

# FIZJOLOGIA I PATOFIZJOLOGIA

ANDRZEJ LEDWOŻYW, ADAM KĄDZIOLKA

## Przetrwanie efektu cytoprotekcyjnego prostaglandyn $E_1$ i $E_2$ w czasie działania na erythrocyty świni

Zakład Patofizjologii Instytutu Nauk Fizjologicznych Wydziału Weterynaryjnego AR,  
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Jednym z mniej poznanych procesów, w których prostaglandyny spełniają rolę modulatorów lub mediatorów, jest ich działanie cytoprotekcyjne. Cytoprotekcyjny wpływ prostaglandyn lub ich syntetycznych analogów na komórki błony śluzowej żołądka stwierdził Robert i wsp. (10) oraz Whittle i Steel (16), na hepatocyty Funck-Brentano i wsp. (4) i Sikujara i wsp. (13). Prostaglandyny wywierają też ochronny wpływ na erythrocyty różnych gatunków zwierząt i człowieka, zmniejszając nasilenie hemolizy wywołanej hipotonicznymi roztworami NaCl (8, 9) lub działaniem rodnika nadtlenkowego (15). W poprzedniej pracy (8) stwierdziliśmy cytoprotekcyjne działanie  $PGE_1$  i  $PGE_2$  na erythrocyty świni w czasie hemolizy wywołanej hipotonicznym roztworem NaCl. Csordas i Schauenstein (2) stwierdzili cytoprotekcyjny efekt 18-węglowych nienasyconych kwasów tłuszczowych w erythrocytach kury i owcy oraz przetrwanie tego efektu po usunięciu nie związanych przez erythrocyty kwasów z układu doświadczalnego kilkakrotnym przepłukiwaniem buforem.

Celem niniejszej pracy było stwierdzenie: a) czy efekt cytoprotekcyjny prostaglandyn zależy od siły działającego czynnika hemolitycznego (stężenia hipotonicznego roztworu NaCl) oraz b) czy efekt ten jest niwelowany przez usunięcie prostaglandyn z układu doświadczalnego.

### Materiał i metody

Krew świń uzyskiwano w miejscowych Zakładach Mięśnych używając heparyny jako antykoagulantu. Krew wirowano 15 min przy 1500 g, osocze wraz z warstwą krwinek białych odrzucano, a erythrocyty przemywano 3-krotnie zimnym (277°K) 0,154 M roztworem NaCl. Następnie sporządzano zawiesinę (1:20 obj.) krwinek czerwonych w 0,15 M buforze fosforanowym o pH 7,4.

Prostaglandyny  $PGE_1$  i  $PGE_2$  otrzymano dzięki uprzejmości prof. D. H. Nugterena, Unilever Research Laboratories, Vlaardingen, Holandia. Roztwory podstawowe prostaglandyn ( $2,6 \times 10^{-2}$  M) sporządzono w absolutnym etanolu. Z roztworów tych przygotowywano roztwory robocze o stężeniu  $2,6 \times 10^{-3}$  M,  $2,6 \times 10^{-4}$  M,  $2,6 \times 10^{-5}$  M i  $2,6 \times 10^{-6}$  M przez rozcieńczenie roztworów podstawowych buforem fosforanowym.

Wpływ prostaglandyn na hemolizę erythrocytów w hipotonicznych roztworach NaCl.

Do zawiesiny erythrocytów (0,5 ml) dodawano 0,1 ml roztworów roboczych prostaglandyn (otrzymując koń-

cowe stężenia  $0,4 \times 10^{-3}$  M,  $0,4 \times 10^{-4}$  M,  $0,4 \times 10^{-5}$  M i  $0,4 \times 10^{-6}$  M) i mieszaninę inkubowano 30 min. w temp. pokojowej. Następnie do każdej próbki dodawano 4,4 ml 0,094 M, 0,086 M lub 0,077 M roztworu NaCl, inkubowano ponownie 30 min. w temp. pokojowej, wirowano 10 min. przy 1500 g i oznaczano gęstość optyczną supernatantu przy 540 nm. Z próba kontrolna postępowano analogicznie dodając do zawiesiny erythrocytów 0,1 ml buforu zamiast roztworu prostaglandyny. Z każdego rozcieńczenia wykonywano 6 powtórzeń.

Procent hamowania hemolizy przy każdym z wymienionych stężeń NaCl obliczano porównując gęstość optyczną supernatantu próbki inkubowanej z prostaglandyną, z gęstością optyczną supernatantu próbki inkubowanej z buforem, która przyjęto za 100% hemolizy.

Izotoniczne działanie prostaglandyn na krwinki czerwone i przetrwanie efektu cytoprotekcyjnego.

Do 0,5 ml zawiesiny erythrocytów dodano 0,1 ml roboczych roztworów prostaglandyn i mieszaninę inkubowano 60 i 120 minut w temp. pokojowej. Po zakończeniu inkubacji erythrocyty przemywano 4-krotnie buforem fosforanowym przez mieszanie z 10 ml buforu i wirowanie przez 10 min. przy 1500 g. Następnie wywoływano hemolizę przez dodanie 4,4 ml roztworów NaCl o wyżej podanych stężeniach i ponowną inkubację przez 30 min. w temp. pokojowej. Próbę kontrolną wykonywano identycznie jak przy badaniu wpływu prostaglandyn na hemolizę w hipotonicznych roztworach NaCl, analogicznie też obliczano procent hamowania hemolizy. Z każdego rozcieńczenia wykonywano 6 powtórzeń.

### Wyniki i omówienie

We wszystkich stosowanych stężeniach  $PGE_1$  wywiera wyraźne działanie cytoprotekcyjne na krwinki czerwone świni hamując hemolizę wywołaną hipotonicznymi roztworami NaCl. Wyraźnie widoczny jest też dwufazowy, zależny od stężenia efekt działania. Prostaglandyna ta, stosowana w stężeniach niższych ( $0,4 \times 10^{-4}$  M,  $0,4 \times 10^{-5}$  M i  $0,4 \times 10^{-6}$  M) hamuje hemolizę wywołaną 0,094 M roztworem NaCl w wyższym stopniu, niż stosowana w stężeniu  $0,4 \times 10^{-3}$  M. Zjawisko to daje się też zauważyć w przypadku hemolizy wywołanej działaniem 0,086 M roztworu NaCl. Efektu tego nie zaobserwowano podczas hemolizy wywołanej 0,077 M roztworem NaCl, gdzie stopień jej hamowania skorelowany był ze stężeniami  $PGE_1$ .

$PGE_2$  wykazuje także działanie cytoprotekcyjne na erythrocyty świni, jednak znacznie słabsze niż  $PGE_1$ . Stopień hamowania hemolizy skorelowany jest ze stężeniami  $PGE_2$ ; nie stwierdzono tutaj dwufazowego efektu w jej działaniu, obserwowanego w przypadku  $PGE_1$ .

Tab. 1. Procent hamowania hemolizy erytrocytów świni wywołanej hipotonicznymi roztworami NaCl ( $\bar{x} \pm s$ )

Typ prostaglandyny i stężenie NaCl	% hamowania hemolizy stężenia prostaglandyn (M)								
	$0,4 \times 10^{-3}$		$0,4 \times 10^{-4}$		$0,4 \times 10^{-5}$		$0,4 \times 10^{-6}$		
PGE <sub>1</sub>	0,094 M NaCl	21,8	3,2	39,6	2,6	34,6	2,0	31,6	1,8
	0,086 M NaCl	12,8	3,4	16,6	3,2	9,6	2,6	7,5	1,2
	0,077 M NaCl	9,0	2,2	7,4	2,0	6,2	1,4	4,8	0,8
PGE <sub>2</sub>	0,094 M NaCl	18,4	2,4	16,2	1,6	13,8	1,4	10,8	1,8
	0,086 M NaCl	12,2	1,8	10,6	2,0	8,6	1,6	7,4	1,4
	0,077 M NaCl	4,8	1,4	4,2	1,0	3,6	0,8	3,0	0,6

Stopień hamowania hemolizy wywołanej 0,077 M roztworem NaCl był niewielki i nie zależał od stężenia PGE<sub>2</sub> (tab. 1).

Efekt cytoprotekcyjny nie zanika po przemyciu buforem preinkubowanych z badanymi prostaglandynami erytrocytów. Nie obserwowano istotnych różnic w hamowaniu hemolizy erytrocytów w próbkach preinkubowanych 60 i 120 min. z PGE<sub>1</sub> lub PGE<sub>2</sub> w stężeniach  $0,4 \times 10^{-3}$  M i  $0,4 \times 10^{-4}$  M; różnice takie dają się zauważyć przy stężeniach prostaglandyn wynoszących  $0,4 \times 10^{-5}$  M i  $0,4 \times 10^{-6}$  M w czasie hemolizy wywołanej 0,086 M i 0,077 M roztworami NaCl. W tym przypadku podczas hemolizy wywołanej 0,094 M i 0,086 M roztworami NaCl również można zauważyć opisany powyżej dwufazowy efekt działania PGE<sub>1</sub> (tab. 2).

W obecnej chwili niewiele jest danych dotyczących mechanizmów oddziaływania prostaglandyn na elementy morfotyczne krwi. Nie ulega wątpliwości, że oddziaływanie to jest uwarunkowane istnieniem specyficznych receptorów na powierzchni tych komórek. Faktycznie, obecność takich receptorów stwierdzono na powierzchni erytrocytów (3, 7, 9, 14) oraz płytek krwi (11, 12, 17). Twierdzenie Kury'ego i wsp. (6, 7), że istnieje na powierzchni krwinki czerwonej receptor posiadający dwa allosteryczne miejsca efektorowe, jedno o wysokim powinowactwie do PGE<sub>1</sub> i niskim do PGE<sub>2</sub>, drugie zaś o wysokim powinowactwie do PGE<sub>2</sub> a niskim do PGE<sub>1</sub>, tłumaczyć może obserwowany przez nas efekt dwufazowy działania PGE<sub>1</sub>. Podobną dwufazowość w działaniu PGE<sub>1</sub> i PGE<sub>2</sub> na erytrocyty człowieka obserwował Rasmussen i wsp. (9).

Niewyjaśniony pozostaje mechanizm pośredniczący w przenoszeniu informacji z receptora do błony komórkowej. Sugerowany przez niektórych autorów (6, 7, 15) udział w tym procesie jonów Ca<sup>2+</sup> pochodzących ze środowiska zewnętrznego, a niezbędnych do aktywacji cyklazy adenylowej i produkcji cyklicznego 3', 5' — AMP, od którego z kolei zależy stopień fosforylacji strukturalnych białek błony komórkowej i zmiany jej własności fizykochemicznych, wydaje się być kontrowersyjny, gdyż w tym przypadku prostaglandyny wywierałyby wpływ na erytrocyty tylko w obecności jonów Ca<sup>2+</sup> w środowisku inkubacyjnym. Zarówno w tej pracy, jak i w poprzedniej (8)

Tab. 2. Przetwarzanie efektu cytoprotekcyjnego prostaglandyn E<sub>1</sub> i E<sub>2</sub> w czasie hemolizy erytrocytów świni wywołanej hipotonicznymi roztworami NaCl ( $\bar{x} \pm s$ )

Typ prostaglandyny, czas inkubacji i stężenie NaCl	% hamowania hemolizy stężenia prostaglandyn (M)								
	$0,4 \times 10^{-3}$		$0,4 \times 10^{-4}$		$0,4 \times 10^{-5}$		$0,4 \times 10^{-6}$		
PGE <sub>1</sub> 60 minut	0,094 M NaCl	17,5	1,6	33,2	1,8	28,4	1,6	26,6	2,4
	0,086 M NaCl	10,4	1,8	15,5	2,2	9,6	1,2	7,7	1,0
	0,077 M NaCl	7,5	1,2	8,8	0,8	5,3	0,8	3,7	1,0
PGE <sub>1</sub> 120 minut	0,094 M NaCl	15,4	1,6	29,2	2,0	25,3	2,4	24,7	1,7
	0,086 M NaCl	9,2	1,0	12,1	1,4	6,0	0,7	4,8	0,6
	0,077 M NaCl	6,0	0,7	5,0	0,5	3,3	0,6	2,5	0,6
PGE <sub>2</sub> 60 minut	0,094 M NaCl	16,0	1,8	17,8	2,2	11,0	1,6	8,4	1,0
	0,086 M NaCl	9,6	2,0	7,6	1,4	6,0	1,2	5,2	0,8
	0,077 M NaCl	3,6	0,8	2,8	0,6	2,0	0,6	1,4	0,4
PGE <sub>2</sub> 120 minut	0,094 M NaCl	11,8	1,6	9,4	1,4	7,2	1,0	6,0	0,7
	0,086 M NaCl	7,0	0,8	5,6	0,7	4,4	0,5	3,2	0,5
	0,077 M NaCl	2,4	0,5	2,0	0,4	1,4	0,5	1,0	0,3

cytoprotekcyjny efekt wywierany przez PGE<sub>1</sub> i PGE<sub>2</sub> obserwowaliśmy podczas inkubacji erytrocytów w środowisku nie zawierającym jonów Ca<sup>2+</sup>. Podobne środowiska inkubacyjne stosowali inni autorzy (1, 5).

Preinkubacja erytrocytów przeprowadzana przez 60 i 120 minut z obydwoma prostaglandynami w izotonii powoduje wystąpienie efektu cytoprotekcyjnego o sile zbliżonej do efektu obserwowanego w warunkach hipotonicznych, który nie ulega niwelacji nawet po usunięciu prostaglandyn ze środowiska inkubacyjnego przez przemycanie buforem. W piśmiennictwie nie napotkano dotychczas opisu przetwarzania efektu cytoprotekcyjnego prostaglandyn, sugerującego trwałe wiązanie się prostaglandyn z receptorem lub trwałość zmian w fizykochemicznych właściwościach błony komórkowej pod wpływem tych hormonów. Podobny efekt w przypadku inkubacji erytrocytów z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi obserwowali Csordas i Schauenstein (2). Obserwowany w badaniach własnych efekt cytoprotekcyjny PGE<sub>1</sub> i PGE<sub>2</sub> zależny jest od siły czynnika uszkadzającego krwinkę czerwoną (od stężenia hipotonicznego roztworu NaCl). Obydwie prostaglandyny w najwyższym stopniu hamują hemolizę wywołaną 0,094 M roztworem NaCl, w niższym zaś hemolizę wywołaną 0,086 M lub 0,077 M roztworem NaCl.

#### Piśmiennictwo

1. Belch J. J. F., Lowe G. D. D., Drummond M. M., Forbes C. D., Prentice C. R. M.: *Thromb. Haemost.* 45, 189, 1981.
2. Csordas A., Schauenstein K.: *Biochim. Biophys. Acta* 769, 571, 1984.
3. Dutta-Roy A. K., Sinha A. K.: *Biochim. Biophys. Acta* 812, 671, 1985.
4. Funk-Brentano C., Tinel M., Degott C., Letteron P., Babany G., Pessayre D.: *Biochem. Pharmacol.* 33, 89, 1984.
5. Guth P. H., Paulson G., Hirabayashi K.: *Dig. Dis. Sci.* 28, 903, 1983.
6. Kury P. G., Ramwell P. W., McConnel H. M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 478, 1974.
7. Kury P. G., McConnel H. M.: *Biochemistry* 14, 2798, 1975.
8. Ledwożyw A., Pruszkowska R., Trawińska B., Ruciński T., Kądziołka A.: *Acta Physiol. Pol.*, w druku.
9. Rasmussen H., Lake W., Allen J. E.: *Biochim. Biophys. Acta* 411, 63, 1975.
10. Robert A., Nezamis J. E., Lancaster C., Hanchar A. J.: *Gastroenterology* 77, 433, 1979.
11. Schafer A. L., Cooper B., O'Hara D., Handin R. L.: *J. Biol. Chem.* 254, 2914, 1979.
12. Stegl A. M., Smith J. B., Silver J. M., Nicolaou K. C., Ahern D.: *J. Clin. Invest.* 63, 215, 1979.
13. Sikuwara O., Monden M., Toyoshima K., Okamura J., Kosaki G.: *Transplantation* 36, 238, 1983.

14. Smith J. B., Silver M. J., Ingerman C. M., Kocsis J. J.: Prostaglandins 9, 137, 1975.  
 15. Taniguchi M., Aikawa M., Sakagami T.: Comp. Biochem. Physiol. 73A, 455, 1982.  
 16. Whittle B. J. R., Steel G.: Gastroenterology 83, 315, 1985.  
 17. Willems C., Stel H. V., van Aken W. G., van Mourik J. A.: Br. J. Haematol. 54, 43, 1983.

Adres autora: lek. wet. Andrzej Ledwożyw, ul. Grażyny 29/13, 20-602 Lublin

**Ледвожив А., Кондзёлка А. — Сохранение цитопротекционного эффекта простагландинов E<sub>1</sub> и E<sub>2</sub> во время действия на эритроциты свиньи**

Исследовали цитопротекционное влияние простагландинов PGE<sub>1</sub> и PGE<sub>2</sub>, применяемых в концентрациях 0,4×10<sup>-3</sup> M, 0,4×10<sup>-4</sup> M, 0,4×10<sup>-5</sup> M, а также 0,4×10<sup>-6</sup> M на эритроциты свиньи во время гемолиза, вызванного 0,094 M, 0,086 M и 0,077 M растворами NaCl. PGE<sub>1</sub> тормозил гемолиз, вызванный 0,094 M раствором NaCl, на 22—40%, 0,086 M NaCl на 8—17%, а гемолиз, вызванный 0,077 M NaCl, на 5—9%. PGE<sub>2</sub> в тех же системах тормозил гемолиз соответственно на 11—18%, 7—12% и 3—5%.

PGE<sub>1</sub> показывал 2-фазное, зависимое от концентрации действие на эритроциты свиньи; концентрации 0,4×10<sup>-4</sup> M — 0,4×10<sup>-6</sup> M тормозили гемолиз сильнее чем концентрация 0,4×10<sup>-3</sup> M.

Цитопротекционный эффект обоих простагландинов не исчезал после их удаления из инкубационной среды через промывание несколько раз преинкубированных эритроцитов буфером.

**Ledwożyw A., Kądziołka A. — Persistence of cytoprotective effect of prostaglandins E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub> during the action on swine erythrocytes**

Cytoprotective effect of prostaglandins PGE<sub>1</sub> and PGE<sub>2</sub> at concentrations 0.4×10<sup>-3</sup>M; 0.4×10<sup>-4</sup>M; 0.4×10<sup>-5</sup>M and 0.4×10<sup>-6</sup>M on swine erythrocytes during haemolysis caused by 0.094M; 0.086M and 0.077M of NaCl was examined. PGE<sub>1</sub> inhibited haemolysis caused by 0.094M of NaCl by 22—40%, 0.086M of NaCl by 8—17% and 0.077M of NaCl by 5—9%. PGE<sub>2</sub> in the identical experiments inhibited haemolysis of red blood cells by 11—18%, 7—12% and 3—5%, respectively.

The action of PGE<sub>1</sub> was biphasic and it depended on concentration of PGE<sub>1</sub> from 0.4×10<sup>-4</sup> to 0.4×10<sup>-6</sup>M inhibited haemolysis of red blood cells stronger than concentration of 0.4×10<sup>-3</sup>M PGE<sub>1</sub>. Cytoprotective effects of these two prostaglandins have not disappeared after their removing from an incubation medium (many fold washing of preincubated erythrocytes with buffer).

WŁADYSŁAW MIGDAŁ, JAN KACZMARCZYK

**Źródła egzogennych kwasów tłuszczowych**

Zespół Hodowli Świń Instytutu Hodowli Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Korzystne oddziaływanie i problemy związane z niedoborami egzogennych kwasów tłuszczowych u zwierząt przedstawiono w artykule „Niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe” (Medycyna Weterynaryjna nr 11, 1985). Uzupełniając informacje zawarte w tym opracowaniu, w oparciu o dostępną literaturę, omówiono poniżej źródła egzogennych kwasów tłuszczowych. Opracowanie to wydaje się tym bardziej uzasadnione, że w tabelach składu chemicznego i wartości pokarmowej pasz oraz w „Normach żywienia zwierząt gospodarskich” nie wykazano składu chemicznego kwasów tłuszczowych, jak również zapotrzebowania zwierząt na egzogenne kwasy tłuszczowe. W tab. od 1 do 6 przedstawiono zawartość egzogennych kwasów tłuszczowych: linolowego (C<sub>18:2</sub>), linolenowego (C<sub>18:3</sub>), arachidonowego (C<sub>20:4</sub>) oraz jednonienasyconych kwasów tłuszczowych: eikozenowego (C<sub>20:1</sub>) i erukowego (C<sub>22:1</sub>), które wpływają na wykorzystanie wszystkich kwasów tłuszczowych przez zwierzęta.

Najważniejszym i najbogatszym źródłem niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych są oleje roślinne. Zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych zależy od gatunku i odmiany roślinnej oleistej, warunków klimatycznych i agrotechnicznych, sposobu pozyskiwania oraz czasu i miejsca przechowywania oleju. W tab. 1 przedstawiono zawartość wy-

mienionych kwasów tłuszczowych w olejach pochodzenia roślinnego (2, 3, 4, 5; 9, 10, 16, 17, 19, 20, 29, 36). Wysoką zawartością egzogennych kwasów tłuszczowych charakteryzują się oleje: sojowy (2), słonecznikowy (4) i lnia-ny (19). Oleje: rzepakowy z odmian wysokoe-rukowych (3, 16, 17), z rzepiku (5) i z rzepy (20) zawierają wysoki poziom kwasu erukowego. Natomiast olej rzepakowy z odmian „bezerukowych” zawiera minimalne ilości kwasu erukowego (3, 16, 36). Znaczne ilości egzo-

Tab. 1. Zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w olejach pochodzenia roślinnego (%)

Olej roślinny	Pozycja piśmiennictwa	Wzrostowe kwasy tłuszczowe			
		C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:3</sub>	C <sub>20:4</sub>	C <sub>22:1</sub>
Olsze:					
- rzepakowy uniwersalny	36	20,0	12,0	-	10,0
- rzepakowy z odmian					
- staré	16	20,5	11,7	-	0,0
- janpol	16	22,2	12,3	-	0,9
- wipol	16	17,5	9,1	-	10,1
- gorczakiński	16	12,9	8,5	-	47,8
- rzepakowy niskoerukowy	3	24,6	12,1	-	0,1
- rzepakowy wyskoerukowy z rzepiku jarego	3	19,3	7,7	-	28,5
- odmiany nowobursynowski	17	15,0	10,4	-	37,9
- odmiany mazowiecki	17	14,7	13,5	-	43,7
- z rzepiku	5	17,9	7,9	-	23,1
- z dyni oleistej	9	60,7	-	-	-
- sojowy	2	46,2	7,9	-	5,0
- słonecznikowy	4	59,2	0,4	-	1,1
- lniaany	19	16,2	57,1	-	-
- tłuszcz parafinacyjny	10	17,94	-	-	19,88
- Zielenka białocza	29	11,6	7,2	-	55,00

Objaśnienia: C<sub>18:2</sub> — kwas linolowy, C<sub>18:3</sub> — kwas linolenowy, C<sub>20:1</sub> — kwas eikozenowy, C<sub>20:4</sub> — kwas arachidonowy, C<sub>22:1</sub> — kwas erukowy.