



A SZUBKLINIKAI HIPOKALCÉMIA HATÁSA AZ IMMUNRENDSZERRE

Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows

N. Martinez, L. D. P. Sinedino, R. S. Bisinotto, E. S. Ribeiro, G. C. Gomes, F. S. Lima, L. F. Greco, C. A. Risco, K. N. Galvão, D. Taylor-Rodriguez, J. P. Driver, W. W. Thatcher, J. E. P. Santos
University of Florida, Gainesville 32611
J. Dairy Sci. 97:874-887

Összeállította: Dr. Orosz Szilvia
Állattenyésztési Teljesítményvizsgáló Kft.

Ez egy rendkívül bonyolult, sok-paraméteres tudományos kísérlet volt, mégis van a gyakorló szakember számára is jól érthető üzenete. Ezért mutatjuk be. Elnézést kérünk a kutatóktól, de a kísérlet módszertanát egyetlen mondattal

említjük csak (mivel a megértést nehezítő, tudományos jellegű), ezért akiket a részletek érdekelnek, megkereshetik az eredeti cikket angolul a Journal of Dairy Science hivatkozott számában.

BEVEZETÉS

A tejtermelés megkezdését negatív energiamérleg és az immunfunkciók rendellenességei kísérik. Ezen körülményeknek a tükrében (a súlyosság és az időtartam függvényében) a tehenek hajlamosak a fertőző betegségekre és anyagcsere-rendellenességekre (Sordillo és Raphael, 2013). A szubklinikai hipokalcémiát korábban már összefüggésbe hozták az energiametabolizmus zavarával és a csökkent immunfunkcióval (Larsen és mtsai., 2001; Martinez és mtsai., 2012), amelyet összekapcsoltak az ellést követő betegségek emelkedett kockázatával (Martinez és mtsai., 2012). Mivel a szubklinikai hipokalcémiának magas az előfordulási gyakorisága a laktáció első hetében (Reinhardt és mtsai., 2011), valamint gyakoriak az ellés utáni problémák a tejelő tehenekben, ezért hasznos lehet megérteni az ionizált kalcium (iCa^{2+}) alacsony koncentrációjának az energia metabolizmusára és az immunfunkciókra gyakorolt hatását.

A kutatás célja az volt, hogy vizsgálják a mesterségesen előidézett szubklinikai hipokalcémia élettani hatását és az immunsejtek funkciójának változását tejelő

tehenben. A kísérlet során 10 (nem vemhes, szárazonálló) holstein tehenben indukáltak hipokalcémiát (ionizált Ca -szint a vérben: <1.0 mM) 5%EGTA intravénás adagolásával 24 órán keresztül. Az EGTA az ionizált kalciummal kelátot képez és a kalcium a vizelettel ürül, aminek eredményeként a hipokalcémia kiváltható. Azért volt *nem vemhes* és *nem tejelő* (szárazonálló) tehen a modellállat, hogy el lehessen különíteni a szubklinikai hipokalcémia közvetlen élettani hatásait az egyéb, ellés után bekövetkező hormonális és anyagcsere-változásoktól.



AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A kísérlet során, a nem frissen ellett (tehát egészséges, jó bendőműködésű, a hormonális változásokkal nem terhelt, az ellésben nem kifáradt) tehénben mesterségesen előidézett szubklinikai hipokalcémia

- **csökkentette a szárazanyag-felvételt** (1. ábra) az infúzió napján a normokalcémiás tehenekhez képest ($5,3 \pm 0,8$ vs. $9,1 \pm 0,8$ kg/nap). De az étvágy gyorsan helyreállt, amikor az iCa^{2+} koncentrációja normalizálódott a következő napokban.
- **csökkentette a bendő összehúzódásait** ($1,9 \pm 0,2$ vs. $2,7 \pm 0,2$ összehúzódás /2 perc) az infúzió utolsó 12 órájában. Ezáltal befolyásolja a kérődzést és a takarmányrészecskék áthaladási sebességét, ami hatással van a bendő telítettségére. Mások is megfigyelték a rágási aktivitás csökkenését, valamint a bendő és az oltógyomor simaizom-összehúzódásának lassulását szubklinikai vagy klinikai hipokalcémia esetén (Daniel, 1983; Hansen és mtsai, 2003). Feltehetően az emésztőrendszer mozgásának (motilitásának) általános romlása csökkentette az étvágyat ebben az esetben, amely érintette az előgyomrokat, valamint az oltógyomrot és a bélrendszert egyaránt, függetlenül attól, hogy a bélsatorna telítettsége hogyan hatott a nyomásérzékelő receptorokra (Allen, 2000).

A mesterségesen előidézett szubklinikai hipokalcémiában lévő tehenekben

- **a nem észteresztett zsírsav-koncentráció (NEFA) nagyobb volt (2. ábra), mint a normokalcémiás tehenekben** ($0,110 \pm 0,019$ vs. $0,061 \pm 0,014$ mM). Pedig a kísérleti állatok nem voltak vemhesek és nem is termeltek tejet, tehát alapvetően kiegyensúlyozott energiamérleg jellemezte őket a hipokalcémia indukálása előtt. Ez azt jelenti, hogy a zsírbontás (lipolízis) intenzívebb volt a hipokalcémiás (de egyébként egészséges és eredetileg energiaegyensúlyban lévő) tehenekben. Ez a megállapítás megegyezik a korai laktációs fázisban lévő tehenekkel végzett korábbi vizsgálatok eredményeivel, amelyekben a szubklinikai hipokalcémiával diagnosztizált teheneknél a NEFA és BHBA plazmakoncentrációjának (egyébként jellemző) emelkedése fokozódott a hipokalcémia hatására (Martinez és mtsai., 2012; Ribeiro és mtsai., 2013). A BHB érték azonban nem volt

emelkedett a normokalcémiás tehenekhez képest. Ezt az magyarázhatja, hogy a szubklinikai hipokalcémiás tehenek NEFA-koncentrációja ugyan a normokalcémiás tehenekhez képest magasabb volt, de még így is viszonylag alacsonynak ítéltető ($0,100 \pm 0,02$ mM). Lehetséges, hogy még azután is, hogy a plazma NEFA-koncentrációja 50%-kal nőtt az EGTA infúziós periódus végén ($0,148 \pm 0,03$ mM), a máj által felvett és oxidált NEFA mennyisége nem érte el a májsejtek túlterhelését jelentő és a ketontestek termelődését elindító küszöbértéket.

A mesterségesen előidézett szubklinikai hipokalcémiában lévő, de mással nem terhelt (nem ellett, nem beteg) tehenekben

- **csökkent a vérplazma inzulinkoncentrációja** ($1,44 \pm 0,23$ vs. $2,32 \pm 0,23$ ng/ml), az infúzió megkezdése után 6-18 órával (3. ábra). Ismert, hogy az inzulinválasztás csökken a természetes módon kialakuló hipokalcémia esetében ellési bénulás esetében (Littledike és mtsai., 1968).
- **emelkedett volt a glükózkoncentráció** (4. ábra) a normokalcémiás tehenekhez képest ($4,40 \pm 0,04$ vs. $4,17 \pm 0,04$ mM). A vércukorszint emelkedése az inzulintermelés csökkenésének tulajdonítható (Hayirli, 2006).

Különböző állatfajokkal végzett kísérletekkel és humán β -sejtekkel végzett *in vitro* vizsgálatok során kimutatták, hogy a hasnyálmirigy-sejtek számára szükséges az ionizált kalcium beáramlása a sejtbe ahhoz, hogy inzulint tudjanak termelni (Witzel és Littledike, 1973; Rorsman és mtsai., 2012). Ez megmagyarázza a szubklinikai hipokalcémia esetében megfigyelt alacsonyabb inzulinkoncentrációt a plazmában, a normokalcémiás tehenekhez képest. Ezek az eredmények együttesen arra utalnak, hogy a szubklinikai hipokalcémia csökkenti a hasnyálmirigy inzulinszekrécióját, ami viszont növeli a vér glükózkoncentrációját azáltal, hogy csökkenti a perifériás szövetek glükózfelvételét. Ez összhangban van egy másik kísérleti eredménnyel, ahol az ellés után (12 órán belül mérve) a vércukorszint negatív korrelációban volt a vér Ca-koncentrációjával (Larsen és mtsai., 2001). A csökkent inzulinszekréció másik következménye a hormonérzékeny lipáz gátlásának leállása, amely elősegíti a lipolízist (zsírbontást), ezáltal fokozza a lipidmobilizációt és így a

NEFA-koncentrációt a vérben (Fukao és mtsai., 2004). A plazma inzulinkoncentrációjának ilyen irányú változása valószínűleg magyarázza a plazma NEFA emelkedését a jelen vizsgálatban is. Ezeknek a folyamatoknak súlyos következményei vannak a korai laktációs tehenekben, ahol jellemzően kialakul az inzulinrezisztencia (Hayirli, 2006). Az inzulin és a glükóz anyagcseréjének további romlása fokozhatja a lipolízist és elősegítheti a szövetek további katabolizmusát (lebomlását), ezáltal a tehenek hajlamosak lesznek a zsíryanycserével kapcsolatos rendellenességekre (pl. zsírmáj-szindróma). Valójában tehát a hipokalcémia közvetlen összefüggésben áll a ketózis és a zsíryanycsere-problémák fokozott kockázatával a tejelő tehenekben (Curtis és mtsai., 1983).

A kísérlet során mérték a neutrofilek és a limfociták iCa^{2+} koncentrációját és vizsgálták a neutrofil-funkciót *in vitro*. A mesterségesen előidézett szubklinikai hipokalcémiában lévő tehenekben

- **a neutrofilekben a sejt iCa^{2+} koncentrációja gyorsabban csökkent** az ionomicinnel végzett stimuláció után *in vitro* ($9,9 \pm 1,0$ vs $13,6 \pm 1,4$ Fluo-4:Fura Red utáni arány), mint a normokalcémiás tehenek esetében. Tehát az immunsejtek ionizált kalciumszintjének csökkenése direkt hatásként rontja az immunfunkciók működését. Korábban már beszámoltak kutatók a csökkent neutrofil funkció és a szubklinikai hipokalcémia (Martinez és mtsai., 2012) vagy a klinikai hipokalcémia (Ducusin és mtsai., 2003) közötti kapcsolatról. Az ionizált kalciumszint csökkenése a neutrofil sejtekben tehát direkt módon csökkenti a fagocitózis mértékét és a baktériumok elpusztításának hatékonyságát a szubklinikai hipokalcémiás tehenekben. A negatív neutrofil funkció az infúzió befejezését követő 72 órával még fennállt, noha a kalciumszint már 30 órával az infúzió befejezését követően helyreállt. A kifejtett szarvasmarha az 'érett' neutrofileket a csontvelőben tárolja mielőtt a keringésbe jutnának, majd 9 órát maradnak a keringésben, amíg a különböző szervek fel nem használják (Paape és mtsai., 2003). Ezért ezek az eredmények azt sugallják, hogy nemcsak az érett, vérben keringő neutrofilek voltak érintettek a szubklinikai hipokalcémia negatív hatása által, hanem a csontvelőben tárolt vagy végső érés alatt álló neutrofilekre is hatással volt a kalciumhiány.
- a szubklinikai hipokalcémia **csökkentette a fagocitózisban részt vevő neutrofilek (5. ábra) százalékát** ($22,1 \pm 2,1$ vs. $29,3 \pm 2,1\%$). Tehát a

hipokalcémia direkt hatásként csökkentette a fagocitózis mértékét, azaz a kórokozók által kiváltott betegségekkel szembeni ellenállóképeséget.

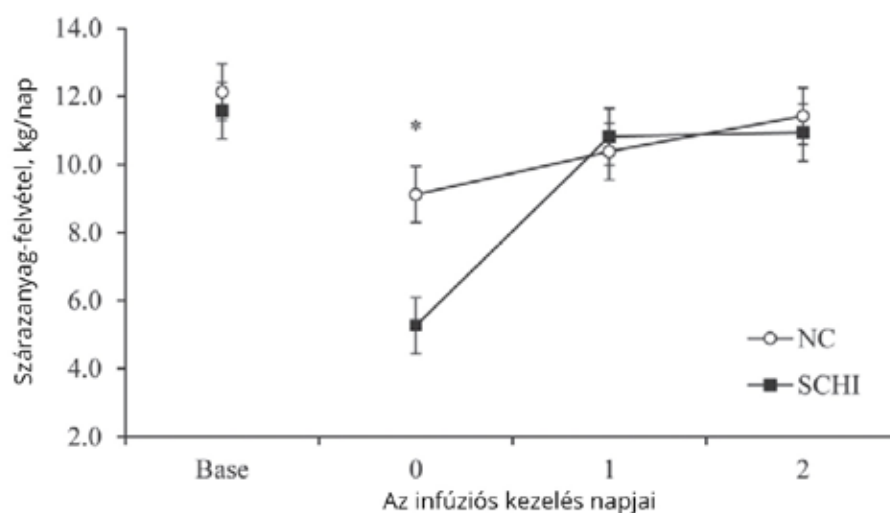
- **csökkentette az oxidatív 'kitörést' (az oxigén szabadgyökök kiszabadulását, ami megöli a baktériumot) a kórokozó baktériumokkal szemben** ($16,1 \pm 1,7$ vs. $24,2 \pm 1,7\%$). Azaz a hipokalcémia még szubklinikai állapotban is elnyomta a baktériumok elpusztítására való képességet.

A szubklinikai hipokalcémia tehát összességében rontotta az étvágyat, hatással volt az anyagcserére és károsította az immunsejtek működését azon tehenekben, melyeket nem terhelt egészségi probléma, elléskörüli stressz vagy fertőzés. Ezért feltételezhető, hogy ellés után ez a direkt hatás még fokozottabb. Ezek az eredmények alátámasztják az ellés utáni tejelő teheneknél végzett korábbi állategészségi vizsgálatok eredményeit (Martinez és mtsai., 2012), megerősítik egy olyan közvetlen mechanizmus tényét, amelynek révén a szubklinikai hipokalcémia tovább csökkenti az energiamérleget és közvetlen módon rontja az immunfunkciót az ellés után tejelő tehenben.

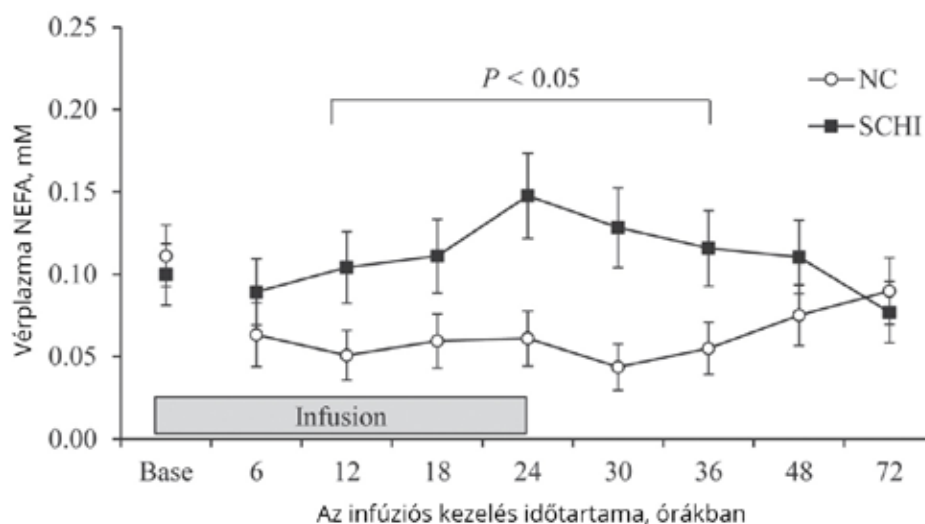
Nyilván további vizsgálatok szükségesek, hogy a frissen ellett tehenek esetében az adaptációs- (tranzíciós) időszak alatt a szubklinikai hipokalcémia hogyan (milyen mértékben és meddig) hat az immunrendszerre.



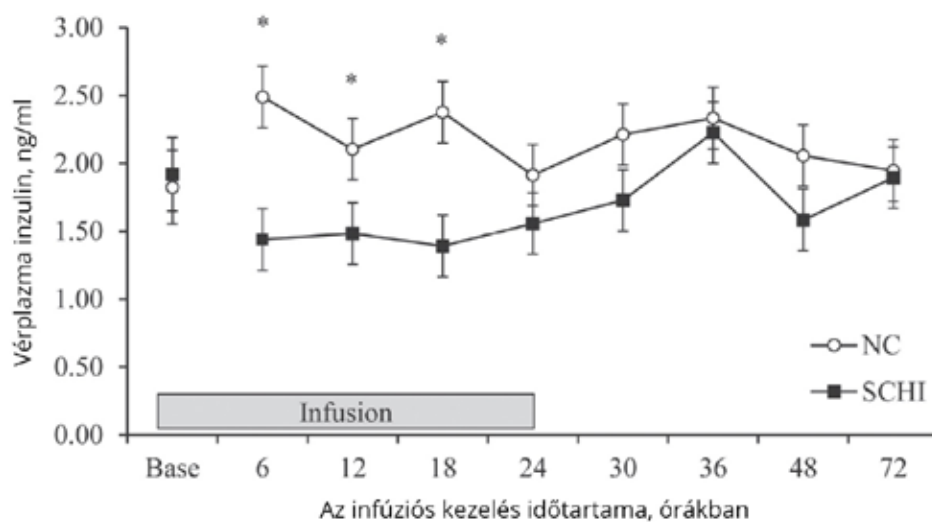
1. ÁBRA A SZÁRAZANYAG-FELVÉTEL ALAKULÁSA MESTERSÉGESEN ELŐIDÉZETT SZUBKLINIKAI HIPOKALCÉMIÁBAN LÉVŐ (SCHI) ÉS NORMOKALCÉMIÁS (NC) NEM VEMHES, SZÁRAZONÁLLÓ TEHENEKBEN. ELEMSZÁM: 10.



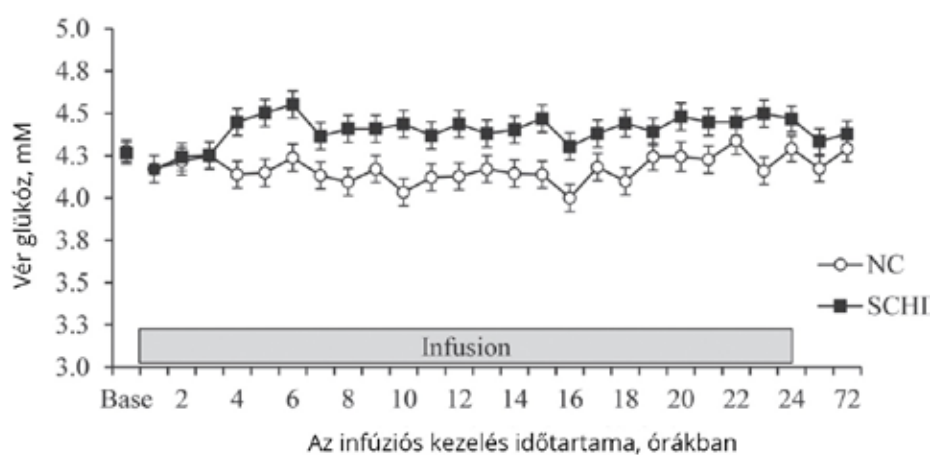
2. ÁBRA A VÉR NEFA-KONCENTRÁCIÓJÁNAK ALAKULÁSA MESTERSÉGESEN ELŐIDÉZETT SZUBKLINIKAI HIPOKALCÉMIÁBAN LÉVŐ (SCHI) ÉS NORMOKALCÉMIÁS (NC) NEM VEMHES, SZÁRAZONÁLLÓ TEHENEKBEN. ELEMSZÁM: 10.



3. ÁBRA A VÉR INZULINKONCENTRÁCIÓJÁNAK ALAKULÁSA MESTERSÉGESEN ELŐIDÉZETT SZUBKLINIKAI HIPOKALCÉMIÁBAN LÉVŐ (SCHI) ÉS NORMOKALCÉMIÁS (NC) NEM VEMHES, SZÁRAZONÁLLÓ TEHENEKBEN. ELEMSZÁM: 10.



4. ÁBRA A VÉR CUKORKONCENTRÁCIÓJÁNAK ALAKULÁSA MESTERSÉGESEN ELŐIDÉZETT SZUBKLINIKAI HIPOKALCÉMIÁBAN LÉVŐ (SCHI) ÉS NORMOKALCÉMIÁS (NC) NEM VEMHES, SZÁRAZONÁLLÓ TEHENEKBEN. ELEMSZÁM: 10.



5. ÁBRA A NEUTROFIL FAGOCITÓZIS ALAKULÁSA MESTERSÉGESEN ELŐIDÉZETT SZUBKLINIKAI HIPOKALCÉMIÁBAN LÉVŐ (SCHI) ÉS NORMOKALCÉMIÁS (NC) NEM VEMHES, SZÁRAZONÁLLÓ TEHENEKBEN. ELEMSZÁM: 10.

