
EVALUATION OF HAIR, BLOOD PLASMA AND FAECES AS INDICATORS OF MINERAL STATUS IN HORSES AFTER ADDITION OF DIFFERENT COPPER SOURCES INTO FEED RATION

Jančíková P., Horký P., Zeman L.

Department of Animal Nutrition and Forage Production, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: petra.jancikova@mendelu.cz

ABSTRACT

The purpose of our work was an evaluation of hair, blood plasma and faeces as indicators of mineral status in horses after the addition of different copper sources. Eighteen warm-blooded horses were divided into three groups. All groups received the same basic feeding rations, which was enriched with an inorganic form of copper for the first group and an organic form of copper for the second group. The results show that the intervention into the feeding ration of mares resulted in a highly significant increase ($P < 0.01$) of copper content excreted in the dry matter of faeces and highly significant increase ($P < 0.01$) of copper content deposited in the dry matter of hair in mares receiving inorganic form of copper. The same results were achieved in the mares receiving the organic form of copper but in the significance level of 0.05. There was the difference ($P < 0.05$) in the content of copper in the blood plasma between the mares supplemented with different sources of copper. Excess of copper showed the least changes in the levels of trace elements in blood plasma, significant interactions were found in hair that can serve as storage of excess materials and the most significant changes were found in the faeces of horses.

Key words: horse, copper, faeces, blood, hair

Acknowledgement: This work has been realized in the context of grant TP 8/2010 and TP 2/2011, financed by the Internal Grant Agency (IGA) of Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno.

ÚVOD

Krevní vzorky jsou často analyzovány s cílem determinovat minerální stav zvířat (Herd t a Hoff, 2011). Převážná většina mědi je vylučována výkaly, trávicí trakt je také hlavní cestou vylučování zinku (Hoyt a kol., 1995), přičemž množství vyloučených mikroelementů výkaly jasně odpovídá dietnímu příjmu těchto prvků (Schryver a kol., 1980). Navzdory nedostatku vědeckých údajů k prokázání spolehlivosti, analýza žíní bývá propagována jako prognostický a diagnostický test pro dietní minerální imbalance u koní (Wells a kol., 1990). Cílem naší práce bylo zhodnocení žíní, krevní plazmy a výkalů jako indikátorů minerálního stavu u koní po přidavku různého zdroje mědi.

MATERIÁL A METODIKA

Do čtrnáctidenního experimentu provedeného na farmě Boukdy – Velké Němčice bylo zařazeno 18 klisen plemene Český teplokrevník. Klisny různého věku (3,6 – 19,8 let), obdobné hmotnostní kategorie (520 - 580 kg) a lehkého pracovního zatížení, byly rozděleny do tří skupin a podrobeny odlišné minerální výživě. Klisny byly krmeny dvakrát denně. Během pokusu zvířata přijímala shodnou základní krmnou dávku, která byla tvořena 12 kg sena, 1,0 kg ovsu, 0,75 kg pšeničného šrotu a 0,75 kg ječného šrotu. Koním v první a druhé skupině byla navíc zkrmována při večerním krmení měď (Cu), v různých formách, v množství 120 mg/den. První skupina (n = 6) přijímala měď v organické formě – proteinát (Bioplex Cu, ALLTECH), druhá (n = 6) měď v anorganické formě – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, třetí skupině (n = 6) nebylo množství mědi v krmné dávce navyšováno a sloužila jako skupina kontrolní. Na množství minerálních látek ve vodě nebyl brán zřetel.

Vzorky krve pro potřebné analýzy byly odebrány 1. a 14. den bilance. Odběry byly provedeny vždy ve stejnou dobu (2 hodiny po ranním nakrmení), klisny nebyly před odběrem fyzicky zatěžovány ani stresovány. Krev byla odebírána z *vena jugularis externa* do plastových vzorkovnic s antikoagulačním roztokem – heparin. Vzorky krve byly ihned po odběru umístěny do chladicího přepravního boxu a vždy nejpozději do 2 hodin zpracovány a uskladněny pro následné analýzy. Krev byla odstředěna (2300 otáček, po dobu 20 minut) a získaná plazma zamražena. Přímé kolorimetrické stanovení koncentrace mědi, zinku a železa bez deproteinace v plazmě bylo provedeno pomocí přístroje Konelab T 20 xt (THERMO ELECTRON OY, Finsko).

Dále byly odebrány vzorky žíní pro stanovení obsahu deponovaných stopových prvků. V den zařazení do sledování byl koním odstraněn na zátylku přibližně 4 cm široký kus hřívy, po 14 dnech byl proveden odběr z tohoto místa, získané žíně byly promyty v jarové vodě, usušeny a připraveny pro analýzu. Obsah jednotlivých prvků v žíních byl stanoven metodou atomové absorpční spektrometrie.

V závěrečných pěti dnech pokusného sledování byly také odebírány od koní výkaly, přibližně 200 g/den. Po vysušení dílčích vzorků, byl připraven vzorek zkušební, v němž byly hladiny vybraných stopových prvků stanoveny pomocí atomové absorpční spektrometrie. Navážka 0,5 g

homogenního vzorku byla mineralizována ve směsi koncentrované kyseliny dusičné a peroxidu vodíku v mikrovlnném systému ETHOS 1 (MILESTONE, Itálie). Po dekompozici vzorku byl roztok doplněn demineralizovanou vodou na objem 25 ml. Koncentrace prvků v takto připravených roztocích byla stanovena na atomovém absorpčním spektrometru s kontinuálním zdrojem záření s vysokým rozlišením ContraAA 700 (ANALYTIK JENA, Německo). Použité vlnové délky: Zn 213,857 nm, Mn 279,482 nm, Fe 248,327 nm, Cu 324,754 nm.

Získané výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí Studentova *t*-testu.

VÝSLEDKY A DISKUZE

V průběhu experimentu bylo provedeno hodnocení žírní, krevní plazmy a výkalů jako indikátorů minerálního stavu u koní po přidávku organického a anorganického zdroje mědi. Průměrný počáteční a závěrečný stav sledovaných prvků v krevní plazmě koní zařazených do bilance, jejich směrodatné odchylky i statistické závislosti zachycuje tabulka 1. Z výsledků je patrné, že na počátku experimentu nebyl mezi skupinami v obsahu sledovaných prvků v krevní plazmě koní průkazný rozdíl. V odběru provedeném po 14 dnech jsme našli průkazný rozdíl ($P < 0,05$) v obsahu Cu mezi klisnami, kterým byla krmná dávka obohacena o tento stopový prvek, rozdíl ($P < 0,01$) byl u těchto klisen nalezen také v případě železa. Hladiny dalších prvků nebyly změněny. Hodnoty minerálních prvků v krvi nekorespondují s jejich obsahem v celém těle, protože výsledky složení plazmy mohou být ovlivněny doplněním nedostatků vysoce efektivními homeostatickými mechanismy (Radomska a kol., 2005; cit., Gabryszuk a kol., 2008; Lowe a kol., 2009). Přičemž jednorázové vysoké dávky minerálních prvků mají pravděpodobně za následek plazmatickou reakci, v porovnání s nižšími dávkami aplikovanými po delší časové období. Dlouhodobá aplikace může dokonce vést ke snížení obsahu minerálních prvků v plazmě, jak bylo prokázáno například při dlouhodobém doplňování zinku (Kreyenberg, 2003; cit., Kienzle a Zorn, 2006). Ve studii provedené Nailem a kol. (2005), který aplikoval ročkům do krmné dávky síran měďnatý a Cuplex došlo k průkaznému zvýšení ($P < 0,05$) její hladiny v séru koní přijímajících organickou formu v porovnání s koňmi doplňovanými síranem. Tento trend však byl nalezen pouze v jedné ze 3 period zkoušky. V naší studii nevedl přírůstek mědi do krmné dávky klisen v porovnání s klisnami kontrolní skupiny k zvýšení její hladiny v krevní plazmě, což může být způsobeno činností homeostatických mechanismů. Nicméně byl nalezen průkazný rozdíl mezi klisnami přijímajícími bioplex a síranovou formu mědi, kde vyšší hladina mědi v plazmě byla nalezena u bioplexu, což by svědčilo o vyšší účinnosti této formy v organismu.

Tab. 1 Statistické vyhodnocení obsahu sledovaných prvků v krevní plazmě koní (průměr ± S_x)

Parametr	Odběr	Skupina	Minerální prvky		
			Zn	Cu	Fe
Plazma ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Kontrolní	Kontrolní	7,96 ± 0,77 ^a	14,72 ± 1,64 ^a	24,86 ± 4,25 ^a
		Počáteční	8,73 ± 0,65 ^a	15,09 ± 1,98 ^a	20,63 ± 4,60 ^a
	Organická Cu	Anorganická Cu	8,56 ± 0,99 ^a	13,79 ± 1,78 ^a	28,53 ± 7,95 ^a
		Kontrolní	9,08 ± 0,74 ^a	13,24 ± 2,08 ^{ab}	27,19 ± 6,74 ^{AB}
	Závěrečný	Organická Cu	9,43 ± 1,62 ^a	14,63 ± 2,30 ^b	29,24 ± 2,80 ^B
		Anorganická Cu	8,36 ± 0,82 ^a	12,23 ± 1,30 ^a	22,57 ± 3,19 ^A

Rozdíly mezi skupinami v rámci jednotlivých odběrů a prvků byly: abc - průkazné ($P < 0,05$); ABC - vysocí průkazné ($P < 0,01$)

Předmětem zájmu bylo také zhodnocení žíň jako ukazatele stavu sledovaných stopových prvků (Tab. 2). Obsah mědi průkazně vzrostl ($P < 0,05$) u klisen přijímajících měď v organické formě a vysocí průkazně vzrostl ($P < 0,01$) u klisen doplňovaných síranem měďnatým v porovnání s klisnami bez přidavku tohoto stopového prvku. Zásah do krmné dávky klisen měl dopad na metabolismus železa a manganu, nevedl však ke změnám v obsahu zinku. Výzkumy naznačují, že koncentrace některých stopových prvků v žíňích mohou být ve vztahu k příjmu jednotlivých látek z diety (Combs a kol., 1982). Dunnett a Lees (2003) provedli pokusy pro použití analýz žíň jako indikátoru minerálního stavu celého těla. Minerální látky včleněné do folikulů zřejmě odrážejí minerální stav v čase, ve kterém byla vlasová vlákna syntetizována (Combs, 1987). Dle Biricika a kol. (2005) neodrážela koncentrace Cu v séru a žíňích klisen hladinu Cu použitou v dietě. V našem experimentu však došlo k ovlivnění obsahu mědi v žíňích při zvýšeném příjmu tohoto prvku. Také Jacob a kol. (1978) uvádějí pozitivní korelaci mezi příjmem mědi a jejím obsahem v chlupcích potkanů. Podobně i O'Mary a kol. (1970) usoudili, že hladina Cu v dietě ovlivňovala koncentraci Cu v žíňích skotu. Sérum, ani žíň nebyly shledány dobrým indikátorem koncentrace Mn v dietě (Biricik a kol., 2005). Stopovými prvky, zejména mědí, zinkem a selenem se zabývali i Wichert a kol. (2002). Wells a kol. (1990) informuje, že synergické a antagonistické vztahy mezi minerálními prvky a jejich vliv na metabolismus by mohly mít větší vliv na obsah minerálních prvků v žíňích, než vlastní nedostatek či nadbytek některého prvku. Nicméně, jsou zde stále obavy o tom, zda obsah žíňí správně koreluje s hladinami celého těla. Platnost tohoto přístupu u koní je třeba teprve potvrdit (Hintz, 2001).

Tab. 2 Statistické hodnocení obsahu sledovaných prvků v sušíně žíňí koní (průměr ± S_x)

Parametr	Skupina	Minerální prvky			
		Zn	Mn	Cu	Fe
Žíň (mg.kg^{-1})	Kontrolní	167,27 ± 27,12 ^a	5,11 ± 2,86 ^b	13,04 ± 1,74 ^{aA}	194,44 ± 112,08 ^{ab}
	Organická Cu	152,82 ± 44,94 ^a	1,89 ± 1,13 ^a	15,26 ± 1,22 ^b	93,38 ± 66,66 ^b
	Anorganická Cu	180,43 ± 20,70 ^a	5,39 ± 2,78 ^b	17,53 ± 2,51 ^B	284,33 ± 181,96 ^a

Rozdíly mezi skupinami v rámci jednotlivých prvků byly: abc - průkazné ($P < 0,05$); ABC - vysocí průkazné ($P < 0,01$)

Vyhodnocen byl také vliv přídatku mědi na její obsah a hladiny dalších stopových prvků ve výkalech koní (Tab. 3). Výsledky naznačují, že zásahem do krmné dávky klisen pokusných skupin došlo k průkaznému zvýšení ($P < 0,01$) obsahu mědi ve výkalech. Obsah zinku byl u klisen pokusných skupin nižší než-li u klisen kontrolní skupiny, statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) byl však nalezen pouze mezi skupinou kontrolní a klisnami, jejichž základní krmná dávka byla doplněna o organickou formu mědi. Vysoce průkazný rozdíl ($P < 0,01$) byl v obsahu zinku i mezi klisnami pokusných skupin. Přídatků organické formy mědi měl také průkazný vliv ($P < 0,05$) na metabolismus železa a manganu. Pagan (2000) uvádí, že zinek a molybden bývají zahrnuty jako prvky narušující absorpci mědi u koní. Ze studie Hoyta a kol. (1995) vyplývá, že rostoucí příjem zinku z diety neměl průkazný vliv na zdánlivou absorpci mědi u koní a tedy ani na její vylučované množství ve výkalech. Rostoucí příjem zinku však byl příčinou průkazného navýšení ($P < 0,05$) vylučovaného zinku ve výkalech. Různé zdroje mědi také použili Naile a kol. (2005) z jejichž výsledků je patrné, že organická forma mědi byla ve dvou ze 3 period vylučována výkaly průkazně více ($P < 0,05$), než-li anorganická forma mědi. Absorpce železa je nižší při jeho zvýšeném příjmu a v případě výskytu vysoké koncentrace mědi, zinku, manganu, kadmia a kobaltu. Navíc, díky účinnému mechanismu zachování železa je vylučování železa nízké a ve výkalech nacházíme zejména neabsorbované železo z krmiv, než-li železo endogenního původu (Jackson, 1998).

Tab. 3 Statistické hodnocení obsahu sledovaných prvků v sušině výkalů koní (průměr \pm S_x)

Parametr	Skupina	Minerální prvky			
		Zn	Mn	Cu	Fe
Výkaly (mg.kg ⁻¹)	Kontrolní	52,93 \pm 9,86 ^b	209,01 \pm 75,05 ^b	8,44 \pm 0,53 ^A	1049,97 \pm 167,84 ^B
	Organická Cu	41,30 \pm 1,36 ^{aA}	136,41 \pm 13,03 ^a	11,46 \pm 0,93 ^B	721,82 \pm 196,68 ^{AA}
	Anorganická Cu	46,15 \pm 1,85 ^B	139,89 \pm 16,69 ^{ab}	12,09 \pm 1,35 ^B	1380,07 \pm 328,57 ^B

Rozdíly mezi skupinami v rámci jednotlivých prvků byly: abc - průkazné ($P < 0,05$); ABC - vysoce průkazné ($P < 0,01$)

ZÁVĚR

Cílem práce bylo zhodnocení žíni, krevní plazmy a výkalů jako indikátorů minerálního stavu po přídatku různého zdroje mědi u koní. Z výsledků naší studie vyplývá, že značné navýšení mědi v krmné dávce klisen je příčinou vzniku minerální disbalance u koní. Nadbytek mědi se nejméně projevil na změně hladin stopových prvků v krevní plazmě, značné interakce byly nalezeny v žíních koní, které mohou sloužit, jako úložiště nadbytečných množství látek a nejvýznamnější změny byly objeveny ve výkalech koní. Absorpce mědi byla nejméně efektivní u klisen přijímajících anorganickou formu mědi. Klisny v této skupině deponovali nejvyšší množství mědi do žíni a její hladina v krevní plazmě byla nejnižší. Naopak množství mědi vyloučené klisnami přijímajícími její organickou formu bylo nižší, hladina v krvi nejvyšší a obsah v žíních byl nižší, než-li v případě klisen přijímajících síran měďnatý. Vysoká biologická aktivita organické formy mědi byla však příčinou významných změn v metabolismu zinku, manganu a železa, které nebyly v případě anorganického zdroje pozorovány.

LITERATURA

Biricik, H., Ocal, N., Gucus, A. I., Ediz, B., Uzman, M. (2005): Seasonal Changes of Some Mineral Status in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 25: 346-348.

Combs, D. K. (1987): Hair Analysis as an Indicator of Mineral Status of Livestock. *Journal of animal science*, 65: 1753-1758.

Combs, D. K., Goodrich, R. D., Meiske, J. C. (1982): Mineral Concentrations in Hair as Indicators of Mineral Status: a Review. *Journal of animal science*, 54: 391-398.

Dunnett, M., Lees, P. (2003): Trace element, toxin and drug elimination in hair with particular reference to the horse. *Research in Veterinary Science*, 75: 89-101.

Gabryszuk, M., Sloniewski, K., Metera, E., Sakowski, T. (2010): Content of Mineral Elements in Milk and Hair of Cows from Organic Farms. *Journal of Elementology*, 15(2): 259-267.

Herd, T. H., Hoff, B. (2011): The Use of Blood Analysis to Evaluate Trace Mineral Status in Ruminant. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 27: 255-283.

Hintz, H. F. (2001): Hair as an Indicator of Nutritional Status. *Journal of Equine Veterinary Science*, 21: 199.

Hoyt, J. K., Potter, G. D., Greene, L. W., Anderson, J. G. (1995): Copper Balance in Miniature Horses Fed Varying Amounts of Zinc. *Journal of Equine Veterinary Science*, 15: 357-359.

Jackson, S. G. (1998): Trace minerals for the performance horse known biochemical roles and estimates of requirements. *The Australian Equine Veterinarian*, 16(3): 119.

Kienzle, E., Zorn, N. (2006): Bioavailability of Minerals in the Horse. In: *Proceedings of the 3rd European Equine Nutrition & Health Congress*.

Jacob, R. A., Klevay, L. M., Logan, G. M. (1978): Hair as a biopsy material: V. Hair metal as an index of hepatic metal in rats: copper and zinc. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 31: 477-480.

Lowe, N. M., Fekete, K., Decsi, T. (2009): Methods of assessment of zinc status in humans: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89: 2040-2051.

Naile, T. L., Cooper, S. R., Freeman, D. W., Krehbiel, C. R. (2005): Effect of Mineral Source on Growth and Balance in Yearling Horses. *The Professional Animal Scientist*, 21: 121-127.

National Research Council (2007): *Nutrient Requirements of Horses*. 6. Washington, D. C.: The National Academies Press, 341 s. ISBN 0-309-10212-X.

O'Mary, C. C., Bell, M. C., Sneed, N. N., Butts, W. T. (1970): Influence of Ration Copper on Mineral in the Hair of Hereford and Holstein Calves. *Journal of animal science*, 31: 626-630.

MENDELNET 2011

Pagan, J. D. (2001): Micromineral requirements in horses. In PAGAN, J. D; GEOR, R. J. *Advances in Equine Nutrition II*. 1. Kentucky Equine Research Inc.: Nottingham University Press, s. 317-327. ISBN 1-897676-78-6.

Schryver, H. F., Hintz, H. F., Lowe, J. E. (1980): Absorption, excretion and tissue distribution of stable zinc and ⁶⁵zinc in ponies. *Journal of animal science*, 51: 896-902.

Wells, L. A., Leroy, R., Ralston, S. L. (1990): Mineral Intake and Hair Analysis of Horses in Arizona. *Equine Veterinary Science*, 10: 412-416.

Wichert, B., Frank, T., Kienzle, E. (2002): Zinc, Copper and Selenium Intake and Status of Horses in Bavaria. *The Journal of Nutrition*, 132: 1776-1777.