

Kądziółka A., Gašior W. — **Hyperlipoproteinaemia and atherosclerosis of coronal vessels in pigs.**

In the blood of pigs, age 5—6 years, the concentration of total cholesterol, triglycerides and lipoproteins fractions were examined. Their levels were elevated at 50—100 per cent. Post mortem the heart, brain and aorta were assayed. The atherosclerotic changes of different

degrees were found in the abdominal aorta. In the deep and superficial coronal vessels of the heart the presence of typical atherosclerotic plaques and microischemia, microinfarctions, oedema around the vessels, and interstitial fat infiltration was noticed. In the brain the lesions were of little significance. There was a relationship between hyperlipoproteinaemia and atherosclerosis, and also the dependence between heart hurts and the degree of metabolic disturbances.

KRZYSZTOF WALAWSKI, BOGUSŁAWA GLOGOWSKA, EWA KACZMARCZYK,  
GALINA KOLMAN, ZENONA KRUK

## Analiza zależności między polimorfizmem i aktywnością alkalicznych fosfataz w surowicy krwi i leukocytach bydłęcych\*)

Z Instytutu Genetyki i Metod Doskonalenia Zwierząt AR-T w Olsztynie

Alkaliczna fosfataza u ludzi i zwierząt wykazuje zróżnicowanie aktywności w zależności od płci, wieku, zaawansowania ciąży, laktacji oraz wpływu różnych czynników środowiskowych (1, 2, 3, 5, 7, 8). Aktywność tego enzymu w surowicy krwi jest wskaźnikiem diagnostycznym zaburzeń wzrostu i rozwoju, zmian nowotworowych kości oraz stanów patologicznych, przejawiających się żółtaczką mechaniczną (2, 3, 9, 12).

Występujące u bydła formy molekularne alkalicznej fosfatazy warunkowane są parą allelicznych genów autosomalnych. Gen dominujący determinuje obecność frakcji wykrywanej w surowicy krwi w strefie alfa-globulin, natomiast gen recesywny przejawia się brakiem frakcji o najszybszym tempie migracji (4, 13).

Badania Gahnego (4) przeprowadzone na 40 parach bliźniąt wskazały na genetyczne uwarunkowanie wysokiej aktywności tego enzymu. Wyniki te zostały potwierdzone przez Walawskiego i wsp. (13) na dużym materiale, obejmującym ponad 1000 krów w różnym wieku. Stwierdzono ścisły związek między polimorfizmem i aktywnością. Zwierzęta z genem dominującym charakteryzowały się średnią aktywnością 155,7 IU, natomiast homozygoty recesywne zaledwie 55,1 IU. Ponad 30% osobników przekraczało zakres zmienności  $\bar{x} \pm 2s$ , uznawany za normę fizjologiczną. W krańcowych przypadkach aktywność alkalicznej fosfatazy u zwierząt z genem dominującym przewyższała średnią obliczoną dla całej populacji o 40—70 jednostek odchylenia standardowego.

Określenie zależności między genetycznie warunkowanym polimorfizmem i aktywnością stwarza realne możliwości kształtowania zmienności enzymu w populacjach hodowlanych.

Praktyczne wykorzystanie stwierdzonych dotychczas prawidłowości wymaga jednak wszechstronnego rozpatrzenia wpływu wysokiej i niskiej aktywności alkalicznych fosfataz na przebieg procesów metabolicznych, decydujących o stanie zdrowia, odporności i wydajności zwierząt.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań nad zróżnicowaniem aktywności alkalicznych fosfataz w leukocytach, jej związku z polimorfizmem i aktywnością w surowicy krwi oraz liczbą leukocytów i procentowym udziałem limfocytów.

### Materiał i metody

Badaniami objęto 532 krowy-pierwiastki, pochodzące z czterech dużych stad bydła rasy nizinnej czarno-białej. Próbkę krwi pobierano z żyły jarzmowej w ilości około 10 ml, stosując heparynę jako środek zapobiegający krzepnięciu.

Badania polimorfizmu prowadzono metodą elektroforezy poziomej na żelu skrobiowym (11). Wprowadzono szereg własnych modyfikacji, łączących elementy elektroforezy klasycznej i cienko-warstwowej (13).

Liczbę leukocytów określano w komorze Bürkera. Badania leukogramów obejmowały obliczenie procentowego udziału limfocytów. Limfocyty barwiono metodą Pappenheima. Stosowano roztwory May-Grünwalda i Giemzy (6).

Leukocyty izolowano wykorzystując różnice w ciśnieniu osmotycznym białych i czerwonych komórek krwi. Po odwirowaniu krwi i ściągnięciu surowicy, do krwinek dodawano 0,85% roztwór  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , dokładnie mieszano i wirowano przy 3000 obr./min. Czynnici te powtarzano 2—3-krotnie ściągając każdorazowo hemolizat pompką wodną. Wyzolowane leukocyty przemycano fizjologicznym roztworem  $\text{NaCl}$ . Po odwirowaniu płyn z nad osadu komórek zlewano a leukocyty wraz z niewielką ilością płynu fizjologicznego wciągano do kalibrowanych pipet. Wyloty pipet zaklejano, a następnie pipety wraz z zawartością wirowano przez 5 minut przy 3000 obr./min. Objętość leukocytów odczytywano na skali, a następnie zawartość pipety usuwano wymuchując leukocyty wraz z płynem fizjologicznym do wcześniej przygotowanych próbek, zawierających od-

\*) Praca wykonana w ramach Problemu Międzyresortowego MR-II/9, koordynowanego przez Polską Akademię Nauk.

mierzona objętość wody destylowanej. Liczę leukocytów powodowano poprzez zamrożenie i odmrożenie próbek.

Badania aktywności alkalicznych fosfatów w surowicy i leukocytach prowadzono metodą Kinda i Kinga w modyfikacji Hansena (6). Wartość ekstynkcji przeliczano na jednostki międzynarodowe (IU). Badając aktywność w leukocytach stosowano współczynnik przeliczeniowy określający względny udział objętości leukocytów w ogólnej objętości badanej próbki.

Zmienność badanych cech scharakteryzowano na podstawie wartości średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego i współczynnika zmienności. Istotność różnic analizowano testem „t”, natomiast współzależność między cechami określano przy pomocy współczynników korelacji.

współczynnika korelacji jest niska i wynosi za ledwie  $r = +0,1229$ .

Krowy z genem dominującym wykazują pewną odrębność w porównaniu z homozygotami recesywnymi. Aktywność alkalicznych fosfatów w leukocytach jest u tych zwierząt ujemnie skorelowana z liczbą leukocytów ( $r = -0,2303$ ), natomiast w całej populacji zależności takiej nie stwierdzono ( $r = +0,0643$ ). Trudny do wykazania dla całego badanego materiału związek między polimorfizmem i aktywnością alkalicznych fosfatów w leukocytach jest wyraźnie zaznaczony u krów

Tab. 1. Aktywność alkalicznej fosfatazy w surowicy krwi i leukocytach

Stado	Liczebność	Aktywność w surowicy krwi			Aktywność w leukocytach		
		$\bar{x}$	s	v	$\bar{x}$	s	v
I	75	40,1	35,8	89,3	4276,3	2964,4	69,3
II	182	42,3	36,1	85,3	7369,4	6131,3	83,2
III	159	53,3	46,5	87,2	6388,4	6262,9	98,0
IV	116	34,0	21,1	62,1	10229,6	9354,5	91,4
Razem	532	43,5	37,6	86,4	7263,8	6933,7	95,5

### Wyniki i omówienie

W tab. 1 przedstawiono wyniki badań aktywności alkalicznej fosfatazy w leukocytach i surowicy krwi. Średnia aktywność w leukocytach wynosi 7263,8 IU i przewyższa 17-krotnie aktywność stwierdzoną w surowicy krwi. Różnicowanie występujące między stadami i poszczególnymi osobnikami w obrębie stad jest bardzo duże. Skrajne wartości wynoszą: dla aktywności w leukocytach od 142 IU do 32 189 IU, dla aktywności w surowicy od 2,4 IU do 345,4 IU. Współczynniki zmienności w większości przypadków przekraczają 80%.

Istotnym czynnikiem różnicującym aktywność w surowicy jest genetycznie warunkowany polimorfizm. Zwierzęta z genem dominującym charakteryzują się średnią aktywnością  $110,6 \pm 75,2$  IU i przewyższają średnią całej badanej populacji ( $43,5 \pm 37,6$  IU). Krowy z genem dominującym wykazują również niższą o 17% aktywność alkalicznych fosfatów w leukocytach oraz wyższą o 8% liczbę leukocytów. Różnice te, z uwagi na dużą zmienność indywidualną, okazały się jednk statystycznie nieistotne.

Podjęto próby określenia polimorfizmu alkalicznych fosfatów w leukocytach. Mimo zastosowania różnych wariantów metodycznych uzyskiwano słabe reakcje barwne, uniemożliwiające rejestrację różnic w tempie migracji poszczególnych frakcji enzymu. Wobec braku informacji o genetycznie warunkowanym polimorfizmie występująca w obrębie badanej populacji zmienność aktywności alkalicznych fosfatów w leukocytach mogła być rozpatrywana jedynie w kategoriach genetyki cech ilościowych. Przeprowadzone obliczenia wykazały, że aktywność w surowicy jest co prawda dodatnio skorelowana z aktywnością w leukocytach, jednak wartość

o nienormalnie wysokiej aktywności enzymu w surowicy. Grupa krów przekraczających zakres normy fizjologicznej charakteryzuje się również wyższą o 23,6% aktywnością enzymu w leukocytach, natomiast krowy o nienormalnie wysokiej liczbie leukocytów wykazują dwukrotnie niższą aktywność enzymu w leukocytach oraz wyższą o 12,5% aktywność w surowicy krwi.

Wobec bardzo dużej zmienności analizowanych cech jednoznaczna interpretacja uzyskanych wyników jest obecnie utrudniona. Obserwowane w obrębie badanej populacji prawidłowości wymagają kontynuacji badań nad wyjaśnieniem przyczyn i skutków zróżnicowanej aktywności alkalicznych fosfatów u bydła.

### Piśmiennictwo

1. Agergaard N., Larsen B.: Anim. Blood Grps biochem. Genet. 5, 11, 1974.
2. Ewy Z., Pater K.: Medycyna Wet. 13, 535, 1957.
3. Gabryś K.: Pol. Arch. Med. Wewn. 46, 273, 1971.
4. Gahne B.: Hereditas 57, 83, 1967.
5. Jastorowska B., Kleczkowski K., Jastorowski H.: Biul. ZHDZ PAN, 9, 37, 1965.
6. Kokot F.: Metody badań laboratoryjnych stosowane w klinice. PZWL Warszawa 1969.
7. Markiewicz K., Markiewicz Z., Kuleta Z.: Medycyna Wet. 30, 613, 1974.
8. Merkurowa E. K., Volgin V. J., Trifonova L. R.: Dokl. Vses. Akad. Sel.-choz. Nauk. 10, 26, 1972.
9. Sacibergovic A.: Veterinaria, Saraj. 17, 523, 1968.
10. Smirnov O. K.: Biul. naucz. Rab. VTZ Dubrovicy 34, 38, 1975.
11. Smithies O.: Biochem. J. 61, 629, 1955.
12. Szczeklik E.: Enzymologia kliniczna, PZWL Warszawa 1974.
13. Walawski K., Kaczmarczyk E., Kolman G., Glogowska B.: Genet. pol. (w druku), 1977.

Adres autora: dr habil. Krzysztof Walawski, ul. Bydgoska 23b m. 1, 10-243 Olsztyn.

Валявский К., Глѣговская Б., Качмарчик Э., Кольман Г., Крук Э. — Анализ зависимости между полиморфизмом и активностью щелочной фосфатазы в сыворотке крови и лейкоцитах крупного рогатого скота.

Активность щелочных фосфатаз, исследованная у 532 коров-первотелок низинной черно-пестрой породы, составила в среднем в сыворотке крови X роды, составила в среднем в сыворотке крови — 43,5 ME, в лейкоцитах — 7263,8 ME. Установили



очень большую изменчивость активности энзима. Существенным фактором, дифференцирующим активность в сыворотке, является генетически обусловленный полиморфизм. Активность в сыворотке положительно коррелируется с активностью в лейкоцитах, однако, коэффициент корреляции низок ( $r = 0,1229$ ). Животные с наибольшим числом лейкоцитов показывают значительно меньшую, чем средняя, активность щелочных фосфатаз в лейкоцитах и высшую — в сыворотке крови.

Walawski K., Glogowska B., Kaczmarczyk E., Kolman G., Kruk Z. — **Analysis of interdependence between polymorphism and activity of alkaline phosphatases in serum and leukocyte in cattle.**

A mean activity of alkaline phosphatases studied in 532 primipara cows, Lowland black and white breed reached in blood serum 43.5 iu, in leukocytes 7263.8 iu. There was noted a very large variability in the activity of the enzyme. The significant factor which differentiated the activity of the enzyme in sera appeared to be genetically conditioned polymorphism. The activity of the enzyme in serum was positively correlated with its activity in leukocytes. However a correlation coefficient was low ( $r = 0.1229$ ). Animals with the highest number of leukocytes showed a considerably lower activity of alkaline phosphatases in leukocytes, and higher activity of these enzymes in blood sera.

STANISŁAW ŁAKOTA, ANNA RASZKA, JACEK ROSZKOWSKI, STEFAN HŁOND,  
FELIKS KOZŁOWSKI, JERZY STEFAN

## Badania nad toksycznością Diuronu, Linuronu, Monolinuronu oraz Monuronu dla narybku karpia w teście osfrym

Z Instytutu Przemysłu Organicznego Oddział w Pszczynie

Z Instytutu Weterynarii w Puławach

Z Samodzielnej Pracowni Biologii Ryb i Środowiska Wodnego w Zatorze Instytutu Zootechniki w Krakowie

Masowe stosowanie pestycydów w rolnictwie i leśnictwie, a także w niektórych gałęziach przemysłu, stwarza groźbę zanieczyszczenia wód powierzchniowych tymi środkami. Przedostają się one do otwartych zbiorników wodnych głównie przez spływy powierzchniowe z pól traktowanych pestycydami, z powietrza — roznoszone wiatrem podczas akcji opylania lub opryskiwania roślin, a także w wyniku bezpośredniego ich wprowadzenia do zbiorników wodnych w czasie zwalczania zbędnej roślinności wodnej lub innych zabiegów sanitarnych. Diuron, Linuron, Monolinuron i Monuron są ciałami stałymi, krystalicznymi, trudno rozpuszczalnymi w wodzie. Należą do herbicydów pochodnych mocznika.

Herbicydy te na rośliny działają totalnie i selektywnie, przy czym odznaczają się małą toksycznością ostrą dla ludzi i zwierząt stałocieplnych. W stosunku do ryb i innych zwierzęcych organizmów wodnych toksyczność ich jest bardzo różnicowana, przy czym objawy zatrucia nie są dotychczas dokładnie scharakteryzowane (1—7).

Celem niniejszej pracy było wykazanie, czy wymienione herbicydy zastosowane na narybek karpia (*Cyprinus carpio* L.) w stężeniach powodujących 50% jego śmiertelności po 48 godzinnym czasie trwania ekspozycji wywołują w organizmie tych ryb zmiany anatomiczno-patologiczne.

### Materiał i metody

#### Herbicydy

Diuron — jest to N-3,4-dwuchlorofenylo-N, N-dwumetylomocznik. W stanie czystym jest on bezwodną

białą substancją, dobrze rozpuszczalną w rozpuszczalnikach organicznych, słabo rozpuszczalną w wodzie.

Linuron — N-/3,4-dwuchlorofenylo/-N-metoksy-N-metylomocznik. Substancja krystaliczna trudno rozpuszczalna w wodzie, dobrze w rozpuszczalnikach organicznych, słabo kumuluje się w organizmach zwierzęcych.

Monolinuron — N-/4-chlorofenylo/-N-metoksy-N-metylomocznik. Zachowanie monolinuronu w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych jest podobne jak linuronu.

Monuron — N-/4-chlorofenylo/-N, N-dwumetylomocznik. Jest to biała bezwonna krystaliczna substancja, trudno rozpuszczalna w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych.

#### Ryby

Do badań użyto jednoroczny narybek karpia, klinicznie zdrowy, wolny od pasożytów, o ciężarze od 25 do 40 gramów, pochodzący z gospodarstwa doświadczalnego PAN w Golyszu oraz Zootechnicznego Zakładu Doświadczalnego w Zatorze. Ryby po kilkudniowej adaptacji umieszczano w akwariach o pojemności 10 l w ilości po 5 sztuk w wodzie studziennej, dobrze napowietrzanej o temperaturze 14—15°C, pH 6,9. Zawartość fizycznie rozpuszczonego tlenu w wodzie w trakcie trwania doświadczenia mierzono raz na dobę; nie spadła ona poniżej 5 mg/0<sub>2</sub>/l. Badane preparaty jako trudno rozpuszczalne w wodzie wprowadzano do wody w formie roztworów acetonowych w koncentracji powodującej 50% śmiertelności badanej populacji ryb po 48 godz. trwania kontaktu tj. Linuronu w dawce 5 mg/l wody, Diuronu i Monolinuronu w dawce 10 mg/l oraz Monuronu w dawce 50 mg/l. Ponadto dla Monolinuronu jako najmniej toksycznie działającego preparatu na narybek karpia zastosowano koncentrację 1 mg/l tj. stężenie około 50-krotnie niższe od dawki powodującej LC<sub>50</sub>. Koncentrację tę wprowadzono celem wyjaśnienia, czy zastosowany w tak niskim stężeniu preparat wywołuje jakiegokolwiek zmiany patologiczne w organizmie ryb. Narybek karpia poddawano następnie 48 godz. ekspozycji w badanym stężeniu określonego pestycydu, przy czym