

Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Nauk Fizjologicznych AR w Lublinie

Anna PIKUL, Tadeusz STUDZIŃSKI

**Badania chromatograficzne nad hemoglobina u koni w warunkach
anemii poupustowej**

Хроматографические исследования гемоглобина у коней в условиях анемии
после кровопускания

Chromatography of Horse Haemoglobin in Conditions of Anemia due to Blood-
-Letting

Wykrycie przez Cabannesa i Seraina (5) polimorfizmu hemoglobiny u zwierząt domowych przyczyniło się do podjęcia licznych badań zarówno nad strukturą białkową, jak i dziedziczeniem genów warunkujących syntezę różnych rodzajów hemoglobiny u zwierząt (1, 3, 7, 8).

Obecność dwu typów hemoglobiny u koni, wykazana w badaniach Cabannesa i Seraina, została potwierdzona wynikami badań przeprowadzonych przez Banghama i Lehmana (1), którzy dwie hemoglobiny migrujące różnie szybko w polu elektrycznym określili jako Hb I i Hb II. Ilość Hb I była większa u prze-ważającej liczby koni i wynosiła około 57—60%, zaś Hb II — nieco mniejsza (40—43%).

Geny warunkujące syntezę hemoglobiny u takich zwierząt jak owce lub kozy są układami genetycznymi labilnymi i w warunkach istniejących w anemii jeden gen może wykazywać wyższą zdolność do syntezy hemoglobiny (3, 4). W warunkach długotrwałej anemii udało się wykazać istnienie dodatkowych genów u owiec (2, 3), które były w stanie pobudzać syntezę zupełnie odmiennego typu hemoglobiny, określonej jako Hb C.

Obecność dwu typów hemoglobiny u koni oraz brak w dostępnej literaturze badań na temat wpływu długotrwałych anemii na syntezę hemoglobiny u koni skłonił nas do podjęcia badań w tym kierunku.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 9 koniach używanych do produkcji surowicy przeciwciałowej, którym pobierano krew celem uzyskania surowicy. Czas trwania cyklu produkcyjnego i pobierania krwi wahał się od 4 do 7 lat, zaś całkowita ilość pobranej krwi wynosiła od 360 l do 1250 l. Średnia ilość krwi pobranej przypadająca na jeden miesiąc i na jednego konia wynosiła 7,8 l.

Badania obejmowały chromatograficzne oznaczanie zawartości Hb I i Hb II, oznaczanie całkowitej zawartości hemoglobiny, obliczanie ilości krwinek czerwonych w 1 mm³ krwi oraz oznaczanie wartości hematokrytowej.

Ilościowe oznaczanie Hb I i Hb II przeprowadzano przy zastosowaniu chromatografii jonowo-wymiennej. Jako nośnika używano DEAE-Sephadex (Farmacia Fine Chemicals, Uppsala). Odważony DEAE-Sephadex zawieszano w wodzie dejonizowanej na 20 godz. i po odsączeniu na lejku Büchnera zawieszano go w 0,5 N HCl na 30 min. Po następowym przemyciu wodą dejonizowaną na lejku zawieszano go na 30 min. w 0,5 N NaOH. Po przemyciu wodą dejonizowaną i buforem startowym TRIS-HCl o pH 7,6 zawieszano Sephadex w buforze startowym na 20 godz. Tak przygotowany nośnik наносzono na kolumnę, płukano przez 24 godz. buforem TRIS-HCl o pH 7,6. Do rozdzielów chromatograficznych hemoglobiny stosowano kolumny o wymiarach 1 cm na 60 cm. Na kolumnę наносzono 1 ml wodnego roztworu hemoglobiny, zawierającego około 70 mg Hb. Elucję prowadzono buforem TRIS-HCl o ciągłym gradiencie pH od 7,6 do 3,5 z dodatkiem 100 mg KCN na 1 l buforu. Frakcje 3,5 ml zbierano przy pomocy automatycznego kolektora frakcji. Ilościowych oznaczeń poszczególnych frakcji hemoglobiny dokonywano na podstawie spektrofotometrycznego pomiaru ekstynkcji przy długości fali 415 nm.

Celem określenia stopnia anemii oraz długości utrzymywania się jej po upustach krwi obliczano ilość ciałek czerwonych na stoliku Thoma-Zeissa, oznaczano całkowitą zawartość hemoglobiny wg metody Drabkina oraz oznaczano wartość hematokrytową przy użyciu metody mikrohematokrytowej oraz wirówki „Unipan” typ 316.

Badania chromatograficzne hemoglobiny oraz oznaczanie całkowitej zawartości hemoglobiny i pozostałych wskaźników hematologicznych wykonywano w czasie 2 lub 3 dnia po upuście krwi, dalej między 10 a 14 dniem po upuście oraz w czasie między 22 a 24 dniem po upuście. Za normę wyjściową dla ilościowych wartości frakcji hemoglobinowych i oznaczeń hematologicznych przyjmowano wartości z oznaczeń między 22 a 24 dniem po upuście. Ilość krwi pobieranej w czasie upustu wynosiła około 16 l.

WYNIKI

Wartości badanych wskaźników hematologicznych oraz Hb I i Hb II otrzymane w czasie trzech kolejnych oznaczeń między upustami ukazano w tabelach 1 i 2. Tabela 1 przedstawia dane otrzymane z oznaczeń u dwu koni, które posiadały mniejszą ilość Hb II, wynoszącą około 20% całkowitej zawartości hemoglobiny, zaś tab. 2 obejmuje wyniki otrzymane od koni, które wykazywały obecność Hb II w około 38%.

Średnia zawartość hemoglobiny ulegała zmniejszeniu w czasie drugiego dnia po upuście z 11,9 do 9,4 g% w grupie koni ze zmniejszoną ilością Hb II (tabela 1) i osiągała wartość 11,4 g% w czasie między 20—24 dniem po upuście. W grupie koni z wyższymi wartościami Hb II (tab. 2) wartość wyjściowa średniej zawartości hemoglobiny wynosiła 13,3 g% (a). Ulegała ona zmniejszeniu w drugim dniu po upuście do 10,6 g% i następowemu wzrostowi do 11,3 g% w czasie między 10 a 14 dniem od upustu. W obydwu grupach koni zawartość hemoglobiny zmniejszyła się około 20—21% w czasie badania w drugim dniu po upuście i była ciągle niższa w czasie 10—14 dnia po upuście o około 15% w porównaniu z wartościami wyjściowymi. Podobnie zachowywały się wartości hematokrytowe, które były mniejsze o 22% w czasie drugiego dnia po upuście i o 15% w czasie mię-

Tab. 1. Zachowanie się całkowitej zawartości hemoglobiny, wartości hematokrytowej, liczby krwinek czerwonych oraz Hb I i Hb II u 2 koni posiadających Hb I w 80% i Hb II w 20%

The behaviour of total content of haemoglobin, haematocrite value, number of red blood corpuscles, and Hb I and Hb II in two cows having Hb I in 80 per cent and Hb II in 20 per cent

Koń nr		Ilość hemo- globiny (g/%)	Wartość hemato- krytowa	Ilość krwinek czerwo- nych mln/mm ³	Ilość Hb I %	Ilość Hb II %
83	a*	11,8	38,0	6,600	82	18
	b*	9,2	30,0	4,780	85	15
	c*	11,2	35,0	6,400	83	17
214	a	12,0	34,5	6,400	78	22
	b	9,5	26,5	5,250	83	17
	c	11,5	33,5	6,000	79	21
Średnio	a	11,9	36,25	6,500	80	20
	b	9,4	28,25	5,010	84	16
	c	11,4	34,25	6,200	81	19

a — oznacza wartości otrzymane przed upustem 16 l krwi, b — oznacza wartości otrzymane 2—4 dni po upuście, c — oznacza wartości otrzymane 10—14 dni po upuście.

a — denotes values obtained before blood-letting of 16 liters, b — denotes values obtained 2—4 days after blood-letting, c — denotes values obtained 10—14 days after blood-letting.

dzy 10 a 14 dniem po upuście. Wartość krwinek czerwonych ulegała również zmniejszeniu do niższych wartości o 21% w grupie koni ze zmniejszoną ilością Hb II (tab. 1) oraz 30% w grupie koni z wyższymi wartościami Hb II (tab. 2). Stan anemii poupustowej nie był więc kompensowany w czasie dwu tygodni po upuście i przeciągał się na następne dni trzeciego tygodnia po upuście.

Ilość Hb I wzrastała u koni z mniejszą ilością Hb II (tab. 1) o 4% i u koni grupy drugiej o 4,3% w czasie pierwszego badania po upuście (b). Hb I była wyższa o 1% w grupie koni ze zmniejszoną ilością Hb II w czasie drugiego badania po upuście i o 2,6% u koni z normalną ilością Hb II. Ilość Hb II ulegała zmniejszeniu zaznaczonemu najwyraźniej w drugim dniu po upuście.

OMÓWIENIE

Dwa typy hemoglobiny u koni, zróżnicowane w badaniach własnych za pomocą chromatografii jono-wymiennej, były identyczne z dwoma typami różnie szybko migrującymi w polu elektrycznym, które zostały przez B a n g h a m a i L e h m a n n a (1) określone jako Hb I i Hb II. Większa procentowo frakcja, która szybciej migruje w polu elektrycznym,

Tab. 2. Zachowanie się całkowitej zawartości hemoglobiny, wartości hematokrytowej, liczby krwinek czerwonych oraz Hb I i Hb II u 7 koni posiadających Hb I w 61,5% i Hb II w 38,5%

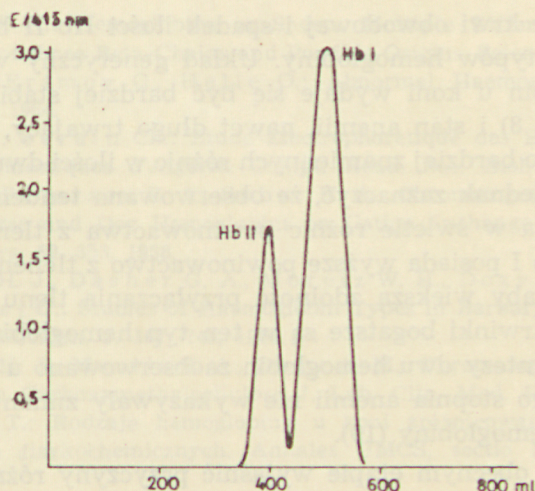
The behaviour of total content of haemoglobin, haematocrite value, number of red blood corpuscles, and Hb I and Hb II in seven horses having Hb I in 61.5 per cent and Hb II in 38.5 per cent

Koń nr		Ilość hemo- globiny (g/%)	Wartość hemato- krytowa	Ilość krwinek czerwo- nych mln/mm ³	Ilość Hb I %	Ilość Hb II %
83	a	13,29	38,0	6,900	55,0	45,0
	b	12,83	29,0	5,380	64,0	36,0
	c	10,47	27,0	5,560	61,0	39,0
208	a	12,5	34,0	8,400	63,0	37,0
	b	11,3	28,0	6,700	67,0	33,0
	c	11,8	30,0	7,100	65,0	35,0
233	a	8,8	29,0	4,100	59,7	40,3
	b	7,2	25,0	3,860	64,0	36,0
235	a	12,6	34,0	8,500	64,0	36,0
	b	11,5	28,0	6,500	67,2	32,8
	c	12,1	33,0	7,900	65,9	34,1
305	a	13,1	37,0	8,300	62,0	38,0
	b	10,9	34,0	5,900	66,0	34,0
	c	11,2	36,0	6,400	64,0	36,0
315	a	13,2	40,5	6,600	63,2	36,8
	b	9,1	24,0	4,700	65,3	34,7
	c	10,2	26,0	5,460	64,8	35,2
325	a	15,4	45,0	9,800	63,5	36,5
	b	10,9	36,0	6,180	67,4	32,6
	c	14,5	44,0	9,200	64,1	35,9
Średnio	a	13,3	37,0	6,500	61,5	38,5
	b	10,6	29,4	5,628	65,8	34,2
	c	11,3	32,6	6,200	64,1	35,9

została nazwana przez nich Hb I, zaś hemoglobina wolniej migrująca i ilościowo mniejsza — Hb II.

Frakcja hemoglobiny ulegająca elucji w pH 5,1 (ryc. 1) odpowiadała pod względem ilościowym Hb I, zaś frakcja wykazująca elucję w pH 4,8 odpowiadała Hb II (6). Procentowe wartości Hb I i Hb II u 7 koni (tab. 2) były zbliżone do wartości podawanych przez innych autorów (1, 8, 9), którzy oceny ilościowej dokonywali na podstawie rozdziałów elektroforetycznych. Ilość Hb I u tych 7 koni wynosi przed upustami 61,5%, zaś Hb II 38,5% (tab. 2). B a n g h a m i L e h m a n n (1) podali wartości 60% dla Hb I i 40% dla Hb II, a S t u d z i Ń s k i (9) 57% dla Hb I i 43% dla Hb II. Ilość Hb I wzrastała w czasie 2 dnia po upuście do 65,8% i wynosiła 64,1% w czasie między 10 a 14 dniem po upuście.

Z 9 badanych koni dwa charakteryzowały się większą ilością Hb I



Ryc. 1. Rozdział hemoglobiny końskiej na DEAE-Sephadexie. Na kolumnę o wymiarach 60×1 cm nanoszono 1 ml wodnego roztworu zawierającego ok. 70 mg hemoglobiny. Elucję przeprowadzano buforem TRIS-HCl o ciągłym gradiencie pH od 7,5 do 3,5. W eluacie otrzymano 2 frakcje: Hb I przy pH buforu 5,1 i Hb II przy pH buforu 4,8. Hb I stanowiła 64% całkowitej ilości hemoglobiny, natomiast Hb II 36%.

Separation of equine haemoglobin on DEAE-Sephadex. 1 ml of water solution containing ca 70 mg of haemoglobin was deposited upon the column (size 60×1). The elution was carried out with TRIS-HCl buffer of the continuous pH gradient from 7,5 to 3,5. In the eluat two fractions were obtained: Hb I at 5,1 pH of the buffer and Hb II at 4,8 pH of the buffer. Hb I constituted 64 per cent of the total amount of haemoglobin, while Hb II, 36 per cent

(średnia wartość wynosiła około 80%) i mniejszą ilością Hb II — 20%. W grupie tych dwu koni dochodziło również do wzrostu zawartości Hb I w czasie pierwszego badania po upuszczeniu do 84% i odpowiedniego zmniejszenia Hb II do 16%. Tendencja zmian u badanych koni szła więc w kierunku wzrostu ilości Hb I i zmniejszenia Hb II i to zarówno u koni z normalną ilością Hb II, jak i z jej zmniejszoną ilością (tab. 1). Zmiany te nie były jednak duże, gdyż wynosiły 4% u koni ze zmniejszoną ilością Hb II i 4,3% u koni z jej normalną ilością. Wzrost ilości Hb I u koni po upuszczeniu krwi wynoszącym około 16 l wskazywał albo na większe uwalnianie ze szpiku kostnego krwinek czerwonych, posiadających zwiększoną ilość Hb I, albo na zwiększoną syntezę Hb I w uwalnianych krwinkach. Utrzymująca się tendencja do wzrostu ilości Hb I u koni anemizowanych nie mogła być statystycznie znamienna ze względu na stosunkowo niewielką liczbę badanych koni oraz na małe różnice obserwowanych zmian. Na uwagę zasługuje fakt, że badane konie znajdowały się w cyklu produkcyjnym od 4 do 7 lat, w czasie których pobierano im średnio w ciągu miesiąca 7,8 l krwi. Stan długotrwałej anemii ujawnił więc wzrost

ilości Hb I we krwi obwodowej i spadek ilości Hb II bez pojawienia się dodatkowych typów hemoglobiny. Układ genetyczny warunkujący syntezę hemoglobin u koni wydaje się być bardziej stabilny niż u innych zwierząt (3, 7, 8) i stan anemii, nawet długo trwający, nie jest w stanie doprowadzić do bardziej znamiennych różnic w ilości dwu frakcji hemoglobiny. Należy jednak zaznaczyć, że obserwowana tendencja wzrostu Hb I jest zrozumiała w świetle różnic powinowactwa z tlenem między Hb I i Hb II (9). Hb I posiada wyższe powinowactwo z tlenem i jej zwiększona synteza dawałaby większą zdolność przyłączania tlenu w płucach przez krew, której krwinki bogatsze są w ten typ hemoglobiny. Podobnie stabilny układ syntezy dwu hemoglobin zaobserwowano u kur, które w warunkach dużego stopnia anemii nie wykazywały zmian w zakresie ilości dwu frakcji hemoglobiny (10).

Trudno na obecnym etapie wyjaśnić przyczyny różnic w zachowaniu się frakcji hemoglobiny u różnych gatunków zwierząt w warunkach anemii. Być może, że takie gatunki jak koń i kura nie posiadają dodatkowych genów zdolnych do syntezy innych hemoglobin poza fizjologicznie występującymi lub może stopień anemii jest za mały do ich uaktywnienia. Biorąc pod uwagę stosunkowo niewielkie zmiany ilościowe Hb I u koni narażonych na długotrwałą anemię wydaje się, że gatunek ten posiada znacznie mniejszą labilność w zakresie zmian syntezy hemoglobiny i mogą istnieć inne mechanizmy adaptacyjne, które jako czynniki pozahemoglobiновые ale wewnątrzkrwinkowe decydują o adaptacji w stanach anemii.

WNIOSKI

1. Hemoglobina koni składa się z dwu frakcji dających się rozdzielić chromatograficznie. Hb I ulega elucji w pH 5,1, zaś Hb II w pH 4,8.
2. Ilość Hb II wynosiła u 7 koni 61,5% a Hb I 38,5%. Dwa konie charakteryzowały się zwiększoną ilością Hb I (80%) oraz mniejszą ilością Hb II (20%).
3. Upusty krwi wynoszące około 16 l powodowały u wszystkich koni wzrost Hb I o około 4% i spadek Hb II o taką samą wartość.
4. Stan długotrwałej anemii (4 do 7 lat) nie powodował istotnych zmian w ilości Hb I i Hb II w porównaniu z danymi z piśmiennictwa.

PÍSMIENNICTWO

1. Bangham A. D., Lehmann H.: "Multiple" Haemoglobins in the Horse. *Nature* **181**, 267, 1958.
2. Blunt M. H., Evans J. V.: Changes in the Concentration of Potassium in the Erythrocytes and in Hemoglobin Type in Merino Sheep under a Severe Anemic Stress. *Nature* **200**, 1215, 1963.
3. Boyer S. H., Hathaway P., Pascasio F., Orton Ch., Bordley J.,

- Naughton M. A.: Hemoglobins in Sheep: Multiple Differences in Amino Acid Sequences of three Beta-Chains and Possible Origins. *Science* **153**, 1539, 1966.
4. Braend M., Erfmov G., Helle O.: Abnormal Haemoglobin in Sheep. *Nature* **204**, 700, 1964.
 5. Cabannes R., Serain Ch.: Etude Electrophoretique des Hemoglobines des Mammiferes Domestiques d'Algerie. *Compt. Rend. Soc. Biol.* **194**, 1193, 1955.
 6. Gutter F. J., Peterson E. A., Sober H. A.: Chromatography of Proteins. III. Human; Horse and Dog Hemoglobins on Cation-Exchange Cellulose. *Arch. Biochem. Biophys.* **80**, 353, 1958.
 7. Huisman T. H. J., Dasher G. A., Moretz W. H., Dozy A. M., Wilson J. B., Van Vliet G.: Studies of Haemoglobin Types in Barbary Sheep (*Ammotragus lervia*). *Biochem. J.* **107**, 745, 1968.
 8. Huisman T. H. J., Martis E. A., Dozy A. M.: Chromatography of Hemoglobin Types on Carboxymethylcellulose. *J. Lab. Clin. Med.* **52**, 312, 1958.
 9. Studziński T.: Rodzaje hemoglobiny u koni różnicowane na podstawie niektórych cech fizykochemicznych. *Annales UMCS, sectio DD*, vol. **19**, 11, Lublin 1964.
 10. Studziński T., Wiśliński M.: Oxygen Affinity of two Hen Hemoglobin Types and Their Behavior under Conditions of Anemia due to Blood-Letting. *Acta Physiol. Polon.* **26**, 55, 1967.
- Wpł. 9 VII 1975.

РЕЗЮМЕ

Исследования провели на 9 конях, использованных для изготовления противостолбнячной сыворотки, которым брали кровь около 7,8 л в месяц на протяжении нескольких лет (самый долгий период — 7 лет, самый короткий — 4 года). Исследования велись в следующих направлениях: определение фракции гемоглобина при помощи колонной хроматографии на ДЕАЕ — Sephadex; вычисление количества эритроцитов; определение содержания гемоглобина; определение гемократной величины периферической крови. В хроматографических исследованиях гемоглобина элюцию проведено буфером TRIS-HCl с постоянным градиенте pH от 7,6 по 3,5. Хроматографическое изолирование фракции гемоглобина а также определение постоянного содержания гемоглобина и остальных гематологических показателей проводили на 2-ой или 3-й день после кровопускания, на 10-й и 14-й день после кровопускания и между 22 и 24 днём после кровопускания. Количество крови взятой во время одного кровопускания равнялось около 16 л. Гемокритные величины, содержание гемоглобина а также количество эритроцитов понизилось на 20—25% после кровопускания во время первого исследования (2—3 день). Во время второго исследования на 10 и 14 день после кровопускания величины эти понизились на 10—12% и равнялись начальному уровню в 22 и 24 день от кровопускания. Гем. I поддан элюции в pH 5,1 возрастал у всех коней после кровопускания на около 4%, а Гем. II с элюцией в pH 4,8 уменьшался на такую же величину.

SUMMARY

Experiments were conducted on 9 horses used as donors of hiperimmune serum against tetanus toxin. The mean value of blood calculated from values taken for the whole period (the shortest time lasted 4 years and the longest — 7 years)

averaged 7.8 litres per month. The following determinations were made: haemoglobin types by ion exchange chromatography on DEAE-Sephadex, the number of erythrocytes, haematocrite value and haemoglobin concentration. For separation of haemoglobin TRIS-HCl buffer was used with constant gradient of pH ranging from 7.6 to 3.5. Chromatography separation of haemoglobin types and estimation of haematological indices were done on the 2nd or 3rd day, then between 12th and 14th days and between 22nd—24th day after blood-letting. The mean volumes of blood which was collected at one blood-letting averaged 16 litres. Haematocrite value, haemoglobin concentration and the number of erythrocytes decreased by 20—25% on the 2nd—3rd day after blood-letting. At the time of the next determination the values mentioned were still lower by about 10—12%. They reached the initial level between 22—24 days after blood-letting. Hb I which eluted at pH 5.1 increased by ca 4%, while Hb II which eluted at pH 4.8 was also 4% lower.