

TADEUSZ MAJEWSKI, MARIA TIETZE

Ocena stanu zdrowotnego wymienia na podstawie poziomu ATP w mleku

Instytut Żywności i Higieny Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR,
ul. Akademicka 13, 20-934 Lublin

Summary

Evaluation of the state of health of udder on the basis of ATP in milk

The aim of the investigations was to evaluate the state of health of the udder on the basis of ATP in milk. The investigations were carried out on milk from the quarters of 67 cows reacting positively in Californian Mastitis Test. The level of ATP and the content of somatic cells were examined in milk samples from the morning milking. The level of ATP was determined liminometrically by Olsson's method using lucypheryn-lucypherase reagent, while Prescott-Breed's method was introduced to estimate the content of somatic cells. The correlation coefficients between the level of ATP and the contents of somatic cells depending on the intensity of udder inflammation. In quarter milk of udders with subclinical inflammation was noted a considerable increase of the ATP level—on the average from 1.50 to 164.7 mM/L, and the content of somatic cells increased from 150 000 to 2 000 000 cells cm^{-3} . Mastitis considerably increases the level of ATP in milk. Determination of the ATP level in milk is a very susceptible diagnostic test of subclinical mastitis.

Zapalenie wymienia stanowi jedną z głównych przyczyn obniżenia wydajności mlecznej krów. Każde podrażnienie gruczołu mlekowego wpływa na obniżenie jakości higienicznej mleka, jego wartości konsumpcyjnej i technologicznej. Ostre i przewlekłe postaci *mastitis*, którym towarzyszą objawy kliniczne, występują u około 5–30% krów w stadzie, natomiast stanami podklinicznymi dotkniętych jest około 40–50% pogłowia (2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12). Philpot i Nickerson (11) podają, że subkliniczne postaci *mastitis* występują 15–40-krotnie częściej niż schorzenia o przebiegu klinicznym. Każda postać zapalenia gruczołu mlekowego prowadzi do istotnych zmian jakościowych mleka. Obniżeniu ulegają składniki syntetyzowane w gruczole: kazeina, laktoza, tłuszcz, przy równoczesnym wzroście albumin, globulin, Na^+ , Cl^- oraz elementów komórkowych (4, 5, 6, 8, 12). Ocena zdrowotności wymion na podstawie mleka można przeprowadzać różnymi metodami. Do najbardziej obiektywnych należy zaliczyć badania bakteriologiczne, jednakże wymagają one czasu, zaś metody biochemiczne pozwalają na dość szybką ocenę zdrowotności wymion na podstawie mleka i informują o stopniu podrażnienia tkanki gruczołowej. Znanych jest wiele prac naukowych na temat wielkości zmian w poziomie badanych składników mleka: laktozy, kazeiny, albumin, globulin, kwasu cytrynowego, sodu, chloru, elementów mineralnych, liczby chloro-cukrowej w zależności od nasilenia procesu chorobowego w gruczole mlekowym (4, 6, 7, 8, 9, 10, 12), zaś nieliczne tylko dotyczą oceny zdrowotności gruczołu mlekowego na podstawie wybranych enzymów mleka: katalazy, LDH, AspAT czy ATP (3, 5, 10, 12, 13).

Celem podjętych badań była ocena stanu zdrowotnego gruczołu mlekowego na podstawie poziomu ATP (adenozynotrójfosforanu) w mleku.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na mleku pochodzącym z poszczególnych ćwiartek wymienia krów w wieku 4–10 lat,

znajdujących się pomiędzy 2–8 laktacją, utrzymywanych w chowie alkiezowym, o dobrym stanie zdrowia, stanowiących własność Rolniczych Zakładów Doświadczalnych AR w Lublinie. Badania wstępne przeprowadzono na 220 krowach. Z grupy tej wybrano do dalszych badań 67 krów, u których mleko po dwukrotnym sprawdzeniu testem TOK wykazywało odczyn dodatni. Próby mleka pobierano z każdej ćwiartki oddzielnie w dwie godziny po zakończonym doju rannym. Stan podrażnienia tkanki gruczołowej określano na podstawie zawartości komórek somatycznych i poziomu ATP. Komórki somatyczne oznaczano metodą Prescott-Breeda, zaś poziom ATP — luminometrycznie z użyciem odczynnika lucyferyno-lucyferazy (10). W zliofilizowanych próbach mleka oznaczono białko ogólne metodą Beneta (1), przy czym każda analizowana próba zawierała 250 μg białka, bufor oraz odczynnik lucyferyno-lucyferazy. Moment dodania odczynnika inicjował proces luminescencji. Pomiar przeprowadzono licznikiem scyntylacyjnym wobec próby kontrolnej bez mleka. Czas pomiaru wynosił 10 s, zaś liczbę impulsów przeliczono na 1 s. Pomiar wykonywano trzykrotnie, a obliczona z nich wartość średnia stanowiła wynik końcowy. Poziom ATP odczytywano z krzywej wzorcowej wykonanej ze znanych stężeń ATPNa_2 i odczynnika lucyferyno-lucyferazy (stężenia od 10^{-16} do 10^{-5} mola ATP). Wyniki opracowano statystycznie analizując zależności pomiędzy ATP a zawartością komórek somatycznych z uwzględnieniem natężenia reakcji z Terenowym Odczynem Komórkowym (TOK). Obliczono współczynnik korelacji r-Pearsona i sprawdzono istotność współzależności p — testem t-Studenta w zależności od natężenia procesu zapalnego wymienia.

Wyniki i omówienie

W warunkach homeostazy ustrojowej poziom ATP w komórkach tego samego rodzaju jest stały. W stanach zapalnych wymienia poziom ATP w mleku ulega istotnym zmianom. Stąd określenie sumy enzymu w ekstrakcie biomasy jest czułą metodą oznaczania ilości tego enzymu (3, 10; 13). Zastosowany układ lucyferyno-lucyferazy i ATP służy do oznaczania poziomu ATP w wyciągu tkankowym, zaś reakcja przebiega dwustopniowo. W pierwszym etapie ATP reaguje z lucyferazą i jej substratem, w wyniku czego powstaje kompleks adenozyno-lucyferyno-monofosforanu. W drugim etapie kompleks ten ulega utlenieniu z uwolnieniem zdekarboksylowanej lucyferazy, wolnego enzymu, adenozyno-mono-fosforanu i fotonu, który odpowiada przereagowanej cząsteczce ATP (13).

Tab. 1 Poziom ATP (mM/l) i zawartość komórek somatycznych w mleku ćwiartkowym przy różnym nasileniu procesu zapalnego wymienia

Nasilenie procesu zapalnego wymienia (test TOK)	n	ATP (mM/l) $\bar{x} \pm s$	Komórki somatyczne (tys./ cm^3) $\bar{x} \pm s$	Współczynnik korelacji r
—	45	1,50 0,003	149 82	+0,803*
+	61	12,30 0,026	337 125	+0,777*
++	67	19,10 0,035	554 167	+0,802*
+++	64	73,50 0,108	1128 374	+0,521*
++++	67	164,70 0,161	1902 586	+0,591*

Objaśnienie: * — istotność przy $p \leq 0,001$.

Poziom ATP i zawartość komórek somatycznych w mleku ćwiartkowym przy różnym nasileniu stanu zapalnego wymienienia podano w tab. 1. Stwierdzono, że ATP w mleku zdrowych ćwiartek wynosi średnio 1,50 mM/l. W zależności od natężenia procesu zapalnego poziom wzrastał średnio od 12,3 mM/l (+) do 164,7 mM/l (+++). Z uzyskanych wartości wynika, że istnieje ścisły związek ($p \leq 0,001$) pomiędzy natężeniem procesu zapalnego a poziomem ATP i zawartością komórek somatycznych w mleku. W ocenianym materiale współczynnik korelacji będący miarą rozrzutu wokół prostej regresji wynosił od 0,521 do 0,803 i był zależny od nasilenia procesu chorobowego (tab. 1 i 2). Wraz z natężeniem reakcji TOK współczynnik korelacji (r) maleje. Zmniejszenie współczynnika korelacji oznacza zwiększenie rozrzutu pojedynczych wyników, czyli wielkości odchyłań od prostej. W badanym mleku współczynnik korelacji przy reakcjach dodatnich i silnie dodatnich (++) i (+++) był znacznie mniejszy niż przy reakcjach słabo zaznaczonych i ujemnych (+, +-, -). Z tab. 2 wynika, że przy różnym nasileniu procesu zapalnego obserwuje się brak zachodzenia skrajnych wartości poziomu ATP, np. maksymalny poziom ATP przy reakcji dodatniej (++) wynosił 94,5 mM/l, zaś minimalny przy odczynie silnie dodatnim (+++) 133,0 mM/l. Natomiast przy różnych reakcjach TOK liczba komórek somatycznych może być taka sama. Różnice poziomu ATP w zależności od natężenia procesu zapalnego w gruczole mlekowym przy tej samej liczbie komórek somatycznych świadczą o celowości przeprowadzonej analizy pomiędzy poziomem ATP i zawartością komórek somatycznych w mleku. Liczba komórek somatycznych w wydzielinie gruczołu mlekowego uzależniona jest m.in. od porcji

zdojonego mleka, pory doju, fazy i kolejności laktacji, wieku, różnic osobniczych i temperatury otoczenia (2, 3, 6, 7, 12). Natomiast poziom ATP w mleku jest ściśle określony stopniem podrażnienia tkanki gruczołowej wymienia. Uzyskane wyniki potwierdzają wartości cytowane przez Emanuelsona (3), Kostyrów (5) i Olssona (10). Zatem zastosowany test okazuje swoją przydatność i jest czułym wskaźnikiem oceny stopnia podrażnienia tkanki gruczołowej wymienia.

Wnioski

1. Zapalenie gruczołu mlekowego powoduje wielokrotny wzrost poziomu ATP w mleku (164,7 mM/l).
2. Poziom ATP w mleku jest czułym testem diagnostycznym w stanach subklinicznych gruczołu mlekowego.

Piśmiennictwo

1. Bennet I. P.: *Techn. Lipid Biochem.* B 403, 1, 1982.
2. Czaplicka M., Puchajda Z., Iwańczuk K.: *Mat. LIII Zjazdu Nauk. PTZ, Olsztyn*, 1, 227, 1987.
3. Emanuelson U., Olsson T., Holmberg O., Hageltorn M., Mattia T., Nelson L., Astrom G.: *Report 73 Swed. Univ. Agric. Sci., Upsala, 1987*, s. 1-11.
4. Kiza J.: *Post. Nauk roln.*, 16/21, 117, 1969.
5. Kostyra E., Kostyria H., Żebicki A.: *Medycyna Wet.*, 41, 226, 1985.
6. Kurek Cz.: *Medycyna Wet.*, 37, 390, 1981.
7. Kurek Cz.: *Przegl. hod.*, 52, 30, 1984.
8. Majewski T.: *Pol. Arch. Wet.*, 25, 1, 1987.
9. Majewski T., Tietze M.: *Mat. LIII Zjazdu Nauk. PTZ, Olsztyn*, 1, 210, 1988.
10. Olsson T., Sandstet K., Holmberg O., Thore E.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 87, 361, 1986.
11. Philpot W. N., Nickerson S. G.: *Quality milk production and mastitis control. Holstei Ass. USA, 1986*.
12. Samborski Z.: *Medycyna Wet.*, 41, 149, 1985.
13. Wierciński J.: *Medycyna Wet.*, 34, 751, 1978.

Adres autora: prof. dr hab. Tadeusz Majewski, ul. Rady Deleatów 3, 20-115 Lublin

BOGDAN BIAŁAS, GRAŻYNA BIERZYŃSKA-MACYSZYN, JERZY STOJKO,
KRZYSZTOF JANUSZEWSKI, FLORIAN RYSZKA*

Badania embriotoksyczności gonadoliberyny u szczurów*)

II Katedra i Zakład Patomorfologii Wydziału Lekarskiego Śląskiej AM,
ul. Medyków 15, 40-752 Katowice

* Katedra Farmacji Stosowanej i Technologii Leków Wydziału Farmaceutycznego
Śląskiej AM, ul. Jagiellońska 40, 41-200 Sosnowiec

Summary

Toxicity of Gonadoliberine for embryos of rats

Gonadoliberine in clinical practice is administered to stimulate reproduction. The authors examined the influence of the drug on the foetus because of its possibility to be applied to pregnant animals. It was found that Gonadoliberine given during pregnancy had a negative effect on its course and neonates might show a physical immaturity. The intensity of immaturity was a reverse proportional to the amount of the drug. However, no congenital defects were observed in the foetuses.

Od dłuższego już czasu gonadoliberyna jest lekiem wykorzystywanym w leczeniu bezpłodności (1, 2, 5, 8) oraz środkiem farmakologicznym stosowanym dla zwiększenia płodności zwierząt hodowlanych o pożądanych cechach genetycznych (4). Stosowane są zarówno wyciągi z podwzgórza, jak i preparaty syntetyczne (1, 3, 6). Podczas stwarzania farmakologicznego procesu rozrodu istnieje teoretyczna możliwość podania leku służącego pobudzeniu płodności w trakcie istniejącej już ciąży. Ewentualne skutki winny być znane prowadzącym farmakologiczną stymulację

rozrodu. Celem pracy było prześledzenie skutków, jakie wywiera podanie gonadoliberyny syntetycznej (6) na płody szczurów. W dostępnej literaturze nie znaleziono podobnej tematyce pozycji.

Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły ciężarne samice szczurów szczepu Wistar w wieku 3 do 5 miesięcy i masie wyjściowej 250 do 300 g, którym w 4, 10 i 14 dniu ciąży podano dootrzewnowo rozpuszczoną w soli fizjologicznej gonadoliberynę otrzymaną jak opisano wcześniej (6). Specyfik dawkowano następująco:

- 12 samicom po 2,5 ug/kg masy ciała
- 12 samicom po 5,0 ug/kg masy ciała
- 12 samicom po 10,0 ug/kg masy ciała

Dawkowanie ustalono przyjmując dawki terapeutyczne 5,0 ug/kg, co powodowało podanie zwierzętom po pół (1 grupa doświadczalna), jednej (2 grupa doświadczalna) i dwie dawki terapeutyczne (3 grupa doświadczalna).

Grupy kontrolne stanowiło:

- 12 samic, którym równocześnie z grupami doświadczalnymi podano dootrzewnowo roztwór soli fizjologicznej (1 grupa kontrolna)
- 12 samic, którym przebiegu ciąży nie zakłócono (2 grupa kontrolna)

Zwierzęta kontrolne i doświadczalne zabijano w 21 dniu trwania ciąży i oznaczano liczbę płodów i śladów resorpcji

*) Badania finansowano z programu CPBP 05.06.1.5.2.