

Kan inducerad hypokalcemi användas för att studera kalvningsförlamning?



Emma Olsson

Kan inducerad hypokalcemi användas för att studera kalvningsförlamning?

Can induced hypocalcemia be used as a method for studying milk fever?

Emma Olsson

Handledare: Cecilia Kronqvist SLU, Institutionen för husdjurens utfodring och vård

Examinator: Sigrid Agenäs, SLU, Institutionen för husdjurens utfodring och vård

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Kandidatarbete i husdjursvetenskap

Kurskod: EX0553

Program: Agronomprogrammet - Husdjur

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2016

Serienamn, delnr: Examensarbete / Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens utfodring och vård, 576

Omslagsbild: Emma Olsson

Nyckelord: kalcium, EDTA, PTH, fettlever, DCAD

Key words: calcium, EDTA, PTH, fatty liver, DCAD

Sammanfattning

Studier på kalvningsförlamning görs på kor som har subklinisk eller klinisk hypokalcemi och på friska kor som får en inducerad hypokalcemi. De friska korna kan vara individer som inte är dräktiga eller lakterande som med kelering av kalcium via infusion, med till exempel EDTA, utvecklar en inducerad hypokalcemi. Att framkalla hypokalcemi är en utbredd metod för att lära sig mer om sjukdomen och de olika faktorer som kan ha effekt på sjukdomsförloppet. I denna litteraturstudie behandlas fysiologiska parametrar vid kalvningsförlamning och hos individer som fått en inducerad hypokalcemi. Faktorer som kan framkalla och påverka kalvningsförlamning tas upp, de faktorerna kan vara foderstaten, djurets kondition eller resistens mot PTH-signalering, vilka även kan påverka resultaten vid inducerad hypokalcemi. De fysiologiska förloppen vid kalvningsförlamning är en drastisk sänkning av kalcium, en ökad koncentration PTH och en minskning av magnesium i plasma. Vid inducerad hypokalcemi sjunker tillgängligt kalcium på grund av kelering, PTH ökar i plasma och magnesium förblir oförändrat. De kliniska symtomen och flera parametrar vid inducerad hypokalcemi och kalvningsförlamning överensstämmer. Därmed går det att anta att inducerad hypokalcemi hos kor kan användas för att lära sig mer om kalvningsförlamning.

Abstract

Studies on milk fever are done on both animals suffering from subclinical hypocalcemia, clinical hypocalcemia and healthy cows with an induced form of hypocalcemia. The healthy cows can be individuals which are not pregnant or lactating that are induced to hypocalcemia through an infusion, for example, by EDTA. Induced hypocalcemia in cows is a widely used method to learn more about milk fever, the cause of the condition and the pattern of the disease. In this review the cause of milk fever will be examined and which physiological parameters that are affected by hypocalcemia, in comparison the physiological parameters on the induced hypocalcemia will also be examined. The cause of milk fever can be a dietary cause, the animals' condition or a resistance for PTH-signalling, these causes can also have an effect on the results from the induced hypocalcemia. The physiological processes in milk fever are a fast decrease in calcium, an increase of PTH and a decrease in magnesium in plasma. In induced hypocalcemia there will be a decrease in calcium due to a chelator, PTH will increase and magnesium stays unchanged in plasma. The clinical signs and several parameters, in induced hypocalcemia and milk fever correspond. It is therefore possible to assume that induced hypocalcemia can be used to learn about milk fever.

Introduktion

Kalvningsförlamning är en sjukdom som kan drabba kor runt kalvning. Det är ett tillstånd som år 2013/2014 drabbade 2,8 % av mjölkorna i Sverige (Växa Sverige, 2015). Kalvningsförlamning är därmed den näst vanligaste rapporterade sjukdomen, efter juverhälsosjukdomar (Växa Sverige, 2015). Kalvningsförlamning är känt som en effekt av kalciumbrist hos kon då hon påbörjar sin laktation. Bristen uppstår när kon inte hinner mobilisera tillräckligt stora mängder av kalcium från skelettet till blodet. Kalciumfosfat är det mineral som skelettet till stor del är uppbyggt av och både kalcium och fosforsyra regleras av samma hormon (Sjaastad *et al.*, 2010).

Det har länge forskats på kalvningsförlamning för att lära sig mer om sjukdomen och metoder för att simulera sjukdomstillståndet har använts för att inte behöva använda sjuka individer (Smith & Brown, 1963; Ramberg *et al.*, 1967). De simulerade metoderna bygger på att inducera ett sjukdomstillstånd hos en individ genom att binda undan endast kalcium i plasma (kelering) så att individen hamnar i ett tillstånd med kalciumbrist (hypokalcemi) (Jørgensen *et al.*, 1999) därefter kan fysiologiska parametrar som mobilisering av mineraler, utsöndring av hormoner och koncentrationer av dessa i blodet studeras. Med inducerad hypokalcemi går det att göra studier på flera djur samtidigt samt styra hur mycket kalcium som ska keleras. Försöksdjuren är i många fall individer som normalt inte skulle få kalvningsförlamning, individerna har i de flesta fall inte nyligen kalvat och påbörjar därmed heller inte någon laktation (Sasaki *et al.*, 2014; Martinez *et al.*, 2014). Det görs även studier på kor som får spontant uppkommen hypokalcemi i samband med kalvning, de individerna kan ha påverkats av fler olika faktorer vilket kan göra det svårt att avgöra vad som utlöst tillståndet.

I den här litteraturstudien har kalcium, PTH och magnesium varit de parametrar som undersökts, kalcium och PTH eftersom de båda är välkända faktorer vid hypokalcemi, och magnesium eftersom det tros påverka uppkomsten av hypokalcemi. Fosforsyra kommer inte tas upp då det varierar tillsammans med kalcium och responderar på samma hormon. Syftet med litteraturstudien var att göra en jämförelse mellan resultaten från de olika tillstånden; inducerad hypokalcemi och spontant uppkommen kalvningsförlamning, och även behandla de faktorer som kan påverka resultatet. Målet var att undersöka om inducerad hypokalcemi är en relevant metod för att lära sig mer om kalvningsförlamning.

Litteraturstudie

Kalvningsförlamning

Bristen på kalcium uppkommer då kon ska påbörja en laktation och hon måste möta behovet som uppstår, utan att tappa för mycket av kalciumnivåerna i blodet. En subklinisk hypokalcemi kan ge upphov till minskat foderintag, försämrad våm- och tarmrörelse, samt öka risken för andra metabola sjukdomstillstånd, infektionssjukdomar och minska kons förmåga att prestera till sin fulla kapacitet (Goff, 2008). Klinisk hypokalcemi kan medföra andra risker såsom

löpmsagsomvridning eftersom musklerna i våmmen och löpmagen påverkas (Goff, 2014). Motilitet hos musklerna i våmmen är enligt Jørgensen *et al.* (1998) extra känslig för förändringar i koncentrationerna av joniserat kalcium i plasma. Dessutom ökar risken för mastit vid hypokalcemi då musklernas kontraktion runt spenkanalerna efter mjölkning försämras (Goff, 2014).

När kalcium tas från plasma på grund av produktion av mjölk måste det extracellulära kalciumet fyllas på, det sker genom att kon ökar sitt upptag av kalcium från foder och mobiliserar kalcium från skelettet (Sjaastad *et al.*, 2010). Enligt Ellenberger *et al.* (1932; refererad i Goff, 2008) så förlorar kon 9-13 % av skelettets kalcium under den första månaden av laktationen, den förlusten återtas senare i laktationen. Mobilisering av kalcium från skelett till plasma regleras av ett hormon, parathormon (PTH), som utsöndras från bisköldkörtlarna, PTH utsöndras när nivåerna av kalcium i plasma sjunker under det normala. Hormonet påverkar tarmarnas absorption av kalciumjoner (Ca^{2+}) genom att stimulera syntes av 1,25-dihydroxycholecalciferol (kalcitriol) (Sjaastad *et al.*, 2010). Kalcitriol har en viktig del i att transportera Ca^{2+} från tarmarna till blodet, då kalcitriol är ett hormon som inducerar bildandet av Ca^{2+} -bindande proteiner (Sjaastad *et al.*, 2010). PTH stimulerar därmed indirekt och direkt de kaliumsparande mekanismerna genom reabsorption och transport av kalcium från kons benvävnad, förmodligen redan innan kalvning då hon förbereder sig för en laktation, och förebygger en drastisk sänkning av kalcium efter kalvning (Goings *et al.*, 1974). Om kroppen inte lyckas återställa balansen av kalcium i blodet tillräckligt snabbt vid påbörjan av laktation så får kon hypokalcemi (Goff, 2008).

Av de kor som kalvar och hamnar i ett stadie av hypokalcemi, visar inte alla kliniska symtom och andelen kor med subklinisk hypokalcemi är mellan 25-42 % med stigande utbredning ju högre laktationsnummer (Reinhardt *et al.*, 2011). Hur allvarlig eller långvarig hypokalcemi kon får beror på kons kalciumhomeostatiska mekanism, hur snabbt behovet av kalcium kan mötas (Goff, 2008).

Kliniska symtom

Tappad aptit, minskad mängd avföring och urin, utmattning, minskad aktivitet i våmmen, förlamning, minskad reflex i pupillerna, något ökad hjärtfrekvens och något lägre kroppstemperatur var de kliniska symtomen som observerades av Basbugan *et al.* (2015). Det var hos kor med hypokalcemi mellan dag två och fem efter kalvning. Hypokalcemi diagnostiserades via kliniska symtom och nivåerna av kalcium i blodet. Kor med total kalciumkoncentration i blodet lägre än 1,5 mmol/L och Ca^{2+} -koncentration på 0,27 mmol/L i blodet ansågs lida av hypokalcemi enligt Basbugan *et al.* (2015). Subklinisk hypokalcemi diagnostiserades vid total kalciumkoncentration under 2,0 mmol/L i studier av Reinhardt *et al.* (2011). Katoh & Nakagawa-Ueta (2001) diagnostiserade kalvningsförlamning med slöhet och respons på kalciumbehandling.

Kalcium

Benvävnad innehåller omkring 99 % av allt kalcium som finns i kroppen, resterande kalcium finns i löslig form i den extracellulära vätskan. Total kalciumkoncentration ligger inom intervallet 1,9-2,5 mmol/L hos friska kor enligt flera författare som mätt koncentrationen innan påbörjade försök (Riond *et al.*, 1997; Staric & Zadnik, 2010; Kronqvist *et al.*, 2011; Goff, 2014). Ca^{2+} binder lätt till proteiner och i plasma är runt 40 % (1,0 mmol/L) av kalciumet bundet till proteiner, i huvudsak albumin. Tio procent (0,25 mmol/L) av kalciumet är bundet till molekyler med negativ laddning, som bikarbonat och citrat. Resterande 50 % (1,25 mmol/L) av kalciumet är joniserat (katjoner, positivt laddade) och kallas fritt kalcium, det är den fysiologiskt aktiva formen av kalcium. Transport av kalcium över membran sker via jonkanaler med hjälp av transportproteiner. Kalcium har en viktig funktion i kontraktion av muskler, Ca^{2+} krävs i hög koncentration i cytosolen runt myofilament för att musklerna ska kontrahera. Ca^{2+} reglerar utsöndringen av acetylcolin i synapsen mellan motorneuron och muskelcellen. Överföringen i dessa synapser är blockerade under hypokalcemi hos kor (Sjaastad *et al.*, 2010). Kor med hypokalcemi kan därför bli förlamade.

Hos kor med hypokalcemi ses en positiv korrelation mellan Ca^{2+} och totalt kalcium på 0,8 och en negativ korrelation med PTH på -0,3 (Basbugan *et al.*, 2015). Grundläggande kunskap om mobilisering av kalcium vid hypokalcemi kunde först identifieras vid inducerad hypokalcemi (Jørgensen *et al.*, 1999).

Magnesium

Extracellulärt magnesium har en viktig roll i nervimpulser, muskelfunktion och vid bildning av benmineral (Goff, 2014). Av totalt magnesium i blodet är uppskattningsvis 20 % bundet till proteiner, 65 % joniserat och resterande del återfinns i komplexa bindningar med anjoner (Goff, 2014). Totalt magnesium i blodet hos en frisk ko ligger normalt på i genomsnitt 1,17 mmol/L och på 1,19 mmol/L i blodet hos en ko med kalvningsförlamning (Staric & Zadnik, 2010). Acidosis och alkalosis har liten effekt på fördelningen av magnesium i serum (Goff, 2014).

Totalt magnesium i plasma ökar normalt runt kalvning (Littledike *et al.*, 1969). När kalcium minskar i plasma vid kalvning så ses en negativ korrelation mellan kalcium och magnesium (Larsen *et al.*, 2001). Om kon har hypomagnesemi så utsöndras inte PTH, även om Ca^{2+} -koncentrationen sjunker under det normala (Sjaastad *et al.*, 2010) hypomagnesemi kan därmed vara en orsak till hypokalcemi (Goff, 2014). Hypomagnesemi påverkar kalciummetabolism på två sätt; genom att reducera vävnadernas känslighet för PTH och genom att reducera PTH-utsöndring som respons på hypokalcemi (Goff, 2014).

Inducerad hypokalcemi

När studier på hypokalcemi utförs på friska kor finns det olika definitioner av vad en frisk ko är. I en studie av Sasaki *et al.* (2014) användes djur vid god hälsa, icke-dräktiga och icke-lakterande kor av rasen Holstein i ålder 6-8 år med en kroppsvikt på 520-665 kg. I en studie av Mellau *et al.* (2001) användes icke-lakterande kor av både raserna Holstein och dansk röd som kalvat minst 3 gånger och inte haft kalvningsförlamning tidigare. Staric & Zadnik (2010)

använde i sin studie på friska kor djur som ansågs vara vid god hälsa. I en studie av Martinez *et al.* (2014) användes icke-dräktiga, icke-lakterande kor i åldern 4-5 år, av rasen Holstein och där definierades individen som frisk om den klarat en fysiologisk undersökning vid påbörjan av försökstiden och ingen historia av sjukdom de senaste 30 dagarna. Dessa kor användes som modell för en inducerad kalvningsförlamning.

Kelatbindare

Det finns tidiga studier som använde sig av inducerade metoder för att forska på kalvningsförlamning (Smith & Brown, 1963; Ramberg *et al.*, 1967; Van de Braak *et al.*, 1984). En metod för att framkalla ett tillstånd av hypokalcemi är genom kelering via infusion med lösningar som till exempel etylendiamintetraättiksyra (EDTA). Vid kelering binds joner undan i plasma och transporteras ut via urinen. EDTA är exempel på en kelator (Chisolm, 1990) som injiceras intravenöst och binder effektivt och specifikt undan Ca^{2+} i plasma (Mellau *et al.*, 2001). Infusion av kelatbindare resulterar i komplexa bindningar och kelering av Ca^{2+} . Det betyder att en mindre andel Ca^{2+} kommer finnas tillgängligt för kon och därmed induceras ett stadie av hypokalcemi i kon (Jørgensen *et al.*, 1999).

Kliniska symtom

Kliniska tecken på hypokalcemi efter infusion av EDTA/kelatbindare i studien av Mellau *et al.* (2001) var kalla extremiteter, ökad puls över 120 slag/min samt generell förlamning och ostadighet. I ett tidigt stadie av infusionen, där kalciumnivåerna av Ca^{2+} reducerats till 0,80 mmol/L sågs första kliniska symtom på hypokalcemi. Vid en Ca^{2+} -nivå på 0,60 mmol/L avtog våmmens aktivitet och korna slutade äta, extremiteterna blev kalla på grund av försämrad blodtillförsel, korna började få svårt att stå stadigt och fick muskelryckningar. Därefter blev korna ännu mer ostadiga för att sedan inte ha förmågan att stå upp. Förlamningen uppkom vid en Ca^{2+} -nivå i genomsnitt på 0,43 mmol/L och vid jämförelse med andra studier (Wang & Beede, 1992; 0,61 mmol/L, Jørgensen *et al.*, 1998; 0,45-0,48 mmol/L) så ligger kalciumkoncentrationen mellan 0,39-0,65 mmol/L av Ca^{2+} när förlamning uppkommer (Mellau *et al.*, 2001). Ramberg *et al.* (1967) såg kliniska symtom som minskat foderintag, upphörande av aktivitet i våmmen och tarmarna, muskelryckningar, kalla extremiteter, tandgnissling, oförmåga att stå upp och till sist förlamning.

Kalcium

Totalt kalcium i serum, vid kelering, är det kalcium som inte är bundet till kelatbindare. Totalt kalcium sjunker vid infusion, så efter infusion anses allt kalcium vara antingen fritt som Ca^{2+} eller bundet till kelatbindare (Riond *et al.*, 1997). Enligt Ramberg *et al.* (1967) sker förändringen av totalt kalcium i plasma vid infusion av kelatbindare i tre faser när infusionen är jämförbar med kalcium som går ut i mjölk vid laktation. En första fas där en drastisk minskning av kalcium i plasma sker i ett par timmar, andra fasen är en jämnare fas där kalciumet håller sig på en jämn låg nivå för att i tredje fasen stadigt sjunka ytterligare (Ramberg *et al.*, 1967).

Om infusion med kelatbindare binder mer kalcium än vad som skulle motsvara förlusterna i mjölk, minskar totalt kalcium i två faser (Riond *et al.*, 1997). I den första fasen, mobiliseras kalcium från kalciumpooler som är lättillgängliga och efter 4 timmar av infusion anses poolerna uttömda och därefter konkurrerar troligtvis kelatbindare mot plasmaproteiner för bindande till kalcium, tills allt kalcium är antingen fritt eller bundet till kelatorn (Riond *et al.*, 1997). En högre koncentration än innan infusion av totalt kalcium återfinns 31 timmar efter avslutad infusion vilket indikerar att PTH har överkorrigerat för den minskade totala kalciumkoncentrationen i serum (Riond *et al.*, 1997). I den andra fasen, efter 4 till 68 timmar, minskade totalt kalcium i en mer måttlig hastighet som troligtvis beror på respons av en anpassning till kalciumhomeostasen (Riond *et al.*, 1997).

Magnesium

Totalt magnesium och joniserat magnesium (Mg^{2+}) förändras inte i koncentration i serum under infusion av kelatbindare (Ramberg *et al.*, 1967; Riond *et al.*, 1997; Mellau *et al.*, 2001). Jørgensen *et al.* (1999) visade i en litteraturstudie att en kelator som EDTA har hundra gånger så stor benägenhet att binda till Ca^{2+} än till Mg^{2+} och därmed binds Ca^{2+} mer selektivt. Det har dock visats att Mg^{2+} mobiliseras från ben och/eller intracellulära pooler under infusion (Riond *et al.*, 1997).

Parathormon (PTH)

PTH i plasma ökar vid infusion av en kelatbindare och nivån av PTH är förhöjd genom hela infusionen, hormonutsöndringen är omvänt proportionell med kalciumnivåerna (Ramberg *et al.*, 1967). Under fas två i sänkningen av kalciumnivån, vid infusion som motsvarar förluster av mjölk till plasman, menar Ramberg *et al.* (1967) skulle vara den PTH-beroende fasen där PTH reagerar på den inducerade hypokalcemi. Vid långvarig inducerad hypokalcemi, som pågått mer än 20 timmar, fortsätter binjurarna att frisätta PTH som respons till de låga kalciumnivåerna och detta medför att en förhöjd mängd PTH förekommer i plasman (Ramberg *et al.*, 1967).

Risikfaktorer

Äldre kor har högre risk att drabbas av kalvningsförlamning (Curtis *et al.*, 1985), år 2014/2015 rapporterades 13,4 % kalvningsförlamningar för kor som genomgått fler än fem laktationer, jämfört med förstakalvare med en frekvens på 0,2 % (Växa Sverige, 2015). Flera författare menar att en ko har högre risk för att utveckla hypokalcemi om hon har haft en eller flera laktationer tidigare, när antalet laktationer blir fler så ökar även risken för hypokalcemi (Curtis *et al.*, 1984; Oetzel, 1991). Enligt Goff (2014) beror det på att äldre kor har svårare att bibehålla kalciumhomeostasen, och att det delvis beror på en minskning av receptorer för kalcitriol i tarmarna (Goff, 2014).

Rasen Jersey (SJB) är känd för att ha högre förekomst av kalvningsförlamning jämfört med Holstein (Goff, 2014). SJB hade högst rapporteringsfrekvens på kalvningsförlamning år 2014/2015 med 3,4 % följt av Holstein (SLB) med en frekvens på 2,9 % (Växa Sverige, 2015). Det kan till viss del förklaras av att SJB-kornas råmjölk innehåller mer kalcium jämfört med

råmjölken hos Holstein. Om rasernas olika kroppsstorlekar och mängden producerad mjölk tas i beaktning så ligger ändå SJB något högre i andelen kalcium i råmjölk jämfört med SLB (Goff, 2014).

DCAD

Förändringar i syra-basbalansen har en stor påverkan på cellfunktion, blir det en obalans av elektrolyter kan inte cellen fungera effektivt. Fodret är av stor betydelse för att bibehålla balansen på grund sitt innehåll av katjoner och anjoner. Ett överskott av absorberade anjoner gör att det produceras vätejoner (katjoner) för att väga upp för anjonerna vilket ger en metabolisk acidosis. Ett överskott av katjoner kräver en buffert, såsom acetat och bikarbonat, vilket orsakar en metabolisk alkalos. Syra-basbalansen påverkar utnyttjandet av kalcium. *Dietary cation-anion differences* (DCAD) används för att uppskatta elektrolytstatusen i fodret. Den metaboliska syra-basbalansen påverkar känsligheten hos ben för PTH och även syntesen av kalcitriol (McDonald 2011). Katjon-anjonbalansen i foder har visats vara av vikt vid att förebygga kalvningsförlamning (Oetzel, 1991), där en hög andel katjoner i fodret såsom Na^+ och K^+ bidrar till ett alkaliskt tillstånd. Det medför att mobiliseringen av kalcium begränsas på grund av att benen blir mindre känsliga för PTH i det stadiet (McDonald 2011). En hög andel anjoner i fodret, Cl^- och S^{2-} , kan istället öka känsligheten för PTH hos ben och öka produktionen av kalcitriol, i ett stadie av acidosis och därmed öka flödet av kalcium (McDonald 2011). Lågt DCAD i foder gav korna i en studie metabolisk acidosis och högt DCAD i foder gav metabolisk alkalos (Goff & Horst, 1997). Utsöndringen av kalcium i urin var högre hos kor som fått foder med lågt DCAD och koncentrationen av kalcium i plasma var lägre hos dessa jämfört med korna som åt en foderstat med högt DCAD (Goff & Horst, 1997). *Plasmahydroxyprolin* kan användas som en indikator på osteoklasternas aktivitet, vilken var som högst i kor med metabolisk acidosis, hos dessa kor var även PTH i blodet som högst (Gaynor *et al.*, 1989; Goff & Horst, 1997).

Kalcium i foder

Mängden kalcium i foder har inte någon direkt effekt på kalciumkoncentrationen i plasma och inte heller på PTH-utsöndringen (Goff & Horst, 1997; Kronqvist *et al.*, 2011). Goings *et al.* (1974) ansåg att kor som åt en foderstat med låg andel kalcium några veckor innan kalvning inte skulle kunna möta de behov som kons egen kropp och fostrets skelettutveckling hade. De korna förväntades hamna i en negativ kalciumbalans redan innan kalvning och att stimuleringen av PTH-utsöndring skulle ske tidigare (Goings *et al.*, 1974). Kichura *et al.* (1982) kom fram till att kalcium i fodret behöver understiga 20 g/dag för att minska risken för kalvningsförlamning och det överensstämmer med resultat från en studie av Kronqvist *et al.* (2011). Skillnaden i intag av kalcium har därmed ingen effekt på kalvningsförlamning eller subklinisk hypokalcemi i försök om nivåerna överstiger 20 g/dag (Goff & Horst, 1997).

En senare studie har påvisat en interaktion mellan kalcium och kalium i foder och att de båda tillsammans påverkar kalciumkoncentrationen runt kalvning men ingen effekt på PTH-koncentrationen i plasma (Goff & Horst, 1997). En ökad koncentration av kalium i fodret kan istället öka risken för kalvningsförlamning (Kronqvist *et al.*, 2012). I en studie på foderinnehåll

och hypokalcemi av Goff & Horst (1997) utvecklade 8 av 10 kor hypokalcemi när de utfodrades med en foderstat med låg andel kalcium och hög andel kalium. Kor som utfodrades en foderstat med hög andel natrium och kalcium så utvecklade 5 av 8 kor hypokalcemi, vilket var en större andel än de kor som fick ett foder med hög andel kalcium och låg andel kalium, 2 av 10 kor. PTH-koncentrationen var därmed lägre hos korna som fick fodret med hög andel kalcium och natrium och låg andel kalium, och PTH var högre hos kor som fick ett foder med låg andel natrium och kalium och hög andel kalcium då kon kalvade. En högre andel kalvningsförflamning observerades vid en ökning av kalium i fodret från 1,1 till 2,1%.

Magnesium i foder

En metaanalys av Lean *et al.* (2006) visade att en högre koncentration av magnesium i foder minskar risken för kalvningsförflamning. Magnesiumkoncentrationen i plasma påverkar kalciumhomeostasen och blir det en brist på magnesium i plasma så reduceras produktionen av PTH i serum (Suh *et al.*, 1973) och känsligheten för PTH kan minska hos vävnaderna (Reddy *et al.*, 1973). Kor som fick mindre magnesium än 26 g/dag, tre veckor innan kalvning hade högre risk för kalvningsförflamning än de som fick mer än 26 g/dag (Kronqvist *et al.*, 2012). På grund av magnesiums effekt på kalcium kan hypomagnesemi ge en försämrad kalciumhomeostatisk mekanism (Kronqvist *et al.*, 2012) och ett lågt intag av magnesium under sintiden kan försämra kons förmåga att mobilisera kalcium efter kalvning (Van de Braak *et al.*, 1987).

PTH-resistens

Pseudohypoparathyroidism är en resistens mot effekterna av PTH då kon får hypokalcemi trots förhöjda nivåer av PTH i plasma (Goff *et al.*, 2014). Pseudohypoparathyroidism är en viktig bidragande faktor till hypokalcemi och kalvningsförflamning (Martig & Mayer 1973; Goff *et al.*, 2014). I ett försök av Goff *et al.* (2014) testades om en metabolisk alkalos inducerad av fodret, gör att kons vävnader inte svarar på PTH-signalering. Den ena gruppen kor fick ett foder med lågt DCAD och den andra gruppen fick ett foder med högt DCAD för att stimulera acidosis eller alkalos. Data från studien visar att ett högt DCAD i foder gör att kon hamnar i metabolisk alkalos som därmed minskar förmågan hos kon att svara på PTH-signalering, foderstaten framkallar ett tillstånd av pseudohypoparathyroidism (Goff *et al.*, 2014).

Övervikt

Kor som i tidigare laktation har varit högpresterande lagrar under sintiden energi i vävnader och muskler, vilket resulterar i att kon kan vara överviktig vid kalvning (Reid *et al.*, 1982). Utfodringen under sintiden är därmed avgörande, särskilt överutfodring har visats ge problem hos nykalvade kor (Higgings *et al.*, 1983). Forskning har visat att kor som blivit överutfodrade under sintiden får i sig mindre foder efter kalvning än vad de behöver (Treacher *et al.*, 1986). Det medför att skillnaderna i energi mellan foderintag och mjölk mängd blir större än hos kor i normalt hull och det i sin tur betyder att de överviktiga korna får en större negativ energibalans (Van Den Top *et al.*, 1996). Då mobiliseras större mängder energireserver från muskler och vävnader för att möta de energikrav som kroppen har. En hög mobilisering av fett från vävnader kan medföra att kon inte hinner bryta ner alla fettsyror som frigörs och därmed ackumuleras

fettsyrorna i kroppens organ, där levern är ett av dessa och detta kan leda till fettlever (Van Den Top *et al.*, 1996). Enligt Reid *et al.* (1982) så är fettlever associerat med en ökad sjukdomsrisk runt kalvning. Triacylglyceroler i levern associeras med leverskada eller försämrad leverfunktion och den högre andelen icke-förestrade fettsyror (*non esterified fatty acids*, NEFA) i plasma efter kalvning, när kon haft fri tillgång på foder under sintiden, beror troligen på en ökad lipolys (Van Den Top *et al.*, 1996).

I en studie av Oikawa & Katoh (2001) diagnostiserades 55 av 67 kor med hypokalcemi och studien visade att de korna hade en ökning av NEFA, en minskning av totalt kolesterol och en minskning av fosfolipider (Oikawa & Katoh, 2002). Fosfolipider är essentiella i strukturen av ett lipoprotein (*very low-density lipid*, VLDL) (Raphael *et al.*, 1973). En låg fosfolipid-koncentration medför att triacylglyceroler lagras i levern istället för att utsöndras som VLDL (Van Den Top *et al.*, 1996). Studien visade därmed att kor med hypokalcemi även hade förhöjda nivåer av fettsyror i levern och menar att det skulle finnas ett samband mellan hypokalcemi och fettleverrelaterade sjukdomar (Oikawa & Katoh, 2002). Fronk *et al.*, (1980) visade att överutfodrade sinkor har en större risk för hypokalcemi och Treacher *et al.*, (1986) kom fram till att överviktiga kor hade en större andel sjukdomar.

Diskussion

Vid kelering binds Ca^{2+} undan och gör att kon hamnar i ett stadie av inducerad hypokalcemi (Jørgensen *et al.*, 1999). Vid kalvningsförflamning blir kon sjuk för att hon inte hinner mobilisera den mängd kalcium som tas till mjölkproduktion. Mellau *et al.* (2001) såg vid inducerad hypokalcemi symtom som ostadighet och förflamning vid en Ca^{2+} -koncentration mellan 0,39-0,65 mmol/L och Basbugan *et al.* (2015) såg att kliniska symtom på kalvningsförflamning, som förflamning, uppkom vid en Ca^{2+} -koncentration på 0,27 mmol/L. De kliniska symtomen som uppkommer vid inducerad hypokalcemi och vid kalvningsförflamning är av liknande karaktär. Det kan tolkas som att symtomen till kalvningsförflamning till största delen beror på bristen av tillgängligt Ca^{2+} och därmed även orsaken till sjukdomen.

PTH utsöndras på liknande sätt vid inducerad hypokalcemi (Ramberg *et al.*, 1967) som vid kalvningsförflamning (Sjaastad *et al.*, 2010). PTH är det hormon som stimuleras när kalciumkoncentrationerna blir för låga (Goff, 2008) och kommer därmed utsöndras i förhållande till kalcium. Utsöndringen av PTH stärker därmed ytterligare att Ca^{2+} reagerar liknande vid inducerad hypokalcemi och kalvningsförflamning. Vid inducerad hypokalcemi anser författaren Ramberg *et al.* (1967) att det identifierats en fas som skulle vara den beroende fasen där PTH utsöndras. Författaren hävdar även att hormonet fortsätter utsöndras genom hela infusionen. I den här litteraturstudien har ingen liknande fas på utsöndring av PTH identifierats hos kor med kalvningsförflamning. Det kan bero på att många studier görs just på inducerad hypokalcemi och det medför att det blir svårt att jämföra de parametrarna mot det verkliga sjukdomstillståndet.

Magnesium i plasma ökar normalt hos kor som ska kalva (Littledike *et al.*, 1969) och det har visats att hypomagnesemi kan orsaka kalvningsförflamning (Goff, 2014). Totalt magnesium och Mg^{2+} hos inducerad hypokalcemi förändras inte i serum vid infusion (Riond *et al.*, 1997) vilket antyder att magnesium inte är en utlösande faktor vid kelering av kalcium, hade däremot magnesium visats minska drastiskt vid infusion hade hypomagnesemi kunnat varit orsaken till en hypokalcemi, vilket skulle ge missvisande resultat.

Flera riskfaktorer och yttre påverkan som kan avgöra om en nykalvad ko klarar av mobiliseringen av kalcium eller inte. Till exempel så har syra-basbalansen visats vara av betydelse för känsligheten för PTH (McDonald 2011) och överutfodring under sintiden som kan resultera i fettlever och därmed en ökad risk för hypokalcemi (Fronk *et al.*, 1980).

Foderstaten kan påverka kons känslighet för hypokalcemi runt kalvning, genom balansen av DCAD kan risken antingen öka eller minska (McDonald 2011). En ko som har lättare acidosis innan kalvning har mindre risk att få hypokalcemi vid kalvning (McDonald 2011) och pH i blodet kan därmed vara en indikator på risken för hypokalcemi. Om pH inte tas hänsyn till vid inducerad hypokalcemi skulle det kunna ge missvisande resultat, då det påverkar hur snabbt kon reagerar på kelering med avseende på mobiliseringshastigheten.

Övervikt och fettlever tros ha ett samband med hypokalcemi (Fronk *et al.*, 1980; Reid *et al.*, 1982; Oikawa & Katoh, 2002) och det kan delvis bero på att den överviktiga kon hamnar i en större negativ energibalans runt kalvning och därmed mobiliserar en större mängd fett från vävnader (Van Den Top *et al.*, 1996). Vid inducerad hypokalcemi används ofta icke-dräktiga och icke-lakterande kor (Mellau *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2014). Mellau *et al.* (2001) angav i sin studie inte någon kroppsvikt eller kondition på korna. Om djuren i försöket av Mellau *et al.* (2001) varit överviktiga hade det kunnat ge ett missvisande resultat. Dock så var de korna inte vid påbörjan av en laktation och ska heller inte genomgå en kalvning, så risken att det mobiliseras större mängder fett från vävnader innan kelering borde anses som liten och därmed ett troligtvis opåverkat resultat.

Kalcium och magnesium i foder innan kalvning har olika effekter där kalcium i foder endast har en positiv effekt på mobilisering av kalcium om mängden i fodret understiger 20 g/dag (Kichura *et al.*, 1982; Kronqvist *et al.*, 2011). Magnesium däremot har setts ge en negativ effekt på kalciummobilisering om det utfodrats mindre än 26 g/dag innan kalvning (Kronqvist *et al.*, 2012). Brist på magnesium kan minska utsöndringen av PTH (Suh *et al.*, 1973). Utfodringen av mineraler är därmed av betydelse för risken av kalvningsförflamning, något som bör tas i beaktning vid studier på inducerad hypokalcemi.

Att kunna göra studier på mer än bara individer i ett faktiskt sjukdomstillstånd anses motiverat eftersom det vid en inducerad metod går att styra vissa parametrar t.ex. hur snabbt kalcium ska sjunka. Beroende på vilka parametrar som ska studeras går det att inducera en subklinisk hypokalcemi eller en klinisk hypokalcemi. Studier på inducerade kor kan vara intressant om effekterna av ett visst fodermedel och kalciumnivåer ska studeras och att kunna göra bredare studier med fler individer som får inducerad hypokalcemi för att få ett bredare resultat. Vid

infusion keleras endast Ca^{2+} och därmed kan kalciums effekt på andra parametrar och flera orsaker till uppkomsten av hypokalcemi studeras. Det finns dock effekter som kan påverka resultatet som ovan nämnts och bör övervägas för att undvika missvisande resultat.

Att individerna i studierna på friska kor inte är dräktiga och hormoner relaterade till kalvning kan ha en påverkan på resultat/inducerad hypokalcemi, har inte tagits i beaktning i den här rapporten och kan vara av intresse för fortsatta litteraturstudier i ämnet.

Slutsats

Förändring i Ca^{2+} -koncentrationerna överensstämmer vid både inducerad hypokalcemi och klinisk kalvningsförlamning och även de kliniska symtomen. Den primära orsaken till spontant uppkommen kalvningsförlamning verkar vara kalcium och en metod som binder undan endast kalcium borde ge ett rättvist resultat. Därmed anser jag att det går att använda inducerad hypokalcemi för studier på kalvningsförlamning.

Litteraturförteckning

- Basbugan, Y., Yüksek, & Altug, N. (2015). Significance of homocysteine and cardiac markers in cattle with hypocalcemia. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, vol. 39, ss. 699-704.
- Chisolm, Jr. J. (1990). Evaluation of the potential role of chelation therapy in treatment of low to moderate lead exposures. *Environmental Health Perspectives*, vol. 89, ss. 67-74.
- Curtis, C.R., Erb, H.N., Sniffen, C.J. & Smith, R.D. (1984). Epidemiology of parturient paresis: predisposing factors with emphasis on dry cow feeding and management. *Journal of Dairy Science*, vol. 67, ss. 817-825.
- Curtis, C.R., Erb, H.N., Sniffen, C.J., Smith, D.R. & Kronfeld, D. S. (1985). Path analysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders, and mastitis in holstein cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 68, ss. 2347-2360.
- Ellenberger, H.B., Newlander, J.A., Jones, C.H. (1932). Calcium and phosphorus requirements of dairy cows. II. Weekly balances through lactation and gestation periods. Vermont Agricultural Experiment Station, Bulletin 342. June 1932. I Goff, J.P. (2008). The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *The Veterinary Journal*, vol. 176, ss. 50-57.
- Fronk, T.J., Schultz, L.H. & Hardie, A.R. (1980). Effect of dry period overconditioning on subsequent metabolic disorders and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 63, ss. 1080-1090.
- Gaynor, P.J., Mueller, F.J., Miller, J.K., Ramsey, N., Goff, J.P. & Horst, R.L. (1989). Parturient hypocalcemia in jersey cows fed alfalfa haylage-based diets with different cation to anion ratios. *Journal of Dairy Science*, vol. 72, ss. 2525-2531.
- Goff, J.P. & Horst, R.L. (1997). Effects of the addition of potassium or sodium, but not calcium, to prepartum rations on milk fever in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 80, ss. 176-186.
- Goff, J.P. (2008). The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *The Veterinary Journal*, vol. 176, ss. 50-57.
- Goff, J.P. (2014). Calcium and magnesium disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, vol. 30, ss. 359-381.
- Goff, J.P., Liesegang, A. & Horst, R.L. (2014). Diet-induced pseudohypoparathyroidism: a hypocalcemia and milk fever risk factor. *Journal of Dairy Science*, vol. 97, ss. 1520-1528.
- Goings, R.L., Jacobson, N.L., Beitz, D.C., Littledike, E.T., Wiggers, K.D. (1974). Prevention of parturient paresis by a prepartum, calcium-deficient diet. *Journal of Dairy Science*, vol. 57, ss. 1184-1188.
- Higgings, R.J. & Andersson, W.S. (1983). Fat cow syndrome in a British dairy herd. *Veterinary Record*, vol. 113, ss. 461.
- Jørgensen, R.J., Nyengaard, N.R., Hara, S., Enemark, J.M. & Andersen, P.H. (1998). Rumen motility during induced hyper- and hypocalcemia. *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 39, ss. 331-338.
- Jørgensen, R.J., Nyengaard, N.R., Daniel, R.C.W., Mellau, L.S.B. & Enemark, J.M.D. (1999). Induced hypocalcemia by Na₂EDTA infusion, a review. *Journal Of Veterinary Medicine Series A-Physiology Clinical Medic*, vol. 46, ss. 389-407.

- Katoh, N. & Nakagawa-Ueta, H. (2001). Concentrations of apolipoprotein C-III in healthy cows during the peripartum period and cows with milk fever. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, vol. 63, ss. 597-601.
- Kichura, T.S., Horst, R.L., Beitz, D.C. & Littledike, E.T. (1982). Relationships between prepartal dietary calcium and phosphorus, vitamin D metabolism, and parturient paresis in dairy cows. *Journal of Nutrition*, vol. 112, ss. 480-487.
- Kronqvist, C., Emanuelson, U., Spörndly, R. & Holtenius, K. (2011). Effects of prepartum dietary calcium level on calcium and magnesium metabolism in periparturient cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 94, ss. 1365-1373.
- Kronqvist, C., Emanuelson, U., Tråvén, M., Spörndly, R. & Holtenius, K. (2012). Relationship between incidence of milk fever and feeding of minerals during the last 3 weeks of gestation. *Animal*, vol. 6, ss. 1316-1321.
- Larsen, T., Møller, G., Bellio, R. (2001). Evaluation of clinical and clinical chemical parameters in periparturient cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 84, ss. 1749-1758.
- Lean, I.J., DeGaris, P.J., McNeil, D.M. & Block, E. (2006). Hypocalcemia in dairy cows: Meta-analysis and dietary cation anion differences theory revisited. *Journal of Dairy Science*, vol. 89, ss. 669-684.
- Littledike, E.T., Whipp, S.C., Shroeder, M.S. (1969). Studies on parturient paresis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 155, ss. 1955-1962.
- Martig, J. & Mayer, G.P. (1973). Diminished hypercalcemic response to parathyroid extract in prepartum cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 56, ss. 1042-1046.
- Martinez, N., Sinedino, L.D.P., Bisinotto, R.S., Ribeiro, E.S., Gomes, G.C., Lima, F.S., Greco, L.F., Risco, C.A., Galvão, K.N., Taylor-Rodriguez, D., Driver, J.P., Thatcher, W.W. & Santos J.E.P. (2014). Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 97, ss. 874-887.
- McDonald, P. (2011). *Animal nutrition*. 7. uppl. ss. 110-111. Harlow, England: Pearson.
- Mellau, L.S.B., Jørgensen, R.J. & Enemark, J.M.D. (2001). Plasma calcium, inorganic phosphate and magnesium during hypocalcaemia induced by a standardized EDTA infusion in Cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 42, ss. 251-260.
- Oetzel, G.R. (1991). Meta-analysis of nutritional risk factors for milk fever in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, vol. 74, ss. 3900-3912.
- Oikawa, S. & Katoh, N. (2002). Decreases in serum apolipoprotein B-100 and A-I concentrations in cows with milk fever and downer cows. *The Canadian journal of veterinary research*, vol. 66, ss. 31-34.
- Ramberg, Jr.C.F., Mayer, G.P., Kronfeld, D.S., Aurbach, G.D., Sherwood, L.M. & Potts, Jr.J.T. (1967). Plasma calcium and parathyroid hormone responses to EDTA infusion in the cow. *American Journal of Physiology*, vol. 213, ss. 878-882.
- Raphael, B.C., Dimick, P.S. & Puppione, D.L. (1973). Lipid characterization of bovine serum lipoproteins throughout gestation and lactation. *Journal of Dairy Science*, vol. 56, ss. 1025-1032.
- Reddy, C.R., Coburn, J.W., Hartenbower, D.L., Friedler, R.M., Brickman, A.S., Massry, S.G. & Jowsey, J. (1973). Studies on mechanisms of hypocalcemia of magnesium depletion. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 52, ss. 3000-3010.

- Reinhardt, T.A., Lippolis, J.D., McCluskey, B.J., Goff, J.P. & Horst, R.L. (2011). Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *The veterinary Journal*, vol. 188, ss. 122-124.
- Riond, J-L., Liesegang, A., Fakler, A. & Spichiger, U.E. (1997). Serum concentrations of total and ionized calcium and magnesium and inorganic phosphate during Na₂EDTA infusion in dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, vol. 77, ss. 161-166.
- Sasaki, K., Yamagishi, N., Kizaki, K., Sasaki, K., Devkota, B. & Hashizume, K. (2014). Microarray-based gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in dairy cows with experimental hypocalcemia and milk fever. *Journal of Dairy Science*, vol. 97, ss. 247-258.
- Sjaastad, Ø.V., Sand, O & Hove, K. (2010). Physiology of domestic animals. 2. uppl. ss. 261-292. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Staric, J. & Zadnik, T. (2010). Biochemical markers of bone metabolism in dairy cows with milk fever. *Acta Veterinaria*, vol. 60, ss. 401-410.
- Suh, S.M., Tashjian, A.H., Matsuo, N., Parkinson, D.K. & Fraser, D. (1973). Pathogenesis of hypocalcemia in primary hypomagnesemia: normal end-organ responsiveness to parathyroid hormone, impaired parathyroid gland function. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 52, ss. 153-160.
- Treacher, R.J., Reid, I.M. & Roberts, C.J. (1986). Effect of body condition at calving on the health and performance of dairy cows. *Animal Production*, vol. 43, ss. 1-6.
- Van De Braak, A.E., Van 't Klooster, A.TH., Van Hal-Van Gestel, J.C. & Malestein, A. (1984). Influence of stage of lactation and calcium level of the ration on mobilisation rate of calcium and excretion of hydroxyproline in urine in dairy cows. Studies with Na₂EDTA infusions in monozygotic twins. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A*, vol. 31, ss. 725-739.
- Van de Braak, A.E., Van 't Klooster, A.TH. & Malestein, A. (1987). Influence of a deficient supply of magnesium during the dry period on the rate of calcium mobilisation by dairy cows at parturition. *Research in Veterinary Science*, vol. 42(1), ss. 101-108.
- Van Den Top, A.M., Geelen, M.J.H., Wensing, T., Wentik, G.H., Van 't Klooster, A.TH. & Beyen, A.C. (1996). Higher postpartum hepatic triacylglycerol concentrations in dairy cows with free rather than restricted access to feed during the dry period are associated with low activities of hepatic glycerolphosphate acyltransferase. *The Journal of Nutrition*, vol. 126, ss. 76-85.
- Växa Sverige. (2015). *Redogörelse för husdjursorganisationens djurhälsovård*. Stockholm: Växa Sverige. Tillgänglig:
<http://www.vxa.se/Global/Dokument/Statistik/2015/Redogörelse%20för%20husdjursorganisationens%20Djurhälsovård%202015.pdf> (2016-05-04).
- Wang, C. & Beede, D.K. (1992). Effects of ammonium chloride and sulfate on acid-base status and calcium metabolism of dry jersey cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 75, ss. 820-828.