

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 Goldberg 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 Goldberg 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 Goldberg 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-

mane w próbce przeznaczony do kolorymetrowania fioletowo-czerwone zabarwienie utrzymuje się bez zmiany powyżej jednej godziny (13). Należy również zaznaczyć, że przy tej reakcji w pokojowej temperaturze estry cholesterolu z nienasyconymi i nasyconymi kwasami tłuszczowymi od C_{16} do C_{18} nie przeszkadzają w określeniu wolnego cholesterolu (4).

Różne metody i ich modyfikacje nie mogą być jednak bezpośrednio zastosowane do określenia zawartości cholesterolu w mleku, gdyż białka i tłuszcze w mleku przy stosunkowo nieznacznej zawartości cholesterolu uniemożliwiają otrzymanie zabarwienia porównywalnego z roztworem wzorcowym. Dlatego też zmuszeni byliśmy do opracowania pewnej modyfikacji stosowanych dla danego celu metod kolorymetrycznych.

Opis metody

Dla wykonania określenia potrzebne są następujące odczynniki: 1) 25% KOH, 2) 96% etanol, 3) eter naftowy, 4) 0,05% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ w lodowatym kwasie octowym, 5) stężony kw. siarkowy, 6) 0,5% roztwór digitoniny (1 g digitoniny + 100 ml etanolu + 2 ml 10% CH_3COOH i dopełnić wodą destylowaną do 200 ml), 7) 50 mg% wzorcowy roztwór cholesterolu w mieszaninie acetonu i etanolu (1:1), 8) mieszanina acetonu i etanolu (1:1), 9) mieszanina acetonu i eteru naftowego, 10) 0,5 n H_2SO_4 .

Wykreślenie krzywej wzorcowej dla cholesterolu całkowitego

Do szeregu próbek odmierza się od 0,2 do 0,9 ml roztworu wzorcowego. Aceton z etanolem odparowuje się na łaźni wodnej i suchą pozostałość rozpuszcza się w 5 ml $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ w lodowatym kwasie octowym. Następnie dodaje się 3 ml stężonego H_2SO_4 i po dokładnym zamieszaniu i ostudzeniu określa się gęstość optyczną próbek (ekstynkcyjne) stosując filtr 570 milimikr. Wykres w podanych wyżej granicach steżeń przedstawia funkcję liniową i odpowiada zawartości cholesterolu od 0,1 do 0,45 mg w próbce co z kolei odpowiada 5 do 22,5 mg% cholesterolu w mleku.

Wykreślenie krzywej wzorcowej dla cholesterolu wolnego

Do szeregu próbek odmierza się od 0,2 do 0,9 ml roztworu wzorcowego, dodaje do każdej odpowiednio równe ilości roztworu digitoniny i po dokładnym zamieszaniu odstawia na 1 godzinę, a następnie wiruje się przy 4000 obr. min. w ciągu 10 minut. Po odwirowaniu płyn z nad osadu zlewa się, osad suszy się w temperaturze około $100^\circ C$ i dodaje jak poprzednio roztwór $FeCl_3$ w kwasie octowym lodowatym, H_2SO_4 i kolorymetruje się.

Zmydlenie

Do kolbki nalewa się 2 ml mleka, dodaje 10 ml 25% KOH i stawia się na łaźni wodnej na 3 godziny uzupełniając wodą destylowaną do poprzedniej ilości.

Można również przeprowadzić zmydlenie tłuszczów i estrów cholesterolu po uprzedniej ekstrakcji według Röse — Gottlieba (9) dodając do odparowanego ekstraktu eterowego 5 ml 2 n KOH w etanolu na gorąco przez 2 godziny pod chłodnicą zwrotną, lub też na zimno pozostawiając zmydlaną próbkę na okres nie mniejszy niż 24 godziny i mieszając od czasu do czasu zawartość kolbki. Wyniki otrzymane przy stosowaniu tych sposobów zmydlenia nie różnią się od siebie w sposób istotny.

Ekstrakcja cholesterolu całkowitego i jego oznaczanie

Po zmydleniu zawartość kolbki przenosimy do rozdzielacza, a kolbkę przepłukuje się kolejno 5 ml etanolu i 10 ml eteru naftowego zlewając za każdym

razem do rozdzielacza płyn użyty do płukania. Zawartość rozdzielacza wytrząsamy energicznie przez 5 min. i po rozdzieleniu się warstw zlewamy dolną do drugiego rozdzielacza, a górną (eterową) pozostawiamy w rozdzielaczu. Dolną warstwę wytrząsamy powtórnie przez 3 min. z 10 ml eteru naftowego i po rozdzieleniu warstw eterową znów przenosimy do pierwszego rozdzielacza.

Dla dokładniejszego zubożnienia i wypłukania ługu potasowego z wyciągu, dodaje się do niego 3 ml 0,5 n H_2SO_4 , 5 ml etanolu i wytrząsa w ciągu 3 min. Warstwę eterową zlewa się do kolbki, rozdzielacz przemywa eterem i cały ekstrakt odparowuje się do sucha. Po ostudzeniu dodajemy do suchej pozostałości 5 ml $FeCl_3$ w lodowatym kwasie octowym i powoli, po ściance, 3 ml stężonego H_2SO_4 . Po dokładnym przemieszaniu pozostawiamy do ostygnięcia do temperatury pokojowej i kolorymetrujemy przy użyciu filtru 570 milimikronów w stosunku do próby ślepej, w której znajduje się również 5 ml $FeCl_3$ w kwasie octowym oraz 3 ml H_2SO_4 . Otrzymaną ekstynkcyjną porównuje się z krzywą wzorcową, a wynik przedstawia zawartość cholesterolu w mleku.

Określenie cholesterolu wolnego

Dla określenia wolnego cholesterolu w mleku mieszaninę eterów zawierającą wyekstrahowany według Röse — Gottlieba tłuszcz i cholesterol odparowuje się do sucha na łaźni wodnej. Następnie postępując wg metody Searcy i Berquista (10) rozpuszcza się suchą pozostałość w 1 ml mieszaniny etanolu i acetonu, dodaje 1 ml roztworu digitoniny, miesza się starannie i odstawia na co najmniej 1 godzinę. Po wytrąceniu się digitonidu cholesterolu, próbkę wiruje się (4000 obr./min.) płyn z nad osadu zlewa, a osad przemywa się 5 ml mieszaniny eteru i acetonu. Po ponownym odwirowaniu i dokładnym zlanii płynu określa się cholesterol przy pomocy $FeCl_3$ w kwasie octowym i H_2SO_4 w ten sam sposób jak to opisano dla cholesterolu całkowitego. Otrzymaną ekstynkcyjną porównuje się z odpowiednią krzywą wzorcową.

Proponowana przez nas modyfikacja sposobów określenia cholesterolu całkowitego w mleku została sprawdzona przy pomocy metody opartej na reakcji barwnej Liebermana — Burcharda wg modyfikacji Laskowskiego (7). Wyniki otrzymane obu sposobami okazały się zgodne (różnice w granicach błędów).

Piśmiennictwo

1. Assous E., Girard M.: C. R. Acad. Sci. 254, 3912, 1962.
2. Cook R. P.: Berichte ü. d. g. exp. Pharm. 244(2), 118, 1963.
3. Creech B. G., Sewell B. W.: Analyt. Biochem. 3, 119, 1962.
4. Girard M., Assous E.: C. R. Acad. Sci. 254, 3752, 1962.
5. Janda J.: Cas. lěk. ces. 91, 21, 1952 wg Homolka J. „Diagnostyka biochemiczna” PZWL, Warszawa, 1958, 295.
6. Kingsley G. R., Schaffert R. R.: J. biol. Chem. 180, 315, 1949.
7. Laskowski K.: Prace Inst. Przem. Mlecz. 2(20), 21, 1961.
8. Pearson S., Stern S., McGavack T.: Analyt. Chem. 25, 813, 1953.
9. Röse-Gottlieb: Ztschr. für angew. Chemie 2, 100, 1890 wg Pijanowski E. „Zarys chemii i technologii mleczarstwa” PWRL, Warszawa, 1957, 51.
10. Searcy R. L., Berquist L. M.: Amer. J. Med. Techn. t. 25, 4, 237, 1959 wg Tulczyński M. (red) „Metody laboratoryjne diagnostyki klinicznej”. PZWL, Warszawa, 1962, 319.
11. Sheff M. F., Gretz M. D., McMarlin J. B.: Berichte ü. d. g. Phys. u. exp. Pharm. 248(3), 198, 1963.
12. Stefaniak B., Juszkiewicz T.: Med. Wet., XVIII, 3, 169, 1962.
13. Steger H.: Arch. f. Tierzucht 4(3), 199, 1961.
14. Webster D.: Berichte ü. d. g. Phys. u. exp. Pharm. 244(2), 118, 1963.

Adres autora: doc. dr S. Rotenberg, Szczecin, ul. Małopolska 46 m. 10.

Ротенберг С. Баранов-Барановский С. — КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СВОБОДНОГО И ОБЩЕГО ХОЛЕСТЕРИНА В МОЛОКЕ.

Авторы описывают метод определения содержания общего и свободного холестерина в молоке. Метод основан на цветной реакции Лившютца с хлористым железом в ледяной уксусной кислоте и с концентрированной серной кислотой.

Rotenberg S., Baranow-Baranowski S. — **Colorimetric Determination of the Free and Total Contents of Cholesterol in Milk.**

The authors have described the method of determining the contents of total and free cholesterol in milk based on the Lifschütz reaction with $FeCl_3$ in acetic acid and H_2SO_4 .

Rotenberg S., Baranow-Baranowski S. — **Dosage colorimétrique du cholestérole libre et total dans le lait.**

Les auteurs décrivent une méthode de dosage colorimétrique du cholestérole total et libre dans le lait. La méthode se base sur la réaction de Lifschütz avec $FeCl_3$ dans le CH_3COOH et H_2SO_4 .

Rotenberg S., Baranow-Baranowski S. — **Kolorimetrische Bestimmung des freien und allgemeinen Cholesteringehalts der Milch.**

Verfasser beschreiben eine Methode der kolorimetrischen Bestimmung des allgemeinen Cholesteringehalts der Milch, welche auf Lifschützchen Farbenreaktion mit $FeCl_3$ in CH_3COOH und H_2SO_4 basiert ist.

PRAKTYKA LABORATORYJNA

ZDZISŁAW LARSKI

Puławy

Przydatność zmodyfikowanego mikroskopu o odwróconym układzie do obserwacji hodowli komórek

W normalnych, powszechnie używanych mikroskopach badany preparat umieszcza się poniżej obiektywu i okularu.

Pewne prace i obserwacje biologiczne wymagają użycia mikroskopu odwróconego, w którym oglądany preparat mieści się powyżej obiektywu i okularu. Umożliwia to między innymi badanie obiektów mieszczących się na dnie naczynia, którego wysokość nie pozwala na obniżenie obiektywu zwykłego mikroskopu dla uzyskania obrazu. Również nieprzejrzystość płynu nad badanym obiektem uniemożliwiać może dokładną obserwację.

Mikroskop odwrócony znajduje szczególnie duże zastosowanie przy badaniu pewnych typów hodowli tkanek i komórek. Hodowle jednowarstwowe rosnące w naczyniach zamykanych korkiem gumowym obserwować można pod zwykłym mikroskopem przez obrócenie naczynia i przybliżenie do obiektywu części pokrytej warstwą komórek. Tak bada się hodowle w próbkach, naczynkach Carrel'a, a nawet mniejszych butelkach Roux. Jednak mikroskop zwykły nie nadaje się do obserwacji hodowli, gdy wysokość naczynia jest większa niż odstęp między stolikiem mikroskopu a maksymalnie podwyższonym obiektywem.

Przy hodowli komórek na płytkach Petriego w termostatach ze stałym przepływem CO_2 , obserwacja rosnącej warstwy hodowli możliwa jest tylko przy pomocy mikroskopu odwróconego. W tym bowiem przypadku niemożliwe jest odwrócenie naczynia z hodowlą zawierającą płyn odżywczy nad warstwą komórek.

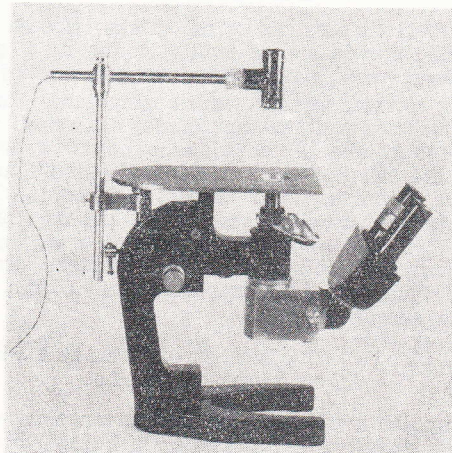
Mikroskopy odwrócone nie są produkowane w Polsce ani w innych krajach socjalistycznych; przy staraniach o sprowadzenie takiego mikroskopu napotkaliśmy na trudności związane z otrzymaniem dewiz. Cena mikroskopu wynosi około 1000 dolarów i nawet w krajach produkujących te przyrządy, ze względów oszczędnościowych robione są próby adaptacji zwykłych mikroskopów. Przykładem tego jest opis takiej modyfikacji podany przez Wischnitzera (An Inexpensive Inverted Microscope System) w czasopiśmie *Stain Technology* 31(2)81—85, 1963. Zaletą opisanego przyrządu jest zachowanie kondensora Abbe'go, co daje możliwość badania preparatów rów-

niez pod dużym powiększeniem. Natomiast wadą jego, z punktu widzenia przydatności do badania hodowli tkankowych, jest niemożność ich oglądania w naczyniach szerokich i wysokich (brak miejsca).

Adaptacji mikroskopu produkcji krajowej, Polskich Zakładów Optycznych (MB) na typ odwrócony dostosowany do obserwacji hodowli tkankowych, podjął się Antoni Sankowski, mechanik precyzyjny Instytutu Weterynarii w Puławach i przeprowadził ją samodzielnie według własnego projektu, w sposób niżej podany.

Wykonanie

Założenia podyktowane względami użytkowymi wymagały usunięcia stolika krzyżowego, którego obecność uniemożliwiałaby jakąkolwiek modyfikację. Następnie należało skierować obiektyw ku górze. Dzięki symetrii wodzideł w głowicy i w górnej części statywu można było odwrócić całą głowicę z rewolwerem, jednak trzeba było pozostawić kremalierę w jej dotychczasowym położeniu. Dzięki symetrii położenia śrub utrzymujących ją można było dokonać zmiany jej ułożenia. Po odkręceniu śrub utrzymujących kremalierę odwrócono ją w stosunku do głowicy.



Fot. Jerzy Pacewicz