

**Wpływ dodatku laktozy do preparatu mlekozastępczego
na profile białkowe osocza krwi i moczu oraz nerkowe
mechanizmy regulacji bilansu wodno-elektrolitowego u cieląt**



142676-8

Wzrost.

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

ALICJA DRATWA-CHALUPNIK

**Wpływ dodatku laktozy do preparatu mlekozastępczego
na profile białkowe osocza krwi i moczu
oraz nerkowe mechanizmy regulacji bilansu
wodno-elektrolitowego u cieląt**

Szczecin 2014

Recenzenci
Barbara Dołęgowska
Jacek Skomial

Opracowanie redakcyjne
Alicja Berner



W. 142676

Wydano za zgodą
Rektora Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie

ISBN 978-83-7663-185-1

Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
70-311 Szczecin, al. Piastów 50, tel. 91 449 47 60, e-mail: wydawnictwo@zut.edu.pl
Druk: PPH „Zapol” Sobczyk, Sp.j., 71-062 Szczecin, al. Piastów 42, tel. 91 434 10 21
e-mail: zarzad@zapol.com.pl

Q. 83/2015

Spis treści

Wykaz skrótów.....	5
1. Wstęp i przegląd piśmiennictwa.....	7
1.1. Wprowadzenie.....	7
1.2. Proteomika.....	8
1.3. Proteomika w badaniach zootechniczno-weterynaryjnych bydła.....	8
1.4. Proteom osocza lub surowicy krwi bydła.....	9
1.5. Proteom moczu zwierząt gospodarskich.....	11
1.6. Białka osocza krwi cieląt w okresie pourodzeniowym.....	14
1.7. Główne hormony regulujące czynność nerek cieląt w okresie postnatalnym.....	16
1.8. Hormonalna regulacja czynności nerek w zaburzeniach wodno-elektrolitowych.....	18
1.9. Zmiany parametrów krwi cieląt podczas zaburzeń wodno-elektrolitowych.....	19
1.10. Czynniki doświadczalne – laktoza.....	20
2. Cel pracy.....	23
3. Materiał.....	25
4. Metody.....	27
5. Wyniki.....	33
6. Dyskusja.....	47
7. Podsumowanie i wnioski.....	61
Piśmiennictwo.....	63
Summary.....	75
Zusammenfassung.....	77

WYKAZ SKRÓTÓW

ADPN	– adiponektyna (ang. <i>adiponectin</i>)
2-D	– dwuwymiarowy (ang. <i>two-dimensional</i>)
2-DE	– elektroforeza dwukierunkowa (ang. <i>two-dimensional electrophoresis</i>)
AFP	– α_1 -fetoproteina (ang. <i>α_1-fetoprotein</i>)
AGP	– α_1 -kwaśna glikoproteina (ang. <i>α_1- acid glycoprotein</i>)
AHSG	– glikoproteina α -2-HS (ang. <i>α-2-HS glycoprotein</i>)
ALDO	– aldosteron (ang. <i>aldosterone</i>)
ANP	– przedsiolkowy peptyd natriuretyczny (ang. <i>atrial natriuretic peptide</i>)
AVP	– wazopresyna argininowa (ang. <i>arginine vasopressin</i>)
AQP2	– akwaporyna 2 (ang. <i>aquaporin 2</i>)
BMI	– wskaźnik masy ciała (ang. <i>body mass index</i>)
BOF	– białka ostrej fazy (ang. <i>accute phase proteins</i>)
bPAP	– bydlęce białko związane z ciążą (ang. <i>bovine pregnancy-associated protein, bPAP</i>)
C1	– składowa dopełniacza C1(ang. <i>complement component 1</i>)
C1r	– fragment C1r pierwszej składowej dopełniacza (ang. <i>C1r fragment of the first component</i>)
C1s	– fragment C1s pierwszej składowej dopełniacza (ang. <i>C1s fragment of the first component</i>)
C1q	– fragment C1q pierwszej składowej dopełniacza (ang. <i>C1q fragment of the first component</i>)
CHAPS	– 3-[(3-cholamidopropyl) dimetyloamonio]-1-propanosulfonian (ang. <i>3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>)
DTT	– DL-Ditiotreitol (ang. <i>DL-Dithiothreitol</i>)
EGF	– nabłonkowy czynnik wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor</i>)
Fb	– fibrynogen (ang. <i>fibrynogen</i>)
GIP	– glukozozależny peptyd insulintropowy (ang. <i>glucose-dependent insulinotropic peptide</i>)
H ₂ O ₂	– nadtlenek wodoru (ang. <i>hydrogen peroxide</i>)
HDL	– lipoproteina o dużej gęstości (ang. <i>high density lipoprotein</i>)
HMW	– duża masa cząsteczkowa (ang. <i>high molecular weight</i>)
Hp	– haptoglobina (ang. <i>haptoglobin</i>)
ICP-OES	– spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w indukcyjnie sprzężonej plazmie argonowej (ang. <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>)
IgA	– immunoglobulina A (ang. <i>immunoglobulin A</i>)
IgG	– immunoglobulina G (ang. <i>immunoglobulin G</i>)
IgM	– immunoglobulina M (ang. <i>immunoglobulin M</i>)
IGF-1	– insulinopodobny czynnik wzrostu-I (ang. <i>insulin-like growth factor I</i>)
IL	– interleukina (ang. <i>interleukin</i>)
IPG	– immobilizowany gradient pH (ang. <i>immobilized pH gradients</i>)

K ₃ EDTA	– wersenian tripotasowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid tripotassium</i>)
LC-MS/MS	– chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (ang. <i>liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>)
LC-ESI-IT-MS/MS	– chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas z jonizacją typu elektrospray (ang. <i>liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry</i>)
LDL	– lipoproteiny o małej gęstości (ang. <i>low density lipoproteins</i>)
Lf	– laktoferyna (ang. <i>lactoferrin</i>)
LMW	– mała masa cząsteczkowa (ang. <i>low molecular weight</i>)
MAC	– kompleks atakujący błonę (ang. <i>membrane attack complex</i>)
MALDI TOF	– desorpcja / jonizacja laserowa wspomagana matrycą z analizatorem czasu przelotu (ang. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight</i>)
MGP	– białko Gla macierzy (ang. <i>matrix Gla protein</i>)
MMW	– średnia masa cząsteczkowa (ang. <i>middle molecular weight</i>)
mRNA	– matrycowy kwas rybonukleinowy (ang. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MS	– spektrometria masowa (ang. <i>mass spectrometry</i>)
MW	– masa cząsteczkowa (ang. <i>molecular weight</i>)
ORBITRAP	– spektrometr masowy z analizatorem mas typu orbitrap (ang. <i>orbitrap mass spectrometer</i>)
pI	– punkt izoelektryczny (ang. <i>isoelectric point</i>)
rpm	– obroty na minutę (ang. <i>rotation per minute</i>)
SAA	– amyloid surowiczy A (ang. <i>serum amyloid A</i>)
SDS	– dodecylosiarczan sodu (ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SSP	– specyficzny spot białkowy (ang. <i>specific spot protein</i>)
Tf	– transferyna (ang. <i>transferrin</i>)
TNF	– czynnik martwicy nowotworu (ang. <i>tumor necrosis factor</i>)
α-CHCA	– kwas α-cyjano-4-hydroksycynamonowy (ang. <i>α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid</i>)

1. WSTĘP I PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

1.1. Wprowadzenie

Pourodzeniowym procesom adaptacji, wzrostu i dojrzewania towarzyszy nasilenie zachorowań i znaczna śmiertelność zwierząt, która w przeciętnych warunkach utrzymania kształtuje się u cieląt na poziomie 10–15%, z czego 60–75% przypada na pierwszy miesiąc życia. Przyczyny śmiertelności neonatalnej są złożone, często ma ona podłoże polietiologiczne, u podstaw którego leżą zaburzenia homeostazy wodno-elektrolitowej. Oszacowanie strat hodowców bydła w związku z zaburzeniami gospodarki wodno-elektrolitowej cieląt jest trudne. Niemniej z piśmiennictwa wynika, że w Polsce zachorowalność cieląt może sięgać nawet 60%.

Przyczyną odwodnienia organizmu, na skutek strat wody i elektrolitów drogą pokarmową, mogą być czynniki niezakaźne (np. niewłaściwa higiena zwierząt, nadmierna podaż mleka lub preparatu mlekozastępczego) oraz zakaźne (np. rotawirusy, koronawirusy, enterotoksyczne szczepy *E. coli*). Często wszystkie te czynniki współuczestniczą w patogenezie biegunk. Istotnym czynnikiem sprzyjającym utracie wody i elektrolitów wraz z kałem jest gromadzenie się w przewodzie pokarmowym niestrawionych dwucukrów (laktozy). Z piśmiennictwa wiadomo, że przekroczenie 55% udziału laktozy w preparacie mlekozastępczym istotnie zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia biegunki ze względu na jej właściwości osmotyczne.

Między stanem gospodarki wodno-elektrolitowej a czynnością nerek istnieje wzajemna zależność. Mimo wielu badań nie są w pełni poznane mechanizmy nerkowej regulacji bilansu wodno-elektrolitowego u cieląt nowo narodzonych w stanie odwodnienia. Pomimo że nerki noworodków są czynnościowo wydolne, ich „rezerwa” czynnościowa jest bardzo ograniczona. Ponadto sprawność regulacji hormonalnej czynności nerek cieląt, w porównaniu z osobnikami dorosłymi, jest mniejsza. Wiadomo, że w regulacji czynności nerek cieląt istotną rolę odgrywają hormony: przedsionkowy peptyd natriuretyczny, wazopresyna oraz składowe układu renina-angiotensyna-aldosteron.

Określenie zmian jakościowych i ilościowych składu peptydowo-białkowego płynów ustrojowych, który ulega nieustannym zmianom w odpowiedzi na czynniki wewnątrzustrojowe lub środowiskowe (w tym doświadczalne), pozwala na scharakteryzowanie białek wskaźnikowych charakterystycznych dla określonego stanu fizjologicznego, w tym także patologicznego.

Metody badawcze, stosowane dotychczas w ocenie zmian procesów fizjologicznych i ich zaburzeń, opierały się na analizie biochemicznej krwi i moczu. Wykorzystanie metod proteomicznych umożliwi dokładniejsze poznanie przebiegu procesów metabolicznych, mechanizmów regulacji ekspresji białek na poziomie translacji. Ponadto połączenie technik proteomicznych z analizą parametrów biochemicznych osocza krwi i moczu umożliwi poznanie mechanizmów reakcji organizmu cieląt na dodanie laktozy do preparatu mlekozastępczego.

Podjęte badania miały na celu określenie wzoru zmian profili białkowych badanych płynów ustrojowych oraz hormonów i wskaźników biochemicznych osocza krwi cieląt w pierwszym tygodniu ich życia w odpowiedzi na krótkotrwałe dodawanie laktozy do preparatu mlekozastępczego. Znajomość charakteru zmian badanych wskaźników (białkowych, humoralnych i biochemicznych) w płynach ustrojowych, wynikających z nadmiernego udziału laktozy w diecie, może przyspieszyć znalezienie przyczyn (lub przyczyny) zaburzeń wodno-elektrolitowych obserwowanych u cieląt w tym okresie życia.

1.2. Proteomika

Termin „proteomika” po raz pierwszy został wprowadzony w 1994 roku; oznacza badanie ogółu białek obecnych w organizmie. Proteomika zajmuje się określaniem struktury, w tym izoform i modyfikacji potraślacyjnych białek, badaniem ich funkcji, lokalizacji oraz analizą interakcji zachodzących pomiędzy białkami.

Badania proteomiczne łączą metody biochemiczne, fizykochemiczne i bioinformatyczne, co daje możliwość równoczesnej analizy wszystkich białek obecnych w komórce, tkance oraz płynach ustrojowych. Całościowa analiza proteomu różni się od klasycznie stosowanych technik biochemicznych, umożliwiających identyfikację i charakterystykę jedynie pojedynczych białek. Proteom ulega nieustannym zmianom w odpowiedzi na czynniki wewnątrzustrojowe lub środowiskowe, dlatego wyniki analiz proteomicznych danego systemu biologicznego dostarczają informacji o poziomie ekspresji i aktywności białek w określonym czasie.

Wysokospecjalistyczne techniki wykorzystywane w proteomice dają możliwość kompleksowej analizy ilościowej polipeptydów i ich identyfikację. Do najpopularniejszych narzędzi wykorzystywanych w analizach proteomicznych należy elektroforeza dwukierunkowa (rozdział białek) w połączeniu ze spektrometrią mas (identyfikacja białek). Wyżej opisane techniki analityczne są stosowane w badaniach z zakresu proteomiki ekspresyjnej, w których analizuje się obecność białek występujących w danym układzie biologicznym oraz zmian ich ekspresji pod wpływem określonych czynników, w tym doświadczalnych.

Istotą badań proteomicznych jest poszukiwanie różnic w profilach białkowych (komórek, tkanek, płynów ustrojowych) na przykład pomiędzy osobnikami zdrowymi i chorymi. Analiza zmian występujących w proteomach pod wpływem działania określonego czynnika (np. leku, zmodyfikowanej diety, stresu, zmiany środowiska) umożliwia wyodrębnienie białek kluczowych dla badanych procesów biologicznych. Analizy proteomiczne umożliwiają również wyszukiwanie białek różniących się ekspresją, które mogą stanowić wskaźniki zmian procesów zachodzących w organizmie.

1.3. Proteomika w badaniach zootechniczno-weterynaryjnych bydła

Narzędzia proteomiczne w badaniach fizjologii zwierząt gospodarskich są coraz częściej stosowane, czego wyrazem jest wzrost liczby publikacji dotyczących zmian profili białkowych komórek, tkanek oraz płynów ustrojowych tych zwierząt. Badania proteomiczne umożliwiają utworzenie referencyjnych map białkowych określonych układów biologicznych lub określenie różnic w profilach białkowych, przejawiających się w postaci zmian w składzie ilościowym i jakościowym polipeptydów, zachodzących w warunkach fizjologicznych lub patologicznych oraz pod wpływem działania różnych czynników, w tym doświadczalnych.

W ostatnich latach utworzono mapy białkowe tkanek i płynów ustrojowych bydła, w tym nerek, wątroby, mięśni poprzecznie prążkowanych, osocza (surowicy) krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego, a także erytrocytów i neutrofilów (Wait i in. 2002; Talamo i in. 2003; Lippolis i in. 2006; Brenn i in. 2009; Skrzypczak i in. 2011). Określono profil białkowy osocza nasienia buhajów (Kelly i in. 2006) oraz płynu owodniowego we wczesnym okresie ciąży u krów (Riding i in. 2008). Porównano profile białkowe siary oraz mleka krów

(Reinhardt i Lippolis 2008). Określono proteom otoczki białkowej tłuszczu mleka krowiego (Reinhardt i Lippolis 2006).

Jednym z kierunków badań proteomicznych jest poszukiwanie białkowych wskaźników odzwierciedlających stan fizjologiczny lub patologiczny organizmu. Porównywano proteomy osocza krwi zdrowych krów mlecznych z krowami, u których stwierdzono gorączkę mleczną (Xia i in. 2012). U chorych krów zidentyfikowano białka, które wykazywały zwiększoną ekspresję, m.in.: angiotensyny, uczestniczącej w regulacji ciśnienia krwi i utrzymaniu homeostazy wodno-elektrolitowej, endopiny 2B, zaangażowanej w regulację układu nerwowego oraz białek wykazujących zmniejszoną ekspresję, takich jak albumina osoczowa (transporter białek), łańcuch α fibrynogenu (zaangażowany w proces krzepnięcia krwi), a także stały region ciężkiego łańcucha immunoglobuliny G biorący udział w odpowiedzi immunologicznej (Xia i in. 2012).

Porównanie proteomów osocza krwi zdrowych krów z osoczem krwi krów z klinicznymi objawami mastitis pozwoliło na wskazanie haptoglobiny oraz białka SCGB 2A1 jako przypuszczalnych wskaźników zapalenia wymienia (Yang i in. 2009). LiLi i in. (2013), używając narzędzi proteomicznych, wskazali na glikoproteinę α -2-HS, obecną w osoczu krwi krów typu mlecznego, jako na nowy czynnik diagnostycznego zapalenia wymienia.

U bydła mlecznego analiza proteomiczna sftuszczonej wątroby pozwoliła na wyodrębnienie nowych cząsteczek sygnałowych uczestniczących w utrzymaniu homeostazy energetycznej (Kuhla i in. 2009). Badanie korelacji pomiędzy poziomem ekspresji białek wątroby a ekspresją białek osocza krwi pozwoliło na wytypowanie we krwi potencjalnych biomarkerów, umożliwiających wczesne wykrycie sftuszczenia wątroby u krów mlecznych (Sejersen i in. 2012).

W płynie mózgowo-rdzeniowym krów chorych na gębczą encefalopatię bydła wykazano 10-krotny wzrost koncentracji apolipoproteiny E (Hochstrasser i in. 1997). U cieląt z infekcją dróg oddechowych, wywołaną przez bydlęcy syncytialny wirus oddechowy (ang. *bovine respiratory syncytial virus*, BRSV), obserwowano wzrost stężenia w osoczu krwi surowiczego amyloidu A, haptoglobiny oraz białka wiążącego lipopolisacharyd (Heegaard i in. 2000; Orro i in. 2011).

Narzędzia proteomiczne są stosowane w badaniach jakości produktów pochodzenia zwierzęcego oraz w wykrywaniu niedozwolonych promotorów wzrostu stosowanych w chowie zwierząt gospodarskich. Określano zmiany ekspresji białek mięśni *post mortem* u bydła, a także wpływ czasu przechowywania mięsa na jego profil białkowy (Jia i in. 2007; Morzel i in. 2008). U cieląt ras mięsnych ocenie poddano zmiany ekspresji białek osocza krwi i moczu podczas stosowania środków steroidowych (Draisci i in. 2007).

1.4. Proteom osocza lub surowicy krwi bydła

Krew, docierając do wszystkich komórek organizmu, staje się rezerwuarem białek oraz metabolitów wydzielanych przez tkanki ustroju. Skład ilościowy i jakościowy białek osocza (surowicy) krwi ulega dynamicznym zmianom w zależności od stanu organizmu, obrazując zarówno jego zmiany fizjologiczne, jak i patologiczne. Współczesne techniki proteomiczne pozwalają na porównanie profili białkowych osocza (surowicy) krwi zdrowych zwierząt

i po zadziałaniu czynnika (żywieniowego, patogennego) oraz poszukiwanie białek różniących się ekspresją, mogących stanowić wskaźniki zmian procesów zachodzących w organizmie.

Obecnie jedynie w dwóch pracach został opisany profil białkowy osocza (surowicy) krwi dorosłych krów (Wait i in. 2002; Talamo i in. 2003). W badaniach Wait i in. (2002) w celu utworzenia mapy białkowej surowicy krwi dorosłego bydła wykorzystano połączenie elektroforezy 2-D ze spektrometrią masową typu MALDI-TOF oraz chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS). Za pomocą tych technik proteomicznych zidentyfikowano 28 białek, wśród których znalazły się m.in.: bydlęcy czynnik H, stały region ciężkiego łańcucha immunoglobuliny G1, α -1-antychymotrypsyna, oksydaza aminowo-miedziowa, gelsolina, stały region ciężkiego łańcucha immunoglobuliny M, serotransferyna, kininogen, glikoproteina α -2-HS, α -1-antyproteinaza, albumina surowicza, apolipoproteina A-IV, bogata w leucynę glikoproteina α_2 , α -1-kwaśna glikoproteina, klasteryna, osocze białko wiążące retinol, transtyretyna, apolipoproteina C-III, łańcuch β haptoglobiny, α_2 -makroglobulina. Natomiast Talamo i in. (2003) w osoczu krwi dorosłego bydła zidentyfikowali 165 spotów białkowych, które stanowiły 22 różne białka. Były wśród nich te, których wcześniej nie zidentyfikowali Wait i in. (2002), między innymi: apolipoproteina A-I, łańcuch β fibrynogenu, łańcuch ciężki immunoglobuliny 2γ , łańcuch ciężki immunoglobuliny 1γ , plasminogen, α -1-antyptrypsyna, protrombina, łańcuch ciężki immunoglobuliny μ , łańcuch γ fibrynogenu, łańcuch α fibrynogenu, łańcuch lekki immunoglobuliny γ , α -1-antychymotrypsyna. W większości były to białka, które związane są z procesem krzepnięcia krwi, zaangażowane w odpowiedź immunologiczną oraz niskocząsteczkowe białka transportujące (D'Ambrosio i in. 2005).

W dostępnym piśmiennictwie niewiele jest prac z zakresu analiz proteomu osocza krwi cieląt nowo urodzonych. Talukder i in. (2002), wykorzystując elektroforezę dwukierunkową w połączeniu z techniką Western blott, obserwowali wzrost ekspresji laktoferyny (Lf), transferyny (Tf), immunoglobuliny G (IgG) oraz nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF) w osoczu krwi cieląt po podaniu siary. Inni autorzy (Draisci i in. 2007; Della Donna i in. 2009) analizowali zmiany ekspresji białek osocza (surowicy) krwi cieląt ras mięsnych pod wpływem stosowania niedozwolonych substancji wspomagających wzrost zwierząt. Draisci i in. (2007), stosując połączone techniki proteomiczne: 2-DE, MALDI-TOF-MS oraz LC-ESI-IT-MS/MS, wykazali, że wskaźnikiem użycia steroidów anabolicznych może być białko apolipoproteina A-I. Wykorzystanie przez Della Donna i in. (2009) techniki MALDI-TOF MS pozwoliło na wyodrębnienie w surowicy krwi cieląt potencjalnego biomarkera wskazującego na stosowanie niedozwolonych środków podczas odchowu cieląt – β -2- glikoproteiny I.

Obecnie dostępna jest jedna publikacja opisująca profil białkowy osocza krwi cieląt (Skrzypczak i in. 2011). Badacze, stosując elektroforezę dwukierunkową sprzężoną ze spektrometrią mas typu MALDI-TOF, spośród 178 spotów białkowych zidentyfikowali 79, które reprezentowały 23 białka osocze. Były to białka uczestniczące w procesie krzepnięcia krwi (łańcuch α fibrynogenu, łańcuch γ -B fibrynogenu, białko 1 podobne do fibrynogenu, czynnik von Willebranda), białka związane z metabolizmem i/lub transportem lipidów (apolipoproteina A-I, apolipoproteina A-IV, apolipoproteina E), białka związane z odpornością – czynniki dopełniacza (subkomponent układu dopełniacza C1s, podjednostka B subkomponentu układu dopeł-

niacza C1q), białka transportowe lub wiążące (albumina surowicza, serotransferyna, białko wiążące witaminę D, gelsolina), inhibitory proteaz (α -1-antyproteinaza), białka strukturalne (aktyna cytoplazmatyczna, łańcuch α -3 tropomiozyny, łańcuch α -4 tropomiozyny, łańcuch α -4-A tubuliny, łańcuch β 1 tubuliny, białko 38 podobne do kinazy serynowo-treoninowej) oraz inne: klusteryna, 78 kDa białko regulowane stężeniem glukozy.

1.5. Proteom moczu zwierząt gospodarskich

Mocz jest płynem ustrojowym, którego duże ilości można pozyskać w sposób nieinwazyjny. Od wielu lat jest on wykorzystywany w diagnostyce weterynaryjnej do oceny zdrowia zwierząt.

Wraz z moczem wydalana jest niewielka ilość białek, która w fizjologicznym moczu nie przekracza 150 mg na dobę. W 30% są to białka pochodzące z osocza krwi, a 70% z nich pochodzi z układu wydalniczego (Thongboonkerd i Malasit 2005). Niskocząsteczkowe białka osocza krwi, przefiltrowane w kłębuszkach nerkowych, są obligatoryjnie resorbowane w kanalikach proksymalnym nefronu, dlatego tylko niewielka ich część trafia do moczu ostatecznego. Oprócz białek przefiltrowanych w moczu obecne są białka aktywnie wydzielane przez komórki śródbłonka naczyń krwionośnych nerek, podocyty kłębuszków nerkowych, komórki nabłonkowe kanalików nerkowych i dróg moczowych. Głównymi białkowymi składnikami fizjologicznego moczu ostatecznego są albuminy, które stanowią 30–40% całkowitego białka moczu, IgG (5–10%), mono- i dimery lekkich łańcuchów immunoglobulin (5%), IgA (3%). Spośród pozostałych białek największy udział ma uromodulina (Lisowska-Myjak i in. 2008).

Analiza ilościowa i jakościowa białek moczu wykorzystywana jest w opisie fizjologii czynności nerek i dróg moczowych. Wydalane z moczem białka niskocząsteczkowe, takie jak: N-acylo-glukozamidaza, aminopeptydaza alāninowa, α -1-mikroglobulina, β -2-mikroglobulina, białko wiążące retinol, endopeptydaza, zostały opisane przez Forterre i in. (2004) jako markery diagnostyczne oceny funkcji kanalików proksymalnych. Ponadto, zdaniem ww. autorów, białko wiążące retinol może posłużyć jako biomarker procesów metabolicznych zachodzących w komórkach kanalików proksymalnych. Natomiast uromodulina, w związku z tym, że jest syntetyzowana wyłącznie przez komórki kanalików dystalnych nerek, nazywana jest białkiem wskaźnikowym funkcji tego odcinka nefronu (Forterre i in. 2004).

W diagnostyce biomedycznej w moczu poszukuje się białkowych markerów prawidłowej funkcji nerek, szczególnie kłębków i kanalików nerkowych. Ponadto analiza proteomiczna moczu wykorzystywana jest w diagnostyce procesów patologicznych, takich jak przewlekła niewydolność nerek, nefropatia zaporowa, rak nerkowokomórkowy, rak pęcherza moczowego (Decramer i in. 2008). W moczu wykazano również obecność białek, które mogą posłużyć jako wskaźniki wykorzystywane w diagnostyce chorób niezwiązanych z układem wydalniczym, takich jak choroba: przeszczep przeciwko gospodarzowi, choroba wieńcowa, uszkodzenie mózgu oraz rak żołądka (Berger i Kochanek 2006; Hong i in. 2007; Weissinger i in. 2007; Zimmerli i in. 2008).

Do tej pory w moczu ludzkim scharakteryzowano ponad 2300 białek (Kentsis i in. 2009). W moczu szczurów Thongboonkerd i in. (2003) zidentyfikowali 111 białek. W niepublikowa-

nych materiałach na podstawie badań własnych (Dratwa-Chałupnik i in. 2014) opisano 692 białka występujące w moczu sześciodniowych cieląt.

Mimo że mocz jest stosunkowo łatwo pozyskiwanym materiałem badawczym, niewiele jest prac z zakresu proteomiki moczu zwierząt gospodarskich. Wykorzystanie przez Pyo i in. (2003) elektroforezy 2D sprzężonej z MALDI-TOF MS pozwoliło na wyodrębnienie w moczu krów, wiarygodnego wskaźnika ciąży: bydlęce białko związane z ciążą (bPAP).

Alhaider i in. (2012), wykorzystując elektroforezę 1D oraz LC-MS/MS, zidentyfikowali w moczu samic wielbłądów białka charakterystyczne dla osocza krwi, między innymi: albuminę surowiczą, serotransferynę, białko wiążące witaminę D, α -1-kwaśną glikoproteinę, glikoproteinę α -1-B, białko AMBP oraz globulinę wiążącą tyroksynę. Ponadto autorzy ci wykazali obecność białek, których dużą ekspresję obserwuje się w nerkach, na przykład: białko 2 związane z receptorem LDL, nabłonkowy czynnik wzrostu oraz uromodulina. Analiza proteomiczna moczu pozwoliła na wskazanie różnic w proteomach moczu jałówek, ciężarnych oraz laktujących wielbłądów. W moczu tych zwierząt stwierdzono obecność białek zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną: łańcuchy ciężkie i lekkie immunoglobulin, receptor polimerycznych immunoglobulin, serotransferynę, uromodulinę, α -1-kwaśną glikoproteinę, lipokalinę 2, lizozym C i protegrynę 5. W moczu samic wielbłądów obecne były także białka, które w sposób pośredni lub bezpośredni uczestniczą w reakcji obronnej organizmu przed bakteriami: peptyd PMAP-23, β -2-mikroglobulina, laktotransferyna, fibronektyna, receptor 1 interferonu γ , przeciwbakteryjny peptyd 2 ulegający ekspresji w wątrobie, białko 1 rozpoznające peptydoglikan, białko S100-A8 oraz receptor 2 toll-podobny. Na podstawie uzyskanych wyników Alhaider i in. (2012) wnioskują, że u wielbłądów, podobnie jak u ludzi, drogi moczowe są sterylne.

Niektóre zwierzęta gospodarskie wykorzystywane są jako modele badawcze do opisu procesów fizjologicznych i patofizjologicznych zachodzących u ludzi. Badania Palviainen i in. (2012), prowadzone na owcach z ostrą niewydolnością nerek, pozwoliły na wskazanie kalbindyny-D28k, białka 4 wiążącego retinol oraz białka CD1d jako potencjalnych biomarkerów, które mogą być przydatne we wczesnej diagnostyce tej choroby u ludzi.

Należy dodać, że u noworodków zwierząt oraz ludzi, w związku ze zwiększoną przepuszczalnością bariery filtracyjnej kłębków oraz ograniczoną wydolnością resorpcji w kanalikach nerkowych, obserwuje się zwiększone wydalanie białek z moczem – proteinurię neonatalną (Schäfer-Somi i in. 2005; Ojala i in. 2006; Ożgo i in. 2009). Z nieopublikowanych badań (Boniecka 2005), przeprowadzonych na cielętach w pierwszych 7 dniach ich życia w Katedrze Fizjologii Cytobiologii i Proteomiki Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego (ZUT), wynika, że wraz z wiekiem zwierząt zmniejsza się ilość białka całkowitego wydalanego z moczem. W pierwszym dniu życia ilość wydalonego z moczem białka całkowitego wynosiła 6,19 mg/min/m², a w kolejnych dniach stopniowo się zmniejszała, osiągając w 7. dniu życia 3,96 mg/min/m². Następujący wraz z wiekiem cieląt wzrost wydalania białek o dużej masie cząsteczkowej (HMW) może wskazywać na pojawienie się białek pochodzenia nerkowego. Źródłem tych białek mogą być: komórki przebudowujących się nefronów, złuszczone nabłonki dróg moczowych, sekrecja kanalikowa białek (urodylatyna). Natomiast zaobserwowane u starszych zwierząt zmniejszanie się wydalania z moczem białek o małej

masie cząsteczkowej (LMW) może wskazywać na uszczelnianie bariery filtracyjnej kłębków oraz wzrost sprawności procesów resorpcji w kanalikach nerkowych.

W okresie pourodzeniowym zachodzą istotne zmiany, zarówno morfologiczne, jak i czynnościowe nerek, co odzwierciedla się w profilu białkowym moczu. Z badań wykonanych na szczurach (Lee i in. 2008) wynika, że proteom moczu noworodków różni się od proteomu dorosłych osobników. Jedynie w moczu noworodków szczurów wykazano obecność białek strukturalnych oraz zaangażowanych w proces przylegania międzykomórkowego, proliferacji i różnicowania komórkowego. Natomiast białka wskazujące na dojrzałość płciową samców (białka prostaty i pęcherzyka nasienne) obecne były jedynie w moczu dorosłych osobników.

W nieopublikowanych materiałach na podstawie badań własnych (Dratwa-Chałupnik i in. 2014), zaprezentowanych na Kongresie Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego 18–20 września 2014 r. w Szczecinie, w wyniku połączenia dwóch technik proteomicznych (elektroforezy dwukierunkowej (2-DE) ze spektrometrią masową typu MALDI-TOF-TOF oraz elektroforezy jednokierunkowej (1-DE) ze spektrometrem ORBITRAP) w moczu sześciodniowych cieląt zidentyfikowano białka, których obecność wykazano również w osoczu (surowicy) krwi u bydła: 78 kDa – białko regulowane stężeniem glukozy, aktyne cytoplazmatyczną 1, α -1-antyproteinazę, glikoproteinę α -2-HS, apolipoproteinę A-I, apolipoproteinę A-IV, apolipoproteinę CIII, apolipoproteinę E, klusterynę, łańcuch α fibrynogenu, łańcuch β fibrynogenu, białko 1 podobne do fibrynogenu, gelsolinę, haptoglobinę, stały łańcuch γ 1 immunoglobuliny, kininogen-1, kininogen-2, plazminogen, protrombinę, białko wiążące retinol 4, serotransferynę, serpinę A3-I, albuminę osoczną, transtytretynę oraz białko wiążące witaminę D.

Ponadto w moczu zidentyfikowano białka, których obecność wykazano w nerkach bydła: tioesterazę acylo-białkową 1, dehydrogenazę alkoholową, reduktazę aldozy, apolipoproteinę A-I, kalbindynę, anhydrazę węglanową 2, transferazę S glutationu P, dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego, pokrewne białko szoku cieplnego 71 kDa, peroksyredoksynę-2, kinazę 1 fosfoglicerynianową, albuminę surowiczą, dysmutazę ponadtlenkową (Cu-Zn), izomerazę triozofosforanową i wimentynę.

W moczu badanych cieląt wykazano obecność białka Delta, które po związaniu z białkiem receptorowym Notch uczestniczy, między innymi, w procesie nefrogenyzy. Ponadto w moczu obecne były białka strukturalne oraz zaangażowane w proces przylegania międzykomórkowego, proliferacji i różnicowania komórkowego, które obserwuje się jedynie w moczu noworodków zwierząt (Lee i in. 2008): aktyna, łańcuch α -1 kolagenu, gelsolina, oksydaza lizylova, nidogen 1, osteopontyna i plazminogen. W proteomie moczu tych cieląt wykazano obecność białek związanych z rozwojem embrionalnym ssaków, których nie stwierdzono u osobników dorosłych: ameloblastyny, α -fetoproteiny, wariantu transkryptu specyficznej fibronektyny płodowej 1, homologu białka Indian hedgehog. W moczu obecne były również białka związane z nerkową regulacją bilansu wodno-elektrolitowego: angiotensynogen, enzym konwertujący angiotensynę, akwaporyna 1, ezryna, uromodulina.

Ponadto w proteomie moczu tych cieląt wykazano obecność białek niezwiązanych z układem wydalniczym, a charakterystycznych dla innych tkanek (narządów, układów), m.in. dla układu nerwowego (białka 14-3-3 epsilon, midkiny, białka NAGLU), układu sercowo-naczyniowego (angiogeniny, angiopoetyny, efryny- α 1, aminopeptydazy glutamylowej, laktad-

heryny (BP47), lizosomalnej α -glukozydazy) oraz układu kostnego (łańcucha kolagenu α -1(i), białka CTHRC1, glipikanu 3, wydzielniczej fosfoproteiny 24, tripeptydylo-peptydazy 1).

1.6. Białka osocza krwi cieląt w okresie pourodzeniowym

Skład białkowy osocza krwi wielu gatunków zwierząt gospodarskich we wczesnym okresie pourodzeniowym różni się istotnie od obserwowanego u osobników dorosłych. Najmniejsze stężenia białka całkowitego w osoczu krwi noworodków zwierząt gospodarskich obserwuje się bezpośrednio po urodzeniu; utrzymują się one w granicach od $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ do $41,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (Abe i in. 1976; Knowles i in. 2000; Talukder in. 2002). Podaż siary powoduje istotne zwiększenie stężenia białka całkowitego w osoczu krwi tych zwierząt (Knowles i in. 2000; Talukder in. 2002). Po 10 godzinach od podania siary stężenie białka w osoczu krwi wynosi średnio $64,2 \text{ mg/ml}$ (Talukder in. 2002). Knowles i in. (2000) wykazali, że w ciągu pierwszych 10 dni życia cieląt stężenie białka mieści się w dolnych granicach zakresu wartości referencyjnych dla dorosłego bydła (od 61 do $81 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), a od 13. dnia życia zmniejsza się i do 70. dnia życia jest mniejsze od zakresu wartości referencyjnych.

Mniejsze stężenie białka całkowitego w osoczu krwi cieląt w ciągu pierwszych 7 dni życia obserwowali Nussbaum i in. (2002). Podają oni, że stężenie białka całkowitego w osoczu krwi cieląt w 1. dniu ich życia kształtuje się na poziomie $40,9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, następnie wzrasta, osiągając wartość $46,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ w 2. dniu życia oraz $47,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ w 3. dniu życia. W 7. dniu życia odnotowano zmniejszenie stężenia białka we krwi badanych zwierząt do wartości $44,8 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (Nussbaum i in. 2002).

Białkami osocza krwi, których stężenie zmienia się w okresie noworodkowym, są albumina oraz α_1 -fetoproteina (AFP). Oba białka wykazują zbliżone właściwości fizykochemiczne oraz znaczną homologię w sekwencji aminokwasowej (Mizejewski 2001). Pełnią także zbliżone funkcje biologiczne. Głównym ich zadaniem jest transport bilirubiny, miedzi oraz kwasów tłuszczowych w osoczu krwi, a także udział w utrzymaniu ciśnienia onkotycznego krwi (Liao i in. 1980; Thomas i Schreiber 1985). α_1 -fetoproteina uznawana jest za płodowy analog albuminy osoczowej (Mizejewski 2001). Stężenie AFP w osoczu krwi cieląt bezpośrednio po urodzeniu jest małe i wynosi średnio $0,034 \text{ mg/ml}$, a następnie zmniejsza się w kolejnych dniach życia, osiągając w 14. dniu życia cieląt wartość uniemożliwiającą jej detekcję (Abe i in. 1976). Odminną tendencję obserwuje się w stężeniu albuminy osoczowej we krwi noworodków (Abe i in. 1976; Knowles i in. 2000; Nussbaum i in. 2002). Knowles i in. (2000) podają, że stężenie albuminy w osoczu krwi cieląt bezpośrednio po urodzeniu jest małe – wynosi około $26 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ i maleje w pierwszej dobie ich życia do wartości około $24 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, po czym w kolejnych dniach życia postnatalnego obserwuje się wzrost stężenia albuminy. Według Knowles i in. (2000) w osoczu krwi cieląt osiąga ono wartości referencyjne dopiero po 9. dniu ich życia. Większe stężenie tego białka we krwi cieląt obserwowali Nussbaum i in. (2002). Autorzy wykazali, że w 1. dniu życia stężenie albuminy w osoczu krwi cieląt wynosi $28,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, w 7. dniu życia – $29,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, w 14. dniu życia – $32,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, w 21. dniu życia – $33,8 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, a w 28. dniu życia – $35,4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (Nussbaum i in. 2002). Według badań Jeżek i in. (2006) wzrost stężenia tego białka w osoczu krwi cieląt następuje do 8. tygodnia życia. W kolejnych tygodniach stężenie albuminy we krwi nie zmienia się – do 24. tygo-

dnia życia utrzymuje się na względnie stałym średnim poziomie wynoszącym około $33,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Jeżek i in. 2006).

Białkami charakteryzującymi się najbardziej dynamicznymi zmianami stężenia we krwi noworodków następującymi wraz z ich wiekiem są osoczowe immunoglobuliny. Budowa łożyska krów uniemożliwia przechodzenie immunoglobulin do krwiobiegu płodu, dlatego w osoczu krwi cieląt bezpośrednio po urodzeniu obserwowane są jedynie ich śladowe ilości. W momencie urodzenia cieląt stężenie immunoglobuliny G (IgG) jest bardzo małe – wynosi od $0,015$ do $0,220 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Abe i in. 1976; Talukder i in. 2002; Nussbaum i in. 2002). Wyniki badań Talukder i in. (2002) wykazały, że po 8 godzinach po pobraniu siary przez cielęta stężenie tego białka może wzrosnąć do wartości około $4,61 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, która jest bardzo zbliżona do odnotowanej po 24 godzinach od pojenia siarą i wynosi $4,90 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Nussbaum i in. 2002). W kolejnych dniach obserwuje się stopniowe zmniejszanie się stężenia IgG we krwi cieląt do średniej wartości wynoszącej $3,80 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, notowanej w 14. dniu ich życia (Nussbaum i in. 2002).

Niezależnie od rasy tendencja zmian stężenia tego białka we krwi cieląt jest taka sama. Wykazano natomiast dwukrotnie większe stężenie IgG we krwi cieląt typu mięsnego niż we krwi cieląt typu mlecznego (Suh i in. 2003). Stężenie immunoglobulin M (IgM) oraz A (IgA) w osoczu krwi cieląt było mniejsze niż stężenie immunoglobuliny G. Ponadto do 6. dnia życia obserwuje się różnice w stężeniu obydwu białek w zależności od rasy. Wykazano, że stężenie tych białek, m.in. IgG, znacznie wzrasta w pierwszej dobie po pojeniu zwierząt siarą. W osoczu krwi cieląt typu mięsnego stężenie IgM w pierwszej dobie życia wynosiło średnio $2,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, natomiast w przypadku cieląt typu mlecznego – $1,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Suh i in. 2003). Średnie stężenie IgA w osoczu krwi cieląt typu mięsnego w tym samym czasie wynosiło $0,9 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, a w osoczu krwi cieląt typu mlecznego – $0,4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Suh i in. 2003). Następnie stężenie obydwu białek w osoczu krwi zmniejszało się, osiągając w 8. dniu życia u obydwu ras zwierząt wartości zbliżone, które w przypadku IgM wynosiły $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, a w przypadku IgA – $0,3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Do 14. dnia życia stężenie IgM i IgA utrzymywało się na stałym poziomie (Suh i in. 2003).

Kolejną grupą białek, których stężenie w osoczu krwi cieląt ulega zmianom wraz z ich wiekiem, są białka wiążące żelazo – transferryny i ferrytyny. Najmniejsze stężenie transferryny w osoczu krwi cieląt obserwowano bezpośrednio po ich urodzeniu ($7,35 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), następnie stężenie to istotnie się zwiększało, osiągając w 3. dniu życia wartość około $10,05 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, która utrzymywała się do 14. dnia życia (Abe i in. 1976). Odmienne obserwacje poczynili Knowles i in. (2000), którzy podają, że stężenie transferryny w pierwszych 3 dniach życia cieląt się zmniejsza, a następnie stopniowo rośnie, osiągając w 40. dniu życia wartość, jaką notowano w pierwszej dobie życia. Natomiast stężenie ferrytyny w osoczu krwi cieląt zmniejsza się wraz z ich wiekiem. Atyabi i in. (2006) wykazali, że stężenie ferrytyny w osoczu krwi cieląt bezpośrednio po urodzeniu wynosi średnio $32,93 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ i jest zbliżone do stężenia odnotowanego we krwi ich matek. W kolejnych dniach życia cieląt stężenie ferrytyny w osoczu krwi zmniejszało się, osiągając w 28. dniu wartość około $26,36 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Atyabi i in. 2006).

We wczesnym okresie pourodzeniowym w osoczu krwi cieląt obserwuje się istotne zmiany w stężeniu białek ostrej fazy (Orro i in. 2008). Białka ostrej fazy (BOF) produkowane są w wątrobie noworodka i stanowią „pierwszą linię obrony” organizmu (Orro i in. 2006).

Rolą tych białek jest ograniczanie wtórnego uszkodzenia tkanek w czasie stanu zapalnego, eliminacja produktów rozpadu tkanek, udział w procesie krzepnięcia krwi i fibrylizacji, wiązanie oraz transport żelaza i miedzi, a także modulacja odpowiedzi immunologicznej, między innymi przez aktywację układu dopełniacza i regulację aktywacji leukocytów (Białka ostrej fazy u zwierząt 2003).

Uważa się, że białka ostrej fazy umożliwiają szybszą adaptację młodego organizmu do środowiska pozamacicznego, ponieważ aktywują mechanizmy obronne noworodka. Jedną z przyczyn obserwowanych zmian stężenia BOF w osoczu krwi nowo narodzonych cieląt może być stres związany z porodem. Ponadto cytokiny (IL-1 β , IL-6, TNF- α) obecne w siewie są czynnikami stymulującymi hepatocyty do syntezy BOF (Orro i in. 2006, 2008).

Wśród wszystkich białek ostrej fazy największą dynamikę zmian stężenia w osoczu krwi cieląt obserwuje się w przypadku α_1 -kwaśnej glikoproteiny (AGP), surowiczego amyloidu A (SAA) oraz haptoglobiny (Hp). Największe stężenie AGP w osoczu krwi cieląt notuje się bezpośrednio po ich urodzeniu (około 1300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), następnie stężenie AGP w kolejnych 3 tygodniach życia zmniejsza się stopniowo do 900 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ w 7. dniu życia, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ w 21. dniu życia i ostatecznie stabilizuje się od 24. dnia życia na poziomie wynoszącym średnio 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, notowanym we krwi dorosłych osobników (Itoh i in. 1993; Orro i in. 2008). Orro i in. (2008) podają, że stężenie surowiczego amyloidu A w osoczu krwi cieląt zaraz po ich urodzeniu jest niewielkie i wynosi średnio 60 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Pojenie siałą wpływa na wzrost jego stężenia we krwi do wartości około 90 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ w 3. dniu życia cieląt oraz do wartości około 110 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ w 7. dniu życia. W kolejnych dniach życia ww. autorzy obserwowali stopniowe zmniejszanie się stężenia tego białka do wartości około 50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ w 14. dniu życia oraz 30 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ w 21. dniu życia, natomiast jego stabilizację – od 4. tygodnia życia (Orro i in. 2008). Niezależnie od wyjściowego stężenia haptoglobiny w osoczu krwi cieląt, mierzonego bezpośrednio po urodzeniu, obserwuje się wzrost stężenia Hp we krwi cieląt po ich pojeniu siałą (Knowles i in. 2000; Orro i in. 2008). Kolejny wzrost stężenia Hp notuje się na początku 2. tygodnia życia, po czym stężenie tego białka zmniejsza się i w ciągu kolejnych 11 tygodni życia utrzymuje się na niskim poziomie (Knowles i in. 2000; Orro i in. 2006, 2008).

1.7. Główne hormony regulujące czynność nerek cieląt w okresie postnatalnym

W okresie noworodkowym zmiany przystosowawcze do środowiska pozamacicznego dotyczą całego organizmu, w tym układu wydalniczego. Duża śmiertelność neonatalna obserwowana u cieląt jest związana między innymi z zaburzeniami homeostazy wodno-elektrolitowej, której głównym regulatorem są nerki. Rozwój nerek zapoczątkowany w okresie płodowym jest kontynuowany po urodzeniu, podobnie jak rozwój kontrolujących je układów. Z badań wielu autorów oraz z badań własnych wynika, że zmiany w funkcjonowaniu nerek oraz aktywności humoralnych czynników regulujących ich funkcję są najbardziej dynamiczne w pierwszym tygodniu życia cieląt (Dratwa 2006; Ożgo 2009).

Bilans wodno-elektrolitowy kontrolowany jest przez układ nerwowy oraz humoralny. Kluczową rolę w homeostazie płynów ustrojowych odgrywają hormony: przedsionkowy peptyd natriuretyczny, wazopresyna argininowa oraz aldosteron (Blaine 1990; Inoue i in. 2001; Rozansky 2006). Do zadań przedsionkowego peptydu natriuretycznego należy przede

wszystkim regulacja bilansu sodu i wody w organizmie oraz ciśnienia hydrostatycznego krwi (Dratwa 2002). Wazopresyna odgrywa główną rolę w utrzymaniu bilansu wody i ciśnienia osmotycznego krwi (Inoue i in. 2001). Natomiast aldosteron jest odpowiedzialny głównie za metabolizm sodu i potasu (Rozansky 2006).

W pierwszym tygodniu życia cieląt obserwuje się dynamiczne zmiany w czynności nerek, obserwowane jako wzrost: przepływu krwi i osocza przez czynny miąższ nerkowy, wielkości filtracji kłębkowej, sprawności resorpcyjnej i sekrecyjnej elektrolitów w kanalikach nerkowych oraz zdolności do zagęszczania moczu (Skrzypczak i Drzeżdżon 2001; Dratwa 2006; Ożgo 2009).

W regulacji czynności nerek cieląt istotną rolę odgrywają przedsionkowy peptyd natriuretyczny, wazopresyna oraz układ renina–angiotensyna–aldosteron (Dratwa 2006; Ożgo 2000, 2001 i 2009).

Stężenie przedsionkowego peptydu natriuretycznego w osoczu krwi cieląt w okresie pourodzeniowym waha się od 5,72 do 62,70 pmol·l⁻¹. Niektórzy autorzy (Amadiou-Farmakis i in. 1988; Takemura i in. 1994) obserwowali duże stężenie tego hormonu bezpośrednio po urodzeniu zwierząt (od 20 do 60 pmol·l⁻¹), a także jego zmniejszanie się wraz z wiekiem do średniej wartości wynoszącej 16,50 pmol·l⁻¹ w 3. dniu życia oraz 11,30 pmol·l⁻¹ w 10. dniu życia. Tulassay i in. (1987) sugerują, że ANP, obecny we krwi noworodków w pierwszej dobie ich życia, może być m.in. pochodzenia matczynego. Zaobserwowali niewielkie stężenie tego hormonu w osoczu krwi cieląt w pierwszej godzinie po urodzeniu, jego istotny wzrost w 3. dniu życia, a następnie nieznaczne zmniejszenie w kolejnych dniach pierwszego tygodnia życia (Tulassay i in. 1987). W badaniach własnych również wykazano małe stężenie ANP w osoczu krwi cieląt w pierwszym dniu życia, wynoszące średnio 5,72 pmol·l⁻¹, a także jego istotne zwiększenie w 2. dniu życia (9,39 pmol·l⁻¹) i w 3. dniu (10,28 pmol·l⁻¹) oraz dalszy stopniowy wzrost do 7. dnia życia (Dratwa 2006). Ożgo (2009) wykazała, że stężenie przedsionkowego peptydu natriuretycznego w osoczu krwi cieląt w 1. dniu życia było niewielkie (7,73 pmol·l⁻¹), istotnie zwiększyło się (do 12,12 pmol·l⁻¹) w 2. dniu życia, a następnie utrzymywało się w zakresie 11,41–14,37 pmol·l⁻¹ do końca 1. tygodnia życia.

Bezpośrednio po urodzeniu cieląt w osoczu ich krwi obserwuje się duże stężenie wazopresyny (Amadiou-Farmakis i in. 1988; Kati-Coulibaly i in. 1989; Ożgo 2000). Amadiou-Farmakis i in. (1988) największe stężenie tego hormonu obserwowali zaraz po urodzeniu zwierząt. Ponadto autorzy ci wykazali, że zmiany stężenia wazopresyny w kolejnych 3 tygodniach życia cieląt były skorelowane ze zmianami molalności osocza krwi. Ożgo (2000) również obserwowała wysokie stężenie wazopresyny w osoczu krwi cieląt bezpośrednio po ich urodzeniu (0,86 pg·ml⁻¹). W pierwszej dobie życia zwierząt stężenie tego hormonu w osoczu krwi zmniejszyło się do wartości 0,62 pg·ml⁻¹, a następnie wzrosło, osiągając wartość 0,92 pg·ml⁻¹ w 72. godzinie życia oraz 1,35 pg·ml⁻¹ w 7. dniu życia (Ożgo 2000). Zmniejszanie się stężenia wazopresyny w osoczu krwi cieląt w pierwszych godzinach po urodzeniu obserwowali również Kati-Coulibaly i in. (1989). Odnotowali oni wysokie stężenie AVP w osoczu krwi cieląt bezpośrednio po ich urodzeniu (20–30 pmol·l⁻¹) oraz istotne jego zmniejszenie w 8. godzinie życia (do poziomu 4–5 pmol·l⁻¹); w 10. dniu życia stężenie wazopresyny wynosiło 4 pmol·l⁻¹.



Ożgo (2009) wykazała, że stężenie aldosteronu w osoczu krwi cieląt w kolejnych dniach 1. tygodnia życia jest niskie i waha się w zakresie $18,87\text{--}30,62\text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Największą wartość autorka ta odnotowała w 1. dniu życia, a najmniejszą – w 2. dniu; niewielkie stężenie tego hormonu utrzymywało się również w 3. dniu życia ($19,12\text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Większe stężenie aldosteronu odnotowali Riad i in. (1986) – u 10-dniowych cieląt wynosiło ono $28,9\text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Itoh i in. (1985) odnotowali wysokie stężenie tego hormonu bezpośrednio po urodzeniu zwierząt (średnio $166,30\text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$) oraz wzrost stężenia w 14. godzinie życia do średniej wartości $173,60\text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, a następnie w 7. dniu życia zmniejszenie – do wartości $67,00\text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Safwate (1985) odnotował istotne zmniejszenie stężenia aldosteronu z wartości $150\text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bezpośrednio po urodzeniu cieląt do $50\text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ w 12. godzinie życia. W 48. i 72. godzinie po urodzeniu stężenie aldosteronu wynosiło $75\text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, po czym stopniowo obniżało się do $15\text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ w 7. dniu życia. W badaniach Amadiu i in. (1989) stężenie aldosteronu w osoczu krwi 4-dniowych cieląt wynosiło $60\text{--}70\text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

1.8. Hormonalna regulacja czynności nerek w zaburzeniach wodno-elektrolitowych

Nerki noworodków wykazują wiele odrębności – zarówno morfologicznych, jak i czynnościowych, w porównaniu z osobnikami dorosłymi, co sprawia, że „rezerwa” czynnościowa tego narządu jest bardzo niewielka. Ograniczone możliwości czynnościowe nerek cieląt oraz mniejsza, w porównaniu z nerkami osobników dorosłych, sprawność ich hormonalnej regulacji sprawiają, że stosunkowo łatwo dochodzi do zaburzeń równowagi wodno-elektrolitowej.

Podczas odwodnienia wzrasta ciśnienie osmotyczne krwi (Bahner i in. 2007). U cieląt w wieku 3–7 dni po wywołaniu biegunki odnotowano wzrost wartości hematokrytu z 28% do 37% (Walker i in. 1998). U cieląt z biegunkami w wieku od 1. do 30. dnia życia Ulutas i Sahal (2005) obserwowali zmniejszenie frakcji wydalonego sodu ($\text{FE}_{\text{Na}} = 0,16\%$) i potasu ($\text{FE}_{\text{K}} = 15,07\%$) z moczem, w porównaniu z frakcją u zdrowych cieląt ($\text{FE}_{\text{Na}} = 0,39\%$, $\text{FE}_{\text{K}} = 29,26\%$).

Utrata soli i wywołane przez nią odwodnienie organizmu stymuluje system hormonalny regulujący bilans wodno-elektrolitowy. Hayashi i in. (2006) wykazali, że u zwierząt odwodnionych głównym czynnikiem pobudzającym uwalnianie wazopresyny jest zmniejszenie objętości krążącej krwi; mniejszy wpływ ma wzrost ciśnienia osmotycznego osocza krwi. Napojenie wodą zwierząt wcześniej odwodnionych przyczynia się do zahamowania sekrecji wazopresyny (Stricker i Hoffmann 2005). U zwierząt, którym ograniczono dostęp do wody, zaobserwowano zmniejszenie objętości osocza krwi i jej ciśnienia hydrostatycznego, wzrost ciśnienia osmotycznego moczu oraz zwiększenie we krwi stężenia hormonów układu RAA zaangażowanych w zatrzymywanie wody i elektrolitów w ustroju (Salas i in. 2004). Wykazano również, że u zwierząt odwodnionych wzrasta stężenie angiotensyny II i wazopresyny oraz obniża się stężenie ANP w osoczu krwi (Bahner i in. 2007). Kierunek działania angiotensyny II i wazopresyny jest zbieżny, a ponadto angiotensyna II stymuluje sekrecję wazopresyny (Coleman i in. 2009). Zmniejszenie stężenia ANP we krwi odwodnionych zwierząt ma na celu ograniczenie utraty wody i elektrolitów z moczem. Wykazano bowiem, że przedsionkowy peptyd natriuretyczny, oprócz tego, że hamuje sekrecję wazopresyny i angiotensyny II, ogranicza wbudowywanie AQP2 (z udziałem której AVP zwiększa wchłanianie zwrotne

wody w kanalikach nerkowych) w błonę komórkową kanalików zbiorczych nerek (Klokkers i in. 2009; Patel 2009). W badaniach Safwate i in. (1991) wykazano 10–15 razy większą aktywność reninową osocza, a także większe stężenie aldosteronu i wazopresyny argininowej w osoczu krwi cieląt z biegunkami, w porównaniu ze stężeniem u zdrowych cieląt.

1.9. Zmiany parametrów krwi cieląt podczas zaburzeń wodno-elektrolitowych

U nowo narodzonych cieląt procesom adaptacji, wzrostu i dojrzewania towarzyszą nasilenie zachorowań i znaczna śmiertelność, w przypadku której największy udział przypisuje się zaburzeniom wodno-elektrolitowym na skutek utraty wody i elektrolitów zarówno drogą nerkową, jak i pozanerkową. Szacuje się, że utrata wody i elektrolitów podczas ostrych biegunek stanowi w Polsce 50% przyczyn upadków cieląt w pierwszych 3 tygodniach ich życia (Wernicki 1996). Przyczyną biegunek mogą być czynniki niezakaźne (np. niewłaściwa higiena zwierząt, nadmierna podaż mleka lub preparatu mlekozastępczego) oraz zakaźne (np. rotawirusy, koronawirusy, enterotoksyczne szczepy *E. coli*) – Quigley i in. (2006), Dratwa-Chałupnik i in. (2012). Gromadzenie się w przewodzie pokarmowym niestrawionej laktozy jest istotnym czynnikiem sprzyjającym utracie wody i elektrolitów wraz z kałem.

W zależności od wieku cieląt oraz od stopnia odwodnienia podczas utraty wody i elektrolitów poprzez układ pokarmowy obserwuje się wiele zmian w stężeniu elektrolitów w osoczu krwi. U cieląt 3–7-dniowych z wywołaną biegunką Walker i in. (1998) nie obserwowali zmian w stężeniu sodu w surowicy krwi, natomiast obserwowali wzrost stężenia potasu i zmniejszenie stężenia chlorków. Również u dwutygodniowych cieląt z biegunkami Seifi i in. (2006) nie obserwowali zmian stężenia sodu, natomiast wykazali istotnie większe stężenie potasu oraz znacznie mniejsze stężenie chlorków w surowicy krwi, w porównaniu ze stężeniami u zwierząt zdrowych. Dopiero w późniejszym okresie życia obserwowano zmiany stężenia sodu w osoczu krwi cieląt z biegunkami (Lorenz i in. 1998; Guzelbektes i in. 2007). U cieląt z biegunkami w wieku do 45. dnia życia Guzelbektes i in. (2007) wykazali zmniejszenie stężenia sodu oraz wzrost stężenia potasu w surowicy krwi, przy czym obserwowane zmiany stężenia obydwu elektrolitów dodatkowo korelowały ze stopniem odwodnienia zwierząt. Natomiast obniżenie stężenia chlorków we krwi autorzy ci zaobserwowali jedynie u osobników bardzo odwodnionych. Roussel (1992) zauważa, że wzrost stężenia potasu we krwi cieląt podczas biegunek jest wynikiem przemieszczenia się tego pierwiastka z płynu wewnątrzkomórkowego do płynu zewnątrzkomórkowego w odpowiedzi na kwasicę metaboliczną, która powstaje w wyniku jelitowej utraty węglowodanów oraz żołądkowej lub jelitowej fermentacji laktozy i glukozy do mleczanów. W odpowiedzi na kwasicę zostaje uruchomiona pompa wodorowo-potasowa, która powoduje transport potasu przez błonę komórkową do krwi.

We krwi cieląt mających biegunki obserwuje się zmiany w stężeniu mikro- i makroelementów we krwi istotnych dla właściwego funkcjonowania rozwijającego się organizmu. Tajik i in. (2013) u cieląt z biegunkami wykazali hipokalcemię; średnie stężenie wapnia w surowicy krwi tych zwierząt wynosiło $1,297 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Ponadto zaobserwowano u zwierząt z krwawą biegunką znacznie wyższe stężenie wapnia we krwi niż u cieląt z biegunką bez krwi w kale. U cieląt 3–7-dniowych z biegunkami zmniejszeniu stężenia wapnia zjonizowanego w osoczu krwi towarzyszyła hiperfosfatemia (Walker i in. 1998). Guzelbektes i in. (2007)

wykazali, że stężenie fosforu w surowicy krwi zwiększa się wraz ze stopniem odwodnienia organizmu cieląt. Nie obserwowano natomiast statystycznie istotnych zmian w stężeniu magnezu w osoczu cieląt z objawami biegunki (Michell i in. 1992; Tajik i in. 2013). Ranjan i in. (2006) u cieląt z biegunkami, w wieku od 15. do 30. dnia życia, zaobserwowali istotnie niższe stężenie cynku oraz istotnie wyższe stężenie miedzi we krwi niż we krwi cieląt zdrowych. Odnotowane przez Tajikiego i in. (2013) stężenie żelaza u cieląt mających biegunki było mniejsze niż odnotowane przez Mohriego i in. (2007) u zdrowych zwierząt.

U cieląt z biegunkami obserwowano zmiany stężenia różnych związków biochemicznych w osoczu (surowicy) krwi. U dwutygodniowych cieląt mających biegunki Seifi i in. (2006) obserwowali istotnie większe stężenie azotu mocznikowego i znacznie mniejsze stężenie glukozy w surowicy krwi niż w surowicy krwi zwierząt zdrowych. Guzelbektes i in. (2007) u cieląt z biegunkami wraz ze wzrostem stopnia odwodnienia organizmu stwierdzili wzrost stężenia mocznika i glukozy w osoczu krwi. Ponadto w osoczu krwi cieląt odwodnionych na skutek biegunki odnotowano wysokie stężenie kreatyniny (Walker i in. 1998; Seifi i in. 2006).

Podczas biegunek następują również zmiany profilu białkowego krwi. U cieląt mających biegunki wykazano, między innymi, większe stężenie białka całkowitego i albumin oraz mniejsze stężenie globulin w surowicy krwi niż w surowicy krwi zwierząt zdrowych (Walker i in. 1998; Seifi i in. 2006; Guzelbektes i in. 2007).

1.10. Czynniki doświadczalny – laktoza

Laktoza jest disacharydem, który stanowi 95% węglowodanów mleka krowiego. Przewód pokarmowy ssących cieląt ma ograniczone możliwości trawienia innych węglowodanów, poza laktozą, dlatego głównymi cukrami stosowanymi w preparatach mlekozastępczych są właśnie laktoza i glukoza.

U cieląt aktywność laktazy jest największa w proksymalnym odcinku jelita cienkiego (Toofanian i in. 1973). Badania Coombe i Smith (1973) na cielętach wykazały, że hydroliza laktozy następuje dużo wcześniej niż resorpcja składowych tego dwucukru. Po pobraniu przez cielęta laktozy produkty jej rozpadu – glukoza i galaktoza gromadzą się w proksymalnym odcinku jelita cienkiego. Oba cukry proste są sprawnie wchłaniane podczas ich pasażu przez całe jelito cienkie. Przy czym w proksymalnym odcinku jelita cienkiego wchłanianie galaktozy, przy dużym stężeniu glukozy, jest osłabione. Natomiast w dystalnym odcinku jelita cienkiego, przy zmniejszonej koncentracji glukozy, następuje intensywne wchłanianie galaktozy.

Zdolność trawienia laktozy przez cielęta zależy od aktywności laktazy, która zmniejsza się wraz z wiekiem. W pierwszych 3 dniach życia cieląt średnia aktywność laktazy w śluzówce jelita czczego jest największa – wynosi średnio 180 IU, po czym istotnie zmniejsza się w 5. dniu życia, osiągając wartość ok. 100 IU, natomiast od 7. do 21. dnia życia utrzymuje się na względnie stałym poziomie – w przedziale od 40 do 80 IU (St. Jean i in. 1991).

Wykazano, że ze względu na właściwości osmotyczne laktozy przekroczenie 55% jej udziału w preparacie mlekozastępczym istotnie zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia biegunki u cieląt (Górka i Kowalski 2007). Ponadto próg nerkowy dla glukozy u noworodków jest niższy, co może doprowadzić do diurezy osmotycznej, z następczą utratą wody i elektrolitów drogą nerkową. Straty wody i elektrolitów, zarówno drogą pokarmową, jak i drogą

nerkową, przyczyniają się do odwodnienia organizmu noworodka i zaburzenia równowagi wodno-elektrolitowej, która jest główną przyczyną dużej śmiertelności obserwowanej w pierwszym miesiącu życia cieląt.

U cieląt, podobnie jak u noworodków ludzkich, wykazano przypadki nietolerancji laktozy, która była przyczyną obserwowanej u tych zwierząt biegunki (Olchowy i in. 1993).

Keller i in. (1998) stwierdzili, że podaż 40 g laktozy bezpośrednio po urodzeniu cieląt zwiększa stężenie glukozy we krwi, które utrzymuje się przez 29 godzin. Nappert i in. (1993) u ssących cieląt z biegunkami wywołanymi przez czynniki zakaźne obserwowali stopniową absorpcję glukozy po podaniu laktozy; u osobników zdrowych po godzinie od podania laktozy wzrost stężenia glukozy w osoczu krwi był wyraźniejszy. Mimo to średnia glikemia po podaniu laktozy była zbliżona w obu grupach. W kolejnych 6 godzinach życia cieląt stężenie glukozy w osoczu krwi w obydwu grupach stopniowo się zmniejszało, przy czym w grupie cieląt z biegunkami było nieznacznie większe od odnotowanego w grupie zdrowych cieląt.

Cielęta, którym od 1. do 16. tygodnia życia podawano preparat mlekozastępczy z 1,5 raza większą zawartością laktozy, niż w przypadku cieląt z grupy kontrolnej, charakteryzowały się pod koniec doświadczenia mniejszą masą ciała (Hugi i in. 1997). Również pod koniec doświadczenia stężenie mocznika w osoczu krwi cieląt, które otrzymywały więcej laktozy, było mniejsze niż w grupie kontrolnej. Ponadto cielęta żywione preparatem mlekozastępczym ze zwiększoną ilością laktozy charakteryzowały się zwiększoną poposiłkową hiperglikemią. Nie obserwowano natomiast pomiędzy obiema grupami cieląt różnic w stężeniu żelaza i hemoglobiny oraz insuliny, glukozozależnego peptydu insulinotropowego, kortyzolu, insulinopodobnego czynnika wzrostu I oraz hormonu wzrostu w osoczu krwi.

2. CEL PRACY

U nowo narodzonych cieląt procesom adaptacji, wzrostu i dojrzewania towarzyszy nasilenie zachorowań i znaczna śmiertelność, w której największy udział przypisuje się zaburzeniom wodno-elektrolitowym. W Polsce szacuje się, że utrata wody i elektrolitów podczas ostrych biegunk jest przyczyną połowy upadków cieląt w pierwszych 3 tygodniach życia.

Większość autorów opisuje zmiany we wskaźnikach hematologicznych oraz biochemicznych krwi i moczu u cieląt z biegunkami wywołanymi przez czynniki zakaźne. Wśród czynników niezakaźnych, będących przyczyną utraty wody i elektrolitów drogą pokarmową, wymienia się błędy żywieniowe wynikające m.in. z nadmiernej podaży mleka lub preparatu mlekozastępczego. Powoduje to nagromadzenie się w przewodzie pokarmowych niestrawionej laktozy będącej istotnym czynnikiem sprzyjającym utracie wody i elektrolitów wraz z kałem.

Metody badawcze, stosowane dotychczas w ocenie zmian procesów fizjologicznych i ich zaburzeń, opierały się na analizie biochemicznej krwi i moczu. Wykorzystanie w prezentowanych badaniach metod proteomicznych umożliwi dokładniejsze poznanie przebiegu procesów metabolicznych, mechanizmów regulacji ekspresji białek na poziomie translacji. Ponadto połączenie technik proteomicznych z analizą parametrów biochemicznych osocza krwi i moczu umożliwi poznanie mechanizmów reakcji organizmu cieląt na dodawanie laktozy do preparatu mlekozastępczego. Metody proteomiczne mogą być stosowane np. w diagnostyce zaburzeń wodno-elektrolitowych i przyczynić się do wskazania kierunków działań prewencyjnych i profilaktycznych podczas chowu nowo narodzonych cieląt.

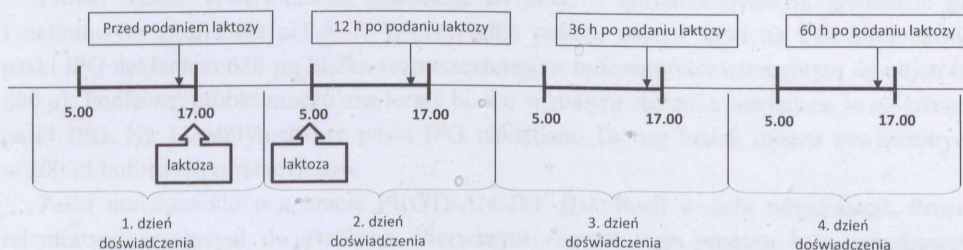
W związku z powyższym podjęto badania mające na celu:

- a) identyfikację różnic w profilach białkowych osocza krwi oraz moczu cieląt przed krótkotrwałym dodawaniem laktozy do preparatu mlekozastępczego i po jej dodawaniu oraz odniesienie różnic w ekspresji białek do procesów fizjologicznych, w które białka te są zaangażowane;
- b) ocenę udziału przedsionkowego peptydu natriuretycznego (ANP), aldosteronu (ALDO) i wazopresyny (AVP) w regulacji bilansu wodno-elektrolitowego przed podaniem preparatu mlekozastępczego z laktozą i po jego podaniu;
- c) analizę stężeń wybranych parametrów biochemicznych krwi (ANP, ALDO, AVP, białka całkowitego, albuminy, Na^+ , K^+ , Cl^- , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , P_i , Mg^{+2} , Ca^{+2} , glukozy, mocznika, kreatyniny) przed zastosowaniem diety z dodatkiem laktozy i po jej zastosowaniu;
- d) poszukiwanie u tygodniowych cieląt po zastosowaniu dodatku laktozy ewentualnych zależności pomiędzy białkami osocza krwi i moczu wykazujących zmiany w ekspresji a wybranymi wskaźnikami biochemicznymi osocza krwi.

3. MATERIAŁ

Badania przeprowadzono na 8 cielętach – buhajkach rasy polskiej holsztyno-fryzyjskiej odmiany czarno-białej, w wieku od 6. do 9. dnia życia. Prezentowane badania na zwierzętach posiadały zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach (nr 3/2010 z dnia 14.01.2010 roku)¹. Zwierzęta przebywały w ujednoliconych kontrolowanych warunkach środowiskowych, podczas doświadczenia nie wykazywały żadnych symptomów choroby. Masa ciała cieląt w 6. dniu życia wynosiła średnio 38 kg.

Od 1. do 3. dnia życia cielęta otrzymywały siarę, a od 4. dnia życia – preparat mlekozastępczy w ilości 10% masy ciała (zgodnie z masą ciała, jaką miały w danym dniu życia) na dzień. Zwierzęta żywione były preparatem mlekozastępczym (Mlekovit Imupro[®]) o składzie: 23% białka surowego, 16% tłuszczu surowego, 0,1% włókna surowego, 45% laktozy, 7,5% popiołu surowego, 1,7% lizyny, 0,42% metioniny, 0,9% wapnia i 0,7% fosforu. Cielęta karmione były dwukrotnie – około godziny 5.00 i godziny 17.00. W trakcie doświadczenia dzienna dawka preparatu mlekozastępczego była wyliczana dla każdego osobnika osobno, w przeliczeniu na masę ciała, jaką miał pierwszego dnia doświadczenia. W 6. dniu życia (podczas wieczornego karmienia) oraz w 7. dniu życia (podczas porannego karmienia) do preparatu mlekozastępczego dodano laktozę jednowodną (Pharma Cosmetic) w ilości 1 g·kg⁻¹ masy ciała (ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat doświadczenia. Laktozę do preparatu mlekozastępczego dodawano o godzinie 17.00 (pierwszego dnia doświadczenia) i 5.00 (drugiego dnia doświadczenia) – strzałki wskazują jednorazową zbiórkę krwi i moczu przed podaniem pierwszej dawki laktozy i w 12., 36. oraz 60. godzinie po podaniu drugiej dawki laktozy

Krew i mocz do badań pobierano jednorazowo – zawsze przed wieczornym karmieniem zwierząt. Krew pobierana była z żyły szyjnej zewnętrznej do probówek zawierających jako antykoagulant K₂EDTA lub heparynę. Bezpośrednio po pobraniu krew była odwirowywana przy 3000 obr·min⁻¹, w temperaturze 4°C, przez 15 min. W uzyskanym osoczu określono wielkość ciśnienia osmotycznego. Pozostałe osocze krwi zamrożono w temperaturze –80°C do czasu wykonania analiz. Zbiórka moczu trwała 3 godziny poprzedzające wieczorne karmienie. Zebrany mocz wymieszano i zlało do probówek (o objętości 50 ml), natychmiast odwirowano przy 3000 obr·min⁻¹, w temperaturze 4°C, przez 15 min. Mocz do analiz proteomicznych zagęszczono przy użyciu filtrów AmiconUltra (Millipore), z punktem odcięcia 3 kDa. Zagęszczony mocz umieszczono w temperaturze –80°C do czasu wykonania analiz.

¹ Badania wykonano w ramach projektu badawczego MNiSW (grant nr N N311 016239).

4. METODY

Przygotowanie prób osocza krwi

Przed przystąpieniem do dwukierunkowego rozdziału białek osocza krwi w badanych próbach ograniczano obecność białek wysokokopijnych za pomocą zestawu ProteoMiner™, Enrichment Kits, firmy Bio-Rad, według instrukcji producenta.

Przygotowanie prób moczu

W celu dwukierunkowego rozdziału białek badane próby moczu poddawano odsalaniu oraz oczyszczaniu za pomocą zestawu ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad), według instrukcji producenta.

Elektroforeza dwukierunkowa

W przygotowanych, według powyższego opisu, próbach płynów ustrojowych oznaczono stężenie białka całkowitego, używając zestawu analitycznego Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad). Po określeniu stężenia białka próby zmieszano z buforem rehydratacyjnym o następującym składzie: mocznik (54% w/v), CHAPS (4% w/v), dithiotreitol (1,54% w/v), amfolit (0,2% v/v), o pH 3–10, oraz błękit bromofenolu w niewielkiej ilości.

Próbki osocza krwi i moczu nakładano na paski o immobilizowanym gradiencie pH i nieliniowym gradiencie pH 4–7. W przypadku próbek osocza krwi na 24-centymetrowe paski IPG nakładano 650 µg białka rozpuszczonego z buforem rehydratacyjnym do objętości 800 µl. Ponieważ próbki moczu zawierały białko w małym stężeniu, nakładano je na krótsze paski IPG. Na 11-centymetrowe paski IPG nakładano 100 µg białek moczu zawieszonych w 200 µl buforu rehydratacyjnego.

Paski umieszczono w aparacie PROTEAN IEF (Bio-Rad) w celu rehydratacji. Proces rehydratacji przebiegał dwuetapowo. Pierwszym etapem tego procesu była rehydratacja pasywna, która trwała 7 godzin, w temperaturze 20°C, bez udziału napięcia. Drugim etapem była rehydratacja aktywna, która trwała 12 godzin (20°C, 50V).

Po zakończonym procesie rehydratacji paski IPG poddano procesowi ogniskowania izoelektrycznego w temperaturze 20°C, przy zmiennym napięciu elektrycznym – w przypadku prób:

- osocza krwi: 250 V przez 300 Vh, 500 V przez 850 Vh, 1000 V przez 1500 Vh przy liniowym wzroście do 5000 V przez 2 godziny i 30 min, 5000 V przez 90 000 Vh;
- moczu: 250 V przez 250 Vh, 500 V przez 500 Vh, 1000 V przez 750 Vh, przy liniowym wzroście do 3000 V przez godzinę i 30 min, 3000 Vh przez 35 000 V.

Rozdzielone w pierwszym wymiarze białka poddano dwuetapowemu procesowi równoważenia, co miało na celu nadanie białkom ujemnego ładunku oraz utrzymanie ich w stanie zdenaturowanym. W pierwszym etapie paski inkubowane były przez 15 min w buforze składającym się z: mocznika (36% w/v), 0,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl (3,4% v/v) o pH 6,8, 10% roztworu SDS (20% v/v), glicerolu (30% v/v) oraz DTT (1% w/v). W drugim etapie paski były inkubowane przez 20 min w buforze składającym się z: mocznika (36% w/v), 0,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl (3,4% v/v) o pH 6,8, 10% roztworu SDS (20% v/v), glicerolu (30% v/v) oraz jodoacetamidu (2,5% w/v).

Po zakończonym procesie równoważenia paski umieszczono na szczycie 12-procentowych żeli poliakrylamidowych. Żele wykonywano w kasetach do jednoczesnego wylewania 12 żeli (PROTEAN Plus Multi-Casting Chamber firmy Bio-Rad). W celu określenia masy molekularnej rozdzielonych białek zastosowano marker mas molekularnych Precision Plus Protein™ Standard Plugs (Bio-Rad). Następnie paski umocowano do 12-procentowych żeli poliakrylamidowych za pomocą 0,5-procentowego żelu agarozowego zabarwionego niewielką ilością błękitu bromofenolu.

Żele umieszczono w aparacie PROTEAN Plus Dodeca Cell (Bio-Rad) wypełnionym buforem migracyjnym o temperaturze 10°C i o składzie: 25 mM Trizma Base, 192 mM glicyny, SDS (0,1% w/v). Następnie przeprowadzono rozdział białek ze względu na ich masę molekularną wg parametrów: 40 V w czasie 2,5 godziny w przypadku osocza krwi oraz 1,5 godziny w przypadku próbek moczu, a następnie 100 V przez 17 godzin w przypadku osocza krwi oraz 13 godzin w przypadku próbek moczu.

Barwienie żeli 2D

Po zakończonym dwukierunkowym rozdziale białek żele wybarwiono błękitem Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250), według zmodyfikowanej metody Kanga (Pink i in. 2010), w komorze do barwienia 12 wielkoformatowych żeli Dodeca™ Stainer large (Bio-Rad).

Barwienie błękitem Coomassie przebiegało w 5 etapach. Pierwszym z nich było trzykrotne płukanie każdego żelu w wodzie destylowanej przez 5 min. Kolejnym etapem było utrwalanie żeli przez 12 godzin w buforze składającym się z: alkoholu etylowego (50%), kwasu fosforowego (2%) oraz wody destylowanej. Następnie żele barwiono w buforze składającym się z: siarczanu glinu (5% w/v), alkoholu etylowego (10%), 5% Coomassie brilliant blue G-250 (0,02% w/v), kwasu fosforowego (10%) oraz wody destylowanej. Po 12 godzinach żele odbarwiano przez godzinę w buforze składającym się z: alkoholu etylowego (10%), kwasu fosforowego (2%) oraz wody destylowanej. Po tym czasie żele płukano wodą destylowaną przez 12 godzin.

Wybarwione żele zarchiwizowano za pomocą kalibrowanego densytometru laserowego GS-800 Imaging Densitometer (Bio-Rad).

Analiza bioinformatyczna żeli

Zarchiwizowane żele poddano ilościowej i jakościowej analizie bioinformatycznej, używając specjalistycznego oprogramowania komputerowego PDQuest 8.0.1 Advanced (Bio-Rad). W pierwszym etapie analizy dokonano obrócenia, wyrównania oraz wycięcia analizowanego fragmentu żelu. Następnie żele podzielono na 2 grupy obrazujące próby przed podaniem laktozy i po jej podaniu. W drugim etapie porównano różnice w ekspresji spotów białkowych oraz określono obecność lub brak spotów na zarchiwizowanych żelach. Dokonano pomiaru wielkości spotów białkowych na podstawie sumy wartości pikseli w obrębie zdefiniowanego obszaru znormalizowanego spotu białkowego. Normalizacji spotów dokonano przy użyciu modelu lokalnej analizy regresji, która pozwoliła na skorygowanie różnic w wybarwieniu poszczególnych spotów białkowych niebędących wynikiem różnic w ich ekspresji, a mogących wynikać z błędów analitycznych. W ostatnim etapie przeprowadzono

statystyczną analizę różnic w ekspresji poszczególnych spotów białkowych z wykorzystaniem testu T-Studenta zintegrowanego z programem PDQuest 8.0.1 Advanced.

Spektrometria mas

Spoty białkowe identyfikowane były za pomocą spektrometrii mas typu MALDI-TOF. Przygotowanie spotów białkowych do identyfikacji odbywa się w 6 etapach. Pierwszym z nich jest wycięcie spotów białkowych z 12-procentowego żelu poliakrylamidowego.

Wycięte spoty podlegały w kolejnym etapie dekoloryzacji. W tym celu inkubowano je przez 20 min w buforze składającym się z: 25 mM dwuwęglanu amonu (95% w/v) oraz acetonitrylu (5% v/v). Następnie spoty białkowe dwukrotnie płukano przez 20 min w buforze składającym się z: 25 mM dwuwęglanu amonu (50% w/v) oraz acetonitrylu (50% v/v).

Trzecim etapem była dehydratacja spotów białkowych, która odbywała się w sonifikatorze przez 10 min i polegała na inkubacji spotów białkowych w acetonitrylu (100%). Po tym czasie acetonitryl usunięto, a jego pozostałość odparowywano za pomocą systemu Concentrator 5301 (Eppendorf).

W kolejnym etapie dokonano hydrolizy białek trypsyną (Promega) w ilości od 100 do 400 ng, w zależności od wielkości spotu białkowego. Roztwór trypsyny przygotowywano, rozpuszczając zliofilizowaną trypsynę w dwuwęglanie amonu – 40 mM (w/v). Spoty białkowe inkubowano z roztworem trypsyny w temperaturze 37°C przez minimum 5 godzin. Po tym czasie próby wirowano z prędkością 3000 obr·min⁻¹ w czasie minuty.

W celu ekstrakcji peptydów każdą z prób wymieszano dokładnie z 10 µl acetonitrylu (100%), po czym inkubowano w temperaturze 37°C przez 15 min. Następnym krokiem było przygotowanie matrycy o składzie: 5 mg·ml⁻¹ α-CHCA (kwas α-cyjano-4-hydroksycynamonowy), kwas trifluorooctowy (0,1% v/v), acetonitryl (50% v/v). Tak przygotowaną mieszaninę wirowano z prędkością 3000 obr·min⁻¹ przez 2 min.

Następnie 1 µl próby wymieszano z 1 µl matrycy na płytce MSP AnchorChip 600/96 (Bruker Daltonics). Na powierzchni płytki próba ulegała krystalizacji, po czym poddawana była jonizacji oraz detekcji w spektrometrze mas MicroflexTM MALDI-TOF (Bruker Daltonics), w trybie z odbiciem. Na płytkę naniesiono również kalibrant – Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics), który stanowił mieszaninę peptydów w zakresie masy molekularnej 700–4000 Da. Przygotowano go do nałożenia, mieszając 5 µl kalibrantu z 50 µl matrycy α-CHCA.

W celu wygenerowania mapy peptydowej poszczególnych białek na podstawie liczb będących stosunkiem ich mas cząsteczkowych do ładunku (m/z), a tym samym w celu uzyskania widm masowych wykorzystano specjalistyczne oprogramowanie komputerowe flexControl oraz flexAnalysis. Tak utworzone listy m/z porównywano z zapisanymi masami cząsteczkowymi w bazie danych NCBI lub SWISS-PROT za pomocą wyszukiwarki MASCOT. Analizę widm przeprowadzono, zaznaczając w tym programie następujące opcje: trypsynę jako enzym fragmentujący łańcuch polipeptydowy, karbamidometylację cysteiny, oksydację metioniny, tolerancję różnicy mas wynoszącą 150 ppm, jedno opuszczone miejsce cięcia. W wyniku tego uzyskano wartość punktową odzwierciedlającą wiarygodność identyfikacji, procent pokrycia odnalezionych fragmentów sekwencji aminokwasowych dla

analizowanych białek, liczby fragmentów dopasowanych do sekwencji aminokwasowej białka. Na tej podstawie dokonano identyfikacji analizowanych białek.

Oznaczanie koncentracji hormonów

Stężenie przedsionkowego peptydu natriuretycznego oznaczono metodą radioimmunologiczną ze znakowanym ^{125}J ANP (zestaw ANP, alpha 1-28, firmy Phoenix Pharmaceuticals Inc. USA). Krzywa standardowa mieściła się w zakresie 10–1280 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Całkowitą radioaktywność mierzono licznikiem promieniowania gamma (Wizard 5) firmy HVD Vertriebs.

Stężenie wazopresyny oznaczono metodą radioimmunologiczną ze znakowanym ^{125}J AVP (zestaw Vasopressin AVP [Arg8] firmy Phoenix Pharmaceuticals Inc. USA). Krzywa standardowa mieściła się w zakresie 10–1280 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Całkowitą radioaktywność mierzono licznikiem promieniowania gamma (Wizard 5) firmy HVD Vertriebs.

Stężenie aldosteronu oznaczono, używając zestawu Aldosterone ELISA, firmy Labor Diagnostika Nord, Niemcy. Krzywa standardowa mieściła się w zakresie 0–1000 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Analizy stężeń hormonów wykonano w laboratorium Katedry Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie.

Oznaczanie biochemiczne osocza krwi

Pierwiastki w osoczu krwi oznaczano metodą spektrometrii emisyjnej, ze wzbudzeniem w indukcyjnie sprzężonej plazmie argonowej (ICP-OES), za pomocą aparatu Optima 2000 DV (Perkin Elmer). Ze względu na możliwość uzyskania niejednorodności próbek mocznik mineralizowano w systemie mikrofalowym Microwave (Anton Paar). Próbkę o objętości 1 ml przenoszono do ciśnieniowych naczyń kwarcowych, do których następnie dodawano 2,0 ml 65-procentowego HNO_3 i 0,25 ml 30-procentowego H_2O_2 . Po zamknięciu uszczelnieniami teflonowymi naczynia umieszczano w piecu mikrofalowym, wyposażonym w układ stałej kontroli temperatury i ciśnienia w każdym z naczyń kwarcowych. Mineralizację prowadzono według integralnej procedury proponowanej przez producenta sprzętu: 0–5 min – gradient mocy, od 100 do 600 W, 6–10 min – 600 W (izoenergetycznie), 11–20 min – 1000 W lub mniej w przypadku osiągnięcia wartości granicznych bezpiecznej pracy aparatu (75 MPa lub 300°C), 21–35 min – schładzanie.

Schłodzony mineralizat rozcieńczano do objętości końcowej wynoszącej 10 ml. W tak przygotowanych roztworach oznaczano: sód, potas, fosfor, wapń, magnez, cynk, miedź oraz żelazo. Wzorzec macierzysty stanowił certyfikowany standard wielopierwiastkowy ICP Multielement Standard IV (Merck). Roztwory wzorców roboczych uzupełniano, dodając kwas azotowy, który był wykorzystywany do mineralizacji, w takiej ilości, jaka pozostawała w próbkach po mineralizacji. Dążąc do zminimalizowania możliwych interferencji typu fizycznego w plazmie argonowej, analizy wykonywano metodą wzorca wewnętrznego, poprzez wprowadzanie itru (Y) do roztworów próbek oraz wzorców, do uzyskania stężenia 0,5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Wszystkie pomiary intensywności emitowanego promieniowania wykonywano, wybierając dłuższą, aksjalną (osiową), drogę optyczną w spektrometrze.

W osoczu krwi stężenie chlorków oznaczono metodą potencjometryczną, przy użyciu Chlorimetru 50cl (Trident), oraz wielkość ciśnienia osmotycznego, metodą krioskopową, przy użyciu osmometru firmy Knauer.

Ponadto w próbkach osocza krwi oznaczono stężenia:

- kreatyniny – metodą kinetyczną bez odbiałczania, używając zestawu odczynnikowego firmy BioMaxima;
- mocznika – kinetyczną metodą enzymatyczną z ureazą i dehydrogenazą glutaminianową, używając zestawu odczynnikowego firmy BioMaxima;
- glukozy – metodą kinetyczną bez odbiałczania, używając zestawu odczynnikowego firmy BioMaxima;
- albuminy – metodą punktu końcowego z zielenią bromokrezolową, używając zestawu odczynnikowego firmy BioMaxima.

Oznaczono również stężenie białka całkowitego zmodyfikowaną metodą Bradforda, z wykorzystaniem zestawu odczynnikowego Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad), używając spektrometru mikroplótkowego Power Wave XS firmy Bio-Tek Instruments.

Na podstawie szczegółowych wyników wskaźników biochemicznych obliczono wartości średnie i odchylenia standardowe. Na potrzeby oceny istotności różnic przeprowadzono analizę wariancji z powtarzanymi pomiarami, z użyciem testu Tukeya w programie Statistica 8.0TM.

5. WYNIKI

Podczas badań wykonano rozdział elektroforetyczny białek osocza krwi cieląt. Uzyskano 12 żeli 2-D odzwierciedlających profile białkowe osocza krwi cieląt przed podaniem pierwszej dawki laktozy i po 12 godzinach od dodania drugiej dawki laktozy do preparatu mlekozastępczego.

Zarchiwizowane żele poddano analizom bioinformatycznym za pomocą programu PDQuest 8.0 Advanced firmy BioRad. Łącznie analizom jakościowym i ilościowym poddano 600 spotów, wśród których 488 obecnych było na wszystkich analizowanych żelach obrazujących profile białkowe osocza krwi cieląt zarówno przed podaniem preparatu mlekozastępczego z dodatkiem laktozy, jak i po jego podaniu. Spośród nich 15 wykazywało statystycznie istotne różnice w ekspresji. Trzy spoty wykazywały zwiększoną ekspresję, natomiast pozostałych 12 – zmniejszoną. Spoty, które wykazywały różnice w ekspresji, reprezentowały 7 białek.

Przykładowy żel, na którym przedstawiono spoty białkowe różniące się ekspresją, zaprezentowano na ryc. 2. Na rycinie przedstawiono zakres pI (odpowiadający pH paska IPG 4–7), a także masę molekularną mieszczącą się w zakresie od 20 do 259 kDa. W tabeli 1 oraz na ryc. 3 podano szczegółowe informacje, dotyczące spotów białkowych różniących się względną ekspresją (względny poziom ekspresji), po przeanalizowaniu ich za pomocą oprogramowania PDQuest.

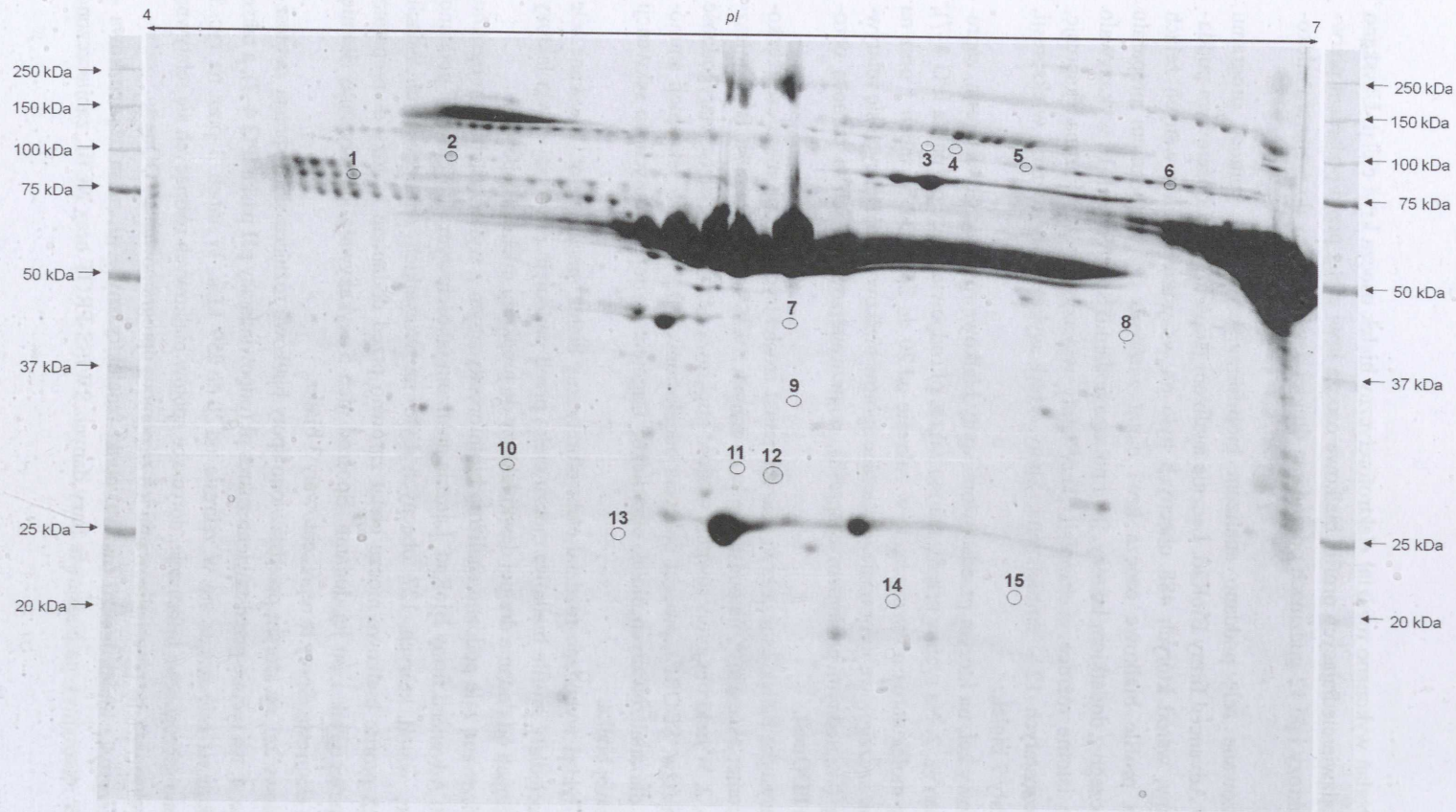
Charakterystykę białek osocza krwi (nazwa, punkt izoelektryczny – pI, masa cząsteczkowa – MW, numer akcesyjny), na podstawie bazy danych SWISS-PROT oraz NCBI, zamieszczono w tab. 2. Wyniki obejmują również wartość punktową odzwierciedlającą wiarygodność identyfikacji (tzw. SCORE), procent pokrycia odnalezionych fragmentów sekwencji aminokwasowych dla analizowanych białek oraz liczbę fragmentów dopasowanych do sekwencji aminokwasowej białka.

Podczas badań wykonano rozdział elektroforetyczny białek moczu cieląt. Uzyskane żele 2-D odzwierciedlały profile białkowe moczu cieląt przed podaniem pierwszej dawki laktozy i po 12 godzinach od dodania drugiej dawki laktozy do preparatu mlekozastępczego.

Zarchiwizowane żele poddano analizom bioinformatycznym z wykorzystaniem programu PDQuest 8.0 Advanced firmy BioRad. Łącznie analizom jakościowym i ilościowym poddano 420 spotów, wśród których 127 obecnych było na wszystkich analizowanych żelach obrazujących profile białkowe moczu cieląt zarówno przed dodaniem laktozy do preparatu mlekozastępczego, jak i po jej dodaniu. Spośród nich 5 wykazywało statystycznie istotnie zwiększoną ekspresję. Spoty te reprezentowały 3 białka.

Przykładowy żel, na którym przedstawiono spoty białkowe różniące się ekspresją zamieszczono na ryc. 4. Na rycinie przedstawiono zakres pI (odpowiadający pH paska IPG 4–7), a także masę molekularną mieszczącą się w zakresie od 20 do 259 kDa. W tabeli 3 oraz na ryc. 5 przedstawiono szczegółowe informacje, dotyczące spotów białkowych różniących się względną ekspresją, po przeanalizowaniu ich za pomocą oprogramowania PDQuest.

Charakterystykę białek moczu (nazwa, punkt izoelektryczny – pI, masa cząsteczkowa – MW, numer akcesyjny), na podstawie bazy danych SWISS-PROT oraz NCBI, zamieszczono w tab. 4.

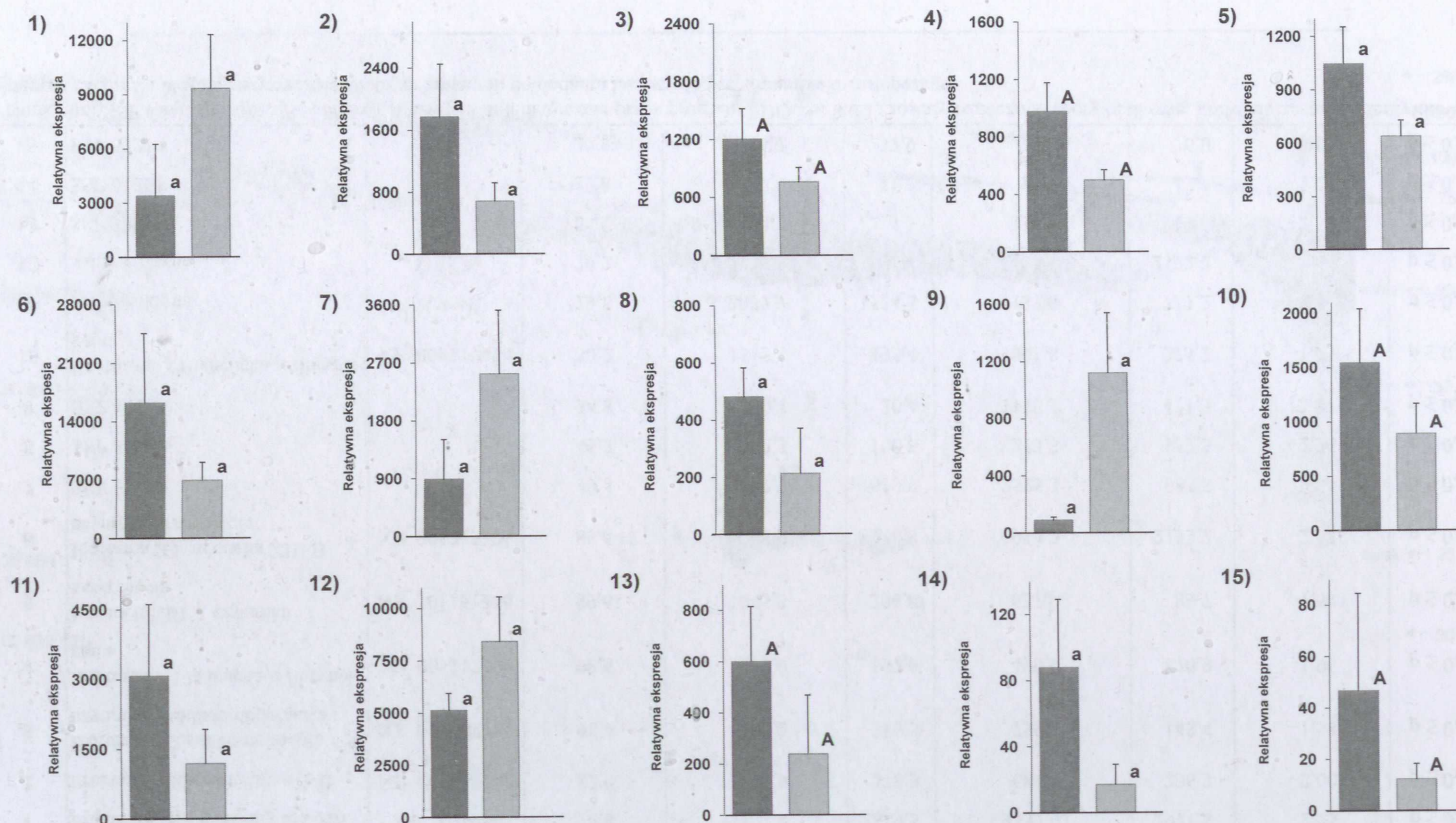


Ryc. 2. Mapa białkowa osocza krwi cieląt z zaznaczonymi białkami wykazującymi statystycznie istotne różnice w ekspresji. Prezentowany żel 2-D wybarwiono błękitem Commassie, na paski (o długości 24 cm) IPG o nieliniowym gradiencie pH 4-7 nałożono 650 μ g białka, rozdziel w drugim wymiarze dokonano na 12-procentowym żelu SDS-PADE. Numery spotów na żelu 2-D odpowiadają numerom spotów podanym w tab. 1 i 2 oraz na ryc. 3

Tabela 1. Lista białek osocza krwi cieląt wykazujących statystyczne różnice w ekspresji

Numer spotu	Nazwa białka	Numer akcesyjny białka	Oszacowana wartość MW [kDa]	Średnia relatywna ekspresja przed podaniem laktozy	SD	Średnia relatywna ekspresja po podaniu laktozy	SD	Krotność zmian ekspresji	Istotność różnic
1	Prekursor glikoproteiny α -2-HS	NP_776409	74,8	3392,4	2859,5	9337,9	2971,8	2,75	$p \leq 0,05$
2	Prekursor glikoproteiny α -1-B	NP_001039708	82,0	1771,9	678,3	681,4	236,3	-2,60	$p \leq 0,05$
3	Izoforma X2 subkomponentu r czynnika 1 układu dopełniacza	XP_005207186	98,4	1202,2	316,5	759,5	148,4	-1,58	$p \leq 0,01$
4	Izoforma X1 łańcucha α fibrynogenu	XP_005217494	98,6	979,9	197,6	499,9	70,9	-1,96	$p \leq 0,01$
5	Łańcuch XIII A czynnika krzepnięcia	NP_001161366	89,6	1045,3	206,8	637,9	89,7	-1,64	$p \leq 0,05$
6	Izoforma X1 łańcucha XIII B czynnika krzepnięcia	XP_005217396	88,6	16225,9	8318,8	6954,7	2133,2	-2,33	$p \leq 0,05$
7	SSP 5308*	—	39,5	887,9	619,7	2525,3	985,3	2,84	$p \leq 0,05$
8	SSP 8328 *	—	45,3	482,3	100,6	213,3	157,5	-2,26	$p \leq 0,05$
9	SSP 4216*	—	34,8	90,4	20,4	1118,2	421,3	12,37	$p \leq 0,05$
10	Izoforma X1 łańcucha α fibrynogenu	XP_005217494	30,2	1545,1	495,4	891,8	275,2	-1,73	$p \leq 0,01$
11	Adiponektyna	Q3Y5Z3	29,8	3077,7	1534,3	1187,8	737,2	-2,59	$p \leq 0,05$
12	Adiponektyna	Q3Y5Z3	29,2	5135,3	805,4	8421,6	2122,2	1,64	$p \leq 0,05$
13	SSP 3229*	—	25,2	600,3	214,3	238,4	229,6	-2,52	$p \leq 0,01$
14	SSP 6122*	—	22,8	87,9	41,2	16,9	12,1	-5,20	$p \leq 0,05$
15	SSP 6121*	—	20,5	46,7	37,9	12,2	6,0	-3,83	$p \leq 0,01$

* Numerami SSP (ang. *spot specific pattern*), nadanymi automatycznie przez program PDQuest 8.0.1, zostały oznaczone spoty białkowe, które nie zostały zidentyfikowane, a których ekspresja ulegała statystycznie istotnym zmianom po dodaniu laktozy do preparatu mlekozastępczego

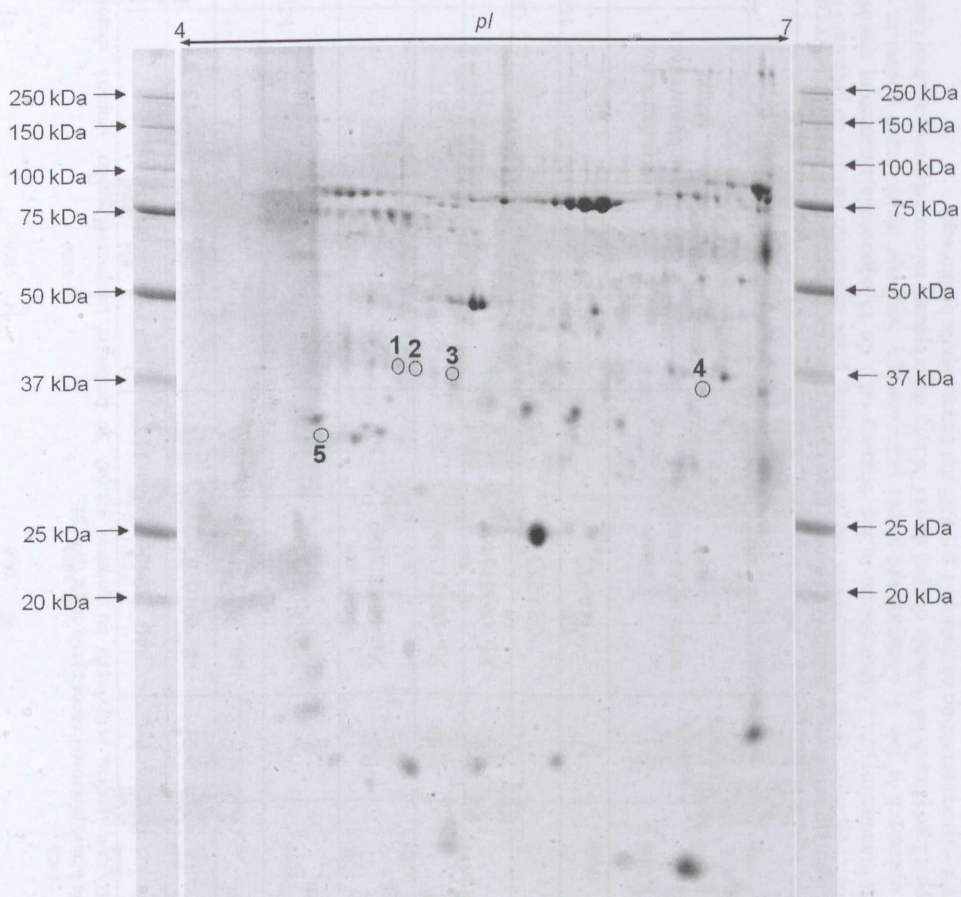


Ryc. 3. Średnia relatywna ekspresja poszczególnych spotów białkowych osocza krwi cieląt przed dodaniem laktozy do preparatu mlekozastępczego i po jej dodaniu, z zaznaczonymi odchyleniami standardowymi i istotnościami różnic. Numery od 1 do 15 odpowiadają numerom spotów zaznaczonych na mapie białkowej osocza krwi (ryc. 2) oraz opisanych w tab. 1. Ciemnoszare słupki przedstawiają ekspresję białek przed podaniem pierwszej dawki laktozy, a jasnoszare słupki – ekspresję białek po 12 godzinach od dodania drugiej dawki laktozy do preparatu mlekozastępczego. Dużą literą A zaznaczono istotność różnic na poziomie $p \leq 0,01$, małą literą a – istotność różnic na poziomie $p \leq 0,05$ dla danego spotu białkowego

Tabela 2. Charakterystyka parametrów identyfikacji spotów białkowych osocza krwi cieląt za pomocą spektrometru mas typu MALDI-TOF

Nazwa białka	Numer spotu	MALDI-TOF MS					
		numer akcesyjny	Mascot Score	stopień pokrycia sekwencji aminokwasowej [%]	liczba dopasowanych fragmentów	pI	MW [kDa]
Adiponektyna	11	Q3Y5Z3	65	25	5	5,46	26,23
Adiponektyna	12	Q3Y5Z3	67	34	6	5,46	26,23
Izoforma X1 łańcucha α fibrynogenu	4	XP_005217494	120	27	17	5,69	95,42
Izoforma X1 łańcucha α fibrynogenu	10	XP_005217494	153	28	21	5,69	95,42
Izoforma X2 subkomponentu r czynnika 1 układu dopełniacza	3	XP_005207186	106	31	17	5,87	81,64
Izoforma X1 łańcucha XIII B czynnika krzepnięcia	6	XP_005217396	145	38	17	6,41	71,80
Łańcuch XIII A czynnika krzepnięcia	5	NP_001161366	119	28	16	5,75	83,19
Prekursor glikoproteiny α -1B	2	NP_001039708	134	34	12	5,29	54,09
Prekursor glikoproteiny α -2-HS	3	NP_776409	112	31	8	5,26	39,19

Prezentowane białka wykazywały statystyczne różnice w ekspresji po dodaniu laktozy do preparatu mlekozastępczego. Numery spotów zidentyfikowanych białek odpowiadają numerom spotów podanym na mapie białkowej osocza krwi cieląt (ryc. 2).



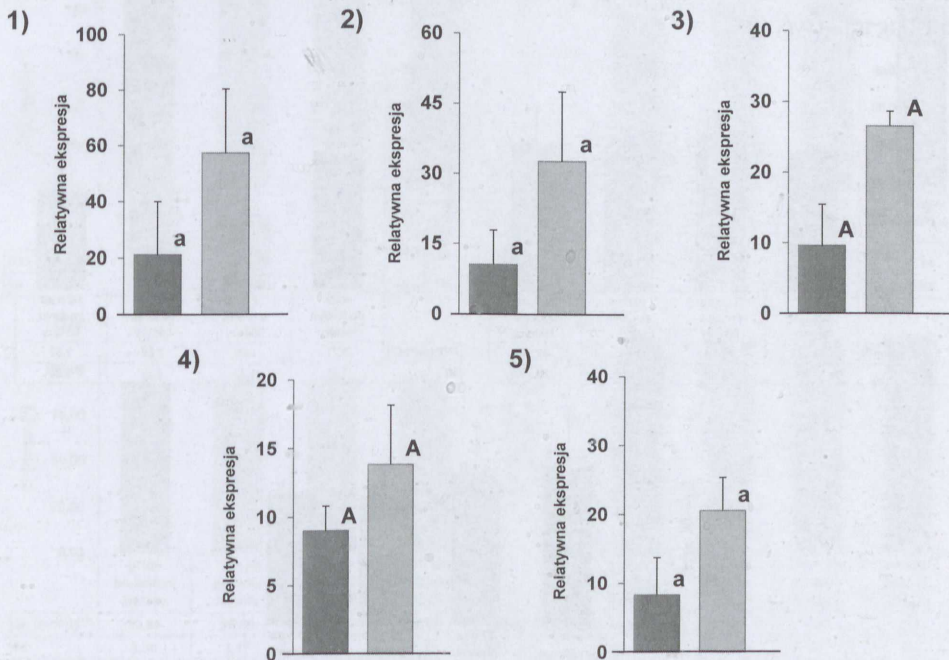
Ryc. 4. Mapa białkowa moczu cieląt z zaznaczonymi białkami wykazującymi statystycznie istotne różnice w ekspresji. Prezentowany żel 2-D wybarwiono błękitem Commassie, na paski IPG (o długości 11 cm) o nieliniowym gradiencie pH 4-7, nałożono 100 μ g białka, rozdział w drugim wymiarze dokonano na 12-procentowym żelu SDS-PADE. Numery spotów podane na żelu 2-D odpowiadają numerom spotów podanym w tab. 3 i 4 oraz na ryc. 5

Tabela 3. Białka moczu cieląt wykazujących statystyczne różnice w ekspresji

Numer spotu	Nazwa białka	Numer akcesyjny białka	Oszacowana wartość MW [kDa]	Średnia relatywna ekspresja przed podaniem laktozy	SD	Średnia relatywna ekspresja po podaniu laktozy	SD	Krotność zmian ekspresji	Istotność różnic
1	Preproklusteryna	NP_776327	39,0	21,3	18,7	57,3	22,9	2,69	$p \leq 0,05$
2	Pęcherzykowe integralne białko błonowe VIP36	XP_003280552	38,8	10,6	7,3	32,7	14,8	3,08	$p \leq 0,05$
3	Preproklusteryna	NP_776409	38,0	9,6	5,8	26,5	2,1	2,76	$p \leq 0,01$
4	Albumina surowicza	P02769	36,2	9,0	1,8	13,8	4,3	1,53	$p \leq 0,01$
5	SSP 0201 *	—	31,9	8,3	5,4	20,5	4,8	2,47	$p \leq 0,05$

* Numerami SSP (ang. *spot specific pattern*), nadanymi automatycznie przez program PDQuest 8.0.1, zostały oznaczone spoty białkowe, które nie zostały zidentyfikowane, a których ekspresja ulegała statystycznie istotnym zmianom w wyniku dodania laktozy do preparatu mlekozastępczego.

Wyniki obejmują również wartość punktową odzwierciedlającą wiarygodność identyfikacji (tzw. SCORE), procent pokrycia odnalezionych fragmentów sekwencji aminokwasowych dla analizowanych białek oraz liczbę fragmentów dopasowanych do sekwencji aminokwasowej białka.



Ryc. 5. Średnia relatywna ekspresja poszczególnych spotów białkowych moczu cieląt przed dodaniem laktozy do preparatu mlekozastępczego i po jego dodaniu, z zaznaczonymi odchyleniami standardowymi i istotnościami różnic. Numery od 1 do 5 odpowiadają numerom spotów podanym na mapie białkowej moczu (ryc. 4) oraz w tab. 3. Dużą literą A zaznaczono istotne różnice na poziomie $p \leq 0,01$, małą literą a – istotne różnice na poziomie $p \leq 0,05$ dla danego spotu białkowego. Pozostałe objaśnienia zob. ryc. 3.

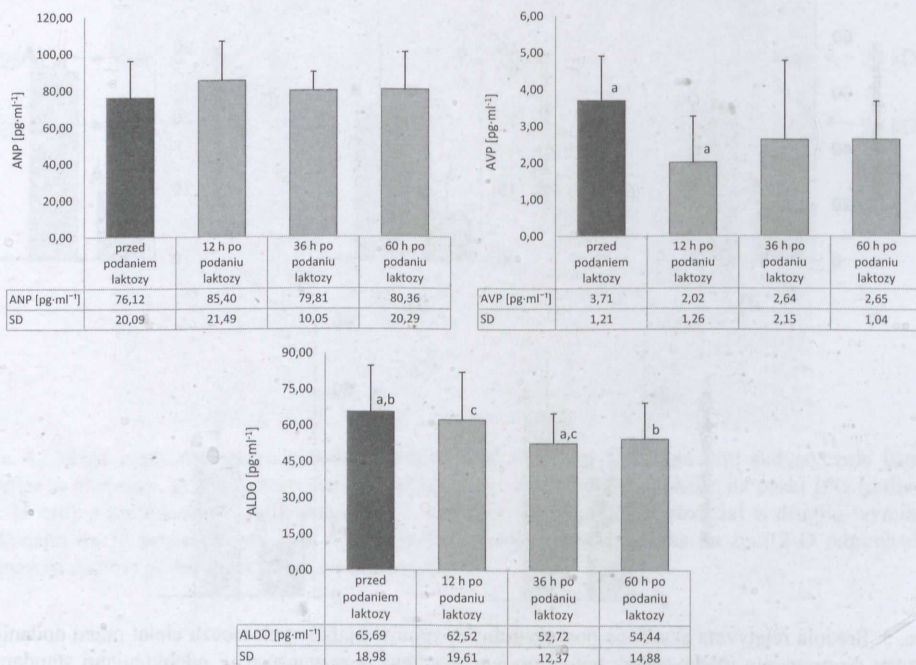
Tabela 4. Charakterystyka parametrów identyfikacji spotów białkowych moczu cieląt przy użyciu spektrometru mas typu MALDI-TOF

Nazwa białka	Numer spotu	MALDI-TOF MS				pI	MW [kDa]
		numer akcesyjny	Mascot Score	stopień pokrycia sekwencji aminokwasowej [%]	liczba dopasowanych fragmentów		
Albumina surowicza	4	P02769	71	22	11	5,82	71,24
Pęcherzykowe integralne białko błonowe VIP36	2	XP_003280552	107	47	12	6,06	32,84
Preproklusteryna	1	NP_776409	97	30	11	5,73	51,65
Preproklusteryna	3	NP_776409	120	33	14	5,73	51,65

Prezentowane białka wykazywały statystyczne różnice w ekspresji w wyniku dodania laktozy do preparatu mlekozastępczego. Numery spotów zidentyfikowanych białek odpowiadają numerom spotów podanych na mapie białkowej moczu cieląt (ryc. 4).

Uzyskane wyniki analiz badanych parametrów osocza krwi przedstawiono na ryc. 6–9; podano średnie wartości badanych parametrów z zaznaczeniem odchyłeń standardowych oraz istotności różnic pomiędzy wartościami przed podaniem pierwszej dawki laktozy i w 12., 36. i 60. godzinie po podaniu drugiej dawki laktozy.

Najmniejsze stężenie przedsiorkowego peptydu natriuretycznego w osoczu krwi cieląt zaobserwowano przed podaniem preparatu mlekozastępczego z dodatkiem laktozy w ilości $76,12 \text{ pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (ryc. 6).



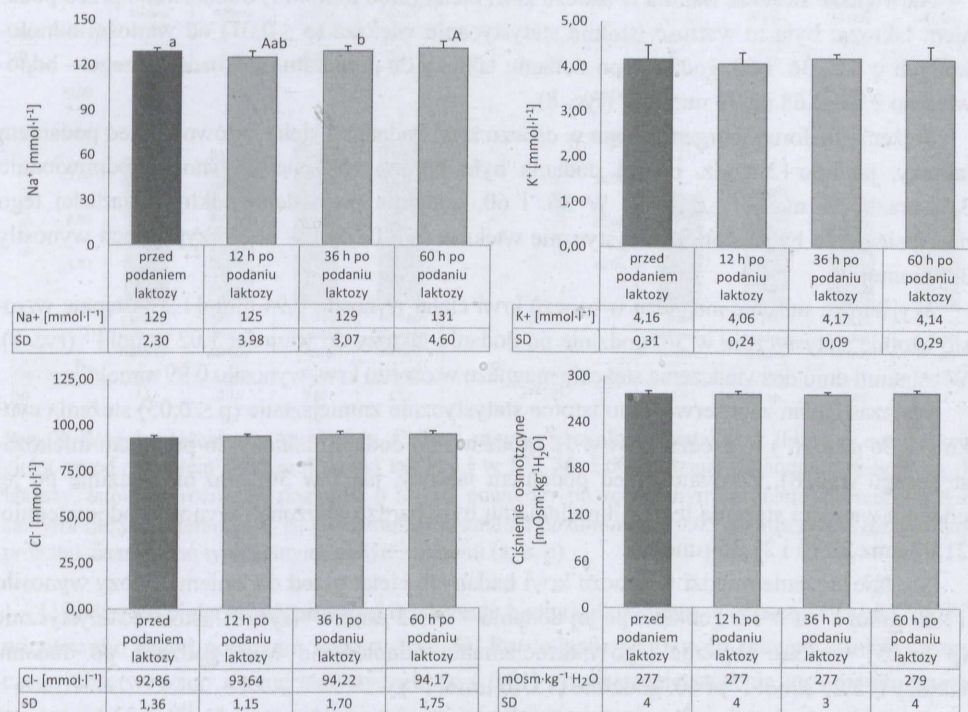
Ryc. 6. Średnie stężenie przedsiorkowego peptydu natriuretycznego (ANP), wazopresyny (AVP) oraz aldosteronu (ALDO) w osoczu krwi cieląt przed podaniem pierwszej dawki laktozy i w 12., 36. i 60. godzinie po podaniu drugiej dawki laktozy. Istotność różnic na poziomie $p \leq 0,05$ pomiędzy poszczególnymi próbami zaznaczono tymi samymi małymi literami (a, b, c)

Stężenie tego hormonu wzrosło po 12 godzinach od podania laktozy do wartości $85,40 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (zmiana nie była istotna statystycznie). Następnie obniżyło się i w 3. oraz 4. dniu doświadczenia; wynosiło odpowiednio $79,81 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ oraz $80,36 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Zaobserwowano duże różnice osobnicze w stężeniu tego hormonu w osoczu krwi badanych zwierząt.

Największe stężenie wazopresyny w osoczu krwi cieląt ($3,71 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$) wykazano w pierwszym dniu doświadczenia (ryc. 6). Po 12 godzinach od podania preparatu mlekozastępczego z dodatkiem laktozy stwierdzono statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) zmniejszenie stężenia tego hormonu do wartości $2,02 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, a następnie jego nieznaczny wzrost do wartości $2,64 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, obserwowanej w 3. dniu doświadczenia oraz do $2,65 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ w ostatnim dniu doświadczenia. Zaobserwowano duże różnice osobnicze stężenia wazopresyny w osoczu krwi zwierząt.

Przed dodaniem laktozy do preparatu mlekozastępczego stężenie aldosteronu (ALDO) w osoczu krwi badanych cieląt było najwyższe – wynosiło $65,69 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (ryc. 6). Po podaniu laktozy stężenie ALDO zmniejszyło się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$), osiągając w 3. dniu doświadczenia najmniejszą wartość ($52,72 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Zaobserwowano duże różnice osobnicze stężenia tego hormonu w osoczu krwi zwierząt.

Średnie stężenie sodu w osoczu krwi cieląt przed dodaniem laktozy do preparatu mlekozastępczego wynosiło $129 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (ryc. 7).



Ryc. 7. Średnie stężenie jonów sodu, potasu, chlorków w osoczu krwi oraz wartość ciśnienia osmotycznego osocza krwi cieląt przed podaniem pierwszej dawki laktozy i w 12., 36. i 60. godzinie po podaniu drugiej dawki laktozy. Istotność różnic na poziomie $p \leq 0,01$ pomiędzy poszczególnymi próbami zaznaczono tymi samymi dużymi literami (A, B, C). Istotność różnic na poziomie $p \leq 0,05$ pomiędzy poszczególnymi próbami zaznaczono tymi samymi małymi literami (a, b, c)

Po 12 godzinach od podania drugiej dawki laktozy zaobserwowano statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) zmniejszenie się stężenia tego elektrolitu w osoczu krwi badanych cieląt ($125 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$). W kolejnych dniach badań stężenie sodu w osoczu krwi zwiększało się, osiągnęło odpowiednio $129 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ i $131 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

W prezentowanych badaniach nie obserwowano statystycznie istotnych zmian stężenia potasu w osoczu krwi (ryc. 7). Średnie stężenie tego elektrolitu przed dodaniem laktozy wynosiło $4,16 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, a w 12., 36. oraz 60. godzinie po dodaniu laktozy wynosiło odpowiednio $4,06$, $4,17$ oraz $4,14 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Dodatek laktozy nie spowodował również zmian w stężeniu chlorków w osoczu krwi badanych cieląt. Stężenie tego elektrolitu w kolejnych 4 dniach doświadczenia wynosiło: $92,86$, $93,64$, $94,22$ i $94,17 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (ryc. 7).

Nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian w wartości ciśnienia osmotycznego osocza krwi u badanych cieląt zarówno przed dodaniem laktozy do preparatu mlekozastępczego, jak i po jej dodaniu (ryc. 7). Średnia wartość ciśnienia osmotycznego osocza krwi tych zwierząt przed podaniem laktozy oraz w 12., 36. i 60. godzinie po dodaniu laktozy wynosiła odpowiednio: 277 oraz 277 , 277 i $279 \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$.

Największe stężenie wapnia w osoczu krwi cieląt ($2,88 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) odnotowano przed podaniem laktozy; była to wartość istotnie statystycznie większa ($p \leq 0,01$) od wartości odnotowanych w 12., 36. i 60. godzinie po dodaniu laktozy do preparatu mlekozastępczego – odpowiednio $2,69$, $2,68$ i $2,74 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (ryc. 8).

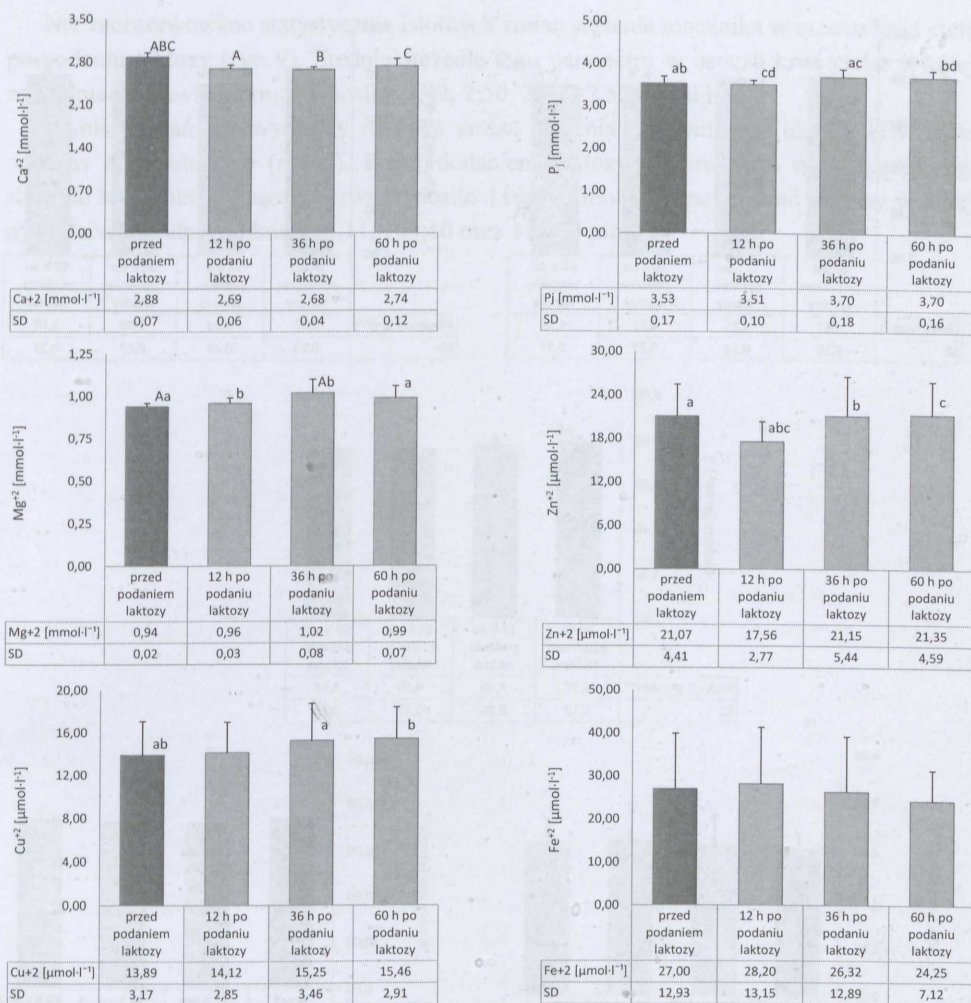
Stężenie fosforu nieorganicznego w osoczu krwi badanych cieląt zarówno przed podaniem laktozy, jak i po 12 godz. od jej dodania było bardzo zbliżone i wynosiło odpowiednio $3,53$ oraz $3,51 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (ryc. 8). W 36. i 60. godzinie po dodaniu laktozy wartości tego makroelementu były istotnie statystycznie większe ($p \leq 0,05$) i w obu przypadkach wynosiły $3,70 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Wyjściowe stężenie magnezu w osoczu krwi cieląt wynosiło $0,94 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, następnie wzrosło istotnie statystycznie w 36. godzinie po dodaniu laktozy do wartości $1,02 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (ryc. 8). W ostatnim dniu doświadczenia stężenie magnezu w osoczu krwi wynosiło $0,99 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Podczas badań zaobserwowano istotne statystycznie zmniejszenie ($p \leq 0,05$) stężenia cynku ($17,56 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) w osoczu krwi w 12. godzinie po dodaniu laktozy do preparatu mlekozastępczego (ryc. 8). Zarówno przed podaniem laktozy, jak i w 36. oraz 60. godzinie po jej podaniu wartości stężenia tego mikroelementu były bardzo zbliżone i wynosiły odpowiednio: $21,07$ oraz $21,15$ i $21,35 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Średnie stężenie miedzi w osoczu krwi badanych cieląt przed dodaniem laktozy wynosiło $13,89 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, a w 12. godzinie po jej dodaniu – $14,12 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (ryc. 8). Istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$) większe stężenie tego mikroelementu odnotowano w 36. godzinie po dodaniu laktozy ($15,25 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) i 60. godzinie ($15,46 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$).

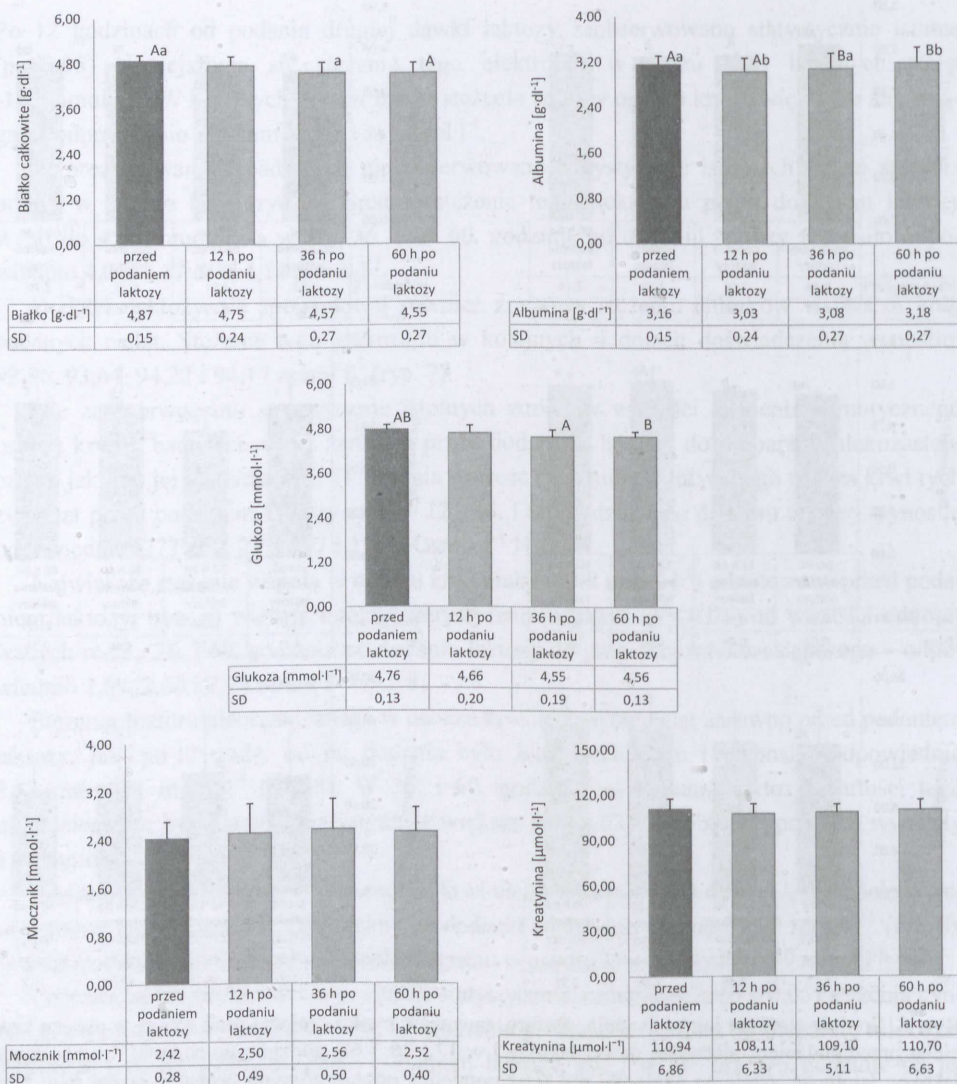
U badanych cieląt stężenie żelaza w osoczu krwi przed dodaniem laktozy do preparatu mlekozastępczego wynosiło $27,00 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, a po jej dodaniu w 2., 3. i 4. dniu doświadczenia stopniowo zmniejszało się, ale na poziomie nieistotnym statystycznie i wynosiło odpowiednio: $28,20$, $26,32$ i $24,25 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (ryc. 8).



Ryc. 8. Średnie stężenie jonów wapnia, fosforu, magnezu, cynku, miedzi oraz żelaza w osoczu krwi cieląt przed podaniem pierwszej dawki laktozy i w 12., 36. i 60. godzinie po podaniu drugiej dawki laktozy. Istotność różnic na poziomie $p \leq 0,01$ pomiędzy poszczególnymi próbami zaznaczono tymi samymi dużymi literami (A, B, C). Istotność różnic na poziomie $p \leq 0,05$ pomiędzy poszczególnymi próbami zaznaczono tymi samymi małymi literami (a, b, c)

U badanych cieląt najwyższe średnie stężenie białka całkowitego w osoczu krwi ($4,87 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$) odnotowano przed podaniem laktozy (ryc. 9). Po dodaniu laktozy do preparatu mlekozastępczego obserwowano istotne statystycznie ($p \leq 0,01$) zmniejszenie stężenia tego parametru do wartości $4,55 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$ odnotowanej w ostatnim dniu doświadczenia.

Średnie wyjściowe stężenie albuminy w osoczu krwi cieląt wynosiło $3,16 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$ (ryc. 9). W 12. godzinie po podaniu laktozy zaobserwowano istotne statystycznie ($p \leq 0,01$) zmniejszenie stężenia tego parametru do wartości $3,03 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$. Do końca doświadczenia obserwowano statystycznie istotny wzrost stężenia albuminy, która w ostatnim dniu osiągnęła wartość zbliżoną do odnotowanej przed dodaniem laktozy do preparatu mlekozastępczego.



Ryc. 9. Średnie stężenie białka całkowitego, albuminy, glukozy, mocznika oraz kreatyniny w osoczu krwi cieląt przed podaniem pierwszej dawki laktozy i w 12., 36. i 60. godzinie po podaniu drugiej dawki laktozy. Istotność różnic na poziomie $p \leq 0,01$ pomiędzy poszczególnymi próbami zaznaczono tymi samymi dużymi literami (A, B, C). Istotność różnic na poziomie $p \leq 0,05$ pomiędzy poszczególnymi próbami zaznaczono tymi samymi małymi literami (a, b, c)

Największe stężenie glukozy w osoczu krwi badanych cieląt ($4,76 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) odnotowano przed dodaniem laktozy do preparatu mlekozastępczego (ryc. 9). Stężenie tego parametru istotnie statystycznie ($p \leq 0,01$) zmniejszyło się w 36. i 60. godzinie po dodaniu laktozy – odpowiednio $4,55$ oraz $4,56 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian stężenia mocznika w osoczu krwi cieląt po podaniu laktozy (ryc. 9). Średnie stężenie tego parametru w osoczu krwi cieląt w kolejnych dniach doświadczenia wynosiło: 2,42, 2,50, 2,56 i 2,52 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Wyniki badań nie wykazały również zmian stężenia kreatyniny w osoczu krwi cieląt podczas doświadczenia (ryc. 9). Przed dodaniem laktozy do preparatu mlekozastępczego stężenie kreatyniny w osoczu krwi wynosiło 110,94 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, a po dodaniu laktozy w kolejnych dniach – odpowiednio 108,11, 109,10 oraz 110,70 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

6. Dyskusja

W okresie pourodzeniowym szybka adaptacja organizmu jest warunkiem przeżycia i prawidłowego rozwoju. Adaptacja dotyczy wszystkich narządów i układów, zwłaszcza tych, których czynności były odmienne lub ograniczone w okresie życia płodowego. Bezpośrednio po urodzeniu następuje bardzo szybkie przystosowanie układów oddechowego i sercowo-naczyniowego do podjęcia czynności oraz stopniowy rozwój układów pokarmowego, neuro-hormonalnego, wydalniczego, immunologicznego oraz termoregulacyjnego.

Rozwój organizmu cieląt w pierwszym tygodniu życia postnatalnego pociąga za sobą istotne zmiany w profilu białkowym osocza krwi (Herosimczyk i in. 2013). Do białek, które wykazują dynamiczne zmiany w okresie noworodkowym cieląt, należą białka zaangażowane w metabolizm tłuszczu (apolipoproteina A-I, A-IV), transport metabolitów i w utrzymanie ciśnienia onkotycznego (albumina osoczowa), transport żelaza (transferyna, ferrytryna), w odpowiedź immunologiczną (immunoglobuliny, białka ostrej fazy), a także w proces krzepnięcia krwi (Knowles i in. 2000; Nussbaum i in. 2002; Suh i in. 2003; Atyabi i in. 2006; Orro i in. 2008; Herosimczyk i in. 2013).

W prezentowanych badaniach, wykorzystując elektroforezę 2D sprzężoną ze spektrometrią masową typu MALDI-TOF, zidentyfikowano w organizmie cieląt 7 białek osocza krwi oraz 3 białka moczu, których ekspresja zmieniła się pod wpływem laktozy dodanej do diety.

Obserwowano, że teoretyczna masa cząsteczkowa zidentyfikowanych białek osocza krwi i moczu, obecnych na żelach 2D, różni się od oszacowanej na podstawie markera masy cząsteczkowej. Bouley i in. (2004) sugerują, że różnice te wynikają z modyfikacji potranslacyjnych, takich jak: fosforylacja, glikozylacja oraz proteolityczny rozpad białek. Białka o większej oszacowanej masie cząsteczkowej od masy teoretycznej (np. glikoproteina α -1B, subkomponent C1r, białko VIP36) są najprawdopodobniej wynikiem procesu glikozylacji, a te o mniejszej masie (klusteryna) powstały na skutek obróbki proteolitycznej.

Do zidentyfikowanych białek osocza krwi, wykazujących zmiany ekspresji po podaniu laktozy, należy adiponektyna. Adiponektyna jest hormonem syntetyzowanym głównie przez adipocyty. Jest ona także uwalniana w niewielkich ilościach z komórek mięśni szkieletowych, kardiomiocytów i osteoblastów (Piñeiro i in. 2005; Shinoda i in. 2006; Krause i in. 2008).

Wykazano, że stężenie adiponektyny w osoczu krwi jest odwrotnie proporcjonalne do wskaźnika masy ciała, stężenia insuliny i triglicerydów, a wprost proporcjonalne do stężenia lipoprotein o wysokiej gęstości (Chan i in. 2004). Adiponektyna oddziałuje na komórki docelowe za pośrednictwem swoistych receptorów błonowych Adipo-R1 lub Adipo-R2 (Yamauchi i in. 2003). Receptor Adipo-R1 jest zlokalizowany głównie w komórkach mięśni szkieletowych, natomiast Adipo-R2 – głównie w hepatocytach. Ponadto mRNA dla obu receptorów wykryto w komórkach β wysp Langerhansa (Kharroubi i in. 2003; Chen i in. 2013). Związane adiponektyny z receptorem Adipo-R1 lub Adipo-R2 uruchamia wewnątrzkomórkowy szlak sygnalizacyjny, wyzwalający syntezę enzymów zwiększających oksydację kwasów tłuszczowych (w mięśniach i wątrobie), zwiększających pobieranie i utlenianie glukozy w mięśniach szkieletowych, spowalniających glukoneogenezę w wątrobie, co ostatecznie prowadzi do zwiększenia wrażliwości tkanek na insulinę (Karbowska i Kochan 2006).

Należy dodać, że adiponektyna w chorobach metabolicznych (cukrzycy, otyłości, zespole metabolicznym, miażdżycy) wykazuje działanie przeciwzapalne, natomiast w chorobach związanych z przewlekłym zapaleniem autoimmunologicznym ma właściwości prozapalne (Ouchi i Walsh 2008).

Adiponektyna występuje w osoczu krwi w różnych wariantach molekularnych: o małej masie cząsteczkowej (LMW), o średniej masie cząsteczkowej (MMW), o dużej masie cząsteczkowej (HMW) oraz globularnej C-końcowej domeny (Kadowaki i Yamauchi 2005). Efekt biologiczny adiponektyny zależy od jej formy cząsteczkowej, która wiąże się ze swoistym receptorem komórkowym (Karbowska i Kochan 2006). Tłumaczy to, dlaczego w prezentowanym doświadczeniu w przypadku różnych spotów tego samego białka (adiponektyny) obserwowano ich odmienną ekspresję. Przypuszczalnie każdy ze spotów stanowi inną izoformę adiponektyny, która uległa zróżnicowanej ekspresji, aby izoformy adiponektyny nie znosiły wzajemnie swojego działania.

Stężenie adiponektyny we krwi noworodków ludzkich jest wysokie i dużo wyższe niż obserwowane u dzieci lub dorosłych i ulega szybkiemu obniżeniu w pierwszym roku życia (Kamoda i in. 2004; Mantzoros i in. 2004; Hytinen i in. 2008; Bozzola i in. 2010). Badania przeprowadzone na szczupłych osobach wykazały, że pobieranie glukozy zmniejsza stężenie leptyny w osoczu ich krwi, nie wpływa natomiast na zmiany stężenia adiponektyny oraz rezystyny (Wurm i in. 2007). Można wnioskować, że obserwowane zmiany ekspresji adiponektyny w osoczu krwi badanych cieląt wynikają z pośredniego wpływu dodatku laktozy do preparatu mlekozastępczego. Wykazano, że u osób z przewlekłą niewydolnością serca przedślonkowy peptyd natriuretyczny zwiększa produkcję adiponektyny w adipocytach (Tsukamoto i in. 2009). Z badań na cielętach w pierwszym tygodniu ich życia wynika, że stężenie ANP w osoczu ich krwi jest wysokie (Dratwa 2006; Ożgo 2009). W prezentowanych badaniach po dodaniu laktozy do preparatu mlekozastępczego obserwowano wzrost stężenia tego hormonu w osoczu krwi cieląt. Wydaje się, że zmiany ekspresji adiponektyny mogą mieć związek ze zmianami stężenia ANP w osoczu krwi. Adiponektyna odgrywa również istotną rolę w regulacji metabolizmu glukozy. Białko to zwiększa pobieranie glukozy przez mięśnie poprzecznie prążkowane oraz hamuje syntezę glukozy w wątrobie, przyczyniając się do zmniejszenia stężenia tego węglowodanu we krwi (Karbowska i Kochan 2006). W prezentowanych badaniach obserwowano stopniowe zmniejszanie się stężenia glukozy w osoczu krwi cieląt w kolejnych dniach doświadczenia, jednak wykazane zmiany nie są wynikiem wpływu adiponektyny, a raczej dojrzewania organizmu noworodka.

W prezentowanych badaniach wykazano również zmianę ekspresji w osoczu krwi cieląt prekursora glikoproteiny α -2-HS. Glikoproteina α -2-HS (AHSG), znana również jako fetuina A, jest syntetyzowana przez hepatocyty i uwalniana do krwi. Białko to charakteryzuje się szerokim spektrum aktywności biologicznej. Zaangażowane jest m.in. w transport lipidów, formowanie tkanki kostnej, ponadto hamuje aktywność trypsyny i proteaz cysteinowych oraz wykazuje działania ochronne i przeciwzapalne (Jahnen-Dechent i in. 2011). Poza oddziaływaniem na gospodarkę wapniowo-fosforanową glikoproteina α -2-HS zmniejsza fosforylację receptora insuliny, co prowadzi do wzrostu insulinooporności (Mathews i in. 2000; Heiss i in. 2008). Wykazano również zależność pomiędzy stężeniem glikoproteiny α -2-HS we krwi

a występowaniem zespołu metabolicznego (Ix i in. 2006). Białko to jest silnym inhibitorem kalcyfikacji ścian naczyń krwionośnych i innych zwapnień ekotopowych (Jahnen-Dechent i in. 2011). Tworzy kompleksy z fosforanem wapnia i białkiem Gla macierzy (MGP), przez co zapobiega wytrącaniu się soli wapnia (Price i Lim 2003).

U cieląt stężenie glikoproteiny α -2-HS zmniejsza się do 14. dnia życia. Zmiany te są związane z obserwowanym w tym czasie wzrostem stężenia albumin osoczowych. Zmniejszanie stężenia tego białka we krwi cieląt związane jest ze zmianą metabolizmu i dojrzewaniem wątroby (Lai i in. 1981). W prezentowanych badaniach obserwowano wzrost ekspresji glikoproteiny α -2-HS po dodaniu laktozy do preparatu mlekozastępczego, któremu towarzyszyło zmniejszenie stężenia osoczowej albuminy we krwi cieląt. Należy zaznaczyć, że albumina należy do białek ostrej fazy, której stężenie zmniejsza się w odpowiedzi na bodziec zapalny (Don i Kaysen 2004).

W prezentowanych badaniach, po dodaniu laktozy do preparatu mlekozastępczego, zaobserwowano zmniejszenie ekspresji białek zaangażowanych w utrzymanie hemostazy organizmu: izoformy X1 łańcucha α fibrynogenu, izoformy X1 łańcucha XIII B czynnika krzepnięcia, łańcucha XIII A czynnika krzepnięcia.

Fibrynogen (Fb) jest glikoproteiną produkowaną przez parenchymalne komórki wątroby i uwalnianą do krwiobiegu w postaci dimeru. Każdy monomer fibryny zbudowany jest z 3 łańcuchów polipeptydowych: $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ oraz γ , połączonych ze sobą wiązaniami dwusiarczkowymi (Mosesson 2005). Fibrynogen pełni funkcję hemostatyczną, poza tym zaliczany jest do białek ostrej fazy. Synteza wątrobowa fibrynogenu i jego uwalnianie do krwiobiegu zwiększa się istotnie pod wpływem czynników prozapalnych (Nazifi i in. 2009).

W końcowej fazie procesu krzepnięcia krwi fibrynogen ulega konwersji do fibryny. Po czym następuje stabilizowanie się polimerów utworzonej z fibrynogenu fibryny poprzez wstawianie wiązań kowalencyjnych, co w konsekwencji prowadzi do wzmocnienia właściwości mechanicznych skrzepu. W ten ostatni etap kaskady krzepnięcia krwi zaangażowany jest czynnik XIII. Obecny w osoczu krwi czynnik XIII jest tetramerycznym białkiem, składającym się z 2 katalitycznych podjednostek A oraz 2 podjednostek B pełniących funkcje regulatorowe (Ariëns i in. 2002).

W dostępnym piśmiennictwie brakuje danych na temat wpływu stosowania dodatku laktozy w żywieniu zwierząt na zmiany stężenia fibrynogenu we krwi. Stężenie tego białka w osoczu krwi cieląt zwiększa się w pierwszych 9 dniach życia (Knowles i in. 2000). Można więc przypuszczać, że zmniejszenie się ekspresji fibrynogenu oraz białek, zaangażowanych w stabilizację skrzepu, było wynikiem dodatku laktozy do preparatu mlekozastępczego podawanego badanym cielętom.

Analiza bioinformatyczna wykazała zmniejszenie ekspresji izoformy X2 subkomponentu r czynnika 1 układu dopełniacza po spożyciu przez cielęta preparatu mlekozastępczego z dodatkiem laktozy. Subkomponent C1r wchodzi w skład komponentu C1 składającego się z cząsteczki C1q i związanych z nią proteaz serynowych C1r i C1s. Jest to pierwszy składnik klasycznej drogi aktywacji układu dopełniacza.

Układ dopełniacza pełni ważną funkcję w nieswoistej i swoistej odpowiedzi immunologicznej; jego działanie wyraża się poprzez: bezpośrednią lizę komórek bakteryjnych i wirusów, chemotaksję komórek fagocytarnych, ułatwianie procesu fagocytozy (opsonizację drobno-

ustrojów), eliminację zmodyfikowanych lub uszkodzonych komórek gospodarza, inicjację reakcji zapalnej, hamowanie precypitacji kompleksów immunologicznych antygen–przeciwciało (Klaska i Nowak 2007).

Aktywacja układu dopełniacza może następować 3 drogami: klasyczną, alternatywną i lektynową, w które zaangażowanych jest ponad 30 białek osocza krwi. Aktywacja układu dopełniacza zachodzi w sposób kaskadowy, co oznacza, że każdy kolejny składnik aktywuje następny. Klasyczna droga aktywacji układu dopełniacza rozpoczyna się w chwili połączenia kompleksu antygen–przeciwciało z obecną w surowicy cząsteczką C1q dopełniacza, co prowadzi do aktywacji proteaz serynowych (C1r, C1s), które uruchamiają kolejne składniki układu dopełniacza. Dochodzi do powstania kompleksu atakującego błonę (MAC), co ostatecznie prowadzi do lizy komórki (Klaska i Nowak 2007; Smykał-Jankowiak i Niemir 2009).

Kolejnym białkiem osocza krwi, którego ekspresja zmniejsza się w odpowiedzi na dodanie laktozy do preparatu mlekozastępczego, jest glikoproteina α -1-B (A1BG). Funkcja tego białka jest wciąż nieznana. Należy ono do rodziny immunoglobulin, jest białkiem uwalnianym do osocza krwi (Ishioka i in. 1986). Wykazano, że ekspresja tego białka w osoczu krwi jednodniowych noworodków ludzkich jest 3,7-krotnie większa niż u osobników dorosłych (Ignjatovic i in. 2011). Wzrost ekspresji glikoproteiny α -1-B w surowicy krwi obserwowano u bydła i owiec podczas zapalenia dróg oddechowych (Seth i in. 2009; Chiaradia i in. 2012). Poza krwią obecność tego białka wykazano również w moczu pacjentów z dziecięcym steroidoopornym zespołem nerczycowym (Piyaphanee i in. 2011). W niepublikowanych badaniach własnych (Dratwa-Chałupnik i in. 2014) wykazano obecność tego białka w moczu sześciodniowych cieląt.

Wydaje się, że zwiększona ilość laktozy w diecie obniża ekspresję białek osocza krwi uczestniczących w procesach wrodzonej odporności immunologicznej (subkomponentu C1r) oraz zaangażowanych w odpowiedź ostrej fazy (fibrynogenu), a także wpływa na zmianę ekspresji białek działających ochronnie i przeciwzapalnie, powodując wzrost ekspresji glikoproteiny α -2-HS i powodując wzrost oraz zmniejszenie ekspresji adiponektyny w zależności od izoformy tego białka, ponadto zmniejsza ekspresję glikoproteiny α -1-B – przypuszczalnie białka ostrej fazy.

Do odpowiedzi ostrej fazy w organizmie dochodzi pod wpływem różnych bodźców, w tym zaburzeń metabolicznych wynikających z błędów żywieniowych. Zmiany stężenia poszczególnych białek ostrej fazy zależą od bodźca, który je wywołał (Horadagoda i in. 1999). W prezentowanym doświadczeniu uruchomienie odpowiedzi ostrej fazy i białek zaangażowanych w ten proces (fibrynogenu, glikoproteiny α -2-HS, glikoproteiny α -1-B i albuminy) było prawdopodobnie reakcją na zwiększoną ilość laktozy w preparacie mlekozastępczym podawanym cielętom.

Analizie bioinformatycznej poddano również żele 2D obrazujące profil białkowy moczu cieląt. Wykorzystanie spektrometru masowego typu MALDI-TOF pozwoliło na zidentyfikowanie 3 białek, których ekspresja zmieniła się pod wpływem zwiększonej ilości laktozy: albuminy surowiczej, preproklusteryny oraz pęcherzykowego integralnego białka błonowego VIP36.

Obecność albuminy surowiczej w moczu potwierdzają badania proteomiczne wykonane na ludziach (Nagaraj i Mann 2011), szczurach w okresie postnatalnym (Lee i in. 2008), wielbłądach (Alhaider i in. 2012) i bydle (Pyo i in. 2003).

W prezentowanych badaniach dodatek laktozy do diety spowodował wzrost ekspresji albuminy surowiczej w moczu cieląt. W nieopublikowanych badaniach Katedry Fizjologii i Cytobiologii Akademii Rolniczej w Szczecinie (Boniecka 2005) wykazano, że do 5. dnia życia istotnie zwiększa się wydalanie tego białka z moczem. W ostatnich dwóch dniach pierwszego tygodnia życia cieląt nie obserwowano zmian w ilości albuminy wydalonej z moczem. Można więc wnioskować, że wykazany w 7. dniu życia wzrost ekspresji tego białka w moczu badanych zwierząt był wynikiem dodania laktozy do preparatu mlekozastępczego.

Należy dodać, że u noworodków obserwuje się zwiększone wydalanie albuminy z moczem, wynikające z niedojrzałości kanalików proksymalnych (Fell i in. 1997). U dzieci w pierwszym miesiącu ich życia obserwuje się duże stężenie albuminy w moczu i stopniowe jego zmniejszanie wraz z wiekiem (Hjorth i in. 2000).

Klusteryna, zwana również apolipoproteiną J, jest glikoproteiną syntetyzowaną przez różne tkanki i zaangażowaną w wiele fizjologicznych i patologicznych procesów. Występuje w dwóch formach – egzogennej (w płynach ustrojowych) oraz endogennej (w cytoplazmie i jądrze komórkowym). Wydzielana do płynów klusteryna powstaje z preklusteryny i ma właściwości antyapoptyczne i antyangiogeniczne. Natomiast forma endogenna jest silnym stymulatorem apoptozy. Klusteryna zaangażowana jest w regulację procesów odpornościowych, transport lipidów, dojrzewanie plemników, ochronę błony komórkowej (Rosenberg i Silkens 1995).

Obecność tego białka stwierdzono w moczu zdrowych ludzi (He i in. 2012). W patofizjologii ilość usuwanej wraz z moczem klusteryny może posłużyć do ustalenia stopnia uszkodzenia kanalików nerkowych, ponadto białko to wykorzystuje się do określenia typu białkomoczu (kłębuszkowego lub kanalikowego) – Hidaka i in. (2002). Badania wskazują również na dodatnią korelację pomiędzy stężeniem klusteryny a ilością białka całkowitego w moczu (Solichowa i in. 2007). Z nieopublikowanych badań, przeprowadzonych w Katedrze Fizjologii i Cytobiologii (Boniecka 2005), wynika, że wydalanie białka całkowitego z moczem zmniejsza się w ciągu kolejnych 7 dni życia cieląt. Sugeruje to, że stężenie klusteryny w moczu również zmniejsza się wraz z wiekiem zwierząt. Można więc przypuszczać, że zaobserwowany wzrost ekspresji tego białka w moczu zwierząt był wynikiem dodatku laktozy do preparatu mlekozastępczego.

Białko błonowe VIP36 jest glikoproteiną należącą do grupy lektyn, zaangażowaną w transport wewnątrzkomórkowy. Wykazano, że wewnątrz komórki białko to jest zlokalizowane w pęcherzykach transportowych oraz sekrecyjnych (Shimada 2003a, b). Po zsyntetyzowaniu ulega ono glikozylacji w strukturach Golgiego (Füllekrug i in. 1999); jest to białko transbłonowe. Jego obecność wykazano w wielu narządach: wątrobie, nerkach, śledzionie, jelicie, płucach, sercu (Fiedler i Simons 1996).

Hara-Kuge i in. (2002) stwierdzili, że białko VIP36 może być odpowiedzialne za transport wewnątrzkomórkowy i sekrecję klusteryny w nerkach psowatych. W prezentowanych badaniach obserwowano wzrost ekspresji białka VIP36 oraz klusteryny w moczu cieląt w odpowiedzi na zwiększoną ilość laktozy w pokarmie, co potwierdza fakt, że w sekrecję klusteryny zaangażowane jest pęcherzykowe integralne białko błonowe VIP36.

W moczu badanych cieląt, w odpowiedzi na dodatek laktozy, wykazano wzrost ekspresji białek (albuminy surowiczej, klusteryny), które wykorzystuje się jako wskaźniki określające

sprawność działania kanalików nerkowych. W pierwszym tygodniu życia cieląt obserwuje się wzrost sprawności resorpcyjnej i sekrecyjnej kanalików nerkowych, a także dynamiczne zmiany aktywności humoralnych czynników zaangażowanych w regulację tych procesów (Dratwa i in. 2004; Ożgo 2009; Dratwa-Chałupnik i in. 2011). Wydaje się, że wykazane zmiany ekspresji białek moczu po podaniu laktozy potwierdzają zmniejszoną sprawność kanalików nerkowych u nowo narodzonych cieląt.

Podanie cielętom laktozy, w dawce $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ masy ciała, wraz z preparatem mlekozastępczym nie wywołało biegunki, a jedynie u 4 cieląt pojawił się lekko kwaśny zapach stolca. W niepublikowanych badaniach własnych u dwu- oraz trzytygodniowych cieląt dodanie do preparatu mlekozastępczego 1 g laktozy na 1 kg masy ciała spowodowało lekką biegunkę. Najprawdopodobniej duża aktywność laktazy w jelicie badanych cieląt skutecznie zapobiegła pojawieniu się biegunki osmotycznej, wywołanej przez niestrawioną laktozę, jaką obserwowano u starszych cieląt. St. Jean i in. (1991) wykazali dużo większą aktywność laktazy w śluzówce jelita czczego cieląt w 1. tygodniu życia od obserwowanej w 2. czy 3. tygodniu.

Głównym regulatorem gospodarki wodno-elektrolitowej jest nerka. Istotną rolę w regulacji czynności nerek cieląt w 1. tygodniu życia odgrywa przedsionkowy peptyd natriuretyczny, układ renina–angiotensyna–aldosteron oraz wazopresyna. Analiza zmian badanych parametrów wskazuje na dużą sprawność układów regulujących czynności nerek cieląt, co stwierdzono również w badaniach innych autorów przeprowadzonych zarówno na cielętach zdrowych, jak i z objawami biegunki (Safwat i in. 1991; Dratwa 2006; Ożgo 2009).

Średnie stężenie przedsionkowego peptydu natriuretycznego w osoczu krwi badanych cieląt wynosiło $80,42 \text{ pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ i było większe od notowanego u osobników dorosłych (Acosta i in. 2000). Wykazane w doświadczeniu różnice osobnicze w koncentracji ANP we krwi obserwowali również Takemura i in. (1994) u cieląt oraz Ito i in. (1990) i Gemelli i in. (1991) u noworodków ludzkich. Takemura i in. (1994) największe stężenie tego hormonu obserwowali po urodzeniu cieląt ($62,7 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$), a najniższe – w 10. dniu ich życia ($11,3 \text{ pmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Według ww. autorów istnieje związek pomiędzy stężeniem we krwi hormonów działających natriuretycznie i diuretycznie a stężeniem hormonów działających antynatriuretycznie i antydiuretycznie.

U badanych cieląt nie obserwowano statystycznie istotnych zmian w stężeniu ANP po zwiększeniu ilości laktozy w preparacie mlekozastępczym. Niemniej jednak po 12 godzinach od podania laktozy obserwowano wzrost stężenia tego hormonu w osoczu krwi cieląt. We wcześniejszych badaniach własnych (Dratwa 2006; Ożgo 2009) wykazano wzrost stężenia ANP w osoczu krwi cieląt wraz z wiekiem. Przy czym w 6. i 7. dniu życia stężenie tego hormonu utrzymywało się na względnie stabilnym poziomie. Przepuszczalnie wzrost stężenia ANP we krwi badanych cieląt nastąpił w odpowiedzi na zwiększone wchłanianie sodu z przewodu pokarmowego. Zwiększona podaż laktozy oraz duża aktywność laktazy u tygodniowych cieląt mogły wpłynąć na zwiększenie stężenia glukozy w przewodzie pokarmowym, co uruchomiło dodatkowe wchłanianie sodu poprzez kotransporter glukozy i sodu. W celu utrzymania stałej ilości sodu we krwi nastąpiło zwiększenie stężenia ANP, którego zadaniem jest zwiększenie wydalania sodu z moczem, a także zahamowanie dalszego wchłaniania sodu z przewodu pokarmowego. Przedsionkowy peptyd natriuretyczny reguluje

resorpcję sodu i wody nie tylko w nerkach, ale również w nabłonku żołądkowo-jelitowym (Godellas i in. 1991). W konsekwencji obserwowano zmniejszenie stężenia sodu w osoczu krwi po 12 godzinach od dodania laktozy do preparatu mlekozastępczego.

Wykazaną w prezentowanych badaniach zmienność osobniczą stężenia wazopresyny w osoczu krwi obserwowali wcześniej Wong i in. (2008) u źrebiąt. Podczas badań średnie stężenie wazopresyny w osoczu krwi cieląt wynosiło $2,75 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ i było większe od stwierdzonego przez Ożgo (2000) u 7. dniowych cieląt ($1,35 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Z wcześniejszych badań prowadzonych w Katedrze (Ożgo 2000) wynika, że stężenie tego hormonu w osoczu krwi cieląt zwiększa się do 7. dnia życia. W drugiej połowie 1. tygodnia życia nie obserwuje się tak dynamicznych zmian stężenia wazopresyny, jakie mają miejsce w pierwszych godzinach po urodzeniu oraz podczas pierwszych 3 dni życia cieląt (Amadiou-Farmakis i in. 1988; Kati-Coulibaly i in. 1989; Ożgo 2000). U badanych cieląt zaobserwowano zmniejszanie się stężenia AVP w osoczu krwi po 12 godzinach od podania preparatu mlekozastępczego z dodatkiem laktozy. Na podstawie wcześniejszych badań Katedry (Ożgo 2000) można wnioskować, że dodanie laktozy do preparatu mlekozastępczego mogło być przyczyną zmniejszenia się stężenia AVP w osoczu krwi badanych cieląt.

W badaniach własnych obserwowano przeciwstawne tendencje zmian stężenia wazopresyny oraz ANP w osoczu krwi cieląt. Czynnikiem, które wpływają na zmiany stężenia obydwu hormonów we krwi, są objętość krążącej krwi oraz molalność osocza krwi (DeLoof i in. 1999; Buemi i in. 2000). W prezentowanych badaniach nie obserwowano zmian w molalności osocza krwi cieląt po dodaniu laktozy. Wykazane istotne statystycznie zmniejszenie stężenia wazopresyny w osoczu krwi badanych cieląt po 12 godzinach od podania laktozy najprawdopodobniej wynikało ze zwiększonego stężenia ANP w tym czasie. Wiadomo, że diuretyczne działanie przedsionkowego peptydu natriuretycznego odbywa się bezpośrednio poprzez ograniczanie wbudowywania AQP2 w błonę komórkową kanalików zbiorczych nerek, ale również pośrednio – poprzez hamowanie sekrecji wazopresyny (Klokkers i in. 2009; Patel 2009). W kolejnych dniach doświadczenia wzrostowi stężenia wazopresyny towarzyszyło zmniejszenie stężenia ANP w osoczu krwi cieląt. Może to wskazywać na wzajemne interakcje pomiędzy tymi dwoma hormonami w regulacji bilansu wody w organizmie tygodniowych cieląt. Należy zaznaczyć, że wazopresyna poprzez AQP2 stymuluje resorpcję wody nie tylko w nerkach, ale również w okrężnicy (Mobasher i in. 2005; Cristia i in. 2007).

W prezentowanych badaniach średnie stężenie aldosteronu w osoczu krwi 6–9-dniowych cieląt wynosiło $58,84 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ i było zbliżone do odnotowanego przez Itoh i in. (1985) u 7-dniowych cieląt ($67,00 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$) oraz przez Amadiou i in. (1989) u 4-dniowych cieląt ($60\text{--}70 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Dużo mniejsze stężenie tego hormonu odnotowali natomiast Riad i in. (1986) u 10-dniowych cieląt ($28,90 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Ponadto inni badacze stwierdzili, że stężenie aldosteronu w osoczu krwi cieląt w pierwszym tygodniu życia jest niższe niż u ich matek w okresie okołoporodowym (Safwate i in. 1991; Ożgo 2001).

Aldosteron jest hormonem odpowiedzialnym za regulację bilansu sodu w organizmie, która odbywa się zarówno poprzez nerki, jak i okrężnicę (Jenkins i in. 1990; Palmer i Frindt 2000). Aldosteron reguluje resorpcję sodu oraz nasila wydalanie potasu w okrężnicy (Jenkins i in. 1990; Singh i in. 2012). Jenkins i in. (1990) wykazali, że rozwój mechanizmów odpowiedzialnych za transport sodu w okrężnicy następuje dużo wcześniej niż w nerkach, co zdaniem

tych autorów może wskazywać, że głównym organem odpowiedzialnym za regulację sodu u wcześniaków noworodków ludzkich jest okrężnica. Badania Martinerie i in. (2009 i 2011) wykonane na noworodkach ludzkich i mysich wskazują na fizjologiczną oporność nerek na aldosteron, związaną ze zmniejszoną ekspresją receptorów tego hormonu w nerkach w momencie urodzenia. Ponadto ww. autorzy stwierdzili, że u noworodków ludzkich przez okres około roku następuje dojrzewanie receptorów aldosteronu, co zbiega się z uzyskaniem dojrzałości czynnościowej nerek. Odmienne obserwacje poczynił Safwate (1985) u 3-dniowych cieląt. Autor ten wykazał, że kanaliki nerkowe tych zwierząt reagują na wlew aldosteronu. W badaniach własnych wykazano istotne zmniejszenie stężenia aldosteronu w osoczu krwi cieląt w 36. godzinie po podaniu laktozy. Zmniejszone stężenie tego hormonu utrzymywało się do 60. godziny po podaniu drugiej dawki laktozy. Z wcześniejszych badań Katedry (Ożgo 2009) wynika, że stężenie ALDO w osoczu krwi cieląt stopniowo się zwiększa w okresie od 2. do 7. dnia życia.

Przypuszczalnie zmniejszenie stężenia aldosteronu w odpowiedzi na podanie laktozy miało za zadanie ograniczenie wchłanianie sodu i usuwanie potasu w okrężnicy, a tym samym utrzymanie stałego stężenia elektrolitów we krwi cieląt. Potwierdza to stabilne stężenie potasu i chlorków w osoczu krwi badanych cieląt oraz powrót w ostatnich dwóch dniach doświadczenia stężenia sodu do poziomu odnotowanego przed podaniem laktozy.

Średnie wartości stężenia wapnia, magnezu oraz żelaza w osoczu krwi badanych cieląt mieściły się w zakresie wartości referencyjnych dla bydła według Winnickiej (2008).

Średnia wartość stężenia wapnia we krwi badanych cieląt wynosiła $2,75 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Większe stężenie wapnia we krwi cieląt w pierwszym tygodniu życia odnotowali Birgele i Ilgaza (2003) – $2,9 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ oraz Herosimczyk i in. (2011) – $3,10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, mniejsze natomiast Jain i in. (2007) – $2,34 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ oraz Mohri i in. (2007) – poniżej $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

W prezentowanych badaniach stwierdzono istotne obniżenie stężenia wapnia w osoczu krwi cieląt po podaniu laktozy, które utrzymywało się na istotnie niższym poziomie do końca doświadczenia. W pierwszym tygodniu życia cieląt obserwuje się wzrost stężenia wapnia we krwi (Birgele i Ilgaza 2003; Herosimczyk i in. 2011), co może potwierdzać wpływ dodatku laktozy, a nie wieku, na wykazane w doświadczeniu zmiany wartości stężenia tego parametru. Obniżone stężenie wapnia (na poziomie $1,297 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) we krwi cieląt z biegunkami obserwowali Tajik i in. (2013). Natomiast Guzelbektes i in. (2007) nie obserwowali statystycznie istotnych zmian stężenia wapnia w surowicy krwi cieląt odwodnionych na skutek biegunki. Jony wapnia uczestniczą w wielu procesach biochemicznych i fizjologicznych zachodzących w komórkach (tkankach), a przede wszystkim są istotne dla mineralizacji kości (Hunt i in. 2008). Utrzymywanie niskiego stężenia wapnia we krwi podczas długotrwałego podawania laktozy może mieć niekorzystny wpływ na rozwijający się organizm.

Fosfor odpowiada za utrzymywanie prawidłowej struktury kości i zębów. Odgrywa także ważną rolę w procesie wzrostu i odbudowy uszkodzonych tkanek, ponadto wchodzi w skład związków bogatoenergetycznych. Średnie stężenie fosforu całkowitego w osoczu krwi badanych cieląt wynosiło $3,61 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ i było większe od wartości referencyjnych dla bydła (od $1,81$ do $2,10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), co jest charakterystyczne dla młodych zwierząt (Winnicka 2008). U krów, w zależności od wydajności mlecznej, stężenie tego makroelementu mieści się

w zakresie od 1,35 do 3,65 mmol·l⁻¹ (Hadżimusić i Krnić 2012; Nazad i in. 2012). Mniejsze stężenie tego wskaźnika (2,49 mmol·l⁻¹) odnotowali Birgele i Ilgaza (2003) we krwi tygodniowych cieląt. W badaniach Jagoš i in. (1981) stężenie fosforu nieorganicznego w osoczu krwi cieląt w wieku od 5. do 7. dnia życia wynosiło 2,69 mmol·l⁻¹ i była to wartość większa od stwierdzonej u ich matek.

Należy zwrócić uwagę na odwrotną tendencję zmian stężenia wapnia oraz fosforu w osoczu krwi badanych cieląt po podaniu laktozy. W prezentowanych badaniach wykazano zwiększenie stężenia fosforu w osoczu krwi cieląt w 36. godzinie po podaniu laktozy. Zwiększenie to utrzymywało się w kolejnej dobie życia cieląt. Walker i in. (1998) obserwowali podwyższone stężenie fosforanów w surowicy krwi 3–7-dniowych cieląt z biegunkami. Ponadto Guzelbektes i in. (2007) wykazali, że stężenie fosforu w surowicy krwi cieląt zwiększa się wraz ze stopniem odwodnienia ich organizmu.

Magnez jest aktywatorem wielu enzymów oraz jest istotny w procesie rozwoju układu kostnego i wzrostu organizmu. W osoczu krwi badanych cieląt średnie stężenie tego makroelementu wynosiło 0,98 mmol·l⁻¹. Herosimczyk i in. (2011) odnotowali nieco większe stężenie magnezu w osoczu krwi tygodniowych cieląt żywionych mlekiem matek (1,09 mmol·l⁻¹). Istotnie większe stężenie tego parametru (na poziomie 5,64 mmol·l⁻¹) odnotowali Jain i in. (2007) w pierwszych 6 dniach życia cieląt. Natomiast niższe stężenie magnezu we krwi cieląt w 1. tygodniu ich życia odnotowali Jagoš i in. (1981) oraz Eshratkhah i in. (2010).

Dodanie laktozy spowodowało wzrost stężenia magnezu w osoczu krwi badanych cieląt. Stężenie tego makroelementu w pierwszym tygodniu życia zdrowych cieląt jest stabilne albo zmniejsza się wraz z wiekiem (Jagoš i in. 1981; Jain i in. 2007; Herosimczyk i in. 2011), dlatego można przypuszczać, że obserwowane zmiany są wynikiem dodawania laktozy do preparatu mlekozastępczego. We krwi cieląt z biegunkami nie obserwowano znaczących zmian w stężeniu tego makroelementu (Michell i in. 1992; Tajik i in. 2013).

Cynk odpowiedzialny jest za prawidłowe funkcjonowanie skóry, układu odpornościowego, enzymów oraz odgrywa istotną rolę w metabolizmie białek, lipidów i cukrów. Średnie stężenie cynku w osoczu krwi badanych cieląt wynosiło 20,28 μmol·l⁻¹ i było większe niż średnia wartość referencyjna dla bydła wynosząca 15,30 μmol·l⁻¹ (Winnicka 2008). Podobne stężenie tego mikroelementu odnotowali Herosimczyk i in. (2011) w osoczu krwi cieląt między 3. a 7. dniem ich życia. Dużo większe stężenie cynku, niż w prezentowanym doświadczeniu, wykazali Jagoš i in. (1981) – zarówno we krwi cieląt w wieku od 5. do 7. dnia życia (39,42 μmol·l⁻¹), jak i we krwi ich matek (26,70 μmol·l⁻¹), a także Jain i in. (2007) we krwi cieląt w pierwszych 6 dniach życia (56 μmol·l⁻¹) oraz u ich matek (52 μmol·l⁻¹).

W dwunastej godzinie po podaniu laktozy wraz z preparatem mlekozastępczym stwierdzono istotne zmniejszenie stężenia cynku w osoczu krwi cieląt, które w kolejnych dniach doświadczenia wróciło do poziomu obserwowanego przed podaniem laktozy. Ranjan i in. (2006) odnotowali małe stężenie tego mikroelementu we krwi cieląt z biegunkami, tłumacząc to zmniejszoną resorpcją i stratami tego pierwiastka w przewodzie pokarmowym oraz zwiększonym zapotrzebowaniem układu immunologicznego na cynk, a także wykorzystaniem jego zasobów tkankowych do syntezy enzymów antyoksydacyjnych. Małe stężenie cynku obserwowano we krwi cieląt z zahamowanym wzrostem i przy różnych zaburzeniach

stanu zdrowia, takich jak zwiększona śmiertelność okołoporodowa, biegunki, powikłania poszczepienne, miopatia i wady serca (Enjalbert i in. 2006).

Miedź jest kofaktorem wielu enzymów uczestniczących m.in. w biosyntezie hemoglobiny, metabolizmie żelaza, odpowiedzi immunologicznej, ochronie przed wolnymi rodnikami. Średnie stężenie miedzi w osoczu krwi cieląt ($14,68 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) było mniejsze niż średnia wartość referencyjna dla tego mikroelementu podana przez Winnicką (2008), wynosząca $18,84 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, zbliżone natomiast do odnotowanego we krwi cieląt między 5. a 7. dniem życia (Jagoś i in. 1981; Herosimczyk i in. 2011). Większe stężenie tego mikroelementu w surowicy krwi cieląt wykazali Jain i in. (2007) w ciągu pierwszych 6 dni życia; wynosiło średnio $37 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

W kolejnych dniach doświadczenia obserwowano stopniowy wzrost stężenia miedzi w osoczu krwi cieląt. Zwiększenie stężenia tego mikroelementu w osoczu krwi cieląt w pierwszym tygodniu życia odnotowali Skrzypczak i in. (2010) oraz Herosimczyk i in. (2011). Dlatego wydaje się, że wzrost stężenia miedzi w osoczu krwi u cieląt w badaniach własnych nie był wynikiem podawania laktozy.

Stwierdzone w prezentowanych badaniach stosunkowo duże stężenie cynku i małe stężenie miedzi w osoczu krwi jest zgodne z wynikami wcześniejszych badań prowadzonych w naszej katedrze (Lepczyński i in. 2011) zarówno na cielętach karmionych mlekiem matek, jak i preparatem mlekozastępczym. Powyższe obserwacje można wyjaśnić konkurencją podczas wchłaniania tych mikroelementów w jelicie (Oestreicher i Cousins 1985). Ponadto stwierdzona niska zawartość miedzi w osoczu krwi może być związana ze znacznym jej wykorzystaniem w nasilonych procesach metabolicznych, między innymi w hemopoezie oraz ograniczonej zdolności wchłaniania tego mikroelementu z preparatów mlekozastępczych (Jagoś i in. 1981; Dörner i in. 1989; Lönnerdal 1996).

Żelazo jest istotnym składnikiem białek (hemoglobiny, mioglobiny) biorących udział w transporcie i magazynowaniu tlenu, a także elementem składowym wielu enzymów odpowiedzialnych m.in. za metabolizm, wytwarzanie energii oraz sprawne funkcjonowanie układu odpornościowego. Średnia wartość stężenia żelaza w osoczu krwi cieląt w okresie badań wynosiła $26,44 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Większe stężenie żelaza w osoczu krwi cieląt, niż wykazane w prezentowanych badaniach, stwierdzili Jagoś i in. (1981), mniejsze natomiast – Knowles i in. (2000), Mohri i in. (2007) oraz Skrzypczak i in. (2010). Zbliżone stężenie żelaza w surowicy krwi cieląt w pierwszych 6 dniach życia, które wynosiło średnio $25,54 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, odnotowali Jain i in. (2007). Zarówno Knowles i in. (2000), Jain i in. (2007), jak i Skrzypczak i in. (2010) obserwowali wzrost stężenia tego mikroelementu w okresie od 3. do 7. dnia życia cieląt. Ponadto Jagoś i in. (1981), Knowles i in. (2000) oraz Mohri i in. (2007) stwierdzili stopniowe zwiększanie stężenia tego mikroelementu w kolejnych tygodniach życia cieląt.

W prezentowanych badaniach nie obserwowano istotnych zmian stężenia żelaza w osoczu krwi cieląt po podaniu laktozy. Również Hugi i in. (1997) nie obserwowali niższego stężenia tego mikroelementu we krwi cieląt, którym podawano laktozę. Należy jednak zwrócić uwagę na małe stężenie żelaza w 60. godzinie po podaniu laktozy. Tajik i in. (2013) obserwowali niskie stężenie tego mikroelementu we krwi cieląt mających biegunkę ($10,03 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Średnia wartość stężenia białka całkowitego w osoczu krwi badanych cieląt wynosiła $4,68 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$ i mieściła się w zakresie wartości referencyjnych podanych przez Winnicką (2008)

dla dorosłego bydła (od 5,1 do 7,1 g·dl⁻¹). Dwukrotnie większe stężenie tego parametru wykazali Herosimczyk i in. (2011) w osoczu krwi cieląt żywionych siarą i mlekiem matek w pierwszym tygodniu życia. Zbliżone do obserwowanego stężenia białka całkowitego w osoczu krwi cieląt w pierwszym tygodniu życia odnotowali Hammon i Blum (1999), Rauprich i in. (2000), Bittrich i in. (2002) oraz Nussbaum i in. (2002).

Po podaniu laktozy wykazano istotne zmniejszenie stężenia białka całkowitego w osoczu krwi tygodniowych cieląt. Knowles i in. (2000) obserwowali stopniowe zmniejszanie się stężenia tego parametru we krwi cieląt w okresie od 6. do 27. dnia życia. Ponadto od 3. do 7. dnia życia obserwuje się zmniejszanie stężenia białka całkowitego we krwi cieląt żywionych preparatem mlekozastępczym, natomiast we krwi cieląt żywionych mlekiem matek nie obserwuje się zmian stężenia tego parametru (Knowles i in. 2000; Rauprich i in. 2000; Herosimczyk i in. 2011). Nieco inne obserwacje poczynili Hammon i Blum (1999), którzy odnotowali większe stężenie białka całkowitego w osoczu krwi cieląt żywionych preparatem mlekozastępczym w 7. dniu życia (46,3 g·l⁻¹) niż we krwi cieląt w 2. dniu życia (43,5 g·l⁻¹). Jednak średnie stężenie tego wskaźnika w osoczu krwi cieląt karmionych jedynie preparatem mlekozastępczym było istotnie mniejsze niż we krwi cieląt, które otrzymywały siarę w pierwszych dniach życia. W nieopublikowanych materiałach na podstawie badań własnych u dwutygodniowych cieląt również odnotowano zmniejszenie stężenia tego wskaźnika po 12 godzinach od dodania laktozy do preparatu mlekozastępczego, a następnie zwiększenie jego stężenia. Ponadto pobieranie krwi na czczo wyeliminowało wpływ pobrania pokarmu na zmianę stężenia białka całkowitego w osoczu krwi badanych cieląt. W 2. dniu życia cieląt nie obserwowano poposiłkowych zmian stężenia białka całkowitego we krwi, natomiast w 7. dniu życia spożycie preparatu mlekozastępczego przyczyniało się do obniżenia stężenia białka całkowitego notowanego do 7 godzin po pobraniu preparatu (Hammon i Blum 1999; Bittrich i in. 2002). Guzelbektes i in. (2007) nie obserwowali istotnych statystycznie zmian stężenia tego parametru w surowicy krwi cieląt odwodnionych na skutek biegunki, co może wskazywać na wpływ laktozy na zmniejszenie się stężenia białka całkowitego w osoczu krwi tygodniowych cieląt.

Średnia wartość stężenia albuminy w osoczu krwi badanych cieląt wynosiła 3,11 g·dl⁻¹ i była niewiele mniejsza od dolnych wartości referencyjnych dla dorosłego bydła, wynoszących od 3,2 do 4,9 g·dl⁻¹ (Winnicka 2008). Większe stężenie tego parametru we krwi tygodniowych cieląt (3,43 g·dl⁻¹) odnotowali Herosimczyk i in. (2011), mniejsze (2,74 g·dl⁻¹) – Birgele i Ilgaza (2003), zbliżone natomiast Rauprich i in. (2000) oraz Ciechanowicz i in. (2010). Rauprich i in. (2000) w 7. dniu życia cieląt wykazali mniejsze stężenie albuminy we krwi cieląt żywionych preparatem mlekozastępczym niż we krwi cieląt żywionych mlekiem matek. Natomiast Hammon i Blum (1999) już od 1. dnia życia obserwowali nieco większe stężenie albuminy we krwi cieląt żywionych preparatem mlekozastępczym niż we krwi cieląt, które otrzymały w pierwszych dniach życia siarę.

W prezentowanych badaniach wykazano zmniejszenie stężenia albuminy w osoczu krwi cieląt po 12 godzinach od podania laktozy. W ostatnim dniu doświadczenia stężenie tego parametru osiągnęło wartość odnotowaną przed podaniem laktozy. W pierwszym tygodniu życia cieląt obserwuje się stopniowy wzrost lub brak istotnych zmian stężenia albuminy wraz z ich wiekiem (Hammon i Blum 1999; Rauprich i in. 2000; Ciechanowicz i in. 2010;

Herosimczyk i in. 2011). Można wnioskować, że zaobserwowane zmniejszenie stężenia albuminy w osoczu krwi cieląt było wynikiem podania laktozy. Ponadto w tym samym czasie w odpowiedzi na podanie laktozy zaobserwowano wzrost ekspresji tego białka w moczu. Można więc sądzić, że zmniejszenie stężenia albuminy we krwi cieląt wynikało z jej zwiększonego wydalania z moczem. Hammon i Blum (1999) oraz Bittrich i in. (2002) odnotowali poposiłkowe zmniejszenie stężenia albuminy we krwi tygodniowych cieląt żywionych preparatem mlekozastępczym. Zbiórka krwi na czczo po 12 godzinach od ostatniego posiłku wyeliminowała bezpośredni wpływ pobrania pokarmu na zmiany stężenia tego wskaźnika w osoczu krwi. Guzelbektes i in. (2007) wykazali, że stężenie albuminy we krwi cieląt odwodnionych na skutek biegunki zwiększa się wraz ze stopniem odwodnienia organizmu.

Istnieje ścisła zależność pomiędzy osoczym stężeniem albuminy a stężeniem wapnia całkowitego w osoczu krwi. Ponieważ jony wapnia w osoczu krwi są związane w 50% z albuminą, zmiany stężenia tego białka powodują zmiany stężenia Ca^{+2} . W prezentowanych badaniach po 12 godzinach od podania laktozy zaobserwowano zmniejszenie stężenia albuminy i wapnia w osoczu krwi badanych cieląt. Jony wapnia oraz magnezu współzawodniczą o miejsca wiążące na powierzchni albuminy. Obniżanie stężenia wapnia w osoczu krwi w kolejnych dniach doświadczenia po podaniu laktozy wraz z preparatem mlekozastępczym przypuszczalnie umożliwiło jonom magnezu związanie się z albuminami. W ostatnich 3 dniach doświadczenia stopniowemu zwiększaniu się stężenia osoczowej albuminy towarzyszyło zwiększanie się stężenia magnezu w osoczu krwi badanych cieląt.

Średnia wartość stężenia glukozy w osoczu krwi badanych cieląt w okresie doświadczenia wynosiła $4,63 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ i była nieco większa od górnej granicy wartości referencyjnych dla bydła, wynoszących od 2,20 do $4,50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Winnicka 2008). Zbliżone stężenia tego parametru u tygodniowych cieląt odnotowali Rauprich i in. (2000), większe (ok. $6,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) – Knowles i in. (2000), a mniejsze ($3,78 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) – Birgele i Ilgaza (2003). Knowles i in. (2000) odnotowali największe stężenie glukozy we krwi cieląt w 3. dniu życia, które następnie zmniejszało się do 9. dnia życia. Natomiast Rauprich i in. (2000) u cieląt żywionych preparatem mlekozastępczym nie obserwowali zmian stężenia tego parametru od 2. do 7. dnia życia. Ponadto u cieląt w wieku od 2. do 7. dnia życia średnio po 2 godzinach od pobrania posiłku obserwuje się zwiększanie stężenia glukozy we krwi, które w kolejnych godzinach utrzymuje się na względnie stabilnym poziomie (Rauprich i in. 2000; Bittrich i in. 2002). U odwodnionych cieląt z biegunkami obserwowano wzrost stężenia glukozy we krwi wraz ze wzrostem stopnia odwodnienia organizmu (Guzelbektes i in. 2007). Hugi i in. (1997) nie obserwowali różnic w stężeniu glukozy w osoczu krwi cieląt żywionych preparatem mlekozastępczym z dodatkiem laktozy, w porównaniu z osoczem krwi cieląt żywionych samym preparatem mlekozastępczym. Trudno jednoznacznie stwierdzić, czy obserwowane stopniowe istotne statystycznie obniżanie się stężenia glukozy w osoczu krwi badanych cieląt w kolejnych godzinach po podaniu laktozy było wynikiem dodania tego dwucukru do preparatu mlekozastępczego czy raczej wynikało z fizjologicznego zmniejszania się tego parametru wraz z wiekiem.

Stężenia mocznika oraz kreatyniny w osoczu krwi są wykorzystywane do oceny i monitorowania natężenia przemian związków azotowych. Birgele i Ilgaza (2003) wskazują na oba para-

metry biochemiczne, których zmiany stężenia w osoczu krwi cieląt mogą służyć do określania przebiegu procesów adaptacyjnych zachodzących we wczesnym okresie noworodkowym.

Zbliżoną średnią wartość stężenia mocznika we krwi do uzyskanej w doświadczeniu ($2,50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) odnotowali Herosimczyk i in. (2011) we krwi cieląt w wieku od 5. do 7. dnia życia, żywionych mlekiem matek ($2,63 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Dwukrotnie większe stężenie tego parametru we krwi odnotowali Birgele i Ilgaza (2003) u tygodniowych cieląt żywionych siarą lub mlekiem matek. Średnie stężenie mocznika we krwi badanych cieląt mieściło się w granicach wartości referencyjnych podanych przez Winnicką (2008) dla dorosłego bydła, wynoszących od 1,66 do $7,47 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Największe stężenie mocznika obserwuje się w pierwszych 2–3 dniach życia zwierząt, następnie zmniejsza się do 7. dnia życia (Knowles i in. 2000; Herosimczyk i in. 2011). We krwi cieląt w pierwszym tygodniu życia zmniejszanie się stężenia mocznika wraz z wiekiem notowali również Bittrich i in. (2002). Natomiast Rauprich i in. (2000) nie obserwowali zmian w stężeniu tego parametru u cieląt żywionych preparatem mlekozastępczym.

W badaniach własnych nie obserwowano istotnych zmian stężenia mocznika w osoczu krwi cieląt po podaniu laktozy. Natomiast Hugi i in. (1997) wykazali mniejsze stężenie tego parametru we krwi cieląt żywionych preparatem mlekozastępczym ze zwiększoną ilością laktozy, w odniesieniu do krwi cieląt z grupy kontrolnej.

Średnie stężenie kreatyniny w osoczu krwi badanych cieląt wynosiło $109,71 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ i mieściło się w granicach wartości referencyjnych dla bydła, wynoszących od 88,40 do $183,00 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Winnicka 2008). Jest to wartość mniejsza od odnotowanej przez Herosimczyk i in. (2011) we krwi cieląt w pierwszych 7 dniach życia żywionych mlekiem matek ($123,61 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), większa od odnotowanej przez Bittrich i in. (2002) u 7-dniowych cieląt żywionych siarą z preparatem mlekozastępczym ($87 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) oraz Rauprich i in. (2000) u cieląt (w wieku od 3. do 7. dnia życia) żywionych jedynie siarą ($91,4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Porównywalne stężenie tego parametru odnotowali Rauprich i in. (2000) w osoczu krwi cieląt 3–7-dniowych żywionych preparatem mlekozastępczym ($119 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

W prezentowanych badaniach nie wykazano istotnego wpływu dodatku laktozy na stężenie kreatyniny w osoczu krwi cieląt. Wielu autorów obserwowało zmniejszanie się stężenia kreatyniny we krwi cieląt w pierwszym tygodniu życia (Knowles i in. 2000; Bittrich i in. 2002; Birgele i Ilgaza 2003; Herosimczyk i in. 2011).

7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Krótkotrwałe podawanie tygodniowym cielętom laktozy, w ilości $1\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ masy ciała, do preparatu mlekozastępczego powoduje istotne zmiany profilu białkowego osocza krwi i moczu.
2. Do białek osocza krwi, które zmieniły swoją ekspresję w odpowiedzi na dodatek laktozy do preparatu mlekozastępczego, należą: adiponektyna, prekursor glikoproteiny α -1-B i prekursor glikoproteiny α -2-HS, izoforma X2 subkomponentu C1r oraz białka zaangażowane w utrzymanie hemostazy organizmu nowo narodzonych cieląt: izoforma X1 łańcucha α fibrynogenu, izoforma X1 łańcucha XIII B czynnika krzepnięcia, łańcuch XIII A czynnika krzepnięcia.
3. Dodatek laktozy do preparatu mlekozastępczego u tygodniowych cieląt powoduje zmniejszenie ekspresji białek osocza krwi uczestniczących w procesach wrodzonej odporności immunologicznej (subkomponentu C1r) oraz zaangażowanych w odpowiedź ostrej fazy (fibrynogenu, glikoproteiny α -1-B), a także wpływa na zmianę ekspresji białek działających ochronnie i przeciwzapalnie – zwiększa ekspresję glikoproteiny α -2-HS i zwiększa oraz zmniejsza ekspresję adiponektyny w zależności od izoformy tego białka; zmniejsza również ekspresję glikoproteiny α -1-B.
4. U tygodniowych cieląt, w odpowiedzi na dodanie laktozy do preparatu mlekozastępczego, obserwuje się zmniejszenie ekspresji białek zaangażowanych w utrzymanie hemostazy organizmu: izoformy X1 łańcucha α fibrynogenu, izoformy X1 łańcucha XIII B czynnika krzepnięcia, łańcucha XIII A czynnika krzepnięcia.
5. Uruchomienie odpowiedzi ostrej fazy i białek zaangażowanych w ten proces (fibrynogenu, glikoproteiny α -2-HS, glikoproteiny α -1-B i albuminy) było prawdopodobnie reakcją na zwiększoną ilość laktozy podawanej cielętom.
6. Dodanie do preparatu mlekozastępczego laktozy, w dawce 1g na 1kg masy ciała, przyczyniło się do zwiększenia ekspresji następujących białek moczu: albuminy surowiczej, preproklusteryny oraz pęcherzykowego integralnego białka błonowego VIP36 związanego z sekrecją klusteryny, które są wskaźnikami sprawności kanalików nerkowych.
7. Duże stężenie przedsionkowego peptydu natriuretycznego i jego zmiany w osoczu krwi cieląt, w odpowiedzi na dodatek laktozy do preparatu mlekozastępczego, mogły mieć związek ze zmianami ekspresji izoform adiponektyny w osoczu krwi.
8. Pomiędzy przedsionkowym peptydem natriuretycznym, wazopresyną i aldosteronem istnieje współzależność czynnościowa, która skutecznie reguluje bilans wodno-elektrolitowy tygodniowych cieląt w odpowiedzi na dodatek laktozy (1g na 1kg m.c.) do preparatu mlekozastępczego. Działanie hormonów potwierdza stabilne stężenie potasu i chlorków w osoczu krwi cieląt oraz powrót w ostatnich 2 dniach doświadczenia stężenia sodu do poziomu notowanego przed dodaniem laktozy do preparatu mlekozastępczego, a także stabilna wartość ciśnienia osmotycznego osocza krwi w czasie doświadczenia.
9. Po pobraniu przez cielęta preparatu mlekozastępczego z dodatkiem laktozy obserwowano również zmiany stężenia niektórych mikro- i makroelementów osocza krwi. Dodanie laktozy zwiększyło stężenie we krwi fosforu nieorganicznego i magnezu, zmniejszyło natomiast stężenie wapnia i cynku. Nie wykazano wpływu podania laktozy na stężenie żelaza i miedzi.

10. U tygodniowych cieląt podanie laktozy, w ilości 1g na 1kg masy ciała wraz z preparatem mlekozastępczym, powoduje zmiany stężenia parametrów biochemicznych istotnych dla rozwijającego się cielęcia noworodka. Wykazano zmniejszenie stężenia białka całkowitego oraz albuminy (białka ostrej fazy) w osoczu krwi w odpowiedzi na podanie laktozy wraz z preparatem mlekozastępczym. Mniejsze stężenie albuminy w osoczu krwi wynikało ze zwiększenia wydalania tego parametru wraz z moczem, wykazane jako wzrost ekspresji tego białka w moczu cieląt po podaniu laktozy. Nie obserwowano zmian stężenia parametrów biochemicznych wskazujących na przemiany związków azotowych i odzwierciedlających czynność nerek, czyli mocznika i kreatyniny. Trudno jednoznacznie określić, czy istotne zmniejszanie się stężenia glukozy w osoczu krwi badanych cieląt w kolejnych dniach doświadczenia było wynikiem dodania laktozy do preparatu mlekozastępczego czy raczej zmian fizjologicznych związanych z dojrzewaniem zwierząt.
11. Wykorzystane w prezentowanych badaniach metody proteomiczne umożliwiły dokładniejsze poznanie przebiegu procesów metabolicznych oraz ocenę zmian procesów fizjologicznych zachodzących w organizmie cieląt poddanych działaniu preparatu mlekozastępczego z dodatkiem laktozy. Wyniki zaprezentowanych badań mogą stanowić wsparcie diagnostyczne i prognostyczne w profilaktyce i (lub) prewencji zootechniczno-weterynaryjnej.

PIŚMIENICTWO

- Abe T., Komatsu M., Takeishi M., Tsunekane T., 1976, The alpha-fetoprotein level in the sera of bovine fetuses and calves. *Jap. J. Vet. Sci.* 38, 339–345.
- Acosta T.J., Ozawa T., Kobayashi S., Hayashi K., Ohtani M., Kraetzl W.D., Sato K., Schams D., Miyamoto A., 2000, Periovarian changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin F2 α , and steroid hormones from bovine mature follicles in vivo. *Biol. Reprod.* 63, 1253–1261.
- Alhaider A.A., Bayoumy N., Argo E., Gader A.G., Stead D.A., 2012, Survey of the camel urinary proteome by shotgun proteomics using a multiple database search strategy. *Proteomics* 12, 3403–3406.
- Amadiou M., Giry J., Barlet J.P., 1989, Effects of synthetic atrial natriuretic factor (ANF) on renin-aldosterone axis in the conscious newborn calf. *J. Dev. Physiol.* 11, 15–18.
- Amadiou-Farmakis M., Barlet J.P., Giry J., Kati-Coulibaly S., 1988, Plasma atrial natriuretic peptide (ANP) and vasopressin changes in calves during the postnatal period. *J. Physiol.* 406, 131.
- Ariëns R.A., Lai T.S., Weisel J.W., Greenberg C.S., Grant P.J., 2002, Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood* 100, 743–754.
- Atyabi N., Gharagozloo F., Nassiri S.M., 2006, The necessity of iron supplementation for normal development of commercially reared suckling calves. *Comp. Clin. Pathol.* 15, 165–168.
- Bahner U., Geiger H., Palkovits M., Lenkei Z., Luft F.C., Heidland A., 2007, Central atrial natriuretic peptide in dehydration. *Ideggyogy Sz.* 60, 130–135.
- Berger R.P., Kochanek P.M., 2006, Urinary S100B concentrations are increased after brain injury in children: a preliminary study. *Pediatr. Crit. Care Med.* 7, 557–561.
- Bialka ostrej fazy u zwierząt, 2003, Red. K. Kostro, Z. Gliński, Lublin, Wydaw. AR w Lublinie.
- Birgele E., Ilgaza A., 2003, Age and feed effect on the dynamics of animal blood biochemical values in postnatal ontogenesis in calves. *Veter. Zootech.* 22, 5–10.
- Bittrich S., Morel C., Philipona C., Zbinden Y., Hammon H.M., Blum J.W., 2002, Physiological traits in preterm calves during their first week of life. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 86, 185–198.
- Blaine E.H., 1990, Atrial natriuretic factor plays a significant role in body fluid homeostasis. *Hypertension* 15, 2–8.
- Boniecka K., 2005, *Białkomocznica neonatalna cieląt*. Praca magisterska. Szczecin, AR (maszynopis).
- Bouley J., Chambon C., Picard B., 2004, Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4, 1811–1824.
- Bozzola E., Meazza C., Arvigo M., Travaglini P., Pagani S., Stronati M., Gasparoni A., Bianco C., Bozzola M., 2010, Role of adiponectin and leptin on body development in infants during the first year of life. *Ital. J. Pediatr.* 36, 26.
- Brenn A., Karger A., Skiba M., Ziegler U., Groschup M.H., 2009, A comprehensive proteome map of bovine cerebrospinal fluid. *Proteomics* 9, 5199–5205.
- Buemi M., Corica F., Di Pasquale G., Aloisi C., Sofi M., Casuscelli T., Floccari F., Senatore M., Corsonello A., Frisina N., 2000, Water immersion increases urinary excretion of aquaporin-2 in healthy humans. *Nephron* 85, 20–26.
- Chan K.C., Chou H.H., Wu D.J., Wu Y.L., Huang C.N., 2004, Diabetes mellitus has an additional effect on coronary artery disease. *Jpn. Heart J.* 45, 921–927.

- Chen H., Zhang L., Li X., Li X., Sun G., Yuan X., Lei L., Liu J., Yin L., Deng Q., Wang J., Liu Z., Yang W., Wang Z., Zhang H., Liu G., 2013, Adiponectin activates the AMPK signaling pathway to regulate lipid metabolism in bovine hepatocytes. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 138, 445–454.
- Chiaradia E., Avellini L., Tartaglia M., Gaiti A., Just I., Scoppetta F., Czernar Z., Pich A., 2012, Proteomic evaluation of sheep serum proteins. *BMC Vet. Res.* 8, 66.
- Ciechanowicz A., Michalek K., Ożgo M., Dratwa-Chałupnik A., Kurpińska A., Klonowska A., Herosimczyk A., Lepczyński A., Niemcewicz M., Stański Ł., Skrzypczak W., 2010, Koncentracja wybranych frakcji białek oraz ich procentowy udział w białku całkowitym osocza krwi cieląt noworodków. *Acta Sci. Pol., Zootechnica* 9, 47–56.
- Coleman C.G., Anrather J., Iadecola C., Pickel V.M., 2009, Angiotensin II type 2 receptors have a major somatodendritic distribution in vasopressin-containing neurons in the mouse hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroscience* 163, 129–142.
- Coombe N.B., Smith R.H., 1973, Absorption of glucose and galactose and digestion and absorption of lactose by the preruminant calf. *Br. J. Nutr.* 30, 331–343.
- Cristià E., Amat C., Naftalin R.J., Moretó M., 2007, Role of vasopressin in rat distal colon function. *J. Physiol.* 578, 413–424.
- D'Ambrosio C., Arena S., Talamo F., Ledda L., Renzone G., Ferrara L., Scaloni A., 2005, Comparative proteomic analysis of mammalian animal tissues and body fluids, bovine proteome database. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 815, 157–168.
- Decramer S., Gonzalez de Peredo A., Breuil B., Mischak H., Monsarrat B., Bascands J.L., Schanstra J.P., 2008, Urine in clinical proteomics. *Mol. Cell Proteomics* 7, 1850–1862.
- Della Donna L., Ronci M., Sacchetta P., Di Ilio C., Biolatti B., Federici G., Nebbia C., Urbani A., 2009, A food safety control low mass-range proteomics platform for the detection of illicit treatments in veal calves by MALDI-TOF-MS serum profiling. *Biotechnol. J.* 4, 1596–1609.
- Deloof S., De Seze C., Montel V., Chatelain A., 1999, Effect of water deprivation on atrial natriuretic peptide secretion and density of binding sites in adrenal glands and kidneys of maternal and fetal rats in late gestation. *Eur. J. Endocrinol.* 141, 160–168.
- Don B.R., Kaysen G., 2004, Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition. *Semin. Dial.* 17, 432–437.
- Dörner K., Dziadzka S., Höhn A., Sievers E., Oldigs H.D., Schulz-Lell G., Schaub J., 1989, Longitudinal manganese and copper balances in young infants and preterm infants fed on breast-milk and adapted cow's milk formulas. *Br. J. Nutr.* 61, 559–572.
- Draisci R., Montesissa C., Santamaria B., D'Ambrosio C., Ferretti G., Merlanti R., Ferranti C., De Liguoro M., Cartoni C., Pistarino E., Ferrara L., Tiso M., Scaloni A., Cosulich M.E., 2007, Integrated analytical approach in veal calves administered the anabolic androgenic steroids boldenone and boldione: urine and plasma kinetic profile and changes in plasma protein expression. *Proteomics* 7, 3184–3193.
- Dratwa A., 2002, Atrial natriuretic peptide – ANP. *Med. Weter.* 58, 108–111.
- Dratwa A., 2006, Atrial natriuretic peptide and renal haemodynamics in newborn calves. *Acta Vet. Brno*, 75, 477–483.
- Dratwa-Chałupnik A., Herosimczyk A., Lepczyński A., Skrzypczak W., 2012, Calves with diarrhea and a water-electrolyte balance. *Med. Weter.* 68, 5–8.

- Dratwa-Chałupnik A., Ożgo M., Herosimczyk A., Lepczyński A., Michałek K., Skrzypczak W.F., 2011, Renal regulation of potassium homeostasis in calves in the first week of life including the role of atrial natriuretic peptide. *Folia Biol. (Krakow)* 59, 157–161.
- Dratwa A., Ożgo M., Skrzypczak W.F., 2004, Udział przedsionkowego peptydu natriuretycznego w regulacji natriurezy i diurezy cieląt noworodków, w: *Noworodek a środowisko*. Wrocław, [b.w.], 7–20.
- Dratwa-Chałupnik A., Wojdyła K., Ożgo M., Lepczyński A., Herosimczyk A., Michałek K., Rogowska-Wrzesińska A., 2014, Defining the urinary proteome of newborn calves. *J. Physiol. Pharmacol.*, 65, Suppl.1, 119 (oral presentation).
- Enjalbert F., Lebreton P., Salat O., 2006, Effects of copper, zinc and selenium status on performance and health in commercial dairy and beef herds: Retrospective study. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 90, 459–466.
- Eshratkhah B., Sadaghian M., Dianat V., 2010, Variations in some plasma macro and micro elements concentrations during different ages of iranian sarabi calves. *Global Veter.* 5, 35–38.
- Fell J.M., Thakkar H., Newman D.J., Price C.P., 1997, Measurement of albumin and low molecular weight proteins in the urine of newborn infants using a cotton wool ball collection method. *Acta Paediatr.* 86, 518–522.
- Fiedler K., Simons K., 1996, Characterization of VIP36, an animal lectin homologous to leguminous lectins. *J. Cell Sci.* 109, 271–276.
- Forterre S., Raila J., Schweigert F.J., 2004, Protein profiling of urine from dogs with renal disease using ProteinChip analysis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16, 271–277.
- Füllekrug J., Scheiffele P., Simons K., 1999, VIP36 localisation to the early secretory pathway. *J. Cell Sci.* 112, 2813–2821.
- Gemelli M., Mami C., De Luca F., Stelitano L., Bonaccorsi P., Martino F., 1991, Atrial natriuretic peptide and renin–aldosterone relationship in healthy newborn infants. *Acta Paediatr. Scand.* 80, 1128–1133.
- Godellas C.V., Gower W.R.Jr., Fabri P.J., Knierim T.H., Giordano A.T., Vesely D.L., 1991, Atrial natriuretic factor: a possible new gastrointestinal regulatory peptide. *Surgery* 110, 1022–1027.
- Górka P., Kowalski Z.M., 2007, Preparaty mlokozastępcze w odchowie cieląt ras mlecznych. *Med. Weter.* 63, 1296–1299.
- Guzelbektes H., Coskun A., Sen I., 2007, Relationship between the degree of dehydration and the balance of acid-based changes in dehydrated calves with diarrhoea. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 51, 83–87.
- Hadžimusić N., Krnić J., 2012, Values of Calcium, Phosphorus and Magnesium Concentrations in Blood Plasma of Cows in Dependence on the Reproductive Cycle and Season. *J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ.* 38, 1–8.
- Hammon H.M., Blum J.W., 1999, Free amino acids in plasma of neonatal calves are influenced by feeding colostrum for different durations or by feeding only milk replacer. *J. Anim. Physiol. A. Anim. Nutr.* 82, 193–204.
- Hara-Kuge S., Ohkura T., Ideo H., Shimada O., Atsumi S., Yamashita, K., 2002, Involvement of VIP36 in intracellular transport and secretion of glycoproteins in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *J. Biol. Chem.* 277, 16332–16339.
- Hayashi M., Arima H., Goto M., Banno R., Watanabe M., Sato I., Nagasaki H., Oiso Y., 2006, Vasopressin gene transcription increases in response to decreases in plasma volume, but not to

- increases in plasma osmolality, in chronically dehydrated rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290, E213–217.
- He W., Huang C., Luo G., Dal Prà I., Feng J., Chen W., Ma L., Wang Y., Chen X., Tan J., Zhang X., Armato U., Wu J., 2012, A stable panel comprising 18 urinary proteins in the human healthy population. *Proteomics* 12, 1059–1072.
- Heegaard P.M.H., Godson D.L., Toussaint M.J.M., Tjørnehoj K., Larsen L.E., Viuff B., Ronsholt L., 2000, The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 77, 151–159.
- Heiss A., Eckert T., Aretz A., Richtering W., Dorp W. van, Schäfer C., Jahnen-Dechent W., 2008, Hierarchical role of fetuin-A and acidic serum proteins in the formation and stabilization of calcium phosphate particles. *J. Biol. Chem.* 283, 14815–14825.
- Herosimczyk A., Lepczyński A., Dratwa-Chałupnik A., Kurpińska A., Klonowska A., Skrzypczak W.F., 2011, Age-related changes of selected blood biochemical indicators in dairy calves during their first week of life. *Folia Biol. (Krakow)*, 59, 25–30.
- Herosimczyk A., Lepczyński A., Ożgo M., Dratwa-Chałupnik A., Michałek K., Skrzypczak W.F., 2013, Blood plasma protein and lipid profile changes in calves during the first week of life. *Pol. J. Vet. Sci.* 16, 425–434.
- Hidaka S., Kranzlin B., Gretz N., Witzgall R., 2002, Urinary clusterin levels in the rat correlate with the severity of tubular damage and may help to differentiate between glomerular and tubular injuries. *Cell. Tissue Res.* 310, 289–96.
- Hjorth L., Helin I., Grubb A., 2000, Age-related reference limits for urine levels of albumin, orosomucoid, immunoglobulin G and protein HC in children. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 60, 65–73.
- Hochstrasser D.F., Frutiger S., Wilkins M.R., Hughes G., Sanchez J.C., 1997, Elevation of apolipoprotein E in the CSF of cattle affected by BSE. *FEBS Lett.* 416, 161–163.
- Hong C.S., Cui J., Ni Z., Su Y., Puett D., Li F., Xu Y., 2007, A computational method for prediction of excretory proteins and application to identification of gastric cancer markers in urine. *Blood* 109, 5511–5515.
- Horadagoda N.U., Knox K.M., Gibbs H.A., Reid S.W., Horadagoda A., Edwards S.E., Eckersall P.D., 1999, Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet. Rec.* 144, 437–441.
- Hugi D., Bruckmaier R.M., Blum J.W., 1997, Insulin resistance, hyperglycemia, glucosuria, and galactosuria in intensively milk-fed calves: dependency on age and effects of high lactose intake. *J. Anim. Sci.* 75, 469–482.
- Hunt J.R., Hunt C.D., Zito C.A., Idso J.P., Johnson L.K. 2008. Calcium requirements of growing rats based on bone mass, structure, or biomechanical strength are similar. *J. Nutr.* 138, 1462–1468.
- Hytinantti T., Kajantie E., Karonen S.L., Andersson S., 2008, Postnatal Changes in Ghrelin, Adiponectin, Insulin and Leptin Concentrations in Term Newborns. *Int. J. Endocrinol. Metab.* 3, 127–134.
- Ignjatovic V., Lai C., Summerhayes R., Mathesius U., Tawfilis S., Perugini M.A., Monagle P., 2011, Age-related differences in plasma proteins: how plasma proteins change from neonates to adults. *PLoS One* 62, www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0017213.

- Inoue T., Nonoguchi H., Tomita K. 2001, Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct. *Cardiovasc. Res.* 51, 470–480.
- Ishioka N., Takahashi N., Putnam F.W., 1986, Amino acid sequence of human plasma alpha 1B-glycoprotein: homology to the immunoglobulin supergene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2363–2367.
- Ito Y., Marumo F., Ando K., Hayashi M., Yamashita F., 1990, The physiological and biological significances of human atrial natriuretic peptide in neonates. *Acta Paediatr. Scand.* 79, 26–31.
- Itoh H., Tamura K., Izumi M., Motoi Y., Funayama Y., 1993, Characterization of serum alpha 1-acid glycoprotein in fetal and newborn calves during development. *Am. J. Vet. Res.* 54, 591–595.
- Itoh N., Murakami D., Naitoh Y., Satoh R., 1985, Plasma aldosterone levels and plasma renin activity during the neonatal period in calves. *Japn. J. Vet. Sci.* 47, 397–401.
- Ix J.H., Shlipak M.G., Brandenburg V.M., Ali S., Ketteler M., Whooley M.A., 2006, Association between human fetuin-A and the metabolic syndrome: data from the Heart and Soul Study. *Circulation* 113, 1760–1767.
- Jagoš P., Dvořák V., Bouda J., 1981, Levels of mineral in the blood plasma of cows and their calves fed from buckets. *Acta Vet. Brno*, 50, 33–41.
- Jahnen-Dechent W., Heiss A., Schäfer C., Ketteler M., . 2011, Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ. Res.* 108, 1494–1509.
- Jain A.K., Sharma I.J., Quadri M.A., Tripathi R.K., 2007, Association of serum electrolytes and minerals of periparturient buffaloes and cows with their neonatal calves as influenced by neem oil. *Buffalo Bull.* 26, 87–90.
- Jenkins H.R., Fenton T.R., McIntosh N., Dillon M.J., and Milla P.J., 1990, Development of colonic sodium transport in early childhood and its regulation by aldosterone. *Gut* 31, 194–197.
- Ježek J., Klopčič M., Klinkon M., 2006, Influence of age on biochemical parameters in calves. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 50, 211–214.
- Jia X., Ekman M., Grove H., Faergestad E.M., Aass L., Hildrum K.I., Hollung K., 2007, Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the early postmortem storage period. *J. Proteome Res.* 6, 2720–2731.
- Kadowaki T., Yamauchi T., 2005, Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* 26, 439–451.
- Kamoda T., Saitoh H., Saito M., Sugiura M., Matsui A., 2004, Serum adiponectin concentrations in newborn infants in early postnatal life. *Pediatr. Res.* 56, 690–693.
- Karbowska J., Kochan Z., 2006, Role of adiponectin in the regulation of carbohydrate and lipid metabolism. *J. Physiol. Pharmacol.* 57, 103–113.
- Kati-Coulibaly S., Giry J., Barlet J.P., 1989, Effects of changes in plasma hepatic-portal and systemic osmolality on plasma concentrations of arginine vasopressin in conscious newborn calves. *J. Dev. Physiol.* 12, 183–187.
- Keller H.L., Gherman L.I., Kosa R.E., Borger D.C., Weiss W.P., Willett L.B., 1998, Kinetics of plasma fructose and glucose when lactose and fructose are used as energy supplements for neonatal calves. *J. Anim. Sci.* 76, 2197–2204.
- Kelly V.C., Kuy S., Palmer D.J., Xu Z., Davis S.R., Cooper G.J., 2006, Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. *Proteomics* 6, 5826–5833.

- Kentsis A., Monigatti F., Dorff K., Campagne F., Bachur R., Steen H., 2009, Urine proteomics for profiling of human disease using high accuracy mass spectrometry. *Proteomics Clin. Appl.* 3, 1052–1061.
- Kharroubi I., Rasschaert J., Eizirik D.L., 2003, Cnop M. Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 1118–1122.
- Klaska I., Nowak J.Z., 2007, Rola układu dopęniacza w fizjologii i patologii. *Post. Hig. Med. Dosw.* 61, 167–177.
- Klokckers J., Langehanenberg P., Kemper B., Kosmeier S., Bally G. von, Riethmüller C., Wunder F., Sindic A., Pavenstädt H., Schlatter E., Edemir B., 2009, Atrial natriuretic peptide and nitric oxide signaling antagonizes vasopressin-mediated water permeability in inner medullary collecting duct cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 297, F693–703.
- Knowles T.G., Edwards J.E., Bazeley K.J., Brown S.N., Butterworth A., Warriss P.D., 2000, Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. *Vet. Rec.* 147, 593–598.
- Krause M.P., Liu Y., Vu V., Chan L., Xu A., Riddell M.C., Sweeney G., Hawke T.J., 2008, Adiponectin is expressed by skeletal muscle fibers and influences muscle phenotype and function. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 295, 203–212.
- Kuhla B., Albrecht D., Kuhla S., Metges C.C., 2009, Proteome analysis of fatty liver in feed-deprived dairy cows reveals interaction of fuel sensing, calcium, fatty acid, and glycogen metabolism. *Physiol. Genomics* 37, 88–98.
- Lai P.C., Huang L.L., Panrucker D.E., Church R.B., Lorscheider F.L., 1981, Distribution of bovine fetuin and albumin in plasma, allantoic and amniotic fluids during development. *J. Reprod. Fertil.* 63, 53–60.
- Lee R.S., Monigatti F., Lutchman M., Patterson T., Budnik B., Steen J.A., Freeman M.R., Steen H., 2008, Temporal variations of the postnatal rat urinary proteome as a reflection of systemic maturation. *Proteomics* 8, 1097–1112.
- Lepczyński A., Herosimczyk A., Dratwa-Chałupnik A., Ożgo M., Michałek K., Malinowski E., Skrzypczak W.F., 2011, Comparative study of selected blood biochemical components in milk or milk-replacer fed calves during the second week of life. *Folia Biol. (Krakow)* 59, 175–181.
- Liao W.S., Conn A.R., Taylor J.M., 1980, Changes in rat $\alpha 1$ -fetoprotein and albumin mRNA levels during fetal and neonatal development. *J. Biol. Chem.* 255, 10036–10039.
- LiLi N., CaiHong W., LiXin D., 2013, Plasma proteomic profiles of healthy and mastitic cows – host responses to bovine mastitis. *Arch. Tierz.* 56, 99.
- Lippolis J.D., Peterson-Burch B.D., Reinhardt T.A., 2006, Differential expression analysis of proteins from neutrophils in the periparturient period and neutrophils from dexamethasone-treated dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 111, 149–164.
- Lisowska-Myjak B., Koper A., Pachecka J., 2008, Wydalanie białka z moczem dla oceny progresji uszkodzenia nerek w nadciśnieniu tętniczym. *Nadciś. Tęł.* 12, 118–126.
- Lönnerdal B., 1996, Bioavailability of copper. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 821S–829S.
- Lorenz I., Rademacher G., Klee W., 1998, Investigations on the development of hyponatremia in older calves with diarrhea. *Tierarztl. Prax. Ausg., G Grosstiere Nutztiere* 26, 133–40.

- Mantzoros C., Petridou E., Alexe D.M., Skalkidou A., Dessypris N., Papathoma E., Salvanos H., Shetty G., Gavrilu A., Kedikoglou S., Chrousos G., Trichopoulos D., 2004, Serum adiponectin concentrations in relation to maternal and perinatal characteristics in newborns. *Eur. J. Endocrinol.* 151, 741–746.
- Martinerie L., Viengchareun S., Delezoide A.L., Jaubert F., Sinico M., Prevot S., Boileau P., Meduri G., Lombès M., 2009, Low renal mineralocorticoid receptor expression at birth contributes to partial aldosterone resistance in neonates. *Endocrinology* 150, 4414–4424.
- Martinerie L., Viengchareun S., Meduri G., Kim H.S., Luther J.M., Lombès M., 2011, Aldosterone postnatally, but not at birth, is required for optimal induction of renal mineralocorticoid receptor expression and sodium reabsorption. *Endocrinology* 152, 2483–2491.
- Mathews S.T., Chellam N., Srinivas P.R., Cintron V.J., Leon M.A., Goustin A.S., Grunberger G., 2000, Alpha2-HSG, a specific inhibitor of insulin receptor autophosphorylation, interacts with the insulin receptor. *Mol. Cell Endocrinol.* 164, 87–98.
- Mitchell A.R., Brooks H.W., White D.G., Wagstaff A.J., 1992, The comparative effectiveness of three commercial oral solutions in correcting fluid, electrolyte and acid-base disturbances caused by calf diarrhoea. *Br. Vet. J.* 148, 507–522.
- Mizejewski G.J., 2001, Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Exp. Biol. Med.* 226, 377–408.
- Mobasheri A., Wray S., Marples D., 2005, Distribution of AQP2 and AQP3 water channels in human tissue microarrays. *J. Mol. Histol.* 36, 1–14.
- Mohri M., Sharifi K., Eidi S., 2007, Haematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: age related changes and comparison with blood composition in adults. *Res. Vet. Sci.* 83, 30–39.
- Morzel M., Terlouw C., Chambon C., Micol D., Picard B., 2008, Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: A central role of HSP27 isoforms. *Meat Sci.* 78, 297–304.
- Mosesson M.W., 2005, Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J. Thromb. Haemost.* 3, 1894–1904.
- Nagaraj N., Mann M., 2011, Quantitative analysis of the intra- and inter-individual variability of the normal urinary proteome. *J. Proteome Res.* 10, 637–645.
- Nappert G., Hamilton D., Petrie L., Naylor J.M., 1993, Determination of lactose and xylose malabsorption in preruminant diarrheic calves. *Can. J. Vet. Res.* 57, 152–158.
- Nazad S., Ramin A.-G., Moghadam G., Asri-Rezaei S., Babapour A., Ramin S., 2012, Relationship between blood urea, protein, creatinine, triglycerides and macro-mineral concentrations with the quality and quantity of milk in dairy Holstein. *Vet. Res. Forum* 3, 55–59.
- Nazifi S., Razavi S.M., Esmailnejad Z., Gheisari H., 2009, Study on acute phase proteins (haptoglobin, serum amyloid A, fibrinogen, and ceruloplasmin) changes and their diagnostic values in bovine tropical theileriosis. *Parasitol. Res.* 105, 41–46.
- Nussbaum A., Schiessler G., Hammon H.M., Blum J.W., 2002, Growth performance and metabolic and endocrine traits in calves pair-fed by bucket or by automate starting in the neonatal period. *J. Anim. Sci.* 80, 1545–1555.
- Oestreicher P., Cousins R.J., 1985, Copper and zinc absorption in the rat: mechanism of mutual antagonism. *J. Nutr.* 115, 159–166.
- Ojala R., Ala-Houhala M., Harmoinen A.P., Luukkaala T., Uotila J., Tammela O., 2006, Tubular proteinuria in pre-term and full-term infants. *Pediatr. Nephrol.* 21, 68–73.

- Olchoway T.W., Linnabary R.D., Andrews F.M., Longshore R.C., 1993, Lactose intolerance in a calf. *J. Vet. Intern. Med.* 7, 12–15.
- Orro T., Jacobsen S., LePage J.P., Niewold T., Alasuutari S., Soveri T., 2008, Temporal changes in serum concentrations of acute phase proteins in newborn dairy calves. *Vet. J.* 176, 182–187.
- Orro T., Nieminen M., Tamminen T., Sukura A., Sankari S., Soveri T., 2006, Temporal changes in concentrations of serum amyloid-A and haptoglobin and their associations with weight gain in neonatal reindeer calves. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 79–88.
- Orro T., Pohjanvirta T., Rikula U., Huovilainen A., Alasuutari S., Sihvonen L., Pelkonen S., Soveri T., 2011, Acute phase protein changes in calves during an outbreak of respiratory disease by bovine respiratory syncytial virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 23–29.
- Ouchi N., Walsh K., 2008, A novel role for adiponectin in the regulation of inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1219–1221.
- Ożgo M., 2001, Renin–angiotensin–aldosterone system versus osmotic pressure of blood plasma in calves in the neonatal period. *Electron. J. Pol. Agric. Univ. Ser. Vet. Med.* 4(2), www.ejpau.medja.pl/volume4/issue2/veterinary/art-03.html.
- Ożgo M., 2009, *Udział enzymu konwertującego w regulacji czynności nerek noworodków cieląt*. Rozprawa habilitacyjna. Szczecin, Wydaw. Uczelniane ZUT.
- Ożgo M., 2000, Zależność między stężeniem AVP i elektrolitami we krwi cieląt w okresie neonatalnym. *Folia Univ. Agric. Stetin.* 39, 119–124.
- Ożgo M., Skrzypczak W.F., Drzeżdżon D., Lepczyński A., Dratwa-Chałupnik A., Michałek, K., Herosińczuk A., 2009, Urinary excretion of low molecular weight proteins in goats during the neonatal period. *J. Physiol. Pharmacol.* 60 (Suppl. 3), 119–125.
- Palmer L.G., Frindt G., 2000, Aldosterone and potassium secretion by the cortical collecting duct. *Kidney Int.* 57, 1324–1328.
- Palviainen M., Raekallio M., Rajamäki M.M., Linden J., Vainio O., 2012, Kidney-derived proteins in urine as biomarkers of induced acute kidney injury in sheep. *Vet. J.* 193, 287–289.
- Patel S., 2009, Sodium balance—an integrated physiological model and novel approach. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* 20, 560–569.
- Piñeiro R., Iglesias M.J., Gallego R., Raghay K., Eiras S., Rubio J., Diéguez C., Gualillo O., González-Juanatey J.R., Lago F., 2005, Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 579, 5163–5169.
- Pink M., Verma N., Rettenmeier A.W., Schmitz-Spanke, S. 2010, CBB staining protocol with higher sensitivity and mass spectrometric compatibility. *Electrophoresis* 31, 593–598.
- Piyaphanee N., Ma Q., Kremen O., Czech K., Greis K., Mitsnefes M., Devarajan P., Bennett M.R., 2011, Discovery and initial validation of α 1-B glycoprotein fragmentation as a differential urinary biomarker in pediatric steroid-resistant nephrotic syndrome. *Proteomics Clin. Appl.* 5, 334–342.
- Price P.A., Lim J.E., 2003, The inhibition of calcium phosphate precipitation by fetuin is accompanied by the formation of a fetuin–mineral complex. *J. Biol. Chem.* 278, 22144–22152.
- Pyo J., Hwang S.I., Oh J., Lee S.J., Kang S.C., Kim J.S., Lim J., 2003, Characterization of a bovine pregnancy-associated protein using two-dimensional gel electrophoresis, N-terminal sequencing and mass spectrometry. *Proteomics* 3, 2420–2427.

- Quigley J.D., Wolfe T.A., Elsasser T.H., 2006, Effects of additional milk replacer feeding on calf health, growth, and selected blood metabolites in calves. *J. Dairy Sci.* 89, 207–216.
- Ranjan R., Naresh R., Patra R.C., Swarup D., 2006, Erythrocyte lipid peroxides and blood zinc and copper concentrations in acute undifferentiated diarrhoea in calves. *Vet. Res. Commun.* 30, 249–254.
- Rauprich A.B., Hammon H.M., Blum J.W., 2000, Influence of feeding different amounts of first colostrum on metabolic, endocrine, and health status and on growth performance in neonatal calves. *J. Anim. Sci.* 78, 896–908.
- Reinhardt T.A., Lippolis J.D., 2006, Bovine milk fat globule membrane proteome. *J. Dairy Res.* 73, 406–416.
- Reinhardt T.A., Lippolis J.D., 2008, Developmental changes in the milk fat globule membrane proteome during the transition from colostrum to milk. *J. Dairy Sci.* 91, 2307–2318.
- Riad F., Lefavre J., Tournaire C., Barlet J.P., 1986, Aldosterone regulates salivary sodium secretion in cattle. *J. Endocrinol.* 108, 405–411.
- Riding G.A., Jones A., Holland M.K., Hill J.R., Lehnert S.A., 2008, Proteomic analysis of bovine conceptus fluids during early pregnancy. *Proteomics* 8, 160–177.
- Rosenberg M.E., Silkensen J., 1995, Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 27, 633–645.
- Roussel A.J., 1992, Neonatal physiology and fluid therapy of calves. *Bov. Pract.* 24, 84–87.
- Rozansky D.J., 2006, The role of aldosterone in renal sodium transport. *Semin. Nephrol.* 26, 173–181.
- Safwate A., 1985, Urinary sodium excretion and the renin-aldosterone system in new-born calves. *J. Physiol.* 362, 261–271.
- Safwate A., Kati-Coulibaly S., Davicco M.J., Giry J., Barlet J.P., 1991, Renin-aldosterone system and arginine vasopressin in diarrhoeic calves. *Br. Vet. J.* 147, 533–537.
- Salas S.P., Giacaman A., Vio C.P., 2004, Renal and hormonal effects of water deprivation in late-term pregnant rats. *Hypertension* 44, 334–339.
- Schäfer-Somi S., Bär-Schadler S., Aurich J.E., 2005, Proteinuria and immunoglobulinuria in neonatal dogs. *Vet. Rec.* 157, 378–382.
- Seifi H.A., Mohri M., Shoorei E., Frzane N., 2006, Using hematological and serum biochemical findings as prognostic indicators in calf diarrhoea. *Comp. Clin. Pathol.* 15, 143–147.
- Sejersen H., Sørensen M.T., Larsen T., Bendixen E., Ingvarsen K.L., 2012, Liver protein expression in dairy cows with high liver triglycerides in early lactation. *J. Dairy Sci.* 95, 2409–2421.
- Seth M., Lamont E.A., Janagama H.K., Widdel A., Vulchanova L., Stabel J.R., Waters W.R., Palmer M.V., Sreevatsan S., 2009, Biomarker discovery in subclinical mycobacterial infections of cattle. *PLoS One* 4, www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0005478.
- Shimada O., Hara-Kuge S., Yamashita K., Tosaka-Shimada H., Yanchao L., Einan, L., Atsumi, S., Ishikawa, H., 2003a, Localization of VIP36 in the post-Golgi secretory pathway also of rat parotid acinar cells. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 1057–1063.
- Shimada O., Hara-Kuge S., Yamashita K., Tosaka-Shimada H., Yanchao L., Yongnan L., Atsumi S., Ishikawa H., 2003b, Clusters of VIP-36-positive vesicles between endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in GH3 cells. *Cell Struct. Funct.* 28, 155–163.
- Shinoda Y., Yamaguchi M., Ogata N., Akune T., Kubota N., Yamauchi T., Terauchi Y., Kadowaki T., Takeuchi Y., Fukumoto S., Ikeda T., Hoshi K., Chung U.I., Nakamura K., Kawaguchi H., 2006,

- Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. *J. Cell. Biochem.* 99, 196–208.
- Singh S.K., O'Hara B., Talukder J.R., Rajendran V.M., 2012, Aldosterone induces active K^+ secretion by enhancing mucosal expression of *Kcnn4c* and *Kcnnal* channels in rat distal colon. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 302, C 1353–1360.
- Skrzypczak W., Dratwa-Chałupnik A., Ożgo M., Michałek K., Lepczyński A., Hejza K., Siwa J., 2010, Effect of converting enzyme inhibitor on copper and iron concentrations of blood plasma in calves during the neonatal period. *Folia Biol. (Krakow)* 58, 119–124.
- Skrzypczak W.F., Drzeżdżon D., 2001, Kidney adaptation of kids and calves newborns to natremia regulation. *Electron. J. Pol. Agric. Univ., Ser. Vet. Med.* 4(2), www.ejpau.media.pl/volume4/issue2/veterinary/art-02.html.
- Skrzypczak W.F., Ożgo M., Lepczynski A., Herosimczyk A., 2011, Defining the blood plasma protein repertoire of seven day old dairy calves – a preliminary study. *J. Physiol. Pharmacol.* 62, 313–319.
- Smykał-Jankowiak K., Niemir Z.I., 2009, Budowa i funkcja C1q składowej dopełniacza oraz jej znaczenie w rozwoju chorób o podłożu autoimmunologicznym. *Pos. Hig. Med. Dośw.* 63, 134–141.
- Solichova P., Karpisek M., Ochmanova R., Hanulova Z., Humenanska V., Stejskal D., Bartek J., 2007, Urinary clusterin concentrations-a possible marker of nephropathy? Pilot study. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech Repub.* 151, 233–236.
- St. Jean G.D., Schmall L.M., Rings D.M., Hoffsis G.F., Hull B.L., 1991, Jejunal mucosal lactase activity from birth to three weeks in conventionally raised calves fed an electrolyte solution on days 5, 6 and 7 instead of milk. *Can. J. Vet. Res.* 55, 86–88.
- Stricker E.M., Hoffmann M.L., 2005, Inhibition of vasopressin secretion when dehydrated rats drink water. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, R1238–1243.
- Suh G.H., Hur T.Y., Son D.S., Choe C.Y., Jung Y.H., Ahn B.S., Lee C.Y., Lee C.G., 2003, Differences in the serum immunoglobulin concentrations between dairy and beef calves from birth to 14 days of age. *J. Vet. Sci.* 4, 257–260.
- Tajik J., Nazifi S., 2013, A preliminary study of the correlations of serum concentrations of electrolytes and trace elements with clinical signs in diarrheic dairy calves. *Pak. Vet. J.* 33, 5–8.
- Takemura N., Koyama H., Sako T., Suzuki K., Motoyoshi S., 1994, Plasma atrial natriuretic peptide in normal calves during the first 10 days of life. *Res. Vet. Sci.* 57, 251–252.
- Talamo F., D'Ambrosio C., Arena S., Del Vecchio P., Ledda L., Zehender G., Ferrara L., Scaloni A., 2003, Proteins from bovine tissues and biological fluids: defining a reference electrophoresis map for liver, kidney, muscle, plasma and red blood cells. *Proteomics* 3, 440–460.
- Talukder M.J., Takeuchi T., Harada E., 2002, Transport of colostral macromolecules into the cerebrospinal fluid via plasma in newborn calves. *J. Dairy Sci.* 85, 514–524.
- Thomas T., Schreiber G., 1985, Acute-phase response of plasma protein synthesis during experimental inflammation in neonatal rats. *Inflammation* 9, 1–7.
- Thongboonkerd V., Klein J.B., Pierce W.M., Jevans A.W., Arthur J.M., 2003, Sodium loading changes urinary protein excretion: a proteomic analysis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 284, F1155–1163.
- Thongboonkerd V., Malasit P., 2005, Renal and urinary proteomics: current applications and challenges. *Proteomics* 5, 1033–1042.

- Toofanian F., Hill F.W.G., Kidder D.E., 1973, The mucosal disaccharides in the small intestine of the calf. *Ann. Rech. Veter.* 4, 57–69.
- Tsukamoto O., Fujita M., Kato M., Yamazaki S., Asano Y., Ogai A., Okazaki H., Asai M., Nagamachi Y., Maeda N., Shintani Y., Minamino T., Asakura M., Kishimoto I., Funahashi T., Tomoike H., Kitakaze M., 2009, Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 53, 2070–2077.
- Tulassay T., Seri I., Rascher W., 1987, Atrial natriuretic peptide and extracellular volume contraction after birth, *Acta Paediatr. Scand.* 76, 444–446.
- Ulutas B., Sahal M., 2005, Urinary GGT/creatinine ratio and fractional excretion of electrolytes in diarrhoeic calves. *Acta Vet. Hung.* 53, 351–359.
- Wait R., Miller I., Eberini I., Cairoli F., Veronesi C., Battocchio M., Gemeiner M., Gianazza E., 2002, Strategies for proteomic with incompletely characterized genomes: the proteome of *Bos taurus* serum. *Electrophoresis* 23, 3418–3427.
- Walker P.G., Constable P.D., Morin D.E., Drackley J.K., Foreman J.H., Thurmon J.C., 1998, A reliable, practical, and economical protocol for inducing diarrhea and severe dehydration in the neonatal calf. *Can. J. Vet. Res.* 62, 205–213.
- Weissinger E.M., Schiffer E., Hertenstein B., Ferrara J.L., Holler E., Stadler M., Kolb H.J., Zander A., Zürbig P., Kellmann M., Ganser A., 2007, Proteomic patterns predict acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 109, 5511–5519.
- Wernicki A., 1996, Prophylaxis of intestinal infections induced by enterotoxic strains of *Escherichia coli* in calves. *Med. Weter.* 52, 615–618.
- Winnicka A., 2008, *Wartości referencyjne podstawowych badań laboratoryjnych w weterynarii*. Warszawa, Wydaw. SGGW.
- Wong D.M., Vo D.T., Alcott C.J., Peterson A.D., Brockus C.W., Hsu W.H., 2008, Plasma vasopressin concentrations in healthy foals from birth to 3 months of age. *J. Vet. Intern. Med.* 22, 1259–1261.
- Wurm S., Neumeier M., Weigert J., Schäffler A., Buechler C., 2007, Plasma levels of leptin, omentin, collagenous repeat-containing sequence of 26-kDa protein (CORS-26) and adiponectin before and after oral glucose uptake in slim adults. *Cardiovasc. Diabetol.* 6, 7.
- Xia C., Zhang H.Y., Wu L., Xu C., Zheng J.S., Yan Y.J., Yang L.J., Shu S., 2012, Proteomic analysis of plasma from cows affected with milk fever using two-dimensional differential in-gel electrophoresis and mass spectrometry. *Res. Vet. Sci.* 93, 857–861.
- Yamauchi T., Kamon J., Ito Y., Tsuchida A., Yokomizo T., Kita S., Sugiyama T., Miyagishi M., Hara K., Tsunoda M., Murakami K., Ohteki T., Uchida S., Takekawa S., Waki H., Tsuno N.H., Shibata Y., Terauchi Y., Froguel P., Tobe K., Koyasu S., Taira K., Kitamura T., Shimizu T., Nagai R., Kadowaki T., 2003, Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762–769.
- Yang Y., Zhao X., Zhang Y., 2009, Comparative Proteomic Analysis of Plasma from Clinical Healthy Cows and Mastitic Cows. *Agric. Sci. China* 8, 1263–1269.
- Zimmerli L.U., Schiffer E., Zurbig P., Good D.M., Kellmann M., Mouis L., Pitt A.R., Coon J.J., Schmieder R.E., Peter K.H., Mischak H., Kolch W., Delles C., Dominiczak A.F., 2008, Urinary proteomic biomarkers in coronary artery disease. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 290–298.

Summary

The impact of lactose addition to milk replacer on protein profiles of blood plasma and urine and the renal mechanisms to regulate the balance of water and electrolytes in calves

Among the main causes of significant mortality in neonatal calves, the disorders of water and electrolyte homeostasis are mentioned. Excessive amount of lactose in milk replacer, or an oversupply of milk substitute preparation to calves contributes to the loss of water and electrolytes in faeces. Kidneys and hormone system are responsible for maintaining the balance of water and electrolytes. Proteomic analyses are helpful to study accurately metabolic processes that allow to search proteins essential for the examined biological processes.

Therefore, studies were undertaken with the main objective to find relationships, if any, between proteins of blood plasma and urine, showing a change in the expression of selected biochemical parameters of blood plasma (ANP, ALDO, AVP, total protein, albumin, Na^+ , K^+ , Cl^- , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , P_j , Mg^{+2} , Ca^{+2} , glucose, urea, creatinine) in one week old calves after a short-lived lactose addition to milk replacer.

The study was conducted on 8 calves aged from 6 to 9 days. The calves were fed on milk-replacer formula twice a day at an amount corresponding to 10% of body weight per day. On the 6th day of life (during evening feeding) and on the 7th day (during morning feeding) lactose monohydrate was added to the milk replacer at an amount of $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ of body weight. Blood and urine samples were collected once - always before the evening feeding of animals. The proteomic analysis of blood plasma and urine was performed, using 2-D electrophoresis in combination with mass spectrometry of MALDI-TOF type. In blood plasma, the concentration of ANP, ALDO, AVP, and of electrolytes along with chosen biochemical parameters were denominated, furthermore osmotic pressure was set out.

The results showed that a short-lived lactose addition at an amount of $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ body weight to milk replacer designated for one week old calves causes significant changes in the protein profile of the blood plasma and urine.

The lactose addition to milk replacer of a week old calves reduces the expression of blood plasma proteins, involved in the processes of innate immune response (C1r subcomponent) and involved in the acute phase response (fibrinogen, glycoprotein α -1-B), and also affects the change in the expression of proteins, acting protectively and anti-inflammatorily - increases the expression of glycoprotein α -2-HS, increases and decreases the expression of adiponectin depending on its isoform, also reduces the expression of glycoprotein α -1-B.

In a week old calves, in response to the addition of lactose to milk replacer, the reduced expression of proteins involved in maintaining body hemostasis is observed - X1isoform of α fibrinogen chain, X1isoform of XIII B coagulation factor chain, XIII A coagulation factor chain.

Adding lactose to milk replacer led to increased urine protein expression: albumin serum, preproclusterine and follicular integral membrane protein VIP36 associated with the secretion of clusterine, which indicate the efficiency of renal tubules.

High concentrations of atrial natriuretic peptide and its changes in blood plasma of calves, in response to the addition of lactose to milk replacer, could be related to changes in the expression of adiponectin isoforms in blood plasma.

There exists a functional interdependence between atrial natriuretic peptide, vasopressin and aldosterone, which effectively regulates the balance of water and electrolytes of one week old calves in response to the addition of lactose (1 g per 1 kg of body weight) to milk replacer. The activity of hormones is confirmed by stable levels of potassium and chlorides in blood plasma of calves and the return of sodium concentration to that observed before the administration of lactose in the last two days of the experiment as well as a stable value of the osmotic pressure of blood plasma during the experiment.

After the calves had milk replacer with lactose, changes in the concentration of some micro- and macro-elements of blood plasma were also observed. The addition of lactose increased levels of inorganic phosphorus and magnesium in blood, decreased, however, the concentration of calcium and zinc. No impact of lactose on the concentration of iron and copper was proved.

Adding lactose in an amount of 1 g per 1 kg of body weight to the milk replacer for one week old calves causes changes in biochemical parameters concentration crucial to the developing neonate. A reduction of total protein concentration and albumin (acute phase protein) in blood plasma in response to lactose administration with milk replacer was demonstrated. Lower levels of albumin concentration in blood plasma resulted from its increased excretion in the urine due to increased expression of this protein in calves urine after lactose administration. There were no changes in the concentration of biochemical parameters, indicating the transformation of nitrogen compounds and reflecting renal function, ie. urea and creatinine.

Proteomic methods used in the present study allowed to learn more on the metabolic processes and to evaluate changes in physiological processes in calves, having a diet, containing lactose. The results of the presented study can be a diagnostic and prognostic support in prophylaxis and (or) prevention in animal husbandry and veterinary medicine.

Zusammenfassung

Einfluss des Laktosezusatzes zum Milchersatzpräparat auf Blutplasma- und Urinproteinprofil sowie Nierenmechanismen der Regulierung des Wasser-Elektrolyt-Haushalts bei Kälbern

Zu den Hauptgründen der Mortalität von Kälbern im Neonatalalter werden Störungen der Wasser-Elektrolyt-Homöostase gezählt. Ein zu hoher Laktosegehalt im Milchersatzpräparat bzw. eine zu hohe Zufuhr von Milchersatzpräparaten stellen bei Kälbern Faktoren dar, die den Wasser- und Elektrolytenverlust mit Stuhl begünstigen. Für die Aufrechterhaltung des Wasser-Elektrolyt-Gleichgewichts sind die Nieren und das Hormonsystem verantwortlich. Bei der Erforschung des Ablaufs metabolischer Prozesse erweisen sich proteomische Analysen als behilflich, denn sie lassen Proteine herausfinden, die für die erforschten biologischen Prozesse von Bedeutung sind.

Angesichts des Obigen wurden Untersuchungen angestellt, deren Hauptzweck es war, eventuelle Zusammenhänge zwischen in ihrer Expression veränderten Blutplasma- und Urinproteinen und ausgewählten biochemischen Parametern des Blutplasmas (ANP, ALDO, AVP, Gesamteiweiß, Albumin, Na^+ , K^+ , Cl^- , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , P_j , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Glukose, Harnstoff, Kreatinin) bei einwöchigen Kälbern nach einem kurzfristigen Laktosezusatz zum Milchersatzpräparat zu eruieren.

Die Untersuchungen wurden an 8 Kälbern zwischen dem 6. und 9. Lebenstag durchgeführt. Die Kälber wurden zweimal täglich mit einem Milchersatzpräparat in einer Tagesmenge gefüttert, die 10% ihres Körpergewichts entsprach. Im 6. Lebenstag (während der Abendfütterung) und im 7. Lebenstag (während der Morgenfütterung) wurde dem Milchersatzpräparat Laktosemonohydrat in einer Menge von $1\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ des Körpergewichts zugesetzt. Die Blut- und Urinprobenentnahmen erfolgten einmal täglich jeweils vor der Abendfütterung.

Die proteomische Blutplasma- und Urinanalyse wurde mittels 2-D-Elektrophorese in Verbindung mit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie durchgeführt. Im Blutplasma wurden Konzentrationen von ANP, ALDO, AVP, Elektrolyten und ausgewählten biochemischen Parametern sowie der osmotische Druck bestimmt.

Die ermittelten Werte zeigten, dass ein kurzfristiger Laktosezusatz zum Milchersatzpräparat in einer Menge von $1\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ des Körpergewichts zu relevanten Änderungen des Blutplasma- und Urinproteinprofils bei einwöchigen Kälbern führt.

Der Laktosezusatz zum Milchersatzpräparat führt bei einwöchigen Kälbern zur Reduzierung der Expression der Blutplasmaproteine, die an Prozessen der angeborenen Immunantwort (Subkomponente C1r) und an der Akute-Phase-Antwort (Fibrinogen, α -1-B-Glykoproteine) beteiligt sind, sowie zur Änderung der Expression schützender und antiinflammatorischer Proteine –er steigert die Expression des α -2-HS-Glykoproteins, steigert bzw. reduziert die Expression des Adiponektins (je nach seiner Isoform) und reduziert die Expression des α -1-B-Glykoproteins.

Bei einwöchigen Kälbern wird in Reaktion auf den Laktosezusatz zum Milchersatzpräparat eine Reduzierung der Expression von Proteinen beobachtet, die an der Aufrechterhaltung der

Körper-Homöostase beteiligt sind –X1-Isoformen der α -kette des Fibrinogens, X1-Isoform der XIII-B-Kette des Gerinnungsfaktors und der XIII-A-Kette des Gerinnungsfaktors.

Der Laktosezusatz zum Milchersatzpräparat trug zur Steigerung der Expression von Indikatoren der Leistungsfähigkeit der Nierentubuli bildenden Urinproteinen wie Serumalbumin, Preproklusterin und vesikulärem integralem Membranprotein VIP36, das mit der Sekretion des Clusterins zusammenhängt, bei.

Eine hohe Konzentration des atrialen natriuretischen Peptids und ihre Änderungen im Blutplasma der Kälber als Reaktion auf den Laktosezusatz zum Milchersatzpräparat können mit den Änderungen der Expression der Adiponektin-Isoformen im Blutplasma zusammenhängen.

Zwischen dem atrialen natriuretischen Peptid, Vasopressin und Aldosteron besteht eine funktionelle Abhängigkeit, die den Wasser-Elektrolyt-Haushalt bei einwöchigen Kälbern in Reaktion auf den Laktosezusatz (1g pro 1kg KG) wirksam reguliert. Die Wirkung der Hormone wird durch die stabile Konzentration von Kalium und Chloriden im Blutplasma und das Wiederreichen der Natriumkonzentration von vor der Laktosezufuhr in den letzten zwei Tagen des Versuchs sowie den stabilen Wert des osmotischen Drucks des Blutplasmas im Laufe des Experiments nachgewiesen.

Nach Verzehr des Milchersatzpräparats mit Laktosezusatz durch Kälber wurden auch Änderungen der Konzentration mancher Spuren- und Makroelemente im Blutplasma beobachtet. Der Laktosezusatz steigerte die Blutkonzentration von anorganischem Phosphor und Magnesium und reduzierte die Calcium- und Zinkkonzentration. Der Laktosezusatz beeinflusste die Eisen- und Kupferkonzentration nicht.

Der Laktosezusatz zum Milchersatzpräparat in einer Menge von 1g pro 1kg des Körpergewichts führt bei einwöchigen Kälbern zu Änderungen biochemischer Parameter, die für die Entwicklung der Neugeborenen relevant sind. Nachgewiesen werden konnte die Reduzierung des Gesamteiweißes und Albumins (Akute-Phase-Protein) im Blutplasma als Reaktion auf die Laktosezufuhr mit dem Milchersatzpräparat. Die reduzierte Albuminkonzentration im Blutplasma ergab sich aus der gesteigerten Ausscheidung des Indikators mit der Urin infolge der gesteigerten Expression dieses Proteins im Urin der Kälber nach Laktosezufuhr. Änderungen biochemischer Parameter, die auf Umwandlung von Stickstoffverbindungen hinweisen und Nierenfunktion widerspiegeln würden, d.i. von Harnstoff und Kreatinin wurden nicht beobachtet.

Die in den präsentierten Untersuchungen angewandten proteomischen Methoden ermöglichten eine genauere Erforschung der metabolischen Prozesse und Beurteilung der Änderungen physiologischer Prozesse, zu denen es bei Kälbern unter Einfluss der Fütterung mit Laktosezusatz kommt. Ergebnisse der präsentierten Untersuchungen können eine diagnostische wie prognostische Unterstützung für die zootechnische und tierärztliche Prophylaxe und (oder) Prävention bilden.



Biblioteka Główna
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu
Technologicznego w Szczecinie
W.142676



012-142676-00-0

ISBN 978-83-7663-185-1