

9. Beer A. E., Billingham R. E.: Ciba Found. Symp. 64, Exc. Med. Amsterdam 1979, s. 393.
10. Biggers B. G., Geisert R. D., Wetteman R. P., Buchanan D. S.: J. Anim. Sci. 61, 1987, 1512.
11. Bishop M. W. H.: J. Reprod. Fert. 7, 1964, 383.
12. Boyd H., Bacsich P., Yuong A., Mc Cracken J. A.: Br. vet. J. 125, 1969, 37.
13. Boyd J. S., Omran S. N., Ayliffe T. R.: Vet. Rec. 123, 1988, 8.
14. Bulman D. C.: Vet. Rec. 3, 1979, 420.
15. Bulman D. C., Lamming C. E.: Br. vet. J. 135, 1979, 559.
16. Burfening P. J., Fridrick R. L., van Horn J. L.: Theriogenology 7, 1977, 285.
17. Chevalier-Clement F.: Anim. Reprod. Sci. 20, 1989, 231.
18. Christie W. B., Newcomb R., Rowson L. E. A.: J. Reprod. Fert. 58, 1979, 701.
19. Davtd J. S. E., Bishop M. W. H., Cembrowicz H. J.: Vet. Rec. 89, 1971, 181.
20. Deas D. W.: Vet. Rec. 30, 1976, 450.
21. Diskin M. G., Sreenam J. M.: J. Reprod. Fert. 59, 1980, 463.
22. Drost M., Thatcher W. W.: Vet. Clin. North. Amer. 3, 1987, 609.
23. Evison B., Nancarrow C., Morton H., Scaramuzzi R., Clunie J. A.: Theriogenology 8, 1977, 157.
24. Fiolka G., Kuller H.-J., Lender S.: Mh. Vet.-Med. 40, 1985, 835.
25. Fischer-Arnstadt A. R., Arnstadt K. J.: Tierzüchter 36, 1984, 247.
26. Foote R. H., Oltenacu E. A. B., Kummerfeld H. L., Smith R. D., Riek P. M., Braun R. K.: Br. vet. J. 135, 1979, 550.
27. Ginther O. J.: Theriogenology 24, 1985, 87.
28. Ginther O. J., Bergfeld D. R., Leith G. S., Scraba S. T.: Theriogenology 24, 1985, 73.
29. Grahn T. C., Fahning M. L., Zemjanis R.: J. Am. Vet. Med. Ass. 185, 1984, 429.
30. Gustafsson H., Larsson K.: Acta Vet. Scand. 24, 1983, 59.
31. Gustafsson H., Larsson K.: Res. Vet. Sci. 39, 1985, 271.
32. Holtz W., Brackel A. V., Küster J.: Zbl. Vet. Med. 33, 1986, 321.
33. Hühn U., Schneider F., Lutter K.: Tierhyg. Inform. 15, 1983, 61.
34. Kaneene J. B., Coe P. H., Gibson C. D., Yamini B., Morrow D. A., Martinez R. O.: Theriogenology 27, 1987, 737.
35. Keeler R. F.: Cornell Vet. 80, 1990, 103.
36. Koch E., Morton H., Niemann H., Ellendorf F.: Acta Endocrinol. Suppl. 246, 1982, 4.
37. Kolb E.: Mh. Vet.-Med. 33, 1978, 191.
38. Mac Farlane J. S., Booth J. M., Deas D. W., Lowman B. W.: Vet. Rec. 100, 1977, 565.
39. Maurer R. R., Chenault J. R.: J. Anim. Sci. 56, 1983, 1186.
40. Maurer R. R., Foote R. H.: J. Reprod. Fert. 31, 1972, 15.
41. Mc Carthy S. M., Foote R. H., Maurer R. R.: Fertil. Steril. 28, 1977, 101.
42. Merkt H.: Tierärztl. Umschau 49, 1985, 428.
43. Morton H., Morton D. J., Ellendorf F.: J. Reprod. Fert. 68, 1983, 437.
44. Nancarrow C. D., Evison B. M., Scaramuzzi R. J., Turnbull K. E.: J. Reprod. Fert. 57, 1979, 385.
45. Nancarrow C. D., Wallace A. L. C., Grewal A. S.: J. Reprod. Fert. Suppl. 30, 1981, 191.
46. Pope G. S., Hodgson-Jones L. S.: Vet. Rec. 96, 1975, 154.
47. Roche J. F., Boland M. P., Mc Geedy T. A.: Vet. Rec. 109, 1981, 411.
48. Scherbarth R.: Dtsch. tierärztl. Wschr. 87, 1980, 189.
49. Shemesh M., Ayalon N., Lindner H. R.: J. Reprod. Fert. 15, 1968, 161.
50. Short R. V.: Ciba Found. Symp. 64, Exc. Med., Amsterdam 1979, s. 377.
51. Smart Y. C., Roberts T. K., Clancy R. L., Gipps A. W.: Fertil. Steril. 35, 1981, 397.
52. Sreenam J. M., Diskin M. G.: Vet. Rec. 28, 1983, 517.
53. Stolla R.: Berl. Munch. tierärztl. Wschr. 98, 1985, 197.
54. Weigelt B., Weigelt R.: Tierhyg. Inform. 15, 1983, 31.
55. Wijeratne W. V. S.: Anim. Prod. Sci. 16, 1973, 251.
56. Wolf P., Eulenberger K., Schulz J., Richter A., Tietze H.-J.: Tierhyg. Inform. 15, 1983, 18.
57. Villahoz M. D., Squires E. L., Voss J. L., Shideler R. K.: Theriogenology 23, 1985, 915.
58. Youngquist R. S., Braun W. F.: J. Am. Vet. Med. Ass. 189, 1986, 411.

Adres autora: dr Andrzej Max, ul. Hawajska 12 m. 27, 02-776 Warszawa

LUIZA DUSZA, JERZY SOBCZAK, BARBARA JANA,
ADAM MURDZA *, WŁADYSŁAW BLUJ **

Zastosowanie Biolactinu-2 (oczyszczona prolaktyna świni) do stymulacji laktacji u loch *)

Zakład Endokrynologii Rozrodu Zwierząt Centrum Agrotechnologii i Weterynarii PAN,
Kortowo 37, 10-718 Olsztyn, skr. pocz. 55
* Przemysłowa Ferma Tuczu Trzody Chlewniej w Bieganowie, 66-630 Cybinka
** Ferma Tuczu Trzody Chlewniej w Białym Dworze, 14-510 Orneta

Summary

Application of Biolactin-2 (purified porcine prolactin) in stimulation of lactation in sows

Biolactin-2 preparation containing 5.0 mg of porcine prolactin (pPRL) purified from porcine pituitaries was used to stimulate lactation in sows with periparturient agalactia and in healthy primiparous and multiparous sows. Immunological activity of Biolactin-2 approached that of the PRL standard.

It was found that a single intramuscular injection of Biolactin-2 effectively stimulates milk ejection in sows with mastitis-metritis-agalactia syndrom (MMA). Performance of piglets treated with a single or double dose of Biolactin-2 and as well as that of healthy ones was similar. A single administration of Biolactin-2 to healthy primiparous sows on the 1st day after farrowing significantly increased daily body gains of their litter in the first two weeks of life. This effect was not observed in multiparous sows.

Prolaktyna (PRL) jest hormonem przedniego płata przysadki mózgowej niezbędnym do zapoczątkowania laktacji oraz prawidłowego jej przebiegu. Wyniki wcześniejszych badań wykazały, że u loch 2—3 dni przed porodem poziom PRL we krwi obwodowej zaczyna narastać, osiągając maksymalne wartości podczas

porodu (4, 6, 17, 18). W czasie laktacji poziom PRL jest wysoki, z tym, że stopniowo obniża się, lecz ciągle pozostaje znacznie wyższy od podstawowego poziomu podczas cyklu rujowego (3, 5). Obniżenie poziomu PRL u loch spowodowane podaniem bromokryptyny (agonista dopaminy) hamowało laktację, lecz nie zakłócało akcji porodowej (16).

Smith i Wagner (14, 15) zaobserwowali obniżenie poziomu PRL u loch po podskórnym podaniu niewielkich dawek endotoksyn *Escherichia coli* drugiego dnia po porodzie. Przyrosty prosiąt karmionych przez te lochy były istotnie niższe, co wskazywało na obniżoną sekrecję mleka. Kliniczne objawy zespołu bezmleczności poporodowej zaobserwowali wcześniej Nachreiner i wsp. (9, 10) jako skutek egzogenego podania endotoksyn *Escherichia coli*.

Cytowane powyżej wyniki badań nasuwały przypuszczenie, że jedną z głównych przyczyn obniżonej sekrecji mleka przy zespole bezmleczności porodowej u loch jest znaczne obniżenie poziomu PRL we krwi. W niniejszej pracy celem pobudzenia wytwarzania mleka podawano lochom z objawami bezmleczności poporodowej egzogenną PRL. Pozytywne wyniki badań skłoniły autorów do sprawdzenia, czy egzogenna PRL spowoduje zwiększenie sekrecji mleka u zdrowych loch pierwiastek i wieloródek.

*) Praca wykonana w ramach CPBP 05.04.

Materiał i metody

Charakterystyka preparatu Biolactin-2. Produkcję preparatu Biolactin-2* opracowali B. Dolińska i F. Ryszka z Katedry Farmacji Stosowanej i Technologii Leków Śląskiej Akademii Medycznej. Jedna ampulka preparatu Biolactin-2 zawiera 5 mg oczyszczonej prolaktyny świni (skrót międzynarodowy — pPRL).

W celu określenia aktywności immunologicznej preparatu Biolactin-2 porównano go ze standardem pPRL-KK2 stosując metodę radioimmunologiczną oznaczania poziomu pPRL. Metoda ta została wcześniej opisana przez Duszę i Krzymowską (3).

Poziom pPRL we krwi świni po podaniu preparatu Biolactin-2. Badania prowadzono na 3 świnich o masie ciała 130–135 kg, które były w fazie lutealnej cyklu rujowego. Zwierzętom zakładano kaniule do żył jarzmowych (7). W drugim dniu po założeniu kaniul świnicom podawano Biolactin-2 (i.m., 5 mg pPRL). Pobieranie krwi do badań poziomu pPRL rozpoczynano 1 godz. przed podaniem preparatu (4 próby krwi co 15 min.). Podawano Biolactin-2 i pobierano próby krwi przez 3 godz. co 15 min., a następnie przez 2 godz. co 30 min. i kolejne 16 godz. co 60 min. Każdorazowo pobraną krew schładzano i wirowano w wirówce z chłodzeniem (1300 G przez 10 min.). Uzyskane osocze zamrażano w próbkach o objętości 0,5 ml w temp. -20°C do czasu oznaczania poziomu pPRL metodą radioimmunologiczną.

Podawanie preparatu Biolactin-2 lochom pierwiastkom z objawami bezmleczności poporodowej. Badaniami objęto 58 loch pierwiastek mieszańców ras wpb \times pbz, u których zaobserwowano objawy bezmleczności poporodowej (w 1–5 dniu po porodzie). Lochy przebywały w Fermie Tuczu Trzody Chlewnej w Bieganowie. Jest to ferma przemysłowa typu „Emona”. Stado podstawowe loch liczyło w okresie prowadzenia doświadczenia 2100 szt. Zwierzęta żywiono pełnoporcjową mieszanką typu L.

Grupa 1. W dniu stwierdzenia zespołu bezmleczności poporodowej 30 loch otrzymało domięśniowo 5 mg preparatu Biolactin-2 rozpuszczonego w 2 ml płynu fizjologicznego.

Grupa 2. Badaniami objęto 28 loch, z tym, że preparat Biolactin-2 podawano lochom w 1 i 2 dniu po zaobserwowaniu zespołu bezmleczności poporodowej. Poza tym lochom obu grup aplikowano antybiotyki, kortykoidy i środki uspokajające w ilościach zależnych od nasilenia objawów chorobowych (rutynowe zabiegi stosowane przy objawach zespołu bezmleczności). Po podaniu preparatu obserwowano lochy i ich prosięta, aby określić czas pojawienia się mleka.

Wskaźniki odchowu prosiąt obu grup loch z zespołem bezmleczności poporodowej, którym podawano preparat Biolactin-2 porównano z wynikami odchowu prosiąt 446 zdrowych loch wyproszonych na fermie w miesiącu doświadczenia. Zwierzęta te przebywały w tych samych warunkach co lochy doświadczone.

Mleczność loch oceniano na podstawie wskaźników odchowu prosiąt, gdyż — jak wynika z badań Lewis i wsp. (8) — istnieje bardzo duża zależność pomiędzy ilością mleka i jego składem a przyrostem prosiąt.

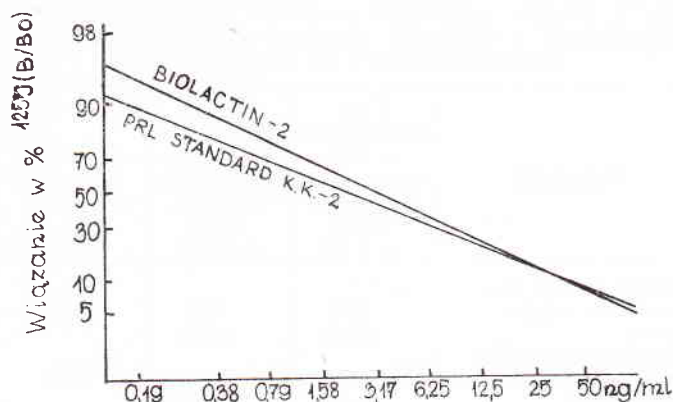
Rejestrowano następujące wskaźniki odchowu prosiąt u obu grup loch: liczbę prosiąt żywych w miocie w dniu urodzenia, masę miotu w 1 dniu życia, masę miotu w dniu odsadzenia (28 dniu życia), liczbę prosiąt odsadzonych. Obliczano: średnią masę ciała prosięcia w 1 dniu życia i w momencie odsadzenia, średni przyrost dzienny prosięcia, padnięcia w procentach w pierwszych 28 dniach życia.

Podawanie preparatu Biolactin-2 lochom pierwiastkom i wieloródkom klinicznie zdrowym. Badaniami objęto: 89 loch pierwiastek (45 doświadczalnych i 44 kontrolne) oraz 40 loch wieloródek (20 doświadczalnych i 20 kontrolnych).

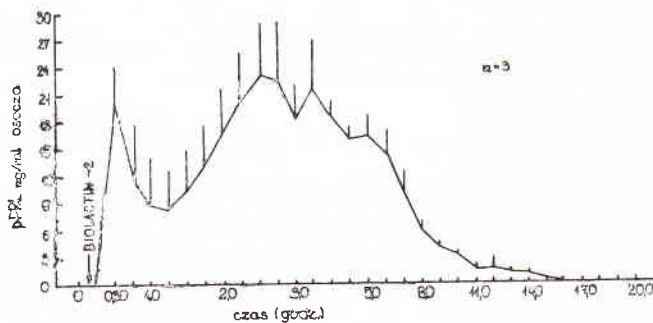
Lochy doświadczone otrzymywały w pierwszym dniu po wyproszeniu jedną domięśniową iniekcję Biolactinu-2 rozpuszczonego w 2 ml płynu fizjologicznego, lochy kontrolne otrzymywały w tym samym czasie 2 ml płynu fizjologicznego.

Badania wykonano w tej samej fermie co poprzednie i w Fermie Tuczu Trzody Chlewnej w Białym Dworze. Ferma ta jest fermą typu „Bisprol”. Stado podstawowe loch mieszańców ras wpb \times pbz \times duroc w okresie prowadzenia doświadczenia liczyło 700 szt. Lochy żywiono pełno-

* Preparat zgłoszony do rejestracji.



Ryc. 1. Wiązanie ^{125}J pPRL przez przeciwciała przeciwko pPRL w obecności różnych rozcieńczeń standardu pPRL (KK-2) lub oczyszczonej pPRL z preparatu Biolactin-2



Ryc. 2. Średni (\pm s) poziom pPRL w osoczu świni po domięśniowym podaniu Biolactinu-2 (5 mg oczyszczonej pPRL)

porcjową mieszanką L. Do doświadczenia na każdej z ferm wybrano losowo jednakową liczbę zwierząt kontrolnych i doświadczalnych wyproszonych w tym samym czasie.

Rejestrowano następujące wskaźniki odchowu prosiąt: liczbę prosiąt żywych w miocie w dniu urodzenia, masę miotu w 1 dniu życia, liczbę prosiąt żywych w 14 dniu życia. Obliczano: średnią masę prosięcia w 1 i 14 dniu życia, średni przyrost dzienny podczas pierwszych 2 tygodni, padnięcia w procentach w pierwszych 14 dniach życia. Wyniki poddano analizie statystycznej testem t-Studenta.

Wyniki i omówienie

Badania dotyczące charakterystyki preparatu Biolactin-2 wykazały, że zawiera on aktywną immunologicznie pPRL. Krzywe wiązania ^{125}J pPRL przez przeciwciała przeciwko pPRL w obecności różnych rozcieńczeń standardu lub Biolactinu-2 były bardzo podobne (ryc. 1). Aktywność biologiczna standardu pPRL KK-2 wynosi 30 j.m./mg (3).

Średni poziom pPRL we krwi obwodowej świni po domięśniowej iniekcji 5 mg Biolactinu-2 wzrastał bardzo szybko z 0,2 ng do ponad 20 ng/ml osocza w 15 minucie (ryc. 2). Następnie obniżał się stopniowo w ciągu 1,5 godz. od podania, po czym stopniowo narastał osiągając 24 ng/ml w trzeciej godzinie. Po 3,5 godz. od iniekcji obserwowano powolne, stopniowe obniżanie się poziomu pPRL w osoczu krwi świni. Dopiero w 13 godzinie od iniekcji Biolactinu-2 poziom pPRL był bardzo niski. Do badań użyto celowo loszek, które były w fazie lutealnej cyklu rujowego. Poziom pPRL podczas tej fazy cyklu jest bardzo niski (3). U loch laktują-

Tab. 1. Wpływ podawania preparatu Biolactin-2 lochom pierwiastkom z objawami poporodowej bezmleczności na wskaźniki odchowu ich prosiąt (x + s)

Wskaźniki	1 in.	2 in.	Lochy zdrowe * (n = 446)
	Biolactinu-2 w dniu wystąpienia bezmleczności (n = 30)	Biolactinu-2 1 i 2 dniu wystąpienia bezmleczności (n = 28)	
Liczba prosiąt żywych w 1 dniu życia	8,33 (2,88)	8,64 (2,31)	8,73
Srednia masa ciała prosięcia w 1 dniu życia (kg)	1,36 (0,16)	1,34 (0,19)	1,39
Liczba prosiąt odsadzonych w miocie (28 dzień życia)	8,06 (2,69)	7,9 (2,4)	8,3
Srednia masa ciała prosięcia odsadzonego (kg)	6,96 (0,45)	6,98 (0,56)	7,2
Sredni przyrost dzienny w okresie 28 dni (kg)	198,1 (16,7)	198,0 (23,1)	201,0
Padnięcia w %	4,17	8,1	4,7

Objaśnienie: * — wskaźniki odchowu prosiąt wszystkich loch w fermie, wyproszonych w miesiącu doświadczenia.

cych zmienny poziom PRL (4) czyniłby wyniki trudno do interpretacji.

Uzyskane wyniki wykazują, że pPRL z preparatu Biolactin-2 wchłania się do krwi bardzo szybko. Wymaga wyjaśnienia poziom pPRL obserwowany podczas pierwszych trzech godzin od podania Biolactinu-2. Można przypuszczać, że taki przebieg krzywej jest związany z szybkim wychwytem PRL przez tkanki docelowe, po czym poziom hormonu zaczyna stopniowo narastać. Hipoteza ta powinna być jednak zweryfikowana w następnych doświadczeniach.

Wyniki dotyczące zastosowania Biolactinu-2 u loch pierwiastek z objawami zespołu bezmleczności poporodowej na wskaźniki odchowu ich prosiąt przedstawiono w tab. 1.

Do badań użyto loch pierwiastek, gdyż jak wynika z naszych obserwacji oraz z badań Pejsaka i wsp. (11) zespół bezmleczności poporodowej jest schorzeniem częściej występującym u pierwiastek niż u wieloródek, szczególnie w przemysłowych fermach tuczu trzody chlewnej (do 30%). Obniżona, a czasami nawet zahamowana laktacja jest przyczyną słabych przyrostów, a nawet padnięć prosiąt (11).

W trakcie trwania doświadczenia zaobserwowano, że podanie Biolactinu-2 lochom z bezmlecznością poporodową pobudzało wytwarzanie mleka. Po około 2 godz. lochy rozpoczynały karmienie, po którym prosięta nie wykazywały oznak głodu. Biolactin-2 zawiera więc PRL aktywną biologicznie.

Jednorazowa domięśniowa iniekcja Biolactinu-2 łącznie z rutynowymi zabiegami stosowanymi przy leczeniu zespołu bezmleczności poporodowej wystarczała do pobudzenia laktacji u loch. Porównanie wyników odchowu prosiąt od loch pierwiastek z objawami zespołu bezmleczności poporodowej otrzymującymi Biolactin-2 z wynikami prosiąt loch zdrowych wyproszonych w fermie w miesiącu doświadczenia wykazało, że nie różniły się one istotnie (tab. 1).

Wskaźniki odchowu prosiąt karmionych przez zdrowe lochy pierwiastki i wieloródki otrzymujące Biolactin-2 w pierwszym dniu laktacji (grupa doświadczalna) i od loch kontrolnych wyproszonych w tym

Tab. 2. Wpływ podawania preparatu Biolactin-2 lochom pierwiastkom i wieloródkom klinicznie zdrowym na wskaźniki odchowu ich prosiąt (x + s)

Wskaźniki	Pierwiastki		Wieloródki	
	kontr. n = 44	dośw. n = 45	kontr. n = 20	dośw. n = 20
Liczba prosiąt urodzonych w miocie	8,65 (2,27)	9,36 (1,46)	9,85 (1,42)	9,30 (1,78)
Srednia masa ciała prosięcia w 14 dniu życia (kg)	1,37 (0,16)	1,35 (0,15)	1,28 (0,17)	1,35 (0,17)
Liczba prosiąt żywych w 14 dniu życia	7,72 (2,03)	7,9 (1,9)	9,05 (1,43)	8,15 (1,22)
Srednia masa ciała prosięcia w 14 dniu życia (kg)	3,72 (0,52)	3,91 (0,50)	4,03 (0,54)	4,11 (0,71)
Sredni przyrost dzienny w okresie 14 dni (g)	186,9 (36,9)	202,0* (29,1)	188,6 (35,8)	183,6 (45,4)
Padnięcia w %	5,9	8,1	9,18	8,76

Objaśnienie: * — $p \leq 0,05$.

samym czasie przedstawiono w tab. 2. Wykazano, że podanie Biolactinu-2 lochom pierwiastkom miało korzystny wpływ na średni przyrost dzienny prosiąt w pierwszych dwu tygodniach ich życia. Średnie przyrosty prosiąt karmionych przez lochy pierwiastki z iniekcjami egzogennej PRL były istotnie wyższe ($P < 0,05$) w porównaniu z kontrolnymi. Podawanie Biolactinu-2 lochom wieloródkom nie zmieniło wskaźników odchowu prosiąt. U żadnej z loch pierwiastek ani wieloródek nie stwierdzono objawów zespołu bezmleczności poporodowej.

Uzyskane wyniki potwierdzają i rozszerzają dotychczasowe obserwacje wskazujące na bardzo ważną rolę PRL w prawidłowym przebiegu laktacji u loch. Wiadomo, że u krów PRL reguluje biochemiczne i cytologiczne różnicowanie komórek nabłonkowych gruczołu mlekowego (1, 2). Jednak podawanie egzogennej PRL wysokomlecznym krowom nie zwiększyło wydajności mlecznej, jedynie synteza α -lactoalbuminy w mleku krów otrzymujących PRL (120 mg przez 14 dni) była istotnie zwiększona (12).

Przedstawione wyniki badań własnych pozwalają postawić hipotezę, że podawanie egzogennej PRL lochom pierwiastkom mogło zwiększyć u nich syntezę mleka, zmienić korzystnie jego skład lub zapobiec ewentualnemu wystąpieniu bezmleczności poporodowej. Jak wynika z badań wykonanych na zwierzętach laboratoryjnych PRL reguluje syntezę białek, tłuszczów, immunoglobulin oraz utrzymuje koncentracje jonów Na^+ , K^+ i Cl^- w mleku (13).

Wskazane byłyby szczegółowe badania, które wyjaśnią mechanizm oddziaływania PRL na syntezę mleka u loch.

Wnio ski

1. Charakterystyka preparatu Biolactin-2 wykazała, że zawiera on oczyszczoną pPRL aktywną immunologicznie i biologicznie.

2. Jednorazowa domięśniowa iniekcja Biolactinu-2 (5 mg pPRL) skutecznie pobudza laktację u loch z objawami zespołu bezmleczności poporodowej.

3. Podanie Biolactinu-2 lochom pierwiastkom w pierwszym dniu laktacji istotnie zwiększa przyrosty dzienne prosiąt w pierwszych 2 tygodniach życia.

Piśmiennictwo

1. Akers R. M., Bauman D. E., Capuco A. V., Goodman G. T., Tucker H. A.: *Endocrinology* 109, 23, 1987.
2. Akers R. M., Bauman D. E., Goodman G. T., Capuco A. V., Tucker H. A.: *Endocrinology* 109, 31, 1981.
3. Dusza L., Krzymowska H.: *J. Reprod. Fert.* 57, 511, 1979.
4. Dusza L., Krzymowska H.: *J. Reprod. Fert.* 61, 131, 1981.
5. Dusza L., Krzymowska H., Okrasa S., Czarnyszewicz J., Kotwica G., Koziorowski M., Kuźnia S., Czarnocki J., Dąbek J., Nowicka R.: *Adv. Physiol. Sci.* 20, 187, 1981.
6. Kendall J. Z., Richards G. E., Shin L. N., Farris T. S.: *Theriogenology* 17, 677, 1982.
7. Kotwica J., Krzymowski T., Dąbek J.: *Medycyna Wet.* 34, 118, 1978.
8. Lewis A. J., Speer U. C., Haught D. C.: *J. Anim. Sci.* 47, 634, 1978.
9. Nachreiner R. F., Garcia M. C., Ginther O. J.: *Am. J. Vet. Res.* 33, 1489, 1972.
10. Nachreiner R. F., Ginther O. J.: *Am. J. Vet. Res.* 35, 619, 1974.
11. Pejsak Z., Tarasiuk K., Czajkowska A., Kempa W., Płuska A., Szczepaniak R., Stokowski G., Rutkowski W.: *Medycyna Wet.* 45, 382, 1989.
12. Plaut K., Bauman D. E., Agergaard N., Akers R. M.: *Domestic Anim. Endocr.* 4, 279, 1987.
13. Shiu R. P., Friesen H. G.: *Ann. Rev. Physiol.* 42, 83, 1980.
14. Smith B. B., Wagner W. C.: *Science* 224, 605, 1984.
15. Smith B. B., Wagner W. C.: *Am. J. Vet. Res.* 46, 175, 1985.
16. Taverner M., Bevers M., Bradshaw J. M. C., Dieleman S. J., Willemse A. H., Porter D. G.: *J. Reprod. Fert.* 65, 85, 1982.
17. Taverner M., Willemse A. H., Dieleman S. J., Bevers M.: *Anim. Reprod. Sci.* 1, 257, 1978/1979.
18. Vale G. T., Wagner W. C.: *Theriogenology* 15, 537, 1981.

Adres autora: doc. dr hab. Luiza Dusza, ul. Kaliningradzka 59/17, 10-437 Olsztyn

KRZYSZTOF ANUSZ, MAGDALENA ZALESKA, BOHDAN KOWALSKI,
JERZY JĘDRYKA, JERZY KITA

Isolacja limfocytów krwi obwodowej krów i owiec ciężarnych w gradiencie Gradisolu G

Katedra Epizootologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR,
ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Summary

Isolation of peripheral blood lymphocytes of pregnant cows and sheep in a Gradisol G gradient

The purpose of the study was to determine the usefulness of Gradisol G (Polfa—Kutno) in the isolation of peripheral blood lymphocytes of pregnant cows and sheep. After isolation the percentage of the individual cells was evaluated using the Thoma's chamber. The morphology, vitality and recovery of the cells compared with the total number of peripheral blood lymphocytes were also assessed. The blastogenic transformation test was applied to evaluate the immunologic activity of lymphocytes isolated in the optimal Gradisol G gradient. The findings were compared with the results obtained using a Lymphoprep (Nyegaard) 1977 gradient. The studies showed that Gradisol G fulfilled all the requirements for the successful isolation of peripheral blood lymphocytes of pregnant cows and sheep. The optimal density to isolate peripheral blood lymphocytes of cows and sheep was 1.077 g/ml.

Isolacja czystej populacji limfocytów jest podstawowym warunkiem do przeprowadzania szeregu badań immunologicznych u ludzi i zwierząt, między innymi testu transformacji blastycznej, który stosuje się do oceny zdolności limfocytów do podjęcia funkcji obronnych, pod wpływem stymulacji antygenowej specyficznej lub niespecyficznej (6). W teście transformacji blastycznej (ttb) bada się aktywność limfocytów krwi obwodowej, rzadziej izolowanych z centralnych i obwodowych elementów układu chłonnego (np. grasicy, śledziony, kępek Peyera czy gruczolu mlekowego).

Isolację limfocytów przeprowadza się najczęściej w gradiencie Ficollu (preparaty Lymphoprep, Ficoll paque, Lymphopaque itp.). Wykazano, że do izolacji limfocytów należy używać ficollu o gęstości optymalnej dla danego gatunku np. dla bydła 1,077—1,084 (10, 16).

U samic ssaków naczelnych i w mniejszym stopniu samic ssaków hodowlanych w okresie poprzedzającym poród występuje ciężowy zespół niedoborów immunologicznych. Między innymi stwierdza się obniżenie aktywności immunologicznej limfocytów T krwi obwo-

dowej (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16). Laboratoria weterynaryjne powinny mieć możliwość wykonania badań stanu odporności samic ciężarnych oraz we wszystkich innych przypadkach, kiedy zwierzęta poddane zostały warunkom stresowym, mogącym wywołać supresję układu immunologicznego. Zakres stosowania metod izolacji komórek układu immunologicznego, będących podstawą dalszych badań stanu odporności zwierzęcia, był w naszym kraju przez długi czas ograniczony, ze względu na konieczność importowania Ficollu. Podjęcie produkcji preparatu Gradisol G pozwala na szersze stosowanie metody w laboratoriach weterynaryjnych i medycznych, co jest ważne zarówno dla diagnostyki klinicznej, jak i badań podstawowych.

Celem pracy była ocena przydatności preparatu Gradisol G produkcji Kutnowskich Zakładów Farmaceutycznych do izolacji limfocytów krwi obwodowej ciężarnych krów i owiec oraz określenie optymalnych gradientów preparatu do izolacji limfocytów krwi obwodowej.

Materiał i metody

Krew żylną do badań pobrano od 50 krów ciężarnych w wieku 3—4 lat i 50 owiec ciężarnych w wieku 2 lat.

Wyprodukowany przez KZF „Polfa” preparat Gradisol G w roztworze wodnym zawiera 28% uropoliny (75% meglumine diatrizate) i 5,5% dekstranu 200 000 (v/w/v).

W celu sprawdzenia optymalnych warunków izolacji limfocytów, w pierwszej fazie krew rozcieńczano za pomocą PBS (Biomed) w stosunku 1:1, bądź pozostawiano nie rozcieńczoną. Tak przygotowaną krew nawarstwiano następnie na testowany Gradisol G w ilości 10 ml krwi rozcieńczonej/nie rozcieńczonej na 4 ml Gradisolu G lub 5 ml krwi rozcieńczonej/nie rozcieńczonej na 2 ml Gradisolu G o gęstościach 1,073; 1,075; 1,077; 1,079; 1,081; 1,082; 1,084. Próbkę wirowano przez różne okresy czasu od 15 do 40 minut w zakresie 80 g—350 g (wirówka MPW 2).

Isolację przeprowadzano w temperaturze pokojowej. Do badań używano stożkowych probówek szklanych o pojemności 10 ml bądź wirówkowych probówek szklanych o pojemności 25 ml. Po wirowaniu uzyskiwano kożuszek limfocytarny na granicy obu faz. Komórki z interfazy zbierano pipetą pasterowską i po trzykrotnym przepłukaniu w MEM (wirowanie 80 g; 100 g) oceniano ich skład ilościowy w komercze Thoma; skład jakościowy, określając morfologicznie