

JANUSZ A. MADEJ, JAN KURYSZKO*

Badania cytoenzymatyczne oraz ultrastrukturalne narządów kotów chorych na zakaźne zapalenie otrzewnej (FIP)

Katedra Anatomii Patologicznej i Weterynarii Sądowej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

*Katedra Anatomii, Histologii i Embriologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Kozuchowska 1-3, 51-631 Wrocław

Summary

Cytoenzymatic and ultrastructural studies of internal organs of cats suffering from feline infectious peritonitis

Cytoenzymatic changes in phagocytes present in organs and tissues with signs of inflammation have been presented, as well as the ultrastructural picture of *peritoneum* in cats affected with feline infectious peritonitis. A significant increase of acid phosphatase, lysozyme, beta-glucuronidase and nonspecific alpha esterase in lysosomes of histiocytes, macrophages and neutrophils were discovered. Ultrastructural examinations revealed an increase of collagen fibres under the *epithelium* and a subsequent decrease of integrity and the detachment of mesothelial cells that made the *peritoneum* less resistant to infection.

Zakaźne zapalenie otrzewnej kotów – FIP (feline infectious peritonitis) po raz pierwszy zostało opisane w USA w 1966 r. przez Wolfe i Greisnera (11). W Polsce w 1992 r. ukazały się jednocześnie dwie prace na ten temat, tj. praca referatowa Buczka i wsp. (2) oraz kliniczno-doświadczalna Madeja i wsp. (8).

FIP wywołany jest przez FIPV (feline infectious peritonitis virus) replikujący się w komórkach absorpcyjnych jelita cienkiego i powodujący w zakażonych nim eksplantatach całkowitą utratę migawek mikrokosmków oraz nadżerki nabłonka walcowatego jelita (4, 11). W obrazie histologicznym w naturalnych zakażeniach przez FIPV obserwuje się ziarniniaki w narządach, zbudowane z limfocytów, histiocytów i plazmocytów, naloty włókna na powierzchni narządów wewnętrznych i błon surowiczych oraz odczyn fibroplastyczny. Dokładny opis zmian morfologicznych w FIP przedstawiono we wcześniejszej pracy, z jednoczesną próbą wyjaśnienia złożonego patomechanizmu choroby opierającego się na zespole DIC (disseminated intravascular coagulation) – (8).

Celem pracy było przedstawienie zmian cytoenzymatycznych w komórkach fagocytarnych, obecnych w narządach i tkankach objętych procesem zapalnym oraz obrazu ultrastrukturalnego otrzewnej u kotów chorych na FIP.

Materiał i metody

Badania wykonano u 7 kotów chorych na FIP oraz u dwu zwierząt kontrolnych. Do badań cytoenzymatycznych pobierano wycinki wątroby, nerek i węzłów chłonnych krezkowych oraz sieci i otrzewnej ściennej, z których sporządzano skrawki kriostatowe grubości 5 mikronów. Oznaczano aktywność enzymów markerowych lizosomów komórek fagocytarnych, tj. fosfatazy kwaśnej (FK – EC 3.1.3.2) metodą Gomoriego (9), beta-glukuronidazy (beta-GU – EC 3.2.1.31) metodą Hayashi i wsp. (9), lizozymu (Li – EC 3.2.1.17) – pośrednio przy pomocy FK wg Kotza i wsp. (7) oraz esterazy niespecyficznej alfa (alfa-EN – EC 3.1.1.1) metodą Nachlasy i Seligmana (9). Wycinki inkubowano w kierunku na FK, Li i beta-GU w temp. 37°C (310 K) przez 45 min., a alfa-EN w temp. pokojowej

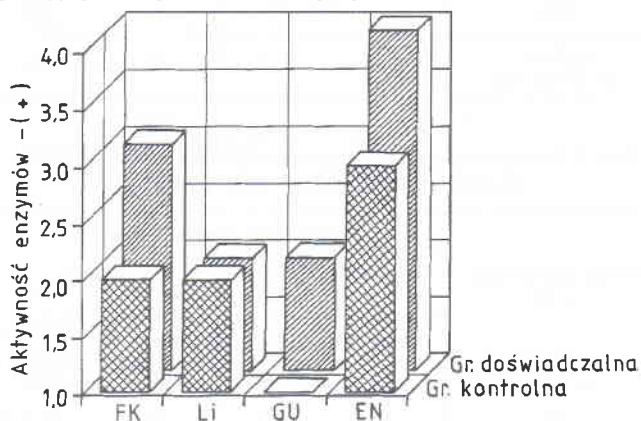
przez 10 minut. Preparaty kontrolne, tzw. kontrola ujemna, inkubowano bez użycia substratów.

Badania mikroskopowo-elektronowe – wycinki otrzewnej po odpowiednim utrwaleniu zatapiano w Eponie 812. Skrawki ultracienkie kontrastowano octanem uranylu i roztworem cytrynianu ołowiu. Materiał analizowano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym Philips EM 301.

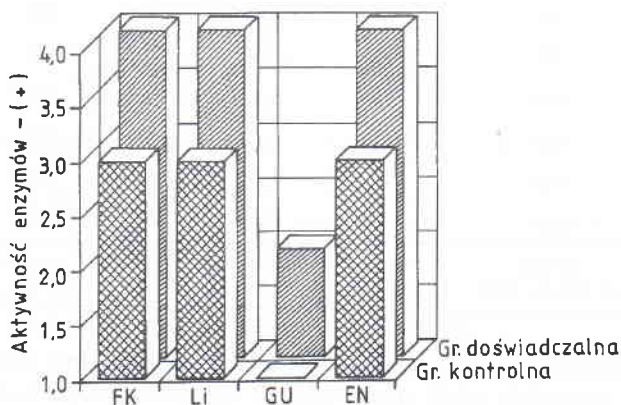
Wyniki i omówienie

Aktywność cytoenzymatyczną w histiocytach, makrofagach i mniej licznych neutrofilach narządowych i tkankowych w kierunku na FK, Li, beta-GU i alfa-EN przedstawiono na ryc. 1-3. Aktywność ww. enzymów notowano także w pojedynczych limfocytach i plazmocytach. Reakcje enzymatyczne oznaczano wg symboli: + odczyn dodatni, ++ odczyn wzmożony, +++ odczyn silnie dodatni i ++++ odczyn bardzo silnie dodatni.

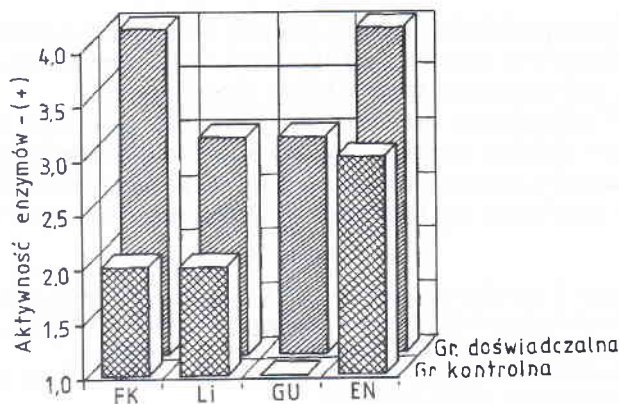
Fosfataza kwaśna, lizozym oraz beta-glukuronidaza lokalizowały się w strukturach lizosomalnych komórek fagocytarnych, zaś esteraza niespecyficzna dodatkowo w ich cytoplazmie i z reguły notowano wyraźny wzrost aktywności wymienionych enzymów u kotów chorych na FIP w postaci odczynu ziarnistego. W przypadku rozpadu lizosomów spotykano odczyn dyfuzyjny na wymienione enzymy.



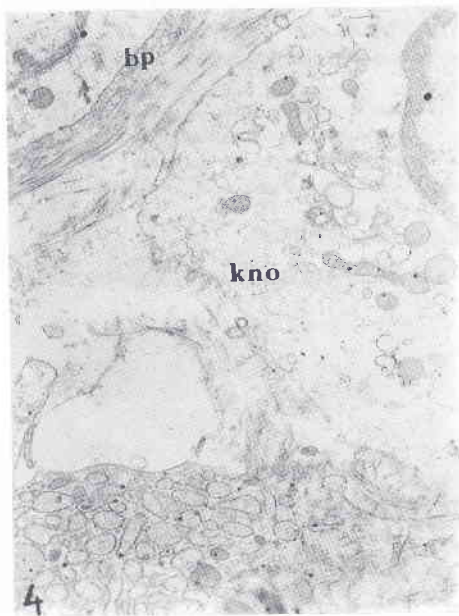
Ryc. 1. Aktywność enzymów lizosomalnych w histiocytach u kotów z FIP



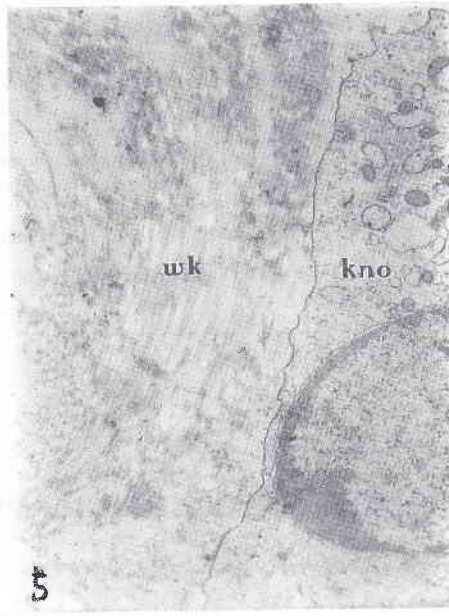
Ryc. 2. Aktywność enzymów lizosomalnych w makrofagach u kotów z FIP



Ryc. 3. Aktywność enzymów lizosomalnych w neutrofilach u kotów z FIP



Ryc. 4. Włókna kolagenowe pojawiające się w strefie tkanki łącznej pod nabłonkiem otrzewnowym; kno – komórki nabłonka otrzewnowego, bp – błona podstawna. Pow. 7000 ×



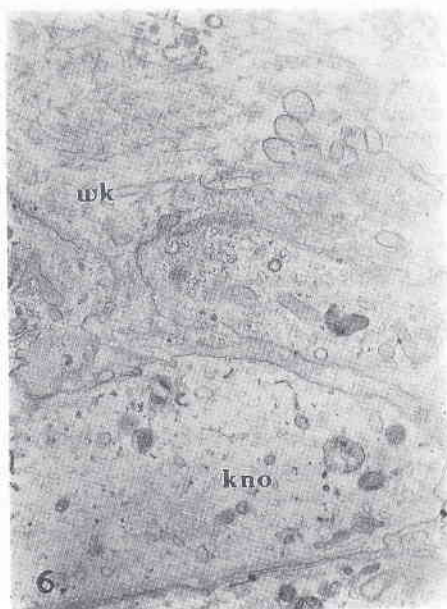
Ryc. 5. Strefa włókien kolagenowych pod komórką nabłonka otrzewnowego; wk – włókna kolagenowe, kno – komórka nabłonka otrzewnowego. Pow. 10 000 ×

Obserwowane u badanych kotów komórki fagocytarne, zwane także komórkami MPS (mononuclear phagocytes system) lub PMN (komórkami polimorfonuklearnymi), ulegały wyraźnemu pobudzeniu, co wyrażało się wzrostem aktywności enzymatycznej. Stymulacja tych komórek jest podstawowym mechanizmem obrony immunologicznej i przeciwwirusowej, w następstwie której wytworzone są różne cytokiny (interferon, interleukiny) i pobudzona aktywacja swoistych i nieswoistych procesów odpornościowych kontrolowanych przez limfocyty B, T i komórki NK (natural killers) – (6). Aktywowane fagocyty są zwane „gniewnymi makrofagami – angry” lub „żadnymi krwi – blood thirsty” i mogą niszczyć wirusy na drodze cytotolitycznej i cytotoxycznej, produkcji defektywnych wirionów oraz syntezy interferonu (6). Makrofagi wykazują bezpośrednią cytotoksyczność wobec zakażonych wirusem komórek, niezależnie od specyficznych przeciwciał ani obecności składników dopełniacza, a także

hamują replikację wirusów wydzielając argininazę interferującą z wykorzystaniem argininy przez cząsteczki wirusa. Kontakt z pewnymi antygenami, np. glikoproteidem D wirusa *Herpes simplex*, powoduje gwałtowną syntezę interferonów przez makrofagi, co chroni sąsiednie komórki gospodarza przed zakażeniem.

Istotną rolę w procesie zapalnym w FIP odgrywają także neutrofile. W wysięku zapalnym są one głównym źródłem enzymów lizosomalnych uszkodzających otrzewną, która cechuje się wówczas dużą zlepnością. Jest to korzystne zjawisko, gdyż sprzyja szybkiemu ograniczeniu procesu chorobowego. Szczególną rolę spełnia tu sieć, która może się przemieszczać w obrębie jamy brzusznej i jest mobilizowana jako narząd ochronny. Łatwość oklejania uszkodzonych narządów niesie też ze sobą możliwość wzmożonej waskularyzacji przez anastomozowanie jej naczyń z naczyniami narządowymi.

Neutrofile wyposażone są w dwa systemy wewnątrzkomórkowego zabijania drobnoustrojów, tj. system zależny od tlenu i tzw. tlenowo-niezależny (12). Po aktywacji enzymatycznej, co obserwowano w badaniach własnych, neutrofile zwiększają zapotrzebowanie na O_2 , a proces ten nosi miano wybuchu oddechowego (respiratory burst) z następowym uwalnianiem O_2^- , H_2O_2 , $OH^\bullet$ i OCI^- (1, 3, 5). Innymi związkami uczestniczącymi w fagocytozie są: oksydaza NADPH, flawoproteina, cytochrom b 245, czynniki cytozolowe, system peroksydaza – H_2O_2 – halogenki oraz tlen singletowy (5). Równolegle zwraca się uwagę na zdolność neutrofilów do zabijania w systemach niezależnych od tlenu, tj. przez defensyny, lizozym, katepsynę G, BPI (bacteriocidal permeability encreasis protein) i laktoferynę (10). Wzrost aktywności enzymatycznej lizozymu obserwowano także u badanych przez nas kotów chorych na FIP.



Ryc. 6. Strefa włókien kolagenowych i degenerujące komórki nabłonka otrzewnowego; wk – włókna kolagenowe, kno – komórki nabłonka otrzewnowego. Pow. 7000 ×



Ryc. 7. Degenerująca komórka nabłonka otrzewnowego, obecna w płynie otrzewnowym. Pow. 10 000 ×

Niestety, część z wym. związków może uszkadzać tkankę prawidłową (10). Znajduje to odzwierciedlenie w badaniach ultrastrukturalnych u kotów chorych na zakaźne zapalenie otrzewnej, niezależnie od działania wirusa FIPV. Obserwowano bowiem w obrębie otrzewnej wyraźne zwiększenie ilości włókien kolagenowych w strefie tkanki łącznej zlokalizowanej pod międzybłonkiem (ryc. 4-6). Powoduje to rozluźnienie wiązań między komórkami *mesothelium* z następową jego dezintegracją powodującą zaburzenia w barierze wyścielającej jamę otrzewnową. Komórki odklejają się od błony podstawnej i przedostają się do płynu surowiczego obecnego w jamie brzusznej (ryc. 7). Tak uwolnione komórki mezotelialne ulegały zmianom degeneracyjnym, co wyrażało się zmniejszeniem w nich obszarów ziarnistej siateczki śródplazmatycznej, wakuolizacją pozostałej jej części, upłynnieniem cytoplazmy podstawowej i agregacją *mitochondrium*. Brak zatem strefy nabłonkowej obniża bardzo wyraźnie funkcję obronną otrzewnej u kotów chorych na FIP, wyrazem czego jest uogólnienie się procesu zapalnego w całej jamie brzusznej.

Po infekcji wirusowej większość białek produkowanych w cytoplazmie i prezentowanych na powierzchni komórki stanowią peptydy wirusa, stąd przyjmuje się, że ich antygeny stymulują głównie limfocyty CD δ . Także limfocyty CD δ wykazują bezpośrednie zdolności cytotoksyczne i tym sposobem przyczyniają się do usuwania komórek zakażonych wirusem. Ko-

mórki te produkują interferon gamma i interleukinę 2. Udział limfocytów w ziarniniakach zapalnych, wprowadzie nieznaczny, zaobserwowano także u kotów chorych na FIP.

W późniejszym stadium choroby dochodzi jednak do defektów układów enzymatycznych w lizosomach komórek fagocytarnych i zaburzeń ich funkcji żernych, następstwem czego jest uogólnienie się zakaźnego zapalenia otrzewnej u kotów.

Piśmiennictwo

1. Babier B. M., Kuver R., Curmutte J. T.: J. biol. Chem. 263, 1713, 1988.
2. Buczek J., Depiula W., Buczek K.: Medycyna Wet. 48, 301, 1992.
3. Dinanier M. C., Orkin S. H.: Immundefic. Rev. 1, 55, 1988.
4. Groot R. J.: A molecular study of feline infectious peritonitis virus. Rijksuniversiteit, Utrecht 1988, s. 92.
5. Kantorski J., Zeman K.: Post. Biol. Kom. 4, 361, 1990.
6. Kostro K.: Medycyna Wet. 49, 493, 1993.
7. Kotz J., Basmadji K., Madej J. A.: Medycyna Wet. 34, 89, 1978.
8. Madej J. A., Klimontowski S., Kielbowicz Z.: Medycyna Wet. 48, 305, 1992.
9. Pearse A. G. E.: Histochemistry, theoretical and applied. Little, Brown and Comp., Boston 1969.
10. Thomas E. L., Lehee R. I., Rest R. F.: Rev. Infec. Dis. 10, 450, 1988.
11. Walter J.: Morphologische und immunohistochemische Untersuchungen zur Antigenlokalisation bei der Feline Infectiöse Peritonitis (FIP) unter Verwendung monoklonaler Antikörper. Praca dokt., Freie Universität, Berlin 1987.
12. Wendel A.: Adv. clin. Enzymol. 6, 161, 1988.

Adres autora: prof. dr hab. Janusz A. Madej, ul. Liskego 4/5, 50-345 Wrocław

KORNEL RATAJCZAK

Model własny aparatu oddechowego dla koni

Katedra i Klinika Chirurgii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, pl. Grunwaldzki 51, 50-039 Wrocław

Summary

A new model of anaesthetic-respiratory equipment for horses

The paper presents observations collected from 7 horses during general anaesthesia with controlled ventilation (CV) used for surgical procedures (laparotomy, correction of long bone fractures). After the horses had been restrained (guiphenesin 0.1 g/kg b.w.), spontaneous ventilation was eliminated by the use of muscle relaxant (pancuronium 0.1 mg/kg b.w.) and replaced by CV (IPPV = 25-35 cm H₂O f = 13, V_{min} = 52 l/min, I/E = 2:3) realized by the „bag in box” respirator. General anaesthesia was maintained using an inhalation technique for an average of 110 min. using 2 vol% halothane with oxygen administered in a quantity of 2.5-3.5 l/min. Artificial ventilation maintaining breathing higher than natural (values V_t and V_{min}) protected the horses from metabolic disturbances. The anaesthesia performed with an anaesthetic-respiratory apparatus made in our department according to the conception of the author was characterized by a complication free course with a preferably rapid induction and a fast recovery. The variant of anaesthetization with mechanical respirators should be applied for long-lasting operations where full relaxation and no motion is required. This type of procedure gives better conditions for work the abdominal cavity and orthopedic procedures.

Znieczulenie wziewne, chociaż odznacza się dużą sterownością, obciąża jednak funkcję wentylacyjną płuc. Wynika stąd, że warto dla polepszenia wymiany gazowej upośledzony

oddech zastąpić, na czas anestezji, sztucznym. Idea wyłączenia, przed przystąpieniem do zabiegu, oddechu spontanicznego (OS) i stosowania mechanicznego, w formie oddychania z przerywanym ciśnieniem dodatnim (IPPV), zaczęła być praktycznie wykorzystywana w medycynie przed 40 laty. Próby zastosowania OK u koni motywowane były początkowo li tylko potrzebą zaradzenia niedomodze oddechowej, wynikłej z przyczyn urazowych, tęcza lub z przedawkowania anestetyków lub sukcynylocholino, używanej onegdaj powszechnie do kładzenia farmakologicznego. Dla tej grupy wskazań, którą można określić resuscytacyjnymi, Rankin przedstawił konstrukcję worka, który za pośrednictwem nozdrzy połączony był z płucami zwierzęcia. Również w latach 50. Schebitz używa balonu gumowego zgniatanego nogą, a Überreiter zamawia urządzenie napędzane ręcznie, przypominające miech kowalski. W 1964 r. opisano aparat do wentylacji wykonany na bazie odkurzacza (3, 5, 9, 10). Pierwsze znieczulenie z wyłączonym oddechem własnym przeprowadził Fowler posługując się medycznym wentylatorem Mark 7. To samo zadanie Weaver rozwiązuje za pomocą wentylatora pancernego. W 1971 r. Smith, jako pierwszy, buduje w całości oryginalny respirator dla koni (1, 11, 13, 14).

Od 12 lat wykonujemy w Klinice anestezję halotanową koni aparatem anestetycznym skonstruowanym przez autora (6). Na podstawie własnych ustaleń oraz doświadczeń innych konstatuję jednak, że anestetyk, ułożenie dużego zwierzęcia do operacji, jak i czynniki aparaturowe doprowadzają do powstania kwasicy oddechowej, co stwarza konkretne problemy