

Piśmiennictwo

1. Bohostewicz M.: Toksykologia weterynaryjna. PWRiL, 1979.
2. Bubiń Z.: Medycyna Wet. 21, 268, 1965.
3. Bubiń Z., Międzybrodzki K.: Medycyna Wet. 22, 68, 1966.
4. Garbaliński T.: Farmakologia weterynaryjna. PWRiL, 1974.
5. Scheuring W.: Choroby nutrl, PWRiL, 1979.

6. Tereszczuk St., Cwakiński T., Czerwinka B., Kozłowski J., Lauko H., Machul Z., Pasternak A., Prokop K., Popiołek M., Skrzyniarz M., Szczygłowski W., Woźniak Z.: Biul. Inf. 3, 3, 1968.

Adres autora: dr Witold Scheuring, ul. Kilińskiego 92, 66-310 Zbąszynek.

EWA SITARSKA, JOANNA KOPEĆ, MARIA GRABARCZYK

Morfologiczna ocena jąderek i lizosomów w limfocytach krów chorych na białaczkę

Z Zakładu Fizjopatologii Instytutu Hematologii w Warszawie

W badaniach nad białaczkami limfatycznymi wielu autorów poszukuje cech limfocytów krwi obwodowej, charakterystycznych dla tych komórek w przebiegu choroby. Metody stosowane powszechnie w diagnostyce białaczki bydła opierają się głównie na ocenie hematologicznej liczby limfocytów oraz ich ogólnej budowy, m.in. wielkości komórek, kształtu jądra limfocytu (18). Pozwala to na stosunkowo łatwą selekcję grupy zwierząt podejrzanych o procesy białaczkowe.

Bardziej swoistą grupę metod stanowią badania sêrologiczne, są one jednak kosztowne — wykonanie ich wymaga wyposażenia pracowni immunologicznej (7).

W niniejszej pracy podjęto próbę zbadania zmian morfologicznych i cytochemicznych wybranych organelli subkomórkowych: jąderek i lizosomów, limfocytów białaczkowych u bydła. Organelle te ulegają bowiem uchwytym zmianom zarówno w cyklu komórkowym *in vitro*, jak również wykazują istotne różnice w limfocytach krwi obwodowej w przebiegu białaczki u ludzi i drobiu (5, 6, 8, 9). Określone cechy charakterystyczne jąderek i lizosomów limfocytów w białaczce bydła mogłyby stanowić dodatkowe kryterium diagnostyczne w uzupełnieniu metod hematologicznych.

Materiał i metody

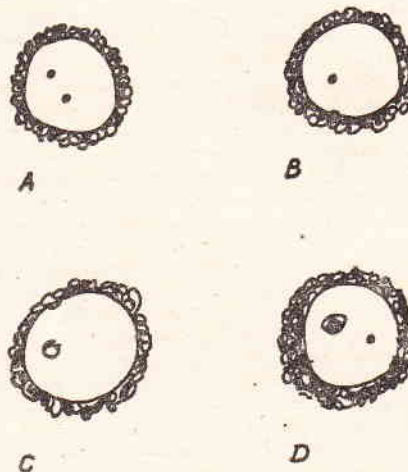
Badania przeprowadzono na krowach zdrowych i doświadczalnych rasy nizinnej (cbn) w liczbie 41 zwierząt.

Podziału na grupy dokonano w układzie podanym

w tab. 1. U krów zaliczonych do grup podejrzanych i chorych na białaczkę dwukrotnie w odstępie 12 miesięcy stwierdzono zwiększoną liczbę limfocytów.

Grupę D₁ — uznano za podejrzaną o białaczkę z uwagi na liczbę limfocytów w 1 μ l krwi obwodowej, zaś D₂ — ze względu na nieco niższy odsetek limfocytów od wartości procentowej ustalonej dla białaczki bydła (75%).

Przeprowadzono również weryfikację immunologiczną surowicy krwi badanych zwierząt z zastosowaniem zestawu diagnostycznego firmy Behring Werke (Reagenzien für die Rinderleukose-Immunodiffusion). Krew do badań pobierano z żyły jarzmowej na heparynę.



Ryc. 1. Formy jąderek w limfocytach krwi obwodowej krów: A i B — limfocyty z mikrojąderkami, C — limfocyt z jąderkiem pierścieniowym, D — limfocyt z jąderkiem złożonym (aktywnym) i mikrojąderkiem

Tab. 1. Kryteria podziału krów na grupy

Wiek krów (w latach)	Liczba osobników	Średnia liczba leukocytów w 1 μ l krwi	Średni % limfocytów	Średnia liczba limfocytów w 1 μ l krwi	Symbol grupy
3—4	7	6 300	63	3 900	K ₁ zdrowe
3—4	7	11 400	62	7 068	D ₁ podejrzane o białaczkę
5—12	7	5 100	60	3 060	K ₂ zdrowe
5—12	10	13 450	69	9 300	D ₂ podejrzane o białaczkę
5—12	10	21 600	77	16 630	D ₃ chore

Obraz różnicowy krwinek białych uzyskiwano z rozmazów barwionych odczynnikami May-Grünwald-Giemsa wg Pappenheima. Bezwzględne wartości limfocytów w μl krwi obliczano z liczby leukocytów i obrazu różnicowego krwinek białych.

Dla wykrycia jąderka stosowano metodę Smetany (15); metoda ta oparta jest na wybiórczym powinowactwie błękitu toluidyny w odpowiednim pH do RNA jąderka w limfocytach. Do badań użyto błękitu toluidyny f-my Merek. Wskaźnik jąderkowy (czyli średnią liczbę jąderka przypadających na limfocyt) obliczono w 100 limfocytach. Wyróżniono 3 formy jąderka: pierścieniowe, złożone (tzw. aktywne) i mikrojąderka wg Smetany (16), analogiczne do form występujących w limfocytach człowieka (ryc. 1). Poślad pierścieniowa jąderka charakteryzuje odwracalnie zahamowaną syntezę RNA w jąderkach; złożona — aktywną syntezę RNA, zaś w mikrojąderkach synteza RNA zahamowana jest nieodwracalnie (13).

Różnice wartości wskaźnika jąderkowego w limfocytach krów w badanych grupach poddano analizie statystycznej wg testu t Studenta.

Identyfikację lizosomów w limfocytach przeprowadzono metodą przyżyciowego barwnika błon lizosomalnych euchryzyną 3Rx Gurr — London wg Bluma (3); ocenę liczby lizosomów w komórkach dokonano w mikroskopie fluorescencyjnym PZO typ MB 30.

W zależności od liczby i rozmieszczenia lizosomów w cytoplazmie wyróżniono 4 typy limfocytów (ryc. 2);

Typ	Schemat	Opis
0		Lizosomów nie stwierdzano
1		Lizosom w postaci dużego ziarna
2		Drobne lizosomy rozmieszczone równomiernie w całej cytoplazmie
3		Duże lizosomy rozmieszczone w całej cytoplazmie

Ryc. 2. Klasyfikacja limfocytów w zależności od obrazu lizosomów

odsetek poszczególnych typów obliczano w 100 losowo wybranych komórkach z każdego preparatu. Aktywność fosfatazy kwaśnej oznaczano metodą Barki i Andersena (1, 10); limfocyty enzymododatnie podzielono w zależności od charakteru reakcji cytochemicznej na 3 rodzaje: (1) ziarniste, (2) ziarnistodyfuzyjne (enzymododatnie zarówno lizosomy jak i cytoplazma), (3) dyfuzyjne (reakcja w cytoplazmie).

Wyniki podano w wartościach bezwzględnych. Wskaźnik zmienności obliczono jako stosunek wartości badanych parametrów do ich wartości u krów zdrowych przyjętych za 1.

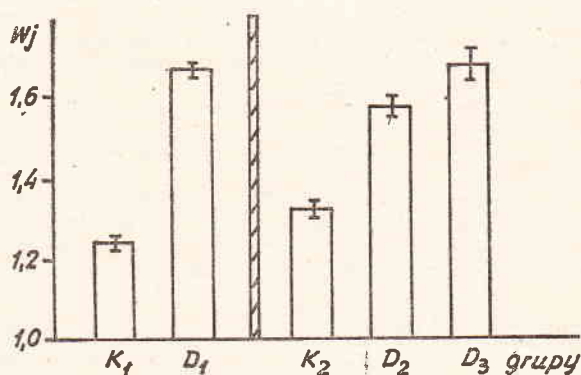
Wyniki i omówienie

W tekście immunodyfuzyjnym stwierdzono brak reakcji dodatnich w grupie krów zdrowych. W grupach zwierząt podejrzanych o białaczkę stwierdzono zarówno wyniki ujemne jak i dodatnie, w grupie krów chorych (D_3) u wszystkich osobników stwierdzono obecność przeciwciał dla antygenu wirusowego białaczki bydła.

Zmiany jąderka w limfocytach krwi obwodowej krów doświadczalnych dotyczą przede wszystkim wartości wskaźnika jąderkowego, zaś w mniejszym stopniu częstości występowania poszczególnych form jąderka.

W limfocytach krów doświadczalnych D_1 wartości wskaźnika jąderkowego są znacznie wyższe od wskaźnika u krów zdrowych K_1 ($p < 0,001$). Zakres wartości tego wskaźnika w grupie D_1 jest również większy niż w grupie K_1 , co znajduje wyraz w wartościach odchylenia standardowego ($K_1 - 1,24 \pm 0,07$, $D_1 - 1,66 \pm 0,16$). W limfocytach grupy D_2 i D_3 wartości wskaźnika jąderkowego są istotnie wyższe w porównaniu do wartości w grupie K_2 ($p < 0,02$); występuje także większy rozrzut wartości wskaźnika w grupach D_2 i D_3 w stosunku do grupy K_2 ($K_2 - 1,32 \pm 0,1$; $D_2 - 1,57 \pm 0,22$; $D_3 - 1,67 \pm 0,38$).

Wartości wskaźnika w badanych grupach ilustruje ryc. 3.



Ryc. 3. Wartości ($\bar{X} - SD$) wskaźnika jąderkowego (W_j) w limfocytach krwi obwodowej u krów zdrowych (K_1 i K_2), podejrzanych o białaczkę (D_1 i D_2) oraz chorych (D_3)

Tab. 2. Formy jąderka w limfocytach krwi obwodowej krów

Grupa	Liczba limfocytów w 1 μl krwi	Formy jąderka w limfocytach					
		Jąderka pierścieniowe		Mikrojąderka		Jąderka aktywne	
		odsetek	liczba w 1 μl krwi	odsetek	liczba w 1 μl krwi	odsetek	liczba w 1 μl krwi
K_1	3 900	39%	1550	54%	2140	7%	270
D_1	7 068	41%	2900	52%	3700	7%	490
K_2	3 060	47%	1430	49%	1940	3%	90
D_2	9 300	39%	3620	55%	5110	6%	550
D_3	16 630	43%	7150	50%	8310	7%	1160

Formy morfologiczne jąder w limfocytach krów chorych (D_3) i podejrzanych o białaczkę (D_1 i D_2) nie różnią się od form jąder w limfocytach zwierząt zdrowych (K_1 i K_2); występują natomiast różnice w proporcjach liczbowych poszczególnych form jąder w limfocytach grup D_1 , D_2 i D_3 .

W grupie D_1 można odnotować nieznaczne zwiększenie częstości występowania limfocytów z jądrami pierścieniowymi przy jednoczesnym niewielkim obniżeniu odsetka limfocytów z mikrojąderkami w stosunku do grupy K_1 .

W grupach D_2 i D_3 można zauważyć również wahania liczbowe odsetka limfocytów z jądrami pierścieniowymi i mikrojąderkami przy stałym, choć niedużym wzroście odsetka limfocytów z jądrami aktywnymi (tab. 2).

Zmiany lizosomów w limfocytach zwierząt doświadczalnych polegały głównie na różnicy w liczbie lizosomów w tych komórkach, a także rodzaju reakcji enzymododatniej kwasnej fosfatazy w porównaniu do tych parametrów w limfocytach krwi obwodowej zwierząt zdrowych. W grupie D_1 — następuje wzrost odsetka limfocytów, w których nie stwierdza się lizosomów, w porównaniu do grupy K_1 . Podobnie w grupie D_2 — w stosunku do grupy K_2 można zauważyć zwiększenie częstości występowania limfocytów z negatywną reakcją na obecność błon lizosomalnych. Jednocześnie ulega podwyższeniu odsetek limfocytów z lizosomami drobnymi rozproszonymi w całej cytoplazmie limfocyta.

W badaniu aktywności fosfatazy kwasnej limfocytów stwierdzono jedynie komórki enzymododatnie.

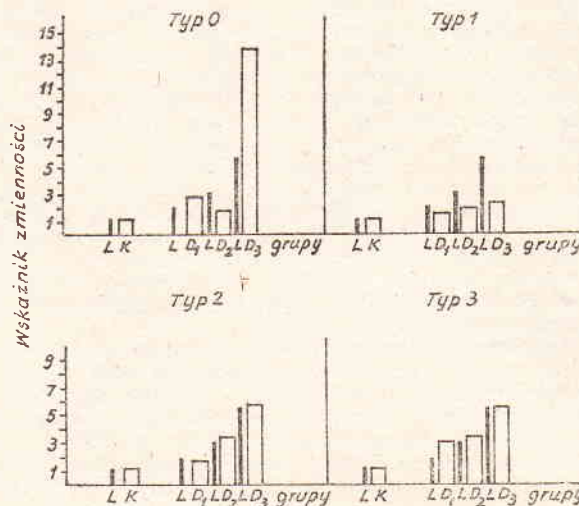
Reakcja określająca aktywność fosfatazy kwasnej w grupach D_1 , D_2 i D_3 wykazuje wzrost odsetka limfocytów z dyfuzywnym typem reakcji w porównaniu do wartości odsetka tego rodzaju enzymododatniej reakcji w limfocytach zwierząt zdrowych (K_1 i K_2). Wskaźnik zmienności dla grupy $D_1 = 3,7$; $D_2 = 6,0$; $D_3 = 9,2$.

Można stwierdzić, że temu wzrostowi częstości występowania limfocytów z dyfuzywnym typem reakcji na fosfatazę kwasną w grupach zwierząt chorych lub podejrzanych o białaczkę towarzyszy wzrost odsetka limfocytów, w których nie obserwuje się występowania lizosomów (ryc. 4).

Wyniki badań liczby lizosomów i aktywności fosfatazy kwasnej w limfocytach w poszczególnych grupach zwierząt doświadczalnych i zdrowych ilustruje tab. 3.

Przeprowadzona w uzupełnieniu badań hematologicznych metoda immunodifuzyj w celu wykrycia przeciwciał dla wirusa białaczki bydła, wykazała zgodność z oceną hematologiczną w grupach zwierząt

zdrowych i chorych. Rozbieżne wyniki w grupach zwierząt podejrzanych o białaczkę mogą być spowodowane opóźnieniem występowania przeciwciał w surowicy w stosunku do zmian hematologicznych. Podobne rezultaty otrzymywali również inni autorzy (7, 12).



Ryc. 4. Charakterystyka morfologiczna lizosomów limfocytów krwi obwodowej u krów chorych na białaczkę w porównaniu do limfocytów prawidłowych

Znaczny wzrost wartości wskaźnika jąderkowego w grupach zwierząt podejrzanych o białaczkę lub chorych ze względu na jego zmienność w porównaniu do wartości w limfocytach zwierząt zdrowych można uważać za charakterystyczną cechę jąder limfocytów bydła chorego na białaczkę. Wzrost wartości wskaźnika jąderkowego w limfocytach w przebiegu chorób proliferacyjnych obserwowano również u ludzi (6, 14, 17). Należałoby tu zaznaczyć, że u krów jedynie podejrzanych o białaczkę, następuje wzrost wskaźnika jąderkowego tak samo wysoki, jak i u zwierząt chorych w stosunku do wskaźnika w grupach kontrolnych. Wzrost wartości tego parametru mógłby mieć dodatkowe znaczenie dla wczesnego wykrywania zakażenia wirusem białaczki bydła.

Z pracy Berana i Pospisila (2) wynika, że wskaźnik jąderkowy w limfocytach krów zdrowych jest znacz-

Tab. 3. Charakterystyka morfologiczna i cytoenzymatyczna lizosomów limfocytów krwi obwodowej krów

Grupy	Limfocyty		Typy limfocytów								Charakterystyka FK +					
			0		1		2		3		reak. ziarn.		reak. ziarn-d		reak. dyf.	
	%	l. bezw.	%	l. bezw.	%	l. bezw.	%	l. bezw.	%	l. bezw.	%	l. bezw.	%	l. bezw.	%	l. bezw.
K_1	$\bar{x}$ 63	3970	2	79	11	437	65	2580	21	834	30	1190	57	2262	13	516
	w 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D_1	$\bar{x}$ 62	7068	3	210	3	640	54	3820	34	2400	30	2120	42	2970	27	1910
	w 0,98	1,8	1,5	2,66	0,8	1,46	0,8	1,48	1,6	2,9	1,0	1,8	0,7	1,3	2,1	3,7
K_2	$\bar{x}$ 60	3060	2	61	10	306	59	1805	28	857	20	612	66	2020	13	398
	w 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D_2	$\bar{x}$ 69	9300	1	93	6	560	61	5670	31	2880	22	2050	52	4840	26	2410
	w 1,15	3,0	0,5	1,5	0,6	1,8	1,0	3,14	1,1	3,4	1,1	3,35	0,8	2,4	2,0	6,0
D_3	$\bar{x}$ 77	16710	5	835	4	670	63	10530	28	4680	21	3510	56	9360	22	3680
	w 5,5	2,5	13,7	0,4	2,19	1,1	5,8	1,0	5,5	1,0	5,7	1,1	4,6	1,7	9,2	

Objaśnienia: w — wskaźnik zmienności, $\bar{x}$ — średnia arytmetyczna.

nie wyższy ($2,28 \pm 0,28$) od wartości uzyskanych w niniejszej pracy. W grupach kontrolnych (K_1 i K_2) autorzy ci stosowali jednak nieco inną metodę wybarwienia jąder. Wartości wskaźnika jąderkowego uzyskane w limfocytach krów grupy kontrolnej są zbliżone do wskaźnika w limfocytach ludzi zdrowych, gdzie $wj = 1,076 - 0,06$ (16), a także w limfocytach krów — $1,17 \pm 0,07$ (8).

Jak już zaznaczono — zmiany form morfologicznych jąder w limfocytach krów chorych na białaczkę są nieznaczne; na uwagę zasługuje wzrost odsetka limfocytów z jąderkami aktywnymi w grupie D_3 . Jest to bowiem cecha jąderki występująca również w limfocytach przewlekłej białaczki limfatycznej u ludzi i można ją przyjąć jako cechę limfocytów białaczkowych (6). Wzrost liczby limfocytów, w których nie stwierdzono lizosomów w grupach zwierząt podejrzanych o białaczkę lub chorych, ma podobny charakter jak w limfocytach ludzkich w przewlekłej białaczce limfatycznej (6).

Dane z piśmiennictwa dotyczące chorób limfoproliferacyjnych (4) potwierdzają własne obserwacje wzrostu liczby limfocytów bez fluorescencji błon lizosomalnych, a także upośledzenie enzymów układu lizosomalnego w limfocytach.

Test aktywności fosfatazy kwaśnej w limfocytach jako znacznika enzymatycznego lizosomów jest dość powszechnie używany w medycynie ludzkiej (11). Zastosowany w pracy sposób oceny reakcji enzymododatniej z równoległym badaniem morfologii lizosomów (błony lizosomalne) pozwala na dokładniejszą ocenę funkcji tych organelli.

Stwierdzony wzrost odsetka limfocytów z reakcją dyfuzyjną u zwierząt grup D_1 , D_2 i D_3 (doświadczalnych) towarzyszy wzrostowi odsetka limfocytów bez „wykrywalnych” lizosomów. Świadczyć to może o destrukcji błon lizosomalnych i przemieszczeniu fosfatazy kwaśnej (znacznika lizosomów) w formie rozproszonej do cytoplazmy limfocytów. Ta cecha limfocytów białaczkowych może przemawiać za charakterem „niepełnowartościowej” komórki i jest wynikiem stanu zaawansowania choroby.

Stosowane w pracy metody określania liczebności i stanu czynnościowego jąderki i lizosomów limfocytów mogą stanowić uzupełnienie rutynowych metod hematologicznych, są proste i szybkie w wykonaniu. Zastosowanie oceny tych organelli jako dodatkowego testu w diagnostyce białaczki bydła rokuje możliwość wcześniejszego i bardziej dokładnego wykrywania zwierząt zakażonych wirusami białaczki.

W n i o s k i

1. Limfocyty krwi obwodowej bydła podejrzanego lub chorego na białaczkę różnią się od limfocytów osobników zdrowych pod względem liczby jąderki i lizosomów, aktywności jąderkowej i fosfatazy kwaśnej.

2. Wzrost wartości wskaźnika jąderkowego w limfocytach krów doświadczalnych jest statystycznie istotny w porównaniu do wartości u krów zdrowych.

3. Populacja limfocytów krów białaczkowych charakteryzuje się wzrostem odsetka komórek nie wykazujących fluorescencji lizosomów przy jednoczesnym wzroście limfocytów z dyfuzyjnym typem reakcji enzymododatniej na aktywność fosfatazy kwaśnej.

4. Badane parametry mogą stanowić uzupełniający wskaźnik diagnostyczny do obecnie stosowanych metod hematologicznych.

P i ś m i e n n i c t w o

1. Barka T., Anderson P.: J. Histochem. Cytochem. 10, 741, 1962.
2. Beran M., Pospisil K.: Folia haemat. Lipsk 88, 287, 1987.

3. Blum R. S., Glade P. R., Chessin L. N.: Blood 33, 87, 1969.
4. Douglas S. D., Cohen G., Köning E., Brittinger G.: Blood 41, 511, 1973.
5. Grabarczyk M., Mázewski B., Malec J., Sitarska E.: Arch. Immun. Ther. 27, 73, 1979.
6. Grabarczyk M., Kopeć J., Sitarska E., Leszko B.: Materiały XIII Zjazdu P.T.H. i T. Katowice, 1979.
7. Grundboeck M.: Medycyna Wet. 33, 527, 1977.
8. Kluciński W., Kopeć J., Borzemska W., Malicka E., Sitarska E.: Morfologiczne zmiany jąderki w limfocytach kur w patologii układu limfatycznego. Medycyna wet., (w druku).
9. Kopeć J., Malec J., Sitarska E.: Arch. Immun. Ther. 28, 145, 1980.
10. Lisiewicz J.: Diagn. Lab. 5—6, 371, 1975.
11. Lisiewicz J.: Pol. Tyg. Lek 31, 1659, 1976.
12. Mammerick M., Portetelle D., Kettann R., Gysdael J., Burny A., Degekel D.: Europ. J. Canc. 12, 433, 1976.
13. Potmesil M., Smetana K.: Folia biol. (Praga) 300, 15, 1969.
14. Smetana K., Janele J., Malinský L.: Neoplasma 13, 643, 1966.
15. Smetana K., Lejnar J., Potmesil M.: Folia haemat. Lipsk 91, 331, 1969.
16. Smetana K., Potmesil M.: Folia haemat. Lipsk 93, 16, 1970.
17. Undritz E.: Schweizer. med. Wschr. 102, 1594, 1972.

Adres autora: doc. dr hab. Ewa Sitarska, ul. Międzynarodowa 60 m. 14, 03-922 Warszawa.

Ситарская Э., Копець И., Грабарчик М. — Морфологическая характеристика лимфоцитов периферической крови коров, больных лейкозом.

В лимфоцитах здоровых и больных лейкозом коров исследовали изменения нуклеолярного коэффициента и разных типов ядрышек (гомогенных, кольцевидных и точечных) а также провели количественную оценку числа лизосомов и кислой фосфатазы.

Определено, что лимфоциты коров, больных лейкозом, характеризует большое увеличение нуклеолярного коэффициента. Одновременно замечено повышение процента лимфоцитов без лизосомной флуоресценции и с диффузионным типом кислой фосфатазы.

Исследование ядрышек и лизосомов лимфоцитов может оказаться полезным дополнительным показателем в диагностике лейкоза крупного рогатого скота.

Sitarska E., Kopeć J., Grabarczyk M. — Morphological characteristics of nucleoli and lysosomes in lymphocytes of leukaemic cows.

There were analysed the changes of nucleolar coefficient, forms of nucleoli, semi-quantitative evaluation of lysosomes and activity of acid phosphatase in peripheral blood lymphocytes of healthy, suspected leukaemia and leukaemic cows. It was confirmed a statistical increase of nucleolar coefficient in peripheral blood of lymphocytes of leukaemia suspected and leukaemic cows as well lymphocytes percentage with dense nucleolus in leukaemic animals. There were observed a parallel increase of lymphocytes count without detectable lysosomal fluorescence and an increased percentage of lymphocytes with enzyme-positive-diffusion reaction to acid phosphatase. The characteristic changes of nucleoli and lysosomes in lymphocytes of leukaemia suspected and leukaemic animals can assist in the diagnosis.

MAKER D., COACKLEY W., SMITH V. W.: Izolacja syncycjalnego wirusa bydła. (Isolation of bovine syncytial virus). Aust. vet. J. 56, 153—154, 1980 (3).

W jednej z 25 hodowli jąder buhajów w piątym pasażu stwierdzono powstawanie syncycjów. To działanie cytopatyczne z łatwością przenoszono po trypsynowaniu i repasazu komórek. W preparatach z mikroskopu elektronowego wykazano obecność cząstek wirusa o średnicy 10 nm i typowej budowie dla wirusa syncycjalnego.

G.