

## Wpływ preparatu białkowo-ksantofilowego PX z lucerny (*Medicago sativa* L.) na aktywność wybranych enzymów w komórkach wątroby tuczników

Katarzyna Abramowicz<sup>1</sup>, Magdalena Krauze<sup>1#</sup>, Eugeniusz R. Grela<sup>2</sup>

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki,

<sup>1</sup>Katedra Biochemii i Toksykologii,

<sup>2</sup>Instytut Żywienia Zwierząt i Bromatologii,

ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin; #e-mail: magdalena.krauze@up.lublin.pl

W dostępnej literaturze krajowej i zagranicznej prezentowane są nieliczne doniesienia na temat aktywności enzymów wskaźnikowych, zwłaszcza markerowych, charakteryzujących pracę konkretnych organelli komórkowych. Ubogie są również informacje na temat zmian aktywności enzymów, jakie zachodzą pod wpływem żywieniowych czynników doświadczalnych. W doświadczeniu założono, że koncentrat białkowo-ksantofilowy PX z lucerny pozytywnie wpłynie na metabolizm, czego efektem będzie poprawa wskaźników produkcyjnych u tuczników. Celem badań było zatem sprawdzenie możliwości wykorzystania niestosowanych dotąd enzymów w ocenie poprawności zachodzących procesów biochemicznych po podaniu PX. Oceniano aktywność enzymów związanych z kluczowymi przemianami biochemicznymi zachodzącymi w komórce, co pozwala na ocenę poprawności zachodzących procesów, jak i reakcji ustroju na czynniki zewnętrzne. Doświadczenie przeprowadzono na 288 tucznikach (loszkach i wieprzkach) mieszańcach (wbp x Neckar), podzielonych na 4 grupy, zróżnicowane pod względem dawki i okresu podawania koncentratu białkowo-ksantofilowego PX z lucerny (*Medicago sativa* L.). Koncentrat z lucerny wprowadzono do mieszanki paszowej w miejsce poekstrakcyjnej śruty sojowej. Analizowano aktywność wybranych enzymów markerowych: dehydrogenazy mleczanowej (LDH), jabłczanowej (MDH), bursztynianowej (SDH) oraz hydrolazy glukozy-6-fosforanowej (G6PC). Wykazano obniżenie aktywności analizowanych enzymów w komórkach wątroby u zwierząt otrzymujących dodatek koncentratu PX w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej, co sugeruje korzystny wpływ zastosowanego preparatu na przemiany metaboliczne u badanych zwierząt. Wyniki doświadczenia potwierdzają celowość stosowania w żywieniu świń koncentratu białkowo-ksantofilowego PX z lucerny, zwłaszcza w dawce 3% podawanej w sposób ciągły.

**SŁOWA KLUCZOWE:** świnie / dodatki paszowe / lucerna / enzymy wskaźnikowe

W krajach Unii Europejskiej, na mocy rozporządzenia 1831/2003 [35], obowiązuje od 1 stycznia 2006 roku zakaz stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu w chowie

zwierząt. Efektem były próby znalezienia alternatywnych, bezpiecznych źródeł dodatków, które mogłyby być stosowane w mieszankach paszowych. Celem podawania suplementów jest uzyskiwanie wysokich efektów produkcyjnych i zdrowotnych zwierząt, a także gwarancja najwyższej jakości produkowanej żywności. Wśród dodatków paszowych wymienia się probiotyki, enzymy paszowe, oligosacharydy, kwasy organiczne, naturalne kopaliny oraz zioła, które ze względu na swoje właściwości wynikające z zawartych substancji czynnych są podstawą fitobiotyków [15, 40]. Przykładem fitobiotyków są zioła, stosowane jako alternatywa dla antybiotykowych stymulatorów wzrostu zwierząt. Zawierają metabolity wtórne, wśród których wymienia się alkaloidy, glikozydy, garbniki, saponiny, olejki eteryczne, terpeny, flawonoidy, śluz roślinny, pektyny, kwasy organiczne oraz witaminy i sole mineralne. Związki te regulują funkcje trawienne, poprawiają motorykę i funkcje sekrecyjne przewodu pokarmowego [15]. Ponadto wspomagają przemianę materii u zwierząt (rdest ptasi), wykazują działanie antibakteryjne i przeciwzapalne (czosnek, cebula, szalwia) oraz przeciwbiegunkowe (klejowiec jadalny). Ze względu na właściwości metabolitów wtórnych, występujących w stosowanych dodatkach paszowych, obserwuje się polepszenie wskaźników produkcyjnych utrzymywanych zwierząt, poprawę ich zdrowotności oraz jakości mięsa [42].

Badania dowodzą, że wzbogacenie mieszanki paszowej pełnoporcjowej w składniki roślinne może wspomagać regulację funkcji trawiennych przewodu pokarmowego zwierząt (kurkuma, pieprz cayenne, imbir, kminek, kozieradka), poprawiać aktywność systemu immunologicznego (imbir, korzeń żeńszenia, kwiat lipy, ziele skrzypu, liście babki wąskolistnej i pokrzywy), obniżać podatność na reakcje stresowe (pieprz czarny, kolenadra, lukrecja, rozmaryn, imbir, kminek, goździki) i zmniejszać ryzyko pojawienia się stresu oksydacyjnego (kurkuma, wanilia, tymianek, sezam, szalwia) [23]. Spośród cennych dodatków roślinnych wymienia się także lucernę (*Medicago L.*). Lucerna (*Medicago L.*) jest rośliną pastewną, która w porównaniu do innych (rzepak, kukurydza, soja, pszenica), dostarcza największej ilości białka z jednego hektara powierzchni uprawnej [26]. W składzie chemicznym dominują glikozydy saponinowe o działaniu hipocholesterolemicznym i przeciwdrobnoustrojowym, sterole o działaniu antyoksydacyjnym, kumestany: biochanina A, daidzeina, genisteina oraz kumesterol, a także izoflawonoidy o potencjale przeciwnowotworowym i przeciwzapalnym [44]. Roślina jest również cennym źródłem witamin, prowitamin oraz aminokwasów [13, 26]. Wśród składników mineralnych można znaleźć: wapń, cynk, fosfor, miedź, żelazo, magnez, potas i krzem. Z kolei wśród witamin wyróżnia się witaminy z grupy B: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, a także: A, C, D, E i K oraz β-karoten. Lucerna zawiera zarówno aminokwasy białkowe, takie jak: izoleucyna, leucyna, lizyna, metionina, fenyloalanina, treonina, tryptofan i walina, jak również niebiałkowe: L-kanawanina [13].

W żywieniu zwierząt roślina ta może być stosowana jako zielonka, siano, kiszonka oraz susz, jednak w przypadku świń, będących zwierzętami monogastrycznymi, nie ma możliwości swobodnego stosowania wszystkich wymienionych rodzajów pasz [5]. Najczęściej podaje się zielonkę oraz susz, który uznaje się za wartościowy substytut otrąb zbożowych, nasion bobiku i grochu. Ciekawą alternatywą są koncentraty: białkowo-ksantofilowy PX pozyskiwany z zagęszczonego soku oraz preparat EFL otrzymywany z suszonych liści. Koncentrat PX jest paszą wysokobiałkową stosowaną w żywieniu zwierząt, a EFL – prze-

znaczony dla ludzi [2]. Lucernę z powodzeniem stosuje się w formie koncentratu także w żywieniu karpia, bydła, drobiu, jagniąt i trzody chlewnej [8, 34].

Koncentrat białkowo-ksantofilowy PX korzystnie wpływa na wyniki tuczu świń. Greła i wsp. [16] testowali wpływ 2% dodatku preparatu PX na przyrosty masy ciała tuczników; zwierzęta z grupy kontrolnej przyrastały dziennie 771 g, natomiast te, które otrzymywały dodatek preparatu PX – 846 g. Ponadto zaobserwowano zmniejszone zużycie paszy o 0,29 kg/kg przyrostu masy ciała w porównaniu do grupy kontrolnej. W pracy Czech i Semeniuk [6] wykazano, że preparat PX spowodował zwiększenie liczby limfocytów i obniżenie liczby neutrocytów, co świadczy o poprawie funkcji układu immunologicznego w wyniku podania tego preparatu.

Badanie aktywności enzymów wykorzystuje się do monitorowania zdrowia zwierząt, ale ostatnio znajdują one coraz większe zastosowanie do oceny wpływu innych czynników na organizm zwierząt, np. stresu, ksenobiotyków różnego pochodzenia czy dodatków stosowanych w celu poprawy efektywności odchowu. Preparaty pochodzenia roślinnego mogą wpływać pośrednio lub bezpośrednio na zmiany aktywności enzymów w ustroju. Badania oparte na analizie aktywności enzymów są dość powszechne, jednak doświadczenia wykorzystujące produkty z lucerny są rzadkością. Porównanie otrzymanych wyników z referencyjnymi jest trudne, ponieważ w dostępnej literaturze brak również danych na temat analizy niektórych wskaźników enzymatycznych u zwierząt gospodarskich. Enzymy wskaźnikowe, zwane indykatorowymi, charakteryzują się znaczną specyficznością narządową i zwykle zmiany ich aktywności wiążą się z konkretną jednostką chorobową. Aktywność tych biokatalizatorów w surowicy o prawidłowym składzie jest niewielka, w porównaniu z tą, jaką obserwuje się wewnątrz komórek. W sytuacji kiedy dojdzie do uszkodzenia narządu, enzym wydostaje się z komórki, co sprawia, że zwiększona ilość tego białka pojawia się w surowicy [20].

W eksperymencie dokonano oceny wpływu preparatu PX na aktywność wybranych enzymów markerowych: hydrolazy glukozy-6-fosforanowej, dehydrogenazy bursztynianowej, dehydrogenazy mleczanowej oraz dehydrogenazy jabłczanowej. Enzymy te wybrano z uwagi na fakt, iż są pomocne w ocenie przebiegu kluczowych procesów biochemicznych, jak również w kontroli funkcjonowania organelli komórkowych biorących udział w tych procesach. Zmiany aktywności enzymu w komórce będą zatem świadczyć o natężeniu zachodzącego procesu i odzwierciedlać reakcję organizmu na czynniki zewnętrzne.

Hydrolaza glukozy-6-fosforanowa (G6PC) jest enzymem wskaźnikowym występującym w gładkiej siateczce śródplazmatycznej. Katalizuje reakcję defosforylacji glukozy-6-fosforanu, powstającego w wyniku przekształcenia glikogenu. W efekcie odłączenia reszty fosforanowej powstaje glukoza, będąca źródłem energii dla organizmów żywych. Omawiane białko enzymatyczne odpowiada za transport tego cukru, dlatego powszechnie występuje w tkankach wątroby i nerek, odpowiadających za metabolizm ustroju [14, 20]. G6PC odpowiada także za detoksykację, a uwalniana do krwiobiegu glukoza stanowi niekompetycyjny inhibitor tego enzymu, którego aktywność wzrasta wraz z wiekiem, po czym obniża się w końcowym okresie tuczu. Tłumaczyć to można starzeniem się retikulum endoplazmatycznego, co wynika z peroksydacji lipidów i zwiększonej syntezy wolnych rodników [30]. Z kolei wzrost aktywności G6PC można tłumaczyć nasileniem

procesu glukoneogenezy, który intensywnie zachodzi np. w sytuacji stresu czy dużego stłoczenia zwierząt [9, 38].

Dehydrogenaza bursztynianowa (SDH) jest flawoproteina biorącą udział w przebiegu cyklu Krebsa. W wyniku łączenia z FAD oraz trzema atomami niehemowego żelaza, tworzy enzymatyczny kompleks katalizujący reakcję przekształcenia bursztynianu do fumaranu oraz przekazanie elektronów w łańcuchu oddechowym [4]. Przeprowadzone badania dotyczące aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w stanach chorobowych wykazały, że ten enzym ma również istotne znaczenie w przypadku reakcji oksydoredukcyjnych [37].

Dehydrogenaza jabłczanowa (MDH) jest enzymem katalizującym reakcję utlenienia L-jabłczanu do szczawiooctanu w cyklu Krebsa, który dzięki temu może przyłączyć kolejną resztę acetylową [27]. Ponadto MDH przenosi równoważniki redukcyjne na dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy  $NAD^+$ , tworząc jego zredukowaną formę NADH. Niektórzy autorzy twierdzą, że aktywność tego enzymu wzrasta pod wpływem stresu oksydacyjnego, dlatego analiza aktywności MDH może być wykorzystana w ocenie nasilenia stresu w organizmie. Być może stres jest induktorem tego enzymu, co związane jest z nasileniem przemian cyklu Krebsa z powodu zwiększonego zapotrzebowania na energię w czasie stresu [29, 30].

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) katalizuje odwracalną reakcję przemiany pirogronianu do mleczanu. Oznacza to, że kierunek przekształcania zależy od stosunku pirogronian/mleczan i  $NADH/NAD^+$ . Dehydrogenaza mleczanowa ma istotną wartość diagnostyczną, ponieważ stosowana jest jako marker uszkodzenia mięśni szkieletowych. Wzrost aktywności tego białka we krwi stanowi o uszkodzeniu struktur komórkowych mięśni, ale może być również odpowiedzią na wysiłek fizyczny lub chorobę [33]. Na wartość poziomu LDH ma wpływ płeć oraz wiek badanych zwierząt, czas trwania oraz intensywność wysiłku fizycznego [18]. W przypadku schorzeń, w przebiegu których pojawiają się stany martwicze tkanek (uszkodzenie mięśnia sercowego, nerek, mięśni szkieletowych, wątroby, płuc), obserwuje się wzrost aktywności dehydrogenazy mleczanowej [30].

Założono, że koncentrat PX pozytywnie wpłynie na metabolizm komórkowy, czego efektem będzie poprawa wskaźników produkcyjnych u tuczników. Celem badań było sprawdzenie możliwości wykorzystania niestosowanych dotąd enzymów w ocenie wybranych procesów biochemicznych zachodzących po podaniu koncentratu PX.

## Material i metody

Material doświadczalny stanowiło 288 tuczników mieszańców (wbp x Neckar), o początkowej masie ciała  $20,0 \pm 0,5$  kg. Zwierzęta podzielono na 4 grupy, zróżnicowane pod względem dawki i okresu podawania koncentratu PX. W każdej grupie znajdowało się 12 tuczników: 6 wieprzków oraz 6 loszek, w 6 powtórzeniach. Wszystkie zwierzęta otrzymywały standardową mieszankę paszową (grower oraz finisher), dostosowaną do grupy wiekowej. Tuczniaki utrzymywano w chlewni w systemie płytkiej ściółki, w standardowych warunkach zoohigienicznych, odpowiadających założeniom zootechnicznym przewidzianym dla danego gatunku zwierząt, proponowanych przez Rokickiego i Kolbuszowskiego

[36]. Zwierzęta otrzymywały *ad libitum* standardową mieszankę paszową z automatów paszowych oraz miały stały dostęp do świeżej wody z poidel miseczkowych. Temperaturę, wilgotność względną i ruch powietrza utrzymywano za pomocą automatycznej wentylacji mechanicznej. Warunki chowu zwierząt były identyczne we wszystkich grupach doświadczalnych.

Grupę kontrolną (K) stanowiły zwierzęta otrzymujące jedynie standardową mieszankę paszową. Tuczniaki z grupy doświadczalnej D1 otrzymywały koncentrat białkowo-ksantofilowy PX w ilości 1,5%. Zwierzęta z grup badawczych D2 oraz D3 otrzymywały ten sam preparat w ilości 3%. W grupie D2 dodatek stosowano okresowo – podawano go codziennie przez 14 dni, po czym przeprowadzono 14-dniową przerwę. Tuczniaki z grupy D3 żywiono mieszanką paszową w sposób ciągły. Układ doświadczenia przedstawiono w tabeli 1., natomiast skład stosowanych mieszanek paszowych – w tabeli 2.

Z pobranych podczas dysekcji prób wątroby sporządzono homogenaty, w których wykonano pomiary spektrofotometryczne aktywności wybranych enzymów wskaźnikowych. Aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH, EC 1.1.1.27) obrazuje szybkość zaniku absorbancji NADH. Technika ta, zwana metodą Wróblewskiego, polega na monitorowaniu reakcji przekształcenia pirogronianu do mleczanu w warunkach 25°C przy długości fali 340 nm [17]. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (SDH, EC 1.3.99.1) oznaczono z wykorzystaniem reakcji redukcji 2,6-dichlorofenolindofenu przy długości fali 580 nm [3]. Do oceny aktywności dehydrogenazy jabłczanowej (MDH, EC 1.1.1.37) zastosowano metodę Arfmana i wsp. [1]. Aktywność hydrolazy glukozy-6-fosforanowej (G6PC, EC 3.1.3.9) badano z zastosowaniem metody Swan-

**Tabela 1 – Table 1**  
Układ doświadczenia  
Experimental design

Wyszczególnienie Specification	Grupy – Groups			
	K	D1	D2	D3
Liczba tuczników Number of pigs	12	12	12	12
Dawka PX w mieszance paszowej (%) Amount of PX in feed (%)	0,0	1,5	3,0	3,0
Sposób stosowania PX w żywieniu tuczników System of feed supplementation with PX product	brak dodatku PX no PX supplementation	ciągły continuous	okresowy* periodic*	ciągły continuous

K – zwierzęta otrzymujące standardową mieszankę paszową (grupa kontrolna) – pigs receiving standard compound feed (control)

D1 – zwierzęta otrzymujące standardową mieszankę paszową wzbogaconą o dodatek paszowy PX w ilości 1,5% – pigs receiving standard compound feed supplemented with PX in the amount of 1.5%

D2 – zwierzęta otrzymujące standardową mieszankę paszową wzbogaconą o dodatek paszowy PX w ilości 3% w sposób okresowy – pigs receiving standard compound feed supplemented with PX in the amount of 3% periodically

D3 – zwierzęta otrzymujące standardową mieszankę paszową wzbogaconą o dodatek paszowy PX w ilości 3% w sposób ciągły – pigs receiving standard compound feed supplemented with PX in the amount of 3% continuously

\*Dodatek PX przez 14 dni, brak dodatku PX przez kolejne 14 dni

\*PX supplementation for 14 days, no PX supplementation for next 14 days

**Tabela 2 – Table 2**

Skład (%) mieszanek paszowych z podziałem na okresy tuczu

Composition (%) of feed used in each fattening period

Komponenty Components	Okres tuczu – Fattening period							
	grower (20-65 kg)				finisher (65-115 kg)			
	K	D1	D2	D3	K	D1	D2	D3
Jęczmień Barley	50,0	50,0	50,0	50,0	54,5	52,5	52,5	52,5
Pszenica Wheat	37,0	35,5	34,0	34,0	35,0	35,5	34,0	34,0
MPU <sup>1</sup>	12,5	12,5	12,5	12,5	10,0	10,0	10,0	10,0
Konserwant <sup>2</sup> Preservative <sup>2</sup>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
PX	0,0	1,5	3,0	3,0	0,0	1,5	3,0	3,0

K – zwierzęta otrzymujące standardową mieszankę paszową (grupa kontrolna) – pigs receiving standard compound feed (control)

D1 – zwierzęta otrzymujące standardową mieszankę paszową wzbogaconą o dodatek paszowy PX w ilości 1,5% – pigs receiving standard compound feed supplemented with PX in the amount of 1.5%

D2 – zwierzęta otrzymujące standardową mieszankę paszową wzbogaconą o dodatek paszowy PX w ilości 3% w sposób okresowy – pigs receiving standard compound feed supplemented with PX in the amount of 3% periodically

D3 – zwierzęta otrzymujące standardową mieszankę paszową wzbogaconą o dodatek paszowy PX w ilości 3% w sposób ciągły – pigs receiving standard compound feed supplemented with PX in the amount of 3% continuously

<sup>1</sup>MPU – 38% białko; 2,5% tłuszcz; 4,7% lizyna; 0,9% metionina; 1,2% metionina+cysteina; 1,9% treonina; 0,45% tryptofan; 45,5 g/kg Ca; 12,0 g/kg P; 13,00 g/kg Na; 100,0 mg/kg Cu; 667,00 mg/kg Fe; 667,00 mg/kg Zn; 53 300 j.m. wit. A; 13 300 j.m. wit. D<sub>3</sub>; 266,0 mg/kg wit. E; 7,0 mg/kg ryboflawina; 4,0 mg/kg wit. B<sub>6</sub>; 0,1 mg/kg wit. B<sub>12</sub>; 40,0 mg/kg kwas nikotynowy; 27,0 mg/kg kwas pantotenowy; 9,33 MJ EM

<sup>2</sup>Konserwant – mieszanina kwasów: fosforowego, mrówkowego, propionowego, mlekowego, cytrynowego, octowego i benzoowego

<sup>1</sup>MPU – 38% protein; 2.5% fat; 4.7% lysine; 0.9% methionine; 1.2% methionine+cysteine; 1.9% threonine; 0.45% tryptophan; 45.5 g/kg Ca; 12.0 g/kg P; 13.00 g/kg Na; 100.0 mg/kg Cu; 667.00 mg/kg Fe; 667.00 mg/kg Zn; 53.300 IU vit. A; 13.300 IU vit. D<sub>3</sub>; 266.0 mg/kg vit. E; 7.0 mg/kg riboflavin; 4.0 mg/kg vit. B<sub>6</sub>; 0.1 mg/kg vit. B<sub>12</sub>; 40.0 mg/kg nicotinic acid; 27.0 mg/kg pantothenic acid; 9.33 MJ ME

<sup>2</sup>Preservative – mixture of acids: phosphoric, formic, propionic, lactic, citric, acetic and benzoic

sona, polegającej na pomiarze nieorganicznego fosforu uwolnionego z glukozy-6-fosforanu [41].

Otrzymane wyniki przedstawiono w jednostkach międzynarodowych (U/l) w przeliczeniu na białko, którego stężenie oznaczono metodą Lowry'ego [25]. Następnie uzyskane dane poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu STATISTICA wersja 13.0 PL. Istotność różnic pomiędzy średnimi wyznaczono testem porównań wielokrotnych Tukey'a po interpretacji wyników otrzymanych z analizy wariancji jednoczynnikowej ANOVA, przyjmując wartość poziomu istotności  $P \leq 0,05$ .

## Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki wskazują na istotny wpływ stosowania preparatu białkowo-ksantofinowego PX z lucerny w żywieniu świń na aktywność dehydrogenazy jabłczanowej, mle-





Rys. Aktywność enzymów wskaźnikowych w komórkach wątroby wieprzków i loszek  
Fig. Activity of indicator enzymes in liver cells of barrows and gilts

czanowej oraz hydrolazy glukozy-6-fosforanowej. W przypadku dehydrogenazy bursztynianowej nie zaobserwowano istotnych zmian aktywności pod wpływem czynnika doświadczalnego. Aktywność enzymów różniła się także w zależności od płci zwierząt (rys.), jednak wartości te nie odbiegały od norm referencyjnych, proponowanych przez innych autorów [7, 19].

Aktywność hydrolazy glukozy-6-fosforanowej (G6PC) osiągnęła wartości od 29,45 do 38,86 U/l i w przypadku wieprzków zaobserwowano nieznacznie wyższe wartości niż u loszek (rys., tab. 3 i 4). Odnotowane różnice nie różniły się jednak statystycznie. Wyniki aktywności G6PC w przypadku osobników z grupy D1 wykazywały wartości zbliżone do grupy kontrolnej. W wyniku okresowego podawania preparatu PX w ilości 3% mieszanki paszowej u samców z grupy D2 aktywność tego enzymu była znacząco ( $p \leq 0,05$ ) niższa – o 7,2%, zaś u samic o 11,44%, w odniesieniu do zwierząt karmionych podstawową mieszanką paszową. Ciągłe podawanie koncentratu PX w dawce 3% spowodowało obniżenie aktywności hydrolazy glukozy-6-fosforanowej o 7,77% u wieprzków oraz o prawie 11% u loszek. Niższą aktywność enzymu w grupach otrzymujących PX można uznać za zjawisko pozytywne, ze względu na udział tego białka w procesach peroksydacji lipidów oraz syntezy wolnych rodników [31, 32]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach przeprowadzonych na indykach [12] i kurczętach [28]. Ponadto niższa aktywność G6PC świadczyć może o braku intensyfikacji glukoneogenezy, obserwowanej np. podczas stresu, jak również lepszej dostępności energii zawartej w glikogenie [20]. Z kolei reakcja odwrotna, polegająca na obniżeniu aktywności enzymu, wiąże się najprawdopodobniej z wiekiem [39].

Aktywność dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) w pobranych tkankach wątroby kształtowała się na poziomie 80,62-99,72 U/l (tab. 3 i 4). W grupie D2 obserwowane zmniejszenie aktywności było niższe niż w grupie D3. Okresowe podawanie 3% dodatku

**Tabela 3 – Table 3**Aktywność wybranych enzymów wskaźnikowych w komórkach wątroby wieprzków ( $\bar{x} \pm SD$ )Activity of indicator enzymes in liver cells of barrows ( $\bar{x} \pm SD$ )

Enzym Enzyme (U/l)	Grupy – Groups				P-value
	K	D1	D2	D3	
LDH	9,55 <sup>a</sup> ±0,8	9,55 <sup>a</sup> ±2,52	8,82 <sup>b</sup> ±0,94	8,83 <sup>b</sup> ±3,01	0,031
MDH	99,72 <sup>a</sup> ±1,06	96,6 <sup>a</sup> ±3,81	95,94 <sup>b</sup> ±0,53	80,62 <sup>c</sup> ±3,0	0,001
SDH	6,71 ±0,94	6,81 ±3,87	6,84 ±0,77	6,57 ±2,38	0,93
G6PC	38,86 <sup>a</sup> ±0,76	36,37 <sup>ab</sup> ±4,92	36,06 <sup>b</sup> ±0,8	35,84 <sup>c</sup> ±2,08	0,026

K – zwierzęta otrzymujące standardową mieszankę paszową (grupa kontrolna) – pigs receiving standard compound feed (control)

D1 – zwierzęta otrzymujące standardową mieszankę paszową wzbogaconą o dodatek paszowy PX w ilości 1,5% – pigs receiving standard compound feed supplemented with PX in the amount of 1.5%

D2 – zwierzęta otrzymujące standardową mieszankę paszową wzbogaconą o dodatek paszowy PX w ilości 3% w sposób okresowy – pigs receiving standard compound feed supplemented with PX in the amount of 3% periodically

D3 – zwierzęta otrzymujące standardową mieszankę paszową wzbogaconą o dodatek paszowy PX w ilości 3% w sposób ciągły – pigs receiving standard compound feed supplemented with PX in the amount of 3% continuously

a, b, c – wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie pod względem statystycznym

a, b, c – statistically significant results are designated with different letters

**Tabela 4 – Table 4**Aktywność wybranych enzymów wskaźnikowych w komórkach wątroby loszek ( $\bar{x} \pm SD$ )Activity of indicator enzymes in liver cells of gilts ( $\bar{x} \pm SD$ )

Enzym Enzyme (U/l)	Grupy – Groups				P-value
	K	D1	D2	D3	
LDH	9,23 <sup>a</sup> ±0,82	9,23 <sup>a</sup> ±0,33	8,71 <sup>ab</sup> ± 0,76	8,61 <sup>b</sup> ±0,85	0,031
MDH	92,64 <sup>a</sup> ±3,87	93,56 <sup>a</sup> ±3,42	90,69 <sup>b</sup> ±6,61	82,63 <sup>c</sup> ±7,61	0,013
SDH	6,73 ±1,12	6,65 ±0,49	6,63 ±0,78	6,86 ±0,42	0,95
G6PC	33,47 <sup>a</sup> ±3,89	29,45 <sup>b</sup> ±0,86	29,64 <sup>b</sup> ±1,93	29,82 <sup>b</sup> ±1,74	0,02

K – zwierzęta otrzymujące standardową mieszankę paszową (grupa kontrolna) – pigs receiving standard compound feed (control)

D1 – zwierzęta otrzymujące standardową mieszankę paszową wzbogaconą o dodatek paszowy PX w ilości 1,5% – pigs receiving standard compound feed supplemented with PX in the amount of 1.5%

D2 – zwierzęta otrzymujące standardową mieszankę paszową wzbogaconą o dodatek paszowy PX w ilości 3% w sposób okresowy – pigs receiving standard compound feed supplemented with PX in the amount of 3% periodically

D3 – zwierzęta otrzymujące standardową mieszankę paszową wzbogaconą o dodatek paszowy PX w ilości 3% w sposób ciągły – pigs receiving standard compound feed supplemented with PX in the amount of 3% continuously

a, b, c – wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie pod względem statystycznym

a, b, c – statistically significant results are designated with different letters

koncentratu PX spowodowało obniżenie aktywności enzymu o prawie 4% u wieprzków i o 2,1% u loszek, w odniesieniu do kontroli. Analogicznie, w grupie D3 wartości te różniły się statystycznie ( $P \leq 0,05$ ) o 19% i prawie 11%. Wzrost aktywności MDH może



sugerować stres zwierząt, który prawdopodobnie jest induktorem tego enzymu, co potwierdzają badania Neeraj i wsp. [29] przeprowadzone na rybach. Tłumaczyć to można zwiększonym wówczas zapotrzebowaniem na energię, a tym samym nasileniem przemian zachodzących podczas cyklu Krebsa.

Aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) osiągnęła wartości 8,82-9,55 U/l u wieprzków oraz 8,61-9,23 U/l u loszek (tab. 3 i 4). Zastosowanie preparatu w ilości 3% u wieprzków sprawiło, że aktywność tego enzymu była niższa niż w kontroli, odpowiednio o 7,77% i 7,64%. U loszek tę zależność zaobserwowano jedynie w grupie D3, gdzie wartość ta była istotnie ( $P \leq 0,05$ ) niższa, o 6,72% w porównaniu do kontroli. Aktywność LDH u loszek nie odbiegała od norm, jakie podaje Winnicka [43], natomiast dla wieprzków z grup K i D1 wartości nieznacznie różniły się od ustalonych poziomów. Kędziński i Przychodzeń [18] wskazują, że dynamika tego białka może zależeć również od wieku badanych zwierząt. Eksperymenty przeprowadzone przez Krauze i Grełę [24] na indykach wskazują na istotny wpływ preparatu białkowo-ksantofilowego PX na aktywność dehydrogenazy mleczanowej. Analizowano w nich wskaźniki biochemiczne krwi indyków, którym podawano produkt PX w ilości 1,5% oraz 3% mieszanki paszowej. Aktywność enzymu uległa znacznemu obniżeniu w przypadku żywienia z 3% udziałem dodatku, co uważa się za korzystne, ponieważ sytuacja odwrotna (wzrost aktywności enzymu) mogłaby świadczyć o wystąpieniu stanów chorobowych [21, 22]. Enzym ten naturalnie występuje w cytoplazmie komórki, a do krwi przenika w następstwie obumarcia komórek oraz w przypadku zwiększonej przepuszczalności błony komórkowej [30].

Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w dynamice enzymu SDH między osobnikami należącymi do grup zróżnicowanych pod względem stosowanej dawki preparatu PX. Zmiana aktywności pomiędzy grupą kontrolną a pozostałymi utrzymywała się na poziomie 2%. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej kształtowała się w granicach 6,57-6,84 U/l w przypadku wieprzków oraz 6,63-6,86 U/l u loszek. W badaniach Krauze i Greli [24] wykazano, że stosowanie preparatu PX w różnych dawkach u 8-tygodniowych indyków tej samej płci nie wpływa na aktywność SDH. Brak zmian aktywności tego enzymu po zastosowaniu dodatku PX jest korzystnym zjawiskiem. SDH jest znacznikiem frakcji mitochondrialnej, występującej w organellach ulegających destrukcji w wyniku stresu oksydacyjnego. Ocenia się, że uszkodzenia mitochondrium powodują zwiększenie aktywności tego enzymu. Wnioskuje się zatem, że niski poziom dehydrogenazy bursztynianowej świadczy o prawidłowej pracy tego organellum [10, 11].

Brak wzrostu aktywności analizowanych enzymów należy zatem uznać za zjawisko korzystne, gdyż taka zmiana towarzyszyłaby nasilonemu metabolizmowi, co z punktu widzenia potrzeb organizmu i konsekwencji nadprodukcji różnych metabolitów, np. wolnych rodników, nie jest pożądana.

Na podstawie przeprowadzonych badań można sądzić, że dodatek preparatu białkowo-ksantofilowego PX z lucerny wpływa korzystnie na aktywność analizowanych enzymów, zwłaszcza hydrolazy glukozy-6-fosforanowej oraz dehydrogenazy mleczanowej i jabłczanowej. Uzyskana w omawianych badaniach niższa aktywność analizowanych enzymów, zwłaszcza w grupie świń żywionych mieszanką z 3% udziałem koncentratu

białkowo-ksantofilowego PX w sposób ciągły, wpływa na poprawę metabolizmu komórkowego. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość stosowania preparatu PX jako dodatku poprawiającego zdrowotność i efekty odchowu świń.

## PIŚMIENNICTWO

1. ARFMAN N., WATLING E. M., CLEMENT W., OOSTERWIJK R. J., GEDE V., HARDER W., ATTWOOD M. M., DIJKHUIZEN L., 1989 – Metanol metabolism in thermotolerant methylotrophic *Bacillus* strains involving a novel catabolic NAD-dependent methanol dehydrogenase as a key enzyme. *Archives of Microbiology* 152, 280-288.
2. BERTIN E., 2008 – Alfalfa leaf extract (EFL). [In:] Alfalfa in human and animal nutrition (ed. E.R. Grela). Stowarzyszenie Rozwoju Regionalnego i Lokalnego "Progress" Dzierżówka-Lublin 3, 29-37.
3. BURKE J.J., SIEDOW J.N., MORELAND D.E., 1982 – Succinate dehydrogenase. *Plant Physiology* 70, 1577-1581.
4. CLARKSON H.D.G., NEAGLE J., LINDSAY J.G., 1991 – Topography of succinate dehydrogenase in the mitochondrial inner membrane. *The Journal of Biochemistry* 273, 719-724.
5. CZECH A., 2010 – Lucerna i inne pasze białkowe w żywieniu zwierząt. [W:] Lucerna w żywieniu ludzi i zwierząt (red. E.R. Grela). 4rd International Conference „Feed and Food Additives”, Lublin – Sandomierz, s. 26-42.
6. CZECH A., SEMENIUK W., 2008 – Profil metaboliczny krwi świń żywionych mieszanką z udziałem koncentratu białkowo-ksantofilowego (PX) z lucerny. [W:] Lucerna w żywieniu ludzi i zwierząt (red. E.R. Grela). 3rd International Conference „Feed and Food Additives”, Dzierżówka – Lublin, s. 107-117.
7. DIMARCO N., BEITZ D., YOUNG J., TOPEL D., CHRISTIAN L., 1996 – Gluconeogenesis from lactate in liver of stress-susceptible and stress-resistant pigs. *Journal of Nutrition* 106 (5), 710-716.
8. DOLATOWSKI Z., 2008 – Jakość mięsa i produktów z indyków i świń żywionych paszą z dodatkiem koncentratu białkowo-ksantofilowego (PX) z lucerny. [W:] Lucerna w żywieniu ludzi i zwierząt (red. E.R. Grela). 3rd International Conference „Feed and Food Additives”, Dzierżówka – Lublin, s. 93-104.
9. DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA D., ŁOZIŃSKA-GABSKA M., ADAMOWICZ A., WOJTASZEK J., DZUGAJ A., 2003 – The effect of high dose of cortisol on glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-bisphosphatase activity, and glucose and fructose-2, 6-bisphosphate concentration in carp tissues (*Cyprinus carpio* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology* 135, 485-491.
10. FATTORETTI P., VECCHIET J., FELZANI G., GRACCIOTTI N., SALAZI M., CASELLI V., BERTONI-FREDEI C., 2006 – Succinate dehydrogenase activity in human muscle mitochondria during aging: a quantitative cytochemical investigation. *Mechanisms of Ageing and Development* 127 (6), 590-596.
11. FENTON R.A., DICKSON E.W., MEYER T.E., DOBSON J.G. JR., 2000 – Aging reduces the cardioprotective effect of ischemic preconditioning in the rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2, 1371-1375.

12. FOYE O.T., UNI Z., MCMURTRY J.P. FERKET P.R., 2006 – **The Effects of Amniotic Nutrient Administration, “In ovo Feeding” of Arginine And/or  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methyl Butyrate (HMB) on Insulin-like Growth Factors, Energy Metabolism and Growth in Turkey Poults.** *International Journal of Poultry Science* 5 (4), 309-317.
13. FURGAŁ W., MILIK K., 2008 – Studium przypadków zastosowania koncentratu białkowo-ksantofilowego z lucerny jako suplementu diety ludzi. [W:] Lucerna w żywieniu ludzi i zwierząt (red. E.R. Grela). 3rd International Conference „Feed and Food Additives”, Dzieńdziałówka – Lublin, s. 49-57.
14. GERIN I., SCHAFTINGEN E., 2002 – Evidence for glucose-6-phosphate transport in rat liver microsomes. *FEBS Letters* 517, 257-260.
15. GRELA E.R., SEMENIUK V., 2006 – **Konsekwencje wycofania antybiotykowych stymulatorów wzrostu z żywienia zwierząt.** *Medycyna Weterynaryjna* 62 (5), 502-507.
16. GRELA E.R., SEMENIUK V., SOSZKA M., 2007 – **Efektywność zastosowania koncentratu białkowo-ksantofilowego (PX) z lucerny w tuczu świń. Raport etapowy z badań zleconych.** Lublin, s. 1-15.
17. KALOUISTIAN H.D., STOLZENBACH F.E., EVERSE J., KAPLAN N.O., 1969 – Lactate dehydrogenase of lobster (*Homarus americanus*) tail muscle I. Physical and chemical properties. *Journal of Biological Chemistry* 244, 2891-2901.
18. KĘDZIERSKI W., PRZYCHODZEŃ M., 2002 – **Aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w osoczu krwi koni rasy arabskiej w różnych fazach treningu.** *Acta Scientiarum Polonorum, Medicina Veterinaria* 1 (2), 107-111.
19. KLAIN G., SULLIVAN F., CHINN K., HANNON J., JONES A., 1977 – Metabolic responses to prolonged fasting and subsequent refeeding in the pig. *Journal of Nutrition* 107 (3), 427-435.
20. KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L., 2002 – **Cytobiochemia. Biochemia niektórych struktur komórkowych.** Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
21. KOKOT F., HYLA-KLEKOT J., KOKOT S., 2011 – **Badania laboratoryjne.** Wydawnictwo PZWL, Warszawa.
22. KONCICKI A., BUKOWSKA A., MAZUR-GONKOWSKA B., KRASNODĘBSKA-DEPTA A., STENZEL T., 2006 – **Ocena skuteczności kwasu 4-nitrofenyloarsenowego w profilaktyce inwazji *Histomonas meleagridis* u indyków.** *Medycyna Weterynaryjna* 62 (10), 1191-1194.
23. KOWALCZUK-VASILEV E., MATRAS J., 2004 – **Zioła w żywieniu zwierząt – funkcje, mechanizm działania** ([http://www.rsi2004.lubelskie.pl/doc/sty5/art/Kowalczuk-Vasilev\\_E\\_art.pdf](http://www.rsi2004.lubelskie.pl/doc/sty5/art/Kowalczuk-Vasilev_E_art.pdf)).
24. KRAUZE M., GRELA T., 2010 – **Effects of an alfalfa concentrate in turkey diets on performance and some blood parameters.** *Archiv Fur Geflügelkunde* 74 (4), 226-232.
25. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J., 1951 – **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
26. LUDWICZUK A., GŁOWNIAK K., 2012 – **Charakterystyka chemiczna lucerny (*Medicago sativa* L.).** [W:] Lucerna w żywieniu ludzi i zwierząt (red. E.R. Grela). 5rd International Scientific Conference „Feed and Food Additives”, Lublin – Susiec, s. 27-35.
27. MINARIK P., TOMASKOVA N., ANTALIK M., KOLLAROVA M., 2002 – **Malate dehydrogenases – structure and function.** *General Physiology and Biophysics* 21, 257-265.

28. MIZUNO Y., 1985 – **Glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activities in early stages of development in dystrophic chickens.** *Journal of the Neurological Sciences* 68 (1), 47-60.
29. NEERAJ KUMAR S.B., JADHAO N.K., CHANDAN KUNDAN KUMAR A.K., JHA S., BHUSHAN SAURAV KUMAR R.S., 2012 – **Rana dietary choline, betaine and lecithin mitigates endosulfan-induced stress in Labeo rohita fingerlings.** *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 989-1000.
30. OGNIK K., KRAUZE M., 2016 – The potential for using enzymatic assays to assess the health of turkeys. *World's Poultry Science Journal* 72 (3), 535-550.
31. PLEWKA A., KAMIŃSKI M., PLEWKA D., NOWACZYK G., 2000 – **Glucose-6-phosphatase and age: biochemical and histochemical studies.** *Mechanisms of Ageing and Development* 113, 49-59.
32. PLEWKA A., PLEWKA D., IHNATOWICZ J., 2006 – Animals manifested the influence of age and some inducers on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Acta Toxicologica* 14 (1-2), 87-93.
33. PROCAJŁO A., 2006 – **Przydatność diagnostyczna markerów uszkodzenia mięśni szkieletowych u psów zaprzęgowych w treningu.** *Medycyna Weterynaryjna* 62 (3), 306-310.
34. RECHULICZ J., STEC M., 2008 – Wpływ dodatku koncentratu białkowo-ksantofilowego (PX) z lucerny na wzrost karpia (*Cyprinus carpio*). [W:] Lucerna w żywieniu ludzi i zwierząt (red. E.R. Grela). 3rd International Conference „Feed and Food Additives”, Dzierżkówka – Lublin, s. 129-136.
35. Regulation (EC) No 1831/2003 on the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official Journal of European Union* 268, 29-43.
36. Rokicki E., Kolbuszowski T., 1996 – Higiena zwierząt. Wyd. Fundacja Rozwoju SGGW, Warszawa.
37. RUSTIN P., MUNNICH A., ROTIG A., 2002 – **Succinate dehydrogenase and human diseases: New insights into a well-known enzyme.** *Journal of Human Genetics* 10, 289-291.
38. SANGIAO-ALVARELLOS S. GUZMÁN J.M., LÁIZ-CARRIÓN R., MÍGUEZ J.M., MARTÍN DEL RÍO M.P., MANCERA J.M., SOENGAS J.L., 2005 – Interactive effects of high stocking density and food deprivation on carbohydrate metabolism in several tissues of gilt-head sea bream *Sparus auratus*. *Molecular and Comparative Physiology* 303 (9), 761-775.
39. SCHMUCKER D.L., 1990 – Hepatocyte fine structure during maturation and senescence. *Journal of Electron Microscopy Technique* 14, 106-125.
40. SEMENIUK W., KLEBANIUK R., GRELA E.R., 2008 – Dodatki paszowe w żywieniu zwierząt. [W:] Lucerna w żywieniu ludzi i zwierząt (red. E.R. Grela). 3rd International Conference „Feed and Food Additives”, Dzierżkówka – Lublin, s. 139-164.
41. SWANSON M.A., 1955 – Determination of activity of glucose-6-phosphatase. *Methods in Enzymology*, Academic Press, NY 2, p. 541-543.
42. VIEGI L., PIERONI A., GUARRERA P.G., VANGELISTI R., 2003 – A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. *Journal of Ethnopharmacology* 89, 221-244.

43. WINNICKA A., 2008 – Wartości referencyjne podstawowych badań laboratoryjnych w weterynarii. SGGW, Warszawa.
44. ZGÓRKA G., GŁOWNIAK K., 2008 – Ocena aktywności biologicznej składników czynnych lucerny (*Medicago sativa* L.) na podstawie badań *in vitro* i *in vivo*. [W:] Lucerna w żywieniu ludzi i zwierząt (red. E.R. Grela). 3rd International Conference „Feed and Food Additives”, Dzierżkówka – Lublin. s. 39-47.

Katarzyna Abramowicz, Magdalena Krauze, Eugeniusz R. Grela

### The effect of protein-xanthophyll concentrate (PX) from alfalfa (*Medicago sativa* L.) on the activity of selected enzymes in the liver cells of fattening pigs

#### S u m m a r y

The available Polish and foreign literature contains few reports on the activity of indicator enzymes, especially marker enzymes, which characterize the work of specific cell organelles. Information on enzyme changes induced by experimental dietary factors is also scarce. We postulated that protein-xanthophyll PX alfalfa concentrate would have a positive effect on metabolism in fattening pigs, resulting in improved performance parameters. Therefore the aim of the study was to test the possibility of using enzymes that have not previously been used to assess the biochemical processes taking place following administration of PX. We evaluated the activity of enzymes associated with key biological transformations taking place in the cell, as this makes it possible to assess whether these processes are proceeding normally and to evaluate the response of the body to external factors. The experiment was conducted on 288 finishers (gilts and barrows), all of which were crossbreds (Polish Large White x Neckar), divided into 4 groups according to the dosage and duration of administration of protein-xanthophyll PX concentrate from alfalfa (*Medicago sativa* L.). The alfalfa concentrate was introduced to the compound feed in place of soybean extraction meal. We analysed the activity of selected marker enzymes: lactate dehydrogenase (LDH), malate dehydrogenase (MDH), succinate hydrolase (SDH), and glucose-6-phosphate hydrolase (G6PC). We found a decrease in the activity of the enzymes in the liver cells of the pigs receiving the PX concentrate as compared to the control, which suggests that the product had a favourable effect on their metabolism. The results confirm the benefit of using protein-xanthophyll PX in pig feed, particularly at a continuous dose of 3%.

**KEY WORDS:** pigs / feed additives / alfalfa / indicator enzymes