

## OCENA WPŁYWU ZMIANY SKŁADU DIETY I RODZAJU JEJ SUPLEMENTACJI WITAMINAMI Z GRUPY B NA CAŁKOWITĄ ZDOLNOŚĆ ANTYOKSYDACYJNĄ WĄTROBY U SZCZURA

Zuzanna Goluch-Koniuszy<sup>1</sup>✉, Radosław Drozd<sup>2</sup>,  
Mariusz Kołodziejwski<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ZUT w Szczecinie, Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa

<sup>2</sup> ZUT w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

**Streszczenie.** Cel pracy: ocena, na modelu zwierzęcym, zmiany składu diety i rodzaju jej suplementacji witaminami z grupy B na całkowitą zdolność antyoksydacyjną wątroby (*Total Antioxidative Capacity*). 48 samców szczura szczepu Wistar podzielono na grupy i żywiono: I paszą podstawową (PP), II–IV paszą zmodyfikowaną (PZ), w której 83,5% pszenicy obecnej w PP zastąpiono mąką pszenną, a 50% kukurydzy – sacharozą. Zwierzęta do picia otrzymywały z grup: I–II wodę, III (PP + suplementacja uzupełniająca SU) witaminy w ilościach uzupełniających różnice między paszą PP i PZ, IV (PZ + suplementacja nadmiarowa SN), dodatkowo ilość witamin 2–4-krotnie przekraczającą normy RDA. Oznaczono: w surowicy stężenie glukozy, białka całkowitego i albumin, w tkance wątrobowej aktywność GST, GPx, CAT, SOD oraz TAC. Stwierdzono, że PZ oraz PZ+SU nie wpłynęły istotnie na badane parametry. Suplementacja nadmiarowa (PZ+SN) przy podwyższonej glikemii ( $P \leq 0,05$ ) przyczyniała się istotnie ( $P \leq 0,05$ ) do zwiększenia TAC w wątrobie mimo istotnego ( $P \leq 0,01$ ) zmniejszenia jej masy i syntetyzowanej przez nią albuminy ( $P \leq 0,05$ ). Suplementacja witaminami wpływała na całkowity status antyoksydacyjny wątroby u szczurów.

**Słowa kluczowe:** szczury, wątroba, suplementacja, witaminy z grupy B, całkowity potencjał antyoksydacyjny

### WSTĘP

W społeczeństwie polskim w ostatnich latach obserwowano większe od rekomendowanego [WHO 2015] spożycie sacharozy w zakresie 11–18% wartości energetycznej diety. Nadmierne jej spożycie, szczególnie przy niedoborach witamin z grupy B, predestynuje

---

✉zuzanna.goluch-koniuszy@zut.edu.pl

w ustroju do hiperglikemii implikującej generowanie ponadfizjologicznych ilości wolnych rodników tlenowych (RTF). Skutkuje to zmniejszeniem ilości osoczowych antyutleniaczy nieenzymatycznych oraz enzymatycznych i prowadzi do rozwoju stresu oksydacyjnego, a tym samym do uszkodzenia komórek i tkanek [Carolo Dos Santos i in. 2014].

Celem zapobieżenia niedoborom witamin z grup B w ustroju dopuszcza się suplementację diety tymi związkami. Jednak wykazano, że witaminy te zawarte w suplementach mogą działać w ustroju prooksydacyjnie lub antyoksydacyjnie, na co szczególnie wrażliwa jest wątroba, od wydolności której zależy sprawne przywracanie homeostazy w ustroju [Higashi-Okai i in. 2006, Li i in. 2015]. Stosowane w naukach żywieniowych modele zwierzęce pozwalają m.in. na badanie skutków długoterminowego spożycia różnych składników diety na metabolizm ustroju, umożliwiają ścisłą kontrolę wpływu innych czynników zewnętrznych, które mogą modyfikować to spożycie [Stanek i Bogusz 2007]. Jednak uzyskane wyniki tylko do pewnego stopnia mogą być przyjmowane jako pewnik w odniesieniu do ludzi ze względu na odmienną biologię zwierząt, metodologię badań, liczebność grup badawczych i czas eksperymentów.

Postanowiono zbadać na modelu zwierzęcym, czy pod wpływem zmiany składu diety i jej suplementacji uzupełniającej lub nadmiarowej syntetycznymi witaminami B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> i niacyną może dochodzić do zmiany całkowitej zdolności antyoksydacyjnej tkanki wątrobowej.

## MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie (zgoda Lokalnej Komisji Etycznej w Szczecinie nr 8/2015) przeprowadzono na 48 samcach szczura szczepu Wistar (w wieku 5 miesięcy i o wyjściowej masie ciała 393,4 ±26,6 g), pochodzących z hodowli Zwierzętarni Katedry i Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Zwierzęta umieszczono w indywidualnych klatkach wiwarium Zakładu Fizjologii Żywienia Człowieka. Po tygodniowym okresie aklimatyzowania (woda do picia oraz pasza podstawowa) w warunkach wiwarium (temp. 21–22°C, wilgotność względna powietrza 55–60%, cykl jasność/ciemność 12/12 h) zwierzęta zostały podzielone na cztery grupy żywieniowe (n = 12) i karmiono je *ad libitum* granulowanymi paszami wyprodukowanymi przez Wytwórnę Pasz i Koncentratów „Morawski” w Kcyni. Grupa I otrzymywała paszę podstawową (PP), która odpowiada wymogom stawianym paszy AIN-93M [Reevs i in. 1993] i zawierała m.in. pełne ziarna pszenicy i kukurydzy. Grupy II–IV otrzymywały paszę zmodyfikowaną (PZ), w której 83,5% pszenicy obecnej w paszy podstawowej zostało zastąpione mąką pszenną (typ 500), a 50% kukurydzy – sacharozą (tab. 1).

W paszach oznaczono [AOAC 2012] zawartość: azotu ogólnego metodą Kjeldahla, który przeliczono na ilość białka, tłuszczu surowego metodą Soxhleta, suchej masy i popiołu metodą wagową. W Krajowym Laboratorium Pasz Państwowy Instytut Badawczy Instytutu Zootechniki w Szczecinie oznaczono zawartość: witamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> i niacyny metodą HPLC oraz włókna surowego metodą wagową (PB-02/PS). Zawartość węglowodanów wyliczono z różnicy między suchą masą a sumą pozostałych składników stałych. Zawartość energii brutto i metabolicznej wyliczono z wykorzystaniem powszechnie stosowanych równoważników energetycznych.

Tabela 1. Skład surowcowy pasz zastosowanych w doświadczeniu [ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]Table 1. Ingredients and nutrient contained in feedstuffs applied in the experiment [ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]

| Wyszczególnienie<br>Item  | Pasza<br>Podstawowa (PP)<br>Basic diet | Pasza z<br>zmodyfikowana (PZ)<br>Modified diet |
|---|--|--|
| Skład surowcowy – Ingredients [ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]               |  |  |
| Pszonica – Wheat Grain  | 36,4                                   | 6,0  |
| Kukurydza – Maize Grain   | 20,0                                   | 10,0   |
| Otręby pszenne – Wheat Bran   | 20,0                                   | 20,0   |
| Serwatka suszona – Dry Whey   | 3,0                                    | 3,0  |
| Śruta sojowa 48% <sup>1</sup> – Soya bean Meal 48%                            | 17,0                                   | 17,0   |
| Fosforan 1-Ca <sup>2</sup> – Phosphate 1-CA                                   | 0,27                                   | 0,25   |
| Kreda pastewna <sup>3</sup> – Fodder Chalk                                    | 2,0                                    | 2,0  |
| Sól pastewna <sup>4</sup> – NaCl  | 0,27                                   | 0,25   |
| Premiks LRM <sup>5</sup> – Mineral And Vitamin Mix                            | 0,8                                    | 1,0  |
| Mąka pszenna typ 500 – Wheat Flour Type 500                                   | –                                      | 30,4   |
| Sacharoza – Sucrose   | –                                      | 10,0   |
| Skład chemiczny – Nutrient composition  |  |  |
| Białko ogółem – Total protein [g]   | 19,1                                   | 17,8   |
| Tłuszcz surowy – Crude fat [g]  | 3,08                                   | 4,18   |
| Węglowodany – Carbohydrates [g]   | 62,3                                   | 63,8   |
| Włókno surowe – Crude fibre [g]   | 2,91                                   | 2,73   |
| Sucha masa – Dry weight [g]   | 90,6                                   | 91,4   |
| Popiół ogółem – Total ash [g]   | 6,61                                   | 6,17   |
| Energia brutto – Gross energy [ $\text{kJ}\cdot\text{g}^{-1}$ ]               | 16,6                                   | 16,9   |
| Energia metaboliczna – Metabolizable energy [ $\text{kJ}\cdot\text{g}^{-1}$ ] | 14,8                                   | 15,2   |
| Tiamina – Thiamine [mg]   | 2,5                                    | 0,62   |
| Ryboflawina – Riboflavin [mg]   | 2,1                                    | 1,14   |
| Pirydoksyna – Pyridoxine [mg]   | 2,35                                   | 1,35   |
| Niacyna – Niacin [mg]   | 8,6                                    | 4,8  |

<sup>1</sup>Śruta sojowa 48% – poekstrakcyjna, zawierająca 48% białka i 7% błonnika; <sup>2</sup>Fosforan 1-CA – dodatek paszowy, zawiera min. 22% P and 15% Ca; <sup>3</sup>Kreda pastewna – zawiera w kg: Ca 350 g, Mg 3,20 g; Na 10,00 mg, P 15,00 mg; <sup>4</sup>Sól pastewna – NaCl; <sup>5</sup>Premix LRM zawiera w kg: IU: A 1500000, vit. D<sub>3</sub> 100000; mg: vit. E 8000; vit. K 300, vit. B<sub>1</sub> 1200, vit. B<sub>2</sub> 1200, vit. B<sub>6</sub> 1000, vit. B<sub>12</sub> 8, Se 100, Fe 16000, Mn 4500, Zn 6000, Cu 1300, J 100, Co 200.

Zwierzęta z grup I–II otrzymywały do picia odstaną wodę wodociągową, a z grup III–IV, 25 ml wodnego roztworu substancji czynnych witamin B<sub>1</sub> (*Thiamini hydrochloridum*), B<sub>2</sub> (*Riboflavinum*), B<sub>6</sub> (*Pyridoxinum hydrochloricum*), niacyny (*Nicotinamidum*), które pochodziły z ogólnie dostępnych preparatów farmaceutycznych. Zwierzęta otrzymywały: z grupy III (PZ + Suplementacja Uzupełniająca) B<sub>1</sub> – 0,94 mg, B<sub>2</sub> – 0,48 mg, B<sub>6</sub> – 0,5 mg, niacyny-1,9 mg, a z grupy IV (PZ + Suplementacja Nadmiarowa) B<sub>1</sub> – 3,1 mg, B<sub>2</sub> – 2,3 mg, B<sub>6</sub> – 2,4 mg oraz niacyny – 6,65 mg. Witaminy podawano w ilościach indywidualnie wyliczonych dla sposobu suplementacji, tak aby w grupie PZ + SU uzupełnić różnice powstałe po zamianie składników diety. Z kolei w grupie PZ + SN uwzględniono dodatkowo zalecaną dawkę profilaktyczną tych witamin, ale przekraczającą normy RDA dla ludzi w przeliczeniu na zapotrzebowanie dla szczura. Sumarycznie podawana ilość

witamin w IV grupie przekraczała 2–4-krotnie ( $B_1$  – 2,3 razy,  $B_2$  – 3,8 razy,  $B_6$  – 3,8 razy, niacyny – 2,5 razy) zalecane dzienne spożycie, co do pewnego stopnia imitowało sposób suplementacji u ludzi.

Doświadczenie trwało 6 tygodni, w trakcie których na bieżąco obliczano ilość spożytej paszy oraz ilość wypijanych płynów. Raz na tydzień kontrolowano masę ciała zwierząt. Na 12 godzin przed zakończeniem doświadczenia odstawiono zwierzętom paszę. Następnie uśpiono je anestetykiem Ketanest (*PfizerIreland Pharmaceuticals*) podanym domięśniowo w dawce  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  masy ciała i pobrano krew z serca. Po odwirowaniu skrzepu (w temperaturze  $4^\circ\text{C}$ , przy  $3500 \text{ obr.} \cdot \text{min.}^{-1}$ , przez  $20'$ ) uzyskano surowicę do dalszych analiz, w której oznaczono stężenie glukozy metodą kolorymetryczną, białka całkowitego metodą biuretową i albuminy z wykorzystaniem biotestów firmy BioSystems. Na bieżąco, zaraz po uśmierceniu zwierząt, wypreparowywano wątrobę zwierząt, którą ważono z dokładnością do  $0,001 \text{ g}$ . Próby tkanki wątrobowej o masie  $100 \text{ mg}$  rozcierano w ciekłym azocie i zawieszano w  $10$  objętościach  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  buforu fosforanowego o  $\text{pH } 7,0$  zawierającego  $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$  EDTA. Następnie zawiesinę mieszano i odwirowywano przez  $10$  minut przy  $15000 \text{ obr.} \cdot \text{min.}^{-1}$  w temp.  $4^\circ\text{C}$ . Uzyskany supernatant wykorzystywany był do dalszych analiz. Oznaczono w nim aktywność: peroksydazy glutationowej GPx [Pagila i Valentine 1967] przy użyciu zestawu RANSEL (Randox Laboratories Ltd.), dysmutazy nadtlenkowej SOD [Marklund i Marklund 1974], katalazy CAT [Li i Schellhorn 2007], transferazy-S-glutationowej GST [Habig i in. 1974]. Białko całkowite oznaczono metodą Bradforda [1976] z albuminą surowicy bydłowej jako standard. Z kolei całkowity status antyoksydacyjny TAC oznaczono metodą Erel [2004], a do kalibracji wykorzystano kwas askorbinowy. Ponadto wyliczono współczynnik efektywności wykorzystania paszy FCE (*Feed Conversion Efficiency*) ze wzoru: całkowite spożycie paszy (g)/końcowa masa ciała (g).

Uzyskane wyniki, po sprawdzeniu normalności rozkładu testem Shapiro-Wilka i sprawdzeniu jednorodności wariancji testem Lavena, poddano logarytmowaniu, a następnie obliczeniom statystycznym (na poziomie istotności  $p \leq 0,05$  lub  $p \leq 0,01$ ) przy użyciu komputerowego programu statystycznego Statistica12.0<sup>®</sup>, z zastosowaniem jednoczynnikowej analizy wariancji testem Tukeya.

## WYNIKI I DYSKUSJA

Stwierdzono, że zmiana składu diety (PZ) i jej suplementacja uzupełniająca (PZ + SU) lub nadmiarowa (PZ + SN) witaminami z grupy B, mimo że istotnie ( $p \leq 0,01$ ) wpłynęły na zwiększenie spożycia paszy i energii przez zwierzęta w stosunku do grupy kontrolnej (PP), to nie przyczyniły się do zmian w końcowej masie ciała i osiągniętych przyrostach na  $100 \text{ g}$  spożytej paszy (tab. 2). Podobny efekt obserwowali również inni autorzy [de Castro i in. 2008]. Z kolei analiza wartości wskaźnika FCE wykazała, że istotnie ( $p \leq 0,01$ ) najlepszym wykorzystaniem paszy na uzyskane przyrosty masy ciała charakteryzowały się zwierzęta karmione PZ. Tylko suplementacja PZ + SN istotnie ( $p \leq 0,01$ ) wpłynęła na obniżenie wartości tego wskaźnika w stosunku do zwierząt z grupy karmionej PZ, nawet do wartości obserwowanych w grupie kontrolnej.

Tabela 2. Wpływ składu diety i jej suplementacji witaminami z grupy B na spożycie paszy, płynów oraz przyrosty u samców szczura Wistar ( $\bar{x} \pm SD$ , n = 48)Table 2. Effects of diet type and B-group vitamins supplementation on feed intake, fluids and weight gain in male Wistar rats ( $\bar{x} \pm SD$ , n = 48)

| Wyszczególnienie<br>Item  | Grupa – Groups            |                           |                            |                           | P<br>value |
|---|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|------------|
|   | PP                        | PZ                        | PZ + SU                    | PZ + SN                   |            |
| Początkowa masa ciała<br>Initial body weight [g]  | 393,3 ± 31,2              | 396,2 ± 29,1              | 389,6 ± 27,1               | 391,1 ± 19,7              | 0,943      |
| Końcowa masa ciała<br>Final body weight [g]   | 416,1 ± 32,5              | 423,4 ± 36,6              | 415,3 ± 29,7               | 415,9 ± 14,8              | 0,909      |
| Spożycie paszy<br>Feed intake [g]   | 914,5 <sup>B</sup> ± 40,1 | 1049 <sup>Aa</sup> ± 44,1 | 993,4 <sup>Ab</sup> ± 60,5 | 912,9 <sup>B</sup> ± 32,2 | 0,000      |
| FCE<br>Feed Conversion Ratio [%]  | 2,21 <sup>B</sup> ± 0,14  | 2,49 <sup>A</sup> ± 0,18  | 2,37 <sup>Aa</sup> ± 0,12  | 2,20 <sup>Bb</sup> ± 0,9  | 0,000      |
| Spożycie energii<br>[kJ · 100 g masy ciała <sup>-1</sup> ]<br>Energy intake<br>[kJ · 100 g body weight <sup>-1</sup> ]                    | 3663 <sup>B</sup> ± 239   | 4209 <sup>A</sup> ± 302   | 4013 <sup>Aa</sup> ± 202   | 3713 <sup>Bb</sup> ± 156  | 0,000      |
| Przyrosty masy ciała<br>[g · 100 g paszy <sup>-1</sup> ]<br>Body weight gain<br>[g · 100 g feed <sup>-1</sup> ]                           | 2,67 ± 1,5                | 2,68 ± 1,8                | 2,65 ± 0,9                 | 3,15 ± 0,6                | 0,363      |
| Spożycie płynów<br>[ml · 100 g masy ciała <sup>-1</sup> ]<br>Liquids intake<br>[ml · 100 g body weight <sup>-1</sup> ]                    | 269,3 <sup>a</sup> ± 25,4 | 282,0 <sup>A</sup> ± 23,2 | 245,0 <sup>Bb</sup> ± 18,6 | 246,8 <sup>Bb</sup> ± 9,1 | 0,000      |
| Spożycie witaminy B <sub>1</sub><br>[g · 100 g masy ciała <sup>-1</sup> ]<br>Thiamine intake<br>[g · 100 g body weight <sup>-1</sup> ]    | 5,5 <sup>C</sup> ± 0,4    | 1,5 <sup>D</sup> ± 0,1    | 10,7 <sup>B</sup> ± 0,7    | 32,0 <sup>A</sup> ± 1,2   | 0,000      |
| Spożycie witaminy B <sub>2</sub><br>[mg · 100 g masy ciała <sup>-1</sup> ]<br>Riboflavin intake<br>[g · 100 g body weight <sup>-1</sup> ] | 4,6 <sup>C</sup> ± 0,3    | 2,8 <sup>D</sup> ± 0,2    | 7,4 <sup>B</sup> ± 0,5     | 25,2 <sup>A</sup> ± 0,9   | 0,000      |
| Spożycie witaminy B <sub>6</sub><br>[g · 100 g masy ciała <sup>-1</sup> ]<br>Pyridoxine intake<br>[g · 100 g body weight <sup>-1</sup> ]  | 5,2 <sup>C</sup> ± 0,3    | 3,4 <sup>D</sup> ± 0,2    | 8,1 <sup>B</sup> ± 0,5     | 26,7 <sup>A</sup> ± 1,0   | 0,000      |
| Spożycie niacyny<br>[g · 100 g masy ciała <sup>-1</sup> ]<br>Niacin intake<br>[g · 100 g body weight <sup>-1</sup> ]                      | 19,6 <sup>C</sup> ± 1,2   | 12,0 <sup>D</sup> ± 0,9   | 30,1 <sup>B</sup> ± 1,8    | 76,2 <sup>A</sup> ± 2,7   | 0,000      |
| Masa wątroby<br>[g · 100 g masy ciała <sup>-1</sup> ]<br>Liver relative weight<br>[g · 100g body weight <sup>-1</sup> ]                   | 3,45 <sup>Aa</sup> ± 0,5  | 3,05 <sup>b</sup> ± 0,3   | 3,0 <sup>B</sup> ± 0,2     | 3,0 <sup>B</sup> ± 0,3    | 0,002      |

PP – pasza podstawowa; PZ – pasza zmodyfikowana; PZ + SU – pasza zmodyfikowana + suplementacja uzupełniająca; PZ + SN – pasza zmodyfikowana + suplementacja nadmiarowa; <sup>aAbBcC</sup> – średnie zaznaczone w wierszach różnymi małymi literami różnią się na poziomie  $p \leq 0,05$ , a wielkimi literami na poziomie  $p \leq 0,01$ .

PP – basic diet; PZ – modified diet; PZ + SU – modified diet + adequate supplementation; PZ + SN – modified diet + excessive supplementation; <sup>aAbBcC</sup> – means in rows bearing different superscripts are significantly different: small letters –  $p \leq 0.05$ , capital letters –  $p \leq 0.01$ .

Istotnie ( $p \leq 0,01$ ) największe spożycie płynów obserwowano w grupie zwierząt karmionych PZ w stosunku do grup zwierząt suplementowanych, które spożywały je w ilościach istotnie ( $p \leq 0,05$ ) mniejszych niż w grupie kontrolnej. Najwyższe spożycie płynów przez zwierzęta karmione PZ wymuszone było prawdopodobnie wzrostem osmolalności osocza przez spożywaną sacharozę.

Wątroba jako główny narząd metaboliczny wykazuje najwyższą aktywność antyoksydacyjną w porównaniu do innych narządów i tkanek. W badaniach własnych, mimo braku zmian w końcowej masie ciała zwierząt, stwierdzono istotnie ( $p \leq 0,01$ ) najniższą masę wątroby u zwierząt z grup doświadczalnych, w stosunku do grupy kontrolnej, co wymaga wyjaśnienia w dodatkowych badaniach. Jednak obserwowane zmiany w masie wątroby mogą wpływać na jej funkcje, m.in. na aktywność glukostatyczną.

Nie stwierdzono wpływu modyfikacji diety (PZ) w stosunku do grupy kontrolnej (PP) na badane parametry krwi tkanki wątrobowej (tab. 3). Również zastosowana suplementacja uzupełniająca (PZ + SU) nie wpłynęła istotnie na zmiany badanych parametrów w stosunku do grupy PZ. Z kolei wykazano istotny ( $p \leq 0,05$ ) wzrost stężenia glukozy we krwi u zwierząt karmionych PZ + SN w stosunku do zwierząt z grupy kontrolnej. Wynikał on z obecności wśród suplementowanych witamin ponadfizjologicznej ilości niacyny, która wywołuje taki efekt wtórnie, przez zmniejszenie wrażliwości komórek na insulinę i zmiany metabolizmu wolnych kwasów tłuszczowych [Heemskerck i in. 2014]. Wpływ ten musiał być tak silny, że obserwowano go, mimo zastosowanej jednocześnie suplementacji diety tiaminą, znanej z normalizującego działania w tym zakresie [Alaei Shahmiri i in. 2013]. Podwyższona glikemia indukuje wytwarzanie RFT. Jednak dodatkowym ich źródłem w wątrobie mógł być metabolizm ksenobiotyków jako efekt naturalnych procesów detoksykacyjnych w ustroju, gdyż zastosowane syntetyczne witaminy w formie chlorowodorów nie występują w naturalnej żywności.

W badaniach własnych nie stwierdzono istotnego wpływu zastosowanych czynników doświadczalnych na stężenie białka całkowitego w surowicy krwi zwierząt, którego pulę stanowią nie tylko białka produkowane przez wątrobę (tab. 3). Białkiem antyoksydantem syntetyzowanym w wątrobie jest albumina, która chroni erytrocyty przed peroksydacją wywołaną jonami miedzi i dzięki ich wiązaniu zapobiega powstawaniu rodnika hydroksylowego z nadtlenu wodoru. Stwierdzono, że jej stężenie w surowicy zwierząt było istotnie ( $p \leq 0,05$ ) najniższe w grupie zwierząt karmionej PZ + SN w stosunku do grupy kontrolnej. Biorąc po uwagę stwierdzone jednocześnie najniższe spożycie płynów przez zwierzęta z tej grupy oraz ich najmniejszą masę wątroby, może ten fakt wskazywać na zaburzenia w funkcjonowaniu tego narządu.

Obserwowana w grupie zwierząt karmionej PZ + SN nieprawidłowa glikemia powinna uruchomić aktywność wewnątrzkomórkowego enzymatycznego układu antyoksydacyjnego, który ogranicza jej toksyczne działanie. Jednak analiza tkanki wątrobowej (tab. 3) nie wykazała wpływu PZ oraz rodzaju jej suplementacji na zmianę w aktywności GPx, GST, SOD i CAT. Z kolei Fridrich i Dolot [2010] stwierdziły u szczurów istotny wpływ diety PZ na zwiększenie aktywności w tkance wątrobowej CAT i obniżenie GPx oraz wpływ suplementacji witaminami z grupy B na zwiększenie aktywności SOD i CAT, ale przy zastosowaniu mniejszych ilości suplementowanych witamin.

Całkowita zdolność antyoksydacyjna TAC odzwierciedla sumaryczną zdolność wszystkich przeciwutleniaczy obecnych w płynach ustrojowych i/lub tkankach do neu-

Tabela 3. Wpływ składu diety i suplementacji witaminami z grupy B na wybrane parametry krwi i tkanki wątrobowej samców szczura szczepu Wistar ( $\bar{x} \pm SD$ , n = 48)Table 3. Effects of diet type and B-group vitamins supplementation on selected parameters in serum and liver male Wistar rats ( $\bar{x} \pm SD$ , n = 48)

| Parametr<br>Parameters                                   | Grupa – Groups           |              |              |                          | P<br>value |
|--|--------------------------|--------------|--------------|--------------------------|------------|
|  | PP                       | PZ           | PZ + SU      | PZ + SN                  |            |
| Glukoza<br>Glucose [mmol · l <sup>-1</sup> ]             | 6,7 <sup>b</sup> ± 1,2   | 7,5 ± 1,6    | 6,9 ± 1,3    | 8,3 <sup>a</sup> ± 1,1   | 0,026      |
| Białko całkowite<br>Total protein [g · l <sup>-1</sup> ] | 58,9 ± 7,4               | 60,1 ± 9,4   | 58,0 ± 9,7   | 55,1 ± 10,4              | 0,644      |
| Albuminy<br>Albumin [g · l <sup>-1</sup> ]               | 36,4 <sup>a</sup> ± 7,1  | 31,3 ± 6,4   | 29,8 ± 8,0   | 27,4 <sup>b</sup> ± 6,7  | 0,021      |
| GPx [mU/mg białka]<br>GPx [mU/mg protein]                | 201,0 ± 54,9             | 206,7 ± 53,9 | 208,3 ± 30,8 | 216,2 ± 65,2             | 0,952      |
| GST [mU/mg białka]<br>GST [mU/mg protein]                | 127,2 ± 33,4             | 126,1 ± 56,1 | 135,6 ± 58,0 | 127,1 ± 51,9             | 0,936      |
| SOD [U/mg białka]<br>SOD [U/mg protein]                  | 9,3 ± 2,3                | 7,2 ± 3,1    | 7,2 ± 2,0    | 6,8 ± 2,1                | 0,114      |
| CAT [U/mg białka]<br>CAT [U/mg protein]                  | 10,4 ± 6,3               | 15,2 ± 5,5   | 13,0 ± 6,3   | 12,5 ± 7,9               | 0,278      |
| TAC [μmol AAE/g białka]<br>TAC [μmol AAE/g protein]      | 41,3 <sup>b</sup> ± 11,8 | 37,6 ± 10,2  | 42,2 ± 9,4   | 49,7 <sup>a</sup> ± 10,2 | 0,048      |

Opis jak w tabeli 2/Description as in Table 2.

tralizacji RTF. W badaniach własnych wartość TAC w grupie zwierząt żywionych PZ była niższa niż w grupie kontrolnej, co wskazuje na osłabianie sytemu antyoksydacyjnego ustroju pod wpływem zastosowanej w paszy sacharozy, ale różnica ta nie była statystycznie istotna. Suplementacja uzupełniająca (PZ + SU) przyczyniła się do poprawy wartości TAC i to do wielkości obserwowanej w grupie kontrolnej. Jednak wartość TAC była istotnie ( $p \leq 0,05$ ) najwyższa w wątrobach zwierząt suplementowanych w sposób nadmiarowy, w stosunku do grupy kontrolnej, co wskazuje na wzmożenie sytemu antyoksydacyjnego ustroju zwierząt przy podaży takiej ilości witamin. Podobnie antyoksydacyjne działanie witamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> na hepatocyty wykazali inni autorzy [Alam i in. 2015, Ganji i in. 2014, Taş i in. 2014, Turan i in. 2013], ale przy zastosowaniu odmiennych metod badawczych i pojedynczych witamin.

## WNIOSKI

Analiza uzyskanych wyników wykazała, że:

1. Zmiana składu diety, polegająca na zamianie pełnych ziaren zbóż na mąkę pszenną i sacharozę oraz jej suplementacja uzupełniająca i nadmiarowa wybranymi witaminami z grupy B, nie wpłynęła istotnie na spożycie paszy, masę ciała oraz jej przyrosty masy u badanych zwierząt.

2. Zmiana składu diety i jej suplementacja nadmiarowa witaminami spowodowała istotny wzrost stężenia glukozy we krwi oraz obniżenie masy wątroby, któremu towarzyszył spadek syntezy albumin.
3. W tkance wątrobowej ww. grupy zwierząt stwierdzono istotny wzrost całkowitego potencjału antyoksydacyjnego mierzonego metodą TAC.

## LITERATURA

- Alaei Shahmiri F., Soares M.J., Zhao Y., Sherriff J., 2013. High-dose thiamine supplementation improves glucose tolerance in hyperglycemic individuals: a randomized, double-blind cross-over trial. *Eur. J. Nutr.* 52, 7, 1821–1824.
- Alam M.M., Iqbal S., Naseem I., 2015. Ameliorative effect of riboflavin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in type-2 diabetic mice: Mechanistic and therapeutic strategies. *Arch. Biochem. Biophys.* 15, 584, 10–19.
- AOAC, 2012. Official methods of analysis of AOAC international (OMA), 19th ed. Gaithersburg, USA.
- Bradford M.M., 1976. A rapid, and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Carolo Dos Santos K., Pereira Braga C., Octavio Barbanera P., Rodrigues Ferreira Seiva F., Fernandes A., Jr., Henrique Fernandes A.A., 2014. Cardiac energy metabolism and oxidative stress biomarkers in diabetic rat treated with resveratrol. *PLoS ONE*.9, 7, e102775.
- de Castro G.S.F., de Almeida L.P., Vannucchi H., Portari G.V., Jordão A.A., 2008. Effects of diets containing different types of carbohydrates on hepatic metabolism. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 35, 4, 321–328.
- Erel O., 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.* 37, 4, 277–285.
- Friedrich M., Dolot A., 2010. Assessment of effects of diet composition and vitamin B supplementation in free radical-related processes in the body. Activity of antioxidant enzymes and the total antioxidant status of rat blood. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 60, 3, 281–287.
- Ganji S.H., Kukes G.D., Lambrecht N., Kashyap M.L., Kamanna V.S., 2014. Therapeutic role of niacin in the prevention and regression of hepatic steatosis in rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 306, 4, 320–327.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Heemskerk M.M., van den Berg S.A., Pronk A.C., van Klinken J.B., Boon M.R., Havekes L.M., Rensen P.C., van Dijk K.W., van Harmelen V. 2014. Long-term niacin treatment induces insulin resistance and adrenergic responsiveness in adipocytes by adaptive downregulation of phosphodiesterase 3B. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306, 7, 808–813.
- Higashi-Okai K., Nagino H., Yamada K., Okai Y., 2006. Antioxidant and prooxidant activities of B group vitamins in lipid peroxidation. *J. UOEH* 28, 4, 359–368.
- Li S., Tan H.Y., Wang N., Zhang Z.J., Lao L., Wong C.W., Feng Y., 2015. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 11, 26087–26124.
- Li Y., Schellhorn H.E., 2007. Rapid kinetic microassay for catalase activity. *J. Biomol. Tech.* 18, 4, 185–187.



- Marklund S., Marklund G., 1974. Involvement of superoxide anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 3, 469–474.
- Paglia D.E., Valentine W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characteristics of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 1, 158–169.
- Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C., 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J. Nutr.* 123, 11, 1939–1951.
- Stanek M., Bogusz J., 2007. Wpływ nasion łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.) na przebieg procesów fermentacyjnych w jelicie ślepym szczurów. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 522, 413–418.
- Taş S., Sarandöl E., Dirican M., 2014. Vitamin B6 Supplementation Improves Oxidative Stress and Enhances Serum Paraoxonase/Arylesterase Activities in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *The Scientific World Journal*, Article ID 351598, 7 pages.
- Turan M.I., Turan I.S., Mammadov R., Altýnkaynak K., Kisaoglu A., 2013. The effect of thiamine and thiamine pyrophosphate on oxidative liver damage induced in rats with cisplatin. *BioMed Res. Internat.* 2013, Article ID 783809, 6 pages.
- WHO, 2015. Sugars intake for adult and children Guideline, Geneva.

## AN ASSESSMENT OF THE IMPACT OF DIET MODIFICATION AND VITAMIN B SUPPLEMENTATION ON THE TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY OF THE LIVER IN THE RAT

**Summary.** The objective of this research was an assessment of the impact of diet modification and supplementation (adequate and excessive one) with vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> and niacin, on the total antioxidant capacity of the liver. 48 male Wistar rats were divided into groups (n = 12); group I was fed a Basic Diet (BD), while groups II–IV were given a Modified Diet (MD), in which 83.5% of wheat present in BD was replaced with wheat flour, and 50% of maize – with sucrose. Groups I–II were given water, while group III (MD + adequate supplementation AS) received vitamins in quantities which supplemented the difference between BD and MD diets, and group IV (MD + excessive supplementation ES) was additionally given vitamins in quantities exceeding RDA norms for humans 2 to 4 times (B<sub>1</sub> – 2.3 times, B<sub>2</sub> – 3.8 times, B<sub>6</sub> – 3.8 times, niacin – 2.5 times), calculated into quantities appropriate for rats. Subsequently, the blood serum was examined to determine the concentration of glucose, total protein and albumins. In the liver tissue, the level of total protein and the activity of GST, GPx, CAT, SOD and the total antioxidant status (TAC) were assessed. It has been concluded that diet modification (MD) and its adequate (MD + AS) and excessive (MD + ES) supplementation with vitamins have not affected the final body mass and achieved gains, even though it significantly ( $p \leq 0,01$ ) affected the rise in feed consumption and energy, in comparison to the control group (BD). Significantly ( $p \leq 0,01$ ) the lowest mass was found among the animals in the experiment groups. No significant impact of the experiment factors on the total protein concentration was found in the blood serum. However, it was ascertained that a significant ( $p \leq 0,05$ ) fall of albumins concentration in the blood serum of animals in the PZ + SN group took place, in comparison to the control group. It was concluded that there is no impact of diet modification and its supplementation the activity of GPx, GST, SOD and CAT. However, the excessive supplementation (MD +

ES) combined with raised glycaemia ( $P \leq 0,05$ ) affected the rise of TAC ( $P \leq 0,05$ ) in the liver. A diet modification, constituting in a replacement of whole meal grains with wheat flour and sucrose, with a larger amount of feed consumed, has not affected the examined parameters significantly. The applied supplementation with selected B vitamins has not changed anything in this respect. However, excessive supplementation of the modified diet with vitamins has led to an increase of the total antioxidant potential of the liver tissue. The excessive supplementation with vitamins affects on the total antioxidant status of the liver in rats.

**Key words:** rats, liver, supplementation, vitamins B, total antioxidant capacity