

UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki

Zootechnika i Rybactwo

mgr Żaneta Steiner-Bogdaszewska

Rozprawa doktorska

**Profil kwasów tłuszczowych i skład mineralny szpiku kostnego
jeleniowatych w zależności od warunków życia lub utrzymania**

**Fatty acid profile and mineral composition of the bone marrow of cervids
depending on living or breeding conditions**

Rozprawa doktorska wykonana w *Katedrze Etologii Zwierząt i Łowiectwa*

Promotor: **dr hab. Katarzyna Tajchman, prof. uczelni**

Lublin, 2023

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 11.10.2023r.

Podpis promotora Katarzyna Tejchman

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami;
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego;
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD wersją elektroniczną.

Data 09.10.2023r.

Podpis autora Ł. Steiner-Bogdaszewska

Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu

Steiner-Bogdaszewska Ż., Tajchman K., Domaradzki P., Florek M. (2022) Composition of fatty acids in bone marrow of red deer from various ecosystems and different categories. *Molecules*, 27(8):2511. DOI: 10.3390/molecules27082511.

Liczba punktów w roku publikacji: MEiN = 140; IF=4,350

Indywidualny wkład pracy w publikację (70%): zaplanowanie i przeprowadzenie doświadczenia, gromadzenie i analiza danych, redagowanie manuskryptu, korekta po recenzjach.

Steiner-Bogdaszewska Ż., Tajchman K., Domaradzki P., Florek M. (2022) Composition and fatty acid profile of bone marrow in farmed fallow deer (*Dama dama*) depending on diet. *Animals*, 12(8): 941. DOI: 10.3390/ani12080941.

Liczba punktów w roku publikacji: MEiN = 100; IF=2,752

Indywidualny wkład pracy w publikację (70%): zaplanowanie i przeprowadzenie doświadczenia, gromadzenie danych, redagowanie manuskryptu, korekta po recenzjach.

Steiner-Bogdaszewska Ż., Tajchman K., Ukalska-Jaruga A., Florek M., Pecio M. (2022) The mineral composition of bone marrow, plasma, bones and the first antlers of farmed fallow deer. *Animals*, 12, 2764. DOI: 10.3390/ani12202764.

Liczba punktów w roku publikacji: MEiN = 100; IF=2,752

Indywidualny wkład pracy w publikację (60%): zaplanowanie i przeprowadzenie doświadczenia, gromadzenie i analiza danych, redagowanie manuskryptu, korekta po recenzjach.

Łączna liczba punktów MEiN* = 340

IF (Impact factor) = 9,854**

Udział w publikacjach = 66%

* Wykaz czasopism naukowych MEiN

** Web of ScienceTM – Journal Citation Reports®

Spis treści

Spis treści.....	4
Streszczenie	5
Summary.....	7
Zastosowane skróty w pracy doktorskiej	9
Wprowadzenie teoretyczne na podstawie publikacji	10
Hipoteza i cel badań	16
Materiał i metody	17
Omówienie wyników i dyskusja	23
Wnioski.....	57
Bibliografia.....	59
Załączniki	72
Kopie opublikowanych prac wchodzących w skład cyklu publikacji (załącznik nr 1)	
Oświadczenia doktoranta oraz współautorów dotyczące ich wkładu w przygotowanie opublikowanych prac naukowych (załącznik nr 2)	

Streszczenie

Jeleniowate to grupa ssaków o stosunkowo wysokich wymaganiach żywieniowych ze względu na ważne potrzeby związane z ich strategiami życiowymi. Zwłaszcza najmłodsze osobniki powinny przed okresem zimowym osiągnąć odpowiednią masę ciała, jednak ta niekoniecznie odzwierciedla korzystny skład kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym. Podczas rozwoju szkieletu jeleniowatych równie ważna jest odpowiednia podaż niezbędnych składników mineralnych. Zmiany metaboliczne wskazują, że pierwiastki są nie tylko zużywane na potrzeby bieżące zwierząt, ale mogą też być magazynowane w organizmie i mobilizowane w przypadku ich niedoborów.

Hodowla jeleniowatych, mimo funkcjonowania w Polsce od ponad 40 lat, nadal nie została w pełni zoptymalizowana, szczególnie w aspekcie żywieniowym, wynikającym z dynamicznych zmian klimatu. Badania składu mineralnego szpiku kostnego oraz osocza, kości i poroża jeleniowatych dostarczają cennych informacji na temat stanu odżywienia, zdrowia i funkcjonowania fermowych jeleniowatych.

Celem głównym badań była analiza profilu kwasów tłuszczowych i składu mineralnego szpiku kostnego fermowych i dzikich jeleniowatych. Główna hipoteza badawcza zakładała, że warunki życia lub utrzymania jeleniowatych determinują profil kwasów tłuszczowych i skład mineralny szpiku kostnego. Pośrednie hipotezy badawcze to: profil kwasów tłuszczowych jeleniowatych dzikich i fermowych różnił się znacząco ze względu na warunki życia, wraz z wiekiem koncentracja i skład kwasów tłuszczowych ulega zmianie oraz warunki utrzymania w chowie fermowym oraz żywienie wywierają wpływ na profil kwasów tłuszczowych i skład mineralny szpiku kostnego młodych jeleniowatych.

W celu zweryfikowania przyjętych hipotez przeprowadzono niezależne trzy badania. W pierwszym z nich przeanalizowano wpływ warunków życia jeleni europejskich (*Cervus elaphus*) (dzikie vs. fermowe) oraz wieku zwierząt (cielęta vs. dorosłe osobniki) na profil kwasów tłuszczowych szpiku kostnego. Najczęściej występującym kwasem tłuszczowym był kwas oleinowy, który stanowił około 37% wszystkich kwasów tłuszczowych. Szpik kostny dzikich cieląt jelenia charakteryzował się istotnie wyższą zawartością tłuszczu i udziałem nasyconych kwasów tłuszczowych, natomiast fermowych cieląt jelenia większą zawartością wody i suchej masy beztłuszczowej, a także większą zawartością jednonienasyconych kwasów tłuszczowych. U dzikich cieląt stwierdzono istotnie wyższy poziom sumy kwasów n-3 i n-6 oraz korzystniejszy stosunek n-6/n-3. Profil

kwasów tłuszczowych dzikich dorosłych łai wynikał z niższego udziału kwasów tłuszczowych nasyconych i wyższego udziału kwasów nienasyconych.

W drugim badaniu analizowano skład kwasów tłuszczowych w szpiku cielat danieli fermowych (*Dama dama*) po okresie pastwiskowym i po żywieniu zimowym. W badaniach wykazano, że profil kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym zwierząt zmieniał się z wiekiem oraz ze względu na odmienne żywienie. Szpik kostny po okresie pastwiskowym wykazywał istotnie wyższy udział nasyconych kwasów tłuszczowych, zawierał także istotnie większe ilości kwasów tłuszczowych *trans* i sprzężonego kwasu linolowego. Stan odżywienia zwierząt po okresie zimowym był korzystniejszy ponieważ szpik kostny składał się z wyższego poziomu jednonienasyconych kwasów tłuszczowych, co wynikało z zapewnienia odpowiednich warunków zimowania i zbilansowanej paszy.

Celem trzeciego badania była analiza zawartości 21 pierwiastków (makroelementów: Ca, P, Mg, K, Na; pierwiastków śladowych: Li, Cr, Mn, Co, Cu, Zn, Se, Mo; oraz pierwiastków potencjalnie toksycznych: Be, Al, As, Cd, Sb, Ba, Pb, Ni) w szpiku kostnym oraz w wybranych tkankach tj. osoczu, kościach i pierwszym porożu danieli fermowych (*Dama dama*). Porównując tkanki miękkie, wykazano wyższe stężenia Ca, P, Mg, Cr, Zn, Se, Al, Ba i Ni w szpiku kostnym niż w osoczu. Wyniki te są zgodne z badaniami dotyczącymi obiegu minerałów w organizmie w zależności od spożywanego pożywienia oraz przemian metabolicznych wynikają głównie z tego, że krew nie gromadzi składników mineralnych, a jedynie je transportuje i odzwierciedla ich ilość w danym momencie.

Przeprowadzone badania potwierdziły hipotezę główną oraz hipotezy poboczne. Stosowana w hodowli fermowej dieta wpływa na skład kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym młodych jeleniowatych. Młode dzikie zwierzęta wydają się lepiej przystosowane do nadchodzącej zimy niż zwierzęta fermowe. Daniele fermowe w pierwszym roku życia były lepiej odżywione po okresie zimowym. Profil kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym zmieniał się wraz z wiekiem jeleniowatych i po włączeniu odpowiedniego żywienia miał pozytywne znaczenie na przeżycie niekorzystnych warunków takich jak zima czy okresy głodu. Wyniki badań pierwiastków potwierdziły możliwość migracji minerałów pomiędzy szpikiem kostnym, krwią, kośćmi i porożem oraz akumulowania się ich w tkankach kostnych poprzez procesy wymiany kationów dwuwartościowych.

Słowa kluczowe: kwasy tłuszczowe; szpik kostny; makroelementy; pierwiastki śladowe; hodowla jeleniowatych

Summary

Cervidae is a family of ruminant mammals with high nutritional requirements due to essential needs related to their life strategies, primarily during antler growth. Especially the youngest should reach the appropriate body weight before winter. Adequate body weight, however, does not necessarily reflect the favorable composition of fatty acids in the bone marrow. Bone marrow is regarded as an indicator of health status because it is not only a fat source but also contains minerals, vitamins, and fatty acids. It is critical during the skeletal growth and development of young deer to have an adequate supply of essential minerals. Moreover, metabolic changes indicate that the elements are used for current needs and can be stored and mobilized.

The knowledge about deer nutrition is still insufficient. Despite operating in Poland for 40 years, deer breeding has not been fully optimized yet, especially in the nutritional aspect, resulting from dynamic climate changes. Studies of the bone marrow, plasma, bones, and antlers provide valuable information on the nutritional status, health and future functioning of farmed deer.

The study's main aim was to analyze the content of minerals and the profile of fatty acids in the bone marrow of farmed and wild cervids. The main hypothesis was that the fatty acid profile and mineral composition of the bone marrow and selected tissues reflect the living or breeding conditions of cervids. Indirect hypotheses were that the fatty acid profile of the bone marrow of wild and farmed cervids differed significantly due to the living conditions; concentration and composition of fatty acids depend on age of animals; breeding conditions influence the fatty acid profile and mineral composition of young deer bone marrow.

Three studies were conducted independently. In the first of them, the impact of the living conditions of red deer (*Cervus elaphus*) and the age of wild animals on the fatty acid profile in the bone marrow was examined. Oleic acid (18:1 *c*9) was the most abundant in deer bone marrow and comprised approximately 37% of total FAs. The bone marrow of young wild deer was characterized by a significantly higher fat content and saturated FAs proportion. In contrast, the bone marrow of farmed calves contained more moisture and fat-free dry matter, as well as more monounsaturated FAs *cis*, branched-chain FAs and monounsaturated FAs *trans*. A significantly higher level of *n*-3 and *n*-6 FAs and a more favorable *n*-6/*n*-3 ratio in the bone marrow of wild calves were determined. Due to the lower

proportion of saturated fatty acids and the higher proportion of monounsaturated fatty acids, a more favorable fatty acid profile was found in adult animals.

In the second study, the composition of fatty acids in the marrow of farmed fallow deer (*Dama dama*) calves after summer and winter feeding was analyzed. After the pasture period, the bone marrow showed a significantly higher amount of saturated fatty acids. In addition, the bone marrow after the grazing period contained significantly higher amounts of trans fatty acids and conjugated linoleic acid and higher levels of monounsaturated fatty acids after the winter-feeding period. The results obtained in the study indicate that providing the animals with appropriate housing conditions on the farm and their optimal feeding resulted in better condition and nutritional status of the animals, which is indicated by a more favourable composition and profile of fatty acids in the bone marrow.

The third study aimed to analyze the content of 21 mineral elements (including bulk elements: Ca, P, Mg, K, Na; trace elements: Li, Cr, Mn, Co, Cu, Zn, Se, Mo; and toxic elements: Be, Al, As, Cd, Sb, Ba, Pb, Ni) in bone marrow, plasma, bones and first antlers of farmed fallow deer (*Dama dama*). When comparing soft tissues, higher concentrations of Ca, P, Mg, Cr, Zn, Se, Al, Ba and Ni were found in the bone marrow than in the plasma. These results are consistent with studies on the circulation of minerals in the body depending on metabolic changes and consumed feed. The blood does not accumulate minerals but only transports them and reflects their amount at a given moment. Between Ca and Cd, Ca and Pb, and P and Pb in the tissues.

The conducted research confirmed all hypotheses. The diet used in deer farming can affect the composition of fatty acids in the bone marrow of young deer. Young wild animals seem better adapted to winter than farm animals. Farmed fallow deer in the first year of life were better nourished after the winter period, which they spent in good living conditions with controlled access to roughage, concentrate and water. The fatty acid profile in the bone marrow changed positively with the age of cervids and, after incorporating appropriate nutrition, positively impacted surviving unfavorable conditions such as winter or famines. The results confirmed the possibility of the migration and concentration of minerals in the bone tissue by the exchange processes of divalent cations.

Keywords: fatty acids; bone marrow; macroelements; trace elements; deer farming

Zastosowane skróty w pracy doktorskiej

F- tłuszcz,
M- woda,
FFM- sucha masa beztłuszczowa,
SFA- suma nasyconych kwasów tłuszczowych,
OCFA- nieparzyste kwasy tłuszczowe,
BCFA- rozgałęzione kwasy tłuszczowe,
MUFA cis- suma jednonienasyconych kwasów cis,
LA- kwas linolowy 18:2 n-6,
PUFA- suma wielonienasyconych kwasów tłuszczowych,
LC PUFA- długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe
MUFA *trans*- suma jednonienasyconych kwasów tłuszczowych *trans*,
TFA- suma kwasów tłuszczowych trans,
CLA- suma sprzężonego kwasu linolowego
ALA- kwas α -linolenowy
DPA- kwas dokozapentaenowy
FAME- estry metylowe kwasów tłuszczowych
PCA- analiza głównych składowych
LOD- granica poziomu wykrywalności
Ca- wapń
P- fosfor
Mg- magnez
K- potas
Na- sól
Li- lit
Cr- chrom
Mn- mangan
Co- kobalt
Cu- miedź
Zn- cynk
Se- selen
Mo- molibden
Be- beryl
Al- glin
As- arsen
Cd- kadm
Sb- antymon
Ba- bar
Pb- ołów
Ni- nikiel

Wprowadzenie teoretyczne na podstawie publikacji

Jeleniowate to grupa ssaków o stosunkowo wysokich wymaganiach żywieniowych ze względu na ważne potrzeby związane z ich strategiami życiowymi. Muszą one zrównoważyć alokację zasobów między rozwojem poroża a zachowaniem dobrej kondycji i zdrowia, ponieważ tylko najlepsze samce będą miały znaczący wkład genetyczny w następne pokolenie (Gómez i in., 2006; Gómez i in., 2012; Ceacero, 2016).

Oceniając stan zdrowia jeleniowatych, zaleca się określenie procentowej zawartości tłuszczu w szpiku kostnym (Silberstein i Anastasi, 2018). Szpik kostny to miękka, dobrze ukrwiona gąbczasta tkanka występująca w jamach szpikowych kości długich. Dzieli się na szpik kostny czerwony, w którym zachodzi hematopoeza (powstawanie elementów morfotycznych krwi) oraz szpik kostny żółty, składający się głównie z komórek tłuszczowych. Szpik czerwony wypełnia wszystkie kości u płodów i noworodków oraz występuje w nasadach kości płaskich i długich w okresie poporodowym (Silberstein i Anastasi, 2018). Wykazano, że kwasy tłuszczowe lipidów szpiku kostnego są wykorzystywane jako źródło energii i przyczyniają się do tworzenia nowych komórek (Dorshkind, 1990), zwłaszcza u młodych zwierząt (Tajchman i in., 2020a,b). U przeżuwaczy lipidy tkankowe w okresie prenatalnym oraz u młodych organizmów zawierają niewielkie ilości kwasu linolowego i linolenowego (Leat, 1966; Scott i in., 1967; Noble i in., 1971). Dlatego najmłodsze zwierzęta mogą wykazywać niedobór niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (Payne, 1978).

Ważne jest, by cielęta były dobrze odżywione, aby osiągnąć odpowiednią masę ciała przed zimą (Janiszewski i in., 2008). Przeżycie najmłodszych jeleniowatych w kolejnych miesiącach życia, a także dalszych latach zależy od prawidłowego żywienia i właściwej kondycji w pierwszym roku życia (Bartoš i in., 2016). Dzieciółowski i in. (1996) wykazali, że cielęta dzikich jeleniowatych, niezależnie od płci, miały taką samą masę ciała do 6 miesiąca życia. Istotne różnice w opisywanej cesze obserwowano u zwierząt w wieku 1,5 roku, kiedy to samce osiągały większe przyrosty. U starszych łań masa ciała stabilizowała się w wieku 2,5 roku, natomiast u samców w wieku 4,5 roku. Ponadto u dorosłych samic, biorących udział w rozrodzie, nie stwierdzono istotnych różnic w masie ciała (Dzieciółowski i in., 1996). Opisywana cecha jednak niekoniecznie odzwierciedla korzystny skład kwasów tłuszczowych czy stężenie minerałów w szpiku kostnym.

Należy pamiętać o tym, że szpik kostny u młodych zwierząt jest nie tylko źródłem tłuszczu, ale także miejscem, w którym magazynowane są minerały, witaminy i kwasy

tłuszczowe mające wpływ na funkcjonowanie młodego organizmu zwłaszcza w najmniej sprzyjających warunkach środowiskowych tj. w okresie zimowym (Irving i in., 1957). Szpik kostny to niezwykła tkanka, w której namnażane są komórki i kolejno wraz z krwią transportowane po organizmie, przyczyniając się tym samym do jego wzrostu i przebudowy (Turner, 1979). Nie są znane optymalne stężenia kwasów tłuszczowych i innych związków, które powinny być obecne w szpiku zdrowych jeleniowatych. Wydaje się jednak zasadne, że dla ich organizmu korzystne jest posiadanie odpowiedniego stężenia, by móc sprawnie poruszać się i utrzymywać odpowiednią podaż tkanki zapasowej w okresie zimowym (Soares, 1995; Kiarie i Nyachoti, 2010). Efektywność wchłaniania substancji odżywczych z przewodu pokarmowego może być modyfikowana, aby sprostać zmieniającym się wymaganiom (NRC, 2005, 2007).

Zawartość kwasów tłuszczowych można modyfikować różnymi dodatkami żywieniowymi, a problem ten został stosunkowo dobrze przeanalizowany u zwierząt gospodarskich. Badania koncentrowały się głównie na składzie lipidów w produktach zwierzęcych (mięso, mleko, jaja), których skład odzwierciedlał zarówno biosyntezę kwasów tłuszczowych w tkankach, jak i skład kwasów tłuszczowych w spożywanych lipidach (Hoz i in., 2003; Kouba i Mourot, 2011; Serrapica i in., 2020). Wykazano, że związek pomiędzy zawartością kwasów tłuszczowych w tkankach a dietą jest silniejszy u zwierząt monogastrycznych niż u przeżuwaczy, u których kwasy tłuszczowe zawarte w pożywieniu podlegają uwodornieniu w żwacu (Christie, 1981; Bruckner, 1992). Z tych powodów u zwierząt poligastrycznych wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) są zwykle obecne w dużych ilościach w tkance tłuszczowej (Stender i in., 2008). Ta grupa kwasów prawdopodobnie jest mobilizowana z diety roślinnej, ponieważ organizm nie potrafi ich sam syntetyzować (Jackson, 1926). Wykazano również, że tłuszcze *trans* obecne w tłuszczu przeżuwaczy powstały w wyniku przemian metabolicznych PUFA przeprowadzanych przez mikroorganizmy w żwacu. Zwykle stężenie kwasów *trans* w tłuszczu przeżuwaczy nie przekracza 6% (Stender i in., 2008).

Zawartość tłuszczu w szpiku kostnym wiąże się również ze stanem fizjologicznym zwierząt (Jackson, 1926; Nieminen i Soppela, 1990; Soppela i Nieminen, 2001). Selektywne odkładanie się nienasyconych kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym może ułatwiać mobilizację tych kwasów w niesprzyjających warunkach środowiskowych takich jak niska temperatura otoczenia. Zbadano, że podczas lipolizy tkanki tłuszczowej uwalniane są głównie długołańcuchowe i nienasycone kwasy tłuszczowe (Gavino i Gavino, 1992;

Raclot i in., 1995). Należy zaznaczyć, że tłuszcz magazynowany jest najpierw w szpiku kostnym, potem w okolicy nerek, a na samym końcu pod skórą. Wielu badaczy uważa szpik kostny za wskaźnik stanu zdrowia zwierząt kopytnych, ponieważ jest to również ostatnia tkanka tłuszczowa mobilizowana w okresie głodu (Ransom, 1965; Davis i in., 1987; Wolkers i in., 1994).

Skład kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym jest ważnym miernikiem stanu odżywienia zwierząt, zwłaszcza młodych. Jednak dotychczas przeprowadzono niewystarczającą ilość badań dotyczących zależności pomiędzy składem kwasów tłuszczowych a kondycją i zdrowiem zwierząt. Badanie tych zależności mogłoby pozwolić lepiej zrozumieć rolę szpiku kostnego w metabolizmie tłuszczów i wpływ diety na jego skład. Określono, że u bardzo młodych zwierząt ssących mleko matki występuje niski poziom kwasu linolowego i linolenowego w lipidach tkankowych (Leat, 1966; Scott i in., 1967; Noble i in., 1971). Na podstawie tych danych, wywnioskowano, że młode zwierzęta mogą być narażone na ryzyko niedoboru niezbędnych kwasów tłuszczowych (Payne, 1978).

Warto podkreślić, że u reniferów, gatunku należącego do rodziny jeleniowatych, w składzie kwasów tłuszczowych kości proksymalnych (kość udowa) dominują nasycone kwasy tłuszczowe (SFA), natomiast w kościach dystalnych (kości śródstopia) dominują nienasycone kwasy tłuszczowe, głównie kwas oleinowy (C18:1 n9); (Meng i in., 1969; Pond i in., 1993). Wyższy poziom jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) niż wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w lipidach szpiku kostnego jest korzystniejszy dla jeleniowatych, gdyż zapewnia płynność adipocytów w niskich temperaturach. Wysoki udział kwasu oleinowego związany jest z niską temperaturą topnienia tłuszczu szpiku kostnego, a tym samym poprawia jego płynność i funkcjonowanie kończyn zwierzęcia podczas mrozów (Christie, 1981). Mechanizm utrzymywania miękkości tłuszczów poprzez zwiększenie stopnia ich nienasycenia zaobserwowano w dystalnych kościach różnych gatunków ssaków (Nieminen i Soppela, 1990; Gavino i Gavino, 1992; Soppela i Nieminen, 2001; Kiarie i Nyachoti, 2010). Zmiany temperatury topnienia szpiku kostnego wykryto zarówno u ssaków arktycznych, jak i tropikalnych (Irving i in., 1957; Irving, 1972). Potwierdzono, że lipoliza tkanki tłuszczowej prowadzi do preferencyjnego uwalniania długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (LC PUFA); (Gavino i Gavino, 1992; Raclot i in., 1995).

W przeciwieństwie do hodowli fermowej, w której można modyfikować warunki bytowe i żywieniowe, jeleniowate dzikie najczęściej narażone są nie tylko na braki w bazie

pokarmowej, ale również na niskie temperatury w okresie zimowym. Wykazano jednak, że jeleniowate mają szereg przystosowań, które pomagają im przetrwać najbardziej wymagające okresy, np. potrafią spowolnić metabolizm zimą lub oszczędzać energię poprzez ograniczanie aktywności (Thouzeau i in., 1997; Arnold i in., 2004; Turbil i in., 2011). Należy też podkreślić, że dzikie osobniki potrafią intuicyjnie odnaleźć i zaspokoić ewentualne niedobory żywnościowe (Tajchman i in., 2021).

Profil składu szpiku kostnego oprócz np. żywienia (Nagy i in., 2019; Razmaité i in., 2020; Hoz i in., 2003; Nguyen i in., 2004), warunków klimatycznych (Irving i in., 1957; Turner, 1979), stanu fizjologicznego (Nieminen i Laitinen, 1986; Jackson, 1926; Nieminen i Soppela, 1990; Soppela i Nieminen, 2001) zmienia się również wraz z wiekiem zwierząt (Soppela i Nieminen, 2001; Razmaité i Pileckas, 2019). U starszych osobników szpik czerwony zmienia się w szpik żółty, a jego udział w kościach wzrasta wraz z wiekiem (Silberstein i Anastasi, 2018). Ze względu na przemiany szpiku kostnego interesujące wydaje się poznanie składu kwasów tłuszczowych szpiku kostnego jeleniowatych młodszych i starszych.

Zmiany metaboliczne wskazują, że w organizmach żywych zachodzi również ciągła wymiana pierwiastków niezbędnych do życia, które są wykorzystywane do budowy komórek i tkanek. Niektóre są okresowo usuwane wraz z wydzielinami i wydaliniami, podczas gdy inne mogą być magazynowane w organizmie i mobilizowane w przypadku ich niedoborów w diecie. Sytuacja mobilizacji rezerw może mieć miejsce u jeleniowatych w okresie wzrostu poroża. Poroże jako tkanka rośnie bardzo szybko i w trakcie budowy wymaga znacznego transferu minerałów ze szkieletu poprzez krwiobieg. Adaptacyjna przebudowa szkieletu poprzez ciągłą biomineralizację zachodzi przez całe życie jeleniowatych, w przeciwieństwie do poroża, które co roku jest zrzucane (Landete-Castillejos i in., 2010). Jednakże, wzrost młodych jeleniowatych jest najszybszy od urodzenia do po pierwszego roku życia, natomiast kolejne cztery lata charakteryzują się niższym tempem wzrostu (Zannése i in., 2006). Pierwsze poroże rośnie średnio $1,95 \pm 0,05$ cm/tydzień przez około 14 tygodni (Gómez i in., 2008). Warunki panujące we wczesnych miesiącach życia młodego samca mają istotny wpływ na jego ostateczną wielkość i sprawność. Poroże, które jest drugorzędową cechą płciową, a zwłaszcza jego wielkość, ma duże znaczenie w ustalaniu hierarchii oraz wpływa na atrakcyjność byka wśród samic (Gómez i in., 2012).

Żywienie, które w pełni zaspokaja potrzeby młodych zwierząt, warunkuje prawidłowy wzrost i rozwój organizmu, a co za tym idzie odpowiednie stężenia pierwiastków i ich właściwe proporcje w tkankach i płynach ustrojowych. Substancje odżywcze transportowane przez układ krążenia są wbudowywane w układ kostny w tym w poroże jeleniowatych. Niemniej jednak krew, podlegająca ciągłym zmianom poprzez funkcję transportową i komunikacyjną, stanowi główny wskaźnik zmian zachodzących w organizmie (Weiss i Wardrop, 2010; Tajchman i in., 2019; Tajchman i in., 2020a). Tkanka ta jednak nie jest dobrym wskaźnikiem odpowiedniej podaży wszystkich minerałów, ukazując jedynie ich zawartość w momencie przepływu. Szpik kostny młodych zwierząt składa się głównie z tkanki aktywnej hematopoetycznie (z niedojrzałych komórek mogą rozwinąć się wszystkie typy krwinek) oraz ze stosunkowo niewielkiej zawartości tłuszczu. Jest on odpowiedzialny za produkcję krwinek, które pełnią kluczowe role w organizmie. Każdego dnia szpik kostny wytwarza miliardy nowych komórek krwi na kilogram masy ciała dorosłego organizmu, a proces ten nazywany jest hematopoezą. Co więcej hematopoeza jest bardzo pochłaniającym procesem ze względu na szybki obrót układu krwiotwórczego i wynikające z tego zapotrzebowanie na składniki odżywcze. Powszechnie wiadomo, że makro- i mikroskładniki mają znaczenie dla produkcji krwinek, chociaż niektóre mechanizmy modulowania hematopoezy przez pierwiastki śladowe pozostają nieznane (Oliveira i in., 2018). Układ krwiotwórczy znajduje się pod znakomitą kontrolą lokalną i ogólnoustrojową oraz reaguje szybko i przewidywalnie na różne bodźce (Silberstein i Anastasi, 2018). W rezultacie spodziewać się możemy, iż niekorzystne warunki bytowania jeleniowatych przekładać się będą stosunkowo szybko na dysfunkcje fizjologiczne związane z niedoborem, nadmiarem lub zaburzoną homeostazą mineralną (Cygan-Szczegielniak, 2021). Odpowiednia podaż makroelementów jest szczególnie ważna w okresie wzrostu i rozwoju szkieletu młodego zwierzęcia (Gracia i in., 1999; Gómez i in., 2008; Tajchman i in., 2020a). Najważniejszą rolą minerałów jest ich funkcja dotycząca prawidłowego rozwoju i utrzymania układu kostnego. Akumulacja minerałów w tkankach jest współzależna, gdyż jeden pierwiastek nie będzie się kumulował bez drugiego. Równie ważna jest synergia z niektórymi witaminami (zwłaszcza rozpuszczalnymi w tłuszczach) i kwasami tłuszczowymi (zwłaszcza z niezbędnymi nienasyconymi kwasami tłuszczowymi); (Nagy i in., 2019; Razmaité i in., 2020).

Niedobory makro- i mikroelementów u przeżuwaczy mogą prowadzić do poważnych problemów z reprodukcją, utrudniać wzrost i powodować osteochondrozę,

czyli martwicę chrzęstno-kostną (Kudrnáčová i in., 2018). Głównym czynnikiem mogącym prowadzić do zaburzeń homeostazy organizmu jest zanieczyszczenie środowiska jego bytowania poprzez skażenie, gleby, roślin, wody czy powietrza (Bąkowska i in., 2018). Hodowlane jeleniowate, szczególnie te utrzymywane w regionach o małym zaludnieniu i stosunkowo nierozwiniętym przemyśle, nie są tak narażone na działanie szkodliwych substancji, jak wolnożyjące. Dzikie zwierzęta przemieszczają się, często wzdłuż dróg i autostrad, a ich pasza i woda nie pochodzi z kontrolowanych źródeł, jak ma to miejsce w przypadku hodowli fermowej. Mimo tego, że jeleniowate hodowlane mają dostęp do zamkniętych pastwisk i są żywione odpowiednio zbilansowaną paszą, w ich tkankach stwierdzono kumulację substancji toksycznych (Tajchman i in., 2020b).

Należy podkreślić, że wpływ składu i zmian kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym na stan odżywienia nie został dokładnie zbadany, zwłaszcza u najmłodszych i najbardziej podatnych na niekorzystne warunki klimatyczne zwierząt. Badania te są istotne z punktu widzenia hodowli fermowej jeleniowatych, gdzie ograniczona przestrzeń wiąże się z ograniczonymi zasobami i koniecznością zapewnienia odpowiedniego żywienia zimowego (Fløjgaard i in., 2017). Hodowla jeleniowatych wymaga zatem stałego doskonalenia i dostosowywania do zmieniających się warunków środowiskowych i rynkowych. Badania nad żywieniem jeleniowatych, takie jak opisane poniżej, mogą przyczynić się do zoptymalizowania zasad żywienia i opracowania standardów żywienia jeleniowatych fermowych. Znajomość profilu kwasów tłuszczowych i składu mineralnego szpiku kostnego jeleniowatych dostarcza cennych informacji na temat stanu odżywienia, zdrowia i przyszłego funkcjonowania fermowych jeleniowatych. Dotychczas prowadzone badania na jeleniach (Tajchman i in., 2021) i reniferach (Hassan i in., 2013) wskazywały, iż zawartość składników mineralnych różniła się w zależności od warunków utrzymania zwierząt, jednak daniiele, które należą do najczęściej hodowanego gatunku jeleniowatych w Europie zostały niezbadane w tym zakresie.

Hipoteza i cel badań

Główna hipoteza badawcza

- Warunki życia lub utrzymania jeleniowatych determinują profil kwasów tłuszczowych i skład mineralny szpiku kostnego.

Pośrednie hipotezy badawcze

- Profil kwasów tłuszczowych szpiku kostnego jeleniowatych dzikich i fermowych różnił się znacząco ze względu na warunki życia.
- Wraz z wiekiem jeleniowatych koncentracja i skład kwasów tłuszczowych ulegają zmianie.
- Warunki utrzymania w chowie fermowym oraz żywienie wywierają wpływ na profil kwasów tłuszczowych i skład mineralny szpiku kostnego młodych jeleniowatych.

Cel badań

Celem głównym pracy była analiza profilu kwasów tłuszczowych i składu mineralnego szpiku kostnego fermowych i dzikich jeleniowatych.

Cele szczegółowe

- Porównanie profilu kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym dzikich i hodowlanych cieląt jelenia europejskiego (wpływ warunków bytowania), oraz dzikich cieląt i łań (wpływ wieku).
- Analiza profilu kwasów tłuszczowych szpiku cieląt danieli fermowych po okresie pastwiskowym i po dokarmianiu zimowym.
- Określenie stężenia 5 makroelementów: wapnia (Ca), fosforu (P), magnezu (Mg), potasu (K), sodu (Na), 8 pierwiastków śladowych: litu (Li), chromu (Cr), manganu (Mn), kobaltu (Co), miedzi (Cu), cynku (Zn), seleniu (Se), molibdenu (Mo) oraz 8 pierwiastków o potencjalnym działaniu toksycznym: berylu (Be), glinu (Al), arsenu (As), kadmu (Cd), antymonu (Sb), baru (Ba), ołowiu (Pb) i niklu (Ni) w szpiku kostnym, osoczu, kościach i pierwszym porożu młodych danieli fermowych.

Material i metody

Dla przejrzystości zastosowano umowny podział zarówno metodyki, jak i wyników zgodnie z pracami, w których zostały opublikowane (Tabela 1).

Tabela 1. Prace, w których opublikowano prezentowane wyniki badań

	Dane bibliograficzne
Praca 1	Steiner-Bogdaszewska Ż. , Tajchman K., Domaradzki P., Florek M. (2022) Composition of fatty acids in bone marrow of red deer from various ecosystems and different categories. <i>Molecules</i> , 27(8):2511. DOI: 10.3390/molecules27082511.
Praca 2	Steiner-Bogdaszewska Ż. , Tajchman K., Domaradzki P., Florek M. (2022) Composition and fatty acid profile of bone marrow in farmed fallow deer (<i>Dama dama</i>) depending on diet. <i>Animals</i> , 7;12(8): 941. DOI: 10.3390/ani12080941.
Praca 3	Steiner-Bogdaszewska Ż. , Tajchman K., Ukalska-Jaruga A., Florek M., Pecio M. (2022) The mineral composition of bone marrow, plasma, bones and the first antlers of farmed fallow deer. <i>Animals</i> , 12, 2764. DOI: 10.3390/ani12202764.

Projekty eksperymentów

Materiał do badań pobrano od 40 fermowych i dzikich jeleniowatych w różnym wieku, w tym 19 hodowlanych danieli zwyczajnych (*Dama dama*) i 21 jeleni europejskich (*Cervus elaphus*); (6 hodowlanych i 15 dzikich). Łącznie pobrano 40 próbek szpiku kostnego z kości śródstopia (*ossa metatarsalia*) oraz po 6 próbek:

- krwi z żyły szyjnej (*vena jugularis externa*),
- całkowicie skostniałego poroża
- kości śródstopia.

W pracy 1 materiał pobrano w listopadzie 2019 r. od 21 jeleni europejskich, w tym 6 samców utrzymywanych fermowo i 9 dzikich w wieku 6-7 miesięcy oraz 6 dzikich nieciężarnych łań w wieku 3-6 lat. W pracy 2 badania przeprowadzono w listopadzie 2019 r. oraz w kwietniu 2020 r. na 13 bykach danieli fermowych w pierwszym roku życia, tj. 6 osobnikach w wieku 6-7 miesięcy po okresie pastwiskowym (listopad) i 7 samcach w wieku 11-12 miesięcy po okresie zimowym (kwiecień). W pracy 3 badania zrealizowano w kwietniu (po żywieniu zimowym) 2021 r. na 6 hodowlanych bykach daniela zwyczajnego w wieku 16 miesięcy.

Jeleniowate fermowe utrzymywano w Stacji Badawczej Instytutu Parazytologii PAN w Kosewie Górnym (woj. warmińsko-mazurskie; Polska; N: 53°48'; E: 21°23'), która prowadzi hodowlę i wypas jeleniowatych na swoich terenach od 1986 r. System żywienia obejmował rotacyjny wypas pastwiskowy o powierzchni zgodnej z DEFRA (2022) i FEDFA (2022), na którym zwierzęta przebywały w okresie od kwietnia do listopada. Roślinność występująca w zagrodach, w których utrzymywane były zwierzęta, była zróżnicowana. Wśród traw najczęściej spotykano *Dactylis glomerata*, *Poa pratensis* i *Lolium perenne*, które zapewniały jeleniowatym wysokowartościowy pokarm. Rośliny strączkowe, takie jak *Trifolium repens*, uzupełniały ich dietę o białko i azot. Nie obserwowano występowania roślin niechcianych lub szkodliwych dla zdrowia zwierząt. Na pastwiskach rosły także drzewa (głównie *Betula pendula*, *Malus sylvestris*, *Malus domestica*, *Prunus domestica* i *Pinus sylvestris*), które stanowiły dodatkowe źródło minerałów oraz ochronę przed słońcem i deszczem (Kulik i in., 2023).

W okresie zimowym (od grudnia do marca) jako paszę objętościową zwierzętom zadawano sianokiszonkę z traw (*ad libitum*) oraz siano. Pasza treściwa podawana była do koryt o takiej długości, by zapewniały dostęp wszystkim osobnikom do pożywienia. Dzienna dawka paszy treściwej wynosiła 260 g. Jej skład był następujący: 70% sprasowanego owsa, 15% koncentratu sojowego (zawierającego 33 % białka surowego; Eco-pasz) i 15% koncentratu rzepakowego (zawierającego 45% białka surowego; Eco-pasz). Zwierzęta miały wolny dostęp do świeżej wody oraz wieloskładnikowych lizawek Josera Phosphoreimer (Josera, Polska) przez cały rok (Tabela 2) (Tajchman i in., 2022).

Ubój samców fermowych jeleniowatych odbywał się w wieku 6-7 miesięcy lub 16 miesięcy zgodnie z praktyką hodowlaną. Zwierzęta dzikie pochodziły z Nadleśnictwa Strzałowo, leżącego w bezpośrednim sąsiedztwie Stacji Badawczej w Kosewie. Dzikie osobniki zostały pozyskane w sezonie łowieckim zgodnie z obowiązującymi w Polsce Zasadami Selekcji Osobniczej i Populacyjnej Zwierząt Łownych (Dz. U Załącznik do uchwały NRL nr 57/2005 z dnia 22 lutego 2005 r.).

Ferma od północnej części graniczyła z Jeziorem Kuc, z pozostałych stron otoczona była lasami administrowanymi przez Nadleśnictwo Strzałowo i Spychowo, wchodzące w skład Kompleksu Promocyjnego „Lasy Mazurskie”. Nadleśnictwa te położone są na terenie Puszczy Piskiej. Ich powierzchnia ogólna to 82 392 ha, w tym lasy, które stanowią 43 336 ha (<https://kosewopan.pl/pl/home/>). Nadleśnictwo Strzałowo, skąd pochodziły jelenie europejskie do badań, charakteryzowało się dużym zróżnicowaniem

siedliskowym i gatunkowym. Dominującym gatunkiem drzew była sosna, która stanowiła około 85% powierzchni leśnej. Wśród cennych siedlisk przyrodniczych na terenie nadleśnictwa wyróżniono m.in.: grądy subkontynentalne, zmiennowilgotne łąki trzęślicowe, suche wrzosowiska, łąkowe lasy, w skład których wchodziły dęby, wiązy i jesiony (<https://strzalowo.olsztyn.lasy.gov.pl/>). Według danych inwentaryzacyjnych w Nadleśnictwie Strzałowo i Spychowo, bytowało około 1500 jeleni europejskich, a zagęszczenie tego gatunku było na poziomie 19,4 szt./1000 ha (2023 r.). Obszar Nadleśnictwa i otaczających go terenów rolnych, w tym obszernych łąk i pastwisk, zapewnia doskonale warunki życia dla dzikich zwierząt (<https://strzalowo.olsztyn.lasy.gov.pl/>).

Tabela 2. Skład wieloskładnikowych lizawek Josera Phosphoreimer (Josera, Polska)

Składniki	Zawartość (na 1 kg)	
Ca	%	5,00
P	%	10,00
Na	%	7,00
Mg	%	7,50
Ca / P		0,5:1
Witamina A	j.m.	650 000,00
Witamina D3	j.m.	120 000,00
Witamina E	mg	1 500,00
Zn (jako tlenek cynku)	mg	8 000,00
Mn (jako uwodniony glicynowy chelat manganu)	mg	4 000,00
Mn (jako tlenek manganu (II))	mg	4 000,00
Cu (jako pentahydrat siarczynu miedzi)	mg	1 200,00
I	mg	100,00
Co	mg	22,00
Se (jako selenin sodu)	mg	40,00

Pobieranie prób

Masę ciała zwierząt gospodarskich mierzono przed ubojem, kiedy zwierzęta przebywały w poskromie. Za pomocą zestawu czujników MP 800 w połączeniu z czytnikiem ciężaru Tru-Test DR 3000 LNB (producent: Tru-Test Group, Auckland, Nowa Zelandia). Zgodnie z deklaracją producenta dokładność tego zestawu wynosiła +/- 1%, a minimalna rozdzielczość to 100 g. za pomocą czujników MP 800 sprzężonych z czytnikiem masy Tru-test DR 3000. Masę tusz jeleni dzikich określano po uboju i patroszeniu. Masę ciała jeleni dzikich szacowano na podstawie masy tuszy, która stanowi ok. 67% masy ciała jeleniowatych (Neiland, 1970).

Kości śródstopia (*ossa metatarsalia*) oraz poroże (całkowicie skostniałe) gromadzono od zwierząt bezpośrednio po uboju. Świeże kości otwierano dentystycznym wiertłem

tytanowym, ostrożnie tak, by nie zanieczyścić szpiku kostnego pyłem kostnym. Szpik kostny po usunięciu szpiku czerwonego był głęboko mrożony w -80°C. Kości i poroża rozdrabniano tytanowym wiertłem dentystycznym, które przechowywano zamrożone.

Krew pobierano z żyły szyjnej zewnętrznej (*vena jugularis externa*) w objętości 5 ml do próżniowych probówek z heparyną jako koagulantem. Skład mineralny analizowano w osoczu krwi uzyskanym przez wirowanie krwi w 3000 obr./min przez 10 minut (wirówka laboratoryjna MPW-350R, MPW Medical Instruments) w temperaturze 4°C. Wszystkie analizy przeprowadzono zgodnie z uzyskanym pozwoleniem Lokalnej Komisji Etyki nr 069, Uchwała nr 24/2021.

Zastosowane metody badawcze

- **Analiza zawartości tłuszczu, wody i suchej masy beztłuszczowej w szpiku kostnym**

Próbkę szpiku kostnego o przybliżonej masie 1,5 g (dokładność do 1 mg) przeniesiono do wstępnie zważonego celulozowego naczynka. Procentową utratę masy (wody) obliczano zgodnie z PN-ISO 1442 (2000) przy użyciu metody suszenia w 103°C za pomocą uniwersalnego pieca Memmert UF30 (Schwabach, Niemcy). Następnie tłuszcz ze szpiku kostnego ekstrahowano metodą Soxhleta z użyciem aparatu Büchi-B-811 (Flawil) i n-heksanu jako rozpuszczalnika. Na koniec obliczono procentowy udział tłuszczu. Naczynko celulozowe z pozostałą suchą masą beztłuszczową suszono dalej około godziny, schłodzono do temperatury pokojowej i obliczono procentowy udział suchej masy.

- **Analiza profilu kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym**

Ekstrakcję tłuszczu do oznaczenia profilu kwasów tłuszczowych (FA) przeprowadzono metodą Folcha i in. (1957). Estrы metylowe kwasów tłuszczowych (FAME) otrzymano w procesie transmetylacji 50 mg próbek tłuszczu przy wykorzystaniu mieszaniny stężonego H₂SO₄ (95%) i metanolu, zgodnie z oficjalną metodą AOCS (2000) Ce 2-66. Analizy metodą chromatografii gazowej (GC) przeprowadzono według Domaradzki i in. (2019) przy użyciu chromatografu gazowego Varian CG 3900 (Walnut Creek, USA) z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID). FAME rozdzielano w kolumnie kapilarnej CP 7420 (Agilent Technologies, USA) o długości 100 m, średnicy wewnętrznej 0,25 mm i grubości warstwy 0,25 µm. Analizę przeprowadzono w warunkach wzrastającej temperatury w następującym programie: 50°C przez 1 min, następnie

wzrastającą temperaturę 30°C/min aż do 120°C. Po przekroczeniu 120°C tempo wzrastania temperatury wynosiło 2°C/min do 160°C, a po przekroczeniu tej temperatury nastąpiło wstrzymanie w 160°C na 30 minut, kolejno zmiana tempa na 1°C/min do 200°C, następnie 5°C/min do 250°C, czas wstrzymywania wynosił 1 minutę. Temperatura wtryskiwacza i detektora wynosiła odpowiednio 260°C i 270°C. Natężenie przepływu gazu nośnego (wodoru) wynosiło 2ml/min, objętość wprowadzanych próbek wynosiła 1μ, a stosunek podziału wynosił 1/50. FAME zidentyfikowano i określono ilościowo, bazując na czasie retencji w porównaniu do mieszaniny referencyjnej (Supelco 37 Component FAME Mix CRM 47885 Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA; ester metylowy CLA O5632-Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; mieszanina FAME o rozgałęzionym łańcuchu BR2, BR3, BR4 - Larodan AB Solna, Szwecja). Do przedstawienia składu kwasów tłuszczowych użyto oprogramowania Sar GC Workstation (Varian Inc., Walnut Creek, USA). Skład kwasów tłuszczowych wyrażono jako procent wszystkich zidentyfikowanych FA. Analizy przeprowadzono dwukrotnie.

Zidentyfikowane kwasy tłuszczowe przedstawiono w następujący sposób: liczba atomów węgla w łańcuchu (liczba przed dwukropkiem), liczba wiązań nasyconych (liczba po dwukropku), konformacja przestrzenna (*cis* lub *trans*). Zidentyfikowano następujące grupy kwasów tłuszczowych i obliczono procentowy udział: SFA - nasycone kwasy tłuszczowe; OCFA - nieparzyste kwasy tłuszczowe; BCFA - kwasy tłuszczowe o rozgałęzionym łańcuchu; MUFA *cis*- jednonienasycone kwasy tłuszczowe, PUFA - wielonienasycone kwasy tłuszczowe, n-3 i n-6, TFA - *trans*- suma jednonienasyconych kwasów tłuszczowych *trans*, Σ C18:2 *trans*, Σ C18:3 *trans*; Σ CLA - sprzężony kwas linolowy: suma 18:2 c9, t11 i 18:2 t9c11; Σ C18:2 *trans*- suma niesprężonych izomerów 18:2 t,c/t,t,t; Σ C18:3 *trans*- suma izomerów 18:3 z nieznaną pozycją przestrzenną podwójnego wiązania; współczynnik PUFA/SFA oraz współczynnik n-6/n-3.

- **Analiza zawartości minerałów w szpiku kostnym oraz wybranych tkankach**

Stężenia minerałów w szpiku kostnym, osoczu, kościach i porożach określono poprzez trawienie próbek o masie 0,5 g w wodzie królewskiej (mieszanina stężonego kwasu solnego i azotowego w proporcji 3:1), a następnie wytrawieniu z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego średniociśnieniowego (32 bary) (Mars Xpress CEM Corp., Matthews, NC, USA). Otrzymane ekstrakty analizowano metodą spektrometrii mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (Agilent quadrupole 7500CE ICP-MS wyposażony

w palnik, nebulizator mikro mgły, próbnik niklu i stożki odpieniacza oraz dwuprzebiegową komorę natryskową). Jako gaz nośny zastosowano argon, a wodór i hel jako gazy reakcyjne do eliminacji zakłóceń. Aby zminimalizować efekt matrycy i zapewnić długoterminową stabilność, wszystkie oznaczenia wykonywano w obecności standardu wewnętrznego składającego się z 1 mg/L ^{45}Sc , ^{89}Y i ^{159}Tb . Ponadto w celu kontroli jakości do analiz włączono ślepą próbę i certyfikowany materiał odniesienia (CRM028-050). Odzysk analizowanych pierwiastków śladowych wahał się od 90 do 97%, natomiast precyzja metody określona jako względne odchylenie standardowe (RSD) wynosiła <3%. Wartości granicy wykrywalności (LOD) kształtowały się na poziomie od 0,007 mg/kg do 0,099 mg/kg.

- **Analiza statystyczna**

Analizy statystyczne przeprowadzono w programie Statistica ver. 13. Wyniki wyrażono jako wartość średnią i odchylenie standardowe. Istotność różnic poszczególnych zmiennych (jelenie hodowlane - jelenie dzikie, młode jelenie - dorosłe jelenie - daniiele żywienie letnie - żywienie zimowe) określano za pomocą testu *t*-Studenta (rozkład normalny), lub testu Kołmogorowa-Smirnowa (brak rozkładu normalnego). Do oceny wzajemnego oddziaływania zmiennych (różnice między osoczem, szpikiem kostnym, kośćmi i porożem) wykorzystano test ANOVA Kruskala-Wallisa na rangach.

Analizę Głównych Składowych PCA (*Principal Component Analysis*) przeprowadzono w celu uproszczenia struktury danych i wskazania zależności pomiędzy zmiennymi charakteryzującymi profil i skład kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym różnych grup jeleni europejskich; zmiennymi charakteryzującymi profil i skład kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym danieli a ich dietą; lub wykazania zależności pomiędzy pierwiastkami występującymi we wszystkich badanych tkankach. Analiza ta pozwala na przekształcenie danego zbioru cech (zmiennych pierwotnych), które są wzajemnie skorelowane w nowy układ cech (główne składowe) wzajemnie ze sobą nieskorelowanych, który następnie jest porównywany z układem wyjściowym.

Związek między masą ciała a cechami szpiku kostnego lub związek pomiędzy poszczególnymi pierwiastkami a zawartością wybranego pierwiastka w różnych tkankach określano przy pomocy współczynnika korelacji Pearsona (rozkład normalny) lub współczynnika rang Spearmana (brak rozkładu normalnego). Dla wszystkich testów przyjęto poziom istotności $p < 0,05$.

Omówienie wyników i dyskusja

Porównano warunki bytowania cieląt jeleni europejskich dzikich i fermowych oraz kategorie wolnożyjących zwierząt: cieląt i łań nieciążarnych w wieku 3-6 lat. W tabeli 3 przedstawiono porównanie średniej masy ciała, a także cech charakteryzujących szpik kostny tj. zawartość tłuszczu, zawartości wody i suchej masy beztłuszczowej między cielętami fermowymi i dzikimi a także dzikimi cielętami i łaniami. Pomimo tego, że nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy masą ciała cieląt dzikich i fermowych, cielęta fermowe były o 3,64 kg cięższe. Szpik kostny dzikich cieląt charakteryzował się wyższą zawartością tłuszczu (o 29,62%; $p < 0,001$), zaś szpik kostny fermowych cieląt zawierał więcej wody i suchej masy beztłuszczowej (o 9,34% i 20,67%; $p < 0,005$). Z kolei porównując skład szpiku kostnego w zależności od wieku (cielęta - łanie) istotną statystycznie różnicę odnotowano jedynie w przypadku większej zawartości suchej masy beztłuszczowej (o 6,15%; $p < 0,01$) w szpiku kostnym dorosłych łań.

Tabela 3. Porównanie średniej masy ciała, składu szpiku kostnego dzikich i hodowlanych jeleni europejskich

Analizowana zmienna	Cielęta jelenia europejskiego					Dzikie jelenie europejskie				
	Fermowe		Dzikie		Wartość p $t^a/K-S^b$	Cielęta		Łanie		Wartość p $t^a/K-S^b$
	M	SD	M	SD		M	SD	M	SD	
Masa ciała (kg)	49,42	5,12	45,78	6,79	>0,05 ^a	45,78	6,79	80,83	30,53	<0,001 ^b
Skład szpiku kostnego (%)										
Tłuszcz	53,52	13,71	83,14	3,43	<0,001 ^b	83,14	3,43	77,33	9,19	>0,05 ^b
Woda	21,01	10,07	11,66	1,77	<0,005 ^b	11,66	1,77	11,01	4,07	>0,05 ^b
Sucha masa beztłuszczowa	25,48	11,78	4,81	2,53	<0,001 ^b	4,81	2,53	10,96	7,19	<0,01 ^b

M-średnia, SD- odchylenie standardowe, ^a - Test t-Studenta, ^b - Test Kolmogorova-Smirnova

Zastosowany rozdział chromatograficzny pozwolił zidentyfikować 47 różnych kwasów tłuszczowych, przy czym udział jednostkowy 35 z nich nie przekraczał 1% (Tabela 5). Śladowe ilości C12:0 wykryto w szpiku kostnym fermowych cieląt jelenia europejskiego, zaś u dzikich cieląt nie wykryto C17:1 *c*7. Najwyższy poziom SFA stwierdzono w szpiku kostnym dzikich cieląt jeleni w porównaniu z innymi grupami jeleniowatych ($p < 0,001$). Ponadto średni odsetek sumy nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) (z wyjątkiem C10:0) był znacznie wyższy w szpiku kostnym młodych dzikich zwierząt (Tabela 4). Tłuszcz w szpiku kostnym dzikich jeleni zawierał znacznie więcej C14:0, C16:0, C18:0 i C20:0 ($p < 0,001$), podczas gdy procentowy udział jednonienasyconych kwasów tłuszczowych *cis* w tym C16:1 *c*13, C18:1 *c*9, C18:1 *c*12, C20:1 *c*13 był istotnie niższy ($p < 0,001$). Stwierdzono także niższy udział rozgałęzionych kwasów tłuszczowych (BCFA) ($p < 0,001$) i jednonienasyconych kwasów tłuszczowych *trans* ($p < 0,001$), w tym C18:1 *t*9 i C18:1 *t*11 (VA) (Tabela 4). Chociaż nie uzyskano statystycznie istotnych różnic w średnim stężeniu OCFA, PUFA i TFA pomiędzy cielętami dzikimi i fermowymi (Tabela 5), to biorąc pod uwagę udział poszczególnych kwasów tłuszczowych w wyżej wymienionych grupach, szpik kostny dzikich cieląt zawierał istotnie statystycznie więcej C17:0, Σ C18:2 *trans*, Σ C18:3 *trans* i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, takich jak: C18:2 *n*-6 (LA), C20:2 *n*-6 i prawie dwa razy tyle C18:3 *n*-3 (ALA) i C18:2 *cis* ($p < 0,003$). Z kolei szpik kostny fermowych cieląt jelenia zawierał dwa razy więcej sprzężonego kwasu linolowego (CLA) ($p < 0,001$) i C22:5 *n*-3 DPA ($p < 0,005$) (Tabela 4). Skutkiem zaobserwowanych zależności był istotnie wyższy poziom sum wszystkich kwasów tłuszczowych *n*-3 i *n*-6 ($p < 0,001$) jak również korzystniejszy stosunek *n*-6/*n*-3 w szpiku kostnym dzikich cieląt jeleni europejskich (Tabela 5).

Tabela 4. Skład kwasów tłuszczowych (% wszystkich kwasów tłuszczowych) w szpiku kostnym fermowych i dzikich cieląt oraz łań jelenia europejskiego.

Analizowana zmienna (%)	Cielęta jelenia					Dzikie jelenie				
	Fermowe		Dzikie		Wartość $P_{t^a/K-S^b}$	Cielęta		Łanie		Wartość $P_{t^a/K-S^b}$
	M	SD	M	SD		M	SD	M	SD	
C10:0	0,06	0,02	0,07	0,02	>0,05 ^a	0,07	0,02	0,08	0,07	>0,05 ^b
C12:0	tr	-	0,62	0,14	—	0,62	0,14	0,11	0,05	<0,001 ^a
C14:0	5,18	1,08	5,94	0,64	<0,018 ^a	5,94	0,64	2,23	0,82	<0,001 ^a
C16:0	15,87	0,78	19,39	0,89	<0,001 ^a	19,39	0,89	13,62	3,57	<0,001 ^b
C18:0	4,58	0,73	5,58	0,94	<0,003 ^a	5,58	0,94	3,85	1,08	<0,001 ^a
C20:0	0,12	0,03	0,17	0,03	<0,001 ^a	0,17	0,03	0,13	0,04	<0,008 ^a
C15:0	0,90	0,08	0,89	0,08	>0,05 ^a	0,89	0,08	0,53	0,16	<0,001 ^b
C15:1	0,46	0,05	0,37	0,09	<0,05 ^a	0,37	0,09	0,36	0,09	>0,05 ^a
C17:0	0,49	0,07	0,57	0,06	<0,003 ^a	0,57	0,06	0,33	0,08	<0,001 ^a
C17:1 <i>c7</i>	0,09	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-
C17:1 <i>c9</i>	0,73	0,08	0,77	0,07	>0,05 ^a	0,77	0,07	0,77	0,07	>0,05 ^a
C21:0	0,09	0,02	0,06	0,02	>0,05 ^a	0,06	0,02	0,11	0,04	<0,001 ^a
C13:0 <i>iso</i>	0,13	0,05	0,07	0,01	<0,001 ^b	0,07	0,01	tr	-	>0,05 ^a
C13:0 <i>anteiso</i>	0,12	0,03	0,11	0,02	>0,05 ^a	0,11	0,02	tr	-	>0,05 ^a
C14:0 <i>iso</i>	0,14	0,02	0,07	0,02	<0,001 ^a	0,07	0,02	0,06	0,02	>0,05 ^a
C15:0 <i>iso</i>	0,33	0,06	0,18	0,03	<0,001 ^b	0,18	0,03	0,16	0,04	>0,05 ^b
C15:0 <i>anteiso</i>	0,52	0,07	0,33	0,07	<0,001 ^a	0,33	0,07	0,28	0,11	>0,05 ^a
C17:0 <i>iso</i>	0,37	0,05	0,27	0,03	<0,001 ^b	0,27	0,03	0,23	0,03	<0,001 ^a
C17:0 <i>anteiso</i>	0,49	0,05	0,48	0,07	>0,05 ^a	0,48	0,07	0,43	0,08	>0,05 ^a
C18:0 <i>iso</i>	0,12	0,03	0,14	0,03	>0,05 ^a	0,14	0,03	0,19	0,05	<0,025 ^b
C14:1 <i>c9</i>	3,62	0,86	3,15	0,46	>0,05 ^a	3,15	0,46	2,67	0,95	>0,05 ^b
C16:1 <i>c11</i>	0,06	0,01	0,06	0,01	>0,05 ^a	0,06	0,01	0,05	0,01	>0,05 ^a
C16:1 <i>c13</i>	0,28	0,05	0,18	0,03	<0,001 ^a	0,18	0,03	0,14	0,04	<0,008 ^a
C16:1 <i>c7</i>	0,63	0,08	0,57	0,05	>0,05 ^b	0,57	0,05	0,51	0,03	<0,001 ^a
C16:1 <i>c9</i>	12,09	2,22	11,35	1,48	>0,05 ^a	11,35	1,48	14,96	1,71	<0,001 ^a
C18:1 <i>c9</i>	38,81	1,15	34,98	1,21	<0,001 ^a	34,98	1,21	37,51	2,48	<0,005 ^b
C18:1 <i>c11</i>	4,19	0,49	4,46	0,88	>0,05 ^b	4,46	0,88	10,33	5,66	<0,001 ^b
C18:1 <i>c12</i>	0,09	0,01	0,14	0,03	<0,001 ^a	0,14	0,03	0,15	0,04	>0,05 ^a
C18:1 <i>c13</i>	0,37	0,05	0,42	0,09	>0,05 ^a	0,42	0,09	0,89	0,42	<0,005 ^b
C20:1 <i>c9</i>	0,18	0,03	0,24	0,05	>0,05 ^a	0,24	0,05	0,19	0,05	>0,05 ^a
C20:1 <i>c11</i>	0,45	0,09	0,46	0,11	>0,05 ^a	0,46	0,11	0,74	0,32	>0,05 ^b
C20:1 <i>c13</i>	0,16	0,02	0,12	0,03	<0,001 ^a	0,12	0,03	0,12	0,02	>0,05 ^a
C18:2 <i>n-6</i> LA	1,21	0,22	1,59	0,18	<0,001 ^a	1,59	0,18	1,66	0,32	>0,05 ^a
C18:2 <i>cis</i>	0,19	0,04	0,36	0,09	<0,001 ^b	0,36	0,09	0,42	0,04	>0,05 ^a
C18:3 <i>n-3</i> ALA	0,62	0,12	1,15	0,26	<0,001 ^a	1,15	0,26	1,14	0,44	>0,05 ^a
CLA	1,73	0,29	0,83	0,21	<0,001 ^a	0,83	0,21	0,87	0,28	>0,05 ^a
C20:2 <i>n-6</i>	0,09	0,02	0,13	0,02	<0,022 ^a	0,13	0,02	0,09	0,03	<0,033 ^a
C20:4 <i>n-6</i> AA	0,09	0,04	0,09	0,04	>0,05 ^a	0,09	0,04	0,07	0,02	>0,05 ^a
C20:3 <i>n-3</i>	0,07	0,01	0,12	0,03	<0,006 ^a	0,12	0,03	0,15	0,05	<0,024 ^a
C22:5 <i>n-3</i> DPA	0,19	0,10	0,06	0,04	<0,005 ^b	0,06	0,04	0,06	0,01	>0,05 ^a
C18:1 <i>t6/7</i>	0,20	0,02	0,19	0,02	>0,05 ^a	0,19	0,02	0,17	0,04	>0,05 ^b
C18:1 <i>t9</i>	0,40	0,07	0,21	0,03	<0,001 ^b	0,21	0,03	0,21	0,02	>0,05 ^a

C18:1 <i>t</i> 10	0,16	0,02	0,17	0,03	>0,05 ^a	0,17	0,03	0,21	0,07	>0,05 ^b
C18:1 <i>t</i> 11 VA	1,51	0,30	0,84	0,18	<0,001 ^a	0,84	0,18	0,65	0,22	<0,011 ^a
C18:1 <i>t</i> 16	0,18	0,02	0,34	0,07	<0,001 ^b	0,34	0,07	0,32	0,09	>0,05 ^a
ΣC18:2 <i>trans</i>	1,05	0,20	1,39	0,24	<0,001 ^a	1,39	0,24	1,85	0,37	<0,001 ^a
ΣC18:3 <i>trans</i>	0,36	0,05	0,45	0,09	<0,007 ^a	0,45	0,09	0,58	0,03	<0,001 ^a

M-średnia, SD- odchylenie standardowe, tr – śladowe ilości < 0.05%, ^a - test t-Studenta, ^b - test Kołmogorowa-Smirnowa, C18:2 *cis* - może obejmować kilka izomerów 18:2 *cis* o nieznannej pozycji wiązań podwójnych

Tabela 5. Procentowy udział (%) wszystkich kwasów tłuszczowych) i stosunek PUFA/SFA oraz n-6/n-3 w szpiku kostnym fermowych i dzikich cieląt jelenia europejskiego.

Analizowana zmienna (%)	Cielęta jelenia					Dzikie jelenie				
	Fermowe		Dzikie		Wartość $P_{t^a/K-S^b}$	Cielęta		Łanie		Wartość $P_{t^a/K-S^b}$
	M	SD	M	SD		M	SD	M	SD	
ΣSFA	26,27	1,73	31,76	1,90	<0,001 ^a	31,76	1,90	19,93	5,39	<0,001 ^b
OCFA	2,79	0,23	2,65	0,23	>0,05 ^a	2,65	0,23	2,07	0,36	<0,001 ^a
ΣBCFA	2,24	0,29	1,65	0,22	<0,001 ^a	1,65	0,22	1,39	0,25	<0,004 ^a
ΣMUFA <i>cis</i>	60,91	1,92	56,08	2,29	<0,001 ^a	56,08	2,29	68,25	6,99	<0,001 ^b
ΣPUFA	3,94	0,55	4,26	0,46	>0,05 ^a	4,26	0,46	4,37	0,89	>0,05 ^b
ΣMUFA <i>trans</i>	2,45	0,38	1,75	0,22	<0,001 ^a	1,75	0,22	1,56	0,39	>0,05 ^b
ΣTFA	3,86	0,49	3,60	0,39	>0,05 ^a	3,60	0,39	3,99	0,68	>0,05 ^b
PUFA/SFA	0,15	0,03	0,13	0,02	>0,05 ^b	0,13	0,02	0,23	0,05	<0,001 ^b
<i>n</i> -3	0,71	0,20	1,32	0,30	<0,001 ^a	1,32	0,30	1,33	0,48	>0,05 ^a
<i>n</i> -6	1,32	0,25	1,74	0,17	<0,001 ^a	1,74	0,17	1,76	0,34	>0,05 ^a
<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3	1,95	0,45	1,37	0,29	<0,001 ^a	1,37	0,29	1,39	0,25	>0,05 ^a

M-średnia, SD- odchylenie standardowe, ^a - test t-Studenta ^b - test Kołmogorowa-Smirnowa

Analiza zależności pomiędzy wiekiem a składem kwasów tłuszczowych u dzikich jeleni wykazała istotne różnice w 21 spośród wszystkich 47 zidentyfikowanych kwasów tłuszczowych (Tabela 5). Dorosłe osobniki charakteryzowały się znacznie niższym odsetkiem nasyconych kwasów tłuszczowych (o 12,46 %; $p < 0,001$) z powodu niższego udziału kwasu palmitynowego C16:0 i stearynowego C18:0, a także wyższym udziałem jednonienasyconych kwasów tłuszczowych *cis* (o 12,17 %; $p < 0,001$), szczególnie kwasu oleopalmitynowego C16:1 *c*9 i oleinowego C18:1 *c*9, C18:1 *c*11. Istotnie różnice wykazano również w grupie nieparzystych i rozgałęzionych kwasów tłuszczowych (OCFA i BCFA), których udział u dzikich cieląt był wyższy niż u osobników dorosłych, choć ich zawartość w całej puli kwasów tłuszczowych była niewielka (odpowiednio 3% i 2%). Co ciekawe nie wykazano żadnych istotnych różnic pomiędzy grupami dziko żyjących jeleni w zawartości

PUFA (w tym *n*-6 i *n*-3), MUFA *trans* i kwasów tłuszczowych *trans* TFA. Istotne statystycznie różnice stwierdzono jedynie w stężeniu C20:2 *n*-6 ($p < 0,033$) i C18:1 *n*-7 ($p < 0,011$), których było więcej w szpiku kostnym dzikich cieląt jelenia, zaś mniej było C20:3 *n*-3 ($p < 0,024$). Niskie proporcje PUFA/SFA u dzikich cieląt wynikały z wysokiego poziomu nasyconych kwasów tłuszczowych (Tabela 5).

Niezależnie od różnic występujących w szpiku kostnym badanych jeleni europejskich dominującą frakcją były jednonienasycone kwasy tłuszczowe (MUFA *cis*, max. 60%), następnie nasycone kwasy tłuszczowe (SFA, max. 25%), wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA, max. 4%) i kwasy tłuszczowe *trans* (max. 4%). Nieparzyste i rozgałęzione kwasy tłuszczowe (OCFA i BCFA) stanowiły mniejszość (2–3%). Najliczniej występującym w szpiku kostnym jeleni kwasem był kwas oleinowy (C18:1 *n*-7) i zawierał ponad 34% sumy wszystkich kwasów tłuszczowych i około 60% sumy wszystkich MUFA *cis*. Pośród nasyconych kwasów tłuszczowych najczęściej występującym był kwas palmitynowy C16:0 (max. 64%). W odniesieniu do PUFA dominującymi kwasami tłuszczowymi (86% wszystkich PUFA) były kwas linolowy (C18:2 *n*-6; średnio 1,49%), sprzężony kwas linolowy (CLA; średnio 1,14%) i kwas α -linolenowy (ALA, 18:3 *n*-3; średnio 0,97%) (Tabela 3, 4).

W celu przeprowadzenia bardziej rozbudowanej analizy zależności pomiędzy masą ciała zwierząt a udziałem kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym jeleni przeprowadzono analizę głównych składowych (PCA) z 18 zmiennymi (17 aktywnymi i 1 dodatkową) i z 30 przypadkami. Trzy główne składowe o wartościach własnych przekraczających 1 wyjaśniły 88,51% całkowitej wariancji. PC1, PC2 i PC3 stanowiły odpowiednio 45,06%, 33,10% i 10,35% wariancji (Tabela 6).

Tabela 6. Wariancje głównych składowych i ich procentowy udział w zmienności zestawu danych.

Główne składowe	Wartości własne macierzy korelacji	Udział %	Łącznie
1	7,66	45,06	45,06
2	5,63	33,10	78,16
3	1,76	10,35	88,52
4	0,66	3,85	92,37
5	0,39	2,32	94,69
6	0,30	1,74	96,44
7	0,24	1,39	97,83
8	0,15	0,91	98,73
9	0,10	0,61	99,73
10	0,07	0,39	99,89
11	0,03	0,15	99,94
12	0,01	0,05	99,26
13	0,00	0,03	99,97
14	0,00	0,02	99,98
15	0,00	0,01	99,99
16	0,00	0,00	99,99
17	0,00	0,00	100,00

Rycina 1 przedstawia zmienne w płaszczyźnie dwuczynnikowej. Pierwsza składowa (PC1) wykazuje bardzo wysoką dodatnią korelację ($0,710 < r < 0,810$) z 8 zmiennymi w tym z tłuszczem (%), C16:0, C18:0, SFA, C18:2 *n*-6 LA, C18:3 *n*-3 ALA, kwasami *n*-3 i *n*-6 oraz negatywną korelację z C18:1 *n*-9 ($r=-0,860$), MUFA cis ($r=-0,740$) i suchą masą beztłuszczową (%) ($r=-0,732$) (Tabela 7). Z kolei druga składowa (PC2) była dodatnio skorelowana z C14:0 ($r=0,912$) i negatywnie skorelowana z PUFA/SFA ($r=-0,925$), C18:1 *c*11 ($r=-0,778$), oraz masą ciała ($r=-0,722$). Trzecia składowa (PC3) wykazywała tylko jedną ujemną korelację z kwasami tłuszczowymi *trans* ($r=-0,897$).

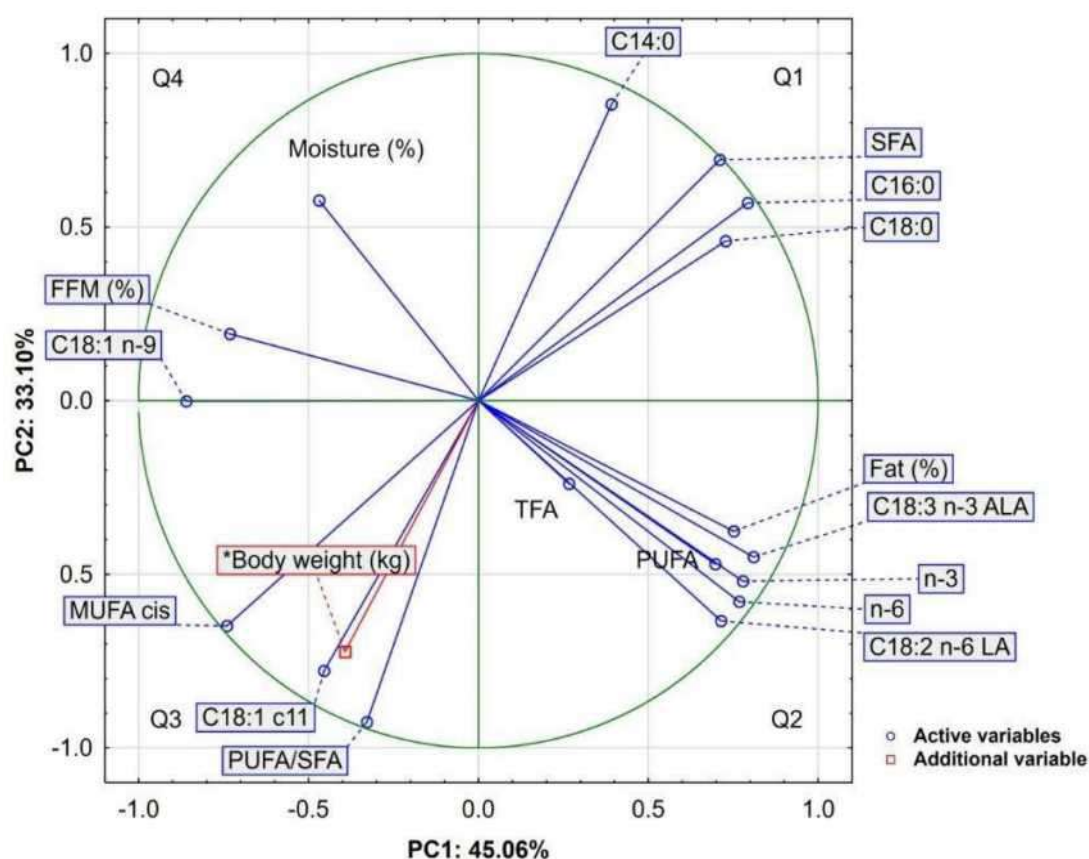
Tabela 7. Korelacje między głównymi składowymi a zmiennymi pierwotnymi.

Zmienna	PC1	PC2	PC3
C14:0	0,392	0,854	0,129
C16:0	0,793	0,570	-0,019
C18:0	0,727	0,459	-0,231
C18:1 <i>n</i> -9	-0,860	-0,002	-0,227
C18:1 <i>c</i> 11	-0,454	-0,778	0,205
C18:2 <i>n</i> -6 LA	0,714	-0,635	0,002
C18:3 <i>n</i> -3 ALA	0,810	-0,450	-0,100
SFA	0,710	0,694	-0,004
MUFA <i>cis</i>	-0,740	-0,648	0,145
PUFA	0,698	-0,470	-0,442
TFA	0,266	-0,239	-0,897
<i>n</i> -3	0,779	-0,520	-0,097
<i>n</i> -6	0,768	-0,579	-0,019
PUFA/SFA	-0,329	-0,925	-0,105
Tłuszcz (%)	0,752	-0,376	0,474
Woda (%)	-0,469	0,577	-0,137
Sucha masa beztłuszczowa (%)	-0,732	0,192	-0,549
Masa ciała (kg)	-0,393	-0,722	0,011

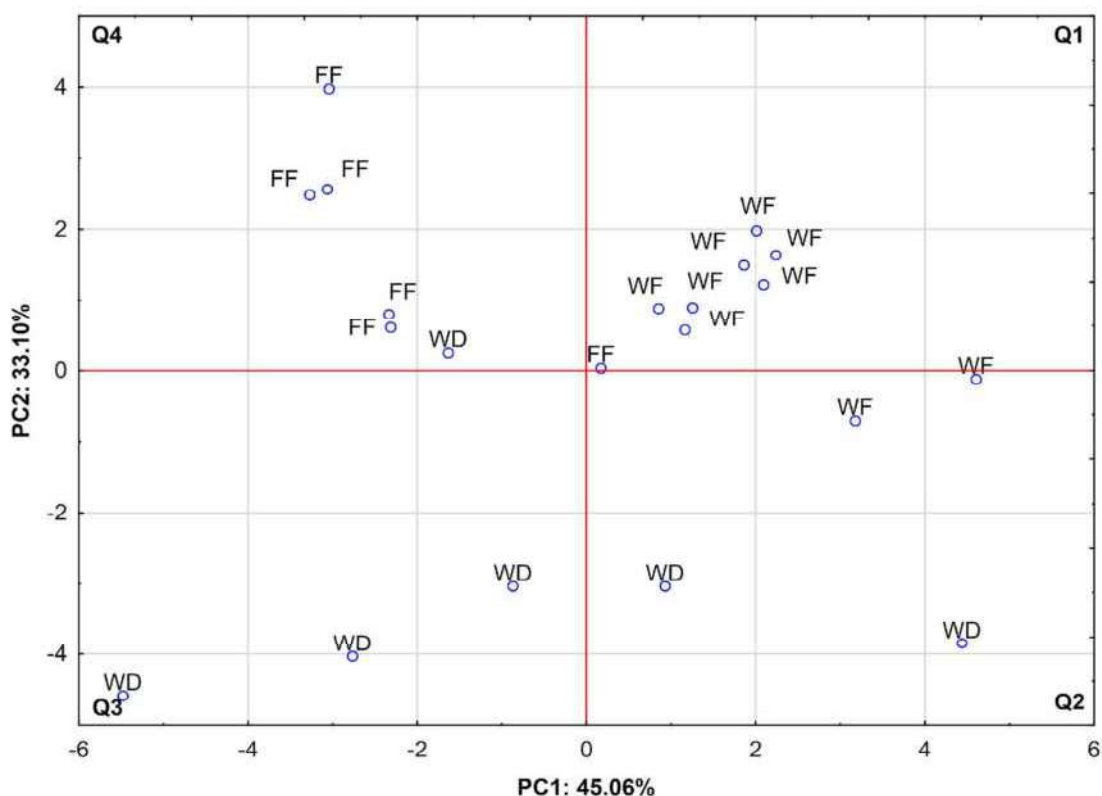
Na podstawie ładunków i długości wektorów kierunkowych można wyróżnić trzy grupy parametrów (Rycina 1). Przedstawienie zmiennych na płaszczyźnie dwuczynnikowej (PC1 x PC2), pierwsza grupa zmiennych obejmowała SFA, C14:0, C16:0 i C18:0 ułożonych w górnym prawym kwadrancie wykresu (Q1) w obu dodatnich obszarach (PC1 i PC2). Druga grupa obejmowała tłuszcz (Fat %) i C18:3 *n*-3 ALA, *n*-3, *n*-6, C18:2 *n*-6 LA, i PUFAs, które znajdowały się w prawym dolnym kwadrancie (Q2) określonym przez dodatnie wartości PC1 i ujemne PC2. Trzecia grupa, która obejmowała MUFA, PUFA/SFA, C18:1 *c*11 i masę ciała, znajdowała się w lewym dolnym kwadrancie (Q3) określonym przez negatywne wartości obu głównych składowych (PC1 and PC2).

Rycina 2 przedstawia projekcję przypadków w zależności od warunków życia jeleni (dzikie/fermowe) i wieku (cielęta/łanie) w układzie współrzędnych określonym przez PC1 × PC2. Na rysunku można wyraźnie wyróżnić dwie grupy danych o wysokim indeksie

skupienia. Pierwsza grupa składa się z dzikich cieląt jelenia zlokalizowanym w prawym górnym kwadrancie. Na rycinie 1 obszar ten odpowiadał na wysokie stężenie nasyconych kwasów tłuszczowych. Druga grupa składa się z fermowych cieląt jelenia zlokalizowanych w lewym górnym kwadrancie (Q4). Obszar ten na rycinie 1 odpowiadał za wodę w szpiku kostnym i suchą masę beztłuszczową. Próbkę pochodzące od dzikich łań były bardziej rozproszone i rozkładały się głównie w kwadratach Q2 i Q3 skorelowanych z masą ciała oraz jedno i wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi.



Rycina 1. Przedstawienie zmiennych na płaszczyźnie dwuczynnikowej (PC1xPC2) (Moisture (%) – zawartość wody, FFM (%) - sucha masa beztłuszczowa, Fat (%) - zawartość tłuszczu; TFA - kwasy tłuszczowe *trans*).



Rycina 2. Rzut przypadków w zależności od przynależności do grupy w płaszczyźnie dwuczynnikowej (PC1 x PC2) (FF - fermowe cielęta, WF- dzikie cielęta, WD- dzikie łanie).

Analiza rozkładu zmiennych wskazuje na to, że ze względu na bliskie sąsiedztwo masa ciała jest silnie dodatnio skorelowana z C18:1 *c*11, MUFA *cis* i PUFA/SFA ale negatywnie skorelowana z C14:0, C16:0, C18:0 i SFAs (znajdujących się po przeciwnych stronach na Rycinie 1). Z kolei prostopadłe ułożenie danych wskazuje, że nie ma związku pomiędzy masą ciała a PUFA, TFA, *n*-6, *n*-3 i innymi elementami. Wszystkie zależności przedstawione na rycinie 1 zostały też potwierdzone przez obliczone dla analizowanych zmiennych współczynniki korelacji (Pearsona lub Spearmana) przedstawione w tabeli 8.

Tabela 8. Korelacje pomiędzy masą ciała a cechami szpiku kostnego.

Zmienna	Współczynnik korelacji (<i>r</i> / <i>r</i> ^S)	Istotność
C14:0	-0,698 ^r	***
C16:0	-0,759 ^r	***
C18:0	-0,581 ^r	***
C18:1 <i>n</i> -9	0,297 ^r	ns
C18:1 <i>c</i> 11	0,601 ^{r^S}	*
C18:2 <i>n</i> -6 LA	0,129 ^r	ns
C18:3 <i>n</i> -3 ALA	0,081 ^r	ns
SFA	-0,767 ^r	***
MUFA <i>cis</i>	0,762 ^r	***
PUFA	0,011 ^r	ns
TFA	0,083 ^r	ns
<i>n</i> -3	0,140 ^r	ns
<i>n</i> -6	0,046 ^r	ns
PUFA/SFA	0,400 ^{r^S}	*
Tłuszcz (%)	-0,122 ^{r^S}	ns
Woda (%)	-0,39 ^{r^S}	ns
Sucha masa beztłuszczowa (%)	0,284 ^{r^S}	ns

Współczynnik korelacji: *r* – Pearsona, *r*^S – Spearmana; * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001; ns- brak istotności

Badania szpiku kostnego dzikich i fermowych jeleni europejskich wykazały duże zróżnicowanie zawartości tłuszczu, wody i suchej masy beztłuszczowej. U fermowych jeleni stwierdzono niższą zawartość tłuszczu i większą zawartość wody, choć masa ciała była wyższa niż dzikich cieląt. Wartości takie mogą wskazywać na niedożywienie (Ransom, 1965; Neiland, 1970; Thouzeau i in., 1997) jednak biorąc pod uwagę również wiek zwierząt różnic należy upatrywać się w zwiększonej ilości szpiku kostnego czerwonego względem żółtego, co tłumaczy większą zawartość wody w analizowanej tkance. Właśnie ze względu na duży udział szpiku czerwonego u młodych zwierząt, uważa się, że są one słabiej przygotowane do sezonu zimowego (Tajchman i in., 2020a). Ponadto w warunkach fermowych suplementacja diety nie zawsze skutkuje korzystnymi proporcjami kwasów tłuszczowych (np.: niski stopień nasycenia) co może podnosić ich temperaturę topnienia

i upośledzać ich płynność w okresie zimowym (Soppela i Nieminen, 2001). Dolne części kończyn fermowych zwierząt, ze względu na obniżoną płynność adipocytów mogą być niewystarczająco chronione przed niskimi temperaturami. Pomimo tego, że najwyższą zawartość kwasu oleinowego (C18:1 *c*9) stwierdzono w szpiku kostnym fermowych cieląt jelenia, szpik kostny cieląt z obu grup charakteryzował się większym udziałem nasyconych kwasów tłuszczowych niż jednonienasyconych kwasów tłuszczowych w porównaniu do dzikich łań jelenia.

Uwolnione z rezerw wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) są prawdopodobnie wykorzystywane do syntezy fosfolipidów dla nowych komórek i mogą brać udział w procesie tworzenia limfocytów i elementów morfotycznych krwi w czerwonym szpiku kostnym (Dorshkind, 1990). Adipocyty szpiku kostnego mogą również wspomagać układ odpornościowy poprzez uwalnianie PUFA jako prekursorów do tworzenia retikulum endoplazmatycznego oraz eikozanoidów, pełniących wiele istotnych metabolicznie funkcji w tym tworzenia prostaglandyn, hormonów o działaniu miejscowym (Sugár i Nagy, 1992).

Średnia zawartość kwasu mirystynowego (C14:0) i pentadekanowego (C15:0) u wszystkich badanych jeleni była dwa razy wyższa niż u reniferów, zaś zawartość kwasu palmitynowego (C16:0), margarynowego (C17:0) i stearynowego (C18:0) była ponad dwukrotnie niższa (Soppela i Nieminen, 2001). Średni udział kwasu linolowego (C18:2 *n*-6) był niższy w szpiku kostnym cieląt jelenia i zbliżony do udziału w szpiku kostnym dorosłych osobników w porównaniu do reniferów. Procentowy udział nasyconych kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym wszystkich badanych jeleni był znacznie niższy niż u reniferów, zaś udział kwasów BCFA, MUFA i PUFA był wyższy (Soppela i Nieminen, 2001). Tak duże różnice w udziale różnych kwasów tłuszczowych mogą wynikać z wielu czynników jak choćby specyfiki gatunkowej reniferów, w szczególności wieku, dlatego że próbki szpiku od reniferów były pobierane od jednomiesięcznych cieląt.

Wielu badaczy wykazało, że skład kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym, różnił się w zależności od występowania w różnych kościach. Szpik kostny kości udowej był zdominowany przez nasycone kwasy tłuszczowe, zaś nienasycone kwasy tłuszczowe w szczególności kwas oleinowy dominował w kości śródstopia (Meng i in. 1969; Pond i in. 1993; Sugár i Nagy 1992). Duże stężenie kwasu oleinowego w kości śródstopia zostało również stwierdzone we wszystkich badanych grupach jeleni. Sugár i Nagy (1992) wykazali,

że w porównaniu do udziału kwasów tłuszczowych w kościach proksymalnych jeleni europejskich, zawartość kwasów tłuszczowych w kościach śródstopia zmniejszyła się, w przypadku kwasu palmitynowego do 14%, stearynowego do 4%, zaś w przypadku kwasu oleopalmitynowego i oleinowego wzrosła odpowiednio do 25% i 56%. Udział kwasu stearynowego we wszystkich badanych grupach był podobny, zaś kwasu oleinowego, mimo że wysoki nadal był niższy niż wartości podane w badaniach przeprowadzonych przez Sugár i Nagy (1992).

Wykazano, że kwasy tłuszczowe *trans* u przeżuwaczy produkowane są z PUFA w wyniku aktywności metabolicznej bakterii w żwaczu i w związku z tym są obecne w tkance tłuszczowej tej grupy zwierząt (zwykle do 6% udziału w tkance tłuszczowej). W mleku przeżuwaczy znajduje się do 4% kwasów tłuszczowych *trans* wyprodukowanych tą drogą (Stender i in., 2008). W wyniku bakteryjnego metabolizmu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych pochodzących z pokarmu roślinnego w żwaczu powstają podwójne wiązania *trans*, z wyraźną preferencją do tworzenia wiązania podwójnego przy 11 atomie węgla, w 18 węglowym kwasie, tak jak w przypadku kwasu wakcenowego. W żwaczu są też wytwarzane niewielkie ilości kwasów *trans* z kwasu linolowego i α -linolenowego. Z powodu powyższych przemian tłuszcz przeżuwaczy może zawierać nawet do 20% kwasów tłuszczowych *trans* (Stender i in., 2008), jednakże udział kwasów tłuszczowych *trans* we wszystkich badanych grupach nie przekraczał 3,9%.

Izomery sprzężonego kwasu linolowego (CLA) były znajdowane w szpiku kostnym antylop (1,5%), łosi (1,0%) oraz jeleni (1,0%) (Cordain i in., 2002). W badanych grupach jeleni stężenie CLA w szpiku kostnym było dużo wyższe i wynosiło do 1,73% u fermowych cieląt jelenia. Wyższe stężenie CLA u cieląt fermowych w porównaniu do cieląt dzikich mogło wynikać z dłuższego okresu karmienia mlekiem matki, lub z dostarczania bardziej wartościowej paszy w warunkach hodowlanych. Cordain i in. (2002) podali również, że stosunek PUFA/SFA u badanych przez nich zwierząt mieścił się w zakresie od 0,24 do 0,33. Zależność ta była podobna do PUFA/SFA dzikich łąń, ale wyższa niż u dzikich i fermowych cieląt jelenia. W badaniach na antylopach i jeleniach również stosunek $n-6/n-3$ mieszczący się w zakresie pomiędzy 2,24 - 2,88, był wyższy niż u wszystkich badanych grup jeleni (Cordain i in., 2002).

W związku z uzyskanymi różnicami w profilu kwasów tłuszczowych cieląt jeleniowatych dzikich i fermowych w okresie przedzimowym dokonano analizy porównawczej młodych samców danieli fermowych po okresie pastwiskowym

(przed zimą) i po okresie żywienia zimowego. Zestawiono średnie stężenie tłuszczu, wody, suchej masy beztłuszczowej i kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym danieli pomiędzy sezonami żywieniowymi (Tabela 9). Masa ciała zwierząt różniła się istotnie pomiędzy okresem po pastwiskowym i po żywieniu zimowym ($p < 0,001$), co było związane z różnym wiekiem zwierząt (jesień: 6-7 miesięcy; wiosna 11-12 miesięcy) (Tabela 9). Stwierdzono również istotne różnice w zawartości tłuszczu, suchej masy beztłuszczowej w szpiku kostnym ($p < 0,05$) w zależności od pory roku. Wyższą średnią zawartość tłuszczu w szpiku kostnym danieli zwyczajnych stwierdzono po okresie żywienia zimowego (kwiecień) niż po okresie pastwiskowym (listopad). Odwrotną zależność wykazano w przypadku zawartości suchej masy beztłuszczowej w szpiku kostnym, która była wyższa po okresie wypasu (Tabela 9).

Analiza chromatografii gazowej pozwoliła na zidentyfikowanie 47 estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FAME). W tabeli 9 przedstawiono FAME, które były obecne we wszystkich próbkach szpiku kostnego w ilości $>1\%$. Jednocześnie ze względu na śladowe ilości następujących nie we wszystkich tkankach FAME: C10:0, C12:0, C13:0, C20:0, C21:0, C16:1 *c*11, C17:1 *c*7, C20:1 *c*13, C20:2 *n*-6, C20:5 *n*-3 EPA i C22:4 *n*-6 nie umieszczono ich w tabeli 9.

Tłuszcz szpikowy danieli po okresie pastwiskowym wykazywał istotnie wyższy udział nasyconych kwasów tłuszczowych, wynikający z istotnie wyższego udziału C16:0 ($p < 0,001$) oraz C18:0 ($p < 0,05$) w porównaniu ze szpikiem zwierząt po okresie żywienia zimowego. Ponadto szpik kostny młodych samców zawierał istotnie większe ilości kwasów tłuszczowych trans Σ TFA ($p < 0,005$) i CLA ($p < 0,01$) po sezonie pastwiskowym oraz wyższy poziom jednonienasyconych kwasów tłuszczowych Σ MUFA ($p < 0,001$) w tym C16:1 *c*9 ($p < 0,05$), C17:1 *c*9 ($p < 0,05$) i C18:1 *c*11 ($p < 0,001$) po okresie żywienia zimowego (Tabela 9). Wzrost masy ciała młodych cieląt wiązał się ze wzrostem poziomu nienasyconych kwasów tłuszczowych kosztem kwasów tłuszczowych nasyconych i trans.

Nie stwierdzono istotnych różnic w udziale kwasów wielonienasyconych w szpiku kostnym w zależności od sezonu żywieniowego. Zaobserwowano wyższe zawartości Σ PUFA i Σn -3 oraz korzystniejszy stosunek n -6/ n -3 u zwierząt po sezonie pastwiskowym jednak z powodu wyższej zawartości kwasów tłuszczowych nasyconych stosunek PUFA/SFA nie zmienił się i był praktycznie taki sam w obu badanych grupach (Tabela 9).

Tabela 9. Masa ciała, skład i zawartość procentowa kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym danieli w zależności od diety.

Zmienna	Żywienie letnie		Żywienie zimowe		Analiza statystyczna	
	M	SD	M	SD	Wartość p	Test
Masa ciała (kg)	32,17	3,10	41,57	4,31	0,001*	t
Skład szpiku kostnego (%)						
Tłuszcz	75,09	6,60	83,11	5,32	0,034*	t
Woda	11,15	1,53	11,24	1,45	0,914	t
Sucha masa beztłuszczowa	13,76	6,48	5,61	3,69	0,016*	t
Procentowa zawartość kwasów tłuszczowych (%)						
C14:0	2,59	0,34	2,68	0,37	0,637	t
C16:0	17,44	0,58	15,95	0,53	< 0,001*	t
C18:0	3,18	0,32	2,80	0,26	0,039*	K-S
SFA	23,34	0,87	21,60	0,61	0,001*	t
C15:0	1,06	0,07	0,98	0,09	0,140	t
OCFA	11,42	1,80	10,03	0,61	0,079	t
C18:0 <i>iso</i>	1,33	0,23	1,32	0,21	0,938	t
BCFA	3,70	0,39	3,48	0,18	> 0,100	K-S
C14:1 <i>c</i> 9	1,72	0,18	1,96	0,27	0,101	t
C15:1	8,14	1,70	6,67	0,51	0,052	t
C16:1 <i>c</i> 9	11,84	0,80	13,26	0,89	0,012*	t
C17:1 <i>c</i> 9	1,45	0,10	1,61	0,10	0,020*	t
C18:1 <i>n</i> 9	37,74	1,67	39,14	0,76	0,070	t
C18:1 <i>c</i> 11	1,77	0,12	2,75	0,26	< 0,001*	t
MUFA <i>cis</i>	54,65	1,33	58,90	0,95	< 0,001*	t
C18:2 <i>n</i> -6 LA	1,44	0,11	1,46	0,09	0,776	t
PUFA	3,88	0,43	3,63	0,29	0,243	t
<i>n</i> -3	0,98	0,18	0,92	0,10	> 0,100	K-S
<i>n</i> -6	1,65	0,15	1,66	0,13	0,831	t
MUFA <i>trans</i>	1,60	0,20	1,21	0,08	< 0,005*	K-S
ΣC18:2 <i>trans</i>	1,07	0,12	0,77	0,05	< 0,001*	t
TFA	2,99	0,34	2,34	0,07	< 0,005*	K-S
CLA	1,04	0,13	0,83	0,10	0,008*	t
<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3	1,71	0,21	1,81	0,18	0,379	t
PUFA/SFA	0,17	0,02	0,17	0,02	0,834	t

M- średnia, SD- odchylenie standardowe, K-S- test Kolmogorova-Smirnowa; t- test t-Studenta, F- tłuszcz, M- woda, FFM- sucha masa beztłuszczowa, SFA- suma nasyconych kwasów tłuszczowych, OCFA- nieparzyste kwasy tłuszczowe, BCFA- rozgałęzione kwasy tłuszczowe, MUFA *cis*- suma jednonienasyconych kwasów *cis*, LA- kwas linolowy 18:2 *n*-6, PUFA- suma wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, MUFA *trans*- suma jednonienasyconych kwasów tłuszczowych *trans*, TFA- suma kwasów tłuszczowych *trans*, CLA- suma sprzężonego kwasu linolowego, * p istotność statystyczna

W celu przeprowadzenia bardziej rozbudowanej analizy zależności pomiędzy powyższymi 17 zmiennymi charakteryzującymi profil i skład kwasów tłuszczowych a masą ciała jako dodatkową zmienną przeprowadzono analizę głównych składowych (PCA). W tabeli 10 zestawiono wartości własne macierzy korelacji, będące wariancją głównych składowych oraz ich procentowy udział w zmienności zbioru danych. Z przedstawionych danych wynika, że stosując kryterium wartości własnych większych od 1 (kryterium Kaisera) do opisu zależności wystarczą trzy pierwsze składowe wyjaśniające łącznie 89,95 % zmienności zawartej w danych, przy czym PC1, PC2, PC3 stanowiły odpowiednio 50,34 %, 31,88 % i 7,73 % zmienności.

Tabela 10. Wariancje głównych składowych i ich procentowy udział w zmienności zestawu danych.

Główne składowe	Wartości własne macierzy korelacji	Udział %	Łącznie
1	8,56	50,34	50,34
2	5,42	31,88	82,22
3	1,31	7,73	89,95
4	0,63	3,72	93,67
5	0,40	2,34	96,01
6	0,29	1,73	97,74
7	0,17	1,02	98,76
8	0,13	0,76	99,52
9	0,05	0,30	99,82
10	0,02	0,12	99,94
11	0,01	0,06	99,99
12	0,00	0,00	100,00

W tabeli 11 przedstawiono, które zmienne są najbardziej istotne dla danej głównej składowej. Pierwsza składowa (PC1) wykazywała bardzo silną dodatnią korelację z Σ MUFA *cis* ($r=0,922$), C18:1 *c1* ($r=0,919$), masą ciała ($r=0,847$), i C16:1 *c9* ($r=0,764$), zaś ze zmiennymi Σ C18:2 *trans* ($r=-0,919$), TFA ($r=-0,913$), Σ MUFA *trans* ($r=-0,882$), C18:1 *t11* VA ($r=-0,875$), C16:0 ($r=-0,830$) i SFA ($r=-0,829$) silną ujemną korelację. Z kolei druga składowa (PC2) charakteryzowała się silną korelacją ze zmiennymi opisującymi

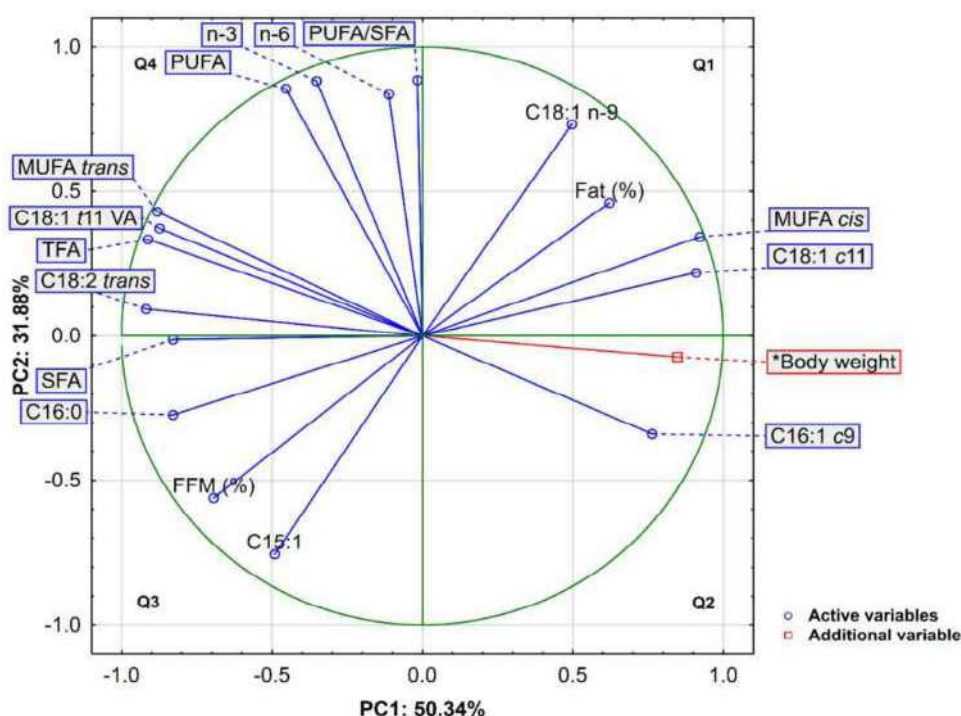
wielonienasycone kwasy tłuszczowe: PUFA ($r = 0,855$), $n-3$ ($r = 0,882$), $n-6$ ($r = 0,836$), stosunku PUFA/SFA ($r = 0,885$) oraz ujemną zależnością z C15:1 ($r = -0,755$). Trzecia składowa (PC3) wykazywała korelację w stopniu umiarkowanym z SFA ($r = 0,471$) i C16:0 ($r = 0,412$) oraz umiarkowaną ujemną korelację z stosunkiem PUFA/SFA ($r = -0,442$).

Tabela 11. Korelacje między głównymi składowymi a zmiennymi.

Zmienne	PC1	PC2	PC3
Masa ciała (kg)	0,847	-0,073	0,398
Tłuszcz (%)	0,621	0,460	0,264
Sucha masa beztłuszczowa (%)	-0,695	-0,560	-0,252
SFA	-0,829	-0,013	0,471
C16:0	-0,830	-0,273	0,412
MUFA <i>cis</i>	0,922	0,343	0,019
C16:1 <i>c9</i>	0,764	-0,339	-0,402
C18:1 <i>c11</i>	0,910	0,218	0,142
C18:1 <i>n-9</i>	0,496	0,732	0,339
C15:1	-0,491	-0,755	-0,326
MUFA <i>trans</i>	-0,882	0,429	0,035
C18:1 <i>t11</i> VA	-0,875	0,372	0,119
C18:2 <i>trans</i>	-0,919	0,093	-0,191
TFA	-0,913	0,334	-0,063
PUFA	-0,454	0,855	-0,156
<i>n-3</i>	-0,353	0,882	-0,038
<i>n-6</i>	-0,112	0,836	-0,330
PUFA/SFA	-0,017	0,885	-0,442

Biorąc pod uwagę wartości tzw. ładunków czynnościowych, na podstawie których można określić, które zmienne są najbardziej istotne dla danej głównej składowej oraz długość wektorów kierunkowych przedstawionych na rycinie 3 można wyróżnić trzy widoczne powiązane ze sobą grupy parametrów. Pierwsza grupa zmiennych do której zaliczają się jednonienasycone kwasy tłuszczowe (Σ MUFA *cis*, C18:1 *c11* i C16:1 *c9*) i dodatkowo masa ciała znajduje się w dodatnim obszarze PC1 w prawym górnym i dolnym kwadrancie (Q1 i Q2). Drugą grupę stanowią nasycone kwasy tłuszczowe (SFA

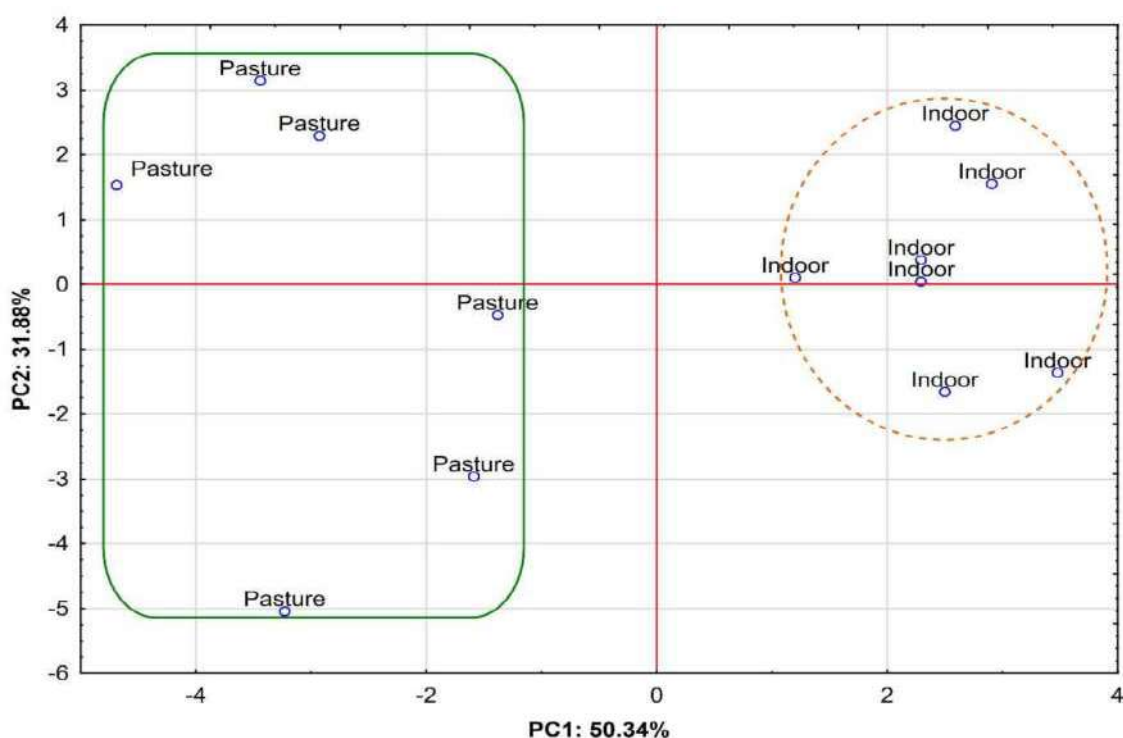
i C16:0) oraz kwasy tłuszczowe *trans* (TFA, Σ MUFA *trans*, C18:1 *t11* VA i Σ C18:2 *trans*) znajdujące się w dodatnim obszarze PC2 w lewym górnym i dolnym kwadrancie (Q4 i Q3). Trzecia grupa składająca się z PUFA, n-3, n-6 i stosunku PUFA/SFA (Q4) znajduje się dodatnim obszarze PC2 i ujemnym PC1. Podsumowując analiza osi PC1 wykazała, że wzrost masy ciała wiązał się ze wzrostem poziomu sumy nienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) takich jak izomery *cis* kwasu oleinowego (C18:1 *c11*) czy kwasu oleopalmitynowego (C16:1 *c9*) kosztem nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) i kwasów tłuszczowych *trans* (ujemne wartości w strefie Q3, Q4). Analiza osi PC2 wykazała obecność silnej korelacji dodatniej pomiędzy czterema zmiennymi: PUFA, n-3, n-6 i stosunek PUFA/SFA kosztem suchej masy beztłuszczowej (FFM) i C15:1.



Rycina 3. Przedstawienie zmiennych na płaszczyźnie dwuczynnikowej (PC1xPC2) (Moisture (%) - zawartość wody, Fat (%) - zawartość tłuszczu, FFM (%) - zawartość suchej masy beztłuszczowej; TFA - kwasy tłuszczowe *trans*).

Rycina 4 przedstawia rzut przypadków na płaszczyźnie dwuczynnikowej w zależności od diety. Z rzutu przypadków na płaszczyznę czynników wyodrębniono dwa zasadnicze podzbiory symboli punktów, na podstawie których można było od siebie odróżnić żywienie zimowe i letnie. Próbkę szpiku kostnego pochodzące od zwierząt z okresu żywienia zimowego znajdują się w dodatnich wartościach PC1 (prawa strona) i są wyraźnie odseparowane od prób pochodzących z żywienia letniego. Jednoczesna analiza

rysunku 3 i 4 wskazuje, iż próbki szpiku kostnego po żywieniu zimowym znajdują się w obszarze reprezentującym najwyższe wartości Σ MUFA *cis*, C18:1 *c11*, C16:1 *c9* i masy ciała. Drugą grupę stanowią próbki szpiku kostnego od zwierząt po żywieniu letnim, które znajdują się z lewej strony wykresu w ujemnych wartościach PC1 i reprezentują nasycone kwasy tłuszczowe oraz kwasy *trans* takie jak SFA, C16:0, TFA, Σ MUFA *trans*, C18:1 *t11* VA i Σ C18:2 *trans*, dla których istotnie wyższe wartości odnotowano w przypadku szpiku kostnego zwierząt po żywieniu letnim (Tabela 9). Trzecia grupa zmiennych, obejmująca kwasy wielonienasycone znajdujące się w kwadrancie Q4 (Rycina 3) wydaje się neutralna ze względu na brak istotnych różnic związanych z typem diety badanych danieli.



Rycina 4. Rzut przypadków w zależności od diety (żywienie letnie/zimowe) w płaszczyźnie dwuczynnikowej (PC1 x PC2). Pasture – żywienie letnie, pastwiskowe, Indoor – utrzymanie zwierząt w pomieszczeniach, żywienie zimowe.

Badania przeprowadzone na młodych samcach danieli wykazały, że zmiany w składzie kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym zwierząt są związane z wiekiem i odmiennym sposobem żywienia. Stwierdzona w badaniach niska zawartość tłuszczu i wyższa zawartość suchej masy beztłuszczowej może świadczyć o niedożywieniu (Ransom,

1965; Neiland, 1970; Thouzeau i in., 1997), aczkolwiek biorąc pod uwagę młody wiek zwierząt, przyczyny należy się raczej doszukiwać w dużej zawartości szpiku kostnego czerwonego za czym przemawia też wysoka zawartość wody w badanych tkankach w obu okresach żywieniowych. Proporcja pomiędzy tłuszczem a suchą masą beztłuszczową zmieniała się u danieli wraz z wiekiem, kiedy to szpik kostny czerwony ulegał przemianom do szpiku kostnego żółtego, będącego rezerwuarem kwasów tłuszczowych.

Średnia zawartość kwasu mirystynowego C14:0 w obu okresach badań była wyższa niż wyniki uzyskane u niedożywionych cieląt reniferów w okresie zimowym (Soppela i Nieminen, 2001). W porównaniu do reniferów zawartość kwasu palmitynowego (C16:0) i kwasu stearynowego (C18:0) była o ponad połowę niższa (Soppela i Nieminen, 2001). Średnia zawartość kwasu linolowego (C18:2 *n*-6) również była niższa niż u reniferów, zaś średnie stężenie kwasu α -linolenowego (18:3 *n*-3) i (18:4 *n*-6) było wyższe (Soppela i Nieminen, 2001). Szpik kostny badanych danieli w obu okresach charakteryzował się dwukrotnie niższą średnią zawartością SFA i dwukrotnie wyższą zawartością BFCA w porównaniu z wynikami uzyskanymi u cieląt reniferów. Poziom MUFA u danieli zwyczajnych był wyższy niż u cieląt renifera. Średnie stężenia PUFA i *n*-3 u badanych jeleniowatych były nieco wyższe, zaś poziom *n*-6 niższy. Różnice te mogą być związane z różnicami między gatunkami jak i różnicami w wieku badanych danieli i reniferów (Soppela i Nieminen, 2001).

U przeżuwaczy wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) są obecne w dużych ilościach w tkance tłuszczowej ze względu na wydajny proces uwodornienia przeprowadzany przez mikroorganizmy żwacza (Christie, 1981), co zostało również potwierdzone w niniejszych badaniach. Zawartość PUFA u badanych danieli była podobna lub wyższa, niż u niedożywionych reniferów, co prawdopodobnie wskazuje na dużą mobilizację tych kwasów tłuszczowych z diety roślinnej, zwłaszcza w okresie wypasu, gdyż proces syntezy tych kwasów przez organizm jest niemożliwy (Bruckner, 1992).

Istotnie statystycznie wyższe stężenie CLA w szpiku kostnym młodych danieli wskazywało, że w badanym czasie młode karmione były jeszcze mlekiem matki, które zawiera znaczne ilości CLA. W listopadzie młode daniela są już całkowicie odsadzone od matek i nie mają z nimi kontaktu (Janiszewski i in., 2014).

Wyższy poziom MUFA w porównaniu z PUFA jest korzystniejszy dla jeleniowatych, zapewniając im płynność adipocytów szpiku kostnego w niskich temperaturach. Należy podkreślić, że dominującym kwasem w szpiku kostnym był kwas oleinowy, który stanowił

prawie 40% sumy kwasów tłuszczowych. Wysoki udział kwasu oleinowego determinował niską temperaturę topnienia tłuszczu w szpiku kostnym, co zwiększało jego płynność, a tym samym funkcjonowanie kończyn w czasie mrozu (Irving i in., 1957; Turner, 1979). Mechanizm utrzymywania miękkości tłuszczów poprzez zwiększenie stopnia ich nienasylenia zaobserwowano w dystalnych kościach lub kończynach różnych gatunków nie tylko arktycznych, ale również tropikalnych ssaków (Turner, 1979; Meng i in., 1969; West i Shaw., 1975; Käckelä i Hyvärinen., 1996). Nienasycone kwasy tłuszczowe dominują w dystalnych częściach ciała, takich jak kości śródstopia, obniżając w ten sposób temperaturę topnienia tłuszczów (Sugár i Nagy, 1992). Udział kwasu palmitynowego (C16:0) i stearynowego (C18:0) w kościach śródstopia w czasie zimy spadł do 14 % i 2,5 %, zaś udział kwasu oleopalmitynowego (C16:1) i oleinowego (C18:1 *cis n-9*) wzrósł odpowiednio do 21% i 43 %. Stężenie kwasu palmitynowego i oleinowego było wyższe u danieli fermowych niż te podawane przez Sugár i Nagy (1992) zaś stężenie kwasu oleopalmitynowego i oleinowego było niższe. Wiosną w szpiku kostnym badanych zwierząt obniżało się stężenie nasyconych kwasów tłuszczowych, zaś wzrastała koncentracja jednonienasyconych kwasów tłuszczowych. Średnie stężenie kwasu oleinowego odpowiedzialnego za płynność adipocytów szpiku kostnego było nieco niższe przed okresem zimowym, ale bardzo zbliżone do wyników uzyskanych w kwietniu.

Wykazano, że kwasy tłuszczowe *trans* wytwarzane przez przeżuwacze są wynikiem bakteryjnego metabolizmu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w żwaczu i w związku z tym są obecne we wszystkich tkankach tłuszczowych tych zwierząt. Kwasy tłuszczowe o konfiguracji *trans* w żywności pochodzą z dwóch różnych źródeł - produkowanego przemysłowo tłuszczu częściowo uwodornionego (IP-TFA) stosowanego w olejach do smażenia, margarynach, smarowidłach i produktach piekarniczych oraz tłuszczu przeżuwaczy w produktach mlecznych i mięsnych (RP-TFA). Pierwsze źródło może zawierać do 60% kwasów tłuszczowych w formie *trans* w stosunku do zawartości tłuszczu przeżuwaczy, która na ogół nie przekracza 6% (Stender i in., 2008). Zawartość kwasów tłuszczowych *trans* u badanych zwierząt w obu okresach badawczych była istotnie niższa i wynosiła 2,280-2,989%.

Szpik kostny to nie tylko magazyn kwasów tłuszczowych, ale również pierwiastków i witamin. Organizm będący w homeostazie powinien mieć odpowiedni profil kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym, ale także odpowiednie stężenie minerałów w tkankach pomiędzy którymi zachodzi wymiana, transport i akumulacja pierwiastków. W związku

z tym przeanalizowano średnie stężenia 21 pierwiastków w 4 badanych tkankach: szpiku kostnym oraz wybranych tkankach tj. osoczu, kościach i pierwszym porożu fermowych danieli zwyczajnych po okresie zimowym i pastwiskowym (Tabela 12). Zgodnie z oczekiwaniami, najwyższy poziom wapnia (Ca), fosforu (P), magnezu (Mg) i sodu (Na) oraz najwyższy stosunek Ca:P stwierdzono w porożu i kościach. Osocze zawierało najmniejsze ilości Ca, P i Mg, natomiast najniższy stosunek Ca:P, oraz najniższą zawartość potasu (K) i Na stwierdzono w szpiku kostnym.

Najwyższe stężenie wszystkich niezbędnych pierwiastków śladowych wykazano w porożu (Tabela 12). Test Kruskala-Wallisa H nie potwierdził istotnych różnic zawartości pierwiastków śladowych w kościach (z wyjątkiem Se), a porównywalne poziomy uzyskano tylko dla Zn (kości 69,79 mg/kg w porównaniu z porożem 78,60 mg/kg). Bardzo niskie stężenia lub wartości poniżej granicy wykrywalności w tkankach miękkich uzyskano dla kobaltu (Co), molibdenu (Mo), litu (Li) i chromu (Cr). Poroże było też miejscem akumulacji większości toksycznych pierwiastków, zwłaszcza glinu (Al) i niklu (Ni), a stężenie baru (Ba) i arsenu (As) były podobne jak w kościach. Poroże zawierało również najwięcej berylu (Be), kadmu (Cd), antymonu (Sb) i ołowiu (Pb), których zawartość w pozostałych tkankach była znikoma lub poniżej poziomu wykrywalności.

Tabela 12. Stężenie pierwiastków w świeżej masie (mg/kg) w zależności od badanej tkanki danieli zwyczajnych

Pierwiastki	Szpik kostny (BM)		Osocze (P)		Kość (B)		Poroże (A)		Test H Kruskala-Wallisa (3, N=24)	Współczynnik korelacji Spearmana (rs) pomiędzy tkankami
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD		
Makroelementy										
Ca	951,4 ^{ab}	970,4	82,5 ^a	11,2	285421,8 ^c	35052,9	242959,3 ^c	13771,3	H=21,600	-
P	691,0 ^{ab}	416,3	60,0 ^a	9,9	109262,9 ^c	5943,5	87852,1 ^{bc}	5194,4	H=21,600	B-A= 0,83*
Mg	28,4 ^{ab}	14,8	16,9 ^a	2,0	4530,2 ^{cbc}	610,2	5818,6 ^c	732,8	H=20,293	-
K	96,6 ^a	23,4	773,3 ^b	94,8	378,7 ^{ab}	38,1	832,4 ^b	123,1	H=19,867	-
Na	445,0 ^a	80,5	3072,9 ^{ab}	180,4	7539,4 ^{bc}	877,8	9204,3 ^c	992,1	H=21,117	-
Ca:P	1,1 ^a	0,6	1,4 ^{ab}	0,4	2,6 ^{cbc}	0,3	2,8 ^c	0,3	H=17,760	-
Pierwiastki śladowe										
Li	< LOD	-	0,01 ^a	0,00	0,42 ^{ab}	0,04	2,26 ^b	1,03	H=20,236	-
Cr	0,09 ^a	0,16	< LOD	-	0,15 ^{ab}	0,16	3,07 ^b	2,72	H=16,120	-
Mn	0,03 ^a	0,03	0,04 ^{ab}	0,50	1,72 ^{ab}	0,76	15,30 ^b	8,96	H=19,547	-
Co	< LOD	-	< LOD	-	0,06	0,01	0,17	0,13	H=21,026	-
Cu	0,13 ^a	0,02	0,61 ^{ab}	0,34	2,42 ^b	1,19	59,05 ^{bc}	40,54	H=20,900	P-A= -0,89*
Zn	1,23 ^{ab}	0,27	0,36 ^a	0,00	69,79 ^b	9,98	78,60 ^b	30,31	H=19,455	-
Se	0,03 ^{ab}	0.00	0,01 ^a	0,00	0,01 ^a	0,00	0,06 ^b	0,02	H=19,689	BM-B= -0,89* P-A= -0,93*
Mo	< LOD	-	0,01	0,04	0,08	0,02	0,38	0,52	H=18,169	-
Pierwiastki potencjalnie toksyczne										
Be	< LOD	-	< LOD	-	< LOD	-	0,012	0,004	H=22,395	-
Al	3,700 ^{ab}	2,285	0,038 ^a	0,060	13,550 ^{bc}	10,124	89,031 ^c	48,346	H=21,239	BM-A= -0,89*
As	< LOD	-	0,001 ^a	0,001	0,050 ^b	0,013	0,183 ^b	0,027	H=21,675	-
Cd	< LOD	-	< LOD	-	0,008	0,017	0,026	0,012	H=20,934	-
Sb	< LOD	-	0,004	0,001	< LOD	-	0,108	0,065	H=22,256	-
Ba	0,380 ^{ab}	0,337	0,039 ^a	0,035	99,470 ^c	15,939	85,950 ^{bc}	6,182	H=20,333	BM-P= -0,94*
Pb	< LOD	-	< LOD	-	0,180	0,116	2,716	1,955	H=21,934	-
Ni	0,020 ^a	0,012	< LOD	-	0,260 ^a	0,061	3,037 ^b	2,251	H=21,367	-

M-średnia, SD- odchylenie standardowe, <LOD – poniżej granicy wykrywalności, * wartość istotna statystycznie $P < 0.05$, a, b, c różnice istotne przy $P < 0,05$ dla porównań wielokrotnych (parami).

Oceniono zależności pomiędzy stężeniami poszczególnych pierwiastków w badanych tkankach (Tabela 143). Stwierdzono istotną statystycznie dodatnią zależność pomiędzy stężeniami P w kościach i porożu zwierząt ($rS = 0,83$, $p < 0,05$) oraz istotną statystycznie ujemną zależność między stężeniami miedzi (Cu) w osoczu i porożu ($rS = -0,89$, $p < 0,05$); seleniu (Se) w szpiku kostnym i kościach ($rS = -0,89$, $p < 0,05$) oraz w osoczu i porożu ($rS = -0,93$, $p < 0,05$); Al w szpiku kostnym i porożu ($rS = -0,89$, $p < 0,05$); i Ba w szpiku kostnym i osoczu ($rS = -0,94$, $p < 0,05$) (Tabela 13).

Współczynniki korelacji Spearmana wskazywał na współzależności między badanymi pierwiastkami (Tabela 13). Analizując zależności między makroelementami, wykryto dodatnie, silne i bardzo silne zależności między wszystkimi pierwiastkami z tej grupy ($0,58 \leq rS \leq 0,95$, $p < 0,05$) z wyjątkiem K. Pierwiastki śladowe były również silnie dodatnio skorelowane ze sobą ($0,45 \leq rS \leq 0,88$, $p < 0,05$), a jedynym wyjątkiem w tej grupie był Se, dla którego wystąpił silny związek z Cr ($rS = 0,70$, $p < 0,05$) i słabszy z Zn ($rS = 0,46$, $p < 0,05$). Dodatnie korelacje stwierdzono również wśród pierwiastków toksycznych ($0,50 \leq rS \leq 0,94$, $p < 0,05$), przy czym jedyne ujemne korelacje stwierdzono między Ba a Cd i Pb ($-0,49 \leq rS \leq -0,50$, $p < 0,05$).

Wśród makroelementów Ca i P były silnie dodatnio skorelowane tylko z Cu ($rS = 0,56$ i $rS = 0,57$, $p < 0,05$) i bardzo silnie skorelowane z Zn ($rS = 0,86$ i $rS = 0,88$, $p < 0,05$), podczas gdy silnie ujemnie skorelowane z Co ($rS = -0,74$ i $rS = -0,77$, $p < 0,05$). Stwierdzono również ujemną korelację dla P i Li ($rS = -0,69$, $p < 0,05$). Podobnie istotne dodatnie korelacje zaobserwowano dla wszystkich pierwiastków toksycznych i wybranych pierwiastków głównych, takich jak Mg ($0,54 \leq rS \leq 0,89$, z wyjątkiem Cd, Pb i Ni), Na ($0,60 \leq rS \leq 0,92$, z wyjątkiem Se i Cd) oraz K ($0,51 \leq rS \leq 0,88$, z wyjątkiem Ca, P, Mg, Zn, Se, Sb i Ba). Z kolei Ca i P były dodatnio silnie skorelowane z Al i As ($0,58 \leq rS \leq 0,66$, $p < 0,05$) oraz bardzo silnie skorelowane z Sb i Ba ($0,74 \leq rS \leq 0,96$, $p < 0,05$). Ujemne i silne zależności stwierdzono dla Ca i Cd ($rS = -0,70$, $p < 0,05$) i Pb ($rS = -0,80$, $p < 0,05$), a także dla P i Pb ($rS = -0,66$, $p < 0,05$).

Analizując korelacje pierwiastków śladowych i pierwiastków toksycznych, stwierdzono silne i znaczące związki Al i As ze wszystkimi (z wyjątkiem Li) pierwiastkami śladowymi ($0,58 \leq rS \leq 0,84$, $p < 0,05$). Podobne silne zależności stwierdzono dla Pb i pierwiastków śladowych (z wyjątkiem Li i Zn) ($0,66 \leq rS \leq 0,78$, $p < 0,05$) oraz bardzo silne korelacje dla Ni i pierwiastków śladowych (z wyjątkiem Li, Zn i Se) ($0,74 \leq rS \leq 0,87$, $p < 0,05$). Cd było dodatnio skorelowane z Cr, Mn i Co ($0,62 \leq rS \leq 0,65$, $p < 0,05$);

Sb był dodatnio skorelowany z Mn, Cu, Zn, Se i Mo ($0,65 \leq rS \leq 0,76$, $p < 0,05$); a Ba było dodatnio skorelowane z Zn i Cu ($rS = 0,59$ i $rS = 0,90$, $p < 0,05$). Jediną ujemną korelację między pierwiastkami z tych grup stwierdzono dla Li i Cd ($rS = -0,60$, $p < 0,05$) (Tabela 13).

Tabela 13. Zależności pomiędzy poszczególnymi pierwiastkami w badanych tkankach danieli fermowych (N=24).

Zmienne	Makroelementy				Pierwiastki śladowe								Pierwiastki potencjalnie toksyczne						
	P	Mg	K	Na	Li	Cr	Mn	Co	Cu	Zn	Se	Mo	Al	As	Cd	Sb	Ba	Pb	Ni
Ca	0,95*	0,79*	-0,08	0,60*	-0,30	0,03	0,18	-0,74*	0,56*	0,86*	0,19	-0,03	0,58*	0,64*	-0,70*	0,74*	0,96*	-0,80*	-0,01
P	1,00	0,76*	-0,12	0,8*	-0,69*	0,05	0,19	-0,77*	0,57*	0,88*	0,20	-0,13	0,62*	0,66*	-0,49	0,79*	0,93*	-0,66*	0,02
Mg		1,00	0,28	0,77*	0,84*	0,74*	0,55*	0,71*	0,75*	0,84*	0,54*	0,66*	0,89*	0,88*	0,41	0,74*	0,83*	0,52	0,39
K			1,00	0,69*	0,75*	0,78*	0,81*	0,87*	0,63*	0,07	0,09	0,53*	0,61*	0,51*	0,58*	0,19	-0,02	0,65*	0,88*
Na				1,00	0,71*	0,72*	0,80*	0,72*	0,92*	0,67*	0,31	0,63*	0,83*	0,83*	0,47	0,84*	0,63*	0,73*	0,73*
Li					1,00	0,70*	0,72*	0,88*	0,84*	0,73*	0,39	0,69*	0,52	0,45	0,47	-0,60	-0,30	0,48	0,43
Cr						1,00	0,65*	0,76*	0,64*	0,67*	0,70*	0,68*	0,77*	0,81*	0,62*	-0,03	0,20	0,75*	0,85*
Mn							1,00	0,82*	0,82*	0,41*	0,33	0,84*	0,74*	0,73*	0,63*	0,68*	0,28	0,76*	0,87*
Co								1,00	0,87*	0,72*	0,33	0,89*	0,64*	0,80*	0,65*	-0,03	-0,39	0,66*	0,85*
Cu									1,00	0,72*	0,37	0,80*	0,84*	0,83*	0,35	0,65*	0,59*	0,69*	0,76*
Zn										1,00	0,46*	0,45*	0,77*	0,81*	-0,30	0,67*	0,90*	-0,05	0,24
Se											1,00	0,23	0,61*	0,58*	0,44	0,73*	0,27	0,78*	0,25
Mo												1,00	0,58*	0,81*	0,53	0,76*	0,13	0,71*	0,74*
Al													1,00	0,94*	0,65*	0,64	0,61*	0,83*	0,65*
As														1,00	0,66*	0,80*	0,67*	0,81*	0,57*
Cd															1,00	0,54	-0,49	0,51	0,50
Sb																1,00	0,70*	0,54	0,75*
Ba																	1,00	-0,50	0,06
Pb																		1,00	0,71*

*wartości istotne statystycznie przy $p < 0,05$

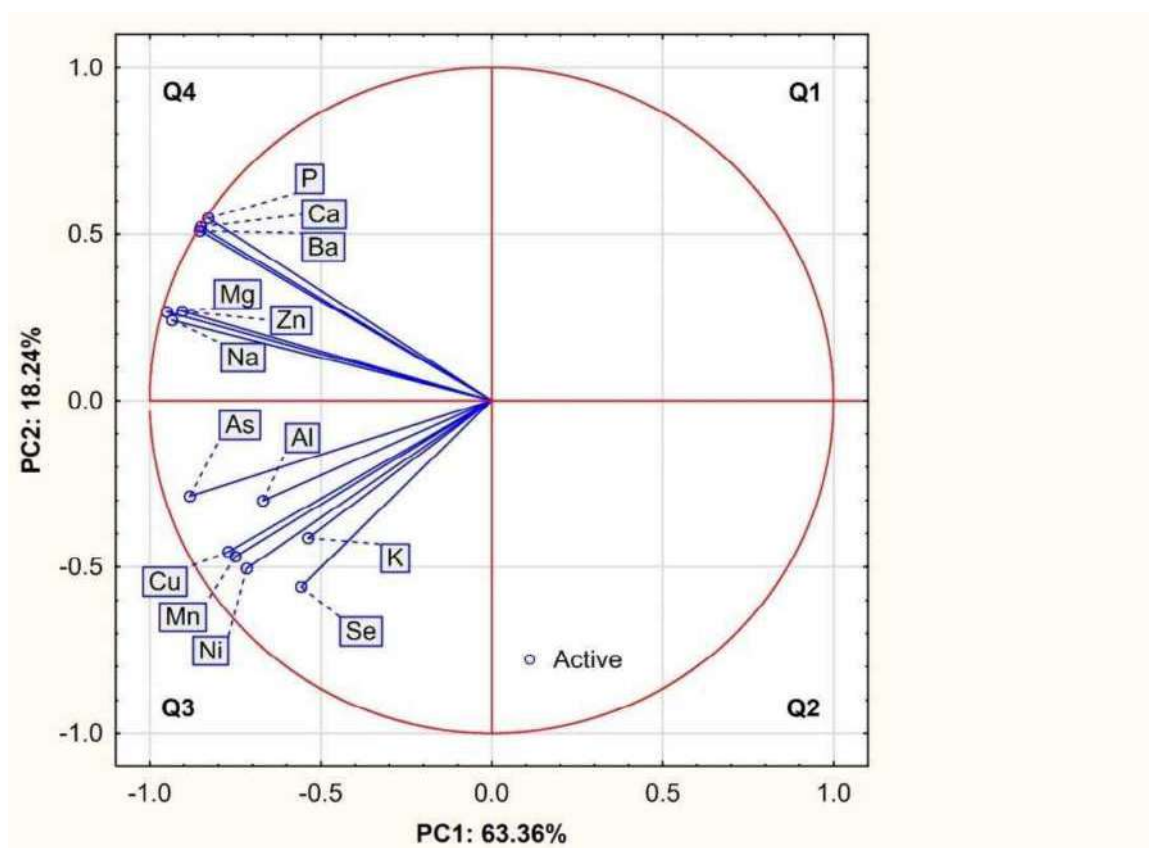
Analiza głównych składowych (PCA) była reprezentowana przez 13 zmiennych i 24 przypadki. Trzy główne składowe (PC) o wartościach własnych ≥ 1 (kryterium Kaisera) wyjaśniły 89,69% całkowitej zmienności, z czego dominowała głównie pierwsza składowa (63,36% zmienności) (Tabela 14).

Tabela 14. Korelacje między głównymi składowymi a zmiennymi pierwotnymi

Zmienna	PC1	PC2	PC3
Na	-0,94	0,24	0,23
Mg	-0,95	0,27	-0,00
K	-0,54	-0,41	0,66
Ca	-0,85	0,52	-0,02
P	-0,83	0,55	-0,05
Mn	-0,75	-0,47	-0,17
Ni	-0,72	-0,51	-0,16
Cu	-0,77	-0,45	-0,24
Zn	-0,91	0,27	-0,22
Se	-0,56	-0,56	-0,44
Al	-0,67	-0,30	0,42
As	-0,88	-0,29	0,15
Ba	-0,85	0,51	-0,06
Wartości własne	8,24	2,37	1,05
% zmienności	63,36	18,24	8,09
łącznie %	63,36	81,60	89,69

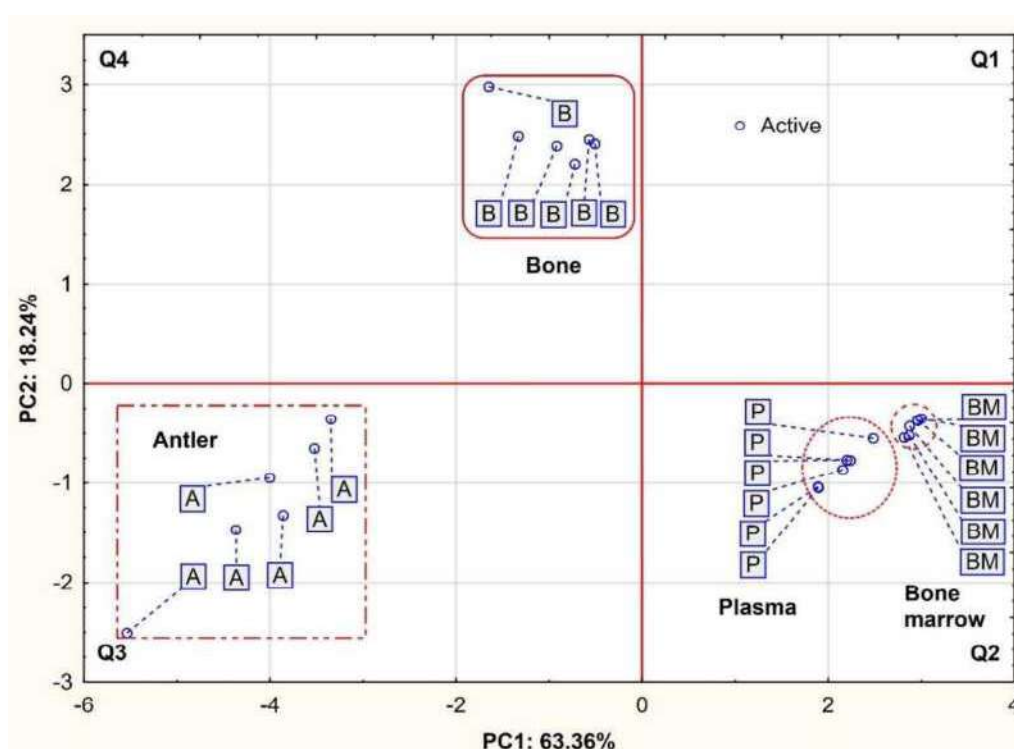
Na rycinie 5 przedstawiono położenie zmiennych względem dwóch głównych składowych ($PC1 \times PC2$). Kąt pomiędzy wskazanymi na rysunku wektorami potwierdził wysokie wzajemne zależności między makroelementami i pierwiastkami śladowymi. Na podstawie ładunków i długości wektorów kierunkowych można było wyróżnić trzy grupy pierwiastków o podobnych właściwościach zgodnie z Ryciną 5. Pierwsza grupa składała się z Mg ($r = -0,95$), Na ($r = -0,94$) i Zn ($r = -0,91$), a druga grupa obejmowała Ba ($r = -0,85$), Ca ($r = -0,85$) i P ($r = -0,83$). Obie te grupy mieściły się w lewym górnym kwadrancie (Q4) określonym przez ujemne wartości PC1 i dodatnie PC2, wskazujące na różne wzajemne korelacje z prezentowanymi grupami czynników. Wszystkie pozostałe

elementy znajdowały się w lewym dolnym kwadrancie (Q3), określonym przez ujemne wartości obu składowych głównych (PC1 i PC2), który tworzyły Cu ($r = -0,77$), Mn ($r = -0,75$) i Ni ($r = -0,72$), co oznaczało, że na zawartość Ba, Ca i P miały negatywny wpływ inne pierwiastki silnie związane z głównymi składowymi PC1 i PC2. Zawartość As ($r = -0,88$) była również bardzo silnie skorelowana z pierwszą składową, natomiast korelacja z Al ($r = -0,70$) była nieco słabsza. Z kolei Se był ujemnie skorelowany ze wszystkimi trzema składowymi w zakresie od -0,44 do -0,56. Tylko K był najsilniej i dodatnio skorelowany z PC3 ($r = 0,66$).



Rycina 5. Położenie analizowanych zmiennych względem dwóch głównych składowych (PC1 x PC2).

Na rycinie 6 przedstawiono rozkład przypadków w zależności od tkanek zwierzęcych (szpiku kostnego, osocza, kości, poroża) w układzie współrzędnych PC1 × PC2, w którym wyraźnie można było wyróżnić trzy grupy. Pierwsza grupa znajdująca się w prawym dolnym kwadrancie (Q2), czyli oznaczona dodatnimi wartościami PC1 i ujemnymi wartościami PC2, składała się z obu tkanek miękkich (szpiku kostnego i osocza). Natomiast obie tkanki twarde znajdują się po lewej stronie wykresu, z porożem w obszarze Q3 (ujemne wartości PC1 i PC2) i kośćmi w obszarze Q4 (ujemne wartości PC1 i dodatnie wartości PC2). To przestrzenne rozmieszczenie próbek, w szczególności poroża i kości, tkanek potwierdziło ich znaczne zróżnicowanie składu mineralnego.



Rycina 6. Przedstawienie przypadków w płaszczyźnie dwuczynnikowej (PC1xPC2) zależności od typu tkanki daniela zwyczajnego; B - kość, A - poroże, P - osocze, BM - szpik kostny.

Badania przeprowadzone na danielach fermowych wykazały dużą zmienność poziomu pierwiastków w tkankach. Było to prawdopodobnie spowodowane odmienną budową tych tkanek, funkcją fizjologiczną, a co za tym idzie różnym stopniem biotransformacji tych pierwiastków, a także wpływem czynników środowiskowych (Hoffman i in. 2007). Ponadto podano stężenia składników mineralnych w świeżej, a nie w suchej masie, które różnią się bardzo silnie pomiędzy badanymi tkankami. Porównując tkanki miękkie, wykazano wyższe

stężenia Ca, P, Mg, Cr, Zn, Se, Al, Ba i Ni w szpiku kostnym niż w osoczu. Wyniki te są zgodne z badaniami dotyczącymi obiegu pierwiastków w organizmie w zależności od spożywanego pożywienia oraz przemian metabolicznych (Tajchman i in., 2020a; Tajchman i in., 2021) i wynikają głównie z tego, że krew nie gromadzi składników mineralnych, a jedynie je transportuje i odzwierciedla ich ilość w danym momencie. W porównaniu z jeleniami europejskimi zawartość Mn i Se była podobna do danieli fermowych (odpowiednio 0,027 mg/kg, 0,036 mg/kg), ale wyższa niż u dzikich jeleni (0,008 g/kg, odpowiednio 0,007 mg/kg) (Tajchman i in., 2021). Zawartość Li i Co w szpiku kostnym danieli, podobnie jak w obu grupach jeleni, były poniżej poziomu wykrywalności (Tajchman i in., 2021). W badaniach Hassana i in. (2013) w szpiku kostnym reniferów wykazano obecność Cd, Pb i As, a w przedstawionych badaniach u danieli zawartość tych pierwiastków była poniżej poziomu wykrywalności. W szpiku kostnym jeleni hodowlanych i dzikich żyjących na tym samym obszarze wyższe stężenia As, Ba, Pb i Ni stwierdzono tylko u dzikich zwierząt (odpowiednio: 0,008 mg/kg, 0,969 mg/kg, 0,003 mg/kg i 0,042 mg/kg), podczas gdy niższe poziomy Al (2,638 mg/kg) i takie same Be, Cd, Sb (poniżej poziomu wykrywalności) i Ni (0,014 mg/kg) stwierdzono u jeleni fermowych w porównaniu z danielami (Tajchman i in., 2020a). Opisane różnice w stężeniach poszczególnych makroelementów, pierwiastkach śladowych i toksycznych mogą wynikać z różnic między porównywanymi gatunkami, różnic wieku badanych zwierząt, a także różnicami w akumulacji pierwiastków w zależności od osobnika.

Stosunek Ca:P w szpiku kostnym daniela wynosił 1,10 i był niższy niż u jeleni europejskich (1,62) (Tajchman i in., 2021). Nie są znane optymalne stężenia makro- i mikroelementów, które powinny być obecne w szpiku kostnym zdrowych jeleniowatych. Wydaje się jednak prawdopodobne, że korzystne dla tych organizmów jest posiadanie przez te organizmy odpowiednich stężeń analizowanych substancji do budowy układu kostnego i zrzuconych co roku poroży oraz prawidłowego przebiegu hematopoezy.

We wcześniejszych badaniach na danielach hodowlanych (Tajchman i in., 2021) poziom Ca i P w osoczu był wyższy w grupie bez suplementów niż wykazanych przez Steiner-Bogdaszewska i in. (2022) (odpowiednio 2,27 mmol/L, 2,30 mmol/L). i in. (2013) oraz Padilla i in. (2000) wykazali niższe stężenia makroelementów w osoczu jeleni niż w przedstawionych badaniach u danieli. Niższe wartości Ca, P i Mg (średnio odpowiednio: 1,960 mmol/L, 1,836 mmol/L i 0,606 mmol/L) w osoczu jeleni hodowlanych

otrzymali również Kuba (2014). Różnice te mogą wynikać z różnic międzygatunkowych, ale także z braku stabilności składu chemicznego osocza, które dynamicznie reaguje na dostarczanie składników pokarmowych i warunki środowiskowe (Kučer i in., 2013). Niedobory tych pierwiastków mogą zaburzać proces tworzenia elementów morfotycznych krwi jak i funkcje krwinek. Makro- i mikroelementy mogą prawdopodobnie wpływać na funkcje krwiotwórcze; dlatego zapewnienie prawidłowego odżywiania powinno zapobiegać chorobom układu krwiotwórczego (Oliveira i in., 2018).

Tkanka kostna była miejscem o najwyższym stężeniu Ca, P i Ba, co nie jest wynikiem zaskakującym, gdyż są to podstawowe pierwiastki budujące układ kostny (Steiner-Bogdaszewska i in., 2022). Poroże było tkanką o najwyższym stężeniu Mg, K, Na, Li, Cr, Mn, Co, Cu, Zn, Se, Mo, Be, Al, As, Sb, Pb i Ni. Pierwiastki, takie jak Co, Cd i Pb, odnotowano tylko w kościach i porożu, Be tylko w porożu, a Sb w osoczu i porożu. Wyniki te potwierdziły możliwość akumulacji niektórych pierwiastków w ramach ciągłej wymiany pierwiastków w organizmie. Na przykład Mg jest potrzebny do utrzymania prawidłowej struktury kryształów fosforanu wapnia, które tworzą strukturę poroża. Ponadto przy dużych niedoborach Ca nie ma możliwości zastąpienia go, gdyż to właśnie dwuwartościowy kation wbudowuje się w sole fosforanowe, tworząc rzadką postać apatytu wchodzącego w skład masy kostnej (Landete-Castillejos i in., 2007a, b, c). Proces ten występuje najczęściej, gdy zapotrzebowanie na Ca nie może być zaspokojone przez układ kostny. Mg jest prawdopodobnie podstawowym budulcem, ale nie jedynym, ponieważ inne pierwiastki, w tym pierwiastki toksyczne, również mają takie właściwości, zwłaszcza w czasach krytycznego zapotrzebowania na Ca (Kuba, 2014). Nic dziwnego, że niektóre toksyczne pierwiastki znaleziono tylko w kościach i porożu. Ponadto odnotowano ich wyższe stężenia w porożach zwierząt, co potwierdziło tezę, że przemieszczały się pomiędzy szpikiem kostnym, osoczem i kośćmi, a następnie były wbudowywane do rosnącego co roku poroża. Ponadto pierwiastki śladowe łatwo gromadzą się w układzie kostnym bez możliwości biologicznej degradacji.

W badaniach na danielach fermowych, utrzymywanych bez dodatkowej suplementacji mineralnej, występowały niższe stężenie Ca (205000 mg/kg), P (97000 mg/kg) i Na (5030 mg/kg) oraz zbliżone Mg (4410 mg/kg), ale wyższe stężenie K (460 mg/kg) (Tajchman i in., 2020b) w porównaniu z wynikami uzyskanymi przez Steiner-Bogdaszewska i in. (2022). Natomiast zawartość Ca (175 000 mg/kg), Mg (4090 mg/kg) i K (570 mg/kg) w porożach była niższa niż w prezentowanej grupie zwierząt, zaś stężenie P (83500 mg/kg) było

podobne, a zawartość Na (510800 mg/kg) była wyższa niż w badaniach Tajchman i in. (2020b). Mogło to być spowodowane okresową suszą, która miała miejsce w 2021 roku i tym samym wpłynęła na zróżnicowaną zawartość składników mineralnych w roślinach pastwiskowych dostępnych dla zwierząt. Analizy chemiczne gleb i traw wykazały, że największe niedobory składników mineralnych występują w porze suchej (Kreulen, 1975; McNaughton, 1988; McNaughton, 1990). Stwierdzono również, że koncentracja składników mineralnych w roślinności zmienia się bez wyraźnego, możliwego do przewidzenia trendu, oraz może przekraczać dopuszczalne poziomy określone dla pasz gospodarczych (Alldredge i in., 2002; Rautiainen i in., 2021).

W badaniach przeprowadzonych na jeleniach hodowlanych zawartość Ca (273469 mg/kg), Mg (4537 mg/kg) i Na (7082 mg/kg) w kościach była podobna jak u danieli, ale wyższa u dzikich jeleni, natomiast stężenia P (110062 mg/kg), Cr (0,131 mg/kg), Co (0,065 mg/kg) i Zn (63,343 mg/kg) były zbliżone do wyników uzyskanych dla dzikich jeleni i wyższe u jeleni hodowlanych. Wykazano również, że poziom K (434-551 mg/kg) w kościach obu grup jelenia europejskiego był wyższy w porównaniu z danielami, ale koncentracja Mn (0,788-1,388 mg/kg) i Se (0,003-0,006 mg/kg) była niższa (Tajchman i in., 2021). K jest ważnym makroelementem, ponieważ przyczynia się do zmniejszenia utraty Ca z moczem oraz do rozwoju poroża poprzez mobilizację Ca ze szkieletu (Raferty i in., 2005). Z kolei Mn jest bardzo słabo wchłaniany przez przeżuwacze i z tego powodu niektóre badania sugerują, że wysoki poziom Ca i P w diecie może zmniejszać wchłanianie tego mikroelementu (Grace i in., 2008; Landete-Castillejos i in., 2012). Zawartość Se w kościach (0,42 mg/kg) była niższa niż podana przez Olguin i in. (2013). Różnice te wynikały prawdopodobnie z faktu, że w obu badaniach analizowano różne gatunki jeleniowatych lub z powodu tego, że selen jest magazynowany głównie w mięśniach, a nie w kościach, a jego niedobór może prowadzić do pokarmowej dystrofii mięśni (PDM) (McDowell, 2003). W związku z tym najprawdopodobniej poziom Se w kościach nie odzwierciedla zawartości Se w diecie.

Stosunek Ca:P w kościach danieli wynosił 2,62 i był wyższy niż (2,0) zalecany przez Nowicka i in. (2006). Niższy stosunek Ca:P w kościach i porożu był zwykle związany z wyższym stosunkiem Ca: Mg (Azorit i Oya, 2021).

Chociaż zapotrzebowanie na Na jest większe w okresie wzrostu poroża (Berger, 1987), to suplementacja Na i innymi pierwiastkami poprawia buforowanie żwacza i jednocześnie zwiększa spożycie składników mineralnych (Beede i Collier, 1986). Badania

na danielach fermowych wykazały dość wysokie stężenie Na w tkankach twardych (kość 7539,4 mg/kg, poroże 9204,3 mg/kg). Co więcej, u badanych zwierząt miał on istotny pozytywny wpływ na wszystkie makroelementy i większość pierwiastków śladowych (z wyjątkiem Se). Spożywanie przez zwierzęta dużych dawek K w diecie jest niebezpieczne, ponieważ hamują one wchłanianie Mg, a tym samym zwiększają prawdopodobieństwo tężyczki pastwiskowej (Ram i in., 1998), ale analiza PCA nie wykazała istotnego związku między tymi pierwiastkami. Wysokie zużycie Ca i P również może być niekorzystne, ponieważ zmniejszają one wchłanianie Mn (McDowell, 2003), ale i w tym przypadku nie wykazano istotnego związku między tymi pierwiastkami. Badana grupa zwierząt miała dostęp do lizawek, co mogło skutkować wyższymi stężeniami niektórych składników mineralnych w ich tkankach.

Koncentracja litu w tkankach badanych danieli została oznaczona po raz pierwszy, dlatego brak jest danych literaturowych dotyczących optymalnego stężenia tego pierwiastka. Badania dotyczące wpływu litu na małe przeżuwacze wykazały, że 41% kóz z niedoborem litu umiera w pierwszym roku życia. Dodatkowo u tych zwierząt obserwowano zmiany skórne (Anke i in., 2005; O'Dell i Sundae, 2019). Niedobór tych pierwiastków śladowych może mieć również konsekwencje w hodowli jeleniowatych, zwłaszcza że analiza PCA wykazała istotny związek między Li a większością makroelementów (z wyjątkiem Ca) i pierwiastków śladowych (z wyjątkiem Se).

Chrom jest najobficiej występującym pierwiastkiem w skorupie ziemskiej i może występować na wszystkich stopniach utlenienia. Różne badania wykazały, że podstawową rolą Cr jest aktywacja enzymów i wpływanie na metabolizm węglowodanów, lipidów i białek. Jest także integralnym składnikiem biologicznie czynnego chromu czy wskaźnika tolerancji glukozy, który wzmacnia działanie ważnego hormonu insuliny. Insulina nie będzie działać skutecznie w diecie ubogiej w Cr (Roy i Keshri, 2020). Ten pierwiastek śladowy jest również niezbędny dla przeżuwaczy do przeciwdziałania stresowi i zwiększania ich odporności (Chang 1995; Moosie-Shageer i Mowat, 1993). Potwierdza to jego wpływ na wiele makroelementów i pierwiastków śladowych w tkankach danieli.

Najważniejszymi mikroelementami dla wypasanych przeżuwaczy są Co, Cu, Se i I (Grace i Wilson, 2002). Ataksja enzootyczna (Xubin, 1996; Mackintosh i in., 1986) i osteochondroza (Thompson i in., 1994; Audigé i in., 1995) są obecnie dobrze rozpoznawanymi zespołami niedoboru miedzi u jeleniowatych. Istnieją dowody

na występowanie osteoporozy związanej z niskim stężeniem Cu w tkankach (Ellison, 1995). W wyniku niedoborów miedzi wzrost młodych jeleniowatych może być również ograniczony (Ellison, 1995, Wilson, 1989), a wzrost poroża może być obniżony (Walker i in. 1997; Serrano i in. 2019). Innym skutkiem niedoboru Cu i Zn może być spadek funkcji odpornościowych zwierząt (Bartoskewitz i in., 2007). Warto wspomnieć, że suplementacja Cu w diecie jeleniowatych może modyfikować jakość mięsa poprzez zwiększenie zawartości białka (Serrano i in., 2019).

Zgodnie z normami hodowlanymi stężenie Se w surowicy *Odocoileus virginianus* powinno mieścić się w przedziale od 0,007 do 0,060 mg/kg (McDowell i in., 1995). U badanych danieli stężenie Se w osoczu wynosiło 0,009 mg/kg i mieściło się w zalecanyim zakresie. Jednak badania na *Dama dama* wykazały niższe stężenie Se niż zalecane przez Wilson i Grace (2001) (Se <130 nmol/L) dla przeżuwaczy, podobnie jak wyniki uzyskane przez Cappelli i in. (2015), którzy również uzyskali znacznie wyższą zawartość tego pierwiastka śladowego w porożach jeleni w porównaniu z danielami. Wilson i Grace (2001) wspominają jednak, że jeśli pojawiają się niedobory, to najczęściej zimą lub latem, a próbki od zwierząt doświadczalnych pobierano późnym latem po okresie wypasu. W związku z tym najprawdopodobniej nie wykazano pozytywnego wpływu Se na blokowanie wchłaniania toksycznych składników mineralnych (Pb, As) w tkankach danieli, na co wskazują badania Łabądź i in. (2017) oraz Vukšić i in. (2018). Ponadto dodatek Se i witaminy E w diecie jeleniowatych spowodował wzrost liczby erytrocytów i poziomu hemoglobiny (Snarska i in., 2018). Analizy przeprowadzone na danielach wykazały dodatnią korelację Se z Al, As, Sb i Pb w badanych tkankach. Se z pewnością może zapobiegać osteoporozie, ponieważ ma korzystny wpływ na stężenie Mg, Cr i Zn w tkankach (Liu i in., 2010; Liu i in., 2012).

Obecność nawet najmniejszych ilości pierwiastków toksycznych może przyczynić się do problemów z układem kostnym. Potwierdziły to wyniki uzyskane u danieli fermowych, u których wykazano istotną ujemną zależność między Ca i Cd, Ca i Pb oraz P i Pb. Wykazano, że tkanki kości jeleniowatych mogą służyć jako bioindykatory zanieczyszczenia środowiska metalami ciężkimi (Cappelli i in., 2020), ponieważ gromadzą pierwiastki śladowe przez lata lub dziesięciolecia (Glimcher i Bone, 2006). Na przykład u ludzi czas połowicznego rozpadu pierwiastków śladowych w tkance kostnej wynosi do 30 lat, a ich zawartość w kościach dochodzi do 90% (Zaichick i in., 2011). Ponadto metale ciężkie, takie jak ołów czy kadm, odkładają się w tkance kostnej głównie poprzez ich interakcje z wapniem (Srebočan i in., 2012).

U danieli, a także dzikich i hodowlanych jeleni europejskich żyjących na tym samym obszarze wykazano obecność pierwiastków toksycznych w ich tkankach: niższe stężenia Sb, Ba, Pb, As i Be, wyższe stężenia Cd i podobne As i poziomy Ba (Tajchman i in., 2020a). Tkanki kostne mogą zatem służyć jako rezerwuuar metali ciężkich (Gizejewska i in., 2017). Nie ma dokładnych danych ilościowych dotyczących tempa przebudowy układu kostnego jeleniowatych; większość danych dotyczy przemieszczania się pierwiastków i innych substancji z kości do poroża w miarę jego wzrostu (Dryden, 2016). Godny uwagi jest znaczący pozytywny wpływ Al i As na większość makro- i mikroelementów (z wyjątkiem Li). Nawet najmniejsze ilości Al i As mogą mieć negatywny wpływ na tkankę kostną zwierząt (Tajchman i in., 2020a; Odstreil i in., 2010; Hu i in., 2012; Priest, 2004). Zjawisko to może być jeszcze bardziej niebezpieczne dla jeleniowatych w trakcie fizjologicznej tymczasowej osteoporozy wynikającej z intensywnego wzrostu poroża (Zannèse i in., 2006; Borsy i in., 2009; Stéger i in., 2010; Ceacero, 2016; Ceacero i in., 2015). Badania *in vivo* wykazały, że nagromadzenie Al w kościach obniża poziom Ca, Mg i P, hamując proces mineralizacji (Li i in., 2011).

Wnioski

Badania potwierdziły założoną hipotezę badawczą.

Profil kwasów tłuszczowych i skład mineralny szpiku kostnego odzwierciedlają warunki życia lub bytowania jeleniowatych co może prowadzić do odpowiedniej suplementacji na odpowiednim etapie odchowu w hodowli fermowej.

Wnioski szczegółowe

1. Stosowana w hodowli fermowej dieta może wpływać na skład kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym młodych jeleniowatych. Jednakże nie jest to równoznaczne z bardziej korzystnym składem kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym. Młode dzikie zwierzęta wydają się być lepiej przystosowane do zimy niż zwierzęta fermowe.
2. U dzikich jeleniowatych profil kwasów tłuszczowych był korzystniejszy u dorosłych zwierząt niż u 6-miesięcznych cieląt, które wydawały się gorzej przygotowane do okresu zimowego niż osobniki dorosłe.
3. Daniele fermowe w pierwszym roku życia były lepiej odżywione po okresie zimowym, który spędziły w dobrych warunkach bytowych z kontrolowanym dostępem do paszy objętościowej, treściwej i wody. Potwierdza to zasadność procedur hodowlanych dotyczących zimowania młodych jeleniowatych w odpowiednich pomieszczeniach, które przed okresem zimowym (listopad) nie mają wystarczających rezerw, czyli odpowiednich proporcji kwasów tłuszczowych w kościach.
4. Profil kwasów tłuszczowych w szpiku kostnym zmieniał się dodatnio wraz z wiekiem jeleniowatych i po włączeniu odpowiedniego żywienia miał pozytywne znaczenie na przeżycie niekorzystnych warunków takich jak zima czy okresy głodu.
5. Zawartość minerałów w szpiku kostnym, krwi, kościach i pierwszym porożu odzwierciedla stan odżywienia młodych jeleniowatych.
6. Wyniki badań stężenia pierwiastków potwierdziły możliwość migracji minerałów pomiędzy szpikiem kostnym, krwią, kośćmi i porożem oraz akumulowania się ich w tkankach kostnych poprzez procesy wymiany kationów dwuwartościowych.

7. Wyższa zawartość pierwiastków toksycznych (Be, Al, As, Cd, Sb, Pb i Ni) w pierwszym porożu niż w kościach, wskazywała na duże zapotrzebowanie na składniki mineralne podczas procesu formowania się poroża, a także ich dużą przyswajalność mimo odpowiedniej suplementacji Ca.

Bibliografia

1. Alldredge M.W., Peek J.M., Wall W.A. (2002) Nutritional quality of forages used by elk in northern Idaho. *Journal of Range Management*, 55, 253-259.
2. Anke M., Arnhold W., Schafer U., Miiller R. (2005) Recent progress in exploring the essentiality of the ultratrace element lithium to the nutrition of animals and man. *Biomedical Research on Trace Elements*, 16(3), 169-76.
3. AOCS. (2000) AOCS Official Method Ce 2-66. Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids; American Oil Chemists' Society: Champaign, IL, USA.
4. Arnold W., Ruf T., Reimoser S., Tataruch F., Ondersheka K., Schober F., (2004) Nocturnal hypometabolism as an overwintering strategy of red deer (*Cervus elaphus*). *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286, R174-R181.
5. Asher G.W., Stevens D.R., Archer J.A., Barrell G.K., Scott I.C., Ward J.F., Littlejohn R.P., (2011) Energy and protein as nutritional drivers of lactation and calf growth of farmed red deer. *Livestock Science*, 140, 8-16.
6. Audigé L., Wilson P.R., Morris R.S., Davidson G.W. (1995) Osteochondrosis, skeletal abnormalities and enzootic ataxia associated with copper deficiency in a farmed red deer (*Cervus elaphus*) herd. *New Zealand Veterinary Journal*, 43(2), 70-6.
7. Azorit C., Oya A. (2021) Modeling the age-related shift in the mineral content of hard tissues in two Mediterranean deer species. *Archives of Oral Biology*, 122, 104999.
8. Bąkowska M., Pilarczyk B., Tomza-Marciniak A., Udała J., Pilarczyk R. (2016) The bioaccumulation of lead in the organs of roe deer (*Capreolus capreolus* L.), red deer (*Cervus elaphus* L.), and wild boar (*Sus scrofa* L.) from Poland. *Environmental Science and Pollution Research*, 348, 14373-14382.
9. Bartoš L., Vaňková D., Hyánek J., Šiler J. (2016) Impact of allosucking on growth of farmed red deer calves (*Cervus elaphus*). *Journal of Animal Science*, 72(3), 493-500.
10. Bartoskewitz M.L., Hewitt D.G., Laurenz J.C., Pitts J.S., Bryant F.C. (2007) Effect of dietary copper and zinc concentrations on white-tailed deer antler growth, body size, and immune system function. *Small Ruminant Research*, 73 (1-3), 87-94.

11. Beede D.K., Collier R.J. (1986) Potential nutritional strategies for intensively managed cattle during thermal stress. *Journal of Animal Science*, 62: 543-554.
12. Berger L.L. (1987) Salt and trace minerals for livestock, poultry, and other animals. Salt Institute: Alexandria, VA.
13. Borsy A., Podani J., Stéger V., Balla B., Horváth A., Kósa J.P., Gyurjan I., Molnár A., Szabolcsi Z., Szabó L., et al. (2009) Identifying novel genes involved in both deer physiological and human pathological osteoporosis. *Molecular Genetics and Genomics*, 281, 301–313.
14. Bruckner G. (1992) Biological effects of polyunsaturated fatty acids. In: *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, Chow, C.K., Ed.; Marcel Dekker: New York, NY, USA, pp. 631–646.
15. Cappelli J., Frasca I., Garcia A., Landete-Castillejos T., Luccarini S., Gallego L., Morimando, F., Varuzza P., Zaccaroni M. (2020) Roe deer as a bioindicator: preliminary data on the impact of the geothermal power plants on the mineral profile internal and bone tissues in Tuscany (Italy). *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 36121–36131.
16. Cappelli J., Garcia A., Ceacero F., Gomez S., Luna S., Gallego L., Gambin P., Landete-Castillejos T. (2015) Manganese Supplementation in Deer under Balanced Diet Increases Impact Energy and Contents in Minerals of Antler Bone Tissue. *PLoS One*, 10(7).
17. Ceacero F., Pluháček J., Landete-Castillejos T., García A.J., Gallego L. (2015) Inter-specific differences in the structure and mechanics but not the chemical composition of antlers in three deer species. *Annales Zoologici Fennici*; Finnish Zoological and Botanical Publishing Board: Helsinki, Finland, 52, 368–376.
18. Ceacero F. (2016) Long or Heavy? Physiological Constraints in the Evolution of Antlers. *Journal of Mammalian Evolution*, 23, 209–216.
19. Chang T.T. (1995) A selective medium for *Phellinus* noxins. *European Journal of Plant Pathology*, 25(4), 185-190.
20. Christie W.W. (1981) The composition, structure, and function of lipids in the tissues of ruminant animals. In: *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*; Christie, W.W., Ed.; Pergamon Press: Oxford, UK, pp. 95–191.

21. Cordain L., Watkins B.A., Florant G.L., Kelher M., Rogers L., Li Y. (2002) Fatty acid analysis of wild ruminant tissues: evolutionary implications for reducing diet-related chronic disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, 181-191.
22. Cygan-Szczegielniak D. (2021) The levels of mineral elements and toxic metals in the longissimus lumborum muscle, hair, and selected organs of red deer (*Cervus elaphus* L.) in Poland. *Animals*, 11, 1231.
23. Davis J.L., Valkenburg P., Reed D.J. (1987) Correlations and depletion patterns of marrow fat in caribou bones. *Journal of Wildlife Management*, 51, 865-873.
24. DEFRA (2022) Code of Recommendations for the Welfare of Farmed Deer. <http://www.defra.gov.uk/animalh/welfare/farmed/othersps/deer/pb0055/deercode.htm> (20.02.2022).
25. Domaradzki P., Florek M., Skąlecki P., Litwińczuk A., Kędzierska-Matysek M., Wolanciuk A., Tajchman K. (2019) Fatty acid composition, cholesterol content and lipid oxidation indices of intramuscular fat from skeletal muscles of beaver (*Castor fiber* L.). *Meat Science*, 150, 131-140.
26. Dorshkind K. (1990) Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annual Review of Immunology*, 8, 111-137.
27. Dryden G.M. (2016) Nutrition of antler growth in deer. *Animal Production Science*, 56, 962–970.
28. Dzieciółowski R., Babińska-Werka J., Goszczyński J. (1996) Physical condition of red deer in a high density population. *Acta Theriologica*, 41, 93-105.
29. Ellison R.S. (1995) Trace elements in deer. Proceedings of a Deer Course for Veterinarians, No. 12. Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association. 57-68.
30. FEDFA (2022) Federation of European Deer Farmers Associations. <https://www.fedfa.com/> (20.02.2022).
31. Fløjgaard C., De Barba M., Taberlet P., Ejrnaes R. (2017) Body condition, diet and ecosystem function of red deer (*Cervus elaphus*) in a fenced nature reserve. *Global Ecology and Conservation*, 11, 312–323.
32. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.

33. García A.J., Landete-Castillejos T., Molina A., Albinana B., Fernandez C., Garde J., Gallego L. (1999) Lactation curves in captive Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Journal of Animal Science*, 77, 3150–3155.
34. Gavino V.C., Gavino G.R. (1992) Adipose hormone-sensitive lipase preferentially releases polyunsaturated fatty acids from triglycerides. *Lipids*, 27, 950-954.
35. Gizejewska A., Szkoda J., Nawrocka A., Zmudzki J., Gizejewski Z. (2017) Can red deer antlers be used as an indicator of environmental and edible tissues' trace element contamination? *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 11630–11638.
36. Glimcher M.J. Bone (2006) Nature of the calcium phosphate crystals and cellular, structural and physical chemical; mechanisms in their formation. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 64, 223–282.
37. Gómez J.A., Landete-Castillejos T., García A.J., Gallego L. (2006) Importance of growth during lactation on body size and antler development in the Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Livestock Science*, 105, 27–34.
38. Gómez J.A., Landete-Castillejos T., García A.J., Gaspar-López E., Estévez J.A., Gallego L. (2008) Lactation growth influences mineral composition of first antler in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Wildlife Biology*, 14, 331–338.
39. Gómez J.A., Ceacero F., Landete-Castillejos T., Gaspar-López E., García A.J., Gallego L. (2012) Factors affecting antler investment in Iberian red deer. *Animal Production Science*, 52, 867–873.
40. Grace N.D., Wilson P.R. (2002) Trace element metabolism, dietary requirements, diagnosis and prevention of deficiencies in deer. *New Zealand Veterinary Journal*, 50(6), 252-9.
41. Grace N.D., Castillo-Alcala F., Wilson P.R. (2008) Amounts and distribution of mineral elements associated with live weight gains of grazing red deer (*Cervus elaphus*). *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 51(4), 439–449.
42. Hassan A.A., Rylander C., Sandanger T.M., Brustad M. (2013) Copper, cobalt and chromium in meat, liver, tallow and bone marrow from semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus* L.) in Northern Norway. *Food Public Health*, 3, 154–160.
43. Hoffman L.C., Kroucamp M., Manley M. (2007) Meat quality characteristics of springbok (*Antidorcas marsupialis*). Chemical composition of springbok meat as influenced by age, gender and production region. *Meat Science*, 76, 762–767.

44. Hoz L., Lopez-Bote C.J., Cambero M.I., D'Arrigo M., Pin C., Ordonez J.A. (2003) Effect of dietary linseed oil and α -tocopherol on pork tenderloin (*Psoas major*) muscle. *Meat Science*, 65(3), 1039-1044.
45. Hu Y.C., Cheng H.L., Hsieh B.S., Huang L.W., Huang T.C., Chang K.L. (2012) Arsenic trioxide affects bone remodeling by effects on osteoblast differentiation and function. *Bone*, 50, 1406–1415.
46. Irving L., Schmidt-Nielsen K., Abrahamson N.S.B. (1957) On the melting points of animal fats in cold climates. *Physiological Zoology*, 30, 93 e105.
47. Irving L. (1972) Arctic Life of Birds and Mammals Including Man. Springer- Verlag, New York, 191.
48. Jackson C. M. (1926) The effects of inanition and malnutrition upon growth and structure. Blakison's, Son & Co., Philadelphia, Pa., 616.
49. Janiszewski P., Dmuchowski B., Gugolek A., Żelobowski R. (2008) Body weight characteristics of farm-raised fallow deer (*Dama dama* L.) over the winter period. *Journal of central European agriculture*, 9, 337–342.
50. Janiszewski P., Bogdaszewska Z., Bogdaszewski M., Bogdaszewski P., Cilulko-Dołęga J., Nasiadka P., Steiner Ż. (2014) *Chów i hodowla fermowa jeleniowatych*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.
51. Käkälä R., Hyvärinen H. (1996) Site-specific fatty acid composition in adipose tissues of several northern aquatic and terrestrial mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 115, 501–514.
52. Kiarie E., Nyachoti C.M. (2010) Bioavailability of Calcium and Phosphorus in Feedstuffs for Farm Animals. In *Phosphorus and Calcium Utilization and Requirements in Farm Animals*; Vitti, D.M.S.S., Kebreab, E., Eds.; CABI: Wallingford, UK, 76–93.
53. Kouba M., Mourot J. (2011) A review of nutritional effects on fat composition of animal products with special emphasis on n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochimie*, 93, 13–17.
54. Kreulen D. (1975) Wildebeest habitat selection in the Serengeti plains, Tanzania, in relation to calcium and lactation: a preliminary report. *African Journal of Ecology*, 13(3-4), 297-304.

55. Kuba J. (2014) Analysis of changes in the concentration of Ca, P and Mg in the blood serum of red deer (*Cervus elaphus*) immature males in farm breeding. *Acta Scientiarum Polonorum Zootechnica*, 13(2), 31-40.
56. Kulik M., Tajchman K., Lipiec A., Bąkowski M., Ukalska-Jaruga A., Ceacero F., Pecio M., Steiner-Bogdaszewska Ż. (2023) The Impact of Rotational Pasture Management for Farm-Bred Fallow Deer (*Dama dama*) on Fodder Quality in the Context of Animal Welfare. *Agronomy*, 13, 1155.
57. Kučer N., Kuleš J., Barić-Rafaj R., Tončić J., Vicković I., Štoković I., Potočnjak D., Šoštarić B. (2013) Mineral concentration in plasma of young and adult red deer. *Veterinarski arhiv*, 83(4), 425-434.
58. Kudrnáčová E., Barton L., Bureš D., Hoffman L.C. (2018) Carcass and meat characteristics from farm-raised and wild fallow deer (*Dama dama*) and red deer (*Cervus elaphus*): A review. *Meat Science*, 141, 9–27.
59. Landete-Castillejos T., García A., Gallego L. (2007a) Body weight, early growth and antler size influence antler bone mineral composition of Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Bone*, 40(1), 230-235.
60. Landete-Castillejos T., Estévez J.A., Martínez A., Ceacero F., García A.J., Gallego L. (2007b) Does chemical composition of antler bone reflect the physiological effort made to grow it? *Bone*, 40, 1095-1102.
61. Landete-Castillejos T., Currey J.D., Estévez J.A., Gaspar-López E., García A., Gallego L. (2007c) Influence of physiological effort of growth and chemical composition on antler bone mechanical properties. *Bone*, 41, 794-803.
62. Landete-Castillejos T., Currey J.D., Estévez J.A., Fierro Y., Calatayud A., Ceacero F., García A.J., Gallego L. (2010) Do drastic weather effect on diet influence changes in chemical composition, mechanical properties and structure in deer antlers? *Bone*, 47, 815–825.
63. Landete-Castillejos T., Currey J.D., Ceacero F., García A.J., Gallego L., Gomez S. (2012) Does nutrition affect bone porosity and mineral tissue distribution in deer antlers? The relationship between histology, mechanical properties and mineral composition. *Bone*, 50 245-254.
64. Leat W.M.F. (1966) Fatty acid composition of the plasma lipids of newborn and maternal ruminants. *Biochemical Journal*, 98, 598.

65. Li X., Hu C., Zhu Y., Sun H., Li Y., Zhang Z. (2011) Effects of aluminum exposure on bone mineral density, mineral, and trace elements in rats. *Biological Trace Element Research*, 143, 378–385.
66. Liu H., Bian W. Liu S., Huang K. (2012) Selenium protects bone marrow stromal cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation by suppressing oxidative stress and ERK signaling pathway. *Biological Trace Element Research*, 150(1-3), 441–50.
67. Liu H., Lu Q., Huang K. (2010) Selenium suppressed hydrogen peroxide induced vascular smooth muscle cells calcification through inhibiting oxidative stress and ERK activation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 15, 111(6), 155664.
68. Łabądz D., Skolarczyk J., Pekar J., Nieradko-Iwanicka B. (2017) Analysis of the influence of selected elements on the functioning of the bone tissue. *Journal of Education, Health and Sport*, 7(4).
69. Mackintosh C.G., Orr M.B., Turner K. (1986) Enzootic ataxia in wapiti. Proceedings of a Deer Course for Veterinarians, No. 3. Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association, 165-9.
70. McDowell L.R., Forrester D.J., Linda S.B., Wright S.D., Wilkinson N.S. (1995) Selenium status of white-tailed deer in Southern Florida. *Journal of Wildlife Diseases*, 31(2), 205-11.
71. McDowell L.R. (2003) Minerals in animal and human nutrition. – Elsevier, Amsterdam.
72. McNaughton S.J. (1988) Mineral nutrition and spatial concentrations of African ungulates. *Nature*, 334, 343-345.
73. McNaughton S.J. (1990) Mineral nutrition and seasonal movements of African migratory ungulates. *Nature*, 345, 613-615.
74. Meng M., Wes G., Irving L. (1969) Fatty acid composition of caribou bone marrow. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 30, 187–191.
75. Moosie-Shageer S., Mowat D.N. (1993) Effects of level of supplemental chromium on performance, serum constituents, and immune status of stressed feeder calves. *Journal of Animal Science*, 71, 232-238.
76. Nagy J., Szabo A., Donko T., Bokor J., Romvari R., Repa I., Horn P., Febel H. (2019) Body composition and venison quality of farmed red deer (*Cervus elaphus*) hinds

- reared on grass, papilionaceous or mixed pasture paddocks. *Archives Animal Breeding*, 62, 227–239.
77. Novák J. (2004) Evaluation of grassland quality. *Ekol. Bratisl.* 232, 127–143.
 78. NRC (2005) National Research Council, Mineral Tolerance of Animals, 2nd ed.; National Academy Press: Washington, DC, USA.
 79. NRC (2007) National Research Council, Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids; The National Academies Press: Washington, DC, USA; p. 362.
 80. Neiland K.A. (1970) Weight of dried marrows as indicator of fat in caribou femurs. *The Journal of Wildlife Management*, 34, 904–907.
 81. Nguyen L.Q., Everts H., Beynen A.C. (2004) Influence of dietary linseed, fish and coconut oil on growth performance of growing pigs kept on small holdings in central Vietnam. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 88, 204–210.
 82. Nieminen M., Laitinen M. (1986) Bone marrow and kidney fats as indicators of condition in reindeer. *Rangifer*, Special Issue., 1, 219–226.
 83. Nieminen M., Soppela P. (1990) Nutritional status and fatty acid composition of bone marrow in semi-domesticated reindeer. *Rangifer*, 4, 57–58.
 84. Noble R.C., Steele W., Moore J. (1971) The metabolism of linoleic acid by the young lamb. *British Journal of Nutrition*, 26, 97.
 85. Nowicka W., Machoy Z., Gutowska I., Nocoń I., Piotrowska S., Chlubek D. (2006) Contents of Calcium, Magnesium, and Phosphorus in Antlers and Cranial Bones of the European Red Deer (*Cervus elaphus*) from Different Region in Western Poland. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(2), 297–301.
 86. Odstreil A.D.C.A., Carino S.N., Ricci J.C.D., Mandalunis, P.M. (2010) Effect of arsenic in endochondral ossification of experimental animals. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62, 243–249.
 87. Oliveira D.C., Nogueira-Pedro A., Santos E.W., Hastreiter A., Silva B.G., Borelli P., Fock R.A. (2018) A review of select minerals influencing the haematopoietic process. *Nutrition Research Reviews*, 31, 267–280.
 88. Olguin C.A., Landete-Castillejos T., Ceacero F. García A.J., Gallego L. (2013) Effects of Feed Supplementation on Mineral Composition, Mechanical Properties and Structure in Femurs of Iberian Red Deer Hinds (*Cervus elaphus hispanicus*). *PLoS One*, 8(6), e65461

89. O'Dell B.L., Sundae R.A. (2019) *Handbook of nutritional essential mineral elements*. New York: CRC Press.
90. Padilla S., Bouda J., Quiroz-Rocha G.F., Dávalos J.L., Sánchez A. (2000) Biochemical and Haematological Values in Venous Blood of Captive Red Deer (*Cervus elaphus*) at Hhigh Altitude. *Acta Veterinaria Brno*, 69, 327-331.
91. Payne E. (1978) Fatty acid composition of tissue phospholipids of the foetal calf and neonatal lamb, deer calf and piglet as compared with the cow, sheep, deer and pig. *British Journal of Nutrition*, 39, 53.
92. PN-ISO 1442 (2000) Meat and Meat Products—Determination of Moisture Content (Reference Method). The Polish Committee for Standardization: Warsaw, Poland.
93. Pond C.M., Mattacks C.A., Colby R.H., Tyler N.J.C. (1993) The anatomy, chemical composition and maximum glycolytic capacity of adipose tissue in wild Svalbard reindeer *Rangifer tarandus platyrhynchus*. in winter. *Journal of Zoology*, 229, 17-40.
94. Priest N.D. (2004) The biological behaviour and bioavailability of aluminium in man, with special reference to studies employing aluminium as a tracer: Review and study update. *Journal of Environmental Monitoring*, 6, 375-403.
95. Raclot T., Mioskowski E., Bach A.C., Groscolas R. (1995) Selectivity of fatty acid mobilization: a general metabolic feature of adipose tissue. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 269, R1060-R1067.
96. Raftery K., Davies K.M., Heaney R.P. (2005) Potassium intake and the calcium economy. *Journal of the American College of Nutrition*, 24, 99–106.
97. Ram L., Schonewille J.T., Martens H., van't Klooster A.T., Beynen A.C. (1998) Magnesium absorption by withers fed potassium bicarbonate in combination with different dietary magnesium concentrations. *Journal of Dairy Science*, 81, 2485-2492.
98. Ransom A.B. (1965) Kidney and marrow fat as indicators of white-tailed deer condition. *Journal of Wildlife Management*, 29, 397-398.
99. Rautiainen H., Bergvall U.A., Felton A.M., Tigabu M., Kjellander P. (2021) Nutritional niche separation between native roe deer and the nonnative fallow deer— a test of interspecific competition. *Mammal Research*, 66, 443–455.
100. Razmaitė V., Pileckas V. (2019) Fatty acid composition in maternal and foetal muscle tissues of beaver (*Castor fiber*). *Biologia*, 74, 97-101.

101. Razmaitė V., Pileckas V., Siukscius A., Juskiene V. (2020) Fatty Acid Composition of Meat and Edible Offal from Free-Living Red Deer (*Cervus elaphus*). *Foods*, 9(7), 923.
102. Roy D., Keshri A. (2020) Wpływ suplementacji chromem na zwierzęta gospodarskie i ptaki drobiowe: *Suplementacja chromem w paszy dla zwierząt*.
103. Scott T.W., Setchell B.P., Bassett J. (1967) Characterization and metabolism of ovine foetal lipids. *Biochemical Journal*, 104, 1040.
104. Serrano M.P., Maggolino A., Lorenzo J.M., De Palo P., García A., Landete-Castillejos T., Gambín P., Cappelli J., Domínguez R., Pérez-Barbería F.J., Gallego L. (2019) Meat quality of farmed red deer fed a balanced diet: effects of supplementation with copper bolus on different muscles. *Animal*, 13:4, 888–896.
105. Serrapica F., Masucci F., Di Francia A., Napolitano F., Braghieri A., Esposito G., Romano R. (2020) Seasonal Variation of Chemical Composition, Fatty Acid Profile, and Sensory Properties of a Mountain Pecorino Cheese. *Foods*, 9, 1091.
106. Silberstein L., Anastasi J. (2018) *Hematology: Basic Principles and Practice*, 7th ed.; Hoffman R., Benz E., Heslop H., Weitz J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. p. 6228.
107. Snarska A., Wysocka D., Rytel L., Żarczyńska K., Sobiech P., Gonkowski S. (2018) The influence of selenium and vitamin E supplementation on cytological assessment of red blood cell line of bone marrow in fallow deer kept in captivity. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 21, 3 431–436.
108. Soare, J.H. (1995) Phosphorus bioavailability. In *Bioavailability of Nutrients for Animals: Amino Acids, Minerals, and Vitamins*. Ammerman C.B., Baker D.H., Lewis A.J., Eds., Academic Press: San Diego, CA, USA, 257–294.
109. Soppela P., Nieminen M. (2001) The effect of wintertime undernutrition on the fatty acid composition of leg bone marrow fats in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 128, 63–72.
110. Srebočan E., Janicki Z., Crnić A.P., Tomljanović K., Šebečić M., Konjević D. (2012) Cadmium, lead and mercury concentrations in selected red deer (*Cervus elaphus* L.) tissues from north-eastern Croatia. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 47, 2101–2108.
111. Stéger V., Molnár A., Borsy, A., Gyurján I., Szabolcsi Z., Dancs G., Molnár J., Papp P., Nagy J., Puskás L., et al. (2010) Antler development and coupled osteoporosis

- in the skeleton of red deer *Cervus elaphus*: Expression dynamics for regulatory and effector genes. *Molecular Genetics and Genomics*, 284, 273-287.
112. Steiner-Bogdaszewska Ż., Tajchman K., Ukalska-Jaruga A., Florek M., Pecio M. (2022) The mineral composition of bone marrow, plasma, bones and the first antlers of farmed fallow deer. *Animals*, 12, 2764.
 113. Stender S., Astrup A., Dyerberg J. (2008) Ruminant and industrially produced trans fatty acids: health aspects. *Food & Nutrition Research*, 52, 1. 1651.
 114. Sugár L., Nagy I. (1992) Fatty Acid Composition in the Bone Marrow Fats of Cervidae. In *The Biology of Deer*. Brown, R.D. Ed.; Springer, New York, NY.
 115. Tajchman K., Bogdaszewski M., Kowalczyk-Vasilev E., Dąbrowski R. (2019) Impact of day length and total protein content in the diet of farmed fallow deer (*Dama dama*) on their plasma mineral level and haematological indices. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17, 14729–14750.
 116. Tajchman K., Bogdaszewski M., Kowalczyk-Vasilev E. (2020a) Effects of supplementation with different levels of calcium and phosphorus on mineral content of first antler, bone, muscle, and liver of farmed fallow deer (*Dama dama*). *Canadian Journal of Animal Science*, 100, 17–26.
 117. Tajchman K., Ukalska-Jaruga A., Bogdaszewski M., Pecio M., Dżiki-Michalska K. (2020b) Accumulation of toxic elements in bone and bone marrow of deer living in various ecosystems. A case study of farmed and wild-living deer. *Animals*, 10, 2151.
 118. Tajchman K., Ukalska-Jaruga A., Bogdaszewski M., Pecio M., Janiszewski P. (2021) Comparison of the accumulation of macro- and microelements in bone marrow and bone of wild and farmed red deer (*Cervus elaphus*). *BMC Veterinary Research*, 17, 324.
 119. Tajchman K., Ukalska-Jaruga A., Ceacero F., Pecio M., Steiner-Bogdaszewska Ż. (2022) Concentration of macroelements and trace elements in farmed fallow deer antlers depending on age. *Animals*, 12, 3409.
 120. Thompson K.G., Audigé L., Arthur D.G., Julian A.F., Orr M.B., McSporran K.D., Wilson P.R. (1994) Osteochondrosis associated with copper deficiency in young farmed red deer and wapiti X red hybrids. *New Zealand Veterinary Journal*, 42, 137-43.

121. Thouzeau C., Massemin S., Handrich Y. (1997) Bone marrow fat mobilization in relation to lipid and protein catabolism during prolonged fasting in barn owls. *Journal of Comparative Physiology B*, 167, 17-24.
122. Turbil C., Ruf T., Mang T., Arnold W. (2011) Regulation of heart rate and rumen temperature in red deer: effects of season and food intake. *Journal of Experimental Biology*, 15, 214 (Pt 6), 963-970.
123. Turner J.C. (1979) Adaptive strategies of selective fatty acid deposition in the bone marrow of desert bighorn sheep. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 62A, 599-604.
124. Vukšić N., Šperanda M., Lončarić Z., Đidara M., Ludek E., Budor I. (2018) The effect of dietary selenium addition on the concentrations of heavy metals in the tissues of fallow deer (*Dama dama* L.) in Croatia. *ESPR*, 25, 11023–11033.
125. Walker I.H., Wilson P.R., Beckett S. (1997) Copper and velvet antler production. A clinical trial. Proceedings of a Deer Course for Veterinarians, No. 14. Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association., 219-27.
126. Weiss D.J., Wardrop K.J. (2010) *Schalm's Veterinary Hematology*, 6th ed., Blackwell Publishing: Ames, IA, USA.
127. West G.C., Shaw D.L. (1975) Fatty acid composition of Dall sheep bone marrow. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 50, 599–601.
128. Wilson P.R. (1989) Body weight and serum copper concentrations of farmed red deer stags following oral copper oxide wire administration *New Zealand Veterinary Journal*, 37(3), 94-7.
129. Wilson P.R., Grace N.D. (2001) A review of tissue reference values used to assess the trace element status of farmed red deer (*Cervus elaphus*). *New Zealand Veterinary Journal*, 49(4), 126-32.
130. Wolkers J., Wensing Th., Schonewille J.Th., van't Klooster A.Th. (1994) Undernutrition in relation to changed tissue composition in wild boar *Sus scrofa*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 108A, 623-628.
131. Xubin W. (1996) Report on 'Huangyao Disease' (Loin Wobble disease) in Sika deer. In *Proceedings of the 1996 International Symposium on Deer Science and Deer Products*. Changchun, China; pp. 192–194.

132. Zaichick S., Zaichick V., Karandashev V.K., Moskvina I.R. (2011) The effect of age and gender on 59 trace-element contents in human rib bone investigated by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Biological Trace Element Research*, 143, 41–57.
133. Zannèse A., Morellet N., Targhetta C., Coulon A., Fuser S., Hewison A.J.M., Ramanzin M. (2006) Spatial structure of roe deer populations: Towards defining management units at a landscape scale *Journal of Applied Ecology*, 43, 1087–1097.
134. <https://kosewopan.pl/pl/home/> (04.09.2023)
135. <https://strzalowo.olsztyn.lasy.gov.pl/> (04.09.2023).
136. Dane z rejonu hodowlanego nr 3 Puszcza Piska (2023)

Załączniki

Załącznik 1

**Kopie opublikowanych prac wchodzących w skład cyklu
publikacji**

Article

Composition of Fatty Acids in Bone Marrow of Red Deer from Various Ecosystems and Different Categories

Żaneta Steiner-Bogdaszewska ¹, Katarzyna Tajchman ^{2,*} , Piotr Domaradzki ^{3,*}  and Mariusz Florek ³ 

¹ Institute of Parasitology of the Polish Academy of Sciences, Research Station in Kosewo Górne, 11-700 Mragowo, Poland; kosewopan@kosewopan.pl

² Department of Animal Ethology and Wildlife Management, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

³ Department of Quality Assessment and Processing of Animal Products, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland; mariusz.florek@up.lublin.pl

* Correspondence: katarzyna.tajchman@up.lublin.pl (K.T); piotr.domaradzki@up.lublin.pl (P.D.)

Abstract: In this study, the influence of the living conditions of red deer (*Cervus elaphus*) fawns (wild vs. farmed) and effect of the category of free-living animals (fawns vs. does) on the fatty acid (FA) profile of the leg bone marrow was assessed. The composition of FAs in the deer bone marrow was determined by the gas chromatography method. In all groups, oleic acid (18:1 *c*9) was the most abundant in deer bone marrow and comprised of approximately 37% of total FAs. The bone marrow of young wild deer was characterized by a significantly ($p < 0.001$) higher fat content and saturated FAs proportion, while farmed fawns contained more moisture ($p < 0.005$) and fat-free dry matter ($p < 0.001$), as well as more monounsaturated FAs *cis* branched-chain FAs and monounsaturated FAs *trans* ($p < 0.001$). Although no significant ($p > 0.05$) differences were found between fawns, in terms of partial sums of PUFA, a significantly ($p < 0.001$) higher level of the sum of *n*-3 and *n*-6 FAs and more favorable *n*-6/*n*-3 ratio in the bone marrow of wild fawns were determined. In general, the legs of wild fawns were better prepared for wintering than farmed ones. In turn, comparing the category-related FAs composition in the bone marrow of free-living animals, a more favorable profile was observed in the adult (does) than in the young (fawns) animals, as the bone marrow of the wild does was characterized by significantly ($p < 0.001$) lower percentages of saturated FAs and a higher percentage of monounsaturated FAs *cis*.

Keywords: *Cervus elaphus*; bone marrow; gas chromatography; fatty acids; living conditions; nutritional status



Citation: Steiner-Bogdaszewska, Ż.; Tajchman, K.; Domaradzki, P.; Florek, M. Composition of Fatty Acids in Bone Marrow of Red Deer from Various Ecosystems and Different Categories. *Molecules* **2022**, *27*, 2511. <https://doi.org/10.3390/molecules27082511>

Academic Editors: Michele De Luca, Gaetano Ragno and Gavino Sanna

Received: 7 March 2022

Accepted: 11 April 2022

Published: 13 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Bone marrow is a soft, highly blood-supplied spongy tissue present inside medullary cavities in long bones. It is divided into red bone marrow, in which hematopoiesis takes place (the formation of morphotic blood elements), and yellow bone marrow, consisting mainly of adipose cells. The red marrow fills all bones in fetuses and neonates and is present in flat and long bone epiphyses in the postnatal period [1]. The fatty acids of bone marrow lipids have been shown to be used as an energy source and contribute to the formation of new cells [2], especially in young animals [3]. In ruminants, tissue lipids in the prenatal period and young deer contain small amounts of linoleic and linolenic acids [4–6]. Therefore, it has been suggested that the youngest animals may be at risk of deficiency of essential fatty acids [7]. It is very important that fawns should be properly nourished, in order to obtain the appropriate body weight before the winter period [8], because their condition determines their survival, not only in the next few months, but also in the following years of adult life [9]. Red deer body weight is a good index of condition for populations living in various habitats. Dzięciołowski et al. [10] revealed that wild red deer fawns, irrespective of sex, had the same body weight up to 6 months of age, and sexual

dimorphism, as a significantly heavier body mass, was significantly marked in 1.5 years old males. In older hinds, body weight was stabilized at the age of 2.5 years, while, in stags, it stabilized at the age of 4.5 years. Moreover, in adult hinds participating in breeding, no significant differences in body weight were found with increasing age up to 9.5 years and above.

On the farm, the living and nutritional conditions provided to deer can be modified, unlike in the case of wild animals, which are usually exposed to deficiencies in the food base and low temperatures in winter. It has been shown that deer have a number of adaptations to help them to survive the most demanding periods, e.g., they can slow their metabolism in winter or limit their activity, in order to save energy [11–13]. In addition, with the age of the animal, the red marrow transformations in yellow, and its proportion in the bones increases [1]. It has been shown that body fat reserves are initially stored in the bone marrow, next around the kidneys, and, finally, under the skin. Hence, many researchers use the content and composition of fat in the bone marrow as an indicator of the condition and nutritional status of ungulates, due to the fact that it is mobilized as the last energy reserve during starvation [14–20]. Dzieciółowski et al. [10] observed the decline of stag conditions, both by the decrease of kidney fat index and percentages of males with high deposits of visceral fat during and after the rutting season. In turn, does managed their fat reserves more rationally, which was indicated by the lack of differences in kidney fat index values, visceral fat, and body weight during and after rut. However, frequencies of females with a large amount of visceral fat indicate a positive relationship between the proportions of fatty hinds up to the age of 9.5 years. Similarly to does, the condition of fawns was, in both sexes, maintained at a roughly equal level.

In reindeer, it has been shown that the fatty acid composition in proximal bones (femur) is dominated by saturated fatty acids (SFA), whereas unsaturated fatty acids (UFA), mainly oleic acid (C18:1 *n*-9), predominate in distal bones (metatarsus) [21,22]. The high content of this acid contributes to the low melting point of bone marrow fat, increases its fluidity, thus improving the function of animals' legs during frosty periods [23,24]. The mechanism of maintaining the softness of fats by increasing their unsaturation degree has been observed in the distal bones of various species of mammals [12,16,17]. Irving et al. [23,25] reported that changes in the bone marrow melting point have been detected in both arctic and tropical mammals. The selective deposition of unsaturated fatty acids in the bone marrow may facilitate their mobilization at low temperatures and in periods of famine. It has been confirmed that adipose tissue lipolysis leads to the preferential release of long-chain polyunsaturated fatty acids (LC PUFA) [26,27].

It should be emphasized that the composition and changes in fatty acids contained in bone marrow fat, in relation to nutritional status, have been insufficiently studied, especially in the case of the youngest animals that are most exposed to adverse climatic conditions. The bone marrow composition profile, apart from, e.g., nutrition [28–31], climatic conditions [23,24], and physiological state [15,18–20], also changes with the age of animals [20,32]. Therefore, it seems interesting to know the fatty acid composition of the bone marrow in younger and older deer.

The aim of the study was to compare the composition of fatty acids in the bone marrow of farmed and wild red deer fawns (effect of the living conditions), as well as wild fawns and 3–6-year-old does (effect of animal category).

2. Results

A comparison of the average body weight, mean concentrations of fat, moisture, and fat-free dry matter in the bone marrow (BM) between wild and farmed fawns, as well as between wild fawns and wild does, are shown in Table 1. Although the body mass of the fawns did not differ significantly, a higher value (by 3.64 kg) was recorded for farm deer. The bone marrow of wild fawns was characterized by a higher fat content (by 29.62 pp; $p < 0.001$), in comparison with the BM of farmed fawns, which contained more moisture and fat-free dry matter (by 9.34 and 20.67 pp, respectively; $p < 0.005$). In turn, when

comparing the category-related proximate composition of the bone marrow of wild deer (fawns vs. does), a significant difference was noted only for the higher content of fat-free dry matter (by 6.15 pp; $p < 0.01$) in the BM of adults (Table 1).

Table 1. Comparison of the mean body weight, bone marrow composition between red deer fawns and does.

Variable (%)	Farmed Fawns		Wild Fawns		Wild Does		Fawns Wild vs. Farmed	Wild Fawns vs. Does
	M	SD	M	SD	M	SD	p -Value $t^a/K-S^b$	p -Value $t^a/K-S^b$
Body Mass (kg)	49.42	5.12	45.78	6.79	80.83	30.53	>0.05 ^a	<0.001 ^b
Bone Marrow Composition (%)								
Fat	53.52	13.71	83.14	3.43	77.33	9.19	<0.001 ^b	>0.05 ^b
Moisture	21.01	10.07	11.66	1.77	11.01	4.07	<0.005 ^b	>0.05 ^b
Fat-Free Dry Matter	25.48	11.78	4.81	2.53	10.96	7.19	<0.001 ^b	<0.01 ^b

M—mean, SD—standard deviation, ^a—Student's t -test, and ^b—Kolmogorov–Smirnov test.

The applied chromatographic separation allowed for identifying 47 different fatty acids, with the unit share of 35 of them not exceeding 1%. A trace amount of FA C12:0 was detected in the bone marrow of the farmed red deer fawns, and no C17:1 $c7$ was present in the wild fawns (Table 2). The significantly highest level of the total SFAs was determined in the BM of wild fawns, compared to other deer groups ($p < 0.001$). Moreover, the mean percentage of almost SFAs (except C10:0) was significantly higher in the BM of this group (Table 2). The BM fat of wild fawns, compared to farmed fawns, contained significantly ($p < 0.001$) more C14:0, C16:0, C18:0, and C20:0, while significantly ($p < 0.001$) less MUFA *cis*, including C16:1 $c13$, C18:1 $c9$, C18:1 $c12$, and C20:1 $c13$, as well as less fatty acids from the BCFA group ($p < 0.001$) and MUFA *trans* ($p < 0.001$), including C18:1 $t9$ and C18:1 $t11$ (VA) (Tables 2 and 3). Although no significant differences were found between fawns in partial sums of groups, such as OCFA, PUFA, and TFA, when considering the participation of individual FAs in these groups, the bone marrow of wild fawns contained significantly ($p < 0.003$) more C17:0, Σ C18:2 *trans*, Σ C18:3 *trans*, and such polyunsaturated FAs as C18:2 $n-6$ (LA) and C20:2 $n-6$, as well as almost twice as many C18:3 $n-3$ (ALA) and C18:2 *cis* (Tables 2 and 3). On the other hand, in the BM of farm fawns, more than two times more CLA ($p < 0.001$) and C22:5 $n-3$ DPA ($p < 0.005$) were shown (Table 3). The observed relationships resulted in a significantly ($p < 0.001$) higher level of the sum of $n-3$ and $n-6$ FAs, as well as a more favorable (lower) $n-6/n-3$ ratio in BM of wild fawns (Table 3).

When analyzing the category-related fatty acid profile of wild deer bone marrow (does vs. fawns), a large differentiation was also shown. In such a comparison, significant differences were observed in 21 out of 47 identified FAs. The wild does BM was characterized mainly by a significantly ($p < 0.001$) lower percentage of SFAs (by 12.46 pp), which was a consequence of lower C16:0 and C18:0 proportions (Table 2), as well as a much higher level of MUFA *cis* (by 12.17 pp; $p < 0.001$), especially FAs belonging to this group, such as C16:1 $c9$, C18:1 $c9$, and C18:1 $c11$ (Table 3). Significant differences were also shown in the smaller groups of FAs, such as OCFA and BCFA, because, in the BM of wild fawns, their higher proportions were reported; although, in the total pool of identified FAs, these groups constituted a small percentage, respectively, below 3% and 2% of total FAs (Table 2). Interestingly, no significant differences in total PUFA (including $n-6$ and $n-3$ FAs), MUFA *trans*, and TFA were found between the analyzed groups of free-living deer. Only in individual FAs belonging to these groups were significant differences observed; so, wild fawns BM contained more C20:2 $n-6$ ($p < 0.033$) and C18:1 $t11$ (VA; $p < 0.011$), with less C20:3 $n-3$ ($p < 0.024$), in comparison with the BM of wild does. The high level of SFA in the BM of wild fawns resulted in a significantly ($p < 0.001$) lower proportion of PUFA/SFA (Table 3).

Table 2. Saturated, odd-, and branched-chain fatty acid composition in the bone marrow of red deer fawns and does.

Variable (%)	Farmed Fawns		Wild Fawns		Wild Does		Wild Fawns vs. Farmed Fawns <i>p</i> -Value <i>t</i> ^a / <i>K</i> -S ^b	Wild Fawns vs. Wild Does <i>p</i> -Value <i>t</i> ^a / <i>K</i> -S ^b
	M	SD	M	SD	M	SD		
C10:0	0.06	0.02	0.07	0.02	0.08	0.07	>0.05 ^a	>0.05 ^b
C12:0	tr	-	0.62	0.14	0.11	0.05	-	<0.001 ^a
C14:0	5.18	1.08	5.94	0.64	2.23	0.82	<0.018 ^a	<0.001 ^a
C16:0	15.87	0.78	19.39	0.89	13.62	3.57	<0.001 ^a	<0.001 ^b
C18:0	4.58	0.73	5.58	0.94	3.85	1.08	<0.003 ^a	<0.001 ^a
C20:0	0.12	0.03	0.17	0.03	0.13	0.04	<0.001 ^a	<0.008 ^a
ΣSFA	26.27	1.73	31.76	1.90	19.93	5.39	<0.001 ^a	<0.001 ^b
C15:0	0.90	0.08	0.89	0.08	0.53	0.16	>0.05 ^a	<0.001 ^b
C15:1	0.46	0.05	0.37	0.09	0.36	0.09	<0.05 ^a	>0.05 ^a
C17:0	0.49	0.07	0.57	0.06	0.33	0.08	<0.003 ^a	<0.001 ^a
C17:1 <i>c</i> 7	0.09	0.03	-	-	-	-	-	-
C17:1 <i>c</i> 9	0.73	0.08	0.77	0.07	0.77	0.07	>0.05 ^a	>0.05 ^a
C21:0	0.09	0.02	0.06	0.02	0.11	0.04	>0.05 ^a	<0.001 ^a
OCFA	2.79	0.23	2.65	0.23	2.07	0.36	>0.05 ^a	<0.001 ^a
C13:0 <i>iso</i>	0.13	0.05	0.07	0.01	tr	-	<0.001 ^b	>0.05 ^a
C13:0 <i>anteiso</i>	0.12	0.03	0.11	0.02	tr	-	>0.05 ^a	>0.05 ^a
C14:0 <i>iso</i>	0.14	0.02	0.07	0.02	0.06	0.02	<0.001 ^a	>0.05 ^a
C15:0 <i>iso</i>	0.33	0.06	0.18	0.03	0.16	0.04	<0.001 ^b	>0.05 ^b
C15:0 <i>anteiso</i>	0.52	0.07	0.33	0.07	0.28	0.11	<0.001 ^a	>0.05 ^a
C17:0 <i>iso</i>	0.37	0.05	0.27	0.03	0.23	0.03	<0.001 ^b	<0.001 ^a
C17:0 <i>anteiso</i>	0.49	0.05	0.48	0.07	0.43	0.08	>0.05 ^a	>0.05 ^a
C18:0 <i>iso</i>	0.12	0.03	0.14	0.03	0.19	0.05	>0.05 ^a	<0.025 ^b
ΣBCFA	2.24	0.29	1.65	0.22	1.39	0.25	<0.001 ^a	<0.004 ^a

M—mean, SD—standard deviation, tr—trace: values for peaks < 0.05%, ^a—Student's *t*-test, and ^b—Kolmogorov–Smirnov test.

Regardless of the differences shown in the bone marrow of the analyzed groups of red deer (farm fawns vs. wild fawns vs. wild does), the dominant fraction of monounsaturated fatty acids (MUFA *cis*; approximately 60%), followed by saturated fatty acids (SFA; approximately 25%), polyunsaturated fatty acids (PUFA; approximately 4%), and *trans*-fatty acids (TFA; approximately 4%), were determined. Among the individual identified FA groups, the OCFA and BCFA were the minority (2–3%). Oleic acid (C18:1 *c*9) was the most abundant in deer bone marrow and comprised of more than 34% of total FA and around 60% of total bone lipid MUFA *cis*. Within SFAs, palmitic (C16:0) was the most abundant, showing levels of approximately 64%. With regard to PUFA, linoleic (C18:2 *n*-6; averaging 1.49%), conjugated linoleic (CLA; averaging 1.14%), and α -linolenic acid (ALA, 18:3 *n*-3; averaging 0.97%) were the predominant FAs, with percentages of approximately 86% of the total PUFA of deer bone marrow (Tables 2 and 3).

For a more comprehensive analysis of the results of the animal body weight and bone marrow characteristics, a principal component analysis (PCA) was performed with 18 variables (17 active and 1 additional) and 30 cases. Three principal components (PCs) with eigenvalues exceeding 1 (Kaiser criterion) explained 88.51% of the total variance. PC1, PC2, and PC3 accounted for 45.06%, 33.10%, and 10.35% of the variance, respectively (Table 4).

Figure 1 shows the projection of variables as a two-factor plane (PC1 $\times$ PC2). The first component (PC1) exhibits a very high and positive correlation ($0.710 < r < 0.810$) with eight variables, including fat (%), C16:0, C18:0, SFA, C18:2 *n*-6 LA, C18:3 *n*-3 ALA, *n*-3, and *n*-6 acids, as well as a negative correlation with C18:1 *n*-9 ($r = -0.860$), MUFA *cis* ($r = -0.740$), and FFM (%) ($r = -0.732$) (Table 5). In turn, the second component (PC2) is positively correlated with C14:0 ($r = 0.912$) and negatively correlated with PUFA/SFA ($r = -0.925$),

C18:1 *c*11 ($r = -0.778$), and body weight ($r = -0.722$). The third component (PC3) exhibits only one negative correlation, i.e., with TFA ($r = -0.897$).

Table 3. Unsaturated and *trans* fatty acid composition in the bone marrow of red deer fawns and does.

Variable (%)	Farmed Fawns		Wild Fawns		Wild Does		Wild Fawns vs. Farmed Fawns <i>p</i> -Value ^a /K-S ^b	Wild Fawns Vs. Wild Does <i>p</i> -Value ^a /K-S ^b
	M	SD	M	SD	M	SD		
C14:1 <i>c</i> 9	3.62	0.86	3.15	0.46	2.67	0.95	>0.05 ^a	>0.05 ^b
C16:1 <i>c</i> 11	0.06	0.01	0.06	0.01	0.05	0.01	>0.05 ^a	>0.05 ^a
C16:1 <i>c</i> 13	0.28	0.05	0.18	0.03	0.14	0.04	<0.001 ^a	<0.008 ^a
C16:1 <i>c</i> 7	0.63	0.08	0.57	0.05	0.51	0.03	>0.05 ^b	<0.001 ^a
C16:1 <i>c</i> 9	12.09	2.22	11.35	1.48	14.96	1.71	>0.05 ^a	<0.001 ^a
C18:1 <i>c</i> 9	38.81	1.15	34.98	1.21	37.51	2.48	<0.001 ^a	<0.005 ^b
C18:1 <i>c</i> 11	4.19	0.49	4.46	0.88	10.33	5.66	>0.05 ^b	<0.001 ^b
C18:1 <i>c</i> 12	0.09	0.01	0.14	0.03	0.15	0.04	<0.001 ^a	>0.05 ^a
C18:1 <i>c</i> 13	0.37	0.05	0.42	0.09	0.89	0.42	>0.05 ^a	<0.005 ^b
C20:1 <i>c</i> 9	0.18	0.03	0.24	0.05	0.19	0.05	>0.05 ^a	>0.05 ^a
C20:1 <i>c</i> 11	0.45	0.09	0.46	0.11	0.74	0.32	>0.05 ^a	>0.05 ^b
C20:1 <i>c</i> 13	0.16	0.02	0.12	0.03	0.12	0.02	<0.001 ^a	>0.05 ^a
ΣMUFA <i>cis</i>	60.91	1.92	56.08	2.29	68.25	6.99	<0.001 ^a	<0.001 ^b
C18:2 <i>n</i> -6 LA	1.21	0.22	1.59	0.18	1.66	0.32	<0.001 ^a	>0.05 ^a
C18:2 <i>cis</i>	0.19	0.04	0.36	0.09	0.42	0.04	<0.001 ^b	>0.05 ^a
C18:3 <i>n</i> -3 ALA	0.62	0.12	1.15	0.26	1.14	0.44	<0.001 ^a	>0.05 ^a
CLA	1.73	0.29	0.83	0.21	0.87	0.28	<0.001 ^a	>0.05 ^a
C20:2 <i>n</i> -6	0.09	0.02	0.13	0.02	0.09	0.03	<0.022 ^a	<0.033 ^a
C20:4 <i>n</i> -6 AA	0.09	0.04	0.09	0.04	0.07	0.02	>0.05 ^a	>0.05 ^a
C20:3 <i>n</i> -3	0.07	0.01	0.12	0.03	0.15	0.05	<0.006 ^a	<0.024 ^a
C22:5 <i>n</i> -3 DPA	0.19	0.10	0.06	0.04	0.06	0.01	<0.005 ^b	>0.05 ^a
ΣPUFA	3.94	0.55	4.26	0.46	4.37	0.89	>0.05 ^a	>0.05 ^b
C18:1 <i>t</i> 6/7	0.20	0.02	0.19	0.02	0.17	0.04	>0.05 ^a	>0.05 ^b
C18:1 <i>t</i> 9	0.40	0.07	0.21	0.03	0.21	0.02	<0.001 ^b	>0.05 ^a
C18:1 <i>t</i> 10	0.16	0.02	0.17	0.03	0.21	0.07	>0.05 ^a	>0.05 ^b
C18:1 <i>t</i> 11 VA	1.51	0.30	0.84	0.18	0.65	0.22	<0.001 ^a	<0.011 ^a
C18:1 <i>t</i> 16	0.18	0.02	0.34	0.07	0.32	0.09	<0.001 ^b	>0.05 ^a
ΣMUFA <i>trans</i>	2.45	0.38	1.75	0.22	1.56	0.39	<0.001 ^a	>0.05 ^b
ΣC18:2 <i>trans</i>	1.05	0.20	1.39	0.24	1.85	0.37	<0.001 ^a	<0.001 ^a
ΣC18:3 <i>trans</i>	0.36	0.05	0.45	0.09	0.58	0.03	<0.007 ^a	<0.001 ^a
ΣTFA	3.86	0.49	3.60	0.39	3.99	0.68	>0.05 ^a	>0.05 ^b
PUFA/SFA	0.15	0.03	0.13	0.02	0.23	0.05	>0.05 ^b	<0.001 ^b
<i>n</i> -3	0.71	0.20	1.32	0.30	1.33	0.48	<0.001 ^a	>0.05 ^a
<i>n</i> -6	1.32	0.25	1.74	0.17	1.76	0.34	<0.001 ^a	>0.05 ^a
<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3	1.95	0.45	1.37	0.29	1.39	0.25	<0.001 ^a	>0.05 ^a

M—mean, SD—standard deviation, tr—trace: values for peaks < 0.05%, ^a—Student's *t*-test, and ^b—Kolmogorov–Smirnov test, and C18:2 *cis*—this peak may include several 18:2 *cis* isomers with an unknown position of double bonds.

Additionally, based on the loadings and length of the directional vectors, three apparent groups of parameters can be distinguished (Figure 1). The first group of variables, comprising of SFA, C14:0, C16:0, and C18:0, was distributed in the upper right quadrant (Q1) of the graph, situated in both positive areas of the principal components (PC1 and PC2). The second group included fat (%), C18:3 *n*-3 ALA, *n*-3, *n*-6, C18:2 *n*-6 LA, and PUFAs, which were located in the bottom right quadrant (Q2), as defined by positive PC1 and negative PC2 values. The third group, which comprised of MUFA, PUFA/SFA, C18:1 *c*11,

and body weight, was located in the bottom left quadrant (Q3), as defined by negative values of both principal components (PC1 and PC2).

Table 4. Eigenvalues and the proportion of variation (%), as explained by the principal components.

Component	Eigenvalue	Proportion	Cumulative
1	7.66	45.06	45.06
2	5.63	33.10	78.16
3	1.76	10.35	88.52
4	0.66	3.85	92.37
5	0.39	2.32	94.69
6	0.30	1.74	96.44
7	0.24	1.39	97.83
8	0.15	0.91	98.73
9	0.10	0.61	99.73
10	0.07	0.39	99.89
11	0.03	0.15	99.94
12	0.01	0.05	99.96
13	0.00	0.03	99.97
14	0.00	0.02	99.98
15	0.00	0.01	99.99
16	0.00	0.00	99.99
17	0.00	0.00	100.00

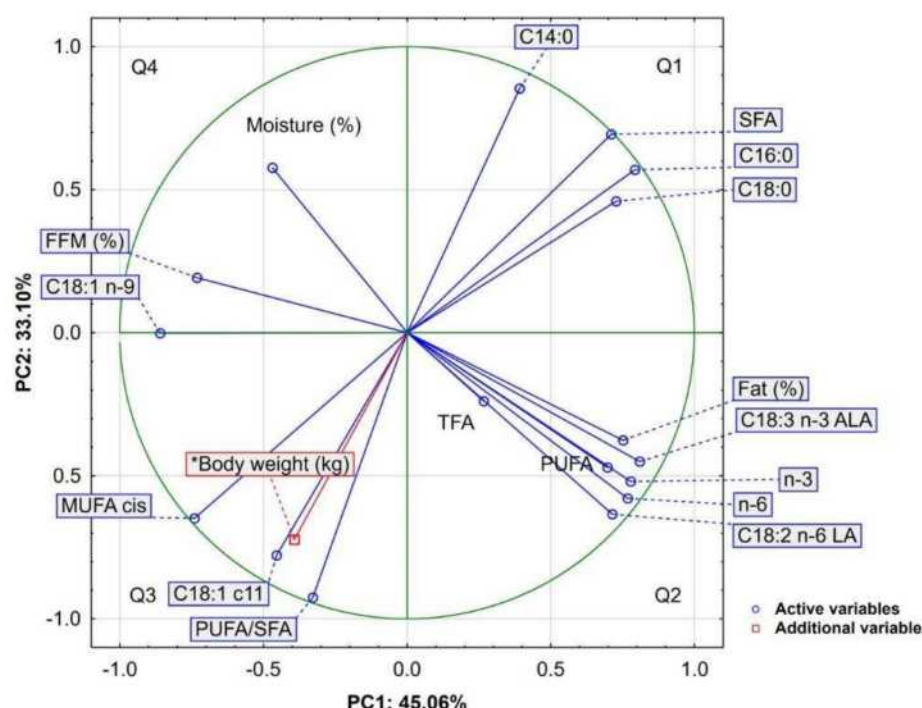


Figure 1. Projection of variables in a two-factor plane (PC1 $\times$ PC2); FFM (%)—fat-free mass content; fat (%)—fat content; TFA—*trans* fatty acids.

Figure 2 shows the projection of cases, depending on the red deer living conditions and animal category (wild fawns vs. farm fawns vs. wild does) in the coordinate system, as defined by PC1 $\times$ PC2. In general, two groups with high spatial clustering can be distinguished. The first group consisted of wild deer fawns' BM, located in the upper right quadrant (Q1), i.e., designated by positive values of PC1 and PC2, and strongly correlated with saturated fatty acids (Figure 1). The second group consisted of farmed fawns' BM,

located in the upper left quadrant (Q4), which is assigned with negative values of PC1 and positive values of PC2, which characterize the moisture and fat-free dry matter percentages (Figure 1). In contrast, samples from the BM of wild does were the most dispersed and mainly located in both bottom quadrants (Q2 and Q3), which are well-correlated with body weight, monounsaturated, and polyunsaturated FAs (Figure 1).

Table 5. Correlations between the principal components and original variables.

Variable	PC1	PC2	PC3
C14:0	0.392	0.854	0.129
C16:0	0.793	0.570	−0.019
C18:0	0.727	0.459	−0.231
C18:1 <i>n</i> -9	−0.860	−0.002	−0.227
C18:1 <i>c</i> 11	−0.454	−0.778	0.205
C18:2 <i>n</i> -6 LA	0.714	−0.635	0.002
C18:3 <i>n</i> -3 ALA	0.810	−0.450	−0.100
SFA	0.710	0.694	−0.004
MUFA <i>cis</i>	−0.740	−0.648	0.145
PUFA	0.698	−0.470	−0.442
TFA	0.266	−0.239	−0.897
<i>n</i> -3	0.779	−0.520	−0.097
<i>n</i> -6	0.768	−0.579	−0.019
PUFA/SFA	−0.329	−0.925	−0.105
Fat (%)	0.752	−0.376	0.474
Moisture (%)	−0.469	0.577	−0.137
FFM (%)	−0.732	0.192	−0.549
Body weight (kg)	−0.393	−0.722	0.011

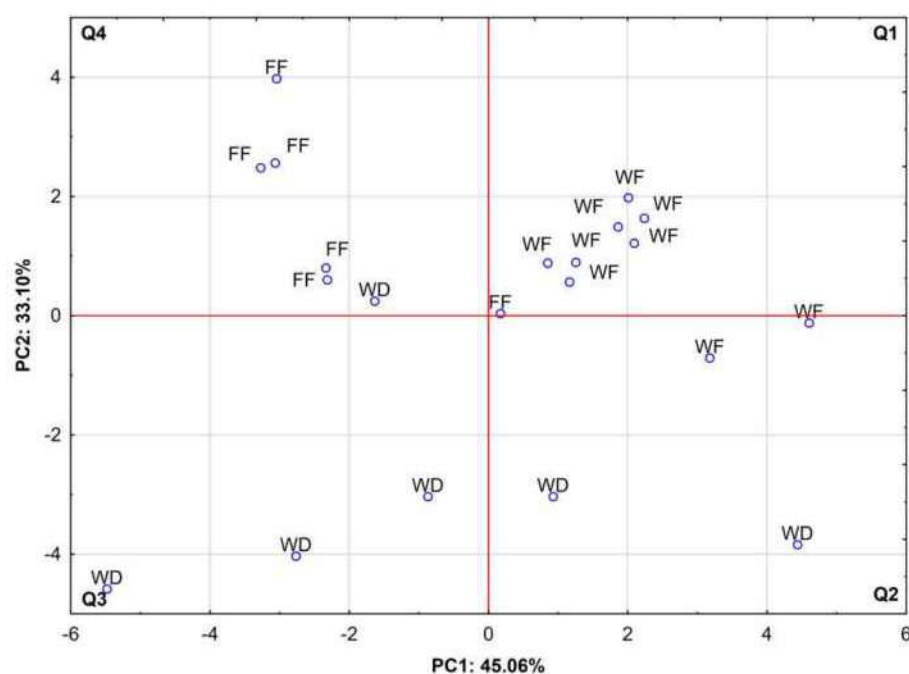


Figure 2. Projection of cases, depending on red deer group, in a two-factor plane (PC1 × PC2); FF—farm fawns; WF—wild fawns; WD—wild does.

The analysis of the distribution of the variables in Figure 1 indicates that, due to its close proximity, body weight is strongly positively correlated with C18:1 *c*11, MUFA *cis*, and PUFA/SFA, but negatively correlated with C14:0, C16:0, C18:0, and SFAs (located on

the opposite side). The perpendicular position, on the other hand, indicates that there is no association between body mass and, e.g., PUFA, TFA, *n*-6, *n*-3, and other elements. All these relationships are confirmed by the correlation coefficients (Pearson or Spearman) calculated for the analyzed variables, which are presented in Table 6.

Table 6. Correlations between the body weight and bone marrow characteristics.

Variable	Correlation Coefficient (^r / ^{rS})	Significance
C14:0	−0.698 ^r	***
C16:0	−0.759 ^r	***
C18:0	−0.581 ^r	***
C18:1 <i>n</i> -9	0.297 ^r	ns
C18:1 <i>c</i> 11	0.601 ^{rS}	*
C18:2 <i>n</i> -6 LA	0.129 ^r	ns
C18:3 <i>n</i> -3 ALA	0.081 ^r	ns
SFA	−0.767 ^r	***
MUFA <i>cis</i>	0.762 ^r	***
PUFA	0.011 ^r	ns
TFA	0.083 ^r	ns
<i>n</i> -3	0.140 ^r	ns
<i>n</i> -6	0.046 ^r	ns
PUFA/SFA	0.400 ^{rS}	*
Fat (%)	−0.122 ^{rS}	ns
Moisture (%)	−0.39 ^{rS}	ns
FFM (%)	0.284 ^{rS}	ns

Correlation coefficient: ^r—Pearson, ^{rS}—Spearman; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns—not significant.

3. Discussion

The study on red deer has shown a large variation in the content of fat, moisture, and fat-free dry matter in the bone marrow of the animals. The lower concentration of fat and higher moisture content were determined in the farmed deer fawns; although, their body weight was higher than that of the wild young animals. Even so, it may indicate malnutrition, as suggested by Ransom [14], Neiland [33], and Thouzeau et al. [13]. However, a high content of fat-free dry matter in the bone marrow in this group of animals is an indication of a higher level of red, rather than yellow, bone marrow, which explains the high moisture content in this tissue, especially considering the fact that the red fraction predominates in animals at an early stage of development; therefore, they are not fully ready for wintering [3]. In addition, despite the diet supplementation, farmed fawns may have unfavorable proportions of fatty acids in the bone marrow (low degree of unsaturation), which may raise the melting point of the fats and impair their fluidity [19]. Therefore, the legs of farmed fawns could be not sufficiently effective in protecting against the cold.

The highest percentage of oleic acid (C18:1 *c*9) was detected in the bone marrow of the farmed animals. However, the bone marrow of farmed and wild fawns exhibited a much higher proportion of SFAs and lower proportion of MUFAs, compared to wild does. A similar relationship was reported by Soppela and Nieminen [20]. As demonstrated by Christie [34], higher proportions of MUFAs in bone marrow lipids, in comparison with PUFAs, are beneficial for cervids because it contributes to the maintenance of adipocyte fluidity at low temperatures. In addition, the reduced PUFA C18 content in the metatarsal bone marrow of the farmed and wild animals was similar or higher than in malnourished reindeer, which implies high mobilization of these fatty acids from the plant diet, as they are not synthesized in the body [35]. This may be related to the farmed red deer fawns' prolonged ingestion of doe's milk, as well as the plant-deficient reindeer diet.

Released PUFAs are probably used to synthesize phospholipids for new cells and may be involved in lymphopoiesis and hematopoiesis into the red parts of the bone marrow [2]. Bone marrow adipocytes may also support the immune system by releasing their PUFAs as precursors of the formation of an extensive membrane and synthesis of eicosanoids [36]. The

utilization of limited amounts of PUFAs as an energy source is less probable in ruminants; although, it has been found to intensify during prolonged malnutrition in adult rats [37].

The mean percentages of myristic (C14:0) and pentadecanoic (C15:0) fatty acids in the bone marrow of farmed and wild red deer fawns and does were two-fold higher than that reported by Soppela and Nieminen [20] for reindeer. Over two-fold lower levels of palmitic acid (C16:0), margaric acid (C17:0), and stearic acid (C18:0) were determined in the bone marrow of the animals from all the study groups, in comparison with the values reported by Soppela and Nieminen [20] for reindeer fawns and does. The mean percentage of linoleic acid (C18:2 *n*-6) was lower in the bone marrow of red deer fawns and similar to does' bone marrow samples, in comparison with the results reported by Soppela and Nieminen [20]. Compared to the results reported by Soppela and Nieminen [20], the percentage of α -linoleic acid (C18:3 *n*-3) was similar in the bone marrow of farmed fawns and two-fold higher in the bone marrow of wild fawns and does. The percentage of arachidonic acid (C20:4 *n*-6) was two-fold higher in the bone marrow of fawns and similar to hinds, in comparison with the results reported for reindeer [20]. The percentages of SFAs in the bone marrow in all deer groups in the present study were substantially lower; however, BCFAs, MUFAs, and PUFAs percentages were considerably higher, in comparison with reindeer. These differences can be due to certain factors, such as the species or age of the animals, as the samples were collected for analyses from 1-month-old reindeer.

The fatty acid composition in the femur bone marrow is dominated by saturated fatty acids (SFAs), whereas MUFAs, especially oleic acid, dominate in the distal parts of the skeleton, e.g., the metatarsus [21,22,36]; this finding was proved in all deer groups in the present study. Sugár and Nagy [36] revealed that, in the metatarsal bone marrow of red deer, the percentages of palmitic and stearic acids decreased to 14% and 4%, respectively, whereas the level of palmitoleic and oleic acids increased to 25% and 56%, respectively. However, the bone marrow of all animals exhibited a similar level of stearic acid. Slightly higher concentrations of palmitic acid were detected in the farmed and wild red deer fawns, and the three animal groups exhibited a similar level of stearic acid. Palmitoleic acid was present in lower amounts in the farmed and wild red deer, while the amount of oleic acid was high, but lower than the values reported by Sugár and Nagy [36].

It has been shown that *trans* FAs in ruminants are produced by the bacterial metabolism of PUFAs in the rumen and are, consequently, present in all fats of these animals, with a maximum content of about 6%. Ruminants produce TFA, which constitutes 4% of the fat in milk [38]. Bacterial desaturation of PUFAs from grasses and vegetables in the rumen produces *trans* double bonds in fatty acid molecules, but with a clear preference for a double bond at position 11 in 18 carbon fatty acids, such as vaccenic acid. Small amounts of *trans* fatty acids from linoleic and linolenic acids, together with *trans* fatty acids with 16, 20, and 22 carbon atoms, are produced in the rumen, as well [39]. The percentage of *trans* fatty acids in the bone marrow of the studied deer ranged between 3.60% and 3.99%.

Conjugated linoleic acid (CLA) isomers have been found in the bone marrow of antelope (1.5%), elk (1.0%), and deer (1.0%) [40]. In the present study, the level of CLA was substantially higher (1.73%) in the bone marrow of farm deer fawns and lower amounts in both groups of wild animals, compared to the aforementioned results. This may be related to the longer period of fawns' milk feeding by does fed a more nutritive diet on the farm. Cordain et al. [40] also reported a PUFA/SFA ratio ranging from 0.24 to 0.33 in lipids from the metatarsal bone marrow in elk, deer, and antelope. In the present study, the cited range of PUFA/SFA ratio was higher, in comparison with the bone marrow of farm and wild fawns, and similar to the level reported for does. Moreover, the PUFA *n*-6/*n*-3 ratio reported by Cordain et al. [40], between 2.24 and 2.88, was higher than the values found in the present study in the bone marrow of all deer groups.

4. Materials and Methods

4.1. Experimental Design

The study was conducted on 21 individuals of red deer, including six farmed and nine wild males, in their first year of life (fawns), as well as six non-pregnant wild does aged 3–6 years old. According to the breeding scheme, the investigated animals were aged between 6 and 7 months, as young stags are usually slaughtered, while does are intended for herd reconstruction. The animals were kept at the Research Station of the Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences, Kosewo Górne (Region of Warmia and Mazury; Poland; N: 53°48'; E: 21°23'). The feeding system included a rotational pasture in plots with an area and density recommended by DEFRA [41], FEDFA [42], and Mattiello [43]. Fawns born in a natural way during the grazing period, lasting from April to November in Poland, were included in the study. Initially, the calves were fed with milk by does; later, they ate the vegetation from the pasture. In winter (from December to March), does were fed *ad libitum* with grass haylage or hay with a moderate nutritional value, concentrated feed, based on compressed oats and protein supplements, in the form of rapeseed and soybean concentrates (Eco-pasz, Poland) and Josera Phosphoreimer multi-ingredient licks (Josera, Poland, Table S1, Supplementary Materials).

The second and third groups of animals comprised of wild individuals living in the area of Strzałowo Forest District, located in the immediate vicinity of the deer farm. The wild red deer individuals were harvested during hunting seasons, in accordance with the applicable Rules of Individual and Population Game Animal Selection in Poland (Polish Journal of Laws, Annex to Resolution no. 57/2005, 22 February 2005).

4.2. Sampling

MP 800 sensors, coupled with a Tru-test DR 3000 weight reader (accuracy: $\pm 1\%$, minimum resolution: 100 g), were used for measurement of the body weight of the farmed animals before slaughter. The weight of the wild red deer was estimated from the carcass weight, which accounts for 67% of the total body weight of red deer [28,44]. The carcass weight was determined in culled and eviscerated animals.

All samples of bones and bone marrow were collected in November 2019. The samples from the farmed animals were collected during routine slaughter, i.e., in the final stage of breeding, after the summer grazing period (between April and October). The wild red deer individuals were harvested during hunting seasons, in accordance with the applicable Rules of Individual and Population Game Animal Selection in Poland (Polish Journal of Laws, Annex to Resolution no. 57/2005, 25 February 2005).

On the day of slaughter, metatarsal bone (*ossa metatarsalia*) was sampled from each animal. The bone was dissected by separating the skin, muscles, and tendons using a stainless-steel knife. Fresh bones were opened using a dental titanium drill, carefully to prevent contamination of the bone marrow, which was collected after removal of the red part and frozen ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$).

4.3. Analysis of Fat, Moisture, and Fat-Free Dry Matter in Bone Marrow

A sample of the bone marrow, with an approximate weight of 1.5 g (accuracy up to 1 mg), was transferred into a preweighed cellulose thimble. The percent moisture loss was calculated in accordance with PN-ISO 1442:2000 [45], with the drying method (103°C), using a universal oven Memmert UF30 (Schwabach, Germany). Next, bone marrow fat was extracted with the Soxhlet lipid extraction procedure, with the use of Büchi-B-811 (Flawil, Switzerland) equipment and n-hexane as a solvent [46]. Finally, the percentage of fat was calculated. The cellulose thimble with the remaining fat-free dry matter was dried at a temperature of approx. $103\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 h and cooled to room temperature in a glass desiccator. Next, the percentage of dry matter was calculated.

4.4. Fatty Acid Analysis in Bone Marrow

The profile of fatty acids (FAs) in the bone marrow was determined following fat extraction, with the method developed by Folch et al. [47]. Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared in the process of transmethylation of 50 mg fat samples with a mixture of concentrated H_2SO_4 (95%) and methanol, in accordance with the AOCS Official Method Ce 2-66 [48]. Gas chromatographic (GC) analyses were performed according to Domaradzki et al. [49], using a Varian CG 3900 (Walnut Creek, USA) gas chromatograph, equipped with a flame ionization detector (FID). The FAMES were separated using a CP 7420 capillary column with 100 m length, 0.25 mm inner diameter, and 0.25 μm film thickness (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The analysis was performed at increasing temperature values. The following temperature program was used: 50 °C for 1 min, 30 °C/min up to 120 °C, 2 °C/min up to 160 °C, 30 min holding, 1 °C/min up to 200 °C, 5 °C/min up to 250 °C, 1 min holding time. The temperatures of the injector and detector were 260 °C and 270 °C, respectively. The carrier gas (hydrogen) flow rate was 2 mL/min, the volume of the injected samples was 1 μL , and the split ratio was 1:50. The FAMES were identified and quantified based on retention times corresponding to reference mixtures (Supelco 37 Component FAME Mix CRM 47885 Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA; CLA methyl ester O5632—Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; branched-chain FAME mixture BR2, BR3, BR4—Larodan AB Solna, Sweden). Star GC Workstation Version 5.5. software was used (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA). The fatty acid composition was expressed as a percentage of total FAs. The analyses were performed in duplicate.

The numerical symbols of the identified FAs contained the number of carbon atoms in the FA chain (before the colon), number of double bonds (after the colon), and double bond geometry (*cis* or *trans*). The notation “n” was used for FAs belonging to the *n*-3, *n*-6, and *n*-9 families, where the *n*-number indicates the position of the first double bond, counted from the methyl terminal end of the carbon chain. The ratios and indices of the following groups of fatty acids were calculated: SFA—saturated FAs, even-numbered; OCFA—odd-chain FAs; BCFA—branched-chain FAs; MUFA *cis*—monounsaturated FAs, even-numbered; PUFA—polyunsaturated FAs; *n*-3 and *n*-6 FAs; TFA—*trans* FAs: sum of MUFA *trans*, $\Sigma 18:2$ *trans*, and $\Sigma \text{C}18:3$ *trans*; ΣCLA —conjugated linoleic acid: sum of 18:2 *c9,t11* and 18:2 *t9,c11*; $\Sigma \text{C}18:2$ *trans*—sum of non-conjugated 18:2 *t,c/c,t/t,t* isomers; $\Sigma \text{C}18:3$ *trans*—sum of 18:3 *trans* isomers with an unknown position of double bonds, as well as the PUFA/SFA and *n*-6/*n*-3 ratios.

4.5. Statistical Analysis

The statistical analyses were performed in Statistica ver. 13 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). The statistical differences in the individual variables between two groups of red deer (farmed fawns vs. wild fawns or wild fawns vs. wild does) were analyzed depending on the results of the Shapiro-Wilk test of normality. Normally distributed variables were tested using the unpaired Student's *t*-test (for two independent groups); otherwise, the Kolmogorov-Smirnov test was applied. The results were expressed as the mean value and standard deviation of the variables. The principal component analysis (PCA) was further applied to visualize data and demonstrate the relationships between variables characterizing the fatty acid profile and composition of the bone marrow of different red deer groups. Moreover, depending on the nature of the variable distribution (normal or non-normal), the relationships between the body mass and bone marrow characteristics were assessed using the Pearson correlation coefficient (*r*) or Spearman rank correlation coefficient (*r*_S), respectively. All relationships were evaluated at a significance level at $p < 0.05$.

5. Conclusions

The diet used on the farm could impact the fatty acid composition in young deer bone marrow. However, it does not contribute to a more favorable composition of fatty acids in the bone marrow of fawns' legs; therefore, these animals seem less well-prepared for the

first winter of their lives than wild fawns. The fatty acid composition of wild red deer bone marrow was more favorable in the adult animals than in the 6-month-old fawns. Therefore, they are less efficiently protected from the cold than adult deer. Additionally, the increase in the body weight of the animals increased the levels of unsaturated fatty acids, at the expense of saturated fatty acids.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27082511/s1>, Table S1: Composition of Josera Phosphoreimer multi-ingredient licks (Josera, Poland).

Author Contributions: Conceptualization: Ż.S.-B., and K.T.; methodology: Ż.S.-B., P.D., M.F., and K.T.; formal analysis: M.F., and K.T.; investigation: Ż.S.-B., and P.D.; statistical analysis: M.F.; writing—original draft preparation: Ż.S.-B., K.T., M.F., and P.D.; writing—review and editing: K.T., and P.D.; supervision: K.T., and M.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the article and Supplementary Material.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds bone marrow are available from the authors.

References

1. Silberstein, L.; Anastasi, J. *Hematology: Basic Principles and Practice*, 7th ed.; Hoffman, R., Benz, E., Heslop, H., Weitz, J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; p. 6228.
2. Dorshkind, K. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Ann. Rev. Immunol.* **1990**, *8*, 111–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Tajchman, K.; Ukalska-Jaruga, A.; Bogdaszewski, M.; Pecio, M.; Dziki-Michalska, K. Accumulation of toxic elements in bone and bone marrow of deer living in various ecosystems. A case study of farmed and wild-living deer. *Animals* **2020**, *10*, 2151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Leat, W.M.F. Fatty acid composition of the plasma lipids of newborn and maternal ruminants. *Biochem. J.* **1966**, *98*, 598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Scott, T.W.; Setchell, B.P.; Bassett, J. Characterization and metabolism of ovine foetal lipids. *Biochem. J.* **1967**, *104*, 1040. [[CrossRef](#)]
6. Noble, R.C.; Steele, W.; Moore, J. The metabolism of linoleic acid by the young lamb. *Br. J. Nutr.* **1971**, *26*, 97. [[CrossRef](#)]
7. Payne, E. Fatty acid composition of tissue phospholipids of the foetal calf and neonatal lamb, deer calf and piglet as compared with the cow, sheep, deer and pig. *Br. J. Nutr.* **1978**, *39*, 53. [[CrossRef](#)]
8. Janiszewski, P.; Dmuchowski, B.; Gugolek, A.; Żelobowski, R. Body weight characteristics of farm-raised fallow deer (*Dama dama* L.) over the winter period. *J. Cent. Eur. Agric.* **2008**, *9*, 337–342.
9. Bartoš, L.; Vaňková, D.; Hyánek, J.; Šiler, J. Impact of allosucking on growth of farmed red deer calves (*Cervus elaphus*). *Anim. Sci.* **2016**, *72*, 493–500. [[CrossRef](#)]
10. Dzieciołowski, R.; Babińska-Werka, J.; Wasilewski, M.; Goszczyński, J. Physical condition of red deer in a high density population. *Acta Theriol.* **1996**, *41*, 93–105. [[CrossRef](#)]
11. Turbil, C.; Ruf, T.; Mang, T.; Arnold, W. Regulation of heart rate and rumen temperature in red deer: Effects of season and food intake. *J. Exp. Biol.* **2011**, *214* Pt 6, 963–970. [[CrossRef](#)]
12. Arnold, W.; Ruf, T.; Reimoser, S.; Tataruch, F.; Ondersheka, K.; Schober, F. Nocturnal hypometabolism as an overwintering strategy of red deer (*Cervus elaphus*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2004**, *286*, R174–R181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Thouzeau, C.; Massemin, S.; Handrich, Y. Bone marrow fat mobilization in relation to lipid and protein catabolism during prolonged fasting in barn owls. *J. Comp. Physiol. B* **1997**, *167*, 17–24. [[CrossRef](#)]
14. Ransom, A.B. Kidney and marrow fat as indicators of white-tailed deer condition. *J. Wildl. Manag.* **1965**, *29*, 397–398. [[CrossRef](#)]
15. Nieminen, M.; Laitinen, M. Bone marrow and kidney fats as indicators of condition in reindeer. *Rangifer* **1986**, *1*, 219–226. [[CrossRef](#)]
16. Davis, J.L.; Valkenburg, P.; Reed, D.J. Correlations and depletion patterns of marrow fat in caribou bones. *J. Wildl. Manag.* **1987**, *51*, 865–873. [[CrossRef](#)]

17. Wolkers, J.; Wensing, T.; Schonewille, J.T.; van't Klooster, A.T. Undernutrition in relation to changed tissue composition in wild boar *Sus Scrofa*. *Comp. Biochem. Physiol.* **1994**, *108A*, 623–628. [CrossRef]
18. Jackson, C.M. *The Effects of Inanition and Malnutrition upon Growth and Structure*; Blakison's, Son & Co.: Philadelphia, PA, USA, 1998; p. 616.
19. Nieminen, M.; Soppela, P. Nutritional status and fatty acid composition of bone marrow in semi-domesticated reindeer. *Rangifer* **1990**, *4*, 57–58. [CrossRef]
20. Soppela, P.; Nieminen, M. The effect of wintertime undernutrition on the fatty acid composition of leg bone marrow fats in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus* L.). *Comp. Biochem. Physiol. B* **2001**, *128*, 63–72. [CrossRef]
21. Meng, M.; West, G.; Irving, L. Fatty acid composition of caribou bone marrow. *Comp. Biochem. Physiol.* **1969**, *30*, 187–191. [CrossRef]
22. Pond, C.M.; Mattacks, C.A.; Colby, R.H.; Tyler, N.J.C. The anatomy, chemical composition and maximum glycolytic capacity of adipose tissue in wild Svalbard reindeer *Rangifer tarandus platyrhynchus*. in winter. *J. Zool. Lond.* **1993**, *229*, 17–40. [CrossRef]
23. Irving, L.; Schmidt-Nielsen, K.; Abrahamson, N.S.B. On the melting points of animal fats in cold climates. *Physiol. Zool.* **1957**, *30*, 93–105. [CrossRef]
24. Turner, J.C. Adaptive strategies of selective fatty acid deposition in the bone marrow of desert bighorn sheep. *Comp. Biochem. Physiol.* **1979**, *62A*, 599–604. [CrossRef]
25. Irving, L. *Arctic Life of Birds and Mammals Including Man*; Springer: New York, NY, USA, 1972; p. 191.
26. Gavino, V.C.; Gavino, G.R. Adipose hormone-sensitive lipase preferentially releases polyunsaturated fatty acids from triglycerides. *Lipids* **1992**, *27*, 950–954. [CrossRef] [PubMed]
27. Raclot, T.; Mioskowski, E.; Bach, A.C.; Groscolas, R. Selectivity of fatty acid mobilization: A general metabolic feature of adipose tissue. *Am. J. Physiol.* **1995**, *269*, R1060–R1067. [CrossRef]
28. Nagy, J.; Szabó, A.; Donkó, T.; Bokor, J.; Romvári, R.; Repa, I.; Horn, P.; Fébel, H. Body composition and venison quality of farmed red deer (*Cervus elaphus*) hinds reared on grass, *papilionaceous* or mixed pasture paddocks. *Arch. Anim. Breed.* **2019**, *62*, 227–239. [CrossRef] [PubMed]
29. Razmaite, V.; Pileckas, V.; Siukscius, A.; Juskiene, V. Fatty Acid Composition of Meta and Edible Offal from Free-Living Red Deer (*Cervus elaphus*). *Foods* **2020**, *9*, 923. [CrossRef] [PubMed]
30. Hoz, L.; Lopez-Bote, C.J.; Cambero, M.I.; D'Arrigo, M.; Pin, C.; Ordonez, J.A. Effect of dietary linseed oil and α -tocopherol on pork tenderloin (*Psoas major*) muscle. *Meat Sci.* **2003**, *65*, 1039–1044. [CrossRef]
31. Nguyen, L.Q.; Everts, H.; Beynen, A.C. Influence of dietary linseed, fish and coconut oil on growth performance of growing pigs kept on small holdings in central Vietnam. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* **2004**, *88*, 204–210. [CrossRef]
32. Razmaite, V.; Pileckas, V. Fatty acid composition in maternal and foetal muscle tissues of beaver (*Castor fiber*). *Biologia* **2019**, *74*, 97–101. [CrossRef]
33. Neiland, K.A. Weight of dried marrows as indicator of fat in caribou femurs. *J. Wild. Manag.* **1970**, *34*, 904–907. [CrossRef]
34. Christie, W.W. The composition, structure and function of lipids in the tissues of ruminant animals. In *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*; Christie, W.W., Ed.; Pergamon Press: Oxford, UK, 1981; pp. 95–191.
35. Bruckner, G. Biological effects of polyunsaturated fatty acids. In *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*; Chow, C.K., Ed.; Marcel Dekker: New York, NY, USA, 1992; pp. 631–646.
36. Sugár, L.; Nagy, I. Fatty Acid Composition in the Bone Marrow Fats of Cervidae. In *The Biology of Deer*; Brown, R.D., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 1992. [CrossRef]
37. Pond, C.M. Physiological specialisation of adipose tissue. *Prog. Lipid Res.* **1999**, *38*, 225–248. [CrossRef]
38. Ferlay, A.; Bernard, L.; Meynadier, A.; Malpuech-Brugere, C. Production of trans and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health: A review. *Biochimie* **2017**, *141*, 107–120. [CrossRef] [PubMed]
39. Stender, S.; Astrup, A.; Dyerberg, J. Ruminant and industrially produced trans fatty acids: Health aspects. *Food Nutr. Res.* **2008**, *52*, 1651. [CrossRef] [PubMed]
40. Cordain, L.; Watkins, B.A.; Florant, G.L.; Kelher, M.; Rogers, L.; Li, Y. Fatty acid analysis of wild ruminant tissues: Evolutionary implications for reducing diet-related chronic disease. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2002**, *56*, 181–191. [CrossRef] [PubMed]
41. DEFRA Code of Recommendations for the Welfare of Farmed Deer. 2022. Available online: <http://www.defra.gov.uk/animalh/welfare/farmed/othersps/deer/pb0055/deercode.htm>. (accessed on 20 February 2022).
42. FEDFA Federation of European Deer Farmers Associations. 2022. Available online: <https://www.fedfa.com/> (accessed on 20 February 2022).
43. Mattiello, S. Welfare issues of modern deer farming. *Ital. J. Anim. Sci.* **2009**, *8*, 205–217. [CrossRef]
44. Janiszewski, P.; Kolasa, S. Zoometric Characteristics of Red Deer (*Cervus elaphus* L.) Stags from Northern Poland. *Balt. For.* **2006**, *12*, 122–127.
45. PN-ISO 1442; Meat and meat products—Determination of moisture content (reference method). International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2000.
46. PN-ISO 1444; Meat and meat products—Determination of free fat content. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2000.
47. Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509. [CrossRef]

48. AOCS Official Method Ce 2–66. *Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids*; American Oil Chemists' Society: Champaign, IL, USA, 2000.
49. Domaradzki, P.; Florek, M.; Skąlecki, P.; Litwińczuk, A.; Kędzierska-Matysek, M.; Wolanciuk, A.; Tajchman, K. Fatty acid composition, cholesterol content and lipid oxidation indices of intramuscular fat from skeletal muscles of beaver (*Castor fiber* L.). *Meat Sci.* **2019**, *150*, 131–140. [[CrossRef](#)]

Supplementary Materials

Composition of Fatty Acids in Bone Marrow of Red Deer from Various Ecosystems and Different Categories

Żaneta Steiner-Bogdaszewska ¹, Katarzyna Tajchman ^{2,*}, Piotr Domaradzki ^{3,*} and Mariusz Florek ³

¹ Institute of Parasitology of the Polish Academy of Sciences, Research Station in Kosewo Górne, 11-700 Mragowo, Poland; kosewopan@kosewopan.pl (Z.S-B.)

² Department of Animal Ethology and Wildlife Management, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

³ Department of Quality Assessment and Processing of Animal Products, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland; mariusz.florek@up.lublin.pl (M.F.)

* Correspondence: katarzyna.tajchman@up.lublin.pl (K.T); piotr.domaradzki@up.lublin.pl (P.D.)

Table S1. Composition of Josera Phosphoreimer multi-ingredient licks (Josera, Poland).

Components		Content (per 1 kg)
Ca	%	5.00
P	%	10.00
Na	%	7.00
Mg	%	7.50
Ca / P		0.5:1
Vitamin A	j.m.	650 000.00
Vitamin D3	j.m.	120 000.00
Vitamin E	mg	1 500.00
Zn (as zinc oxide)	mg	8 000.00
Mn (as manganese chelate of glycine hydrate)	mg	4 000.00
Mn (as manganese (II) oxide)	mg	4 000.00
Cu (as copper sulphate pentahydrate)	mg	1 200.00
I	mg	100.00
Co	mg	22.00
Se (as sodium selenite)	mg	40.00

Article

Composition and Fatty Acid Profile of Bone Marrow in Farmed Fallow Deer (*Dama dama*) Depending on Diet

Żaneta Steiner-Bogdaszewska ¹, Katarzyna Tajchman ^{2,*} , Piotr Domaradzki ³  and Mariusz Florek ^{3,*} 

¹ Institute of Parasitology of the Polish Academy of Sciences, Research Station in Kosewo Górne, 11-700 Mragowo, Poland; kosewopan@kosewopan.pl

² Department of Animal Ethology and Wildlife Management, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

³ Department of Quality Assessment and Processing of Animal Products, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland; piotr.domaradzki@up.lublin.pl

* Correspondence: katarzyna.tajchman@up.lublin.pl (K.T.); mariusz.florek@up.lublin.pl (M.F.)

Simple Summary: The bone marrow is regarded as an indicator of the health status in ungulates, because it is not only a source of fat but also it contains minerals, vitamins, and fatty acids. These substances affect the functioning of the organism, especially in unfavorable conditions such as winter. However, the relevant concentrations of fatty acids for healthy deer bone marrow are not known; their contents can be modified by various nutrition, although for ruminants there are some limitations. Unfortunately, studies on the composition of bone marrow fatty acids or their changes are scarce, especially in relation to the youngest deer. Therefore, the aim of the study was to analyze the fatty acid composition of the bone marrow of farmed fallow deer fawns after the pasture period and the winter feeding. The results obtained in the study indicate that, notwithstanding inclement weather conditions in winter, providing the animals with appropriate housing conditions on the farm as well as their optimal feeding resulted in better condition and nutritional status of the animals, which is indicated by a more favourable composition and profile of fatty acids in bone marrow, compared to the optimal summer grazing period for ruminants.

Abstract: There are few studies on the composition of fatty acids and how they change the bone marrow fat of young animals depending on nutrition. Therefore, the proximate and fatty acid composition of metatarsal bone marrow from fawns of farm fallow deer after a summer of grazing and the winter feeding was compared. Due to the size and nature of the data, parametric or nonparametric tests were used. Fatty acid composition was determined by gas chromatographic analysis. After the winter feeding, bone marrow contained more fat (83.11% vs. 75.09%, $p < 0.05$) and less fat free dry matter (5.61% vs. 13.76%, $p < 0.05$) compared to the pasture period. Moreover, there was a significantly higher amount of saturated fatty acids (23.34% vs. 21.60%, $p < 0.001$), more *trans* fatty acids (2.99% vs. 2.34%, $p < 0.005$), and conjugated linoleic acid isomers (1.04% vs. 0.83%, $p < 0.01$), compared to post winter feeding, which in turn contained significantly more total *cis*-monounsaturated fatty acids (54.65% vs. 58.90%, $p < 0.001$). The percentage of polyunsaturated fatty acids (including *n*-3 and *n*-6) was not affected by feeding season. In conclusion, it was shown that young male farm fallow deer were better nourished after the winter period, during which they were kept in properly prepared rooms and fed fodder prepared by people.

Keywords: *Dama dama*; bone marrow; fatty acid; pasture period; winter nutrition



Citation: Steiner-Bogdaszewska, Ż.; Tajchman, K.; Domaradzki, P.; Florek, M. Composition and Fatty Acid Profile of Bone Marrow in Farmed Fallow Deer (*Dama dama*) Depending on Diet. *Animals* **2022**, *12*, 941. <https://doi.org/10.3390/ani12080941>

Academic Editor: Agostino Sevi

Received: 6 March 2022

Accepted: 4 April 2022

Published: 7 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Deer have a unique biology linked to their characteristic feature: the antler. As with many other secondary sexual traits of males, antler size strongly depends on external factors, particularly nutrition. Cervids are a group of mammals with relatively high nutritional

needs due to the important demands of their life strategies [1–3]. When assessing the body condition of deer, it is recommended that the percentage of fat in the bone marrow be determined, and most studies follow this suggestion [4]. However, the marrow of young animals is not only a source of fat but also a site of various concentrations of minerals, vitamins and fatty acids that affect the functioning of the young animal, especially during unfavourable periods [5]. In bone marrow, cells are multiplied and circulated through the bloodstream for growth and remodelling [6]. The optimal concentrations of fatty acids and other compounds for healthy deer bone marrow are not known; however, it seems probable that it is beneficial to have sufficient concentrations to move around efficiently and maintain an adequate supply of backup tissue for winter [7,8]. Animals take up nutrients and structural components from the gastrointestinal tract transported by the circulatory system according to their needs and can alter absorption efficiency to meet changing requirements [9]. Young animals have been shown to absorb more Ca^{+2} , for example, compared to mature ones [10]. Quantitatively, the development and maintenance of the skeletal system is the most important function of minerals, and their accumulation in the skeletal tissue is interdependent: one element will not accumulate without the other, and a synergy exists among certain vitamins (especially the fat-soluble vitamin A and D) and fatty acids (especially the necessary unsaturated fatty acids) [11,12].

The fatty acid (FA) content can be modified by various nutritional additives, and this issue has been relatively well investigated in livestock. The composition of FAs of animal products (meat, milk, and eggs) reflects both the tissue biosynthesis of fatty acids and the fatty-acid profile of lipids supplied with nutrition [13–16]. This relationship has been shown to be stronger in monogastric animals than in ruminants, where dietary fatty acids are hydrogenated in the rumen [17,18]. For these reasons, in monogastric animals, PUFAs are usually present in adipose tissue in large amounts [19]. This group of acids is probably mobilized from a plant-based diet, as they cannot be synthesized in the body [20]. It has also been shown that the trans fatty acids present in the lipids of all ruminants are the result of the bacterial metabolism of PUFAs in their rumen. The natural content of these acids in ruminant fat generally does not exceed 6% [21].

Bone marrow fat content has long been associated with the physiological condition of animals [22–25]. Selective deposition of unsaturated fatty acids in the bone marrow may facilitate the mobilization of these fatty acids at low temperatures. It has been shown that mainly long-chain and unsaturated fatty acids are released from adipose tissue during lipolysis [26,27].

Many researchers regard bone marrow as an indicator of the health status in ungulates, as it is the last adipose tissue to be mobilized during starvation periods [23,28–30]. Unfortunately, studies on the composition of bone marrow fatty acids or their changes are scarce, especially in relation to the youngest animals and their nutritional status. It is important for fawns to reach an appropriate body weight before winter as the condition of their bodies before adulthood affects their survival not only over the following few months but also in subsequent years [31–33]. However, achievement of sufficient body weight does not necessarily reflect a favourable fatty acid composition in the bone marrow, as demonstrated in our study on red deer [34]. In neonatal and suckling animals, a large part of the marrow is occupied by its red component where hematopoietic cells are formed. Prenatal, neonatal, and juvenile ruminants are characterized by low levels of linoleic and linolenic acid in tissue lipids [35–37]. On this basis, it has been suggested that the youngest animals may be on the verge of essential fatty acid deficiency [38]. Moreover, the link between diet and body condition is highly relevant for managing large herbivores, especially in fenced ecosystems with limited resources [39].

Information on the nutritional management of cervids is still limited, meaning that production is still not optimized for these species, which means that investment strategies cannot be studied under perfect nutritional conditions [40,41]. Therefore, the aim of the study was to analyse the fatty-acid composition of the bone marrow of farmed fallow deer fawns after the pasture period and after the winter feeding.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Design

The studies were carried out on 13 male farmed fallow deer (*Dama dama*) in the first year of life; i.e., six 6–7-month-old animals after the grazing period (November) and seven 11–12-month-old male after the winter period (April). Young stags are usually culled in the breeding process, while hinds are intended for reconstruction of the herd. The animals were reared at the Research Station of the Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences (Region of Warmia and Mazury; Kosewo Górne, Poland; N: 53°48'; E: 21°23'), under constant observation and emergency veterinary care. The breeding system was based on rotational pasture. The area and density of the plots were consistent with the recommendations proposed by Department for Environment Food and Rural Affairs (DEFRA) [42], Federation of European Deer Farmers Associations (FEDFA) [43], and Mattiello [44]. The study involved fawns born in a natural way during the grazing period, which lasts from April to November in Poland. At the beginning of their lives, they were fed with milk by the doe, and later they ate the vegetation available on the pasture. In the winter period (from December to March), the animals were fed ad libitum with grass haylage or hay with a moderate nutritional value. Each animal ingested on average 260 g d^{−1} of a mixture comprising 70% crushed oats, 15% rapeseed concentrate (containing 33% crude protein; Eko-pasz, Mońki, Poland), and 15% of soybean concentrate (with 45% crude protein content; Eko-pasz, Mońki, Poland) and Josera Phosphoreimer multi-ingredient licks (Josera, Nowy Tomyśl, Poland).

2.2. Sampling

The body weight of the farmed animals was measured before slaughter using MP 800 sensors coupled with a Tru-test DR 3000 weight reader (accuracy: ±1%, minimum resolution: 100 g). The weight of the fallow deer was estimated from the carcass weight, which accounts for 67% of the body weight of these animals [45]. The carcass weight was determined after culling and evisceration of the animals.

Bones and bone marrow were sampled in November 2019 and in April 2020. The samples were collected from the farmed animals during routine slaughter, which is the final stage of breeding. On the day of slaughter, metatarsal bone (*ossa metatarsalia*) samples were collected from each animal. The metatarsal bone was dissected by separating the skin, muscles, and tendons with a stainless-steel knife. Fresh bones were opened with a dental titanium drill carefully to avoid contamination of the bone marrow, which was collected after the removal of the red part and frozen (−20 °C).

2.3. Determination of Fat, Moisture, and Fat-Free Dry Mass in Bone Marrow

A bone marrow sample weighing approximately 1.5 g (accuracy up to 1 mg) was placed in a preweighed cellulose thimble. The percent moisture loss was determined according to PN-ISO 1442:2000 [46] with the drying method (103 °C) using a universal oven Memmert UF30 (Schwabach, Germany). The bone marrow fat was extracted with the Soxhlet lipid extraction method using Büchi-B-811 (Flawil, Switzerland) equipment and n-hexane as a solvent according to PN-ISO 1444:2000 [47], and finally the percentage of fat was calculated. The cellulose thimble with the remaining fat-free dry matter was dried at approximately 103 °C for 1 h and then cooled to room temperature in a glass desiccator; next, the percentage of dry matter was calculated.

2.4. Fatty Acid Analysis in Bone Marrow

The fatty acid (FA) profile in the bone marrow was determined after fat extraction according to the method proposed by Folch et al. [48] method. FA methyl esters (FAMES) were prepared via transmethylation of the fat samples (50 mg) using a mixture of concentrated H₂SO₄ (95%) and methanol according to the AOCS Official Method Ce 2-66 [49]. Gas chromatographic (GC) analyses were performed according to Domaradzki et al. [50] using a Varian CG 3900 (Walnut Creek, CA, USA) gas chromatograph with a flame ionization detec-

tor (FID). The FAMES were separated in a CP 7420 capillary column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA; 100 m in length, inner diameter 0.25 mm, film thickness 0.25 μ m). The analysis was carried out in increasing temperature conditions. The temperature program was as follows: 50 °C for 1 min, 30 °C/min up to 120 °C, 2 °C/min up to 160 °C, 30 min holding, 1 °C/min up to 200 °C, 5 °C/min up to 250 °C, and 1 min holding time. The temperature of the injector and the detector was 260 °C and 270 °C, respectively; the carrier gas (hydrogen) had a flow rate of 2 mL/min, the volume of the injected samples was 1 μ L, and the split ratio was 1:50. The identification and quantification of FAMES were based on retention times corresponding to reference mixtures (Supelco 37 Component FAME Mix CRM 47885 Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA; CLA methyl ester O5632—Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Branched Chain FAME Mixture BR2, BR3, BR4—Larodan AB Solna, Sweden). Star GC Workstation v5.5. software (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA) was used. The fatty acid composition was expressed as a percentage of total identified FAs. The analyses were carried out in duplicate.

The FAs were recorded using numerical symbols containing the number of carbon atoms in the FA chain (the number before the colon), the number of double bonds (the number after the colon), and the double bond geometry (*cis* or *trans*). The notation “*n*” was used for FAs representing the *n*-3, *n*-6, and *n*-9 family, where the *n*-number indicates the position of the first double bond counted from the methyl terminal end of the carbon chain. The following groups of fatty acids were identified and their ratios and indices were calculated: SFA—saturated FAs, even-numbered; OCFA—odd-chain FAs; BCFA—branched-chain FAs; MUFA *cis*—monounsaturated FAs, even-numbered; PUFA—polyunsaturated FAs; *n*-3 and *n*-6 FAs; TFA—*trans* FAs: sum of MUFA *trans*, Σ 18:2 *trans* and Σ C18:3 *trans*; Σ CLA—conjugated linoleic acid: sum of 18:2 *c9,t11*, 18:2 *t9,c11*; Σ C18:2 *trans*—sum of non-conjugated 18:2 *t,c*/ *c,t*/ *t,t* isomers; Σ C18:3 *trans*—sum of 18:3 *trans* isomers with an unknown position of double bonds, and the PUFA/SFA, MUFA/SFA, and *n*-6/*n*-3 ratios.

2.5. Statistical Analysis

The statistical analyses were performed in Statistica v13 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). The statistical differences in the individual variables between the fallow deer groups were analysed depending on the results of the Shapiro–Wilk test of normality. Variables normally distributed were tested using the unpaired Student’s *t*-test (for two independent groups), otherwise the Kolmogorov–Smirnov test was applied. The results were expressed as the mean value and standard deviation of the variables. A principal component analysis (PCA) was further applied to visualize data and demonstrate the relationships between variables characterizing the fatty acid profile and composition in the bone marrow and the fallow deer diet.

3. Results

The mean marrow concentrations of fat, moisture, fat-free dry matter, and fatty acids were compared between feeding seasons (Table 1). Clearly, the body weight of the animals differed significantly ($p < 0.001$), which was related to different ages (autumn, 6–7 months; spring, 11–12 months) (Table 1). Significant differences were also found in the content of fat (F) and fat-free dry matter (FFM) ($p < 0.05$), depending on the season. The higher mean fat content was determined after the winter nutrition period (April) rather than after the pasture period (November). An opposite relationship was revealed in the FFM levels, which was higher in the bone marrow after the pasture period (Table 1).

The gas chromatography analysis (GC–FID) allowed for the effective separation and identification of 47 FAs in the bone marrow fat (BMF), taking into account their configuration. Trace amounts of the following fatty-acid methyl esters (FAMES) were detected: C10:0, C12:0, C13:0, C20:0, C21:0, C16:1 *c11*, C17:1 *c7*, C20:1 *c13*, C20:2 *n*-6, C20:5 *n*-3 EPA, and C22:4 *n*-6; moreover, in the case of the next 22 FAs, their unit share did not exceed 1%. Hence, Table 2 presents 14 selected FAs, the proportion of which in the bone marrow samples was not less than 1%.

Table 1. Body weight, composition, and fatty acid percentages of bone marrow of fallow deer, depending on diet.

Variable	Pasture		Indoor		Statistics	
	M	SD	M	SD	<i>p</i> -Value	Test
Body weight (kg)	32.17	3.10	41.57	4.31	0.001	t
Bone marrow composition (%)						
Fat	75.09	6.60	83.11	5.32	0.034	t
Moisture	11.15	1.53	11.24	1.45	0.914	t
FFM	13.76	6.48	5.61	3.69	0.016	t
Fatty acid percentage (%)						
C14:0	2.59	0.34	2.68	0.37	0.637	t
C16:0	17.44	0.58	15.95	0.53	<0.001	t
C18:0	3.18	0.32	2.80	0.26	0.039	K-S
ΣSFA	23.34	0.87	21.60	0.61	0.001	t
C15:0	1.06	0.07	0.98	0.09	0.140	t
ΣOCFA	11.42	1.80	10.03	0.61	0.079	t
C18:0 _{iso}	1.33	0.23	1.32	0.21	0.938	t
ΣBCFA	3.70	0.39	3.48	0.18	>0.100	K-S
C14:1 <i>c</i> 9	1.72	0.18	1.96	0.27	0.101	t
C15:1	8.14	1.70	6.67	0.51	0.052	t
C16:1 <i>c</i> 9	11.84	0.80	13.26	0.89	0.012	t
C17:1 <i>c</i> 9	1.45	0.10	1.61	0.10	0.020	t
C18:1 <i>n</i> -9	37.74	1.67	39.14	0.76	0.070	t
C18:1 _{c11}	1.77	0.12	2.75	0.26	<0.001	t
ΣMUFA <i>cis</i>	54.65	1.33	58.90	0.95	<0.001	t
C18:2 <i>n</i> -6 LA	1.44	0.11	1.46	0.09	0.776	t
CLA	1.04	0.13	0.83	0.10	0.008	t
ΣPUFA	3.88	0.43	3.63	0.29	0.243	t
Σ <i>n</i> -3	0.98	0.18	0.92	0.10	>0.100	K-S
Σ <i>n</i> -6	1.65	0.15	1.66	0.13	0.831	t
ΣMUFA <i>trans</i>	1.60	0.20	1.21	0.08	<0.005	K-S
ΣC18:2 <i>trans</i>	1.07	0.12	0.77	0.05	<0.001	t
ΣTFA	2.99	0.34	2.34	0.07	<0.005	K-S
<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3	1.71	0.21	1.81	0.18	0.379	t
PUFA/SFA	0.17	0.02	0.17	0.02	0.834	t

M—mean; SD—standard deviation; K-S—Kolmogorov–Smirnov test; t—Student’s *t*-test; FFM—fat-free dry mass; SFA—sum of saturated fatty acids; OCFA—odd-chain fatty acids; BCFA—branched-chain fatty acids; MUFA *cis*—sum of *cis* monounsaturated fatty acids; LA—linoleic acid 18:2 *n*-6; PUFA—sum of polyunsaturated fatty acids; MUFA *trans*—sum of *trans* monounsaturated fatty acids; TFA—sum of *trans* fatty acids; CLA—sum of conjugated linoleic acid isomers.

Table 2. Eigenvalues and the proportion of variation (%) explained by the principal components.

Component	Eigenvalue	Proportion	Cumulative
1	8.56	50.34	50.34
2	5.42	31.88	82.22
3	1.31	7.73	89.95
4	0.63	3.72	93.67
5	0.40	2.34	96.01
6	0.29	1.73	97.74
7	0.17	1.02	98.76
8	0.13	0.76	99.52
9	0.05	0.30	99.82
10	0.02	0.12	99.94
11	0.01	0.06	99.99
12	0.00	0.00	100.00

In the BMF after the pasture period, compared to deer after the winter feeding, significantly more ΣSFAs ($p < 0.001$) were found, which was a consequence of a significantly higher share of C16:0 ($p < 0.001$) and C18:0 ($p < 0.05$), as well as higher ΣTFA ($p < 0.005$), ΣMUFA

trans ($p < 0.005$), Σ C18: 2 *trans* ($p < 0.001$), and Σ CCLA ($p < 0.01$). In turn, the bone marrow of fallow deer after the winter nutrition showed a higher share of Σ MUFA *cis* ($p < 0.001$), including C16:1 *c9* ($p < 0.05$), C17:1 *c9* ($p < 0.05$), and C18:1 *c11* ($p < 0.001$, Table 1).

The mean share of oleic acid responsible for the fluidity of the bone marrow in the distal parts of deer legs did not differ significantly between the feeding seasons, and there was a lower content determined after the grazing season ($p = 0.070$).

It is worth noting that although no significant differences in total PUFAs were found, a higher level including $\Sigma n-3$ and a more favourable $n-6/n-3$ ratio were observed in the BMF after pasture feeding. The PUFA/SFA ratio in both groups was the same, which was mainly related to the higher proportion of saturated fatty acids in the BMF of fallow deer fed on pasture (Table 1). The principal component analysis (PCA) was performed for a more extended analysis of the relationships between the 17 variables characterizing the bone marrow and the body weight of the animals as an additional variable. Three principal components (PCs) with eigenvalues exceeding 1 (Kaiser criterion) explained 89.95% of the total variance, with PC1, PC2, and PC3 accounting for 50.34%, 31.88%, and 7.73% of the variance, respectively (Table 2).

Table 3 shows the correlation coefficients between the PCs and variables obtained from the correlation matrix. The first component (PC1) exhibits a very high positive correlation with Σ MUFA *cis* ($r = 0.922$), C18:1 *c11* ($r = 0.919$), body weight ($r = 0.847$), and C16:1 *c9* ($r = 0.764$), but a high negative correlation with six variables, namely, Σ C18:2 *trans* ($r = -0.919$), TFA ($r = -0.913$), Σ MUFA *trans* ($r = -0.882$), C18:1 *t11* VA ($r = -0.875$), C16:0 ($r = -0.830$), and SFA ($r = -0.829$) (Table 3). In turn, the second component (PC2) is characterized by a high positive correlation with 4 variables describing the polyunsaturated fatty acids, namely, PUFA, $n-3$, $n-6$, and the PUFA/SFA ratio ($0.836 \leq r \leq 0.885$), and a negative correlation with C15:1 ($r = -0.755$). The third component (PC3) displays the closest positive correlation with SFA ($r = 0.471$) and C16:0 ($r = 0.412$) and a negative relationship with PUFA/SFA ($r = -0.442$).

Table 3. Correlations between the principal components and the original variables.

Variable	PC1	PC2	PC3
Body weight (kg)	0.847	−0.073	0.398
Fat (%)	0.621	0.460	0.264
FFM (%)	−0.695	−0.560	−0.252
SFA	−0.829	−0.013	0.471
C16:0	−0.830	−0.273	0.412
MUFA <i>cis</i>	0.922	0.343	0.019
C16:1 <i>c9</i>	0.764	−0.339	−0.402
C18:1 <i>c11</i>	0.910	0.218	0.142
C18:1 <i>n-9</i>	0.496	0.732	0.339
C15:1	−0.491	−0.755	−0.326
MUFA <i>trans</i>	−0.882	0.429	0.035
C18:1 <i>t11</i> VA	−0.875	0.372	0.119
C18:2 <i>trans</i>	−0.919	0.093	−0.191
TFA	−0.913	0.334	−0.063
PUFA	−0.454	0.855	−0.156
<i>n-3</i>	−0.353	0.882	−0.038
<i>n-6</i>	−0.112	0.836	−0.330
PUFA/SFA	−0.017	0.885	−0.442

Taking into account the loadings and the length of the directional vectors shown in Figure 1 (as a two-factor plane PC1 $\times$ PC2), three apparent groups of parameters can be distinguished. The first group of variables, which included monounsaturated fatty acids with the *cis* conformation (Σ MUFA *cis*, C18:1 *c11*, and C16:1 *c9*) and additionally the body weight, was distributed in the positive area of the first PC (Q1 and Q2, upper and bottom right quadrants). The second group comprised saturated fatty acids (SFA and C16:0) and

trans fatty acids (TFA, Σ MUFA *trans*, C18:1 *t*11 VA, and Σ C18:2 *trans*), which were located in the positive area of PC2 (Q3 and Q4, upper and bottom left quadrants). The third group comprising PUFA, *n*-3, *n*-6, and PUFA/SFA was located in the upper right quadrant (Q4) defined by positive values of PC2 and negative values of PC1.

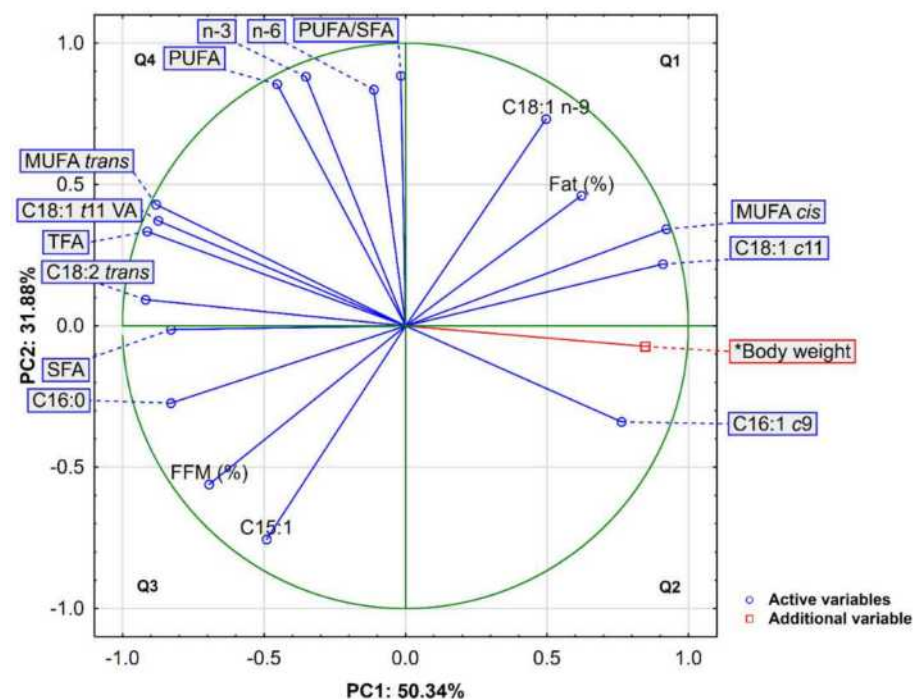


Figure 1. Projection of variables in a two-factor plane (PC1 $\times$ PC2); Fat (%)—fat content; TFA—*trans* fatty acids; FFM (%)—fat-free dry matter.

Figure 2 shows the projection of cases depending on the fallow deer diet in the coordinate system defined by PC1 $\times$ PC2.

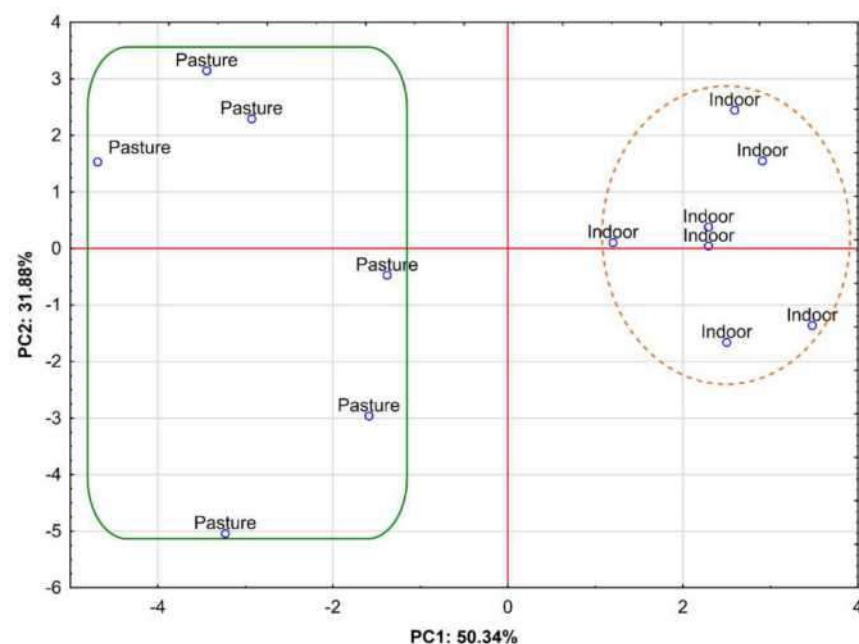


Figure 2. Projection of cases depending on the fallow deer diet (Pasture vs. Indoor) in the a two-factor plane (PC1 $\times$ PC2).

The samples of the bone marrow from the animals fed indoors (in the winter period) are clearly separated and situated in the right area of the plot; i.e., they have positive values of PC1. This area represents the highest values for Σ MUFA *cis*, C18:1 *c*11, C16:1 *c*9, and body weight (Figure 1), which clearly corresponds to the results shown in Table 1 for this fallow deer group. The second group, in turn, is composed of bone marrow samples from the pastured animals, which were distributed on the left area of the plot, with negative values of PC1. This area is distinctive for saturated and trans fatty acids, e.g., SFA, C16:0, TFA, Σ MUFA *trans*, C18:1 *t*11 VA, and Σ C18:2 *trans* (Figure 1), for which significantly higher values were reported in the case of the bone marrow from the grazing animals. The third group of variables, comprising polyunsaturated acids, located in the Q4 square of Figure 1, appears to be neutral due to the absence of significant differences related to the fallow deer diet.

4. Discussion

The results of this research on young male farm fallow deer showed that the bone marrow FA composition changed with age, which is directly related to the feeding season according to the established production cycle on the farm. In addition, the fawns, after pasture feeding, showed both a lower fat concentration and a higher FFM, which may indicate malnutrition before the winter period [28,51,52]. On the one hand, it can be assumed that the young males were better nourished after the winter period, which would confirm the practice of wintering the fawns because those aged 6–7 months (November) do not have sufficient reserves fatty acids in their bones [53]. On the other hand, twice the amount of fat-free mass after the grazing season indicates a greater amount of red bone marrow compared to yellow. It has been shown that in young animals, the red fraction may dominate [45]. The proportion of both bone fractions significantly changes in the spring in older animals because the amount of adipose tissue increases, while the FFM decreases.

In the study by Soppel and Nieminen [25], the marrow in the metatarsal bones of reindeer calves showed more than 50% more Σ SFA, including palmitic acid (C16:0) and stearic acid (C18:0) and fewer MUFAs (average 33.88 vs. 56.78%) compared with the BMF of fawns assessed in both feeding seasons. In the case of Σ PUFAs and Σ *n*-3, the BMF values were similar among the animals; however, the bone marrow of reindeer calves contained more PUFAs from the *n*-6 group, especially linoleic acid (C18:2 *n*-6; average 1.92 vs. 1.45%). The differences could have resulted from interspecies differences, diet or age: the reindeer were younger than the fallow deer.

Conjugated linoleic acid (CLA) isomers were found in the marrow of antelope (1.5%), elk (1.0%) and deer (1.0%) [54]. In studies on farm fallow deer fawns, the bone marrow content of this acid was the same or lower (around 0.93%). A significantly higher share of Σ CLAs was found in the bone marrow of fawns that nursed during the pasture season compared to those fed in winter. This was likely associated with longer milk-feeding from a better-fed doe because ruminant milk may contain high levels of CLA [55].

In ruminants, PUFAs are present in adipose tissue in large amounts due to their efficient hydrogenation by rumen microorganisms [19], which was confirmed by the results obtained from the farmed fallow deer. The PUFA content in the metatarsal bone marrow was either equal to or higher than that for the malnourished reindeer, which probably indicated a high mobilization of these fatty acids from the plant diet, especially after the pasture period due to their exogenous nature [20].

The composition of fatty acids in the bone marrow may have varied depending on the bones: the more distal ones were dominated by unsaturated fatty acids, which lowered the melting point of fat [56]. Sugár and Nagy [56] in the metatarsal bones of fallow deer showed a decrease in the share of palmitic and stearic acids to 14% and 2.5%, respectively; at the same time, they observed an increase in the share of palmitoleic and oleic acids to 21% and 43%, respectively. Compared to the results of Sugár and Nagy [56], the authors of this research found the share of C16:0 and C18:0 acids in the marrow of farm fallow deer to be higher, especially in the pre-winter period, and the share of palmitoleic and oleic acids

to be lower. The inverse relationship (i.e., a lower proportion of C16:0 and C18:0 acids in the bone marrow and a greater proportion of palmitoleic and oleic acids) was observed in the spring.

In the fallow deer bone marrow, several times more MUFAs than PUFAs were found, both in November and April. It should be emphasized that the dominant acid in the bone marrow was oleic acid, which accounted for nearly 40% of the sum of the FAs. The high proportion of oleic acid determined the low melting point of fat in the bone marrow, which increased its fluidity and thus the functioning of the limbs during a frost [7,8]. The mechanism of maintaining the softness of fats by increasing the degree of their unsaturation has been observed in the distal bones or limbs of various species [8,57–59]. Irving et al. [7,60] determined that changes in bone marrow melting temperature were not limited to arctic mammals, but also occurred in tropical mammals.

5. Conclusions

Based on the bone marrow studies of young male farm fallow deer, those in the winter had a more favourable nutritional status, which resulted from properly provided living conditions and properly balanced feed. The bone marrow of fawns after the winter feeding, contained fewer saturated and trans fatty acids, and more monounsaturated FAs, with a similar level of PUFAs than after pasture feeding. It can therefore be assumed that supplementing the fallow deer diet with unsaturated fatty acids before the winter period favourably modifies the fatty acid composition in the bone marrow. However, further studies are needed to confirm this hypothesis. In addition, learning about the composition of fatty acids in the bone marrow of farm animals will allow the level of animal nutrition to be determined, which leads to appropriate supplementation at the appropriate stage of rearing.

Author Contributions: Conceptualization, Ż.S.-B. and K.T.; methodology, P.D., K.T. and Ż.S.-B.; resources, Ż.S.-B. and K.T.; formal analysis, P.D. and M.F.; writing—original draft, Ż.S.-B., K.T., M.F. and P.D.; investigation, K.T., M.F. and P.D.; data curation, M.F. and P.D.; writing—review & editing, P.D. and M.F.; visualization, M.F.; supervision, M.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The experiment was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and in compliance with the European Union law (Directive 2010/63/UE, received in Poland by Legislative Decree 266/2015) of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific or educational purposes. Having regard to the legal basis according to Polish law, Ethical Approval is not required for services within the scope of the Act of 18 December 2003 on animal treatment facilities, as well as agricultural activities, including rearing or breeding of animals, carried out in accordance with the provisions on the protection of animals, and activities that, in compliance with the veterinary medicine practice, do not cause pain, suffering, distress or permanent damage to the body of animals, to an extent equal to a needle stick or more intense (Act of the Protection of Animals Used for Scientific and Educational Purposes, Legislative Decree 266/2015). Therefore, without prejudice to the right, the Ethical Review and Approval is waived for this study.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data sharing not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ceacero, F. Long or Heavy? Physiological Constraints in the Evolution of Antlers. *J. Mamm. Evol.* **2016**, *23*, 209–216. [[CrossRef](#)]
2. Gómez, J.A.; Landete-Castillejos, T.; García, A.J.; Gallego, L. Importance of growth during lactation on body size and antler development in the Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Livest. Sci.* **2006**, *105*, 27–34. [[CrossRef](#)]
3. Gómez, J.A.; Ceacero, F.; Landete-Castillejos, T.; Gaspar-López, E.; García, A.J.; Gallego, L. Factors affecting antler investment in Iberian deer. *Anim. Prod. Sci.* **2012**, *52*, 867–873. [[CrossRef](#)]

4. Murden, D.; Hunnam, J.; De Groef, B.; Rawlin, G.; McCowan, C. Comparison of methodologies in determining bone marrow fat percentage under different environmental conditions: Assessing a tool for ruminant welfare investigations. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2017**, *29*, 83–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Tajchman, K.; Ukalska-Jaruga, A.; Bogdaszewski, M.; Pecio, M.; Janiszewski, P. Compared accumulation of macro- and microelements in bone marrow and bone of wild and farm red deer (*Cervus elaphus*). *BMC Vet. Res.* **2021**, *17*, 324. [[CrossRef](#)]
6. Silberstein, L.; Anastasi, J. *Hematology Basic Principles and Practice*, 7th ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018.
7. Irving, L.; Schmidt-Nielsen, K.; Abrahamson, N.S.B. On the melting points of animal fats in cold climates. *Physiol. Zool.* **1957**, *30*, 93–105. [[CrossRef](#)]
8. Turner, J.C. Adaptive strategies of selective fatty acid deposition in the bone marrow of desert bighorn sheep. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **1979**, *62*, 599–604. [[CrossRef](#)]
9. Soares, J.H. Phosphorus bioavailability. In *Bioavailability of Nutrients for Animals: Amino Acids, Minerals, and Vitamins*; Ammerman, C.B., Baker, D.H., Lewis, A.J., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 1995; pp. 257–294.
10. Kiarie, E.; Nyachoti, C.M. Bioavailability of Calcium and Phosphorus in Feedstuffs for Farm Animals. In *Phosphorus and Calcium Utilization and Requirements in Farm Animals*; Vitti, D.M.S.S., Kebreab, E., Eds.; CABI: Wallingford, UK, 2010; ePDF 9781845936273; pp. 76–93.
11. National Research Council (NRC). *Mineral Tolerance of Animals*, 2nd ed.; National Academy Press: Washington, DC, USA, 2005.
12. National Research Council (NRC). *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids*; The National Academies Press: Washington, DC, USA, 2007; p. 362.
13. Nagy, J.; Szabo, A.; Donko, T.; Bokor, J.; Romvari, R.; Repa, I.; Horn, P.; Febel, H. Body composition and venison quality of farmed red deer (*Cervus elaphus*) hinds reared on grass, papilionaceous or mixed pasture paddocks. *Arch. Anim. Bred.* **2019**, *62*, 227–239. [[CrossRef](#)]
14. Razmaite, V.; Pileckas, V.; Šiukšcius, A.; Juškienė, V. Fatty Acid Composition of Meat and Edible Offal from Free-Living Red Deer (*Cervus elaphus*). *Foods* **2020**, *9*, 923. [[CrossRef](#)]
15. Hoz, L.; Lopez-Bote, C.J.; Cambero, M.I.; D'Arrigo, M.; Pin, C.; Ordonez, J.A. Effect of dietary linseed oil and α -tocopherol on pork tenderloin (*Psoas major*) muscle. *Meat Sci.* **2003**, *65*, 1039–1044. [[CrossRef](#)]
16. Serrapica, F.; Masucci, F.; Di Francia, A.; Napolitano, F.; Braghieri, A.; Esposito, G.; Romano, R. Seasonal Variation of Chemical Composition, Fatty Acid Profile, and Sensory Properties of a Mountain Pecorino Cheese. *Foods* **2020**, *9*, 1091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Kouba, M.; Benatmane, F.; Blochet, J.E.; Mourot, J. Effect of a linseed diet on lipid oxidation, fatty acid composition of muscle, perirenal fat, and raw and cooked rabbit meat. *Meat Sci.* **2008**, *80*, 829–834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Kouba, M.; Mourot, J. A review of nutritional effects on fat composition of animal products with special emphasis on n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochimie* **2011**, *93*, 13–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Christie, W.W. The composition, structure and function of lipids in the tissues of ruminant animals. In *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*; Christie, W.W., Ed.; Pergamon Press: Oxford, UK, 1981; pp. 95–191.
20. Bruckner, G. Biological effects of polyunsaturated fatty acids. In *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*; Chow, C.K., Ed.; Marcel Dekker: New York, NY, USA, 1992; pp. 631–646.
21. Stender, S.; Astrup, A.; Dyerberg, J. Ruminant and industrially produced trans fatty acids: Health aspects. *Food Nutr. Res.* **2008**, *52*, 1651. [[CrossRef](#)]
22. Jackson, C.M. *The Effects of Inanition and Malnutrition upon Growth and Structure*; Blakison's, Son & Co.: Philadelphia, PA, USA, 1928; p. 616.
23. Nieminen, M.; Laitinen, M. Bone marrow and kidney fats as indicators of condition in reindeer. *Rangifer* **1986**, *6*, 219–226. [[CrossRef](#)]
24. Nieminen, M.; Soppela, P. Nutritional status and fatty acid composition of bone marrows in semi-domesticated reindeer. *Rangifer* **1990**, *4*, 57–58. [[CrossRef](#)]
25. Soppela, P.; Nieminen, M. The effect of wintertime undernutrition on the fatty acid composition of leg bone marrow fats in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus* L.). *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **2001**, *128*, 63–72. [[CrossRef](#)]
26. Gavino, V.C.; Gavino, G.R. Adipose hormone sensitive lipase preferentially releases polyunsaturated fatty acids from triglycerides. *Lipids* **1992**, *27*, 950–954. [[CrossRef](#)]
27. Raclot, T.; Mioskowski, E.; Bach, A.C.; Groscolas, R. Selectivity of fatty acid mobilization: A general metabolic feature of adipose tissue. *Am. J. Physiol.* **1995**, *269*, R1060–R1067. [[CrossRef](#)]
28. Ransom, A.B. Kidney and marrow fat as indicators of white-tailed deer condition. *J. Wildl. Manag.* **1965**, *29*, 397–398. [[CrossRef](#)]
29. Davis, J.L.; Valkenburg, P.; Reed, D.J. Correlations and depletion patterns of marrow fat in caribou bones. *J. Wildl. Manag.* **1987**, *51*, 865–873. [[CrossRef](#)]
30. Wolkers, J.; Wensing, T.; Schonewille, J.T.; van't Klooster, A.T. Undernutrition in relation to changed tissue composition in wild boar *Sus scrofa*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **1994**, *108*, 623–628. [[CrossRef](#)]
31. Fennessy, P.F.; Thomson, J.M.; Suttie, J.M. Season and growth strategy in red deer. Evolutionary implications and nutritional management. In *Wildlife Production: Conservation and Sustainable Development*; Renecker, I.A., Hudson, R.J., Eds.; University of Alaska: Fairbanks, AK, USA, 1991; pp. 495–501.
32. Janiszewski, P.; Dmuchowski, B.; Gugolek, A.; Żelobowski, R. Body weight characteristics of farm-raised fallow deer (*Dama dama* L.) over the winter period. *J. Cent. Eur. Agric.* **2008**, *9*, 337–342.

33. Bartoš, L.; Vaňková, D.; Hyánek, J.; Šiler, J. Impact of allosucking on growth of farmed red deer calves (*Cervus elaphus*). *Anim. Sci.* **2016**, *72*, 493–500. [\[CrossRef\]](#)
34. Steiner-Bogdaszewski, Z.; Tajchman, K.; Domaradzki, P.; Florek, M. Composition of fatty acids in bone marrow of red deer from various ecosystems. *Molecules* **2022**. in review.
35. Leat, W.M.F. Fatty acid composition of the plasma lipids of newborn and maternal ruminants. *Biochem. J.* **1966**, *98*, 598–603. [\[CrossRef\]](#)
36. Scott, T.W.; Setchell, B.P.; Bassett, J. Characterization and metabolism of ovine foetal lipids. *Biochem. J.* **1967**, *104*, 1040–1047. [\[CrossRef\]](#)
37. Noble, R.C.; Steele, W.; Moore, J. The metabolism of linoleic acid by the young lamb. *Br. J. Nutr.* **1972**, *27*, 503–508. [\[CrossRef\]](#)
38. Payne, E. Fatty acid composition of tissue phospholipids of the foetal calf and neonatal lamb, deer calf and piglet as compared with the cow, sheep, deer and pig. *Br. J. Nutr.* **1978**, *39*, 53–58. [\[CrossRef\]](#)
39. Fløjgaard, C.; De Barba, M.; Taberlet, P.; Ejrnaes, R. Body condition, diet and ecosystem function of red deer (*Cervus elaphus*) in a fenced nature reserve. *Glob. Ecol. Conserv.* **2017**, *11*, 312–323. [\[CrossRef\]](#)
40. Dryden, G.M. Quantitative nutrition of deer: Energy, protein, and water. *Anim. Prod. Sci.* **2011**, *51*, 292–302. [\[CrossRef\]](#)
41. Dryden, G.M. Nutrition of antler growth in deer. *Anim. Prod. Sci.* **2016**, *56*, 962–970. [\[CrossRef\]](#)
42. DEFRA. Department for Environment Food & Rural Affairs. Code of Recommendations for the Welfare of Farmed Deer. Available online: <http://www.defra.gov.uk/animalh/welfare/farmed/othersps/deer/pb0055/deercode.htm> (accessed on 12 October 2021).
43. FEDFA. Federation of European Deer Farmers Associations. Available online: <https://www.fedfa.com/> (accessed on 12 October 2021).
44. Mattiello, S. Welfare issues of modern deer farming. *Ital. J. Anim. Sci.* **2009**, *8*, 205–217. [\[CrossRef\]](#)
45. Tajchman, K.; Ukalska-Jaruga, A.; Bogdaszewski, M.; Pecio, M.; Dziki-Michalska, K. Accumulation of toxic elements in bone and bone marrow of deer living in various ecosystems. A case study of farmed and wild-living deer. *Animals* **2020**, *10*, 2151. [\[CrossRef\]](#)
46. PN-ISO 1442; Meat and Meat Products—Determination of Moisture Content (Reference Method). The Polish Committee for Standardization: Warsaw, Poland, 2000.
47. PN-ISO 1444; Meat and Meat Products—Determination of Free Fat Content. The Polish Committee for Standardization: Warsaw, Poland, 2000.
48. Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509. [\[CrossRef\]](#)
49. AOCS. AOCS Official Method Ce 2–66. *Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids*; American Oil Chemists' Society: Champaign, IL, USA, 2000.
50. Domaradzki, P.; Florek, M.; Skąlecki, P.; Litwińczuk, A.; Kędzierska-Matysek, M.; Wolanciuk, A.; Tajchman, K. Fatty acid composition, cholesterol content and lipid oxidation indices of intramuscular fat from skeletal muscles of beaver (*Castor fiber* L.). *Meat Sci.* **2019**, *150*, 131–140. [\[CrossRef\]](#)
51. Neiland, K.A. Weight of dried marrows as indicator of fat in caribou femurs. *J. Wildl. Manag.* **1970**, *34*, 904–907. [\[CrossRef\]](#)
52. Thouzeau, C.; Massemmin, S.; Handrich, Y. Bone marrow fat mobilization in relation to lipid and protein catabolism during prolonged fasting in barn owls. *J. Comp. Physiol. B* **1997**, *167*, 17–24. [\[CrossRef\]](#)
53. Janiszewski, P.; Bogdaszewski, M.; Murawska, D.; Tajchman, K. Welfare of farmed deer—Practical aspects. *Pol. J. Natur. Sci.* **2016**, *31*, 345–361.
54. Cordain, L.; Watkins, B.A.; Florant, G.L.; Kelher, M.; Rogers, L.; Li, Y. Fatty acid analysis of wild ruminant tissues: Evolutionary implications for reducing diet-related chronic disease. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2002**, *56*, 181–191. [\[CrossRef\]](#)
55. Ferlay, A.; Bernard, L.; Meynadier, A.; Malpuech-Brugere, C. Production of *trans* and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health: A review. *Biochimie* **2017**, *141*, 107–120. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Sugár, L.; Nagy, I. Fatty Acid Composition in the Bone Marrow Fats of Cervidae. In *The Biology of Deer*; Brown, R.D., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 1992. [\[CrossRef\]](#)
57. Meng, M.; West, G.; Irving, L. Fatty acid composition of caribou bone marrow. *Comp. Biochem. Physiol.* **1969**, *30*, 187–191. [\[CrossRef\]](#)
58. West, G.C.; Shaw, D.L. Fatty acid composition of Dall sheep bone marrow. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **1975**, *50*, 599–601. [\[CrossRef\]](#)
59. Käkälä, R.; Hyvärinen, H. Site-specific fatty acid composition in adipose tissues of several northern aquatic and terrestrial mammals. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **1996**, *115*, 501–514. [\[CrossRef\]](#)
60. Irving, L. *Arctic Life of Birds and Mammals Including Man*; Springer: New York, NY, USA, 1972.

Article

The Mineral Composition of Bone Marrow, Plasma, Bones and the First Antlers of Farmed Fallow Deer

Żaneta Steiner-Bogdaszewska ¹, Katarzyna Tajchman ^{2,*} , Aleksandra Ukalska-Jaruga ^{3,*} , Mariusz Florek ⁴  and Monika Pecio ³

¹ Institute of Parasitology of the Polish Academy of Sciences, Research Station in Kosewo Górne, 11-700 Mrągowo, Poland

² Department of Animal Ethology and Wildlife Management, Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

³ Department of Soil Science Erosion and Land Protection, Institute of Soil Science and Plant Cultivation, State Research Institute, Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, Poland

⁴ Department of Quality Assessment and Processing of Animal Products, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

* Correspondence: katarzyna.tajchman@up.lublin.pl (K.T.); aukalska@iung.pulawy.pl (A.U.-J.)

Simple Summary: Young cervids build their skeleton during the growth of their first antlers, which is why this is a period of great demand for minerals. The mineral compositions of bone marrow, plasma, bones, and antlers are good indicators of changes that occur in the metabolism of farmed fallow deer. The aim of the study was to analyze the concentrations of 21 mineral elements (bulk elements: Ca, P, Mg, K, Na; trace elements: Li, Cr, Mn, Co, Cu, Zn, Se, Mo; and toxic elements: Be, Al, As, Cd, Sb, Ba, Pb, Ni) in the aforementioned tissues. The highest content was characterized by bulk elements whose content increased in bone, bone marrow and antlers according to the following series: Ca > P > Na > Mg > K. The plasma was characterized by a different concentration of individual elements in the order of Na > K > Ca > P > Mg. The analysis of trace and toxic elements indicated that higher levels were recorded in bone tissues (in antlers and then in bones). It is worth emphasizing that the research indicates a negative correlation between Ca and Cd and between Ca and Pb and between P and Pb in tissues.



Citation: Steiner-Bogdaszewska, Ż.; Tajchman, K.; Ukalska-Jaruga, A.; Florek, M.; Pecio, M. The Mineral Composition of Bone Marrow, Plasma, Bones and the First Antlers of Farmed Fallow Deer. *Animals* **2022**, *12*, 2764. <https://doi.org/10.3390/ani12202764>

Academic Editor: Martina Pérez Serrano

Received: 21 August 2022

Accepted: 12 October 2022

Published: 14 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Abstract: An adequate supply of essential nutrients is particularly important during the skeletal growth and development of young deer, especially in males, who build new antlers each year. The aim of the research was to analyze the levels of 21 mineral elements (including the bulk elements: Ca, P, Mg, K, Na; trace elements: Li, Cr, Mn, Co, Cu, Zn, Se, Mo; and toxic elements: Be, Al, As, Cd, Sb, Ba, Pb, Ni) in the bone marrow, plasma, bones, and first antlers of farmed fallow deer (*Dama dama*). The mineral compositions of tissues were analyzed using inductively coupled plasma mass spectrometry. Higher concentrations of Ca, P, Mg, Cr, Zn, Se, Al, Ba and Ni were found in bone marrow than in plasma. The highest concentrations of Ca, P and Ba were recorded in fallow deer bone, while the highest concentrations of Mg, K, Na, Li, Cr, Mn, Co, Cu, Zn, Se, Mo, Be, Al, As, Sb, Pb and Ni were found in the antlers. Moreover, the research showed a significant negative relationship between Ca and Cd, and between Ca and Pb, and P and Pb ($r_s = -0.70$, $r_s = -0.80$, and $r_s = -0.66$, respectively; $p < 0.05$) in the tissues.

Keywords: *Dama dama*; bulk elements; trace elements; toxic elements; ICP-MS; absorption



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Metabolic changes indicate that in living organisms, there is a constant exchange of elements necessary for life, which are used to build cells and tissues. Some are periodically removed along with secretions and excretions, while others may be stored in the body. Their reserves are usually activated when there is a dietary deficiency. Such a situation may

occur during the antler growth period in cervids because this tissue grows fast and requires a substantial mineral transfer from the skeleton through the bloodstream into the antlers during its growth. Adaptive bone tissue remodeling through continuous biomineralization takes place throughout the deer's life, in contrast to the antlers, which are shed every year [1]. Moreover, the growth of young cervids is the fastest between birth and the first year of life, whereas the subsequent four years are characterized by a lower growth rate [2]. The first antler grows at an average rate of 1.95 ± 0.05 cm per week and reaches maturity after 14 weeks [3]. The young male's conditions in the early months of life have important effects on its final size and fitness. However, the antlers, which are a secondary sex feature present in cervid males (with the exception of reindeer), especially their size, are important in the establishment of the hierarchy and position of the male and its attractiveness to females [4].

Nutrition that fully meets the needs of young animals, and thus the appropriate concentrations of trace elements and bulk elements and their proportions in tissues and body fluids, determines the proper growth and development of their system. Nutrients transported by the circulatory system are built into the skeletal system, including the antlers of cervids. Nevertheless, blood is the main and first indicator of changes occurring in the organism because it has a transport function and ensures communication between various body systems and thus undergoes constant changes [5–7]. The bone marrow of young animals consists largely of hematopoietically active tissue (from immature cells which can develop into all types of blood cells), with relatively little fat. In these animals, all cells of the body, especially blood, are formed primarily in the bone marrow and are then distributed in the blood throughout the body [8]; however, blood is not an indicator of an adequate supply of all minerals, only showing their content in the moment. Moreover, haematopoiesis is a process that is highly consuming due to the rapid turnover of the haematopoietic system and consequent demand for nutrients and dependence on highly specialised bone marrow. It is well established that micronutrients are relevant to blood cell production, although some of the mechanisms for how trace elements modulate haematopoiesis remain unknown [9]. Thus, the bone marrow is the primary site of blood cell production or hematopoiesis, while hematopoietic tissue is highly proliferative. Billions of cells per kilogram of body weight are produced each day. The hematopoietic system is under exquisite local and systemic control and responds rapidly and predictably to various stimuli [10]. Therefore, we can expect its quick response to unfavorable living conditions related to the deer's environment.

Various physiological dysfunctions related to deficient, excess, or disturbed homeostasis of elements in the animal organism are caused by biological, genetic, or environmental factors [11]. An adequate supply of bulk elements is particularly important during the growth and development of the young animal's skeleton [3,6,12]. Micronutrients in ruminants, especially their deficiencies, can lead to serious reproductive problems, impede growth, and cause osteochondrosis [13]. The main factor that may lead to disturbances in the organism's homeostasis is environmental pollution manifested by the contamination of soil, plants, water, or air that is often associated with biogeochemical conditions [14]. Farmed cervids, unlike wild ones, are not exposed to harmful substances to such a large extent because they cannot move, and they receive feed and water from a controlled environment. They have access to permanent pastures and are fed with properly balanced fodder, especially in winter; therefore, they should be free from toxic substances. Despite this, studies on farmed red deer have shown the accumulation of hazardous substances in their tissues [8].

Examining the mineral composition of bone marrow, plasma, bones, and antlers in cervids provides valuable information about the nutritional status of animals, their health, and their future functioning, especially in farm breeding. The mineral content in the bone marrow and bones of deer was investigated, and it differed because of the maintenance conditions of red deer [15] and also owing to age, which was demonstrated in reindeer [16]. However, fallow deer, which are the most commonly bred deer in Central Europe, have

not been studied in this regard so far. Therefore, the aim of the research was to determine and assess the mineral concentration using multivariate analysis of 21 elements, including 5 bulk elements: calcium (Ca), phosphorus (P), magnesium (Mg), potassium (K), sodium (Na); 8 trace elements: lithium (Li), chromium (Cr), manganese (Mn), cobalt (Co), copper (Cu), zinc (Zn), selenium (Se), molybdenum (Mo); and 8 minerals with toxicological risk: beryl (Be), aluminum (Al), arsenic (As), cadmium (Cd), antimony (Sb), barium (Ba), lead (Pb), and nickel (Ni) in the bone marrow (BM), plasma (P), bones (B) and the first antlers (A) of young farmed fallow deer (*Dama dama*).

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Design

The study was conducted in 2021 on 6 farmed male fallow deer aged 16 months old according to the scheme presented in our earlier publication [15]. Generally, in the breeding scheme, young stags are mainly culled as the hinds are intended for herd reconstruction; therefore, the analysis included studies of male subjects. The animals were bred in the Research Station of the Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences, Kosewo Górne (Region of Warmia and Mazury; Poland; 53°48' N; 21°23' E) in compliance with all quality standards and the required permits. The feeding system comprised the use of rotary grazing in pasture plots with an area and density recommended by DEFRA [17], FEDFA [18], and Mattiello [19]. The research was focused on the fawns born in a natural way during the grazing period, lasting from April to November in Poland. The fawns were fed by doe milk and then vegetation from the pastures. In the winter period (from December to March), the animals were fed ad libitum with grass haylage or hay with a moderate nutritional value. Each animal ingested on average 260 g/d of a mixture comprising 70% crushed oats, 15% rapeseed concentrate (containing 33% crude protein; Eko-pasz), and 15% soybean concentrate (with 45% crude protein content; Eko-pasz) and Josera Phosphoreimer multi-ingredient licks (Josera, Nowy Tomyśl, Poland, Table S1).

2.2. Sampling

Before slaughter, the body weights of the animals were precisely measured by MP 800 sensors coupled with a Tru-test DR 3000 weight reader with an accuracy of $\pm 1\%$. The body mass of each animal ranged from 38.0 to 46.0 kg with an average value of 41.92 kg (SD = 3.08 kg).

Blood was collected from the external jugular vein (*vena jugularis externa*) at a volume of 5 mL into heparinized vacuum tubes. The biochemical parameters were analyzed in blood plasma obtained by centrifugation of sampled blood at 3000 rpm for 10 min in a laboratory centrifuge (MPW-350R, MPW Medical Instruments, Warsaw, Poland) at 4 °C.

The metatarsal bone (*ossa metatarsalia*) as well as antlers (completely ossified) were collected from the animals directly on the day of slaughter. The metatarsal bone was dissected by separating the skin, muscles, and tendons with a stainless-steel knife. Subsequently, the fresh bones were appropriately opened using a dental drill, and bone marrow was selected and frozen at -80 °C. Surgical instruments free of the possibility of secondary contamination of the samples with the tested elements were used in the preparation process.

2.3. Mineral Content Analysis

Chemical analyzes of element determinations were performed in accordance with the descriptions contained in previous publications [6–8,14]. Briefly, the mineral concentrations in the tissues of fallow deer were determined by the aqua regia digestion (sample weight of 0.5 g) with a microwave digestion (Mars Xpress from CEM Corp., Matthews, NC, United States). The obtained extracts were analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (Agilent quadrupole 7500CE ICP-MS). Internal standards such as ^{45}Sc , ^{89}Y and ^{159}Tb were used for the elimination of the matrix effect and to ensure the long-term stability of samples. Moreover, in each sequence of samples, a blank test and the internal reference material were included in analyses for quality control of the analytical

process. Among the validation parameters, the recovery for trace elements ranged from 90% to 97%, while the precision of the method defined as a relative standard deviation (RSD) was <3%. The limits of detection were defined at the level from 0.007 to 0.099 mg/kg depending on the determined element.

2.4. Statistical Analysis

Statistica ver. 13 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) was used to statistically process the obtained raw data. Parametric and non-parametric tests of data analysis were used to evaluate the interplay of variables according to the result of the assumption of normality. The results were expressed as the mean value and standard deviation of the variables, and statistical differences between tissues (plasma, bone marrow, bone, and antler) were tested using Kruskal–Wallis ANOVA on ranks (Kruskal–Wallis H test). Spearman's rank correlation analysis was used to assess the relationship (r_s) between individual elements and the content of the selected element in different tissues. Principal component analysis (PCA) was applied to visualize the dataset and demonstrate the relationships among the elements (variables) present in all tissues studied. The Kaiser criterion (eigenvalue of component > 1) was used as a criterion for selecting the number of principal components. P-values were identified as statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results

Table 1 shows the mean concentration of 21 bulk elements, trace elements and toxic elements in the examined tissues from the bone marrow, plasma, bone, and antlers of farmed fallow deer. As expected, among all analyzed bulk elements, the highest levels of Ca and P were found in bones and antlers, while the highest Mg and Na levels and the highest Ca:P ratio were found in antlers and bones. In general, plasma contained the lowest amounts of Ca, P and Mg, while K, Na, and the lowest Ca:P ratio were found in bone marrow.

Table 1. Concentration of elements in fresh matter (mg/kg) depending on tissues of fallow deer.

Elements	Bone Marrow (BM)		Plasma (P)		Bone (B)		Antler (A)		Kruskal–Wallis H Test (3, N = 24)	Spearman Rank Correlation Coefficient (r _s) between Tissues
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD		
	Bulk elements									
Ca	951.4 ^{ab}	970.4	82.5 ^a	11.2	285,421.8 ^c	35,052.9	242,959.3 ^c	13,771.3	H = 21.600	-
P	691.0 ^{ab}	416.3	60.0 ^a	9.9	109,262.9 ^c	5943.5	87,852.1 ^{bc}	5194.4	H = 21.600	B – A = 0.83 *
Mg	28.4 ^{ab}	14.8	16.9 ^a	2.0	4530.2 ^{bc}	610.2	5818.6 ^c	732.8	H = 20.293	-
K	96.6 ^a	23.4	773.3 ^b	94.8	378.7 ^{ab}	38.1	832.4 ^b	123.1	H = 19.867	-
Na	445.0 ^a	80.5	3072.9 ^{ab}	180.4	7539.4 ^{bc}	877.8	9204.3 ^c	992.1	H = 21.117	-
Ca:P	1.1 ^a	0.6	1.4 ^{ab}	0.4	2.6 ^{bc}	0.3	2.8 ^c	0.3	H = 17.760	-
	Trace elements									
Li	<LOD	-	0.01 ^a	0.00	0.42 ^{ab}	0.04	2.26 ^b	1.03	H = 20.236	-
Cr	0.09 ^a	0.16	<LOD	-	0.15 ^{ab}	0.16	3.07 ^b	2.72	H = 16.120	-
Mn	0.03 ^a	0.03	0.04 ^{ab}	0.50	1.72 ^{ab}	0.76	15.30 ^b	8.96	H = 19.547	-
Co	<LOD	-	<LOD	-	0.06	0.01	0.17	0.13	H = 21.026	-
Cu	0.13 ^a	0.02	0.61 ^{ab}	0.34	2.42 ^b	1.19	59.05 ^{bc}	40.54	H = 20.900	P – A = −0.89 *
Zn	1.23 ^{ab}	0.27	0.36 ^a	0.00	69.79 ^b	9.98	78.60 ^b	30.31	H = 19.455	-
Se	0.03 ^{ab}	0.00	0.01 ^a	0.00	0.01 ^a	0.00	0.06 ^b	0.02	H = 19.689	BM – B = −0.89 *
Mo	<LOD	-	0.01	0.04	0.08	0.02	0.38	0.52	H = 18.169	P – A = −0.93 *
	Toxic elements									
Be	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	0.012	0.004	H = 22.395	-
Al	3.700 ^{ab}	2.285	0.038 ^a	0.060	13.550 ^{bc}	10.124	89.031 ^c	48.346	H = 21.239	BM – A = −0.89 *
As	<LOD	-	0.001 ^a	0.001	0.050 ^b	0.013	0.183 ^b	0.027	H = 21.675	-
Cd	<LOD	-	<LOD	-	0.008	0.017	0.026	0.012	H = 20.934	-
Sb	<LOD	-	0.004	0.001	<LOD	-	0.108	0.065	H = 22.256	-
Ba	0.380 ^{ab}	0.337	0.039 ^a	0.035	99.470 ^c	15.939	85.950 ^{bc}	6.182	H = 20.333	BM – P = −0.94 *
Pb	<LOD	-	<LOD	-	0.180	0.116	2.716	1.955	H = 21.934	-
Ni	0.020 ^a	0.012	<LOD	-	0.260 ^a	0.061	3.037 ^b	2.251	H = 21.367	-

M—mean, SD—standard deviation, <LOD—below the limit of detection, * values statistically significant $p < 0.05$, a, b, c differences significant at $p < 0.05$ for multiple comparisons (pairwise).

The highest concentration of all essential trace elements marked in the research was found in the antlers (Table 1). Despite obvious numerical differences, the results of the Kruskal–Wallis H test did not confirm significant differences in their content in bones (except for Se), and comparable levels in hard tissues were obtained only for Zn (bones 69.79 mg/kg vs. antlers 78.60 mg/kg). Very low concentrations or <LOD values in soft

tissues were obtained for Co, Mo, Li and Cr. In general, the antlers accumulated most of the toxic elements, especially Al and Ni, and had levels of Ba and As similar to bones. Antlers also contained the most Be, Cd, Sb and Pb, the content of which in the remaining tissues was negligible or below the detection level.

The relationships among the concentrations of individual elements in the examined tissues were also assessed (Table 1). There was a significant positive relationship between the concentrations of P in the bones and antlers of animals ($r_s = 0.83$, $p < 0.05$), and a negative significant relationship between the concentrations of Cu in plasma and antlers ($r_s = -0.89$, $p < 0.05$); Se in bone marrow and bones ($r_s = -0.89$, $p < 0.05$) and in plasma and antlers ($r_s = -0.93$, $p < 0.05$); Al in bone marrow and antlers ($r_s = -0.89$, $p < 0.05$); and Ba in bone marrow and plasma ($r_s = -0.94$, $p < 0.05$) (Table 1).

The Spearman correlation coefficients indicate the interdependencies between the examined elements (Table 2). When analyzing the relationships among bulk elements, positive, strong and very strong relationships were detected among all elements in this group ($0.58 \leq r_s \leq 0.95$, $p < 0.05$) except for K. Trace elements were also strongly positively correlated with each other ($0.45 \leq r_s \leq 0.88$, $p < 0.05$), and the only exception in this group was Se, for which there was a strong relationship with Cr ($r_s = 0.70$, $p < 0.05$) and a weaker one with Zn ($r_s = 0.46$, $p < 0.05$). Positive relationships were also found among toxic elements ($0.50 \leq r_s \leq 0.94$, $p < 0.05$), with the only negative correlations found between Ba and Cd and Pb ($-0.49 \leq r_s \leq -0.50$). Considering the correlations of elements from the group of bulk and trace elements, the advantage of positive and strong compounds was shown, especially in the case of Mg and all trace elements ($0.54 \leq r_s \leq 0.84$, $p < 0.05$), Na except for Se ($0.63 \leq r_s \leq 0.92$, $p < 0.05$) and K except for Se and Zn ($0.54 \leq r_s \leq 0.87$, $p < 0.05$). Among the important bulk elements, Ca and P were strongly positively correlated only with Cu ($r_s = 0.56$ and $r_s = 0.57$, $p < 0.05$) and very strongly correlated with Zn ($r_s = 0.86$ and $r_s = 0.88$, $p < 0.05$) while strongly negatively correlated with Co ($r_s = -0.74$ and $r_s = -0.77$, $p < 0.05$). A negative correlation was also found for P and Li ($r_s = -0.69$, $p < 0.05$). Similarly, the significant positive correlations were observed for all toxic elements and selected bulk elements such as Mg ($0.54 \leq r_s \leq 0.89$, except Cd, Pb and Ni), Na ($0.60 \leq r_s \leq 0.92$, except Se and Cd), and K ($0.51 \leq r_s \leq 0.88$, except Ca, P, Mg, Zn, Se, Sb and Ba). In turn, Ca and P were positively strongly correlated with Al and As ($0.58 \leq r_s \leq 0.66$, $p < 0.05$) and very strongly correlated with Sb and Ba ($0.74 \leq r_s \leq 0.96$, $p < 0.05$). Negative and strong relationships were found for Ca and Cd ($r_s = -0.70$, $p < 0.05$) and Pb ($r_s = -0.80$, $p < 0.05$), as well as for P and Pb ($r_s = -0.66$, $p < 0.05$). Analyzing the correlations of trace elements and toxic elements, strong and significant relationships of Al and As were found with all (except Li) trace elements ($0.58 \leq r_s \leq 0.84$, $p < 0.05$). Similar strong relationships were found for Pb and trace elements (except Li and Zn) ($0.66 \leq r_s \leq 0.78$, $p < 0.05$) and very strong correlations for Ni and trace elements (except Li, Zn and Se) ($0.74 \leq r_s \leq 0.87$, $p < 0.05$). Cd was positively correlated with Cr, Mn, and Co ($0.62 \leq r_s \leq 0.65$, $p < 0.05$); Sb was positively correlated with Mn, Cu, Zn, Se, and Mo ($0.65 \leq r_s \leq 0.76$, $p < 0.05$); and Ba was positively correlated with Zn and Cu ($r_s = 0.59$ and $r_s = 0.90$, $p < 0.05$). The only negative correlation between elements from these groups was found for Li and Cd ($r_s = -0.60$, $p < 0.05$) (Table 2).

Principal component analysis (PCA) was represented by 13 variables and 24 cases. Three principal components (PCs) with eigenvalues of ≥ 1 (Kaiser criterion) explained 89.69% of the total variance, with an overwhelming value of PC1 (Table 3).

Table 2. The relationship between minerals in the examined tissues of fallow deer in total ($N = 24$).

Analyzed Variable	Bulk Elements						Trace Elements						Toxic Elements						
	P	Mg	K	Na	Li	Cr	Mn	Co	Cu	Zn	Se	Mo	Al	As	Cd	Sb	Ba	Pb	Ni
Ca	0.95 *	0.79 *	−0.08	0.60 *	−0.30	0.03	0.18	−0.74 *	0.56 *	0.86 *	0.19	−0.03	0.58 *	0.64 *	−0.70 *	0.74 *	0.96 *	−0.80 *	−0.01
P	1.00	0.76 *	−0.12	0.8 *	−0.69 *	0.05	0.19	−0.77 *	0.57 *	0.88 *	0.20	−0.13	0.62 *	0.66 *	−0.49	0.79 *	0.93 *	−0.66 *	0.02
Mg		1.00	0.28	0.77 *	0.84 *	0.74 *	0.55 *	0.71 *	0.75 *	0.84 *	0.54 *	0.66 *	0.89 *	0.88 *	0.41	0.74 *	0.83 *	0.52	0.39
K			1.00	0.69 *	0.75 *	0.78 *	0.81 *	0.87 *	0.63 *	0.07	0.09	0.53 *	0.61 *	0.51 *	0.58 *	0.19	−0.02	0.65 *	0.88 *
Na				1.00	0.71 *	0.72 *	0.80 *	0.92 *	0.67 *	0.31	0.63 *	0.83 *	0.83 *	0.47	0.84 *	0.63 *	0.73 *	0.73 *	0.73 *
Li					1.00	0.71 *	0.72 *	0.88 *	0.84 *	0.73 *	0.39	0.69 *	0.52	0.45	0.47	−0.60	−0.30	0.48	0.43
Cr						1.00	0.65 *	0.76 *	0.64 *	0.67 *	0.70 *	0.68 *	0.77 *	0.81 *	0.62 *	−0.03	0.20	0.75 *	0.85 *
Mn							1.00	0.82 *	0.82 *	0.41 *	0.33	0.84 *	0.74 *	0.73 *	0.63 *	0.68 *	0.28	0.76 *	0.87 *
Co								1.00	0.87 *	0.72 *	0.33	0.89 *	0.64 *	0.80 *	0.65 *	−0.03	−0.39	0.66 *	0.85 *
Cu									1.00	0.72 *	0.37	0.80 *	0.84 *	0.83 *	0.35	0.65 *	0.59 *	0.69 *	0.76 *
Zn										1.00	0.46 *	0.45 *	0.77 *	0.81 *	−0.30	0.67 *	0.90 *	−0.05	0.24
Se											1.00	0.23	0.61 *	0.58 *	0.44	0.73 *	0.27	0.78 *	0.25
Mo												1.00	0.58 *	0.81 *	0.53	0.76 *	0.13	0.71 *	0.74 *
Al													1.00	0.94 *	0.65 *	0.64	0.61 *	0.83 *	0.65 *
As														1.00	0.66 *	0.80 *	0.67 *	0.81 *	0.57 *
Cd															1.00	0.54	−0.49	0.51	0.50
Sb																1.00	0.70 *	0.54	0.75 *
Ba																	1.00	−0.50	0.06
Pb																		1.00	0.71 *

* values statistically significant $p < 0.05$.**Table 3.** Correlations between the principal components and the original variables.

Variable	PC1	PC2	PC3
Na	−0.94	0.24	0.23
Mg	−0.95	0.27	−0.00
K	−0.54	−0.41	0.66
Ca	−0.85	0.52	−0.02
P	−0.83	0.55	−0.05
Mn	−0.75	−0.47	−0.17
Ni	−0.72	−0.51	−0.16
Cu	−0.77	−0.45	−0.24
Zn	−0.91	0.27	−0.22
Se	−0.56	−0.56	−0.44
Al	−0.67	−0.30	0.42
As	−0.88	−0.29	0.15
Ba	−0.85	0.51	−0.06
Eigenvalue	8.24	2.37	1.05
% of variance	63.36	18.24	8.09
Cumulative %	63.36	81.60	89.69

The projection of variables as a two-factor plane ($PC1 \times PC2$) is presented in Figure 1. Most of the vectors reach the circuit of the plot; thus, all variables are well represented by the first two main components of PCA coordinates. The distance (angle) between vectors confirmed high mutual relationships between bulk and trace elements. The factor loadings matrix details the results of the PCA analysis (Table 3). The first component (PC1) exhibits only negative and high and very high correlations with all variables (Table 3). Based on the loadings and the length of the directional vectors, three groups of elements similar in the properties can be separated according to Figure 2. The first group is composed of Mg ($r = -0.95$), Na ($r = -0.94$) and Zn ($r = -0.91$), and the second group includes Ba ($r = -0.85$), Ca ($r = -0.85$) and P ($r = -0.83$). Both of these groups are located in the upper left quadrant (Q4) defined by negative PC1 and positive PC2 values, indicating different mutual correlations with the presented groups of factors. All other elements are located in the lower left quadrant (Q3), defined by negative values of both principal components (PC1 and PC2). The third group is formed by Cu ($r = -0.77$), Mn ($r = -0.75$) and Ni ($r = -0.72$), which means that the content of Ba, Ca and P is negatively influenced by other elements strongly related to the factors PC1 and PC2. As ($r = -0.88$) was also very strongly correlated with the first component, while the correlation of Al ($r = -0.70$) was slightly weaker. In turn, Se was negatively correlated with all three components in a range from -0.44 to -0.56 . Only K was most strongly and positively correlated with PC3 ($r = 0.66$).

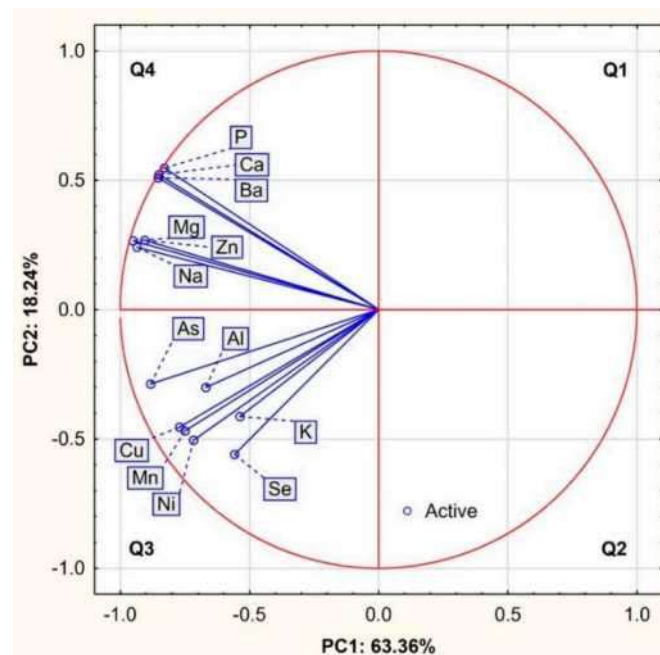


Figure 1. Projection of variables (bulk, trace and toxic elements) in a two-factor plane (PC1 × PC2).

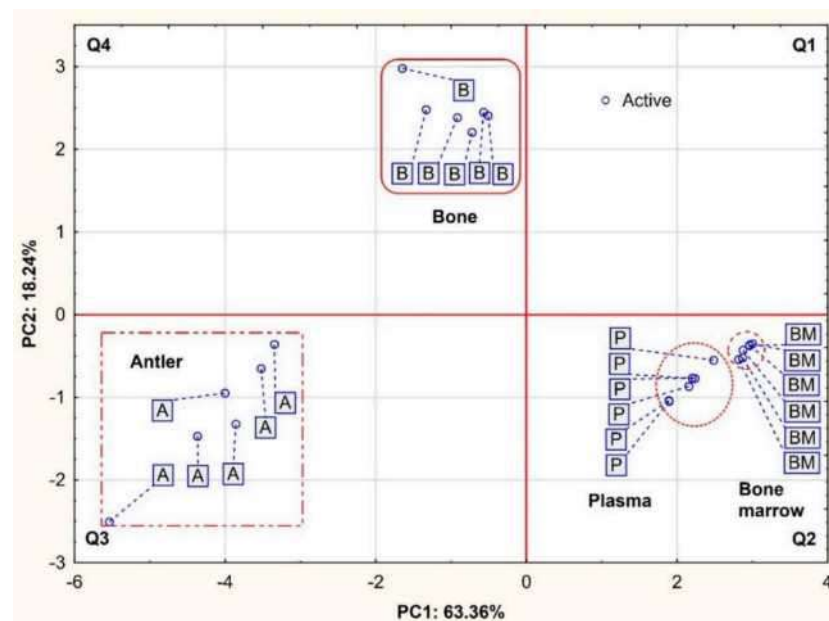


Figure 2. Projection of cases depending on the fallow deer tissues in the two-factor plane (PC1 × PC2).

Figure 2 presents the projection of cases depending on the animal tissues (B, A, P and BM) in the PC1 × PC2 coordinate system. In general, three groups can be distinguished considering the spatial clustering. The first group located in the lower right quadrant (Q2), i.e., designated by positive PC1 values and negative PC2 values, consisted of both soft tissues (bone marrow and plasma). In contrast, both hard tissues are located on the left side of the graph, with antlers in the Q3 area (negative PC1 and PC2 values) and bones in the Q4 area (negative PC1 and positive PC2 values). This spatial distribution of the tissue samples confirmed their significant variation in mineral composition. This is particularly evident with regard to hard tissue, i.e., antlers and bone.

4. Discussion

The research conducted on farmed fallow deer showed a high variability in the levels of elements in the tissues. This was probably caused by the different structures of these tissues, the physiological function, and hence, the different degrees of biotransformation of these elements, as well as the influence of environmental factors [20]. Moreover, mineral concentrations were given in fresh matter and not in dry matter, which vary very strongly between the examined tissues.

4.1. Soft Tissues (BM and P)

When comparing soft tissues, higher concentrations of Ca, P, Mg, Cr, Zn, Se, Al, Ba and Ni in bone marrow than in plasma were demonstrated. This research also confirms our previous study on the translocation of minerals within the body and depending on the consumed food and metabolic changes [8,15] due to the fact that blood does not accumulate minerals but only transports them and reflects their amount at a given time. Blood is a tissue with a high renewal rate due to the physiologically short life span of cells in the circulation. The production of these cells is dependent on a highly specialised bone marrow microenvironment, which regulates the quiescence, differentiation and self-renewal of haematopoietic stem cells [9].

Compared to our previous research [15], the contents of Mn and Se were similar to those of farmed red deer (0.027 mg/kg, 0.036 mg/kg, respectively) but higher than those of wild red deer (0.008 g/kg, 0.007 mg/kg, respectively). The contents of Li and Co in the bone marrow of fallow deer, as in both groups of *Cervus elaphus*, were below the detection level [15]. In the studies of Hassan et al. [16] on the bone marrow of reindeer, evidence of Cd, Pb, and As was demonstrated, and in the presented studies in fallow deer, the content of these elements was below the detection level. In the bone marrow of farmed and wild red deer living in the same area [8], higher concentrations of As, Ba, Pb and Ni were found only in wild animals (0.008 mg/kg, 0.969 mg/kg, 0.003 mg/kg, 0.042 mg/kg, respectively), while lower Al levels (2.638 mg/kg) and the same levels of Be, Cd, Sb (<LOD) and Ni (0.014 mg/kg) were found in farmed red deer compared to with fallow deer. The described differences in the concentrations of individual bulk, trace and toxic elements may result from differences between species, but they may also be caused by the different ages of the tested animals and the potential for assimilation of individual elements resulting from individual characteristics.

The Ca:P ratio in fallow deer bone marrow was 1.10 and was lower than that in red deer (1.62) [15]. The optimal concentrations of macro- and micronutrients that should be present in bone marrow in healthy cervids are not known. However, it seems probable that it is beneficial for these organisms to have sufficient concentrations of the analysed substances to form the skeletal system and antlers, which are shed every year, and for the proper course of hematopoiesis.

In previous studies on farmed fallow deer, the level of Ca and P in the plasma was higher in the group without supplements than in the present (2.27 mmol/L, 2.30 mmol/L, respectively) [21]. Kučer et al. [22] and Padilla et al. [23] showed lower concentrations of bulk elements in deer plasma than in the presented studies in fallow deer; similarly, Kuba et al. [24] obtained lower values of Ca, P, and Mg (average: 1.960 mmol/L, 1.836 mmol/L 0.606 mmol/L, respectively) in the plasma of farmed red deer throughout the period of monthly analyses. These differences may result from interspecies differences, but also from the lack of stability of the chemical composition of the plasma, which reacts dynamically to the supply of nutrients and environmental conditions [22]. Minerals are mandatory for the development of effective haematopoiesis, and the absence of these elements can have a deep impact on blood cell formation and/or blood cell functions. Minerals can likely influence haematopoietic functions; therefore, providing proper nutrition should prevent haematopoietic diseases [9].

The Ca:P ratio in the plasma of fallow deer was 1.42 and was higher compared to the results obtained in the group without supplements in the authors' earlier studies (0.98) [21].

4.2. Hard Tissues (B and A)

The highest concentrations of Ca, P and Ba were recorded in fallow deer bone tissue, which is not a surprising result because they are the basic elements of the skeletal system, while Mg, K, Na, Li, Cr, Mn, Co, Cu, Zn, Se, Mo, Be, Al, As, Sb, Pb and Ni were detected in antlers. Minerals such as Co, Cd, and Pb were recorded only in the bones and antlers of animals, Be only in the antlers, and Sb in the plasma and antlers. This confirmed the possibility of some minerals accumulating on the basis of exchange. For example, Mg is required to maintain the correct structure of the calcium phosphate crystals that form the antlers. Moreover, it is irreplaceable in the case of large Ca deficiencies, as it is the divalent cation that is incorporated into the phosphate salts to form a rare form of apatite that is part of the bone mass [25–28]. This replacement with divalent cations occurs most often when the Ca demand cannot be met by the skeletal system. Mg is probably the basic building material, but it is not the only one because other minerals, including toxic elements, also have such properties, especially in times of critical demand for Ca [24]. Not surprisingly, some toxic elements were only found in the bones and antlers. In addition, their higher concentrations were recorded in the antlers of animals, which confirmed the thesis that they were moved between the tissues, BM, P, and B, and incorporated into the new antlers that grow every year, even though there were no low levels of Ca in the examined tissues. In addition, trace elements easily accumulate in the skeletal system without the possibility of biological degradation.

In the authors' previous studies, farm fallow deer from the group without supplements showed a lower concentration of Ca (205,000 mg/kg), P (97,000 mg/kg) and Na (5030 mg/kg) and similar Mg (4410 mg/kg) but higher K (460 mg/kg) concentrations in bones compared to the group of animals in the presented study [21]. On the contrary, the levels of Ca (175,000 mg/kg), Mg (4090 mg/kg), and K (570 mg/kg) in the antlers were lower than in the presented group of animals, while the concentration of P (83,500 mg/kg) was similar, and the content of Na (510,800 mg/kg) was higher than in previous studies [21]. This might have been caused by the periodic drought that took place in 2021 and thus affected the different mineral contents in pasture plants available to animals. Chemical analyses of soils and grasses indicated that the greatest mineral deficiencies occur in the dry season [29–31]. It was also found that the concentrations of minerals in vegetation change without a predictable trend and may exceed the permissible levels specified for fodder [32,33].

In research conducted on farmed red deer, the contents of Ca (273,469 mg/kg), Mg (4537 mg/kg), and Na (7082 mg/kg) in bones were similar to those in fallow deer but higher in wild red deer [15], while the concentrations of P (110,062 mg/kg), Cr (0.131 mg/kg), Co (0.065 mg/kg), and Zn (63.343 mg/kg) were similar to the results obtained for wild red deer and higher in farm red deer. It was also shown that the level of K (434–551 mg/kg) in the bones of both groups of *Cervus elaphus* was higher compared to fallow deer, but the concentrations of Mn (0.788–1.388 mg/kg) and Se (0.003–0.006 mg/kg) were lower. K is an important bulk element because it contributes to the reduction in Ca loss in urine and to the development of antlers by mobilizing Ca from the skeleton [34]. Manganese, on the other hand, is very poorly absorbed by ruminants, and few studies have suggested that high levels of calcium and phosphorus in the diet may reduce the absorption of this micronutrient [25,35]. It seems that these minerals did not interfere with the absorption of Mn in the test animals. The Se content in the bones was lower than that reported by Olguin et al. [36] (0.42 mg/kg). These differences were likely due the fact that different deer species were analyzed in both studies or Se is mainly stored in muscles rather than in bones, and its deficiency leads to white muscle disease [37]. This may be the reason why bone Se levels do not reflect dietary Se levels.

The mineral composition of bones of one-year-old red deer [38] and fallow deer differed, as lower concentrations of Ca (259,500 mg/kg), Mg (4.220 mg/kg), K (238.9 mg/kg), Zn (41.3 mg/kg), and Mn (1.4 mg/kg) and higher P (122,800 mg/kg) and Ba (317.8 mg/kg) levels in red deer were shown.

The Ca:P ratio in fallow deer bones was 2.62, higher than (2.0) that recommended by Nowicka et al. [39]. A lower Ca:P ratio was usually associated with a higher Ca:Mg ratio in the hard tissues of deer [40].

Landette-Castilejos et al. [41,42] reported lower concentrations of Ca (203,000 mg/kg), Na (5670 mg/kg), Mn (3.52 mg/kg), Cu (0.29 mg/kg), and Zn (55.8 mg/kg) in the antlers of farmed and wild red deer compared to the fallow deer presented in this study, but higher levels of P (98,000 mg/kg), K (549 mg/kg), Co (0.17 mg/kg), and Se (0.71 mg/kg) and a similar Mg (4620 mg/kg) level. Fallow deer antlers, in comparison with *Cervus elaphus corsicanus* [43], contained more Ca (211,700 mg/kg), Mg (4460 mg/kg), K (360 mg/kg) and Na (5550 mg/kg) and less P (9900 mg/kg), Mn (0.47 mg/kg), Co (0.036 mg/kg), Zn (68.73 mg/kg), Se (1.07 mg/kg) and Cu (0.76 mg/kg). The mineral composition of the antlers of three deer species [44], *Cervus duvaceli*, *Axis*, and *Axis porcinus*, was also different from that of fallow deer because the contents of Ca (234,400–220,500 mg/kg), Cu (5.30–8.44 mg/kg), and Zn (32.14–35.81 mg/kg) were lower, P (126,200–108,300 mg/kg), Mg (7300–8000 mg/kg), Co (7.67–9.01 mg/kg), and Cd (1.58–2.18 mg/kg) were higher, and Pb (2.16–2.84 mg/kg) was similar. Additionally, in fallow deer, the Ca:P ratio was higher than in *Cervus duvaceli*, *Axis*, and *Axis porcinus* at the level of 2.76 [44] but slightly lower than in wild and farmed *Cervus elaphus* (2.95) [15]. Moreover, it was shown that the antlers of one-year-old red deer were characterized by a similar concentration of Ca (247,400 mg/kg); higher P (112,200 mg/kg), Ba (320 mg/kg) and Mn (17.1 mg/kg); and lower Mg (428 mg/kg), K (442 mg/kg) and Zn (45.4 mg/kg) [38].

Although the demand for Na is higher during the antler growth period [45], supplementation with Na and other minerals improves rumen buffering and at the same time increases the consumption of minerals [46]. Studies on farmed fallow deer showed a fairly high concentration of Na in hard tissues (bone 7539.4 mg/kg, antler 9204.3 mg/kg). Moreover, it had a significant positive effect on all bulk elements and most trace elements (except Se) in the tested animals, although there is usually an increased demand for this mineral during summer thermal stress and it is usually expelled with sweat [47]. However, it is more dangerous for animals to consume high doses of K in their diet because they inhibit the absorption of Mg and hence raise the possibility of pasture tetany [48], but our studies did not show a significant relationship between these bulk elements. High consumption of Ca and P may also be disadvantageous because they reduce the absorption of Mn [37], but also in this case, no significant relationship between these minerals was demonstrated. Cu deficiency, on the other hand, may occur not only at the level of 5 mg/kg Cu in feed but also with a Mo content above 3–5 mg/kg and Fe above 200 mg/kg [49]. The studied group of animals had access to licks, which could result in higher concentrations of some minerals in their tissues.

As far as we know, this was the first time that the concentration of Li in fallow deer tissues was determined. The effect of lithium on small ruminants has been investigated. Studies have found that 41% of lithium-deficient goats die in the first year of life. Additionally, skin lesions were observed in these animals [50,51]. A deficiency of these trace elements may also have consequences in deer breeding, especially since a significant relationship was shown in our research between Li and most bulk elements (except Ca) and trace elements (except Se).

Chromium is the most abundant mineral in the earth's crust and can be present in all states of oxidation. Various studies have shown that the primary role of Cr is to activate enzymes and to influence the metabolism of carbohydrates, lipids, and proteins. It is also an integral component of biologically active chromium or the glucose tolerance index, which enhances the action of the important hormone insulin. Insulin will not work effectively in a chromium-deficient diet [52]. This trace element is also necessary for ruminants to counteract stress and increase immunity [53,54]. This confirms its influence on many bulk and trace elements in the tissues of fallow deer.

Cappelli et al. [55] showed that Mn supplementation in red deer increased the mean content of Ca, Na, P, B, Co, Cu, K, Mn, Ni, and Se in the antlers (with a reduction in the Si

content), and also had a positive effect on the mechanical properties of the antlers of test animals. Our research also showed a positive relationship between the concentration of Mn and the content of certain minerals such as Mg, K, Na, Li, Cr, Co, Cu, Zn, and Mo in the tissues of fallow deer. However, no relationship was found between Mn and Ca.

The trace elements most important for the grazing of ruminants are Co, Cu, Se, and iodine [56]. Enzootic ataxia [57,58] and osteochondrosis [59,60] are now well-recognized syndromes of copper deficiency in cervids. There is evidence of osteoporosis that is associated with low tissue copper concentrations [61]; the growth of young deer may also be limited [61,62] and antler production may be reduced [63,64]. Another effect of Cu and Zn deficiency may be the reduction in the immune functions of animals [65]. It is worth mentioning that Cu supplementation in deer diet may modify the quality of meat by increasing the protein content [64]. The herd of Norwegian red deer (*Cervus elaphus*) [66] was characterized by insufficient amounts of Cu in the diet, as some animals died from exhaustion, although they had free access to salt licks containing 3000 mg Cu/kg. The herd evaluation showed a poor calf growth rate, low weight of adult hind legs, dull and pale fur, and cases of diarrhea. The studied fallow deer showed two times more Cu in their blood plasma than the described deer before the copper treatment period; moreover, no problems with their hair were observed.

Based on breeding standards, the serum Se concentration for white-tailed deer should range from 0.007 to 0.060 mg/kg [67]. In the tested animals, the concentration of Se in plasma was 0.009 mg/kg and fell within the recommended range. However, studies on farmed fallow deer showed a lower concentration of Se than recommended by Wilson and Grace [68] (Se < 130 nmol/L) for ruminants, similar to the results obtained by Cappelli et al. [55], which also showed a much higher content of this trace elements in deer antlers compared to fallow deer. Wilson and Grace [68] mentioned, however, that if deficiencies appear, it is most often in winter or summer, and the samples from the test animals were taken in late summer after the grazing period. Therefore, most probably, the positive effect of Se in blocking the absorption of toxic minerals (Pb, As) in the tissues of fallow deer was not shown, as indicated in the studies by Łabędź et al. [69] and Vukšić et al. [70]. Moreover, the addition of Se and vitamin E in the cervid diet caused an increase in the number of erythrocytes and level of hemoglobin [71]. The analyses carried out on fallow deer showed a positive correlation of Se with Al, As, Sb and Pb in the examined tissues. Therefore, we cannot confirm the effect of limiting the accumulation of unfavorable Se elements, but it can certainly prevent osteoporosis [72,73] because it has a beneficial effect on the concentration of Mg, Cr, and Zn in the tissues.

In mammals, Mo compounds, especially molybdates, reduce the availability of Cu [74]. Mathieu [75] demonstrated that the effect of molybdenum on animals can be seen at a concentration in the liver of <2 mg/kg regardless of the capture area. The studies on fallow deer showed much lower levels of Mo in the tissues; therefore, it probably did not have a negative effect on the content of other minerals, especially Cu. However, research by Mason et al. [76] and Freudenberger et al. [77] showed that the effect of molybdates on Cu metabolism in cervids may be lower than in other ruminants.

The optimal concentrations of bulk and trace elements that should be present in healthy fallow deer have not been thoroughly investigated. However, it seems likely that it is beneficial for their bodies to have sufficient concentrations of the analyzed substances to form the skeletal system and antlers that are shed every year and to prevent periodic osteoporosis. Unfortunately, the presence of even the smallest amounts of toxic elements may contribute to problems with the skeletal system. This was confirmed by our results obtained in fallow deer, as a significant negative relationship between Ca and Cd, Ca and Pb, and P and Pb was shown. It has been shown that deer bone tissues can serve as environmental bioindicators [78] because accumulate trace elements over years or decades [79]. In humans, for instance, the biological half-life of trace elements in bone tissue lasts up to 30 years, and their content in bones is up to 90% [80]. Moreover, such

heavy metals as lead or cadmium are mainly deposited in bone tissues through their interactions with calcium [81].

In fallow deer, as well as in farmed and wild red deer living in the same area, the presence of toxic elements in their tissues was demonstrated: lower concentrations of Sb, Ba, Pb, As and Be, higher Cd concentrations, and similar As and Ba levels [8]. Bone tissues can therefore serve as a reservoir of heavy metals [82]. There are no precise quantitative data on the rate of remodeling of the deer skeletal system; most data concern the movement of minerals and other substances from the bone to the antler as it grows [83]. The significant positive effect of Al and As on most bulk and trace elements (except Li) is noteworthy. Even the smallest amounts of Al and As can have a negative effect on the bone tissues of animals, which was described in more detail in the studies by Tajchman et al. [8], Odstřil et al. [84], Hu et al. [85], and Priest [86]. This phenomenon may be even more dangerous for deer suffering from cyclical physiological osteoporosis during antler growth [2,87–90]. Moreover, *in vivo* studies have shown that the accumulation of Al in the bones lowers the levels of Ca, Mg and P, inhibiting the mineralization process [91].

5. Conclusions

The conducted research showed that the bones contain the most Ca, P, Mg, Cr, Zn, Se, Al, Ba and Ni compared to plasma, which results from the nature of the tissues studied and their role in the animal organism. Among trace elements, the Co, Cd, and Pb were only detected in the bones and antlers of animals, while Be was only detected in antlers, and Sb was only detected in plasma and antlers. These results confirmed the possibility of the migration and concentration of minerals in the bone tissue by the exchange processes of divalent cations. Moreover, the higher contents of toxic elements (Be, Al, As, Cd, Sb, Pb and Ni) in the first antlers of young fallow deer compared to the bones indicated a high demand of minerals during the formation of antlers in young growing cervids as well as their high absorption despite the adequate supplementation of Ca.

The research also showed a significant negative correlation between Ca and Cd, Ca and Pb, and P and Pb ($r_s = -0.70$, $r_s = -0.80$, and $r_s = -0.66$, respectively; $p < 0.05$) in the tissues. Despite the use of a properly balanced diet, it is impossible to avoid the adherence of harmful compounds by animals and their incorporation into tissue structures, which may have toxic effects to the body's health.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani12202764/s1>, Table S1: Composition of Josera Phosphoreimer multi-ingredient licks (Josera, Poland).

Author Contributions: Conceptualization: Ž.S.-B. and K.T.; Methodology: Ž.S.-B. and A.U.-J.; Formal Analysis: K.T. and M.F.; Investigation: Ž.S.-B., A.U.-J. and M.P.; Statistical analysis: M.F.; Writing—Original Draft Preparation: Ž.S.-B. and K.T.; Writing—Review and Editing: K.T., M.F. and A.U.-J.; Supervision: K.T. and M.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: All analyses were conducted according to the approval of the Local Ethics Committee No. 069, Resolution No. 24/2021.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or supplementary material.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Landete-Castillejos, T.; Currey, J.D.; Estévez, J.A.; Fierro, Y.; Calatayud, A.; Ceacero, F.; García, A.J.; Gallego, L. Do drastic weather effect on diet influence changes in chemical composition, mechanical properties and structure in deer antlers? *Bone* **2010**, *47*, 815–825. [\[CrossRef\]](#)
- Zannèse, A.; Morellet, N.; Targhetta, C.; Coulon, A.; Fuser, S.; Hewison, A.J.M.; Ramanzin, M. Spatial structure of roe deer populations: Towards defining management units at a landscape scale. *J. Appl. Ecol.* **2006**, *43*, 1087–1097. [\[CrossRef\]](#)
- Gómez, J.A.; Landete-Castillejos, T.; García, A.J.; Gaspar-López, E.; Estévez, J.A.; Gallego, L. Lactation growth influences mineral composition of first antler in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Wildl. Biol.* **2008**, *14*, 331–338. [\[CrossRef\]](#)
- Gómez, J.A.; Ceacero, F.; Landete-Castillejos, T.; Gaspar-López, E.; García, A.J.; Gallego, L. Factors affecting antler investment in Iberian red deer. *Anim. Prod. Sci.* **2012**, *52*, 867–873. [\[CrossRef\]](#)
- Weiss, D.J.; Wardrop, K.J. *Schalm's Veterinary Hematology*, 6th ed.; Blackwell Publishing: Ames, IA, USA, 2010.
- Tajchman, K.; Steiner-Bogdaszewska, Ż.; Kowalczyk-Vasilev, E.; Dąbrowski, R. Effect of Ca and P supplementation on the haematological parameters and content of selected minerals in the blood of young farmed fallow deer males (*Dama dama*). *Biologia* **2020**, *75*, 401–411. [\[CrossRef\]](#)
- Tajchman, K.; Bogdaszewski, M.; Kowalczyk-Vasilev, E.; Dąbrowski, R. Impact of day length and total protein content in the diet of farmed fallow deer (*Dama dama*) on their plasma mineral level and haematological indices. *Appl. Ecol. Environ. Res.* **2019**, *17*, 14729–14750. [\[CrossRef\]](#)
- Tajchman, K.; Ukalska-Jaruga, A.; Bogdaszewski, M.; Pecio, M.; Dzik-Michalska, K. Accumulation of toxic elements in bone and bone marrow of deer living in various ecosystems. A case study of farmed and wild-living deer. *Animals* **2020**, *10*, 2151. [\[CrossRef\]](#)
- Oliveira, D.C.; Nogueira-Pedro, A.; Santos, E.W.; Hastreiter, A.; Silva, B.G.; Borelli, P.; Fock, R.A. A review of select minerals influencing the haematopoietic process. *Nutr. Res. Rev.* **2018**, *31*, 267–280. [\[CrossRef\]](#)
- Silberstein, L.; Anastasi, J. *Hematology: Basic Principles and Practice*, 7th ed.; Hoffman, R., Benz, E., Heslop, H., Weitz, J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018.
- Cygan-Szczegieliński, D. The levels of mineral elements and toxic metals in the *longissimus lumborum* muscle, hair and selected organs of red deer (*Cervus elaphus* L.) in Poland. *Animals* **2021**, *11*, 1231. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- García, A.J.; Landete-Castillejos, T.; Molina, A.; Albinana, B.; Fernandez, C.; Garde, J.; Gallego, L. Lactation curves in captive Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *J. Anim. Sci.* **1999**, *77*, 3150–3155. [\[CrossRef\]](#)
- Kudrnáčová, E.; Bartoň, L.; Bureš, D.; Hoffman, L.C. Carcass and meat characteristics from farm-raised and wild fallow deer (*Dama dama*) and red deer (*Cervus elaphus*): A review. *Meat Sci.* **2018**, *141*, 9–27. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bąkowska, M.; Pilarczyk, B.; Tomza-Marciniak, A.; Udała, J.; Pilarczyk, R. The bioaccumulation of lead in the organs of roe deer (*Capreolus capreolus* L.), red deer (*Cervus elaphus* L.), and wild boar (*Sus scrofa* L.) from Poland. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *348*, 14373–14382. [\[CrossRef\]](#)
- Tajchman, K.; Ukalska-Jaruga, A.; Bogdaszewski, M.; Pecio, M.; Janiszewski, P. Comparison of the accumulation of macro- and microelements in bone marrow and bone of wild and farmed red deer (*Cervus elaphus*). *BMC Vet. Res.* **2021**, *17*, 324. [\[CrossRef\]](#)
- Hassan, A.A.; Rylander, C.; Sandanger, T.M.; Brustad, M. Copper, cobalt and chromium in meat, liver, tallow and bone marrow from semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus* L.) in Northern Norway. *Food Public Health* **2013**, *3*, 154–160. [\[CrossRef\]](#)
- DEFRA Code of Recommendations for the Welfare of Farmed Deer. 2022. Available online: <http://www.defra.gov.uk/animalh/welfare/farmed/othersps/deer/pb0055/deercode.htm> (accessed on 20 February 2022).
- FEDFA Federation of European Deer Farmers Associations. 2022. Available online: <https://www.fedfa.com/> (accessed on 20 February 2022).
- Mattiello, S. Welfare issues of modern deer farming. *Ital. J. Anim. Sci.* **2009**, *8*, 205–217. [\[CrossRef\]](#)
- Hoffman, L.C.; Kroucamp, M.; Manley, M. Meat quality characteristics of springbok (*Antidorcas marsupialis*). Chemical composition of springbok meat as influenced by age, gender and production region. *Meat Sci.* **2007**, *76*, 762–767. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Tajchman, K.; Bogdaszewski, M.; Kowalczyk-Vasilev, E. Effects of supplementation with different levels of calcium and phosphorus on mineral content of first antler, bone, muscle, and liver of farmed fallow deer (*Dama dama*). *Can. J. Anim. Sci.* **2020**, *100*, 17–26. [\[CrossRef\]](#)
- Kučer, N.; Kuleš, J.; Barić-Rafaj, R.; Tončić, J.; Vicković, I.; Štoković, I.; Potočnjak, D.; Šoštarić, B. Mineral concentration in plasma of young and adult red deer. *Vet. Arch.* **2013**, *83*, 425–434. Available online: <https://hrcak.srce.hr/105559> (accessed on 1 September 2022).
- Padilla, S.; Bouda, J.; Quiroz-Rocha, G.F.; Dávalos, J.L.; Sánchez, A. Biochemical and haematological values in venous blood of captive red deer (*Cervus elaphus*) at high altitude. *Acta Vet. Brno* **2000**, *69*, 327–331. [\[CrossRef\]](#)
- Kuba, J. Analysis of changes in the concentration of Ca, P and Mg in blood serum of red deer (*Cervus elaphus*) immature males in farm breeding. *Acta Sci. Pol. Zootech.* **2014**, *13*, 31–40. Available online: https://asp.zut.edu.pl/2014/13_2/asp-2014-13-2-234.pdf (accessed on 1 September 2022).
- Grace, N.D.; Castillo-Alcala, F.; Wilson, P.R. Amounts and distribution of mineral elements associated with live weight gains of grazing red deer (*Cervus elaphus*). *N. Z. J. Agric. Res.* **2008**, *51*, 439–449. [\[CrossRef\]](#)

26. Landete-Castillejos, T.; García, A.; Gallego, L. Body weight, early growth and antler size influence antler bone mineral composition of Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Bone* **2007**, *40*, 230–235. [\[CrossRef\]](#)
27. Landete-Castillejos, T.; Estévez, J.A.; Martínez, A.; Ceacero, F.; García, A.J.; Gallego, L. Does chemical composition of antler bone reflect the physiological effort made to grow it? *Bone* **2007**, *40*, 1095–1102. [\[CrossRef\]](#)
28. Landete-Castillejos, T.; Currey, J.D.; Estévez, J.A.; Gaspar-López, E.; García, A.; Gallego, L. Influence of physiological effort of growth and chemical composition on antler bone mechanical properties. *Bone* **2007**, *41*, 794–803. [\[CrossRef\]](#)
29. Kreulen, D. Wildebeest habitat selection in the Serengeti plains, Tanzania, in relation to calcium and lactation: A preliminary report. *Afr. J. Ecol.* **1975**, *13*, 297–304. [\[CrossRef\]](#)
30. McNaughton, S.J. Mineral nutrition and spatial concentrations of African ungulates. *Nature* **1988**, *334*, 343–345. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. McNaughton, S.J. Mineral nutrition and seasonal movements of African migratory ungulates. *Nature* **1990**, *345*, 613–615. [\[CrossRef\]](#)
32. Alldredge, M.W.; Peek, J.M.; Wall, W.A. Nutritional quality of forages used by elk in northern Idaho. *J. Range Manag.* **2002**, *55*, 253–259. [\[CrossRef\]](#)
33. Rautiainen, H.; Bergvall, U.A.; Felton, A.M.; Tigabu, M.; Kjellander, P. Nutritional niche separation between native roe deer and the nonnative fallow deer—A test of interspecific competition. *Mammal Res.* **2021**, *66*, 443–455. [\[CrossRef\]](#)
34. Rafferty, K.; Davies, K.M.; Heaney, R.P. Potassium intake and the calcium economy. *J. Am. Coll. Nutr.* **2005**, *24*, 99–106. [\[CrossRef\]](#)
35. Landete-Castillejos, T.; Molina-Quilez, I.; Estevez, J.A.; Ceacero, F.; García, A.J.; Gallego, L. Alternative hypothesis for the origin of osteoporosis: The role of Mn. *Front. Biosci.* **2012**, *E4*, 1385–1390. [\[CrossRef\]](#)
36. Olguin, C.A.; Landete-Castillejos, T.; Ceacero, F.; García, A.J.; Gallego, L. Effects of Feed Supplementation on Mineral Composition, Mechanical Properties and Structure in Femurs of Iberian Red Deer Hinds (*Cervus elaphus hispanicus*). *PLoS ONE* **2013**, *8*, e65461. [\[CrossRef\]](#)
37. McDowell, L.R. *Minerals in Animal and Human Nutrition*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2003.
38. Kierdorf, U.; Stoffels, D.; Kierdorf, H. Element concentrations and element ratios in antler and pedicle bone of yearling red deer (*Cervus elaphus*) stags—a quantitative X-ray fluorescence study. *Biol. Trace Elem. Res.* **2014**, *162*, 124–133. [\[CrossRef\]](#)
39. Nowicka, W.; Machoy, Z.; Gutowska, I.; Nociński, I.; Piotrowska, S.; Chlubek, D. Contents of calcium, magnesium, and phosphorus in antlers and cranial bones of the European Red Deer (*Cervus elaphus*) from different region in western Poland. *Pol. J. Environ. Stud.* **2006**, *15*, 297–301.
40. Azorit, C.; Oya, A. Modeling the age-related shift in the mineral content of hard tissues in two Mediterranean deer species. *Arch. Oral Biol.* **2021**, *122*, 104999. [\[CrossRef\]](#)
41. Landete-Castillejos, T.; García, A.; Ceacero, F.; Gallego, L. The composition and mechanical properties of deer antlers and bones as an information source to manage ecosystems. *Ecosistemas* **2013**, *22*, 68–75. [\[CrossRef\]](#)
42. Landete-Castillejos, T.; Currey, J.D.; Ceacero, F.; García, A.J.; Gallego, L.; Gomez, S. Does nutrition affect bone porosity and mineral tissue distribution in deer antlers? The relationship between histology, mechanical properties and mineral composition. *Bone* **2012**, *50*, 245–254. [\[CrossRef\]](#)
43. Cappelli, J.; Atzori, A.S.; Ceacero, F.; Landete-Castillejos, T.; Cannas, A.; Gallego, L.; Garcia-Diaz, A.J. Morphology, chemical composition mechanical properties and structure in antler of Sardinian red deer (*Cervus elaphus corsicanus*). *Hystrix Ital. J. Mammal.* **2017**, *28*, 110–112. [\[CrossRef\]](#)
44. Pathak, N.N.; Pattanaik, A.K.; Patra, R.C.; Arora, B.M. Mineral composition of antlers of three deer species reared in captivity. *Small Rumin. Res.* **2001**, *42*, 61–65. [\[CrossRef\]](#)
45. Hellgren, E.C.; Pitts, W.J. Sodium economy in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Physiol. Zool.* **1997**, *70*, 547–555. [\[CrossRef\]](#)
46. Beede, D.K.; Collier, R.J. Potential nutritional strategies for intensively managed cattle during thermal stress. *J. Anim. Sci.* **1986**, *62*, 543–554. [\[CrossRef\]](#)
47. Kadzere, C.T.; Murphy, M.R.; Silanikove, N.; Maltz, E. Heat stress in lactating dairy cows: A review. *Livest. Prod. Sci.* **2002**, *77*, 59–91. [\[CrossRef\]](#)
48. Ram, L.; Schonewille, J.T.; Martens, H.; van't Klooster, A.T.; Beynen, A.C. Magnesium absorption by withers fed potassium bicarbonate in combination with different dietary magnesium concentrations. *J. Dairy Sci.* **1998**, *81*, 2485–2492. [\[CrossRef\]](#)
49. Berger, L.L. *Salt and Trace Minerals for Livestock, Poultry and Other Animals*; Salt Institute: Alexandria, VA, USA, 1987.
50. Anke, M.; Arnhold, W.; Schafer, U.; Müller, R. Recent progress in exploring the essentiality of the ultratrace element lithium to the nutrition of animals and man. *Biomed. Res. Trace Elem.* **2005**, *16*, 169–176. [\[CrossRef\]](#)
51. O'Dell, B.L.; Sunde, R.A. *Handbook of Nutritional Essential Mineral Elements*; CRC Press: New York, NY, USA, 2019.
52. Roy, D.; Keshri, A. *Wpływ Suplementacji Chromem na Zwierzęta Gospodarskie i Ptaki Drobiowe: Suplementacja Chromem w Paszy Dla Zwierząt*; Polish Edition; Wydawnictwo Nasza Wiedza: Warszawa, Poland, 2020.
53. Chang, T.T. A selective medium for Phellinus noxins. *Eur. J. For. Pathol.* **1995**, *25*, 185–190. [\[CrossRef\]](#)
54. Moosie-Shageer, S.; Mowat, D.N. Effects of level of supplemental chromium on performance, serum constituents, and immune status of stressed feeder calves. *J. Anim. Sci.* **1993**, *71*, 232–238. [\[CrossRef\]](#)
55. Cappelli, J.; Garcia, A.; Ceacero, F.; Gomez, S.; Luna, S.; Gallego, L.; Gambin, P.; Landete-Castillejos, T. Manganese supplementation in deer under balanced diet increases impact energy and contents in minerals of antler bone tissue. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0132738. [\[CrossRef\]](#)

56. Grace, N.D.; Wilson, P.R. Trace element metabolism, dietary requirements, diagnosis and prevention of deficiencies in deer. *N. Z. Vet. J.* **2002**, *50*, 252–259. [\[CrossRef\]](#)
57. Xubin, W. Report on ‘Huangyao Disease’ (Loin Wobble disease) in Sika deer. In Proceedings of the 1996 International Symposium on Deer Science and Deer Products, Changchun, China, 23–26 July 1996; pp. 192–194.
58. Mackintosh, C.G.; Orr, M.B.; Turner, K. Enzootic ataxia in wapiti. In *Proceedings of a Deer Course for Veterinarians*, No. 3; Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association: Wellington, New Zealand, 1986; pp. 165–169.
59. Thompson, K.G.; Audigé, L.; Arthur, D.G.; Julian, A.F.; Orr, M.B.; McSporran, K.D.; Wilson, P.R. Osteochondrosis associated with copper deficiency in young farmed red deer and wapiti X red hybrids. *N. Z. Vet. J.* **1994**, *42*, 137–143. [\[CrossRef\]](#)
60. Audigé, L.; Wilson, P.R.; Morris, R.S.; Davidson, G.W. Osteochondrosis, skeletal abnormalities and enzootic ataxia associated with copper deficiency in a farmed red deer (*Cervus elaphus*) herd. *N. Z. Vet. J.* **1995**, *43*, 70–76. [\[CrossRef\]](#)
61. Ellison, R.S. Trace elements in deer. In *Proceedings of a Deer Course for Veterinarians*, No. 12; Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association: Wellington, New Zealand, 1995; pp. 57–68.
62. Wilson, P.R. Body weight and serum copper concentrations of farmed red deer stags following oral copper oxide wire administration. *N. Z. Vet. J.* **1989**, *37*, 94–97. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Walker, I.H.; Wilson, P.R.; Beckett, S. Copper and velvet antler production. A clinical trial. In *Proceedings of a Deer Course for Veterinarians*, No. 14; Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association: Wellington, New Zealand, 1997; pp. 219–227.
64. Serrano, M.P.; Maggiolino, A.; Lorenzo, J.M.; De Palo, P.; García, A.; Landete-Castillejos, T.; Gambín, P.; Cappelli, J.; Domínguez, R.; Pérez-Barbería, F.J.; et al. Meat quality of farmed red deer fed a balanced diet: Effects of supplementation with copper bolus on different muscles. *Animal* **2019**, *13*, 888–896. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Bartoskewitz, M.L.; Hewitt, D.G.; Laurenz, J.C.; Pitts, J.S.; Bryant, F.C. Effect of dietary copper and zinc concentrations on white-tailed deer antler growth, body size, and immune system function. *Small Rumin. Res.* **2007**, *73*, 87–94. [\[CrossRef\]](#)
66. Handeland, K.; Bernhoft, A.; Aartun, M.S. Copper deficiency and effects of copper supplementation in a herd of red deer (*Cervus elaphus*). *Acta Vet. Scand.* **2008**, *50*, 8. [\[CrossRef\]](#)
67. McDowell, L.R.; Forrester, D.J.; Linda, S.B.; Wright, S.D.; Wilkinson, N.S. Selenium status of white-tailed deer in Southern Florida. *J. Wildl. Dis.* **1995**, *31*, 205–211. [\[CrossRef\]](#)
68. Wilson, P.R.; Grace, N.D. A review of tissue reference values used to assess the trace element status of farmed red deer (*Cervus elaphus*). *N. Z. Vet. J.* **2001**, *49*, 126–132. [\[CrossRef\]](#)
69. Łabadz, D.; Skolarczyk, J.; Pekar, J.; Nieradko-Iwanicka, B. Analysis of the influence of selected elements on the functioning of the bone tissue. *J. Educ. Health Sport* **2017**, *7*, 202–209. [\[CrossRef\]](#)
70. Vukšić, N.; Šperanda, M.; Lončarić, Z.; Didara, M.; Ludek, E.; Budor, I. The effect of dietary selenium addition on the concentrations of heavy metals in the tissues of fallow deer (*Dama dama* L.) in Croatia. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 11023–11033. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
71. Snarska, A.; Wysocka, D.; Rytel, L.; Żarczyńska, K.; Sobiech, P.; Gonkowski, S. The influence of selenium and vitamin E supplementation on cytological assessment of red blood cell line of bone marrow in fallow deer kept in captivity. *Pol. J. Vet. Sci.* **2018**, *21*, 431–436. [\[CrossRef\]](#)
72. Liu, H.; Lu, Q.; Huang, K. Selenium suppressed hydrogen peroxide-induced vascular smooth muscle cells calcification through inhibiting oxidative stress and ERK activation. *J. Cell. Biochem.* **2010**, *111*, 155664. [\[CrossRef\]](#)
73. Liu, H.; Bian, W.; Liu, S.; Huang, K. Selenium protects bone marrow stromal cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation by suppressing oxidative stress and ERK signaling pathway. *Biol. Trace Elem. Res.* **2012**, *150*, 441–450. [\[CrossRef\]](#)
74. Mason, J.; Williams, S.; Harrington, R.; Sheahan, B. Some preliminary studies on the metabolism of Mo-labelled compounds in deer. *Ir. Vet. J.* **1984**, *38*, 171–175.
75. Mathieu, S.F. Toxic Effects of Molybdenum on Forest Small Mammals at the Endako Mine in North-Central British Columbia. Master’s Thesis, College of Graduate Studies and Research, Department of Biology, University of Saskatchewan Saskatoon, Saskatoon, SK, Canada, 1996. Available online: <http://hdl.handle.net/10388/etd-11142008-151209> (accessed on 1 September 2022).
76. Mason, J.; Kelleher, C.A.; Letters, J. The demonstration of protein-bound 99Mo-di- and trithiomolybdate in sheep plasma after the infusion of ggMo-labelled molybdate into the rumen. *Br. J. Nut.* **1982**, *48*, 391–397. [\[CrossRef\]](#)
77. Freudenberger, D.O.; Familton, A.S.; Sykes, A.R. Comparative aspects of copper metabolism in silage-fed sheep and deer (*Cervus elaphus*). *J. Agric. Sci.* **1987**, *108*, 1–7. [\[CrossRef\]](#)
78. Cappelli, J.; Frasca, I.; Garcia, A.; Landete-Castillejos, T.; Luccarini, S.; Gallego, L.; Morimando, F.; Varuzza, P.; Zaccaroni, M. Roe deer as a bioindicator: Preliminary data on the impact of the geothermal power plants on the mineral profile internal and bone tissues in Tuscany (Italy). *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2020**, *27*, 36121–36131. [\[CrossRef\]](#)
79. Glimcher, M.J. Bone: Nature of the calcium phosphate crystals and cellular, structural and physical chemical mechanisms in their formation. *Rev. Miner. Geochem.* **2006**, *64*, 223–282. [\[CrossRef\]](#)
80. Zaichick, S.; Zaichick, V.; Karandashev, V.K.; Moskvina, I.R. The effect of age and gender on 59 trace-element contents in human rib bone investigated by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Biol. Trace Elem. Res.* **2011**, *143*, 41–57. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
81. Srebočan, E.; Janicki, Z.; Crnić, A.P.; Tomljanović, K.; Šebečić, M.; Konjević, D. Cadmium, lead and mercury concentrations in selected red deer (*Cervus elaphus* L.) tissues from north-eastern Croatia. *J. Environ. Sci. Health A* **2012**, *47*, 2101–2108. [\[CrossRef\]](#)

82. Gizejewska, A.; Szkoda, J.; Nawrocka, A.; Zmudzki, J.; Gizejewski, Z. Can red deer antlers be used as an indicator of environmental and edible tissues' trace element contamination? *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2017**, *23*, 11630–11638. [[CrossRef](#)]
83. Dryden, G.M. Nutrition of antler growth in deer. *Anim. Prod. Sci.* **2016**, *56*, 962–970. [[CrossRef](#)]
84. Odstrcil, A.D.C.A.; Carino, S.N.; Ricci, J.C.D.; Mandalunis, P.M. Effect of arsenic in endochondral ossification of experimental animals. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2010**, *62*, 243–249. [[CrossRef](#)]
85. Hu, Y.C.; Cheng, H.L.; Hsieh, B.S.; Huang, L.W.; Huang, T.C.; Chang, K.L. Arsenic trioxide affects bone remodeling by effects on osteoblast differentiation and function. *Bone* **2012**, *50*, 1406–1415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Priest, N.D. The biological behaviour and bioavailability of aluminium in man, with special reference to studies employing aluminium as a tracer: Review and study update. *J. Environ. Monit.* **2004**, *6*, 375–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Borsy, A.; Podani, J.; Stéger, V.; Balla, B.; Horváth, A.; Kósa, J.P.; Gyurjan, I.; Molnár, A.; Szabolcsi, Z.; Szabó, L.; et al. Identifying novel genes involved in both deer physiological and human pathological osteoporosis. *Mol. Genet. Genom.* **2009**, *281*, 301–313. [[CrossRef](#)]
88. Stéger, V.; Molnár, A.; Borsy, A.; Gyurján, I.; Szabolcsi, Z.; Dancs, G.; Molnár, J.; Papp, P.; Nagy, J.; Puskás, L.; et al. Antler development and coupled osteoporosis in the skeleton of red deer *Cervus elaphus*: Expression dynamics for regulatory and effector genes. *Mol. Genet. Genom.* **2010**, *284*, 273–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Ceacero, F. Lon or heavy? Physiological constraints in the evolution of antlers. *J. Mammal. Evol.* **2015**, *23*, 2209–2216. [[CrossRef](#)]
90. Ceacero, F.; Pluháček, J.; Landete-Castillejos, T.; García, A.J.; Gallego, L. Inter-specific differences in the structure and mechanics but not the chemical composition of antlers in three deer species. In *Annales Zoologici Fennici*; Finnish Zoological and Botanical Publishing Board: Helsinki, Finland, 2015; Volume 52, pp. 368–376. [[CrossRef](#)]
91. Li, X.; Hu, C.; Zhu, Y.; Sun, H.; Li, Y.; Zhang, Z. Effects of aluminum exposure on bone mineral density, mineral, and trace elements in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **2011**, *143*, 378–385. [[CrossRef](#)]

Table S1. Composition of Josera Phosphoreimer multi-ingredient licks (Josera, Poland)

Components		Content (per 1 kg)
Ca	%	5.00
P	%	10.00
Na	%	7.00
Mg	%	7.50
Ca / P		0.5:1
Vitamin A	j.m.	650, 000.00
Vitamin D3	j.m.	120, 000.00
Vitamin E	mg	1 500.00
Zn (as zinc oxide)	mg	8 000.00
Mn (as manganese chelate of glycine hydrate)	mg	4 000.00
Mn (as manganese (II) oxide)	mg	4 000.00
Cu (as copper sulphate pentahydrate)	mg	1 200.00
I	mg	100.00
Co	mg	22.00
Se (as sodium selenite)	mg	40.00

Załącznik 2

**Oświadczenia doktoranta oraz współautorów dotyczące
ich wkładu w przygotowanie opublikowanych prac
naukowych**

Praca 1

Żaneta Steiner-Bogdaszewska
Stacja Badawcza Instytutu Parazytologii PAN
Kosewo Górne 7
11-700 Mrągowo
724 344 229
zaneta.steiner@gmail.com

Lublin, 09.10.2023 r.

**Rada Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Steiner-Bogdaszewska Ż.**, Tajchman K., Domaradzki P., Florek M. (2022) Composition of fatty acids in bone marrow of red deer from various ecosystems and different categories. *Molecules*, 27(8):2511. DOI: 10.3390/molecules27082511

Mój wkład pracy w publikację wynosił 70% i polegał na zaplanowaniu i przeprowadzeniu doświadczenia, gromadzeniu i analizie danych, redagowaniu manuskryptu oraz korekcie po recenzjach.

.....
Ż. Steiner-Bogdaszewska

Podpis

Dr hab. Katarzyna Tajchman prof. UPL
Katedra Etologii Zwierząt i Lowiectwa
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Lublin, 25.09.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Steiner-Bogdaszewska Ż., Tajchman K., Domaradzki P., Florek M. (2022) Composition of fatty acids in bone marrow of red deer from various ecosystems and different categories. Molecules, 27(8):2511* mój udział polegał na konceptualizacji pracy, opracowaniu metodologii, analizie formalnej, pisaniu publikacji, korekcie po recenzjach, na nadzorze nad badaniami, oraz roli autora korespondencyjnego. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Profil kwasów tłuszczowych i skład mineralny szpiku kostnego jeleniowatych w zależności od warunków życia lub utrzymania” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr Żanety Steiner-Bogdaszewskiej.



Podpis

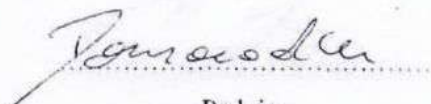
Dr hab. Piotr Domaradzki prof. UPL
Katedra Oceny Jakości
i Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych
Zakład Instrumentalnej Analizy Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Lublin, 25.09.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Steiner-Bogdaszewska Z, Tajchman K., Domaradzki P., Florek M. (2022) Composition of fatty acids in bone marrow of red deer from various ecosystems and different categories. Molecules, 27(8):2511* mój udział polegał na opracowaniu metodologii, pisaniu publikacji, korekcie po recenzjach oraz roli autora korespondencyjnego. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

Wyrazam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Profil kwasów tłuszczowych i skład mineralny szpiku kostnego jeleniowatych w zależności od warunków życia lub utrzymania” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr Żanety Steiner-Bogdaszewskiej.



Podpis

Prof. dr hab. Mariusz Florek
Katedra Oceny Jakości
i Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Lublin, 25.09.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Steiner-Bogdaszewska Ż, Tajchman K., Domaradzki P., Florek M. (2022) Composition of fatty acids in bone marrow of red deer from various ecosystems and different categories. Molecules, 27(8):2511* mój udział polegał na opracowaniu metodologii, analizie formalnej, analizie statystycznej, pisaniu publikacji oraz na nadzorze nad badaniami. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Profil kwasów tłuszczowych i skład mineralny szpiku kostnego jeleniowatych w zależności od warunków życia lub utrzymania” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr Żanety Steiner-Bogdaszewskiej.



Podpis

Praca 2

Żaneta Steiner-Bogdaszewska
Stacja Badawcza Instytutu Parazytologii PAN
Kosewo Górne 7
11-700 Mrągowo
724 344 229
zaneta.steiner@gmail.com

Lublin, 09.10.2023 r.

Rada Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Steiner-Bogdaszewska Ż., Tajchman K., Domaradzki P., Florek M. (2022) Composition and fatty acid profile of bone marrow in farmed fallow deer (*Dama dama*) depending on diet. *Animals*, 7;12(8): 941. DOI: 10.3390/ani12080941.**

Mój wkład pracy w publikację wnosił 70% i polegał na zaplanowaniu i przeprowadzeniu doświadczenia, gromadzeniu danych, redagowaniu manuskryptu oraz korekcie po recenzjach.

.....*Ż. Steiner-Bogdaszewska*.....

Podpis

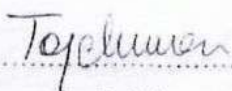
Dr hab. Katarzyna Tajchman prof. UPL
Katedra Etologii Zwierząt i Lowiectwa
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Lublin, 25.09.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Steiner-Bogdaszewska Z., Tajchman K., Domaradzki P., Florek M. (2022) Composition and fatty acid profile of bone marrow in farmed fallow deer (Dama dama) depending on diet. Animals, 7;12(8): 941* mój udział polegał na konceptualizacji pracy, opracowaniu metodologii, zbieraniu materiału biologicznego, prowadzeniu badań, pisaniu publikacji oraz roli autora korespondencyjnego. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Profil kwasów tłuszczowych i skład mineralny szpiku kostnego jeleniowatych w zależności od warunków życia lub utrzymania” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr Żanety Steiner-Bogdaszewskiej.


.....
Podpis

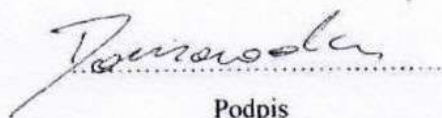
Dr hab. Piotr Domaradzki prof. UPL
Katedra Oceny Jakości
i Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych
Zakład Instrumentalnej Analizy Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Lublin, 25.09.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Steiner-Bogdaszewska Ż., Tajchman K., Domaradzki P., Florek M. (2022) Composition and fatty acid profile of bone marrow in farmed fallow deer (Dama dama) depending on diet. Animals, 7;12(8): 941* mój udział polegał na opracowaniu metodologii, analizie formalnej, pisaniu publikacji, przechowywaniu danych oraz korekcie publikacji po recenzjach. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Profil kwasów tłuszczowych i skład mineralny szpiku kostnego jeleniowatych w zależności od warunków życia lub utrzymania” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr Żanety Steiner-Bogdaszewskiej.



Podpis

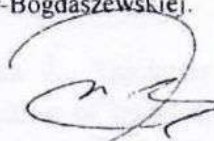
Prof. dr hab. Mariusz Florek
Katedra Oceny Jakości
i Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Lublin, 25.09.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Steiner-Bogdaszewska Ż., Tajchman K., Domaradzki P., Florek M. (2022) Composition and fatty acid profile of bone marrow in farmed fallow deer (Dama dama) depending on diet. Animals, 7,12(8): 941* mój udział polegał na analizie formalnej, pisaniu publikacji, przechowywaniu danych, korekcie pracy po recenzjach, wizualizacji danych, na nadzorze nad badaniami oraz roli autora korespondencyjnego. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Profil kwasów tłuszczowych i skład mineralny szpiku kostnego jeleniowatych w zależności od warunków życia lub utrzymania” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr Żanety Steiner-Bogdaszewskiej.



Podpis

Praca 3

Żaneta Steiner-Bogdaszewska
Stacja Badawcza Instytutu Parazytologii PAN
Kosewo Górne 7
11-700 Mrągowo
724 344 229
zaneta.steiner@gmail.com

Lublin, 09.10.2023 r.

Rada Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy **Steiner-Bogdaszewska Ż., Tajchman K., Ukalska-Jaruga A., Florek M., Pecio M. (2022) The mineral composition of bone marrow, plasma, bones and the first antlers of farmed fallow deer. *Animals*, 12, 2764. DOI: 10.3390/ani12202764.**

Mój wkład pracy w publikację wynosił 60% i polegał na zaplanowaniu i przeprowadzeniu doświadczenia, gromadzeniu i analizie danych, redagowaniu manuskryptu oraz korekcie po recenzjach.

.....*Ż. Steiner-Bogdaszewska*.....

Podpis

Dr hab. Katarzyna Tajchman prof. UPL
Katedra Etologii Zwierząt i Łowiectwa
Zakład Etologii Zwierząt
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Lublin, 25.09.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Steiner-Bogdaszewska Ż., Tajchman K., Ukalska-Jaruga A., Florek M., Pecio M. (2022) The mineral composition of bone marrow, plasma, bones and the first antlers of farmed fallow deer. Animals, 12, 2764* mój udział polegał na konceptualizacji pracy, analizie formalnej, pisaniu publikacji, korekcie po recenzjach, na nadzorze nad badaniami oraz roli autora korespondencyjnego. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Profil kwasów tłuszczowych i skład mineralny szpiku kostnego jeleniowatych w zależności od warunków życia lub utrzymania” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr Żanety Steiner-Bogdaszewskiej.


.....
Podpis

Dr Aleksandra Ukalska-Jaruga
Zakład Gleboznawstwa, Erozji i Ochrony Gruntów
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
Państwowy Instytut Badawczy
ul. Czarторыskich 8, 24-100 Puławy

Lublin, 25.09.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Steiner-Bogdaszewska Ż., Tajchman K., Ukalska-Jaruga A., Florek M., Pecio M. (2022) The mineral composition of bone marrow, plasma, bones and the first antlers of farmed fallow deer. Animals. 12, 2764* mój udział polegał na opracowaniu metodologii, analizie laboratoryjnej materiału biologicznego, korekcie pracy po recenzjach oraz roli autora korespondencyjnego. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Profil kwasów tłuszczowych i skład mineralny szpiku kostnego jeleniowatych w zależności od warunków życia lub utrzymania” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr Żanety Steiner-Bogdaszewskiej.



.....
Podpis

Prof. dr hab. Mariusz Florek
Katedra Oceny Jakości
i Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Lublin, 25.09.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Steiner-Bogdaszewska Ż., Tajchman K., Ukalska-Jaruga A., Florek M., Pecio M. (2022) The mineral composition of bone marrow, plasma, bones and the first antlers of farmed fallow deer. Animals. 12, 2764* mój udział polegał na analizie formalnej, analizie statystycznej, korekcie pracy po recenzjach oraz na nadzorze nad badaniami. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Profil kwasów tłuszczowych i skład mineralny szpiku kostnego jeleniowatych w zależności od warunków życia lub utrzymania” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr Żanety Steiner-Bogdaszewskiej.



.....

Podpis

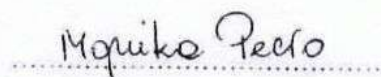
Mgr Monika Pecio
Zakład Gleboznawstwa, Erozji i Ochrony Gruntów
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
Państwowy Instytut Badawczy
ul. Czarotoryskich 8, 24-100 Puławy

Lublin, 25.09.2023 r.

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy *Steiner-Bogdaszewska Z., Tajchman K., Ukalska-Jaruga A., Florek M., Pecio M. (2022) The mineral composition of bone marrow, plasma, bones and the first antlers of farmed fallow deer. Animals, 12, 2764* mój udział polegał na analizie laboratoryjnej materiału biologicznego. Mój indywidualny wkład pracy szacuję na 10%.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niniejszej publikacji w opracowaniu pt. „Profil kwasów tłuszczowych i skład mineralny szpiku kostnego jeleniowatych w zależności od warunków życia lub utrzymania” stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr Żanety Steiner-Bogdaszewskiej.


.....
Podpis