

## FIZJOLOGIA ZWIERZĄT

JERZY LECHOWSKI, BARBARA NAGÓRNA-STASIAK

Wpływ biotyny (witaminy H) na syntezę witaminy C, kwasu D-glukuronowego oraz aktywność L-gulono- $\gamma$ -oksydazy u kurcząt

Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Nauk Fizjologicznych Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

## Summary

## The influence of biotin (Vitamin H) on synthesis of vitamin C, D-glucuronic acid and activity of L-gulono-gamma-oxydase in chickens

The effect of biotin on synthesis of vitamin C in intestinal wall was examined on meat chickens. The birds were injected intraperitoneally 1 mg of biotin/day for 30 days and after sacrifice the content of vitamin C was determined in the wall of ileum and caecum by the method of Roe-Kuenthner, the level of an intermediate product of synthesis-D-glucuronic acid by the method of Bitter and the activity of L-gulono-gamma-oxydase active in a terminal phase of vitamin C synthesis by the method of Chatterjee.

It was found a significant increase of vitamin C in the experimental group of chickens comparing to controls from 274.1 mg/kg to 302.9 mg/kg in ileum and from 141.3 mg/kg to 158.8 mg/kg in caecum. The level of D-glucuronic acid increased in ileum by 137% and in caecum by 16%. The activity of L-gulono-gamma-oxydase increased by about 50%. Biotin increased also absorption of vitamin C from intestines determined by the method of perfused intestinal loop in vivo. This observation is valid for the animals and man that can not synthesize ascorbic acid or synthesize the acid only in a small degree, and ascorbic acid is supplied with food only. Acceleration of ascorbic acid synthesis by biotin in animals that are able to synthesize ascorbic acid can protect these animals against deficiency of vitamin C in food.

Poziom witamin w organizmie uzależniony jest od ich wchłaniania z przewodu pokarmowego oraz od ich syntezy przez sam organizm lub florę bakteryjną jelit. Witamina C (kwas askorbowy) u kurcząt wchłania się zarówno z jelita czczego, jak i ślepego, w niższych stężeniach na zasadzie transportu czynnego, w wyższych zaś na zasadzie biernej dyfuzji (20). Jak wykazano, wiele witamin rozpuszczalnych w wodzie przyspiesza lub zwalnia ten proces (21, 22, 23). Witamina jest syntetyzowana w różnych ilościach przez zwierzęta i ptaki, a zdolności tej nie posiadają owady, ryby i świnki morskie, co jest związane z brakiem enzymów biorących udział w przemianie glukozy w tę witaminę (10, 12, 13, 14, 16, 24). Pośrednim produktem powstawania witaminy C z glukozy jest kwas D-glukuronowy, zaś enzym L-gulono- $\gamma$ -oksydaza bierze udział w końcowej fazie przekształcenia L-gulono- $\gamma$ -laktanu w kwas L-askorbowy (3, 18).

Biotyna (witamina H) bierze czynny udział w przemianie węglowodanów, wchodząc w skład wielu enzymów katalizujących reakcję karboksylacji i dekarboksylacji tj. wiązania lub uwalniania dwutlenku węgla. Biotyna bierze również udział w metabolizmie aminokwasów. Jak wykazano niedobór biotyny zaburza przekształcenie leucyny w szczawiooctan, zmniejsza też zdolność syntetyzowania cytruliny z ornityny w wątrobie (29). Niedobór biotyny u kurcząt powodował zmiany

zapalne skóry, perozę, deformację kości, zmniejsza się również wylęgowość (5, 6, 15).

W pokarmach naturalnych biotyna występuje zarówno w formie związanej, jak i wolnej. Prawdopodobnie jednak część witaminy związanej biologicznie jest niedostępna dla zwierząt (27). Pewna część biotyny jest rozkładana lub wykorzystywana przez bakterie przewodu pokarmowego, ale również witamina ta jest syntetyzowana przez mikroflorę zasiedlającą jelita, szczególnie jelito ślepe (4, 11, 17, 28). Istnieje szereg czynników powodujących brak wchłaniania biotyny z jelit. Należą do nich np. awidyna, wydzielana przez jajo-wód kury do białka jaja. Powstający z połączenia kompleks awidyna-biotyna nie ulega rozłączeniu, więc biotyna w ten sposób złączona jest niedostępna dla organizmu. Istnieją również związki pochodne biotyny, które działają jako antywitamina. Należą tu detiobiotyna, sulfon biotyny, jak również imidazolidan kwasu kapro-nowego (9).

Istnieją doniesienia o wpływie biotyny na poziom witaminy C w ustroju. Wykazano, że u szczerów z niedoborami biotyny w diecie obniżała się synteza kwasu askorbowego, u indyków natomiast takiej zależności nie stwierdzono (1, 7, 29).

Celem pracy było wykazanie, czy biotyna ma wpływ na wchłanianie witaminy C z przewodu pokarmowego oraz czy wywiera ona wpływ na syntezę kwasu askorbowego w ścianach jelit u kurcząt.

## Materiał i metody

Badania wykonano na 45 kurczętach mięsnych w wieku od 6 do 10 tygodni. 20 kurcząt 6-tygodniowych o masie ciała śr. 1,3 kg podzielono na 2 grupy; 10 kurcząt traktowano jako grupę kontrolną, 10 zaś otrzymywało dootrzewnowo raz dziennie przez 30 dni 1 mg biotyny (witaminy H) w 1 ml płynu fizjologicznego. Kury przebywały w pomieszczeniu o temp. otoczenia 16°C—18°C i żywione były mieszanką paszową niestandardową. Skład mieszanki: otręby i śruty zbożowe, śruty z nasion roślin strączkowych, śruty poekstrakcyjne z nasion roślin oleistych, mączka zwierzęca, susz z zielonek, kreda pastewna. Do 1 kg mieszanki dodano: 7000 j.m. witaminy A, 1000 j.m. D<sub>3</sub>, 10 mg E, 18 mg witaminy B<sub>1</sub>, 18 mg B<sub>2</sub>, 6 mg B<sub>6</sub>, 20 µg B<sub>12</sub>, 50 mg kwasu nikotynowego, 2000 mg chlorku choliny, 6 mg kwasu foliowego, 20 mg pantotenianu wapnia, 10 g Ca, 5 g P przy-szwajalnego, 2 g Na ogólnego, 113,8 mg Mn czystego, 600 mg Mg; 74,6 mg Zn; 100,5 mg Fe, 10,7 mg Cu.

1 kg mieszanki dostarczał 2900 kcal energii metabolicznej, 18% białka ogólnego, 4,5% włókna surowego; 0,9% lizyny; 0,4% metioniny; 0,2% tryptofanu. Pasza nie zawierała witaminy C, co stwierdzono na podstawie badania laboratoryjnego.

Po 30 dniach kurczęta ważono (śr. masa ciała 2,0 kg) i następnie zgładzano w celu pobrania odcinków jelita czczego i ślepego. W ścianie jelit oznaczono poziom witaminy C (kwasu askorbowego) metodą Roe-Kuenthnera (25, 26), kwas D-glukuronowy metodą Bittera i Muira (2) oraz aktywność enzymu występującego w mikrosomach L-gulono- $\gamma$ -oksydazy metodą Chatterjee (3) i wyrażano ją w jednostkach enzymatycznych (jednostka enzymatyczna U — ilość enzymu syntetyzująca 1 µmol kwasu askorbowego w ciągu godziny).

U 25 kurcząt określano przyżyciowo metodą perfuzyjowej pętli jelitowej wchłanianie witaminy C z jelita czczego i ślepego w obecności biotyny w stężeniu 50 mg/l i 100 mg/l (19, 20). Kwas askorbowy oznaczano metodą Roe-Kuethnera, a ilość wchłoniętej witaminy wyrażano w mg/l/cm<sup>2</sup>/60 min. Jednocześnie oznaczano pH płynu perfuzyjnego z witaminami oraz w doświadczeniach *in vitro* poziom kwasu askorbowego po zmieszaniu z biotyną, aby wykazać, czy nie posiada ona właściwości niszczących kwas askorbowy w płynie perfuzyjnym.

W doświadczeniach stosowano kwas L-askorbowy cz. Polfa c.c.z. 176,0; L-gulono- $\gamma$ -lakton c.c.z. 178,1 Sigma; kwas D-glukuronowy c.c.z. 194,1 Sigma; biotyna c.c.z. 250,0 Serva. Wyniki pracy poddano analizie statystycznej posługując się testem t-Studenta.

### Wyniki i omówienie

Witamina C powstaje w tkankach z glukozy, a jednym z pośrednich produktów jest kwas D-glukuronowy. W procesie tym bierze udział wiele enzymów, między innymi L-gulono- $\gamma$ -oksydaza występująca w mikrosomach, która uczestniczy w powstawaniu ostatecznej formy kwasu L-askorbowego (10, 13, 14, 16). Ponieważ, jak wykazały badania, pasza kurcząt nie zawierała witaminy C, więc całość witaminy występująca w tkankach pochodziła z syntezy przez własny organizm. Aby wykazać, czy biotyna wywiera wpływ na proces syntezy witaminy C, po 30 dniach podawania jej dootrzewnowo, oznaczano w ścianie jelita czczego i ślepego poziom kwasu askorbowego, kwasu glukuronowego oraz aktywność enzymu L-gulono- $\gamma$ -oksydazy.

Wykazano, że w ścianie jelita czczego w grupie kurcząt doświadczalnych w porównaniu do kontrolnych, poziom witaminy C wzrósł z 274,7 mg/kg tkanki do 302,9 mg/kg (100%—110%). Zaobserwowano istotny wzrost kwasu D-glukuronowego, bo z 1590 mg/kg do 3770 mg/kg (100%—273%). Mniejszy wzrost witaminy C w porównaniu do bardzo istotnego wzrostu poziomu kwasu D-glukuronowego należy tłumaczyć tym, że z tego ostatniego powstaje nie tylko kwas L-askorbowy, ale również L-ksyluloza (18). Aktywność enzymu L-gulono- $\gamma$ -oksydazy wzrosła z 0,337 U do 0,489 U (100%—145%).

W ścianie jelita ślepego wartość kwasu askorbowego wzrosła z 141,3 mg/kg do 158,8 mg/kg (100%—112%), kwasu D-glukuronowego z 1060 mg/kg do 1230 mg/kg (100%—116%), a aktywność enzymu L-gulono- $\gamma$ -oksydazy z 0,312 U do 0,527 U (100%—169%), (tab. 1).

Można więc stwierdzić na podstawie przeprowadzonych badań, że biotyna powodowała u kurcząt znaczny wzrost syntezy witaminy C, czego dowodzi nie tylko wzrost ilości kwasu askorbowego w ścianie jelit, ale również wzrost ilości produktu pośredniego, jakim jest kwas D-glukuronowy oraz wzrost aktywności L-gulono- $\gamma$ -oksydazy. Podniesienie poziomu kwasu D-glukuronowego po biotynie jest spowodowane tym, że posiada ona właściwości przyspieszania procesów fosforylacji glukozy (8). Wykazano u szczurów, że niedobór biotyny redukuje fosforylację glukozy, obniżając syntezę witaminy C, która powstaje właśnie z tego węglowodanu (7, 29). U indyków zdecydowanego wpływu biotyny na produkcję witaminy C w tkankach nie wykazano, ale w surowicy poziom jej ulegał podwyższeniu (1). Biotyna wywierała niewątpliwie bardzo wyraźny wpływ na wchłanianie witaminy C zarówno z jelita czczego, jak i ślepego (tab. 2). Dodatek do roztworu perfuzyjnego zawierającego 200 mg/l kwasu askorbowego, 50 mg/l biotyny, powodowało wzrost wchłaniania witaminy C w jelicie czczym o 42%, ślepym zaś o 31%. Wyższe stężenie biotyny, wynoszące 100 mg/l, znacznie zwiększyło

Tab. 1. Poziom witaminy C, kwasu D-glukuronowego oraz aktywność enzymu L-gulono- $\gamma$ -oksydazy w ścianie jelit kurcząt otrzymujących dootrzewnowo 1 mg biotyny dziennie ( $\bar{x} \pm s$ )

	Grupa	Jelito czcze	%	Jelito ślepe	%
Witamina C mg/kg n=50	K	274,7 $\pm$ 9,23 a	100	141,3 $\pm$ 4,60 a	100
	D	302,9 $\pm$ 8,06 b	110	158,8 $\pm$ 7,31 b	112
Kwas D-glukuronowy mg/kg n=25	K	1590 $\pm$ 55,15 a	100	1060 $\pm$ 44,96 a	100
	D	3770 $\pm$ 62,98 b	237	1230 $\pm$ 60,34 b	116
L-gulono- $\gamma$ -oksydaza U n=10	K	0,337 $\pm$ 0,011 a	100	0,312 $\pm$ 0,008 a	100
	D	0,489 $\pm$ 0,011 b	145	0,527 $\pm$ 0,015 b	169

Objaśnienia: K — grupa kontrolna, D — grupa doświadczalna, a, b — średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p \leq 0,05$ .

Tab. 2. Wchłanianie witaminy C z jelit kurcząt w zależności od stężenia biotyny ( $\bar{x} \pm s$ ; n = 27)

Stężenie witamin w płynie infuzyjnym mg/l	Wchłonięty kwas askorbowy mg/l/cm <sup>2</sup> /60 min.			
	Jelito czcze	%	Jelito ślepe	%
Witamina C 200	2,60 $\pm$ 0,14 a	100	4,00 $\pm$ 0,39 a	100
Witamina C 200 + biotyna 50	3,70 $\pm$ 0,18 b	142	5,24 $\pm$ 0,09 b	131
Witamina C 200 + biotyna 100	6,70 $\pm$ 0,39 c	257	8,66 $\pm$ 0,24 c	216

Objaśnienie: a, b, c — średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p \leq 0,05$ .

Tab. 3. Wartość odzyskanego kwasu askorbowego z płynu fizjologicznego przed i po dodaniu biotyny w doświadczeniach *in vitro* (n = 10) — pH roztworu 3,56

Dodana biotyna mg/l	Dodany kwas askorbowy mg/l	%	Odzyskany kwas askorbowy mg/l	%
—	200	100	199,70 $\pm$ 1,43 a	99,85
50	200	100	198,50 $\pm$ 0,46 a	99,25
100	200	100	197,05 $\pm$ 0,68 a	98,52

Objaśnienie: jak w tab. 2.

wchłanianie witaminy C, bo w jelicie czczym o 157%, ślepym zaś o 116%. Zmieszanie witaminy C z biotyną w doświadczeniach *in vitro* wykazało, że nie jest ona niszczone przez biotynę, pH roztworu również nie ulega zmianie (tab. 3). Można więc przyjąć, że cały ubytek witaminy C z roztworu perfuzyjnego należy zaliczyć jako witaminę wchłoniętą. Jak wykazały poprzednie badania wiele witamin rozpuszczalnych w wodzie zmniejsza w różnym stopniu wchłanianie witaminy C, np. witamina B<sub>1</sub>, kwas nikotynowy, pantotenian wapnia, czy też chlorek choliny (20, 21, 22, 23). Ze znanych witamin rozpuszczalnych w wodzie jedynie kwas foliowy zwiększał wchłanianie kwasu askorbowego (22). Bio-

tyna więc należy do niewielu witamin, które podnoszą poziom witaminy C w ustroju poprzez lepsze wchłanianie. Mechanizm ten jest bardzo istotny szczególnie u zwierząt, u których synteza witaminy C nie zachodzi z powodu braku odpowiednich enzymów lub też istnieje w bardzo niewielkim stopniu jak u człowieka (10, 12, 13, 14, 16, 18, 24). Źródłem biotyny dla zwierząt jest pokarm oraz bakterie jelita grubego, które wytwarzają ją w dużych ilościach. Jednakże ilość biotyny wchłonięta do organizmu jest trudna do określenia, ponieważ w materiałach naturalnych biotyna może występować w formie związanej, niedostępnej dla zwierząt oraz w formie wolnej, która może być wchłonięta z przewodu pokarmowego (27). Źródłem biotyny dla zwierząt jest również koprofagia — zjadanie własnego kału bogatego w witaminę. W przewodzie pokarmowym biotyna jest produkowana przez florę bakteryjną jelit i to nie tylko u kur, ale również u świń, królików i bydła. Wykazano, że wycięcie jelita ślepego powodowało znaczne zmniejszenie produkcji witamin w przewodzie pokarmowym, między innymi i biotyny (4, 11, 17, 28). Niemniej jednak należy pamiętać, że część witamin produkowana przez bakterie jelitowe lub z pokarmu jest wykorzystywana konkurencyjnie przez samą florę bakteryjną. Istnieje również wiele substancji działających jako antywitamina w stosunku do biotyny, jak np. detiobiotyna (9). Tak więc ilość biotyny wykorzystywana przez sam organizm jest trudna do określenia.

Biotyna u kurcząt zapobiega zmianom zapalnym skóry, perozie, zapobiega również spadkowi wylęgowości (5, 6, 15). Według niniejszych badań powoduje wzrost wchłaniania witaminy C oraz wzrost jej syntezy w ścianie jelit. Intensywna synteza witaminy C przez ściany jelita cienkiego i grubego u kur została wykazana już uprzednio (24). Tak więc biotyna podnosząc poziom kwasu askorbowego wpływa pośrednio na syntezę kolagenu w organizmie. Stąd więc jej wpływ na tworzenie chrząstek i proces kostnienia (5).

#### Wnioski

1. Biotyna powoduje wzrost syntezy witaminy C w ścianie jelit, co u zwierząt, które tę zdolność posiadają

może w pewnym stopniu zapobiegać niedoborom witaminy C w pożywieniu.

2. Biotyna wzmacnia wchłanianie witaminy C, co jest bardzo istotne dla tych zwierząt i człowieka, u których nie zachodzi synteza kwasu askorbowego w organizmie lub w bardzo niewielkim stopniu, a jest on dostarczany tylko z pożywieniem.

#### Piśmiennictwo

1. Arends L., Kienholz E.: J. Nutr. 102, 1667, 1972.
2. Bitter T., Muir M.: Analyt. Biochem. 4, 30, 1962.
3. Chatterjee I.: Methods. Enzymol. 18, 28, 1970.
4. Coates M., Ford J., Harrison G.: Br. J. Nutr. 22, 493, 1968.
5. Couch J., Cravens W., Elvehjem C., Halpin J.: Anat. Rec. 100, 29, 1948.
6. Cravens W., Sebesta W., Halpin J., Hart E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 50, 101, 1942.
7. Dakshinamurti K., Mistry S.: Arch. Biochem. Biophys. 99, 254, 1962.
8. Dakshinamurti K., Cheak-Tan K.: Arch. Biochem. Biophys. 127, 17, 1968.
9. Dittmer K., Du Vigneaud V.: Science 100, 129, 1944.
10. Avans C., Conney A., Trousof N., Burns J.: Biochem. Biophys. Acta. 41, 9, 1960.
11. Ford D.: Br. Poul. Sci. 1, 131, 1974.
12. Hill B., Starcher B.: J. Nutr. 85, 271, 1965.
13. Isherwood F., Chen Y., Mapson L.: Biochem. J. 56, 1, 1954.
14. Jackel S., Mosbach S., Burns J., King C.: J. Biol. Chem. 186, 569, 1950.
15. Jukes T., Bird F.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 49, 231, 1942.
16. Kagawa Y., Takiguchi H.: J. Biochem. 3, 197, 1962.
17. Kapiński J., Leibholz J., Bryden W.: Br. J. Nutr. 62, 773, 1989.
18. Levin S.: Vitamin C, Acad. Press., London New York San Francisco, 1976.
19. Mykkanen H., Fullmer C., Wasserman R.: J. Nutr. 114, 68, 1984.
20. Nagórna-Stasiak B., Łazuga-Adamczyk A., Kolodyńska M.: Medycyna Wet. 10, 631, 1986.
21. Nagórna-Stasiak B., Kolodyńska M.: Medycyna Wet. 12, 754, 1987.
22. Nagórna-Stasiak B., Łazuga-Adamczyk A., Kolodyńska M.: Medycyna Wet. 4, 235, 1987.
23. Nagórna-Stasiak B., Kolodyńska M.: Medycyna Wet., 9, 572, 1988.
24. Nagórna-Stasiak B., Wawrzeńska M.: Medycyna Wet. 7, 430, 1988.
25. Roe J., Kuenther C.: J. Biol. Chem. 47, 399, 1943.
26. Roe J.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 92, 277, 1961.
27. Scott M., Nesheim M., Young R.: Żywnienie Kur. PWRiL, Warszawa 1978.
28. Sunde M., Cravens W., Elvehjem C., Halpin J.: Poultry Sci. 29, 10, 1950.
29. Terroine T.: Vitamins Hormones 18, 1, 1960.

Adres autora: mgr Jerzy Lechowski, ul. Dragonów 14/16, 20-554 Lublin

**STUEN S., FRIDRIKDOTTIR V.:** Daświadczenie zakażenia owiec *Borrelia burgdorferi*. (Experimental inoculation of sheep with *Borrelia burgdorferi*). Vet. Rec. 129, 315, 1991 (14)

Przeciwciała dla *Borrelia burgdorferi* stwierdzono u owiec w Szwecji. Owce przebywały na pastwiskach, na których był obecny *Ixodes ricinus*. Celem wykazania ewentualnego działania patogennego *B. burgdorferi* jagnięta w wieku 3 mies. — 1 rok zakażono dożylnie, śródskórnym lub podskórnym mieszaniną dwóch żywych szczepów *B. burgdorferi*. Cztery jagnięta zakażono ponownie po roku tym samym szczepem *Borrelia*. Ponadto 4 jednoroczne jagnięta zakażono *Whirllichia phagocytophila*, a 3 z nich po 5 dniach zakażono dodatkowo *B. burgdorferi* dożylnie, śródskórnym lub podskórnym. U zakażonych zwierząt nie wystąpiły objawy chorobowe. Jedynie w miejscu zakażenia dochodziło do lokalnego przekrwienia. Nie występowały też zmiany we krwi i nie wykazano obecności *Borrelia* we krwi heparynizowanej i w preparatach mazanych sporządzonych z krwi. Serokonwersja wystąpiła po tygodniu po zakażeniu ponownym.

G.

**LYSONS R. J.:** Aglutynacja mikroskopowa szybkim testem wykrywania *Treponema hyodysenteriae*. (Microscopic agglutination: a rapid test for identification of *Treponema hyodysenteriae*). Vet. Rec. 129, 314—315, 1991 (14)

Rozpoznanie laboratoryjne dyzenterii świń opiera się o wykazanie obecności *Treponema hyodysenteriae* w bezpośrednim badaniu mikroskopowym oraz w odczynie immunofluorescencji. Jednakże bardzo często uzyskuje się wyniki fałszywie dodatnie i fałszywie ujemne. Bardzo zachęcające rezultaty uzyskano w odczynie aglutynacji mikroskopowej w mikroskopie fazowo-kontrastowym lub w ciemnym polu widzenia. Aglutynację od 10—50% krętków uznano za wynik pozytywny, 50—100% bardzo silnie dodatni. W przypadku wyniku ujemnego do 10% krętków jest aglutynowane. Badania porównawcze odczynu aglutynacji szkiełkowej i mikroskopowej przeprowadzone z 12 szczepami *T. hyodysenteriae* i 9 szczepami krętków wysobnionych z jelit wykazały bardzo dużą przydatność odczynu aglutynacji mikroskopowej.

G.