

EDWARD MALINOWSKI, HENRYKA LASSA, ANNA KŁOSSOWSKA

N-acetylo-beta-D-glukozaminidaza jako wskaźnik stanu zdrowotnego wymienia

Zakład Fizjopatologii Rozrodu i Gruczołu Mlekowego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Summary

N-acetyl- β -D-glucosaminidase as an indicator of udder health

The activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) was determined in 40 samples of quarter milk from 40 healthy cows, and in 188 samples of secretion from subclinically and clinically inflamed udders, and in 181 sample of raw bulk milk collected from small private farms. The study was performed by ADC apparatuses and diagnostics delivered by ELKABE Ltd. The average activity of NAGase was the following: 125 AFU for health quarters, 220 AFU for the recovered quarters on the 21st day after treatment (s.c.c. 300 000), 260 AFU for the cases of latent udder infections caused by *S. aureus* or *S. agalactiae* (s.c.c. below 350 000/ml), 680 AFU for cases of subclinical bacterial or aseptic mastitis (average s.c.c. 3.5 million/ml), and 1360 AFU for quarters affected with clinical forms of mastitis. The activity of NAGase in raw bulk milk was as follows: 117 AFU for s.c.c. below 200 000/ml, 123 AFU for s.c.c. 201 000-300 000/ml, 139 AFU s.c.c. 301 000-400 000/ml, 143 AFU for s.c.c. 401 000-500 000/ml, and 246 AFU for s.c.c. 0.75-1 mln/ml determined by Fossomatic. It has been noted that the state of healthy of udders and the changes in a quarter milk are determined more precisely by NAGase than by somatic cell count. The „cut off” indicator and Applied Diagnostics Corporation computer programme are fully appropriate for the estimation of the hygienic acceptability of raw bulk milk.

Podkliniczne postaci zapalenia wymienia prowadzą do ilościowych i jakościowych zmian w zakresie biochemicznych i komórkowych składników mleka. Wzrasta liczba patogennych drobnoustrojów, ilość toksyn bakteryjnych, liczba komórek somatycznych, zawartość białek surowiczych i niektórych jonów oraz aktywność wielu enzymów. Towarzyszy temu spadek stężenia laktozy i kazeiny oraz wydajności mlecznej krów. Zmiany zachowania się wymienionych elementów stanowią podstawę coraz bardziej precyzyjnych metod rozpoznawania mastitis subclinica. W różnym stopniu przydatne okazały się oznaczenia zawartości laktozy (13, 20), albumin surowiczych (13, 20, 22), antytrypsyny (13, 16), adenozynotrójfosforanu (15, 19) oraz aktywności katalazy (9, 17), laktodehydrogenazy (3), fosfatazy kwaśnej (9, 20), fosfatazy zasadowej (3, 17), aminotransferazy (3), arylsulfatazy (9, 20), glukuronidazy (9, 21), lipazy lipoproteinowej (1) i NAGazy (2, 9, 13, 16, 20). Znaczenie diagnostyczne ma wzrost przewodności elektrycznej mleka (7) jako efekt zmian składu jonowego, szczególnie

w zakresie sodu i chloru (13, 20). Według Ischikawa i wsp. (8), a także innych autorów (5, 6, 19), właściwe rozpoznanie mastitis subclinica jest możliwe po uwzględnieniu wyników badania bakteriologicznego, liczby komórek somatycznych, przewodności elektrycznej oraz aktywności N-acetylo-beta-D-glukozaminidazy (NAGazy).

NAGaza jest enzymem lizosomalnym, który cechuje się dużą stabilnością w zdrowym gruczole mlekowym. Wzrost aktywności ma związek z uszkodzeniem nabłonka wydzielniczego i dróg wyprowadzających oraz naciekiem komórkowym towarzyszącym zapaleniu (4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 17, 19, 20, 23).

Celem pracy była ocena aktywności NAGazy w próbkach pobranych z ćwiartek zdrowych i objętych zapaleniem oraz w mleku zbiorczym pochodzącym z gospodarstw indywidualnych.

Materiał i metody

Aktywność NAGazy określono w 40 próbkach mleka ćwiartkowego pobranych od 40 krów, które na podstawie badania klinicznego i TOK uznano za zdrowe, w 130 próbkach wydzieliny z ćwiartek cechujących się podwyższonym poziomem komórek somatycznych (TOK +, ++, +++) oraz w 58 próbkach wydzieliny zapalnej zmienionej makroskopowo. Badania laboratoryjne próbek objęły posiewy na podłoża bakteriologiczne i ocenę bezwzględnej liczby komórek somatycznych (Fossomatic). Przeprowadzono także pomiary aktywności N-acetylo-beta-D-glukozaminidazy w 181 próbkach mleka bańkowego (zbiorczego) z gospodarstw indywidualnych, pobranego w chwili odbioru w zlewniach. Oznaczeń dokonano wg Applied Diagnostics Corporation (ADC) przy użyciu fluorometru, programu komputerowego oraz odczynników dostarczonych przez Pharmacia LKB Oddział w Warszawie. Zestaw odczynników zawiera: standard dodatni mleka, standard ujemny mleka, substrat (4-metyl-umbeliferyl-N-acetyl-beta-D-glukozaminid), bufor do rozpuszczania substratu i bufor hamujący.

Wykonanie oznaczeń polegało na wprowadzeniu do kolejnych wgłębień mikropłytki następujących płynów: próbka zerowa (woda dest.), standard pozytywny, standard negatywny i badane próbki mleka (po 10 μ l). Następnie dodawano po 50 μ l substratu, delikatnie mieszano i pozostawiano na 15 minut w temp. pokojowej (inkubacja), po czym przerywano reakcję enzymatyczną za pomocą buforu (100 μ l). Odczytu dokonywano przez pomiar fluorescencji. Wyniki po analizie wg programu komputerowego podawane są w jednostkach fluorescencji (AFU) oraz w postaci wskaźnika NAGazy (cut off).

Wyniki i omówienie

Aktywność N-acetylo-beta-D-glukozaminidazy w próbkach pobranych z ćwiartek zdrowych i chorych przedstawiono w tab. 1. Wartości były najniższe w mleku krów zdrowych, które nie chorowały na zapalenie wymienia w okresie co najmniej 3 miesięcy. Prawie dwukrotnie wyższą aktywność stwierdzono w próbkach pobranych około 21 dnia po wyleczeniu klinicznej postaci mastitis, chociaż liczba komórek somatycznych była w tych ćwiartkach charakterystyczna dla

Tab. 1. Aktywność N-acetylo- β -D-glukozaminidazy w zależności od stanu zdrowia ćwiartek wymienia

Rozpoznanie	Liczba komórek somatycznych w tys/ml		n	Aktywność NAGazy (AFU)		Wsp. korelacji
	zakres	\bar{x}		\bar{x}	s	
Ćwiartki zdrowe nie leczone	do 150	77	14	125	47	0,73**
Ćwiartki zdrowe po wyleczeniu <i>mastitis</i>	do 300	172	18	219	81	0,48*
Zakażenie utajone	do 350	248	8	261	88	0,35
Podkliniczna postać <i>mastitis</i>	do 1500	965	41	389	161	0,20
	1500–3000	2272	39	558	215	0,20
	3000–5000	3687	25	750	240	0,01
	ponad 5000	9604	25	1183	589	0,48**
Kliniczna postać <i>mastitis</i>	do 10 000	5276	25	1323	1159	0,36*
	10 000–20 000	14168	18	2102	895	0,01
	ponad 20 000	42489	15	3289	1132	0,48

Objaśnienia: ** – $p < 0,001$; * – $p < 0,05$

zdrowego gruczołu mlekowego. Jeszcze wyższy poziom NAGazy odnotowano przy prawidłowej liczbie komórek somatycznych w przypadku utajonego zakażenia spowodowanego przez *Staph. aureus* i *Str. agalactiae*. Wartości AFU wzrastały wraz ze zmianami charakterystycznymi dla zapalenia podklinicznego i klinicznej postaci *mastitis*, co wyrażała liczba komórek somatycznych. Na uwagę zasługuje przy tym fakt, że aktywność enzymu była podobna w przypadkach zapaleń podklinicznych cechujących się l.k.s. ponad 5 mln i zapaleń klinicznych z liczbą komórek poniżej 10 mln. Chociaż średnia liczba komórek w *mastitis subclinica* była prawie 2 razy wyższa niż w zapaleniach z objawami klinicznymi, to wartości enzymu były nawet nieco niższe. Średnia aktywność NAGazy wyniosła 680 AFU w przypadkach zapalenia podklinicznego oraz 1350 AFU w przypadkach klinicznej postaci *mastitis*.

Między liczbą komórek w zakresie do 150 tys./ml i aktywnością NAGazy w próbkach mleka ze zdrowych ćwiartek zachodziła istotna korelacja (0,001), a jej współczynnik $r = 0,73$. Jeszcze wyższy współczynnik korelacji (0,95) wystąpił między średnią liczbą komórek somatycznych, a odpowiadającą temu średnią aktywnością NAGazy zarówno w mleku, jak też w wydzielinie zapalnej. Zależności tej nie stwierdzono jednak porównując aktywności enzymu z liczbą komórek somatycznych mieszczącą się w poszczególnych zakresach.

Aktywność NAGazy w zależności od liczby komórek somatycznych w mleku zbiorczym przedstawiono w tab. 2. Dane wskazują, że w mleku cechującym się liczbą komórek niższą od 200 000/ml aktywność wynosiła średnio 116,5 AFU. Wraz ze wzrostem l.k.s. rosły wartości NAGazy, a średnie wartości dla mleka, które w 1 ml zawierało od 201 do 500 tysięcy tych komórek, mieściły się w granicach od 122,6 do 143,1 AFU. Wyraźny wzrost aktywności miał miejsce w przypadkach wysokiego tj. ponad 500 000/ml poziomu komórek somatycznych. Przy dużej ich liczbie rosło też odchylenie standardowe.

Wskaźnik cut off dla mleka zawierającego 200 tys. komórek nie przekraczał 20, a dla mleka które zawierało do 400 tys. wynosił maksymalnie 24.

Przeprowadzone badania wykazały, że wartości NAGazy są zróżnicowane w zależności od stanu gruczołu mlekowego krów. W ćwiartkach zdrowych aktywność była najniższa i wynosiła 125 AFU (jednostek fluorescencyjnych). Wyraźne różnice miały miejsce nie tylko między ćwiartkami zdrowymi i chorymi, ale także w ocenie mleka pobranego z ćwiartek, w których poziom komórek był typowy dla zdrowego wy-

mienia (TOK-). Badania aktywności tego enzymu pozwoliły na uchwycenie utrzymujących się zaburzeń funkcji nabłonka wydzielniczego po wyleczeniu *mastitis* oraz zmian związanych z utajonym zakażeniem, kiedy ocena poziomu komórek nie daje podstaw do rozpoznania podklinicznego stanu zapalnego. Znaczenie poznawcze ma też fakt, że w klinicznej postaci *mastitis*, nawet przy niższej liczbie komórek somatycznych, występują większe uszkodzenia tkanki gruczołowej niż w przypadkach zapalenia podklinicznego. Z przeprowadzonych badań wynika, że pomiar NAGazy lepiej niż liczba komórek somatycznych oddaje stan zdrowotny gruczołu mlekowego krów. Powyższe stwierdzenie koresponduje z danymi piśmiennictwa (2, 5, 6, 8, 14, 16).

Tab. 2. Aktywność NAGazy (AFU) oraz wskaźnik (cut off) w zależności od liczby komórek somatycznych w mleku zbiorczym ($\bar{x} \pm s$)

Liczba komórek somatycznych (tys/ml)	n	NAGaza (AFU)	NAGaza (cut off)
do 200	50	116,5 29,7	15,2 4,4
201–300	33	122,6 26,1	17,5 4,3
301–400	27	139,2 27,6	19,9 4,1
401–500	18	143,1 31,0	21,1 4,1
501–750	22	194,4 59,6	29,8 7,9
751–1000	12	245,9 44,5	41,3 8,3
1001–2000	13	283,6 54,9	46,1 9,3
pow. 2000	6	340,0 37,9	62,0 16,5

Wahania zawartości N-acetylo-beta-D-glukozaminidazy, szczególnie w przypadkach niskiej liczby komórek somatycznych w badanym mleku zbiorczym można tłumaczyć tym, że komórki są odpowiedzialne za 15-22% zawartości stwierdzanej w zdrowym wymieniu (4). Poza stanem zapalnym aktywność NAGazy wzrasta po wycieleniu, przed zasuszeniem, wskutek urazów oraz w przypadkach utajonego zakażenia spowodowanego przez bakterie pierwszej i drugiej grupy patogenności (5, 6, 18). Oceniane próbki pochodziły z gospodarstw indywidualnych, które w większości odstawią po około 20 litrów, czyli mleko od 1-3 krów (11). Wśród tych zwierząt mogły trafić się wymienione wyżej przypadki. Należy też brać pod uwagę możliwość rozpadu komórek somatycznych na fragmenty, które sztucznie zwiększały ich liczbę przy niskich wartościach NAGazy.

Badania własne wykazały, że zakresom liczby komórek somatycznych w mleku zbiorczym odpowiada określona wartość wskaźnika cut off NAGazy. Dlatego wskaźnik ten może być wykorzystany jako kryterium oceny surowca mlecznego. Według Applied Diagnostic Corporation do oznaczeń nadaje się mleko świeże, schłodzone, zamrożone lub konserwowane.

Można zatem stwierdzić, że pomiar N-acetylo-beta-D-glukozaminidazy stanowi precyzyjną metodę oceny stanu zdrowia wymienia i może być uznanym wskaźnikiem jakości mleka surowego.

Piśmiennictwo

1. Azzara C. D., Dimick P. S.: J. Dairy Sci. 68, 3171, 1985.
2. Ball H. J., Davidson B., Greer D.: Vet. Rec. 124, 145, 1989.
3. Bogin E., Ziv G.: Cornell Vet. 63, 666, 1973.
4. Capuco A. V., Paape M. J., Nickerson S. C.: Am. J. vet. Res. 47, 663, 1986.
5. Emanuelson U., Olsson, Holmberg O., Hageltorn M., Mattila T., Nelson L., Aström G.: J. Dairy Sci. 70, 880, 1987.
6. Fox L. K., Shook G. E., Schultz L. H.: J. Dairy Sci. 68, 2100, 1985.
7. Hillerton J. E., Walton A. W.: Vet. Rec. 128, 513, 1991.
8. Ichikawa M., Ichikawa T., Notsuki J., Nakano T.: Anim. Sci. Techn. 64, 462, 1993.

9. Kitchen B. J.: J. Dairy Res. 43, 251, 1976.
10. Kitchen B. J.: Kiel. Milchwirt. Forsch. 37, 329, 1985.
11. Klossowska A., Malinowski E., Biegala T.: Życie wet. 68, 183, 1993.
12. Kunkel J. R., Bushnell R. B., Cullor J., Aleong J.: Cornell Vet. 77, 225, 1987.
13. Lappalainen R., Kaartinen L., Veijalainen K., Kuosa P. L., Sankari S., Pyörälä S., Sandholm M.: J. Vet. Med. B 35, 664, 1988.
14. Lesiak M., Klossowska A., Janiak K., Drożdżyńska M.: Medycyna Wet. 43, 601, 1987.
15. Majewski T., Tietze M.: Medycyna Wet. 46, 256, 1990.
16. Mattila T., Sandholm M.: Am. J. vet. Res. 46, 2453, 1985.
17. Mellors A.: Can. J. Biochem. 46, 451, 1968.
18. Miller R. H., Paape M. J.: J. Dairy Sci. 71, 2508, 1988.
19. Nelson L., Olsson T., Emanuelson U., Holmberg O., Sandholm M., Aström: Kiel. Milchwirt. Forsch. 37, 444, 1985.
20. Obara Y.: Jap. Agr. Res. Quart. 18, 298, 1985.
21. Perdigon G., Medici M., Cecilia M., Nader de Macias M. E., Haedo R., Oliver G., Holgado A. A.: J. Dairy Sci. 69, 27, 1986.
22. Poutrel B., Caffin J. P., Rainard P.: J. Dairy Sci. 66, 535, 1983.
23. Ulberth F., Foissy H., Neumeister E.: Wien. tierärztl. Mschr. 71, 273, 1984.

Adres autora: doc. dr hab. Edward Malinowski, ul. Sułkowskiego 50/34, 85-634 Bydgoszcz

MARIOLA FRIEDRICH

Wpływ arginino-wazopresyny i deksametazonu na stężenie ACTH i kortyzolu w surowicy krwi cieląt w okresie neonatalnym

Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR, ul. Dr Judyma 6, 71-460 Szczecin

Summary

Influence of arginino-vasopressin and dexamethasone on the level of ACTH and cortisol in the serum of calves during early postnatal life

The experiment was carried out on 34 calves from birth (day 0) to 18 days of age. ACTH secretion stimulation was performed on 18 calves using arginino-vasopressine AVP Sigma, given intramuscular at a dose of 0.1 IU/kg of body weight. ACTH secretion inhibition was conducted on 16 calves by means of dexamethasone Dexaven Polfa, administered intravenously at a dose of 50 µg/kg of body weight. The hormones were administered on 0, 3, 7, 12 and 18 days after birth. Blood samples were collected between 8.00 to 8.30 a.m. The levels of ACTH and cortisol were determined in sera of the animals.

The hypophysis-adrenal cortex system in calves was found to be capable of a full feedback reaction from the second week of life.

Jednym z ważniejszych układów, odpowiedzialnych za zespół reakcji adaptacyjnych do gwałtownie zmienionych przy urodzeniu warunków, jest układ podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowy. Z danych dotyczących przysadki okresu pre-

natalnego wiadomo, że przysadka gruczołowa u wielu gatunków zwierząt wytwarza hormony już w życiu płodowym (5, 12, 21). Dotychczasowe badania wykazały w tym okresie życia kortykotropową, tyreotropową, somatotropową i gonadotropową potencję przysadki. Pod koniec ciąży we krwi płodowej stwierdza się wysokie stężenia ACTH, TSH, FSH i LH (1, 16, 20) a przyczyną tej nadmiernej sekrecji mają być niedojrzałe mechanizmy sprzężenia zwrotnego dla tych hormonów (11, 12, 19, 20). Trudno jest natomiast określić czas biosyntezy i sekrecji hormonów wytwarzanych przez nadnercza płodu, z uwagi na przechodzenie hormonów kory nadnerczy matki przez łożysko (12, 20). U płodów bydłych biosyntezę kortyzolu stwierdza się już od 8 miesiąca życia płodowego. Towarzyszy temu systematyczny wzrost stężenia tego hormonu w osoczu krwi aż do stężeń maksymalnych obserwowanych przed samym porodem (16). Zjawisko to wydaje się być oczywiste, ponieważ wyniki licznych badań dowodzą, że kortyzol jest jednym z ważniejszych stymulatorów dojrzewania płodu.

Problem w jakim czasie okresu pre- lub postnatalnego układ przysadka – kora nadnerczy zaczyna funkcjonować na zasadzie sprzężeń zwrotnych, jest ciągle otwarty, a badania prenatalne nie dają jednoznacznych odpowiedzi i często są nawet sprzeczne. Canny i wsp. (5) twierdzą, że stężenie glikokortykoidów już u 135-140 dniowych płodów owczych jest regulowane na zasadzie sprzężeń zwrotnych przez układ podwzgórze-przy-