

HENRYK ZIELIŃSKI, MAŁGORZATA REJEWSKA, HENRYK KOSTYRA

ZAWARTOŚĆ KWASÓW NUKLEINOWYCH W MLEKU I KRWI KRÓW ZDROWYCH I Z ZAPALENIEM WYMIENIA

NUCLEIC ACIDS CONTAIN IN MILK AND BLOOD OF HEALTHY COWS
AND ILL COWS WITH *MASTITIS*

Z Zakładu Patofizjologii Wydziału Weterynaryjnego i z Zakładu Biochemii Żywności
Wydziału Technologii Żywności ART w Olsztynie
Kierownik: doc. dr hab. H. Kostyra

W mleku i krwi krów zdrowych i z zapaleniem wymienia oznaczono zawartość kwasów nukleinowych. Stwierdzono zależność pomiędzy liczbą komórek somatycznych w mleku i ilością kwasów nukleinowych oraz wzrost zawartości kwasów nukleinowych we krwi krów z zapaleniem wymienia.

WSTĘP

Kwasy nukleinowe są obok białek podstawowymi składnikami komórek. Występują one w jądrach komórkowych, mitochondriach, mikrosomach i w rozpuszczalnych frakcjach komórek.

Źródłem kwasów nukleinowych w mleku są przede wszystkim komórki somatyczne i bakteryjne. Obecność komórek somatycznych w mleku można tłumaczyć przechodzeniem do niego komórek nabłonka pęcherzyków, przewodów i zatok mlecznych oraz składników morfotycznych krwi i limfy. Zawartość kwasów nukleinowych w mleku jest dobrym wskaźnikiem stanu zdrowotnego krowy. Mleko charakteryzujące się niską zawartością komórek, poniżej 300 tys./cm³, uznawane jest za pochodzące od krów wolnych od *mastitis*.

Spożywanie przez człowieka mleka i jego przetworów bogatych w kwasy nukleinowe jest problemem żywieniowym, ściśle związanym z metabolizmem tych związków w organizmie ludzkim. Rozszczepienie RNA i DNA katalizują rybonukleazy – enzymy należące do grupy hydrolaz. Pod wpływem ich działania powstają produkty hydrolizy, którymi są między innymi nukleotydy cykliczne. Na skutek deaminacji mogą one się przekształcić w monofosforany nukleotydów ulegające dalszej hydrolizie do odpowiedniej rybozy i zasady purynowej lub pirymidynowej. Przykładem przemian metabolicznych może być adenina, która po deaminacji przekształca się w hipoksantynę, a ta po utlenieniu – w ksantynę. Ksantyna jest przedostatnim ogniwem w tym metabolizmie. Ostatnim natomiast jest kwas moczowy, który jest szkodliwy dla organizmu ludzkiego. Może on np. wiązać wapń powodując chorobę – dnę moczanową.

Celem tej pracy było określenie zależności pomiędzy zawartością kwasów nukleinowych w mleku i we krwi krów zdrowych i z zapaleniem wymienia.

MATERIAŁY I METODYKA

Materiały

Przeprowadzono pomiary zawartości kwasów nukleinowych w mleku i we krwi pochodzących od krów rasy *ncb*. Badaniami objęto 30 krów podzielonych na dwie równe grupy. Pierwszą grupę stanowiły krowy zdrowe, drugą natomiast krowy ze stanem zapalnym wymienia. Za podstawę klasyfikacji prób, ze względu na stan zdrowotny wymion badanych krów, przyjęto wykonywany w oborze test z płynem diagnostycznym *Mastirapid*. Metoda jest prosta w wykonaniu i polega na reakcji kwasu dezoksyrybonukleinowego jąder komórkowych z substancją powierzchniowo czynną – siarczanem alkylarylu wchodzącym w skład odczynnika testującego. Efektem reakcji jest tworzenie się żelu, którego konsystencja i stopień lepkości zależą od ilości nie uszkodzonych komórek w mleku [2, 3]. Spośród innych metod pozwalających dokładnie obliczyć liczbę komórek somatycznych w mleku, a tym samym zakwalifikować je do jednej z dwu badanych grup, zastosowana metoda z odczynnikiem *Mastirapid* wydaje się być najbardziej użyteczna [1, 4, 5, 10].

Oznaczanie zawartości kwasów nukleinowych w mleku [7, 9]

Próbki mleka z doju porannego o objętości około 250 cm³ pobierano do jałowych butelek i analizowano je najpóźniej po 24 godz. przetrzymując je w temperaturze 4°C. Następnie 50 cm³ mleka wirowano przez 20 minut przy 4 tys. obr./min. Po odwirowaniu i usunięciu warstwy śmietany i mleka odtłuszczonego, pozostały na dnie próbówki wirowniczej osad zawierający komórki somatyczne mleka przemywano dwukrotnie 70% alkoholem etylowym o temp. 75°C. Po ponownym odwirowaniu przy 4 tys. obr./min. przez 15 minut, płyn nad osadu usuwano. Następnie do osadu dodawano 15 ml 0,6 N HClO₄ i całość ogrzewano przez 20 minut w łaźni wodnej w temp. 90°C. Po oziębieniu do temperatury pokojowej próbówki zawierające zhydrolizowane kwasy nukleinowe i zdenaturowane białko wirowano przez 15 minut przy 4 tys. obr./min. Otrzymany supernatant przenoszono do kwarcowych kuwet o grubości warstwy 1 cm i przeprowadzano pomiary absorpcji przy długości fali 270, 290 i 260 nm wobec 0,6 N HClO₄ jako roztworu odniesienia. Na podstawie otrzymanych wyników absorbancji obliczono sumaryczną zawartość kwasów nukleinowych.

Oznaczanie kwasów nukleinowych we krwi [8]

Od badanych krów, bezpośrednio po pobraniu próbek mleka, pobierano z żyły jarzmowej próbki krwi do heparynizowanych próbek. Krew przechowywano w chłodzie i analizowano ją najpóźniej po 24 godz. od momentu pobrania.

0,1 ml krwi mieszano z 1,4 ml wody destylowanej. Do otrzymanego hemolizatu dodawano 13,5 ml 0,6 N HClO₄ i całość ogrzewano w łaźni wodnej w temp. 100°C przez 20 minut. Po ochłodzeniu zimną wodą próbówki wirowano przez 15 minut przy 4 tys. obr./min. Supernatant przenoszono do kwarcowych kuwet o grubości warstwy 1 cm i przeprowadzano pomiary absorpcji przy długości fali 270, 290 i 260 nm wobec 0,6 N HClO₄ jako roztworu odniesienia. Na podstawie otrzymanych wyników obliczano sumaryczną zawartość kwasów nukleinowych.

Pomiary absorpcji przeprowadzano przy użyciu spektrofotometru *Pay Unicam 8800*.

Obliczenia statystyczne

Wnioskowanie statystyczne przeprowadzono niezależnie przy pomocy testu na rozstęp i testu *t-Studenta* [6]. Współczynnik korelacji wyznaczono na podstawie wyników zamieszczonych w tabeli I w oparciu o wzór:

$$r = \frac{\sum XY \frac{\sum X Y}{N}}{\sqrt{(\sum(X)^2 - \frac{(\sum X)^2}{N}) (\sum(Y)^2 - \frac{(\sum Y)^2}{N})}}$$

Objaśnienia:

X – zawartość kwasów nukleinowych w g/100 cm³ w badanej próbce mleka,

Y – zawartość kwasów nukleinowych w g/100 cm³ w badanej próbce krwi,

N – liczba badanych prób,

WYNIKI

Uzyskane w doświadczeniu wyniki zestawiono w tabeli I. Na dokładność otrzymanych wyników duży wpływ ma oddzielenie białek, które absorbują promieniowanie nadfioletowe w badanym zakresie. Dlatego też dla każdej analizowanej próbki mleka i krwi sprawdzano wartość ilorazu:

$$I = \frac{A_{270} - A_{260}}{A_{270}}$$

Jeżeli $|I| < 0,15$, próby uznawano za odbiałczone właściwie.

Jeżeli $|I| > 0,15$, obiałczanie prób przeprowadzano ponownie i sprawdzano powyższą metodą jego skuteczność.

Tabela I. Zawartość kwasów nukleinowych w mleku i we krwi krów zdrowych i z zapaleniem wymienia

Nucleic acids contain in milk and blood of healthy cows and ill cows with *mastitis*

Zawartość kwasów nukleinowych		
	Mleko [µg/100ml]	Krew [g/100 ml]
1	2	3
Krowy zdrowe	143,1	0,091
	202,5	0,076
	260,2	0,096
	244,8	0,113
	266,7	0,124
	245,6	0,139
	226,1	0,111
	265,1	0,129
	312,3	0,114
	391,9	0,115
	283,0	0,116
284,6	0,125	

c.d. tab. I

1	2	3
	378,9	0,131
	243,9	0,113
	346,4	0,117
Średnia	273,0	0,114
Odchylenie standardowe	16,8	$4,2 \times 10^{-3}$
Krowy z zapaleniem wymion	371,3	0,168
	456,2	0,100
	270,9	0,138
	539,9	0,107
	960,4	0,137
	711,5	0,176
	401,7	0,116
	235,8	0,150
	548,1	0,130
	552,9	0,146
	282,9	0,168
	356,2	0,148
	684,6	0,143
	544,8	0,146
	585,5	0,123
Średnia	500,2	0,140
Odchylenie standardowe	50,0	$5,7 \times 10^{-3}$

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W grupie zdrowych krów zawartość kwasów nukleinowych w mleku wynosiła średnio $273 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, natomiast we krwi – średnio $0,114 \text{ g}/100 \text{ ml}$. W tej grupie krów współczynnik korelacji dotyczący ilości kwasów nukleinowych w mleku i we krwi wynosił $r = +0,57$. W grupie krów ze stanem zapalnym wymienia, ilości kwasów nukleinowych w mleku i we krwi wynosiły odpowiednio $500 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ i $0,140 \text{ g}/100 \text{ ml}$. Współczynnik korelacji miał wartość $r = -0,09$. Średnie różnice w zawartości kwasów nukleinowych w mleku i we krwi krów zdrowych i chorych odpowiadały wartościom $227 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ oraz $0,026 \text{ g}/100 \text{ ml}$ i przy $p < 0,01$ były statystycznie istotne.

WNIOSKI

1. Pomiedzy zawartością komórek somatycznych i ilością kwasów nukleinowych w mleku istnieje statystycznie istotna korelacja – jest to potwierdzenie znanego faktu.
2. Wzrost zawartości kwasów nukleinowych we krwi krów może być wskaźnikiem stanu zapalnego ich wymion.

H. Zieliński, M. Rajewska, H. Kostyra

NUCLEIC ACIDS CONTAIN IN MILK AND BLOOD OF HEALTHY COWS AND ILL COWS WITH *MASTITIS*

Summary

Investigations were carried out in 30 *ncb* breed cows divided into two groups. First group was consisted with cows in good health. In second group there were cows ill with *mastitis*. Number of somatic cells in milk was evaluated by *California Mastitis Test* and nucleic acids content in milk and blood by spectrophotometric method. Nucleic acids content in group of healthy cows amounted 273 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ in milk and 0,114 g/100 ml in blood. In this group correlation factor concerning nucleic acids content in milk and blood amounted $r = +0,57$. In group ill cows nucleic acids content in milk and blood amounted respectively 500 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ and 0,140 g/100 ml, and value of correlation factor $r = -0,09$ was noted. Differences in nucleic acids content in milk and blood between both groups healthy and ill cows correspond to values 227 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ and 0,026 g/100 ml and were statistically significant by $p < 0,01$.

Above resultants allow to formulate the following conclusions:

1. Statistically high correlation between quality of somatic cells and nucleic acids content in milk exists – it is confirmation well known fact.
2. The rise of nucleic acids content in blood of cows can be an index of udder inflammation in cows.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bremel R.*: Estimating somatic cells in milk samples by the membrane-filter-DNA procedure. *J. Food Protect.*, 1977, 40, 32. – 2. *Dijemen A.*: The variability of cell counts in milk from individual cows. *Noth. Milk Dairy J.*, 1985, 39, 247. – 3. *Grajewski H.*: Badania porównawcze nad wartością diagnostyczną kilku płynów stosowanych w pośredniej analizie cytologicznej mleka przy rozpoznawaniu *mastitis* u krów. *BTN*, Bydgoszcz, 1966, 5, 99. – 4. *Hutjens M., Schultz L., Ward G., Ymdagni S.*: Estimation of somatic cells in milk using membrane filter separation and DNA determination with diphenylamine. *J. Milk Food Technol.*, 1970, 33, 227. – 5. *Kowalczyk S.*: Zmodyfikowana próba *Whiteside'a* oraz jej zastosowanie w rozpoznawaniu przewlekłych stanów zapalnych u krów. *Med. Wet.*, 1962, 12, 910. – 6. *Ruszczyc Z.*: Metodyka doświadczeń zootechnicznych., PWRiL, Warszawa, 1981, 21. – 7. *Spirin A.*: Spektrofotometryczne opredelenije summarnowo koliczestwa nukleinowych kislot. *Biochemija*, 1958, 5, 656. – 8. *Simiakow P.*: Koliczestwiennoje opredelenije nukleinowych kislot w krowi czelowieka i zywotnych. *Voprosy Pitaniya.*, 1960, 6, 69. – 9. *Sjerjebrijannikow W., Aristow W.*: Sodjerzhanije nukleinowych kislot w malokie i kisłomasłocznych produktach. *Voprosy Pitaniya.*, 1980, 4, 76. – 10. *Ward G., Schultz L.*: Estimation of somatic cells in milk by filter-deoxyribonucleic acid. *J. dairy Sci.*, 1973, 56, 1097.

Dn. 1989.10.16

10-736 Olsztyn Kortowo 120/311