
ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL. XXII, 46

SECTIO EE

2004

Pracownia Biologii Rozrodu Katedry Higieny Zwierząt i Środowiska
Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt Akademii Rolniczej w Lublinie
Univerzita Veterinárskeho Lekárstva, Košice, Slovenská Republika

HANNA BIS-WENCEL, LEON SABA,
MONIKA PYZIK-MOLEDA, BEATA LIKOS-GRZESIAK,
BOŻENA NOWAKOWICZ-DĘBEK, OLGA ONDRAŠOVIČOVÁ

*Kształtowanie się wybranych wskaźników
stanu oksydacyjnego u lisów polarnych
w zależności od wieku i warunków utrzymania**

Development of Some Oxidation State Indices at Polar Foxes in Relation to
Their Age and Maintenance Conditions

Wolne rodniki tlenowe (WRT) ze względu na wysoką niespecyficzną reaktywność mogą być niebezpieczne dla zdrowia zwierząt. Wynika to z możliwości wzrostu ich ilości w organizmie, co w rezultacie doprowadza do zachwiania równowagi między antyoksydantami a prooksydantami na rzecz utlenienia. W konsekwencji prowadzi to do pojawienia się stanu zwanego stresem oksydacyjnym. Wiele badań klinicznych potwierdza, iż istnieje związek pomiędzy stresem oksydacyjnym a zaburzeniami stanu zdrowia. Stan ten nie musi być ich główną, bezpośrednią przyczyną, niemniej jednak ma swoje ważne miejsce w całym łańcuchu zdarzeń, które prowadzą do powstania choroby polietiologicznej i rozwoju towarzyszących objawów (1, 4, 11). W związku z tym istotne wydają się źródła wolnych rodników, które mogą tworzyć się w organizmie zarówno pod wpływem czynników endo-, jak i egzogennych. Do tych ostatnich należy zaliczyć m.in. żywienie, promieniowanie ultrafioletowe, a nade wszystko substancje zanieczyszczające środowisko.

W hodowli zwierząt futerkowych mięsożernych, a szczególnie lisów, istnieje ryzyko narażenia organizmu zwierzęcia na stres oksydacyjny, będący wynikiem zanieczyszczenia powietrza. Femy zwierząt futerkowych są bowiem źródłem ponad 40 substancji odorotwórczych, głównie związków siarkoorganicznych,

* Praca finansowana ze środków KBN w latach 2003-2004, jako projekt badawczy nr 3 PO6Z 054 24

ketonów, aldehydów, alkoholi oraz węglowodorów alifatycznych i aromatycznych (6, 8, 9). Związki te charakteryzują się nie tylko znaczną uciążliwością zapachową, ale niejednokrotnie są to także substancje toksyczne czy kancerogenne dla ludzi i zwierząt (5, 6, 9). Lotne substancje gazowe wytwarzane są tutaj nie tylko podczas złożonych procesów trawiennych zachodzących w przewodzie pokarmowym, powstają również na skutek złożonych reakcji rozkładu, jakie zachodzą w odchodach opadających lub zalegających pod klatkami. Nie bez znaczenia pozostaje także wpływ żywienia karmą wysokoenergetyczną i wysokobiałkową, jak odpady rybne czy mięsne, które łatwo ulegają procesom rozkładu (5, 6).

Celem pracy było przedstawienie kształtowania się wybranych parametrów, uznawanych za markery stanu antyoksydacyjnego, u lisów zróżnicowanych wiekowo i hodowanych w różnych warunkach fermowych.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na fermie lisów polarnych C, położonej w południowo-wschodniej części kraju. Obiekt otoczony był szerokim pasem zieleni, stanowiącym naturalną barierę przed rozprzestrzenianiem się odorów na dalsze odległości. Obsada stada podstawowego wynosiła około 50 samic. Lisy żywione były karmą o przeciętnej, w stosunku do zalecanych norm, koncentracji energii i średnim udziale poszczególnych składników, to jest wartość energetyczna 1 kg karmy wynosiła 5468 KJEM przy udziale energii z białka 32,4%, tłuszczu 46,9% i cukrów 20,7%.

Podstawę do badań stanowiło wydzielenie dwóch grup po 6 samic stada podstawowego oraz ich potomstwa, z czego jedna utrzymywana była w pomieszczeniu zamkniętym z wyposażeniem w wentylację grawitacyjną, druga zaś w klatkach na wolnym powietrzu. Podział ten pozwolił na wykazanie ewentualnego wpływu lotnych zanieczyszczeń gazowych na stan zdrowia zwierząt przebywających w odmiennych warunkach fermowych.

Zwierzęta były zróżnicowane wiekowo. Krew do badań pobrano w miesiącu marcu od matek oraz w sierpniu od ich potomstwa. Badania osocza objęły oznaczenie: całkowitego stężenia glutationu (GSH-GSSG), całkowitej aktywności oksydacyjnej (TAS), aktywności dysmutazy nadnadtlenkowej (EC-SOD) i peroksydazy glutationowej (GPx). Ponadto oznaczono FRAP, czyli całkowitą zdolność antyoksydacyjną i białko rozpuszczalne. Całkowitą aktywność antyoksydacyjną określono przy pomocy testu – *Total Antioxidant Status* firmy Randox. *FRAP* na podstawie metody opisaną przez Benzie i Straina (2). Oznaczenia całkowitego stężenia glutationu (GSH+GSSG) dokonano według metody Akerbooma i Siesa (1). Pomiar aktywności EC-SOD wykonano metodą adrenalinową według Misra (1). Do oznaczania aktywności peroksydazy glutationowej posłużono się testem diagnostycznym RANSEL firmy RANDOX. Poziom białka oznaczono metodą Lowrego (1). Oznaczenia wykonano przy użyciu spektrofotometru CE 7200 (dwuwiązkowego) firmy CECIL (Wielka Brytania).

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, wykorzystując metodę ANOVA. Wartości w poszczególnych pomiarach scharakteryzowano średnią arytmetyczną ($\bar{x}$) i odchyleniem standardowym (SD).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Odpowiedź na zaistniały stres oksydacyjny wyraża się określonym stanem antyoksydacyjnym, który można przedstawić w formie aktywności całkowitej.

TAS jest doskonałym markerem tego stanu, gdyż pomiędzy antyoksydantami zachodzą liczne interakcje, które są łatwe do przeoczenia przy indywidualnych oznaczeniach. Ponadto oznaczenie wszystkich antyoksydantów jest niemożliwe, gdyż część z nich nie została dotychczas zidentyfikowana (1).

Tab. 1. Poziomy wybranych wskaźników stanu antyoksydacyjnego
The levels of some antioxidation state indices

	Grupa wiekowa	Ferma		Pomieszczenie	
		średnia	odchylenie	średnia	odchylenie
Total	1	0,0035 ^a	0,00176	0,0033 ^a	0,0015
μmol/mgb	2	0,0098 ^b	0,00172	0,0085 ^b	0,0021
FRAP	1	4,88 ^a	0,75	3,98 ^a	1,352
nmol/mgb	2	11,57	6,00	4,92	0,948
GSH+GSSG	1	0,000692 ^a	0,00012	0,000973 ^a	0,00045
nmol/mgb	2	0,00324	0,00081	0,00078	0,00022
EC-SOD	1	0,0435 ^a	0,0346	0,0123 ^a	0,0100
U/mgb	2	0,1523 ^b	0,0670	0,142 ^b	0,0247
GPX	1	0,195	0,046	0,134	0,0327
U/mgb	2	0,156	0,022	0,154	0,0068
Białko	1	82,99 ^a	10,38	98,66 ^a	20,08
mg/ml	2	53,27 ^b	7,72	54,06 ^b	2,41

1 – zwierzęta dorosłe (matki), 2 – zwierzęta młode (potomstwo), ^{a, b} Istotność różnic między grupami, średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy ($p < 0,05$)

Całkowita aktywność oksydacyjna (TAS) u lisów dorosłych, utrzymywanych w klatkach kształtowała się na poziomie 0,0035 μmol/mgb i była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu z lisami przebywającymi w pomieszczeniu 0,0033 μmol/mgb. Podobnie przedstawiała się sytuacja w odniesieniu do ich potomstwa. Dodatkowo dokonano oznaczenia całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (FRAP). Istotne statystycznie różnice zaobserwowano u matek utrzymywanych w różnych warunkach fermowych.

Glutation (GSH+GSSG) należy do antyoksydantów działających na zasadzie mechanizmu nieenzymatycznego. Grupa tiolowa glutationu łatwo reaguje z wolnymi rodnikami – najszybciej z rodnikiem hydroksylowym, nieco wolniej z rodnikami organicznymi występującymi w fazie wodnej. Reakcje glutationu z wolnymi rodnikami substancji organicznych (w tym wolnymi rodnikami białek i innych makrocząsteczek) mogą prowadzić do „naprawy” tych cząsteczek kosztem tworzenia wolnego rodnika glutationu (1). Bierze udział w odtwarzaniu

uszkodzonych składników komórki. Warto tutaj jednocześnie podkreślić, iż główną jego funkcją jest utrzymanie grup tiolowych białek w stanie zredukowanym, co w wielu przypadkach jest wręcz niezbędne dla aktywności funkcjonalnej białek. Interesujący jest także fakt, iż obniżenie jego stężenia do połowy wartości uznawanych za referencyjne z reguły nie prowadzi do zauważalnych następstw fizjologicznych. Co więcej, enzymy współdziałające z GSH w komórce, nawet w warunkach istotnego obniżenia tego tripeptydu, nie zmniejszają swojej aktywności. Dopiero znaczny spadek stężenia GSH obniża ich efektywność (1). Poziom (GSH+GSSG) u dorosłych lisów przebywających w klatkach był statystycznie istotnie niższy ($0,000692 \text{ nmol/mgb}$) w porównaniu z lisami przebywającymi w zamknięciu ($0,00097 \text{ nmol/mgb}$).

Ważną rolę w systemie obrony przed atakiem WRT pełnią enzymy antyoksydacyjne. Do nich należą m.in. dysmutaza ponadtlenkowa (EC-SOD) oraz peroksydaza glutationu (GPx). Enzymy te metabolizują wolne rodniki ($\text{O}_2^{\cdot}$ w przypadku SOD) bądź to produkty pośrednie (H_2O_2 w przypadku GPx) do mniej toksycznych lub nietoksycznych produktów. Często EC-SOD nazywany jest „miejscowo specyficznym” enzymem ochronnym. Związane jest to z analogią do miejscowego, specyficznego tworzenia rodnika $\cdot\text{OH}$. (1,7)

Warto tutaj jednocześnie podkreślić, że aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w płynach pozakomórkowych jest niższa niż wewnątrz komórek. Pomimo tego ochrona powierzchni komórek jest chroniona przed anionorodnikiem ponadtlenkowym przez związane z nimi małe ilości EC-SOD (1). W czasie przeprowadzonych badań poziom EC-SOD zarówno u dorosłych, jak i młodych lisów przebywających w zamknięciu osiągnął statystycznie istotnie niższe wartości w porównaniu ze zwierzętami zamkniętymi w klatkach.

Peroksydaza glutationu (GPx) jest enzymem adaptatywnym, jej aktywność rośnie w odpowiedzi na stres oksydacyjny (10). Katalizuje ona redukcję nadtlenu wodoru i nadtlenków organicznych przez zredukowany glutation. W komórkach człowieka stwierdzono występowanie czterech różnych form peroksydazy glutationowej. Pierwsza z nich to wewnątrzkomórkowa, zwana „klasyczną” (cGPx). Występuje ona w różnych komórkach, m.in. w erytrocytach, a jej zadaniem jest ochrona komórek przed stresem oksydacyjnym, zwłaszcza nadtlaniem wodoru. Kolejną formą jest GI-GPx, czyli peroksydaza żołądkowo-jelitowa, występująca w ścianach przewodu pokarmowego. Jej obecność stwierdza się także w wątrobie i niektórych liniach komórek nowotworowych. Stanowi barierę przed nadtlenkami i ksenobiotykami, które przedostały się do przewodu pokarmowego (3). Forma osoczowa (pGPx) występuje głównie w płynach pozakomórkowych jak również w tkankach, które pozostają z nimi w kontakcie (nerki, łożysko). Ostatnią formą jest peroksydaza glutationowa wodoro-tlenków fosfolipidów (PHGPx). Największe ilości tego enzymu u ssaków

stwierdza się w jądrach samców. Ciekawe, że występując w mitochondriach plemników odpowiada prawie za połowę całkowitej zawartości białka zewnętrznej ich błony mitochondrialnej, a w dojrzałych plemnikach jest nieaktywna. Z pewnością odgrywa tam istotną fizjologiczną rolę, ponieważ w plemnikach bezpłodnych mężczyzn stwierdza się znacznie mniejsze ilości tego enzymu (1). Poziomy peroksydazy glutationowej u lisów utrzymywanych w klatkach były wyższe w porównaniu z lisami przebywającymi w zamknięciu.

W czasie badań dokonano także pomiaru białka rozpuszczalnego. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 1. Jego wartość w przypadku dorosłych lisów utrzymywanych w klatkach kształtowała się na poziomie 82,9 mg/ml i była statystycznie istotnie niższa w porównaniu z poziomem białka zwierząt przebywających w zamknięciu (98,66mg/ml). Analogicznie przedstawiała się sytuacja w odniesieniu do młodych (klatka – 53,23 mg/ml; pomieszczenie – 54,06 mg/ml).

Ze względu na fakt, iż brak jest publikacji, do których można byłoby odnieść uzyskane wyniki, przedstawione wartości należy traktować jako badania wstępne.

WNIOSKI

1. Niższe wartości parametrów antyoksydacyjnych stwierdzono, z wyjątkiem glutationu i peroksydazy glutationowej u matek, co świadczy o możliwości wystąpienia u nich stresu oksydacyjnego.

2. Istotny wpływ na kształtowanie się poziomów przeciwutleniaczy miały warunki chowu. W pomieszczeniu, gdzie stężenia gazów są wyższe, zarówno u matek, jak i ich potomstwa odnotowano niższe wartości antyoksydantów w porównaniu ze zwierzętami utrzymywanymi w klatkach na otwartej przestrzeni.

PIŚMIENICTWO

1. Bartosz G.: *Druga twarz tlenu*. PWN, Warszawa 2003.
2. Benzie I. F. F., Strain J. J.: The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of „Antioxidant Power”: the FRAP Assay, *Anal. Biochem.* 239, 70-76, 1996.
3. Brigelrius-Flohe R., Muller C., Menard J., Florian S., Schmehl K., Winkler K.: Functions of Gl-GPx: Lessons from Selenium – Dependent Expression and Intracellular Localization”, *Biofactors* 14, 101-106, 2001
4. Kleczkowski M., Kluciński W., Sitarska E., Sikora J.: Stres oksydacyjny i wybrane wskaźniki stanu oksydacyjnego zwierząt; *Med. Wet.*, 54, 166-171, 1998.
5. Nowakowicz - Dębek B., Saba L., Bis - Wencel H.: Emissionen aus Pelztierfarmen in Polen. *Agrarforschung*, 7, 2, 2000.

6. Nowakowicz-Dębek B., Saba L., Bis-Wencel H.: Zanieczyszczenie powietrza alkoholami, aldehydami i ketonami przez fermy zwierząt futerkowych. *Med. Wet.*, 57, 5, 346-348, 2001.
7. Makurland S. L.: Ceruloplasmin, Extracellular-Superoxide Dismutase, and Scavenging of Superoxide Anion Radicals. *J. Free Rad. Biol. Med.*, 2, 255-260, 1986.
8. Saba L., Bis-Wencel H., Sławoń J., Polonis A.: Zanieczyszczenie gleby i powietrza przez fermy mięsożernych zwierząt futerkowych. *Annales UMCS, sectio EE*, vol. 11, 215-222, 1993.
9. Saba L., Sławoń J., Tymczyńska L., Bis-Wencel H.: Emisje odorów siarko-organicznych z ferm zwierząt futerkowych mięsożernych. *Annales UMCS, sectio EE*, vol. 14, 177, 1996.
10. Sies H.: Oxidative Stress: introductory remarks. Sies H. (ed): *Oxidative stress*, Academic Press., 1-8, London 1985.
11. Sitarska E., Kleczkowski M., Kluciński W., Ładysz R., Górecka R.: Stan antyoksydacyjny koni i próba modulacji tego układu. *Med. Wet.*, 53, 585-587, 1997.

SUMMARY

The studies were conducted on two treatment groups of foxes, 6 animals each. One group was maintained in a closed space equipped with exhaust ventilation, the other caged in the open. The animals were at varied age. In I group (March) blood for examination was collected from dams, while in II group from their offspring (August). The examinations of blood plasma included determination of: GSH-GSSG, TAS, EC-SOD and GPx. Moreover, FRAP and protein soluble were established. The studies led to the following conclusions. The lower values of antioxidation parameters (except glutathione and glutathione peroxidase) were detected at dams, which proved a potential antioxidation stress occurrence. The higher antioxidant levels at their offspring are likely to result from the adaptation of the successive animal generation to the unfavourable maintenance conditions. Time may also exert some impact as the young were exposed to the harmful substances operation for a shorter period. However, it is clear that a significant influence on the antioxidant level development was exerted by the very maintenance of animals. In the closed space where gas concentrations are higher, in both dams and offspring, lower antioxidant values were recorded as compared to the caged animals kept in the open.