

MAREK GEHRKE, JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI*, JANUSZ ZBYLUT*, ANDRZEJ WŁODARCZAK**

Wybrane wskaźniki metabolizmu żelaza u krów z hypokuprozą

Zakład Chorób Niedoborowych, *Zakład Biotechniki Rozrodu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego
Oddz. w Bydgoszczy, Al. Powstańców Wielkopolskich 10, 85-090 Bydgoszcz
**Prywatna Lecznica Zwierząt, ul. Sportowa 9, 83-230 Smętowo Graniczne

Gehrke M., Jaśkowski J. M., Zbylut J., Włodarczak A.

Selected indices of iron metabolism in cows with hypocuprosis

Summary

The aim of the study was to explain why in a farm in the Bydgoszcz region young cattle were getting low body weight gains and milking cows were in a poor state of health. The studies included blood assessment, i.e. haematocrit – Ht, concentration of haemoglobin – Hb, the level of Cu and ceruloplasmin – Cp in sera obtained from the animals treated by various systems during grazing time and following feeding on silage supplemented with microelements. Iron metabolism was assessed on the basis of the changes of Fe levels, total iron binding capacity (TIBC), unsaturated iron binding capacity (UIBC) in sera and the index of transferrin saturation (TfS).

The studies indicated that lowered indices of Ht and Hb during grazing time were accompanied by hypocupraemia. Despite low concentrations of Cp in sera of cows with hypocupraemia, the alterations in Fe, UIBC and TfS pointed to a mobilisation of iron transport.

Zespół objawów chorobowych związanych z niedoborem miedzi (hypokuproza) może być indukowany eksperymentalnie u wielu gatunków zwierząt, lecz w warunkach terenowych występuje wyłącznie u przeżuwaczy (9).

Częstym objawem hypokuprozy u bydła, chociaż nie zawsze jej towarzyszącym, jest niedokrwistość o różnym, ale z reguły łagodnym nasileniu (11). Patogeneza niedokrwistości w niedoborze miedzi do dzisiaj pozostaje niejasna. Wśród hipotetycznych mechanizmów uzależniających jej występowanie wymienia się zaburzenia transportu i mobilizacji żelaza, jako substratu do syntezy hemu (4, 14, 22). Inna hipoteza zakłada zmiany cytoarchitektury błon erytrocytarnych w hypokuprozie, które po rozpoznaniu przez komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego śledziona są przyczyną zwiększonej eliminacji krwinek czerwonych z układu krążenia. Badania wielu autorów (12, 13, 17) wykazały, że niedoborowi miedzi towarzyszą zmiany ilościowe w warstwie lipidowej błon krwinek czerwonych oraz ich odmienne właściwości fizyczne. Wskazuje się, że przyczyną zmian destrukcyjnych frakcji lipidowej może być obniżona aktywność Cu-zależnej dysmutazy nadtlenkowej i wzrost jej podatności na utlenianie inicjowane rodnikami nadtlenkowymi (1, 7, 16).

Celem pracy było zbadanie wpływu niskiej zawartości ceruloplazminy w surowicy w niedoborze miedzi w powstawaniu zaburzeń transportu żelaza i generowaniu niedokrwistości. Prezentowane wyni-

ki pochodzą z badań nad terenowym przypadkiem przewlekłej hypokuprozy u krów mlecznych wypasanych na glebach torfowych doliny Noteci.

Material i metody

Niskie przyrosty masy ciała u młodego bydła oraz postępujący spadek kondycji krów mlecznych w jednym z gospodarstw położonych w dolinie Noteci (województwo bydgoskie) stał się przyczyną podjęcia badań zmierzających do ustalenia tła przyczynowego obserwowanych objawów. Badania koprolologiczne i hematologiczne wskazały na obecność jaj nicieni żołądkowo-jelitowych z rodzaju *Trichostrongylus* sp. i tasiemców z rodzaju *Moniezia* sp. w większości badanych próbek kału oraz obniżenie wskaźnika hematokrytowego i stężenia hemoglobiny.

Podstawową paszą objętościową dawki pokarmowej w analizowanym okresie było pastwisko położone na glebach torfowych, natomiast paszę treściwą stanowiły niewielkie ilości sruć zbożowych i otrąb pszennych bez uzupełniających dodatków mineralnych.

Ponieważ zakres prowadzonych badań nie obejmował składu chemicznego pasz stosowanych w żywieniu bydła, stąd rozpoznanie oparto na wynikach badań hematologicznych i biochemicznych surowicy krwi krów, uzyskanych w warunkach zróżnicowanego leczenia krów w okresie pastwiskowym oraz po przejściu na żywienie zimowe, obejmujące kisonki z kukurydzy, kisonki z traw oraz pasze treściwe i lizawki z mikroelementami.

Losowo wybrane krowy zakwalifikowano do trzech grup. Grupę pierwszą (6 szt.) stanowiły zwierzęta, u których wykonano odrobaczenie fenbendazolem (preparat

Tab. 1. Poziom Hb, Ht, SSH oraz Cu i Cp w surowicy krów w zależności od rodzaju leczenia i żywienia

Rodzaj leczenia	Fenbendazol (n=6)	Fenbendazol + Co lub B ₁₂ (n=8)	Co lub B ₁₂ (n=12)
Hemoglobina (Hb) g/dL			
Przed leczeniem*	8,5 ± 1,1 ^b	8,3 ± 1,0 ^b	8,8 ± 1,2 ^b
23 dni po podaniu leków*	9,3 ± 0,8 ^b	8,7 ± 0,9 ^b	8,8 ± 1,1 ^b
21 dni po zmianie żywienia**	11,1 ± 0,7 ^a	11,1 ± 0,7 ^a	11,4 ± 0,8 ^a
Wskaźnik hematokrytowy (Ht) %			
Przed leczeniem*	24,1 ± 3,1 ^b	23,9 ± 2,8 ^b	23,6 ± 4,0 ^b
23 dni po podaniu leków*	24,5 ± 3,5 ^b	24,5 ± 2,9 ^b	25,8 ± 4,1 ^b
21 dni po zmianie żywienia**	30,7 ± 3,4 ^a	29,9 ± 2,1 ^a	30,7 ± 3,5 ^a
Miedź (Cu) μM/L			
Przed leczeniem*	4,6 ± 1,4 ^b	3,8 ± 1,0 ^b	3,7 ± 0,7 ^b
23 dni po podaniu leków*	4,6 ± 1,0 ^b	4,8 ± 1,2 ^b	4,5 ± 1,1 ^b
21 dni po zmianie żywienia**	9,9 ± 2,0 ^a	10,2 ± 1,2 ^a	11,3 ± 1,8 ^a
Ceruloplazmina (Cp) mg/dL			
Przed leczeniem*	27,9 ± 7,6 ^b	27,3 ± 9,8 ^b	30,6 ± 7,6 ^b
23 dni po podaniu leków*	28,1 ± 8,3 ^b	29,9 ± 7,3 ^b	32,7 ± 10,4 ^b
21 dni po zmianie żywienia**	120,7 ± 40,4 ^a	113,0 ± 28,9 ^a	121,7 ± 25,3 ^a

Objaśnienia:

* – pobranie krwi przypadające na okres żywienia pastwiskowego;

** – pobranie krwi przypadające na okres żywienia kiszonkami i dodatkami mineralnymi w postaci lizawek;

^{a,b} – średnie arytmetyczne oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie (p<0,05)

– FENBESAN) w jednorazowej dawce 120 g *per os* /zwierzę. Krowy grupy drugiej (8 szt.) również otrzymały preparat odrobaczający, a następnie wydzielono spośród nich dwie stawki zwierząt po 4 sztuki, z których jedna otrzymała dwukrotnie iniekcję domięśniową witaminy B₁₂ w dawce 2,5 mg cyjanokobalaminy/szt. w odstępie 7 dni (preparat Intravit B₁₂, W. Brytania), a druga tlenki kobaltu w dawce 20 g/szt. w postaci dozwaczonych granul (firma PERMACO, W. Brytania). Trzecia grupa krów (12 szt.) nie była odrobaczana, a jej leczenie stanowiła dwukrotna iniekcja witaminy B₁₂ (6 szt.) i do-

zwaczowa aplikacja granul kobaltowych (6 szt.). Dawkowanie witaminy B₁₂ i kobaltu było identyczne jak w grupie drugiej.

Próbki krwi do badań hematologicznych (hematokryt – Ht, hemoglobina – Hb) oraz biochemicznych (stężenie Cu, Fe, ceruloplazminy – Cp, całkowita zdolność wiązania żelaza – CZWŻ) pobrano 3-krotnie tj.: przed podaniem leków (15.09.96), w 23 dniu po podaniu leków (8.10.96) oraz w 21 dniu po zakończeniu wypasu pastwiskowego i przejściu na żywienie zimowe (28.11.96). W oparciu o wyniki badań hematologicznych wyliczono średnie stężenie hemoglobiny w jednej krwince – SSH, a na podstawie oznaczeń stężeń Fe i CZWŻ w surowicy utajoną zdolność wiązania żelaza – UZWŻ i wskaźnik wysycenia transferyny żelazem – WWTf, wyrażony w procentach. W próbkach krwi pobranych przed doświadczeniem oraz po zmianie żywienia obliczono dodatkowo całkowitą liczbę leukocytów oraz bezwzględną liczbę poszczególnych frakcji komórkowych układu leukocytnego.

Wskaźnik hematokrytowy oznaczono po odwirowaniu krwi w kapilarach szklanych, a hemoglobinę metodą cyjanomethemoglobinową. Stężenia miedzi i żelaza w surowicy (również po wysyceniu białek surowicy FeCl₃) oznaczono metodą absorpcyjnej spektrofotometrii atomowej. Zawartość ceruloplazminy w surowicy oznaczono metodą Houchina (10).

Badania statystyczne obejmowały analizę wariancji jednoczynnikowej średnich i ich podział na grupy jednorodne testem Studenta-Newmana-Keulsa oraz analizę korelacji badanych wskaźników hematologicznych i biochemicznych. Wszystkie obliczenia statystyczne wykonano przy użyciu pakietu statystycznego STATGRAPHICS.

Omówienie wyników

Wyniki oznaczeń wskaźnika Ht, stężeń Hb oraz Cu i Cp podano w tab. 1. Średnie wartości wskaźnika Ht i stężenia Hb we krwi krów przed podaniem leków wynosiły odpowiednio 24,3% i 8,8 g/dL. Spośród 27 badanych krów u 13 (48,1%) stwierdzono obniżoną wartość wskaźnika hematokrytowego (<24%), natomiast u 7 (25,9%) obniżoną zawartość hemoglobiny (poniżej 8 g/dL). U wszystkich krów z obniżonym stężeniem Hb stwierdzono obni-

Tab. 2. Wybrane wskaźniki metabolizmu żelaza u krów z hypokupremią w zależności od rodzaju żywienia (n=27)

Badany wskaźnik	Cu ($\mu\text{M/L}$)	Cp (mg/dL)	Fe ($\mu\text{M/L}$)	CZWŻ ($\mu\text{M/L}$)	UZWŻ ($\mu\text{M/L}$)	WWTf (%)
Okres pastwiskowy (bez dodatku mikroelementów)	$3,8 \pm 1,1^a$	$28,6 \pm 8,5^a$	$29,1 \pm 12,7^a$	$50,2 \pm 11,1$	$21,1 \pm 11,6^a$	$58,2 \pm 20,3^a$
Okres żywienia kiszonkami (mikroelementy w lizawkach)	$10,6 \pm 1,8^b$	$119,0 \pm 30,6^b$	$18,7 \pm 4,0^b$	$47,5 \pm 8,8$	$29,2 \pm 8,3^b$	$39,4 \pm 8,3^b$
Poziom istotności	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,001$

Objaśnienie: ^{a, b} – średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie

żone wartości Ht. Średnie stężenie Cu w surowicy krów w pobraniu wyjściowym wynosiło $3,82 \mu\text{M/L}$ i mieściło się w zakresie podanego przez Suttle (18) przedziału stężeń granicznych $3-9 \mu\text{M/L}$, natomiast zawartość Cp w surowicy $28,6 \text{ mg/dL}$. Średnie wartości wskaźnika Ht oraz stężenia Hb, Cu i Cp nie różniły się statystycznie między wybranymi do dalszych badań grupami.

Po upływie 23 dni od podania leków nie obserwowano wyraźnych zmian średnich wartości badanych wskaźników hematologicznych i biochemicznych krwi. Należy wskazać, że paszą objętościową stosowaną w żywieniu krów w tym okresie było nadal pastwisko.

Zakończenie wypasu pastwiskowego i wprowadzenie do dawki pokarmowej kiszonek oraz zastosowanie lizawek zawierających sole miedzi wpłynęło na statystycznie istotny wzrost stężeń Cu i Cp w surowicy oraz wskaźnika Ht i Hb w próbkach krwi krów we wszystkich grupach niezależnie od uprzednio zastosowanego leczenia. Na podstawie zmian stężeń Cu i Cp oraz wyraźnego wzrostu wartości badanych wskaźników hematologicznych uznano, że przyczyną postępującego w stadzie spadku kon-

dycji krów była przewlekła hypokuproza. Jak wynika z danych piśmiennictwa pasze (zielonki i siano) wyprodukowane na glebach torfowych charakteryzuje niska zawartość kobaltu i miedzi przy prawidłowej zawartości molibdenu i żelaza (2, 3, 23). Uznano zatem, że stwierdzona hypokupremia miała charakter pierwotny.

W tab. 2 przedstawiono średnie wartości wybranych wskaźników metabolizmu żelaza u krów w okresie hypokupremii oraz po zmianie żywienia i wprowadzeniu lizawek z mikroelementami. Istotne różnice między porównywanymi okresami żywieniowymi dotyczyły stężeń Fe, UZWŻ i WWTf.

Analizę korelacji między badanymi wskaźnikami hematologicznymi i biochemicznymi w próbkach pochodzących z pobrania wyjściowego oraz po zmianie żywienia przedstawiono w tab. 3. Dowodzi ona istotnego związku między stężeniem Cu i zawartością Cp w surowicy a wartościami wskaźnika Ht i stężem Hb, potwierdzając trafność rozpoznania. Badania wykazały, że spadkowi stężeń Cu i zawartości Cp towarzyszył wzrost stężeń Fe i WWTf, jak również zmniejszenie UZWŻ. Podobną korelację obserwowano między badanymi wskaźnikami

Tab. 3. Korelacje między badanymi wskaźnikami hematologicznymi i biochemicznymi surowicy krów (n=54)

Wskaźnik	Cu	Cp	Hb	Ht	SSH	Fe	CZWŻ	UZWŻ
Cp	0,9432 ³	-	-	-	-	-	-	-
Hb	0,7730 ³	0,7557 ³	-	-	-	-	-	-
Ht	0,6985 ³	0,6867 ³	0,8090 ³	-	-	-	-	-
SSH	-0,0269	0,2301	0,1568	-0,4432 ³	-	-	-	-
Fe	-0,4976 ³	-0,4484 ³	-0,2095	-0,2926 ¹	0,2308	-	-	-
CZWŻ	-0,1488	-0,0837	0,1059	-0,0129	0,1870	0,4614 ³	-	-
UZWŻ	0,3523 ³	0,3647 ³	0,3062 ¹	0,2771 ¹	-0,0529	-0,5560 ³	0,4809 ³	-
WWTf	-0,3950 ³	-0,3887 ³	-0,3171 ²	-0,3221 ²	0,1119	0,7343 ³	-0,0757	-0,7966 ³

Objaśnienia: ¹ – $p < 0,05$, ² – $p < 0,02$, ³ – $p < 0,01$; – analizie korelacji poddano próbki pochodzące z pobrania w okresie pastwiskowym (15.09.1996) oraz po przejściu na żywienie kiszonkami i dodatkami mineralnymi w postaci lizawek (28.11.1996)

Tab. 4. Bezwzględna liczba leukocytów (tys./ μ l) u krów z hypokupremią w zależności od rodzaju żywienia (n=27)

Rodzaj krwinek	Okres pastwiskowy (bez dodatku mikroelementów)	Okres żywienia kisonkami (mikroelementy w lizawkach)
Leukocyty	6,9 $\pm$ 1,8	7,5 $\pm$ 1,7
Bazofile	nie stwierdzono	nie stwierdzono
Eozynofile	0,34 $\pm$ 0,43	0,55 $\pm$ 0,29
Neutrofile z jądrem palcz.	0,09 $\pm$ 0,12	0,07 $\pm$ 0,09
Neutrofile z jądrem segment.	2,47 $\pm$ 1,39	2,40 $\pm$ 0,88
Limfocyty	3,92 $\pm$ 1,18	3,76 $\pm$ 1,02
Monocyty	0,06 $\pm$ 0,09	0,14 $\pm$ 0,16

metabolizmu Fe i wskaźnikiem Ht oraz stężeniem Hb. Przedstawione zależności potwierdzają, że hypokupremia uzależnia zewnątrzkomórkowy metabolizm żelaza, wskazując raczej na mobilizację transportu żelaza. Wniosek ten pozostaje w sprzeczności z hipotezą niedokrwistości w hypokuprozie zakładającej niską aktywność ferroooksydazową Cp. Wątpliwość stawia tę hipotezę fakt, że aktywność Cp w osoczu nie jest zależna od jonów Cu²⁺ i przypuszczalnie enzym może zachowywać swoją aktywność w hypokupremii (15). Goodman i Dallman (8) wskazują, że niedoborowi miedzi towarzyszy zwiększona zawartość Fe w erytroblastach. Sugeruje to, że w patogenezie niedokrwistości w niedoborze Cu większą rolę należy przypisać zaburzeniom wewnątrzkomórkowego metabolizmu Fe niż zaburzeniom w transporcie zewnątrzkomórkowym (21).

Interesujące wydają się również obserwacje własne wskazujące na ujemną korelację między wskaźnikiem Ht i SSH. Badania Suttle i wsp. (19) wskazały, że u jagniąt z niedoborem Cu i Se obok obniżonej aktywności Cu-zależnej dysmutazy nadtlencowej i peroksydazy glutationowej (GSH-Px) obserwuje się obecność ciałek Heinza w erytrocytach, będących nieodwracalnie zdenaturowanymi agregatami hemoglobiny. Ponieważ pojawienie się ich w krwinkach poprzedza hemolizę erytrocytów wskazuje się, że niedokrwistość w niedoborze miedzi może być generowana procesem hemolitycznym. Hypokuproza prowadzi również do zmian ilościowych we frakcji lipidowej błon erytrocytarnych, co może być powodem wzrostu ich podatności na uszkodzenia spowodowane działaniem czynników mechanicznych *in vivo* i *in vitro*. W badaniach własnych nie obserwowano jednak wyraźnej hemolizy w próbkach surowic po odwirowaniu.

Wskazuje się również, że zaburzenia metabolizmu żelaza mogą występować wtórnie, w następstwie

przewlekłych stanów zapalnych towarzyszących hypokuprozie (5, 6). Jak wynika z danych tab. 4 u badanych krów nie obserwowano istotnych odchyleń od normy w zakresie całkowitej liczby leukocytów oraz bezwzględnej liczby poszczególnych frakcji leukocytów. Obserwowane w infekcji zmiany metabolizmu żelaza obejmują obniżenie jego stężeń w surowicy oraz obniżenie wskaźnika wysycenia transferyny żelazem (20). W badaniach własnych kierunek zmian wymienionych wskaźników był przeciwny, co wskazuje, że opisany mechanizm nie miał istotnego znaczenia w indukowaniu zaburzeń metabolizmu żelaza.

Podsumowanie

Na podstawie braku efektów zróżnicowanego leczenia krów w okresie pastwiskowym oraz wzrostu wartości wskaźnika Ht, stężeń Hb, Cu i Cp po przejściu na okres żywienia kisonkami z uzupełniającym dodatkiem mikroelementów w postaci lizawek uznano, że przyczyną obserwowanego zespołu objawów chorobowych była przewlekła hypokuproza. Pomimo niskiej zawartości Cp w surowicy krów z hypokupremią, zmiany stężeń Fe, UZWŻ i WWTf wskazały na mobilizację transportu żelaza.

Piśmiennictwo

1. Andrewartha K. A., Caple I. W.: Res. Vet. Sci. 28, 101, 1980.
2. Domański E., Dobrowolska D., Glińska A., Stodolak J.: Pol. Arch. Wet. 15, 125, 1972.
3. Domański E., Młyńska M., Gliszczyński J., Stodolak J.: Pol. Arch. Wet. 9, 719, 1966.
4. Evans G. W.: Physiol. Rev. 53, 537, 1973.
5. Feldman B. F., Kaneko J. J., Farver T. B.: Am. J. Vet. Res. 42, 586, 1981.
6. Feldman B. F., Keen C. L., Kaneko J. J. i wsp.: Am. J. Vet. Res. 42, 1114, 1981.
7. Gallagher C. H.: Biochemical and pathological effects of copper deficiency, w: J. O. Nriaga: Copper in the environment, cz. 2: Health effects. John Wiley i Sons, New York 1979, s. 57.
8. Goodman J. R., Dallman P. R.: Blood 34, 747, 1969.
9. Gooneratne S. R., Buckley W. T., Christensen D. A.: Can. J. Anim. Sci. 69, 819, 1989.
10. Houchin O. B.: Clin. Chem. 4, 519, 1958.
11. Graham T. W.: Food. Anim. Proc. 7, 153, 1991.
12. Jain K. J., Williams D. M.: Am. J. Clin. Nutr. 48, 637, 1988.
13. Johnson W. T., Kramer T. R.: J. Nutr. 117, 1085, 1987.
14. Prohaska J. R.: Nutr. Res. 1, 159, 1981.
15. Prohaska J. R.: J. Nutr. 113, 2148, 1983.
16. Prohaska J. R.: J. Nutr. Biochem. 1, 453, 1990.
17. Rock E., Gueux E., Lab C., Motta C., Rayssiguier Y.: Proc. 8-th Internat. Symp. on Trace Elements in Man and Animals. Verlag Media Touristik, Jena, 1993, s. 595.
18. Suttle N. F.: Vet. Rec. 16, 148, 1986.
19. Suttle N. F., Jones D. G., Woolliams C., Woolliams J. A.: Br. J. Nutr. 58, 539, 1987.
20. Weinberg E. D.: Physiol. Rev. 1, 65, 1984.
21. Williams D. M., Kennedy F. S., Green B. G.: Br. J. Nutr. 53, 131, 1985.
22. Williams D. M., Loukopoulos D., Lee G. G. i wsp.: Blood 48, 77, 1976.
23. Zalewska E., Kłębowska A., Łuczycka M., Domański E.: Pol. Arch. Wet. 9, 119, 1965.

Adres autora: dr Marek Gehrke, ul. gen. L. Okulickiego 1/17, 85-799 Bydgoszcz