa ówczesnego kierownika Zakładu doc. dr S. Kirkora (23), a w 1961 r. „Choroby pszczoł i ich zwalczanie” (23). Autorem był lek. wet. mgr Ryszard Kostecki — późniejszy kierownik Zakładu, który pracę w Gorzowie Wlkp. rozpoczął w 1954 r.

Zainteresowanie chorobami pszczoł znacznie wzrosło. Przejawem tego było tworzenie pracowni rozpoznawczych