

# FIZJOLOGIA I FIZJOPATOLOGIA

TADEUSZ WESOŁOWSKI

## Normy laboratoryjne proteinogramów surowicy królików

Instytut Medycyny Pracy i Higieny Wsi w Lublinie  
Dyrektor: doc. dr H. RAFALSKI

Zwierzęta laboratoryjne używane do badań doświadczalnych (3) wykazują bardzo zróżnicowaną wrażliwość na otaczające je środowisko. Czynniki te wywołują cały szereg najprzeróżniejszych zaburzeń, które ze względu na swój złożony charakter, są bardzo trudne do uchwycenia a najczęściej w wielu wypadkach jedynie z dużymi trudnościami, możliwe do udowodnienia, dostępnymi i stosowanymi metodami laboratoryjnymi oraz posiadaną aparaturą pomiarowo-kontrolną. Związane jest to nie tylko z błędami wynikającymi z samej metody, ale również z wrażliwością osobniczą, która odgrywa nie mniejszą rolę, od wyżej wspomnianych błędów metody i samej techniki postępowania w trakcie wykonywania badań.

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że najczęściej brak jest odpowiednich opracowań, mówiących o wartościach prawidłowych, jakie powinno się otrzymać u zwierząt laboratoryjnych w stanie zdrowia (10). Stan taki tym bardziej komplikuje interpretację wyników, otrzymanych na podstawie przeprowadzonych doświadczeń i zmusza do opracowywania we własnym zakresie pewnych wartości, które w przybliżeniu można nazwać wartościami prawidłowymi, obowiązującymi w danym laboratorium czy zakładzie naukowym, dla danego gatunku i rodzaju zwierząt laboratoryjnych.

Celem pracy jest oznaczenie wahań ilościowych i podanie wartości średnich frakcji białkowych surowicy krwi królików zdrowych wyrażonych w gramoprocentach (g%), czyli próba ustalenia normy, wynikającej z badań własnych, wykonywanych w czasie jednorazowego pobierania krwi od zwierząt badanych.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono u 85 klinicznie zdrowych królików, mieszańców w wieku od około 6 miesięcy do 1 roku, były to samce o ciężarze najmniej 3 kg. Na zwierzętach tych nie przeprowadzono poprzednio żadnych doświadczeń. Króliki umieszczone były w

klatkach w suchym pomieszczeniu z pełnym dostępem świeżego powietrza i światła dziennego. Wiwarium było budynkiem izolowanym od ubocznych czynników i posiadało ono również ogrodzony wybieg z którego króliki często korzystały.

Zwierzęta przed doświadczeniem wystandaryzowano, karmiąc je dietą o określonym składzie przez 4 tygodnie. Dieta pokrywała zapotrzebowanie zwierząt na kalorie i składniki odżywcze. Jedno zwierzę otrzymywało 470 g diety na dobę zawierającej:

pasza graunlowana LSK	200 g
marchew lub buraki ćwikłowe czerwone	150 g
siano	120 g
woda <i>ad libitum</i>	

Codziennie kontrolowano ciężar ciała zwierząt. Do doświadczenia wybrano zwierzęta o zbliżonym ciężarze ciała.

W czasie poprzedzającym dany eksperyment pobierano krew od królików do sprawdzenia poziomu poszczególnych frakcji białkowych w surowicy krwi. Sprawdzenie poziomu frakcji białkowych przeprowadzono przy pomocy elektroforezy bibułowej.

Surowicę otrzymywano z krwi królików zdrowych według ogólnie przyjętych metod. Rozdziału białka surowicy na frakcje białkowe dokonywano za pomocą elektroforezy bibułowej według ogólnie znanej i przyjętej metodyki w komorze wilgotnej, seryjnym aparatem produkcji krajowej (4, 7). Czas trwania rozdziału białka surowic na frakcje białkowe wynosił 13 godzin, przy napięciu 175 V, około 6 V/cm.

Badając obraz białek krwi wykonany elektroforezą bibułową, oznaczono jednocześnie poziom białka całkowitego przy pomocy refraktometru firmy Zeissa, ponieważ sam rozdział elektroforetyczny dostarcza jedynie danych do obliczenia procentowej zawartości poszczególnych frakcji (4). Pragnąc otrzymać liczby absolutne dla poszczególnych frakcji należy oznaczyć białko całkowite i z tego wyliczyć wartości bezwzględne dla poszczególnych frakcji (7).

Uzyskane wyniki mogą być obarczone błędem wynikającym ze zmiany wartości badanej cechy w czasie, jak też z różnic między badanymi osobnikami. Przyjęto 5% ryzyko błędu i przy takim poziomie obliczono zasięg średniej arytmetycznej i zasięg 95% wartości wyników indywidualnych — norma. Oznacza to, że oszacowanie średniej arytmetycznej obarczone jest 5% ryzykiem błędu, w podanym zasięgu poszczególnych wyników powinno się znajdować 95% wszystkich oznaczeń, wykonanych dla badanej populacji zwierząt w podanych warunkach (9). Po przeprowadzeniu analizy statystycznej otrzymane dane zebrano w tab. 1.

Tab. 1. Podstawowe charakterystyki statystyczne wartości średnich arytmetycznych białka całkowitego i frakcji białkowych krwi królików (w g%)

Oznaczenia	Białko całkowite	Albuminy	G l o b u l i n y		
			alfa—	beta—	gamma—
Średnia arytmetyczna ( $\bar{x}$ )	5,87	3,00	0,91	0,85	1,08
Błąd średniej arytmetycznej (m)	0,04	0,03	0,02	0,02	0,02
Odchylenie standardowe ( $\sigma$ )	0,37	0,25	0,19	0,21	0,20
Współczynnik zmienności (v)	6,34	8,47	20,47	25,30	18,34
Oszacowanie (zasięg) średniej arytmetycznej w populacji	5,79 — 5,95	2,94 — 3,06	0,87 — 0,95	0,81 — 0,89	1,04 — 1,12
Oszacowanie (zasięg) 95% wartości wyników indywidualnych w populacji	5,13 — 6,61	2,49 — 3,51	0,54 — 1,28	0,42 — 1,28	0,69 — 1,49

## Wyniki i omówienie

Otrzymano 85 indywidualnych, różnych elektroforogramów białek surowicy krwi królików zdrowych. Wykonano z tego 85 analiz, uzyskując wartości wyrażone w procentach bezwzględnych (g%), dla każdej z frakcji białkowych zawartych w poszczególnych białkach surowicy krwi.

Rozstęp uzyskanych wartości dla poszczególnych frakcji białkowych surowicy krwi obliczony w gramoprocenciech był następujący: albuminy 2,16—3,73%, alfa-globuliny 0,65—1,30 g%, beta-globuliny 0,44—1,36 g% gamma-globuliny 0,48—1,74 g% oraz białko całkowite 5,01—6,98 g%.

W wyżej opisanych warunkach uzyskano następujące wartości średnich arytmetycznych, czyli tak zwaną normę, dla badanej populacji podane w tab. 2.

Tab. 2. Wartości średnich arytmetycznych (norma) frakcji białkowych w surowicy krwi królika

Frakcje białkowe w surowicy krwi królika			
Albuminy	Globuliny		
	alfa —	beta —	gamma —
3,00 ± 0,50 g%	0,91 ± 0,38 g%	0,84 ± 0,42 g%	1,08 ± 0,40 g%
białko całkowite		5,87 ± 0,74 g%	

Wartości średnie frakcji białkowych w surowicy krwi królika zdrowego wyrażone w procentach względnych, podano w stosunkowo wielu opublikowanych pracach, natomiast na temat tych samych wartości wyrażonych w wartościach bezwzględnych (gramoprocenciech) brak było odpowiednich danych (10).

Antonini (2) podaje, że białko całkowite w surowicy krwi królików wynosi 5,6 g%, Chopard (6) określa jego wartość na 5,64 g%, natomiast Klieneberger (8) stwierdza, że jest ono zawarte w granicach 6,27—7,53 g%. W stosunku do Antoniniego (2) i Choparda (6) badania własne wykazały wyższy poziom białka całkowitego, natomiast w stosunku do Klienebergera (8) poziom ich był niższy. Według danych opublikowanych, przez Albritton (1) białko całkowite ma wartość 5,7 g% i jest ona nieznacznie mniejsza od wartości otrzymanych w badaniach własnych. Autor ten podaje również wartości dla niektórych frakcji białkowych surowicy krwi i tak dla albumin ustala on wartość 4,2 g%, podczas kiedy w badaniach własnych otrzymano wartość wynoszącą 3,00 ± 0,50 g%. Według Albrittona (1) frakcja globulin surowicy krwi ma poziom 1,5 g%, natomiast według badań własnych otrzymano wartość 2,84 g%. Chodera i wsp. (5) dla białka całkowitego podają wartości wynoszące 4,85—5,25 g% w których wartość średniej wynosi 5,1 g% a więc są one znacznie niższe niż wartości otrzymane

w badaniach własnych. Ziarek i wsp. (1) uzyskali inne wartości dla białka całkowitego, które były zawarte w granicach 6,0—7,2 g%, były one więc wyższe od otrzymanych wartości podanych w tej pracy. Dla frakcji białkowych surowicy krwi Ziarek i wsp. (11) podają natomiast wartości: dla albumin 1,5—3,25 g%, które są niższe od wartości podanych w tej pracy, natomiast dla globulin podają oni wartość 3,75—5,20 g% które są wyższe od poziomu globulin oznaczonego w badaniach własnych. Wartość gamma-globulin jest według tych ostatnich autorów, wynosząca 1,10—2,70 g% również wyższa od wartości otrzymanych w badaniach własnych.

Dużą trudność w porównaniu podanych przez wymienionych autorów wartości poziomów białka całkowitego i poszczególnych frakcji białkowych surowicy krwi sprawiał fakt, że nie podane były metody przy pomocy których je oznaczano, jak również w zasadzie brak było informacji o ilości zwierząt na których przeprowadzono powyższe badania.

Wydaje się sprawą interesującą fakt, że poziom białka całkowitego oznaczony przez różnych autorów (1, 2, 5, 6) w kilkuletnim odstępie czasu, wykazuje niemal identyczne wartości, natomiast wartości otrzymane w latach późniejszych (11), jak i wcześniejszych (8), stosunkowo znacznie od nich odbiegają. Należy sądzić że metody oznaczania białka całkowitego różniły się między sobą i dawały odmienne wyniki.

Brak danych w dostępnym piśmiennictwie o wartości poziomów frakcji białkowych surowicy krwi zwierząt laboratoryjnych, wiąże się prawdopodobnie z szybkim a tym samym, może mało wnikliwym rozwojem metody elektroforezy bibułowej, która zdecydowanie wyparła z wielu pracowni badawczych inne metody, stosowane poprzednio do frakcjonowania surowic. Konieczność przeprowadzenia badań nad zachowaniem się i zmianami we frakcjach białkowych surowicy krwi wykazała brak wyżej wymienionych danych.

## Wnioski

1. Wartości średnich arytmetycznych frakcji białkowych surowicy krwi królików zdrowych, obliczone w gramoprocenciech (wartościach bezwzględnych), były następujące: albuminy 3,00 g%, alfa-globuliny 0,91%, beta-globuliny 0,85 g%, gamma-globuliny 1,08 g% oraz białko całkowite 5,87 g%.

2. Króliki nadają się do badań nad białkami surowicy krwi, należy jednak wartości średnich arytmetycznych ustalić na większej ilości zwierząt doświadczalnych.

3. Interpretacja wyników elektroforetycznych w chwili obecnej, możliwa jest w oparciu o własne wartości średnich arytmetycznych, czyli o własną normę laboratoryjną.



4. Własnych wyników badań nie powinno się interpretować w oparciu o wartości średnich arytmetycznych (normy) innych pracowni.

5. W większości opublikowanych prac przeprowadzone badania miały charakter krótkotrwały.

#### Piśmiennictwo

1. Albritton E. C.: Standard Values in Blood, Verl. W. B. Saunders Comp., Philadelphia u. London 1935.
2. Antonini F. M., Piva G.: cyt. przez Ostrowskiego W. w roz. „Elektroforeza bibulowa”. („Chromatografia” PWN, Warszawa 1957, pod red. Opieńskiej-Blauth J. Waksmundzkiego A., Kańskiego M.).
3. Barański S., Czernski P., Krzezińska-Ławkowicz I., Krzymowski T., Ławkowicz W.: Układ krwiotwórczy zwierząt laboratoryjnych, PWN, Warszawa 1962.
4. Bogdanikowa B.: Klinika białek krwi, PZWL, Warszawa 1960.
5. Chodera A., Wójciak T.: Acta Physiol. Pol., 12, 681, 1961.
6. Chopard P.: cyt. przez Schermera S. w roz. „Das Kaninchen” („Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere”, pod red. Schermer S., Wydawnictwo Barth J. A. Verlag, Leipzig, 1968).
7. Homolka J.: Diagnostyka biochemiczna, PZWL, Warszawa 1958.
8. Klieneberger C.: Die blutmorphologie der Laboratoriumstiere, 2 Aufl. Leipzig 1927.
9. Oktaba W.: Elementy statystyki matematycznej i metodyka doświadczalności, PWN, Łódź—Warszawa 1962.
10. Wesolowski T.: Zwierz. Lab., 5, 38, 1967.
11. Ziarek S., Szyszko St., Nowak St., Łąkowski Z.: Acta Physiol. Pol., 12, 711, 1961.

Adres autora: mgr Tadeusz Wesolowski, Lublin, ul. Krańcowa 87/16.

Вэсоловски Т. — Лабораторные нормы протеинограмов сыворотки кроликов.

Исследовали количественные колебания и средние величины белковых фракции сыворотки крови здоровых кроликов, т.е. пытались установить для этих величин нормы на основании собственных исследований. Полученные результаты подвергли статистической обработке. Средние величины собраны в таблицы равняются: для альбуминов — 3,00 г%, для альфа-глобулинов — 0,91 г%, для бета-глобулинов — 0,85 г%, для гамма-глобулинов — 1,08 г% и для полного белка — 5,87 г%.

Wesołowski T. — Laboratory norms of proteinograms of rabbit sera.

The aim of the work was to establish the quantitative fluctuations and mean values of proteinic fractions of sera from healthy rabbits. The results of the examinations were analysed statistically. The main statistical characteristics were calculated. The mean values of individual proteinic fractions of sera from healthy rabbits are presented in table 1 and 2. The mean values calculated on the strength of investigations are: albumins 3.00 g%, alpha-globulins 0.91%, beta-globulins 0.85 g%, gamma-globulins 1.08 g% and total protein 5.87 g%.

## PRAKTYKA LABORATORYJNA

HANNA LEWKOWICZ

### W sprawie zgodności aglutynacji probówkowej nastawionej metodą klasyczną i za pomocą mikropipet

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Poznaniu  
Kierownik: dr T. ŁOSIŃSKI

Wobec dużego nasilenia badań serologicznych w kierunku brucelozy, od dawna ujawniała się dążność badaczy do uproszczenia techniki stosowanych metod w tych badaniach i w wielu krajach na tym odcinku wprowadzono szereg ulepszeń (1, 3, 4, 5, 6, 7).

W odniesieniu do aglutynacji probówkowej po raz pierwszy w Polsce — Anczykowski i Murat (2) podali w udokumentowany sposób celowość posługiwania się mikropipetami przy nastawianiu prób; badania wykonano na dość liczny materiał i w ujednoczonych warunkach krajowego ośrodka do spraw brucelozy. Tę uproszczoną technikę zlecono urzędowo (9) w badaniach rutynowych w Polsce.

W niniejszej pracy zamierzano sprawdzić zgodność wyników aglutynacji probówkowej, nastawianej techniką standardową i za pomocą mikropipet w warunkach i przy wyposażeniu naszego laboratorium.

Podjęcie tego tematu z inicjatywy i przy wskazówkach doc. dr Feliksa Anczykowskiego (któremu za to serdecznie dziękuję), posiadało szczególnie aspekt praktyczny, związany bezpośrednio z bieżącymi zadaniami Pracowni Serologicznej w Poznaniu, w której zastosowano do masowych badań serologicznych apa-

raturowo automatycznie rozlewającą płyny. Przy posługiwaniu się tego typu zautomatyzowaną techniką, odmierzanie odpowiednich dawek surowicy przy pomocy mikropipet, było jedyną do przyjęcia, racjonalną metodą.

#### Materiał i metody

Jako materiał służyły wybrane surowice bydlęce otrzymywane z prób nadsyłanych do rutynowego badania, o określonej zawartości aglutynin w granicach od 50 do 400 j. m. ze względu na możliwość bezpośredniego odmierzania materiału mikropipetami w tym zakresie mian. Wymienione surowice zakonserwowane fenolem w stosunku 1:1000, przetrzymywano w chłodni w temp. około +4°C. Do rozcieńczania surowicy w metodzie klasycznej, jak również do rozcieńczania antygeny w obu metodach stosowano 5% roztwór NaCl z dodatkiem 0,5% fenolu. Antygenem była standaryzowana barwna zawiesina *Brucella abortus*, produkcji Biowet — Puławy, rozlewana w rozcieńczeniu 1:10 w metodzie klasycznej, a w rozcieńczeniu 1:20 przy użyciu mikropipet.

#### Technika nastawiania prób

Odczyn aglutynacji metodą uproszczoną nastawiano w trzech powtórzeniach w wystandaryzowanych przez Anczykowskiego i Murat (2) probówkach aglutynacyjnych dł. 100 mm, średnicy 10 mm o dnie wypukłym bez wkłesnień i pofałdowań posiadających na krawędzi wcięcie do oparcia pipety. Wcięcie to zapewnia umieszczenie na tym samym miejscu krawędzi zarówno pipety odmierzającej materiał jak i