

Aktywność izoenzymów LDH w stanach biegunkowych u koźląt

PRZEMYSŁAW SOBIECH, ALEKSANDRA PLATT-SAMORAJ*,
MIROSLAW MARIUSZ MICHALSKI*

Katedra Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 14, 10-957 Olsztyn

*Katedra Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn

Sobiech P., Platt-Samoraj A., Michalski M. M.

Isoenzymatic activity cases of diarrhea in kid goats

Summary

The aim of the study was to determine the level of homeostatic disturbances during the course of diarrhea in kid goats. The study examined 20 kid goats divided into two groups: 10 clinically healthy and 10 with symptoms of diarrhea. Acid-base balance parameters, electrolyte concentration as well the level of AST, ALP and LDH activity were measured in the blood of all the kids. LDH was also separated into its isoenzymatic fractions. Decompensated metabolic acidosis was found in all the kids having diarrhea as well as a decreased level of Na⁺ and Cl⁻ and an increased concentration of K⁺. There was also an increase in the activity of AST, ALP and LDH. An increase of LDH1 together with a simultaneous decrease of LDH5 was found during separation of LDH isoenzymes

Keywords: goat kids, diarrhea, LDH isoenzymes

Jednym z podstawowych problemów w odchowie koźląt są schorzenia przebiegające z objawami biegunki. Stanowią one bardzo częsty powód padnięć koźląt w pierwszych dniach życia. Przyczyny biegunki są bardzo zróżnicowane, najczęściej mają podłoże zakaźne a jako główny czynnik etiologiczny wymieniane są enterotoksyczne szczepy *E. coli* (27). Innymi patogenami wywołującymi biegunkę u koźląt są: *Salmonella sp.*, *Clostridium perfringens*, *Yersinia sp.* oraz wirusy z rodzaju *Rotavirus*, *Coronavirus*, *Adenovirus* czy *Herpesvirus* (23). Często też przyczynami biegunki są zakażenia pierwotniakami np.: *Cryptosporidia sp.* czy *Eimeria sp.* (23). Jednym z ważniejszych czynników mogących sprzyjać występowaniu biegunki u nowo narodzonych koźląt jest brak lub pobranie złej jakości siary. Zawartość immunoglobulin w sianie kóz gwałtownie spada w ciągu 6 do 12 godzin po porodzie, dlatego też jak najszybsze napojenie koźlęcia zapobiega występowaniu chorób okresu neonatalnego, w tym biegunkom (22). Innymi czynnikami sprzyjającymi biegunkom koźląt, podobnie jak i innych przeżuwaczy, są złe warunki chowu lub trudne warunki pogodowe w okresie wykotów np.: wysoka lub niska temperatura czy też intensywne opady atmosferyczne (12).

Objawy kliniczne obserwowane w stanach biegunkowych u koźląt, powodowanych z reguły przez zespół czynników środowiskowych i zakaźnych, obejmują rozluźnienie kału, brak apetytu i bolesność okolicy jamy brzusznej. Przy dłuższej utrzymującej się biegunce stwierdza się odwodnienie, znaczne osłabienie i stopniową utratę odruchu ssania (10, 11). Znaczna utrata

płynów powoduje hipowolemię i zaburzenia krążenia, co doprowadza do obniżenia temperatury wewnętrznej ciała koźlęcia, a zaburzenia w równowadze kwasowo-zasadowej i elektrolitowej mogą prowadzić do objawów nerwowych kończących się konwulsjami i śmiercią (20). U koźląt z objawami biegunki, obok objawów klinicznych, dochodzi do szeregu zaburzeń metabolicznych manifestujących się zmianami wskaźników enzymatycznych i biochemicznych.

Celem badań było określenie zakresu i stopnia zaburzeń homeostazy ustrojowej koźląt w stanach nieżytnych przewodu pokarmowego przez ocenę wybranych parametrów enzymatycznych oraz wskaźników gospodarki wodno-elektrolitowej i równowagi kwasowo-zasadowej.

Material i metody

Badania wykonano na 20 koźlętach rasy polskiej białej uszlachetnionej, w wieku 4-8 dni, obu płci, w okresie chowu alkierzowego, pochodzących z jednej koziarni na terenie Warmii. Zwierzęta podzielono na dwie grupy: I – kontrolną stanowiło 10 koźląt zdrowych oraz II – doświadczalną, która obejmowała 10 koźląt z objawami nieżytności przewodu pokarmowego. Wszystkie koźlęta badano klinicznie oraz pobrano od nich krew z żyły jarzmowej do badań biochemicznych. Krew od koźląt chorych pobierano drugiego dnia po wystąpieniu objawów biegunki.

W zakresie parametrów równowagi kwasowo-zasadowej w pełnej krwi oznaczono: pH, ciśnienie cząstkowe dwutlenku węgla (pCO₂), ciśnienie cząstkowe tlenu (pO₂), stężenie jonów wodorowęglanowych (HCO₃⁻), nadmiar lub niedobór zasad (BE), stopień wysycenia hemoglobiny tlenem (O₂SAT)

Tab. 1. Parametry równowagi kwasowo-zasadowej i stężenia elektrolitów we krwi kozłat (n = 10, \bar{x} + SEM)

Grupy	pH	pCO ₂ kPa	ctCO ₂ mmol/l	HCO ₃ ⁻ act mmol/l	pO ₂ kPa	O ₂ SAT %	BE mmol/l	Na ⁺ mmol/l	K ⁺ mmol/l	Cl ⁻ mmol/l
Kozłeta zdrowe	7,34 0,01	7,01 0,09	28,58 2,21	28,12 1,09	4,55 0,31	52,63 4,02	1,52 0,35	144,22 0,69	4,43 0,11	110,11 0,22
Kozłeta z objawami biegunki	7,26* 0,01	7,33 0,24	25,37 1,54	23,83* 0,71	3,41* 0,14	32,12* 2,43	-3,37* 0,56	136,53* 1,35	5,22* 0,06	107,27* 0,64

Objaśnienie: * p ≤ 0,01

Tab. 2. Aktywność AST, ALP, LDH oraz izoenzymów LDH w surowicy kozłat (n = 10, \bar{x} + SEM)

Grupy	AST U/l	ALP U/l	LDH U/l	LDH ₁ %	LDH ₂ %	LDH ₃ %	LDH ₄ %	LDH ₅ %
Kozłeta zdrowe	48,91 2,51	443,12 27,99	326,41 16,33	17,55 0,46	7,85 0,53	29,13 0,89	17,59 0,38	27,88 0,71
Kozłeta z objawami biegunki	111,31* 15,56	1457,30* 91,24	416,13 48,37	25,46* 1,26	8,97 0,43	26,99 1,46	15,91 0,64	22,67* 1,36

Objaśnienie: jak w tab. 1

i całkowitą zawartość dwutlenku węgla (ctCO₂). Wskaźniki te oznaczano przy użyciu analizatora Corning 248.

Określenie stanu gospodarki elektrolitowej obejmowało oznaczanie w surowicy stężenia sodu (Na⁺), potasu (K⁺) i chlorków (Cl⁻) metodą jonoselektywną przy użyciu aparatu Easy Lyte Plus. W zakresie wskaźników enzymatycznych oznaczono w surowicy metodą kinetyczną aktywność AST (aminotransferazy asparaginianowej), ALP (fosfatazy alkalicznej) oraz LDH (dehydrogenazy mleczanowej). Dodatkowo dokonano rozdziału LDH na frakcje izoenzymatyczne przy użyciu elektroforezy wysokonapięciowej na żelu agarowym w systemie Paragon firmy Beckman.

Wyniki badań laboratoryjnych przedstawiono w jednostkach układu SI i poddano ocenie statystycznej testem Newmana-Keulusa przy użyciu programu Statistica 6.0.

Wyniki i omówienie

U kozłat grupy kontrolnej w okresie trwania badań nie zauważono klinicznych objawów chorobowych, natomiast u wszystkich kozłat grupy doświadczalnej stwierdzono osowiałość, upośledzenie lub brak łaknienia, szorstkość i suchość skóry oraz zmniejszenie jej elastyczności, a dominującym objawem było występowanie biegunki. Kozłeta oddawały wodnisty kał koloru szarozółtego, a temperatura wewnętrzna utrzymywała się w granicach norm fizjologicznych lub była nieznacznie obniżona (37,9-39,5°C). Wskaźniki równowagi kwasowo-zasadowej kozłat zdrowych mieściły się w granicach norm uznanych za fizjologiczne dla gatunku (tab. 1) (17, 18).

U kozłat z objawami biegunki stwierdzono natomiast znaczne zaburzenia równowagi kwasowo-zasadowej. Zaobserwowano statystycznie istotne przesunięcie pH w kierunku kwaśnym, obniżenie stężenia wodorowęglanów, ciśnienia parcjalnego tlenu, wysycenia hemoglobiny tlenem oraz zasobu zasad (tab. 1). Zmianom tym towarzyszył nieznaczny wzrost ciśnienia parcjalnego dwutlenku węgla. Analiza zmian parametrów

równowagi kwasowo-zasadowej wskazuje na występowanie stanu kwasicy metabolicznej niewyrównanej. W stanach nieżytowych przewodu pokarmowego za główną przyczynę omawianych zaburzeń uznaje się utratę z kałem wodorowęglowodanów oraz elektrolitów, głównie jonów sodowych i chlorkowych. Dodatkowo w stanach kwasicy metabolicznej pogłębienie spadku poziomu wodorowęglanów może być wynikiem ich wiązania z jonami H⁺ w przestrzeni wodnej pozakomórkowej (4).

W ścisłym związku ze stanem równowagi kwasowo-zasadowej pozostaje poziom elektrolitów. Zawartość ich we krwi zwierząt

zdrowych pozostawała w granicach norm fizjologicznych (8, 19), natomiast u kozłat z objawami biegunki odnotowano obniżenie poziomu sodu i chlorków z jednoczesnym podwyższeniem stężenia potasu (tab. 1). Istotny spadek zawartości jonów sodowych i chlorkowych we krwi kozłat wykazujących objawy biegunki można wytłumaczyć ich utratą z kałem, natomiast wzrost poziomu K⁺ jest ściśle związany z zaburzeniami równowagi kwasowo-zasadowej. Wzrost pH osocza powoduje zmniejszenie stężenia jonów potasowych, natomiast jego spadek prowadzi do zwiększenia ich koncentracji. Mechanizm tych współzależności polega na wymianie jonów wodorowych i potasowych między przestrzeniami pozakomórkową i komórkową. Wymiana ta może być powodowana przez pierwotne zwiększenie stężenia jonów wodorowych (spadek pH) w płynie komórkowym, powodując ich przesunięcie do komórek. Zgodnie z zasadą elektroobojętności płynów ustrojowych, w przeciwnym kierunku (z komórki do płynu pozakomórkowego) przechodzą jony potasowe, powodując wzrost ich stężenia w osoczu (7, 28).

Średnia aktywność oznaczanych enzymów w kozłat zdrowych mieściła się w granicach norm uznanych za fizjologiczne (tab. 2), jedynie aktywność ALP osiągała górne granice tych norm (2, 6). Wiąże się to z jej powinowactwem do układu kostnego, który u młodych organizmów ulega intensywnemu rozwojowi (14).

U kozłat z nieżytem przewodu pokarmowego zanotowano natomiast statystycznie istotny wzrost aktywności AST i ALP oraz nieznaczny wzrost całkowitej aktywności LDH. Podwyższenie aktywności wymienionych enzymów może wystąpić w wielu przypadkach np.: w chorobach wątroby, nerek, układu szkieletowego lub dysfunkcjach trawiennych (21). W omawianym przypadku można wnioskować, że wzrost aktywności AST i LDH związany był z nadmiernym obciążeniem wątroby w stanach biegunkowych, natomiast bardzo

wysoki, dziesięciokrotny, wzrost aktywności ALP wywołany został uszkodzeniem błony śluzowej jelit toczącym się procesem zapalnym i uwolnieniem do krwioobiegu frakcji jelitowej tego enzymu (30).

Przy rozdzielaniu elektroforetycznym LDH na frakcje izoenzymatyczne w obydwu grupach zwierząt otrzymano 5 izoenzymów. W medycynie ludzkiej i weterynaryjnej rozdział izoenzymatyczny LDH jest wykorzystywany w rozpoznawaniu schorzeń serca, wątroby lub mięśni szkieletowych (1, 9, 13, 26). U przeżuwaczy stwierdzono, że w przypadku uszkodzenia wątroby w surowicy wzrasta aktywność frakcji LDH₁, w schorzeniach mięśni natomiast frakcji LDH₅ (25, 27).

U kozłat zdrowych największą aktywność w surowicy wykazywały frakcje wolno wędrujące LDH₃ i LDH₅ (tab. 2). W piśmiennictwie istnieją duże rozbieżności w otrzymywanych profilach izoenzymatycznych LDH surowicy zdrowych kozłat i kóz. Blackwell i Libby (3) podają, że największą aktywność osiąga izoenzym LDH₁, natomiast Georgieva i Todorow (5) twierdzą, że LDH₅ i LDH₃, co potwierdzałoby wyniki uzyskane w badaniach własnych. Porównując profil izoenzymatyczny LDH surowicy kóz dorosłych (24) i kozłat, można stwierdzić, że u tych ostatnich następuje wzrost aktywności izoenzymu LDH₅ (charakterystycznego dla mięśni szkieletowych), a spadek aktywności frakcji LDH₁ (specyficznej dla wątroby).

U kozłat grupy doświadczalnej stwierdzono statystycznie istotny wzrost aktywności frakcji LDH₁ (tab. 2), co może świadczyć o destrukcji komórek wątrobowych w stanach nieżytowych przewodu pokarmowego. Jednocześnie statystycznie spadła aktywność frakcji LDH₅, ale wydaje się, że nie ma to znaczenia diagnostycznego w omawianym przypadku, gdyż ta zmiana jest wynikiem przesunięcia aktywności izoenzymatycznej w kierunku frakcji LDH₁.

Reasumując można stwierdzić, że u wszystkich kozłat wykazujących objawy biegunki stwierdzono przypadki zaburzenia homeostazy ustrojowej objawiające się występowaniem stanu kwasicy metabolicznej niewyrównanej z obniżeniem poziomu sodu i chlorków oraz wzrostem aktywności całkowitej AST, ALP i LDH. Uzyskane wyniki są potwierdzeniem badań innych autorów (11, 15-17) dotyczących opisywanych zaburzeń homeostazy w stanach biegunkowych u kozłat i innych przeżuwaczy. Jednocześnie wykazano wyraźne zmiany w obrazie izoenzymatycznym LDH w surowicy ze wzrostem aktywności frakcji LDH₁ i spadkiem aktywności izoenzymu LDH₅.

Uzyskane wyniki upoważniają do wyciągnięcia następujących wniosków:

1. W przebiegu biegunki kozłat następuje znaczne zaburzenie homeostazy ustrojowej, a celem jej przywrócenia zaleca się w leczeniu stosowanie infuzji płynów wieloelektrolitowych z dodatkiem dwuwęglanów, octanów lub propionianów.

2. Oznaczenie aktywności enzymatycznej AST, ALP i LDH, a zwłaszcza zymogramu LDH w surowicy, jest wskaźnikiem oceny ogólnego stanu zdrowia kozłat lub

wskaźnikiem uszkodzenia narządów wewnętrznych, a w szczególności wątroby.

Piśmiennictwo

1. Bhayana V., Henderson A. R.: Biochemical markers of myocardial damage. Clin. Biochem. 1995, 28, 1-29.
2. Białkowski Z., Saba L., Bis-Wencel H., Janecki T.: Zmiany wskaźników hematologicznych, białka ogólnego, glukozy, cholesterolu oraz aktywności AP, AspAT i AIAT w surowicy krwi kozłat w pierwszych miesiącach życia. Medycyna Wet. 1988, 44, 112-114.
3. Blackwell J. G., Libby W.: Metabolic and cellular profile of wether goats: Protein fractions and lactate dehydrogenase isoenzymes – reference values. Am. J. Vet. Res. 1982, 43, 1060-1067.
4. Breen P. H.: Arterial blood gas and pH analysis, Clinical approach and interpretation. Anesthesiol. Clin. North Am. 2001, 19, 885-906.
5. Georgieva D., Todorov B.: Total LDH activity and isoenzyme spectrum in experimental *Cysticercus ovis* infestation of lambs and kids. Vet. Med. Nauki 1987, 24, 28-35.
6. Hikasa Y., Hokushin S., Takase K., Ogasawara S.: Cardiopulmonary, serum biochemical and behavioral effects of sevoflurane compared with isoflurane or halothane in spontaneously ventilating goats. Small Rumin. Res. 2002, 43, 167-178.
7. Holtenius K.: Plasma electrolyte concentration in food-deprived goats orally supplemented with potassium chloride. Brit. J. Nutr. 1990, 64, 211-218.
8. Jankowiak D., Sarelo K., Drzeżdżon D., Łukaszewska E.: Koncentracja jonów sodowych, potasowych oraz chlorkowych w osoczu krwi i erytrocytach ciężarnych kóz. Medycyna Wet. 2003, 59, 728-732.
9. Keller P.: Lactate dehydrogenase isoenzymes in normal bovine serum and during experimental liver and muscle damage. Res. Vet. Sci. 1974, 17, 49-58.
10. Kritas S. K., Burriel A. R., Tzivara A. H., Govaris A., Kyriakis S. C., Karatzias H., Vlemmas J.: Prevention of scours in neonatal kids after modification of management and experimental vaccination against *Escherichia coli*. Small Rumin. Res. 2003, 50, 51-56.
11. Kumar M. J. M., Balasubramaniam G. A.: Incidence of coccidiosis in goats in Namakkal. Indian Vet. J. 2003, 80, 817-818.
12. Lane R. H.: A case of scours in goat kids. N. Z. Vet. J. 1987, 35, 58-59.
13. Mair J.: Progress in myocardial damage detection: new biochemical markers for clinicians. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 1997, 34, 1-66.
14. McDougall K., Beecroft J., Watsnidge C., King W. A., Hahnel A.: Sequences and expression patterns of alkaline phosphatase isozymes in preattachment bovine embryos and the adult bovine. Mol. Reprod. Develop. 1988, 50, 7-17.
15. Meintjes R. A., Engelbrecht H.: The role of the large intestine in acid-base balance in sheep. South Afr. J. Sci. 1995, 91, 352-354.
16. Morris F.: Neonatal calf diarrhoea. Irish Vet. J. 2004, 57, 101-102.
17. Qi K., Lu C. D., Owens F. N.: Effects of sulfate supplementation on performance, acid-base balance, and nutrient metabolism in Alpine kids. Small Rumin. Res. 1994, 15, 9-18.
18. Qi K., Lu C. D., Owens F. N., Lupton C. J.: Effects of sulfate supplementation on performance, acid-base balance, and nutrient metabolism in Angora kids. Small Rumin. Res. 1994, 15, 19-29.
19. Saba L., Białkowski Z.: Zmiany zawartości elementów mineralnych w surowicy krwi i siarcei kozłat w okresie wzrostu. Medycyna Wet. 1988, 44, 505-507.
20. Sharma V. K., Shrivastava A. K., Bhatia A. K.: Clinicopathological study of induced *Escherichia coli* infection in kids. Indian J. Vet. Pathol. 2003, 27, 50-51.
21. Smith M. C., Sherman D. M.: Goat Medicine. Lea and Febiger, Philadelphia 1994, 65-68.
22. Smith M. C., Sherman D. M.: Goat Medicine. Lea and Febiger, Philadelphia 1994, 220-223.
23. Smith M. C., Sherman D. M.: Goat Medicine. Lea and Febiger, Philadelphia 1994, 342-345.
24. Sobiech P., Kuleta Z.: Activity of LDH isoenzymes in goats. Proceedings of 10th Congress ESVIM 2000, Neuchatel, Switzerland 2000, 97.
25. Sobiech P., Kuleta Z.: Levels of selected biochemical indicators of serum and blood during subclinical forms of nutritional muscular dystrophy in lambs. Polish J. Vet. Sci. 1999, 2, 37-41.
26. Sobiech P., Kuleta Z.: Usefulness of some biochemical indicators in detection of early stages of nutritional muscular dystrophy in lambs. Small Rumin. Res. 2002, 45, 209-215.
27. Vihan V. S., Singh S. V., Singh N.: Prevalence pathogenicity and serotypes of *Escherichia coli* associated with diarrhoea in newborn kids. Indian J. Anim. Sci. 1990, 60, 793-795.
28. Warner M. M., Mitchell G. S.: Ventilatory responses to hyperkalemia and exercise in normoxic and hypoxic goats. Respir. Physiol. 1990, 82, 239-249.
29. Yasuda J., Szuoto B., Too K., Ohfiji S.: Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in bovine liver tissue. Jap. J. Vet. Sci. 1989, 51, 733-739.
30. Yin G. R., Yang J. Y., Yao S. Z., Li J. H.: Separation of dairy cow serum alkaline phosphatase isoenzymes and identification of its tissue of origin using polyacrylamide gel electrophoresis. Acta. Vet. Zoot. Sinic 1993, 24, 125-129.