

Aktivnost alkoholdehidrogenaze u jetri krava muzara

Mira Kovačević^{1*}, Slavica Košarčić¹, Milovan Jovičin¹, Ivan Vujanac²,
Aleksandar Milovanović¹, Dejan Bugarski¹, Tomislav Barna¹

¹Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad, Rumenački put br. 20

²Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Bulevar oslobođenja 18

Kratak sadržaj

Na velikim farmama u našoj zemlji silaža je važan dio obroka krava muzara. U sastavu silaže, kao produkti fermentacije pojavljuju se u različitim količinama različite vrste alkohola, a pre svih etil alkohol. Osim toga, u buragu krava hranjenih lako svarljivim ugljenim hidratima, uobičajeno se mogu utvrditi manje količine etanola. Cilj ovog rada je bio da se utvrdi da li se alkohol, koji se dodaje u burag, resorbuje u krv, koliko se dugo zadržava u krvi i kolika je aktivnost ADH u jetri krava koje su alkohol dobijale tokom 21 dana. Za potrebe ovog rada su bila postavljena dva eksperimenta. U prvom eksperimentu su tri krave u periodu puerperijuma, pre obroka dobijale po 100, 200 ili 300 ml preparata „Energy plus” koji u svom sastavu ima 30% etil alkohola. Uzorci krvi su uzimani pre davanja preparata (0) i 1, 2, 3 i 4. sata nakon tretmana radi određivanja koncentracije etanola. U drugi eksperiment su bile uključene 3 krave u periodu visokog graviditeta, 10 dana prepartalno. Ove životinje su dobijale po 300 ml preparata „Energy plus” tokom 21 dana (10 dana prije očekivanog termina telenja i 11 dana postpartalno). Jedanaestog dana postpartalno uzimani su uzorci krvi i buragovog sadržaja radi određivanja koncentracije etanola. Buragov sadržaj je uziman 1 sat, a krv 2 sata nakon tretmana. Odmah nakon uzorkovanja krvi urađena je biopsija jetre radi određivanja aktivnosti ADH. Na koncentraciju etanola u krvi krava je uticalo vreme uzorkovanja pokazujući najveće razlike između prvog i drugog uzorkovanja ($p=0,01$), kao prvog i trećeg ($p=0,03$), dok između prvog i poslednja dva uzorkovanja nema statistički značajnih razlika. Također postoji visok koeficijent korelacije ($r=0,92$, $0,97$ i $0,97$) između koncentracije alkohola u krvi i količine alkohola koju su krave dobile infuzijom etanola (100, 200, 300 ml). Dodavane količine alkohola su takve da prekomerno ne pokreću metabolički put razgradnje alkohola u jetri, s obzirom na činjenicu da se aktivnost ADH nalazi u fiziološkim granicama.

Ključne riječi: jetra, etanol, aktivnost alkoholdehidrogenaze, krave muzare

* e-mail: mira@niv.ns.ac.yu

Alcohol hydrogenase activity in the liver of dairy cows

Mira Kovačević¹, Slavica Košarčić¹, Milovan Jovičin¹, Ivan Vujanac²,
Aleksandar Milovanović¹, Dejan Bugarski¹, Tomislav Barna¹

¹Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”, Novi Sad, Rumenački put 20

²Faculty of Veterinary Medicine, Beograd, Bulevar oslobođenja 18

Apstract

On large farms in our country silage presents an important part in dairy cows ration. During the process of fermentation, different kinds and amounts of alcohol, first of all ethyl alcohol, emerge in silage. Besides this, in rumen of cows fed with easily digested carbohydrates, a small quantity of ethanol can be detected. The aim of this paper was to determine if alcohol added to rumen is resorbed in blood, determine how long it retains in blood and what is ADH activity in liver in the cows that have been receiving alcohol for 21 days. Two experiments were set for this purpose. In the first experiment three cows in the phase of puerperium received 100, 200 or 300 ml/ratio „Energy plus” that contains 30% of ethyl alcohol. The blood was sampled before administration of „Energy plus” (0) and 1, 2, 3 and 4 hours after treatment for determining ethanol concentration. The second experimente included 3 cows in high gravity, 10 days prepartal. They were given „Energy plus” for 21 days (10 days before expected calving and 11 days postpartum). On the eleventh day postpartum the blood and rumen content were sampled for determining ethanol concentration. The rumen content was sampled 1 hour and blood 2 hours after the treatment. Immediately after blood sampling liver biopsy was done for determining ADH activity. The concentration of ethanol in blood was influenced by time of sampling showing the largest differences between the first and second sampling ($p=0.01$), as well between the first and the third ($p=0.03$), while between the first and the last two sampling there were no statistically important differences. Also, the correlation coefficient was very high ($r=0.92$, 0.97 and 0.97) between concentration of alcohol in blood and amount of alcohol that the cows received through ethanol infusion (100, 200, 300 ml). Added amount of alcohol did not significantly change metabolic decomposition of alcohol in liver, since activity of ADH is within the limits of physiological values.

Key words: liver, ethanol, alcohol hydrogenase activity, dairy cows

UVOD

Na velikim farmama u našoj zemlji silaža je važan deo obroka krava muzara. U sastavu silaže, kao produkti fermentacije pojavljuju se u različitim količinama različite vrste alkohola, a pre svih, etil alkohol. Osim toga, u buragu krava hranjenih lako svarljivim ugljenim hidratima, uobičajeno se mogu utvrditi manje količine etanola (Allison, 1964; Pradhan, 1970) što je u skladu sa rezultatima drugih istraživača (Teunissen, 1992; Laukova, 1992) koji su pokazali da gljivice i bakterije buraga mogu da sintetišu alkohole.

Pedesetih godina prošlog veka se smatralo da alkohol kao aditiv manje kvalitetnim obrocima u ishrani preživara utiče na bolje iskorištavanje uree (Andersson, 1955, 1957), ali već šezdesetih istraživači zaključuju da je u ishrani preživara etanol značajan samo kao izvor energije (Emery, 1959; Garrett, 1963; Chalupa, 1964).

Oraskov i Hemken (1967) su nedvosmisleno utvrdili povećanje procenta mlečne masti nakon kontinuirane infuzije etanola, a Radby (1999) osim povećanja procenta mlečne masti ukazuje i na povećanje koncentracije proteina u mleku. Međutim, isti autor je utvrdio da dodavanje većih količina etanola u obrok za ishranu krava uzrokuje promenu i ukusa i mirisa mleka.

Metabolizam etanola je najdetaljnije ispitano kod ljudi, što je dobro dokumentovano u preglednom radu Crabba i sar. (2004). Utvrđeno je da su za katabolizam ovog alkohola ključna dva enzima, alkohol dehidrogenaza (ADH) i aldehid dehidrogenaza (ALDH), a oba enzima imaju više izoenzimskih formi. Alkoholdehidrogenaza se nalazi u citosolu i mikrozomima, a ALDH je mitohondrijalni enzim. U nizu reakcija etanol preko acetaldehida prelazi u acetil CoA uz stvaranje redukovano NAD (NADH).

Sudbina etanola iz buragovog sadržaja vezana je za mikrobijalni metabolizam, ali i za apsorpciju preko buragove sluzokože (Jean-Blain 1992). Ispitivanje aktivnosti ADH u različitim organima goveda uradili su Kovar i sar. (1983). Prema rezultatima tih ispitivanja aktivnost alkohol dehidrogenaze je najveća u jetri, ali je detektovana i u bubrezima, duodenumu, nadbubrežnoj žlezdi, plućima, slezini, srcu, timusu i ovarijumu. Aktivnost ADH u ovim organima je značajno manja u odnosu na jetru.

Metabolizam alkohola kod mlečnih krava, kako je rekao Kristensen (2007), komplikovan je sistem zbog toga što je broj njegovih izvora veliki, zbog toga što postoje višestruke mogućnosti razgradnje alkohola, a istovremeno je i nedovoljno rasvetljen.

Cilj ovog rada je bio da se utvrdi da li se alkohol koji se dodaje u burag resorbuje u krv, koliko se dugo u krvi zadržava i kolika je aktivnost ADH u jetri krava koje su alkohol dobijale tokom 21 dana.

MATERIJAL I METODE RADA

Za potrebe ovog rada su bila postavljena dva eksperimenta. U prvom eksperimentu su tri krave u periodu puerperijuma pre obroka dobijale po 100, 200 ili 300 ml preparata „Energy plus” koji u svom sastavu ima 30% etil alkohola. Uzorci

krvi su uzimani pre davanja preparata (0) i 1, 2, 3 i 4 sata nakon tretmana radi određivanja koncentracije etanola.

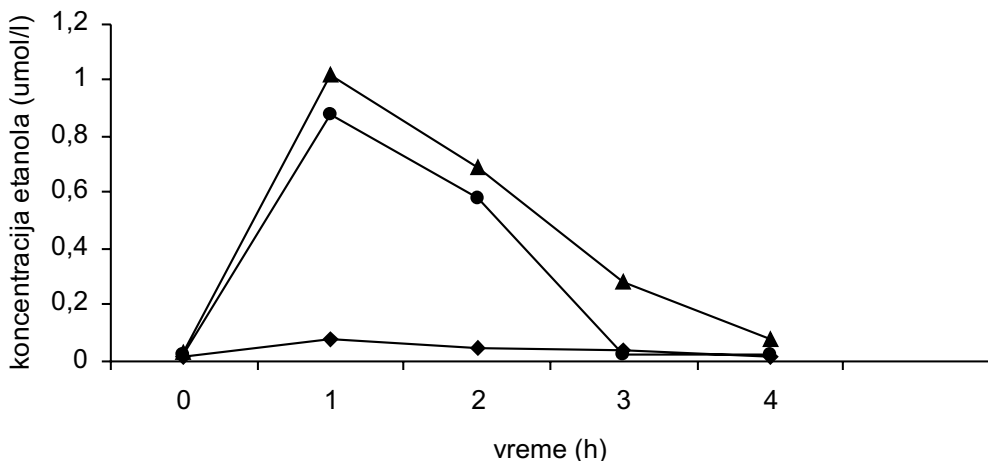
U drugi eksperiment su bile uključene 3 krave u periodu visokog graviditeta 10 dana prepartalno. Ove životinje su dobijale po 300 ml preparata „Energy plus” tokom 21 dana (10 dana prije očekivanog termina telenja i 11 dana postpartalno). Jedanaestog dana postpartalno uzimani su uzorci krvi i buragovog sadržaja radi određivanja koncentracije etanola. Buragov sadržaj je uziman 1 sat, a krv 2 sata nakon tretmana. Odmah nakon uzorkovanja krvi urađena je biopsija jetre radi određivanja aktivnosti ADH.

Uzorci krvi su uzimani punkcijom v. jugularis u epruvete koje su sadržavale natrijum fluorid kao antikoagulans. Uzorkovanje buragovog sadržaja vršeno je pomoću univerzalne predželudačne opružne sonde UPS-NS (Lalić i sar., 1996). Biopsija jetre je rađena modifikovanom metodom (Gaal, 1983) koju su preporučili Iversen i Rahlom (1939), a uzorci su transportovani u plastičnim kesicama u ledu na -18°C .

U uzorcima krvi je određivana koncentracija alkohola gasnom hromatografijom, plameno jonskim detektorom. Aktivnost ADH je određivana kolorimetrijski, upotrebom seta (cat:E-108) BRSC, USA. Reakcija je zasnovana na redukciji tetrazolium soli INT u NADH u enzimatskoj reakciji u formazon koji je rastvoriv u vodi i ima maksimum apsorpcije na 492 nm.

REZULTATI RADA

Grafikon 1. Koncentracija etil alkohola u krvi (μmol/ml) krava koje su dobile po 100 ml (◆), 200 ml (●) ili 300 ml (▲) preparata „Energy plus”. Redosled na x osi: (0) označava uzimanje uzoraka krvi prije davanja preparata, a 1, 2, 3 i 4 označavaju vreme uzorkovanja krvi nakon davanja preparata (sati).



Na koncentraciju etanola u krvi krava je uticalo vreme uzorkovanja pokazujući najveće razlike između prvog i drugog uzorkovanja ($p=0,01$), kao prvog i trećeg ($p=0,03$) dok između prvog i poslednja dva uzorkovanja nema statistički značajnih razlika. Također postoji visok koeficijent korelacije ($r=0,92, 0,97$ i $0,97$) između koncentracije etanola u krvi i količine alkohola koju su krave dobile infuzijom etanola u burag (100, 200, 300 ml).

Tabela 2. Koncentracija etanola u buragu i krvi i aktivnost ADH u jetri krava koje su preparat „Energy plus” dobijale tokom 21 dana

Koncentracija etanola u buragovom sadržaju ($\mu\text{mol/ml}$)	Koncentracija etanola u krvi ($\mu\text{mol/ml}$)	Aktivnost ADH u jetri (nkcat/g proteina)
$0,64\pm0,24$	$0,21\pm0,06$	3200 ± 200

Koncentracija etanola u buragovom sadržaju je viša u odnosu na njegovu koncentraciju u krvi, ali razlika nije statistički značajna. Aktivnost alkohol dehidrogenaze u jetri krava je u okviru fizioloških granica.

DISKUSIJA

Rezultati naših ispitivanja pokazuju da se najveća količina etanola iz sadržaja buraga u krv apsorbuje u toku prvog sata nakon infuzije preparata „Energy plus”. Nakon toga koncentracija etanola u krvi postepeno opada da bi četiri sata posle davanja infuzije dostigla početni nivo. Kristensen i sar. (2007) su utvrdili da etanol u krvi krava dostiže najvišu koncentraciju 3 sata nakon tretmana, a nakon 7 sati koncentracija etanola u krvi dolazi na početni nivo. Ova razlika se vrlo verovatno javlja zbog količine etanola koji je uključen u obrok. Koncentracija etanola u buragu koju su ustanovili Kristensen i sar. je iznosila od 2 do 6 mmol/l, dok je u našem eksperimentu ona znatno niža ($0,4\text{--}0,96$ mmol/l).

Osim toga, u našem ogledu kod krava koje su dobile najveću količinu preparata, a time i najveću količinu etanola (300 ml), njegov potpuni obrt je produžen jer nakon četiri sata ove životinje u krvi imaju nešto viši sadržaj u odnosu na početni. Prosečna vrednost aktivnosti ADH u jetri je iznosila 3300 nkat/g proteina i u potpunosti je u skladu sa rezultatima do kojih su došli Kovar i sar. (1983). Rezultat pokazuje da količina etanola koju su životinje dobijale infuzijom u burag nije značajno uticala na rad jetre. Ova činjenica može biti značajna za tumačenje, razumevanje i preporuke o poboljšanju energetskog metabolizma krava u puerperijumu. Zato što je etanol čisti nutrijent, a jedan deo se direktno resorbuje u krv, očekuje se da je konverzija ukupne energije u neto energiju za etanol viša u odnosu na uobičajena hraniva (Randby i sar., 1999). Isti autori su ispitivali efekat dodavanja etanola na sadržaj mlečne masti i kompoziciju masnih kiselina mleka. Oni su utvrdili da se u mleku povećava procenat masti i proteina. U sastavu mleka su u većem broju zastupljene zasićene masne kiseline kratkih i srednjih lanaca dužine koje se sintetišu u vimenu, dok je zastupljenost masnih kiselina dugačkih lanaca koje nastaju u jetri u procesu lipomobilizacije manja od uobičajene. Ovakav nalaz je suprotan kompoziciji mleka

ketoznih krava kod kojih je povećanje procenta mlečne masti vezano za pojačanu lipomobilizaciju i povećanje sadržaja masnih kiselina dugačkih lanaca. S druge strane, velike količine dodatog alkohola mogu da utiču na stvaranje nepoželjnog mirisa mleka.

Buduća ispitivanja treba da daju odgovore o mogućnosti i načinu korišćenja etanola u ishrani mlječnih krava, naročito u periodu ranog puerperijuma, kao faktora koji bi mogao da utiče na smanjenje lipomobilizacije u ovom periodu.

LITERATURA

1. Allison M.J., Bucklin J.A., Dougherty R.W.: Ruminal changes after overfeeding with wheat and the effect of intraruminal inoculation on adaptation to a ration containing wheat. *J. Animal Sci.* 23: 1164-1171, 1964.
2. Andersson P.C., Rapp J.L.C.: Available hydrogen for rumen microfloral synthesis of protein in ruminants. Feed Service Comm.1(1) Crete Nebraska: Feed Service Corp, 1995.
3. Chalupa W., Evans J.L., Stillions M.C.: Influence of ethanol on rumen fermentation and nitrogen metabolism. *J. Animal Sci.* 23: 802-807, 1964.
4. Crabb D.W., Michinaga Matsumoto, Chang D., Min You: Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proc. of the Nutrition Society* 63, 49-63, 2004.
5. Emery R.S., Lewis T.R., Everett J.P., Lassiter C.A.: Effect of ethanol on rumen fermentation. *J. Dairy Sci.* 42: 1182- 1187, 1959.
6. Garrett W.N., Meyor J.H. : Ethyl alcohol supplement not beneficial to cattle in feed lots. *Calif. Agr.* 17 (9) 11-15, 1963.
7. Jean-Blain C., Durix A., Tranchant B.: Kinetics of ethanol metabolism in sheep. *Reprod. Nutr. Dev.* 32: 83-90, 1992.
8. Kristensen N.B., Stortm A., Raun B.M.L., Rojen B.A., Harmont D.L.: Metabolism of silage alcohol in lacting dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90: 1364-1377, 2007.
9. Kovar J., Racek P., Vlčkova V.: Alcohol dehydrogenase activity and isoenzyme distribution in the organs of cow, pig and sheep. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B (1) 161-165, 1983.
10. Lalić M., Jovičin M., Pavlović R., Jovanović Đ.: Registar malih patenata 105. *Glasnik intelektualne svojine*, 5, 549, 559 (1-7), 1996.
11. Laukova A., Marounek M.: Physiological and biochemical characteristics of staphylococci isolated from the rumen of young calves and lambs. *Zentralbl. Mikrobiol.* 147: 489-494, 1992.
12. Orskov E.R., Hemken R.W, Moore L.A.: Effect of ethanol infusion on milk fat content and composition and on volatile fatty acids in the rumen liquor. *J. Dairy Sci.* 50: 692-698, 1967.
13. Pradhan K., Hemken R.W.: Utilisation of ethanol and its effect on fatty acid patterns in ruminants. *J. Dairy Sci.* 53: 1739-1746, 1970.

14. Randby AT, Selmer-Olsen I., Baevre L.: Effect of ethanol in feed on milk flavor and chemical composition. *J. Dairy Sci.* 82:420-428, 1999.
15. Teunissen M.J., Kets E.P.W., Op den Camp H.J.M, Huis in't Veld J.H.J, Vogels G.D.: Effect on coculture of anaerobic fungi isolated from ruminants and non-ruminants with methanogenic bacteria on cellulosic and xylanolytic enzyme activities. *Arch. Microbiol.* 157:176-182, 1992.

Primljeno: 17. 07. 2008.

Odobreno: 21. 10. 2008.