

Zofia Goc, Alexandra Szymborski, Edyta Kapusta

Zakład Fizjologii Zwierząt i Toksykologii, Instytut Biologii

Uniwersytet Pedagogiczny

**Stężenie glutationu zredukowanego
oraz zawartość pierwiastków biogenych
we krwi koni sportowych****Wstęp**

Mikro- oraz makroelementy są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu, ponieważ biorą udział w wielu procesach fizjologicznych, a także biochemicznych. Bardzo często są składnikami tkanek miękkich, kości lub kofaktorów enzymatycznych. Mają bardzo duży wpływ na regulację ciśnienia osmotycznego oraz wartości pH w organizmie, a także biorą udział w przemianach energetycznych. Odgrywają kluczową rolę w syntezie aminokwasów, hormonów oraz wybranych witamin (Gruszka i wsp., 2005, Jamroz i wsp., 2005, Odrowąż-Sypniewska i wsp., 2005, Wiśniewski, 1999). Nawet nieznaczne zmiany stężenia związków mineralnych w organizmie mogą zakłócać pracę istotnych dla życia układów, takich jak układ nerwowy, kostny czy mięśniowy, a także narządów na przykład serca czy nerek (Demińska-Kieć i Naskalski, 2002; Schottdorf-Timm i Maier, 2004; Stewart i wsp., 2004; Tomaszewski, 2001).

Cynk (Zn) jest mikroelementem, który jest niezbędny w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu. Jest składnikiem lub działa jako aktywator cynkoenzymów, takich jak dehydrogenaza mleczanowa, dehydrogenaza glutationowa oraz polimeraza RNA (Kulikowska i wsp., 1991). Jako składnik polimerazy uczestniczy w biosyntezie RNA oraz DNA. Cynk bierze udział w przemianach metabolicznych lipidów, peptydów oraz węglowodanów. Pełni rolę osłonową przy zatruciu organizmu kadmem i ołowiem, bierze udział w eliminacji wolnych rodników ponadtlenkowych, ponieważ hamuje utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych. Cynk jako kwas Lewisa pełni istotną rolę w wielu enzymach ze względu na fakt iż procesy wymiany ligandów w obecności cynku są szybkie. Wchłanianie cynku z pożywienia zachodzi w jelicie cienkim, w głównej mierze w dwunastnicy (Łoniewski i wsp., 1997). Cynk bierze udział w zachowaniu równowagi jonowej pierwiastków śladowych w organizmie (m.in. miedzi, manganu, seleniu i magnezu). Działa bakteriostatycznie oraz przeciwwzapalnie co przyczynia się do jego korzystnego wpływu na gojenie się ran skóry (Puzanowska-Tarasiewicz i wsp., 2010). Niedobór cynku w organizmach ssaków powoduje wiele chorób układu nerwowego, hormonalnego i immunologicznego.

Miedź (Cu) odgrywa szczególnie istotną rolę w procesach biologicznych, ponieważ stanowi składnik lub jest aktywatorem wielu enzymów, takich jak: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), oksydaza cytochromowa, tyrozynaza oraz hydroksylaza (Rinaldi, 2000; Windisch, 2002). Proces wchłaniania miedzi, który zachodzi w żołądku i jelicie cienkim, niejednokrotnie jest zaburzany poprzez obecność pierwiastków antagonistycznych, takich jak: kadm, ołów, żelazo, cynk, siarka i wapń. Niedobór Cu przyczynia się do zmniejszenia obrony antyoksydacyjnej organizmu. W krwi miedź występuje w kompleksach z histydyną, treoniną i kwasem glutaminowym. Obecność jonów Cu determinuje prawidłowe funkcjonowanie wielu hormonów oraz witamin. Miedź uczestniczy w metabolizmie tkanki łącznej (synteza kolagenu) oraz w hematopoezie, poprzez tworzenie pierścienia porfiryнового hemoglobiny. Pierwiastek ten pełni znaczącą rolę w powstawaniu keratyny, melaniny, syntezie neurotransmiterów, oddychaniu komórkowym, prawidłowej mielinizacji włókien nerwowych (De Romana i wsp., 2011, Rinaldi, 2000) oraz w metabolizmie żelaza. Zbyt duża ilość miedzi wpływa na zmniejszenie stężenia hemoglobiny, uszkodzenie wątroby i nerek. W związku z faktem, iż miedź jest antagonistą cynku, jej nadmiar może prowadzić do niedoboru cynku, a co za tym idzie, niedoborów immunologicznych (Aoyagi i Baker, 1993).

Wapń (Ca) jest dwuwartościowym kationem, który nie tylko uczestniczy w tworzeniu tkanki kostnej, ale przede wszystkim w wielu najważniejszych procesach fizjologicznych. Ca jest niezbędny w procesie krzepnięcia krwi ze względu na jego rolę jako kofaktora dla czynników VII, IX, X oraz protrombiny. Dodatkowo wapń pełni funkcję mediatora, który przetwarza bodziec fizyczny, chemiczny lub hormonalny na sprecyzowany efekt biologiczny m.in. uwalnianie neuroprzebieżników, hormonów i enzymów. Pierwiastek ten bierze udział w wymianie, poprzez kanały wapniowe, między komórką a jej otoczeniem lub też między organellami komórkowymi. Wapń jest również przebieżnikiem stanów pobudzenia w synapsach nerwowych, uczestniczy w skurczu mięśni, a poprzez regulację przepuszczalności błon dla jonów sodu jest wyznacznikiem progu pobudliwości komórek (Poznańska-Linde i Odrowąż-Sypniewska, 2000). Stężenia wapnia w organizmie jest regulowane głównie przez parathormon (PTH), kalcitriol i kalcytoninę, w mniejszym stopniu przez tyreotropinę, a także przez narządy – jelita, nerki i kości.

Mikroelementem szczególnie istotnym ze względu na jego uczestnictwo w transporcie i magazynowaniu tlenu jest żelazo (Fe). Pierwiastek ten jest substratem w syntezie hemu, głównego składnika hemoglobiny, ponadto bierze udział w reakcjach oksydo-redukcyjnych i immunologicznych (Ganz, 2007). Należy również zwrócić uwagę na znaczenie żelaza w procesie dojrzewania limfocytów, w syntezie mieliny, neuroprzebieżników oraz kwasów nukleinowych. Interakcja jonów żelaza występujących w centrach aktywnych enzymów mitochondrialnych, a tlenem jest fundamentem do wykorzystania tlenu jako źródła energii komórki. Oddziaływanie między Fe, a tlenem w organizmach ma również swoją złą stronę: jony żelaza, które nie są związane z wysokocząsteczkowymi ligandami mogą reagować ze zredukowanymi formami tlenu, a w efekcie tych reakcji powstają silnie toksyczne wolne rodniki tlenowe (Gutteridge i Halliwell, 2000).

Magnez (Mg) to dwuwartościowy kation wewnątrzkomórkowy, który ma bardzo duże znaczenie dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania organizmów żywych (Thomas, 1998). Ponad 50% magnezu znajduje się w kościach, 45% w komórkach tkanek miękkich, takich jak wątroba, nerki i mięśnie, a pozostała część (około 5%) w płynach pozakomórkowych. Pierwiastek ten pełni rolę koenzymu lub aktywatora około 300 układów enzymatycznych, w głównej mierze tych związanych z przenoszeniem grup fosforanowych oraz z przemianami energetycznymi w komórce. Bierze udział w regulacji stężenia cholesterolu w krwi, a także ułatwia wbudowywanie wapnia do kośćca, obniżając jego poziom w krwi (Poznańska-Linde i Odrowąż-Sypniewska, 2000). Magnez jest czynnikiem koniecznym do prawidłowego funkcjonowania pompy sodowo-potasowej (Thomas, 1998). Mg uczestniczy również w procesach replikacji, transkrypcji i translacji w komórkach oraz w procesach związanych ze skurczem mięśni gładkich i prądkowanych. W dużym stopniu wpływa na układ krwiotwórczy, a także procesy krzepnięcia krwi.

Sód (Na) i potas (K) zalicza się do podstawowych kationów jednowartościowych organizmów zwierzęcych. Na jest kationem zewnątrzkomórkowym, który jest czynnie usuwany z komórek za pomocą pompy sodowo-potasowej. Jedną z podstawowych funkcji sodu jest udział w gospodarce wodno-elektrolitowej oraz prawidłowym funkcjonowaniu układu mięśniowego i nerwowego. Bilansując ujemne ładunki anionów chlorowych, wodorowęglanowych i fosforanowych uczestniczy w regulacji gospodarki kwasowo-zasadowej organizmu. Co istotne, jest niezbędny do utrzymania potencjału czynnościowego błony komórkowej. Nagły napływ kationów sodowych do komórki (depolaryzacja) jest podstawą pobudliwości komórek oraz przewodnictwa impulsów nerwowych. Potas, kation wewnątrzkomórkowy, jest aktywnie wpompowywany do komórek również przez pompę sodowo-potasową. K uczestniczy w regulacji gospodarki kwasowo-zasadowej na drodze wymiany z zewnątrz-komórkowymi jonami wodorowymi (tzw. wymiana jonowa). Dodatkowo jony potasu są aktywatorami wielu enzymów wewnątrzkomórkowych, związanych głównie z przemianą węglowodanów i białek (McDonald i wsp., 2002).

Antyoksydanty to substancje, które chronią komórki organizmu przed szkodliwymi wolnymi rodnikami. Jednym z najbardziej powszechnych i uniwersalnych związków posiadających właściwości antyoksydacyjne jest glutation zredukowany (GSH) – niskocząsteczkowy związek tiolowy, licznie występujący w komórkach eukariotycznych, zarówno zwierzęcych jak i roślinnych. Glutation to tripeptyd składający się z trzech aminokwasów: kwasu glutaminowego (Glu), cysteiny (Cys) oraz glicyny (Gly). Stężenie wewnątrzkomórkowego GSH jest specyficzne dla danego typu komórek i znacznie przekracza stężenia innych niskocząsteczkowych związków tiolowych, na przykład koenzymu Q, cysteiny oraz homocysteiny. Wewnątrzkomórkowe stężenie glutationu wynosi od 0,5 do 10 mM w zależności od rodzaju tkanki (Winiarska, 2000). W warunkach fizjologicznych około 99% glutationu występuje w formie zredukowanej (GSH), natomiast forma utleniona (GSSG) stanowi jego nieznaczną frakcję. W komórkach glutation zazwyczaj występuje w cytoplazmie, mitochondriach i jądrze komórkowym, natomiast syntetyzowany jest w głównej mierze w cytozolu komórek wątroby (Shelly, 2013). Dzięki osobliwej strukturze glutation jest chroniony przed wewnątrzkomórkowymi peptydazami.

Obecność wiązania izopeptydowego (grupa α -aminowa cysteiny wiąże się z grupą γ -karboksylową glutaminianu) zabezpiecza GSH przed „trawieniem” przez aminopeptydazy. Wyłącznym enzymem, dla którego wiązanie to nie stanowi blokady jest γ -glutamylotransferaza, inaczej glutationaza, zlokalizowana po zewnętrznej stronie błony komórkowej. Drugą, bardzo ważną cechą charakterystyczną w budowie glutationu jest obecność grupy tiolowej (-SH), której GSH zawdzięcza swoje biologiczne funkcje (Bilska i wsp., 2007). Obecność wolnych grup karboksylowych oraz grupy aminowej i tiolowej powoduje iż związek ten jest bardzo dobrze rozpuszczalny w wodzie.

Glutation dzięki swojej budowie posiada właściwości antyoksydacyjne: dezaktywuje reaktywne formy tlenu (RFT), takie jak nadtlenek wodoru i nadtlenuki organiczne, ponadto chelatuje jony metali, takich jak Cu (I), Cu (II), Se, Zn, Cr (Winiarska, 2000). GSH zabezpiecza grupy tiolowe białek przed trwałą inaktywacją spowodowaną przez RFT (Bartosz, 2003). Poza rolę antyoksydacyjną glutation pełni wiele funkcji w naszym organizmie: bierze udział w metabolizmie leukotrienów, prostaglandyn, oraz w redukcji methemoglobiny, ma wpływ na aktywność enzymów glikolizy, redukuje kwas dehydroaskorbinowy do kwasu askorbinowego, jest rezerwuarem cysteiny. Ponadto GSH odgrywa istotną rolę w procesie wchłaniania żelaza (Kapsokefalou i Miller, 1991), a także mikroelementów, takich jak selen (Scharrer, 1992). Stosunek stężeń glutationu w postaci zredukowanej do postaci utlenionej (GSH/GSSG) stanowi miarę stanu oksydacyjno-redukcyjnego komórki (Gilbert, 1995). Stosunek ten określany jest symbolem R. W komórkach wątroby, w warunkach fizjologicznych, wartość R jest równa 300-400, podczas głodu wynosi ok. 150, a pod wpływem bardzo silnego stresu oksydacyjnego może spaść do wartości 2. Potencjał redoks układu GSSG/GSH umożliwia reakcje glutationu zredukowanego z utlenionymi postaciami innych antyoksydantów. Wszystkie komórki ssaków są zdolne do wytwarzania glutationu, pomimo to przeważającym miejscem jego syntezy w organizmie jest wątroba, w której zachodzi produkcja cysteiny z wykorzystaniem metioniny jako źródła siarki (Eriksson i wsp., 2015). Zachodzące w organizmie procesy patologiczne mogą zarówno obniżyć jak i spowodować wzrost stężenia GSH w określonych tkankach. Działanie mające na celu podwyższenie poziomu GSH jest korzystne w stanach chorobowych, którym towarzyszy spadek stężenia GSH, takim jak: choroba Parkinsona, choroba Alzheimera, cukrzyca oraz AIDS (Wu i wsp., 2004). Natomiast obniżenie poziomu GSH jest wskazane w komórkach nowotworowych w celu zwiększenia ich wrażliwości na chemio- i radioterapię, a także przy transplantacji narządów, aby wywołać immunosupresję. O szczególnym znaczeniu glutationu świadczy powszechność jego występowania oraz niezwykle właściwości, z tego powodu jest to związek bardzo intensywnie badany w ostatnich latach.

Podstawowym sposobem uzyskania informacji o ogólnym stanie zdrowia zwierzęcia i ewentualnego zdiagnozowania wczesnego stanu chorobowego jest wykonanie badań laboratoryjnych, w trakcie których oznacza się między innymi parametry biochemiczne i składniki mineralne we krwi (Neumeister i wsp., 2001, Szarska, 2003). W związku z tym celem niniejszej pracy była analiza stężenia cynku, miedzi, wapnia, magnezu, potasu, sodu i żelaza oraz stężenia glutationu zredukowanego (GSH) we krwi pełnej koni sportowych z terenu małopolski.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 10 dorosłych, zdrowych koniach sportowych (klacze $n = 5$, wałach $n = 5$), różnych ras, pochodzących z jednej stajni znajdującej się w województwie małopolskim. Wiek koni był zróżnicowany i wynosił od 7 do 13 lat. Krew do badań pobrano jednorazowo w godzinach popołudniowych, do dostępnej na rynku próbówki zawierającej odmierzoną ilość antykoagulantu – heparyny. Krew została pobrana z żyły szyjnej zewnętrznej, przez wykwalifikowanego weterynarza hipiatrę. Próbkę zamrożono w temperaturze -80°C do czasu wykonania oznaczeń.

Oznaczenie stężenia wybranych pierwiastków

Próbki przygotowano poprzez mineralizację 2 ml krwi pełnej z 2 ml HNO_3 przez 24 godziny. Całość próbki z dodatkiem 1,5 ml HNO_3 podgrzano w 90°C przez 90 min, następnie 120 min w 115°C . Cały cykl mineralizacji powtórzono trzykrotnie. Każdą z próbek uzupełniono wodą dejonizowaną do objętości 10 ml. Tak przygotowane próbki filtrowano a następnie poddano analizie na zawartość Zn, Cu, Ca, Mg, K, Na, Fe, Pb oraz Cd metodą płomieniowej, absorpcyjnej spektrofotometrii atomowej (AAS) na analizatorze firmy PerkinElmer – Atomic Absorption Spectrometer AAnalyst 200. Do każdego pierwiastka używana była osobna lampa, która stanowiła źródło promieniowania absorbowanego przez wolne atomy. Długości fal używanych przy pomiarze pierwiastków: Zn – 213,86 nm, Cu – 324,75 nm, Ca – 422,67 nm, Mg – 285,21 nm, K – 766,49 nm, Na – 589 nm, Fe – 248,33 nm, Pb – 283,31 nm, Cd – 228,8 nm. Otrzymane wartości wyrażono w mg/ml krwi.

Oznaczenie stężenia glutationu zredukowanego (GSH)

Oznaczenie glutationu zredukowanego wykonano metodą Ellmana (1959). W tym celu w próbkach przygotowano 500 μl TCA + 500 μl EDTA + 500 μl krwi, wymieszano i chłodzono w temperaturze 8 stopni przez 10 minut. Następnie całość odwirowano z prędkością 6300 obrotów/ minutę. W osobnych próbkach przygotowano 2,3 ml H_2O + 100 μl EDTA + 300 μl TRIS + 100 μl DTNB do których dodano 200 μl supernatantu pobranego po odwirowaniu próbek. Całość chłodzono w temperaturze 8 stopni przez 10 minut. Przy użyciu spektrofotometru MARCEL S330 odczytano ekstynkcję przy długości fali 412 nm wobec próby kontrolnej, która składała się z 2,3 ml H_2O , 200 μl EDTA, 300 μl TRIS, 100 μl TCA oraz 100 μl DTNB. Otrzymane wartości, wyrażono w mmol/l pełnej krwi.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych wyników wykonano przy użyciu programu STATISTICA (wersja 13, StatSoft), wyznaczając wartości: średnia, minimum, maksimum, mediana, odchylenia standardowe oraz błąd standardowy. Ponadto wykonano analizę statystyczną testem t-Studenta i wyznaczono współczynnik korelacji Pearsona. Za istotne statystycznie uznano wartości $p < 0,05$.

Wyniki

W tabelach 1 i 2 przedstawiono stężenia Zn, Cu, Ca, Mg, K, Na, Fe, we krwi pełnej klaczy ($n = 5$) oraz we krwi pełnej wałachów ($n = 5$), wyrażone w mg/ml.

Tabela 1. Zawartość wybranych składników mineralnych we krwi klaczy (mg/ml)

Pierwiastek	Średnia	Minimum	Maksimum	Odchylenie standardowe
Zn	0,0040	0,0037	0,0042	0,000261
Cu	0,0006	0,0005	0,0007	0,000103
Fe	0,0045	0,0041	0,0049	0,000332
Ca	0,1474	0,1335	0,1590	0,010568
Mg	0,0487	0,0395	0,0540	0,005740
K	0,0244	0,0198	0,0270	0,002870
Na	1,5727	1,4955	1,6655	0,061970

Tabela 2. Zawartość wybranych składników mineralnych we krwi wałachów (mg/ml)

Pierwiastek	Średnia	Minimum	Maksimum	Odchylenie standardowe
Zn	0,0046	0,0036	0,0053	0,000716
Cu	0,0006	0,0004	0,0007	0,000125
Fe	0,0050	0,0042	0,0061	0,000748
Ca	0,1577	0,1515	0,1685	0,006467
Mg	0,0522	0,0430	0,0620	0,006788
K	0,0261	0,0215	0,0310	0,003394
Na	1,5751	1,4580	1,6520	0,088841

Najniższe stężenia cynku, miedzi i sodu występowały w krwi pełnej u klaczy, natomiast najwyższe stężenia żelaza, cynku, wapnia, magnezu i potasu zostały odnotowane we krwi wałachów. Średnie stężenie cynku, żelaza, wapnia, magnezu i potasu u wałachów było wyższe niż u klaczy, natomiast średnie stężenie miedzi było na tym samym poziomie w obu grupach. Pomimo różnic w średnich zawartościach pierwiastków analiza statystyczna testem t-Studenta nie wykazała statystycznie istotnych różnic pomiędzy stężeniami badanych pierwiastków w krwi wałachów a stężeniami badanych pierwiastków we krwi klaczy.

W tabeli 3 przedstawiono wyniki analizy stężenia glutationu zredukowanego we krwi pełnej koni, z uwzględnieniem płci koni.

Tabela 3. Stężenie glutationu zredukowanego we krwi klaczy (n = 5) i wałachów (n = 5) wyrażone w mM/l

	Klacje	Wałachy
Średnia	1,232388	1,076200
Mediana	1,308650	1,226280
Minimum	0,930390	0,597890
Maksimum	1,452020	1,467270
Odchylenie standardowe	0,215862	0,354033
Błąd standardowy	0,096536	0,158329

Wartość minimalna stężenia GSH u wałachów wynosiła $\approx 0,59$ i była wyraźnie niższa niż u klaczy, natomiast wartość maksymalna stężenia GSH była na bardzo

podobnym poziomie u klaczy i wałachów. Z kolei średnie stężenie glutationu zredukowanego wynosiło $\approx 1,23$ u klaczy i było wyższe od stężenia GSH u wałachów, jednakże przeprowadzona analiza statystyczna testem t-Studenta nie wykazała statystycznie istotnych różnic pomiędzy stężeniem GSH we krwi klaczy a jego stężeniem we krwi wałachów.

Przeprowadzona analiza korelacji Pearsona wykazała występowanie zależności pomiędzy stężeniami cynku, żelaza, magnezu, potasu i sodu we krwi pełnej koni ($n = 10$) (tab. 4).

Tabela 4. Analiza korelacji pomiędzy stężeniami wybranych pierwiastków we krwi pełnej koni

Pierwiastek	Zn	Fe
Zn	-	$r = 0,899$
		$p = 0,0004$
Fe	$r = 0,899$	-
	$p = 0,0004$	
Mg	$r = 0,795$	$r = 0,827$
	$p = 0,0059$	$p = 0,0031$
K	$r = 0,755$	$r = 0,807$
	$p = 0,0051$	$p = 0,0021$
Na	-	$r = -0,749$
		$p = 0,0126$

r – współczynnik korelacji, p – poziom istotności

Szukając ewentualnych zależności między oznaczonymi pierwiastkami stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy większością badanych pierwiastków, jedynie korelacja pomiędzy stężeniami sodu i żelaza była ujemna. Współczynnik korelacji wszystkich zależności mieścił się w przedziale $0,7 < |r| \leq 0,9$ co oznacza, iż korelacje między badanymi pierwiastkami były bardzo wysokie.

Dyskusja

Stan środowiska, w którym żyjemy ma bardzo duży wpływ na naszą kondycję fizyczną, psychiczną i zdrowotną. Zanieczyszczenie środowiska, którego głównymi źródłami są produkcja przemysłowa, rolnictwo i transport, powoduje poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Niebezpieczeństwo ze strony metali ciężkich wynika bezpośrednio z ich przemieszczania się w łańcuchu troficznym: gleba \rightarrow roślina \rightarrow zwierzę, a także z możliwością ich kumulacji w tkankach.

Mikro- oraz makroelementy niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu to między innymi cynk, miedź, wapń, magnez, żelazo, potas i sód. Pierwiastki te wchodzi w skład enzymatycznych kofaktorów, są składnikami budulcowymi tkanek miękkich i kości, uczestniczą w przemianach energetycznych, odgrywają znaczącą rolę w syntezie niektórych witamin, aminokwasów i hormonów, a także biorą udział w regulacji pH oraz ciśnienia osmotycznego. Jak podaje literatura naukowa czynnikami, które mogą istotnie wpływać na otrzymane w pracy stężenia wyżej

wymienionych pierwiastków biogennych w organizmie koni mogą być wiek oraz płeć zwierząt.

W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono istotnego wpływu płci na stężenia cynku, miedzi, wapnia, magnezu, potasu, sodu oraz żelaza w krwi pełnej koni. Jednak wpływ płci na stężenia pierwiastków biogennych był analizowany przez Miranda i wsp. (2000), którzy metodą płomieniowej AAS badali zawartość cynku i miedzi w wątrobie, nerkach, mięśniach i krwi cieląt. Autorzy odnotowali wyższe stężenia cynku w krwi cieląt płci żeńskiej niż w krwi cieląt płci męskiej. Natomiast zawartości miedzi w wątrobach badanych zwierząt wykazywały odwrotne zależności, wyższe wartości odnotowano u cieląt płci męskiej niż u cieląt płci żeńskiej. Podobne badania prowadzili Krumrych i Wiśniewski (1993). Autorzy w swoich badaniach stwierdzili istotny wpływ płci na stężenie magnezu i wapnia w surowicy krwi konika polskiego. Jak podają autorzy klacze miały istotnie wyższe stężenia wapnia w krwi niż ogiery, natomiast w przypadku magnezu to ogiery miały wyższe stężenia tego pierwiastka niż klacze. Prawdopodobnie stwierdzone różnice płciowe mogły być spowodowane specyficzną hierarchią stadną koni i związanym z tym dostępem do pokarmu.

Płeć ma również wpływ na stężenie glutationu zredukowanego i związane z nim enzymy. W pracy Yamamoto i wsp. (2002) odnotowali wyższe stężenie glutationu zredukowanego, a także wyższą aktywność peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej w wątrobach samic niż w wątrobach samców. W badaniach własnych analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy stężeniem GSH w krwi wałachów, a stężeniem GSH w krwi klaczy.

W przedstawionej pracy własnej nie analizowano wpływu wieku na badane parametry ze względu na brak możliwości podzielenia badanych koni na jednorodniczne grupy wiekowe. Jednak jak donoszą inni autorzy na stężenia pierwiastków biogennych wpływ ma również wiek zwierząt. W swojej pracy Gurgoze i Icen (2010) stwierdzili zwiększanie się stężenia wapnia w surowicy krwi klaczy czystej krwi arabskiej wraz z wiekiem. Żrebięta miały istotnie niższe stężenie wapnia w surowicy krwi niż konie starsze. Z kolei w badaniach przeprowadzonych na koniach wyścigowych pełnej krwi angielskiej przez Asano i wsp. (2002) w analizowanych próbkach włosów, pochodzących z ogonów koni, stwierdzono negatywną korelację wieku ze stężeniem żelaza i manganu. Wiadomo również, że nie tylko u koni, ale u ssaków poziom glutationu zredukowanego maleje wraz z wiekiem. W badaniach przeprowadzonych na myszach przez Hazeltona i Langa (1980) u starszych myszy (31 miesięcy) stwierdzono niższe stężenia GSH – o 30% w wątrobie, o 34% w nerkach i o 20% w sercu, niż u zwierząt młodszych (17–23 miesięcy). Wyniki uzyskane przez wyżej wymienionych autorów potwierdzają postawioną przez nich hipotezę, że potencjał redukcyjny tkanek zmniejsza się wraz ze starzeniem się organizmu.

W dużej części przeprowadzanych na świecie badań analiza stężeń pierwiastków biogennych i ksenobiotycznych wykonywana jest na surowicy lub osoczu krwi, natomiast w innowacyjnych badaniach przeprowadzonych przez Massanyi i wsp. (2014) analizowano między innymi zawartości miedzi, cynku, kadmu i ołowiu w krwi pełnej, w surowicy i w krwinkach 26 koni różnych ras. Autorzy uzyskali najwyższe stężenia badanych pierwiastków w krwi pełnej koni. Przeprowadzili

również analizę korelacji i w krwinkach stwierdzili bardzo wysoką korelację stężeń cynku i ołowiu, a także niemal pełną korelację stężeń kadmu i ołowiu. Natomiast w badaniach własnych szukając ewentualnych zależności między oznaczonymi pierwiastkami w krwi pełnej koni stwierdzono bardzo wysoką, dodatnią korelację pomiędzy stężeniami Fe-Zn, Mg-Zn, K-Zn, K-Fe, Mg-Fe, a także bardzo wysoką ujemną korelację pomiędzy stężeniami sodu i żelaza.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki mogą być doskonałym źródłem informacji na temat kondycji fizycznej badanych zwierząt jak również mogą zostać wykorzystane w czasie monitorowania stanu zdrowia koni.

Literatura

- Aoyagi S., Baker D.H. 1993. Copper-amino acid complexes are partially protected against inhibitory effects of L-cysteine and L-ascorbic acid on copper absorption in chicks. *Jour. of Nutrition*, 124: 388–395.
- Asano R., Suzuki K., Otsuka T., Otsuka M., Sakurai H.J. 2002. Concentrations of toxic metals and essential minerals in the mane hair of healthy racing horses and their relation to age. *Vet.Med. Sci.*, 64(7): 607–610.
- Bartosz G. 2003. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wyd. Nauk PWN. Warszawa, 186–189.
- Bilska A., Kryczyk A., Włodek L. 2007. Różne oblicza biologicznej roli glutationu. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 61: 438–453.
- De Romana D.L., Olivares M., Uauy R., Araya M. 2011. Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 25: 3–13.
- Dembińska-Kieć A., Naskalski W.J. 2002. Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Urban & Partner. Wrocław.
- Ellman M. 1959. A spectrophotometric method for determination of reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.*, 74: 214–226.
- Eriksson S., Prigge J.R., Talago E.A., Arnér E.S.J., Schmidt E.E. 2015. Dietary methionine can sustain cytosolic redox homeostasis in the mouse liver. *Nat Commun.*, 6: 6479.
- Ganz T. 2007. Molecular control of iron transport. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 18: 394–400.
- Gruszka M., Odrowąż-Sypniewska G., Pater A. 2005. Znaczenie fosforu i fosforanów w organizmie. *In Vitro Explorer*, 2(4): 9–12.
- Gurgoze S.Y., Icen H. 2010. The influence of age on clinical biochemical parameters in pure-bred Arabian mares. *J. Equine Vet. Sci.*, 30: 569–573.
- Gutteridge J.M., Halliwell B. 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Ann. NY Acad. Sci.*, 899: 136–147.
- Hazelton G.A., Lang C.A. 1980. Glutathione contents of tissues in the aging mouse. *Biochem. J.*, 188(1): 25–30.
- Jamroz D., Buraczewski S., Kamiński J. 2005. Żywnienie zwierząt i paszoznawstwo. T. 1, Fizjologiczne i biochemiczne podstawy żywienia zwierząt. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa.
- Kapsokefalou M., Miller D.D. 1991. Effect of meat and selected food components on the valence of nonheme iron during *in vitro* digestion. *J. Food Sci.*, 6: 52–355.
- Krumrych W., Wiśniewski E. 1993. Wpływ płci na wartości biochemicznych wskaźników krwi u koni. *Med. Vet.*, 49: 327–328.

- Kulikowska E., Moniuszko-Jakoniuk J., Miniuk K. 1991. Rola cynku w procesach fizjologicznych i patologicznych organizmu. *Pol. Tyg. Lek.*, 46: 470–473.
- Łoniewski I., Wójcicki J., Pawlik A. 1997. Wchłanianie z przewodu pokarmowego cynku podawanego w skojarzeniu z witaminą E. *Farm. Polska*, 53: 684–688.
- Massanyi P., Stawarz R., Halo M., Formicki G., Lukac N., Cupka P., Schwarcz P., Kovacik A., Tusimova E., Kovacik J. 2014. Blood concentration of copper, cadmium, zinc and lead in horses and its relation to hematological and biochemical parameters. *J. Environ. Sci. Health*, 49: 973–979.
- McDonald P., Edwards R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan C.A. 2002. Digestibility. Evaluation of food. *Animal Nutrition*. 6th ed., Longman, 121–122.
- Miranda M., Alonso M.L., Castillo C., Hernández J., Benedito J.L. 2000. Effect of sex on arsenic, cadmium, lead, copper and zinc accumulation in calves. *Vet. Hum. Toxicol.*, 42: 265–268.
- Neumeister B., Besenthal I., Liebich H. 2001. Diagnostyka laboratoryjna. Volumes, Urban & Partner. Wrocław.
- Odrowąż-Sypniewska G., Pater A., Gruszka M. 2005. Rola magnezu w ustroju. *In Vitro Explorer*, 2(4): 13–16.
- Poznańska-Linde H., Odrowąż-Sypniewska G. 2000. Wybrane zagadnienia z diagnostyki laboratoryjnej. *AM. Bydgoszcz*, 141–148.
- Puzanowska-Tarasiewicz H., Kuźmicka L., Tarasiewicz M. 2010. Antyoksydanty a reaktywne formy tlenu. *Brom. i Chem. Tok.*, 43: 419–422.
- Rinaldi A.C. 2000. Meeting report – copper research at the top. *Biomaterials*, 13: 9–13.
- Scharrer E., Senn E., Wolfram S. 1992. Stimulation of mucosal uptake of selenium from selenite by some thiols at various sites of rat intestine. *Biol. Trace Elem. Res.*, 33: 109–120.
- Schottdorf-Timm C., Maier V. 2004. Badania laboratoryjne: odczytywanie wyników. Muza. Warszawa.
- Shelly C. Lu. 2013. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.*, 1830(5): 3143–3153.
- Stewart A.J., Hardy J., Kohn C.W., Toribio R.E., Hinchcliff K.W., Silver B. 2004. Validation of diagnostic tests for determination of magnesium status in horses with reduced magnesium intake. *Am. J. Vet. Res.*, 65(4): 422–430.
- Szarska E. 2003. Znaczenie badań diagnostycznych krwi w ocenie stanu zdrowia oraz efektywności treningu koni wyścigowych i sportowych. Wyd. AR. Wrocław.
- Thomas L. 1998. Clinical laboratory diagnostics. TH. Frankfurt.
- Tomaszewski J. 2001. Diagnostyka laboratoryjna: podręcznik dla studentów medycyny. Wyd. Lek. PZWL. Warszawa.
- Windisch W. 2002. Interaction of chemical species with biological regulation of the metabolism of essential trace elements. *Anal. Bioanal. Chem.*, 372: 421–425.
- Winiarska K. 2000. Glutathion: niezwykle funkcje pospolitego tripeptydu. *Post. Biochem.*, 46: 318–326.
- Wiśniewski E. 1999. Zaburzenia metabolizmu wapnia i fosforu u koni. *Nowa Wet.*, 4: 24–27.
- Włodek L. 2003. Glutathion. Antyoksydacyjne i detoksykacyjne właściwości, biologiczna i farmakologiczna regulacja biosyntezy. WUJ. Kraków, 111–160.

- Wu G., Fang Y.Z., Yang S., Lupton J.R., Turner N.D. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.*, 134: 489–492.
- Yamamoto T., Ohkuwa T., Itoh H., Sato Y., Naoi M. 2002. Effect of gender differences and voluntary exercise on antioxidant capacity in rats. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 132(4): 437–444.

Streszczenie

Podstawowym sposobem uzyskania informacji o ogólnym stanie zdrowia zwierzęcia i ewentualnego zdiagnozowania wczesnego stanu chorobowego jest wykonanie badań laboratoryjnych, w trakcie których oznacza się między innymi parametry biochemiczne i składniki mineralne we krwi. W związku z tym w niniejszej pracy przeprowadzono analizę stężenia pierwiastków biogennych (Zn, Cu, Ca, Mg, K, Na, Fe) i stężenia glutationu zredukowanego (GSH) we krwi pełnej koni sportowych z terenu Polski południowej. Badania przeprowadzono na 10 dorosłych, zdrowych koniach sportowych, różnych ras, pochodzących z jednej stajni znajdującej się w województwie małopolskim. Wiek koni był zróżnicowany i wynosił od 7 do 13 lat. Nie stwierdzono istotnego wpływu płci na stężenie GSH i pierwiastków biogennych we krwi pełnej badanych zwierząt. Natomiast stwierdzono bardzo wysokie korelacje dodatnie pomiędzy stężeniami Fe-Zn ($r = 0,899$), Mg-Zn ($r = 0,795$), K-Zn ($r = 0,755$), K-Fe ($r = 0,807$), Mg-Fe ($r = 0,827$), a także bardzo wysoką korelację ujemną pomiędzy stężeniami sodu i żelaza ($r = -0,749$). Przedstawione w niniejszej pracy wyniki mogą być doskonałym źródłem informacji na temat kondycji fizycznej badanych zwierząt, jak również mogą zostać wykorzystane w czasie monitorowania stanu zdrowia koni.

Słowa kluczowe: krew, pierwiastki biogenne, glutation zredukowany

Concentration of reduced glutathione and content of biogenic elements in the blood of sport horses

Abstract

The basic method of obtaining information on the general health condition of the animal and possible diagnosis of the early disease state is the performance of laboratory tests, during which biochemical parameters and mineral components in the blood are determined. Therefore, in the present study, the concentration of biogenic elements (Zn, Cu, Ca, Mg, K, Na, Fe) and the concentration of reduced glutathione (GSH) in whole blood of sport horses from the Małopolska region was analyzed. The research was carried out on 10 adult, healthy sport horses, of different races, coming from one stable located in the south Poland. The age of horses varied and ranged from 7 to 13 years. There was no significant effect of sex on the concentration of GSH and biogenic elements in the whole blood of the tested animals. However, very high positive correlations were found between concentrations of: Fe-Zn ($r = 0.899$), Mg-Zn ($r = 0.795$), K-Zn ($r = 0.755$), K-Fe ($r = 0.807$), Mg-Fe ($r = 0.827$), as well as a very high negative correlation between sodium and iron concentrations ($r = -0,749$). The results presented in this paper can be an excellent source of information on the physical condition of the examined animals, as well as can be used during the monitoring of the horse's health status.

Keywords: blood, biogenic element, reduced glutathione

Z.Goc, A. Szyborski, E. Kapusta

Zakład Fizjologii Zwierząt i Toksykologii, Instytut Biologii
Uniwersytet Pedagogiczny im. KEN, Podbrzezie 3, 31-054 Kraków