

Wpływ nadmiernej podaży siarki na metabolizm miedzi i potencjał antyoksydacyjny u młodego bydła z objawami zapalenia dróg oddechowych i przewodu pokarmowego

JAROSŁAW WIECZOREK

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Wieczorek J.

The effect of excessive supplementation of sulfur on copper metabolism and antioxidant status in young cattle with symptoms of mucosa inflammation

Summary

This study was conducted to determine the effect of excessive sulfur on copper metabolism and antioxidant status in young cattle with symptoms of mucosa inflammation. Eight calves were divided into four groups and administered mineral supplements over 35 days: A(S) – elementary sulfur 0.15 g/kg body weight, B(Cu) – copper 0.35 mg/kg body weight, C(S + Cu) – sulfur and copper as in the preceding groups and K was the control. There were two stages. The first took 4 weeks during which feed and mineral supplements were served normally; the second was in the last week of this study and feed was reduced to 40% energy and protein content (half hungry period).

The results indicate that mucosa inflammation with feeding reduction can bring about a copper deficit, while an excessive supplement of sulfur did not significantly affect the progress of this deficit or antioxidant status.

Keywords: calves, sulfur, copper, mucosa inflammation

Zaburzenia metabolizmu miedzi i zmiany w aktywności enzymów miedziowych zależne od siarki mogą ulegać nasileniu lub znacznej modyfikacji w stanach zapalnych (5,6,18). Szczególną rolę przypisuje się miedziozależnej ceruloplazminie, będącej jednym z czynników białek ostrej fazy. Na odpowiedź ostrej fazy składa się seria specyficznych reakcji fizjologicznych w następstwie uszkodzenia tkanek. W wyniku zranienia, urazu czy infekcji organizm usiłuje zapobiec dalszemu uszkodzeniu przez izolację chorobowo zmienionych miejsc, aktywację procesów naprawy i przywrócenie normalnej funkcji. Ten kumulatywny homeostatyczny proces jest znany jako zapalenie, a te wczesne natychmiastowe reakcje są nazywane odpowiedzią ostrej fazy. Poziom ceruloplazminy i innych białek ostrej fazy: m.in. fibrynogenu, haptoglobiny, α_1 -antytrypsyny czy seromukoidu jest podwyższony np. w procesach nowotworowych (20) i reumatoidalnych u ludzi (6), *mastitis* u krów (4), stanach zapalnych wywołanych dożylnym podaniem terpentyny (5) i niedokrwistościach (17).

Ceruloplazmina jest około sześciokrotnie czulszym wskaźnikiem procesów zapalnych niż konwencjonalnie stosowane metody, jak liczba leukocytów czy poziom fibrynogenu. Na tej podstawie proponuje się wykorzystanie stężenia ceruloplazminy przy diagnozowaniu stanów zapalnych (14).

Stany zapalne, szczególnie w warunkach zaburzeń przemiany miedzi powodowanych siarką sprzyjają

powstawaniu i mogą wyzwać stres oksydacyjny (2). Wynikiem wzmożonego narażenia komórek na rodniki tlenowe jest obniżenie ATP, stężenia glutationu w komórkach, opóźnienie regeneracji uszkodzonych białek, a przede wszystkim zwiększenie peroksydacji lipidów (11). Temu procesowi sprzyja wysoki poziom wolnych jonów miedzi i żelaza (9, 15), a odpowiedzialnymi za jego tempo uważa się ceruloplazminę i dysmutazę ponadtlenkową (7). Stres oksydacyjny wiąże się m.in. z wyczerpaniem rezerw enzymów głównie ceruloplazminy, dysmutazy ponadtlenkowej, które hamują lawinowe powstawanie wolnych rodników, głównie rodnika hydroksylowego, przez utrzymywanie miedzi i żelaza na drugim i trzecim stopniu utlenienia.

Wyczerpanie rezerw antyoksydacyjnych nasila się szczególnie w procesach fagocytozy drobnoustrojów przez neutrofile i makrofagi. Dochodzi wówczas do powstawania dużej ilości reaktywnych form tlenu doprowadzając z czasem do stresu oksydacyjnego i upośledzenia funkcji leukocytów (3, 16, 19). Będąc w stanie spoczynku leukocyty zużywają niewielką ilość tlenu (10). Natomiast komórki fagocytykujące reagują na bodźce chemiczne lub cząsteczki fagocytywane kilkudziesięciokrotnym wzrostem zużycia tlenu.

Interesujące wydają się także zmiany metabolizmu miedzi w warunkach stresu żywieniowego, który wzmacnia lipolizę i peroksydację lipidów.

Celem przeprowadzonych badań było określenie jednoczesnego wpływu nadmiernej podaży siarki, sta-

nu zapalnego błon śluzowych i stresu żywieniowego na przemiany miedzi i potencjał oksydacyjny młodego bydła.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono łącznie na 8 młodych buhajkach o masie 235-350 kg z objawami zakaźnego zapalenia dróg oddechowych i przewodu pokarmowego charakterystycznymi dla wirusowej biegunki i choroby błon śluzowych. Wybrano zwierzęta, które jeszcze nie wykazywały wyraźnych objawów klinicznych poza sporadycznym kaszlem, a objawy choroby rozwinęły się w trakcie doświadczenia. W trakcie badań zwierzęta przebywały pojedynczo w boksach, a żywienie było ogólnie zbilansowane pod względem zawartości suchej masy, energii, białka i zgodnie z zalecanymi normami.

Zwierzęta były podzielone na 4 grupy, po 2 w każdej [A(S), B(Cu), C(S + Cu) i K]

W grupach zastosowano następujące dodatki mineralne:

A(S) – otrzymywała dodatek siarki elementarnej w ilości 0,15 g/kg m.c.,

B(Cu) – dodatek miedzi w dawce 0,35 mg/kg m.c. w postaci uwodnionego siarczanu miedzi,

C(S + Cu) – dodatek siarki i miedzi w takiej samej ilości jak podgrupy poprzednie,

K – stanowiła kontrolę zwierząt chorych.

Podaż dodatków mineralnych, układ doświadczenia i metody badań były identyczne jak we wcześniejszej pracy na zwierzętach zdrowych (18).

Wyniki i omówienie

Najbardziej przekonywujący na przemianę miedzi był wpływ procesu chorobowego. We wszystkich grupach stężenie miedzi w surowicy spadło znacznie między 14 a 21 dniem, wraz z ustępowaniem objawów choroby i poprawą stanu klinicznego zwierząt. Stężenie pierwiastka w surowicy uległo dodatkowemu pogłębieniu do granic niedoborowych po diecie półgłodowej. Stężenie miedzi u zwierząt chorych było niższe w porównaniu ze zdrowymi, u których podobne badania wykonano wcześniej (18) Różnice te zaznaczają się szczególnie w ostatnich trzech tygodniach doświadczenia, choć i u zdrowych widoczny był spadek stężenia miedzi w okresie stresu głodowego. Również w porównaniu ze zdrowymi (18) niższa była zawartość miedzi w narządach wewnętrznych, przede wszystkim wątrobie i nerkach.

We wszystkich grupach nastąpił znaczny wzrost aktywności ceruloplazminy już 3 dnia i wysokie stę-

Tab. 1. Zmiany stężenia miedzi ($\mu\text{mol/l}$) w surowicy chorych buhajków po podaży siarki i miedzi ($n = 2$; $\bar{x} \pm s$)

Podgrupa	Dzień doświadczenia						
	0	3	7	14	21	28	35
A (S)	17,94 \pm 1,61	17,43 \pm 1,88	16,80 \pm 1,90	16,52 \pm 2,17	15,47 \pm 2,46	15,52 \pm 3,24	12,25 \pm 1,33
B (Cu)	17,73 \pm 2,26	17,03 \pm 0,78	19,41 \pm 1,87	18,68 \pm 0,67	15,45 \pm 0,98	15,31 \pm 0,44	13,55 \pm 0,73
C (S + Cu)	20,28 \pm 0,33	20,10 \pm 0,22	18,76 \pm 0,56	19,70 \pm 1,67	14,29 \pm 2,22	14,29 \pm 1,78	12,48 \pm 1,00
K	21,37 \pm 1,07	19,39 \pm 2,11	20,02 \pm 0,11	19,08 \pm 1,67	13,74 \pm 0,56	13,97 \pm 0,22	12,25 \pm 1,33

Tab. 2. Zawartość miedzi ($\mu\text{g/g}$) w narządach wewnętrznych buhajków chorych po 35 dniowej podaży siarki i miedzi ($n = 2$; $\bar{x} \pm s$)

Grupa	Narządy wewnętrzne			
	wątroba	nerka	mózg	mięsień
A (S)	114,00 \pm 5,66	18,39 \pm 3,49	5,50 \pm 2,12	6,50 \pm 2,12
B (Cu)	136,00 \pm 12,73	19,54 \pm 2,26	7,50 \pm 0,71	6,50 \pm 0,71
C (S + Cu)	142,00 \pm 9,90	19,00 \pm 4,47	6,50 \pm 2,12	6,00 \pm 1,41
K	96,00 \pm 9,90	18,38 \pm 1,81	5,90 \pm 7,21	6,00 \pm 1,41

Tab. 3. Zmiany stężenia ceruloplazminy ($\mu\text{mol/l}$) w surowicy chorych buhajków po podaży siarki i miedzi ($n = 2$; $\bar{x} \pm s$)

Grupa	Dzień doświadczenia						
	0	3	7	14	21	28	35
A (S)	23,61 \pm 1,84	27,64 \pm 0,50	24,91 \pm 1,39	27,75 \pm 2,53	25,99 \pm 3,44	25,15 \pm 3,17	20,74 \pm 3,81
B (Cu)	25,50 \pm 2,22	36,15 \pm 2,39	34,99 \pm 1,55	37,71 \pm 1,05	38,42 \pm 0,74	33,80 \pm 1,24	28,53 \pm 1,80
C (S + Cu)	29,06 \pm 2,18	31,07 \pm 3,87	27,16 \pm 3,11	32,50 \pm 0,67	29,65 \pm 3,35	23,13 \pm 1,17	21,59 \pm 1,34
K	28,06 \pm 1,07	32,85 \pm 2,52	30,24 \pm 3,18	33,19 \pm 1,36	29,89 \pm 2,34	26,57 \pm 2,35	22,78 \pm 2,34

Tab. 4. Zmiany aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (U/ml) w hemolizacie erytrocytów po podaży siarki i miedzi ($n = 2$; $\bar{x} \pm s$)

Grupa	Dzień doświadczenia				
	0	3	14	28	35
A (S)	61,66 \pm 6,01	83,07 \pm 5,41	44,17 \pm 7,41	67,89 \pm 3,94	57,35 \pm 5,08
B (Cu)	74,13 \pm 7,23	82,08 \pm 4,01	49,19 \pm 2,31	75,05 \pm 4,29	74,13 \pm 3,69
C (S + Cu)	71,16 \pm 5,30	70,86 \pm 5,71	52,99 \pm 2,60	77,96 \pm 5,56	65,91 \pm 4,24
K	72,58 \pm 5,18	77,63 \pm 7,57	38,70 \pm 3,48	64,57 \pm 3,47	53,29 \pm 2,16

Tab. 5. Zmiany wartości całkowitej zdolności antyoksydacyjnej osocza (mmol/l) buhajków chorych po podaży siarki i miedzi ($n = 2$; $\bar{x} \pm s$)

Grupa	Dzień doświadczenia				
	0	3	14	28	35
A (S)	0,80 \pm 0,10	0,50 \pm 0,03	0,44 \pm 0,01	0,55 \pm 0,04	0,41 \pm 0,06
B (Cu)	0,93 \pm 0,10	0,58 \pm 0,06	0,49 \pm 0,08	0,62 \pm 0,08	0,53 \pm 0,08
C (S + Cu)	0,88 \pm 0,06	0,65 \pm 0,05	0,50 \pm 0,04	0,70 \pm 0,01	0,47 \pm 0,02
K	0,94 \pm 0,06	0,72 \pm 0,06	0,58 \pm 0,03	0,70 \pm 0,03	0,55 \pm 0,07

żenie enzymu utrzymywało się do 14 lub 28 dnia. Następnie pojawiła się wyraźna tendencja spadkowa, aż do końca doświadczenia. Powszechnie uważa się, że ceruloplazmina jest czułym wskaźnikiem procesów zapalnych, a równocześnie wyraża nasilenie reakcji adaptacyjnych i obronnych organizmu. Wzrost aktyw-

ności enzymu pojawia się bezpośrednio po zadziałaniu czynnika zapalnego. Potwierdzają to wyniki własne, a także innych autorów. Wykazano m.in. znaczny wzrost aktywności już po 2 godzinach przy urazowym zapaleniu u szczurów (6) i wysoki wzrost (średnio o 100%) 3 dnia u bydła po iniekcji terpentyny (5). Wykazano także wzrost poziomu ceruloplazminy przy jednoczesnym spadku miedzi w warunkach eksperymentalnego zakażenia cieląt wirusem HBV-1. W badaniach własnych aktywność ceruloplazminy była umiarkowanie wysoka we wszystkich podgrupach, najwyższa w podgrupie B(Cu). Sugeruje to, że dodatek miedzi wzmacnia aktywność jednego z najważniejszych czynników ostrej fazy, jakim jest ceruloplazmina. Wysoka aktywność ceruloplazminy przy równoczesnym spadku stężenia miedzi spowodowała wzrost stosunku enzymu do pierwiastka. W badaniach własnych stosunek ten w 21 dniu doświadczenia czyli w końcowej fazie choroby wynosił 2,04 podczas gdy u zwierząt zdrowych tylko 1,08 (18). Wyższa wartość tego stosunku sugeruje wzrost puli miedzi biologicznie czynnej.

W dostępnym piśmiennictwie mało jest danych na temat zmian metabolizmu miedzi w warunkach różnego rodzaju stresów w tym adaptacyjnego, żywieniowego oraz chorobowego i jeszcze dodatkowo skojarzonych z nadmierną podażą siarki. W ciągu trzydniowego stresu głodowego stwierdzono początkowo niewielki spadek, a następnie wzrost poziomu miedzi w plazmie odpowiednio z 0,62 do 0,60 i 0,77 ppm (13). Cytowana praca ze względu na inne warunki doświadczenia, przede wszystkim krótszy okres stresu ma ograniczoną wartość porównawczą. Niemniej jej autorzy zwracają uwagę na rolę mechanizmów adaptacyjnych i odpowiedzi ostrej fazy jako czynników mogących zmniejszać negatywny wpływ stresu. Sugerują, że możliwe jest stresopochodne zmniejszenie wchłaniania miedzi z przewodu pokarmowego, czego następstwem był spadek jej stężenia w surowicy.

Czynniki stresujące w formie infekcji, adaptacji do nowych warunków i znacznego ograniczenia podaży paszy miały także istotny wpływ na wskaźniki układu antyoksydacyjnego. Teoretycznie każdy z tych czynników może stymulować powstawanie wolnych rodników, a nawet doprowadzać do stresu oksydacyjnego i obniżenia wydolności antyoksydacyjnej (10, 12). Wyniki badań własnych w dużym stopniu potwierdzają ten pogląd.

Duży wpływ na większość wskaźników stanu antyoksydacyjnego miał proces chorobowy. W okresie nasilenia objawów chorobowych tj. w pierwszych 14 dniach całkowita zdolność antyoksydacyjna i aktywność dysmutazy ponadtlenkowej spadły do niskich wartości. Wraz z powrotem zwierząt do zdrowia zaznacza się wzrost omawianych parametrów, w przypadku dysmutazy ponadtlenkowej prawie do poziomu zbliżonego w początkowym dniu doświadczenia. Sugeruje to zmniejszenie potencjału antyoksydacyjnego w chorobie, prawdopodobnie w następstwie zwiększo-

nego wytwarzania wolnych rodników, m.in. wskutek wzmocnienia procesu fagocytozy. Wzrost wolnych rodników podczas fagocytozy jest warunkiem jej skuteczności szczególnie w odniesieniu do bakterii (8).

Wnioski

1. Proces chorobowy w postaci zapalenia błon śluzowych i połączony z ograniczeniem podaży paszy może łatwo doprowadzić do zubożenia organizmu w miedź i zmniejszenia potencjału antyoksydacyjnego

2. Nadmierna podaż siarki nie zwiększa istotnie rozmiarów tego deficytu i nie ogranicza wydolności antyoksydacyjnej ustroju

Piśmiennictwo

1. *Arthington J.D., Corah L.R., Blecha F.*: The effect of molybdenum – induced copper deficiency on acute – phase protein concentrations, superoxide dismutase activity, leukocyte numbers, and lymphocyte proliferation in beef heifers inoculated with bovine herpesvirus – 1. *J. Anim. Sci.* 1996, 74, 211-217.
2. *Bartosz G.*: Druga twarz tlenu. PWN Warszawa 1995.
3. *Broniek S., Grzybowski G.*: Metabolizm ceruloplazminy i jej biologiczna rola w utrzymaniu homeostazy organizmu. *Post. Biol. Kom.* 1988, 15, 23-40.
4. *Conner J.G., Eckersall P.D., Doherty M., Douglas T.A.*: Acute phase response and mastitis in the cow. *Res. Vet. Sci.* 1986, 41, 126-128.
5. *Conner J.G., Eckersall P.D., Aitchison T.C., Douglas T.A.*: Bovine acute phase response following turpentine injection. *Res. Vet. Sci.* 1988, 44, 82-88.
6. *Denko C.W.*: Protective role of ceruloplasmin in inflammation. *Agents Act.* 1979, 9, 333-335.
7. *Gleed P.T., Allen W.M., Mallinson C.B., Rowlands G.J., Sansom B.F., Vagg J., Caswell R.D.*: Effects of selenium and copper supplementation on the growth of beef steers. *Vet. Rec.* 1983, 113, 388-392.
8. *Gonet B.*: Wolne rodniki w zdrowiu i chorobie. *Pol. Przeg. Radiol.* 1993, 57, 165-168.
9. *Karten B., Beisiegel U., Gercken G., Kontush A.*: Mechanism of lipid peroxidation in human blood plasma: a kinetic approach. *Chem. Phys. Lipids* 1997, 88, 83-96.
10. *Kleczkowski M., Kluciński W., Sitarska E., Sikora J.*: Stres oksydacyjny i wybrane wskaźniki stanu antyoksydacyjnego zwierząt. *Medycyna Wet.* 1998, 54, 166-171.
11. *Kontush A., Finckh B., Karten B., Kohlschütter A., Beisiegel U.*: Antioxidant and prooxidant activity of α -tokoferol in human plasma and low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 1996, 37, 14361-448.
12. *Kwiatkowski J.M.*: Dysmutaza ponadtlenkowa – struktura, funkcja i filogeneza. *Post. Biochem.* 1988, 34, 311-333.
13. *Nockles C.F., DeBonis J., Torrent J.*: Stress induction affects copper and zinc balance in calves fed organic and inorganic copper and zinc sources. *J. Anim. Sci.*, 1993 71, 2539-2545.
14. *Solter P.F., Hoffman W.E., Hungerford L.L., Siegel J.P., Denis S.H.S., Domer J.L.*: Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. *Am. Vet. Res.* 1991, 52, 1738-1742.
15. *Spranger T., Finckh B., Fingerhut R., Kohlschütter A., Beisiegel U., Kontush A.*: How different constituents of human plasma and low density lipoprotein determine plasma oxidizability by copper. *Chem. Phys. Lipids* 1998, 91, 39-52.
16. *Suttle N.F., Jones D.G.*: Copper and disease resistance in sheep: a rare natural confirmation of interaction between a specific nutrient and infection. *Proc. Nutr. Soc.* 1986., 45, 317-325.
17. *Szela S.*: Czynniki „ostrej fazy” w niedokrwistościach. *Acta Haemat. Pol.* 1991, 22, 303-308.
18. *Wieczorek J.*: Wpływ nadmiernej podaży siarki na przemianę miedzi i potencjał antyoksydacyjny u młodego bydła. *Medycyna Wet.* 2002 (w druku).
19. *Xin Z., Waterman D.F., Hemken R.W., Harmon R.J.*: Effects of copper status on neutrophil function, superoxide dismutase and copper distribution in steers. *J. Dairy Sci.* 1991, 74, 3078-3085.
20. *Yenisey C., Fadiloğlu M., Önvural B.*: Serum copper and ceruloplasmin concentration in patients with primary breast cancer. *Bioch. Soc. Trans.* 1996, 24, 321.