

TADEUSZ FRYMUS

Analiza immunoelektroforetyczna surowicy krwi krów chorych na białaczkę

Z Instytutu Fizjologii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR w Warszawie

Przeżyciowe rozpoznawanie białaczki limfatycznej bydła, a zwłaszcza jej wczesnej postaci, opiera się dziś praktycznie jedynie na obliczeniu ilości leukocytów oraz procentu limfocytów we krwi obwodowej zwierząt. Interpretacja tych wyników nastęrcza jednak pewne trudności. Istnieje bowiem kilka tzw. kluczy białaczkowych, według których oceniane wyniki badania hematologicznego niejednokrotnie nie pokrywają się ze sobą (9). Stosunkowo często występuje również u bydła postać aleukemiczna białaczki. Ponieważ w tej postaci choroby skład morfotyczny krwi jest niezmienny, można ją rozpoznać dopiero badaniem histopatologicznym.

Jednym z zalecanych kierunków poszukiwań dodatkowych metod diagnostycznych białaczek są badania immunologiczne (6). W przebiegu chorób nowotworowych może bowiem dojść do pojawienia się nowych komponent antygenowych w obrębie guzów nowotworowych (antygeny guzowo-specyficzne, TSA-tumor specific antigens) albo zwiększenia lub zmniejszenia się ilości normalnych składników antygenowych tkanek. Dotychczas nie udało się jednak wykryć cech antygenowych guzów białaczkowych bydła pozwalających na diagnozowanie tego schorzenia (5). Ponieważ białaczka bydła jest chorobą obejmującą niemal wszystkie elementy układu siateczkowo-śródbłonkowego można przypuszczać, że w następstwie upośledzenia funkcji tego układu u zwierząt chorych zmienia się poziom immunoglobulin w surowicy. Opierając się na tym przypuszczeniu Trainin i wsp. dokonali analizy immunoelektroforetycznej surowicy krów chorych na białaczkę. W licznych pracach (7, 11, 12, 14) donoszą oni o braku lub znacznym zmniejszeniu frakcji makroglobulin surowicy bydła dotkniętego białaczką.

Biorąc pod uwagę fakt, że doniesienia w piśmiennictwie na temat zachowania się IgM w surowicy bydła białaczkowego są rozbieżne oraz uwzględniając znaczenie problemu dla ewentualnego serologicznego rozpoznawania tej choroby podjęto próbę przebadania obecności frakcji IgM w surowicy bydła z hematologicznie rozpoznaną białaczką.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono u 14 krów, u których po dwukrotnym, w odstępie 6 miesięcy, badaniu hematologicznym na podstawie klucza getyndzkiego stwierdzono białaczkę limfatyczną. Surowice kontrolne pochodziły od 10 zdrowych krów, które w badaniu klinicznym i hematologicznym nie odbiegały od normy. Surowice po oddzieleniu od skrzepów przechowywano bez dodatku środków konserwujących w temperaturze -20°C . Frakcję IgM normalnej surowicy bydłowej otrzymano według metody opisanej przez Penhala (8) drogą rozdziału euglobulin surowicy na kolumnie z Sephadexem G-200. Antysurowice przeciwko pełnej surowicy bydłowej oraz frakcji IgM otrzymano przez uodpornienie królików według metody podanej przez Surjana (10). Surowice te z dodatkiem thiomersalu przechowywano w stanie zamrożonym. Immunoelektroforezę surowiec krów białaczkowych i krów kontrolnych wykonywano według mikrometody Scheideggera w 1,5 agarze Difco i 0,05 molarnym buforze weronalowym o pH 8,4. Immunoelektroforegramy po wypłukaniu i wysuszeniu barwiono azokarminem (4).

Wyniki

We wszystkich badanych surowicach, pochodzących od krów zdrowych jak i chorych na białaczkę, wykazano obecność łuku precypitacyjnego odpowiadającego globulinom klasy IgM. W immunoelektroforegramach surowiec czterech krów białaczkowych łuki makroglobulin otrzymane przy użyciu antyserum przeciwko pełnej surowicy jak i surowicy anty-IgM były krótkie i słabo zaznaczone. Przemawia to za zmniejszoną ilością IgM w tych surowicach.

Dyskusja

Trainin i wsp. (11) badając surowice 26 krów białaczkowych wykazali u 21 z nich brak lub tylko śladowe ilości frakcji IgM. U niektórych z tych krów białaczka miała postać aleukemiczną i została stwierdzona dopiero w czasie badania sekcyjnego i histopatologicznego. Sugerowałoby to, iż w przyżyciowej diagnostyce białaczki badania immunoelektroforetyczne mogą posiadać większą wartość niż badania hematologiczne.

Usiłując wyjaśnić problem czy w przebiegu białaczki dochodzi do upośledzenia produkcji makroglobulin w układzie limfoidalnym czy też obserwowany brak IgM w surowicy ma inną przyczynę Trainin i wsp. (13) zastosowali metodę immunofluorescencji w badaniu wycinków śledziony i węzłów chłonnych pochodzących od krów białaczkowych. Spośród 25 krów z

brakiem lub ilością śladową IgM w surowicy u żadnej w zmienionych węzłach chłonnych nie występowały komórki produkujące IgM. Nie stwierdzono również tych komórek w śledzionie oraz w niezmienionych węzłach chłonnych. Natomiast spośród 6 krów chorych na białaczkę ale posiadających normalny poziom IgM w surowicy, wszystkie zwierzęta wykazywały brak komórek wytwarzających IgM w zmienionych węzłach chłonnych. Komórki te stwierdzono natomiast w śledzionie oraz w niezmienionych węzłach chłonnych. Wobec niestwierdzenia istotnych zmian w ilości komórek produkujących globuliny klasy IgG autorzy ci dochodzą do wniosku, że w przebiegu białaczki następuje uszkodzenie układu limfoidalnego wybiórczo w zakresie komórek wytwarzających IgM. Zanik tych komórek może być stwierdzony zanim wystąpią objawy choroby. Analiza powyższych wyników nasuwa przypuszczenie, że w przebiegu białaczki najpierw ustaje synteza IgM w objętych procesem chorobowym węzłach chłonnych nawet przed pojawieniem się w nich guzów. Pozostała, nie uszkodzona część układu limfoidalnego może — przynajmniej tymczasowo — przejmować funkcje części objętej procesem nowotworowym. Tłumaczyłoby to fakt, iż nie wszystkie krowy wykazują w przebiegu białaczki zmniejszenie ilości IgM we krwi. Według Trainina i wsp. (14) 18% bydła dotkniętego tą chorobą posiada normalny poziom makroglobulin w surowicy. Być może związane jest to również ze stwierdzonymi przez Klopfera i wsp. (7) wahaniami poziomu IgM u krowy białaczkowej. Autorzy ci zaobserwowali, że zwierzę z obniżoną ilością IgM w surowicy może za kilka dni wykazywać poziom nie odbiegający od normy. Wobec tego stwierdzenia, zrozumieliśmy staję się istnienie w literaturze prac nie potwierdzających tezy o zmniejszaniu się ilości makroglobulin w surowicy w przebiegu białaczki bydła. Brummerstedt i Bendixen (1) przeprowadzwszy analizę białek surowicy 14 krów białaczkowych stwierdzili u 8 z nich brak pewnej komponenty, która jednak nie wydawała się być IgM. Celer (2) zaś porównując immunoelektroforegram surowicy krowy o bardzo dużej, bo wynoszącej 800 tys. w mm³, ilości limfocytów we krwi obwodowej z immunoelektroforegramem krowy zdrowej nie stwierdził między nimi żadnej różnicy. Również w surowicy żadnej z przebadanych przez nas krów nie stwierdzono braku IgM. Jedynie u 4 zwierząt ilość makroglobulin wydaje się być zmniejszona. Koniecznym zatem byłoby ilościowe oznaczenie immunoglobulin tej klasy jak również kilkakrotne powtórzenie badania w różnych odstępach czasu.

Ważnym zagadnieniem jest problem, czy spadek ilości makroglobulin w surowicy jest zjawiskiem specyficznym dla białaczki i czy nie może wystąpić z innych przyczyn. Trainin i wsp. (11) przebadali 60 krów dotkniętych róż-

nymi chorobami, zarówno ostrymi jak i przewlekłymi. Surowice wszystkich tych zwierząt zawierały IgM. Poziom ich często był wyższy od normalnego, nawet mimo zmniejszenia się ogólnej ilości immunoglobulin w surowicy.

Wobec uszkodzenia układu siateczkowo-śródbłonkowego przez proces białaczkowy oraz wobec zmian ilościowych w obrębie IgM można się spodziewać, że odpowiedź immunologiczna u bydła dotkniętego białaczką będzie wykazywała większe lub mniejsze zaburzenia. Potwierdzają to wyniki prac Celera i Cernego (2, 3), którzy podawali krowom białaczkowym dostrzykowo erytrocyty owcy. Nie stwierdzono u nich żadnej reakcji immunologicznej, podczas gdy w surowicy krów kontrolnych pojawiły się hemolizyny i hemaglutyniny, a w węzłach chłonnych nadwymieniowych wykryto metodą Jernego komórki produkujące przeciwciała.

Interesującym wydaje się fakt, że o ile u dorosłych krów białaczkowych nie występują wyraźne zmiany w wytwarzaniu i w poziomie immunoglobulin klasy IgG (13), o tyle u cieląt dotkniętych tą chorobą daje się zauważyć dość charakterystyczne zmniejszenie się ilości tych białek w surowicy, przy czym nie odpowiada to wahanom ilościowym immunoglobulin związanym z wiekiem (14).

Wnioski

Wyniki własnych badań nie potwierdziły hipotezy, że brak makroglobulin w surowicy może stanowić pewne kryterium diagnostyczne białaczki limfatycznej u bydła. Wobec tego, iż często dochodzi jedynie do zmniejszenia ich ilości konieczne są badania ilościowe.

Piśmiennictwo

1. Brummerstedt E., Bendixen H. J.: Acta path. microbiol. scand. (B) 79, 699, 1971.
2. Celer V.: Neoplasma 18, 523, 1971.
3. Cerny L., Celer V.: Neoplasma 16, 109, 1969.
4. Clausen J.: Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules, North-Holland Publishing Company, Amsterdam—London, 1969.
5. Gillette K. G., Olson C., Tekeli S.: Am. J. vet. Res. 30, 975, 1969.
6. International Committee on Bovine Leucosis: J. nat. Cancer Inst. 41, 243, 1968.
7. Klopfer U., Trainin Z.: Refuah vet. 27, 60, 1970.
8. Penhale W. J., Christie G.: Res. vet. Sci. 10, 493, 1969.
9. Scheuring W., Barnecki W.: Medycyna Wet. 29, 99, 1973.
10. Surjan J.: Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 16, 107, 1969.
11. Trainin Z., Nobel T. A., Klopfer U., Neuman F.: Refuah vet. 25, 187, 1968.
12. Trainin Z.: Am. J. vet. Res. 30, 1475, 1969.
13. Trainin Z., Klopfer U.: Cancer Res. 31, 1968, 1971.
14. Trainin Z., Maitrom R., Klopfer U., Meidan G.: J. comp. Path. 83, 87, 1973.

Adres autora: Tadeusz Frymus, ul. Pasteura 4/6 m. 60, 02-093 Warszawa.

Praca została wykonana pod kierunkiem dr Antoniego Schollenbergera, któremu autor składa serdeczne podziękowania.

Фрымуc Т. — Иммуноэлектрофоретический анализ сыворотки крови коров больных лейкозом.

Исследованиям подвергли сыворотки крови 14 коров больных лейкозом и 10 здоровых коров при помощи антисыворотки против полной говяжевой сыворотки крови и моновалентной антисыворотки против IgM. Установили, что все сыворотки больных и здоровых коров вызывали появление преципитационной дуги отвечающей глобулине IgM. В 4 сыворотках крови лейкозных коров эти дуги были слабо представлены что указывает на понижение количества глобулинов IgM. Результаты обсудили на фоне литературных данных.

Frymus T. — **Immunoelectrophoretic analysis of sera of cows suffering from leukaemia.**

Immunoelectrophoretic analysis has been carried out with 14 sera of cows suffering from leukaemia and with 10 sera of normal cows. There were used immune sera against the total serum of cow and mo-

novalent serum anti-IgM. All the sera examined (from diseased and normal animals) revealed precipitation line corresponding to IgM globulins. In four sera derived from sick cows the precipitation lines were not distinctive pointing to the decreased amounts of macroglobulins. The results were discussed with the data obtained from literature.

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

EDWARD WIERZCHOŚ, ALINA ŁADA-GORZOWSKA, EWA KRAWCZYK

Podwiązanie nasieniowodów u kogutów

Z Zakładu Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt

Z Zakładu Hodowli Drobiu

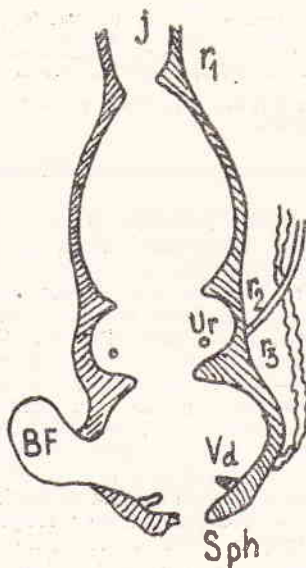
Instytutu Zootechniki, Balice k. Krakowa

Selekcja ras mięsnych drobiu, zmierzająca głównie do poprawy umięśnienia ptaków, spowodowała znaczne obniżenie płodności na skutek występujących trudności w kopulowaniu. W związku z tym coraz większego znaczenia nabierają próby wprowadzenia do rozrodu drobiu metody sztucznego unasieniania, jak również badania nad zachowaniem się samców wobec samic, odchowywanych w stadku o ustalonej hierarchii społecznej.

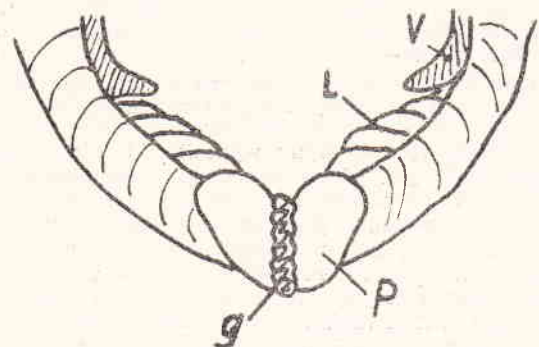
Przy prowadzeniu tych badań wynika potrzeba posiadania kogutów stymulatorów — próbników, charakteryzujących się dobrym postępem płciowym, jednakże niezdolnych do zapłodnienia kur. Z uwagi na trudności w dostarceniu do nasieniowodów koguta poprzez powłoki brzuszne, podejmowane próby wazektomii w obrębie jamy brzusznej nie powiodły się, dlatego też podjęto zabiegi umożliwiające podwiązanie nasieniowodów w obrębie kloaki.

Topografia miejsca podwiązania nasieniowodów

Ujście zewnętrzne nasieniowodów znajduje się u kogutów w kloace, na tzw. wyrostkach brodawkowatych (2), wystających obustronnie z końcowego odcinka steku, doogonowo za trzecim fałdem kloaki (ryc. 1). Dogłównowo od tego fałdu uchodzą do kloaki moczowody, na-



Ryc. 1. Schemat kloaki ptaków. Ur — ujście moczowodu, Vd — ujście nasieniowodu, r₁ — 1-szy fałd kloaki, r₂ — 2-gi fałd kloaki, r₃ — 3-ci fałd kloaki, Sph — zwieracz odbytu, BF — Bursa Fabricius'a, j — jelito. Zmodyfikowany przez autorów rysunek Grass'a (2).



Ryc. 2. Schemat narządu kopulacyjnego koguta. V — wyrostek brodawkowy nasieniowodu, L — fałd chłonny, p — prącie, g — rynienka. Rysunek Nishimama (3).