

EWA KACZMARCZYK

Badania polimorfizmu kwaśnej fosfatazy w leukocytach krwi obwodowej u bydła

Instytut Genetyki i Metod Doskonalenia Zwierząt Wydziału Zootechnicznego ART,
10-957 Olsztyn-Kortowo

Polimorfizm białek jest zjawiskiem często występującym u zwierząt. Wielopostaciowość białek związana jest często ze zróżnicowaniem funkcji, a w przypadku enzymów ze zmianą ich aktywności. Polimorfizm oddziałujący na przebieg procesów fizjologicznych może wpływać na zdolność przystosowawcze organizmów. Ze względu na rolę układu białokrwinkowego w procesach obronnych, duże nadzieje wiąże się z badaniami polimorfizmu białek występujących w leukocytach. Jednym z nich jest kwaśna fosfataza. U ludzi występuje ona w lizosomach wszystkich rodzajów komórek układu białokrwinkowego. W ziarnistościach azurochłonnych neutrofilii stanowi część enzymatycznego wyposażenia degradującego materiał sfaagocytowany. Podobną rolę pełni w monocytach (3). Uczestniczy także w transformacji blastycznej limfocytów i usuwaniu resztek organelli komórkowych powstałych podczas podziałów mitotycznych (2, 4).

Andrews i Alichanidis (1) stosując żywiczy wymiennik jonowy Amberlite CG-50, wyekstrahowali z leukocytów krwi pojedynczą formę elektroforetyczną enzymu o masie cząsteczkowej ok. 42 tys. daltonów i optimum działania pH 5,8. Nie wyekstrahowana część zawierała około 80% ogólnej aktywności kwaśnej fosfatazy wykazującej optimum działania w pH 4,9. Metodą elektroforezy „dyskowej” w żelu poliakrylamidowym zidentyfikowano tę część enzymu jako frakcję wolno migrującą. Autorzy nie wykluczają jednak istnienia więcej niż jednej frakcji kwaśnej fosfatazy w tej strefie migracji. Cytowana praca jest jedyną pozycją literatury na temat polimorfizmu kwaśnej fosfatazy występującej w leukocytach u bydła.

Celem pracy była analiza zróżnicowania leukocytarnych form polimorficznych kwaśnej fosfatazy występujących w obrębie populacji bydła rasy czarno-białej.

Materiał i metody

Badaniami objęto 769 klinicznie zdrowych osobników pochodzących z kilku dużych stad bydła rasy czarno-białej oraz ze Stacji Hodowli i Unasienniania Zwierząt z północno-wschodnich i centralnych rejonów Polski. Wydzielono 8 następujących grup wiekowych: jałówki do 0,5 roku — 66 sztuk, jałówki od 0,5 do 1 roku — 118 sztuk, jałówki od 1 do 2 lat — 202 sztuki, krowy do 5 lat — 155 sztuk, krowy od 6 do 10 lat — 122 sztuki oraz buhajki od 1,5 do 2 lat — 60 sztuk, buhaje od 2 do 3 lat — 22 sztuki i buhaje od 3 do 4 lat — 24 sztuki.

Krew do badań w ilości 30 ml pobierano z żyły jarzmowej stosując heparynę jako antykoagulant.

Leukocyty izolowano z krwi obwodowej stosując 0,85% roztwór NH_4Cl (5). Uzyskaną masę leukocytarną przemywano schłodzoną do temperatury 281,15K (+4°C) roztworem fizjologicznym NaCl dodawano kilka kropli wody destylowanej i umieszczano w zamrażarce w temperaturze 257,15K (-16°C). Po sześciokrotnym rozmrażaniu i zamrażaniu masę leukocytarną wirovano przez 15 minut przy 3282 g w temperaturze 269,15K. Otrzymany supernatant poddawano elektroforezie w żelu agarozowym stosując następujące bufor: — bufor do elektroforezy stanowił 0,1 mol/l wodny roztwór weronału sodu o pH 8,4 i sile jonowej 0,1. Bufor ten po rozcieńczeniu wodą w stosunku 1:2 używany był także do żelu.

— do barwienia stosowano 50 mmol/l bufor weronał sodu — octan sodu o pH 4,9—5,0.

Na płytkę szklaną o wymiarach 23×20 z ustawionym w odległości 5 cm od końca katodowego „grzebieniem” wylewano rozpuszczoną na łaźni wodnej 1% agarozę i pozostawiano do zastygnięcia na 20 minut w temperaturze pokojowej. Grubość żelu wynosząca ok. 1,2 mm uzyskiwano przy pomocy ramki gumowej, którą nakładano na płytkę przed wylaniem agarozy. W powstałych po wyjęciu „grzebienia” 12 rowkach umieszczano supernatant leukocytarny z kroplą 0,1% roztworu błękitu bromofenolowego jako wskaźnika migracji białek podczas elektroforezy, którą prowadzono w lodówce w temperaturze 269,15K przez 6—8 godzin przy gradiente napięcia 15 V/cm (350 V i 50 mA). Kończono elektroforezę, gdy linia wyznaczona błękitem bromofenolowym znajdowała się na granicy mostka anodowego. Wówczas żel zdejmowano z płytki i inkubowano przez 18 godzin w temperaturze 291,15K w 50 mmol/l buforze do barwienia zawierającym 0,1% alfa-naftylofosforan sodu, 0,1% Fast Red TR Salt oraz 5 mmol/l MnCl_2 . Elektroforegramy utrwalano i przechowywano w 7% roztworze kwasu octowego.

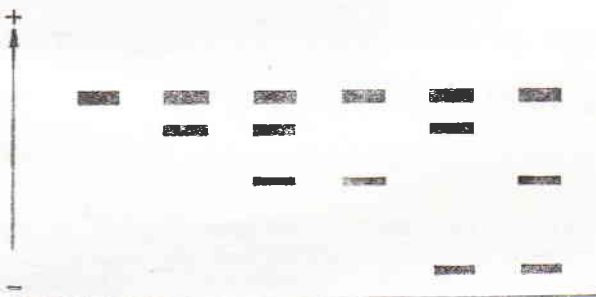
Wyniki i omówienie

W elektroforegramach leukocytów krwi badanych zwierząt obserwowano występowanie czterech frakcji kwaśnej fosfatazy różniących się między sobą ruchliwością elektroforetyczną oraz natężeniem barwy obserwowanym u poszczególnych osobników. Formy te oznaczone symbolami A, B, C, D (od najszybszej do najwolniejszej) występowały w żelu agarozowym w sześciu kombinacjach tworzących następujące fenotypy: A, AB, ABC, AC, ABD i ACD (ryc. 1). Największą intensywnością barwy obserwowaną u wszystkich badanych zwierząt cechowała się szybko wędrująca frakcja A, natomiast różne natężenie barwy u poszczególnych osobników rejestrowano w strefach migracji B, C, D. Wolno wędrujące frakcje C i D były dobrze widoczne, chociaż intensywność barwy była mniejsza w porównaniu z frakcjami A i B.

Tab. 1. Zróżnicowanie populacji bydła pod względem polimorfizmu kwaśnej fosfatazy występującej w leukocytach

Grupa wieku	Fenotypy						Razem n
	A	AB	ABC	AC	ABD	ACD	
Jałówki:							
- do 0,5 roku	35 (54,6)*	28 (42,4)	2 (3,0)				66
- od 0,5-1 roku	23 (19,5)	89 (75,4)	4 (3,4)				116
- od 1-2 lat	42 (20,8)	153 (76,7)	1 (0,5)	1 (0,5)	2 (1,0)	1 (0,5)	202
Krowy:							
- do 5 lat	26 (16,8)	125 (80,7)	3 (1,9)	1 (0,6)			155
- od 6-10 lat	21 (17,2)	93 (76,3)	5 (4,1)	1 (0,8)		2 (1,6)	122
Buhaje:							
- od 1,5-2 lat	5 (8,3)	54 (90,0)				1 (1,7)	60
- od 2-3 lat	1 (4,5)	21 (95,5)					22
- od 3-4 lat		22 (91,7)	2 (8,3)				24

Objaśnienie: * — poddano liczbę zwierząt, a w nawiasie %.



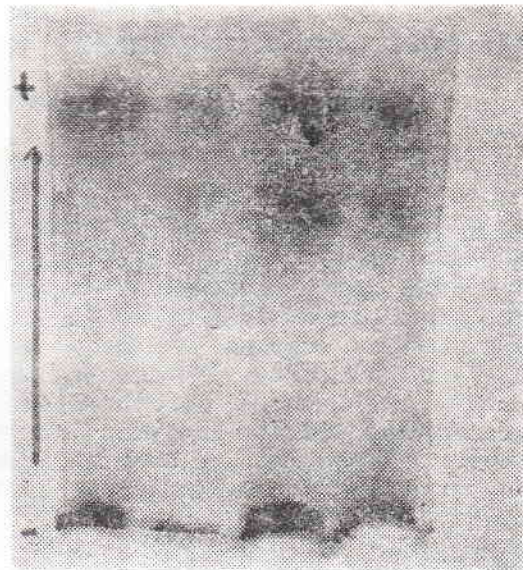
Ryc. 1. Typy polimorficzne kwaśnej fosfatazy leukocytów krwi u bydła — schemat; od lewej: A, AB, ABC, AC, ABD, ACD

Obserwowane różnice w natężeniu barwy mogą być spowodowane różnym stężeniem tych frakcji w komórkach leukocytarnych poszczególnych osobników, a także ich różną aktywnością wobec stosowanego substratu.

Badania populacyjne wykazały najczęstsze występowanie fenotypów A i AB (ryc. 2), których frekwencja wykazuje związek z wiekiem i płcią badanych zwierząt (tab. 1). Fenotyp AB rejestrowano najczęściej wśród zwierząt starszych czyli buhajów, krów i jałówek powyżej szóstego miesiąca życia, natomiast u jałówek najmłodszych (do 0,5 roku) przeważał fenotyp A, którego frekwencja stopniowo obniżała się w starszych grupach wiekowych (tab. 1). Wśród buhajów fenotyp ten występował kilkakrotnie rzadziej niż u jałówek i krów (tab. 1).

Spośród czterech pozostałych fenotypów kwaśnej fosfatazy, najczęściej rejestrowano typ ABC, natomiast tylko sporadycznie stwierdzano występowanie typów AC, ABD i ACD (tab. 1).

Uzyskane wyniki wskazują, że kwaśna fosfataza leukocytów krwi obwodowej u bydła jest enzymem heterogennym, co potwierdzałoby sugestie Andrews'a i Alichanidisa (1). Przyczyny polimorfizmu oraz lokalizacja poszczególnych frakcji kwaśnej fosfatazy w zróżnicowanych morfologicznie komórkach nie są znane.



Ryc. 2. Typy polimorficzne kwaśnej fosfatazy leukocytów krwi u bydła — od lewej: A, AB, AB, AB

W obrębie badanej populacji stwierdzono występowanie czterech frakcji kwaśnej fosfatazy, które w elektroforegramach żelu agarozowego tworzą sieć kombinacji fenotypowych.

Prawidłowości występowania typów A i AB w obrębie badanej populacji wskazują na możliwość genetycznego uwarunkowania polimorfizmu kwaśnej fosfatazy. Potwierdzenie tej hipotezy wymaga przeprowadzenia badań rodzinnych, dających podstawę do przedstawienia propozycji modelu dziedziczenia genów warunkujących występowanie rejestrowanych form polimorficznych kwaśnej fosfatazy w leukocytach krwi u bydła.

Piśmiennictwo

1. Andrews A. T., Alichanidis E.: J. Dairy Res. 42, 391, 1975.
2. Astaldi G., Lisiewicz J., Cichoński T., Burlina A.: Acta Vitaminol. Enzymol. 27, 197, 1973.
3. Lisiewicz J., Moszczyński P.: Przegl. lek. 40, 455, 1983.
4. Moszczyński B., Lisiewicz J.: Pol. Tyg. lek. 37, 813, 1982.
5. Walawski K., Głogowska B., Kaczmarczyk E., Kolman G., Kruk Z.: Med. Wet. 34, 19, 1979.

Adres autora: dr Ewa Kaczmarczyk, ul. Limanowskiego 50/57, 10-343 Olsztyn

Качмарчик Э. — Исследования полиморфизма кислой фосфатазы в лейкоцитах периферической крови у скота

Cель исследований состояла в анализе дифференциации лейкоцитарных полиморфических форм кислой фосфатазы в пределах популяции черно-пестрого скота.

Исследования охватили 769 клинических здоровых особей разного возраста, из нескольких крупных стад. С применением горизонтального электрофореза в агаровом геле отмечено, что кислая фосфатаза в лейкоцитах периферической крови скота является гетерогенным энзимом. Записано 4 фракции этого энзима, образующие 6 фенотипических комбинаций. Правильность появления типов А и

AB указывает на возможность генетического обусловления полиморфизма кислой фосфатазы.

Kaczmarczyk E. — Studies on polymorphism of acid phosphatase in leukocytes of bovine peripheral blood

The objective of the studies was to analyze the differentiation of polymorphic forms of acid phosphatase in lymphocytes of black-and-white cows. The examinations were performed on 769 normal cows of various age in a few large herds. Horizontal electrophoresis in agarose gel showed that acid phosphatase of bovine peripheral blood leukocytes is a heterogenous enzyme. Four fractions of this enzyme forming 6 phenotypic combinations were noted. Regularity of appearance of A and AB types of acid phosphatase points to a possibility of a genetic regulation of acid phosphatase polymorphism.

KRYSTYNA TYZENHAUZ-MALINOWSKA, HUBERT TWARDOWSKI

Aktywność aminotransferazy asparaginianowej (AspAT) i alaninowej (AlAT) a ocena histopatologiczna wątroby u krów

Oddział Weterynaryjnej Ochrony Produkcji Zwierzęcej Zakładu Higieny Weterynaryjnej,
ul. Kartuska 249, 80-125 Gdańsk

Wzrost zainteresowania oznaczaniem aktywności enzymów, zwłaszcza aminotransferaz przy badaniu bydła, datuje się od 1970 r. W owym czasie Sommer w badaniach nad zagrożeniem krów tzw. zespołem porodowym wprowadził i uzasadnił termin „Fermentdiagnostik” (14). Autor ten badaniom aktywności aminotransferaz przypisuje duże znaczenie i twierdzi, że zespół porodowy pozostaje w związku przyczynowym z niedoborem energii, a to z kolei powoduje zwiększenie przepuszczalności błon komórkowych w wątrobie, w tym także zwiększone przenikanie enzymów wewnątrzkomórkowych do płynów międzykomórkowych. Wczesne wykrywanie krów zagrożonych zespołem porodowym legło u podstaw tzw. metafylaktyki, propagowanej m.in. przez Flashoffa (4) oraz Ochlicha (11), a w Polsce przez Marcinkowskiego i wsp. (9).

Jak podaje piśmiennictwo, oznaczanie aktywności aminotransferaz, a zwłaszcza AspAT stanowi integralną część badań tzw. profilu metabolicznego wchodzących w skład kompleksowych programów diagnostycznych u krów mlecznych (8, 12, 13, 14, 17). W programach tych aktywności aminotransferaz przypisuje się dużą rolę. Niektórzy uważają, że aktywność AspAT należy zaliczyć do najważniejszych wskaźników diagnostycznych, a badania Mikusza (10) wykazały u krów istnienie zależności znacznego stopnia między aktywnością obydwu aminotransferaz a zmianami histopatologicznymi wątroby.

Wyniki badań własnych nad aktywnością aminotransferaz, wykonywanych od szeregu lat w ramach kompleksowych badań profilu metabolicznego u krów, nie są jednoznaczne. W niektórych stadach stwierdzano istotny wzrost ak-

tywności enzymów, zwłaszcza AspAT, mimo braku odchyżeń od normy innych wskaźników metabolicznych, w tym także tzw. wskaźników wątrobowych, jak m.in. bilirubiny lub albumin. W innych stadach, w których dość często występowały przypadki zaliczane do tzw. zespołu porodowego i w których stwierdzano liczne odchylenia wskaźników metabolicznych, aktywność enzymów nie ulegała zmianie.

Powyższe obserwacje skłoniły autorów niniejszego opracowania do sprawdzenia na materiale własnym zależności między aktywnością AspAT i AlAT a stwierdzanymi histopatologicznie cechami uszkodzenia wątroby u krów. Przedstawione rezultaty stanowią fragment większych badań, poświęconych ocenie diagnostycznej wartości oznaczania aktywności aminotransferaz u krów mlecznych w warunkach chowu stadnego.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 100 krowach rasy ncb w tym samym wieku, nie ciężarnych, bez widocznych objawów chorobowych, poddawanych ubojowi w rzeźni. Próbkę krwi pobierano tuż przed ubojem. Aktywność aminotransferazy asparaginianowej i alaninowej oznaczano metodą Reitmana-Fränkela, wg Krawczyńskiego (6), z użyciem buforu fosforanowego przy temp. inkubacji enzymów wynoszącej 37°C. Po uboju przeprowadzono makroskopowe oględziny narządów wewnętrznych, ze szczególnym uwzględnieniem wątroby, z której następnie pobierano wycinki do badań histopatologicznych, zawsze z tych samych obszarów topograficznych. Wycinki utrwalano w 10% zobojętowanym roztworem formaliny i po rutynowej obróbce histopatologicznej barwiono metodą HE. Na podstawie uzyskanych wyników badań histopatologicznych wyodrębniono dwie grupy krów. Do pierwszej z nich zaliczono 20 krów z prawidłowym obrazem morfologicznym wątroby, a do drugiej — 80 krów ze zmianami w mięszu wątrobowym.