ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA
VOL. XLVIII, 7 SECTIO DD 1993

KATEDRA FIZJOLOGII ZWIERZĄT WYDZIAŁU WETERYNARYJNEGO AR W LUBLINIE

Barbara NAGÓRNA-STASIAK, Jerzy LECHOWSKI

Badania nad syntezą witaminy C u kurcząt

Studies on Vitamin C Synthesis in Chickens

Witamina C (kwas askorbowy) jest syntetyzowana przez większość ssaków i ptaków, w niewielkim stopniu przez człowieka, natomiast zdolności tej nie posiadają owady, ryby i świnki morskie, co jest spowodowane brakiem enzymów biorących udział w przemianie D-glukozy w tę witaminę (12, 16, 18, 21, 22). U kur bezpośrednim dowodem na istnienie syntezy witaminy C było wykazanie pewnej jej ilości w tkankach i osoczu przy diecie pozbawionej witaminy C, jednak bez określania produktów pośrednich w syntezie oraz aktywności enzymów biorących udział w tych reakcjach (13, 24, 25, 29). Poziom witaminy C u kur uzależniony jest od czynników żywieniowych, temperatury otoczenia, płci, zakażeń bakteryjnych, stresów (21, 25, 26).

Karma dla kur bogata w skrobię, jak ziarna zbóż, bulwy i nasiona, dostarcza glukozy, która częściowo ulega w jelitach fermentacji, przy udziale flory bakteryjnej, do lotnych kwasów tłuszczowych, reszta zaś ulega wchłonięciu. Część glukozy prawdopodobnie jest wykorzystywana do syntezy witaminy C, jak to się dzieje u ssaków, np. u szczurów, psów i człowieka (1, 2, 3, 6, 19, 20).

Celem pracy było wykazanie, czy glukoza podawana *per os* wpływa na wzrost syntezy witaminy C u kurcząt (tak jak u ssaków), czego dowodem będzie wzrost ilości w tkankach nie tylko witaminy C, ale również produktu pośredniego w syntezie – kwasu D-glukuronowego oraz wzrost aktywności enzymu mikrosomalnego – L-gulono-γ-oksydazy, biorącego udział w końcowej fazie powstawania witaminy C.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na 20 kurczętach brojlerach w wieku 6 tygodni i masie ciała średnio 1,3 kg. Kurczęta były żywione w trakcie doświadczenia mieszanką DKA-finiszer, nie zawierającą witaminy C.

W celu przebadania wpływu glukozy na syntezę witaminy C w tkankach kurcząt podzielono je na dwie grupy: grupa kontrolna (K) – 10 kurcząt i grupa doświadczalna (D) – 10 kurcząt, otrzymująca *per os* codziennie przez 30 dni po 2 g glukozy. Poziom glukozy oznaczono w pełnej krwi przy pomocy glukometru 3 firmy Ames. Po 30 dniach kurczęta obu grup zgładzono w celu pobrania tkanek: żołądka gruczołowego, jelita czczego, jelit ślepych, wątroby, nerek, nadnerczy i mięśni piersiowych oraz krwi. Następnie oznaczano zawartość witaminy C (kwasu askorbowego) metodą Roe-Kuethnera (27, 28), kwas D-glukuronowy metodą Bittera i Muira (4) oraz aktywność enzymu

mieszczącego się w mikrosomach komórkowych L-gulono-γ-oksydazy metodą Chatterjee (11). Aktywność enzymu wyrażano w jednostkach enzymatycznych U/mg białka (jednostka enzymatyczna U to ilość enzymu syntetyzująca 1 μmol kwasu askorbowego w ciągu 1 godziny).

Wyniki badań poddano analizie statystycznej posługując się testem t-Studenta. W doświadczeniach stosowano kwas L-askorbowy cz. Polfa c. cz. 176,0; L-gulono-γ-lakton c. cz. 178,1 Sigma; kwas D-glukuronowy c. cz. 194,1 Sigma; glukoza bezwodna cz. d. a. 180,16 POCH.

WYNIKI

Podawanie *per os* kurczętom brojlerom na czczo 2 g glukozy powodowało już po 15 min. duży jej wzrost w krwi z 11,2 mmol/l do 19,2 mmol/l. Następnie w ciągu 3 godz. poziom glukozy ulegał obniżeniu do wartości wyjściowych. W grupie kontrolnej nie otrzymującej ani pożywienia, ani glukozy nie obserwowano wzrostu poziomu glukozy (tab. 1).

Tab. 1. Stężenie glukozy we krwi kurcząt przed i po podaniu glukozy ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
The concentration of glucose in chickens blood before and after application of glucose

Czas w min.	Grupa	0	15	30	45	60	120	180
Glukoza mmol/l	K	11,4 ±0,57[a]	11,0 ±0,30[a]	11,6 ±0,25[a]	11,2 ±0,30[a]	11,2 ±0,42[a]	11,0 ±0,33[a]	10,8 ±0,21[a]
	D	11,2 ±0,45[a]	19,2 ±0,86[b]	18,2 ±0,23[b]	18,0 ±0,35[b]	17,8 ±0,38[b]	12,8 ±0,18[b]	11,0 ±0,20[a]

Objaśnienia: K – grupa kontrolna, D – grupa doświadczalna, a, b – średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leqslant 0{,}01$. Porównania między grupą K i D (dotyczy tab. 1–4).

Explanations: K – control group, D – experimental group, a, b – the means denoted with various letters differ statistically at $p \leqslant 0.01$. Comparison between groups K and D (refers to Tabs. 1–4).

Glukoza po 30 dniach podawania powodowała duży wzrost zawartości witaminy C w tkankach kurcząt. Największy wzrost w porównaniu do grupy kontrolnej stwierdzono w nerkach o 153,4% (z 100 do 253, 4 mg/kg) oraz w wątrobie o 89% (z 254,7 do 481,5 mg/kg). Nieco mniejszy wzrost ilości witaminy C zaobserwowano w żołądku gruczołowym i jelicie ślepym (o 34,9%), najmniejszy zaś w nadnerczach i mięśniach piersiowych około 16% (tab. 2). W osoczu poziom witaminy C nie uległ zmianie i wynosił w grupie kotrolnej 8,25 μmol/l, zaś w grupie doświadczalnej 8,39 μmol/l.

Nieco inaczej przedstawiał się poziom kwasu D-glukuronowego w przebadanych narządach. Po podawaniu glukozy znacznie wzrastała koncentracja kwasu D-glukuronowego w ścianie jelita ślepego (o 77,2%) oraz jelita czczego (o 62,7%). Nieco mniejszy wzrost wystąpił w nerkach, żołądku gruczołowym, wątrobie i nadnerczach (od 38% do 56,9%), natomiast bardzo niewielki (tylko o 4%) w mięśniach piersiowych (tab. 3).

Tab. 2. Poziom witaminy C w tkankach kurcząt ($\bar{x} \pm s$, n=30)
Level of vitamin C in chick tissues

Tkanka	Witamina C mg/kg			
	K	%	D	%
Nerki	100,0 ± 7,51[a]	100,0	253,4 ±24,30[b]	253,4
Nadnercza	252,0 ± 7,32[a]	100,0	292,6 ± 6,30[b]	116,1
Wątroba	254,7 ±10,34[a]	100,0	481,5 ±22,20[b]	189,5
Żołądek gruczołowy	122,2 ± 7,39[a]	100,0	168,8 ±10,25[b]	134,9
Jelito czcze	275,3 ± 5,26[a]	100,0	321,8 ±13,60[b]	116,9
Jelita ślepe	128,0 ± 5,18[a]	100,0	172,7 ± 7,62[b]	134,9
Mięśnie piersiowe	53,0 ± 3,54[a]	100,0	61,8 ± 2,48[b]	116,6
Osocze μmol/l	8,25 ± 0,10[a]	100,0	8,39 ± 0,21[a]	101,7

Tab. 3. Poziom kwasu D-glukoronowego w tkankach kurcząt ($\bar{x} \pm s$, n=30)
Level of D-glucuronic acid in chick tissues

Tkanka	Kwas D-glukoronowy mg/kg			
	K	%	D	%
Nerki	1642,5 ± 21,11[a]	100,0	2 577,5 ± 40,19[b]	156,9
Nadnercza	3722,5 ± 71,98[a]	100,0	5 137,0 ± 42,85[b]	138,0
Wątroba	7652,5 ±106,95[a]	100,0	10 680,0 ±106,49[b]	139,6
Żołądek gruczołowy	1661,3 ± 29,29[a]	100,0	2 472,5 ± 33,59[b]	148,8
Jelito czcze	1630,0 ± 39,91[a]	100,0	2 651,3 ± 45,67[b]	162,7
Jelito ślepe	1112,5 ± 27,09[a]	100,0	1 971,3 ± 38,03[b]	177,2
Mięśnie piersiowe	2236,3 ± 19,04[a]	100,0	2 335,0 ± 18,97[b]	104,4

Tab. 4. Aktywność L-gulono-γ-oksydazy w tkankach kurcząt ($\bar{x} \pm s$, n=30)
Activity of L-gulono-γ-oxidase in chick tissues

Tkanka	Aktywność L-gulono-γ-oksydazy (U/mg białka)			
	K	%	D	%
Nerki	0,950 ±0,0059[a]	100,0	1,197 ±0,0060[b]	126,0
Nadnercza	0,133 ±0,0012[a]	100,0	0,186 ±0,0015[b]	139,8
Wątroba	0,042 ±0,0064[a]	100,0	0,062 ±0,0008[b]	147,6
Żołądek gruczołowy	0,050 ±0,0035[a]	100,0	0,143 ±0,0042[b]	286,0
Jelito czcze	0,063 ±0,0073[a]	100,0	0,113 ±0,0015[b]	179,4
Jelita ślepe	0,066 ±0,0058[a]	100,0	0,084 ±0,0017[b]	127,3
Mięśnie piersiowe	0,016 ±0,0004[a]	100,0	0,040 ±0,0013[b]	250,0

Najwyższy wzrost aktywności enzymu mikrosomalnego L-gulono-γ-oksydazy po podawaniu kurczętom przez 30 dni *per os* glukozy wystąpił w ścianie żołądka gruczołowego (z 0,05 do 0,143 U/mg białka, tj. o 186,0%) oraz w mięśniach piersiowych (z 0,016 do 0,04 U/mg białka, tj. o 150%). W pozostałych tkankach wystąpił również istotny wzrost aktywności tego enzymu od 26% w nerkach do 79,4% w jelicie czczym (tab. 4).

Analizując sumaryczny wzrost we wszystkich tkankach, a następnie średnie określanych parametrów w przebadanych narządach, należy stwierdzić, że poziom witaminy C wzrósł o 51%, kwasu D-glukuronowego o 47%, zaś aktywność enzymu L-gulono-γ-oksydazy o 79%.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Witamina C syntetyzowana jest u ssaków, np. szczurów, psów i królików, a także u człowieka z D-glukozy, która ulega fosforylacji, przechodząc następnie w kwas D-glukuronowy. Z kwasu D-glukuronowego ostatecznie powstają dwie substancje: L-ksyluloza oraz kwas L-askorbowy. Pośrednią substancją w powstawaniu kwasu L-askorbowego z kwasu D-glukuronowego jest L-gulono-γ-lakton, który pod wpływem enzymu zawartego w mikrosomach L-gulono-γ-oksydazy przechodzi w kwas L-askorbowy, tj. witaminę C (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 16, 17, 23).

Dowodem więc w niniejszych doświadczeniach na wzrost syntezy witaminy C u kurcząt po podaniu *per os* glukozy jest nie tylko wzrost ilości samej witaminy C, ale również produktu pośredniego, jakim jest kwas D-glukuronowy, oraz wzmożenie aktywności enzymu mikrosomalnego biorącego udział w tym procesie, tj. L-gulono-γ-oksydazy. Prawdopodobnie tak jak to wykazano u szczurów i królików, którym podawano znakowaną glukozę (6, 14, 15), również u kurcząt łańcuch węglowy glukozy zostaje włączony do syntetyzowanego kwasu askorbowego.

Wykazano, że wysoki wzrost witaminy C w danym narządzie nie zawsze łączy się z intensywnym wzrostem kwasu D-glukuronowego czy też z dużym wzrostem aktywności badanego enzymu. I tak najwyższy wzrost zawartości witaminy C wystąpił w nerkach i wątrobie, natomiast kwasu D-glukuronowego w ścianie jelita czczego i ślepego, zaś aktywność L-gulono-γ-oksydazy najintensywniej wzrosła w ścianie żołądka gruczołowego oraz mięśniach piersiowych. Jednakże sumując wzrost ilości witaminy C w przebadanych tkankach wykazano, że zwiększyła się ona po glukozie średnio o 51%, a kwas D-glukuronowy o 47%. Najintensywniej wzrosła aktywność L-gulono-γ-oksydazy, średnio o 79%. Powyższe wyniki pozwalają wnioskować, że zarówno witamina C, jak i kwas D-glukuronowy oraz L-gulono-γ-oksydaza mogą powstawać lub być aktywowane w jednych tkankach, a następnie być przenoszone do innych. Stąd wysoki poziom witaminy C w nerkach i wątrobie – jak należy sądzić – pochodzi nie tylko z syntezy, ale również z nagromadzenia witaminy C, która powstała w innych narządach.

WNIOSKI

1. Glukoza powoduje w tkankach kurcząt wzrost syntezy witaminy C.
2. Poziom witaminy C w narządzie jest uzależniony od jej syntezy w danej tkance oraz od nagromadzenia witaminy pochodzącej z innych narządów.

PIŚMIENNICTWO

1. Baker E., Bierman E., Plough I.: Effect of D-glucuronic acid and D-glucuronolactone on ascorbic acid levels in blood and urine of man and dog. Amer. J. Clin. Nutrition **8**, 369, 1960.
2. Baker E., Saari J., Tolbert B.: Ascorbic acid metabolism in man. Amer. J. Clin. Nutrition **19**, 371, 1966.
3. Baker E., Sauberlich H., Wolfskill S.: Trace studies of vitamin C utilisation in men. Metabolsim of D-glucuronolactone-6-C^{14}, D-glucuronic-6-C^{14} acid and L-asorbic acid. Proc. Soc. Exptl. Med. **109**, 737, 1962.
4. Bitter T., Muir M.: A modified uronic acid carbazole reaction. Analyt. Biochem. **4**, 330, 1962. (5).
5. Bublitz C., Grollman A., Zehinger A.: Enzymatic conversion of D-glucuronate to L-ascorbate in animal tissues. Fed. Proc. **16**, 382, 1957.
6. Burns J., Mosbach J.: Further observations on the biosynthesis of L-ascorbic acid from D-glucose in the rat. J. Biol. Chem. **221**, 107, 1956.
7. Burns J., Evans C.: The synthesis of L-ascorbic acid in the rat from D-glucuronolactone. J. Biol. Chem. **223**, 894, 1956.
8. Chatterjee J.: Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. Science (Dec.) 1271, 1973.
9. Chatterjee J.: Vitamin C synthesis in animals. Evolutionary trend. Science and Culture. **39**, 210, 1973.
10. Chatterjee J., Chatterjee G.: Biological synthesis of L-ascorbic acid in animal tissues: Conversion of L-gulonolactone and L-ascorbic acid. Biochem. J. **74**, 193, 1960.
11. Chatterjee J.: Biosynthesis of L-ascorbate in animals. Methods. Enzymol. **18**, 28, 1970.
12. Chatterjee J.: Biosynthesis of L-ascorbate in animals. Methods. Enzymol. **18**, 28, 1970.
13. Chaudhuri C., Chatterjee J.: L-ascorbic acid synthesis in birds: Phylogenetic trend. Science **164**, 435, 1969.
14. Eisenberg F., Dayton P., Burns J.: Studies on the glucuronic acid pathway of glucose metabolism. J. Biol. Chem. **234**, 250, 1959.
15. Eisenberg F., Gurin S.: The biosynthesis of glucuronic acid from 1-C^{14}-Glucose. J. Biol. Chem. **195**, 317, 1952.
16. Evans C., Conney A., Trousof N., Burns J.: Metabolism of D-galactose to D-glucuronic acid, L-gulonic acid and L-ascorbic acid in normal and barbital-treated rats. Biochem. Biophys. Acta. **41**, 9, 1960.
17. Gupta S., Gupta C., Chaudhuri C., Chatterjee J.: Enzymatic synthesis of L-ascorbic acid from synthetic and biological D-glucurono-1,4-lactone conjugates. Analyt. Biochem. **38**, 46, 1970.
18. Gupta S., Chaudhuri C., Chatterjee J.: Inacapability of L-ascorbic acid synthesis by insects. Arch. Biochem. Biophys. **152**, 889, 1972.
19. Horovitz H., King C.: The conversion of glucose-6-C^{14} to ascorbic acid by the albino rat. J. Biol. Chem. **200**, 125, 1953.
20. Hellman L., Burns J.: Metabolism of L-ascorbic acid-1-C^{14} in man. J. Biol. Chem. **230**, 923, 1958.
21. Jackel S., Mosbach E., Burns J., King C.: The synthesis of L-ascorbic acid by the albino rat. J. Biol. Chem. **186**, 569, 1950.
22. Kagawa Y., Takiguchi H.: Enzymatic studies on ascorbic acid catabolism in animals. J. Biochem. **51** (3), 200, 1963.
23. Kagawa Y., Takiguchi H.: Enzymatic studies on ascorbic acid catabolism in animals. J. Biochem. **51**, 197, 1962.
24. Nagórna-Stasiak B., Wawrzeńska M., Łazuga-Adamczyk A.: Zawartość witaminy C w osoczu i tkankach kurcząt brojlerów w zależności od diety. Medycyna Wet. **44**, 430, 1988.

25. Pardue S., Thaxton J.: Ascorbic acid in poultry. World's Poultry Sci. J. **42**, 107, 1986.
26. Pardue S., Thaton J., Brake J.: Role of ascorbic acid in chickens exposed to high environmental temperature. Journ. App. Physiol. **58**, 1511, 1985.
27. Roe J., Kuethner C.: The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. J. Biol. Chem. **147**, 399, 1943.
28. Roe J.: Appraisal of methods for the determination of L-ascorbic acid. Annals. N. Y. Acad. Sci. **92**, 277, 1961.
29. Scott M., Nesheim M., Young R.: Żywienie kur. PWRiL, Warszawa 1978.

SUMMARY

The effect of glucose on synthesis of vitamin C in tissues was examined in chickens. Vitamin C was determined by the method of Roe-Kuethner, intermediate product of ascorbic acid synthesis D-glucuronic acid – by the method of Bitter and Muir, activity microsomal enzyme L-gulono--oxydase – by the method of Chatterjee.

There was found a significant increase of vitamin C in the experimental group of chickens compared with controls from 100 mg/kg to 253.4 mg/kg in kidneys and from 254.7 mg/kg to 481.5 mg/kg in liver. In adrenal glands, glandular stomach, caecum wall and jejunum vitamin C increased by 16%–34%. The level of D-glucuronic acid increased in tissues by about 47%, and activity of L-gulono-γ-oxydase increased by 79%. The data imply that glucose increases vitamin C synthesis in chickens.