

Valutazione dello stress ossidativo in conigli a lento accrescimento

Paci G.¹, Preziuso G.¹, Russo C.¹, Mozzoni C.¹, D'Agata M.¹, D'Avino L.²

¹Dipartimento di Produzioni Animali. Università di Pisa, Italy

²Laboratori Tedeschi, San Giuliano Terme, Italy

Corresponding Author: Gisella Paci, Dipartimento di Produzioni Animali, Università di Pisa. Viale Piagge 2, 56100 Pisa, Italy - Tel +39 050 2216903 - Fax: +39 050 2216901 - Email: gpaci@vet.unipi.it

ABSTRACT: Oxidative stress in slow growing rabbits. The aim of the study was to determine the oxidative stress in growing rabbits reared in standard condition. Blood samples were collected into EDTA-K tubes from the ear vein of 41 rabbits. Blood collections were scheduled at 57, 80 and 100 days of age. The markers of oxidative stress analysed, on red blood cells, were superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and thiobarbituric acid reactive substance (TBAR'S). The relationship between TBAR'S and enzyme activities was analysed by single regressions analysis. The parameters were analysed by ANOVA considering age as main categorical factor. The results showed high correlations between the parameters studied. The levels of antioxidant defenses, such as SOD and GPx activities, significantly decrease with ageing, while the levels of TBAR'S increase ($P < 0,01$). The data indicate that a moderate situation of oxidative stress is age related.

Key words: Oxidative stress, Antioxidant enzymes; Age; Rabbit.

INTRODUZIONE – La modificazione del normale equilibrio intracellulare tra sostanze ossidanti, prodotte fisiologicamente durante i processi metabolici, e il sistema di difesa antiossidante che svolge la funzione di neutralizzarli, determina lo stress ossidativo. Il risultato di tale condizione è la presenza incontrollata di radicali liberi la cui produzione può accelerarsi in presenza di cause predisponenti quali: età, patologie e buona parte di quei fattori di allevamento che interferiscono con il benessere animale. L'azione distruttiva dei radicali liberi è mirata soprattutto alle cellule, in particolare agli acidi grassi polinsaturi dei fosfolipidi che ne formano le membrane (perossidazione lipidica), agli zuccheri e ai fosfati, alle proteine e al DNA (Siliprandi e Tettamanti, 1998). Per contrastare l'ossidazione, l'organismo utilizza diversi meccanismi di difesa antiossidanti, sia enzimatici che non. Il meccanismo antiossidante più importante è quello primario di tipo enzimatico, costituito da superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT), e glutathione perossidasi (GPx), che consiste nell'intercettare il radicale superossido e, attraverso una serie di reazioni, neutralizzarlo. È necessario ricordare che a tutt'oggi non è ancora ben chiarito se i radicali liberi costituiscano la causa di insorgenza di danni tissutali o ne siano la conseguenza (Nelson *et al.*, 2006), è però ormai assodato il loro incremento con il progredire dell'età (De La Fuente *et al.*, 2004). Tale fenomeno, rilevato in varie specie animali, risulta essere più contenuto rispetto alla specie umana, in relazione alla presenza non solo di antiossidanti primari ma anche di antiossidanti secondari assunti in maggior misura con la dieta (Nelson *et al.*, 2006). Per quanto riguarda la specie cunicola sono state condotte varie ricerche sulla valutazione dello stress ossidativo nelle carni (Betti *et al.*, 2003; Dal Bosco *et al.*, 2002, 2003), ma

scarse sono le informazioni relative allo stress ossidativo in vivo (Sgorlon *et al.*, 2005). Per tale motivo è stata condotta un'esperienza per valutare la risposta antiossidante in vita di soggetti a lento accrescimento ed allevati in condizioni standard.

MATERIALI E METODI – Nell'ambito di una prova di accrescimento, condotta per valutare le prestazioni produttive di una popolazione tardiva di conigli, un campione di 41 soggetti è stato sottoposto a prelievo ematico per la valutazione dello stress ossidativo. Tutti gli animali sono stati svezzati all'età di 35 giorni, allevati secondo metodo convenzionale in un capannone con ventilazione a estrazione forzata, alla densità di 14 soggetti/mq, ed alimentati *ad libitum* con mangime commerciale (Proteina Grezza 16,3%, lipidi grezzi 3,5 %, fibra grezza 17,1%) e fieno di medica (Proteina grezza 19,9%, lipidi grezzi 1,4 %, fibra grezza 25,8%). All'età di 57, 80 e 100 gg sono stati effettuati prelievi ematici dalla vena auricolare. I prelievi sono stati condotti in EDTA-K e su di essi sono stati effettuati gli esami ematologici. Un volume noto è stato centrifugato (1000 g per 15') e le cellule sono state lavate tre volte in soluzione salina; gli eritrociti sono stati lisati con un buffer ipotonico (pH 7,40) ed il lisato di eritrociti è stato separato a 3500 g per 15'. Sui campioni così ottenuti sono stati analizzati i seguenti indicatori di stress ossidativo: SOD, CAT, GPx e le sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBAR'S). L'attività di SOD è stata analizzata secondo il metodo di Flohe e Otting (1984). L'attività di CAT e GPx e le TBAR'S sono state determinate con kit commerciale (Randox Laboratories Ltd., Crumlin UK). I dati sono stati sottoposti all'analisi della regressione lineare semplice; successivamente è stata eseguita un'analisi multivariata e tramite stepwise si è provveduto all'esclusione dei parametri a variabilità meno influente per $P > 0,01$. I dati sono stati analizzati tramite ANOVA considerando come variabile categorica l'età.

RISULTATI E CONCLUSIONI – I risultati hanno evidenziato una correlazione lineare semplice negativa ($P < 0,0001$) tra l'attività dei complessi enzimatici antiossidanti considerati ed i valori di TBAR'S (Tab. 1). Questa relazione indica che all'aumentare dei processi ossidativi a carico dei lipidi la risposta antiossidante, da parte degli enzimi deputati a contrastare la perossidazione lipidica, diviene meno efficiente, come indicato dai valori di b ed evidenziato anche in altre esperienze condotte nella specie cunicola (Grattagliano *et al.*, 2004; Sgorlon *et al.*, 2005).

Tabella n. 1 – Correlazione tra alcuni enzimi antiossidanti e TBAR'S.

Parametri	intercetta	b	P
SOD	6,38	-1,62	0,0001
GPX	5,87	-0,12	0,0001
CAT	6,07	-2,41	0,0001

L'analisi multivariata e l'analisi della regressione multipla con il metodo stepwise (Prob. to enter = 0,05 e Prob. to leave = 0,01) hanno permesso di individuare nel solo complesso enzimatico SOD l'indicatore maggiormente correlato ai processi di perossidazione lipidica, escludendo pertanto le altre variabili enzimatiche considerate. Nella tabella 2 vengono riportate le attività enzimatiche e le TBAR'S in funzione dell'età. Dall'esame dei dati si evidenziano differenze significative per le attività di SOD ($P < 0,05$), GPx ($P < 0,01$) e la perossidazione lipidica ($P < 0,01$). In particolare gli

animali analizzati hanno presentato una diminuzione delle attività enzimatiche di SOD e GPx ed un incremento dello stato ossidativo in funzione del crescere dell'età.

In conclusione l'andamento riscontrato a carico di SOD, GPx, CAT e TBAR'S riflette quanto riportato in buona parte degli studi condotti sia sull'uomo che in animali di laboratorio, nei quali si assiste ad una diminuzione della risposta antiossidante e ad un incremento dei prodotti derivanti dai danni ossidativi alle macromolecole con il procedere dell'età (Junqueira et al., 2004).

Tabella n. 2 – Attività antiossidante e stato ossidativo in funzione dell'età.

n.	Parametri	Età					
		57gg		80gg		100gg	
		17	11	13			
		media	e.s.	media	e.s.	media	e.s.
	SOD U/mg Hgb	1,75 a	0,081	1,63 ab	0,108	1,44 b	0,088
	CAT “	1,02	0,057	0,91	0,076	0,89	0,063
	GPX U/g Hgb	19,75 A	0,955	18,15 A	1,274	14,41 B	1,047
	TBAR'S pmol/mgHgb	3,29 B	0,156	3,75 B	0,209	4,31 A	0,172

Nota: sulla riga lettere maiuscole: differenze significative per $P < 0,01$; Lettere minuscole: differenze significative per $P < 0,05$.

RINGRAZIAMENTI – La ricerca è stata svolta con il Finanziamento della Fondazione Cassa di Risparmio di Pisa.

BIBLIOGRAFIA – **Betti**, M., Bianchi, M., Petracchi, M., Cavani C., 2003. Suscettibilità all'ossidazione e caratteristiche sensoriali della carne di coniglio durante la conservazione. Riv. Coniglicoltura 4:36-37. **Dal Bosco**, A., Castellini, C., Mugnai, C., 2002. Rearing rabbits on a wire net floor or straw litter: behaviour, growth and meat qualitative traits. Livestock production science, 75: 149-156. **Dal Bosco**, A., Castellini, C., Mugnai, C., 2003. Influenza del sistema di allevamento sul metabolismo energetico dei muscoli e sulla stabilità ossidativa della carne di coniglio. Riv. Coniglicoltura 4:46-47. **De la Fuente**, M., Hernanz A., Guayerbas, N., Alvarez, P., Alvarado, C., 2004. Changes with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence. Cell. Mol. Biol. 15(Suppl.50):OL683-OL690. **Flohe**, L., Otting, F., 1984. Superoxide dismutase assays. Methods in Enzymology. 105:93-97. **Grattagliano**, I., Portincasa, P., Cocco, T., Moschetta, A., Di Paola, M., Calmieri, V.O., Palasciano, G., 2004. Effect of dietary restriction and N-acetylcysteine supplementation on intestinal mucosa and liver mitochondrial redox status and function in aged rats. Exp. Gerontol. 39(9): 1323-1332. **Nelson**, S, K., Bose, S. K., Grunwald, G. K., Myhill, P., McCord, J. M., 2006. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: A fundamentally new approach to antioxidant therapy. Free Radical Biology and Medicine. 40:341-347. **Siliprandi**, N., Tettamanti, G. 1998. Biochimica Medica. Piccin Edition, Italy. **Sgorlon**, S., Stradaoli, G., Stefanon, B., Altimer, G., Della Loggia, R., 2005. Dietary grape polyphenols modulate oxidative stress in ageing rabbits. Ital. J. Anim. Sci. 4: 541-543. **Junqueira**, V. B. C., Barros, S. B. M., Chan, S. S., Rodrigues, L., Giavarotti, L., Abud, R. L. Deucher, G., P., 2004. Aging and oxidative stress. Mol Aspects Med. 25(1-2):5-16.