

FIZJOLOGIA I FIZJOPATOLOGIA

WŁADYSŁAW BARNECKI, ZBIGNIEW HEJŁASZ, ALEKSANDER KRÓLICZEK

Karoteny i witamina A w krwi bydła z terenów wolorodnych Dolnego Śląska

Katedra Fizjopatologii Wydz. Wet. WSR we Wrocławiu
Kierownik: doc. dr WŁADYSŁAW BARNECKI

Katedra Chorób Wewnętrznych Wydz. Wet. WSR
we Wrocławiu

Kierownik: prof. dr BRONISŁAW GANCARZ

W okresie wykonywania badań nad czynnością tarczycy u bydła z terenów wolorodnych Dolnego Śląska zwrócono uwagę na zachowanie się karotenów i witaminy A we krwi tych zwierząt. Z badań poziomu PBI osocza bydła, pochodzącego z terenów wolorodnych wynikało, że był on znacznie niższy (2,31 mcg%) w porównaniu z poziomem PBI u bydła z terenów wolnych od wola endemicznego (4,31 mcg%). Również u około 10% zwierząt znaleziono w mniejszym lub większym stopniu zmiany patologiczne w tarczycy (1).

Euler (cyt. wg 2) przyjmował istnienie antagonizmu pomiędzy tarczycą i witaminą A. Stwierdził on, że małymi dawkami karotenów można zapobiegać spadkowi wagi u dorosłych szczurów, powodowanemu przez tyroksynę. Antagonizm ten został później potwierdzony przez Sadhu i Brody (cyt. wg 2), którzy dużymi dawkami witaminy A obniżyli przemianę podstawową, hamując jej wzrost powodowany przez tyroksynę. Nadmiar witaminy A powodował zmniejszenie się tarczycy, i to nawet u szczurów traktowanych tiouracylem. Badacze ci uważają, że witamina A odciąga jod z tarczycy i w ten sposób ją unieczynnia.

Również wydaje się pewne, że tarczyca jest w głównej mierze odpowiedzialna za przemianę barwników karotenowych w witaminę A. Pierwsze obserwacje poczynione przez Fasolda i Heidemanna (cyt. wg 2) podają, że mleko kóz pozbawionych tarczycy przybiera żółtą barwę wskutek nadmiaru karotenów. Również Schneider i Widmann (cyt. wg 5) stwierdzili, u pozbawionych tarczycy świń morskich, powolny spadek i całkowite zniknięcie zapasów witaminy A w wątrobie, mimo żywienia bogato karotenowym pokarmem. Drill i Truant (cyt. wg 2) potwierdzili tę zależność na drodze eksperymentalnej. Wykazali oni, że szczury pozbawione tarczycy otrzymujące tylko karoteny w pożywieniu wykazywały objawy typowe dla awitaminozy A. Natomiast grupa szczurów beztarczyczych otrzymująca z karmą witaminę A nie wykazywała żadnych zaburzeń.

Innym problemem wiążącym się z gospodarką karotenowo-witaminową jest zagadnienie okresowych wahań poziomów tych związków we krwi. Z polskich autorów Domański i wsp. (4) stwierdzają niższy poziom witaminy A w surowicy bydła w zimie niż w lecie. Dotyczyło to tak krów dojrzałych, jak i cieląt. Podają oni wartości dla witaminy A w okresie letnim 63,70 mcg%, w okresie zimowym 19,62 mcg%. U cieląt tuż po urodzeniu poziom witaminy A wahał się w granicach 4,07—8,7 mcg%. Piotrowska (7) podaje, że u cieląt w okresie żywienia przejściowego, poziom karotenów we krwi przed wypuszczeniem na pastwisko wynosił 85 mcg%. Berger (cyt. wg 7) badając poziom karotenoidów w surowicy krów rasy czerwonej polskiej stwierdził, że w kwietniu przed wypuszczeniem na pastwisko wynosił on 27,1 mcg%. Według Divena i wsp. (3) poziom witaminy A w surowicy bydła, w zależności od pór roku, wahał się

od 39 mcg% do 66 mcg%, podczas gdy poziom karotenów oscylował w granicach 441—996 mcg%.

Celem pracy było zbadanie zachowania się poziomów barwników karotenowych i witaminy A w surowicy bydła pochodzącego z terenów wolorodnych oraz ustalenia stosunku poziomów PBI do gospodarki karotenowej ustroju zwierząt. Badania przeprowadzono w okresie przejściowym z żywienia alkierzowego na żywienie pastwiskowe. Zwierzęta użyte do badań, w ilości 36 sztuk, były żywione w różny sposób. Dowóz karotenów z paszą był nieznan.

Metody

Karoten w surowicy oznaczano kolorymetrycznie w aparacie Pulfricha posługując się filtrem nr S 47 o długości fali 463 mμ. Surowicę po zmydleniu 50% ługiem potasowym i alkoholem ekstrahowano 3-krotnie eterem naftowym i w wyciągu oznaczano poziom karotenów. Ekstynkcję odczytywano z krzywej sporządzonej dla roztworu karotenu — beta.

Witaminę A oznaczano kolorymetrycznie w reakcji Carr-Price'a z $SbCl_3$ w fotokolorymetrze Pulfricha, posługując się filtrem nr S 61 o długości fali 619 milimikrona. Grubość naczynka pomiarowego wynosiła 1,005 cm. Ekstynkcję odczytywano z krzywej sporządzonej dla octanu akseroftolu. Wobec dużej zawartości karotenów w surowicy od ekstynkcji otrzymanej wspólnie dla karotenów i witaminy A odejmowano ekstynkcję, jaką daje czysty karoten w reakcji Carr-Price'a. W obliczeniach posługiwano się wzorem:

$$x = \frac{C \cdot V \cdot 10}{a}$$

C = stężenie związku otrzymanego na podstawie krzywej standardowej (w mcg%),

V = objętość roztworu chloroformowego w ml,

a = objętość surowicy w ml.

Opis metody podano za Lewicką (6). Oznaczenia karotenów, witaminy A i PBI były prowadzone równolegle. Dane o zawartości PBI w osoczu pochodzą z pracy Barneckiego (1).

Wyniki badań i omówienie

Tab. 1.

L. p.	Opis zwierzęcia czas i miejsce pobierania prób.	Wiek w l.	Waga w kg	Poziom PBI w mcg%	Poziom karotenów w mcg%	Poziom witaminy A w mcg%
	Okres I					
	Kłodzko 13.V.60 r.					
	Bydło rzeźniane					
1	Krowa czerwona	6	420	3,6	57	32
2	" "	2	300	3,0	97	50
3	" "	2	300	0,8	149	33
4	" "	2	280	1,7	115	57
5	" "	3	320	2,4	81	47,5
	średnio			2,3	79,4	45,0

L. p.	Opis zwierzęcia czas i miejsce pobierania prób.	Wiek w l	Waga w kg	Poziom PBI w mcg%	Poziom karotenów w mcg%	Poziom witaminy A w mcg%
Okres II						
1	Kłodzko 20.V.60 r. Bydło rzeźniane	8	460	2,6	115	44
2	Krowa czarno-biała	7	500	1,2	90	38
3	" " "	15	360	2,15	133	44
4	Buhaj czerw.-biały	1	200	3,3	230	40
5	" " "	1	180	3,1	101	31
średnio				2,47	133,8	35
Okres III						
1	Kowary 24.V.60 r. Bydło hodowlane	5		3,7	640	48,5
2	Krowa czerw.-biała	5		2,8	580	61,5
3	" " "	5		3,5	528	44
4	" " "	5		3,5	528	56
5	" " "	5		1,9	330	56
średnio				3,1	521	53
Okres IV						
1	Kamienna Góra 25.V.60 r. Bydło rzeźniane	5	720	5,1	124	33,5
2	Buhaj siwy	2	310	3,0	154	41,5
3	Krowa czerw.-biała	8	540	0,9	690	46
Okres V						
1	Kłodzko 3.VI.60 r. Bydło rzeźniane	10	430	1,5	800	80
2	" " "	8	400	1,4	1200	38
3	" " "	10	400	1,3	1240	58
4	" czarna	12	240	0,9	560	58
5	" czerw.-biała	12	400	2,3	260	50
6	" " "	1	300	4,0	880	64
średnio				1,9	833	58
Okres VI						
1	Bukowiec 8.VI.60 r. Bydło hodowlane	3		1,7	768	90
2	Krowa czerw.-biała	2,5		2,4	520	66
3	" " "	2,5		2,1	760	72
4	" " "	4,5		1,2	820	68
5	" " "	3		1,6	740	66
6	" " "	2,5		3,0	512	42
średnio				2,0	685	67
Okres VII						
1	Mysłakowice 10.VI.60 r. Bydło hodowlane	6		2,3	976	60
2	Krowa czerw.-biała	6		2,1	680	46
3	" " "	6		2,4	724	62
4	Krowa czerw.-biała	6		1,6	718	94
5	" " "	6		1,6	880	90
6	" " "	6		1,5	1112	86
średnio				1,9	846	73

Oznaczanie karotenów i witaminy A były przeprowadzane równolegle z oznaczeniami poziomów PBI. Materiał użyty do badań pochodził częściowo od zwierząt z ośrodków hodow-

lanych częściowo zaś od sztuk przeznaczonych na ubój.

Przeprowadzone oznaczenia wskazują na niski poziom barwników karotenowych we krwi zwierząt w okresie przedpastwiskowym (po-czątek maja). Poziomy te wahały się od 57 mcg⁰/₀ do 149 mcg⁰/₀ (tabela 1, okres I). Poziomy witaminy A u tych samych sztuk mieściły się w granicach 32—57 mcg⁰/₀, a więc w ilości zabezpieczającej prawidłowe przemiany. Stosunkowo niskim poziomem karotenów towarzyszył średnio niski poziom witaminy A (tabela 1 okres I i II). Po przejściu na żywienie pastwiskowe w surowicy krwi pojawiły się barwniki karotenowe w stężeniach dochodzących do 1240 mcg⁰/₀ (okres V—VII). Poziom witaminy A w omawianych okresach ulegał powolnemu wzrostowi. U poszczególnych zwierząt osiągnął on poziom 90—94 mcg⁰/₀, średnio 67—73 mcg⁰/₀ (tabela 1 okres VI—VII).

Ze względu na duży rozrzut wyników w poziomach karotenów i witaminy A u zwierząt w poszczególnych grupach, starano się je powiązać z gospodarką jodową ustroju i zestawiono w tabeli 2.

Tab. 2. Średnie wartości PBI, karotenów i witaminy A we krwi bydła

Okres	Ilość sztuk	Wartości średnie			Ilość sztuk	Wartości średnie		
		PBI w mcg%	karoten w mcg%	wit. A w mcg%		PBI w mcg%	karoten w mcg%	wit. A w mcg%
I	2	1,2	131	47,4	3	3,0	78	44,7
IV	1	0,9	690	46,0	2	4,0	139	37,5
V	4	1,1	970	58,0	2	3,1	570	57,0
VI	3	1,5	774	71,6	3	2,5	597	60,0
VII	3	1,6	900	90,0	3	2,3	770	56,0

Lewa strona tabeli obejmuje zwierzęta, u których poziom PBI w osoczu nie przekraczał 2,0 mcg⁰/₀, prawa zwierzęta, u których poziom PBI był wyższy niż 2,9 mcg⁰/₀.

Śledząc zależności pomiędzy poziomem PBI a poziomem karotenów i witaminy A u zwierząt w poszczególnych okresach (tabela 2) zaobserwowano, że w przypadkach niskiego PBI (poniżej 2,0 mcg⁰/₀) poziomy karotenów były wyższe, o 100 do 400 mcg⁰/₀, od poziomu karotenu zwierząt, u których zawartość PBI w surowicy przekraczała 2,0 mcg⁰/₀. Interesujące jest jednak, że poziom witaminy A w grupie zwierząt z niskim PBI był niezmienny, lub nawet wyższy w porównaniu z grupą zwierząt o wysokim PBI.

Wnioski

1. Stwierdzono statystycznie istotne różnice ($P = 0,01$) w poziomach karotenów w surowicy krwi między zwierzętami o wysokich i niskich poziomach PBI. U zwierząt z niskim PBI poziomy karotenów były wyższe, niż u zwierząt z wysokim PBI.

2. W krwi bydła z terenów wolorodnych, w okresie przejściowym z żywienia zimowego na żywienie pastwiskowe, stwierdzono niskie poziomy karotenów i średnio niskie poziomy witaminy A. Poziomy tych związków nie wskazywały na niedobory.

Piśmiennictwo

1. Barnecki W.: Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 17, 161 (1963).
2. Buddenbrock: Vergleichende Physiologie, Bd. IV. Hormone, Basel 1950.
3. Diven R. H., Pahnish O. F., Raubicek C. B., Ervin E. S., Page H. M.: Journal of Dairy Sci., 43, 11, 1632 (1960).
4. Domański E., Dobrowolska D., Zalewska E.: Roczniki Nauk Rolniczych, T. 67, E. 3 (1956).
5. Haubold H.: Schriftenreihe über Mangelkrankheiten, 4, 88, 106 (1955).
6. Lewicka K.: Medycyna Weterynaryjna, 4, 220 (1959).
7. Piotrowska K.: Medycyna Weterynaryjna, 10, 619 (1961).

Adres autora: doc. dr Władysław Barnecki — Wrocław, Norwida 25.

Барнецкий В., Гейлаш З., Круличек А.: Каротены и витамин А в крови крупного рогатого скота из струмородных местностей Нижней Силезии.

Проведенные в струмородных местностях Нижней Силезии исследования плазмы крупного рогатого скота установили низкий уровень каротиновых пигментов в предпастбищном периоде — 57—149 мкг%. После перехода на пастбищное питание уровень каротенов в сыворотке приближался к 1240 мкг% а уровень витамина А к 94 мкг%, в среднем к 67—73 мкг%. Исследуя соотношение между уровнем PBI („protein bound iodine“)

а уровнем каротенов и витамина А установили, что в случаях низкого уровня PBI (до 2 мкг%), уровень каротенов в среднем 100—400 мкг%, был выше, чем у животных у которых уровень PBI был выше 2 мкг%. То же самое наблюдали при исследовании и витамина А.

Установили статистически существенные различия ($P = 0,01$) в уровне каротенов между животными с высоким и низким уровнем PBI. В переходном периоде кормления установили низкий уровень каротенов и средне-низкий уровень витамина А, что не указывало однако на их недостаточность.

Barnecki W., Hejlasz Z., Króliczek A.: Carotens and vitamin A in the blood of cattle from the strumage-nie areas Lower Silesia.

The determinations carried out showed a low level of caroten colourants in the pre-pasture period (57—149 mcg%). After pasture grazing began, the level of carotens in the plasma reached 1240 mcg%, and the level of vitamin A rose to 94 mcg% — average 67—73 mcg%. Following the correlation between the level of PBI and level of carotens and vitamin A, in cases of low PBI levels (up to 2 mcg%), higher levels of carotens (average 100—400 mcg%) were found than the level of these compounds in animals in which the level of PBI was higher by 2 mcg%. Vitamin A behaved similarly.

The authors found statistically significant differences ($P = 0.01$) in the level of carotens in the blood plasma between animals with low or high level of PBI.

In the transition phase of nutrition a low level of carotens and an averagely low level of vitamin A were found. This did not, however, indicate a deficiency.

TEODOR JUSZKIEWICZ, BOGDAN MIZAK, ALEKSANDER PALEOLOG

Kolometryczna metoda oznaczania esterazy cholinowej w materiale biologicznym

Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Lecznictwa, Instytut Weterynarii, Puławy
Kierownik: doc. dr T. JUSZKIEWICZ

W latach ostatnich wprowadzono do lecznictwa, a również do zwalczania szkodników roślin i zwierząt, szereg estrów kwasu ortofosforowego. Związki te po dostaniu się do organizmu dają trwałe połączenia z esterazami cholinowymi i inaktywują je. Wskutek tego następuje gromadzenie się acetylocholin w synapsach nerwowych, co zazwyczaj prowadzi do zatrucia. Dlatego oznaczanie stężenia esterazy cholinowej we krwi staje się testem z wyboru w przypadku podejrzenia o zatrucie antycholinoesterazami. W dodatku, brak jest dotychczas metod, które pozwalałyby oznaczać w materiale biologicznym bezpośrednio związki fosforoorganiczne w warunkach przeciętnie wyposażonego laboratorium.

W dostępnym piśmiennictwie opisano cały szereg metod, które pozwalają oznaczyć esterazy cholinowe w pełnej krwi, osoczu lub krwinkach. Dobry przegląd tych metod dał Augustinsson (1), a ostatnio w polskim piśmiennictwie Mizak (15). Usiłując zaadaptować którąś z opisanych metod, natrafiliśmy na szereg trudności. Wiele metod nadaje się jedynie do oznaczania esteraz cholinowych we krwi człowieka, u którego stężenie zarówno acetylocholinoesterazy w erytrocytach, jak też pseudocholinoesterazy w osoczu krwi jest bardzo wysokie. U większości gatunków zwierząt stężenia esteraz są wielokrotnie niższe i dlatego napotyka się na trudności przy wyborze odpowiedniej metody. Z tych też powodów, jak też ze względu na trudności techniczne, po przeprowadzeniu dłuższych badań postanowiliśmy zrezygnować ze stosowania metod elektrometrycznych

i ich odmian polegających na kolometrycznym pomiarze zmiany pH (3, 4, 7, 8, 11, 12, 14, 16, 17, 18).

Metoda Hestrina (9) i opisane w dostępnym nam piśmiennictwie jej modyfikacje (5, 2, 6, 10, 13), aczkolwiek są proste i dość dokładne, sprawiały przy wykonaniu szeregu kłopotów. Do nich przede wszystkim trzeba zaliczyć: trudności z odbiałaniem osocza zwierzęcego kwasem solnym, powstawanie pęcherzyków gazu, który utrudnia oznaczenia gęstości optycznej i wreszcie, względnie słabe natężenie zabarwienia.

Biorąc pod uwagę przedstawione tu trudności, postanowiono opracować metodę, która umożliwiłaby oznaczanie esteraz cholinowych w pełnej krwi, osoczu i krwinkach, a także w zhomogenizowanych tkankach różnych zwierząt. Badania oparto na reakcji z hydroksyloaminą według opisu podanego przez Hestrina (9).

Zasada

Estry cholinyl (acetylocholina) tworzą ze znajdującą się w roztworze alkalicznym hydroksyloaminą kwas acetohydroksamowy, który następnie w roztworze kwaśnym reaguje z jonami żelazowymi dając rozpuszczalny związek kompleksowy o zabarwieniu fioletowo-czerwonym. Natężenie zabarwienia jest proporcjonalne do stężenia acetylocholin w badanym roztworze.

Odczynniki

I. Bufor acetylocholinowy:

A. Rozpuścić 9,083 g chlorku acetylocholinyl (silnie higroskopijny!) lub 11,306 g bromku acetylocholinyl w