

ZYGMUNT EWY, KAZIMIERZ WÓJCIK

BADANIA NAD TYPAMI HEMOGLOBIN U ZWIERZĄT

Z Katedry Fizjologii Zwierząt W. S. R. w Krakowie

Kierownik: prof. dr Z. Ewy

W ostatnich latach były przeprowadzone liczne badania hematologiczne u ludzi i wykazano, że przy zastosowaniu odpowiednich metod fizykochemicznych i biochemicznych można wyodrębnić kilka typów hemoglobina. Typy powyższe różnią się składem aminokwasowym i odpornością na denaturację alkaliczną [15], wysalaniem buforem fofosoranowym [7], absorpcją przy długości fali 5500 Å—6500 Å, właściwościami immunologicznymi i genetycznymi [16], ruchliwością w chromatografii na wymienniaczu jonowym [15] i chromatografii bibułowej [21], ruchliwością w elektroforezie wolnej względnie bibułowej [6], lub żelowej [4].

Harris i Warren (1955 r.) [14], badając ruchliwość hemoglobiny kozy i owcy przy użyciu metody elektroforezy bibułowej wykazali, że istnieje hemoglobina płodowa i dwa typy hemoglobiny u zwierząt dorosłych. Dało to początek do przeprowadzenia podobnych badań w krwi u różnych gatunków zwierząt ssących, ptaków, ryb i płazów [6, 14, 19, 5, 8].

Wykazano, że poszczególne typy hemoglobin występują w określonym stosunku u różnych gatunków zwierząt, a nawet i ras oraz dziedziczą się w myśl praw genetycznych [9]. W przeprowadzonej przez nas pracy staraliśmy się orientacyjnie podać występowanie typów hemoglobiny u niektórych gatunków zwierząt domowych w Polsce.

METODYKA

Hemoglobinę otrzymywano według H. J. van der Helma i wsp. Odwirowane krwinki z krwi heparynowej przemywano trzykrotnie roztworem fizjologicznym i trzykrotnie roztworem NaCl o stężeniu 1,25%. Krwinki hemolizowano dodając równą objętość wody destylowanej i 0,5 objętości toluenu. Po dokładnym kilkukrotnym wytrząśnięciu mieszaninę pozostawiano przez okres 24 godzin w temperaturze od 0° do 4°C. Hemoglobinę odwirowywano z szybkością 3000 obr./min. i częściowo oczyszczony roztwór wirowano przy 18000 obr./min. Dalsze oczyszczanie hemoglobiny przeprowadzano przesączając próbki na żelu krzemowym stosując Celit 535. Dializę

przeprowadzano w woreczkach kolodionowych w czasie 48 godzin wobec wody destylowanej. Stężenie hemoglobinu oznaczano metodą według *Betke* i wsp. [3], przeprowadzając oksyhemoglobinę w cyjanhemoglobinę. Do badań używano 4% roztworów hemoglobinu. W celu dłuższego przechowywania hemoglobinu w stanie zamrożonym, próbki wysycano CO, uzyskując monokarboksyhemoglobinę. CO otrzymywano w wyniku reakcji działania kwasu mrówkowego na stężony kwas siarkowy w temperaturze 60°C.

Elektroforeza bibułowa.

Badania ruchliwości elektroforetycznej hemoglobinu różnych gatunków zwierząt, przeprowadzano w buforze o następującym składzie: 1,84 g kwasu dwuetylobarbiturowego, 10,30 g dwuetylobarbituranu sodu, 1000 ml wody destylowanej, pH 8,6, siła jonowa 0,05.

Stosowano różnicę potencjału 7 volt/cm przez okres 18 godzin. Dla oznaczenia ruchliwości posługiwano się paskami bibuły Whatman Nr 3 MM o wymiarach 25×230 mm, natomiast do oznaczeń procentowej zawartości przy równocześnie występujących dwu typach hemoglobiny, paskami bibuły Whatman Nr 1. Próbkę w ilości 0,05 ml nakładano jako kroplę do oznaczenia ruchliwości, zaś do oznaczeń procentowej zawartości próbkę nakładano w postaci poprzecznie ułożonego pasma.

Barwienie pasków.

Paski po elektroforezie barwiono według *Jencks'a* i wsp. w barwniku o następującym składzie: 0,01% błękitu bromofenolowego, 5,0% kwasu octowego, 5,0% siarczanu cynku ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) w 1000 ml wody destylowanej.

Uzyskane paski podczas elektroforezy barwiono przez zanurzenie ich na okres 16 godzin w roztworze barwnika. Nadmiar barwnika z miejsc wolnych od hemoglobiny wymywano 2% roztworem kwasu octowego, trzykrotnie przez 5 minut.

Interpretacja elektroforegramów.

Ruchliwości hemoglobinu oznaczano wizualnie, mierząc drogę jaką próbka przebyła w porównaniu (każdorazowo) ze znanymi standartami. Oznaczeń procentowej zawartości dwu równocześnie występujących komponentów hemoglobiny w badanej próbce, dokonywano wprost z pasków, przez fotometrowanie ich według *Górskiego* i *Wójcika*. Uzyskane wykresy ekstynkcji planimetrowano i wyliczono procentową zawartość poszczególnych komponentów (Ryc. 1).

Elektroforeza na żelu skrobiowym.

Rozdział elektroforetyczny prowadzono według metody podanej przez *Brugscha* i wsp., na płytkach szklanych pokrytych żelem skrobiowym (10 g skrobi rozpuszczonej w 80 ml buforu), stosując bufor weronalowy o pH 8,6 siły jonowej 0,05 i różnicę potencjału 20 volt/cm podczas 6 godzin.

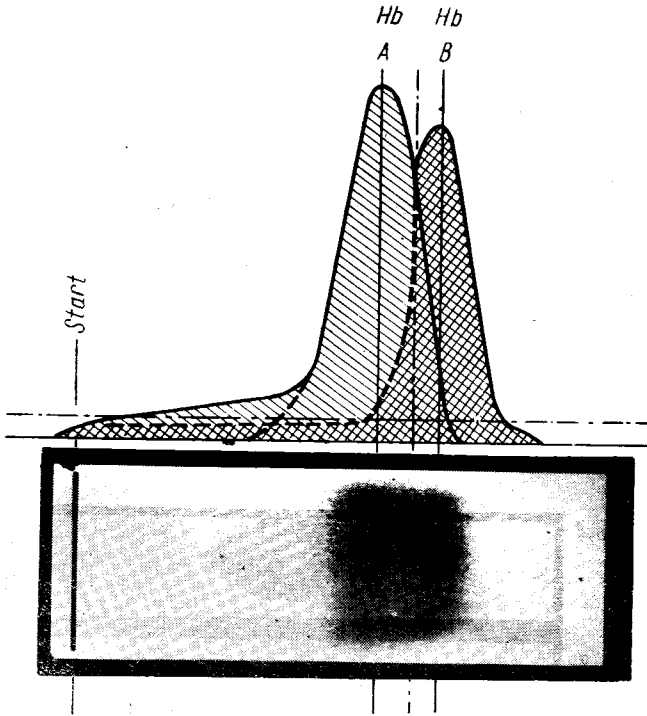
Badania przeprowadzono u:

- 122 szt. owiec rasy najczęściej występującej w rejonie Podhala, polskiej owcy górskiej,
- 39 szt. jagniąt rasy polskiej owcy górskiej,
- 70 szt. krów rasy czerwonej polskiej i rasy nizinnej czarnobiałej,
- 10 szt. cieląt ras wyżej wymienionych,
- 14 szt. buhajów rasy czerwonej polskiej,
- 50 szt. świń rasy zwisłouchej i wielkiej białej angielskiej (materiał rzeźny),

20 szt. koni różnych ras (materiał rzeźny),
 4 szt. mulic,
 4 szt. oślic.

WYNIKI

Uzyskane wyniki są przedstawione jako ryciny elektroforegramów hemoglobiny.

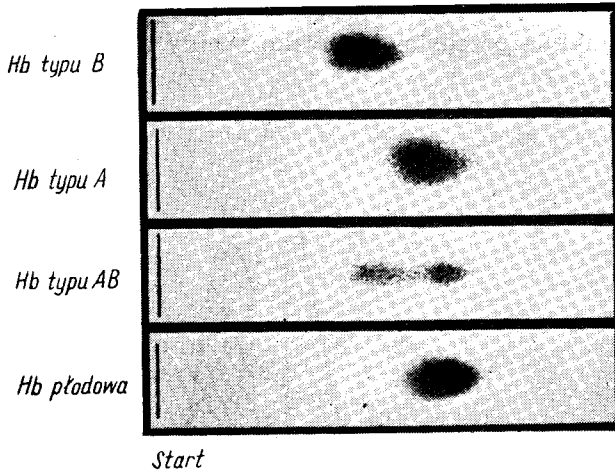


Ryc. 1. Elektroforegram hemoglobiny owcy typu AB. Barwienie: błękitem bromofenolowym. Oznaczenia ilościowe: aparatem wg Górskiego i Wójcika.
 Fig. 1. Electropherogram of ovine type AB haemoglobin. Bromophenyl blue staining. Quantitative determinations: ing. with apparatus of Górski a. Wójcik.

Badając elektroforetyczną ruchliwość hemoglobiny u owiec można podzielić je na 3 grupy: owce posiadające typ hemoglobiny A, typ B, oraz mieszaninę powyższych typów AB. Hemoglobina typu A zachowuje taką samą ruchliwość w polu elektrycznym jak hemoglobina typu płodowego. Stwierdzono to porównując 122 elektroforegramy hemoglobiny owiec dorosłych z 7 elektroforegramami hemoglobiny jagniąt w wieku od 1 do 20 dni (Ryc. 2).

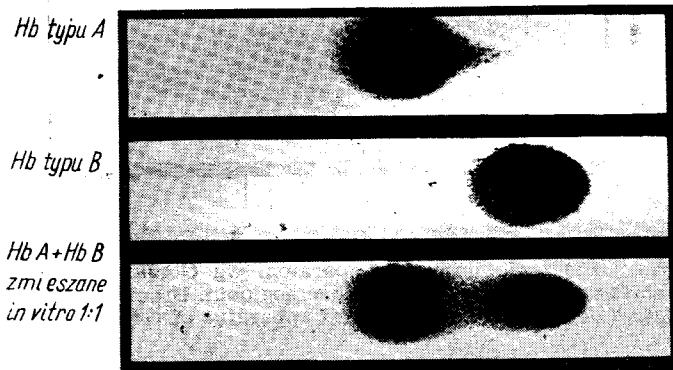
W hemoglobinach krów wyodrębniono dwa typy hemoglobiny różniące się ruchliwością: typ A i B. Ruchliwość hemoglobiny typu B, odpowiada ruchliwości hemoglobiny typu płodowego wykazanej u cieląt (Ryc. 3).

Rycina 4 przedstawia elektroforegramy hemoglobiny krwi i jaiówki z typem hemoglobiny A, oraz hemoglobinę cielęcia typu AF (F — płodowa) z ustępującą hemoglobina typu F na korzyść hemoglobiny typu A.



Ryc. 2. Elektroforegramy hemoglobiny owiec. Hb typu B.
Hb płodowa.

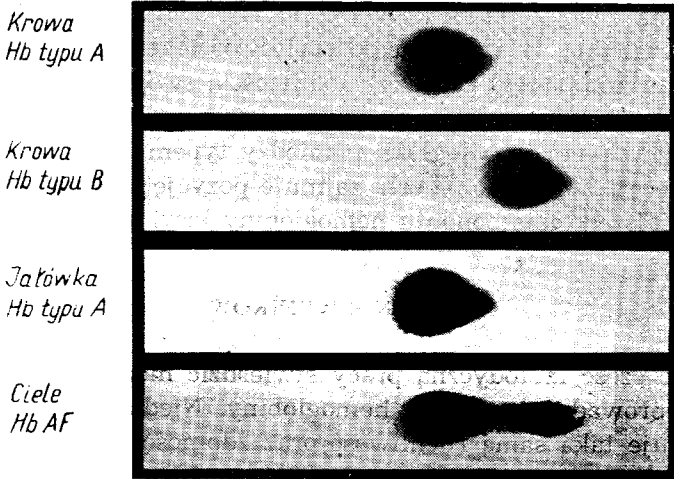
Fig. 2. Electropherograms of ovine haemoglobin. Type B Hb. Foetal Hb.



Ryc. 3. Elektroforegramy hemoglobiny krów. Hb typu A, HbA.
HbB zmieszane in vitro 1:1.

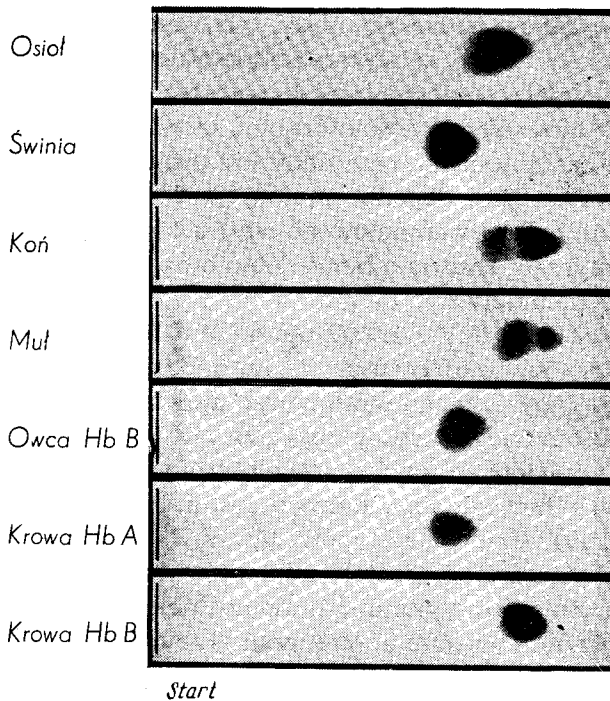
Fig. 3. Electropherograms of ovine haemoglobin. Type A Hb.
HbA and HbB mixed 1:1 in vitro.

Analizując niżej zamieszczone elektroforegramy (Ryc. 5) hemoglobiny osła i świni stwierdzono występowanie jednego typu Hb, zaś u konia i muła wykazano również jeden typ, w którego skład wchodzi dwie frakcje. Poza tym na powyższej rycinie zestawiono niektóre typy hemoglobin, celem porównania wzajemnej ich ruchliwości.



Ryc. 4. Elektroforegramy hemoglobiny bydłowej. Krowa Hb typu A. Jalówka Hb typu A. Ciele Hb AF.

Fig. 4. Electropherograms of bovine haemoglobin. Cow — type A Hb. Heifer — type A Hb. Calf — type AF HB.



Ryc. 5. Ruchliwość względna hemoglobiny różnych gatunków zwierząt. Osioł, świnia, koń, muł, owca HbA, krowa HbA.

Fig. 5. Relative mobility of the haemoglobin of various species. Donkey, swine, horse, mule, sheep HbA, cow HbA.

Hemoglobina owcy typu B, krowy typu A i świni wykazują mniejszą ruchliwość względną, w stosunku do ruchliwości hemoglobin konia, osła i muła. U koni komponent szybszy ruchliwością swoją odpowiada ruchliwości hemoglobiny B u bydła. Natomiast komponent wolniejszy umiejscowiony jest w połowie odległości pomiędzy typem A i typem B hemoglobiny bydłowej. Hemoglobina osła zajmuje pozycję odpowiadającą ruchliwości wolniejszego komponentu hemoglobiny krwi końskiej.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Omawiając część metodyczną pracy stwierdzić można, że nie jest konieczne przeprowadzenie dializy hemoglobiny. Niedializowana hemoglobina zachowuje taką samą ruchliwość oraz zdolność rozdzielania się jak hemoglobina dializowana. Przy odczytywaniu ruchliwości na bibule można opuścić barwienie, gdyż przesuwająca się plama jest dostatecznie widoczna i nie zanika po wysuszeniu pasków bibuły. Początkowo uzyskiwane wyniki na bibule były kontrolowane elektroforezą żelową, ze względu jednak na powtarzalność wyników badań czynności tych zaniechano.

Zwrócono również uwagę, że wyższe temperatury wpływają niekorzystnie na rozdział typów hemoglobiny, dlatego też stosowano ochładzanie przez dodatek lodu do komory, w której znajdowały się paski bibuły.

Na podstawie naszych badań oraz danych z piśmiennictwa stwierdzono, że dotychczas najbardziej dogodną metodą jest elektroforeza bibułowa, przy zastosowaniu buforu weronałowego o pH 8,6 i sile jonowej 0,05. Uzyskane wyniki dotyczące rozdziału hemoglobin oraz ich ruchliwość potwierdzają dane z piśmiennictwa.

Harris i Warren oraz *Evans i wsp.* opisali u owiec dwa typy hemoglobiny, typ A, który szybciej porusza się ku anodzie oraz typ B poruszający się wolniej. Typy te mogą występować u owiec w formie homozygotycznej AA i BB oraz heterozygotycznej AB.

Helm i wsp. w podobnych badaniach elektroforetycznych otrzymywali również dwa typy hemoglobiny, które określili jako typ I i II. Przypuszczają oni, że I ma odpowiadać typowi B, zaś II typowi A. Hemoglobina płodowa, którą oznaczyli F (foetal) miałyby ruchliwość typu hemoglobiny A. *Helm i Huisman* wykazali, że hemoglobina II w porównaniu do hemoglobiny I zawiera większe ilości kwasu glutaminowego, treoniny i seryny, oraz mniejsze ilości kwasu asparaginowego, glicyny i alaniny. Powyższe różnice w składzie aminokwasów wpływają na różną budowę łańcuchów polipeptydowych hemoglobin. W Anglii [9] przeprowadzono badania nad występowaniem odpowiednich typów hemoglobin u 4500 owiec należących do 32 ras i wykazano, że u poszczególnych ras występuje stały procentowy stosunek typów hemoglobin, np. u rasy Leicester układ ho-

mozygotyczny BB występuje w 98⁰/₀, układ AA w ogóle nie występuje, zaś układ heterozygotyczny AB występuje w 2⁰/₀. Natomiast u rasy szkockiej czarnogłównki układ AA występuje w 61⁰/₀, BB w 6⁰/₀, zaś AB w 33⁰/₀.

W naszych badaniach przeprowadzonych na owcach rasy polskiej owcy górskiej stwierdziliśmy występowanie układu BB w 60⁰/₀, AA w 10⁰/₀, zaś AB w 30⁰/₀.

U bydła podobnie jak u owiec wykazano dwa typy hemoglobin. Typ A wykazujący mniejszą, oraz typ B wykazujący większą ruchliwość na bibule. Typ B porusza się z szybkością podobną do hemoglobiny płodowej. U cieląt Hb płodowa zanika około 90 dnia życia. U krów i jałówek mogą występować trojakiemu rodzaju kombinacje powyższych typów, może być forma homozygotyczna AA i BB oraz heterozygotyczna AB. Zmieszanie *in vitro* hemoglobiny typu A oraz hemoglobiny typu B daje elektroforegram podobny do typu AB (ryc. 3), *Salisbury* i wsp., *Grimes* i wsp. [11, 12], oraz *Bangham* [1] przebadali występowanie poszczególnych hemoglobin u szeregu ras mlecznych i wykazali, że u niektórych ras np. holsztyńskiej, fryzyjskiej i hereford występuje jedynie forma homozygotyczna AA, natomiast brak form BB i AB, zaś u krów rasy Guernsey i Jersey stwierdzono występowanie wszystkich trzech układów.

W naszych zapoczątkowanych badaniach na bydle rasy czerwonej polskiej wykazujemy w większości wypadków hemoglobinę typu A i jedynie jeden wypadek hemoglobiny B, natomiast układu AB dotychczas nie stwierdziliśmy.

U koni *Cabannes* i wsp. oraz *Bangham* i wsp. [2], badając konia, osła i muła wykazali, że u konia występuje w 96,5⁰/₀ hemoglobina zbudowana z dwu frakcji poruszających się z różną szybkością, natomiast w 3,5⁰/₀ występuje hemoglobina pojedyncza szybciej wędrująca. W dalszych badaniach przy użyciu elektroforezy żelowej wykazano, że również i ta pojedyncza Hb jest złożona z dwu frakcji. Poza tym stwierdzono, że u mułów występuje podobnie jak u konia Hb zbudowana z dwu komponentów. Porównując hemoglobinę konia i muła wykazano różną procentową zawartość białka w poszczególnych komponentach hemoglobin.

U osła występuje jeden typ hemoglobiny, ruchliwością swoją odpowiadający wolniejszej frakcji Hb konia.

W naszych badaniach dotychczas wykazujemy jedną dwufrakcyjową hemoglobinę konia i muła oraz pojedynczą hemoglobinę u osła. Badając hemoglobinę 50 świń wykazano tylko jeden typ hemoglobiny, który w elektroforezie bibułowej zachowuje się tak, jak typ B hemoglobiny owcy.

W przeprowadzonej pracy natrafiono na duże trudności przy określaniu typów hemoglobin, bowiem szereg autorów używa różnych symboli dla ich określania. Tak np. u owiec są używane określenia typ A, B, AB, α , β , I, II i F. Typ wolniej poruszający się u owiec jest określany jako typ A.

Poza tym niektórzy badacze [22] uzyskali u bydła trzy typy, które tworzyły pięć kombinacji ze sobą.

Ze względu na to, że badania nad typami hemoglobin są prowadzone w coraz szerszym zakresie i mogą mieć zastosowanie przy określaniu dziedziczności, wydaje się koniecznym ujednoczenie nomenklatury dla poszczególnych typów hemoglobin.

WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych badań uwzględniających elektroforetyczną ruchliwość na bibule hemoglobin poszczególnych gatunków zwierząt stwierdzono:

1. U owiec rasy polskiej owcy górskiej występuje hemoglobina typu AA w 10%, BB w 60%, zaś AB w 30%.

2. U 69 krów rasy czerwonej polskiej oraz rasy nizinnej czarnobiałej wykazano typ AA, a tylko u jednej krowy rasy czerwonej polskiej typ BB.

3. U świń rasy wielkiej białej angielskiej i zwiślouchej występuje jeden typ o szybkości odpowiadającej typowi B owcy oraz A krowy.

4. U koni i mułów występuje jeden typ składający się z dwu frakcji, zaś u osła jeden typ odpowiadający wolniej poruszającej się frakcji hemoglobiny konia.

Koszty związane z przeprowadzeniem powyższej pracy zostały pokryte z dotacji Komitetu Zootechnicznego V Wydziału PAN.

З. Эвы, К. Вуйцик

ИССЛЕДОВАНИЯ НАД ВИДАМИ ГЕМОГЛОБИН У ЖИВОТНЫХ

Содержание

Учитывая электрофоретическую подвижность на бумаге проводились исследования гемоглобина крупного рогатого скота, овец, свиней, лошадей, мулов и ослов.

У 120 овец польской горной породы наблюдалось в 10% гомозиготическую форму, AA, в 60% — BB, а в 30% — гетерозиготическую форму, у 70 коров низменной и польской красной пород в 69 случаях наблюдалась форма, AA, и только в одном случае форма BB.

У 50 лошадей различных пород и 4 мулов обнаружено один вид с 2 фракциями, а у 40 слонов — один вид, соответствующий приблизительно в изменчивости более медленной фракции у лошадей.

Z. Ewy, K. Wójcik

STUDIES ON ANIMAL HAEMOGLOBIN TYPES

Summary

Differences in paper-electrophoresis mobility were used to investigate haemoglobin of cattle, sheep, horses, mules and donkeys.

The homozygotic AA and BB and heterozygotic forms (types) were demonstrated in 10, 60 and 30 per cent respectively of 120 sheep of the Polish mountain breed. The form (type) AA was demonstrated in 69 of 70 cows of the Holstein-Friesian and Polish red breeds, and the form (type) BB in only one.

In 50 Large Yorkshire hogs only 1 type was found, which roughly corresponded in mobility to the ovine B and bovine A types.

In 50 horses of various breeds and four mules only one type, composed of two fractions, was found, and in four donkeys also one type only was found, which in mobility corresponded to the slower equine fraction.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bangham A. D.*: Nature, 1957, 179, 467.
2. *Bangham A. D., Lehmann H.*: Nature, 1958, 181, 267.
3. *Betke K., Sawelsberg W.*: Biochem. Z., 1949/1950, 320, 431.
4. *Betke K., Sawelsberg W.*: Klin. Wschr., 1950, 28, 482.
5. *Brugsch J., Hasse E., Hügel A.*: Z. ges. inn. Med. u. ihre Grenz., 1959, 14, 503.
6. *Buhler D. R., Shanks W. E.*: Science, 1959, 129, 899.
7. *Cabannes R., Serain C.*: C. R. Soc. Biol., 1955, 149, 1193.
8. *Derrien Y.*: Biochim. et Biophys. Acta, 1952, 8, 631.
9. *Dessauer H. C., Fox W., Ramirez R. J.*: Arch. Bioch. Bioph., 1957, 71, 11.
10. *Evans J. V., King J. W. B., Cohen B. L., Harris H., Warren F. L.*: Nature, 1956, 178, 849.
11. *Giri K. W., Pillai N. C.*: Nature, 1956, 178, 1057.
12. *Grimes R. M., Duncan C. W.*: Arch. Bioch. Bioph., 1959, 84, 393.
13. *Grimes R. M., Duncan C. W., Lassiter C. A.*: J. Dairy Sci., 1957, 40, 1338.
14. *Górski L., Wójcik K.*: Chemia Analityczna, 1958, 3, 137.
15. *Harris H., Warren F. L.*: Biochem. J., 1955, 60, 29.
16. *Helm H. J., Vliet G., Huisman T. H. J.*: Arch. Bioch. Bioph., 1957, 72, 331.
17. *Hunt J. A., Ingram V. M.*: Nature, 1959, 184, 870.
18. *Jencks W. P., Jetton R., Durrum E. L.*: Biochem. J., 1955, 60, 205.
19. *Jonxis J. H. P., Huisman T. H. J.*: Laboratory Manual on Abnormal Haemoglobins, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1958.
20. *Saha A., Dutta R., Ghosh J.*: Science, 1957, 125, 447.
21. *Salisbury G. W., Schreffler D. C.*: J. Dairy Sci., 1957, 40, 1198.
22. *Sansone G., Cusmano F.*: Boll. Ital. Soc. Biol. Sperim., 1950, 26, 1343, 1680.
23. *Vella F.*: Nature, 1958, 181, 564.

Otrzymano: 29. 6. 1960.

Adres autorów: Katedra Fizjologii Zwierząt W. S. R. w Krakowie,
Aleja Mickiewicza 21, II p.