

Ekspresja genu VEGF-A, VEGF-B oraz receptorów Flk-1 i Flt-1 w nerce szczurów Sprague Dowley z utrwalonym brakiem lewej zstępującej tętnicy wieńcowej

ARKADIUSZ GRUHLIK, DOROTA DOMAL-KWIATKOWSKA, JERZY STOJKO*, SŁAWOMIR SMOLIK, ARTUR STOJKO*, URSZULA MAZUREK, TADEUSZ WILCZOK

Katedra Biologii Molekularnej, Biochemii i Biofarmacji Śląskiej AM, ul. Narcyzów 1, 41-200 Sosnowiec
*Katedra i Zakład Higieny, Bioanalizy i Badania Środowiska Śląskiej AM, ul. Medyków 4, 40-752 Katowice

Gruchlik A., Domal-Kwiatkowska D., Stojko J., Smolik S., Stojko A., Mazurek U., Wilczok T.

Expression of VEGF-A, VEGF-B genes and Flk-1 and Flt-1 receptors in the kidneys of Sprague Dowley rats lacking a left artery descending into the coronary

Summary

The paper describes a long-term study on a herd of Sprague Dowley rats (3 months old, male, 150 ± 20 weight). The rats were derived from a primary herd characterized by the lack of a left artery descending into the coronary. Pathological changes in the kidneys of the rats were observed 7 months after the study began. These changes were probably due to the functioning of the circulatory system as well as angiogenesis.

The aim of the study was to estimate the expression of angiogenesis – regulatory genes VEGF-A, VEGF-B and their receptors – Flt-1 and Flk-1 in the kidneys of SD rats using the QRT-PCR (Real Time, TaqMan) technique. Following this, the investigated samples of kidneys were divided into two groups having different expressions of the analyzed transcripts. Group one had twice as high a percentage of VEGF-B and four times lower percentage of Flk-1 receptors compared to group two. There were no differences in the percentages of VEGF-A (43-48%) and Flt-1 (18-21%) between the analyzed groups.

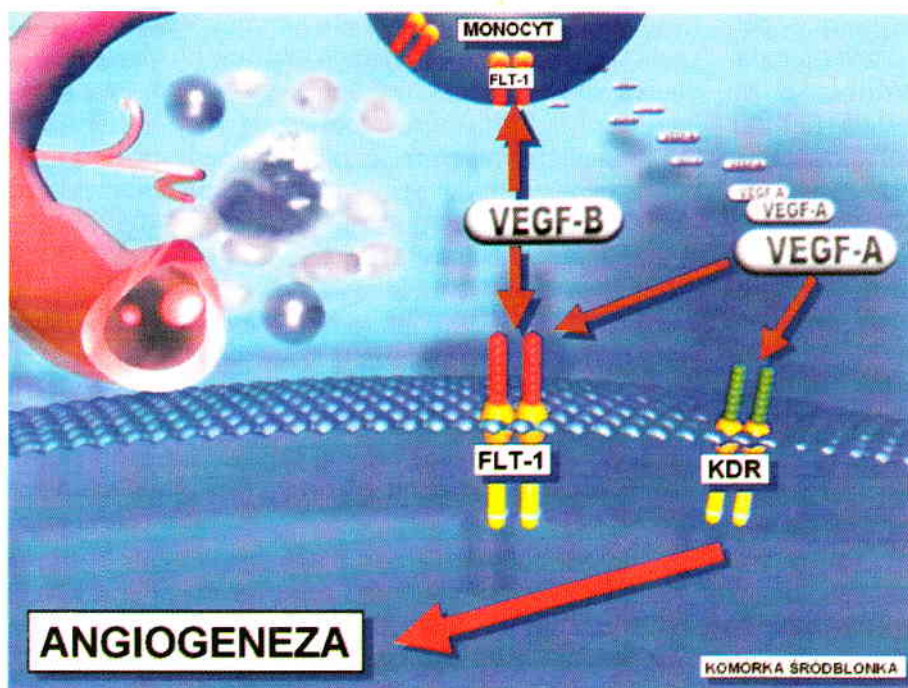
Keywords : VEGF, VEGF receptors, rat kidney rat

Angiogeneza jest jednym z podstawowych czynników determinujących wzrost i różnicowanie się tkanek zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Zależy między innymi od intensywnej proliferacji i migracji komórek śródbłonka, przzerwania ciągłości błony podstawnej naczynia „matczynego” oraz zmiany struktury macierzy zewnątrzkomórkowej (3). Istotny wpływ na wszystkie wymienione procesy mają cytokiny z rodziny naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu VEGF (vascular endothelial growth factor), które manifestują swoją obecność poprzez wiązanie się z receptorami błonowymi Flk-1 lub Flt-1 komórek śródbłonka (4). Receptory Flt-1 i Flk-1 różnią się mechanizmami transdukcji sygnału. Po pobudzeniu receptora Flk-1 zachodzi silna, zależna od ligandu autofosforylacja tyrozyny w obrębie domeny kinazy tyrozynowej, podczas gdy pobudzenie receptora Flt-1 wykazuje słabą lub trudną do zidentyfikowania odpowiedź. Sugeruje to, że receptor Flt-1 może negatywnie regulować proces angiogenezy (5). Aktywacja receptora Flk-1 zwiększa aktywność proliferacyjną komórek śródbłonka, hamując przy tym proces apoptozy, zwiększa także przepuszczalność naczyń

krwionośnych. Wydaje się, że receptor ten jest odpowiedzialny za pełne spektrum działania angiogenego VEGF (18). Natomiast receptor Flt-1 reguluje syntezę metaloproteaz w komórkach mięśni gładkich (21), migrację monocytów/makrofagów, komórek śródbłonka oraz wpływa na reorganizację cytoszkieletu przez aktywację kinazy p38 MAPK i paksyliny (9).

Ekspresja genów VEGF-A, VEGF-B oraz receptorów Flk-1 i Flt-1 podlega ścisłej kontroli w komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych. W obrębie promotora genu Flt-1 oraz VEGF-A stwierdzono występowanie sekwencji zależnej od hipoksji HRE (hypoxia response element), której nie posiadają promotory genów Flk-1 i VEGF-B. Wydaje się zatem, że ekspresja genu VEGF-B i receptora Flk-1 jest niezależna od hipoksji (5, 13) i może być związana z wystąpieniem tzw. fenotypu angiogenego.

VEGF-A jest ligandem zarówno dla receptora Flk-1, jak i Flt-1, natomiast VEGF-B wykazuje powinowactwo jedynie do receptora Flt-1 (17) (ryc. 1). Istnieje hipoteza dotycząca relacji między VEGF-A, VEGF-B a receptorami Flk-1 i Flt-1 w procesie angiogenezy (19). Według tej hipotezy za migrację komórek odpo-



Ryc. 1. Interakcje między VEGF-B i antyangiogenym receptorem Flt-1 a VEGF-A i angiogenym receptorem Flk-1 w procesie angiogenezy

wiedzialna jest aktywacja receptora błonowego Flt-1, natomiast receptor Flk-1 jest odpowiedzialny za aktywność proliferacyjną komórek śródbłonna. Zachodząca angiogeneza jest więc efektem współdziałania ze sobą obu receptorów. Wydzielanie chemoatraktantów oraz czynników wzrostu przez zaaktywowane za pośrednictwem VEGF-B monocyty (11, 12, 15) może odegrać dużo ważniejszą rolę w angiogenezie niż słaba aktywność mitogenna samego receptora Flt-1. VEGF-B wiążąc się z receptorem Flt-1 na powierzchni komórek nabłonkowych, blokuje miejsca wiązania dla VEGF-A, zwiększając tym samym wolną pulę VEGF-A w sąsiedztwie receptora Flk-1. Aktywacja receptora Flk-1 prowadzi do indukcji procesu angiogenezy (1, 2, 19) (ryc. 1).

Celem badań było wyznaczenie profilu ekspresji genów VEGF-A, VEGF-B, receptora Flk-1 i Flt-1, w wycinkach pochodzących z nerek trzymiesięcznych szczurów Sprague Dowley, wywodzących się ze stada podstawowego, charakteryzującego się utrwalonym brakiem lewej zstępującej tętnicy wieńcowej.

Materiały i metody

Przebadano 5 szczurów (samców) ze stada Sprague Dowley (masa 150 ± 20 g), obciążonych brakiem lewej zstępującej tętnicy wieńcowej, wyhodowanych w Centralnej Zwierzętarzni Doświadczalnej Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach. Opisywana wada rozwojowa jest typem patologii wrodzonej o utrwalonym podłożu genetycznym. Kryterium doboru zwierząt do badań oparto na ocenie przyżyciowej stanu klinicznego badanej populacji oraz potwierdzonym w wielopokoleniowych badaniach stwierdzeniu, iż u samców pochodzących z tego stada w wieku siedmiu miesięcy rozwijają się zmiany morfologiczne w obrębie nerek. Należy zaznaczyć, że wyżej wy-

mienione stado poddawane jest badaniom mającym na celu standaryzację hodowlaną oraz rejestrację stada. Badane szczury nie wykazywały w badaniu klinicznym żadnych zmian świadczących o toczącym się w obrębie ich organizmu procesie patologicznym. Do momentu rozpoczęcia eksperymentu zwierzęta utrzymywano w warunkach chowu „za barierą”, stosując normy zoohigieniczne spełniające wymagania stawiane hodowli zwierząt SPF. Szczury przechodziły okresowy monitoring stanu zdrowia ze szczególnym uwzględnieniem badań mikrobiologicznych, parazytologicznych, biochemicznych oraz hematologicznych. Po przeprowadzeniu eutanazji szczurów poprzez wykonanie iniekcji z Morbitalu w dawce 2 ml/kg m.c., w ramach badania pośmiertnego jamy brzusznej pobierano od zwierząt obie nerki do dalszych analiz.

Isolację całkowitego RNA przeprowadzono przy użyciu zestawu do ekstrakcji RNA (Total RNA Prep Plus firmy A&A Biotechnology). Jakość wyizolowanego RNA sprawdzono na 1,5% żelu agarozowym, natomiast pomiar stężenia RNA wykonano metodą spektrofotometryczną, stosując kalkulator DNA/RNA Gene-Quant firmy Pharmacia.

Amplifikację wybranych fragmentów mRNA, połączoną z wyznaczeniem kinetyki reakcji PCR dla każdej próbki oraz wyznaczenie ilości kopii badanych transkryptów wykonano techniką QRT-PCR z zastosowaniem detektora sekwencji ABI PRISM™ 7700 (Real – Time). Zastosowano następujący profil termiczny reakcji QRT-PCR: odwrotna transkrypcja w temperaturze 60°C (30 min.), 40 cykli obejmujących termiczną denaturację w 95°C (30 sek.), hybrydyzację starterów i sondy do cDNA oraz elongację przy udziale polimerazy Tth w 55°C (60 sek.). Probówki po 40 cyklach inkubowano w 72°C przez 10 min. Dla badanych genów, których sekwencje pochodziły z bazy internetowej Gene Bank (www.ncbi.nih.gov/) zaprojektowano sondy i startery przy użyciu programu Primer Express 2.0 (22).

Specyficzność zaprojektowanych oligonukleotydów potwierdzono techniką elektroforezy w 6% żelu poliakrylamidowym, a otrzymane elektroforegramy analizowano komputerowo w systemie dokumentacji żelowej Biotec – Fischer Bas-Sys 1D.

Wyniki i omówienie

Liczbę kopii mRNA badanych genów wyznaczono na podstawie kinetyki reakcji QRT-PCR z zastosowaniem detektora sekwencji ABI PRISM™ 7700 (Taq-Man). Dla każdego badanego wycinka nerki wyznaczano profil ekspresji genów VEGF-A, VEGF-B oraz receptorów Flk-1 i Flt-1. Analizowano zarówno poziom ekspresji genów, których miarą była liczba kopii mRNA danego genu w 1 µg całkowitego RNA ekstraktu, jak i procentowy udział tego genu w badanej puli genów (tab. 1).

Na podstawie procentowego udziału poszczególnych genów w każdej nerce, w oparciu o test nieparametryczny χ^2 wyróżniono dwa typy profili ekspresji (założony poziom istotności wynosił $\alpha = 0,05$) (tab. 1). Nerki trzech szczurów (grupa I) cechowała przynależność typu I, a dwóch (grupa II) do typu II.

Stosując test t-Studenta dla prób niezależnych, przy założeniu, że poziom istotności $\alpha = 0,05$, porównywano poziom ekspresji badanych genów między grupami. Test wykazał brak istotnych statystycznie różnic między poziomem ekspresji genów VEGF-A, VEGF-B i prawdopodobnie receptora Flt-1 między grupami (odpowiednio $p = 0,262$, $p = 0,136$, $p = 0,083$). Grupy różniły się jedynie poziomem ekspresji receptora Flk-1 ($p < 10^{-4}$). Dla poziomu ekspresji genu VEGF-B w grupie I i II nie stwierdzono rozkładu normalnego, dlatego zamiast testu t-Studenta zastosowano test nieparametryczny U Manna-Whitneya.

Badania przeprowadzone na trzymiesięcznych szczurach szczepu Sprague Dowley z utrwalonym brakiem lewej zstępującej tętnicy wieńcowej wykazały, że w obrębie populacji samców szczurów, u których nie odnotowano manifestacji klinicznej jakiegokolwiek procesu patologicznego, zwierzęta różnią się aktywnością transkrypcyjną genu Flk-1, podczas gdy aktywność transkrypcyjna genów VEGF-A, VEGF-B i prawdopodobnie receptora Flt-1 (tendencja) była na stałym poziomie (tab. 1).

Otrzymane wyniki pozwoliły na zróżnicowanie przebadanych nerek na grupy różniące się procentowym udziałem analizowanych transkryptów. Typ I charakterystyczny był dla grupy pierwszej, natomiast typ II – dla grupy drugiej (tab. 1). Nasuwa się pytanie, czy obserwowane różnice w fenotypie angiogennym mogą mieć wpływ na prawidłową funkcję nerek.

Z danych literaturowych wynika, że wzrost poziomu ekspresji VEGF w nerkach może być związany

z uszkodzeniem tego narządu lub zachodzącym w nim procesem regeneracyjnym. Wykazano, że przerostowi nerek spowodowanemu dietą wysokobiałkową można zapobiec, stosując przeciwciała anty-VEGF (20). Populacja badanych zwierząt żywiona jest paszą standaryzowaną oraz w pełni zbilansowaną o nazwie Labofeet-B, a co za tym idzie – proces patologiczny nie może być wywołany dietą wysokobiałkową. Uszkodzenie nerek może przebiegać także ze zmniejszeniem ekspresji VEGF, tak jak to miało miejsce po częściowej nefrektomii u szczura, gdzie 1,4 razy zmniejszyła się ekspresja VEGF w porównaniu z kontrolą (10). Zmniejszenie ekspresji VEGF lub jej brak może towarzyszyć miażdżycy naczyń nerkowych, która prawdopodobnie związana jest z utratą funkcjonalnych podocytów (6).

Stanom patologicznym nerek towarzyszy również zmiana poziomu ekspresji receptorów Flt-1 i Flk-1. W sztucznie wywołanym zapaleniu kłębuszków nerkowych tzw. rozplemie mezangialnym (anty-Thy nephritis) wzrasta jedynie poziom ekspresji receptora Flk-1 (7). Z innych badań wynika, że podczas niedokrwienia nerek poziom receptora Flk-1 wzrastał 2-4 krotnie w porównaniu z kontrolą, natomiast poziom ekspresji VEGF-A i Flt-1 pozostawał bez zmian (8).

Kłębuszek nerkowy jest wyjątkową strukturą naczyń włosowatych. Uszkodzenie śródbłonna jest częstą przyczyną wielu schorzeń nerek. Wiedza o czynnikach, które wpływają na integralność ściany naczyń włosowatych kłębuszków może odegrać istotną rolę w zrozumieniu mechanizmu powstawania wielu schorzeń nerek (16). Wydaje się zatem, że VEGF jest niezbędny do prawidłowego rozwoju nerki i odgrywa istotną rolę w regeneracji naczyń włosowatych w uszkodzonych kłębuszkach nerkowych (14).

Analiza histopatologiczna nerek badanych trzymiesięcznych szczurów nie wykazała żadnych zmian patologicznych w obrębie tego narządu.

Wiadomo jest jednak, że zmiany na poziomie molekularnym wyprzedzają zmiany patologiczne na poziomie komórkowym. Prowadzone niezależnie badania długoterminowe nad przeżywalnością analizowanego stada wykazały, że w obrębie nerek u osobników po ukończeniu siódmego miesiąca życia obserwuje się lawinowo rozwijające się procesy patologiczne pod postacią zwyrodnienia szklisatego kłębuszków nerkowych oraz masywnych procesów o charakterze rozplemowym. Wyznaczanie profilu angiogennego badanej nerki, w postaci oceny poziomu ekspresji genów VEGF-A, VEGF-B oraz receptorów Flk-1 i Flt-1, pozwoli przewidywać procesy angio-

Tab. 1. Typy profili ekspresji genów VEGF-A, VEGF-B, receptorów Flk-1 i Flt-1 oraz aktywność transkrypcyjna badanych genów w poszczególnych typach (miarą aktywności jest ilość kopii mRNA genu przeliczona na 1µg całkowitego RNA; przynależność do danego typu oparta jest na udziale procentowym liczby cząsteczek mRNA danego genu w całej puli badanych genów)

Typ	Gen	%	Aktywność transkrypcyjna			
			wartość minimalna	wartość maksymalna	średnia	odchylenie standardowe
I	VEGF-B	19	18 450	25 200	20 308	2549
	Flk-1	17	15 100	21 500	17 500	2596
	Flt-1	21	16 300	28 700	22 320	5652
	VEGF-A	43	22 550	60 850	44 857	13 901
II	VEGF-B	30	19 900	31 000	23 150	5260
	Flk-1	4	2400	3300	2867	451
	Flt-1	18	12 400	13 900	13 150	1061
	VEGF-A	48	31 900	40 050	36 130	3575

genezy i – być może – dużo wcześniej określić moment wystąpienia nefropatii, a także wykazać zależności między określonym typem angiogenym a czasem wystąpienia patologii w obrębie nerki.

Przeprowadzone badania pilotowe populacji stada z utrwalonym brakiem lewej zstępującej tętnicy wieńcowej u osobników w wieku 3 miesięcy sugerują wykonanie molekularnych badań porównawczych w obrębie nerek w kolejnych etapach rozwojowych omawianej populacji (np. 5., 7., 9. miesiąc życia), co pozwoliłoby na udokumentowanie dynamiki rozwoju patologii w obrębie nerek w aspekcie badanych zmian molekularnych.

Piśmiennictwo

1. Aase K., Von Euler G., Li X., Pontén A., Thorén P., Cao R., Cao Y., Olofsson B., Gebre-Medhin S., Pekny M., Alitalo K., Betsholtz C., Eriksson U.: Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation* 2001, 104, 358-364.
2. Akuzawa N., Kurabayashi M., Ohyama Y., Arai M., Nagai R.: Zinc finger transcription factor Egr-1 activates Flt-1 gene expression in THP-1 cells on induction for macrophage differentiation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000, 20, 377-384.
3. Bilińska R. T., Rużyłło W.: Angiogeneza. Od eksperymentu do badań klinicznych. *Kardiologia Polska* 2001, 54, 131-136.
4. Ferrara N., Davis-Smyth T.: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 1997, 18, 4-25.
5. Ferrara N.: Molecular and biological properties of Vascular Endothelial Growth Factor. *J. Mol. Med.* 1999, 77, 527-543.
6. Honkanen E. O., Teppo A. M. and Grönhagen-Riska C.: Decreased urinary excretion of vascular endothelial growth factor in idiopathic membranous glomerulonephritis. *Kidney. Int.* 2000, 57, 2343-2349.
7. Horita Y., Miyazaki M., Koji T., Kobayashi N., Shibuya M., Razaque M. S., Cheng M., Ozono Y., Kohno S., Taguchi T.: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rats with protein-overload nephrosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998, 13, 2519-2528.
8. Kanellis J., Paizis K., Cox A. J., Stacker S. A., Gilbert R. E., Cooper M. E., Power D. A.: Renal ischemia-reperfusion increases endothelial VEGFR-2 without increasing VEGF or VEGFR-1 expression. *Kidney. Int.* 2002, 61, 1696-1706.
9. Karkkainen M. J., Petrova T. V.: Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* 2000, 19, 5598-5603.
10. Kelly D. J., Cox A. J., Wu L. L., Gilbert R. E.: VEGF gene expression in proteinuric rats. *Nephrology* 2002, 7, 123.
11. Koehn P., Willam C., Strauss E., Schindler R., Eckardt K. U., Bühler C.: Lack of hypoxic stimulation of VEGF secretion from neutrophils and platelets. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2000, 279, 817-824.
12. Lee C. G., Yoon H. J., Zhu Z., Link H., Wang Z. J. M., Gwaltney J. R., Landry M., Elias J. A.: Respiratory syncytial virus stimulation of vascular endothelial cell growth factor/vascular permeability factor. *Am. J. Respi. Cell. Mol. Biol.* 2000, 23, 662-669.
13. Li X., Eriksson U.: A novel VEGF family members: VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2001, 33, 421-426.
14. Masuda Y., Shimizu A., Mori T., Ishiwata T., Kitamura H., Ohashi R., Ishizaki M., Asano G., Sugisaki Y., Yamanaka N.: Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.* 2001, 159, 599-608.
15. Nör J. E., Christensen J., Mooney D. J., Polverini P. J.: Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am. J. Pathol.* 1999, 154, 375-384.
16. Ostendorf T., Kunter U., Eitner F., Loos A., Regele H., Kerjaschki D., Henninger D. D., Janjic N., Floege J.: VEGF₁₆₅ mediates glomerular endothelial repair. *J. Clin. Invest.* 1999, 104, 913-923.
17. Petrova T. V., Makinen T., Alitalo K.: Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp. Cell. res.* 1999, 253, 117-130.
18. Saaristo A., Kurpanen T., Alitalo K.: Mechanism of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. *Oncogene* 2000, 19, 6122-6129.
19. Schaper W., Ito W. D.: Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ. Res.* 1996, 79, 911-919.
20. Schrijvers B. F., Rasch R., Tilton R. G., Flyvbjerg A.: High protein-induced glomerular hypertrophy is vascular endothelial growth factor-dependent. *Kidney Int.* 2002, 61, 1600-1604.
21. Shen B. Q., Lee D. Y., Cortopassi K. M., Damico L. A., Zioncheck T. F.: Vascular endothelial growth factor KDR receptor signaling potentiates tumor necrosis factor-induced tissue factor expression in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 5281-5286.
22. Smolik S., Domal-Kwiatkowska D., Mazurek U., Stojko J., Stojko A., Adamska J., Halinowska P., Wilczok T.: Detekcja mRNA naczyniowo-śródbronkowego czynnika wzrostu (VEGF) i jego receptorów w wybranych tkankach markerem procesu angiogenezy. *Diag. Lab.* 2001, 37, 155.

Adres autora: mgr Arkadiusz Gruchlik, ul. Spokojna 4, 41-404 Mysłowice; e-mail: biolmolfarm@slam.katowice.pl

VOS A., SCHAARSCHMIDT V., MULUNEH A., MÜLLER T.: Pochodzenie przeciwciał przeciwko wirusowi wścieklizny przekazywanych przez lisie potomstwu. (Origin of maternally transferred antibodies against rabies in foxes). *Vet. Rec.* 153, 16-18, 2003 (1)

Noworodki rudyh lisiał (*Vulpes vulpes*) otrzymują od szczepionych matek przeciwciała przeciw wirusowi wścieklizny. W celu ustalenia sposobu przekazywania tych przeciwciał określono ich miano w surowicach 70 samic szczepionych przeciw wściekliznie oraz u płodów testem seroneutralizacji i szybkim testem hamowania fluorescencji (RFFIT). Samice otrzymały szczepionkę *per os* podczas akcji zwalczania wścieklizny w Saksonii w lutym-kwietniu 2001 r. Na tych terenach corocznie przeprowadzano szczepienie lisów na wiosnę i w jesieni począwszy od 1991 r. U 19 samic stwierdzono obecność przeciwciał przeciwko wirusowi wścieklizny w klasie IgG immunoglobulin w teście seroneutralizacji w mianie > 0,5 jm/ml. Średnie miano geometryczne tych przeciwciał wynosiło 1,83 jm/ml (0,58-8,95 jm/ml). U żadnego z płodów nie stwierdzono obecności przeciwciał dla wirusa wścieklizny. Samice lisów przekazują potomstwu przeciwciała przeciwko wirusowi wścieklizny za pośrednictwem siary.

G.

PUSTERLA N., WATSON J. L., AFFOLTER V. K., MAGDESIAN K. G., WILSON W. D., CARLSON G. P.: Czerwieńca krwotoczna u 53 koni. (Purpura haemorrhagica in 53 horses). *Vet. Rec.* 153, 118-121, 2003 (4)

Badanie 53 koni w wieku od 6 miesięcy do 19 lat (średnia 8,4) z czerwieńcą krwotoczną wykazało, że 17 koni było zakażonych *Streptococcus equi*, 9 – *Corynebacterium pseudotuberculosis*, 5 koni było szczepionych szczepionką zawierającą białko M S. equi, u 5 koni występowała infekcja układu oddechowego o nieustalonej etiologii, zaś u 2 koni były otwarte rany. W 15 przypadkach nie można było ustalić na podstawie wywiadu przebiega zakażenia wirusowego lub bakteryjnego. Wśród objawów klinicznych dominował wyraźnie zaznaczony obrzęk tkanki podskórnej kończyn, wybroczyny na błonach śluzowych, depresja, utrata łaknienia, gorączka, tachykardia i duszność, trudności w poruszaniu się, kolkę, krwawienie z nosa i spadek masy ciała. Występowała niedokrwistość, neutrofilia, hiperproteinemia i hiperfibrinogenemia, hiperglobulinemia, zwiększona aktywność aminotransferazy asparaginianowej, kinazy kreatyny, dehydrogenazy sorbitolu. W terapii zastosowano kortykosterydy, u 42 koni ponadto niesterydowe leki przeciwzapalne, a u 26 – leki przeciwbakteryjne. Przeżyło 49 koni, jeden padł, a 3 poddano eutanazji.

G.