

FIZJOLOGIA ZWIERZĄT

JAN KOPER, RYSZARD ZAMORSKI

Stężenie cynku i magnezu oraz aktywność fosfatazy alkalicznej we krwi owiec z ferm hodowlanych regionu kujawsko-pomorskiego *)

Pracownia Biochemii Wydziału Rolniczego AT-R, ul. Bernardyńska 6-8, 85-029 Bydgoszcz

Summary

Concentration of zinc and magnesium, and alkaline phosphatase activity in blood of sheep from farms of the Cuiavian-Pomeranian region

The concentrations of zinc and magnesium were assayed by atom absorption spectrophotometry in whole blood and plasma of 85 ewes and their lambs from 9 farms. Alkaline phosphatase activity was also measured in plasma by the Bessey method. The concentrations of zinc and magnesium were at physiological limits. Blood of lambs contained usually a higher concentration of zinc and magnesium than was found in ewes. Similar relationship was less frequent for the blood plasma. The activity of alkaline phosphatase in blood plasma of lambs ranged from 1286 to 2649 U/L and was markedly higher than the values measured in the ewes plasma (155-1103 U/L). A positive correlation was found between the concentrations of zinc and magnesium in a whole blood and plasma of mothers and their lambs. No positive relationship was demonstrated between the enzyme activity and zinc and magnesium content in the blood plasma.

Dla prawidłowego funkcjonowania komórek i tkanek zwierząt niezbędny jest odpowiedni poziom w płynie zewnątrzkomórkowym mikro- i makroskładników, wśród których szczególną rolę spełniają cynk i magnez. Cynk jest składnikiem wielu białek i enzymów. Jego niedobór wywołuje szereg chorób zwierząt gospodarskich. U owiec stan ten charakteryzuje się wypadaniem i pogorszeniem się jakości wełny oraz powoduje zmiany skórne. Niedobór cynku u jagniąt przejawia się zahamowaniem wzrostu, a u trzyczek nieprawidłowym rozwojem jąder i brakiem spermatogenezy (11). Niedobór cynku prowadzi do obniżenia odporności zwierząt, a tym samym do wzrostu zagrożenia czynnikami chorobowymi (1).

Również magnez uczestniczy w prawidłowym funkcjonowaniu systemu odpornościowego w syntezie rybosomów i aktywowaniu niektórych witamin, szczególnie z grupy B i D₃ (2). Na absorpcję magnezu duży wpływ ma odpowiednie stężenie mikroelementów, w tym cynku (3) oraz innych nieorganicznych składników (13).

Zarówno cynk, jak i magnez należą do tych pierwiastków, które wpływają na aktywność szeregu enzymów, w tym i alkalicznej fosfatazy, biorących udział w regulacji wielu funkcji metabolicznych.

Celem badań było określenie stężenia cynku i magnezu we krwi pełnej, osoczu krwi oraz ocena aktywności fosfatazy alkalicznej osocza u owiec. Z przeprowadzonego przeglądu piśmiennictwa wynika, że w regionie kujawsko-pomorskim nie podejmowano badań nad stężeniami tych biopierwiastków w relacji matka-jagnię w powiązaniu z aktywnością enzymu.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 85 owcach-matkach i ich jagniętach, z 9 owczarni położonych w okolicy Bydgoszczy, na przełomie lat 1986-1987 (październik-kwiecień). Krew od matek i jagniąt pobierano z żyły szyjnej do probówek z heparyną w czasie od 2 do 4 tygodni po wykocie.

W okresie badań owce otrzymywały paszę pochodzenia lokalnego w postaci siana, owsa, sushu oraz kiszzonek. Maciorkom i owcom po wykocie podawano okresowo pasze treściwe. Z przeprowadzonej analizy tych pasz wynikało, że są one mało zasobne w cynk i magnez. Potwierdziło to powszechnie panującą opinię, że zarówno gleby, jak i pasze z obszaru Doliny Nadnoteckiej są ubogie w magnez, miedź i cynk (6).

Skarmiane pasze zawierały średnio następujące ilości Zn i Mg: siano (3,61 — 1,45), sush (38,5 — 1,64), owies (30,2 — 0,91), kiszzonka (83,6 — 3,51), pasze treściwe (133,0 — 2,52). Pierwsza wartość w nawiasie dotyczy cynku i jest wyrażona w µg/g s.m., druga natomiast odnosi się do magnezu i wyrażono ją w mg/g s.m.

Stężenie cynku i magnezu we krwi pełnej i osoczu oznaczono metodą ASA przy użyciu spektrometru PYE Unicam typu SP-2900, po uprzedniej mineralizacji prób w mieszaninie kwasów. Błąd metody i odzysk wynosił odpowiednio dla cynku 4,6% i 94% oraz dla magnezu 2,5% i 97%.

Aktywność fosfatazy alkalicznej oznaczono za pomocą aparatu firmy Beckman wg metody Bessey'a i wsp. (4), używając p-nitrofenylofosforanu jako substratu. Za jednostkę aktywności przyjęto taką ilość enzymu zawartą w 1 litrze osocza, która w ciągu 1 minuty, w temp. 28°C uwalnia 1 µmol p-nitrofenolu.

Wyniki poddano analizie statystycznej wg testu-t. Studenta.

Wyniki i omówienie

Wartości stężenia cynku w pełnej krwi matek i jagniąt (tab. 1) wykazywały duże zróżnicowanie w poszczególnych stadach. Należy w tym miejscu dodać, że wartości hematokrytowe u wszystkich owiec w badanych stadach mieściły się w wąskim przedziale 35—37%. Najniższą ilość cynku stwierdzono u owiec z fermy Strzelewo — średnio 2,72 µg/cm³, a najwyższą — 4,60 µg/cm³ z fermy Kołaczkowo. W siedmiu badanych fermach stwierdzono nieco niższą ilość cynku w pełnej krwi dla badanych jagniąt, w porównaniu z jego ilością we krwi matek. Zawartość cynku we krwi pełnej owiec z owczarni w Kołaczkowie była istotnie wyższa niż w większości badanych ferm, z wyjątkiem krwi owiec z Chobiolina i Osiecin. W osoczu krwi matek stężenie Zn wahało się w poszczególnych owczarniach od 0,45—1,28 µg/cm³, natomiast u jagniąt od 0,43—1,50 µg/cm³. Istotnie niskie ilości tego mikroskładnika stwierdzono w osoczu krwi owiec matek i jagniąt w fermach Stanisławka i Rycerzewo. W pełnej krwi było niekiedy 3-krotnie więcej cynku niż w osoczu.

Stężenia magnezu we krwi i osoczu owiec z poszczególnych ferm wykazywało nieco mniejsze zróżnicowanie między badanymi stadami w porównaniu do stę-

*) Praca wykonana w ramach tematu CPBR 10.17/IV.

Tab. 1. Wartości średnie ($\bar{x} \pm s$) stężeń cynku i magnezu w pełnej krwi i osoczu zwierząt oraz aktywność fosfatazy alkalicznej w osoczu

Ferma (n)	Zn $\mu\text{g}/\text{cm}^3$				Mg $\mu\text{g}/\text{cm}^3$				Fosfataza alkaliczna U/l	
	pełna krew		osocze		pełna krew		osocze		matka	jagnię
	matka	jagnię	matka	jagnię	matka	jagnię	matka	jagnię		
Chobielin (10)	4,33	3,75	1,27	0,99	30,59	29,27	20,21	20,47	155	2649
	1,03	0,80	0,23	0,24	2,69	2,39	1,15	1,84	28	624
Kaczkowo (10)	3,36	3,40	1,20	1,24	27,38	27,20	19,50	19,24	519	1033
	0,56	0,44	0,46	0,39	1,40	0,87	1,48	1,26	284	274
Kołaczkowo (9)	4,60	3,83	1,22	0,99	30,91	30,42	21,02	21,79	—	—
	1,12	0,99	0,48	0,27	2,48	1,20	1,55	1,79	—	—
Osiećciny (10)	4,30	4,15	1,25	1,45	25,90	26,08	18,99	18,34	329	1091
	0,60	0,50	0,40	0,27	1,50	1,30	1,43	1,17	106	391
Rycerzewo (10)	4,05	3,95	0,60	0,80	27,81	27,96	18,03	18,77	555	—
	0,50	0,76	0,20	0,17	0,66	0,83	0,84	1,12	236	—
Samokłęski (10)	3,57	3,33	1,06	0,83	35,46	30,97	20,02	19,73	273	2444
	0,57	0,41	0,17	0,20	3,40	3,21	0,91	1,32	85	1282
Słupowa (10)	3,80	3,78	1,28	1,50	26,17	26,83	19,11	19,42	544	—
	0,51	0,58	0,47	0,39	1,77	0,74	0,72	0,90	45	—
Stanisławka (6)	2,92	3,00	0,45	0,43	23,90	23,70	17,28	16,80	1103	1286
	0,34	0,41	0,25	0,09	0,49	0,56	0,55	0,43	364	579
Strzelewo (10)	2,72	2,70	0,81	0,78	32,10	32,83	21,42	21,84	225	2026
	0,62	0,61	0,08	0,14	2,02	3,43	1,30	1,75	207	407

Tab. 2. Współczynniki korelacji (r)

Ferma (n)	Zn				Mg			
	pełna krew matka: jagnię	osocze matka: jagnię	pełna krew : osocze		pełna krew matka: jagnię	osocze matka: jagnię	pełna krew : osocze	
			matka	jagnię			matka	jagnię
Chobielin (10)	0,481	0,084	0,197	0,041	0,694 ^b	0,471	0,159	0,532 ^a
Kaczkowo (10)	0,801 ^d	0,570 ^b	0,031	0,582 ^b	0,282	0,088	0,238	-0,027
Kołaczkowo (9)	0,030	0,028	0,936 ^e	0,874 ^d	0,654 ^b	0,366	0,435	0,537 ^a
Osiećciny (10)	0,514 ^a	-0,115	-0,207	0,425	0,939 ^e	0,793 ^d	0,717 ^b	0,723 ^b
Rycerzewo (10)	0,567 ^b	0,631 ^c	0,429	0,439	0,428	0,265	-0,300	0,411
Samokłęski (10)	0,751 ^c	-0,152	0,491	0,531 ^a	0,506 ^a	-0,140	0,008	0,026
Słupowa (10)	0,481	0,598 ^b	0,438	0,048	0,311	0,660 ^b	0,515	0,309
Stanisławka (6)	-0,297	0,138	0,142	0,433	0,572 ^a	-0,080	0,429	-0,723 ^b
Strzelewo (10)	0,950 ^e	0,585 ^b	0,380	-0,361	0,645 ^b	0,141	-0,066	0,329

Objaśnienia: istotność różnic przy p: $< a_{0,1}$, $< b_{0,05}$, $< c_{0,02}$, $< d_{0,01}$, $< e_{0,001}$.

zenia cynku. Najniższą zawartość magnezu we krwi i osoczu stwierdzono, podobnie jak dla Zn, u matek i jagniąt z fermy Stanisławka (tab. 1). Niskie stężenie tego pierwiastka stwierdzono również we krwi pełnej u owiec z fermy Słupowa. W pełnej krwi matek występowało zwykle nieznacznie wyższe stężenie magnezu niż w pełnej krwi jagniąt. Najwyższe stężenie magnezu w osoczu stwierdzono u owiec w stadzie ze Strzelewa (średnio 21,42 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ u matek i 21,84 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ u jagniąt). W pięciu fermach stwierdzono nieco podwyższoną ilość tego pierwiastka w osoczu jagniąt w porównaniu z ilością, jaką oznaczono w osoczu matek.

Aktywność fosfatazy wykazywała duże wahania dla poszczególnych owiec (tab. 1). Najniższą jej aktywność stwierdzono u matek z fermy Chobielin (155 U/l), a najwyższą u matek z fermy Stanisławka (1103 U/l). Ciekawym jest, że osocze tych owiec charakteryzowało się najniższą ilością cynku. Osocze jagniąt wykazywało zawsze wyższą aktywność fosfatazy w porównaniu do aktywności osocza matek (tab. 1).

Wyniki analizy statystycznej stężeń cynku i magnezu zestawiono w tab. 2. W większości przypadków stwierdzono dodatnią korelację między stężeniem cynku i magnezu dla układu: pełna krew matki i jagnięcia. Dla czterech ferm uzyskano istotną korelację dodatnią dla stężenia cynku osocza par zwierząt, natomiast dla stężeń magnezu osocza istotną zależność stwierdzono w przypadku par zwierząt z 3 ferm.

W kilku przypadkach stwierdzono istotną zależność pomiędzy stężeniem obu pierwiastków w pełnej krwi i osoczu matek i jagniąt.

W tab. 2 nie zamieszczono wartości współczynników korelacji r dla stężeń Zn i Mg oraz aktywności fosfatazy, ponieważ zdecydowana ich większość miała niskie i nieistotne wartości. Tylko w przypadku osocza owiec matek z fermy Samokłęski, dla zależności — aktywność fosfatazy: stężenie Zn, współczynnik r wyniósł 0,595 przy $p < 0,05$. Również dla zależności stężeń magnezu i aktywności enzymu tylko w jednym przypadku uzyskano wysoką wartość współczynnika korelacji. W osoczach jagniąt z fermy Stanisławka dla tego układu $r = 0,981$, $p < 0,001$.

Z przeglądu piśmiennictwa dotyczącego metabolizmu pierwiastków wynika jasno fakt, że stężenie mikro- i makroskładników we krwi zwierząt jest ściśle skorelowane z ich zawartością w skarmianych paszach. Przeprowadzone badania nad zawartością cynku i magnezu we krwi owiec matek i jagniąt w połączeniu z aktywnością fosfatazy alkalicznej są pierwszymi tego typu opracowaniami dla regionu kujawsko-pomorskiego.

Objawy niedoboru cynku są dość złożone i różnią się znacznie u poszczególnych gatunków zwierząt. Stężenia cynku w pełnej krwi i osoczu badanych owiec były niższe od stwierdzonych we wcześniejszych pracach (9, 10, 12). Niską zawartość cynku w surowicy krwi

owiec, wynoszącą 0,63—0,68 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ wykazał Markiewicz i wsp. (8). Przyjmując za wartość prawidłową stężenie Mg od 20—30 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ osocza (5) wynika, że wartości uzyskane w naszych badaniach znajdują się blisko dolnej granicy stężeń.

Sword i wsp. (12) zauważyli, że nie zawsze zwiększonej podaży cynku towarzyszył wzrost aktywności cynkoenzymu, jakim jest fosfataza alkaliczna. Kirschgesner i wsp. (7) zaobserwowali natomiast, że przy obniżaniu zawartości cynku w osoczu nastąpił spadek aktywności enzymatycznej. White (14) dla szczurów z dietą kontrolną Zn uzyskiwał aktywność fosfatazy alkalicznej rzędu 350—400 U/l. Stosując diety deficytowe cynku zauważył najpierw spadek aktywności enzymatycznej, a pod koniec eksperymentu wzrost aktywności fosfatazy, nawet nieco powyżej wartości wyjściowej, czyli 600 U/l. W przeprowadzonych badaniach uzyskaliśmy 2-krotny wzrost aktywności enzy-

mu w osoczu krwi matek z fermy Stanisławka, które wykazywały najniższą zawartość cynku (tab. 1).

Piśmiennictwo

1. Bednarek D.: *Medycyna Wet.* 42, 92, 1986.
2. Bednarek D.: *Medycyna Wet.* 43, 156, 1987.
3. Bengoa J., Wood R.: *Absorption and melabsorption of Mineral Nutrients.* Alan R. Liss, Inc. New York, 12, 1984, s. 69.
4. Bessey O. A., Lowry O. H., Brock M. J.: *J. biol. Chem.* 164, 321, 1946.
5. Cąkała S.: *Choroby owiec.* PWRiL 1981, s. 520.
6. Jaśkowski J. M.: *Medycyna Wet.* 41, 45, 1985.
7. Kirschgesner M., Rotil H. P., Weigand E.: *Trace Elements.* ed A. S. Prasad, Academic Press, New York, 1, 1976, s. 198.
8. Markiewicz K., Broniecki M., Łuczak Z., Kowalczyk R.: *Medycyna Wet.* 44, 85, 1988.
9. Pięnkowski M.: *Biul. VI Zjazdu PTNW, Wrocław, 2, 510, 1978.*
10. Pięnkowski M., Grzebiela S., Zimowski A.: *Biul. VI Zjazdu PTNW, 2, 519, 1978.*
11. Sandurski T.: *Medycyna Wet.* 40, 489, 1984.
12. Sword J. T., Ataja A. M., Pope A. L.: *J. Anim. Sci.* 59, 1594, 1984.
13. Teller E., Godeau J. M.: *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 57, 16, 1987.
14. White C. L.: *Aust. J. biol. Sci.* 41, 343, 1988.

Adres autora: dr Jan Koper, ul. Z. Berlinga 11/31, 85-791 Bydgoszcz

PRAKTYKA LABORATORYJNA

ANNA KOZAK

Metoda wykrywania i oznaczania kokcydiostatyków jonoforowych w paszach

Zakład Farmakologii i Toksykologii Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

A method for the identification and determination of ionophorous coccidiostatics in feedingstuffs

A method for the identification and determination of ionophorous coccidiostatics such as monensin, salinomycin, narasin and lasalocid in feedingstuffs has been described. The method is based on the reaction of these compounds with an alcoholic vanillin solution. Separation and identification of the ionophores by means of the thin layer chromatography permits to detect monensin, salinomycin and narasin in the amounts of 5 mg/kg and lasalocid by 10 mg/kg feedingstuffs. Quantitative determinations are performed by the colorimetric method at 518 nm. The method makes possible to detect monensin, salinomycin and narasin at the content of 1.0 mg/kg feedingstuffs. However, this method is not applicable for lasalocid.

Monenzyna (monensin), salinomycina (salinomycin), narazyna (narasin) i lasalocyd (lasalocid) są antybiotykami polieteryowymi stosowanymi w praktyce weterynaryjnej głównie do zwalczania kokcydiozy drobiu. Podawane w odpowiednich dawkach (monenzyna: 90 lub 100 mg, salinomycina: 60 mg, narazyna: 70 mg i lasalocyd: 75 mg na 1 kg paszy) wykazują wysoką skuteczność przeciwko patogennym u drobiu kokcydiom, działając w ich różnych stadiach rozwoju (2, 5, 9). W dawkach niższych od zalecanych mogą być nieskuteczne i sprzyjać powstawaniu opornych szczepów kokcydii. Podawane w nadmiarze — mogą stać się przyczyną zatrucia drobiu i pozostawać w żywności zwierzęcego pochodzenia. Istnieje zatem konieczność kontroli ich zawartości w preparatach, premiksach i mieszankach paszowych. W praktyce analizę zawartości oznaczanych

leków wykonuje się prostymi technikami analitycznymi, najczęściej kolorymetrią i chromatografią cienkowarstwową (1, 4, 6, 8), a w przypadku niezbędności dysponowania wynikami bardziej dokładnymi stosuje się instrumentalne techniki: chromatografię gazową (10) i wysokosprawną chromatografię cieczową (3, 7, 10, 11). Opisane poniżej oznaczanie tych leków w mieszankach paszowych opracowane zostało do stosowania w laboratoriach, które nie dysponują drogą aparaturą analityczną.

Zasada metody

Wykrywanie i oznaczanie kokcydiostatyków jonoforowych w paszach oparte jest na ich reakcji z alkoholowym roztworem waniliny, z którym po ogrzewaniu dają reakcje barwne. Rozdzieleniu i identyfikacji dokonuje się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Oznaczenia ilościowe przeprowadza się kolorymetrycznie przy długości fali 518 nm.

Odczynniki i aparatura

1. Aceton, cz.d.a.
2. Alkohol metylowy, cz.d.a.
3. Kwas siarkowy stęż., cz.d.a.
4. Tlenek glinu zasadowy do chromatografii kolumnowej, I stopień aktywności wg Brockmanna. Porcję około 200 g tlenku glinu prażyć przez 4 godz. w 500°C. Przed użyciem potrzebną ilość wysuszyć przez noc w 130°C, dodać 3% obj. wody redest. i wytrząsać przez 2 godz. Przechowywać w szczelnie zamkniętym słoju.
5. Octan etylu, cz.d.a.
6. Wanilina, cz.d.a. Roztwór 3% w metanolu: rozpuścić 3,0 g waniliny w 60 ml alkoholu metylowego. Zakwaszyć stężonym kwasem siarkowym (ok. 1,0 ml) i dopełnić alkoholem do 100 ml. Sporządzać każdorazowo świeży roztwór przed wykonaniem oznaczeń.
7. Wzorce analityczne. Monenzyna, narazyna — najlepiej