

OSMOTSKA REZISTENCIJA ERITROCITA HYBRO KOKOŠI

Z. Stojević, Metka Vlahek

Sažetak

Metodom po Hamburgu istražena je osmotska rezistencija eritrocita kokošiju teške pasmine linije Hybro. Krv za pretrage uzimana je venepunkcijom krilne vene uz upotrebu heparina kao antikoagulansa tijekom razdoblja odgoja, potom nesenja sve do izlučenja i to u 11., 14., 18., 22., 27., 31., 35., 45. i 53. tjednu starosti. Rezultati pokusa pokazali su kako poslije 11. tjedna starosti raste otpornost kokošnjih eritrocita prema hipotoničnim otopinama. Značajan porast opažen je kako u pogledu minimuma tako i maksimuma osmotske rezistencije. Metoda određivanja osmotske rezistencije pokazala se pouzdana i vrlo prikladna za rad u terenskim uvjetima.

Uvod

Eritrociti su visokodiferencirane stanice krvi bez mogućnosti reprodukcije. U ptica su to elastične, eliptične, bikonveksne spljoštene stanice, s tamnoljubičastom jezgrom bogatom kromatinom. Broj eritrocita u 1 litri krvi nešto je manji nego u sisavaca i kreće se prosječno od $2,2 - 3,6 \times 10^{12}/L$ (Mehner i Hartfiel, 1983.). Njihovo nastajanje, kao i sazrijevanje odvija se u koštanoj srži i vezano je uz niz čimbenika koji su u osnovi podijeljeni u dvije skupine: nutritivni, oni koji ulaze u sastav eritrocita; aminokiseline, željezo i maturacioni koji sudjeluju u zrenju eritrocita; bakar, cink, vitamini B skupine i vitamin C.

Prosječni životni vijek eritrocita u kokoši puno je kraći od onog u sisavaca i iznosi 28-35 dana (Sturkie, 1986.). Kad ostare u njima se odvija čitav niz promjena; pad aktivnosti enzima, osobito LDH i GOT (Walter i sur., 1965.), kontrakcija jezgre i stvaranje vakuola u njima. Na koncu puca membrana i razorenu stanicu fagocitira RES. Hemoglobin se raspada u jetri na hem i globin. Konačno hem se razgradi na željezo i žučne boje. Željezo se upotrijebi u novoj sintezi, a žučne boje se izlučuju putem žuči u sadržaj crijeva (Bell i Freeman, 1971.).

Dr. sc. Zvonko Stojević, docent, Zavod za fiziologiju i radiobiologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 10000 Zagreb, Heinzelova 55; Mr. sc. Metka Vlahek, dipl. vet., Veterinarska Stanica Prelog, 40323 Prelog, Kralja Zvonimira 51.

Osmotska rezistencija crvenih krvnih stanica ovisi o osmotskom tlaku tekućine u kojoj se oni nalaze. U hipertoničnoj se smežuraju, a u hipotoničnoj bubre. U otopinama s niskim osmotskim tlakom (hipotoničnim) eritrociti primaju u sebe vodu, a u svrhu izjednačavanja osmotskog tlaka unutar i izvan stanice. Kad količina vode unutar stanice bude takva da membrana ne može više izdržati hidrostatski tlak u unutrašnjosti dolazi do njezina pucanja. Ovu pojavu nazivamo hemolizom. Općenito vrijedi pravilo kako mladi eritrociti imaju elastičniju pa prema tome i otporniju membranu i pucaju pri nižem osmotskom tlaku od starijih. Prema tome prevladavaju li u krvi mladi eritrociti hemoliza će nastupiti kasnije, odnosno osmotska rezistencija bit će povišena i obrnuto. Odnos mlađih i starijih eritrocita u krvnom optoku zdravih životinja je konstantan i ovisi o stanju eritropoetskih organa. Na osnovi ove međuovisnosti upotrebljava se određivanje osmotske rezistencije kao klinička metoda za procjenu funkcije eritropoetskog sustava.

Ptice imaju veće vrijednosti osmotske rezistencije od sisavaca. O tome postoje brojni podaci, no na osnovi njih se ne može postaviti standard koji bi vrijedio za sve vrste peradi i starosnu dob.

Tako Mitin i Emanović (1965.) navode podatak kako minimum osmotske rezistencije počinje s 0,46% NaCl, a maksimum nastupa tek u 0,14% otopini NaCl. Podaci se odnose na kokoši različitih vrsta. Sturkie, (1986.) navodi podatke za piliće s minimumom 0,40% NaCl, a maksimumom 0,28%. Oyewale i Aijibade (1990.), istražuju osmotsku rezistenciju purana i napominju kako eritrociti mladih pokazuju veću otpornost od starijih životinja.

Sve navedene raznolikosti navele su nas da istražimo osmotsku rezistenciju eritrocita teške pasmine nesilica linije, Hybro. U prvom redu želja nam je bila uspostaviti okvirne standarde s obzirom na dob. Isto tako utvrditi mogućnost rada metodom po Hamburgeru za koju nisu potrebni mjerni instrumenti pa je kao takva lako primjenljiva u terenskim uvjetima.

Materijal i metode

Pokusi su obavljani na roditeljskim kokošima Hybro. Kokoši za pokus držane su prema uvjetima koje propisuje proizvođač ove genetske linije, tvrtka "Euribrid", Nizozemska. Krv za analizu uzimana je venepunkcijom krilne vene uz upotrebu heparina kao antikoagulansa i to devet puta. Prvi puta u 11. tjednu starosti, a potom u 14., 18., 22., 27., 31., 45. i na kraju u 53. tjednu starosti kada je jako izlučeno. U dobivenoj krvi određena je osmotska rezistencija eritrocita po Hamburgeru (Fisher - Herman, 1956.). U svakoj seriji pokusa krv je uzeta od 12 kokošiju odabranih nasumce iz jata za svaku jedinku određen je minimum i maksimum osmotske rezistencije.

Princip ove metode sastoji se u postupnom razrijeđivanju 1% otopine NaCl destiliranom vodom s intervalom od 0,2%. Ovime se smanjuje i osmotski tlak u otopini. Potrebne reagencije su: točno 1% otopina NaCl i destilirana voda.

U stalak se stavi 20 epruveta označenih brojevima. Graduiranim pipetama odmjeri se u svaku epruvetu točno određena količina 1% - tne otopine NaCl i destilirane vode po slijedećoj shemi:

Broj epruvete	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1% otopina NaCl ml	9,60	9,40	9,20	9,00	0,80	8,60	8,40	8,20	8,00	7,80
Destilirana voda ml	0,40	0,60	0,80	1,00	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00	2,20
Koncentracija NaCl%	0,96	0,94	0,92	0,90	0,88	0,86	0,84	0,82	0,80	0,78

Sadržaj epruvete dobro se izmiješa te nakon toga ukapa kapaljkom (4-5 kapi) krvi u svaku epruvetu. Svaka epruveta začepi se palcem pri vrhu i lagano okrene kako bi se krv izmiješala sa sadržajem. Okretanje mora biti vrlo lagano da ne dode do mehaničke hemolize. Nakon toga epruvete se ostave stajati u stalku 1 sat. Potom se očitava minimum i maksimum osmotske rezistencije. Minimum osmotske rezistencije označava ono mjesto (tj., epruvetu) gdje se iznad istaloženog sloja eritrocita tekućina crvenkasto oboji. Zabilježi se broj epruvete, odnosno koncentracija NaCl-a. Ovaj podatak pokazuje pri kojoj koncentraciji počinje hemoliza starih i manje otpornih eritrocita. Potom se iza stalka stavi papir na kojem je ucrtana deblja crna crta. Prva epruveta kroz koju se jasno vidi ova crna crta označava mjesto potpune hemolize, odnosno maksimum osmotske rezistencije. Rezultati su obrađeni statistički računanjem srednje vrijednosti, standardne devijacije, srednje pogreške srednje vrijednosti i koeficijenta varijabilnosti. Značajnost razlika među rezultatima provjerena je t-testom po Studentu i Fisheru (Renner 1970.).

Rezultati i razmatranje

Rezultati pokusa prikazani su na slici 1. Kako se iz nje vidi osmotska rezistencija eritrocita kokoši "Hybro" poraste nakon 11. tjedana starosti i ta povećana otpornost prema hipotoničnim otopinama zadrži se sve do izlučenja u 53. tjednu. Provjerom značajnosti među rezultatima utvrđeno je kako kokoši u starosti od 11 tjedana imaju znakovito više vrijednosti osmotske rezistencije u odnosu prema ostalim tjednima starosti kako u pogledu minimuma tako i maksimuma. Ova značajnost kretala se na nivou od $P < 0,025$ do $P < 0,001$.

Slika 1. - OSMOTSKA REZISTENCIJA ERITROCITA KOKOŠI LINIJE HYBRO IZRAŽENA U NaCl%
 Fig. 1. - OSMOTIC RESISTENCE OF ERYTHROCYTES OF HYBRO HENS EXPRESSED AS PERCENTAGE OF NaCl



Što su numeričke vrijednosti (NaCl%) pri kojima dolazi do hemolize više, to je otpornost eritrocita manja i obrnuto. Prema tome iz ovih rezultata može se zaključiti da starije kokoši imaju veću osmotsku rezistenciju od mladih. Ovi podaci u suprotnosti su sa dosadašnjim saznanjima. Oyewale i Aijibide (1990.) i Oyewale (1991.) nalaze kako mlađe ptice imaju veću osmotsku rezistenciju od starijih. Navedeni podaci odnose se i na puru i biserku pa načelno ne moraju biti pravilo za kokoši. Što bi bilo uzrokom povećane stabilnosti membrane eritrocita starijih kokošiju ne može se iz ovih pokusa zaključiti. Moguće je iznijeti tek nekoliko pretpostavki. U prvom redu poznato je kako mladi i potpuno zreli eritrociti imaju otpornije membrane od starijih i nezrelih oblika. Tako je moguće da starije kokoši imaju stabilniji sustav eritropoeze pri čemu se u krvi nalazi manji broj bržoj hemolizi podložnih eritrocita. Isto tako, struktura membrane, posebice njezin proteinski dio, mogu utjecati na opisanu pojavu. Međutim, valja naglasiti kako cilj ovog rada i nije bio istražiti uzroke eventualnih promjena u osmotskoj rezistenciji eritrocita kokošiju već, kako je to i u uvodu naglašeno, postaviti okvirne standarde osmotske rezistencije eritrocita za ovu pasminu kokoši kao i utvrditi mogućnost pretrage ovom jednostavnom metodom. Kako je statistička obrada rezultata pokazala da nema velikih odstupanja među rezultatima unutar skupine, koeficijent varijabilnosti kretao se do maksimum 11 %, metoda po Hamburgeru, osim jednostavnosti i brzine, pokazala se i prilično pouzdanom te se kao takva može uspješno primijeniti kao klinička pretraga u peradarskoj proizvodnji. Njome se pouzdano može dobiti uvid u zdravstveno stanje hematopoetskih organa čija patologija je vezana uz neke zarazne bolesti ili uz pogrešnu ishranu; manjak nutritivnih ili maturacionih čimbenika u hrani.

LITERATURA

1. Fišer-Herman, Marija (1956): Kliničko-biokemijske pretrage. Školska knjiga, Zagreb, 1956.
2. Mahner, A., W. Hartfiel (1983): Handbuch der Geflügelphysiologie, Teil 1 VEB. Gustav Fisher Verlag, Jena, 1983.
3. Mitin, V., D. Emanović (1965): Osmotska rezistencija i hemoliza krvi kokoši. Stočarstvo, 19, 328-331.
4. Oyewale, J. O., H. A. Ajibade (1990): Osmotic fragility of erythrocytes in age-group turkeys. Vet. arhiv, 60, 43-48.
5. Oyewale, J. O. (1991): Osmotic fragility of erythrocytes of guinea-fowls at 21 and 156 weeks of age. Vet. arhiv, 61, 49-56.
6. Renner, E. (1970): Mathematisch-statistische Methoden in der praktischen Antwerung, Paul Parey, Berlin.
7. Sturkie, P. D. (1986): Avian physiology pp.112 Springer-Verlag, New York, Berlin Heidelberg, Tokyo, (1986).
8. Walter, H., J. M. Brake, F. W. Selby (1965): cit. po: Mehner i Hartfiel (1983): Handbuch der Geflügelphysiologie, Teil 1, VEB Gustav Fisher Verlag, Jena, 1983.

OSMOTIC RESISTENCE OF ERYTHROCYTES OF THE HYBRO HEN

Summary

Osmotic resistance of erythrocytes was determined by the method after Hamburger. The experiments were carried out on hens of the heavy breed line Hybro. The blood with the heparin as anticoagulant was collected by venepuncture of wing vein, in hens aged 11, 14, 18, 22, 27, 31, 35, 45 and 53 weeks, i.e. during the breeding and laying period up to the end of their exploitation. The results of the investigation have shown an increase of the resistance of erythrocytes to the hypotonic solutions after the 11th week of age which existed up to the end of the experiment. At that time the significant increase of both minimal and maximal values of osmotic resistance of erythrocytes was achieved. The measurement of osmotic resistance of erythrocytes was proved to be a suitable method under the field conditions.

Primljeno: 23. 2. 1998.