Aktywność krwinkowej dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy glutationowej oraz surowicze stężenie witaminy E u psów z zaćmą związaną z wiekiem

JACEK MADANY, BEATA ABRAMOWICZ, ANDRZEJ MILCZAK,
DAGMARA WINIARCZYK, KAROLINA WRZEŚNIEWSKA

Katedra i Klinka Chorób Wewnętrznych Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Otrzymano 19.02.2019

Zaakceptowano 11.04.2019

Madany J., Abramowicz B., Milczak A., Winiarczyk D., Wrześniewska K.

Activities of blood superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum vitamin E level in dogs with age-related cataract

Summary

Oxidative mechanisms play a major role in the etiology and pathogenesis of cataract, especially age-related cataract (ARC). Our study aimed to investigate the serum vitamin E level and the activities of systemic antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX) in the blood of dogs with age-related cataract but without any general diseases. The population examined consisted of 40 dogs of various breeds and both sexes, aged 10-16 years, diagnosed with age-related cataract. Cataract was diagnosed by complete ocular examination. Blood was collected during clinical examination from the external jugular vein in dogs weighing less than 20 kg or from the small saphenous vein in dogs weighing over 20 kg. The control group consisted of 10 healthy dogs of different breeds and sexes, aged 8-12 years, without cataract. SOD and GPX were measured by a colorimetric reagent kit Randox SOD and Randox GPX. The level of vitamin E was determined using a Perkin-Elmer LS 30 luminescent spectrometer. This apparatus determines the vitamin E level by the fluorometric method of Hansen and Warwick. The results showed a significantly lower activity of SOD as well as a lower activity of GPX and a lower level of the vitamin E in dogs with ARC compared to healthy dogs. The results obtained indicate a weakening of the general antioxidant defence system in the course of ARC in dogs. These results suggest that such conditions may have effect on the development of canine age-related cataract and are consistent with the free radical theory of age-related cataract development.

Keywords: dogs, age-related cataract (ARC), blood superoxide dismutase (SOD), blood glutathione peroxidase (GPX), serum vitamin E

Zaćma starcza (senile cataract – SC) od niedawna zwana też zaćmą związaną z wiekiem (age-related cataract – ARC) jest częścią procesu starzenia się organizmu zarówno u ludzi, jak i zwierząt. U ludzi na całym świecie jest główną przyczyną pogorszenia ostrości wzroku i utraty widzenia (5, 21). Szacuje się, że u psów sytuacja jest podobna, a przeprowadzone badania wskazują, że u wszystkich psów w wieku powyżej 13,5 lat występuje zaćma o różnym stopniu nasilenia (15, 24). Jej stopień rozpowszechnienia w ciągu ostatnich 40 lat w Ameryce Północnej zwiększył się aż o 255% (7). Obecnie przyjmuje się hipotezę o wieloczynnikowej patogenezie ARC, a z analizowanych mechanizmów biochemicznych biorących udział w inicjowaniu powstających w soczewce zmętnień jednym

z bardziej prawdopodobnych wydaje się mechanizm stresu oksydacyjnego (16, 20, 22).

Celem badań była ocena aktywności enzymów obrony antyoksydacyjnej: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationowej (GPX) w pełnej krwi oraz badanie stężenia witaminy E w surowicy psów z ARC, bez towarzyszących schorzeń ogólnych.

Materiał i metody

Badania wykonano u 40 psów różnych ras i płci, w wieku od 10 do 16 lat, u których w badaniu klinicznym i okulistycznym rozpoznano zaćmę starczą przy braku innych chorób narządowych. Krew do badań pobierano w ciągu 3-7 dni od zgłoszenia i pierwszych badań, co spowodowane było koniecznością dostosowania się do istniejących

procedur laboratoryjnych. Krew pobierano u psów powyżej 20 kg z żyły dostopowej, a u ważących mniej z żyły szyjnej zewnętrznej. Dla oznaczeń aktywności enzymów pobierano krew do probówek z heparyną, a do oznaczeń witaminy E do probówek bez koagulantów.

Grupę kontrolną stanowiło 10 psów klinicznie zdrowych bez zaćmy, w wieku 8-12 lat korzystających z programu opieki geriatrycznej prowadzonego w klinice.

W celu oceny stanu antyoksydacyjnego oznaczono we krwi aktywność enzymów: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w jednostkach na 1 g hemoglobiny (U/g Hb) i peroksydazy glutationowej (GPX) w jednostkach na 1 g hemoglobiny (U/g Hb) oraz witaminę E w $\mu\text{g/ml}$. SOD i GPX oznaczano za pomocą testów firmy Randox – Wielka Brytania. Oznaczenia tych enzymów przeprowadzano w termostadowej kuwecie w spektrofotometrze Cobas-Miras firmy Roche przy długościach fal 450 nm i 340 nm, odpowiednio. Witaminę E oznaczano w spektrometrze luminescencyjnym Perkin-Elmer LS 30. Aparat ten wykorzystuje do oznaczania witaminy E metodę fluorometryczną Hansena i Warwicka.

Rezultaty badań opracowano statystycznie, korzystając z dostępnego na rynku oprogramowania (SigmaPlot® 12.0; Systat Software Inc., San Jose, CA, USA), podając w tabeli wartości średnie ($\bar{x}$) i odchylenie standardowe (s). Różnice między grupami psów analizowano stosując test t-Studenta. Za istotne statystycznie uznawano wartości dla $p \leq 0,05$.

Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationowej (GPX) w pełnej krwi oraz stężenie witaminy E w surowicy psów z zaćmą związaną z wiekiem i psów kontrolnych przedstawiono w tabeli 1.

Analiza krwinkowej aktywności SOD wskazuje, iż w grupie psów z zaćmą jej aktywność jest niższa niż w grupie psów kontrolnych. Różnica między średnimi wynikami w obydwu grupach jest znaczna i statystycznie istotna. Dysmutaza ponadtlenkowa jest pierwszoplanowym ogniwem enzymatycznej obrony antyoksydacyjnej. Katalizuje przekształcanie rodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru i w ten sposób chroni komórki organizmu, w tym i nabłonek soczewki, przed destrukcyjnym działaniem tlenu.

Uzyskane wyniki krwinkowej aktywności SOD są podobne do wyników stwierdzanych u ludzi (8, 9) i psów (2, 19). Wykazana zależność istotnie niższej aktywności SOD u psów z zaćmą jest zbieżna z wy-

nikami uzyskiwanymi u ludzi z ARC, o czym donoszą liczni autorzy (3, 9, 13, 25). U psów Barros nie wykazał istotności różnic pomiędzy grupami psów z zaćmą i kontrolną (2). Wśród ostatnich prac wykazano istotnie niższe stężenie SOD również w soczewkach i cieczy wodnistej przedniej komory oka u psów z ARC (17). W innej zaś pracy wykazano, że nadekspresja SOD w soczewkach chroni je przed formowaniem się zaćmy (10). Obserwowane w badaniach własnych obniżenie aktywności krwinkowej SOD, jak można przypuszczać, spowodowane jest, z jednej strony, nasileniem systemowej peroksydacji lipidów w przebiegu zaćmy, także w soczewkach i cieczy wodnistej przedniej komory oka, co wykazano we wcześniejszych pracach (1, 4, 9, 11, 12, 14), z drugiej zaś strony może być powodowane postępującym z wiekiem osłabieniem enzymatycznego systemu obrony (15). Będące efektem tych działań obniżenie sprawności obrony antyoksydacyjnej może sprzyjać zmianom w białkach komórkowych, a tym samym przyczyniać się do rozwoju ARC.

Analiza aktywności GPX wskazuje, że w grupie psów z zaćmą wyniki są niższe niż w grupie psów kontrolnych, różnice nie są jednak statystycznie istotne. Peroksydaza glutationowa współdziała z dysmutazą ponadtlenkową w pierwszej linii obrony przed wolnymi rodnikami i w kolejnej reakcji, po dysmutacji, usuwa powstałe cząsteczki nadtlenu wodoru, a może także rozkładać nadtlene lipidowe.

Uzyskane wyniki krwinkowej aktywności GPX u psów są podobne do uzyskanych u ludzi (3, 4, 9) i psów (2, 19). Obserwowana w badaniach własnych tendencja do obniżania aktywności GPX w przebiegu zaćmy koresponduje ze studiami wykonanymi u ludzi, u których stwierdzono istotnie niższą aktywność u osób z ARC (4, 8, 9). U psów obserwowano istotnie niższą zawartość GPX w zmętniałych soczewkach, a także w cieczy wodnistej przedniej komory oka (17). Uzyskane wyniki własne aktywności GPX nie różnią się statystycznie między grupami jednak niższe wartości w grupie psów z zaćmą, przy jednoczesnym istotnym obniżeniu aktywności SOD, mogą świadczyć o postępującym osłabieniu głównych enzymów obrony antyoksydacyjnej. Fakt ten może również tłumaczyć łatwiejsze powstawanie zaćmy.

Średnie stężenie witaminy E w surowicy psów z zaćmą jest niższe niż w grupie psów kontrolnych.

Tab. 1. Krwinkowa aktywność enzymów SOD i GPX oraz stężenie witaminy E w surowicy psów z zaćmą zależną od wieku i psów kontrolnych

Grupa psów	SOD U/g Hb $\bar{x} \pm s$ (min.-max.)	GPX U/g Hb $\bar{x} \pm s$ (min.-max.)	Witamina E $\mu\text{g/ml}$ $\bar{x} \pm s$ (min.-max.)
Z zaćmą zależną od wieku (ARC) n = 40	1196 $\pm$ 258 ^a (762-1954)	540 $\pm$ 105 ^a (334-687)	12,2 $\pm$ 6,41 ^a (3,0-22,2)
Kontrolna n = 10	1367 $\pm$ 313 ^b (508-1864)	601 $\pm$ 84 ^a (510-758)	14,3 $\pm$ 3,82 ^a (7,70-19,6)

Objaśnienie: a, b średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

Różnica jest niewielka i statystycznie nieistotna. U psów z zaćmą zwraca uwagę poziom niższy od uznanego za optymalny i fakt dużego rozrzutu wyników u poszczególnych osobników (u 8 psów wyniki były poniżej 10 $\mu\text{g/ml}$). W grupie kontrolnej stężenie witaminy E zbliżone jest do optymalnego, przy niskim rozrzucie wyników.

Witamina E pełni w komórce funkcję antyoksydacyjną. Razem z witaminą

A, C, K, selenem i związkami zawierającymi grupy tiolowe należy do naturalnych antyoksydantów. Jest silnym przeciwutleniaczem umiejscowionym głównie na błonach komórkowych, chroniąc fosfolipidy przed tworzeniem grup nadtlenkowych. Badania wykonane u ludzi wykazały, że istnieje odwrotna zależność między poziomem witaminy E a częstością występowania zaćmy i zwyrodnieniem plamki (18). Stwierdzono też, że witamina E i witamina C odgrywają pewną rolę w zapobieganiu ARC u ludzi (6, 23), dlatego proponuje się aktualnie w medycynie ludzkiej intensywną suplementację z udziałem witaminy E jako formę zapobiegania lub opóźniania występowania zaćmy. U psów wykazano jedynie, że niedobór składników o charakterze przeciwutleniaczy, w tym witaminy E, prowadzi do zwyrodnienia siatkówki i odkładania lipofuscyny (15). Przez bliską analogię z ludźmi przypuszcza się, że niedobór witaminy E może ułatwiać powstawanie ARC u psów. Uzyskane wyniki upoważniają do przypuszczenia, że u psów z zaćmą może występować niedobór witaminy E i zmniejszenie jej antyoksydacyjnego oddziaływania.

Łączna analiza uzyskanych wyników, krwinkowej aktywności SOD, GPX i surowiczego stężenia witaminy E, jak można przypuszczać, wskazuje na osłabienie ogólnego systemu obrony antyoksydacyjnej, występujące u psów z zaćmą. Wyniki te sugerują, że sytuacja ta może się przyczyniać do powstawania zaćmy i tym samym potwierdzać wolnorodnikową teorię powstawania ARC.

Piśmiennictwo

1. Ates N. A., Yildirim O., Tamer L., Unlu A., Ercan B., Muslu N., Kanik A., Hatungil R., Atik U.: Plasma catalase activity and malondialdehyde level in patients with cataract. *Eye* 2004, 18, 785-788.
2. Barros P. S. M., Angelotti A. C., Nobre F., Morales A., Fantoni D. T., Barros S. B. M.: Antioxidant profile of cataractous english cocker spaniels. *Vet. Ophthalmol.* 1999, 2, 83-86.
3. Chandrasena L. G., Chackrewarthy S., Perera P. T., de Silva D.: Erythrocyte antioxidant enzymes in patients with cataract. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2006, 36, 201-204.
4. Chang D., Zhang X., Rong S., Sha Q., Liu P., Han T., Pan H.: Serum antioxidant enzymes level and antioxidative stress products in age-related cataract patients. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013, 1-7.
5. Congdon N., O'Colmain B., Klaver C. C., Klein R., Munoz B., Friedmann D. S., Kempen J., Taylor H. R., Mitchell P.: Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch. Ophthalmol.* 2004, 122, 477-485.
6. Cui Y.-H., Jing Ch.-X., Pan H.-W.: Association of blood antioxidants and vitamins with risk of age-related cataract: a metaanalysis of observational studies 1-3. *Am. J. Clin. Nutr.* 2013, 98, 778-786.
7. Gelatt K. N., MacKay E. O.: Prevalence of primary breed-related cataracts in the dog in North America. *Vet. Ophthalmol.* 2005, 8, 101-111.
8. Inal M. E., Kanbak G., Sunal E.: Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to ageing. *Clin. Chim. Acta* 2001, 305, 75-80.
9. Kaur J., Kukreja S., Kaur A., Malhotra N., Kaur R.: The oxidative stress in cataract patients. *J. Clin. Diagn. Res.* 2012, 6, 1629-1632.
10. Lin D., Barnett M., Grauer L., Robben J., Jewell A., Takemoto L., Takemoto D. J.: Expression of superoxide dismutase in whole lens prevents cataract formation. *Mol. Vis.* 2005, 11, 853-858.
11. Madany J.: Serum malondialdehyde level and activity of total antioxidant status of dogs with age-related cataract. *Pol. J. Vet. Sci.* 2016, 19, 429-431.
12. Madany J., Miczak A., Abramowicz B.: Malondialdehyde content and the activity of the total antioxidant status in the aqueous humor of dogs with senile cataract. *Med. Weter.* 2014, 70, 636-637.

13. Maurya O. P., Mohanty L., Bhaduri G., Chandra A.: Role of anti-oxidant enzymes superoxide dismutase and catalase in the development of cataract: study of serum levels in patients with senile and diabetic cataracts. *J. Indian Med. Assoc.* 2006, 104, 394, 396-397.
14. Micelli-Ferrari T., Vendemiale G., Grattagliano I., Boscia F., Arnese L., Altomare E., Cardia L.: Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of myopic and senile cataract. *Brit. J. Ophthalmol.* 1996, 80, 848-843.
15. Ofri R.: Soczewka, [w:] Maggs D. J., Miller P. E., Ofri R.: *Okulistyka weterynaryjna* Slattera. Elsevier, Wrocław 2008, s. 284-304.
16. Ottonello S., Foroni C., Carta A., Petrucco S., Maraini G.: Oxidative stress and age-related cataract. *Ophthalmologica* 2000, 214, 78-85.
17. Simeonova G. P., Nedev V. S., Sleiman M. U.: Evidence of local oxidative stress in canine senile cataract. *Revue Med. Vet.* 2018, 169, 7-9, 173-179.
18. Taylor A., Jacques P. F., Epstein E. M.: Relations among aging, antioxidant status and cataract. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995, 63, 1439S-1447S.
19. Tomsic K., Seliskar A., Lukanc B., NemecSwete A.: Plasma total antioxidant capacity and activities of blood glutathione peroxidase and superoxide dismutase determined in healthy dogs by using commercially available kits. *Acta Vet. Beograd* 2016, 66, 534-548.
20. Truscott R. J.: Age-related nuclear cataract oxidation is the key. *Exp. Eye Res.* 2005, 80, 709-725.
21. Vashist P., Talwar B., Gogoi M., Maraini G., Camparini M., Ravindran R. D., Murthy G. V., Fitzpatrick K. E., John N., Chakravarthy U. et al.: Prevalence of cataract in an older population in India: the India study of age - related eye disease. *Ophthalmology* 2011, 118, 272-278.
22. Vinson J. A.: Review. Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology* 2006, 13, 151-162.
23. Wiliam C. G., Glynn R. J., Manson J. E., MacFadyen J., Bubes V., Schwartz M., Buring J. E., Sesso H. D., Gaziano J. M.: Effects of multivitamin supplement on cataract and age-related macular degeneration in a randomized trial of male physicians. *Ophthalmology* 2014, 121, 525-534.
24. Williams D. L., Heath M. F., Wallis C.: Prevalence of canine cataract: preliminary results of a cross-sectional study. *Vet. Ophthalmol.* 2004, 7, 29-35.
25. Yang W., Yu W., Li Z.: The study on superoxide dismutase and trace element in patients with senile cataract. *Eye Science* 2000, 16, 246-248.

Adres autora: lek. wet. Karolina Wrześniewska, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin; e-mail: karola.wrzesniewska@gmail.com