Rocz. Nauk. Zoot., T. 43, z. 2 (2016) 135–145

ZNACZENIE OCENY POTENCJAŁU ANTYOKSYDACYJNEGO W BADANIACH ZWIERZĄT GOSPODARSKICH NARAŻONYCH NA STRES CIEPLNY*

Dorota Godyń

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Technologii, Ekologii i Ekonomiki Produkcji Zwierzęcej,
32-083 Balice k. Krakowa

Wysoka temperatura powietrza jest podstawowym czynnikiem wpływającym negatywnie na efektywność produkcji zwierzęcej. Na skutek globalnego ocieplania się klimatu walka ze stresem cieplnym u zwierząt będzie stanowić coraz większy problem dla hodowców i producentów. Jak pokazują liczne badania, przebywanie zwierząt w upale jest związane z występowaniem stresu oksydacyjnego i zwiększoną produkcją wolnych rodników. Stan ten ma niekorzystny wpływ na budowę i funkcjonowanie komórki. Jednym z procesów wywoływanych przez nadmierną ilość RFT jest peroksydacja lipidów. Zarówno stężenie produktów utleniania tłuszczowców, jak i badanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych mogą być dobrym wskaźnikiem, umożliwiającym szybsze diagnozowanie i zapobieganie skutkom stresu cieplnego u zwierząt fermowych.

Słowa kluczowe: enzymy antyoksydacyjne, stres cieplny, RFT

Wysoka temperatura powietrza jest podstawowym czynnikiem wpływającym negatywnie na efektywność produkcji zwierzęcej. Na skutek globalnego ocieplania się klimatu walka ze stresem cieplnym u zwierząt będzie stanowić coraz większy problem dla hodowców i producentów. Istnieje zatem silna przesłanka do poszukiwania różnego rodzaju rozwiązań umożliwiających łagodzenie skutków oddziaływania wysokich temperatur powietrza. Przebywanie zwierząt w niekorzystnych warunkach środowiskowych wpływa na obniżenie wskaźników produkcyjnych, wywołuje zakłócenia w fizjologii i zachowaniu. W dobie rozwoju biologii molekularnej procesy zachodzące w samej komórce pod wpływem stresu cieplnego budzą duże zainteresowanie wśród naukowców. Wraz z przegrzaniem organizmu wzrasta między innymi produkcja reaktywnych form tlenu (RFT) i innych wolnych rodników, w których unieszko-

*Praca finansowana z zadania nr 06-009.1.

dliwianiu kluczową rolę pełnią między innymi enzymy antyoksydacyjne. Wśród nich do najważniejszych zaliczane są katalazy (CAT), peroksydazy glutationowe (GPx), dysmutazy ponadtlenkowe (SOD).

Celem tego artykułu jest przegląd najnowszej literatury związanej z tematyką aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych i innych markerów stresu oksydacyjnego w badaniach zwierząt gospodarskich narażonych na stres cieplny.

Powstawanie wolnych rodników, właściwości enzymów antyoksydacyjnych

Powstawanie wolnych rodników, w tym reaktywnych form tlenu (RFT) związane jest w dużym stopniu z naturalnymi procesami oksydacyjno-redukcyjnymi (przemiany łańcucha oddechowego) zachodzącymi w mitochondrium każdej komórki (Bartosz, 2003). Podczas transportowania elektronów (lub wodorów) na tlen, przez kompleksy białek w łańcuchu oddechowym, w sposób ciągły wytwarzana jest jedna z najbardziej charakterystycznych reaktywnych form tlenu: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot}$). Dalsze etapy redukcji tlenu doprowadzają do powstawania innych wolnych rodników z grupy RFT takich jak rodnik wodoronadtlenkowy ($HO_2^{\cdot}$) czy rodnik wodorotlenowy ($HO^{\cdot}$). Ponadto pośrednimi produktami kolejnych etapów redukcji tlenu są cząsteczki o charakterze nierodnikowym, takie jak nadtlenek wodoru (H_2O_2). Z procesem powstawania reaktywnych form tlenu związane jest zjawisko „przecieku" czy też opuszczenia przez elektrony łańcucha oddechowego. Głównym źródłem mitochondrialnych reaktywnych form tlenu jest pierwszy kompleks łańcucha oddechowego: oksydoreduktaza NADH-CoQ oraz ubichinon (Potargowicz i in., 2005). Ponadto w generowaniu RFT biorą udział także enzymy mitochondrialne takie jak dehydrogenaza liponianowa czy acetylotransferaza dihydroliponianowa (Jezek i Hlavata, 2005). Innym źródłem RFT są także: kompleks desmolazy cholesterolowej, mikrosomalny łańcuch transportu elektronów czy peroksysomy (Jezek i Hlavata, 2005). Stany zapalne w organizmie również przyczyniają się do zwiększonej produkcji wolnych rodników. Procesy te związane są ze wzrostem aktywności oksydazy NADPH w komórkach układu odpornościowego (Bedard i Krause, 2007). Działanie enzymu polega na utlenianiu NADPH przez białka NOX, które są związane z błoną komórkową. W tej reakcji dochodzi do przeniesienia elektronów z NADPH na tlen, co prowadzi do powstawania anionorodnika ponadtlenkowego (Decoursey i Ligeti, 2005). Izoformy oksydaz o podobnym działaniu zostały stwierdzone także w innych komórkach niezwiązanych z układem odpornościowym (Bedard i Krause, 2007).

Poza rodnikami tlenowymi duże znaczenie w organizmie ma także obecność wolnych rodników azotowych i reaktywnych form azotu. Głównymi przedstawicielem tej grupy jest tlenek azotu ($NO^{\cdot}$), który na skutek reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym wytwarza nadtlenoazotyn ($ONOO^{-}$), odpowiedzialny między innymi za proces peroksydacji lipidów czy blokowanie aktywności poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego (Jezek i Hlavata, 2005).

Pomimo tego że wolne rodniki oddziaływają pozytywnie na wiele procesów zachodzących w organizmie, na przykład takich jak regulacja wzrostu komórki, sekrecja hormonów, skurcze mięśni, oraz sygnalizacja między- i wewnątrzkomórkowa (Czaja, 2003), ich nadmiar ma silne działanie cytotoksyczne (Bernabucci i in., 2002). Zarówno w przypadku rodników tlenowych jak i azotowych, z uwagi na istnienie

niesparowanych elektronów, cząsteczki te niezwykle łatwo wchodzą w różnego typu reakcje. Podczas tych procesów dochodzi do uszkodzenia wielu elementów komórkowych. Wynikiem reakcji wolnych rodników ze związkami organicznymi są między innymi uszkodzenia białek, utlenianie składników kwasów nukleinowych, rozerwanie wiązań glikozydowych i ich depolimeryzacja. Szczególnie niekorzystne działanie ma wspomniana wcześniej peroksydacja lipidów (utlenianie), głównie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład fosfolipidów. Są one podstawowym składnikiem budulcowym błon komórkowych, stąd proces ten doprowadza do uszkodzenia i depolaryzacji błon cytoplazmatycznych oraz błon mitochondrialnych (Deaton i Marlin, 2003; Kang i Hamasaki, 2003).

Produkty powstające podczas peroksydacji lipidów, głównie MDA (aldehyd dimalonowy) oraz 4-hydroksynonenal, nazywane wtórnymi przekaźnikami peroksydacji (Dotan i in., 2004), biorą udział w hamowaniu lub aktywowaniu pracy wielu enzymów, tym samym wpływając na sygnalizację komórkową, doprowadzają do uszkodzeń białek i kwasów nukleinowych (Bartosz, 2003).

Produkty reakcji reaktywnych form tlenu i azotu z białkami, lipidami, węglowodanami oraz składnikami DNA przyczyniają się do generowania jeszcze większej liczby wolnych rodników. Takie zakłócenie równowagi w komórkach definiuje się jako stres oksydacyjny. Konsekwencją tego stanu jest obniżenie poziomu ATP (zahamowanie glikolizy), zmniejszenie ilości glutationu (GSH) w komórce (a zwiększenie jego formy utlenionej; GSSG), zakłócenia w transporcie jonów doprowadzające do depolaryzacji błony komórkowej. Wysoka produkcja wolnych rodników przy niedostatecznej aktywności systemów ochronnych skutkuje także uszkodzeniami jądrowego i mitochondrialnego DNA (Grover i Samson, 1988). Dalszą konsekwencją zmian w komórce wywołanych stresem oksydacyjnym jest często apoptoza i nekroza (Sies i Cadenas, 1985).

Mechanizmy ochronne w organizmie skupiają się głównie na przerywaniu łańcuchów reakcji utleniania, unieszkodliwianiu powstałych już wolnych rodników oraz naprawie wszelkiego rodzaju uszkodzeń spowodowanych przez te cząsteczki. W tych reakcjach biorą udział zarówno związki enzymatyczne, jak i nieenzymatyczne (Bartosz, 2003). Enzymy antyoksydacyjne, pomimo występowania w różnych lokalizacjach oraz w różnych izoformach, tworzą zintegrowany system obronny (Wielkoszyński i in., 2007).

Jednym z kluczowych enzymów jest dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) katalizująca rozkład anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenku wodoru (H_2O_2) i tlenu. Omawiany enzym zawiera w swojej strukturze metale. W zależności od rodzaju pierwiastka wyróżnia się dysmutazę miedziowo-cynkową (Cu/Zn-SOD, SOD-1) występującą głównie w cytozolu, dysmutazę manganową (Mn-SOD, SOD-2), zlokalizowaną w znacznej ilości w mitochondrium oraz zawierającą Cu i Zn dysmutazę ponadtlenkową (EC-SOD, SOD-3) występującą na powierzchni komórek i w macierzy pozakomórkowej (Culotta i in., 2006). Jony metali, zawarte w centrum aktywnym enzymów, charakteryzują się przejściową wartościowością. W dwuetapowej reakcji dysmutacji są one redukowane przez anionorodnik ponadtlenkowy (uwalniany zostaje tlen). W kolejnym etapie dochodzi do ponownego utlenienia atomu metalu i powstawania cząsteczki nadtlenku wodoru (Ray i Husain, 2002).

Rozkład omawianego związku na wodę i tlen przeprowadzany jest z kolei przez katalazę. Enzym ten zawiera w swojej strukturze atom żelaza, którego utlenienie przez nadtlenek wodoru doprowadza do powstania rodnika porfirynowego. W następnym etapie rodnik zostaje zredukowany przez kolejną cząsteczkę H_2O_2. Tym sposobem aktywność katalazy zapobiega nadmiernemu nagromadzeniu nadtlenku wodoru w komórkach (Kirkman i Gaetani, 2007). Postać enzymu występująca w erytrocytach ma szczególne znaczenie w zapobieganiu skutkom stresu oksydacyjnego. Aktywność katalazy wzmacnia działanie innych enzymów (Ścibor i Czeczot, 2006). Obecność NADPH w strukturze katalazy wpływa pozytywnie na aktywność peroksydazy glutationowej. Centrum aktywne tego enzymu stanowi selenocysteina umożliwiająca utlenienie zredukowanego glutationu. Innym substratem GPx może być nadtlenek wodoru. Ta grupa enzymów redukuje także nadtlenki organiczne (Bartosz, 2003). Można wyróżnić 4 izoformy peroksydazy glutationowej ssaków; GPx-1, GPx-2, GPx-3 oraz ostatnią formę enzymu GPx-4, zabezpieczającą błony komórkowe. Peroksydazy obecne są w cytoplazmie, mitochondriach, jądrze i płynie zewnątrzkomórkowym. W zależności od postaci enzymu ich obecność stwierdza się między innymi w erytrocytach, tkankach przewodu pokarmowego, wątroby czy nerek (Ursini i in., 1995).

Do innych enzymów uczestniczących w ochronie komórek przed szkodliwym działaniem wolnorodnikowym, zaliczyć można reduktazę glutatianową (GR). Enzym umożliwia redukcję utlenionego glutationu, przywracając mu tym samym właściwości antyoksydacyjne.

Kolejny enzym: S-transferaza glutationowa (GST) pełni dużą rolę w ochronie zwłaszcza lipidów przed szkodliwym działaniem RFT poprzez sprzęganie reaktywnych, aldehydowych produktów peroksydacji lipidów, takich jak 4-hydroksynonenal (Giannini i in., 2000).

Dużym zainteresowaniem obecnie cieszą się także enzymy z grupy paraoksonaz. Zwłaszcza PON1 (występująca w strukturze lipoproteiny transportującej cholesterol HDL) wykazuje działanie antyoksydacyjne, poprzez bezpośrednią eliminację wolnych rodników, a także ograniczenie utlenienia fosfolipidów lipoprotein (Mates i in., 1999).

Do innych enzymów, których główną funkcją jest zapobieganie w wytwarzaniu nowych rodników, zaliczamy celuroplazminę, utleniającą jony żelazawe do żelazowych. Białka takie jak transferryna, haptoglobina, albumina czy hemopeksyna również wykazują działanie ochronne, ograniczając dostępność jonów metali przejściowych (zawierających niesparowane elektrony). Ponadto istnieją także inne związki wykazujące aktywność antyoksydacyjną, takie jak kwas moczowy, bilirubina, kwas α-liponowy, estradiol, estron czy koenzym Q (Bartosz, 2003). Warto dodać, że jednym z najistotniejszych antyutleniaczy jest wspomniany już wcześniej glutation. Poza zwalczaniem RFT ważną funkcją GSH jest ochrona grup tiolowych białek (-SH) przed nieodwracalną inaktywacją (Bartosz, 2003). Grupy te mają kluczowe znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania metabolizmu komórkowego. Jedną z konsekwencji utlenienia -SH jest dezintegracja błon komórkowych i ich większa przepuszczalność dla białek (Christie i in., 1994).

Poza endogennymi czynnikami stanowiącymi zabezpieczenie organizmu przed nadmierną produkcją wolnych rodników istnieją antyoksydanty dostarczane wraz

z pożywieniem. Do tej grupy zaliczyć można przede wszystkim witaminy, kwas askorbinowy, α-tokoferol, prowitaminę i witaminę A, jak również flawonoidy (Bartosz, 2003).

W przypadku diagnozowania różnego rodzaju zaburzeń związanych z występowaniem stresu oksydacyjnego, poza oceną aktywności enzymów, ogromne znaczenie ma także badanie substancji związanych ze zwiększoną peroksydacją lipidów, takich jak aldehyd dimalonowy (MDA) oznaczany głównie poprzez parametr TBARS, czyli stężenie substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym. Parametry te mogą być interpretowane jako wskaźniki uszkodzenia komórkowego (Chen i Yu, 1994). Innym parametrem umożliwiającym ocenę aktywności systemów ochronnych jest TRAP – całkowita zdolność zmiatania wolnych rodników. Omawiany wskaźnik odzwierciedla poziom takich substancji, jak MDA, kwas moczowy, witaminy C i E, enzymy SOD, GSH, GPx i grup tiolowych białek (Schlesier i in., 2002). W badaniach dotyczących tej tematyki wykorzystywany jest także parametr TAS określający całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza (Turk i in., 2015).

Skutki stresu cieplnego u zwierząt gospodarskich – znaczenie oceny potencjału antyoksydacyjnego

Utrzymywanie relatywnie stałej temperatury ciała (temperatury wewnętrznej) u zwierząt homoiotermicznych wymaga zaangażowania wielu układów i narządów. Termoregulacja jest procesem związanym z działaniem układu nerwowego, krwionośnego, oddechowego czy hormonalnego. Warunki mikroklimatyczne, w jakich przebywają zwierzęta, a zwłaszcza temperatury powietrza, stanowią najważniejszy czynnik decydujący o wymianie ciepła (Mader i in., 2006). Głównym zadaniem procesów związanych z termoregulacją jest właśnie utrzymywanie równowagi pomiędzy wytwarzaniem ciepła metabolicznego a jego uwalnianiem do otoczenia na drodze ewaporacji, kondukcji, konwekcji i radiacji. Optymalne wartości temperatur, w jakich powinny przebywać zwierzęta, wyznacza górna i dolna wartość temperatury krytycznej. W takim przedziale temperatur, zwanym strefą komfortu termicznego, organizm zwierzęcia wykazuje minimalny wysiłek metaboliczny do utrzymania stałej ciepłoty ciała. Kiedy temperatura powietrza w znaczny sposób wzrasta lub maleje, organizm nie jest w stanie kontrolować temperatury wewnętrznej. Utrzymywanie się takiej sytuacji może doprowadzić do hipertermii lub hipotermii (w przypadku nadmiernego wychłodzenia), uszkodzenia wielu narządów i w konsekwencji do śmierci (Renaudeau i in., 2012). Strefa komfortu termicznego zależy od takich czynników, jak gatunek zwierzęcia, wiek, faza produkcji, rodzaj okrywy włosowej czy ilości tkanki tłuszczowej (Berman i in., 1985).

Według Heitmana i Hughesa (1949) dla tuczników o masie powyżej 75,34 kg optymalne temperatury powietrza mieszczą się w przedziale 15,5 i 21,1°C. Z pracy Blacka i in. (1993) wynika, że optymalna temperatura powietrza dla prosiąt wynosi 30–37°C, a dla loch karmiących mieści się w przedziale temperatur 12–22°C. Dallaire i in. (1996) zanotowali czterokrotny wzrost śmiertelności wśród macior karmiących, kiedy temperatura powietrza, w jakiej przebywały te samice, wzrastała powyżej wartości 30°C (w porównaniu z grupą kontrolną). W przypadku dorosłego bydła mlecznego strefa komfortu termicznego mieści się w przedziale od –5°C do 20°C. Dla cieląt

optymalne temperatury wynoszą 10–25°C (Berman i in., 1985). Huber i in. (1994) stwierdzili, że stres cieplny u bydła występuje w warunkach, kiedy na zwierzęta działają przez co najmniej 17 godzin temperatury powietrza o wartościach powyżej 31°C, przy wilgotności względnej większej niż 60%. De Basilio i in. (2001) zaobserwowali, że w przypadku drobiu spadek produkcji i zwiększona śmiertelność związane są z przebywaniem paków w temperaturach powietrza wynoszących 38–40°C przy wilgotności względnej 50–55%.

Globalny wzrost produkcji zwierzęcej wymaga odpowiednich programów hodowlanych, skupiających się głównie na uzyskiwaniu zwierząt o najlepszym potencjale genetycznym. Równocześnie osobniki charakteryzujące się wysoką produkcyjnością wykazują znaczne problemy z adaptacją do wysokich temperatur powietrza (Renaudeau i in., 2012). Skutki stresu cieplnego rozpatrywane są nie tylko w kwestii obniżenia produkcji. Przebywanie zwierząt w upale ma decydujący wpływ na obniżenie poziomu dobrostanu, w tym pogorszenie zdrowotności. W okresie oddziaływania wysokich temperatur powietrza obserwuje się zmiany dotyczące zachowania zwierząt, spadek pobrania paszy, niższą aktywność, częstsze picie, poszukiwanie chłodniejszych miejsc (Kadzere i in., 2002). U zwierząt narażonych na stres cieplny stwierdza się także zwiększoną liczbę oddechów, zianie, przyspieszoną akcje serca, wzrost temperatury rektalnej i temperatury skóry (Huynh i in., 2005). Stres termiczny diagnozuje się również poprzez analizę parametrów morfologicznych, hormonalnych i biochemicznych (Altan i in., 2003). Obecnie uważa się, że przebywanie zwierząt w ponadnormatywnych temperaturach powietrza wywołuje stres oksydacyjny i związaną z tym zwiększoną produkcję RFT oraz peroksydację lipidów (Altan i in., 2003). Z tego względu w badaniach zwierząt narażonych na stres cieplny coraz częściej wykorzystywane są różne markery stresu oksydacyjnego.

Jedną z pierwszych prac dotyczących wpływu stresu cieplnego na obniżenie ilości antyoksydantów u bydła była publikacja Harmona i in. (1997). Autorzy, prowadząc doświadczenie w komorach klimatycznych, dostrzegli niski poziom witaminy E w osoczu krów narażonych na działanie wysokich temperatur powietrza (około 29,5°C).

W doświadczeniu Bernabucci i in. (2002) oceniano wpływ pory roku na poziom niektórych markerów stresu oksydacyjnego u krów. Pod uwagę wzięto takie parametry jak; stężenie TBARS, grup tiolowych białek (-SH) oraz aktywność peroksydazy glutationowej w osoczu. Analizowano też poziom SOD, TBARS, -SH, i stężenie peroksydazy GPx w erytrocytach. Krew do badań pobierana była od krów w 21. i 3. dniu przed wycieleniem oraz w 1., 15. i 35. dniu po wycieleniu. Doświadczenie przeprowadzono w okresie wiosny i lata. Monitoring mikroklimatu prowadzony był poprzez obliczanie indeksu termiczno-wilgotnościowego THI. W okresie wiosny wartości indeksu kształtowały się na poziomie 58,5±3,7 w ciągu dnia i 53,3±4,0 w nocy. W okresie letnim wartości THI wynosiły 75,2±2,6 w dzień i 71,2±2,5 w nocy. Pomimo znacznych różnic w temperaturach powietrza, w jakich przebywały zwierzęta z obu grup, doświadczenie wykazało brak statystycznie istotnych różnic w poziomie markerów mierzonych w osoczu. W przypadku badania erytrocytów, stwierdzono wyższy poziom SOD, TBARS, -SH oraz peroksydazy glutationowej u krów przebywających w wysokich temperaturach powietrza. Biorąc pod uwagę analizę próbek

pobranych 21. dnia przed wycieleniem, wartości poszczególnych parametrów kształtowały się następująco; grupa letnia SOD (176,4 U/ml), TBARS (8,3 nmol/ml), GPx (65,7 U/ml PCV), -SH (210,3 µmol/ml PCV). W grupie wiosennej wartości omawianych parametrów wynosiły odpowiednio 141,4 U/ml; 7,5 nmol/ml; 46,4 U/ml PCV i 119,0 µmol/ml PCV. Autorzy pracy sugerują, że w porównaniu z analizą osocza badanie markerów w erytrocytach jest bardziej wiarygodną i dokładniejszą metodą oceny skutków stresu oksydacyjnego.

Chandra i Aggarwal (2009) również stwierdzili wyższą aktywność dysmutazy ponadtlenkowej u krów (w okresie przedwycieleniowym) podczas przebywania zwierząt w wysokich temperaturach powietrza w okresie lata (159,94±0,10 µmol/min/mgHb) w porównaniu z grupą zimową (153,85±0,08 µmol/min/ mgHb). Z kolei Lakritz i in. (2002) stwierdzili wzrost ilości utlenionego glutationu (GSSG) i niskie stężenie GSH w krwi bydła utrzymywanego w komorach klimatycznych, w temperaturach powietrza wzrastających od 26ºC do 33ºC. Wartość GSH u krów poddawanych działaniom wysokich temperatur była na poziomie 2,4 mmol/L, natomiast u zwierząt przebywających w optymalnych warunkach klimatycznych, średnia wartość zredukowanego glutationu kształtowała się na poziomie 3,2 mmol/L.

Chigerwe i in. (2013) porównywali wskaźniki związane ze stresem oksydacyjnym u cieląt urodzonych i odchowywanych w okresie lata i jesieni. Średnie temperatury powietrza, w jakich przebywały zwierzęta z grupy letniej, przyjmowały wartości na poziomie 21,5ºC. Zwierzęta odchowywane w okresie jesiennym poddawane były działaniom temperatur na poziomie około 18ºC. W tym doświadczeniu oceniana była aktywność; SOD i GPx oraz stężenie TBARS w osoczu. Autorzy pracy stwierdzili statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami dotyczące aktywności enzymów. U cieląt urodzonych i odchowywanych w lecie stwierdzono wyższe wartości dla SOD (12 U/ml vs 9,5 U/ml) i GPx (91,7 nmol/min/m vs 43 nmol/min/m). Stężenie związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym kształtowało się na podobnym poziomie u obu grup.

Turk i in. (2015) przeprowadzili badania aktywności paraoksonazy (PON1) w surowicy krwi i całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza (TAS) u krów. Doświadczenie realizowane było w okresie zimy i lata. Krew od samic pobierana była w dniu inseminacji, następnie w dzień porodu oraz w 1., 2., 4. i 8. tygodniu po wycieleniu. W okresie lata średnie temperatury powietrza osiągały wartości 13,8–19,4ºC (temperatury maksymalne 28,1–32ºC). W czasie zimowym temperatury powietrza, w jakich przebywały zwierzęta, charakteryzowały się średnimi wartościami na poziomie 0,6–4,7ºC (temperatury maksymalne w tym czasie były na poziomie 12,6–21,1ºC). Niezależnie od wartości temperatury powietrza autorzy stwierdzili spadek aktywności (PON1) po porodzie. Grupa krów przebywająca w cieplejszym mikroklimacie charakteryzowała się natomiast niższym poziomem TAS, mierzonym w 1. tygodniu przed i 8. tygodniu po wycieleniu, w porównaniu z samicami z grupy zimowej (w 1. tygodniu: 0,85 mmol/l vs 1,4 mmol/l, w 8. tygodniu: 1,10 mmol/l vs 1,45 mmol/l).

Trzoda chlewna oraz różne gatunki drobiu charakteryzują się szczególną podatnością na stres cieplny (Huynh i in., 2005). W doświadczeniu Montilla i in. (2014) dokonano analizy ekspresji genów katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej (Mn-SOD i Cu/Zn-SOD) oraz badano poziom białek modyfikowanych przez MDA w mięśniach

szkieletowych tuczników (samice, waga ciała około 35 kg) narażonych na działanie wysokich temperatur powietrza. Grupa kontrolna przebywała w neutralnych warunkach mikroklimatycznych (20±1ºC; 35–50% wilgotność względna), grupy doświadczalne poddawane były działaniu wysokich temperatur powietrza (35±1°C; 20–35% wilgotność względna) przez okres 1 i 3 dni. Krótkotrwały stres cieplny miał istotny wpływ na zwiększenie ekspresji genu katalazy oraz Mn-SOD, a także na wzrost poziomu białek modyfikowanych przez MDA, w włóknach czerwonych mięśnia półścięgnistego. Statystycznie istotny wzrost ekspresji genu dysmutazy manganowej notowany był także w włóknach białych (po 1. dniu działania wysokich temperatur powietrza). W przypadku utrzymywania zwierząt w upale przez okres 3 dni, autorzy zanotowali spadek ekspresji genów, wszystkich badanych enzymów antyoksydacyjnych, niezależnie od rodzaju włókien mięśniowych. Badania Montilla i in. (2014) dowodzą, że stres cieplny wywołuje uszkodzenia w mięśniach szkieletowych (związane z peroksydacją lipidów), lecz dotyczy to głównie włókien oksydatywnych charakteryzujących się większą liczbą mitochondrium.

Istnieje wiele publikacji dotyczących wpływu krótko- i długotrwałego stresu cieplnego na aktywność enzymów antyoksydacyjnych u drobiu (praca przeglądowa, Akbarian i in., 2016). W przypadku ekspozycji zwierząt na działanie wysokich temperatur powietrza przez krótki okres czasu (do kilkunastu godzin) stwierdza się natychmiastową wzmożoną aktywność enzymów; CAT, GPx, i SOD. W przypadku narażania ptaków na stres cieplny przez dłuższy czas (dni, tygodnie) niektóre wyniki badań wskazują na obniżenie aktywność GPx (Seven i in., 2009). Pamok i in. (2009) badali aktywność peroksydazy glutationowej i poziom MDA w 1., 4., 7., 11. i 21. dniu utrzymywania kurcząt w wysokich (38±2°C) i neutralnych (26±2°C) temperaturach powietrza. Autorzy udowodnili, że aktywność enzymu jak i poziom MDA był wyższy w grupie ptaków narażonych na stres cieplny (w 1., 4., 7. i 11. dniu) w porównaniu z grupą kontrolną. Aktywność GPx u kurcząt utrzymywanych w upale była wysoka w pierwszym dniu eksperymentu (24 U/gHb), po czym od 4. dnia notowany był spadek (15,3 U/gHb). Podobnie kształtował się poziom aldehydu dimalonowego w surowicy krwi, którego najwyższe wartości stwierdzone były w pierwszym dniu doświadczenia (237,6 μM), natomiast od 7. dnia notowany był spadek (155,5 μM). Wang i in. (2016) analizowali wpływ suplementacji witaminą E oraz preparatem zawierającym drożdże na aktywność enzymów antyoksydacyjnych i stężenie produktów peroksydacji lipidów w krwi kóz przebywających w wysokich temperaturach powietrza. Trzy samice utrzymywane były w komorach klimatycznych przez 6 tygodni. Temperatura pomieszczeń wynosiła 35°C (od 8:00 do 20:00) i 24°C (od 20:00 do 8:00 rano następnego dnia). W tym czasie zastosowano 3 różne pasze; bez dodatków, z witaminą E (100 IU) oraz suplement zawierający drożdże (30 g). Każdy eksperyment żywieniowy trwał 14 dni. W ostatnich 4 dniach każdego etapu pobierane były próbki krwi, w których oceniano aktywność SOD, stężenie MDA oraz TAS. Oba rodzaje dodatków miały istotny wpływ na obniżenie poziomu dysmutazy ponadtlenkowej. W grupie karmionej paszą standardową aktywność SOD wynosiła średnio 113,48 U/mL i była wyższa w porównaniu z wynikami uzyskanymi od zwierząt karmionych paszą z dodatkiem witaminy E (101,61 U/mL) oraz tymi, które były karmione paszą z dodatkiem drożdży (101,51 U/mL). W przypadku badania stężenia aldehydu dimalonowego najwięk-

szą ilość MDA stwierdzono w krwi kóz z grupy kontrolnej (2,40 nmol/mL), najniższą zaś u kóz karmionych paszą z dodatkiem witaminy E. Działanie suplementów miało stymulujący wpływ na wzrost całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza. W grupie kontrolnej wyniki badania TAP pokazały niższe wartości tego parametru (1,39 EU/mL) w stosunku do wyników uzyskanych od kóz karmionych paszą z dodatkiem witaminy E (1,66 EU/mL) i zwierząt karmionych paszą z dodatkiem drożdży (1,51 EU/mL). Jak sugerują autorzy pracy, zwłaszcza suplementacja preparatami z witaminą E w okresie upałów jest ważnym czynnikiem zapobiegającym skutkom stresu cieplnego u tego gatunku zwierząt.

Podsumowanie

Ocena aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz analiza innych wskaźników związanych z nadmierną produkcją wolnych rodników zyskuje coraz większe znaczenie, także w badaniach zwierząt gospodarskich, szczególnie że w ostatnich latach obserwuje się rozwój metod i technik laboratoryjnych (w tym technik biologii molekularnej), które umożliwiają coraz dokładniejszy pomiar. Szybka i wiarygodna diagnostyka zaburzeń fizjologicznych, związanych między innymi z niekorzystnym działaniem czynników środowiskowych jest niezwykle istotna. Monitorowanie markerów stresu oksydacyjnego może przyczynić się do skuteczniejszych działań profilaktycznych, skupiających się na odpowiednim żywieniu lub stosowaniu różnego rodzaju rozwiązań technologicznych umożliwiających zwierzętom lepsze funkcjonowanie w okresie letnich upałów. Niemniej jednak ocena aktywności systemów antyoksydacyjnych w dużej mierze zależy od temperatury powietrza, w jakiej przebywają zwierzęta, ich wieku oraz czasu ekspozycji na niekorzystne warunki. Nie bez znaczenia jest także rodzaj materiału biologicznego przeznaczonego do analiz oraz zastosowana metoda pomiaru. Z tych względów istnieje silna potrzeba kontynuacji tego rodzaju badań.

Piśmiennictwo

Akbarian A., Michiels J., Degroote J., Majdeddin M., Golian A., De Smet S. (2016). Association between heat stress and oxidative stress in poultry; mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. J. Anim. Sci. Biotechnol.,7, p. 37.

Altan O., Pabuccuoglu A., Alton A., Konyalioglu S., Bayraktar H. (2003). Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers. Br. Poultry Sci., 4: 545–550.

Bartosz G. (2003). Druga twarz tlenu. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, ss. 99–120.

Bedard K., Krause K.H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol. Rev., 87: 245–313.

Berman A., Folman Y.M., Kaim M., Mamen Z., Herz D., Wolfenson A., Grabber Y. (1985). Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a tropical climate. J. Dairy Sci., 68: 488–495.

Bernabucci U., Ronchi B., Lacetera N., Nardone A. (2002). Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. J. Dairy Sci., 85: 2173–2179.

Black J.L., Mullan B.P., Lorschy M.L., Giles L.R. (1993). Lactation in the sow during heat stress. Livest. Prod. Sci., 35: 153–170.

Chandra G., Aggarwal A. (2009). Effect of DL-α-tocopherol acetate on calving induced oxidative stress in periparturient crossbred cows during summer and winter seasons. IJAN, 26: 204–210.
Chen J.J., Yu B.P. (1994). Alteration in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. Free Radic. Biol. Med., 17: 411– 418.
Chigerwe M., Beck A.D., Kim S.S., Coons D.M. (2013). Comparison of plasma oxidative status biomarkers in neonatal dairy calves during summer and fall seasons. J. Vet. Sci. Technol., 11: 006.
Christie N.A., Slutsky A.S., Freeman B.A., Tanswell A.K. (1994). A critical role for thiol, but not ATP, depletion in 95% O_2-mediated injury of preterm pneumocytes *in vitro*. Arch. Biochem. Biophys., 313: 131–138.
Culotta V.C., Yang M., O'Halloran T.V. (2006). Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. Biochim. Biophys. Acta, 1763: 747–758.
Czaja A. (2003). Wolne rodniki tlenowe a mechanizmy obronne organizmu. Now. Lek., 75 (6): 582–586.
Dallaire S., Drolet R., Brodeur D. (1996). Sow mortality associated with high ambient temperatures. Can. Vet. J. Rev., 37: 237–239.
Deaton C.H.M., Marlin D.J. (2003). Exercise-associated oxidative stress. Clin. Tech. Equine Prac., 2: 278–291.
De Basilio V., Vilarino M., Yahav S., Picard M. (2001). Early age thermal conditioning and a dual feeding program for male broilers challenged by heat stress. Poultry Sci., 80: 29–36.
Decoursey T.E., Ligeti E. (2005). Regulation and termination of NADPH oxidase activity. Cell Mol. Life Sci., 62: 2173–2193.
Dotan Y., Lichtenberg D., Pinchuk I. (2004). Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. Prog. Lipid Res., 43: 200–227.
Giannini E., Risso D., Ceppa P., Botta F., Chiarbonello B., Fasoli A., Malfatti F., Romagnoli P., Lantieri P.B., Testa R. (2000). Utility of a-glutathione S-transferase assessment in chronic hepatitis C patients with near normal alanine aminotransferase levels. Clin. Biochem., 33: 297–301.
Grover A.K., Samson S.E. (1988). Effect of superoxide radical on Ca^{2+} pumps of coronary artery. Am. J. Physiol., 255: 297–303.
Harmon R.J., Lu M., Trammel D.S., Smith B.A. (1997). Influence of heat stress and calving on antioxidant activity in bovine blood. J. Dairy Sci., 80 (1), p. 264.
Heitman H., Hughes E.H. (1949). The effects of air temperature and relative humidity on the physiological well-being of swine. J. Anim. Sci., 8: 171–181.
Huber J.T., Higginbotham G., Gomez-Alarcon R.A., Taylor R.B., Chen K.H., Chan S.C., Wu Z. (1994). Heat stress interactions with protein, supplemental fat, and fungal cultures. J. Dairy Sci., 77, p. 2080.
Huynh T.T.T., Aarnink A.J.A., Gerrits W.J.J., Heetkamp M.J.H., Canh T.T., Spoolder H.A.M., Kemp B., Verstegen M.W.A. (2005). Thermal behaviour of growing pigs in response to high temperature and humidity. Appl. Anim. Behav. Sci., 91: 1–16.
Jezek P., Hlavata L. (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. Int. J. Biochem. Cell Biol., 37: 2478–503.
Kadzere C.T., Murphy M.R., Silanikove N., Maltz E. (2002). Heat stress in lactating dairy cows: a review. Livest. Prod. Sci., 77: 59–91.
Kang D., Hamasaki N. (2003). Mitochondrial oxidative stress and mitochondrial DNA. Clin. Chem. Lab. Med., 41: 1281–1288.
Kirkman H.N., Gaetani G.F. (2007). Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. Trends Biochem. Sci., 32: 44–50.
Lakritz J., Leonard M.J., Eichen P.A., Rottinghaus G.E., Johnson G.C., Spiers D.E. (2002). Whole-blood concentrations of glutathione in cattle exposed to heat stress or a combination of heat stress and endophyte-infected tall fescue toxins in controlled environmental conditions. Am. J. Vet. Res., 63, 6: 799–803.
Mader T.L., Davis M.S., Brown-Brandl T. (2006). Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. J. Anim. Sci., 84: 712–719.
Mates J.M., Perez-Gomez C., De Castro I.N., (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. Clin. Biochem., 32 (8): 595–603.
Montilla S.I.R., Johnson T.P., Pearce S.C., Gardan-Salmon D., Gabler N.K., Ross J.W., Rhoads R.P., Baumgard L.H., Lonergan S.M., Selsby J.T. (2014). Heat stress

causes oxidative stress but not inflammatory signaling in porcine skeletal muscle. Temperature, 1: 42–50.
Pamok S., Aengwanich W., Komutrin T. (2009). Adaptation to oxidative stress and impact of chronic oxidative stress on immunity in heat-stressed broilers. J. Thermal. Biol., 34: 353–357.
Potargowicz E., Szerszenowicz E., Staniszewska M., Nowak D. (2005). Mitochondria jako źródło reaktywnych form tlenu. Postepy Hig. Med. Dosw., 59: 259–266.
Ray G., Husain S.A. (2002). Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. Indian J. Exp. Biol., 40: 1213–1232.
Renaudeau D., Collin A.,Yahav S., de Basilio V., Gourdine J.L., Collier R.J. (2012). Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. Anim., 6 (5): 707–728.
Schlesier K., Harwat M., Bohm V., Bitsch R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. Free Rad. Res., 36: 177–187.
Seven P.T., Yilmaz S., Seven I., Cerci I.H., Azman M.A., Yilmaz M. (2009). Effects of propolis on selected blood indicators and antioxidant enzyme activities in broilers under heat stress. Acta Vet. Brno,78: 75–83.
Sies H., Cadenas E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 311: 617–631.
Ścibor D., Czeczot H. (2006). Katalaza – budowa, właściwości, funkcje. Postępy Hig. Med. Dośw., 60: 170–180.
Turk R., Podpečan O., Mrkun J., Flegar-Meštrić Z., Perkov S., Zrimšek P. (2015). The effect of seasonal thermal stress on lipid mobilisation, antioxidant status and reproductive performance in dairy cows. Reprod. Domest. Anim., 50 (4): 595–603.
Ursini F., Maiorino M., Brigelius-Flohé R., Aumann K.D., Roveri A., Schomburg D., Flohé L. (1995). Diversity of glutathione peroxidase. Methods Enzymol., 252: 38–53.
Wang L., Wang Z., Zou H., Peng Q. (2016). Yeast culture and vitamin E supplementation alleviates heat stress in dairy goats. Asian-Australas J. Anim. Sci., 29 (6): 814–822.
Wielkoszyński T., Zawadzki M., Ordon-Lebek A., Szlacheta-Korzonek I. (2007). Enzymatyczne układy antyoksydacyjne – właściwości, występowanie i rola biologiczna. Diag. Lab., 43: 283–296.

Zatwierdzono do druku 7 XII 2016

DOROTA GODYŃ

Role of antioxidant potential assessment in the study of farm animals exposed to thermal stress

SUMMARY

The high ambient temperature is the primary limiting factor of animal production efficiency. Considering the effect of global warming, development of solutions to reduce the heat stress in livestock will be a growing problem for farmers. It has recently been shown that heat stress disturbs the steady state concentrations of free radicals, having negative impact on the structure and functioning of a cell. One of the processes caused by the excessive amount of ROS is lipid peroxidation. Both the concentration of lipid peroxidation products and antioxidation enzymes activity may be good indicators, enabling faster diagnosis and prevention of the effects of heat stress in farm animals.

Key words: antioxidant enzymes, heat stress, ROS