

Zárójelentés OTKA 37321

Témavezető neve: Dr. Gaál Tibor

A téma címe: Az antioxidáns rendszer ontogenezisének vizsgálata emlős állatfajokban

A kutatás időtartama: 2002-2005

A kutatásban vizsgáltuk az antioxidáns rendszer ontogenezisét újszülött csikókban, borjakban, bárányokban és malacokban élettani alapadatok nyerése és a fajok közötti összehasonlítás céljából. Esetenként más állatfajok (kutyák, baromfik, tehenek, nyulak) szervezetében is tanulmányoztuk az antioxidáns rendszert befolyásoló élettani hatásokat és egyes betegségek, illetve takarmány-kiegészítők hatását. A vizsgálatok elsősorban az újszülött állatok *véréből* történtek. A vörösvérsejtekben a lipidperoxidáció (LPO) mértékét jelző tiobarbitursav-reaktív anyagok (TBARS) mennyiségét malondialdehidben (MDA) kifejezve adtuk meg. Két antioxidáns enzim, a glutation-peroxidáz (GSHPx) és a szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitását ugyancsak a vvs-ben mértük. A vérplazmában a teljes antioxidáns kapacitást TAS és FRAP eljárással határoztuk meg. Szabadgyök mérésekre malacokban és borjakban a teljes vérből került sor.

Az eredeti kutatási tervet a központi elvonások miatt jelentősen módosítani, illetve csökkenteni kellett. Részben emiatt, részben előre nem tervezhető tényezők miatt olyan vizsgálatokra is sor került, amelyeket a tervezés állapotában, 2001-ben csak körvonalazni lehetett.

Tapasztalatszerzés, előkísérletek direkt szabadgyök-meghatározásokkal csirke modellállatban

Korábbi kutatásaink során a kelés/születés után feltételezett, relatív hyperoxia hatását *közvetve*, az antioxidáns rendszer enzimatis és nem enzimatis elemeinek pre- és postnatalis vizsgálata alapján értékeltük. Mielőtt a szabadgyökök *közvetlen* kimutatásával is vizsgáltuk volna hipotézisünk helyességét, csirke modell-állaton kívántuk bizonyítani a tojásból való kikelés utáni hyperoxia hatását. A vizsgálatba 16 és 18 napos csirkeembriókat (n=19) valamint 1 és 2 napos csirkéket (n=16 és 19) vontunk be. Az exterminált és elvéreztetett egyedek agyvelő- és májmintáit azonnal eltávolítottuk, folyékony nitrogénben fagyasztottuk és tároltuk. A szövetminták szabadgyök-tartalmát moduláris elektron spin rezonancia (ESR) spektrométer-készülékkel határoztuk meg.

Mindkét szervben a két prenatalis és a két postnatalis ESR-eredmény hasonló volt (máj prenatalis átlag: a 16. napon 1483 E illetve a 18. napon 1551 E, postnatalis átlag: egynapos korban 1871 E, illetve kétnapos korban 1762 E; agyvelő prenatalis átlag: 130 E illetve 156 E, postnatalis átlag: 157 E illetve 156 E). A prenatalis és a postnatalis szabadgyök koncentráció-különbség mindkét szervben szignifikánsnak bizonyult ($p < 0,05$). Minden időpontban a máj stationer szabadgyök-mennyisége mintegy tízszerese volt az agyvelőének ($p < 0,001$). Eredményeink szerint az ESR módszer további kísérleteinkben is alkalmazható, és azok a születéskori hyperoxia közvetlen bizonyítékául szolgáltak.

1. Az antioxidáns rendszer ontogenezise különböző állatfajokban

1.1. Malacok

Tíz kocától származó huszonegy újszülött malac vörösvérsejtjeiben az anyakocákhoz képest kisebb MDA értékeket észleltünk, ami érdemileg nem változott 3 hét alatt. Ehhez képest a vérplazma-MDA (amely az újszülött malacokban a kocákéhoz volt hasonló) a 7 napos korra szignifikánsan emelkedett. A teljes vér ESR értéke egynapos korban (36 ± 13 egység) a felnőtt állatokétól (29 ± 17 egység) és az első négy hét során a későbbi időpontokban mért értékektől nem tért el.

A plazma-FRAP érték által reprezentált antioxidánsok koncentrációja jelentősen meghaladta az anyakoca FRAP szintjét és a 3. hétre csökkent a felnőtt kocák értékére.

A plazma TAS aktivitása – szemben a FRAP-éval – születéskor és az első két héten is hasonló volt az újszülött malacokban, mint a kocákban, és értéke a kor előrehaladtával nőtt.

A teljes vér szabadgyök tartalma mind a kocákban, mind a malacokban nagy szórást mutattak. Az újszülött malac vérében mért érték nem tért el szignifikánsan sem a kocákban mért értéktől, sem az idősebb korú társaiktól.

A kísérlet során kapott eredmények közül a vérplazma MDA-koncentrációjának alakulása alátámasztotta a feltételezést, miszerint a születés után fokozódik a lipidperoxidációs terhelés, átmenetileg növekszik az extracelluláris térben az MDA mennyisége. A vörösvérsejtekben hasonló folyamatok nem észlelhetők. Véleményünk szerint a vörösvérsejtek valószínűleg már születéskor megfelelő antioxidáns védelemmel rendelkeznek a szabadgyök hatások kivédésére. Ugyanezt a feltételezést támasztja alá, hogy az újszülött malacokban a teljes vér szabadgyök-koncentrációjában sincs növekedés a vizsgált időpontokban. Érdekes megfigyelés a FRAP és a TAS közötti ellentétes változási tendencia a növekvő malacok vérplazmájában.

1.2. Bárányok

Az LPO mértéke az újszülöttek vörösvérsejtjeiben hasonló volt az anyákban találtakhoz, majd gyorsan emelkedett, és a 14 napos korú bárányokban találtunk csúcserkéket.

A plazma-FRAP mennyisége az újszülött bárányokban (a malacokhoz hasonlóan) nagyobb volt, mint az anyákban, ugyanakkor TAS koncentrációja az újszülöttekben csak mintegy 80 %-a volt az anyaállatban mértnek. A FRAP átmeneti növekedés után a 3. hétre a születéskori értékre csökkent.

A plazma TAS koncentrációja az újszülöttekben csak mintegy 80 %-a volt az anyaállatban mértnek, azonban a 2.-3. hétre a felnőtt állatokban talált eredményekhez hasonlóra emelkedett.

Mivel a bárányok vörösvérsejtjeiben növekvő LPO-t észleltünk, ezt a relatív hyperoxiás környezet hatásának tudjuk be. Az újszülöttek vérplazmájának antioxidáns kapacitása a születéskor ebben a fajban is megfelelőnek bizonyult.

1.3. Borjak

Holstein-fríz teheneiben az elléskor, borjaik vérében (n=14) pedig az élet első 3 hetében vizsgáltuk a lipidperoxidációs (LP) változásokat és az antioxidáns rendszert a korábban malacokon és bárányokon alkalmazott protokoll szerint.

A borjakban a vvs. MDA-tartalma a születéskor jelentős volt, ami 10%-kal csökkent a 2. hétig ($p < 0,01$). A teheneiben az elléskor, valamint a borjakban bármely időpontban a vvs MDA koncentrációja mintegy 40 %-al nagyobb volt annál, amit tejelő teheneiben más időpontokban (szárazon álláskor vagy előrehaladott laktáció idején) más kísérleteinkben mértünk.

A vvs. GPX aktivitása a borjakban nem változott, az enzim aktivitása hasonló volt az anyaállatokéhoz. A SOD aktivitása a születés után a 3. hétig szignifikánsan ($p < 0,001$), de csak kis mértékben nőtt, és a három hét alatt egyszer sem érte el a tehének elléskor mért értékeit. Fontos megfigyelésünk volt, hogy a tehének vvs.-ében az elléskor tapasztalt SOD-aktivitás közel kétszerese volt annak, amit más vizsgálataink során hasonló termelésű teheneiben az ellés előtt vagy hetekkel azután mértünk. A borjak SOD-értékei ezekhez a leletekhez hasonlítottak.

A teljes vér stationer szabadgyök-koncentrációja a borjakban a születéstől kezdve szignifikánsan növekedett, a 14. és a 21. napon az anyaállatok értékeit meghaladta ($p < 0,05$).

Az újszülött borjak vérplazmájának TAS koncentrációja (0,82 mmol/l) alig tért el a teheneiktől, és a kísérleti idő alatt sem változott. Ugyanakkor a nem enzimikus antioxidánsok mennyiségét a TAS-nál jobban jelző FRAP mennyisége az újszülöttekben mintegy kétszerese volt az anyaállatokénak, tehát ebből a szempontból a borjak megfelelő védettséggel léptek az extrauterin életbe. Ez a megfigyelés emlékeztet a malacokon és bárányokon tapasztaltakra. A jelentős FRAP-koncentráció csak az egyhetes borjakban csökkent a felnőtt állatokat jellemző szintre ($p < 0,001$).

Eredményeink szerint a születés utáni fokozott O₂-felvétel az újszülött borjak vérben növelte a szabad gyökök mennyiségét. A borjak antioxidáns védelmi rendszerének aktiválódását a vvs.- és a plazmaparaméterek azonnali (FRAP) illetve későbbi időpontokban (SOD) bekövetkező emelkedése jelezte.

1.4. Csikók

A 2004-2005-ben elvégzett kísérletünk során 17 újszülött csikó antioxidáns rendszerét vizsgáltuk az élet első három hetében, a korábban alkalmazott ütemezésben. A vérmintákat 1, 3, 7, 14 és 21 napos korú csikókból, valamint a kancákból az ellés után vettük.

Táblázat: Különböző antioxidáns paraméterek értékei (átlag, ± szórás) kancákban az ellés időpontjában, illetve csikókban a születéstől három hetes korig.

	Kancák ellés után	Csikók				
		1. nap	2. nap	7. nap	14. nap	21. nap
Vvs-MDA nmol/g feh.	391 ± 26	461 ± 18	505 ± 47	389 ± 20	346 ± 29	326 ± 21
Vvs-SOD U/g feh.	359 ± 40	428 ± 30	411 ± 44	459 ± 43	534 ± 63	537 ± 49
Vvs-GSH-Px U/g feh.	44 ± 4	33 ± 2	36 ± 4	36 ± 3	37 ± 3	37 ± 5
PI-FRAP mmol/L	0.41 ± 0.03	0.50 ± 0.04	0.50 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.28 ± 0.2	0.26 ± 0.01
PI-TAS mmol/L	0.89 ± 0.11	0.87 ± 0.13	0.80 ± 0.07	0.93 ± 0.05	0.84 ± 0.05	0.84 ± 0.07

A MDA szintjét a csikók első mintáiban 25%-kal nagyobbak találtuk, mint a kancák ugyanezen értékeit. A MDA koncentrációja a második napon vett mintákban volt a legmagasabb, és ezután csökkent ($p < 0,05$).

A SOD enzim aktivitásváltozását nem találtuk szignifikánsnak az idő függvényében. Szignifikánsan nagyobb volt azonban a kanca SOD értékeinél a csikók 1. 5. és 6. mintavételi időpontban vett mintáinak aktivitása. A SOD aktivitásában bekövetkezett változások tendenciája a MDA-éval ellentétes volt.

A GSH-Px aktivitása az újszülött csikók vörösvérsejtjeiben a születés után 63%-kal alacsonyabb volt, mint a kancák ugyanezen értékei. Az első naptól kezdve a GSH-Px értéke folyamatosan emelkedett, de a vizsgált periódus alatt mindvégig a kanca mintáiban mért érték alatt maradt.

A vérplazmában a TAS értékeit a kismértékű mindkét irányba történő ingadozása miatt biológiai következtetések levonására nem találtuk alkalmasnak.

Nagyobb (0,51 mmol/L) FRAP értékeket mértünk a kancákhoz viszonyítva (0,41 mmol/L) a csikók első három mintavételi időpontban vett vérplazma-mintáiban. Ezt a jelenséget már a negyedik állatfajban állapítottuk meg. Az anyaihoz hasonló kisebb értéket csak az egyhetes csikókban találtunk, majd a FRAP értékének további csökkenését tapasztaltuk.

A MDA kezdeti növekedéséből arra következtettünk, hogy a megszülető csikót ért oxigénterhelés hatására a LPO-s folyamatok a szervezetben fokozódnak. Az antioxidáns védekezési rendszer aktiválódik, mely során egyes paramétereinek értéke azonnal (SOD, FRAP) másoké (GSH-Px) pedig később nő meg a vérben.

Figyelemre méltó eredményt mutat a borjakkal való összehasonlítás: a vörösvérsejtben különbségeket tapasztaltunk a két faj újszülöttjei között (SOD- és GSH-Px aktivitásban), míg az extracelluláris tér antioxidáns védelme (plazma TAS- és FRAP) hasonlóan alakult.

2. Egyéb vizsgálatok az antioxidáns rendszerrel kapcsolatban

2.1. Az ellés hatása tehének vérének antioxidáns állapotára

A borjúkísérletben észleltük, hogy a 14, az ellés napján vett tehenévér-minta antioxidáns státusza különbözik azoktól, amelyeket korábbi években gyűjtöttünk nem ellő tehenektől.

Feltételeztük, hogy az ellés hatására oxidatív stresszre utaló állapot alakult ki a tehenekben. Ennek bizonyítására 58 Holstein-fríz tehén vérért vizsgáltuk az ellés körüli időszakban négy alkalommal: az ellés előtt három és egy héttel (n=10 és 14), az ellés napján (n=22), végül az ellés után három héttel (n=12). A négy időpont MDA, GSHPx, SOD, TAS, FRAP, ESR eredményeinek átlaga egymástól nem különbözött. Az elléskori értékeket azonban a másik három időpont egyesített átlagához hasonlítva az elléskor a vörösvérsejtekben szignifikánsan nagyobb SOD aktivitást és a vérplazmában kisebb FRAP aktivitást tapasztaltunk. Ez igazolta, hogy az ellés okozta stressz-állapot az anyaállat szervezetében nemcsak jól ismert metabolikus változásokat okoz, hanem a redox rendszer egyes paramétereire is hatással van.

2.2. Előkísérlet tehenekben: a lipidperoxidációs és az antioxidáns mutatók változása az ellés körül a májban

A vizsgálatban 10 nagy hozamú Holstein-Fríz tehén vér- és májbiopsziás mintáit elemeztük. Vizsgáltuk, hogy van-e az ellés körüli időszak ismert metabolikus változásainak (növekvő tejhozam, energiahiány, fokozott lipid-mobilizáció, májelzsírosodás) hatása a vér lipidperoxidációs folyamatára, antioxidáns kapacitására. Néhány állat májából első ízben végeztünk szabadgyök-meghatározást.

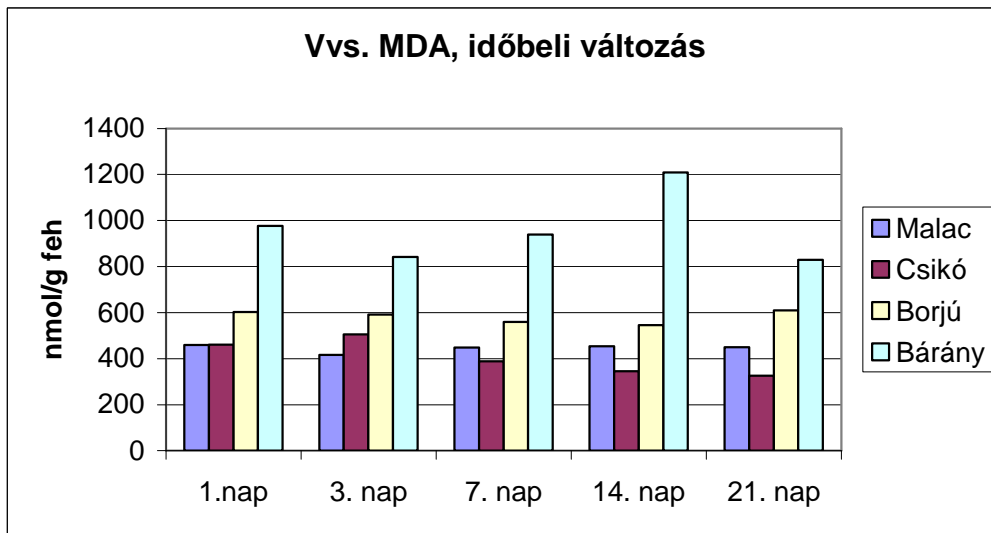
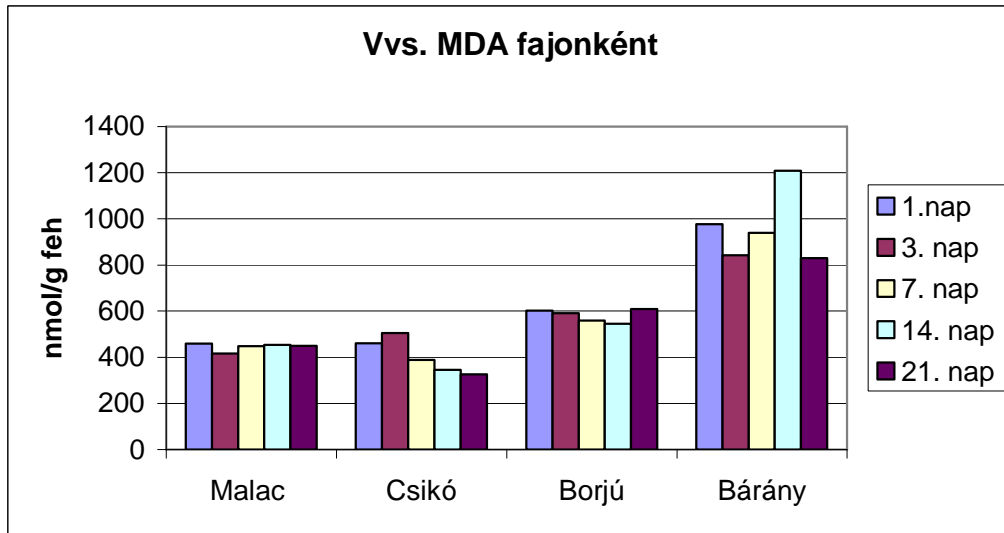
A metabolikus változásokkal kapcsolatban a vvs-hemolizátumban az MDA nőtt, a GPX nem változott, a SOD csökkent, a GSH és a GSSG az ellés utáni 3. hétre átmenetileg nőtt, majd csökkent ($p<0,05$). A vérplazmában a TAS végig emelkedett, a FRAP az ellés utáni 3. hétre átmenetileg csökkent ($p<0,05$). A máj szabadgyök tartalma az ellés után 35 és 60 nappal mintegy 80 %-kal több volt, mint az ellés előtt vagy 7 nappal az ellés után ($p<0,05$).

2.3. Egyéb, az antioxidáns kutatási témával kapcsolatos vizsgálatok

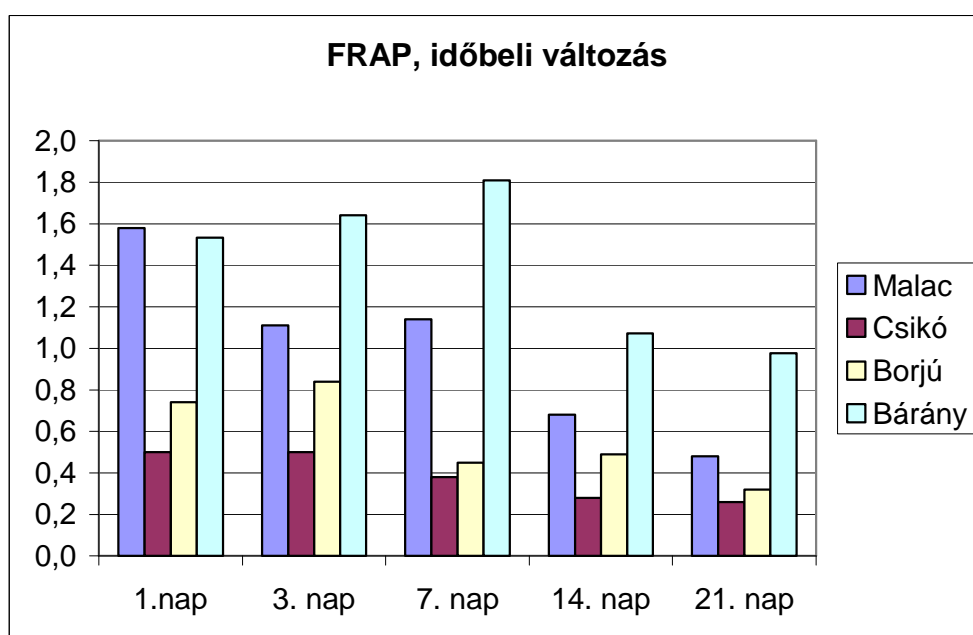
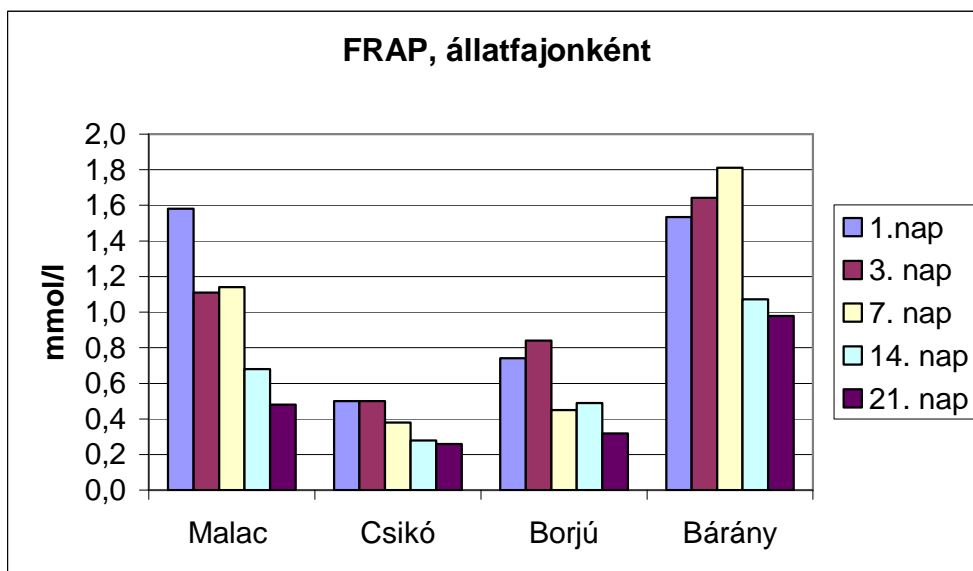
A központi költségcsökkentés miatt más kutatók ugyancsak csökkentett támogatásban részesülő OTKA- vagy egyéb pályázataikhoz kapcsolódtunk. Így az antioxidáns rendszer mutatóit daganatos (lymphomás) kutyák különböző szerveiben (T 035246 téma), valamint különböző metionin- és zsírkiegészítésben részesülő brojlercsirkék májában is vizsgáltuk (T 037963 téma). Nyulak hátizomzatában a lipidek zsírsavösszetételének és MDA-tartalmának változását ugyancsak elemeztük elektromos stimuláció hatására.

Összefoglaló értékelés a vér LPO-s folyamatairól (a vvs. MDA-koncentrációiról), valamint a vérplazma antioxidáns státuszának (FRAP, TAS) változásáról újszülött malacokban, csikókban, borjakban és bárányokban

A négyéves kutatómunka során mind a négy állatfaj újszülötteiben ugyanazon napokon (1, 3, 7, 14 és 21. életnapon) vizsgáltuk ezt a három mutatót. Az alábbi ábrák a könnyebb áttekinthetőség kedvéért csak az átlageredményeket tüntetik fel, a statisztikai különbségek jelzése nélkül.



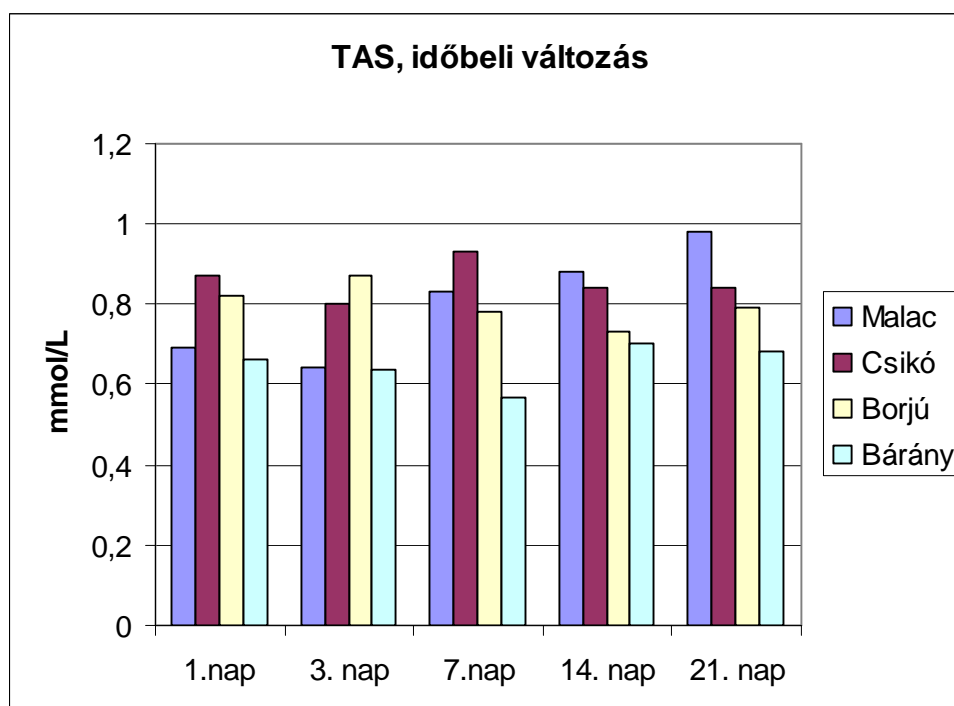
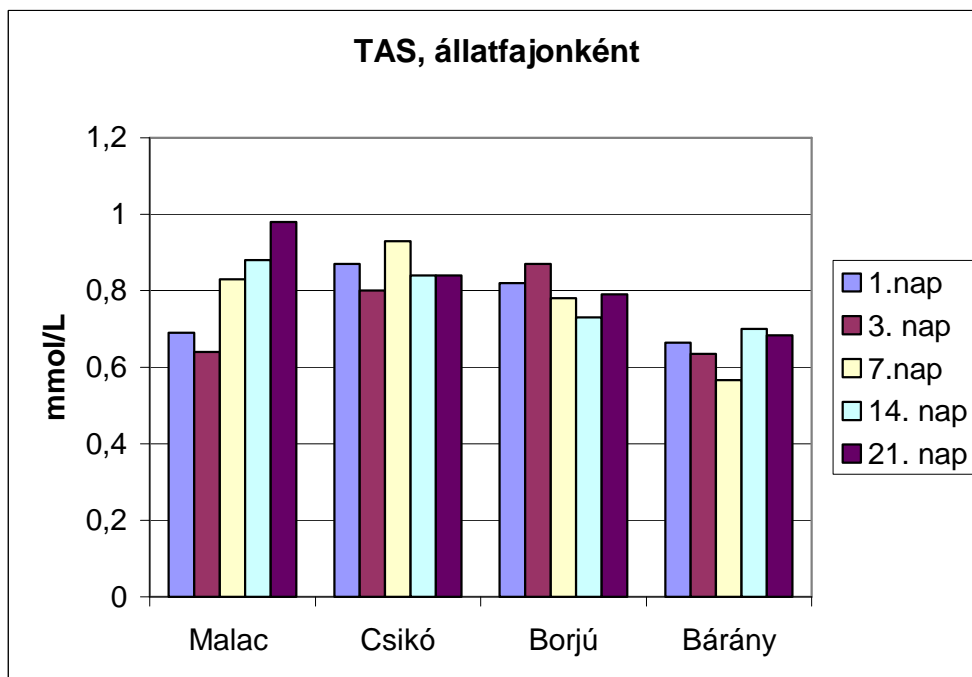
A fajokat összehasonlítva megállapítható, hogy a lipidperoxidáció (LPO) mértéke az élet első 3 hete alatt nagyobb volt a két kérődző faj újszülötteiben, mint a két monogasztrikusében ($p < 0,05$). A legnagyobb MDA koncentrációkat a bárányok vörösvérsejtjeiben mértük, ez mintegy kétszerese volt a malacok és a csikók értékének, és 30%-kal nagyobb volt a borjakénál is. Az időbeli lefutást tekintve az LPO terhelés egyik állatfaj vörösvérsejtjeiben sem változott az élet első három hetében. Mindez arra utal, hogy a születéssel kapcsolatos oxidatív stressz az egészséges újszülött állatokban nem okozott nagyobb mértékű LPO-t, tehát a vvs. antioxidáns védelme megfelelő volt.



A vérplazma teljes antioxidáns státuszát jelző két mutató közül a FRAP-ban mind a négy fajban hasonló és markáns időbeli változásokat, ugyanakkor az abszolút értékekben a fajok közötti különbségeket észleltünk. A TAS-ban ezeket nem tapasztaltuk.

A FRAP koncentrációja a vérplazma (az extracelluláris tér) nem enzimatis antioxidánsait (húgysav, albumin, glükóz, bilirubin, antioxidáns vitaminok stb.) jellemzi. A négy állatfaj közül a legnagyobb (1 mmol/L körüli) FRAP-értékeket a bárányokban mértük ($p < 0,05$), ennek kb. 60%-át észleltük a malacokban, míg a legkisebb aktivitásokat a csikókban tapasztaltuk (a bárányok FRAP-jának kb. 40 %-át). A borjak értékei köztes helyet foglaltak el (0,5 mmol/L). A FRAP *időbeli* változását mindegyik állatfajban csökkenő tendencia jellemezte.

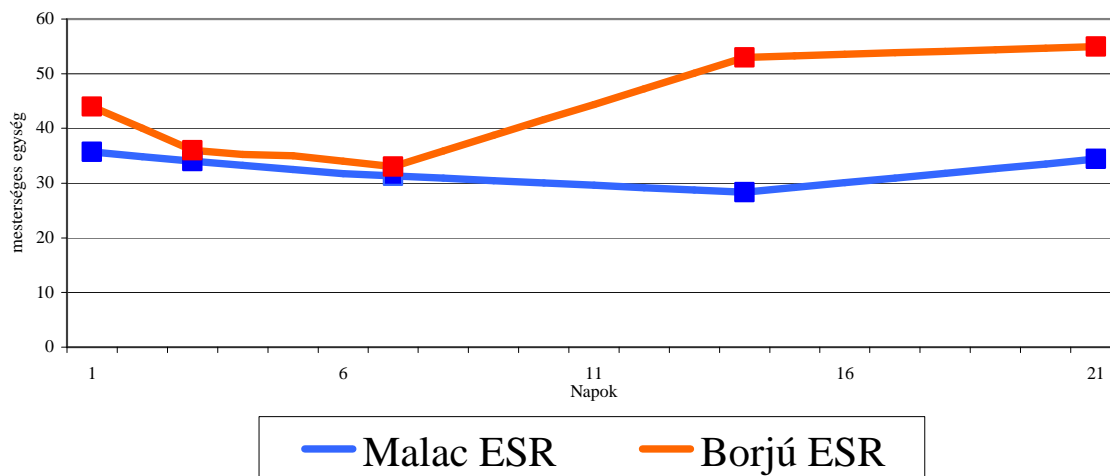
Az eredményekből az a következtetés vonható le, hogy az egészséges újszülött állatok extracelluláris terének nem enzimatis antioxidáns védelme megfelelő, sőt a felnőtt állatokénál erősebb, de ebben faji különbségek észlelhetők. A kor előrehaladtával jelentős FRAP-csökkenés észlelhető, vélhetően a fokozódó oxidatív metabolizmus és a takarmányozási viszonyok változásának hatására.



A TAS az antioxidáns rendszer enzimatis és nem enzimatis elemeinek aktivitását együtt jelzi, ilyen értelemben többet mond a teljes antioxidáns státuszról, mint a FRAP. A vérplazma TAS aktivitásában az újszülött állatfajok között érdemi különbséget nem tapasztaltunk. Vélhetően ez úgy magyarázható, hogy a kisebb nem enzimatis védelmű (kisebb FRAP-pal bíró) állatfajokban (csikó, borjú) az enzimatis védelem viszont erősebb. Az időbeli változást vizsgálva csak a malacokon észleltünk növekvő TAS aktivitást, szemben a FRAP kifejezett csökkenésével. E fajban tehát az antioxidáns védelem enzimatis oldalának gyors aktiválódását láthatjuk.

A teljes vér teljes szabadgyök tartalma borjakban és malacokban.

Az elektronspin-rezonanciás vizsgálatokat csak két állatfaj teljes véreinek vizsgálatakor alkalmaztuk, és az eredményeket grafikonon ábrázoljuk.



A vér szabadgyök értékei az egynapos állatokban mindkét fajban a szülőkhöz képest nagyobbak voltak. A 7. napig mind a borjakban, mind a malacokban a gyökkoncentráció hasonló módon csökkent. A fokozódó prooxidáns hatást a borjakban már a 2. hét végére, a malacokban pedig csak a 3. héten mutatkozott nagyobb szabadgyök-koncentráció. A két faj közötti mintegy 30%-os különbség arra utal, hogy a borjak véreben háromhetes korban nagyobb az oxidatív terhelés, mint a malacokéban.

A négyéves kísérletsorozat összehasonlító élettani és kórélettani szempontból új ismeretekkel gazdagított. A vizsgált kérdések egy részének gyakorlati hasznosítására is lehetőség kínálkozik, elsősorban a postnatalis korban több fajban már eddig is alkalmazott profilaktikus antioxidáns kezeléshez szolgáltatott adatokat.