

Zależność między liczbą komórek somatycznych a poziomem GSH, wydajnością i składem chemicznym mleka

ARTUR JÓŻWIK, ANNA ŚLIWA-JÓŻWIK, NINA STRZAŁKOWSKA, JÓZEF KRZYŻEWSKI,
ADAM KOŁĄTAJ

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, ul. Postępu 1, Jaszczewiec, 05-552 Wólka Kosowska

Jóźwik A., Śliwa-Jóźwik A., Strzałkowska N., Krzyżewski J., Kołataj A.

Relationship between somatic cell count, level of GSH, milk yield and its chemical composition

Summary

The aim of the study was to evaluate the relation between the number of somatic cell count (SCC) and the level of GSH in the milk of high yielding cows. The experiment was carried out on Black-and-White dairy cows ($n = 44$), divided into 3 groups with different SCC in milk ($\times 10^3/\text{ml}$): 1 - 29; 2 - 2008; 3 - 3962. The average milk yield was 8800 (± 250) kg per lactation. During a whole year the experimental animals were fed the same type of diet, consisting of corn silage and wilted grass silage (in relation of 1:1 on the dry matter basis), supplemented with a concentrate and mineral-vitamin mixture, according to the INRA-system. There were significant differences between SCC number in the milk and its yield, concentration of lactose and GSH level. The observed increase in GSH and SCC levels in the cows' milk allowed for the assumption that GSH plays a vital role in health maintenance and the prevention of cows' udders from the effects of inflammation.

Keywords: GSH, milk, somatic cells

Liczba komórek somatycznych (LKS) znajdujących się w mililitrze mleka jest jednym z głównych parametrów oceny jego jakości, ponieważ odzwierciedla stan zdrowotny gruczołu mlekowego. Obecnie w krajach Unii Europejskiej przyjmuje się, że w skupowanym mleku surowym, zaliczanym do klasy ekstra, liczba elementów komórkowych nie może przekraczać 300 tys./ml (Dyrektywa 42/96 Unii Europejskiej). Taki poziom komórek somatycznych świadczy o dobrym zdrowiu wymienia, a tym samym o wysokiej jakości pozyskiwanego mleka. Przekroczenie podanego poziomu może być rezultatem subklinicznych stanów zapalnych gruczołu mlekowego, które obok zmniejszenia wydajności, pociągają za sobą pogorszenie niektórych parametrów jakościowych mleka. Stany zapalne gruczołu mlekowego są najczęściej występującym schorzeniem w stadach krów mlecznych, mającym bezpośredni negatywny wpływ zarówno na ilość pozyskiwanego mleka, jak i na jego jakość (6, 16, 17). W sytuacji rosnących wciąż wymagań współczesnych konsumentów, mleko, obok właściwego składu chemicznego i dobrych parametrów technologicznych, powinno charakteryzować się również dobrym smakiem. Cecha ta w największym stopniu jest uzależniona od tzw. statusu oksydacyjnego, tj. określonej zawartości antyoksydantów w mleku, które zapobiegają utlenianiu zawartych w nim składników, głównie

tłuszczu. Z informacji dostępnych w piśmiennictwie wynika, że czołowe miejsce wśród wszystkich antyutleniaczy zajmuje glutation (15). Tripeptyd ten w formie zredukowanej (GSH) zbudowany jest z trzech aminokwasów, tj. cysteiny, glicyny i kwasu glutamylowego (2, 27). Pełni on w organizmie szereg funkcji metabolicznych o istotnym znaczeniu dla zdrowia i życia. Główna jego rola polega na wzmacnianiu systemu immunologicznego, eliminacji różnego rodzaju toksyn i karcinogenów, przeciwdziałaniu procesom utleniania, wspomaganie syntezy białka i prostaglandyn, transporcie aminokwasów, regulacji aktywności wielu enzymów itp. (4, 5, 7, 19-22). Znaczne ilości GSH znajdują się we wszystkich tkankach ssaków, w tym także w tkance gruczołu mlekowego (1-2 mM/g tkanki). Wyniki najnowszych badań wskazują, że ten tripeptyd może występować także w mleku (11).

W dostępnym piśmiennictwie brak jest wyników badań, dotyczących relacji pomiędzy GSH a zdrowiem gruczołu mlekowego krów lub innych gatunków ssaków. Z uwagi na to, że GSH bierze aktywny udział w zapobieganiu wielu chorobom u ludzi i zwierząt, istnieje duże prawdopodobieństwo, że dotyczy to także gruczołu mlekowego krów. Mając na uwadze powyższą przesłankę przeprowadzono wstępne badania, których celem było określenie zależności między liczbą komórek somatycznych a poziomem GSH w mleku oraz jego dobową wydajnością i składem chemicznym.

Material i metody

Próbki mleka do badań pobrano od 44 krów. Różniły się one wyraźnie zróżnicowaną liczbą komórek somatycznych. Na tej podstawie wyodrębniono następujące grupy zwierząt:

Grupa	n	LKS ($\times 10^3$ /ml mleka)		Wartości skrajne w grupach
		LSM	SE	
1	22	29	17	9-52
2	10	2008	247	1783-2293
3	12	3962	225	2661-4926

Mimo bardzo wysokiej LKS w mleku krów grupy 2 i 3, u żadnego zwierzęcia nie zaobserwowano objawów klinicznych. Również w mleku tych zwierząt nie występowały jeszcze widoczne zmiany; każdorazowo przed założeniem aparatów udojowych pierwsze strugi mleka z poszczególnych ćwiartek były kontrolowane na przedzjadaczu. Należy dodać, że wzrost LKS nastąpił w okresie nie dłuższym niż jeden miesiąc, tj. między dwoma kolejnymi dojami kontrolnymi. Krowy, od których pobierano próby mleka, charakteryzowały się bardzo wysokim udziałem genów hf (powyżej 90%). Utrzymywano je na fermie doświadczalnej w Kosowie, należącej do IGiHZ PAN w Jastrzębcu. Przeciętna wydajność mleczna krowy w tym stadzie wynosiła ok. 8500 kg w okresie laktacji, a wydajność mleka zwierząt użytych do badań mieściła się w przedziale 8600-9100 kg w laktacji. Zwierzęta utrzymywane były w oborze wolno stanowiskowej z dostępem do wybiegów. Krowy w okresie całego roku żywiono wg systemu TMR. W skład dawki wchodziły podstawowe pasze objętościowe, tj. kiszonka z kukurydzy oraz kiszonka z traw podwiedniętych. W zależności od dobowej wydajności mleka diety uzupełniano odpowiednią ilością mieszanki pasz treściwych oraz premiksów mineralno-witaminowych; bilansowano je wg systemu INRA. Krowy dojne były dwukrotnie w okresie doby, w szczycie laktacji jednak zwierzęta o najwyższej dobowej wydajności mleka dojono trzykrotnie. Do chwili rozpoczęcia badań wybrane zwierzęta nie otrzymywały jakichkolwiek środków farmakologicznych. W pobranych próbach mleka oznaczono zawartość podstawowych składników, tj. tłuszczu, białka i laktozy przy użyciu aparatu Milcoscan 104, komórek przy pomocy aparatu Fossomatic oraz poziom GSH. Oznaczenie glutationu zredukowanego przeprowadzono wg metody opisanej przez Ellmana (9). Próbki mleka poddawano odbiałczaniu 10% roztworem TCA w obecności 10 mM EDTA (w stosunku 1 : 1). Po odwirowaniu próbki mleka dodano do mieszaniny zawierającej 3,2 M bufor Tris-HCl o pH 8,1 i 10 mM EDTA, a następnie roztwór 0,05 mM DTNB. Odczytu absorbancji dokonywano na spektrofotometrze firmy Perkin-Elmer, przy długości fali 412 nm.

Uzyskane wyniki poddano weryfikacji statystycznej przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji w pakiecie SAS (SAS System, USA, 1996) oraz obliczono współczynniki korelacji.

Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki zamieszczono w tab. 1 i 2. Wydajność mleczna krów grup 2 i 3 była istotnie niższa w porównaniu z grupą 1. Różnice te zostały uwarunkowane stadium laktacji; krowy grupy 1 znajdowały się w pierwszej, zaś grupy 2 i 3 w drugiej połowie laktacji. Wraz z przebiegiem laktacji wzrastała zawartość tłuszczu i białka w mleku, jednakże różnice nie były istotne. W mleku krów grupy 3 zmniejszyła się istotnie koncentracja laktozy, co mogłoby wskazywać na zapoczątkowanie procesów zapalnych w gruczole mlekowym. Stwierdzono istotne różnice w poziomie GSH w mleku między grupami 1 a 2 i 3. Zaobserwowana tendencja do zmniejszania się zawartości GSH w mleku krów grupy 3 w porównaniu z grupą 2 może sugerować, iż jest on rozkładany w większym stopniu w obecności większej LKS. Ilość GSH znajdująca się w dobowej ilości produkowanego mleka była najwyższa w grupie 2; różnica między grupami 1 i 3 była nieistotna. Zarówno istotny wzrost koncentracji GSH w mleku krów z większą LKS, jak i istotny współczynnik korelacji ($r = 0,39$) między poziomem GSH a LKS (wyrażoną w postaci \ln) – tab. 2, pozwalają przypuszczać, że GSH aktywnie uczestniczy w ochronie komórek gruczolu mlekowego przed skutkami stanu zapalnego. Jak wiadomo GSH jest jednym z najważniejszych wskaźników homeostazy biochemicznej komórki zwierzęcej (1, 14, 25, 28, 29). Zatem wzrost koncentracji GSH w mleku krów z dużą liczbą komórek somatycznych świadczyć może o jej zaburzeniu, spowodowanym prawdopodobnie powstawaniem w gruczole mlekowym ognisk zapalnych, których występowaniu sprzyja zwiększona ilość tzw. reaktywnych form

Tab. 1. Poziom badanych wskaźników mleka krów

Grupa	N	Dobowa wydajność mleka kg		Tłuszcz %		Białko %		Laktoza %		GSH μ M/g białka		GSHG ¹⁾ mg	
		LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
1	22	31,5 ^A	1,7	3,58	0,17	3,57	0,10	4,9 ^A	0,07	33,9 ^A	4,11	37,54 ^A	4,26
2	10	25,1 ^B	2,5	3,82	0,26	3,75	0,14	4,8 ^{AB}	0,10	57,6 ^B	6,10	54,11 ^B	6,32
3	12	19,4 ^B	2,3	4,03	0,24	3,84	0,13	4,6 ^B	0,90	46,3 ^B	5,57	32,49 ^A	5,77

Objaśnienia: Wartości liczbowe w tej samej kolumnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,01$, ¹⁾ Ilość GSH wydalaną w dobowej ilości mleka

Tab. 2. Współczynniki korelacji między poziomem GSH w mleku a jego wydajnością, składem chemicznymi i liczbą komórek somatycznych

	Liczba komórek somatycznych (\ln)	Laktoza	Tłuszcz	Białko	Dobowa wydajność mleka
GSH	0,39**	-0,38**	0,29	-0,14	-0,10

Objaśnienia: ** $p \leq 0,01$

tlenu. W celu zapewnienia normalnej równowagi między procesami oksydacyjnymi i antyoksydacyjnymi organizm zwiększa ilość syntetyzowanego GSH, który odgrywa kluczową rolę w procesach antyoksydacyjnych (3). Przypuszcza się, że podwyższenie stężenia GSH w komórce zwiększa jej oporność na działanie różnych związków oksydacyjnych (8). Grupa -SH glutationu jest znacznie łatwiej dostępna dla cząsteczki tlenu niż chemiczne ugrupowania innych antyoksydantów. Glutation zredukowany poprzez reakcje transhydrogenacji zabezpiecza przed destrukcją aktywne biologicznie białka oraz reaktywuje enzymy zainaktywowane w wyniku utleniania grup tiolowych (10, 18). Dzięki tym reakcjom istnieje możliwość zachowania enzymatycznych właściwości wielu białek, ekspresji genów oraz syntezy DNA (13, 24). Stwierdzono, że glutation bierze udział w procesach rekonwalescencyjnych u zwierząt hodowlanych, ujawniając swoje właściwości zbliżone do innych antyoksydantów (23, 27).

Korzystne działanie GSH w stanach chorobowych jest związane z jego istotną funkcją w procesie proliferacji i prawidłowego funkcjonowania leukocytów, a także z jego ochronnym oddziaływaniem na komórki nabłonka. Efekt działania GSH w organizmie zwierzęcym jest bezpośrednio związany z tempem jego syntezy. Jest interesujące, że w sytuacji niedożywienia organizmu stężenie GSH w leukocytach obniża się o ok. 40%, zaś w wątrobie o ok. 25% (18). Badania Hayesa i McLellana (12) wskazują, że zarówno poziom glutationu, jak i innych antyoksydantów oraz enzymów związanych z GSH zależą od czynników żywieniowych. Jednym z najważniejszych czynników niedoborowych, który uniemożliwia syntetyzowanie dostatecznej ilości GSH są aminokwasy siarkowe (cystyna i cysteina). Interesującym zjawiskiem jest katabolizm GSH pod wpływem γ -glutamyltranspeptydazy. Fujikake i Ballatorii (11) w badaniach na szczurach wykazali, że po inaktywacji enzymu γ -glutamyltranspeptydazy ilość GSH w mleku wzrosła 3-4-krotnie. W wyniku rozkładu GSH w gruczole mlekowym następuje uwalnianie cysteiny do mleka jako jednego z najważniejszych aminokwasów egzogennych, niezbędnych do prawidłowego rozwoju osesków.

W podsumowaniu przeprowadzonych badań można stwierdzić, że poznanie całego szlaku metabolicznego GSH w organizmie zwierzęcym, w połączeniu z innymi antyoksydantami, takimi jak witaminy A, E i C oraz niektórymi pierwiastkami śladowymi, głównie Se, mogłoby umożliwić świadome pobudzanie lub hamowanie określonych procesów i przyczynić się w znacznym stopniu do poprawy stanu zdrowotnego gruczołu mlekowego, a w konsekwencji do zwiększenia wydajności i poprawy jakości produkowanego mleka.

Piśmiennictwo

1. Bartosz G.: Druga twarz tlenu. Wydawnictwo PWN, Warszawa 1995.
2. Bartosz G.: Metabolizm glutationu. Postepy Biochem. 1993, 39, 32-38.

3. Baruchel S., Viau G.: In vitro selective modulation of cellular glutathione by a humanized native milk protein isolate in normal cells and rat mammary carcinoma model. Anticancer Res. 1996, 16, 1095-1100.
4. Boggs S. E., McCormick T. S., Lapetina E. G.: Glutathione levels determine apoptosis in macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998, 247, 229-233.
5. Bounous G., Molson J. H.: The antioxidant system. Anticancer Res. 2003, 23, 1411-1415.
6. Bradley A. J., Green M. J.: Aetiology of clinical mastitis in six Somerset dairy herds. Vet. Rec. 2001, 148, 683-686.
7. Chen G., Wang S. H., Converse C. A.: Glutathione increases interleukin-2 production in human lymphocytes. Int. J. Immunopharmacol. 1994, 16, 9, 755-760.
8. Dziubek K.: Wpływ czynników chemicznych i fizycznych na zawartość glutationu zredukowanego (GSH) i utlenionego (GSSG) w niektórych narządach *Rana esculenta* L. w okresie zimowania. Praca hab. Prace monograficzne nr 237, Wyd. Nauk. WSP, Kraków 1998.
9. Ellman G. L.: Tissue sulphhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 1959, 82, 70-77.
10. Freeman M. L., Huntley S. A., Meredith M. J., Senisterra G. A., Lepock J.: Destabilization and denaturation of cellular protein by glutathione depletion. Cell Stress Chaperones 1997, 2, 191-198.
11. Fujikake N., Ballatorii N.: Glutathione secretion into rat milk and its subsequent gamma-glutamyltranspeptidase-mediated catabolism. Biol. Neonate. 2002, 82, 134-138.
12. Hayes J. D., McLellan L. I.: Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. Free Radical Res. 1999, 31, 273-300.
13. Ito H., Okamoto K., Kato K.: Enhancement of expression of stress proteins by agents that lower the levels of glutathione in cells. Biochem. Biophys. Acta. 1998, 1397, 223-230.
14. Kołtąj A.: Fizjologiczna rola grup tiolowych. Kiel. Stud. Biol. Kielce 1986, 127-150.
15. Kongshavn P. A. L.: The science of glutation. Ann. Pharmacother. 1995, 29, 12, 1263-73.
16. Kossabati M. A., Esslemont R. J.: The costs production diseases in dairy herds in England. Vet. J. 1997, 154, 41-51.
17. Leslie K., Kelton D., Kathleen D., Snyder C., Bashiri A., Lackowsky W., Barnum D., Godkin A., Edge V.: An investigation of the relationship between the presence of Prototheca and bactoscan counts in raw milk samples. Proc. 2nd Internat. Symp. Mastitis and Milk Quality. Vancouver, Canada 2001, s. 135-139.
18. Liczmański A. M.: Toksyczność tlenu. II. Mechanizmy ochronne. Post. Biochem. 1988, 34, 293-310.
19. Meister A.: Glutathione, ascorbic acid antioxidant system in animals. J. Biol. Chem. 1994, 269, 9397-9401.
20. Meister A.: The antioxidant effects of glutathione and ascorbic acid, [in:] Oxidative Stres, Cell Activation and Vioral Infection. Pasquier C. (Eds.). Birkauer Verlag, Basel, Switzerland 1994, 101-111.
21. Oja S. S., Janaky R., Varga V., Saransaari P.: Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. Neurochem. Int. 2000, 37, 299-306.
22. Parcell S.: Sulfur in human nutrition and applications in medicine. Altern. Med. Rev. 2002, 7, 22-44.
23. Sautler T., Fuerll M.: Antioxidative status (SOD, GPX) of cows with displaced abomasum, clinical significance and influence of the treatment with antioxidants XXII. World Buiatrics Congress, 18-23 August 2002. Hannover, Germany 2002, s. 97-98.
24. Sies H.: Glutathione and its role in cellular functions. Free Rad. Biol. Med. 1999, 27, 916-921.
25. Śliwa-Józwiak A., Józwiak A., Kołtąj A.: Influence of exogenous glutathione (GSH), as stressfactor, on the activity of lysosome enzymes in some organs of mice. Arch. Tierz. 2002, 45, 307-314.
26. Wang S., Bottje W. G., Cawthon D., Evenson C., Beers K., Mc New R.: Hepatic export of glutathione and uptake of constituent amino acids, glutamate and cysteine in broilers in vivo. Poultry Sci. 1998, 77, 1556-1564.
27. Weiss W. P., Hogan J. S., Smith K. L., Hoblet K. H.: Relationships among selenium, vitamin E, and mammary gland health in commercial dairy herds. J. Dairy Sci. 1990, 73, 381.
28. Winiaska K.: Glutathione: niezwykle funkcje pospolitego tripeptydu. Post. Biochem. 2000, 46, 179-193.
29. Wong Y. L., Smith C. V., McMicken H. W., Rogers L. K., Welty S. E.: Mitochondrial thiols sttus in the liver is altered by exposure to hyperoxia. Toxicol. Lett. 2001, 15, 179-193.

Adres autora: dr Artur Józwiak, ul. Postępu 1, IGIHZ PAN, Jastrzębiec, 05-552 Wólka Kosowska; e-mail: AA.Jozwik@ighz.pl