

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL. XXIII, 35

SECTIO EE

2005

Pracownia Biologii Rozrodu Katedry Higieny Zwierząt i Środowiska
Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt Akademii Rolniczej w Lublinie

HANNA BIS-WENCEL, LEON SABA, MONIKA PYZIK-MOLEDA,
BEATA LIKOS-GRZESIAK

*Próba oceny markerów stanu oksydacyjnego w świetle żywienia
wysokoenergetycznego u norek w różnym okresie wzrostu**

Attempt at the Oxidative State Markers Evaluation Against the Background
of High Energy Feeding of Minks at Various Growth Stages

W naturalnym środowisku bytowania norki żywią się głównie małymi ssakami, ptakami i rybami, dlatego naturalna ich dieta bogata jest w białko zwierzęce i tłuszcz, natomiast uboga w cukry. Norki posiadają bardzo prosty przewód pokarmowy z niską aktywnością enzymów trawiących cukry [4, 6, 7]. W systemie hodowlanym również dąży się do stworzenia podobnych warunków żywieniowych drogą stosowania pasz pochodzenia zwierzęcego. Karma wysokoenergetyczna, stosowana obecnie na fermach zwierząt mięsożernych, łatwo ulega procesom jęlczenia, co doprowadza do zaburzenia wewnętrznej homeostazy organizmu poprzez narażenie go na tzw. stres oksydacyjny [3, 8].

Badania reakcji pomiędzy związkami biologicznie aktywnymi a reakcjami redox zachodzącymi w żywym organizmie stanowią istotny element ogólnej oceny stanu zdrowia zarówno ludzi, jak i zwierząt. Informacje na temat kształtowania się tych wskaźników są nieliczne i jeszcze nie w pełni poznane. Celem badań była próba oceny markerów stanu oksydacyjnego przy zastosowaniu żywienia wysokoenergetycznego

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na fermie norek C położonej w południowo-wschodniej części kraju. Spośród ogólnej liczby norek odmiany barwnej pastel wybrano 30 samic jednorocznych, z czego

* Praca finansowana przez KBN w latach 2003-2005 jako projekt badawczy nr 3PO6Z 012 25

wydzielono dwie grupy (kontrolną – K i doświadczalną – D). Krew do badań pobrano trzykrotnie: w listopadzie 2003 r. (pobranie I), styczniu 2004 r. (pobranie II), wrześniu 2004 r. (pobranie III). Norki były żywione odpowiednio zbilansowaną karmą wysokoenergetyczną, uzupełnioną premiksem witaminowo-mineralnym GuyoFox w dawce 0,10 kg/tonę karmy gotowej [10]. Przez cały okres doświadczenia w obu grupach stosowano konserwant (pirosiarczyn sodu) w dawce stanowiącej 0,2–0,3% masy karmy gotowej. Różnica między grupami polegała na zastosowaniu w grupie doświadczalnej antyutleniacza Rendox w dawce 200–250 ml/t paszy. Preparaty dodawane były do surowców mięsno-rybnych, składowanych w chłodni. Przez cały okres doświadczenia karma podawana była do woli, ze stałym dostępem do wody.

Badania surowicy objęły oznaczenie: całkowitej aktywności oksydacyjnej (TAS), aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (EC-SOD), peroksydazy glutationowej (GPx) oraz reduktazy glutationowej (GR). Całkowitą aktywność antyoksydacyjną TAS określono przy pomocy testu *Total Antioxidant Status* firmy Randox. Pomiar aktywności EC-SOD wykonano metodą adrenalinową wg Misra [2]. Do oznaczania aktywności peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej posłużono się testami diagnostycznymi firmy Randox. Oznaczenia te wykonano przy użyciu spektrofotometru CE 7200 /dwuwiązkowego/ firmy CECIL (Wielka Brytania).

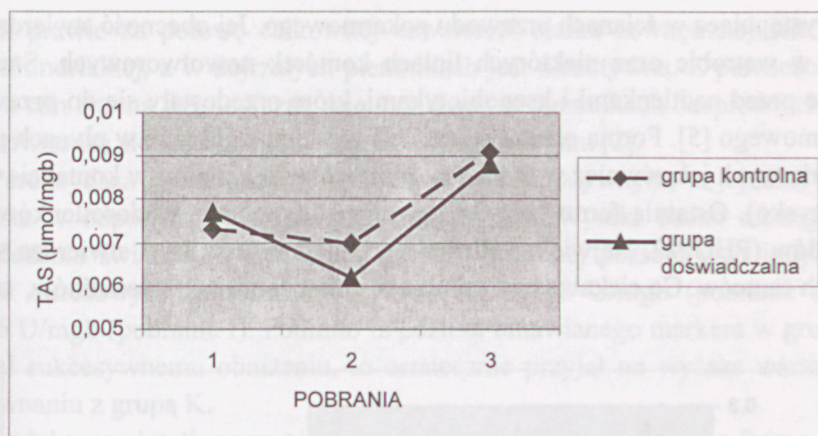
Wartości w poszczególnych pomiarach scharakteryzowano średnią arytmetyczną ($\bar{x}$) i odchyleniem standardowym (SD).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

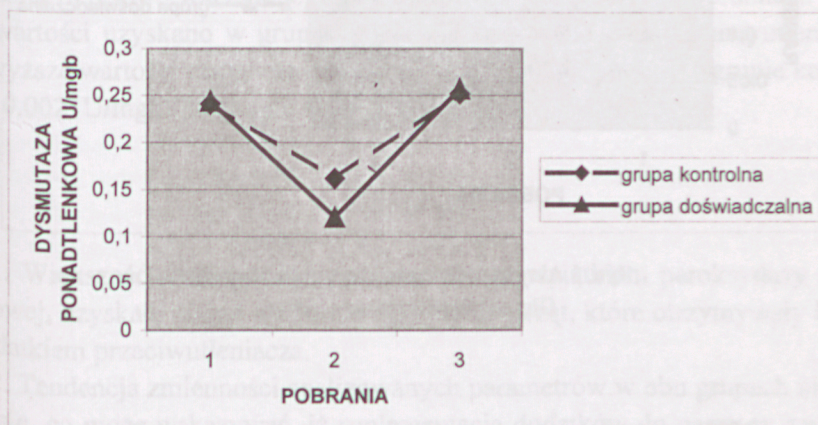
W celu określenia stanu oksydacyjnego u norek wykorzystano wybrane antyutleniacze z bloku enzymatycznego, to jest: EC-SOD, GPx, GR oraz całkowitą siłę antyutleniającą TAS. Wszystkie uzyskane wyniki zaprezentowane zostały na rycinach.

Całkowita aktywność oksydacyjna (TAS) jest wskaźnikiem zdolności zapobiegania procesom peroksydacyjnym indukowanym przez wolne rodniki [1]. Marker ten kształtował się w przedziale wartości od 0,007 do 0,0091 $\mu\text{mol}/\text{mgb}$ w grupie kontrolnej i od 0,0062 do 0,0088 $\mu\text{mol}/\text{mgb}$ w grupie doświadczalnej. Najwyższy poziom zaobserwowano w pobraniu III, tj. od zwierząt młodych w okresie wzrostu.

Dysmutaza ponadtlenkowa (EC-SOD) jest enzymem rozkładającym anionorodnik ponadtlenkowy w przestrzeni pozakomórkowej [2]. Pomimo faktu, iż aktywność tego enzymu w płynach pozakomórkowych jest niższa niż wewnątrz komórek, to i tak ich powierzchnia jest chroniona przed anionorodnikiem ponadtlenkowym przez związane z nimi małe ilości EC-SOD [2]. W czasie prowadzonych badań zauważono wahania poziomu tego wskaźnika (w grupie kontrolnej 0,162–0,252 U/mgb, w grupie doświadczalnej 0,1207–0,257 U/mgb). Tak jak w przypadku TAS, najwyższe jego wartości uzyskano w okresie wrześniowym. W grupie D, gdzie zastosowano antyutleniacz, wartości dysmutazy były wyższe niż w grupie kontrolnej.



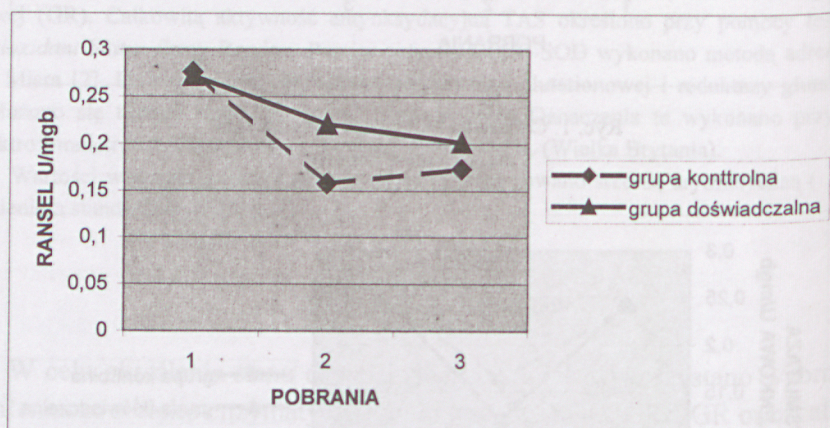
Ryc. 1. Całkowita aktywność oksydacyjna
Total oxidative activity



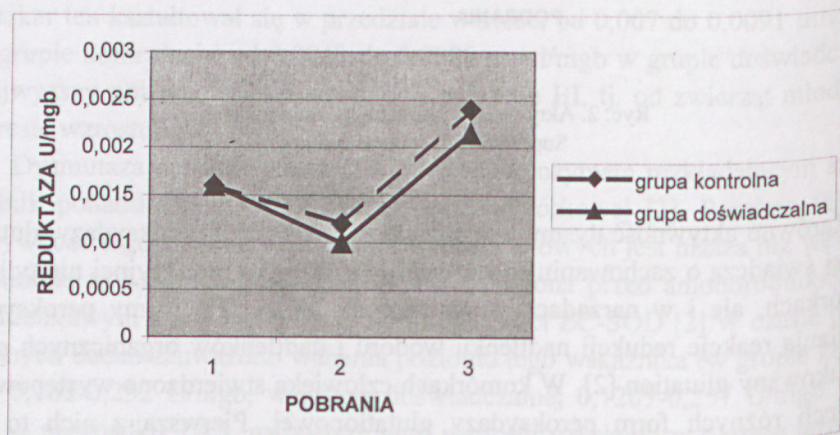
Ryc. 2. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej
Superoxide dismutase activity

Zarówno aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, jak i peroksydazy glutationowej świadczą o zachowaniu równowagi oksydacyjno-redukcyjnej nie tylko w komórkach, ale i w narządach wewnętrznych. Wszystkie formy peroksydazy katalizują reakcje redukcji nadtlenu wodoru i nadtlenu organicznych przez zredukowany glutation [2]. W komórkach człowieka stwierdzono występowanie czterech różnych form peroksydazy glutationowej. Pierwsza z nich to wewnętrzkomórkowa, zwana „klasyczną” (cGPx). Występuje w różnych komórkach, m.in. w erytrocytach, a jej zadaniem jest ochrona komórek przed nadtlaniem wodoru. Kolejną formą jest GI-GPx, czyli peroksydaza żołądkowo-jelito-

wa, występująca w ścianach przewodu pokarmowego. Jej obecność stwierdza się także w wątrobie oraz niektórych liniach komórek nowotworowych. Stanowi barierę przed nadtlenkami i ksenobiotykami, które przedostały się do przewodu pokarmowego [5]. 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 wodorotlenków fosfolipidów (PHGPx). Największe ilości tego enzymu u ssaków stwierdza się w jądrach samców. Co ciekawe, występując w mitochondriach plemników, odpó-



Ryc. 3 Aktywność peroksydazy glutationowej
Glutathione peroxidase activity



Ryc. 4. Aktywność reduktazy glutationowej
Glutathione reductase activity

wiada 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 samców stwierdza się znacznie mniejsze ilości tego enzymu [2].

Peroksydaza glutationowa jest enzymem adaptatywnym, a jej aktywność wzrasta w odpowiedzi na stres oksydacyjny [9]. Wyniki badań naszego doświadczenia świadczą o tym, że w grupie kontrolnej poziom tego indykatora ulegał okresowym zmianom i oscylował od 0,158 U/mgb (pobranie II) do 0,276 U/mgb (pobranie I). Pomimo iż poziom omawianego markera w grupie D ulegał sukcesywnemu obniżeniu, to ostatecznie przyjął on wyższe wartości w porównaniu z grupą K.

Reduktaza glutationowa to enzym odtwarzający zredukowaną formę glutationu kosztem utleniania NADPH do NADP^+ [2]. Jest markerem, który może odzwierciedlać między innymi sposób żywienia. W czasie doświadczenia zauważono okresowe wahania jego poziomu w poszczególnych pobraniach. Wyższe wartości uzyskano w grupie, gdzie nie stosowano dodatku antyutleniacza. Najwyższe wartości osiągnięto w pobraniu III (0,0024 U/mgb – w grupie kontrolnej i 0,0021 U/mgb – w grupie doświadczalnej).

WNIOSKI

1. Większość analizowanych parametrów, z wyjątkiem peroksydazy glutationowej, uzyskała niższe wartości w grupie zwierząt, które otrzymywały karmę z dodatkiem przeciwutleniacza.

2. Tendencja zmienności analizowanych parametrów w obu grupach nie różniła się, co może wskazywać, iż suplementacja dodatków do paszy w zaproponowanych ilościach nie wywarła negatywnego wpływu na zdrowie zwierząt.

PIŚMIENNICTWO

1. Aleksiewicz R., Pawłowska-Góral K., Maciejewska-Paszek I., Wardas M.: Aktywność enzymów antyoksydacyjnych w krwi królików ekspozowanych na wzmożoną podaż żelaza. *Med. Wet.*, 57 (10), 762–763, 2001.
2. Bartosz G.: *Druga twarz tlenu*. PWN, Warszawa 2004.
3. Bis-Wencel H., Saba L., Kopczewski A., Nowakowicz-Dębek B., Wnuk W.: Some biochemical parameters in serum of mink fed high energy feedstuff with antioxidant and preservative supplement. VIII International Scientific Congress in Fur Animal Production, Netherlands, 165–167, 2004.
4. Børsting Ch., F., Gade A., Glucose homeostasis in mink (*Mustella vison*). A review based on interspecies comparisons. *Scientifur*, vol. 24, No. 1, 9–18, 2003.

5. Brigelius-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.
6. Cholewa R.: Chów i hodowla zwierząt futerkowych. AR Poznań, 2000.
7. Gliński Z., Kostro K., pr. zbior.: Podstawy hodowli lisów i norek. Profilaktyka i zwalczanie chorób. PWRiL, Warszawa 2002.
8. Kopczewski A., Bis-Wencel H., Saba L., Sławoń J., Ondrašović M., Wnuk W.: Wpływ zróżnicowanego poziomu żywienia wysokoenergetycznego oraz antyoksydantów na parametry biochemiczne surowicy lisów polarnych, *Med. Wet.*, 58 (8), 616–619, 2002.
9. Sies H.: Oxidative Stress: introductory remarks. H. Sies (ed): Oxidative stress, Academic Press, 1–8, London 1985.
10. Sławoń J.: Żywienie lisów i norek. PWRiL, 27–30, Warszawa 1987.

SUMMARY

A high energy feed undergoes the rancid process quite readily results in the inner homeostasis disturbance due to the organism exposure to so-called oxidative stress. The present investigations focused on the evaluation of the oxidative state markers with the high energy feeding use. The studies were performed at the farm "C" situated in the south-eastern Poland. The animals were of differentiated age. Blood for examination was collected three times a year. The minks were fed a well balanced high energy feed with a vitamin-mineral premix GuyoFox additive. Till November it was supplemented with an antioxidant Rendox and a preservative (sodium pyrosulphite). The serum examinations included the determination of: total oxidative activity (TAS), the activity of superoxide dismutase (EC-SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR). The above determinations were made by a spectrophotometer CE 7200 /twobeam/ CECIL firm. The values of each measurement were characterized with arithmetic means ($\bar{x}$) and standard deviation (SD). The obtained results allow to state that most parameters analysed, except for glutathione peroxidase, showed lower values in the animal group where the antioxidant was applied.