

WŁODZIMIERZ KLUCIŃSKI, JOANNA KOPEĆ, WANDA BORZEMSKA,
ELŻBIETA MALICKA, EWA SITARSKA

Morfologiczne zmiany jąderek w limfocytach kur w patologii układu limfatycznego

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR w Warszawie
Z Instytutu Hematologii w Warszawie

Badania ostatnich lat dostarczyły szereg publikacji z zakresu struktury jąderka różnych komórek organizmu i związanej z nią aktywności syntezy RNA. Szczególnie interesujące są doniesienia na temat morfologicznego obrazu jąderek w limfocytach krwi obwodowej (10, 11, 13).

Na podstawie dotychczasowych badań wykazano, że średnia liczba jąderek przypadająca na limfocyt oraz częstość występowania trzech zasadniczych form morfologicznych jąderek jest wielkością stałą dla danego gatunku ssaka i nie ulega zmianie w warunkach fizjologicznych (3, 7). Zaobserwowano, że wartości te ulegają zmianie pod wpływem czynników patologicznych, w szczególności w zaburzeniach immunologicznych oraz w chorobach proliferacyjnych, zarówno u człowieka, jak i zwierząt. Zmiany te cechują się wzrostem wskaźnika jąderkowego czyli średniej liczby jąderek przypadających na limfocyt, jak również odsetka jąderek pierścieniowych, aktywnych i mikrojąderek (12). Wyniki tych badań sugerują, że ocena obrazu morfologicznego jąderek może być czułym przyżyciowym testem określającym aktywność limfocytów krwi obwodowej, a pośrednio również i stan czynnościowy całego układu limfatycznego. Może ona służyć do określania rozwoju i zaawansowania procesu chorobowego w organizmie jak również do oceny skutków terapii. W dostępnym piśmiennictwie brak jest prac na temat morfologii jąderek w limfocytach krwi obwodowej u kur.

Celem niniejszej pracy było ustalenie wskaźnika jąderkowego oraz odsetka poszczególnych form jąderek u ptaków zdrowych i chorych, zwłaszcza wykazujących zaburzenia układu limfatycznego.

Materiał i metody

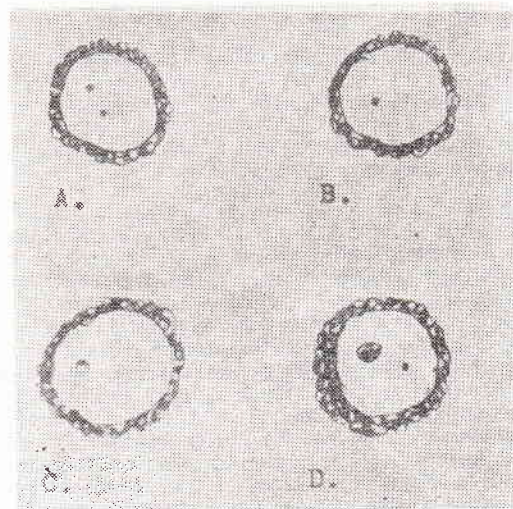
Badania przeprowadzono na 60 kurczętach i kurach rasy White Rock. Do badań pobierano krew od żywych, zdrowych ptaków oraz chorych na chorobę Gumboro, wtretowe zapalenie wątroby, chorobę Mareka i białaczkę limfatyczną. W skład każdej grupy wchodziło 10 ptaków ze stada, w których stwierdzono daną jednostkę chorobową. Wykonano ocenę ilościową krwinek białych u wszystkich ptaków (8). Rozmaz dla oceny liczby i struktury jąderek barwiono wg metody opisanej przez Smetanę i wsp. (11), wykorzystując powinowactwo RNA do błękitu toluidynowego w środowisku kwaśnym. W badaniach uwzględniono: wskaźnik jąderkowy czyli średnią liczbę jąderek przypadającą na jeden limfocyt oraz odsetek poszczególnych, morfologicznych postaci jąderek określonych przez Smetanę (10, 11).

Ponadto pobierano od chorych, wykrwawionych ptaków wycinki wątroby, śledziony, żołądka gruczołowego, nerwów kulszowych i torby Fabrycjusza.

Wycinki utrwalono w 4% formalnie zbuforowanej fosforanami. Skrawki parafinowe barwiono metodą HE. W przypadku choroby Gumboro skrawki z torby Fabrycjusza mrożono i barwiono Sudanem III na obecność tłuszczów obojętnych.

Wyniki i omówienie

Wskaźnik jąderkowy limfocytów krwi obwodowej u kurcząt w wieku 4 tygodni oraz kur w wieku 35 tygodni życia nie wykazywał istotnych różnic ($p > 0,05$). Przeprowadzana analiza morfologiczna wykazała u ptaków zdrowych, w wieku od 4 do 35 tygodni, średnie wartości wskaźnika jąderkowego $1,116 \pm 0,105$. U 70% limfocytów obserwowano jedno jąderko, w pozostałym odsetku — dwa lub trzy. Mikrojąderka stanowiły 61%, jąderka pierścieniowe 25% a aktywne 14% (ryc. 1, 2).



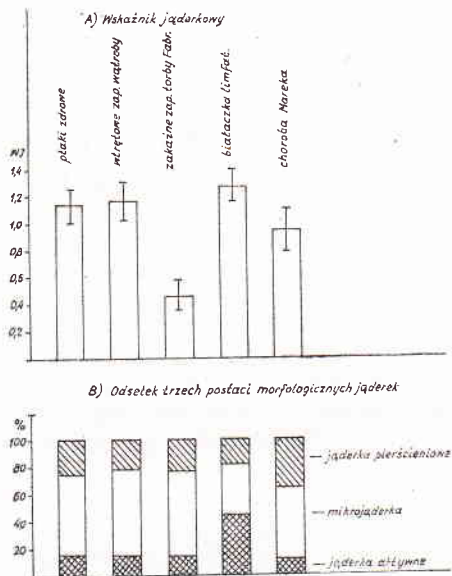
Ryc. 1. Formy jąderek limfocytów krwi obwodowej kury

Objaśnienia: A, B — limfocyty z mikrojąderkami, C — z jąderkiem pierścieniowym, D — z jąderkiem aktywnym i mikrojąderkiem.

Nie stwierdzono również istotnych różnic między dwiema grupami wiekowymi w liczbie krwinek białych oraz obrazie Schillinga. U badanych ptaków średnia liczba białych ciałek krwi wynosiła $30\,500 \pm 4900$, w tym limfocyty stanowiły $66,4 \pm 7,8\%$, heterofile $24,3 \pm 4,8\%$, eozynofile $2,4 \pm 0,6\%$, bazofile $3,6 \pm 0,98\%$ i monocyty $3,3 \pm 1,0\%$.

Choroba Gumboro. Ocenę morfologiczną limfocytów przeprowadzono u 7-tygodniowych kurcząt w 5 dniu trwania choroby. U ptaków tych stwierdzono wyraźne zmniejszenie liczby jąderek w limfocytach krwi obwodowej. W 70%

limfocytów nie stwierdzono obecności jąderek, w pozostałym odsetku zaledwie jedno lub dwa. Średni wskaźnik jąderkowy kształtował się u tych kurcząt $0,459 \pm 0,121$ i był znacznie niższy w porównaniu do ptaków zdrowych (ryc. 2). Jąderka barwiły się słabo wg metody Smetany, chociaż komórki z reguły były prawidłowe. Odsetek poszczególnych form nie różnił się od rozkładu obserwowanego u ptaków zdrowych.



Ryc. 2. Zmiany w obrazie morfologicznym jąderek limfocytów krwi obwodowej u kur

Objaśnienia: A — wskaźnik jąderkowy, B — odsetek trzech postaci morfologicznych jąderek.

Liczba białych krwinek oraz odsetek limfocytów u ptaków z chorobą Gumboro były niższe w porównaniu z wartościami stwierdzonymi u ptaków zdrowych w tym samym wieku, chociaż różnice między tymi grupami kurcząt nie były tak wyraźne, jak w obrazie morfologicznym jąderek. Średnia liczba białych krwinek wynosiła $26\,700 \pm 10\,400$, w tym limfocyty stanowiły $48,6 \pm 13,1\%$. Chore kurczęta wykazywały typowe objawy kliniczne i zmiany anatomopatologiczne dla choroby Gumboro. W torbie Fabrycjusza mikroskopowo stwierdzono cechy zapalenia: przekrwienie, obrzęk, nacieki heterofili oraz nekrobiozę limfocytów i komórek siateczki w obrębie grudek chłonnych. W niektórych przypadkach obserwowano również cechy zaniku grudek chłonnych oraz rozplem elementów nabłonkowych, a także w różnych komórkach stwierdzono obecność tłuszczów obojętnych.

Wtrętowe zapalenie wątroby. Ocena morfologiczną jąderek limfocytów krwi obwodowej przeprowadzono u 6 tygodniowych kurcząt w 6 dniu choroby.

Na podstawie przeprowadzonej analizy nie wykazano istotnych różnic we wskaźniku jąderkowym oraz odsetku jąderek pierścieniowych, aktywnych i mikrojąderek w porównaniu z ptakami zdrowymi. Średni wskaźnik jąderkowy u tej grupy ptaków wynosił $1,180 \pm 0,110$, jąderka pierścieniowe stanowiły 21,6%, mikrojąderka 66,4%, a aktywne 12% (ryc. 2).

Średnia liczba krwinek białych wynosiła $29\,000 \pm 5100$, w tym limfocyty stanowiły $65,1 \pm 9,1\%$. Wartości te nie różniły się od wyników stwierdzonych u

ptaków zdrowych. Obraz anatomopatologiczny u kurcząt chorych był typowy dla tej jednostki chorobowej. W badaniu histopatologicznym obserwowano w wątrobie przekrwienie, ogniskowe nacieki zapalne komórkowe, zwłaszcza wokół naczyń krwionośnych, nacieczenie tłuszczowe i bardzo znaczną nekrobiozę hepatocytów. U niektórych ptaków stwierdzono w jądrach komórek wątrobowych obecność kwasochłonnych, wewnątrzjądrowych ciałek wtrętowych. W torbie Fabrycjusza stwierdzono zanik grudek chłonnych, a także kamórek limfoidalnych, rozplem komórek siateczki. Niekiedy obserwowano nekrobiozę komórek w środkowej części grudek oraz formowanie torbielek, a ponadto rozrost tkanki łącznej śródmiąższowej.

Choroba Mareka. Obserwacje morfologicznych zmian w limfocytach i limfoblastach krwi obwodowej przeprowadzono u kur w 26 tygodniu życia. Najbardziej charakterystyczną cechą obrazu morfologicznego krwi była obecność bardzo licznych komórek limfoblastycznych, które nie występowały w przebiegu innych badanych jednostek chorobowych. Dlatego też oddzielnie przeprowadzono analizę morfologiczną jąderek w limfocytach oraz w limfoblastach. Średni wskaźnik jąderkowy w limfocytach wynosił $0,94 \pm 0,15$, podczas gdy w limfoblastach $1,40 \pm 0,19$. Limfoblasty cechowały się licznymi, silnie barwiącymi się i dużymi jąderkami.

Odsetek poszczególnych postaci jąderek w limfocytach niewiele odbiegał od wartości obserwowanych u ptaków zdrowych. Jąderka aktywne stanowiły 12%, mikrojąderka 53%, a jąderka pierścieniowe 35% (ryc. 2). W limfoblastach natomiast obserwowano wyższy odsetek jąderek aktywnych — 24,8%, pierścieniowych — 42% oraz niższy procent mikrojąderek — 33,2% w porównaniu z limfocytami. Średnia liczba krwinek białych wynosiła $32\,000 \pm 4700$ i nie różniła się istotnie w porównaniu z ptakami zdrowymi.

Badania anatomopatologiczne wykazały obecność typowych guzów nowotworowych w narządach wewnętrznych (śledzionie, wątrobie, nerkach itp.). Ponadto stwierdzono zgrubienie ściany żołądka gruczołowego. Zmiany histopatologiczne cechowały się naciekami komórkowymi złożonymi w przeważającej części z limfocytów o różnym stopniu dojrzałości oraz komórek siateczki. Występowały one w nerwach kulszowych, wątrobie, nerkach oraz żołądka gruczołowym.

Białaczka limfatyczna. W badaniach uwzględniono białaczkę limfatyczną występującą u kur w wieku 35 tygodnia życia. W limfocytach krwi obwodowej u tych ptaków obserwowano znamienny wzrost wskaźnika jąderkowego w porównaniu z kurami zdrowymi. Średni wskaźnik u kur z białaczką kształtował się $1,270 \pm 0,110$ (ryc. 2). Równocześnie obserwowano wzrost odsetka jąderek aktywnych do 43,5% (ptaki zdrowe 14,1%), kosztem zmniejszenia ilości mikrojąderek do 37,2% (kury zdrowe 61,%). Liczba krwinek białych oraz odsetek limfocytów ulegał niewielkiemu wzrostowi. W nielicznych przypadkach obserwowano pojedyncze limfoblasty. Średnia wartość krwinek białych wynosiła $38\,000 \pm 10\,200$, w tym limfocytów 74,6%.

Badaniami anatomopatologicznymi stwierdzono zmiany typowe dla tej choroby nowotworowej, cechujące się znacznym powiększeniem wątroby, nerek, śledziony z obecnością szaro-białych guzków różnej wielkości. Histopatologicznie stwierdzono w wątrobie, śledzionie oraz nerkach rozplem dużych komórek limfoidalnych o słabym różnicowaniu.

W analizie morfologicznej jąderek u ptaków zdrowych, w wieku od 4 do 35 tygodni, nie

stwierdza się istotnych różnic we wskaźniku oraz odsetku poszczególnych postaci jąderek. Opisany obraz morfologiczny jąderek limfocytów ptaków zdrowych różnił się od obrazu opisanego u człowieka i innych ssaków.

U ptaków zasadniczą postacią są mikrojąderka, czyli jąderka o nieodwracalnie zahamowanej syntezie RNA, stanowią one 61%, podczas gdy u ludzi postać ta stanowi około 5%, a u myszy 17,7%. Odsetek limfocytów z jąderkami pierścieniowymi (o odwracalnie zahamowanej syntezie RNA) stanowiących zasadniczą formę morfologiczną jąderek u ludzi zdrowych — 92% wynosi u ptaków zdrowych zaledwie 24%. Mniejsze różnice między poszczególnymi gatunkami wystąpiły w odsetku limfocytów z jąderkami aktywnymi — ptaki 14%, człowiek 2,3%, myszy 11% (2).

Porównując obraz morfologiczny jąderek limfocytów u ptaków zdrowych z obrazem u ptaków chorych na szczególną uwagę zasługują zmiany we wskaźniku przy chorobie Gumboro oraz wskaźniku i odsetku limfocytów z jąderkami aktywnymi przy białaczce limfatycznej.

Wydaje się, że istotnie niższy wskaźnik jąderkowy w limfocytach kurcząt chorych na chorobę Gumboro powiązany jest z nieodwracalnymi zmianami degeneracyjnymi w torbie Fabrycjusza. Zmian takich nie obserwowano w limfocytach kurcząt chorych na wtętowe zapalenie wątroby, przy którym zmiany w torbie Fabrycjusza mają również charakter zmian atroficznych. Jednakże zmiany te obserwowane przy wtętowym zapaleniu wątroby zbliżone są do obrazu obserwowanego przy fizjologicznej inwolucji tego narządu (4, 5, 9). Przy proliferacji torby Fabrycjusza w białaczce następuje wzrost liczby jąderek w limfocytach, a także — co jest najbardziej charakterystyczne — wzrost odsetka jąderek aktywnych w tym ostatnim przypadku. Obraz ten jest zbliżony do zmian obserwowanych u człowieka i zwierząt (1, 6, 13).

Na podstawie przeprowadzonych wstępnych badań wykazano w obrazie morfologicznym jąderek limfocytów krwi obwodowej zmiany, które mogą być wykorzystywane w badaniach laboratoryjnych do różnicowania pewnych jednostek choroby w etiologii wirusowej.

Piśmiennictwo

1. Archer R. K., Jeffcott L. B.: *Comparative clinical haematology*. Blackwell Sci. Publ. Oxford 1977.
 2. Draber P., Nouza K., Nemeš M.: *Folia biol.*, Praha, 20, 36, 1974.
 3. Enbergs H.: *Adv. Vet. Med. Suppl.* 22 to *Zentbl. Vet. Med.*, Verlag Paul Parey, Berlin — Hamburg, 1975.
 4. Hoffmann R., Dorn P.: *Avian Dis.* 22, 266, 1978.
 5. Hoffmann R., Wessling E., Dorn P., Dangschat.: *Avian Dis.* 19, 224, 1975.
 6. Kopeć J.: Jąderka w limfocytach krwi obwodowej u bydła. *Medycyna Wet.* (w druku).
 7. Potmesil M., Wienerová E.: *Folia morpholog.*, Praha 13, 352, 1965.
 8. Rusov C.: *Vet. Glasn.* 31, 719, 1977.
 9. Schorbiers H., Wike E., Schmidt V.: *Mh. Vet.-Med.* 32, 700, 1977.
 10. Smetana K., Gyorky P., Busch H.: *Expl. Cell Res.* 91, 143, 1975.
 11. Smetana K., Lejnar J., Potmesil M.: *Folia haemat.* Lipsk 91, 381, 1969.
 12. Smetana K., Vlastiborova A., Matejkova E., Hondlik J., Lejnar J., Liskovsky Z.: *Neoplasma* 23, 183, 1976.
 13. Smetana K., Potmesil M.: *Folia haemat.* Lipsk 93, 16, 1970.
- Adres autora: dr habil. Włodzimierz Kluciński, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa.

Клюцинский В., Копець И., Божемская В., Малицкая Э., Ситарская Э. — **Морфологические изменения ядрышек в лимфоцитах кур в патологии лимфатической системы.**

Провели морфологический анализ ядрышек лимфоцитов периферической крови здоровых кур различного возраста с учетом ядрышечного показателя и процента активных и кольцеобразных ядрышек и микроядрышек. Затем определялись изменения, появившиеся в этих органеллах при избранных нозологических единицах (вирусное воспаление сумки Фабриция, инклюзивное воспаление печени, лимфатический лейкоз, болезнь Марек).

На основе исследований показали при болезни Гумборо понижение показателя ядрышка в лимфоцитах до $0,459 \pm 0,121$ при отсутствии изменений в проценте отдельных форм (кольцеобразные ядрышка — 25%, активные — 14% и микроядрышка — 61%). В лимфатическом лейкозе наблюдался значительный рост показателя до $1,27 \pm 0,11$ с одновременным ростом процента активных ядрышек до 43,5%.

Kluciński W., Kopeć J., Borzemska W., Malicka E., Sitariska E. — **Morphological changes in nucleoli of lymphocytes in hens in pathology of lymphatic system.**

The authors performed morphological analysis of nucleoli of peripheral blood lymphocytes of normal hens at various age taking into consideration a nucleolar coefficient and a percentage of active, ring nucleoli and micronucleoli. Then there was determined the character of the changes observed in these organelles in the course of certain diseases (Gumboro disease, inclusion viral hepatitis, lymphatic leukemia, Marek's disease).

The studies revealed diminishment of the nucleolar coefficient up to 0.459 ± 0.21 and lack of changes in percentage of various forms of nucleoli (ring nucleoli — 25%, active nucleoli — 14%, micronucleoli — 61%) in Gumboro disease. In lymphatic leukemia increased significantly the nucleolar coefficient up to 1.27 ± 0.11 and a percentage of active nucleoli up to 43.5%.

BAR A., SACHS M., HURWITZ S.: Obserwacje nad stosowaniem 1-alfa hydroksycholekalcyferolu w zapobieganiu porażeniu poporodowemu u krów. (Observations on the use of 1-alpha hydroxycholecalciferol in the prevention of bovine parturient paresis). *Vet. Rec.* 106, 529—532, 1980 (25).

1-alfa hydroksylalcyferol (1 alfa-HCC) w dawce 50, 150, 250 i 350 µg podawano w iniekcji dożylniej 30 krowom jednorazowo. Lek podano ponadto powtórnie 14 krowom po 48 godzinach w dawce 250 lub 350 µg, zaś 10 krowom po 72 godzinach w dawce 350 µg. Po 24 godzinach po iniekcji dawki 150, 250 lub 350 µg wzrastał poziom wapnia w płazmie osiągający wartość maksymalną między 3 i 4 dniem. Powrót do wartości wyjściowej nastąpił 5 dnia po dawce 150 µg, ósmego dnia po dawce 250—350 µg. Powtórne podanie 1 alfa HCC po 48 godzinach przedłużało czas utrzymywania się zwiększonego poziomu wapnia o trzy dni, zaś po 72 godzinach o cztery dni. Natomiast stężenie magnezu w płazmie obniżało się jedynie nieznacznie 3 dnia po iniekcji. Podawanie karmy wzbogaconej w wapń oraz iniekcja 350 µg 1 alfa HCC nie wpływały na zmianę poziomu wapnia, która występowała po iniekcji samego 1 alfa HCC. Porażeniu poporodowemu zapobiegała jedna iniekcja 1 alfa HCC w dawce 350 µg.

G.