

ELŻBIETA SOBIECH, KRZYSZTOF A. SOBIECH

Aktywność gamma - glutamylotranspeptydazy (GGTP) we krwi bydła zdrowego i chorego na białaczkę

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej we Wrocławiu

Z Laboratorium Biochemii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

γ -glutamylotranspeptydaza (GGTP) jest enzymem opisanym po raz pierwszy w 1950 roku (5). Enzym ten katalizuje przeniesienie reszty γ -glutamylowej z γ -glutamyłowych peptydów na aminokwasy lub peptydy. Aktywność GGTP w surowicy ludzkiej stwierdzona została przez Szewczuka i Orłowskiego (15), zaś histochemiczną lokalizację w tkankach przeprowadzili Albert i wsp. (1). Ponadto, jak wykazały badania Szewczuka, enzym w surowicy jest identyczny z formą rozpuszczalną GGTP z wątroby (13). Obecność GGTP w krwinkach białych krwi obwodowej i szpiku wykazał histochemicznie Szmigielski i wsp. (16), zaś Bona i Streja znaleźli aktywność tego enzymu w leukocytach wysięku otrzewnowego świnki morskiej (3). W 1966 roku Kotlarek-Haus opisała występowanie aktywności GGTP w leukocytach krwi ludzkiej, wykazując jej wybitne podwyższenie w białaczce paramieloblastycznej, natomiast obniżenie w mikromieloblastycznej (7).

Z badań Unglauba i wsp. (17)) wynika, że aktywność GGTP w surowicy bydła dorosłego nie zmienia się w zależności od wieku, rasy, pory roku oraz w przebiegu ciąży. Ponadto Simesen i wsp. (10) w doświadczalnej fasciozie u bydła stwierdzili pięciokrotny wzrost aktywności GGTP w surowicy. W dostępnym piśmiennictwie brak jest danych na temat oznaczania aktywności GGTP u bydła chorego na białaczkę, dlatego też celem niniejszej pracy było skontrolowanie aktywności tego enzymu we krwi bydła dotkniętego najczęstszą formą białaczki bydłowej — białaczką limfatyczną.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na wyselekcjonowanych 42 sztukach bydła rasy nizinnej czarno-białej (32 krowy i 10 cieląt). Hematologicznie białaczkę wykazano u 18 krów, zaś badaniem klinicznym stwierdzono formę guzowatą tego schorzenia u 4 krów. Grupę kontrolną stanowiło 10 sztuk bydła dorosłego oraz 10 cieląt w wieku od 10 do 30 dnia życia nie wykazujących tych zmian.

Dobór zwierząt przeprowadzono na podstawie następujących badań laboratoryjnych: obliczenia ilości białych i czerwonych krwinek w 1 mm³ krwi, względnego procentu limfocytów, oznaczenia poziomu hemoglobiny i liczby hematokrytowej. Obliczenia ilości krwinek białych dokonano przy pomocy celoskopu produkcji szwedzkiej firmy Lars Ljungberg Co. typ 401; wyniki sprawdzono losowo metodą klasyczną w komorze Thoma-Zeissa. Oznaczenie poziomu hemoglobiny wykonano metodą fotokolorymetryczną-cyjanhemoglobi-nową, przy użyciu fotokolorymetru Spekol, natomiast względną liczbę krwinek czerwonych — metodą mi-

krohematokrytową przy użyciu mikrohematokrytu Unipan typ 316. Materiał do badań stanowiła krew, z której izolowano leukocyty według zmodyfikowanej metody Bicza i wsp. (2) oraz surowica, osocze wersenianowe i hemolizat z krwinek czerwonych. Zawiesinę izolowanych leukocytów homogenizowano w temperaturze 0—2° w szklanym homogenizatorze Pottera z 0,85% NaCl w stosunku 1:1 w czasie 1 minuty. Z otrzymanego homogenatu wykonano rozmaz, w którym pod mikroskopem nie stwierdzono całych limfocytów. Aktywność GGTP w surowicy i osoczu oznaczono według uproszczonego testu opracowanego ostatnio w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu*). Test ten polega na zastosowaniu krążków bibuły nasyconych γ -glutamyl- α -naftyloamidem, buforem i aktywatorem. Uwolnioną α -naftyloaminę oznacza się kolorymetrycznie w reakcji z p-dwumetyloaminobenzaldehydem (DMBA) wobec kwasu solnego (14).

Aktywność GGTP w homogenacie z krwinek białych i hemolizacie oznaczono według metody Orłowskiego i Szewczuka (8). W tym przypadku aktywność enzymu wyrażono w jednostkach oznaczających ilość μ mol (10⁻⁶) NA, uwolnionej w ciągu 60 minut w przeliczeniu na 10¹⁰ leukocytów.

Histochemiczną lokalizację enzymu w leukocytach wykonano według metody Szmigielskiego i wsp. (16), używając w mieszaninie reakcyjnej glicyloglicynę, zamiast metioniny. Dwupeptyd ten, jak wykazano, w większym stopniu przyspiesza reakcję niż metionina. Preparaty, w których wykazano aktywność GGTP były porównywane z rozmazami wykonanymi z tej samej zawiesiny izolowanych leukocytów, barwionymi metodą Pappenheima.

Tab. 1. Średnie wartości hematologiczne w badanych grupach bydła

	Cielęta	Zwierzęta dorosłe	
		zdrowe	białaczkowe
Leukocyty w tys./mm ³	10,6 ± 0,9	6,7 ± 0,7	42,2 ± 4,8
Limfocyty w %	62,9 ± 7,6	62,3 ± 6,7	88,4 ± 7,1
Erythrocyty mln/mm ³	9,3 ± 1,1	5,4 ± 0,6	6,2 ± 0,6
Hemoglobina g/100 ml	12,1 ± 1,4	9,7 ± 1,0	9,3 ± 0,8
Liczba hematokrytowa	33,1 ± 4,1	28,4 ± 2,9	23,6 ± 2,1

Wyniki

Wyniki badań hematologicznych według których klasyfikowano zwierzęta do obu grup przedstawia tab. 1. Wyraźne różnice pomiędzy zwierzętami dorosłymi zdrowymi i białaczkowymi wykazuje liczba leuko-

*) Zestaw do oznaczania aktywności gamma-glutamylotranspeptydazy w surowicy i w moczu jest oferowany przez Wytwórnę Surowic i Szczepionek w Krakowie.

cytów (tys./mm³) oraz względny procent limfocytów. W pozostałych badaniach różnice badanych parametrów w grupach zwierząt zdrowych i chorych były nieznaczne. U cieląt stwierdzono wyższe wartości liczby erytrocytów, hemoglobiny i liczby hematokrytowej w porównaniu ze zwierzętami dorosłymi.

Tab. 2. Aktywność GGTP we krwi bydła w różnym wieku

Materiał badany	Aktywność GGTP	
	Cielęta	Krowy
Surowica (mj/ml)	11,6 ± 3,1	3,1 ± 1,1
Osocze (mj/ml)	10,8 ± 2,9	2,8 ± 1,2
Hemolizat 20% (mj/ml)	0	0
Homogenat izolowanych leukocytów (jedn./10 ¹⁰ krwinek)	56 ± 22	62 ± 19

W tab. 2 przedstawiono wyniki oznaczania aktywności GGTP w grupie zwierząt zdrowych, tj.: cieląt (10—30 dnia życia) i krow w surowicy, osoczu wersenianowym, hemolizacie i izolowanych krwinkach białych. Aktywność GGTP w surowicy i osoczu cieląt była ponad trzykrotnie wyższa, niż u osobników dorosłych. W hemolizacie, zarówno u cieląt, jak i krow nie stwierdzono aktywności badanego enzymu, natomiast w homogenacie izolowanych krwinek białych różnice w aktywności są niewielkie.

Tab. 3. Aktywność GGTP we krwi bydła dorosłego

Materiał badany	Aktywność GGTP	
	Grupa kontrolna zwierząt dorosłych	Zwierzęta chore na białaczkę
Surowica (mj/ml)	3,1 ± 1,1	3,0 ± 1,4
Krwinki białe *) tys./mm ³		
< 10	62 ± 19	—
10—20		52 ± 22
20—50		43 ± 16
> 50		36 ± 11

Objaśnienie: *) = Homogenat z zawiesiny krwinek białych został sporządzony jak opisano w części Materiał i metody a aktywność GGTP wyrażona w jednostkach w przeliczeniu na 10¹⁰ krwinek.

Aktywność GGTP we krwi bydła zdrowego i chorego na białaczkę limfatyczną obrazuje tab. 3. Jak wynika z tej tabeli, aktywność enzymu w surowicy obydwu grup zwierząt jest podobna, natomiast istotne różnice w aktywności GGTP obserwowano w krwinkach białych. Wraz ze wzrostem ilości leukocytów w 1 mm³ krwi, aktywność GGTP w homogenacie z leukocytów maleje. W grupie zwierząt białaczkowych, posiadających w 1 mm³ krwi ponad 50 tys. krwinek białych (ponad 80% limfocytów) jest o 58% niższa niż u osobników zdrowych (tab. 3). Metodą histochemiczną zlokalizowano w cytoplazmie izolowanych leukocytów krwi zwierząt zdrowych, wykazując jego obecność w granulocytach obojętnochłonnych i nieznacznym procencie limfocytów. W badanym materiale białokrwinkowym, pochodzącym od zwierząt białaczkowych, odczyn histochemiczny był bardzo słaby i pochodził od niewielkiej ilości granulocytów obojętnochłonnych. W rozmazach z krwi białaczkowej z limfocytozą wykazującą od 84 do 99% limfocytów, obserwowano niedojrzałe postacie z układu limfocytnego, ich formy nieprawidłowe, takie jak: limfocyty z dzielącym się jądrem płatowatym oraz komórki limfoidalne, trudne do różnicowania.

Omówienie wyników

Wprowadzenie na początku sześćdziesiątych lat szybkich i dokładnych metod oznaczania aktywności GGTP, pozwoliło na zastosowanie testu oznaczania tego enzymu w diagnostyce schorzeń wątroby, trzustki i mięśnia sercowego.

W medycynie ludzkiej GGTP należy do nielicznych enzymów, których oznaczanie wytrzymało próbę praktycznej przydatności w ciągu minionych piętnastu lat (4, 6).

W badaniach nad GGTP u bydła wykazano, że aktywność w surowicy jest trzykrotnie wyższa u cieląt, niż u osobników dorosłych. Podobne różnice aktywności GGTP w surowicy, w zależności od wieku, obserwowano także u ludzi i świnki morskiej (9, 11). Aktywność GGTP stwierdzono również w homogenacie izolowanych krwinek białych u bydła zdrowego i chorego na białaczkę limfatyczną, przy czym obserwowano, że ze wzrostem ilości leukocytów w 1 mm³ krwi, zmniejsza się aktywność badanego enzymu. Uzyskane wyniki zostały potwierdzone w badaniach cytochemicznych, w których wykazano aktywność GGTP w granulocytach obojętnochłonnych a śladową w limfocytach krow zdrowych. Wyższą aktywność w granulocytach niż w leukocytach stwierdzono także u takich enzymów, jak aminopeptydaza leucynowa, aminotrójpeptydaza, karboksypeptydaza oraz w arylamidazie aminokwasów, natomiast wyższe aktywności w leukocytach wykazują aminopeptydaza aspartylowa, prolinaza, prolidaza oraz dwupeptydaza glicylo-glicynowa i leucylo-glicynowa (12). We krwi krow białaczkowych aktywność badanego enzymu była wyraźnie niższa.

Oslabienie reakcji cytochemicznej może być uzależnione od wielu czynników jak szybkość dyfuzji substratu do komórki, szybkość dyfuzji produktu (α -naftyloaminy) z komórki do otoczenia lub adsorpcja na ścianach leukocytów.

Piśmiennictwo

- Albert Z., Orłowski M., Szewczuk A.: Nature, Lond., 191, 767, 1961.
- Bicz W., Koj H., Zgliczyński M.: Acta physiol. pol. 9, 3, 1958.
- Bona C., Streja D.: J. Histochem. Cytochem. 13, 298, 1965.
- Gibiński K.: Pol. Tyg. lek. 27, 649, 1972.
- Hanes C. S., Hird F. J. R., Isherwood R. A.: Nature, Lond., 166, 288, 1950.
- Kokot F., Siedziński Z.: Z. klin. Chem. klin. Biochem. 12, 374, 1974.
- Kotlarek-Haus S.: Pol. Arch. Med. wewn. 37, 407, 1966.
- Orłowski M., Szewczuk A.: Acta bioch. pol. 8, 189, 1961.
- Sasowa J., Wartenberg J., Maksymowicz J.: Pediat. pol. 42, 31, 1967.
- Simesen M. G., Nielsen K., Nansen P.: Res. vet. Sci., 15, 32, 1973.
- Sobiech K. A., Szewczuk A.: Arch. Immun. Ther. 22, 635, 1974.
- Szczeklik E.: Enzymologia kliniczna, PZWL, 1974.
- Szewczuk A.: Clinica chim. Acta, 14, 608, 1966.
- Szewczuk A., Nienartowicz B.: Diag. Lab. 9, 277, 1973.
- Szewczuk A., Orłowski M.: Clinica chim. Acta 6, 430, 1961.
- Szmigielski S., Litwin J., Zupańska B.: J. clin. Path. 18, 244, 1965.
- Unglaub W., Afschar A., Marx D.: Dt. tierärztl. Wschr. 80, 131, 173.

Adres autora: lek. wet. Elżbieta Sobiech, ul. Olszewskiego 65/4, 51-642 Wrocław.

Podziękowanie: Autorzy dziękują za cenne uwagi i dyskusję dr hab. M. Nikołajczuk i doc. dr hab. A. Szewczukowi.

Собех Э., Собех К. А. — Активность γ -глутамил-транспептидазы (GGTP) в крови здорового и больного лейкозом крупного рогатого скота.

Активность GGTP определяли в сыворотке крови, в плазме крови в гомогенате лейкоцитов и в гемолизате крови здорового и больного лимфатическим лейкозом крупного рогатого скота. Установили, что активность GGTP в сыворотке крови телят была свыше три раза сильнее чем в сыворотке взрослых животных. Кроме того установили присутствие активности GGTP в плазме и в гомогенате изолированных лейкоцитов а отсутствие в гемолизате. Определяя активность GGTP в материалах от животных больных лейкозом обнаружили значительное ей понижение в лейкоцитах и отсутствие отчетливых разниц в сыворотке крови. Гистохимически локализовали энзим в нейтрофильных гранулоцитах и в лимфоцитах, причем процент кровяных телец проявляющих положительную энзи-

матическую реакцию был у больных животных ниже чем у здоровых.

Sobiech E., Sobiech K. A. — The activity of gamma-glutamyl-transpeptidase (GGTP) in the blood of normal and leukaemic cattle.

The activity of GGTP in the sera, plasma, homogenized leukocytes and haemolytic blood of normal and leukaemic cattle was assayed. It was found that the activity of GGTP in the serum was over three times higher in calves than in adult animals. Besides there was noticed the occurrence of the activity of the enzyme in the haemolytic blood. The activity of GGTP in cattle suffering from leukosis was decreased in leukocytes but not in sera. The enzyme was situated in neutral granulocytes and lymphocytes; the percentage of blood corpuscles with positive enzymatic reaction was lower in sick animals compared with those of normal ones.

JULIAN STANKIEWICZ
Lubartów

Enzootia grzybicy u indyków w przebiegu mykoplazmozy, leczonej antybiotykami

Grzyby należą do szczególnie rozpowszechnionych w otoczeniu domowych zwierząt drobnoustrojów warunkowo-chorobotwórczych. W patologii drobiu szczególnie dużą rolę odgrywają dwa rodzaje grzybów, a mianowicie pleśń z rodzaju *Aspergillus* oraz grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida*. Pierwsze z nich występują najczęściej w postaci zarodników w ściółce dla drobiu (słoma, siczka, wióry, trociny itp.), zepsutej karmie, w wodzie, aparatach lęgowych i kłujnikach, koszach na pisklęta i in. Grzyby z rodzaju *Candida* bytują jako komenzale na błonach śluzowych jamy dziobowej, przewodu pokarmowego a nawet górnych dróg oddechowych (1, 2). Przy zaistnieniu czynników usposabiających obydwie rodzaje grzybów powodować mogą masowe zachorowania ptaków. Jednym z ważniejszych czynników, ułatwiających grzybom nabycie właściwości chorobotwórczych są antybiotyki, które podawane ptakom doustnie hamują rozwój bakteryjnej flory jelitowej o antagonistycznym działaniu w stosunku do grzybów, co ułatwia tym ostatnim obfite namnażanie się (4).

Własne obserwacje dotyczą enzootii zakażeń grzybami, jakie rozwinęły się w stadzie indyków po stosowaniu streptomycyny, oxytetracyliny oraz neotarchocinu. Stado obejmowało 2290 ptaków, u których w 6-tym tygodniu życia wybuchła mykoplazmoza, połączona z masowymi upadkami indyków. Oprócz typowych dla tej choroby objawów stwierdzano silną biegunkę oraz stany zapalne stawów, zwłaszcza skokowych.

Badania laboratoryjne padłych ptaków początkowo wykazały obfity wzrost *E. coli* (szczyepy gamma-hemolityczne). W celach leczniczych zastosowano w chorym stadzie u części indyków streptomycynę, u pozostałych oxytetracynę (obydwie antybiotyki podawano *per os*). Przy braku wyraźniejszej poprawy po upływie tygodnia w miejsce streptomycyny i oxytetracyliny podano ptakom neotarchocin przez okres dalszych 7 dni. Wobec nowej fali upadków dokonano szczegółowych badań chorych i padłych ptaków. Tym razem badania laboratoryjne wykazały aspergilozę płuc i worków powietrznych oraz kandydiazę przewodu pokarmowego. Po uzyskaniu powyższego wyniku przerwano podawanie antybiotyków a podjęto leczenie zakażeń grzybami.

W tym celu przez okres 5 dni stosowano z wodą do picia roztwór jodu w jodku potasu



Ryc. 1. Obrzęk zatoki podoczodołowej na tle mykoplazmozy u indyka