

**OCENA ANTYOKSYDACYJNEGO BILANSU
WE KRWI GOŁĘBI (*COLUMBA LIVIA*)
Z RÓŻNYCH ŚRODOWISK PÓLNOCCYJNEJ POLSKI**

**ANTIOXIDANT PARAMETERS ESTIMATION
IN BLOOD OF PIGEONS (*COLUMBA LIVIA*)
FROM DIFFERENT REGIONS OF NORTHERN POLAND**

**Nataliya Kurhalyuk¹, Tomasz Hetmański², Józef Antonowicz³,
Mariusz Kasprzak¹, Aleksandra Kaleniecka¹, Halyna Tkachenko⁴,
Małgorzata Milewczyk¹**

¹ Akademia Pomorska
Zakład Fizjologii Zwierząt
Instytut Biologii i Ochrony Środowiska
ul. Arciszewskiego 22b, 76-200 Słupsk
e-mail: kurhalyuk@pap.edu.pl

² Akademia Pomorska
Zakład Zoologii
Instytut Biologii i Ochrony Środowiska
ul. Arciszewskiego 22b, 76-200 Słupsk

³ Akademia Pomorska
Zakład Chemii Środowiskowej
Instytut Biologii i Ochrony Środowiska
ul. Arciszewskiego 22b, 76-200 Słupsk

⁴ Lwowski Narodowy Uniwersytet Medyczny im. Daniły Halickiego
Zakład Higieny i Toksykologii
ul. Pekarska 69, Lwów, Ukraina

ABSTRACT

To investigate the effects of heavy metal accumulations on birds, we compared the lead content, intensity of lipoperoxidation, total antioxidant activity, peroxide resistance of erythrocytes in blood of pigeons (*Columba livia*) from different regions of northern Poland. The results showed that concentration of Pb on blood of pigeons in Szpeęgawa were four times higher than in Słupsk colony. This indicates that pigeons at Szpeęgawa region may be affected more by the toxic Pb exposure in environment. Elevating metal exposure may result in increasing oxidative stress deals with intensification of lipid peroxidation and decrease of process peroxide resistance of erythrocytes.

Słowa kluczowe: gołąb (*Columba livia*), intensywność procesów lipoperoksydacji, stres oksydacyjny, środowisko, metale ciężkie, antyoksydanty, północna Polska

Key words: pigeons (*Columba livia*), intensity of lipoperoxidation processes, oxidative stress, environment, heavy metals, antioxidants, northern Poland

WPROWADZENIE

Gołąb miejski (*Columba livia* f. *domestica*) występuje w większych miastach prawie na wszystkich kontynentach świata. Jego kolonie lęgowe często skupiają się w centrum miasta (Steiner i Zahner 1994, Johnston i Janiga 1995, Sacchi i in. 2002), a stada żerowiskowe obserwuje się nawet w miejscach o nasilonym ruchu drogowym. Ostatnie badania Hetmańskiego (2007) wskazują, że jest to gatunek osiadły, ponieważ ptaki nie migrują z miasta do innych miast, a osobniki wykazują duże przywiązanie nie tylko do środowiska zurbanizowanego, ale również do jednej kolonii lęgowej. Dyspersja gołębi miejskich z kolonii do innych kolonii lęgowych na terenie jednego miasta występuje wyłącznie u młodych ptaków i zanika całkowicie u form dorosłych. Taka cecha czyni gołębie bardzo dobrymi indykatorami środowiska zurbanizowanego, gdyż ptaki akumulują w swoim ciele różne szkodliwe substancje z określonej powierzchni miasta, najczęściej w pobliżu kolonii lęgowej. Silne przywiązanie ptaków do miejsc żerowiskowych i lęgowych jest zaletą w badaniach monitoringowych, gdyż pozwala to zbadać różnicę w poziomie zanieczyszczeń występujących w różnych dzielnicach miasta.

Do badań można wykorzystać różne narządy wewnętrzne ptaków, a przyżyciowo można badać jaja (Nagel i in. 2001), pióra (Burger i Gochfeld 1999, Nam i in. 2004) lub krew. Wyniki badań pokazują, że gołębie miejskie mają kilkakrotnie wyższy poziom metali ciężkich zakumulowanych w swoich tkankach od gołębi domowych (Johnston i Janiga 1995).

Do metabolicznych skutków stresu oksydacyjnego, spowodowanego oddziaływaniem metali ciężkich w środowisku zdegradowanym, należą przede wszystkim procesy peroksydacji lipidów, oksydacyjne uszkodzenia białek i DNA, ale stres oksydacyjny powoduje również uszkodzenia wszystkich klas molekularnych składników komórek. Liczne badania przeprowadzone na zwierzętach i ludziach wykazują, że reaktywne formy tlenu (RTF) wpływają na rozwój niedokrwistości w przebiegu wrodzonych nieprawidłowości metabolizmu krwinek czerwonych oraz w procesach chorobowych (Bartosz 2004).

Zakres czynników środowiskowych zawartych w wodzie, wdychanym powietrzu czy pokarmie, zdolnych do wywoływania patologicznych reakcji wolnorodnikowych, ciągle się poszerza. W znacznym stopniu na takie działanie narażone są zwierzęta miejskie, do organizmów których związki toksyczne dostają się drogą pokarmową przez łańcuch troficzny. Takie zmiany dotyczą głównie działania metali ciężkich pochodzących z ruchu kołowego czy też starego budownictwa powstałego z wykorzystaniem azbestu. Wywołane w taki sposób mutacje genowe sprzyjają kancerogenezie i są przykładami zaburzeń wywoływanych czynnikami fizycznymi z udziałem rodników tlenowych (Sies 1991, Hoffman i in. 2000, Patrick 2003, Uchida i in. 2004).

Celem naszej pracy była ocena wpływu zróżnicowanego stresu środowiskowego na parametry oksydacyjne we krwi gołębia miejskiego (intensywność procesów lipoperoksydacji, całkowita zdolność antyoksydacyjna, właściwości peroksydacyjne erytrocytów) oraz zawartość ołowiu w tych warunkach.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania prowadzono w dwóch miejscach: w Słupsku (54°27' N i 17°01' E) oraz we wsi Szpęgawa (54°05' N i 18°42' E). Słupsk jest miastem z ok. 100 000 ludności. Populacja gołębi miejskich została oszacowana w 2006 roku na ok. 1200 osobników. Kolonie lęgowe oraz stada żerowiskowe gołębia skupiają się głównie w centrum Starego Miasta. Na głównym placu gromadziło się do 500 osobników. Gołębie w Słupsku zostały schwyte w jednej z kolonii lęgowych zamieszkującej strych budynku KRUS w śródmieściu, w odległości ok. 200 metrów od głównego żerowiska. Ptaki złapano nocą do przewiewnych worków, a następnie w innym pomieszczeniu ważono je za pomocą wagi typu PESOLA z dokładnością do 10 gramów.

Druga grupa ptaków pochodziła z terenów wiejskich z gospodarstwa rolnego w Szpęgawie, zlokalizowanego bezpośrednio przy drodze o nasilonym ruchu samochodowym, łączącej Skarszewy z Tczewem. Kilka kilometrów od tego gospodarstwa prowadzone są intensywne prace drogowe związane z budową autostrady A1. W związku z tym na tej drodze w ostatnich latach było szczególnie wysokie zagęszczenie samochodów ciężarowych. Kolonia gołębia domowego liczyła 60 osobników, jednakże do badań przeznaczono wyłącznie osobniki dorosłe. Ptaki były karmione zbożem (głównie pszenicą) na placu gospodarstwa w odległości ok. 50 m od drogi.

Badania w Słupsku i Szpęgawie wykonano w listopadzie 2006 roku. Krew pobrano z żyły skrzydłowej ptaków. Do badań wybrano wyłącznie osobniki o cechach dorosłych ptaków, kierując się przy tym kształtem, a zwłaszcza wybarwieniem woskówki dzioba. U dorosłych woskówka jest wyraźnie biała i dobrze wykształcona zarówno u samic, jak i samców. Natomiast u osobników młodych jest słabo rozwinięta i koloru bardziej szarego niż białego.

Analizy stężenia ołowiu wykonano metodą spektrometrii atomowej (Dittrich 1998). Procesy analityczne poprzedza homogenizacja i mineralizacja materiału. Krzywe wzorcowe (AAS) sporządzono z użyciem wzorców standardowych firmy Merck.

Intensywność procesów stresu oksydacyjnego wyznaczano poprzez pomiar poziomu malonaldehydu (MDA), który jest ostatecznym produktem zmian lipidowych wywoływanych przez stres oksydacyjny, według metody Kamysznikova (2004).

Do oznaczania całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (ang. total antioxidant activity) wykorzystano metodę Galaktionovej i in. 1998. Całkowita zdolność antyoksydacyjna polega na oznaczeniu poziomu inhibicji askorbat- i żelazo-indukowanego utleniania Tweenu 80 do dialdehydu malonowego, końcowego produktu lipoperoksydacji, który tworzy z kwasem 2-tiobarbiturobim trimetynowy kompleks (TBARS).

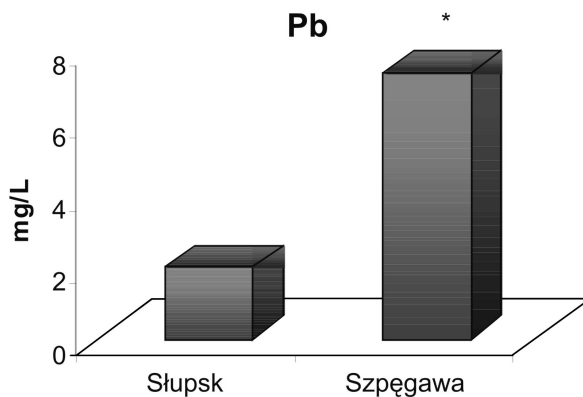
Analizę właściwości peroksydacyjnych erytrocytów przeprowadzono według Gzhegotskyi i in. (2004). Metoda polega na oznaczeniu peroksydacyjnej odporności

blon erytrocytów i obliczeniu odsetka hemolizowanych erytrocytów przy działaniu nadtlenu wodoru H_2O_2 . Zastosowanie azydku sodu jako inhibitora katalazy powoduje stabilizację stężenia dodanego H_2O_2 . Metoda oznacza realną ilość zhemolizowanych erytrocytów w ujęciu procentowym odnośnie całkowitej hemolizy.

Otrzymane wyniki badań poddano analizie statystycznej. Dla każdego parametru obliczano średnie arytmetyczne oraz odchylenie standardowe. Istotność różnic pomiędzy średnimi arytmetycznymi poszczególnych parametrów w grupach z odmiennych środowisk określano testem t-Studenta jako statystycznie istotne ($p < 0,05$).

WYNIKI I DYSKUSJA

Jak wynika z danych przedstawionych na rycinie 1, zawartość ołowiu we krwi gołębi miejskich, zamieszkujących różne tereny północnej Polski, znacznie się różniła: we wsi Szpęgawa zanotowano wzrost poziomu tego pierwiastka do 276% ($p < 0,001$) w porównaniu do wyników uzyskanych z krwi ptaków ze Słuska.



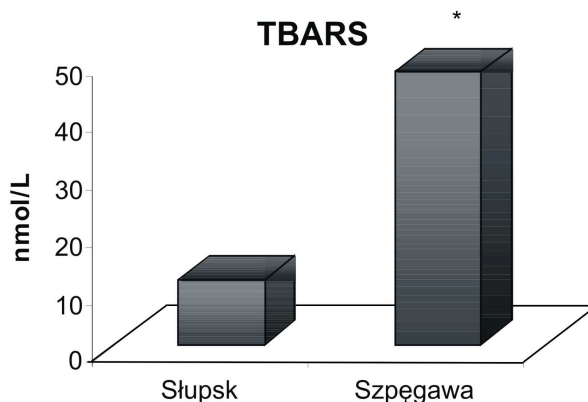
Ryc. 1. Zawartość ołowiu (mg/L) we krwi gołębi miejskich (*Columba livia f. domestica*) pochodzących z różnych środowisk północnej Polski

Fig. 1. Lead blood content (mg/L) in pigeons (*Columba livia f. domestica*) from different regions of northern Poland

* – różnica statystycznie istotna dla relacji Słusk–Szpęgawa ($p < 0,001$)

Intensywność procesów lipoperoksydacji, analizowana we krwi tych ptaków, zaświadczyla wysoce statystycznie wiarygodny wzrost również tego parametru. I tak, zawartość TBARS zwiększyła się prawie do czterokrotnego poziomu ($p < 0,001$) w porównaniu do gołębi z terenów miejskich (ryc. 2). Analiza tych wyników świadczy, że wzrost poziomu ołowiu we krwi nasila aktywację wolnorodnikowych procesów, co negatywnie oddziałuje na organizm tych zwierząt.

Analizując wyniki procesów peroksydacyjnej zdolności krwinek czerwonych jako sposób monitorowania skutków oddziaływania dużych stężeń ołowiu na organizm gołębi, należy zwrócić szczególną uwagę na obniżoną odporność tych ko-



Ryc. 2. Intensywność procesów lipoperoksydacji (zawartość TBARS, nmol/L) we krwi gołębi miejskich (*Columba livia* f. *domestica*) pochodzących z różnych środowisk północnej Polski

Fig. 2. Intensity of lipoperoxidation (TBARS content, nmol/L) in pigeons (*Columba livia* f. *domestica*) blood from different regions of northern Poland

* – różnica statystycznie istotna dla relacji Słupsk–Szpęgawa ($p < 0,001$).

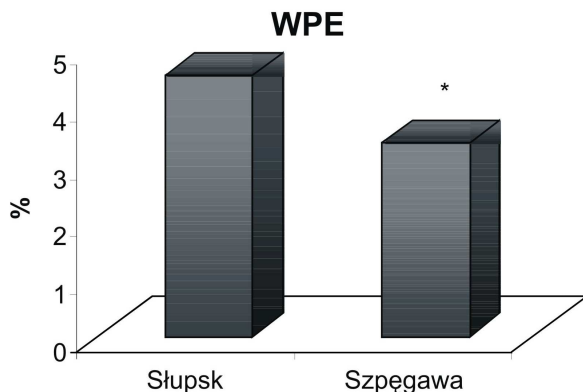
mórek na działanie peroksydów. Zanotowaliśmy wiarygodne obniżenie do 26,4% ($p < 0,05$) tego parametru u ptaków ze wsi Szpęgawa. Wyniki dotyczące tej serii badań przedstawiono na rycinie 3. Aktywacji procesów lipoperoksydacji na działanie wysokich stężeń ołowiu towarzyszy też wzrost całkowitej antyoksydacyjnej zdolności osocza i erytrocytów. Ten parametr, oceniany jako askorbat i żelazo-indukowane utlenianie Tweenu 80 do końcowych produktów lipoperoksydacji, też znacznie wzrasta. Zanotowano jego podwyższenie do 29,5% ($p < 0,05$) we krwi ptaków ze wsi w relacji do ptaków bytujących w mieście.

Stwierdzono, że ołów jest aktywatorem stresu oksydacyjnego u zwierząt, czemu towarzyszy wzmożona peroksydacja lipidów w różnych tkankach, zwłaszcza w wątrobie (Hoffman i in. 2000). W poszczególnych przypadkach ołów może okazać się przyczyną dysfunkcji tarczycy u myszy (Chaurasia i Kar 1997) czy bezpłodności u samic szczura. Jony ołowiu powodowały wzrost aktywności dysmutazy nadtlenkowej, która eliminuje w reakcji dysmutacji ze środowiska komórki anionorodniki nadtlenkowe, zapobiegając powstawaniu innych wolnych rodników tlenu i ich pochodnych (Valko i in. 2005).

Wiadomo, że właściwości toksyczne mają nieorganiczne związki metali, które – łatwo rozpuszczalne i silnie dysocjujące – przenikają przez błony komórkowe i dostają się do narządów wewnętrznych (Kang 2002, Patrick 2003, Sies 1991, Uchida i in. 2004). Metale ciężkie pochodzą ze źródeł naturalnych i antropogenicznych. Są poważnym zagrożeniem dla produkcji roślinnej, szczególnie na terenach mocno uprzemysłowionych. Metale ciężkie przedostają się do gleby, skąd są pobierane przez rośliny i w ten sposób włączane do łańcucha pokarmowego. Bardzo łatwo przenikają do nadziemnych części roślin z zanieczyszczonego powietrza. Ich źródłem są też nawozy mineralne oraz ścieki komunalne i przemysłowe dostające się

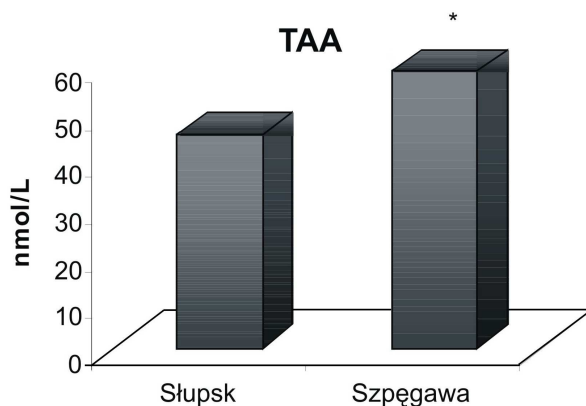
do gleby. W warunkach naturalnych o zawartości metali ciężkich w glebach decyduje ich koncentracja w skale, z której gleba powstała.

Badania potwierdzają wpływ metali ciężkich na zmianę poziomu enzymów oksydoredukcyjnych (Underwood 1977). Metale ciężkie mają właściwości zwiększające natężenie stresu oksydacyjnego organizmów, zaś enzymy antyoksydacyjne (ryc. 4) okazały się odpowiednimi wskaźnikami efektów oddziaływań metali.



Ryc. 3. Analiza właściwości peroksydacyjnych krwinek czerwonych (%) gołębi miejskich (*Columba livia f. domestica*) pochodzących z różnych środowisk północnej Polski
Fig. 3. Peroxide resistance of erythrocytes (%) in pigeons (*Columba livia f. domestica*) blood from different regions of northern Poland

* – różnica statystycznie istotna dla relacji Słupsk–Szpęgawa ($p < 0,05$)



Ryc. 4. Całkowita zdolność antyoksydacyjna (nmol/L) krwi gołębi miejskich (*Columba livia f. domestica*) pochodzących z różnych środowisk północnej Polski
Fig. 4. Total blood antioxidant activity (nmol/L) in pigeons (*Columba livia f. domestica*) blood from different regions of northern Poland

* – różnica statystycznie istotna dla relacji Słupsk–Szpęgawa ($p < 0,05$)

Rozwój przemysłu powoduje wzrost stężenia metali ciężkich w środowisku. Metale te, kumulując się w organizmach, wyrządzają rozmaite szkody. W zależności od dawki wpływają m.in. na zakłócenie homeostazy, co może prowadzić do wzrostu liczby wolnych rodników i innych reaktywnych form tlenu (Cooke i in. 1998, Tudek 1999, Uchida i in. 2004).

Wielu autorów stwierdziło, że ołów i kadm to metale zaliczane do szczególnie toksycznych (Patrick 2003, Valko i in. 2005, Chaurasia i Kar 1997). Bioakumulacja tych pierwiastków związana jest z wysokim natężeniem ruchu samochodowego i – jak wykazują nasze dane – odkładane we krwi i tkankach gołębi. Pierwiastki te mogą hamować działanie niektórych enzymów (Johnston i Janiga 1995), co odbija się niekorzystnie na kondycji tych ptaków. Badania wykazują, że może też modyfikować ich przeżywalność i wskaźniki reprodukcji (Nam i Lee 2006).

Badania kliniczne ujawniły zwiększenie markerów stresu oksydacyjnego, m.in. metabolitów oksydacyjnego uszkodzenia DNA (Sies 1991). Rodnik hydroksylowy ze względu na wysoką reaktywność oddziałuje z biomolekułami w miejscu swego powstania. Reaguje zarówno z cząsteczką deoksyrybozy, jak i z zasadami azotowymi, wchodzącymi w skład DNA. Reakcja z cząsteczką deoksyrybozy prowadzi do powstania pojedynczych i podwójnych pęknięć nici DNA. Pojedyncze pęknięcia są naprawiane stosunkowo szybko, natomiast podwójne pęknięcie nici DNA rzadziej (Kang 2002). W reakcji rodnika hydroksylowego z DNA najczęściej uszkodzeniu ulegają zasady azotowe, czego konsekwencją jest powstanie wielu pochodnych, różniących się właściwościami tworzenia par zasad od wyjściowych substratów, a skutkiem tego mogą być mutacje (Tudek 1999). Wzrost dotyczy także produktów utleniania lipidów i prostaglandyn, metalotioneiny, obniżenia stężenia grup tiolowych w białkach u pacjentów z rozpoznaną chorobą nowotworową (Clark i in. 1996). Dlatego wolne rodniki tlenowe są uznawane za podstawowy czynnik rozwoju nowotworów (Kang 2002).

Wcześniejsze badania porównawcze wykazały, że ptaki z centrum miast, gdzie występował intensywny ruch samochodowy, akumulują znacznie więcej metali ciężkich od ptaków z koloni zamieszkujących obrzeża miast, a zwłaszcza żyjących na wsiach (Johnston i Janiga 1995, Nam i in. 2004). Ponadto często obserwuje się duże różnice w akumulacji metali ciężkich u gołębi z różnych miast, co świadczy o zróżnicowanym stopniu zanieczyszczenia miast (Nam i Lee 2006).

U gołębia miejskiego ołów akumulowany jest głównie w kościach, następnie w nerkach, wątrobie i mózgu. Z kolei kadm akumulowany jest w podobnych narządach, z wyjątkiem kości (Johnston i Janiga 1995). Te metale toksyczne dostają się do organizmu głównie drogą pokarmową wraz z kamykami z podłoża, które pełnią w żołądku gołębi funkcję gastrolitów. W związku z tym poziom ołowiu w ciele gołębi zależy od zawartości tego pierwiastka w podłożu, na którym ptaki zbierają pokarm i gastrolity.

PODSUMOWANIE

Nasze badania pokazały znaczne zróżnicowanie poziomu ołowiu we krwi ptaków z koloni miejskiej i wiejskiej. Różnice pomiędzy tymi dwiema grupami ptaków

wystąpiły zarówno w parametrach intensywności procesów lipoperoksydacji, jak i w funkcjonowaniu krwinek czerwonych (odporność na działanie peroksydów). Więcej ołowiu stwierdzono we wsi Szpęgawa niż w mieście Słupsku. Są to odmienne wyniki niż uzyskali Nam i in. 2004. Różnice w poziomie ołowiu można tłumaczyć nasilonym ruchem samochodowym na drodze przy gospodarstwie rolnym. Bliższe sąsiedztwo przejeżdżających samochodów zanieczyszcza otoczenie jezdni, oddziałując niekorzystnie na organizm ptaków.

LITERATURA

- Bartosz G. 2004. Druga twarz tlenu. PWN. Warszawa.
- Burger J., Gochfeld M. 1999. Interspecific and locational differences in heavy metal levels in four species of birds near Sydney, Australia. *Environ. Monit. Assess.*, 58: 105-119.
- Chaurasia S.S., Kar A. 1997. Protective effects of vitamin E against lead-induced deterioration of membrane associated type-I iodothyronine 5'-monodeiodinase (5'D-I) activity in male mice.
- Clark L.C., Combs L.J., Turnbull W.B., Slate E.H., Chalker D.K., Chow J. 1996. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: a randomized controlled trial. *JAMA*, 276: 1957-1963.
- Cooke M.S., Herbert K.E., Butler P.C. 1998. Further evidence for a possible role of conformation in the immunogenicity and antigenicity of the oxidative DNA lesion, 8-oxo-2'-deoxyguanosine. *Free Radic Res.*, 28: 459-469.
- Dittrich K. 1998. Absorpcyjna spektrometria atomowa. PWN. Warszawa.
- Galaktionova L.P., Molchanow A.V., Yelchaninova S.A., Varshavsky B.Y. 1998. Lipid peroxidation in patients with gastroduodenal ulcer. *Clin. Lab. Diag.*, 6: 10-14.
- Gzhegotskyi M., Kovalchuk S., Panina L., Terletska O., Mysakovets O. 2004. Method for determination of erythrocyte membranes peroxide resistance and its informativeness under physiological conditions and at intoxication of organism. *Exp. Clinic. Physiol. Bioch.*, 3: 58-64.
- Hetmański T. 2007. Dispersion asymmetry within a Feral Pigeon *Columba livia* population. *Acta Ornithol.*, 42: 23-31.
- Hoffman D.J., Heinz G.H., Sileo L. 2000. Developmental toxicity of lead-contaminated sediment in Canada geese (*Branta canadensis*). *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 59(4): 235-252.
- Johnston R., Janiga M. 1995. Feral pigeons. Oxford Univ. Press. New York.
- Kamyshnikov V.S. 2004. Reference book on clinic and biochemical researches and laboratory diagnostics. MED press-uniform. Moscow.
- Kang D.H. 2002 Oxidative stress, DNA damage, and breast cancer. *Arch. Clin. Issues*, 13: 540-549.
- Nagel P., Smrekar G., Haag-Wackernagel D. 2001. Use of feral pigeon eggs for urban biomonitoring. *Fresenius Environ. Bull.*, 10: 18-25.
- Nam D.H., Lee D.P. 2006. Reproductive effects of heavy metal accumulation on breeding feral pigeons (*Columba livia*). *Scie. Total Environ.*, 366: 682-687.
- Nam D.H., Lee D.P., Koo T.H. 2004. Monitoring for lead pollution using feathers of feral pigeons (*Columba livia*) from Korea. *Environ. Monit. Assess.*, 95: 13-22.
- Patrick L. 2003. Toxic metals and antioxidants: Part II. The role of antioxidants in arsenic and cadmium toxicity. *Altern. Med. Rev.*, 8: 106-128.

- Sacchi R., Gentili A., Razzetti E., Barbieri F. 2002. Effects of building features on density and flock distribution of feral pigeons *Columba livia* var. *domestica* in an urban environment. *Can. J. Zool.*, 80: 48-54.
- Sies H. 1991. Oxidative stress: Introduction w Oxidative stress. Oxidants and antioxidants, XV-XXI Academic Press Ltd. London.
- Steiner R., Zahner A. 1994. Untersuchungen zu Siedlungsdichte und Aktionsradius der Strassentauben (*Columba livia* f. *domestica*) in Wien mit einer Bestandsschätzung für das gesamte Stadtgebiet. *Egretta*, 37: 78-93.
- Tudek B. 1999. Mechanizmy naprawy utlenionych zasad DNA. *Kosmos*, 245: 339-352.
- Uchida M., Teranishi H., Aoshima K. 2004. Reduction of erythrocyte catalase and superoxide dismutase activities in male inhabitants of a cadmium-polluted area in Jinzu river basin. *Japan. Toxicol. Letters*, 151: 451-457.
- Underwood E.J. 1977. Trace Elements in Human and Animal Nutrition. 4th ed. Acad. Press. New York.
- Valko M., Morris H., Cronin M.T. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, 12: 1161-1208.