

Ewa M. Skibniewska*, Tadeusz Kośla*, Michał Skibniewski,
Ewa Węgrzyn***, Renata Madyniak***, Danuta Oyrzanowska*****

**ZAWARTOŚĆ Cu, Zn I Mn W WĄTROBIE I NERKACH KRÓW
Z REJONU WOJ. MAZOWIECKIEGO**

**THE Cu, Zn AND Mn CONCENTRATION IN LIVER AND KIDNEYS
OF THE COWS FROM MAZOVIA REGION**

Słowa kluczowe: krowy mleczne, miedź, cynk, mangan, wątroba, nerka.

Key words: dairy cows, copper, zinc, manganese, liver, kidney.

The aim of the study was to determined Zn, Cu and Mn concentration in the liver and kidneys of the dairy cows from Mazovia region to proof local deficiency or excess of certain trace elements. Material was collected in slaughterhouses from 42 animals and their age ranged from 2 to 8 years. Trace elements concentration of digested samples was determined by FAAS method. The average concentration of copper, zinc and manganese in kidneys were respectively: 19.93; 111.41 and 5.83 mg·kg⁻¹ s.m., whereas in liver samples: 68.79; 149.36; 10.65 mg·kg⁻¹ s.m.

1. WPROWADZENIE

Badania nad zawartością pierwiastków mineralnych w tkankach zwierząt gospodarskich są interesujące zarówno z punktu widzenia utrzymania dobrostanu zwierząt, jak i ze

* **Dr Ewa M. Skibniewska, prof. dr hab. Tadeusz Kośla – Katedra Biologii Środowiska Zwierząt, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; tel.: 22 593 66 18, fax: 22 593 66 11; e-mail: ewa_skibniewska@sggw.pl, tadeusz_kosla@sggw.pl**

** **Dr Michał Skibniewski – Katedra Nauk Morfologicznych, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; tel.: 22 59 362 10, fax: 22 59 362 07; e-mail: michał_skibniewski@sggw.pl**

*** **Mgr inż. Ewa Węgrzyn, dr inż. Renata Madyniak, technik Danuta Oyrzanowska – Centrum Analityczne, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; tel.: 22 59 358 10, fax : 22 59 358 12; e-mail: ewa_wegrzyn@sggw.pl, renata_madyniak@sggw.pl, danuta_oyrzanowska@sggw.pl**

względu na zdrowotność ludzi wykorzystujących surowce zwierzęce. Obejmują nie tylko ekspozycję na metale ciężkie, takie jak kadm czy ołów, ale także koncentrację i przemieszczanie się w łańcuchu pokarmowym pierwiastków uznanych za niezbędne, np.: cynk, miedź oraz mangan. Metale stanowiące składniki tkanek zwierzęcych są spożywane przez ludzi, wpływając bezpośrednio na stan zdrowia publicznego [Nriagu i in. 2009]. Szczególną zdolność do kumulacji niektórych pierwiastków wykazują wątroba oraz nerki zwierząt. Są to także narządy powszechnie wykorzystywane do celów kulinarnych. W świadomości społecznej wielu kultur szczególnie wątroba uchodzi za cenne źródło makro- i mikroelementów oraz witamin rozpuszczalnych w tłuszczach.

Z punktu widzenia dobrostanu zwierząt i w konsekwencji zdrowia człowieka znajdującego się na końcu łańcucha pokarmowego niebezpieczne są zarówno niedobory, jak i nadmiar metali w diecie. Właściwy poziom składników mineralnych w diecie bydła mlecznego warunkuje prawidłową zdrowotność i wydajność tych zwierząt. Składniki te są dostarczane wraz z paszą, w postaci gotowych mieszanek i przygotowywane z tzw. szerokim „marginosem bezpieczeństwa”. Może to powodować spożycie mikroelementów niejednokrotnie przewyższające potrzeby metaboliczne zwierząt [Blanco-Penedo 2006]. Nieprawidłowe tkankowe stężenia pierwiastków wywołują wiele zaburzeń metabolicznych. Jony metali i ich związki chemiczne pełnią rolę kofaktorów w licznych reakcjach biochemicznych.

Miedź. Podstawową funkcją miedzi jest udział w procesach oksydacyjno-redukcyjnych, regulacja metabolizmu żelaza oraz uczestnictwo w procesie tworzenia kolagenu. Niedobory miedzi powodują u zwierząt wiele objawów chorobowych, wśród których należy wymienić: niedokrwistość, utratę łaknienia, uszkodzenia narządów wewnętrznych, deformacje kości, obniżenie zdolności reprodukcyjnych, zmiany okrywy włosowej, zwłóknienie mięśnia sercowego oraz przewlekłe, wyniszczające biegunki. Wśród gatunków zwierząt udomowionych objawy niedoborów tego pierwiastka obserwuje się głównie u bydła, wysoką wrażliwość zaś nawet na niskie stężenia miedzi w diecie wykazują owce. W gospodarce tym pierwiastkiem szczególną rolę odgrywa wątroba, która wychwytuje z osocza miedź związaną z albuminami, stanowiąc jej główny magazyn. Z tego względu za dobry wskaźnik zaopatrzenia organizmu w ten pierwiastek przyjmuje się jej zawartość w wątrobie [Anke 1994, Payne 1983, Rattjen, Anke 2000, Dorton i in. 2003].

Cynk. Pierwiastek ten jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania organizmów zwierzęcych, ponieważ uczestniczy w licznych procesach metabolicznych. Jest składnikiem wielu hormonów i enzymów, np.: insuliny, glukagonu, dehydrogenazy oraz karboksypeptydazy A i B. Bierze udział w metabolizmie węglowodanów, syntezie kwasów nukleinowych i białek oraz w osteogenezie jako czynnik stymulujący formowanie i mineralizację kości [Kirsch i in. 2000, Zhang i in. 2003]. Wykazuje on zdolność do regulacji aktywności osteoklastów resorbujących tkankę kostną [Lai, Yamaguchi 2005]. Cynk jest także niezbędny w procesie syntezy kolagenu a jego obecność warunkuje aktywność fosfatazy alkalicznej [Palacios 2006]. Jest on magazynowany w wątrobie (130–270 ppm), nerkach (180–210 ppm), trzust-

ce (25–800 ppm), sercu (100–145 ppm) oraz w wytworach rogowych skóry i włosach (40–480 ppm). Organizm zwierząt starszych zawiera więcej cynku, niż organizm zwierząt nowonarodzonych, a zawartość ta w głównej mierze zależy od zasobów cynku w paszy [Sadurski 1984]. Ostre niedobory tego pierwiastka mogą powodować zahamowanie wzrostu oraz zaburzenia rozwoju pierwszorzędowych cech płciowych (hipogonadyzm). Przy niedoborze cynku zwierzęta wykazują zmniejszoną tolerancję na glukozę. Szczególną wrażliwością na jego niską zawartość w diecie wyróżnia się trzoda chlewna, u której dochodzi do zaburzeń metabolicznych manifestujących się parakeratozą [Sadurski 1984, Anke 1994]. Niedobór cynku jest przyczyną zapaleń skóry, łysienia, a także nieprawidłowego wzrostu sierści, wełny oraz upierzenia ptaków. Toksyczność cynku związana jest przede wszystkim z wtórnym deficytem miedzi i u zwierząt obserwuje się ją stosunkowo rzadko [Pasternak, Majdaniak 1999].

Mangan. W organizmach zwierząt mangan aktywuje wiele enzymów biorących udział w procesach utleniania. Jest on składnikiem enzymów sterujących syntezą białek, tłuszczów i cholesterolu. Szczególnie istotną rolę ogrywa zawierająca mangan glukozylotransferaza, która uczestniczy w procesie tworzenia kości. Mangan występujący w środowisku wewnątrzkomórkowym związany jest głównie z mitochondriami oraz z DNA i RNA. Pierwiastek ten wraz z miedzią uczestniczy także w hematopoezie. Poza wymienionymi wyżej funkcjami metabolicznymi mangan jest również niezbędny w procesie tworzenia melaniny, a także odgrywa istotną rolę w prawidłowej czynności ośrodkowego układu nerwowego. Jest on również niezbędny do prawidłowego funkcjonowania mikroflory żwacza [Anke 1994].

Niedobory manganu u zwierząt gospodarskich są przyczyną zaburzeń procesu kostnienia, nieprawidłowości w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego oraz zaburzeń w rozrodzie, które manifestują się między innymi zmniejszeniem skuteczności inseminacji a także zwiększonym odsetkiem poronień. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że nadmiar manganu w paszy powoduje zmniejszenie wchłaniania miedzi, fosforu i żelaza [Anke 1994, Anke i in. 1994, Groppel 1995].

Celem badań było określenie zawartości cynku, miedzi i manganu w wątrobie i nerkach krów mlecznych oraz ewentualne wykazanie miejscowych niedoborów lub nadmiaru poszczególnych pierwiastków oraz próba określenia interakcji zachodzących pomiędzy wyżej wymienionymi pierwiastkami.

2. MATERIAŁ I METODY

Próbki wątroby i nerek pobrano od 42 krów mlecznych, pochodzących z terenu województwa mazowieckiego. Wiek zwierząt zawierał się w przedziale od 2 do 8 lat. Materiał badawczy stanowiły próbki wątroby i nerek pobierane w rzeźniach. Były to: fragmenty płata ogoniastego wątroby oraz doczaszkowa połowa prawej nerki, wycinana tak, aby zawierała zarówno warstwę korową, jak i rdzenną narządu. Próbki zapakowano w torebki polietylenowe i poddano mrożeniu w temperaturze -18°C do czasu wykonania analizy zawar-

tości pierwiastków. Mineralizację tkanek uzyskano przez spalanie w temperaturze 450°C, a powstały popiół rozpuszczono w kwasie solnym. Zawartość Cu, Zn i Mn określano stosując metodę płomieniowej atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej (FAAS). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem pakietu Statistica, moduł anova. Do porównań międzygrupowych zastosowano test najmniejszej istotnej różnicy (NIR).

3. WYNIKI

Średnia zawartość miedzi w wątrobie wynosiła 68,79 mg·kg⁻¹ suchej masy (s.m.) narządu, w nerce zaś wartość ta kształtowała się na poziomie 19,93 mg·kg⁻¹ s.m. Średnia zawartość cynku w wątrobie wynosiła 149,36 mg·kg⁻¹ s.m., a w nerkach 111,41 mg·kg⁻¹ s.m. Zawartość manganu w badanych narządach przedstawiała się podobnie jak miedzi i cynku, w odniesieniu do których wyższe wartości odnotowano w wątrobie niższe zaś w próbkach nerek. W badanej populacji wynosiły one odpowiednio 10,65 mg·kg⁻¹ s.m. (wątroba) oraz 5,83 mg·kg⁻¹ s.m. narządu (nerka).

Tabela 1. Zawartości miedzi, cynku i manganu w wątrobie i nerkach krów (mg·kg⁻¹ s.m.)

Table1. The Cu, Zn and Mn concentration in liver and kidneys of cows (mg·kg⁻¹ s.m.)

Parametr statystyczny	Wątroba			Nerka		
	Cu	Zn	Mn	Cu	Zn	Mn
Średnia	68,79	149,36	10,65	19,93	111,41	5,83
Odchylenie standardowe	59,14	89,65	1,85	3,59	27,64	1,12
Kwartył dolny	29,25	113,40	9,37	17,93	91,40	5,03
Mediana	57,28	121,35	10,80	19,82	103,95	5,85
Kwartył górny	90,93	141,40	12,14	21,68	118,50	6,67

W analizie korelacji wewnątrzgrupowych stwierdzono, że w nerce występuje istotna statystycznie ($p \leq 0,05$) zależność pomiędzy zawartością miedzi i manganu. W wątrobie natomiast nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności pomiędzy zawartościami poszczególnych pierwiastków.

4. DYSKUSJA

Otrzymane wyniki dotyczące zawartości miedzi w wątrobie są nieco niższe od danych literaturowych. Anke i in. [1993] podają, że prawidłowa średnia zawartość miedzi w wątrobie była wynosi 123 w mg·kg⁻¹ suchej masy narządu. Wyniki otrzymane w doświadczeniu własnym korespondują z danymi publikowanymi przez tych autorów, dotyczącymi zawartości miedzi w wątrobach była pochodzącego z rejonów niedoborowych, gdzie wartości tego

parametru wahały się w granicach od 25 do 66 w $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m. Należy jednak dodać, że na terenie Polski rejestruje się znacznie niższe tkankowe stężenia miedzi. Kraczkowski i Zipser [1993] badając zawartość miedzi w wątrobach była z terenu wschodniej Polski uzyskali wartość średnią wynoszącą zaledwie 20 w $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m. Podobnie niskie wyniki uzyskali autorzy zajmujący się m.in. badaniami zawartości miedzi w wątrobach krów pochodzących z rejonu północnej Polski. W tym wypadku średnia wartość badanego parametru wynosiła 33 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ suchej masy narządu [Falandysz 1993].

Większą zawartość miedzi w wątrobie była stwierdził także zespół badawczy z Maroka i Francji. Średnia wartość tego parametru bowiem wynosiła 112 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ suchej masy narządu [Sedki i in. 2003]. Podobne wyniki (114 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m.) w odniesieniu do zawartości miedzi w wątrobie krów uzyskali Baxter i Kienholz [1983].

Analogiczną zależność stwierdzono w odniesieniu do zawartości miedzi w nerkach. Według danych z terenu Niemiec waha się ona w granicach od 27,8 do 32,4 w $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m. [Schmidt i in. 1987]. Średnia zawartość miedzi w nerkach krów pochodzących z Maroka wynosiła 33,2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ suchej masy narządu [Sedki i in. 2003], podczas, gdy w badaniach Falandysza [1993] prowadzonych na terenie północnej Polski wartość ta wynosiła 5,80 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m. i była niższa od danych uzyskanych w doświadczeniu własnym.

Zawartości cynku w próbkach badanych tkanek mieściły się w zakresie podawanym w literaturze. Anke i in. [1989] podają, że zawartość tego pierwiastka w wątrobie była wynosi średnio 158 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m. Podobne wartości uzyskali Baxter i in. [1982] oraz Żmudzki i in. [1991], według których średnia zawartość cynku w wątrobie była wynosiła odpowiednio 141 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m i 153 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m. Sedki i in. [2003] odnotowali niższe wartości cynku – 126 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m.

Podobne wyniki uzyskano także w analizie nerek. Schmidt i in. [1987] podają, że zawartość cynku w nerkach była zawiera się w granicach od 73,3 do 177,1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m. W analizie zawartości cynku w nerkach była Friel i in. [1987] uzyskali wartości zbliżone do badań własnych – 119 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ suchej masy tkanki, Sedki i in. [2003] natomiast odnotowali u była pochodzącego z Maroka nieco niższe wyniki – 89 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m.

Odnosząc się łącznie do zawartości miedzi i cynku w obu badanych narządach można wnioskować, że zwierzęta otrzymywały zbilansowane dawki pokarmowe, ponieważ pomiędzy badanymi pierwiastkami istnieje ścisła, odwrotnie proporcjonalna zależność.

Interakcje pomiędzy miedzią i cynkiem opisywano szeroko w światowej literaturze. W momencie, gdy poziom cynku w diecie jest wysoki zmniejsza się tkankowa zawartość miedzi, a zwierzęta wykazują kliniczne objawy jej niedoboru. Niska zawartość cynku w pokarmie powoduje natomiast akumulację miedzi, która u przeżuwaczy prowadzi do wystąpienia klinicznych objawów zatrucia tym pierwiastkiem [Mills, Dalgarno 1972, Blanco-Penedo i in. 2006].

Średnia zawartość manganu w wątrobie była zarejestrowana w badaniach własnych autorów była wyższa od wartości podawanych w literaturze. Posenti i in. [1992] odnotowali, że wartość ta zawiera się w granicach od 6 do 7 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m. Brak zaś danych literaturo-

wych dotyczących zawartości manganu w suchej masie nerki.

W badaniu nad interakcjami pomiędzy poszczególnymi pierwiastkami w wątrobie i nerkach stwierdzono, że jedynie w nerkach występuje istotna statystycznie dodatnia korelacja pomiędzy zawartością miedzi i manganu. Podobne wyniki uzyskał zespół badaczy z Hiszpanii. Lopez-Alonso i in. [2004] oraz Blanco-Penedo i in. [2006] zarejestrowali obecność istotnej statystycznie korelacji pomiędzy zawartością miedzi i manganu w nerkach bydła. Mechanizmy powstawania tej zależności nie są w pełni poznane, lecz przypuszcza się, że mogą one być związane z utrzymaniem homeostazy mineralnej organizmu.

5. WNIOSKI

U badanych krów mlecznych z rejonu Mazowsza nie stwierdzono zarówno niedoborów, jak i nadmiaru miedzi, cynku i manganu, uzyskane wyniki zaś są zbieżne z danymi literaturowymi.

PIŚMIENICTWO

- ANKE M., MASAOKA T., ARNOLD W., KRAUSE U., GROPPPEL B., SCHWAN S. 1989. The influence of a sulfur, molybdenum or cadmium exposure on the trace element status of cattle and pigs, *Arch. Anim. Nutr.*, Berlin 39,7: 657–666.
- ANKE M., MASAOKA T., MÜLER M., GLEI M., KRAMER K. 1993. Die Auswirkungen der Belastung von Tier und Menschen mit Schwefel, Molybden und Cadmium. Akute und Chronische Toxizität von Spurenelementen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart: 11–29.
- ANKE M. 1994. Störungen im Mengen- und Spurenelementhaushalt. In: H. Hartmann und H. Meyer (eds.) *Klinische Pathologie der Haustiere*, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart: 154–175.
- ANKE M., GROPPPEL B., ANGELOW L. 1994. Der Einfluss des Mangan, Zink, Kupfer, Jod, und Selenmangels auf die Fortpflanzungsleistung des Wiederkäuers. *Rekasan-Journal* 1: 23–28.
- BAXTER J.C., BARRY B., JHONSON D.E., KIENHOLZ E.W. 1982. Heavy metal relation in cattle tissues from ingestion of sewage sludge. *J. Environ. Qual.* 11: 303–309.
- BAXTER J.C., KIENHOLZ E.W. 1983. Heavy metals and persistent organics content in cattle exposed to sewage sludge. *J. Environ. Qual.* 12: 316–319.
- BLANCO-PENEDO I., CRUZ J.M., LOPEZ-ALONSO M., MIRANDA M., CASTILLO C., HERNANDEZ J., BENEDITO J.L. 2006. Influence of copper status on the accumulation of toxic and essential metals in cattle. *Environ. Inter.* 32: 901–906.
- DORTON K.L., ENGLE T.E., HAMAR D.W., SCILIANO P.D., YEMN R.S. 2003. Effects of cooper source and concentration on copper status and immune function in growing finishing steer. *Anim. Feed Sci. Technol.* 110: 31–44.

- FALANDYSZ J. 1993. Some toxic and essential trace metals in cattle from the northern part of Poland. *Sci. Total Environ.* 135: 177–191.
- FRIEL J.K., BORGMAN R. F., CHANDRA R.K. 1987. Effect of chronic cadmium administration on liver and kidney concentrations of zinc, copper, iron, manganese and chromium. *Bull. Environ. Con. Toxicol.* 38: 588–593.
- GROPPEL B. 1995. Mengen-und Spurenelemente- Funktion, Bedarf, Versorgung und Diagnose, *Rekasan J.* 2 (3): 3–6.
- KIRSCH T., HARRISON G., WORCH K.P., GOLUG E.E. 2000. Regulatory roles of zinc in matrix vesicle mediated mineralization of growth plate cartilage. *J. Bone. Miner. Res.* 15 (2): 261–270.
- KRACZKOWSKI H., ZIPSER J. 1993. Zawartość kadmu, miedzi, cynku oraz metalotioneiny w nerkach i wątrobie koni i krów z różnych regionów ziem wschodnich Polski. *Med. Weter* 49 (6): 253–255.
- LOPEZ-ALONSO M., PRIETO-MONTANA F., MIRANDA M., CASTILLO C., HERNANDEZ J., BENEDITO J.L. 2004. Interactions between toxic (As, Cd, Hg and Pb) and nutritional essential (Ca, Co, Cr, Mn, Mo, Ni, Se, Zn) elements in the tissues of cattle from NW Spain *Biometals* 17: 389–397.
- LAI Y.L., YAMAGUCHI M. 2005. Effects of copper on bone component in the femoral tissues of rats: anabolic effect of zinc in weakened by copper. *Biol. Pharm. Bull.* 28 (12): 2296–2301.
- MILLS C.F., DALGARNO A.C. 1972. Copper and zinc status of ewes and lambs receiving increased dietary concentrations of cadmium. *Nature* 239: 171–173.
- NRIAGU J., BOUGHANEN M., LINDER A., HOWE A., GRANT CH., RATTRAY R., VUTCHOV M., LALOR G. 2009. Levels of As, Cd, Pb, Cu, Se and Zn in bovine kidneys and livers in Jamaica. *Ecotoxicology and Environmental Safety* Vol. 72 (2): 564–571.
- PALACIOS C. 2006. The role of nutrients in bone health, from A to Z. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 46 (8): 621–628.
- POSENTI R.A., LABAO A., RIBERIO W.R., DELISTOIANOW J. 1992. Estimation of minerals in forages and tissues of cattle. *Boletin de industria animal* 49 (2): 131–144.
- PASTERNAK K., MAJDANIK M. 1999. Rola cynku w przyrodzie. *Biul. Magnezol.* 4 (¾): 547–553.
- PAYNE J.M. 1983. Bedarfsgerechte Versorgung des Rindes mit Mineralstoffen und Spurenelementen im Hinblick auf gesundheit. Fruchtbarkeit und Leistung. *Krafftfutter* 66: 290–294.
- RATJEN A., ANKE M. 2000. Der Mengen, Spuren und Ultraspurenelementgehalt des Pferdedehaars in Abhängigkeit von Lebensraum, Geschlecht, Haarfarbe. 1. Mitteilung: Der Kupfergehalt, Mengen- und Spurenelemente, Jena: 1169–1176.
- SADURSKI T. 1984. Schorzenia wywołane niedoborem cynku. *Med. Weter.* 8: 489–493.
- SEDKI A., LEKOUCH N., GAMON S., PINEAU A. 2003. Toxic and essential trace metals in muscle, liver and kidney of bovines from polluted area of Marocco. *Sci. Total Environ.* 317: 201–205.

- SCHMIDT A., KOLB E., DITTRICH H., NESTLER K. 1987. Untersuchungen über den Gehalt an Fe, Cu und Zn in Gehirnabschnitten, in Herzmuskel, *M. Gracilis*, Leber, Nieren, Lunge und Milz von Kalbern und Junggrindern. Arch. Exper. Vet. Med., Leipzig 41 (2): 222–230.
- ZHANG Y.H., CHENG Y.Y., HONG Y., WANG D.L., LI S.T. 2003. Effects of zinc deficiency on bone mineralization and its mechanism in rats. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi 37 (2): 121–124.
- ŻMUDZKI J., SZKODA J., JUSZKIEWICZ T. 1991. Stężenie pierwiastków śladowych w tkankach bydła w Polsce. Med. Weter. 47 (3): 413–416.