مجله علوم دامی ایران
دوره ۴۳، شماره ۲، ۱۳۹۱ (۱۷۱-۱۶۱)

اثر سطح و نوع مکمل مس بر فراسنجه‌های هماتولوژی، سرولوپلاسمین و غلظت پلاسمایی مس، روی و آهن در بره های نر مهربان

علی اصغر بهاری[1*]، حسن علی عربی[2]، محمدمهدی طباطبائی[3]، امیرحسین دزفولیان[4]، جواد رشیدی[5]، پویا زمانی[2]، داریوش علیپور[2]، علی صادقی نسب[1]، زهرا بختیاری[6] و امیر فدایی فر[7]
۱، ۶، ۷، استادیاران و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه بوعلی سینا-همدان
۲، ۳، ۴، استادیار، دانشیار، دانشجوی دوره دکتری، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا-همدان
۵، عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی جهاد کشاورزی همدان
(تاریخ دریافت : ۸۹/۶/۱۶ – تاریخ تصویب: ۹۱/۴/۲۰)

چکیده

این پژوهش برای بررسی اثر سطح و نوع مکمل مس بر فراسنجه های هماتولوژی بره‌های نر مهربان انجام شد. تعداد ۲۰ راس بره نر در قالب چهار گروه پنج راسی در جایگاه‌های انفرادی نگهداری شدند. مقدار و نوع مکمل مس گروه‌های مختلف ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم به شکل سولفات و ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم به شکل پروتئینات بودند که روزانه همراه جیره پایه در اختیار بره‌ها قرار می‌گرفت. در روزهای صفر، ۷، ۱۴، ۲۸، ۵۷ و ۶۵ آزمایش بره‌ها از ورید وداج خونگیری شدند و فراسنجه های خونی آن ها تعیین گردید. همچنین از نمونه های روزهای صفر، ۲۸ و ۶۵ برای تعیین میزان مس، روی و آهن پلاسمایی و سرولوپلاسمین سرمی استفاده شد. همبستگی منفی معنی‌داری (P <۰/۰۰۱) بین سطوح پلاسمایی مس و آهن سرم مشاهده شد (r = -۰/۶۰۴) و همزمان با افزایش سطح مس پلاسما میزان آهن در روز ۶۵ در تمام تیمارها کاهش قابل توجهی نشان داد. منبع مس بر غلظت سرولوپلاسمین اثر معنی داری داشت (P <۰/۰۵). در روز ۶۵ تیمار ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم مس پروتئینات بالاترین غلظت سرولوپلاسمین را داشت (P ۰/۰۵ >). سطح ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم مس تعداد گویچه های سرخ، هماتوکریت و هموگلوبین بالاتری را سبب گردید که با سطح ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم مس تفاوت آماری معنی‌داری نشان داد (P <۰/۰۵). هیچ یک از نشانه های بالینی یا هماتولوژی مسمومیت با مس دیده نشد. در اواخر دوره آزمایش تعداد گویچه‌های سرخ، هماتوکریت و هموگلوبین در تمام تیمارها رو به کاهش نهاد که احتمال دارد بدلیل بر هم کنش مس و آهن و تاثیر آن بر متابولیسم آهن و ساخت گویچه‌های سرخ باشد.

واژه های کلیدی: تعداد گویچه‌های سرخ، هماتوکریت، هموگلوبین خون، همدان.

مقدمه

مس از عناصر معدنی کم مصرف می‌باشد که در بسیاری از فرآیندهای مهم بدن حضور دارد و نقش حیاتی را ایفا می‌کند. آنزیم‌هایی چون سرولوپلاسمین، سیتوکروم c اکسیداز، مس-روی سوپراکسیددیسموتاز و چندین آنزیم دیگر در بافت‌های پستانداران به مس

* نویسنده مسئول: علی اصغر بهاری تلفن: ۰۹۱۸۸۱۳۰۷۱۰ E-mail: aliasghar.bahari@basu.ac.ir

وابسته هستند (Underwood & Suttle, 1999). نقش مس در فعالیت این آنزیم‌ها سبب گردیده است که این عنصر در عملکردهای فیزیولوژیکی همچون خونسازی، سلامت سیستم ایمنی، محافظت در برابر اکسیدان‌ها و عملکردهای دیگر نقش با اهمیتی داشته باشد.

کمبود مس سبب بروز نشانه های بالینی همچون کم خونی، اختلالات استخوانی، اختلالات بافت پیوندی، عدم تعادل (Ataxia) نوزادان، اختلالات قلبی عروقی، از بین رفتن رنگدانه‌های بافت پوششی بدن، کاهش کیفیت پشم و مو، اسهال، ناباروری و حساسیت در برابر عفونت‌ها و بیماری ها می‌گردد (Underwood & Suttle, 1999).

گوسفند در مقایسه با حیوانات اهلی دیگر همچون بز، گاو، خوک و مرغ نسبت به مقادیر مازاد مس حساس‌تر است و طبق گزارش NRC (۲۰۰۷) اگر میزان مس خوراکی در جیره به بالاتر از ۱۵ میلی گرم در کیلوگرم برسد احتمال مسمومیت با مس وجود خواهد داشت. با وجود حساسیت بالای گوسفند به مازاد مس، حضور عناصر گوگرد و مولیبدن و رابطه آنتاگونیستی این عناصر با مس سبب کاهش جذب و بروز کمبود در گوسفند می‌شود (Underwood & Suttle, 1999).

با وجود این، احتیاجات مس در گوسفند آن قدر به فاکتورهای جیره‌ای و ژنتیکی وابسته است که بدون مشخص کردن وضعیت آن ها تعیین احتیاجات حیوان دشوار خواهد بود (NRC, 2007). از سوی دیگر، در تحقیقات مختلفی ترکیبات آلی مس یعنی مس باند شده با یک ماده آلی مثل پروتئین یا اسید آمینه که اصطلاحاً به آن‌ها کیلات (Chelate) گفته می‌شود با شکل غیر آلی آن یعنی سولفات مس مقایسه شده‌اند (Du et al., 1996; Eckert, et al., 1999; Engle & Spears, 2000; Kegley & Spears, 1994; Kincaid, et al., 1986; Senthilkumar, et al., 2009 Solaiman et al., 2001 & 2006; Zhang et al. 2008).

با توجه این که در تنظیم جیره غذایی گوسفندان به منظور جبران کمبود مس از مکمل های تغذیه ای آن استفاده می شود، لذا هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر استفاده مکمل های مس از دو منبع آلی و معدنی مس بیش از مقادیر توصیه شده NRC بر فراسنجه های خونی در بره‌های نر مهربان بود.

مواد و روش ها

این پژوهش با استفاده از ۲۰ رأس بره نر مهربان ۶-۵ ماهه با میانگین وزنی ۳/۰۴ ± ۳۰/۵۳ کیلوگرم در مزرعه آموزشی-پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا در همدان انجام شد. قبل از شروع دوره آزمایش، برای از بین بردن انگل‌های دستگاه گوارش از قرص‌های ضد انگل آلبندازول (داروسازی لرستان) به میزان ۷/۵ میلی گرم به ازاء کیلوگرم وزن زنده دام استفاده شد.

جیره غذایی پایه بر اساس احتیاجات غذایی توصیه شده توسط NRC (۲۰۰۷) به غیر از مس تنظیم شد. قبل از انجام آزمایش به منظور تنظیم و متعادل نمودن جیره غذایی، ترکیب شیمیایی اجزای جیره تعیین شد (جدول ۱). بره‌ها جهت سازگاری با محیط و جیره جدید در یک دوره دو هفته‌ای با جیره پایه تغذیه شدند و پس از وزن‌کشی به طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند (هر گروه شامل ۵ بره) که گروه ۱ (سولفات ۱۰) با جیره پایه + ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم مس به شکل سولفات مس، گروه ۲ (سولفات ۲۰) با جیره پایه + ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم مس به شکل سولفات مس، گروه ۳ (پروتئینات ۱۰) با جیره پایه + ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم مس به شکل مس‌پروتئینات و گروه ۴ (پروتئینات ۲۰) با جیره پایه + ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم مس به شکل مس‌پروتئینات تغذیه شدند.

در این طرح از مکمل مس به دو شکل معدنی (نمک سولفات مس، شرکت مرک آلمان) و آلی (مس پروتئینات، شرکت Bioplex انگلستان) استفاده شد. غذادهی به حیوانات روزانه در دو نوبت صبح و بعدازظهر انجام می شد. به منظور دریافت مقدار مس مورد نظر، ابتدا به طور هفتگی از هر یک از منابع مس به طور جداگانه محلول های حاوی مقدار مشخصی از مس (۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر و ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر) تهیه شد.

سپس به ازاء هر کیلوگرم ماده خشک خوراک مصرفی ۱۰ میلی لیتر از محلول تهیه شده که حاوی ۱۰ یا ۲۰ میلی‌گرم مس بود به بخش کنجاله سویای آسیاب شده اضافه می‌شد و در نوبت غذایی صبح در اختیار دام ها قرار می گرفت. در روزهای صفر، ۷، ۱۴، ۲۸، ۵۷ و ۶۵ آزمایش، قبل از خوراک‌دهی نوبت صبح ۱۰ میلی

لیتر خون از ورید وداج تمام بره‌ها اخذ و به دو لوله یکی حاوی هپارین و دیگری بدون ماده ضد انعقاد منتقل شد.

جدول۱- ترکیب شیمیایی مواد خوراکی و جیره پایه مورد استفاده در آزمایش

مواد خوراکی	یونجه (٪۲۷)	جو (٪۷۰)	کنجاله سویا (٪۳)	جیره پایه
ماده خشک (درصد)	۹۲/۰۰	۹۲/۵۰	۹۴/۰۰	۹۳/۱۱
ماده آلی (درصد ماده خشک)	۹۲/۴۰	۹۵/۲۰	۹۳/۵۰	۹۴/۳۹
پروتئین خام (درصد ماده خشک)	۱۵/۸۰	۱۱/۹۰	۴۳/۲۰	۱۳/۸۹
عصاره اتری (درصد ماده خشک)	۱/۷۸	۱/۴۰	۱/۸۰	۱/۵۱
الیاف نامحلول در شوینده خنثی (درصد ماده خشک)	۵۴/۳۰	۲۱/۷۰	۲۹/۴۰	۳۰/۷۳
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (درصد ماده خشک)	۳۵/۷۸	۹/۶۹	۹/۹۸	۱۶/۷۴
کربوهیدرات‌های غیر فیبری (درصد ماده خشک)	۲۰/۵۲	۶۰/۲۰	۱۹/۱۰	۴۸/۲۵
خاکستر (درصد ماده خشک)	۷/۶	۴/۸	۶/۵	۵/۶
کلسیم (درصد ماده خشک)	۱/۶۹	۰/۰۷	۰/۳۷	۰/۵۱
فسفر (درصد ماده خشک)	۰/۲۳	۰/۳۲	۰/۶	۰/۲۹
روی (میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک)	۲۳/۳۰	۲۰/۵۰	۶۱/۰۰	۲۲/۴۷
مس (میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک)	۹/۰	۸/۰	۱۹/۰	۸/۶
آهن (میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک)	۳۷۷/۰۰	۹۵/۳۴	۱۹۴/۱۰	۱۷۴/۳۵
مولیبدن (میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک)	۴/۳۴	۰/۵۹	۱/۱۴	۱/۶۲
انرژی قابل متابولیسم* (مگا کالری بر کیلوگرم ماده خشک)	۲/۰۳	۳/۱۱	۳/۱۷	۲/۸۲

*انرژی قابل متابولیسم با استفاده از جداول NRC، (۲۰۰۷) محاسبه شده است.

در آزمایشگاه ابتدا یک میلی لیتر خون کامل از هر نمونه برای تعیین فراسنجه های خون جدا شد. برای اندازه گیری فعالیت سرولوپلاسمین و همچنین میزان مس، روی و آهن، به ترتیب سرم و پلاسمای روزهای صفر، ۲۸ و ۶۵ تهیه (۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه) و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

فراسنجه های خون با استفاده از دستگاه شمارشگر سلولی خودکار Abacus C مدل release 2.8 (ساخت اتریش) تعیین شدند. این فراسنجه ها شامل، تعداد گویچه های سرخ (RBC)، هموگلوبین (Hb)، هماتوکریت (PCV)، متوسط هموگلوبین سلول (MCH)، متوسط غلظت هموگلوبین سلول (MCHC) و متوسط حجم سلول (MCV) بودند. ضمن این که برای بررسی احتمال بروز بحران همولیتیک، گسترش خون هر نمونه پس از رنگ آمیزی با رایت-گیمسا از نظر وجود هینزبادی (Heinz body) بررسی می شد.

فعالیت سرولوپلاسمین در سرم بر اساس روش Schosinsky و همکاران (۱۹۷۴) اندازه‌گیری شد با این تفاوت که به جای اُدیانیزیدین دی‌هیدروکلراید که در دمای اتاق پایداری مناسبی ندارد از پودر اُدیانیزیدین استفاده شد. پودر اُدیانیزیدین پایدارتر بوده و به راحتی در دمای اتاق قابل نگهداری است. در این روش بر اساس فعالیت اکسیدازی سرولوپلاسمین میزان آن در سرم تعیین می‌گردد.

برای اندازه گیری میزان مس، روی و آهن، درون لوله هضمی به ۴ میلی لیتر نمونه پلاسمای بدون همولیز ۱۰میلی لیتر اسید نیتریک ۰/۴ نرمال افزوده می شد و لوله به مدت ۱۴ ساعت درون بن‌ماری ۸۰ درجه قرار داده می شد. سپس نمونه‌ها با آب مقطر بدون یون به حجم ۵۰ سی‌سی رسانده می شد. مقدار مس، روی و آهن نمونه های هضم شده با دستگاه جذب اتمی Varian spectr مدل AA220 (ساخت استرالیا) تعیین گردید.

داده های بدست آمده در روزهای ۲۸ و ۶۵ به صورت فاکتوریل ۲×۲ در چارچوب طرح کاملاً تصادفی و به صورت اندازه های تکرار شده تجزیه شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد و مقادیر $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS (۲۰۰۴) صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتیجه تجزیه آماری یافته های غلظت عناصر مس، روی و آهن پلاسمای بره‌های نر مهربان در روزهای ۲۸ و ۶۵ آزمایش و همچنین میانگین مصرف خوراک در دوره ۶۵ روزه در جدول ۲ آمده است. در روز صفر تفاوت آماری معنی‌داری بین تیمارها برای این سه عنصر وجود نداشت. بنابراین، داده‌ها به صورت اندازه‌های تکرار شده و بدون در نظر گرفتن روز صفر تجزیه و ارائه شده‌اند. اثر متقابل تیمار× زمان و سطح × منبع مکمل مس برای هیچ‌یک از عناصر معنی‌دار نبود. میانگین خوراک مصرفی روزانه بین تیمارها تفاوت معنی داری نشان نداد. بعلاوه، نمایش روند تغییرات عناصر مس و آهن در دوره آزمایش، به ترتیب در شکل های ۱ و ۲ آمده است.

جدول ۲- اثر سطح و نوع مکمل مس بر غلظت پلاسمایی عناصر مس، روی و آهن (میکرومول بر لیتر)، فعالیت سرمی سرولوپلاسمین (میلی گرم در دسی لیتر) و میانگین خوراک مصرفی روزانه (کیلوگرم) در بره های نر مهربان

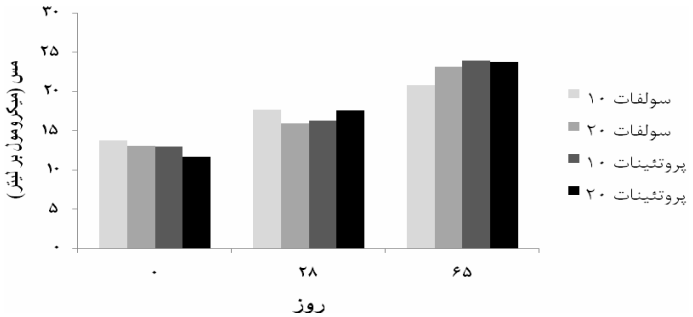
صفت	مس	روی	آهن	سرولوپلاسمین	میانگین خوراک مصرفی
منبع مس					
سولفات	۱۹/۵۶	۱۵/۰۳	[a]۱۲۵/۱۰	[b]۱۱/۰۸	۱/۴۳
پروتئینات	۲۰/۳۸	۱۳/۹۷	[b]۱۱۱/۶۰	[a]۱۴/۳۶	۱/۳۵
SEM	۰/۷۸	۰/۹۴	۵/۱۸	۰/۵۵	۰/۰۴
P	۰/۵۱	۰/۴۱	۰/۰۴	۰/۰۰۱۲	۰/۱۳
سطح مس					
۱۰ (میلی گرم در کیلوگرم)	۱۹/۹	۱۴/۳۷	۱۱۸/۶۹	[a]۱۲/۱	۱/۳۷
۲۰ (میلی گرم در کیلوگرم)	۲۰/۰۸	۱۴/۵۲	۱۱۵/۸۴	[a]۱۳/۳	۱/۴۰
SEM	۰/۷۷	۰/۹۴	۵/۱۴	۰/۵۵	۰/۰۴
P	۰/۸۸	۰/۹۴	۰/۸۳	۰/۱۸	۰/۵۷
برهم‌کنش سطح مس × منبع مس P	۰/۷۷۱۷	۰/۹۰	۰/۹۱۳۳	۰/۸۹	۰/۴۹
تیمار					
سولفات ۱۰	۱۹/۶۲	۱۴/۸۵	۱۲۵/۱۶	[c]۱۰/۵۹	۱/۴۰
سولفات ۲۰	۱۹/۵۱	۱۵/۲۶	۱۲۵/۰۲	[bc]۱۱/۵۸	۱/۴۳
پروتئینات ۱۰	۲۰/۱۳	۱۳/۹۴	۱۱۲/۸۷	[ab]۱۳/۵۹	۱/۳۵
پروتئینات ۲۰	۲۰/۶۴	۱۴/۰۰	۱۱۰/۳۴	[a]۱۵/۲۱	۱/۳۷
SEM	۱/۱۰	۱/۳۳	۷/۴۱۷	۰/۷۸	۰/۰۵
P	۰/۸۹	۰/۸۶	۰/۱۹۱۷	۰/۰۰۸	۰/۷۸

اعداد با حروف متفاوت در ستون‌ها نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در $P < ۰/۰۵$ می باشد.

بدون توجه به مقدار مکمل مس، تیمار پروتئینات نسبت به تیمار سولفات میزان مس پلاسمایی بیشتری را سبب شد اما این اختلاف معنی‌دار نبود. خلاف این روند در مورد روی و آهن رخ داد با این تفاوت که تنها کاهش میزان آهن پلاسمایی در تیمارهای دارای مس پلاسمایی بالاتر (مس پروتئینات) معنی دار بود ($P<۰/۰۵$). در یک بررسی که برای تعیین اثر مس بر وضعیت مس پلاسما در بزهای کشمیری انجام شد، افزایش مس پلاسما در تمام گروه های دریافت کننده سطوح متفاوت مس گزارش گردید و مشابه نتایج پژوهش حاضر در پایان دوره ۶۰ روزه آن آزمایش نیز تفاوت معنی‌داری در بین گروه ها نشان داده نشد (Zhang et al., 2008). نتایج مشابهی نیز در بز گزارش شده است (Solaiman et al., 2006). علاوه براین، نشان داده شده که مس پلاسما مستقل از مس دریافت شده از راه غذا است و جز در موارد دریافت کننده سطوح بالاتر از۶۰۰ میلی گرم در روز تفاوت آماری معنی‌داری در میزان مس پلاسمای بزهای دریافت کننده مقادیر مختلف مس وجود ندارد (Solaiman et al., 2001).

نتایجی مشابه این در گاوهای نر اخته نیز گزارش شده است (Engle & Spears, 2000). از سوی دیگر، نشان داده شده است که سطح پلاسمایی مس در گوساله‌های دریافت کننده دو مکمل سولفات مس و مس‌لایزین مشابه است (Kegley & Spears, 1994).

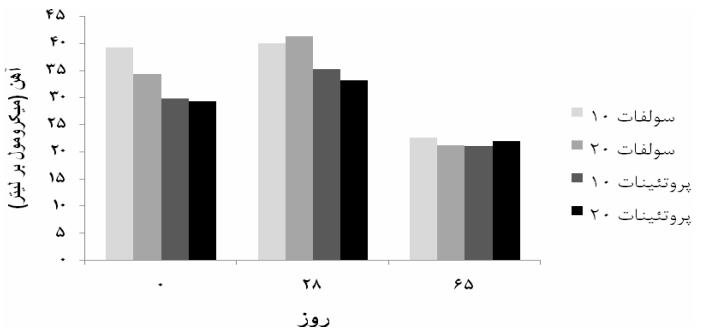
نتایج پژوهش حاضر با گزارش های محققین یادشده سازگاری دارد، اما با نتایج Eckert و همکاران (۱۹۹۹) که گزارش کردند سه سطح ۱۰، ۲۰ و ۳۰ پی‌پی‌ام مس (به شکل سولفات و پروتئینات) سبب افزایش سطح مس پلاسمایی در میش‌ها نمی شود، سازگاری ندارد.



شکل ۱: اثر تیمار مس بر غلظت مس پلاسمایی بره های نر مهربان در روزهای مختلف نمونه گیری

همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود، میزان مس پلاسما از آغاز تا روز ۶۵ آزمایش روبه افزایش است. در هیچ یک از روزهای نمونه‌گیری تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه ها وجود نداشت. اگرچه مس‌پروتئینات نتایج بهتری داشت ولی نمی توان در ایجاد سطح پلاسمایی مس بین این دو منبع تفاوت چندانی قائل شد. البته به نظر می رسد افزایش چشمگیر غلظت مس پلاسما در روز ۶۵ نسبت به شروع آزمایش در تمام گروه ها بیانگر محدودیت ظرفیت کبد برای ذخیره مس اضافی است. ضمن این که دفع مازاد مس از راه صفرا و باز جذب مجدد مس صفراوی علاوه بر مس موجود در جیره غذایی موجب افزایش سطح پلاسمایی مس می شود و از سوی دیگر بر رقابت مس با جذب روده ای دیگر عناصر معدنی می افزاید (Underwood & Suttle, 1999). دامنه طبیعی مس در پلاسمای نشخوارکنندگان ۱۵-۹ میکرومول برلیتر است (Suttle, 1994). آن گونه که در شکل ۱ دیده می شود میزان مس در پلاسمای بره‌های پژوهش حاضر از دامنه طبیعی بالاتر رفته و تا حدود ۲۵ میکرومول بر لیتر نیز رسیده است. هرچند با این سطح از مس پلاسمایی هیچ یک از نشانه های بالینی یا آزمایشگاهی مسمومیت با مس مانند همولیز یا وجود هینزبادی در گویچه های سرخ و ضعف، بی‌اشتهایی، رنگ پریدگی مخاطات، هموگلوبینوری و زردی در بره‌ها دیده نشد و هیچ‌یک از آن ها در دوره آزمایش تلف نشدند. مشاهدات پژوهش حاضر در مورد افزایش سطح پلاسمایی مس با نتایج Sansinanea و همکاران (۱۹۹۳) همخوانی دارد اما با نتایج Eckert و همکاران (۱۹۹۹) همخوانی ندارد. از آنجایی که علاوه بر مس جیره، حساسیت دام ها در برابر با مس را به گونه، ژنتیک و سن نیز نسبت می دهند (Bremner, 1998)، دلیل ناهمخوانی متابولیسم مس در یافته های پژوهش حاضر با گزارش Eckert و همکاران که در آزمایش خود با با مقادیر۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم در کیلوگرم مس به صورت سولفات و پروتئینات در سطح پلاسمایی مس میش های بالغ اختلافی نیافتند را شاید بتوان تفاوت در سن، جنس یا حتی اختلاف نژادی گوسفندان مورد استفاده در این دو پژوهش نسبت داد. نتایج مربوط به اثر سطح و نوع مکمل مس بر سرولوپلاسمین سرم در جدول ۲ ارائه شده است. اثر نوع مس بر میزان سرولوپلاسمین سرم معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۱$) اما اثر سطح مس معنی‌دار نشد ($P > ۰/۰۵$). بنابراین تیمارهای دریافت کننده مکمل پروتئینات مس، سرولوپلاسمین بالاتری در سرم خود داشتند ($P < ۰/۰۱$). برهم‌کنش سطح × منبع و همچنین تیمار × روز معنی‌دار نشد ($P > ۰/۰۵$). در مقایسه میانگین تیمارها، تیمار پروتئینات۲۰ بیشترین میزان سرولوپلاسمین را سبب گردید ($P < ۰/۰۱$). Eckert و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند که میش‌های دریافت کننده پروتئینات مس پس از ۲۸ روز مقدار فعالیت سرولوپلاسمین بالاتری نسبت به میش‌های دریافت کننده سولفات مس

داشتند (P > ۰/۱). هرچند در پایان آزمایش ۷۳ روزه این محققین، تیمارهای دریافت کننده پروتئینات مس بطور معنی‌داری سرولوپلاسمین بالاتری داشتند (P < ۰/۰۵). Senthilkumar و همکاران (۲۰۰۹) و Turnlund و همکاران (۲۰۰۴) نتایج مشابهی گزارش کردند که با نتایج تحقیق حاضر سازگاری دارند. مس در ارتباط با سرولوپلاسمین است و از اینرو در گوسفند نیز مانند سایر دام ها فعالیت سرولوپلاسمین همبستگی نزدیکی با مس سرم (r = ۰/۹۲) دارد (Blakley & Hamilton, 1985). در تحقیق حاضر همبستگی معنی‌داری بین میزان مس پلاسما و سرولوپلاسمین سرم دیده نشد (P > ۰/۱، r = -۰/۲۲۶). بنابراین به نظر می رسد رابطه مس پلاسما با سرولوپلاسمین سرم همواره یک رابطه خطی نباشد و افزایش مس تا یک مرزی سبب افزایش سرولوپلاسمین می‌گردد و پس از آن ممکن است اثر منفی بر فعالیت آن بگذارد. همبستگی منفی بین مقادیر مس و آهن سرم گزارش شده است (Mohri, et al., 2005). در پژوهش حاضر نیز همبستگی منفی معنی‌داری (P < ۰/۰۰۱) بین سطوح پلاسمایی مس و آهن سرم مشاهده شد (r = -۰/۶۰۴) که با نتایج Mohri و همکاران (۲۰۰۵) سازگاری دارد. مس در بکارگیری آهن در بدن نقش کلیدی دارد ولی مکانیسم آن بخوبی شناخته نشده است. سرولوپلاسمین پروتئین اصلی حاوی مس در پلاسمای خون است که می تواند عملکرد فرواکسیدازی داشته باشد و بنابراین آزاد شدن آهن از فریتین در مخاط روده کوچک و سلول های کبدی و همچنین اتصال آهن به ترانسفرین را تسهیل می نماید. از سوی دیگر، پروتئین های اتصالی مسئول تنظیم آهن (Iron-Responsive Element Binding Protein) که به غلظت های آهن آزاد حساس هستند، آهن را از ترانسفرین دریافت و در مسیرهای ساخت هموگلوبین یا ذخیره آهن توزیع می نمایند (Underwood & Suttle, 1999). بنابر آنچه در بالا آمد، افزایش آهن پلاسمای بره ها در روز ۲۸ قابل توجیه می باشد. بعلاوه، با نگاهی به روند تغییرات آهن پلاسمایی (شکل ۲) به نظر می رسد گوسفندان احتمالا دچار کمبود نسبی مس بوده اند زیرا در مقایسه با روز صفر به سطوح و منابع مختلف مس پاسخ داده اند و متابولیسم آهن بهبود یافته است ولی در ادامه پروتئین های اتصالی مسئول تنظیم آهن موجب هدایت آهن اضافی پلاسما به محل های ساخت هموگلوبین یا ذخیره آهن شده است. پایین بودن آهن پلاسما در روز ۶۵ در تمامی گروه ها علاوه بر تایید این موضوع می تواند بیانگر رخ ندادن همولیز هنگام نمونه برداری و یا در بدن گوسفندان دریافت کننده مقدار ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم مکمل از منابع آلی و معدنی مس دراین آزمایش باشد. اگرچه ممکن است بتوان بخشی از کاهش در میزان آهن پلاسمایی در روز ۶۵ آزمایش (شکل ۲) را به تشدید برهم کنش مس با آهن به دلیل دفع مازاد مس بدن از راه صفرا و اضافه شدن مس صفراوی به مس موجود در جیره غذایی نسبت داد (Underwood & Suttle, 1999).



شکل ۲: اثر تیمار مس بر غلظت آهن پلاسمایی بره های نر مهربان در روزهای مختلف نمونه گیری

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود افزودن مکمل مس در سطوح پایین جیره ای (۱۰ و ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم مس) رابطه آنتاگونیستی با روی نشان نداده است که با نتایج مطالعه Eckert و همکاران

(۱۹۹۹) همخوانی دارد که نشان دادند مکمل مس به شکل سولفات یا پروتئینات در میش های دریافت کننده ی سطوح ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم در کیلوگرم مس تأثیری بر زیست فراهمی روی در طول دورهٔ ۷۳ روزه نداشته است. هرچند، Du و همکاران (۱۹۹۶) گزارش کرده بودند که موش های دریافت کنندهٔ مس پروتئینات یا مس لایزین غلظت کبدی آهن و روی بالاتری نسبت به تیمار دریافت کنندهٔ سولفات مس داشتند. مکمل مس (صرف نظر از سطح و نوع آن) اختلاف معنی داری بر متوسط خوراک مصرفی روزانه ایجاد نکرد که با نتایج Zervas و همکاران (۱۹۹۰) که بر روی بره های مبتلا به مسمومیت مزمن مس تحقیق کردند مطابقت دارد.

همچنین، Luginbuhl و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که ۱۰ یا ۳۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم ماده خشک، در طی ۸۸ روز بر متوسط خوراک مصرفی روزانه، بزغاله های از شیر گرفته شده تأثیری ندارد. نتایج مربوط به تجزیه تحلیل آماری فراسنجه های خون در روزهای صفر، ۷، ۱۴، ۲۸، ۵۷ و ۶۵ آزمایش در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳- اثر سطح و نوع مکمل مس بر فراسنجه های هماتولوژی بره های نر مهربان (روزهای صفر، ۷، ۱۴، ۲۸، ۵۷ و ۶۵)

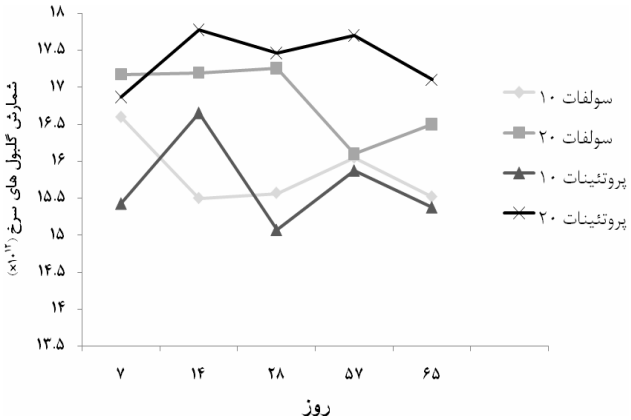
	RBC (×۱۰^۱۲)	PCV (درصد)	Hb (گرم بر دسی لیتر)	MCV (فمتولیتر)	RDWc (درصد)	MCH (پیکوگرم)	MCHC (میکرومول بر لیتر)
منبع مس							
سولفات	۲۰/۶۱	۳۳/۹۸	۱۲/۶۷	۲۳/۹	۲۵/۲۸	۷/۰۴	۲۹/۳۷
پروتئینات	۲۰/۶۰	۳۴/۷۶	۱۲/۵۱	۲۴/۹۵	۲۴/۸۳	۷/۱۴	۲۹/۲۴
SEM	۰/۴۰	۰/۴۹	۰/۱۶	۰/۴۸	۰/۳۹	۰/۱۴	۰/۳۵
P	۰/۷۳	۰/۲۵	۰/۵۱	۰/۱۳	۰/۵۶	۰/۷۳	۰/۸۹
سطح مس							
۱۰ (میلی گرم در کیلوگرم)	b۱۹/۲۹	b۳۳/۰۷	b۱۲/۰۱	۲۴/۵۳	۲۵/۰۶	۷/۱۵	۲۹/۷۳
۲۰ (میلی گرم در کیلوگرم)	a۲۰/۸۱	a۳۵/۵۸	a۱۳/۱۲	۲۴/۳۲	۲۵/۰۵	۷/۰۲	۲۸/۹۰
SEM	۰/۴۰	۰/۴۹	۰/۱۷	۰/۴۸	۰/۳۹	۰/۱۴	۰/۳۵
P	۰/۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۵	۰/۷۵	۰/۸۴	۰/۶۴	۰/۱۱
برهم‌کنش سطح × منبع P	۰/۶۶	۰/۸۳	۰/۶۱	۰/۳۳	۰/۵۱	۰/۹۸	۰/۸۶
تیمار							
سولفات۱۰	b۱۹/۲۲	b۳۲/۷۷	b۱۲/۰۲	۲۳/۶۷	۲۵/۵۳	۷/۰۸	۲۹/۸۵
سولفات۲۰	a۲۱/۸۸	a۳۵/۱۱	a۱۲/۹۵	۲۴/۱۳	۲۵/۰۳	۶/۹۹	۲۸/۸۹
پروتئینات۱۰	b۱۹/۳۵	b۳۳/۳۷	b۱۲/۰۰	۲۵/۴۰	۲۴/۵۵	۷/۲۳	۲۹/۵۹
پروتئینات۲۰	a۲۱/۷۵	a۳۶/۰۵	a۱۳/۲۸	۲۴/۵۰	۲۵/۰۸	۷/۰۶	۲۸/۹۱
SEM	۰/۵۷	۰/۷۰	۰/۲۴	۰/۶۷	۰/۵۵	۰/۱۹	۰/۴۶
P	۰/۰۴	۰/۰۰۷	۰/۰۳	۰/۳۴	۰/۸۳	۰/۹۵	۰/۴۱

اعداد با حروف متفاوت در ستون‌ها نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در $P < ۰/۰۵$ می باشد.

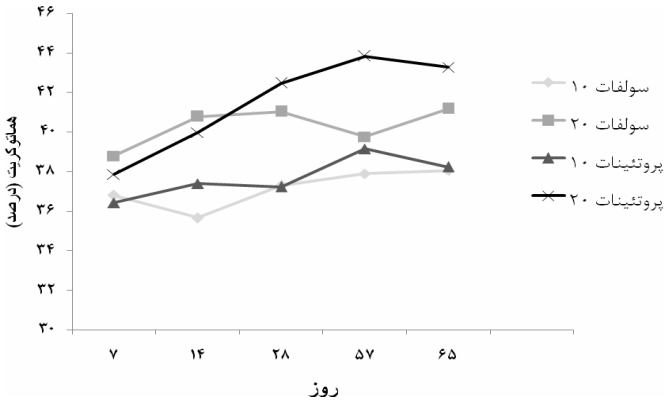
RBC (تعداد گویچه های سرخ)، PCV (حجم فشرده سلولی یا هماتوکریت)، Hb (هموگلوبین)، MCV (متوسط حجم سلول)، RDWc (معیار تغییرات قطر گویچه های سرخ)، MCH (متوسط هموگلوبین سلول) و MCHC (متوسط غلظت هموگلوبین سلول).

اثر منبع مس بر هیچکدام از فراسنجه های هماتولوژی معنی‌دار نبود. اثر سطح مس بر فراسنجه‌هایی چون تعداد گویچه های سرخ (RBC)، هماتوکریت (PCV) و هموگلوبین (Hb) معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$). تیمارهای پروتئینات۲۰ و سولفات۲۰ بیشترین مقدار را در تعداد گویچه های سرخ، هماتوکریت و هموگلوبین داشتند و تفاوت آماری معنی‌داری با تیمارهای سولفات۱۰ و پروتئینات۱۰ نشان دادند ($P < ۰/۰۵$). اثر متقابل بین تیمار و روز نمونه-گیری در مورد هیچ کدام از فراسنجه ها معنی‌دار نبود. همچنین اثر متقابل سطح × نوع مکمل مس در هیچ-کدام از فراسنجه های خونی معنی‌دار نشد. با وجود این، داده‌های مربوط به روزهای نمونه‌گیری بطور جداگانه به صورت نمودار نشان داده شده اند تا روند تغییرات

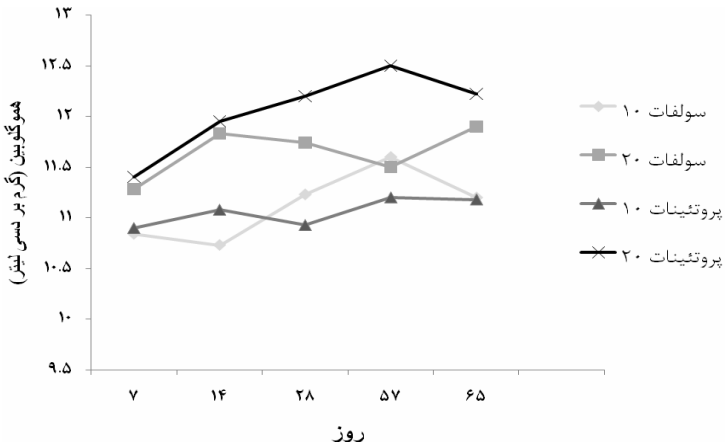
میانگین این فراسنجه ها در روزهای نمونه گیری مشخص گردد. شکل های ۳، ۴ و ۵ به ترتیب نشان دهنده روند تغییرات تعداد گویچه های سرخ، هماتوکریت و هموگلوبین در طول روزهای آزمایش هستند.



شکل ۳: اثر تیمار مس بر تعداد گلبول های سرخ بره های نر مهربان در روزهای مختلف نمونه گیری



شکل ۴: اثر تیمار مس بر هماتوکریت خون بره های نر مهربان در روزهای مختلف نمونه گیری



شکل ۵: اثر تیمار مس بر هموگلوبین خون بره های نر مهربان در روزهای مختلف نمونه گیری

محدوده طبیعی تعداد گویچه های سرخ، هموگلوبین و هماتوکریت برای گوسفند به ترتیب $۱۰^{۱۲}$×۱۵-۹ در میلی لیتر، ۱۵-۹ گرم بر دسی‌لیتر و ۴۵-۲۷ درصد گزارش شده است (Jain, 2000). آهن یکی از عناصر با

اهمیت در خونسازی است که در هموگلوبین نقش ساختمانی و کوفاکتوری دارد، فقر آهن در بدن سبب کم خونی میکروسیتیک (گویچه های سرخ کوچک همراه با کاهش میزان هماتوکریت و هموگلوبین خون) می گردد (Jain, 2000). وجود مس در ساختار و کارکرد سرولوپلاسمین نقش این عنصر را در متابولیسم آهن و در نتیجه خونسازی برجسته می‌نماید. از سوی دیگر، مسمومیت با مس موجب کمخونی همولیتیک و کاهش در مقادیر فراسنجه‌هایی چون تعداد گویچه‌های سرخ، هموگلوبین و هماتوکریت می‌گردد (Fenger et al, 1992). در تحقیق حاضر هر چند که افزودن مس در سطح ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در ابتدا سبب افزایش هماتوکریت، تعداد گویچه‌های سرخ و هموگلوبین شد ولی کاهش هماتوکریت، تعداد گویچه‌های سرخ و هموگلوبین از روز ۵۷ به بعد خودنمایی می‌کند. با وجود این، میزان این فراسنجه‌ها از حدود طبیعی خارج نگردید. در پژوهشی نشان داده شده است که بره‌های دریافت کننده سطح ۱۵ میلی گرم در کیلوگرم مس (بدون مکمل گوگرد و مولیبدن) به طور معنی‌داری تعداد گویچه‌های سرخ، هموگلوبین و هماتوکریت بالاتری دارند ولی این میزان مس در روزهای ۷۹ و ۸۴ آزمایش موجب تلف شدن دو رأس از بره‌ها بدلیل مسمومیت با مس شد (Kline et al., 1971).

شایان توجه است که بر اساس این گزارش مقدار PCV و Hb این دو بره تا روز ۵۶ آزمایش در محدوده نرمال بوده و تنها ۴ تا ۵ روز پیش از تلف شدن، نشانه های مسمومیت در آن ها دیده شده است که این خود بر بروز ناگهانی روند همولیتیک در موارد مسمومیت تاکید دارد. نتایج تحقیق ما با نتایج Ekert و همکاران (۱۹۹۹) از این رو سازگاری دارد که نوع مکمل مس از نظر مقادیر هموگلوبین و هماتوکریت تفاوتی بین گروه ها ایجاد نکرد. از سوی دیگر میزان بالای مولیبدن در یونجه برداشت شده از مزرعه دانشگاه بوعلی سینا واقع در منطقه دستجرد استان همدان (جدول۱) بیانگر این واقعیت است که مشاهدهٔ نشانه های کمبود مس در بره های منطقه می تواند از نوع ثانویه ناشی از مولیبدن بالای علوفه این منطقه باشد. میزان مولیبدن در جیرهٔ پایه در این پژوهش، نسبت مس به مولیبدن (Cu:Mo) حدود ۵:۱ را ایجاد نمود که نزدیک به نسبت ۴:۱ است که در برخی گزارشات نسبت مطلوبی اعلام شده است. اما تیمارهای دریافت کنندهٔ سطح ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم مس، مقادیر مس بسیار بالاتر از این نسبت دریافت می کردند (حدود ۱۸:۱). گزارش شده است که حداکثر نسبت قابل تحمل مس به مولیبدن برای گوسفند که مانع از مسمومیت می شود ۱۰:۱ می باشد (Berger, 2006) و تیمارهای دریافت کنندهٔ سطح ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم مس نسبت حدود ۱۱:۱ دریافت می کردند. با توجه به این مطلب انتظار می رود گوسفندان طرح حاضر حداقل در تیمارهای دریافت کنندهٔ سطح ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم مس می بایست دچار مسمومیت می شدند اما همانطور که پیش تر نیز اشاره شد هیچ یک از نشانه های بالینی و آزمایشگاهی مسمومیت مس مشاهده نشد. البته برهم کنش مس با مولیبدن، گوگرد و آهن پیچیده تر از آن است که به راحتی بتوان وضعیت آن را در دام های یک منطقه بررسی نمود یا نتایج بدست آمده را بطور قطعی تفسیر نمود. احتمالاً یکی دیگر از دلایل بروز کمبود مس در منطقه یا یکی از دلایلی که در تحقیق حاضر نشانه های مسمومیت مشاهده نشد می تواند غلظت بالای آهن در یونجه و جیرهٔ پایه باشد. نسبت آهن به مس (Fe:Cu) جیره اگر بیش از ۱۰۰ باشد علامت خطر کمبود مس است و نسبت Fe:Cu جیره بین ۵۰ و ۱۰۰ می تواند نشانه بروز مشکل در آینده باشد. حتی با وجود این، محدودیت های دیگری وجود دارد زیرا اثرات مولیبدن و آهن را نمی توان به سادگی با هم ترکیب کرد زیرا این دو به صورت افزایشی عملی نمی کنند (Underwood & Suttle, 1999). با توجه به نسبت های مس به مولیبدن و آهن به مس در یونجه و علوفه مصرفی دام ها پیش از آغاز آزمایش و یافته های این پژوهش، احتمال می رود گوسفندان پیش از شروع دورهٔ آزمایشی در درجاتی با کمبود ثانویه مس روبرو بوده اند و بنابراین مکمل مس سبب بهبود متابولیسم آهن در بدن و افزایش برخی فراسنجه ها از جمله شمارش گویچه های سرخ، هموگلوبین و هماتوکریت تا روز ۵۷ آزمایش شده باشد. به نظر می رسد پس از این افزایش و از روز ۵۷ به بعد ظرفیت کبد برای پذیرفتن و متابولیسم مس اضافی

کاهش یافته و بنابراین و یا به دلیل تشدید بر هم کنش مس و آهن تا پایان آزمایش فراسنجه های اشاره شده رو به کاهش گذاشتند.

نتیجه گیری کلی

افزودن مس در سطوح ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک به جیره حاوی ۸/۶ میلی گرم مس در کیلوگرم ماده خشک در یک دوره ۶۵ روزه در بره های نر مهربان با وجود افزایش دادن سطح مس پلاسما موجب خروج فراسنجه های خون از دامنه نرمال نشد و نشانه های بالینی و هماتولوژی مسمومیت با مس دیده نشد.

با توجه به برخی یافته های متناقض و گاهی مخالف بدست آمده از پژوهش حاضر، به نظر می رسد موارد اختلاف باید به وسیله تحقیقات وسیع تر و دامنه دارتری در حضور تیمار شاهد ارزیابی گردد.

سپاسگزاری

بخشی از هزینه های این پژوهش از محل پژوهانه شماره ۲۱۶۸-۳۲ دانشگاه بوعلی سینا تامین شده است. نگارندگان بدینوسیله از زحمات سرکار خانم مهندس ابوالقاضی کارشناس محترم دستگاه جذب اتمی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا قدردانی می نمایند.

REFERENCES

1. Berger, L.L. (2006) "Salt and trace minerals for livestock, poultry and other animals". Salt institute. Alexandria, Virginia.
2. Blakley, B.R. and Hamilton, D.L. (1985). "*Ceruloplasmin as an indicator of copper status in cattle and sheep*". Can J Comp Med. 49, 405-408.
3. Bremner, I., (1998) Manifestations of copper excess. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67 (Suppl.), 1069S–1073S.
4. Du, Z., Hemken, R.W., Jackson, J.A. & Trammell, D.S. (1996) Utilization of copper in copper proteinate, copper lysine, and copper sulfate using the rat as an experimental model. *Journal of Animal Science*, 74,1657-1663.
5. Eckert, G.E., Greene, L.W., Carstens, G.E. & Ramsey, W.S. (1999) Copper status of ewes fed increasing amounts of copper from copper sulfate or copper proteinate. *Journal of Animal Science*, 77, 244-249.
6. Engle, T.E. & Spears, J.W. (2000) Effects of dietary copper concentration and source on performance and copper status of growing and finishing steers. *Journal of Animal Science*, 78, 2446-2451.
7. Fenger, C.K., Hoffsis, G.F. & Kociba, G.J. (1992) Idiopathic immune-mediated hemolytic anemia in a calf. *Journal of of the American Veterinary Medical Assocciation*, 201, 97-99.
8. Jain, N.C. (2000) Schalm's veterinary hematology 5th ed. (pp. 1075-1084) Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
9. Kegley, E.B. & Spears, J.W. (1994) Bioavailability of feed-grade Cu sources (oxide, sulfate, or lysine) in growing cattle. *Journal of Animal Science*, 72, 2728-2734.
10. Kincaid, R. L., Blauwiekel, R. M. & Cronrath, J. D. (1986) Supplementation of copper as copper sulfate or copper proteinate for growing calves fed forages containing molybdenum. *Journal of Dairy Science*, 69,160–163.
11. Kline, R.D., Hays, V.W. & Cromwell, G.L. (1971) Effects of copper, molybdenum and sulfate on performance, hematology and copper stores of pigs and lambs. *Journal of Animal Science*, 33 (4), 771-779
12. Luginbuhl, J.M., Poore, M.H., Spears, J.W. and Brown, T.T. (2000) "Effect of dietary copper level on performance and copper status of growing meat goats". Sheep Goat Res. J. 16, 65-71
13. Mohri, M., Jannatabadi, A.A. & Aslani, M.R. (2005) Studies on haemoglobin polymorphism of two breeds of Iranian sheep and its relationship to concentrations of iron, copper, haemoglobin, haematocrit and RBC number. *Veterinary Research Communications*, 29, 305-312.
14. NRC (2007) *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids and New World Camelieds.* National Research Council, National Academies Press, Washington, USA.
15. Sansinanea A. S., Silvia I., Cerone DVM., Quiroga M. & Auza N. (1993) Antioxidant capacity of erythrocytes from sheep chronically poisoned by copper. *Nutrition Research*, 13, 891-899
16. SAS (2004) User's guide: Statistics, Version 9.1. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
17. Senthilkumar P., Nagalakshmi D., Ramana Reddy Y. & Sudhakar K. (2009) Effect of different level and source of copper supplementation on immune response and copper dependent enzyme activity in lambs. *Tropical Animal Health and Production*, 41, 645-653.

18. Solaiman, S.G., Maloney, M.A., Qureshi, M.A., Davis, G. & D'Andrea, G. (2001) Effects of high copper supplements on performance, health, plasma copper and enzymes in goats. *Small Ruminant Research*, 41, 127-139.
19. Solaiman, S.G., Shoemaker, C.E. and D'Andrea, G.H. (2006) The effect of high dietary Cu on health, growth performance, and Cu status in young goats. *Small Ruminant Research*, 66, 85-91.
20. Suttle, N.F. (1994) Meeting the copper requirements of ruminants. *Recent Advances in Animal Nutrition* (pp. 172-188). Nottingham, Nottingham University Press.
21. Schosinsky K. H., Lehmann H. P. and Beeler M. F. (1974) Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride. Clin. Chem.20/12, 1556-1563.
22. Turnlund, J.R., Jacob, R.A., Keen, C.L., Strain, J.J., Kelly, D.S., Domek, J.M., Keyes, W.R., Ensunsa, J.L., Lykkesfeldt, J. and Coulter, J. (2004). "*Long-term high copper intake: effects on indexes of copper status, antioxidant status, and immune function in young men*". American Journal of Clinical Nutrition. 79, 1037-1044.
23. Underwood E.J. & Suttle N.F. (1999) *The mineral nutrition of livestock* (3rd ed.) (Chapter 11). New York, CABI Publishing Company.
24. Zervas, G., Nikolaou, E. and Mantzios, A. (1990) "Comparative study of chronic copper poisoning in lambs and young goats". Anim. Prod. 50, 497-506
25. Zhang, W., Wang, R., Kleemann, D.O., Lu, D., Zhu, X., Zhang, C. & Jia, Z. (2008) Effects of dietary copper on nutrient digestibility, growth performance and plasma copper status in cashmere goats. *Small Ruminant Research*, 74, 188-193