

30. Raj H., Wiebe W. J., Liston J.: Detection and enumeration of fecal indicator organisms in frozen sea foods. II. Enterococci. Appl. Microbiol. 9, 295, 1961.
31. Sharpe M. E., Shattock P. M. F.: The serological typing of Group D streptococci associated with outbreaks of neonatal diarrhea. J. Gen. Microbiol. 6, 150, 1952.
32. Sharpe M. E.: Serological typing of strains of Streptococcus faecium and unclassified Group D streptococci isolated from canned hams and pig intestines. J. Gen. Microbiol. 23, 621, 1960.
33. Shattock P. M. F.: The streptococci of Group D: the serological grouping of Streptococcus bovis and observations on serologically refractory Group D strains. J. Gen. Microbiol. 3, 80, 1949.
34. Shattock P. M. F.: The faecal streptococci. 12th Int. Dairy Congress. Stockholm. 2, 598, 1949.
35. Shattock P. M. F.: The identification and classification of Streptococcus faecalis and some associated streptococci. Ann. Inst. Pasteur Lille. 7, 95, 1955.
36. Silliker J., Deibel R. H.: On the association of enterococci with food poisoning. Bact. Proc. 48, 1960.
37. Smith D. G., Shattock P. M. F.: The serological grouping of Streptococcus equinus. J. Gen. Microbiol. 29, 731, 1962.
38. Sherman J. M.: The streptococci. Bacteriol. Rev. 1, 3, 1937.
39. Sherman J. M., Wing H. U.: Streptococcus durans. J. Dairy Sci. 20, 165, 1937.
40. Sherman J. M.: The enterococci and related streptococci. J. Bacteriol. 35, 81, 1938.
41. Sherman J. M., Gunsalus I. C., Bellamy W. D. 57th Ann. Rep., New York State Coll. Agr., Cornell Univ. Agr. Exper. Stat. 116, 1944.
42. Skadhauge K.: Studies of enterococci. Kopenhagen: Einar Munksgaards, 1950.

Adresy autorów: dr Stanisław Kafel, Puławy, Instytut Weterynarii; prof. dr John C. Ayres, Food Processing Laboratory, Iowa State University, Ames, Iowa, U.S.A.

FIZJOLOGIA

ALEKSANDRA MALINOWSKA

Aktywność L-leucylo-aminopeptydazy (LAP) w krwi bydła zdrowego z uwzględnieniem niektórych badań hematologicznych

Z Katedry Chemii Fizjologicznej SGGW w Warszawie
Kierownik: prof. dr STEFAN NYREK

Dotychczasowe badania aktywności LAP dotyczyły w znacznej mierze płynów ustrojowych. Prace histochemiczne prowadzone przez Nachlasa i wsp. (10), Monisa i wsp. (9), oraz Wilczoka i wsp. (13) wykazały różne nasilenie aktywności enzymatycznej LAP w zdrowych tkankach ludzi i zwierząt laboratoryjnych oraz przy nowotworach. Wilczok i Steplewski (14) badali aktywność LAP w poszczególnych frakcjach homogenizowanych komórek wątrobowych.

Wiele badań aktywności LAP przeprowadzono w surowicy u ludzi (7). Porównawcze badania Arsta i wsp. (1) wykazały różnicę w poziomie tej aktywności. Całkowicie zhemolizowana krew człowieka wykazuje 3,5-krotnie wyższą aktywność niż surowica. Brak jest danych dotyczących zachowania się enzymu w elementach morfotycznych krwi. Próby tego rodzaju badań zostały podjęte przez Haschena (4), który oznaczył aktywność LAP w ludzkich erytrocytach.

Jak wynika z poprzednich badań autorki (8) zhemolizowana krew bydła wykazuje około 4-krotnie wyższą aktywność LAP w porównaniu z surowicą i osoczem.

Aktywność enzymów w krwi zwierząt hodowlanych jest zagadnieniem, któremu dotychczas poświęcano mało uwagi. Wydaje się więc konieczne prowadzenie badań nad czynnikami, które mogą wywierać wpływ na tę aktywność.

Praca niniejsza przedstawia aktywność LAP w zhemolizowanej krwi bydła oraz wyniki badania statystycznego regresji aktywności enzymatycznej zależnie od wieku zwierząt, od liczby erytrocytów i leukocytów, od ilości hemoglobiny oraz od wskaźnika hematokrytowego.

Badania własne

Materiał i metody. Badania przeprowadzono na bydło rasy nizinnej czarno-białej, zdrowym klinicznie, pochodzącym z majątków SGGW z obór wolnych od gruźlicy i brucelozy. Zwierzęta zostały podzielone na trzy grupy. Do grupy pierwszej zakwalifikowano 31 cieląt w wieku od 1 tygodnia do 6 miesięcy, do grupy drugiej 24 jałówki w wieku od 7 miesięcy do 2,5 lat, grupę trzecią stanowiło 37 krów w wieku od 3 do 8 lat.

Krew do badań pobierano z żyły jarzmowej rano przed pierwszym karmieniem zwierząt. Jako środka zapobiegającego krzepnięciu krwi używano heparyny.

1) Oznaczanie kolorymetryczne aktywności LAP metodą Goldbarga i Rutenburga (2, 3) z modyfikacją Sigma Chemical Company (12). Do oznaczeń aktywności enzymu przygotowywano rozcieńczenia krwi wodą destylowaną w proporcji 1:10. Przygotowane rozcieńczenia odstawiano do czasu wystąpienia całkowitej hemolizy. Na podstawie wyników dwu prób równoległych obliczano średnią wartość dla każdego oznaczenia. Natężenie barwy mierzono za pomocą kolorymetru Langego, używając filtru VG — 9 (525 mμ). Wartości otrzymane w jednostkach Goldbarga i Rutenburga odpowiadały aktywności LAP w 0,1 ml krwi, dlatego też w przeliczeniu na 1 ml wyniki mnożono przez 10.

Błąd statystyczny metody oznaczania aktywności LAP ustalono na podstawie 30 badań krwi od jednej krowy, przy $P = 0.95$. Średnia arytmetyczna aktywności enzymu w jedn. G.—R. $y = 289,50$. Przedział ufności dla średniego odchylenia wynosił: $9,90 < 0 < 16,72$, odchylenie średnie próby $s = 12,44$, a współczynnik zmienności $v = 4,29\%$.

2) Obliczanie liczby erytrocytów w 1 mm³ krwi.

3) Obliczanie liczby leukocytów w 1 mm³ krwi.

Licze erytrocytów i leukocytów oznaczano przy użyciu mieszalników Potaina i komory typu Thoma — Zeissa.

4) Obliczanie ilości hemoglobiny za pomocą hemoglobinometru Sahliego.

5) Obliczanie wskaźnika hematokrytowego.

Wyniki

W tab. 1 podano wyniki badania aktywności enzymatycznej krwi bydła.

Widoczne są wyraźne różnice zachowania się enzymu w poszczególnych grupach zwierząt, zależnie od wieku. Istotność tych różnic sprawdzono metodą analizy wariancji (tab. 2).

Tab. 1. Średnia aktywność L — leucylo — aminopeptydazy w krwi bydła z wyznaczeniem przedziału ufności przy $P = 0,95$

Grupy zwierząt	Aktywność enzymu w jedn. G. — R./ml krwi
Cielęta	614,19 ± 52,00
Jałówki	335,00 ± 1 ^o ,58
Krowy	326,49 ± 19,06

Tab. 2. Porównanie metodą analizy wariancji wyników aktywności L — leucylo — aminopeptydazy w krwi zwierząt, zestawionych w grupy w zależności od wieku ($P = 0,95$)

Zmienność	Sumy kwadratów	Liczba stopni swobody	S ²	F _{emp.}	F _{t=0,05}	Istotność
między grupami	1663123	2	831561	95,52	3,11	+
wewnątrz grup (błąd)	774713	89	8705			
ogólna	2437836	91				

Dalszego porównania dokonano testem t-Studenta:

- 1) cielęta — jałówki
 $t_{emp} = 9,907 > 1,98 = t_{0,05}$ (różnica istotna)
- 2) cielęta — krowy
 $t_{emp} = 11,99 > 1,98 = t_{0,05}$ (różnica istotna)
- 3) jałówki — krowy
 $t_{emp} = 1,009 < 1,98 = t_{0,05}$ (różnica nieistotna)

Zależność aktywności LAP od liczby erytrocytów

Średnie liczby erytrocytów w krwi cieląt, jałówek i krow oraz wartości współczynników regresji zamieszczono w tab. 3.

Tab. 3. Zależność aktywności L — leucylo — aminopeptydazy w krwi bydła od liczby czerwonych krwinek

Grupy	Średnia liczba krwinek czerwonych w 1 mm ³ krwi	Współczynnik regresji by/x aktywności enzymu w krwi od liczby krwinek czerwonych:
Cielęta	7453000 ± 546000	2,555 · 10 ⁻⁸
Jałówki	7357500 ± 854000	1,439 · 10 ⁻⁶
Krowy	4597000 ± 258400	12,490 · 10 ⁻⁶

Nie stwierdzono występowania regresji.

Zależność aktywności LAP od liczby leukocytów

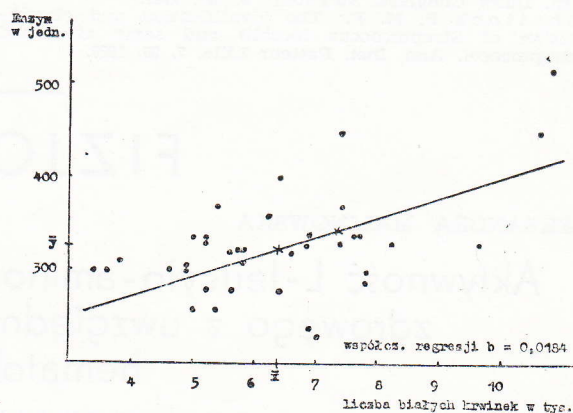
Dane dotyczące liczby leukocytów jak również współczynników regresji przedstawia tab. 4.

Regresję o charakterze istotnym stwierdzono tylko u krow. Graficznie obrazuje ją wykres 1.

Tab. 4. Zależność aktywności L — leucylo — aminopeptydazy w krwi bydła od liczby krwinek białych

Grupy	Średnia liczba krwinek białych w 1 mm ³ krwi	Współczynnik regresji by/x aktywności enzymu w krwi od liczby krwinek białych
Cielęta	8545 ± 995	0,0074
Jałówki	8367 ± 920	0,00555
Krowy	6357 ± 572	0,0184 +

(+) w prawym górnym rogu oznacza regresję istotną



Wykres 1. Zależność (regresja prostoliniowa) aktywności LAP w krwi krow od liczby białych krwinek

Zależność aktywności LAP od poziomu hemoglobiny

Tab. 5 przedstawia średni poziom hemoglobiny oraz wartości współczynników regresji w grupach badanych zwierząt.

Tab. 5. Zależność aktywności L — leucylo — aminopeptydazy w krwi bydła od poziomu hemoglobiny

Grupy	Średni poziom hemoglobiny w g/100 ml krwi	Współczynnik regresji by/x aktywności enzymu w krwi od poziomu hemoglobiny
Cielęta	9,44 ± 0,28	32,78
Jałówki	9,33 ± 0,36	-2,07
Krowy	9,12 ± 0,28	7,74

Jak wynika z powyższych danych, regresja nie wystąpiła w żadnej grupie.

Zależność aktywności LAP od wskaźnika hematokrytowego

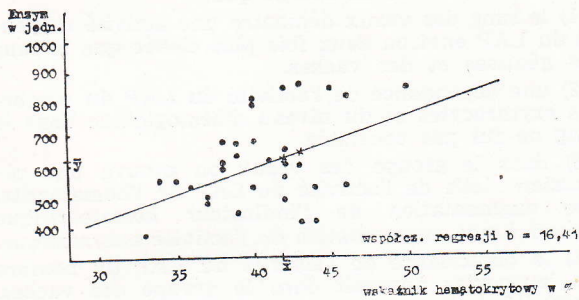
W tab. 6 podano średnie wartości wskaźnika hematokrytowego jak również odpowiednie wartości współczynników regresji.

Tab. 6. Zależność aktywności L — leucylo — aminopeptydazy w krwi bydła od wartości wskaźnika hematokrytowego

Grupy	Średnie wartości wskaźnika hematokrytowego w %	Współczynnik regresji by/x aktywności enzymu w krwi od wartości wskaźnika hematokrytowego
Cielęta	41,93 ± 1,22	16,41 +
Jałówki	38,29 ± 0,974	2,11
Krowy	38,65 ± 0,941	-1,60

(+) w prawym górnym rogu oznacza regresję istotną

Istotną regresję aktywności LAP od wskaźnika hematokrytowego obserwuje się tylko u cieląt. Przedstawiono ją jako regresję prostoliniową na wykresie 2.



Wykres 2. Zależność (regresja prostoliniowa) aktywności LAP w krwi cieląt od hematokrytu.

Omówienie

Aktywność enzymatyczna LAP w krwi bydła osiąga różne wartości w zależności od wieku. U zwierząt młodych jest ona najwyższa. Cielęta wykazują około dwukrotnie wyższą aktywność tego enzymu w porównaniu z jałówkami i krowami. Tego rodzaju zachowanie się enzymu w krwi może świadczyć o większym powiązaniu jego funkcji z metabolizmem rozwijającego się organizmu. Spadek aktywności towarzyszy wzrostowi wieku zwierzęcia. U jałówek, które przekroczyły 1 rok życia obserwuje się pewną stabilizację poziomu aktywności LAP. Dalszy rozwój zwierząt, po przekroczeniu tego wieku, nie powoduje większych odchyień w aktywności.

Oprócz oznaczenia aktywności enzymatycznej, przeprowadzono dodatkowe badania krwi. Tabela 3 i 4 przedstawia średnie liczby erytrocytów i leukocytów w 1 mm^3 krwi badanego bydła. Zarówno w przypadku erytrocytów jak i leukocytów stwierdzono najwyższą średnią liczbę u cieląt, nieco niższą u jałówek, najniższą natomiast u krów. Znacznie wyższe liczby krwinek czerwonych i białych w 1 mm^3 krwi cieląt, w porównaniu z bydlęciem dorosłym, podaje w swych pracach Krzymowski (5, 6).

Poziom hemoglobiny (tab. 5) wykazuje bardzo zbliżone wartości średnie w grupach zwierząt. Podobnie nie obserwuje się większych odchyień średnich wartości wskaźnika hematokrytowego (tab. 6). Warto jednak zwrócić uwagę, że u cieląt występują nieznacznie podwyższone wartości.

U wszystkich zwierząt objętych badaniami, określano metodami statystycznymi zależność aktywności LAP od wyników badań dodatkowych. Wartości odpowiednich współczynników regresji podano w tabelach.

Nie wykryto zależności działania enzymu w krwi, od liczby krwinek czerwonych, chociaż zarówno liczba erytrocytów jak i aktywność enzymatyczna wykazują spadek związany z wiekiem. Nie stwierdzono także regresji od

ilości hemoglobiny we krwi. Może to wskazywać na pewną niezależność działania enzymu od zawartości barwnika krwi.

Regresja o charakterze istotnym wystąpiła w przypadku liczby białych ciałek krwi u zwierząt dorosłych. Podwyższeniu liczby leukocytów o 1000 odpowiada przeciętny wzrost aktywności LAP o 18,4 jednostki. Należałoby zbadać jak kształtuje się ta zależność w przypadkach leukocytozy i jakie jest rozmieszczenie enzymu w poszczególnych rodzajach białych krwinek.

W grupie cieląt wykryto istotną regresję aktywności enzymatycznej LAP zależnie od wskaźnika hematokrytowego. Wzrostowi wskaźnika o 1% odpowiada wzrost aktywności średnio o 16,41 jednostek.

Z przeprowadzonych badań wynika, że aktywność LAP zachowuje się w sposób zupełnie inny u zwierząt młodych niż u dorosłych. Występowanie regresji istotnej od badanych czynników tylko w grupie cieląt, lub krów, przy tym niepowtarzalność regresji w innych grupach może nasuwać przypuszczenie, że enzym spełnia inną rolę w młodym, rosnącym organizmie a inną u zwierząt dojrzałych.

Piśmiennictwo

1. Arst H. E., Manning R. T., Delp M.: Am. J. Med. Sci. 238; 120-31, 1959.
2. Goldberg J. A., Rutenburg A. M.: Cancer 11; 2, 1958.
3. Goldberg J. A., Pineda E. P., Rutenburg A. M.: Am. J. Clin. Path. 32; 571-5, 1959.
4. Haschen R. J.: Biochem. Z. 334; 569-75, 1961.
5. Krzymowski T.: Roczn. Nauk Roln. E, 69; 1-44, 1959.
6. Krzymowski T.: Roczn. Nauk Roln. E, 69; 45-81, 1959.
7. Malinowska A.: Med. Wet., 19; 381-2, 1963.
8. Malinowska A.: Pol. Arch. Wet. praca oddana do druku.
9. Monis B., Nachlas M. N., Seligman A. M.: Cancer 12; 601, 1959.
10. Nachlas M. N., Crawford D. T., Seligman A. M.: J. Histochem. 5; 264, 1957.
11. Nawrocki Z.: Matematyczne podstawy statystyki dla zootechników, W-wa, PWN, 1953.
12. Sigma Chemical Company: Tentative Techn. Bull. No 250, 1960.
13. Wilczok T., Vorbrodt A.: Bull. de L'Acad. Pol. Sci. 8; 545, 1960.
14. Wilczok T., Stęplewski Z.: Bull. de L'Acad. Pol. Sci. 8; 549, 1960.

Adres autora: Aleksandra Malinowska, Warszawa, ul. Grochowska 272.

Малиновска А. — АКТИВНОСТЬ Л-ЛЕУЦИЛО-АМИНОПЕПТИДАЗА (ЛЯП) В КРОВИ ЗДОРОВОГО КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С УЧЕТОМ НЕКОТОРЫХ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Энзиматическую активность (ЛЯП) в крови здорового скота определяли колориметрическим способом по методу Гольдбарга и Рутенбурга. Исследовано 31 телят, 24 телели и 37 коров. Статически проверяли зависимость активности энзима от возраста животных, количества красных и белых кровяных телец в 1 мм^3 крови, количества гемоглобина, а также от гематокритового показателя.

На основании полученных результатов автор заключает, что:

1. Кровь телят проявляет среднюю активность ЛЯП почти вдвое высшую, чем кровь телели и коров.
2. Не обнаружено зависимости активности ЛЯП от количества эритроцитов и от уровня гемоглобина в крови.

3. В группе телят доказано существенную регрессию активности ЛЯП от гематокрита. При повышении гематокритового показателя наступает увеличение энзиматической активности.

4. Зависимость активности ЛЯП от количества лейкоцитов наблюдали в группе коров: чем больше число лейкоцитов, тем выше активность энзима.

Malinowska A. — The activity of L-leucylo-aminopeptidase (LAP) in the blood of healthy cattle with regard to some haematological tests.

The enzymatic activity of LAP in the blood of healthy cattle was determined colorimetrically by the method of Goldburg and Rutenburg.

Tests were made on 31 calves, 24 heifers and 37 cows.

The correlation between the activity of the enzyme and the age of the animals, number of erythrocytes and leucocytes in 1 mm³ of blood, the amount of haemoglobin and the haematocritic index was checked by statistical methods.

On the bases of the tests carried out it was found that:

1. The calves blood shows average LAP activity to be about twice as high as that in heifers and cows.

2. No correlation was found between the activity of LAP and the number of red blood cells, or the level of haemoglobin in the blood.

3. In the calves, significant regression of LAP activity was demonstrated from the haematocrit. A rise in the enzymatic activity corresponds to a rise in the haematocritic index.

4. A correlation between the activity of LAP and the number of white blood cells occurs in cows. The higher the white blood cell count, the higher the enzymatic activity.

Malinowska A. — L'activité du L — leucylo — aminopeptidase (LAP) dans le sang des bovins bien portants avec une considération de certaines investigations hématologiques.

L'activité enzymatique du LAP dans le sang des bovins bien portants fut défini à l'aide de la méthode colorimétrique de Goldburg et Rutenburg.

Les investigations furent effectuées chez 31 veaux, 24 génisses et 37 vaches.

A l'aide de la méthode statistique on constata la dépendance de l'activité enzymatique de l'âge de l'animal, du nombre des erythrocytes et de leucocytes dans 1 mm³ de sang, de la quantité d'hémoglobine ainsi que de l'indicateur hématocritique.

De cette manière on définit que:

1) le sang des veaux démontre une activité moyenne du LAP environ deux fois plus élevée que le sang des génisses et des vaches.

2) une dépendance de l'activité du LAP du nombre des erythrocytes et du niveau d'hémoglobine dans le sang ne fut pas constatée,

3) dans le groupe des veaux on prouva une régression réelle de l'activité du LAP de l'hématocrite. Une augmentation de l'indicateur hématocritique répond à une augmentation de l'activité enzymatique.

4) la dépendance de l'activité du LAP du nombre des leucocytes apparaît dans le groupe des vaches. L'activité de l'enzyme s'accroît avec un accroissement du nombre des leucocytes.

Malinowska A. — Aktivität der L-Leucylo-aminopeptidase-LAP- im gesunden Rinderblut mit Berücksichtigung mancher hematologischen Untersuchungen.

Die enzymatische Aktivität LAP im Blut gesunder Rinder wurde kolorimetrisch nach der Methode Goldburg und Rutenburg bestimmt. Die Untersuchungen betreffen 31 Kälber, 24 Färsen und 37 Kühe. Statistisch wurde überprüft: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität vom Alter der Tiere, der Zahl der Erythro- und Leukocyten in 1 mm³ Blut, Hb Menge und Hematokritindex.

Auf Grund der Untersuchungen ist festgestellt worden: 1. Das Kälberblut weist eine mittlere Aktivität LAP ungefähr zweimal höher auf, wie das Blut der Färsen und Kühe. 2. Eine Abhängigkeit der Aktivität LAP von der Erythrocytenzahl und dem Hb Niveau wurde nicht beobachtet. 3. In der Kälbergruppe wurde eine tatsächliche Regression der Aktivität LAP vom Hematokrit bewiesen. Der Steigerung des hematokritischen Index entspricht eine Steigerung der enzymatischen Aktivität. 4. Eine Abhängigkeit der Aktivität LAP von der Leukocytenzahl tritt bei Kühen auf. Je höher die Leukocytenzahl umso mehr wächst die enzymatische Aktivität.

SAMUEL ROTENBERG, STANISŁAW BARANOW-BARANOWSKI

Kolorymetryczne określenie zawartości wolnego i całkowitego cholesterolu w mleku

Z Katedry Fizjologii Zwierząt WSR w Szczecinie
Kierownik: doc. dr SAMUEL ROTENBERG

W związku z baczna uwagą, którą zwraca się obecnie na przemianę cholesterolu w fizjologicznych i patologicznych procesach w ustroju ludzkim i zwierzęcym ukazują się liczne publikacje o zawartości cholesterolu we krwi i tkankach różnych organizmów. Stosunkowo rzadko jednak spotykają się wśród nich prace dotyczące zawartości cholesterolu w mleku i produktach pochodzenia mlecznego, które są przecież podstawą racjonalnego odżywiania. W pewnej mierze jest to być może wynikiem braku dostatecznie dokładnej i łatwej zarazem metody określenia zawartości wolnego i całkowitego cholesterolu w mleku.

W dostępnej literaturze znaleźliśmy co prawda starannie opracowane metody Stegera (13) i Laskowskiego (7), wymagają one jednak szczególnej dbałości o czystość i całkowite odwodnienie odczynników oraz ścisłego przestrzegania czasu przy wywoływaniu reakcji barwnej, co sprawia wiele kłopotów przy masowych analizach.

Istniejące bardzo liczne kolorymetryczne metody określania cholesterolu we krwi i surowicy opierają się najczęściej na reakcjach barwnych Liebermana-Burcharda z bezwodnikiem kwasu octowego i stężonym kwasem siarkowym (2, 6, 8), na reakcji z ZnCl₂ i CH₃COCl (11, 13), na reakcji Lifschütza z FeCl₃ w lodowatym kwasie octowym i z stężonym H₂SO₄ (1, 4, 10, 12, 14), lub jednej z reakcji barwnych po zastosowaniu odpowiednich adsorbentów dla oddzielenia cholesterolu wolnego i zestryfikowanego (3, 5).

Metody opierające się na barwnej reakcji Liebermana — Burcharda lub na reakcji z chlorkiem cynku i CH₃COCl wymagają dużej czystości i całkowitego odwodnienia odczynników. Prócz tego, jak podaje Cook (2) szereg steroidów takich jak kaprostanol, 24-dehydrocholesterol, steroidy z podwójnym wiązaniem przy C₅ i wiele innych daje reakcję barwną z bezwodnikiem kwasu octowego i z H₂SO₄.

Metody oparte na reakcji Lifschütza z FeCl₃ są mniej czułe na ślady wody w odczynnikach, a otrzy-