

Ocena aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych we krwi koni z nawracającą chorobą obturacyjną dróg oddechowych

ARTUR NIEDŹWIEDŹ, JÓZEF NICPOŃ, HIERONIM BOROWICZ*, PIOTR ŁOŚ*,
MARCIN ZAWADZKI**, LIDIA JANUSZEWSKA**

Katedra Chorób Wewnętrznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, pl. Grunwaldzki 47, 50-366 Wrocław

*Studenci V roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP we Wrocławiu

**Katedra i Zakład Higieny AM, ul. Mikulicza-Radeckiego 7, 50-345 Wrocław

Niedźwiedz A., Nicpoń J., Borowicz H., Łoś P., Zawadzki M., Januszewska L.

Evaluation of selected antioxidant enzymes in the blood of horses with recurrent airways obstruction

Summary

The aim of this study was to evaluate the activity of antioxidant enzymes in horses diagnosed with recurrent airway obstruction (RAO). The study was conducted on a group of 40 horses, various breeds, divided into two groups, aged 8-15 years, including 15 males and 25 mares. Blood was collected for antioxidant analyses from 20 recurrent airway obstruction (RAO)-affected horses and 20 healthy control horses. The authors determined the activity of glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase in the blood. Average reductase activity in a group of healthy horses was 79.7 U/g, while in the group of RAO-affected horses it was 39.7 U/g. The average activity of glutathione peroxidase in the group of healthy horses was 47.8 U/g, while in the group of RAO-affected horses it was 37.8 U/g. The average activity of glutathione S-transferase in the group of healthy horses was 39.8 U/g, while in the group of RAO-affected horses it was 21.8 U/g. The resulting research indicates that oxidative stress is a consequence of chronic airway inflammation in the course of RAO in horses.

Keywords: horses, RAO, oxidative stress

Po raz pierwszy dowody dotyczące istnienia wolnych rodników w żywych organizmach uzyskano ponad 50 lat temu (5). Krótko po tym odkryciu Harmann wysunął hipotezę zakładającą, że wolne rodniki mogą być ubocznym produktem enzymatycznych reakcji zachodzących w żywych organizmach. W 1956 r. po raz pierwszy opisano skutki działania wolnych rodników tlenowych na organizm, polegające na uszkodzeniu komórek, czego konsekwencją mogą być procesy mutagenyzy, nowotworzenia oraz biologicznego starzenia się organizmów (11, 12). Kolejna era, dotycząca badań w tej dziedzinie, rozpoczęła się w 1968 r., w chwili odkrycia enzymu dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) (2). Od tamtej chwili uwaga świata naukowego została zwrócona w kierunku badań uszkodzeń struktur komórkowych, takich jak: DNA, lipidy, białka oraz inne fragmenty komórek, wywoływanych przez reaktywne formy tlenu (RFT). Jednocześnie od niedawna wysuwane są teorie dotyczące korzystnego wpływu wolnych rodników na żywy organizm. Reak-

tywne formy tlenu powstają w toku fizjologicznego metabolizmu i to nie tylko jako produkt uboczny tego metabolizmu. Przykładem są białe krwinki, które w zetknięciu z chorobotwórczymi drobnoustrojami wytwarzają reaktywne formy tlenu – m.in. nadtlenek wodoru. Od pośrednictwa RFT zależne jest również przekazywanie sygnałów między komórkami (22).

Konsekwencją reakcji wolnorodnikowych zachodzących w organizmach żywych było wykształcenie się różnych mechanizmów obronnych. Rolę tę pełnią zarówno niskocząsteczkowe antyoksydanty o prostej strukturze, jak i białka enzymatyczne wyspecjalizowane w usuwaniu reaktywnych form tlenu (3). Istotną rolę w antyoksydacyjnej ochronie organizmu pełnią związki niskocząsteczkowe w postaci witamin i mikroelementów, nazywanych ogólnie „wymiataczami wolnych rodników” (4). Za najważniejsze z nich uważa się: selen, kwas askorbinowy, tokoferole, karotenoidy oraz związki polifenolowe.

Ponadnormatywny wzrost stężeń reaktywnych form tlenu nazywany jest stresem oksydacyjnym. Sytuacja ta może mieć miejsce zarówno w warunkach zwiększonego tempa endogennej produkcji RFT, ekspozycji na dodatkowe czynniki indukujące, jak i upośledzenia naturalnych mechanizmów antyoksydacyjnych organizmu (9).

Związek stresu oksydacyjnego z chorobami jest aktualnie przedmiotem szeroko zakrojonych badań w wielu dziedzinach medycyny człowieka. Istnieje szereg chorób, w przebiegu których udokumentowano wpływ wolnych rodników na ich patogenezę, jak również stwierdzono zwiększoną rodnikogenezę w ich przebiegu (14, 15, 26).

Podobne badania wykonywane są również u koni, jednak ich zasięg jest ograniczony jedynie do niektórych jednostek chorobowych. Dość dobrze udokumentowany jest związek następstw niedokrwienia jelit oraz reperfuzji w przebiegu chorób morzyskowych z inicjacją rodnikogenezy (23). Podobne badania prowadzono nad wpływem intensywnego wysiłku fizycznego na status oksydacyjny krwi oraz w przebiegu nawracającej choroby obturacyjnej dróg oddechowych koni (RAO). RFT odgrywają znaczącą rolę w przypadku chorób układu oddechowego ludzi. Powiązanie stresu oksydacyjnego z chorobami układu oddechowego ludzi wykazano w przebiegu ostrej niewydolności oddechowej, astmy alergicznej, przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP) oraz po ekspozycji na ozon. Badania nad powiązaniem wolnych rodników z chorobami dróg oddechowych koni ograniczają się głównie do nawracającej choroby obturacyjnej dróg oddechowych koni (RAO), jednakże istnieją przypuszczenia dotyczące powiązania stresu oksydacyjnego z powysiłkowym krwawieniem z płuc u koni (exercise-induced pulmonary hemorrhage – EIPH) (19).

Badania porównujące stężenie glutationu w popłuczynach płuc pęcherzykowo-oskrzelowych (BAL) koni zdrowych, w okresie remisji RAO i koni z zaostrzeniem tej choroby wykazały związek stresu oksydacyjnego z nawracającą obturacją dróg oddechowych koni (21). W porównaniu z grupą koni zdrowych, konie z zaostrzeniem RAO miały podwyższone stężenie GSH oraz GSSG. Natomiast u zwierząt w okresie remisji RAO, w porównaniu z końmi z zaostrzeniem tej choroby, obserwuje się znaczny wzrost GSSG z jednoczesnym spadkiem stężenia GSH (1). Zarówno w pierwszym, jak i drugim przypadku patofizjologia tego procesu nie jest do końca poznana. Obserwowany w niniejszym badaniu wzrost aktywności GSH w okresie zaostrzenia choroby można tłumaczyć aktywacją układu antyoksydacyjnego w odpowiedzi organizmu na wytwarzanie dużych ilości wolnych rodników tlenowych w warunkach stresu tlenowego (18).

Celem badań była ocena aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych u koni z rozpoznaną nawracającą obturacją dróg oddechowych koni (RAO).

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na grupie 40 koni różnych ras, podzielonych na dwie grupy, w wieku od 8-15 lat. Grupę pierwszą w liczbie 20 stanowili pacjenci Kliniki Chorób Wewnętrznych UP we Wrocławiu z rozpoznaną nawracającą obturacją dróg oddechowych, grupę drugą – kontrolną, w liczbie 20 – stanowiły konie zdrowe, użytkowane rekreacyjnie. Kryterium rozpoznania RAO był pozytywny wywiad, objawy kliniczne, charakterystyczny obraz dróg oddechowych w badaniu bronchoskopowym oraz wynik badania popłuczyn płuc pęcherzykowo-oskrzelowych (BAL). Na przeprowadzone badania uzyskano zgodę II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu – uchwała nr 39/2008 z dnia 16 czerwca 2008 r.

Materiał do badań stanowiła krew pobierana z jednego wklucia z żyły szyjnej zewnętrznej (*vena jugularis externa*). Do badań hematologicznych oraz analizy enzymów antyoksydacyjnych krew pobierano w ilości 2 ml do trzech jednorazowych probówek z wersenianem dwupotasowym (K₂EDTA). Materiał do badań stanowiła masa krwinkowa zabezpieczona do czasu oznaczeń w temp. –70°C.

Masę krwinkową po rozmrożeniu zawieszano w podwójnej objętości wolnego od nadtlenu 1% roztworu detergentu Triton X-100 (Sigma, USA) i po homogenizacji oraz 10-minutowej inkubacji wirowano przy 13 000 G przez 10 minut. Nadsącz rozcieńczano w 50 mM buforze fosforanowym o pH 7,5 zawierającym 0,2% albuminę surowicy wołowej i 2 mM EDTA, i przeznaczano do oznaczeń enzymów antyoksydacyjnych. Stężenie hemoglobiny oznaczano metodą Drabkina.

Oznaczanie aktywności reduktazy glutationowej (GR) dokonywano w hemolizatach krwinek rozcieńczonych PBS w temperaturze 37°C, wg instrukcji do zestawu firmy Bioxytech metodą kinetyczno-spektrofotometryczną, długość fali 340 nm w analizatorze biochemicznym EM 280 (Emapol, Gdańsk). Metoda polega na spektrofotometrycznym pomiarze szybkości tworzenia się zredukowanego NADP powstającego podczas redukcji utlenionego glutationu i katalizowanego przez GR obecną w próbce. Wyniki przeliczano na U/g hemoglobiny, przyjmując, że 1U oznacza tworzenie 1 μmol substratu/min. Współczynnik zmienności dla metody oznaczenia GR wynosił 4,21%.

Oznaczanie aktywności peroksydazy glutationowej (GPx) przeprowadzano metodą kinetyczno-spektrofotometryczną wg instrukcji do zestawu firmy Bioxytech. Obecna w próbce GPx katalizuje rozkład wodoronadtlenku, jednocześnie utleniając zredukowany glutation do jego formy disiarczkowej. W reakcji pomocniczej wykorzystuje się katalizowany przez GR i związany ze spadkiem zawartości NADPH proces redukcji glutationu utlenionego. Pomiaru reakcji szybkości zmiany absorbancji dokonywano w temperaturze 37°C przy długości fali 340 nm, za pomocą analizatora biochemicznego EM 280 (Emapol, Gdańsk). Wyniki przeliczano na U/g białka (1U oznacza tworzenie 1 μmol substratu/min.), uwzględniając stężenie białka oraz rozcieńczenie próbek. Współczynnik zmienności dla metody oznaczania GPx wynosił 1,82%.

Oznaczanie aktywności transferazy S-glutationowej (GST) przeprowadzono metodą kinetyczno-spektrofotometryczną wg instrukcji do zestawu firmy Cayman Chemical

Company (USA, cat no 703302). Metoda opiera się na pomiarze szybkości reakcji katalizowanego przez GST sprzęgania chlorodinitrobenzenu ze zredukowanym glutationem. Pomiarów kinetyki dokonano w temperaturze 37°C, długości fali 340 nm, za pomocą analizatora biochemicznego EM 280 (Emapol, Gdańsk). Wyniki przeliczano na U/g białka, uwzględniając stężenia białka oraz rozcieńczenie próbek homogenatów, przyjmując, że 1U oznacza tworzenie 1 μmol substratu/min. Współczynnik zmienności dla metody oznaczania GST wynosił 2,73%.

Analiza statystyczna. Zgodność rozkładów zmiennych z rozkładem normalnym sprawdzano testem Kolmogorova-Smirnova. Wszystkie parametry zostały ocenione jako zgodne z rozkładem normalnym. Dla porównań parametrycznych przeprowadzono test t-Studenta, przyjmując za istotne różnice, których poziom istotności p nie przekroczył 5% ($p < 0,05$). Wszystkie analizy przeprowadzono za pomocą oprogramowania Statistica v. 7.1 firmy StatSoft.

Wyniki i omówienie

Obserwując średnią aktywność reduktazy glutationu, zauważono istotną statystycznie ($p < 0,05$) różnicę pomiędzy średnią aktywnością tego enzymu w grupie koni chorych. Średnia aktywność reduktazy koni zdrowych wynosiła 79,7 U/g, podczas gdy u koni chorych wynosiła 39,7 U/g (ryc. 1).

Obserwując średnią aktywność peroksydazy glutationowej, nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pomiędzy końmi zdrowymi a chorymi. Średnia aktywność peroksydazy glutationowej koni zdrowych wynosiła 47,8 U/g, natomiast u koni chorych 37,8 U/g (ryc. 2).

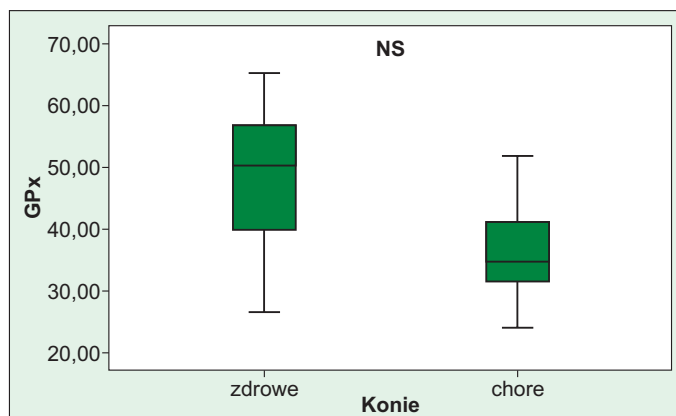
Badając średnią aktywność transferazy S-glutationowej, stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy końmi zdrowymi i chorymi ($p < 0,05$). Średnia aktywność transferazy S-glutationowej koni zdrowych wynosiła 39,8 U/g, podczas gdy u koni chorych wynosiła 21,8 U/g (ryc. 3).

W niniejszych badaniach zaobserwowano, że u koni z RAO dochodzi do istotnego rozchwiania aktywności antyoksydantów enzymatycznych. Świadczyć to może o nasilonych procesach rodnikogenezy mającej miejsce w przebiegu nawracającej obturacji dróg oddechowych koni. Do pomiaru narażenia wolnorodnikowego badanych koni w przebiegu RAO wykorzystano związki enzymatyczne o charakterze antyoksydantów. Spośród wielu znanych związków o takim charakterze częstym obiektem badań są enzymy związane z metabolizmem selenu – GPx, GST oraz GR (19). Enzymy te, występujące w dużych ilościach w krwinkach czerwonych, są jedną z ważniejszych linii obrony w przypadku ataku wolnych rodników tlenowych (16, 24).

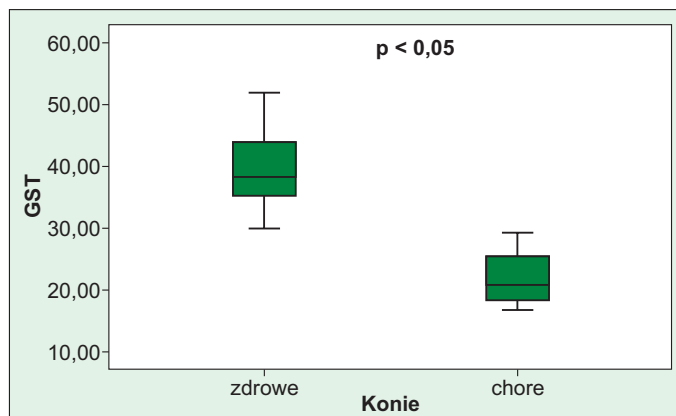
Pomimo iż wartości średniej aktywności peroksydazy glutationowej nie różniły się istotnie statystycznie, zauważono tendencję spadkową omawianego enzymu. Badania nad zachowaniem się tego enzymu u koni z RAO przyniosły zróżnicowane wyniki. W części prac wykazano statystycznie istotny wzrost aktyw-



Ryc. 1. Średnia aktywność reduktazy glutationu (U/g)



Ryc. 2. Średnia aktywność peroksydazy glutationowej (U/g)



Ryc. 3. Średnia aktywność transferazy S-glutationowej (U/g)

ności całkowitej peroksydazy glutationowej u chorych koni, podczas gdy w innych badaniach wykazano spadek aktywności omawianego enzymu (2, 7). Różnice te mogą być spowodowane wpływem wielu czynników na aktywność GPx u koni z RAO, takich jak: stopień nasilenia choroby, zastosowane leczenie oraz warunki utrzymania zwierząt. Nie bez znaczenia mogą być również procedury laboratoryjne, wykorzystane do oceny enzymu.

Reduktaza glutationowa (GR) pełni funkcję pomocniczą w układzie antyoksydacyjnym enzymów związanych z glutationem. Poprzez redukcję utlenionego glutationu przywraca jego właściwości antyoksydacyjne oraz umożliwia ponowny udział w reakcjach katal-

lizowanych przez GPx i GST, a także zdolność bezpośredniego „wymiatania” wolnych rodników. Podobnie jak inne enzymy antyoksydacyjne, synteza GR podlega regulacji, a reaktywne formy tlenu indukują jej syntezę. Niedobór seleniu, poza wpływem na aktywność GPx, może również prowadzić do zmniejszenia aktywności GR (8). W badaniach własnych zaobserwowano istotny statystycznie spadek aktywności reduktazy glutationowej u koni chorych ($p < 0,05$). Wskazuje to na dużą rolę reduktazy glutationowej, jako enzymu pełniącego funkcję wczesnego wymiatacza wolnych rodników, w przypadku ich nadmiernej syntezy w przebiegu RAO. Podobne obserwacje poczynili inni autorzy (13, 20).

Kolejnym enzymem podlegającym analizie była transferaza S-glutationowa, enzym wchodzący w tzw. cykl glutationowy. Transferazy glutationowe są polimorficzną nadrodziną wielofunkcyjnych białek enzymatycznych obecnych w cytoplazmie, mikrosomach, oraz w formie związanej z błonami komórkowymi. Biologiczna rola tego enzymu polega głównie na uczestniczeniu w drugiej fazie detoksykacji ksenobiotyków. Istotny statystycznie spadek aktywności tego enzymu u koni chorych w porównaniu do koni zdrowych wskazuje na zwiększenie ilości procesów wolnorodnikowych obejmujących wielonienasycone kwasy tłuszczowe błon komórkowych. Badania własne są zgodne z wynikami innych autorów (7, 13, 17).

Liczne badania u ludzi potwierdziły powiązanie stresu oksydacyjnego z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POCHP). Podobne badania, lecz w mniejszej skali, wykonywane były u koni. W badaniach tych wykazano nasiloną rodnikogenezę w przebiegu POChP oraz RAO, lecz z powodu odmiennej patofizjologii tych dwóch chorób, nie można ich jednoznacznie porównywać. W przypadku POChP cechy stresu oksydacyjnego związane są prawdopodobnie z nasiloną peroksydacją lipidów w drogach oddechowych, zmniejszeniem ilości wolnych grup sulfhydrylowych, wzrostem stężenia osoczowych izoprostanów oraz wzrostem ilości wydychanych gazów toksycznych, takich jak tlenek węgla oraz tlenek azotu (10, 26).

Uważa się, że u koni nasilone wytwarzanie wolnych rodników, powodujące powstanie stanu stresu oksydacyjnego, prawdopodobnie związane jest z przewlekłym zapaleniem dróg oddechowych. Stan ten powoduje wyczerpanie naturalnych rezerw antyoksydacyjnych, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia rodnikogenezy. Z powyższych danych wynika więc, że stres oksydacyjny w przypadku RAO u koni nie uczestniczy w patofizjologii procesu chorobowego, lecz jest jego konsekwencją (2, 7, 18).

Wydaje się, że u koni z RAO zasadne jest stosowanie związków neutralizujących wolne rodniki (6, 25). Aktualnie prowadzone są liczne badania mające na celu określenie korzyści płynących z suplementowania antyoksydantów drobnocząsteczkowych u koni z objawami nawracającej obturacji dróg oddechowych.

Piśmiennictwo

1. Art T., Kirschvink N., Smith N., Lekeux P.: Indices of oxidative stress in blood and pulmonary epithelium lining fluid in horses suffering from recurrent airway obstruction. *Equine Vet. J.* 1999, 31, 397-401.
2. Bannister W. H.: From haemocuprein to copper-zinc superoxide dismutase: a history on the fiftieth anniversary of the discovery of haemocuprein and the twentieth anniversary of the discovery of superoxide dismutase. *Free Radic. Res. Commun.* 1988, 5, 35-42.
3. Byung P. Y.: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 1994, 74, 139-162.
4. Cannio R., Fiorentino G., Morana A., Rossi M., Bartolucci S.: Oxygen: friend or foe? Archaeal superoxide dismutases in the protection of intra- and extracellular oxidative stress. *Front Biosci.* 2000, 5, 768-779.
5. Commoner B., Townsend J., Pake G. E.: Free radicals in biological materials. *Nature* 1954, 174, 689-691.
6. Cuzzocrea S., Riley D. P., Caputi A. P., Salvemini D.: Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol. Rev.* 2001, 53, 135-159.
7. Deaton C. M., Marlin D. J., Smith N. C., Roberts C. A., Harris P. A., Schroter R. C., Kelley F. J.: Antioxidant and inflammatory responses of healthy horses and horses affected by recurrent airway obstruction to inhaled ozone. *Equine Vet. J.* 2005, 37, 243-249.
8. Górecka R., Sitarowska E., Kluciński W.: Antioxidant parameters of horses according to age, sex, breed and environment. *Pol. J. Vet. Sci.* 2002, 5, 209-216.
9. Halliwell B.: How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.* 1990, 9, 1-32.
10. Halliwell B., Gutteridge J. M. C.: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990, 186, 1-85.
11. Harman D.: Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 1956, 11, 298-300.
12. Harman D.: The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981, 78, 7124-7128.
13. Harvey J. W.: Pathogenesis, laboratory diagnosis, and clinical implications of erythrocyte enzyme deficiencies in dogs, cats, and horses. *Vet. Clin. Pathol.* 2006, 35, 144-156.
14. Heaton M. B., Paiva M., Mayer J., Miller R.: Ethanol-mediated generation of reactive oxygen species in developing rat cerebellum. *Neurosci. Lett.* 2002, 334, 83-86.
15. Jacob R. A., Sotoudeh G.: Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutr. Clin. Care.* 2002, 5, 66-74.
16. Ji L. L., Dillon D. A., Bump K. D.: Antioxidant enzyme response to exercise in equine erythrocytes. *Equine Vet. Sci.* 1990, 10, 380-388.
17. Kirschvink N., Art T., de Moffarts B., Smith N., Marlin D., Roberts C., Lekeux P.: Relationship between markers of blood oxidant status and physiologic variables in healthy and heaves-affected horses after exercise. *Equine Vet. J. Suppl.* 2002, 34, 159-164.
18. Kirschvink N., Art T., Smith N., Lekeux P.: Effect of exercise and COPD crisis on isoprostane concentration in plasma and bronchoalveolar lavage fluid in horses. *Equine Vet. J. Suppl.* 1999, 30, 88-91.
19. Kirschvink N., Lekeux P.: *Pferdeheilkunde. Oxidative stress in equine medicine – current knowledge.* 2002, 18, 569-573.
20. Matskevich G. N., Korotkina R. N., Devlikanova A. Sh., Vishnevskii A. A., Karelin A. A.: The study of the antioxidant enzymes in erythrocytes in lung diseases. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 2003, 2, 23-25.
21. Mills P. C., Roberts C. A., Smith N. C.: Effects of ozone and airway inflammation on glutathione status and iron homeostasis in the lungs of horses. *Am. J. Vet. Res.* 1996, 57, 1359-1363.
22. Mittal C. K., Murad F.: Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977, 74, 4360-4364.
23. Moore R. M., Muir W. W., Granger D. N.: Mechanisms of gastrointestinal ischemia-reperfusion injury and potential therapeutic interventions: a review and its implications in the horse. *J. Vet. Intern. Med.* 1995, 9, 115-132.
24. Nozik-Grayck E., Suliman H. B., Piantadosi C. A.: Extracellular superoxide dismutase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005, 37, 2466-2471.
25. Williams C. A., Kronfeld D. S., Hess T. M., Saker T. E.: Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. *J. Anim. Sci.* 2004, 82, 588-594.
26. Young I., Woodside J.: Antioxidants in health and Diseases. *J. Clin. Pathol.* 2001, 54, 176-186.

Adres autora: dr Artur Niedzwiedź, pl. Grunwaldzki 47, 50-366 Wrocław;
e-mail: artur.niedzwiedz@up.wroc.pl