

EWA SITARSKA, MIROSLAW KLECZKOWSKI, WŁODZIMIERZ KLUCIŃSKI,
ROMUALDA ŁADYSZ, RENATA GÓRECKA, PRZEMYSŁAW DZIEKAN

Stan antyoksydacyjny koni i próba modulacji tego układu

Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Wydziału Weterynaryjnego SGGW, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Summary

Antioxidant system in horses and attempts for its modulation

The aim of the research was to determine the values of selected antioxidant indicators in horse and the possibility of the modulation of the antioxidant system. The research was performed at early spring in a group of horses kept in similar feeding and environmental conditions. Catosal was administered i.m. at a daily dose of 20 ml per animal for 6 days. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, total antioxidant status and ceruloplasmine, malondialdehyde and ascorbic acid levels were measured. Furthermore haematological parameters were determined. Determinations were performed before Catosal was administered and at the 2nd and 7th days after the last injection. Results showed a significant temporal rise of the superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity. A week after the last injection of Catosal a significant rise in the total antioxidant status, ceruloplasmine level and the number of erythrocytes was ascertained. At the same time an improvement of the horses general health status indicated by increased appetite and more vivid temperament was also observed.

Od chwili poznania znaczenia tzw. wolnych rodników w procesach fizjologicznych i patologicznych organizmów aerobowych rozpoczęto intensywne badania nad systemami ochronnymi komórek przed szkodliwym działaniem tych form. Zaburzenie równowagi między powstawaniem atomów lub cząsteczek z niesparowanym elektronem na zewnętrznej orbicie, ich wykorzystywaniem i unieszkodliwieniem może stać się przyczyną rozwoju stanów patologicznych komórek, tkanek i narządów (3, 4, 8, 15, 25). Dobrze poznane są reakcje wolnorodnikowe reaktywnych form tlenu (RFT). Lista poznanych RFT i form pokrewnych obejmuje 27 różnych atomów i cząsteczek, które są bezpośrednią lub pośrednią przyczyną destrukcyjnych reakcji. Jednym z następstw nadmiernej aktywności procesów oksydacyjnych są zapalenia. W ognisku zapalnym powstają wysokie stężenia RFT uwalniane przez pobudzone fagocyty (4, 26). Reakcje wolnych rodników tlenowych z substancjami wewnątrzkomórkowymi zapoczątkowują uwalnianie kolejnych aktywnych form tlenu w przylegających tkankach. Zapoczątko-

wane w tym mechanizmie reakcje chemiczne prowadzą do zmiany aktywności biologicznej kwasów nukleinowych, lipidów, cukrów i innych związków organicznych z naruszeniem ich struktur molekularnych. Zaburzenia równowagi reakcji peroksydacyjno-antyoksydacyjnych prowadzących do przewagi procesów utleniania określone zostało terminem stresu oksydacyjnego (4, 25). Skutki tych procesów stanowią stan podwyższonego ryzyka zachorowań ludzi i zwierząt. Udział powstających w nadmiarze wolnych rodników tlenowych wykazano w etiopatogenezie około 50 różnych jednostek chorobowych między innymi nowotworów, rozedmie płuc, ostrym zapaleniu trzustki i szeregu chorób metabolicznych (9, 10, 24).

Organizmy tlenowców dysponują całymi systemami wewnątrz- i zewnątrzkomórkowymi chroniącymi przed reaktywnymi formami tlenu, pozwalającymi na utrzymanie stałej równowagi między powstawaniem wolnych rodników i ich neutralizacją. Taka rolę pełni szereg enzymów antyoksydacyjnych: dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza, reduktaza, transferaza glutationowa i szereg innych. Niektóre białka wiążące jony metali, takie jak ceruloplazmina, transferyna, laktoferyna, haptoglobina, hemopeksyna, albumina, stanowią zabezpieczenie przed powstawaniem rodników wodorotlenowych z udziałem jonów żelaza, miedzi i innych metali (4, 11, 12, 14, 17, 27).

W osoczu krwi znajduje się cały zestaw antyoksydantów endogennych powstających w wyniku przemian metabolicznych np. bilirubina, kwas moczowy, glutation, pirogronian jak również zewnątrz pochodnych jak tokoferole, karoteny i askorbinian. Stres oksydacyjny powoduje wyczerpanie poszczególnych antyoksydantów w określonej kolejności.

Z dotychczasowych badań wynika, że najszybciej zużywany jest askorbinian, następnie grupy tiolowe białek >bilirubina>kwas moczowy i α -tokoferol (4). Zapobieganie peroksydacji lipidów przez osocze krwi przyjęto jako wykładnik całkowitej zdolności zmiatania wolnych rodników (Total Radical-trapping Antioxidant Parametr TRAP). Mimo niedoskonałości wskaźnik ten jest jednym z częściej badanych wyznaczników intensywności procesów indukowanych przez reaktywne formy tlenu (RFT) (21).

Konie jako gatunek zwierząt o szczególnie wysokim zużyciu tlenu w procesach przemian energe-

tycznych, stanowią interesujący model do badania systemu antyoksydacyjnego i prób modulowania tego układu w różnych procesach patologicznych. W piśmiennictwie lat 90-tych zaczęły pojawiać się publikacje na temat antyoksydantów u tego gatunku zwierząt. Norelli i wsp. (19) stwierdzili wyższe stężenie SOD i ceruloplazminy u samców, przy czym u dorosłych były one wyższe niż u źrebiąt i młodych koni. Inni autorzy badali wpływ różnych dodatków paszowych na wybrane parametry stanu antyoksydacyjnego koni (2, 5, 16). W kilku pracach określono wpływ selenu i witaminy E na stan antyoksydacyjny oraz różne aspekty stanu zdrowia i wydajności wysiłkowej (2, 6, 8, 20). Avellini (1) sugeruje, że u koni szczególnie intensywne procesy przemian tlenowych w czasie wysiłku mogą prowadzić do wyczerpania antyoksydantów zewnątrz i wewnątrzkomórkowych. Nadmiar powstających reaktywnych form zapoczątkowuje miopatie i hemolizę powysiłkową.

Celem pracy było ustalenie wartości wyjściowych wybranych wskaźników systemu antyoksydacyjnego koni oraz sprawdzenie możliwości modulowania tego układu.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w okresie lutego i marca na 6 koniach użytkowanych w celach rekreacyjnych pozostających w jednakowych warunkach żywieniowo-bytowych. Jako modulatora w doświadczeniu użyto Catosal ze względu na efektywność farmakologiczną tego preparatu. Składnik Catosalu butafosfan jest donatorem fosforu, związkiem stymulującym syntezę białka, ATP i innych bogatoenergetycznych substancji. Pośrednio spełnia również istotną rolę w procesie wiązania tlenu przez hemoglobinę, wzmacnia aktywność fagocytarną granulocytów. Drugi składnik tego preparatu – cyjankobalamina jest kofaktorem koenzymu A, poprzez udział w metabolizmie kwasu foliowego zapewnia prawidłową syntezę DNA i erytropoezę. Biologiczna aktywność tego preparatu uzasadnia przypuszczenie, że może mieć wpływ na wskaźniki stanu antyoksydacyjnego koni (13). Konie przed doświadczeniem badano klinicznie, wykonywano pomiar temperatury, tętna i oddechów. Dane te zestawiono w tab. 1.

Tab. 1. Charakterystyka koni użytych w doświadczeniu

Nr	Wiek (lata)	Płeć	Masa ciała (kg)	Maść	Stan kliniczny
1	10	klacz	400	siwa	ok. 4 tyg. po przechorowaniu grypy, czerniaki u nasady ogona
2	8	wałach	600	gniada	sezonowo-objawy duszności, kaszel (COPD)
3	13	klacz	400	kasztanowata	w okresie doświadczenia wszystkie konie bez objawów klinicznych. Temperatura, tętno, oddechy w normie
4	15	klacz	450	gniada	
5	3	klacz	350	gniada	
6	3	ogier	500	gniada	

Krew pobierano z żyły jarzmowej zewnętrznej w odstępach tygodniowych. Po pierwszym pobraniu koniom podano w iniekcji domięśniowej Catosal w dawkach 20 ml/szt./dziennie przez 6 dni. Następnie pobierano krew w drugim i siódmym dniu po ostatniej iniekcji. Oznaczono następujący zestaw antyoksydantów: dysmutazę nadadtlenkową SOD (J/g hemoglobiny), całkowity stan antyoksydantów TAS (IV/1), peroksydazę glutationową GPX (J/l hemolizatu), witaminę C ($\mu\text{mol/l}$), ceruloplazminę CP ($\mu\text{mol/l}$) oraz dialdehyd malonowy ($\mu\text{mol/l}$), SOD, TAS, GPX – oznaczano testami diagnostycznymi firmy Randox, SOD – wg metody testu Ransod, GPX – testami diagnostycznymi Ransel, TAS-testem Randox (21, 22, 23), ceruloplazminę oznaczano metodą Sundermana i Nomoto, dialdehyd malonowy i witaminę C oznaczano wg Grysa (7). Oznaczenia wskaźników hematologicznych wykonano metodą półautomatyczną przy użyciu aparatu firmy Hycel typ HC-510. Oznaczano stężenie hemoglobiny Hb (g/dl), hematokryt Ht (l/l) średnią objętość erytrocytów MCV (fl), liczbę leukocytów (G/l) oraz wykonano ocenę obrazu krwinkowego w preparatach barwionych metodą May-Grünwalda-Giemsa.

Wyniki poddano analizie statystycznej testem t-Studenta.

Wyniki i omówienie

Z zespołu enzymów o antyoksydacyjnej aktywności najczęściej wykorzystywanymi wskaźnikami w ocenie stanu antyoksydacyjnego organizmu jest dysmutaza nadadtlenkowa (SOD) – enzym rozkładający reaktywne formy tlenu oraz peroksydaza glutationowa (GPX) – katalizująca reakcje między glutationem a nadadtlenkiem wodoru. Stan antyoksydacyjny zależy także od stężenia ceruloplazminy – białka ostrej fazy, hamującego utlenianie lipidów i usuwającego rodniki anionu nadadtlenkowego. Wskaźniki te oznaczone przed podaniem Catosalu były o zbliżonych wartościach u wszystkich zwierząt. Po 6-dniowym stosowaniu Catosalu odnotowano istotny wzrost aktywności SOD i GPX, przy czym wartość aktywności SOD szczególnie znacząco wzrosła u koni nr 1 i 2 obciążonych przebytymi i istniejącymi stanami chorobowymi (tab. 1). U koni tych 2 dni po ostatniej iniekcji w porównaniu do wartości wyjściowych wartość SOD wzrosła o 32 i 19 J/gHB.

Tab. 2. Aktywność oraz stężenie wskaźników antyoksydacyjnych krwi koni przed i po podaniu Catosalu (n = 6, $\bar{x} \pm J$)

Antyoksydant	I	II	III
Dysmutaza ponadtlenkowa SOD (J/g Hb)	74,16 \pm 8,39	90,46** \pm 11,63	78,72 \pm 9,84
Peroksydaza glutationowa GPX (J/l hemol)	266,85 \pm 25,90	412,02* \pm 111,57	209,05 \pm 50,53
Całkowity stan antyoksydacyjny TAS (JU/l)	0,02 \pm 0,02	0,02 \pm 0,02	0,07** \pm 0,03
Ceruloplazmina CP μ mol/l	0,88 \pm 0,12	0,98 \pm 0,06	1,04* \pm 0,08
Dialdehyd malonowy DM μ mol/l	2,00 \pm 0,08	2,02 \pm 0,09	2,08 \pm 0,11
Askorbinian AC μ mol/l	52,99 \pm 8,39	59,85 \pm 3,89	55,87 \pm 16,54

Objaśnienia: różnica statystycznie istotna: *p < 0,05, **p < 0,01, I – przed podaniem Catosalu, II – 2 dni po 6-dniowym podawaniu Catosalu, III – 7 dni po ostatniej iniekcji Catosalu

Tab. 3. Średnie wartości wskaźników hematologicznych (n = 6, $\bar{x} \pm J$)

Parametr	I	II	III
Hemoglobina HbG/dl	12,82 \pm 1,72	13,80 \pm 1,66	12,95 \pm 1,22
Hematokryt Ht-l/l	0,24 \pm 0,03	0,25 \pm 0,02	0,30** \pm 0,05
Erytrocyty Erytr. T/l	7,93 \pm 1,34	7,79 \pm 1,37	9,92* \pm 2,0
Średnia objętość erytrocytów MCV fl.	31,03 \pm 1,94	32,50 \pm 3,25	31,42 \pm 1,96
Leukocyty leuk. G/l	6,55 \pm 1,47	6,32 \pm 1,20	7,22 \pm 1,20
Granulocyty obojętnochłonne G/l	3,45 \pm 0,62	3,25 \pm 0,96	3,97 \pm 0,75
Limfocyty G/l	2,92 \pm 1,13	2,71 \pm 0,58	3,14 \pm 0,69

Objaśnienia: jak w tab. 2.

W całej grupie koni wzrost stężenia tego parametru był wysoko znamieny. Po tygodniu wartości dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy glutationowej obniżyły się. Stężenie ceruloplazminy i całkowita zdolność antyoksydacyjna (TAS) statystycznie istotnie wzrosła ($p \leq 0,01$) tydzień po zakończeniu podawania Catosalu. W tym czasie stężenie witaminy C nie uległo istotnym zmianom.

Dialdehyd malonowy (DM) – jeden z głównych produktów peroksydacji lipidów w naszym doświadczeniu okazał się być bardzo stabilnym wskaźnikiem. U wszystkich koni stężenie DM wynosiło ok. 2 μ mol/l, nie zmieniło się po stosowaniu Catosalu (tab. 2).

W badaniach hematologicznych odnotowano statystycznie istotny wzrost liczby erytrocytów ($p \leq 0,05$) i wskaźnika hematokrytowego ($p \leq 0,01$) tydzień po zakończeniu podawania Catosalu (tab. 3). Po tygodniu stosowania Catosalu widocznie poprawił się stan ogólny koni. Konie ożywiły się, chętniej biegały, demonstrowały wzmożony temperament, obserwowano poprawę apetytu. Mała liczba zwierząt użytych w doświadczeniu nie pozwala na wyciągnięcie daleko idących wniosków. Uzyskane wyniki upoważniają jednak do stwierdzenia, że wybrane wskaźniki stanu antyoksydacyjnego a zwłaszcza dysmutaza ponadtlenkowa i peroksydaza glutationowa stanowią czuły wykładnik stanu antyoksydacyjnego

koni. Po przejściowym wzroście wartości tych wskaźników tydzień po stosowaniu Catosalu istotnie zwiększył się całkowity stan antyoksydacyjny, wzrosło stężenie ceruloplazminy, liczby erytrocytów i hematokryt.

Piśmiennictwo

1. Avellini L., Silvestrelli M., Gaiti A.: Vet. Res. Comm. 19, 179, 1995.
2. Avellini L., Chiaradia E., Rueca F.: Pferdeheilkunde 12, 557, 1996.
3. Bacon B. R., Britton R. S.: Chem. Biol. Interactions. 70, 183, 1989.
4. Bartosz G.: Druga twarz tlenu. PWN, Warszawa, 1995.
5. Block G.: Nutrition Rev. Vol 50 n.7.207, 1992.
6. Dillon D. A., Bump K. D., Lawrence L. M.: Journ. of Equine Vet. Science 10, 15, 380, 1990.
7. Grys S.: Mat. XV Konf. Bioch ZHW, Łomża, 1988, s. 166 i 171.
8. Halliwell B., Gross., Gutteridge I. M. C.: J. Lab. Clin. Med. USA, 119, 598, 1992.
9. Jendryczko A.: Molekularne czynniki w patomechanizmie powstawania doświadczalnej kolagenozy. Praca hab. AM Katowice, 1986.
10. Jenner P.: Lancet 344, 796, 1994.
11. Kleczkowski M.: Ocena procesów peroksydacji w tkankach buhajów karmionych dodatkowo miedzią, cynkiem, molibdenem i siarką siarczanową.: Praca hab. SGGW Warszawa, 1991.
12. Kleczkowski M., Kluciński W., Sikora J., Strzeziński S., Wojewoda L., Dziekan P.: IV forum Ekologiczne, 322, 1995.
13. Kluciński W., Sitarzka E., Lechowski R., Czerwiecki W., Winnicka A.: Magazyn Wet. 5, 434, 1996.
14. Madej Z.: Medycyna Wet. 46, 413, 1990.
15. Malec J.: Wiad. Lek. XLII, 19, 1989.
16. Meentzen B.: Per und antioxidativer Stoffwechsel des Pferdes bei Fütterung oxidierter Futterfette – Hannover p. 153, 1995.
17. Milanino R., Rainford K. D., Velo P. G.: Cooper and zinc in inflammation. Kluwe Academic Publishers, Dordrecht, 1989.

18. Mihailovic M., Zlic V., Lindberg P.: Acta Vet., Beograd 46, 27, 1996.
19. Novelli E. L. B., Rodriguez N. L., Chicchio S. B.: Acta Hung. 41, 151, 1993.
20. Ono K., Inui K., Hasegawa T., Matsuki N.: Jap. J. Vet. Sci., 52, 759, 1990.
21. Randox laboratories LTD.: Randox manual procedures. TAS, 2, 10, 91, 1996.
22. Randox laboratories LTD.: Randox manual procedures superoxidate dismutase. 27, 2, 90, 1996.
23. Randox laboratories LTD.: Randox manual procedures glutathione peroxidase, 1/8, 88, 1996.
24. Smart D., Melusker C. M., Lamont J. V.: Internal Congres of elin Chemistry, London 548, 1996.
25. Stes H.: Oxidative Stress. Acad. Press. New York, 1985.
26. Van der Vlet, Bast A.: Free Rad. Biol. Med. 12, 499, 1992.
27. Wayner D. D. M.: Free Rad. Biol Med. 2, 419, 1996.

Adres autora: prof. dr hab. Ewa Sitarska, ul. Międzynarodowa 20/14, 03-922 Warszawa

WŁODZIMIERZ KLUCIŃSKI, ANNA WINNICKA, JERZY KAWIAK*, GRAŻYNA HOSER*,
BARBARA MIKS*, ROBERT BAŃKOWSKI, EWA SITARSKA, MIROSLAW KLECZKOWSKI

Analiza subpopulacji limfocytów krwi obwodowej przeżuwaczy metodą cytometrii przepływowej*)

Katedra Chorób Wewnętrznych Wydziału Weterynaryjnego SGGW, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

*Zakład Cytologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa

Summary

Examination of ruminant lymphocyte subpopulations by flow cytometry

Flow cytometry is one of the most modern methods of qualitative and quantitative evaluation of cells, e.g. blood cells. Different cell populations are analysed separately by „leucogate”, being distinguished by their scatter (forward and side) profiles.

The aim of the research was to establish reference values of lymphocyte subpopulations in ruminants by FACS analysis. Whole blood samples were analysed. Populations of leukocytes were determined with a set of specific monoclonal antibodies against: CD45, CD14, CD2, CD4, CD8, CD 19, while „null” populations were labelled FITC and PE. Erythrocytes were lysed with FACS lysing solution. Data acquisition and analysis were done with SimulSet in FACStrak (Becton Dickinson) and additionally analysed with the PC-Lysis program. Obtained results have been presented as a mean of percent and total numbers per liter with a standard deviation. Statistical differences between the results obtained in the research of ruminant species were observed. The presented studies have shown that the above methods can be useful in the phenotyping of animal cells.

rzeń. Do nowej generacji metod tej kategorii należy cytometria przepływowa umożliwiająca precyzyjną ocenę jakościową i ilościową elementów morfotycznych we krwi oraz w innym materiale. Podstawą badania materiału biologicznego przy użyciu analizatora – cytofluorymetru jest prawidłowo przeprowadzona reakcja immunologiczna z właściwymi przeciwciałami monoklonalnymi. Właśnie produkcja i dostępność przeciwciał monoklonalnych stały się bodźcem do rozwoju tej metody badawczej. Główną zaletą przeprowadzenia analizy cytometrycznej jest możliwość zbadania dużej liczby komórek (kilkadziesiąt tysięcy) w różnym materiale biologicznym (krew, szpik kostny, węzły chłonne, wypłuczyny pęcherzykowo-oskrzelowe, mleko). Badanie to prowadzi do ustalenia immunofenotypu komórek, co może być pomocne w diagnostyce chorób układu krwiotwórczego, chorób płuc, chorób autoimmunizacyjnych i nowotworowych, a także wrodzonych i nabytych niedoborów immunologicznych oraz stanów immunosupresji. Metoda ta zastąpiła m.in. stosowaną dotychczas ocenę ilości limfocytów T przy pomocy testu rozetkowego i poszerzyła badania immunofluorescencyjne przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (5).

Ponadto przy pomocy cytometrii przepływowej można określić stan czynnościowy pojedynczych komórek i ich substruktur poprzez pomiar zawartości DNA, poszukiwanie ekspresji określonych białek i sekwencji nukleotydów RNA, obserwację aktywacji komórek czy wreszcie opis mechanizmów śmierci komórki (7, 10).

Postęp jakiego dokonano w ostatnich 20 latach w zakresie konstrukcji aparatury spektrofluometrycznej opartej na technikach komputerowych spowodował niezwykle szybki rozwój nowych metod badawczych, które nabierają coraz większego znaczenia w diagnostyce laboratoryjnej wielu scho-

*) Praca częściowo finansowana z grantu KBN 5 S 31002206