

ENZYMES ACTIVITY IN BLOOD SERUM FROM CHRONIC COPPER-POISONED SHEEP

Velimir Stojkovski¹, Kole Popovski², Georgi Mickovski², Nikola Jankulovski¹ and Dino Chrchev²

¹Faculty of Veterinary Medicine, Lazar Pop Trajkov 5-7, MK-1000 Skopje, Macedonia

²Veterinary Institute, Lazar Pop Trajkov 5-7, MK-1000 Skopje, Macedonia

³Surgical Clinic, Medical Faculty, Vodnjanska 17, MK-1000 Skopje, Macedonia

ЕНЗИМСКА АКТИВНОСТ ВО КРВНИОТ СЕРУМ КАЈ ОВЦИ ХРОНИЧНО ИНТОКСИЦИРАНИ СО БАКАР

Велимир Стојковски¹, Коле Појовски², Георѓи Мицковски², Никола Јанкуловски¹ и Дино Чрчев²

¹Ветеринарен факултет, Лазар Пој Трајков 5-7, МК-1000 Скопје

²Ветеринарен Институт, Лазар Пој Трајков 5-7, МК-1000 Скопје

³Клиники за хируршки болести, Медицински факултет, Водњанска 17, МК-1000 Скопје

INTRODUCTION

The copper presents an essential element for all animal organisms necessary for the development and the normal metabolism, as well as for the normal functioning of a numerous enzymes (Štraus, 1988). Its concentration in the serum increases in cases of acute and chronic illnesses of the liver and, especially in cases of obstruction of the bile ducts which increasing mechanisms is not completely explained.

Copper absorption may also be dependent on the protein metallothionein since excess intake of either copper or zinc interferes with the absorption of the other. Copper is present in a number of important metalloenzymes, including cytochrome *c* oxidase, dopamine β -hydroxylase, superoxide dismutase, lysyl oxidase and $\Delta 9$ -desaturase. Some of the symptoms of copper deficiency include hypercholesterolemia, demineralization of bones, leukopenia, anemia, fragility of large arteries, and demyelination of neural tissue. It is not known whether there exist widespread marginal copper deficiencies, or whether the copper balance studies are inaccurate. Recognizable symptoms of copper deficiency are usually seen only as a result of excess zinc intake and in Menkes syndrome, a relatively rare X-linked hereditary disease associated with a defect in copper transport.

Wilson's disease, an autosomal recessive disease, is associated with abnormal accumulation of copper in various tissues and can be treated with the naturally occurring copper chelating agent penicillamine (Delvin, 1997).

ВОВЕД

Бакарот е есенцијален елемент за сите animalните организми, потребен за растот и нормалниот метаболизам, како и за нормалното функционирање на бројни ензими (Štraus, 1988). Неговата концентрација во серумот се покачува при акутни и хронични болести на црниот дроб, а особено при опструкција на жолчните патишта, чиј што механизам на покачување не е сосема разјаснет.

Апсорпцијата на бакарот може исто така да зависи од протеинот металотионеин чиј вишок интерферира за апсорпцијата со бакарот или цинкот. Бакарот е присутен и во бројни важни металоензими вклучувајќи ги цитохром *c* оксидазата, допамин β -хидроксилазата, супероксид дисмутаза, лизил оксидазата и $\Delta 9$ -десатуразата. Некои од симптомите на недостаток на бакар вклучуваат хиперхолестеролемија, деминерализација на коските, леукопенија, анемија, кршливост на големите артерии и демиелинизација на нервното ткиво. Не е познато дали постои широка распространетост на бакарниот дефицит или пак студиите за рамнотежата на бакарот не се целосни. Во секој случај, препознатливите симптоми за дефицит на бакар се разгледуваат само како резултат на вишок на цинк и во Menkes-овиот синдром, реалтивно ретка X херeditарна болест асоцирана со дефект во бакарниот транспорт. Wilson-овата болест, авто-

On other hand, overconsuming of copper in the organism may also bring to coppermya, which can provoke a number of biochemical, haematological and histopathological changes.

Thus, in the literature, data from 1975 can be found, when Hartmans had investigated the incidence of copper poisoning in 1000 sheep in Holland, by which he concluded that less than 30% of the incidences were lethal, due to the high concentration of copper in the serum (over 20 ppm).

Edelsten (1980) came to a similar conclusion. He points to some specific clinical characteristics and hemolysis occurrence in sheep exposed to copper, in Nigeria.

The results of the investigation conducted on different models of experimental animals show that the cytotoxicity of the copper is not only due to its intracellular localization, but also upon the organellae damage on an ultrastructural level. It had been proved that the level of damage varies in different kinds of animals, whereas in human beings some mitochondrial abnormalities are noted after the copper exposure. It is also realized that the lysosomes protect the cell from the copper toxicity, although the mechanism of the copper incorporation in the lysosomes is not known (Alt et al., 1990). The chronic coppermya in sheep, leads to pathological changes in the liver and the kidneys (Gooneratne, 1981), changes in the renal LDH (Dobryszyska, 1981), also changes of the glucose level in the blood and the activity of the G-6-PD in the erythrocytes (Sansinanea, 1996).

Toussaint et al. (1993) realized that the toxicity of the copper is also manifested on the DNA molecule, since its aim in the cell is the nucleus, contrary to the zinc, for instance, which acts upon the cell membrane. Abu Damir et al. (1993), who investigated the copper poisoning (type of copper and copper sulphate) in camels, came to similar conclusions about the copper toxicity. Anorexia, diarrhea, dehydration and weight loss were noted, while on the histological intersections necrological changes in the liver with an infiltration of the leukocytes, dilatation and necrosis of the renal tubule were also noted. In a number of these animals a macrocytic hypochromic anemia and hemoconcentration appeared, as well as an increase of the AST, ALT, GGT, CK and LDH occurred.

Recently, as a result of the increased copper exposure of the animals in the industrial regions, the researches direct their studies more frequently towards the problem of the body detoxication. Thus, Hwang (1998) investigated the effect of the thaurine on the copper toxicity in rats of the Wistar strain. He came to the conclusion that the level of copper in the liver and the activity of the AST and ALT in the plasma, increase together with the increase of the dosage of the consumed copper. However, the levels of the copper and the

зонална рецесивна болест, е асоцирана со абнормална акумулација на бакар во различните ткива и може да биде третирана со природно добиениот пенициламин кој хелатно го врзува бакарот (Delvin, 1997).

Од друга страна, секако, до купремија може да доведе и прекумерното внесување на бакар во организмот, што од своја страна може да предизвика низа биохемиски, хематолошки и хистопатолошки промени.

Така во литературата се сретнуваат податоци уште од 1975 година, кога Hartmans ја испитувал инциденцата од труење со бакар кај 1000 овци во Холандија, при што констатирал дека помалку од 30% од нив завршуваат летално заради високата концентрација на бакар во серумот (преку 20 ppm).

До слични констатации дошол и Edelsten (1980), кој укажува на специфични клинички карактеристики и појава на хемолиза кај изложените овци на бакар во Нигерија.

Резултатите од истражувањата вршени врз различни модели на експериментални животни укажуваат дека цитотоксичноста на бакарот се должи не само на неговата интрацелуларна локализација, туку и на оштетувања на органелите на ултраструктурно ниво. Докажано е дека нивоата на оштетување варираат кај различните видови животни, додека кај човекот по изложувањето на бакар се забележани митохондријални абнормалности. Исто така констатирано е дека лизозомите ја заштитуваат клетката од токсичноста на бакарот, меѓутоа не е познат механизмот на неговата инкорпорација во лизозомите (Alt и сор., 1990).

Хроничната купремија кај овците доведува и до патолошки промени во црниот дроб и бубрезите (Gooneratne, 1981), промени во активноста на бубрежната LDH (Dobryszyska, 1981), како и промени во нивото на глукозата во крвта и активноста на G-6-PD во еритроцитите (Sansinanea, 1996).

Toussaint и сор. (1993) констатирале е дека токсичноста на бакарот се манифестира и врз молекулата на DNA, бидејќи негова цел на дејство во клетката е јадрото, за разлика од цинкот на пример, кој делува на клеточната мембрана.

До слични констатации за токсичноста на бакарот дошле и Abu Damir и сор. (1993) кои го испитувале труењето со бакар (форма на бакар сулфат) кај камилите. Констатирана е анорексија, диареа, дехидратација, губење на масата, додека на хистолошките пресеци евидентни биле некротични промени во црниот дроб со леукоцитна инфилтрација и дилатација и некроза на бубрежните тубули. Исто така, кај дел од живот-

enzyme activities were significantly lower in the groups treated with copper and thaurine. In addition, the level of copper in the excrement was higher in the rats treated with thaurine, which indicates a possibility that thaurine reduces the toxic effect of the copper in rats.

Beginning from the importance, which the problem of the copper intoxication has for the fundamental science, the stockbreeding and alike, the subject of this research, is to note the changes of the enzyme activity in the serum of sheep, chronically intoxicated with copper.

MATERIAL AND METHODS

The investigation has been carried out for 25 sheep, out of which 10 were chronically exposed to copper for a period of 12. month (exogeny, kept in ecologically polluted environment close to a copper mine), while the other 15 sheep presented the control group. On all these animals was examines AST, ALT, AP, α -AMYL, γ GT and LDH, in the serum with an automatic biochemical analyzer Vitros DT60-II (Johnson & Johnson). The concentration of copper in the serum was examined colorimetrically with biochemical kits (Cat. No. 1.03319.0001, Merck, Germany). The achieved data were statistically proceeded with the Student's t-test.

RESULTS AND DISCUSSION

Results of our study showed that the sheep live near the copper mine have a typical case of chronic copper poisoning, so that its concentration in the serum is higher from the concentration at the control group for 151,9% ($p < 0,001$); ($16,2 \pm 1,9 \mu\text{mol/l}$ in control to $40,8 \pm 6,7 \mu\text{mol.l}$ in group exposed to copper, Fig. 1).

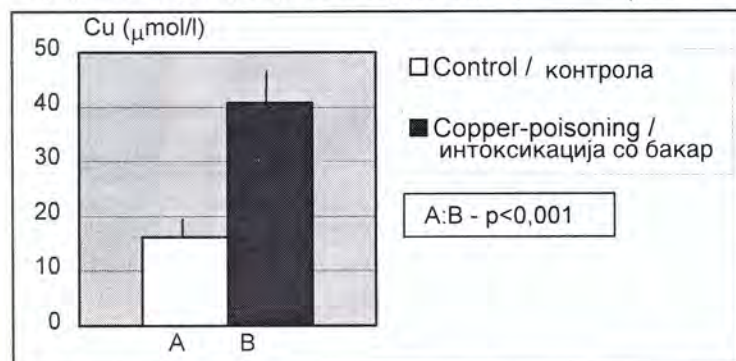


Fig. 1. The effect of copper-poisoning on copper concentration in sheep blood serum
Слика 1. Концентрација на бакар во серум кај овци хронично изложени на бакар

Evaluation of aminotransferases showed similar results considering both AST and ALT. As we can see on Fig. 2 and 3, after the chronically exposed to copper, the activity of AST increases for 25,3% in regard to control

ните се јавила и макроцитна хипохормна анемија и хемоконцентрација, како и покачување на AST, ALT, GGT, CK и LDH.

Во последно време, заради сè поголемата изложеност на животните на бакар во индустриските региони, истражувачите своите истражувања сè почесто ги насочуваат и врз проблемот на детоксикација на организмот. Така, Hwang (1998), го испитувал е ефектот на тауринот врз токсичноста на бакарот кај стаорци од сојот Wistar. Тој утврдил дека нивото на бакар во црниот дроб и активноста на AST и ALT во плазмата се покачуваат со покачување на дозата на примениот бакар. Меѓутоа, нивоата на бакар и ензимската активност биле сигнификатно пониски кај групите третирани со бакар и таурин. Притоа, нивото на бакар во фецесот било повисоко кај стаорците кои биле третирани со таурин, што укажува на можноста тауринот да го редуцира токсичниот ефект на бакарот кај стаорците.

Тргувајќи од значењето на проблемот на бакарна интоксикација за фундаменталната наука, сточарството и пошироко, предмет на истражување на оваа студија е да се видат промените во ензимската активност во серумот кај овци хронично интоксигирани со бакар.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Истражувањето беше извршено на 25 овци од кои 10 беа хронично експонирани на бакар за време од 2 месеци (егзогено, чувани во еколошки загадена средина во близина на рудник за бакар), додека другите 15 беа контролна група.

Кај сите животни во серумот беа испитувани AST, ALT, AP, α -AMYL, γ GT и LDH, со автоматски биохемиски анализатор Vitros 60 DT-II (Johnson & Johnson). Концентрацијата на бакар во серум, беше испитувана колориметриски со готови биохемиски китови (Cat. No. 1.03319.0001, Merck, Germany). Добиените податоци беа статистички обработени со помош на Student-овиот t-тест.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Анализите покажуваат дека кај овците кои живеат во близина на рудникот за бакар, има типичен случај на хронично труење со овој метал, така што неговата концентрација во серумот е за 151,9% ($p < 0,001$) повисока од таа кај контролната група (од $16,2 \pm 1,9 \mu\text{mol/l}$ кај контролата на $40,8 \pm 6,7 \mu\text{mol/l}$ кај групата експонирана на

group (from $72,1 \pm 8,0$ U/l to $90,3 \pm 8,9$ U/l; $p < 0,001$), while the activity of ALT increases for 93,3% in comparison with control (from $15,0 \pm 1,8$ U/l to $29,1 \pm 3,2$ U/l; $p < 0,001$).

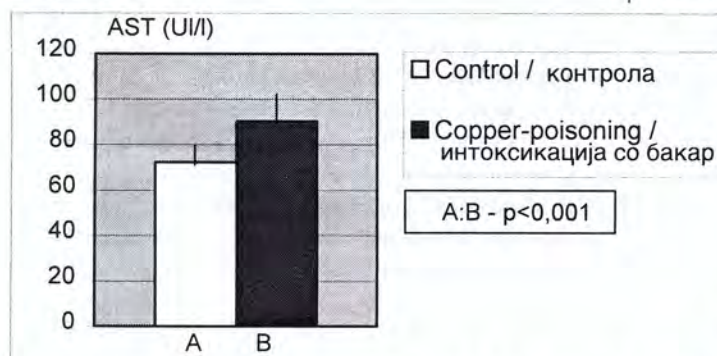


Fig. 2. The effect of copper-poisoning on AST activity in sheep blood serum

Слика 2. Активност на AST во serum на овци хронично изложени на бакар

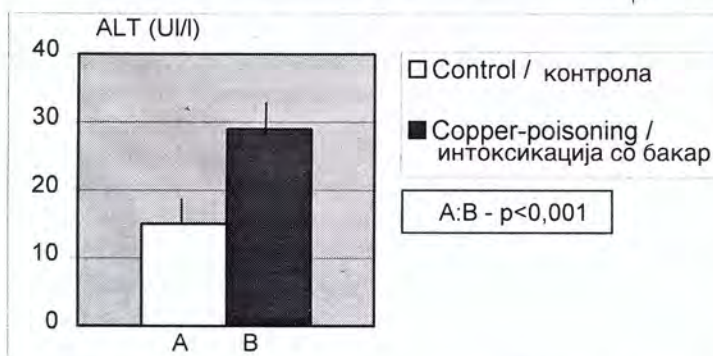


Fig. 3. The effect of copper-poisoning on ALT activity in sheep blood serum

Слика 3. Активност на ALT во serum на овци хронично изложени на бакар

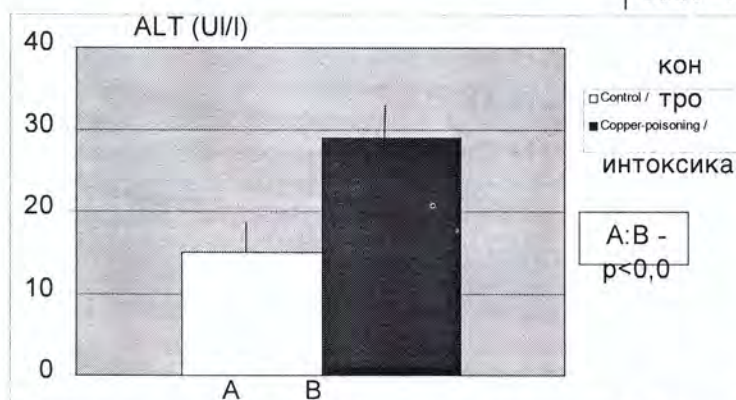


Fig. 4. The effect of copper-poisoning on γ -GT activity in sheep blood serum

Слика 4. Активност на γ -GT во serum на овци хронично изложени на бакар

бакар, сл. 1).

Испитувањата на трансминазите покажуваат слични резултати. Како што се гледа на сл. 2 и 3, по хроничната експозиција на бакар, активната на AST е покачена за 25,3% во однос на контролната група (од $72,1 \pm 8,0$ U/l на $90,3 \pm 8,9$ U/l, $p < 0,001$), додека активната на ALT е покачена за 93,3% (од $15,0 \pm 1,8$ U/l на $29,1 \pm 3,2$ U/l; $p < 0,001$).

Исто така, констатирани се и промени во активната на γ -GT и LDH. Имено, регистрирано е високосигнификантно покачување од 214,3% ($p < 0,001$) во активната на γ -GT кај овците експонирани на бакар во споредба со контролната група (од $40,5 \pm 5,2$ U/l кај контролата, на $127,3 \pm 14,8$ U/l кај групата хронично експонирана на бакар; сл. 4), додека активната на LDH е покачена за 44,4% (од 906 ± 87 U/L на 1308 ± 127 U/L; $p < 0,001$; сл. 5).

Покрај споменетите ензими, во истражувањето беа мерени и вредностите на AP и α -AMYL, меѓутоа се покажа дека во нивната активност нема промени (сл. 6 и 7).

Резултатите укажуваат дека кај испитуваните овци кои се одгледуваат во близина на рудникот за бакар, станува збор за типична интоксикација со бакар. Со оглед на високата концентрација на бакар во serumот, најверојатно се работи и за хепатично оштетување на што укажува и Gooneratne (1981) и бубрежно оштетување под дејство на бакарот (Dobryszyska, 1981).

Потврда за таквите патолошки промени на ниво на црниот дроб е и активната на хепатичните ензими (AST и ALT) која е високосигнификантно покачена во крвниот serum како резултат на лезии на хепатоцитите.

Што се однесува до LDH треба да се напомене дека иако тој не е строго специфичен ензим и е широко распространет во ткивата, сепак најмногу се покачува при црnodробните болести и оштетувања, а со оглед на големата концентрациска разлика меѓу LDH во еритроцитите и serumот, се покачува и во случаи на хемолитичка анемија.

Инаку на појава на анемија во случаи на интоксикација со бакар укажуваат и Abu Damir и сор. (1993).

Also there are variations in the serum activity of γ -GT and LDH. We registered highly significant increase of 214,3% ($p < 0,001$) of the activity of γ -GT in sheep exposed to copper in comparison with control group ($40,5 \pm 5,2$ U/l in control to $127,3 \pm 14,8$ U/l in group chronically exposed to copper; Fig. 4), while the activity of LDH increases for 44,4% (from 906 ± 87 U/l to 1308 ± 127 U/l; $p < 0,001$; Fig. 5).

Besides above-mentioned enzymes, we evaluated the levels of AP and α -AMYL as well, but both were not changed (Fig. 6 and 7.).

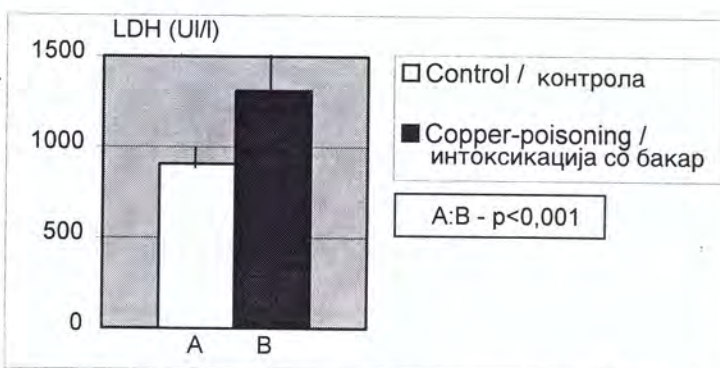


Fig. 5. The effect of copper-poisoning on LDH activity in sheep blood serum

Слика 5. Активност на LDH во serum на овци хронично изложени на бакар

ЗАКЛУЧОК

Врз основа на добиените резултати во истражувањето за ензимската активност во крвниот serum кај овци интоксирани со бакар, може да се донесат следните заклучоци:

1. Хроничната експозиција на бакар доведува до сигнификантно покачување на концентрацијата на бакар во крвниот serum;

2. Хроничната интоксикација со бакар доведува до покачување на ензимската активност (кај AST, ALT, γ -GT и LDH), додека AP и α -AMYL се непроменети.

На крајот од овој труд може да се донесе општ заклучок дека хроничната интоксикација со бакар предизвикува сериозни промени како во метаболизмот на црниот дроб, така и во вкупниот метаболизам на овците.

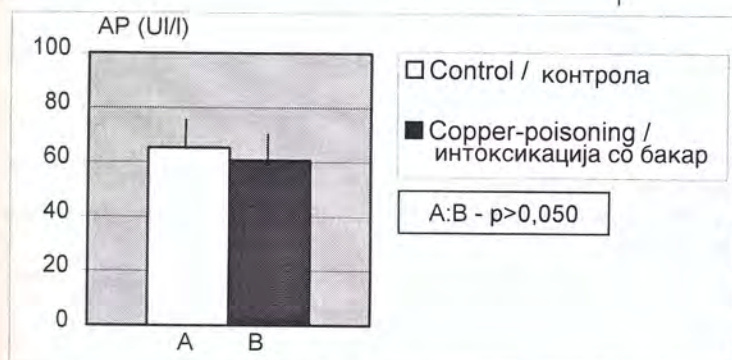


Fig. 6. The effect of copper-poisoning on AP activity in sheep blood serum

Слика 6. Активност на AP во serum на овци хронично изложени на бакар

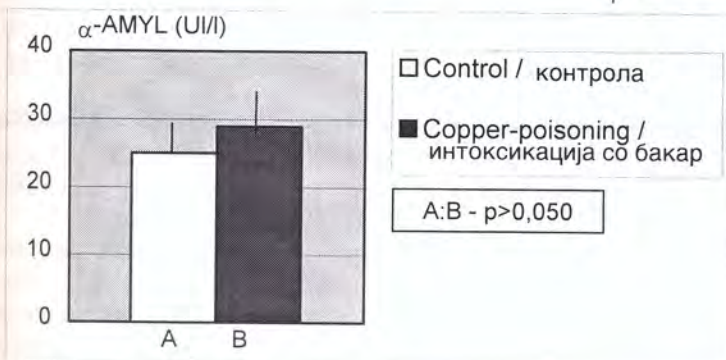


Fig. 7. The effect of copper-poisoning on α -AMYL activity in sheep blood serum

Слика 7. Активност на α -AMYL во serum на овци хронично изложени на бакар

CONCLUSION

According to the results of the study on the influence of a enzymes activity in blood serum from chronic copper-poisoned sheep, the following conclusions emerge:

1. The chronic exposition of a copper lead to a

significant increase of copper concentration in the blood serum;

2. The copper-poisoned lead to a increase of the enzymes activity (AST, ALT, γ -GT and LDH), while AP and α -AMYL were not changed;

Finally, we can make general conclusion that the chronically copper poisoning causes serious changes either in the liver metabolism and the whole metabolism of the sheep.

REFERENCES

- Abu Damir, H., Eldirdiri, N.I., Adam, S.E., Howarth, J.A., Salih, Y.M., Idris, O.F. (1993) Experimental copper poisoning in the camel (*Camelus dromedarius*). *J Comp Pathol*, **108**: 191-208.
- Alt, E.R., Sternlieb, I., Goldfischer, S. (1990) The cytopathology of metal overload. *Int Rev Exp Pathol*, **31**: 165-88.
- Dobryszczycka, W., Owczarek, H. (1981) Effects of lead, copper, and zinc on the rat's lactate dehydrogenase in vivo and in vitro. *Arch Toxicol*, **48**: 21-7.
- Edelstein, R.M. (1980) Chronic copper poisoning of sheep in Nigeria. *Trop Anim Health Prod*, **12**: 69-76.
- Gooneratne, S.R., Howell, J.M. and Cook, R.D. (1980) An ultrastructural and morphometric study of the liver of normal and copper-poisoned sheep. *Am J Pathol*, **99**: 429-449.
- Hartmans, J. (1975) The incidence of copper poisoning in sheep and the role of concentrates as a causative factor. *Tijdschr Diergeneeskde*, **100**: 379-82.
- Hwang, D.F., Wang, L.C., Cheng, H.M. (1998) Effect of taurine on toxicity of copper in rats. *Food Chem Toxicol*, **36**: 239-44.
- Kerr, L.A. and McGavin, H.D. (1991) Chronic copper poisoning in sheep grazing pastures fertilized with swine manure. *J Am Vet Med Assoc*, **198**: 99-101.
- Sansinanea, A.S., Cerone, S.I., Elperding, A. and Auza, N. (1996) Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in erythrocytes from chronically copper-poisoned sheep. *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol*, **114**: 197-200.
- Toussaint, M.J., Nederbragt, H. (1993) Copper and zinc toxicity in two rat hepatoma cell lines varying in differentiation. *Comp Biochem Physiol C*, **104**: 253-62.
- Štraus, B. (1988) Medicinska biokemija. *JUMENA*, Zagreb, p. 710-711.