



Ekstra zink og kobber til grise i fravænningsperioden? – Bag om de fysiologiske mekanismer

Dorthe Carlson & Hanne Damgaard Poulsen
Afd. for Husdyrernæring og Fysiologi, Forskningscenter Foulum

Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri
Danmarks JordbrugsForskning

Siden sidst i 1980'erne har flere danske og udenlandske undersøgelser vist, at en høj dosering af zinkoxid (2500 mg zink/kg foder) i de første 2 uger efter fravæning har en gavnlig effekt på foderoptagelse, tilvækst samt tilfælde af fravænningsdiarré. Imidlertid er den tilladte koncentration af zink i svinefoder maksimalt 250 mg/kg, og den anbefalede norm ligger på 100 mg/kg.

Kobber i høje koncentrationer til unge grise har også i flere undersøgelser, siden sidst i 1950'erne, vist sig at have en gavnlig effekt på grises trivsel i form af forøget tilvækst. Det har derfor igennem en årrække været almindeligt at tilsætte ekstra kobber til smågrise-foder (175 mg/kg) indtil grisenes 16. leveuge. Dette er dog under revision. Den anbefalede norm for kobber ligger på 6 mg/kg foder.

Det har således længe været kendt, at et ekstra tilskud af zink og kobber har en vækststimulerende og diarréhæmmende effekt på smågrise. Men selv om der er udført talrige forsøg og undersøgelser, har man endnu ikke et præcist kendskab til, hvorfor zink og kobber har denne effekt. Det gennemførte forsøg havde derfor til formål at undersøge de fysiologiske effekter af høj zink- og kobber-dosering til fravænnede grise.

Med en større viden om baggrunden for de positive effekter af et ekstra tilskud af zink og kobber samt viden om dyrenes fysiologiske behov har man et bedre grundlag for at træffe de rigtige beslutninger angående anbefalede normer for disse spormineraler i fravænningsfoder.

Essentielle næringsstoffer

Zink og kobber er essentielle næringsstoffer, som har stor betydning for mange biokemiske og fysiologiske processer i kroppen. Zink vides at være særlig vigtig for dyr i kraftig vækst. Det labile zinkdepot i kroppen kan hurtigt opbruges, og der vil derfor ved for ringe tilførsel med foderet hurtigt opstå mangel på zink.

Nogle af de første symptomer på zinkmangel er lav foderoptagelse, dårlig tilvækst samt diarré. Det er påfaldende, at disse symptomer er af samme type som de symptomer, der undgås ved en høj zinkdosering til fravænnede grise. Det anses derfor som muligt, at de positive effekter af en høj zinkdosering kan forklares ved, at grisene undgår at udvikle symptomer på zinkmangel lige efter fravæning, hvor foderoptagelsen og dermed zinkoptagelsen er meget lille. Situationen for de fravænnede grise kan formentlig sidestilles med situationen i udviklingslande, hvor underernærede børn ofte lider af diarré. Mange undersøgelser har vist, at denne form for ernæringsbetinget diarré kan behandles (eller forebygges) med et ekstra zinktilskud til disse børn.

Mange af de gennemførte forsøg med kobber har vist, at kobber har størst effekt hos helt unge grise, og at effekten falder med stigende alder. Det er muligt, at effekten af kobber skyldes en systemisk effekt, og at der også for kobber kræves en højere koncentration i foderet umiddelbart efter fravæning for at kompensere for den meget lave foderoptagelse.



Tarmepitelet spændes op i Ussing-kammer

Som følge af disse antagelser blev nærværende forsøg udført med henblik på at undersøge effekten af høj zink- og kobberdosering på smågrisenes zink- og kobberstatus. De fysiologiske effekter, der blev undersøgt, var bl.a. tarmepitelets (tarmcellelagets) transportegenskaber *in vitro* samt blodets indhold af zink, kobber, alkalisk fosfatase, metallothionein mRNA og IGF-I (Insulin-like growth factor-I). Disse er alle faktorer, der forventes påvirket af grisenes zink- og/eller kobberstatus.

Forsøgsbeskrivelse

Forsøget omfattede 48 grise (6 kuld á 8 grise), som ved fravæning (28 dage) blev fordelt på 4 hold, se tabel 1, og efterfølgende aflivet 5-7 dage efter fravæning. Der blev udtaget blodprøver umiddelbart før og tarmepitelprøver umiddelbart efter aflivningen.

Zinkkilden, der blev anvendt var ZnO, og kobberkilden var CuSO₄. For alle grise blev den daglige foderoptagelse og tilvækst målt. Desuden blev det noteret hver gang en af forsøgsgrisene udviste behandlingskrævende diarré (baseret på gødningskonsistens).

Der blev udført følgende kemiske analyser på blodprøverne:

- zink- og kobberkoncentration i plasma
- alkalisk fosfatase aktivitet i plasma
- metallothionein mRNA niveau i lymfocytter
- IGF-I koncentration i serum

Desuden blev Ussing-kammer teknikken anvendt til at undersøge tarmepitelets følsomhed overfor

Tabel 1 Forsøgsopstilling

Hold	1.	2.	3.	4.
Antal grise	12	12	12	12
Zink, mg/kg foder	100	100	2500	2500
Kobber, mg/kg foder	30	175	30	175

Ussing-kammer teknikken

Ussing-kammer teknikken, se figur 1, kan anvendes til at undersøge funktionen af epitelvæv (f.eks fra tarmen) *in vitro*. Princippet bag teknikken er, at epitelet isoleres fra dyret umiddelbart efter aflivning og spændes op imellem to halvdele af kammeret. Epitelet holdes i live i 1-3 timer efter slagtning ved at holde systemet konstant på 38°C, ved konstant tilførsel af ilt samt ved at væsken, der omgiver vævet, indeholder næringsstoffer i koncentrationer, der svarer til de koncentrationer, der findes rundt om cellerne inde i det levende dyr. I perioden, hvor epitelets funktioner holdes i live, undersøges specifikke transportegenskaber hos det isolerede væv. Der anvendes 2 elektroder til at måle potentialeforskellen over epitelet (mV/cm²) og 2 andre elektroder til at måle strømstyrken (mA/cm²). Strømstyrken kan bruges som et indirekte mål for den aktive transport af ioner over tarmepitelet.

Figur 1
Ussing-kammer opstilling



modelstoffer, der forårsager kloridsekretion. De 2 modelstoffer, der blev anvendt, var serotonin (5-hydroxytryptamin (5-HT)) og theophyllin. Ved at anvende disse modelstoffer simuleres situationen, hvor toksiner fra sygdomsfremkaldende bakterier trænger ind i cellen og sætter gang i en kaskadereaktion, der resulterer i diarré (øget kloridsekretion).

Effekt på produktionsresultater

Den statistiske analyse af data-materialet viste ingen signifikante effekter af vekselvirkninger imellem zink og kobber på de resultater, der præsenteres i det følgende. Det er derfor muligt at angive re-

sultaterne særskilt, som hhv. effekter af zink og effekter af kobber.

Forsøget bekræftede en positiv effekt af den høje zinkdosering på produktionsresultaterne i form af forbedret tilvækst og forøget foderoptagelse. Tilvæksten i løbet af de 5-7 dage, hvor forsøget stod på, var således gennemsnitligt -32 g/dag og +80 g/dag for grisene på hhv. lav og høj zinkdosering. Desuden var den gennemsnitlige foderoptagelse 160 g/dag og 216 g/dag for grisene på hhv. lav og høj zinkdosering. Antallet af grise, der krævede behandling mod diarré, blev halveret som følge af den høje zinkdosering. Til gengæld viste det samme forsøg ingen effekt af den høje kobberdosering på disse produktionsegenskaber.

Effekt på grisenes zink- og kobberstatus

Tabel 2 viser effekten af zinkdosering på smågrisenes zink- og kobberstatus 5-7 dage efter fravæning. Der er en tydelig og statistisk sikker stigning i koncentrationen af zink i plasma som følge af den høje zinkdosering. Dette viser, at den høje zinkdosering resulterer i forøget koncentration af zink, der cirkulerer i kroppen. I dette såvel som i tidligere danske og udenlandske forsøg blev det fundet, at de forbedrede produktionsresultater som følge af høje zinkdoseringer hænger sammen med en stigning i koncentrationen af zink i plasma. Samlet set indikerer resultaterne, at en koncentration på ca. 1,5 mg zink/l plasma giver det bedste respons i form af forbedrede produktionsresultater. Dette tyder på, at effekten af zink skyldes en systemisk effekt, altså at funktionen af zink foregår inde i kroppen efter, at zinkionerne er absorberet, i modsætning til at være en lokal effekt i tarmlumen på f.eks. tarmfloraen.

Som supplement til målingerne af zinkkoncentrationen blev alkalisk fosfatase samt metallothionein mRNA anvendt som mål for grisenes zinkstatus. Alkalisk fosfatase er et zinkafhængigt enzym, der traditionelt har været anvendt som et mål for dyr og menneskers zinkstatus. Resultaterne viste, at aktiviteten af enzymet var påvirket af den forøgede zinkkoncentration i foderet, se tabel 2, hvilket også støtter antagelsen om, at effekten af zink skyldes forbedret zinkstatus hos disse dyr.

Tabel 2. Effekt af zinkdosering på grisenes generelle zink- og kobberstatus målt vha. plasma zink, plasma kobber, plasma alkalisk fosfatase samt lymfocyt metallothionein (MT) mRNA

Zink, mg/kg foder	100	2500	p-værdi
Plasma zink (mg/l)	0,76	1,45	<0,0001
Plasma kobber (mg/l)	1,9	1,7	0,003
Plasma alkalisk fosfatase (U/l)	111	143	0,002
Lymfocyt MT mRNA ¹	0,0002	0,0001	0,25

¹værdierne er relative i forhold til en intern standard (18S rRNA)

Tabel 3. Effekt af kobberdosering på grisenes generelle zink- og kobberstatus målt vha. plasma zink, plasma kobber, plasma alkalisk fosfatase samt lymfocyt metallothionein (MT) mRNA

Kobber, mg/kg foder	30	175	p-værdi
Plasma zink (mg/l)	0,89	1,27	0,005
Plasma kobber (mg/l)	1,75	1,82	0,36
Plasma alkalisk fosfatase (U/l)	127	126	0,90
Lymfocyt MT mRNA ¹	0,0002	0,0002	0,76

¹værdierne er relative i forhold til en intern standard (18S rRNA)

Koncentrationen af metallothionein mRNA i lymfocytterne var til gengæld ikke påvirket af den forøgede koncentration af zink i foderet. Metallothionein er et protein, som er tilstede i stort set alle væv. Syntesen af proteinet induceres af zink og andre tungmetaller, og selve proteinet binder disse tungmetaller. En af metallothioneins hovedfunktioner er formentlig at fungere som et midlertidigt depot for disse mineraler. Baggrunden for at måle metallothionein mRNA i lymfocytter var, at udenlandske undersøgelser har vist, at dette mål kan være en god indikator for marginal zinkmangel hos mennesker. En forklaring på, hvorfor lymfocyt metallothionein mRNA ikke var påvirket af zinkdoseringen i dette forsøg på grise, er formentlig den korte forsøgsperiode på 5-7 dage, idet lymfocytternes livscyklus tager op til flere måneder. Lymfocyt metallothionein mRNA er derfor formentlig mere anvendelig som en langtidsindikator for et individs zinkstatus.

Den høje zinkdosering resulterede i reduceret kobberkoncentration i plasma. Dette viser, at der er vekselvirkninger i omsætningen af zink og kobber. Disse vekselvirkninger kan finde sted mange steder, f.eks. i tarmlumen (under nedbrydningen af foderet), under absorptionen (i tarmcellen), under transporten rundt i kroppen mv.

Tabel 3 viser effekten af høj kobberdosering på de samme parametre, som er vist i tabel 2. Det er interessant, at kobberkoncentrationen i plasma ikke blev påvirket af den høje kobberdosering. Dette tyder på, at ekstra kobber i

foderet ikke resulterede i en større absorption og cirkulation af kobber. Til gengæld viste resultaterne, at en høj kobberdosering resulterede i øget zinkkoncentration i plasma. Dette indikerer, at den høje kobberdosering resulterede i større absorption og cirkulation af zink. Vekselvirkningerne mellem zink og kobber, der ligger til grund for denne stigning i plasma zinkkoncentrationen, foregår sandsynligvis i tarmcellen. Zink og kobber konkurrerer om nogle af de samme bindings- og transportproteiner i tarmcellen, og ifølge litteraturen tyder det på, at kobber er stærkest i denne konkurrence. Hvis dette er tilfældet, vil det resultere i, at zink må vige pladsen for kobber på disse proteiner, og at zink derfor i større grad overføres fra tarmcellerne til blodbanen. Der var, som nævnt, ingen effekt af kobber på produktionsresultaterne i dette forsøg, men en inte-

ressant tanke kunne være, at de positive effekter, der tidligere er set i andre forsøg, kan skyldes en indirekte effekt af forbedret zinkstatus hos grise på høj kobberdosering som følge af disse vekselvirkninger imellem zink og kobber.

Effekten af kobber på koncentrationen af zink i plasma var dog ikke på højde med effekten af zink, idet den høje koncentration af kobber resulterede i et gennemsnitligt zinkniveau i plasma på 1,27 mg/l, hvorimod den høje koncentration af zink resulterede i et gennemsnitligt niveau i plasma på 1,45 mg zink/l plasma. Den højere koncentration af zink i plasma hos grise på høj kobberdosering påvirkede ikke zinkstatus målt i form af alkalisk fosfatase. Desuden blev lymfocytternes koncentration af metallothionein mRNA heller ikke påvirket af den høje kobberdosering.



Tarmepitelet er spændt op imellem de 2 halvdele af Ussing-kammeret. 2 elektroder (blå) måler potentialeforskellen over epitelet, og 2 elektroder (rød) måler strømstyrken

Effekt på IGF-I – et vækstregulerende hormon

IGF-I er et centralt hormon i regulering af vækst. Studier på rotter og mennesker har vist, at IGF-I syntesen bliver nedreguleret ved zinkmangel, og at zinktilskud i sådanne situationer resulterer i øget IGF-I koncentration i serum.

IGF-I koncentrationen i serum fra forsøgsgrisene viste, at IGF-I niveauet var signifikant forøget, når grisene havde fået den høje zinkdosering. IGF-I syntesen forøges, når den generelle foderoptagelse stiger, hvilket umiddelbart kunne være forklaringen på den forøgede IGF-I koncentration i serum fra grisene på høj zinkdosering. Men når den statistiske model korrigerede for forskellene i foderoptagelse imellem forsøgholdene, viste resultaterne stadigvæk et signifikant højere IGF-I niveau i serum fra grisene, der havde fået foder indeholdende 2500 mg zink/kg, se figur 2. IGF-I koncentrationen i serum var derimod ikke påvirket af kobberdosering.

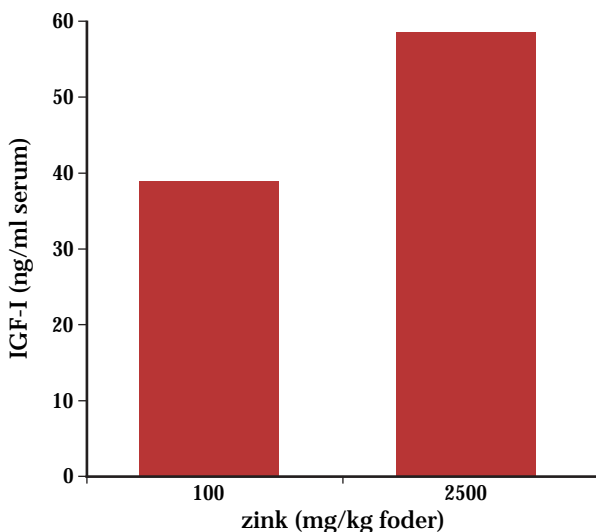
Disse resultater antyder således, at zink øger IGF-I syntesen, og at dette kan være med til at forklare den vækststimulerende effekt af høje zinkdoseringer. Desuden støtter disse resultater også antagelsen om, at grisenes zinkstatus bliver forbedret, når grisene får den høje zinkdosering.

Effekt på tarmens følsomhed overfor toksiner
Ussing-kammer forsøgene, der blev udført med henblik på at

undersøge tarmepitelets transportfunktioner, viste, at tarmepitelet blev mindre følsomt overfor de anvendte modelstoffer, når grisene havde fået den høje zinkdosering, se figur 3. Der var ingen effekt af kobberdosering på disse målinger. I det levende dyr bliver 5-HT udskilt fra specielle tarmceller, når der er toksiner fra sygdomsfremkaldende bakterier (f.eks. *E. coli*) tilstede i tarmlumen. Serotonin vil bl.a. via nervesystemet i tarmen sætte gang i en kaskade af reaktioner, der til sammen resulterer i sekretion af hovedsagelig klorid fra tarmcellerne. Når det sker i udpræget grad, resulterer det i, at grisen får diarré.

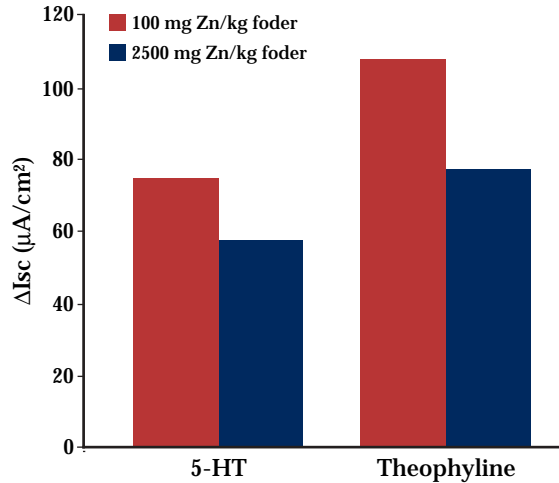
Ussing-kammer resultaterne viser altså, at tarmcellernes

sekretoriske reaktion på 5-HT er mindre, når grisene har fået ekstra zink. Dette kan forklare den positive effekt af zink mod fravænningsdiarré. Theophyllin påvirker tarmcellerne direkte, og cellernes reaktion på stoffet er, at kloridkanalerne aktiveres, hvilket resulterer i kloridsekretion. Theophyllin findes ikke naturligt i dyret, men det anvendes i Ussing-kammer forsøg til at vurdere selve tarmcellens følsomhed overfor diarréfremkaldende stoffer. Theophyllins påvirkning af cellen sker som nævnt udelukkende direkte, i modsætning til 5-HT, som udover at aktivere receptorer på tarmcellerne også fungerer via tarmepitelets nervesystem.

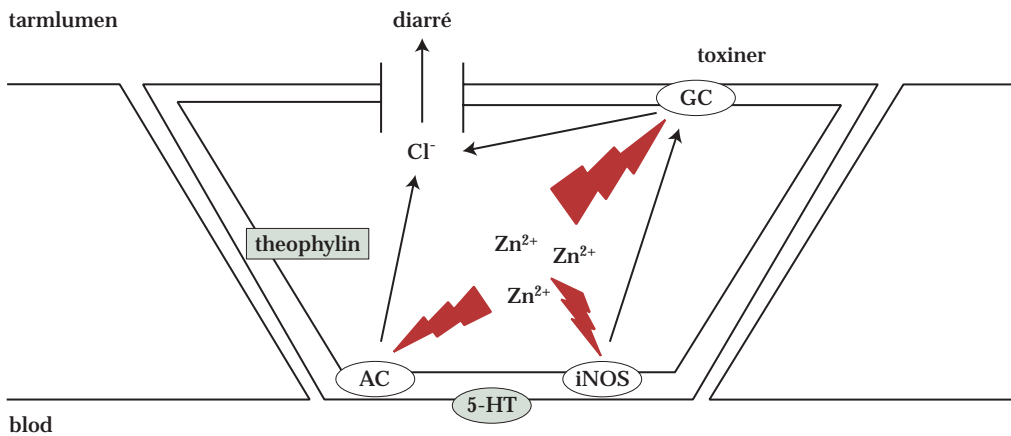


Figur 2. IGF-I koncentrationen i serum fra grise, der har fået hhv. 100 eller 2500 mg zink/kg foder i 5-7 dage efter fravænnning

Et af de første tegn på zinkmangel er som tidligere nævnt diarré. Det er således muligt, at effekten af den høje zinkdosering på fravænningsdiarré og på reaktionerne overfor modelstofferne skyldes, at grisenes og dermed også tarmvævet zinkstatus er forbedret. De nøjagtige mekanismer bag effekten af zink på theophyllin- og 5-HT-induceret sekretion er endnu ikke klarlagte. En mulig forklaring kunne være, at den forøgede koncentration af zinkioner i tarmvævet resulterer i en inaktivering af nogle af de enzymer, der sidder i celledmembranen. Funktionen af disse membranbundne enzymer er bl.a. at aktivere de reaktioner i tarmcellen, der resulterer i klorid sekretion. Denne mekanisme er illustreret i figur 4.



Figur 3. Effekt af zinkdosering på tarmvævet sekretoriske respons overfor modelstofferne 5-HT og theophyllin, under Ussing-kammer forsøg. ΔI_{sc} (ændringer i strømstyrke) er et indirekte mål for ændringer i hovedsageligt klorid sekretion som følge af modelstoffernes virkning. Et lille respons betyder lille klorid sekretion, hvilket er et udtryk for lav følsomhed overfor diarré-fremkaldende stoffer



Figur 4. Illustration af en tarmcelle og de mulige virkemekanismer bag den diarréhæmmende effekt af høje zinkdoseringer. De membranbundne enzymer adenylat cyklase (AC), nitrogen oxid syntase (iNOS) og guanylat cyklase (GC) aktiverer kemiske reaktioner inde i cellen, som resulterer i klorid sekretion (diarré). Det er muligt, at høje zinkkoncentrationer i tarmcellen resulterer i inaktivering af disse enzymer og dermed reduceret klorid sekretion. Inaktivering af enzymerne vil således resultere i reduceret sekretorisk følsomhed overfor sygdomsfremkaldende bakterier i tarmmlumen

Grøn Viden indeholder informationer fra Danmarks JordbrugsForskning.

Grøn Viden udkommer i en mark-, en husdyr- og en havebrugsserie, der alle henvender sig til konsulenter og interesserede jordbrugere.

Abonnement tegnes hos
Danmarks JordbrugsForskning
Forskningscenter Foulum
Postboks 50, 8830 Tjele
Tlf. 89 99 10 10 / www.agrsci.dk

Prisen for 2003: Markbrugsserien kr. 222, husdyrbrugsserien kr. 162 og havebrugs-serien kr. 137.

Adresseændringer meddeles særskilt til postvæsenet.

Michael Laustsen (ansv. red.)
Britt-Ea Jensen (redaktør)

Layout:
Ulla Nielsen

Tryk: Rounborgs grafiske hus

ISSN 1397-9868



Konklusion

Det gennemførte forsøg har bidraget med værdifulde informationer omkring de fysiologiske mekanismer bag effekten af især ekstra zink til grise i fravænningsperioden.

De egenskaber, der bliver påvirket positivt af et højt zinkindhold i foderet er bl.a. daglig tilvækst, daglig foderoptagelse, diarréhypighed, koncentrationer af zink i plasma, aktivitet af alkalisk fosfatase i plasma og koncentrationer af IGF-I i serum. Disse er alle egenskaber, som vides at blive påvirket negativt ved zinkmangel. Resultaterne tyder således på, at grisenes zinkstatus bliver forbedret af den høje zinkdosering. De positive effekter, som zink har på produktionsegenskaberne, kan derfor skyldes, at grisene undgår at udvikle begyndende zinkmangel som følge af den meget lave foderoptagelse efter fravænningsperiode. Udover at foderoptagelsen og dermed zinkoptagelsen er meget lav i denne periode, er tilgængeligheden af zink fra det faste foder og ZnO meget lav. Disse faktorer er sandsynligvis begrun-

delsen for, at doseringer på helt op til 2500 mg zink/kg foder er nødvendige for at opnå den positive effekt.

En konsekvens af de opnåede informationer kunne være, at man i stedet for at angive normer i mg/kg foder burde angive behovet som et dagligt zinkbehov (mg/dag), og på grundlag heraf tilpasse foderets indhold i forhold til den daglige foderoptagelse. Resultaterne tyder desuden på, at grisene har et ekstra stort behov for zink i perioden lige efter fravænningsperiode. Der er som følge heraf baggrund for, at der bør fokuseres på specifikke normer for zink til grise i netop denne korte periode efter fravænningsperiode.

I modsætning til mange andre undersøgelser angående effekten af høje kobberdoseringer på grise, viste dette forsøg ingen effekt på hverken tilvækst, foderoptagelse eller tilfælde af diarré. Af de fysiologiske målinger, der blev foretaget, påvirkede kobber udelukkende koncentrationen af zink i plasma. Dette skyldes vekselvirkninger mellem zink og kobber.

Hvorvidt disse vekselvirkninger i virkeligheden er baggrunden for de positive effekter, der kan opnås med høje kobberdoseringer, er endnu uvist. Da dette forsøg, der inkluderede 48 grise, viste tydelige effekter af zink, men ingen effekter af kobber, tyder det på, at effekten af en høj zinkdosering er mere markant i forhold til mulige effekter af kobber. Dette stemmer overens med tidligere observationer fra forsøg og praksis.

Der vil i en ny forsøgsserie blive fulgt op på de fundne resultater. Bl.a. vil virkemekanismen bag det nedsatte respons overfor modelstofferne (den diarréhæmmende effekt) blive undersøgt nærmere i Ussing-kammer forsøg. Desuden vil alternative zinkkilder blive undersøgt, hvor især muligheden for at opnå de samme positive effekter ved anvendelse af koncentrationer lavere end 2500 mg zink/kg foder undersøges. Hvis dette er muligt kan det være til gavn for såvel svineproduktionen som det omgivende miljø.