

NAUČNO DRUŠTVO SR BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA XXIII

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

Knjiga 10.



Urednik
NEDO ZEC,
redovni član Naučnog društva SR BiH

SARAJEVO
1964

ZLATKO FORŠEK, MILAN MIHOLJČIĆ i TOŠO KAČANSKI

KVANTITATIVNI TEST AMILAZE U ORGANIMA I KRVI SVINJA INFICIRANIH VIRUSOM SVINJSKE KUGE

(Primljeno na sjednici Odjeljenja medicinskih nauka održanoj 28. IV 1964. g.)

Taylorov test (1, 2) u dijagnostici svinjske kuge osniva se na kvalitativnom dokazivanju amilaze u ekstraktu pankreasa svinja oboljelih od svinjske kuge, pa se njime, iako ne specifično, na osnovu smanjene aktivnosti amilaze ukazuje na infekciju virusom svinjske kuge. Iako je pankreas poznat kao organ u kojemu se formira amilaza i u kojemu je titar virusa svinjske kuge vrlo visok, virus se u slučaju akutne svinjske kuge kao posljedica viremije nalazi i u svim ostalim organima i tkivima u kojima zbog primarne degeneracije endotela krvnih kapilara mogu nastati i određeni patološki procesi.

Međutim osim pankreasa su i pljuvačne žlijezde jedan od izvora amilaze, a Mc Geachin (5) je dokazao da je to još i jetra i intestinalna mukozna, dok je prisustvo amilaze, najvjerojatnije intracelularne, utvrdio i u slezeni, bubrezima i mišićima. Pošto se smatra da su u organizmu izmjene u sadržaju fermenta iz grupe hidrolaza gotovo beziznimno posljedica jednog patološkog stanja, ovim smo ispitivanjima nastojali utvrditi kvantitativne odnose vrijednosti amilaze u nekim organima i krvi svinja koje su bile inficirane virusom svinjske kuge. Osim toga smo smatrali da bi ova ispitivanja bila korisna i zbog toga što se u Taylorovom testu primjenjuje ispitivanje isključivo pankreasa, a često nedovoljno objektivnom kvalitativnom metodom, pa bi poznavanje kvantitativnih vrijednosti amilaze u organima i krvi moglo biti od koristi u laboratorijskoj dijagnostici svinjske kuge i onda kada za ispitivanje ne stoji na raspoloženju pankreas ili u slučaju još živih svinja — krv i mokraća.

MATERIJAL I METODA RADA

Ispitivanje smo izvršili obuhvativši dvije grupe svinja, od kojih se jedna sastojala od 5 zdravih svinja u starosti od 5 do 6 mjeseci, a druga od 14 svinja iste starosti, koje su nakon infekcije virulentnim virusom svinjske kuge oboljele i zaklane 5—7 dana nakon infekcije. Prilikom klanja obih grupa svinja uzeli smo: pankreas (posebno korpus, lijevi i desni lobus), parotis, tanko crijevo, jetru, slezenu, dio

mišića te krv i mokraću. Pripremanje ekstrakta i određivanje vrijednosti amilaze vršeno je 48 sati nakon klanja, do kada je sav materijal držan na ledu.

Kvantitativno određivanje amilaze vršili smo kolorimetrijskom mikrometodom po Smithu (3), koju su modificirali Miholjčić i saradnici (4). 1 cc 0,95% NaCl dodano je po 0,1 ccm krvi, mokraće ili ekstrakta organa (1 : 1). Samo ekstrakti pankreasa su bili prethodno razrijeđeni u omjeru 1 : 1.000 sa 0,95% NaCl, dok ekstrakte ostalih organa nije bilo potrebno razrjeđivati. Nakon dodavanja 10 cc 0,3% otopine škroba medij je inkubiran 30 minuta na 38° C, a zatim mješavini dodan 1 cc 30% trikloroctene kiseline, da bi se izvršila deproteinizacija. Nakon centrifugiranja, na 4 cc bistrog supernatanta dodano je 0,4 cc Lugolove otopine. Ovim postupkom medij poprima intenzivno plavu boju te zbog toga nije podesan za kolorimetriranje, pa je potrebno izvršiti razrjeđivanje tako da se 0,4 cc medija stavi u 10 cc destilirane vode. Kolorimetrijsko očitavanje je vršeno na talasnoj dužini od 620 milimikrona. Po ovoj modificiranoj tehnici jedna encimska jedinica odgovara 1 mg razorenog škroba do gubitka plave boje u škrobno-jednoj reakciji.

REZULTATI

1. Nalaz kod zdravih svinja

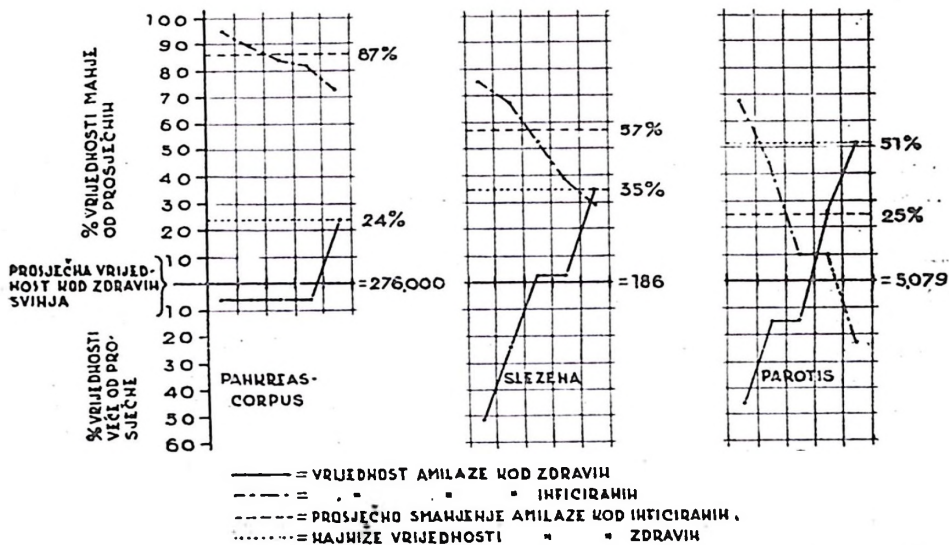
U ekstraktima sva 3 dijela pankreasa, parotiša, intestinalne mukoze i jetre utvrđene su znatno veće vrijednosti amilaze (osobito u sva 3 dijela pankreasa) nego u slučaju slezene i mišića, a zatim i u krvi i mokraći. Prosječne vrijednosti amilaze izražene u encimskim jedinicama iznosile su: u pankreaskorpusu 276.000, pankreas-lobusu sin. 234.200, pankreas-lobusu deks. 42.300, parotisu 3.079, intestinalnoj mukozi 1.670, jetri 334, slezeni 186, mišiću 182, krvi 222 i mokraći 93 encimske jedinice. Najmanje individualne varijacije ustanovljene su u pankreas-korpusu: između 210.000 i 292.500 encimskih jedinica, a najveće u parotisu (1.495 do 4.550 encimskih jedinica) i slezeni (120 do 285 enzimskih jedinica). Varijabilni nalazi u krvi i mokraći su razumljivi jer su ovisni o izlučivanju iz organa koji formiraju amilazu, odnosno o brzini izlučivanja iz krvi.

2. Nalaz kod inficiranih svinja

Prosječne kvantitativne vrijednosti amilaze u ekstraktima svih ispitanih organa inficiranih svinja bile su znatno smanjene u odnosu prema organima zdravih svinja te su iznosile: pankreas-korpus 36.785 — smanjenje za 87%; pankreas-lobus sin. 23.285 — smanjenje za 90%; pankreas-lobus deks. 16.107 — smanjenje za 62%; parotis 2.333 — smanjenje za 25%; intestinalna mukoza 182 — smanjenje za 90%; jetra 43 — smanjenje za 87%, slezena 81 — smanjenje za 57%, i mišići 43 — smanjenje za 76%.

Međutim ove prosječne vrijednosti amilaze nisu za sve organe od jednakog značaja u prosuđivanju infekcije virusom svinjske kuge ako ih usporedimo s individualnim i prosječnim vrijednostima u orga-

GRAFIKON 1.



Prikaz odnosa prosječnih i najnižih kvantitativni vrijednosti amilaze u organima zdravih i u organima inficiranih svinja

nima zdravih svinja. Odnosi ovih vrijednosti u slučaju pankreas-korpusa, slezene i parotisa prikazani su u grafikonu 1.

Na osnovu prikazanih komparativnih vrijednosti može se uočiti da individualne vrijednosti amilaze u slučaju parotisa inficiranih svinja mogu biti više (3.800 encimskih jedinica) od prosječne vrijednosti kod zdravih svinja (3.079 encimskih jedinica), kao i obratno, da individualne vrijednosti kod zdravih svinja mogu biti niže (1.495 encimskih jedinica) od prosječnih vrijednosti kod inficiranih (2.333 encimskih jedinica). Slični odnosi utvrđeni su i za vrijednosti amilaze u krvi, pa je vjerojatno da su varijacije tih vrijednosti u krvi kod zdravih svinja imale utjecaja i na visinu prosječnih vrijednosti kod inficiranih svinja. Smanjenje aktivnosti amilaze u krvi inficiranih svinja iznosilo je 18%.

Nešto manje disproporcije u tim odnosima pokazale su se u slučaju slezene i pankreas-lobusa deks. Individualne najviše vrijednosti kod inficiranih (135, odnosno 26.000 encimskih jedinica) ne prelaze prosječne vrijednosti kod zdravih svinja (186, odnosno 42.300 encimskih jedinica), ali zato najniže individualne vrijednosti kod zdravih (120, odnosno 16.000 encimskih jedinica) mogu biti niže ili u istim granicama kao najniže individualne vrijednosti inficiranih svinja (135, odnosno 16.000 encimskih jedinica).

Razlike su nedvojbeno jasno izražene u slučaju pankreas-korpusa, pankreas-lobusa sin., intestinalne mukoze, jetre i mišića. One su osobito jasno limitirane u slučaju pankreas-korpusa, intestinalne mukoze i jetre, za koje su prosječne smanjene vrijednosti amilaze kod inficiranih svinja (36.785 — 182 — 43 — 43 encimske jedinice) prema prosječnim vrijednostima kod zdravih svinja (276.000 — 1.670

— 334 — 182 encimske jedinice) značajno niže. Isto tako su i najniže individualne vrijednosti amilaze kod zdravih svinja (210.000 — 1.200 — 202 — 183 encimske jedinice) zaista vrlo visoke.

DISKUSIJA

Poznato je da između količine fermentata u organizmu ili u određenom organu i općeg stanja organizma postoje određene korelacije ako se uzme u obzir centralna uloga fermentata u općem metabolizmu. Međutim utvrđene količine fermentata u krvi ili u organu ne moraju uvijek varirati samo kao posljedica općeg patološkog stanja ili oštećenja jednog ili više organa u kojima se dati ferment stvara. Kvantitativne vrijednosti fermentata mogu biti podložne znatnim individualnim razlikama zahvaljujući utjecaju unutaršnjih faktora (konstitucija, starost i dr.), a često i usljed utjecaja vanjskih faktora, osobito načina ishrane (sadržaj hrane u pogledu proteina i ugljikohidrata). Osim toga, i u tehnici dokazivanja aktivnosti fermentata mogu takođe ležati uzroci koji mogu utjecati na varijabilnost nalaza kao što su: temperatura, pH-medija, razni fizikalni faktori (smrzavanje i otapanje tkiva), a, konačno, i sama procedura pripremanja homogenata. No i unatoč tih elemenata može se zaključivati o određenom patološkom stanju u organizmu ako odstupanja u kvantitativnim vrijednostima fermentata leže izvan normalnih varijacionih granica.

Iako u ovim ispitivanjima nisu uzete u obzir mogućnosti transformiranja nekoliko mogućih stanja amilaze u normalnom organizmu (ekstracelularna krvna amilaza, intracelularna rastvorljiva amilaza i amilaza vezana na mikrosomatske partikule) koje su Brosemer i Rutter (6) utvrdili u jetri, a Laird i Barton (7) u pankreasu, kao i mogući utjecaj ovih stanja na određivanje aktivnosti amilaze u homogenatima organa, ona su ipak dokazala da u organima, krvi i mokraći svinja inficiranih virusom svinjske kuge dolazi do općeg smanjenja količina amilaze. Smanjena aktivnost amilaze nije u ekstraktima svih organa svinja inficiranih virusom svinjske kuge jednako intenzivna. Aktivnost amilaze u parotisu, pankreas-lobusu deks. i slezeni podliježe tolikim individualnim varijacijama da u smislu Taylorovog testa nije dovoljno signifikantna niti u kvantitativnom testu. Najizrazitije kvantitativno sniženje aktivnosti amilaza ustanovljeno je u pankreas-korpusu, sa najnižom individualnom vrijednosti od 10.000 encimskih jedinica, najvišom — od 75.000, odnosno prosječnom — od 36.785 kod inficiranih svinja, prema prosječnoj vrijednosti od 276.000 encimskih jedinica kod zdravih svinja. Značajne razlike utvrđene su i u intestinalnoj mukozii, jetri i mišićima, tako da bi se i ova tkiva mogla u kvantitativnom testu s istim uspjehom upotrijebiti u laboratorijskoj dijagnostici svinjske kuge kao i pankreas.

Nalazi smanjenih vrijednosti amilaze u organima svinja inficiranih virusom svinjske kuge čini se da nisu posljedica direktnog djelovanja virusa na parenhim datih organa. U jetri svinja inficiranih virusom svinjske kuge nisu histološki utvrđena oštećenja paren-

hima, a ti nalazi se poklapaju i sa našim započetim ispitivanjima u vezi s pankreasom. Phillips (9) je međutim utvrdio da je koncentracija krvne amilaze u uskoj vezi sa funkcionalnim stanjem pankreasa, pa je u slučaju kroničnog pankreatitisa našao povišene vrijednosti amilaze u krvi, a Mc Geachin (8) — maksimalnu ekskreciju amilaze mokraćom u slučaju akutnog pankreatitisa. Kod svinja inficiranih virusom svinjske kuge su vrijednosti amilaze u svim ispitanim organima, kao i u krvi i mokraći, smanjene, pa se nužno nameće pretpostavka da bi u slučaju ove infekcije smanjenje aktivnosti amilaze moglo biti posljedica patološkog stanja, koje je izazvao virus svinjske kuge, ali djelovanjem na jedan centralni, najvjerojatnije hormonalni, dio u CNS-u. Ova pretpostavka imala bi svoje opravdanje zato što je u slučaju svinjske kuge mozak osobito zahvaćen degenerativnim procesima kao što su encefalomijelitis, glija-reakcije, tigroliza i neuronofagija.

ZAKLJUČAK

Kvantitativnom kolorimetrijskom metodom u pankreasu (korpus, lobus sin. i deks.), parotisu, intestinalnoj mukozi, jetri, slezeni, mišićima, krvi i mokraći svinja inficiranih virusom svinjske kuge utvrđeno je znatno smanjenje aktivnosti amilaze.

Najizrazitije smanjenje ustanovljeno je u pankreas-korpusu sa najnižom individualnom vrijednosti od 10.000 encimskih jedinica i najvišom — od 75.000, odnosno prosjekom — od 36.785 encimskih jedinica kod inficiranih prema prosjeku od 276.000 encimskih jedinica kod zdravih svinja. Slični odnosi nađeni su još i u slučaju jetre i intestinalne mukoze.

Smanjenje aktivnosti amilaze u organima u kojima se formira, odnosno u kojima je utvrđena amilaza, ukazuju na moguću pretpostavku da su takva stanja nastala više djelovanjem virusa na jedan centar u CNS-u, a manje kao posljedica oštećenja parenhima datih organa.

ZLATKO FORŠEK, MILAN MIHOLJČIĆ AND TOŠO KAČANSKI

QUANTITATIVE AMYLASE TEST IN ORGANS AND BLOOD OF SWINE INFECTED WITH SWINE FEVER VIRUS

SUMMARY

The determination of the amylase activity was carried out with the quantitative colorimetric method in extracts of pancreas, parotis, intestinal mucosa, liver, spleen, muscle, blood and urine of swine infected with swine fever virus. Animals was sacrificed 5—6 days following infection. In all examined organs as in the blood and urine was established a remarkable decrease of the amylase activity

with the most significant manifestation in pancreas-corpus, intestinal mucosa and liver.

The amylase activity in pancreas-corpus, intestinal mucosa and liver of infected animals decreased for 87%, 90% and 87% respectively and it was considerable below the lowest individual values of infected animals. Authors indicate on the presumption that the cause of such a condition would be necessary to demand rather in the activity of the virus on one center in CNS than in direct injury of the respective organs.

LITERATURA

1. Taylor R.: Vet. Medicine 56, 6, 229, 1961.
2. Karlović M., Zeljko M., Foršek Z. i Kaćanski T.: Vet. arhiv 32, 7—8, 202, 1962.
3. Smith W. and Roe H. J.: Journal of Biol. Chem. 227, 357, 1957.
4. Miholjčić M., Šalamon T. i Nikulin H.: Enzymologie denn Hag (u štampi)
5. McGeachin R., Gleason J. and Adams M. R.: Arch. of Biochem. and Biophysic 75, 403, 1958.
6. Brosemer R. W. and Rutter W. J.: Journal of Biol. Chem. 236, 5, 1252, 1961.
7. Laid H. K. and Barton A. D.: Biochem. et Biophysic Acta 25, 56, 1957.
8. McGeachin L. R. and Horgan A. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 95, 341, 1957.
9. Phillips M. A.: Arch. Inter. Med. 93, 7, 373, 1954.

