

Ocena potencjału antyoksydacyjnego krwi krów w okresie okołoporodowym

HANNA MARKIEWICZ, MAREK GEHRKE, EDWARD MALINOWSKI, MICHAŁ KACZMAROWSKI

Zakład Fizjopatologii Rozrodu i Gruczołu Mlekowego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego
– Państwowego Instytutu Badawczego Oddział w Bydgoszczy, Al. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Markiewicz H., Gehrke M., Malinowski E., Kaczmarowski M.

Evaluating the antioxidant potential in the blood of transition cows

Summary

Oxidative stress may be monitored using biomarkers presented in blood and erythrocytes. The purpose of the study was to determine the antioxidant balance in the blood of cows with a normal periparturient period. Blood samples from 30 cows were taken twice in the last month of pregnancy and three times after calving. Enzymatic (SOD, GPX, CAT) and non-enzymatic (uric acid, bilirubin, albumin) antioxidants, total antioxidant status (TAS) and concentrate of MDA+HAE as an indicator of lipid peroxidation were measured. Slightly increased activity of SOD, GSH-Px, CAT took place during the week of calving. The decrease of TAS was observed from 14-7 days before parturition. The lower TAS level was maintained until the 4th week of lactation ($p < 0.05$). Concentration of MDA+4-HNE was the lowest during the week of calving. At that time an increased bilirubin and uric acid level were observed ($p < 0.05$). The results indicate that antioxidant defense might be impaired in the periparturient period and it returns to an antioxidant balance in the second month of lactation.

Keywords: cow, periparturient period, antioxidant status

Reaktywne formy tlenu coraz częściej rozpatrywane są jako czynniki naruszające homeostazę ustroju. Są one fizjologicznymi metabolitami reakcji zachodzących w organizmie. Źródłem ich są, między innymi, aktywowane leukocyty, proces autooksydacji hemoglobiny, oddychanie komórkowe czy fagocytoza. Zaburzenie stanu równowagi między ilością powstających reaktywnych form tlenu (RFT) a obroną organizmu przeciwko nim określa się mianem stresu tlenowego. Na występowanie stresu oksydacyjnego wskazuje zarówno podwyższone stężenie produktów peroksydacji lipidów, jak i wzrost lub osłabienie aktywności enzymów chroniących przed RFT oraz spadek stężeń antyoksydantów nieenzymatycznych. Zmiany poziomu RFT mogą być konsekwencją procesu chorobowego, jego mediatorem, a także przyczyną (1, 3).

Reakcje utleniania kontrolowane są przez mechanizmy zarówno enzymatyczne, jak i nieenzymatyczne (19). Wśród mechanizmów enzymatycznych szczególne miejsce zajmuje tzw. triada enzymatyczna. Stanowi ją dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), która katalizuje dysmutację anionorodnika ponadtlenkowego do H_2O_2 , katalaza (CAT), rozkładająca nadtlenek wodoru do wody i tlenu cząsteczkowego oraz peroksydaza glutationowa (GSH-Px), katalizująca z udziałem glutationu degradację nadtlenku wodoru i nadtlenków organicznych, głównie wodoronadtlenków pochodzących z nienasyconych kwasów tłuszczowych. O aktywności tych enzymów decydują jony metali, będące ich kofaktorami. Cynk, miedź i mangan decydują o aktywności SOD, selen wpływa na aktywność GSH-Px, a żelazo na aktywność katalazy (22). O po-

tencjale antyoksydacyjnym krwi decydują też związki niskocząsteczkowe (kwas moczowy, bilirubina, albuminy, karotenoidy, glutation, witaminy A, C, E). Ich wspólną aktywność określa się jako całkowity stan antyoksydacyjny (TAS). TAS to parametr opisujący zdolność ochronny układów biologicznych przed uszkodzeniami wywołanymi przez reaktywne metabolity tlenu (12). Do określenia zdolności antyoksydacyjnych środowiska zarówno hydrofilnego, jak i lipofilnego wykorzystuje się rodnik chromogenowy ABTS⁺ (2).

Krowa w okresie okołoporodowym, ze względu na zachodzące zmiany hormonalne, immunologiczne i metaboliczne jest szczególnie narażona na zachwianie równowagi między wytwarzaniem aktywnych form tlenu, a możliwościami antyutleniającymi komórek. Uważa się, że poród łącznie z laktacją, jak również nasilenie procesów katabolicznych w okresie okołoporodowym, może być źródłem stresu tlenowego (1, 5). Nie obserwuje się różnic w poziomie antyoksydantów i substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) między krowami w pierwszym tryestrze ciąży a niecielnymi (16). Stan stresu oksydacyjnego może być monitorowany za pomocą biomarkerów obecnych w plazmie i/lub erytrocytach.

Celem badań była ocena ogólnoustrojowej równowagi antyoksydacyjnej krów z prawidłowym przebiegiem okresu okołoporodowego na podstawie aktywności głównych enzymów antyoksydacyjnych, produktów peroksydacji lipidów oraz stężenia niektórych nieenzymatycznych markerów stresu tlenowego.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w okresie wiosenno-letnim, w 2 gospodarstwach o alkiezowym systemie utrzymania krów. Żywnienie oparte było na kiszonce z kukurydzy, sianokiszonce oraz paszy treściwej przygotowywanej w gospodarstwach. Średnia wydajność w obu gospodarstwach wynosiła 6500 kg mleka za 305 dni laktacji. Do badań zakwalifikowano 30 krów (po 15 z każdego gospodarstwa). Krew pobierano dwukrotnie przed porodem (-4/-3 i -2/-1 tydzień), w tygodniu kiedy nastąpił poród (0) oraz w 4. i 8. tygodniu po porodzie do probówek z heparyną litową i EDTA, które do laboratorium transportowano w temperaturze 4°C.

Stan ustrojowej równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej oceniano na podstawie stężenia aldehydowych produktów peroksydacji lipidów (malonyldialdehydu – MDA i 4-hydroksynonenalu – 4-HNE) i TAS w surowicy, aktywności SOD w erytrocytach, GSH-Px i CAT w pełnej krwi oraz stężenia albumin, kwasu moczowego i bilirubiny. Do oznaczeń wykorzystano zestawy Ransel, Ransod i Total Antioxidant firmy Randox oraz Catalase-520 i LPO-586 firmy Oxis. Oznaczenia biochemiczne wykonano przy użyciu zestawów Alpha Diagnostics. Wymienione parametry oznaczano kolorymetrycznie zgodnie z instrukcją dla odpowiednich zestawów. Określono także wskaźniki hematologiczne krwi – WBC, RBC, HGB (analyzer Sysmex F800).

Obliczenia statystyczne wykonano przy użyciu programu „Statgraphics” analizą korelacji i analizą wariancji ANOVA w modyfikacji Newmana-Keulsa.

Wyniki i omówienie

Wartości wskaźników hematologicznych krwi krów przedstawiono w tab. 1. Nie odbiegały one od danych piśmiennictwa (20).

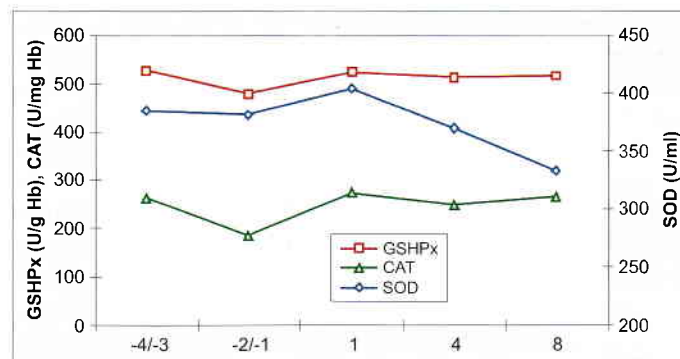
Ryc. 1, 2 i 3 obrazują parametry stanu antyoksydacyjnego krwi krów zdrowych. Nie zanotowano różnic statystycznie istotnych w aktywność SOD, GSH-Px i CAT (średnia dla GSH-Px w zakresie 480-530 U/g Hb, dla SOD 333-405 U/ml, dla CAT U/mg Hb). Widoczna była jednak tendencja do wzrostu aktywności tych enzymów między 2.-1. tygodniem przed porodem, a tygodniem kiedy nastąpił poród, po czym następował spadek ich poziomu (ryc. 1). Wzrost aktywności SOD w tygodniu, kiedy nastąpił poród, może być odpowiedzią na zwiększone wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$). Jest on generowany w dużych ilościach podczas oksydacji hemoglobiny (12). Rezultatem dysmutacji tego rodnika jest wzrost ilości nadtlenu wodoru, co z kolei zwiększa aktywności GSH-Px i CAT. Można przypuszczać, że wzrost aktywności wymienionych enzymów odnotowany w badaniach własnych jest skutkiem opisanego mechanizmu. Stężenie MDA + 4-HNE uległo obniżeniu w tygodniu porodu, a następnie widoczny był stopniowy wzrost w 4. i 8. tygodniu laktacji (średnia w zakresie 0,97-1,496 $\mu\text{mol/l}$). Końcowym produktem peroksydacji lipidów (wolnorodnikowego procesu dotyczącego głównie PUFA) są aldehydy, hydroksyaldehydy oraz produkty węglowodorowe. Znaczenie biologiczne ma peroksydacja dwudziestowęglowych, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych prowadząca do powstania eikozanoidów. Produkty peroksydacji lipidów wykazują działanie zarówno cytotoksyczne, jak i mutagenne (np. 4-hydroksynonenal, powstający podczas peroksydacji kw. arachi-

Tab. 1. Wskaźniki hematologiczne krwi krów w okresie okołoporodowym ($\bar{x} \pm sD$)

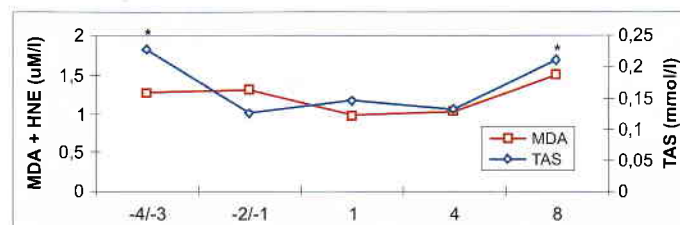
Tygodnie	WBC $\times 10^3/\mu\text{l}$	RBC $\times 10^6/\mu\text{l}$	HGB g/dl
-4/-3	7,66	5,16	8,21 ^a
	2,65	0,77	0,88
-2/-1	7,35	5,96	8,29 ^a
	2,34	1,26	0,80
0	7,48	6,50	7,82 ^a
	2,59	1,93	1,02
+4	7,98	5,92	6,96 ^b
	1,44	1,44	1,06
+8	8,24	6,34	7,07 ^b
	3,61	1,61	1,03

Objaśnienia: a, b – różnice statystycznie istotne $p \leq 0,05$

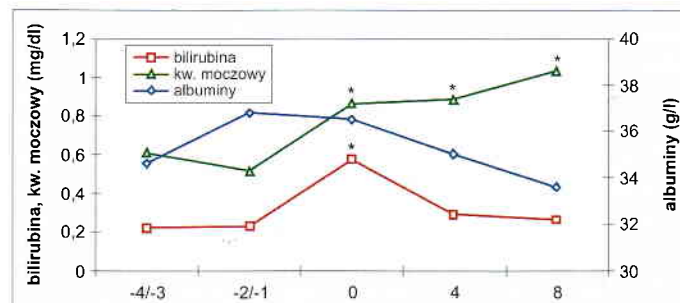
donowego) (22). Uzyskane wyniki wskazują, że w zdrowym organizmie mechanizmy kompensacyjne zapobiegają wzrostowi MDA+4-HNE w okresie przejściowym, pomimo osłabienia obrony antyoksydacyjnej (niski TAS). Równoczesna tendencja do wzrostu aktywności tzw. triady enzymatycznej wskazuje na aktywację procesów antyoksydacyjnych przy nieprzekroczonych możliwościach



Ryc. 1. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych w krwi w okresie okołoporodowym



Ryc. 2. Poziom TAS i MDA+4-HNE w surowicy w okresie okołoporodowym



Ryc. 3. Stężenie antyoksydantów nieenzymatycznych w surowicy w okresie okołoporodowym

buforowych organizmu. Istotne różnice obserwowano w poziomie TAS. Parametr ten uległ istotnemu obniżeniu na 2 tygodnie przed porodem. Osłabienie obrony antyoksydacyjnej utrzymywało się w tygodniu, kiedy nastąpił poród i w 4. tygodniu laktacji, po czym w 8. tygodniu po porodzie stężenie TAS istotnie wzrosło. Niewielka tendencja do wzrostu TAS dała się zauważyć w tygodniu porodu. Miller (15) oznaczając całkowitą aktywność antyoksydacyjną osocza uzyskał przeciwne wyniki. W miarę zbliżającego się porodu notował on wzrost tego parametru. Zaznaczyć należy, że wydajność mleczna jest też czynnikiem determinującym zmiany w poziomie substancji utleniających (8). Istotny wzrost stężenia bilirubiny i kwasu moczowego obserwowano w tygodniu, kiedy nastąpił poród. W kolejnych tygodniach po porodzie widoczny był istotny wzrost stężenia kwasu moczowego. Poziom albumin nie ulegał wahaniom w całym cyklu badań, z niewielką tendencją do wzrostu w ostatnich 2 tygodniach przed porodem oraz w tygodniu, w którym miał miejsce poród. Uważa się, że kwas moczowy jest głównym antyoksydantem surowicy, zarówno wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowym. Mechanizm antyoksydacyjnego działania kwasu moczowego nie jest do końca zdefiniowany, a jego ochronne działanie wiąże się z tworzeniem stabilnych kompleksów z jonami żelaza i miedzi oraz ochroną askorbinianu. Hydrofobowym antyoksydantem surowicy jest też bilirubina. Reaguje ona z ROO[•] (rodnik peroksydowy), przerywając proces peroksydacji lipidów (22). W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono korelacji między stężeniem TAS a poziomem kwasu moczowego, bilirubiny i albumin. Wskazuje to, że o poziomie TAS decydują głównie: wit. A, C, E i glutation. Na zachowanie homeostazy proantyoksydacyjnej krwi krów w okresie okołoporodowym wpływają, obok poprzednio wymienionych, także pochodne estronu i estradiolu, cechujące się właściwościami antyoksydacyjnymi (3). Hormony te posiadają pierścień aromatyczny, a grupy –OH związane z tym pierścieniem mają właściwości fenoli i mogą reagować z wolnymi rodnikami (18). Najwyższe wartości zarówno estronu, jak i 17-β estradiolu obserwowano w okresie porodu, ale stopniowy ich wzrost rozpoczyna się na kilkanaście dni przed porodem (11).

Stopniowy wzrost w surowicy ilości szybko działających antyoksydantów oraz GSH-Px, zarówno selenozależnej, jak i niezależnej oraz zredukowanego glutationu obserwowano w kolejnych tygodniach przed porodem u krów z prawidłowym przebiegiem okresu poporodowego, suplementowanych wit. E. Równocześnie widoczny był spadek stężenia TBARS i α-tokoferolu (6). Wzrostu stężenia TBARS w okresie przejściowym nie odnotowano także w innych badaniach (5). Podobne zachowanie MDA+4-HNE obserwowano w badaniach własnych. W okresie okołoporodowym widoczny jest spadek poziomu witamin A i E, głównych antyoksydantów rozpuszczalnych w tłuszczach. Jest to związane nie tylko z wydzielaniem tych witamin z siarą, ale także ich działaniem przeciwutleniającym, szczególnie w obrębie błon komórkowych (10, 21).

Zachowanie równowagi proantyoksydacyjnej ustroju jest szczególnie ważne w okresie przejściowym, gdyż

aktywne postacie tlenu wpływają na funkcje leukocytów – hamują aktywność limfocytów T, ograniczają migrację makrofagów i poziom czynników chemotaktycznych w stosunku do granulocytów obojętnochłonnych (4). Bydło cechuje się małą rezerwą szpikową neutrofilów i stosunkowo niską ich liczebnością we krwi. W okresie okołoporodowym widoczny jest tzw. leukogram stresowy, który charakteryzuje się leukocytozą wywołaną wyrzutem do krwi obwodowej dojrzałych postaci granulocytów obojętnochłonnych oraz limfopenią i monocytopenią (9). PMN w tym okresie cechują się jednak osłabioną zdolnością fagocytarną (14, 17).

Z przeprowadzonych badań wynika, że w okresie okołoporodowym dochodzi do osłabienia obrony antyoksydacyjnej, a powrót organizmu do stanu równowagi proantyoksydacyjnej ma miejsce w drugim miesiącu laktacji.

Piśmiennictwo

- Allison R. D., Laven R. A.: Effect of vitamin E supplementation on the health and fertility of dairy cows: a review. *Vet. Rec.* 2000, 147, 703-708.
- Andrzejak R., Goch J. H., Jurga M.: Wolne rodniki i ich znaczenie w medycynie. *Post. Hig. Med. Dośw.* 1995, 49, 531-549.
- Arnao M. B.: Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Technol.* 2000, 11, 419-421.
- Bartosz G.: *Druga twarz tlenu*. PWN, Warszawa 1995.
- Bendich A.: Physiological role of antioxidants in the immune system. *J. Dairy Sci.* 1993, 76, 2789-2794.
- Bernabucci U., Ronchi B., Lacetera N., Nardone A.: Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *J. Dairy Sci.* 2002, 85, 2173-2179.
- Brzezinska-Ślebodzińska E., Miller J. K., Quigley J. D., Moore J. R.: Antioxidant status of dairy cows supplemented peripartum with vitamin E and selenium. *J. Dairy Sci.* 1994, 77, 3087-3095.
- Castillo C., Hernandez J., Lopez-Alonso M., Miranda M., Sotillo J., Benedicto J. L.: Plasma lipid hydroperoxides and total antioxidant status in healthy dairy cows. *Abstr. XXII World Buiatrics Congress, Hannover 2002*, s. 71.
- Cole D. J., Roussel A. J., Whitney M. S.: Interpretacja wyników badania hematologicznego u bydła. *Weterynaria po Dyplomie 2000*, 1, 20-26.
- Goff J. P., Kimura K., Horst R. L.: Effect of mastectomy on milk fever, energy and vitamins A, E, and β-carotene status at parturition. *J. Dairy Sci.* 2002, 85, 1427-1436.
- Janowski T., Zduńczyk S., Małeki-Tepicht J., Barański W., Raś A.: Mammary secretion of oestrogens in the cow. *Dom. Anim. Endocrinol.* 2002, 23, 125-137.
- Liczmański A. E.: Toksyczność tlenu. II. Mechanizmy ochronne. *Post. Biochem.* 1988, 34, 293-310.
- Kleczkowski M., Kluciński W., Sikora J., Zdanowicz M., Dziekan P.: Role of the antioxidants in the protection against oxidative stress in cattle – nonenzymatic mechanisms (Part 2). *Pol. J. Vet. Sci.* 2003, 6, 301-308.
- Mehrzad J., Duchateau L., Pyorala S., Burvenich C.: Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. *J. Dairy Sci.* 2002, 85, 3268-3276.
- Miller J. K., Brzezinska-Ślebodzińska E., Madsen F. C.: Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J. Dairy Sci.* 1993, 76, 2812-2823.
- Naziroglu M., Gur S.: Antioxidants and lipid peroxidation levels of blood and cervical mucus in cows in relation to pregnancy. *Dt. Tierärztl. Wschr.* 2000, 107, 374-376.
- Nonnecke B. J., Kimura K., Goff J. P., Kehrl M. E.: Effects of the mammary gland on functional capacities of blood mononuclear leukocyte populations from periparturient cows. *J. Dairy Sci.* 2003, 86, 2359-2368.
- Sumida S., Tanaka K., Kitao H., Nakamodo F.: Properties of estrone and estradiol derivatives. *Int. J. Biochem.* 1989, 21, 835-838.
- Szelachowska M., Abdelrazek S., Zonenberg A., Kinalska I.: Rola stresu oksydacyjnego w procesach chorobowych. *Terapia 2002*, 5, 1-7.
- Winnicka A.: Wartości referencyjne podstawowych badań laboratoryjnych w weterynarii. *Wyd. SGGW, Warszawa 2004*.
- Wang X., Quinn P. J.: The location and function of vitamin E in membranes (review). *Mol. Membr. Biol.* 2000, 17, 143-156.
- Yo B. Y.: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 1994, 74, 139-162.

Adres autora: dr Hanna Markiewicz, ul. Toruńska 52D/51, 86-050 Solec Kujawski