

Katedra Nauk Klinicznych Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

PRZEMYSŁAW SOBIECH, ANDRZEJ POMIANOWSKI,
ANNA SNARSKA

Aktywność izoenzymów LDH u koźląt w pierwszym okresie życia

Activity of LDH isoenzymes in goat kids during the first life period

STRESZCZENIE

Badania przeprowadzono na koźlątach w okresie pierwszych trzech tygodni ich życia. Krew do badań pobierano z żyły jarzmowej trzykrotnie, w odstępach tygodniowych, zaczynając od drugiego dnia życia. We krwi oznaczano parametry równowagi kwasowo-zasadowej, zawartość elektrolitów oraz aktywność enzymów AST, AP, LDH oraz izoenzymów LDH. Analiza parametrów równowagi kwasowo-zasadowej i gospodarki elektrolitowej wykazała, że koźlęta rodzą się w stanie kwasicy oddechowej z jednocześnie podwyższonym poziomem potasu. Aktywność AST, AP i LDH pozostawała w granicach norm fizjologicznych podczas całego doświadczenia. Przy rozdziale LDH w surowicy na frakcje izoenzymatyczne otrzymano we wszystkich badaniach pięć izoenzymów, z których w trzecim badaniu statystycznie wzrosła frakcja LDH₅ (izoenzym charakterystyczny dla mięśni szkieletowych).

Słowa kluczowe: izoenzymy LDH, koźlęta, surowica

WSTĘP

Rosnąca popularność hodowli kóz i coraz większa jej opłacalność wpływają na zainteresowania badawcze tym gatunkiem zwierząt. Wśród zajmujących się tą tematyką odczuwa się niedobór publikacji dotyczących wskaźników biochemicznych oznaczanych u koźląt w okresie neonatalnym, praktycznie natomiast brakuje literatury opisującej dynamikę zmian aktywności dehydrogenazy mleczanowej i jej izoenzymów. Pierwsze doniesienia na temat wykorzystania rozdziału izoenzymatycznego LDH w diagnozowaniu chorób zwierząt gospodarskich pojawiły się w latach 60. ub. wieku i dotyczyły zmian aktywności poszczególnych frakcji izoenzymatycznych u owiec z ostrą postacią pokarmowej dystrofii mięśni [Boyd 1964]. Oznaczanie zymogramu LDH u przeżuwaczy zastosowano też później w diagnozowaniu podklinicznych stanów chorobowych wątroby i mięśni szkieletowych [Keller 1974].

Celem niniejszej pracy była próba ustalenia wartości fizjologicznych wybranych wskaźników biochemicznych krwi koźląt, w tym profilu izoenzymatycznego LDH w surowicy, w okresie trzech pierwszych tygodni życia.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na 30 koźlętach obu płci, w wieku 2 dni, rasy polskiej białej uszlachetnionej, w okresie chowu alkierzowego, pochodzących z koziarni na terenie Warmii. Krew do badań pobierano z żyły jarzmowej, trzykrotnie w odstępach tygodniowych. Wszystkie koźlęta w okresie prowadzenia badań były klinicznie zdrowe, a badaniem koproskopowym wykluczono u nich obecność pasożytów wewnętrznych.

W zakresie podjętych badań w pełnej krwi oznaczano stan równowagi kwasowo-zasadowej na podstawie takich parametrów, jak: pH, ciśnienie cząstkowe dwutlenku węgla ($p\text{CO}_2$), ciśnienie cząstkowe tlenu ($p\text{O}_2$), stężenie jonów wodorowęglanowych (HCO_3^-), nadmiar lub niedobór zasad (BE), stopień wysycenia hemoglobiny tlenem (O_2SAT) i całkowita zawartość dwutlenku węgla (ctCO_2). Wskaźniki te oznaczano przy użyciu analizatora Corning 248.

Określenie stanu gospodarki elektrolitowej obejmowało oznaczanie w surowicy stężenia sodu (Na^+), potasu (K^+) i chlorków (Cl^-) metodą jonoselektywną przy użyciu aparatu Easy Lyte Plus. W zakresie wskaźników enzymatycznych oznaczono w surowicy metodą kinetyczną aktywność AST (aminotransferazy asparaginianowej), AP (fosfatazy alkalicznej) oraz LDH (dehydrogenazy mleczanowej). Dodatkowo dokonano rozdziału LDH na frakcje izoenzymatyczne przy użyciu elektroforezy wysokonapięciowej na żelu agarowym w systemie Paragon firmy Beckman.

Wyniki badań laboratoryjnych przedstawiono w jednostkach układu SI i poddano ocenie statystycznej testem Newmana-Keulusa przy użyciu programu Statistica 6.0.

WYNIKI I DYSKUSJA

Analiza parametrów równowagi kwasowo-zasadowej wykazała (tab. 1), że średnia wartość pH krwi miała tendencję wzrastania (od 7,28 do 7,32), przy czym w pierwszym badaniu pH było najmniejsze i różnica ta była statystycznie istotna. Ciśnienie parcjalne dwutlenku węgla ($p\text{CO}_2$) w przebiegu całego doświadczenia miało wyrównany poziom, natomiast całkowita zawartość dwutlenku węgla (ctCO_2) była najniższa w pierwszym badaniu, ale ten wynik nie był statystycznie istotny. Podobnie jak ctCO_2 , zachowywało się stężenie jonów wodorowęglanowych (HCO_3^- act), natomiast ciśnienie parcjalne tlenu ($p\text{O}_2$) było najwyższe w trzecim badaniu (wynosiło 4,81 kPa) i różnica ta była statystycznie istotna. Podobną tendencję zauważono przy analizie stopnia wysycenia hemoglobiny tlenem (O_2SAT). Wskaźnik BE w pierwszym badaniu wykazywał wartości ujemne, natomiast w kolejnych nieznacznie wzrastał. Stan równowagi określony w pierwszym badaniu, tj. w drugim dniu życia jagniąt, klinicznie określa się jako kwasicę oddechową niewyrównaną, która mogła nastąpić wskutek zaburzeń wentylacji związanych z okresem życia płodowego i porodu i nieustaloną jeszcze homeostazą ustroju. Wraz z wiekiem zwierząt następowała kompensacja pierwotnie występującej kwasicy i parametry równowagi kwasowo-zasadowej przyjmowały wartości mieszczące się w zakresie norm fizjologicznych dla gatunku [McDougall i in. 1991, Qi i in. 1994].

Tabela 1. Średnie wartości parametrów równowagi kwasowo-zasadowej i poziomu elektrolitów w krwi kozłąt

Table 1. Mean values of gasometry, acid-base balance parameters and levels of electrolytes in goat kids blood

Pobranie Examination	pH	pCO ₂ kPa	ctCO ₂ mmol/l	HCO ₃ ⁻ act mmol/l	pO ₂ kPa	O ₂ SAT %	BE mmol/l	Na ⁺ mmol/l	K ⁺ mmol/l	Cl ⁻ mmol/l
I	7,28 ^A 0,01	7,15 0,06	27,09 1,58	25,58 1,01	3,65 0,42	38,03 2,67	-0,9 0,43	141,7 0,67	4,92 ^a 0,21	107,26 0,34
II	7,31 0,01	7,36 0,31	28,20 2,18	26,55 1,35	3,78 0,31	40,34 3,11	0,1 0,21	138,8 0,45	4,35 0,05	105,73 0,54
III	7,32 0,01	7,12 0,15	28,22 2,54	26,61 1,45	4,81 ^A 0,55	46,31 ^A 3,89	0,37 0,34	139,6 1,11	4,41 0,12	105,39 0,23

a – różnica statystycznie istotna dla $p \leq 0,05$ – differences statistically significant at $p \leq 0.05$ A – różnica statystycznie istotna dla $p \leq 0,01$ – differences statistically significant at $p \leq 0.01$

Tabela 2. Średnia aktywność enzymów w surowicy kozłąt

Table 2. Mean enzymes activity in goat kids serum

Pobranie Examination	AST (U/l)	AP (U/l)	LDH (U/l)	LDH ₁ (%)	LDH ₂ (%)	LDH ₃ (%)	LDH ₄ (%)	LDH ₅ (%)
I	63,9	1135,2	414,4	20,8	7,4	27,9	16,6	27,3
SD	3,56	86,15	17,54	0,78	0,45	1,15	0,35	0,76
II	73,3	921,1	486,6	16,9	8,7	25,2	18,3	30,9
SD	4,78	63,11	49,33	0,56	0,54	1,43	0,41	1,16
III	77,6	946,1	581,1	18,4	8,9	22,4	18,1	32,2 ^A
SD	4,98	67,34	45,89	0,67	0,43	0,98	0,46	1,09

a – różnica statystycznie istotna dla $p \leq 0,05$ – differences statistically significant at $p \leq 0.05$ A – różnica statystycznie istotna dla $p \leq 0,01$ – differences statistically significant at $p \leq 0.01$

Z równowagą kwasowo-zasadową krwi wiąże się gospodarka wodno-elektrolitowa. Jony sodowe, potasowe i chlorkowe określane są jako „jony stałe”, ponieważ ich stężenie jest stabilne, w odróżnieniu od anionu HCO₃⁻, określanego mianem „jonu niestałego” [Holtenius 1990]. W opisywanych badaniach stężenia jonów sodowych i chlorkowych u kozłąt nie wykazywały różnic statystycznie istotnych, natomiast stężenie jonów potasowych było istotnie wyższe w pierwszym badaniu i wynosiło 4,92 mmol/l (tab. 1). Można to tłumaczyć wzajemną korelacją stężenia jonów K⁺ i pH [Warner i Mitchell 1990]. Wzrost pH osocza powoduje zmniejszenie stężenia jonów potasowych, natomiast jego spadek prowadzi do zwiększenia ich koncentracji. Mechanizm tych współzależności polega na wymianie jonów wodorowych i potasowych między przestrzeniami pozakomórkową i komórkową. Wymiana ta może być wywołana przez pierwotne zwiększenie stężenia jonów wodorowych (spadek pH) w płynie pozakomórkowym, co powoduje ich przesunięcie do komórek. Zgodnie z zasadą elektroobojętności płynów ustrojowych, w przeciwnym kierunku (z komórki do płynu pozakomórkowego) przechodzą jony potasowe, wskutek czego następuje wzrost ich stężenia w osoczu. Zjawisko to zaobserwowano u kozłąt przy pierwszym badaniu, gdzie stwierdzono stan kwasicy oddechowej.

Aktywność aminotransferazy asparaginianowej (AST) u koźląt w okresie badań utrzymywała się na podobnym poziomie i mieściła się w granicach wartości referencyjnych podawanych przez innych autorów [Białkowski i in. 1988, Smith i Sherman 1994] (tab. 2). Obserwowane zmiany aktywności AST wskazują na brak zmian patologicznych w tkance wątrobowej i mięśniowej koźląt.

Aktywność fosfatazy alkalicznej (AP) uwarunkowana jest w dużej mierze odpowiednim zaopatrzeniem w pierwiastki mineralne, znacznie wzrasta przy zaburzeniach mineralizacji kości, gdy pojawiają się w surowicy duże ilości AP pochodzenia kostnego, tzw. izoenzym kostny tego enzymu [Yin i in. 1993]. W omawianych badaniach aktywność AP mieściła się w granicach norm fizjologicznych w okresie całego doświadczenia (tab. 2), co świadczy o prawidłowym przebiegu procesu kostnienia u badanych koźląt.

Aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w czasie doświadczenia utrzymywała się na podobnym poziomie (tab. 2). Z danych piśmiennictwa wynika, że wzrost aktywności LDH w surowicy może wystąpić w chorobach nerek, wątroby, mięśni szkieletowych i dysfunkcjach trawiennych [Smith i Sherman 1994]. Obserwowana u koźląt aktywność LDH mieściła się w granicach wartości referencyjnych dla gatunku i nie wskazuje na występowanie jakichkolwiek zmian patologicznych.

W rozdziale elektroforetycznym LDH na frakcje izoenzymatyczne u wszystkich koźląt wykazano obecność 5 izoenzymów (tab. 2). W medycynie ludzkiej i weterynaryjnej rozdział izoenzymatyczny LDH jest wykorzystywany w rozpoznawaniu schorzeń serca, wątroby lub mięśni szkieletowych [Keller 1974, Bhayana i Henderson 1995, Sobiech i Kuleta 2002]. U przeżuwaczy stwierdzono, że w przypadku uszkodzenia wątroby w surowicy wzrasta aktywność frakcji LDH₁, w schorzeniach mięśni aktywność frakcji LDH₅ [Yasuda i in. 1989, Sobiech i Kuleta 1999].

U badanych koźląt we wszystkich pobraniach największą aktywność w surowicy wykazywały frakcje wolno wędrujące LDH₃ i LDH₅, przy czym wzrost aktywności LDH₅ pod koniec trwania doświadczenia był statystycznie istotny. Dane piśmiennictwa wskazują na istnienie dużych rozbieżności profilów izoenzymatycznych LDH surowicy zdrowych koźląt i kóz. Blackwell i Libby [1982] podają, że największą aktywność wykazuje izoenzym LDH₁, natomiast Georgieva i Todorow [1987] wskazują na LDH₅ i LDH₃, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w badaniach własnych. Porównując profil izoenzymatyczny LDH surowicy kóz dorosłych [Sobiech i Kuleta 2000] i koźląt, można stwierdzić, że u tych ostatnich następuje wzrost aktywności izoenzymu LDH₅ (charakterystycznego dla mięśni szkieletowych) i spadek aktywności frakcji LDH₁ (specyficznej dla wątroby). Uzyskany w trakcie doświadczenia statystycznie istotny wzrost aktywności LDH₅ (do 32,2%) w ostatnim pobraniu można tłumaczyć zmianami zachodzącymi podczas wzrostu koźląt i intensywnym rozwojem ich tkanki mięśniowej.

WNIOSKI

1. Koźlęta rodzą się w stanie kwasicy oddechowej niewyrównanej, która wraz z rozwojem fizycznym ulega kompensacji.
2. Wraz z wiekiem koźląt następuje wzrost aktywności izoenzymu LDH₅ (frakcji mięśniowej) w surowicy.
3. Uzyskane wyniki mogą stanowić wartości odniesienia dla koźląt rasy polskiej białej uszlachetnionej.

PIŚMIENNICTWO

- Bhayana V., Henderson A. R. 1995: Biochemical markers of myocardial damage. *Clin. Biochem.* 28, 1–29.
- Białkowski Z., Saba L., Bis-Wencel H., Janecki T. 1988: Zmiany wskaźników hematologicznych, białka ogólnego, glukozy, cholesterolu oraz aktywności AP, AspAT i AlAT w surowicy krwi kozłąt w pierwszych miesiącach życia. *Medycyna Wet.* 44, 112–114.
- Blackwell J.G., Libby W. 1982: Metabolic and cellular profile of wether goats: Protein fractions and lactate dehydrogenase isoenzymes – reference values. *Am. J. Vet. Res.* 43, 1060–1067.
- Boyd J.W. 1964: Serum enzyme changes in lambs with experimentally-induced acute muscular dystrophy. *Res. Vet. Sci.* 5, 419–433.
- Georgieva D., Todorov B. 1987: Total LDH activity and isoenzyme spectrum in experimental *Cysticercus ovis* infestation of lambs and kids. *Vet. Med. Nauki* 24, 28–35.
- Holtenius K. 1990: Plasma electrolyte concentration in food-deprived goats orally supplemented with potassium chloride. *Brit. J. Nutr.* 64, 211–218.
- Keller P. 1974: Lactate dehydrogenase isoenzymes in normal bovine serum and during experimental liver and muscle damage. *Res. Vet. Sci.* 17, 49–58.
- McDougall S., Lephherd E.E., Smith S. 1991: Hematological values for grazing Saanen goats. *Austral. Vet. J.* 68, 370, 7–17.
- Qi K., Lu C. D., Owens F. N. 1994: Effects of sulfate supplementation on performance, acid-base balance, and nutrient metabolism in Alpine kids. *Small Rumin. Res.* 15, 9–18.
- Smith M. C., Sherman D. M. 1994: *Goat Medicine*. Lea and Febiger, Philadelphia, 65–68.
- Sobiech P., Kuleta Z. 2000: Activity of LDH isoenzymes in goats. *Proceedings of 10th Congress ESVIM*, Neuchatel, Switzerland, 97.
- Sobiech P., Kuleta Z. 1999: Levels of selected biochemical indicators of serum and blood during subclinical forms of nutritional muscular dystrophy in lambs. *Polish J. Vet. Sci.* 2, 37–41.
- Sobiech P., Kuleta Z. 2002: Usefulness of some biochemical indicators in detection of early stages of nutritional muscular dystrophy in lambs. *Small Rumin. Res.* 45, 209–215.
- Warner M. M., Mitchell G. S. 1990: Ventilatory responses to hyperkalemia and exercise in normoxic and hypoxic goats. *Respir. Physiol.* 82, 239–249.
- Yasuda J., Syuoto B., Too K., Ohfuji S. 1989: Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in bovine liver tissue. *Jap. J. Vet. Sci.* 51, 733–739.
- Yin G.R., Yang J.Y., Yao S.Z., Li J.H. 1993: Separation of dairy cow serum alkaline phosphatase isoenzymes and identification of its tissue of origin using polyacrylamide gel electrophoresis. *Acta. Vet. Zoot. Sinic.* 24, 125–129.

SUMMARY

The study was conducted to measure acid-base parameters, ionic composition and the activity of AST, AP, LDH and LDH isoenzymes in the blood of goat kids during the first 3 weeks of life. The blood was collected from jugular vein, once a week, starting from second day after the birth. The analysis of acid-base balance revealed that kids just after birth have respiratory acidosis and a higher level of potassium. The activity of AST and AP and LDH stayed within the physiological range during the entire experiment. Separation on serum LDH isoenzymes showed five fractions and the activity of LDH₅ (muscle fraction) increased in the third examination.

Key words: LDH isoenzymes, goat kids, serum