

Wybrane wskaźniki stanu oksydacyjnego koni przed okresem intensywnego użytkowania rekreacyjnego i w trakcie jego trwania*)

HANNA BIS-WENCEL, LEON SABA, JUSTYNA ODÓJ,
BOŻENA NOWAKOWICZ-DĘBEK, BARTŁOMIEJ KAPROŃ

Pracownia Biologii Rozrodu Katedry Higieny Zwierząt i Środowiska Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt AR,
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Bis-Wencel H., Saba L., Odój J., Nowakowicz-Dębek B., Kaproń B.

Chosen elements of horses' antioxidant system before and during high-activity periods

Summary

Horses are a species which is particularly exposed to a high consumption of oxygen. Therefore they are good models for antioxidant system examinations, especially during high-activity periods.

The examinations covered 10 saddle half-bred horses in herd „N” in the Central Pomorze region. The horses were used for recreational purposes. Previous examinations had indicated that the horses' blood serum contained low levels of Cu and Fe, independently of the intensity of their effort.

The aim of the examination was to define the antioxidant level of some specific elements of the blood serum. Blood serum examinations were carried out three times: firstly in April (low activity period), secondly in July, and thirdly in August (the highest activity period). The levels of protein, total glutathione (GSH+GSSG), peroxides in aqueous solution, lipid peroxides and superoxide dismutase EC-SOD activity were defined.

The result of the examinations indicate that the level of the antioxidant system parameters decreased and the level of protein increased during periods of high activity.

Keywords: antioxidant system, glutathione, peroxides, superoxide dismutase EC-SOD

Potwierdzeniem stanu deficytu biopierwiastka w układzie troficznym jest ustalenie jego niedoboru funkcjonalnego poprzez badanie tkanek stanowiących jego naturalny rezerwuár. Genetycznie i biogeochemicznie zróżnicowana efektywność mechanizmów homeostazy ustrojowej m.in. miedzi, magnezu, manganu i selenu określa wielkość zapotrzebowania na te składniki i decyduje o podatności na ich niedobór oraz jego klinicznej manifestacji (3). Zdaniem innych autorów (5, 6, 9) znacznie czulszym wykładnikiem niedoboru pierwiastków jest pomiar aktywności wybranych enzymów, stanowiących kluczową rolę w systemie obronnym organizmu przed wolnymi rodnikami (4). Konie jako gatunek zwierząt szczególnie narażonych na wysokie zużycie tlenu w procesach przemian energetycznych stanowią interesujący model badania systemu antyoksydacyjnego organizmu, zwłaszcza w czasie wysiłku, kiedy to procesy przemian tlenowych są wyjątkowo intensywne (13). W warunkach fizjologicznych wolne rodniki są inaktywowane przez obecne w komórkach tzw. zmiatacze. Należy do nich m.in. sekwestr metali, polegający na przechowywaniu w formie niedostępnej dla reakcji Habera-Weissa niewykorzystanych przez organizm jonów metali, m.in. Fe i Cu. Efekt

ten wzmacnia niedobór biopierwiastków w układzie troficznym, szczególnie tych uznanych jako bezpośrednio hamujące reakcje nadtlenkowego utleniania lipidów (16).

We wcześniejszych badaniach własnych (2) poddano badaniu inwentaryzacyjnemu wybrany rejon geochemiczny Pomorza Środkowego, na którym zlokalizowane było stado koni wierzchowych półkrwi. W surowicy badanych zwierząt stwierdzono niskie poziomy miedzi i żelaza, niezależnie od obciążenia fizycznego zwierząt. Uznano więc za celowe poszerzenie badań o pomiar wybranych elementów stanu oksydacyjnego koni.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w stadzie „N” usytuowanym na Pomorzu Środkowym. Do badań wybrano 10 koni wierzchowych półkrwi o równej liczbie zwierząt obu płci, w wieku 4-6 lat, o wyrównanych parametrach hodowlanych, klinicznie zdrowych, utrzymywanych w celach rekreacyjno-sportowych. Przez cały okres badań zwierzęta utrzymywane były w stajni o prawidłowych parametrach zoohigienicznych zalecanych dla tego gatunku. Żywnienie koni oparte było o pasze pochodzenia lokalnego: zielonka (siano), słoma owsiana, ziarno owsa, z uwzględnieniem średniej dawki pokarmowej dla tego gatunku zgodnie z Normami ży-

*) Praca finansowana przez KBN nr projektu 5PO6K 021 19.

wienia koni (12). Ustalając dawki uwzględniono dwa okresy użytkowania koni. W pierwszym, który przypadał na kwiecień, konie otrzymywały po 5 kg siana, 2 kg słomy owsianej i 3 kg ziarna owsa, a w drugim okresie, intensywnego użytkowania – w lipcu i sierpniu odpowiednio 3 kg siana, 5 kg ziarna owsa i 15 kg zielonki z pastwiska.

Krew do oznaczeń pobierano z żyły powierzchownej szyjnej, w godzinach porannych przed pojeniem i żywieniem zwierząt. Terminy pobrań ustalono na podstawie okresowej eksploatacji koni, tj. pierwsze pobranie w kwietniu, w okresie roztrenowania, drugie i trzecie w miesiącach intensywnego użytkowania wierzchowego. Badania surowicy objęły oznaczenie poziomu białka, całkowitego stężenia glutationu, nadtlenców w fazie wodnej i organicznej oraz aktywności dysmutazy ponadtlenkowej EC-SOD. Poziom białka oznaczono metodą Lowrego (1).

Oznaczenia całkowitego stężenia glutationu (GSH+GSSG) dokonano wg metody Akerbooma i Siesa (1). Czułość tej metody uwarunkowana jest katalitycznym działaniem glutationu w układzie, w którym ulega on cyklicznemu utlenianiu przez DTNB i redukcji przez NADPH. W badaniach posłużono się metodą wykrywania H_2O_2 w roztworach wodnych, w przedziale 1-7 nmol w reakcji objętościowej, przy użyciu zestawu Peroxi Detect KIT, SIGMA. Jej mechanizm polega na reakcji nadtlenu wodoru z Fe^{2+} , którego utlenienie w Fe^{3+} wyraża się reakcją barwną, aktywną przy długości światła 560 nm. W roztworach wodnych zawierających H_2O_2 reakcję kolorymetryczną otrzymuje się przez dodanie sorbitolu do pozostałych odczynników.

Pomiaru poziomu nadtlenców lipidów dokonano za pomocą tego samego zestawu, na bazie odczynnika metanoloowego, zawierającego oranż ksilenolu i maślan hydroksytoluenu (BHT). BHT jest antyoksydantem i chroni reagenty przed powolną oksydacją tłuszczów.

Pomiaru aktywności EC-SOD dokonano metodą adrenalinową wg Misra (1) w modyfikacji dla długości fali światła 320 nm. Metodę zmodyfikowano ze względu na większą jej selektywność dla przejściowych produktów reakcji przy tej długości światła.

Uzyskane wyniki poddano dostosowanej analizie statystycznej wykorzystując metodę ANCOVA. Wartości pierwiastków w poszczególnych pobraniach scharakteryzowano średnią arytmetyczną ($\bar{x}$), odchyleniem standardowym (s) i współczynnikiem zmienności V%. Szczegółowego porównania średnich dokonano testem Tukey'a przy $p \leq 0,05$.

Wyniki i omówienie

Z bilansu dawek pokarmowych (tab. 1) wynika, że konie otrzymywały większe ilości Mg i Fe, a mniejsze Cu i Zn w stosunku do norm ich żywienia (12).

Średni poziom białka u badanych koni mieścił się w granicach wartości referencyjnych i był porównywalny z wielkościami prezentowanymi przez innych autorów (7, 8, 14, 15). Stwierdzono wzrost jego po-

Tab. 1. Wartość pokarmowa dawek dla koni w różnych okresach ich użytkowania

Rodzaj paszy	Zawartość poszczególnych składników w 1 kg paszy						
	s.m. kg	b.o. str. G/kg	MJEN kg	Mg g	Fe mg	Cu mg	Zn mg
Siano	0,85	32	2,24	0,89	108,29	1,79	18,45
Słoma	0,85	10	1,29	0,34	103,45	0,35	10,80
Owies	0,875	84	5,78	5,43	172,03	6,07	63,30
Pastwisko	0,25	35	1,06	0,43	32,23	0,73	6,95
Termin żywienia	Zawartość składników w dawce pokarmowej						
Kwiecień	8,575	432	31,152	21,5	1264,4	27,8	303,8
Lipiec/sierpień	10,675	1041	51,566	36,33	1668,37	46,59	476,16

Tab. 2. Poziomy wybranych parametrów stanu oksydacyjnego w surowicy koni (n = 10)

Parametry	Pobranie	$\bar{x} \pm s$	V%	p
Białko mg/ml	1	85,92 $\pm$ 2,59	3,01	a
	2	88,27 $\pm$ 4,95	5,60	a
	3	92,54 $\pm$ 5,78	6,25	b
Glutation nmol/l	1	149,22 $\pm$ 1,42	0,95	c
	2	143,77 $\pm$ 6,83	4,75	b
	3	136,22 $\pm$ 4,94	3,63	a
Nadtlenki w fazie wodnej nmol/ml	1	114,81 $\pm$ 41,50	36,15	a
	2	103,27 $\pm$ 11,00	10,65	a
	3	95,15 $\pm$ 16,13	16,96	a
Nadtlenki w fazie organicznej nmol/ml	1	300,59 $\pm$ 46,95	15,62	b
	2	257,81 $\pm$ 40,01	15,52	a
	3	237,37 $\pm$ 71,98	30,32	a
EC-SOD U/ml	1	6,29 $\pm$ 1,79	28,59	b
	2	5,76 $\pm$ 0,55	9,71	b
	3	4,64 $\pm$ 0,85	18,34	a

Objaśnienie: a, b, c – istotność różnic między pobraniami; średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy ($p \leq 0,05$).

ziomu od wartości 85,92 g/dl w pierwszym pobraniu do 92,54 g/dl w trzecim pobraniu, przy czym statystycznie istotne różnice dotyczyły pobrania trzeciego (tab. 2).

Glutation należy wprowadzić do antyoksydantów działających na zasadzie mechanizmu nieenzymatycznego, ale jest on najbardziej rozpowszechnionym tiolem występującym w komórkach ssaków w wysokich stężeniach rzędu 1-10 mmol/l⁻¹. Główną funkcją glutationu jest utrzymywanie grup tiolowych białek w stanie zredukowanym, co w bardzo wielu przypadkach jest niezbędne dla funkcjonalnej aktywności białek. Grupy karboksylowe uczestniczą w wiązaniu glutationu z peroksydazą glutationową podczas reakcji rozkładu utleniaczy (nadtlenków lipidów i nadtlenu wodoru) w organizmie. Poziom glutationu jako markera

antyoksydacyjnego stanu organizmu wzbudza kontrowersje na tle faktu, że obniżenie jego stężenia do połowy wartości uznanych za referencyjne (1) nie zawsze powoduje zauważalne konsekwencje metaboliczne. Przyjmuje się, że nawet przy stężeniach glutationu rzędu $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ aktywność enzymów z nim współdziałających nie zawsze odbiega od normy (1). Stwierdzono natomiast znaczny spadek glutationu zarówno we krwi pełnej, jak i osoczu ludzi z zespołem obniżonej odporności. W badaniach wykazano statystycznie istotny spadek poziomu glutationu w miarę wzrostu intensywności wysiłku fizycznego koni. Wartości zmieniały się od $149,22 \text{ nmol/l}$ do $136,22 \text{ nmol/l}$.

Organizmy żywe zawierające specjalne enzymy katalizujące rozkład reaktywnych form tlenu. Należy do nich m.in. dysmutaza ponadtlenkowa (E. C. 1.15.1.1.) EC-SOD (superoxide dismutase), uznana jako porównywalna z ceruloplazminą (E. C. 1.16.3.1.) (11, 12). U Eukariota wyróżnia się trzy typy SOD: MnSOD mitochondrialny, CuZnSOD cytoplazmatyczny i EC-SOD pozakomórkowy (extracellular SOD). Pozakomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa podobnie jak SOD komórkowa zawiera w swojej cząsteczce jony miedzi i cynku, lecz jej występowanie w organizmie ogranicza się do osocza krwi, oraz innych płynów komórkowych m.in. limfy, płynu maziowego, czy płynu śródmiąższowego tkanek. Wyróżnia się trzy podtypy EC-SOD: A, B i C, przy czym w organizmie człowieka i zwierząt syntetyzowany jest głównie typ C. Poprzez analogię do miejscowego specyficznego tworzenia rodnika $\cdot\text{OH}$ niektórzy autorzy (1, 11) traktują EC-SOD jako „miejscowo specyficzny” enzym ochronny. Obecność pozakomórkowych, tetrametrycznych SOD zawierających jony miedzi i cynku stwierdzono również u ptaków i ryb (12).

Uzyskane wartości dysmutazy ponadtlenkowej przedstawiono w tab. 2. Średnia aktywność EC-SOD ulegała statystycznie istotnemu zmniejszeniu w miarę zwiększania wysiłku fizycznego koni, osiągając wartości w przedziale $6,29\text{--}4,64 \text{ U/l}$, prezentowane przez Markulanda (11). W surowicy ludzkiej aktywność EC-SOD określono na około 20 U/ml , co stanowi dwukrotnie mniejszą wartość w porównaniu do aktywności ceruloplazminy. U takich gatunków zwierząt jak szczury stwierdzono dominujący wpływ EC-SOD w osoczu (12). Wydaje się, że w diagnostyce mechanizmów obronnych przed stresem oksydacyjnym rola pozakomórkowej dysmutazy ponadtlenkowej wzrosła z chwilą potwierdzenia istnienia reakcji wiązania enzymu do powierzchni komórek śródbłonna (11).

W układach biologicznych równie ważne jest określanie poziomu nadtlenu, które stanowią istotny wskaźnik aktywności wolnych rodników tlenowych w poszczególnych tkankach. Określenie poziomu nadtlenu wodoru w tkankach jest wykorzystywane wieloletowo, jako wyznacznik uszkodzeń badanych tkanek przez wolne rodniki zarówno w trakcie wielu procesów chorobowych, jak też w procesach starzenia się

organizmu, oraz wywoływanych promieniowaniem UV. Stwierdzono patogenny efekt działania H_2O_2 jako potencjalnego mitogenu w etiopatogenezie miażdżycy i zapalenia naczyń. Poziomy nadtlenu w fazie wodnej ($\text{O}_2^{\cdot-}$) stanowią odzwierciedlenie dysmutazy ponadtlenkowej żelazo- i miedziozależnej.

Uzyskane wartości nadtlenu w fazie wodnej przedstawione w tab. 2 wykazują podobną tendencję do obniżania się poziomów w miarę zwiększania intensywności użytkowania wierzchowego koni, chociaż zmiany te nie były statystycznie istotne. Poziomy nadtlenu w fazie organicznej określają poziom produktów procesów peroksydacji lipidów w organizmie koni. Otrzymane średnie wielkości również ulegały statystycznie istotnemu obniżeniu w miarę intensyfikacji treningu, osiągając wartości od $300,59 \text{ nmol/l}$ do $237,37 \text{ nmol/l}$.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że pod wpływem wzmożonego wysiłku fizycznego koni poziom badanych parametrów stanu oksydacyjnego zwierząt charakteryzował się tendencją spadkową. Jedynie zawartość białka wykazywała wyraźny wzrost. Brak jest badań, do których można by odnieść uzyskane wyniki, dlatego przedstawione wartości należy traktować jako badania wstępne. Wydaje się, że wyniki randomizowanych badań klinicznych pozwolą szerzej spojrzeć na badany problem.

Piśmiennictwo

1. Bartosz G.: Druga twarz tlenu. PWN, Warszawa 1995.
2. Bis-Wencel H., Saba L., Wnuk W., Nowakowicz-Dębek B., Krzyszycha J.: Ocena stanu mineralnego koni w układzie troficznym, z uwzględnieniem aktywności wybranych enzymów w surowicy przed okresem intensywnego użytkowania rekreacyjnego i w trakcie jego trwania. Medycyna Wet. (praca złożona do druku).
3. Gehrke M.: Miedź i mangan w patogenezie chorób układu kostnego zwierząt. Medycyna Wet. 1997, 53, 644-646.
4. Jaśkowski J. M., Lachowski A., Gehrke M.: O diagnozowaniu i ocenie niedoborów miedzi, seleniu, kobaltu i manganu u bydła i owiec. Medycyna Wet. 1993, 49, 306-308.
5. Kędzierski W., Podolak M.: Zmiany metaboliczne u koni w procesie ujeżdżania. Medycyna Wet. 2001, 57, 207-209.
6. Kleczkowski M., Kluciński W., Sitarska E., Sikora J.: Stres oksydacyjny i wybrane wskaźniki stanu oksydacyjnego zwierząt. Medycyna Wet. 1998, 54, 166-171.
7. Krumych W., Wiśniewski E.: Wpływ płci na wartości biochemicznych wskaźników krwi koni. Medycyna Wet. 1993, 49, 327-328.
8. Krumych W., Wiśniewski E., Danek J., Dąbrowska J.: Sezonowa zmienność składników mineralnych, glukozy i białek we krwi koników polskich. Medycyna Wet. 1995, 51, 168-169.
9. Krumych W., Kędzierski W., Podolak M.: Zmiany metaboliczne u koni w procesie ujeżdżania. Medycyna Wet. 2001, 57, 207-209.
10. Markuland S. L., Holme L., Hellner L.: Superoxide dismutase in extracellular fluids. Clin. Chim. Acta 1982, 126, 41-51.
11. Markuland S. L.: Ceruloplasmin, extracellular-superoxide dismutase, and scavenging of superoxide anion radicals. J. Free Rad. Biol. Med. 1986, 2, 255-260.
12. Normy żywienia koni, Omnitech Press Warszawa 1994, s.20-35.
13. Sitarska E., Kleczkowski M., Kluciński W., Ładysz R., Górecka R., Dziekan P.: Stan antyoksydacyjny koni i próba modulacji tego układu. Medycyna Wet. 1997, 53, 585-587.
14. Szarska E.: Ocena koni startujących we wszechstronnym konkursie konia wierzchowego. Życie wet. 2001, 76, 379-381.
15. Szarska E.: Ocena wydolności koni na podstawie zmian wybranych wskaźników krwi badanych w spoczynku, po wysiłku i po okresie restytucji. Medycyna Wet. 1990, 46, 452-453.
16. Wieleba E., Pasternak K.: Pierwiastki śladowe w systemie antyoksydacyjnym zwierząt. Medycyna Wet. 2001, 57, 788-791.

Adres autora: dr hab. Hanna Bis-Wencel, ul. Bychawska 1/8, 24-200 Bełżyce