

# REMIVA<sup>®</sup>

## UTJECAJ SUPKUTANE APLIKACIJE KALCITRIOLA NA METABOLIZAM MAGNEZIJA KOD PJETLIĆA LAKE PASMINE

## EFFECT OF SUBCUTANEOUS APPLICATION OF CALCITRIOL ON MAGNESIUM METABOLISM IN LIGHT BREED COCKERELS

**Katrin Gnjiđić, Natalija Filipović, Lana Vranković, Z. Stojević, T. Mašek**

Izvorni znanstveni članak - Original scientific paper  
Primljeno - Received: 28. travanj - April 2014

### SAŽETAK

Istražen je učinak aplikacije 1,25-dihidroksikalciferola na razinu magnezija u serumu pjetlića lake pasmine. Istraživanja su obavljena na 78 pjetlića, u tri odvojena pokusa. Prvi pokus imao je za cilj utvrditi učinke jednokratne aplikacije visokih doza kalcitriola, drugi pokus učinke ponavljanih niskih doza kalcitriola, a treći učinke jednokratne visoke doze kalcitriola i 48-satnog gladovanja. Koncentracija magnezija određena je u serumu pomoću automatskog analizatora. Visoke doze kalcitriola dovele su do smanjenja razine magnezija u serumu i kod stresa uzrokovanog gladovanjem i pri odsutnosti stresa, dok ponavljanje niskih doza nije dovelo do značajnih promjena. Iz rezultata je vidljivo kako visoke doze kalcitriola pri optimalnim količinama minerala u hrani dovode do smanjenja razine magnezija u krvi. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdio učinak kalcitriola na metabolizam magnezija u stanjima promijenjene opskrbe peradi magnezijem i utvrdila važnost stimulativnog učinka vitamina D na intestinalnu resorpciju magnezija.

Ključne riječi: pjetlići, kalcitriol, magnezij, stres

### UVOD

Vitamin D se unosi u organizam hranom u obliku kolekalciferola sadržanog u namirnicama animalnog podrijetla poput riba, ribljeg ulja, žumanjka, jetre, mlijeka i mliječnih proizvoda, kao i u obliku ergokalciferola, koji pod utjecajem ultraljubičastog zračenja nastaje iz ergosterola, prekursora vitamina D<sub>2</sub>, podrijetlom iz gljiva i kvasaca (Muller, 2002.). Vrlo važan izvor vitamina D predstavlja i njegova sinteza u koži iz provitamina D<sub>3</sub> (7-dehidrokolesterola). U jetri, pod djelovanjem mikrosomalnog enzima 25-hidroksilaze, tijekom reakcije posredovane citokromom P-450 (CYP450), kolekalciferol i ergokalciferol podliježu hidroksilaciji na položaju 25, pri čemu prelaze u 25-hidroksikolekalciferol (kalcidol), odnosno 25-hidroksiergokalciferol (Houghton i Vieth, 2006.). Taj oblik prevladava u cirkulaciji, a

metabolički je slabo aktivan. On podliježe još jednoj modifikaciji i to prvenstveno u mitohondrijima proksimalnih tubula bubrega, gdje biva hidroksiliran pod utjecajem enzima 1- $\alpha$ -hidroksilaze, te tako nastaje biološki najaktivniji metabolit u organizmu: 1,25 dihidroksikolekalciferol, odnosno kalcitriol (Lips, 2006.).

Upravo je konverzija iz 25-hidroksikolekalciferola u 1,25 dihidroksikolekalciferol limitirajući čimbenik u metabolizmu vitamina D. Ptice čine poseban model za istraživanja metabolizma minerala, pa tako i proučavanje učinaka kalcitriola. Odgovor organizma na hipokalcemiju u ptica je izuzetno brz, a razliku od sisavaca (Koch i sur., 1984.). Vrlo mobilne zalihe kalcija u takozvanom medularnom koštanom tkivu, koje se mobiliziraju pod djelovanjem estrogena, omogućuju ovaj brzi odgovor na hipokalcemiju, prvenstveno uzrokovanu velikim gubitkom kalcija tijekom formiranja ljuske jaja (Stanford, 2005.). Me-

Dr. sc. Katrin Gnjiđić; dr. sc. Natalija Filipović, docent; Lana Vranković, dr. vet. med.; Dr. sc. Zvonko Stojević, red. prof.; Dr. sc. Tomislav Mašek, docent, Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet.

Tablica 1. Sastav pokusne hrane

Table 1. Composition of the experimental feed

Kemijski sastav (Chemical composition)		Dodano u 1kg hrane: vitamin A 24000 i.j., vitamin D <sub>3</sub> 3000 i.j., vitamin E 20 mg, vitamin K <sub>3</sub> 4 mg, vitamin B <sub>1</sub> 4 mg, vitamin B <sub>2</sub> 6 mg, vitamin B <sub>6</sub> 4 mg, vitamin B <sub>12</sub> 20 µg, niacin 60 mg, pantotenska kiselina 14 mg, kolin klorid 1000 mg, vitamin C 30 mg, folna kiselina 1 mg, biotin 0,1 mg, jod 1,5 mg, željezo 120 mg, bakar 4 mg, mangan 150 mg, cink 100 mg, kobalt 0,15 mg, selen 0,30 mg. Added in 1kg of feed: vitamin A 24000 IU, vitamin D <sub>3</sub> 3000 IU, vitamin E 20 mg, vitamin K <sub>3</sub> 4 mg, vitamin B <sub>1</sub> 4 mg, vitamin B <sub>2</sub> 6 mg, vitamin B <sub>6</sub> 4 mg, vitamin B <sub>12</sub> 20 µg, niacin 60 mg, pantothenic acid 14 mg, cholin chloride 1000 mg, vitamin C 30 mg, folic acid 1 mg, biotin 0,1 mg, iodine 1,5 mg, iron 120 mg, copper 4 mg, manganese 150 mg, zinc 100 mg, cobaltum 0,15 mg, selenium 0.30 mg.
Sirove bjelančevine (Crude protein)	14,50 %	
Metionin (Methionine)	0,34 %	
Sirova vlaknina (Crude fibre)	4,50 %	
Sirova mast (Crude fat)	3,40 %	
Sirovi pepeo (Crude ash)	6,30 %	
Kalcij (Calcium)	1,25 %	
Fosfor (Phosphorus)	0,75 %	

metabolizam vitamina D u peradi pokazuje i druge specifičnosti, kao što su: umanjena tvorba kalciferola u koži zbog nedostatka izloženosti prirodnom svjetlu u tehnološkom postupku peradarske proizvodnje; aktivnosti metabolita 24,25 (OH)<sub>2</sub> vitamina D u koži nesilica, te slabe aktivnosti vitamina D<sub>2</sub> u usporedbi s D<sub>3</sub> u ptica, za razliku od sisavaca, a koja je posljedica njegove pojačane ekskrecije bubrezima (Stanford, 2005.).

Osim utjecaja na metabolizam kalcija i fosfora, kalcitriol stimulira jejunalnu resorpciju magnezija kod čovjeka i štakora (Hardwick i sur., 1991.). Prema našim saznanjima, ne postoje istraživanja učinka kalcitriola na metabolizam magnezija kod peradi. Kako bi istražili ove učinke kao i važnost vitamina D u metabolizmu magnezija, provest će se istraživanja akutnih visokih doza kalcitriola, niskih kroničnih doza i visokih doza pri stresu.

#### MATERIJAL I METODE

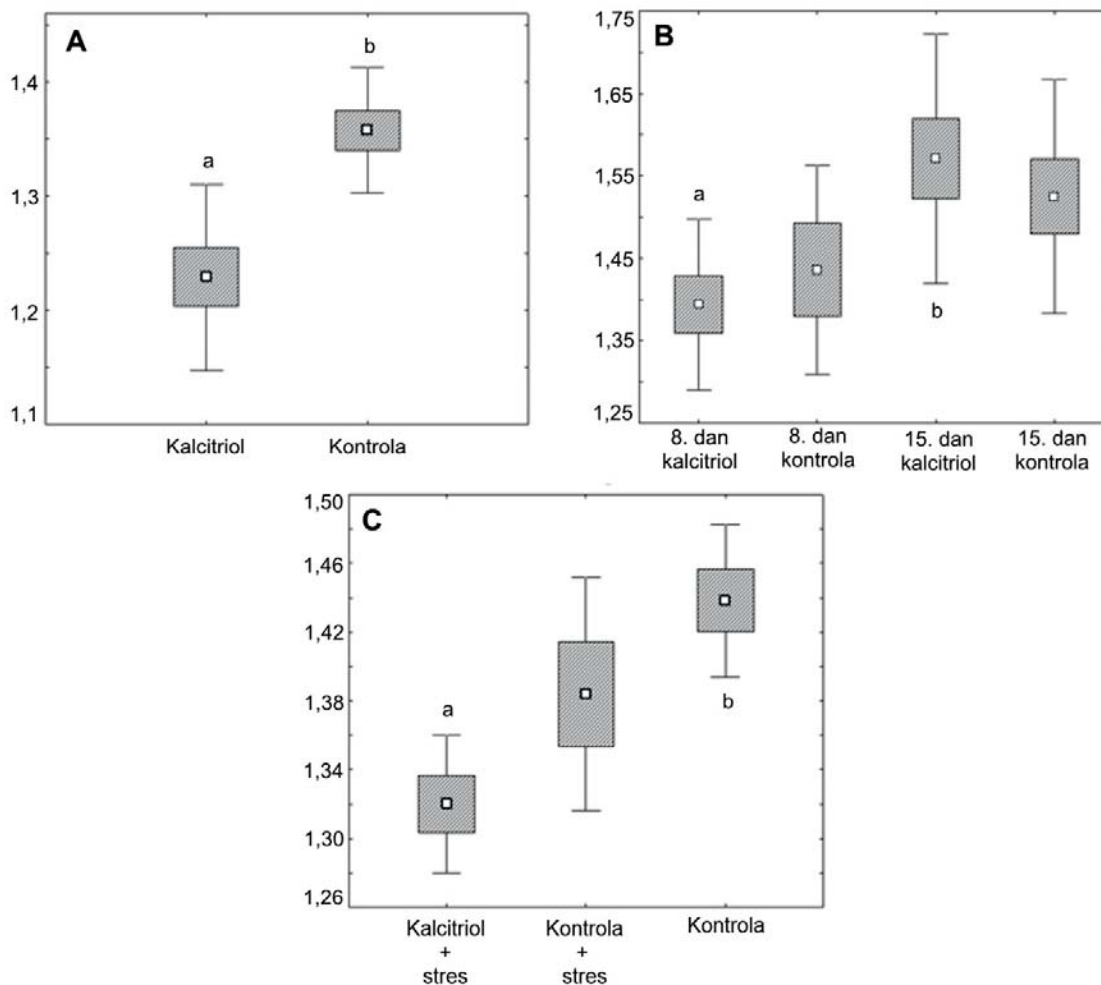
Pokusi su provedeni na 78 pjetlića pasmine Lohman brown koji su u dobi od 9 tjedana smješteni u kaveze po 5 životinja. Pjetlići su tijekom pokusa hranjeni potpunom krmnom smjesom čiji sastav je prikazan u tablici 1. Smjesa i voda pjetlićima su davani ad libitum. Istraživanje se sastojalo od tri odvojena pokusa. Prvi pokus, kojemu je za cilj bio utvrditi akutne učinke aplikacije visokih doza kalcitriola obavljen je na životinjama u dobi od 11 tjedana. Skupini od 10 pjetlića supkutano je aplicirana jednokratna visoka doza kalcitriola (Sigma, St Louis, SAD): 10 µg/kg tjelesne mase,

dok je kontrolnoj skupini (n=10) bila aplicirana fiziološka otopina u istoj količini kao placebo. Nakon 24 h uslijedilo je uzimanje uzoraka krvi. Drugi dio pokusa kojemu je za cilj bio utvrditi učinke aplikacije ponavljanih niskih doza kalcitriola započeo je u dobi od 11 tjedana. Skupini od 19 pjetlića svakodnevno je supkutano aplicirana niska doza kalcitriola: 0,28 µg/kg tjelesne mase, dok je kontrolnoj skupini (n=17) bio istodobno apliciran placebo. Nakon 7 dana tretmana, 8. dan je uslijedilo uzimanje uzoraka krvi od 9 pokusnih i 7 kontrolnih životinja, a nakon 14. dana uzorkovano je po 10 životinja iz kontrolne i pokusne skupine. Treći dio pokusa proveden je u dobi od 18 tjedana. Skupina od 12 životinja bila je podvrgnuta 48 satnom gladovanju. Nakon 24 h gladovanja, a 24 h prije uzorkovanja, skupini od 6 pjetlića aplicirana je jednokratna visoka doza kalcitriola: 10 µg/kg tjelesne mase, a drugoj skupini (n=6) placebo. Kao kontrolna skupina korišteno je 6 životinja koje su hranjene ad libitum te im je 24 h prije uzorkovanja apliciran placebo. Krv za analizu uzimana je, punkcijom vratne vene (*v. jugularis externa*), u epruvete s gelom (BD Vacutainer® tubes, BD Diagnostics, Plymouth, Velika Britanija). Nakon grušanja i centrifugiranja (15 minuta/3000 g, pri 4 °C) odvojen je krvni serum. Dobiveni uzorci krvnog seruma alikvotirani su i pohranjeni pri -20 °C do analiza. U dobivenim uzorcima krvnoga seruma određena je koncentracija magnezija korištenjem gotovih kompleta reagensa, pomoću automatskog biokemijskog analizatora SABA 18 (AMS, Rim, Italija).

## REZULTATI I RASPRAVA

Koncentracija Mg u krvnome serumu pjetlića 24 h nakon jednokratne supkutane aplikacije visoke doze kalcitriola ( $10 \mu\text{g/kg}$  tjelesne mase) bila je značajno niža u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ;

slika 1A). Kod svakodnevne supkutane aplikacije niske doze kalcitriola ( $0,28 \mu\text{g/kg}$  tjelesne mase), koncentracija Mg u krvnome serumu pokusne skupine pjetlića bila je značajno viša 15. dana pokusa u odnosu na 8. dan ( $p < 0,05$ ; slika 1B). Utvrđen je značajni utjecaj stresa izazvanog 48-satnim glado-



Slika 1. Utjecaj jednokratne aplikacije visoke doze kalcitriola ( $10 \mu\text{g/kg}$  tjelesne mase) na razinu magnezija (mmol/l) u krvi pjetlića (A), utjecaj dnevnih aplikacija niske doze kalcitriola ( $0,28 \mu\text{g/kg}$  tjelesne mase/dan) na razinu magnezija (mmol/l) u krvi pjetlića nakon 8 i 15 dana (B) i utjecaj jednokratne aplikacije visoke doze kalcitriola ( $10 \mu\text{g/kg}$  tjelesne mase) na razinu magnezija (mmol/l) u krvi pjetlića nakon 48 sati gladovanja (C). □, srednja vrijednost; ▒, standardna pogreška;  $\pm$ , standardna devijacija. a,b: skupine s različitim oznakama se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

Figure 1. Effect of single dose administration of high dosage of calcitriol ( $\mu\text{g/kg}$  body weight) on the magnesium level (mmol/l) in cockerel blood (A), the effect of daily application of low dosages of calcitriol ( $0.28 \mu\text{g/kg}$  body weight/day) on the magnesium level (mmol/l) in cockerel blood after 8 and 15 days (B) and the influence of single dose application of high dosage of calcitriol ( $10 \mu\text{g/kg}$  body weight) on the magnesium level (mmol/l) in cockerel blood after 48 hours of fasting (C). □, mean; ▒, standard error;  $\pm$ , standard deviation. a,b: groups with different labels are statistically significantly different ( $p < 0.05$ ).

vanjem i jednokratne supkutane aplikacije visoke doze kalcitriola ( $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  tjelesne mase) na koncentraciju Mg u krvnome serumu pjetlića, koja je bila niža u skupini kojoj je apliciran kalcitriol u odnosu na kontrolnu skupinu (slika 1C). Nakon jednokratne aplikacije visoke doze kalcitriola, koncentracija magnezija u krvnom serumu pjetlića značajno se snižava. Međutim, i nakon toga, vrijednosti ostaju unutar fiziološkog raspona utvrđenog za perad (Farzinpour i sur., 2011., Piotrowska i sur., 2011.). Postoje tri intestinalna transportna sustava za magnezij, pri čemu je jedan ovisan o utjecaju vitamina D (aktivan), drugi neovisan o utjecaju vitamina D (jednostavna difuzija), a kod trećeg magnezij prolazi kroz sluznicu zajedno s vodom na osnovi hiper-hipertonične otopine (vlakom otapala) (Stojević i sur., 1993.; Stojević i Timet, 1989.; Hardwick i sur., 1991.). Uloga pasivnog transporta je pri tome najvažnija (Stojević i sur., 2003.). Visoka koncentracija kalcija u hrani uzrokuje smanjenu resorpciju magnezija (Feizi i sur., 2011.). Uz stupanj resorpcije, koncentracija magnezija u krvi ovisi i o izlučivanju urinom i redistribuciji u ekstravaskularne i tkivne komponente, a to su vjerojatno neki od razloga zbog čega rezultati istraživanja o utjecaju vitamina D na koncentraciju magnezija u organizmu nisu jednoznačni. Tako, na primjer, neki autori nisu zabilježili značajnu povezanost vitamina D i koncentracije magnezija u krvnoj plazmi (Karbach, 1989.), dok su drugi autori utvrdili pozitivan utjecaj vitamina  $D_3$  na resorpciju magnezija (Dai i sur., 2001.; Krejs i sur., 1983.; Hardwick i sur., 1991.). Neki autori su taj pozitivan utjecaj vitamina  $D_3$  utvrdili samo u životinja s izraženim deficitom magnezija (Krejs i sur., 1983.). Visoke doze vitamina D povisuju količinu Mg u urinu, što dovodi do smanjenja razine serumskog Mg i kod ljudi i kod životinja (Hanna, 1961.; Lifshitz i sur., 1967.). Svakodnevna aplikacija niskih doza kalcitriola nije imala utjecaja na koncentraciju magnezija u krvnom serumu pjetlića, ali je koncentracija magnezija u krvnom serumu pokusne skupine pjetlića bila značajno viša 15. dana pokusa u odnosu na 8. dan pokusa.

Stres uzrokovan 48-satnim gladovanjem i jednokratna supkutana aplikacija visoke doze kalcitriola dovode do smanjenja koncentracije Mg u krvnome serumu. Povezanost vitamina D i smanjene koncentracije magnezija još je izraženija zbog gladovanja, što su utvrdili Cason i Teeter (1994.) te Landers i sur. (2007.), a što objašnjava i smanjenu razinu u našem istraživanju.

## ZAKLJUČAK

Visoke doze kalcitriola kod peradi dovode do smanjenja razine magnezija u krvi. Ovakvo smanjenje sukladno je činjenici da administracija vitamina D povećava ekskreciju magnezija putem urina. Zbog toga ostaje nejasna uloga vitamina D kao stimulatora resorpcije magnezija.

## LITERATURA

1. Cason, J. J., Teeter, R. G. (1994): Feed access effects on serum metabolites of hybrid large white male turkeys. *Poult. Sci.* 73, 1348-1351.
2. Dai, L. J., Ritchie, G., Kerstan, D., Kang, H. S., Cole, D. E., Quamme, G. A. (2001): Magnesium transport in the renal distal convoluted tubule. *Physiol. Rev.* 81, 51-84.
3. Farzinpour, A., Karimi, A., Ahmadi, A. S. (2011): Effect of Dietary Phytase and Different Levels of Non-Phytate Phosphorus on Some Serum Minerals and Biochemical Parameters in Broiler Chickens. *J. Animal Vet. Adv.* 10, 1317-1321.
4. Feizi, A., Dadian, F., Nazeri, M. (2011): Evaluation the Effect of Dietary Calcium Percentage on Incidence of Gout syndrome in Broiler Chicks. *Aus. J. Basic Appl. Sci.* 5, 1750-1755.
5. Hanna, S. (1961) Influence of large doses of vitamin D on magnesium metabolism in rats. *Metabolism.* 10, 734-743.
6. Hardwick, L. L., Jones, M. R., Brautbar, N., Lee, D. B. N. (1991): Magnesium Absorption: Mechanisms and the Influence of Vitamin D, Calcium and Phosphate. *J. Nutr.* 121, 13-23.
7. Houghton, L. A., Vieth, R. (2006): The case against ergocalciferol (vitamin D<sub>2</sub>) as a vitamin supplement. *Am. J. Clin. Nutr.* 84, 694-697.
8. Karbach, U. (1989): Cellular-mediated and diffusive magnesium transport across the descending colon of the rat. *Gastroenterology* 96, 1282-1289.
9. Koch, J., Wideman, R. F. Bush, E. G. (1984): Blood ionic calcium response to hypocalcaemia in the chicken induced by ethylene glycol-bis- (B-aminoethylether)-N, N'- tetraacetic acid: Role of the parathyroids. *Poultry Science* 63, 167-171.
10. Krejs, G. J., Nicar, M. J., Zerwekh, J. E., Norman, D. A., Kane, M. G., Pak, C. Y. C. (1983): Effect of 1,25 dihydroxyvitamin D on calcium and magnesium absorption in the healthy human jejunum and ileum. *Am. J. Med.* 75, 973-976.

11. Landers, K. L., Moore, R. W., Dunkley, C. S., Herrera, P., Kim, W. K., Landers, D. A., Howard, Z. R., Mc Reynolds, J. L., Bryd, J. A., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., Ricke, S. C. (2007): Immunological cell and serum metabolite response of 60-week-old commercial laying hens to an alfalfa meal molt diet. *Bioresource Technology* 99, 604–608.
12. Lifshitz, F., Harrison, H. C., Harrison, H. E. (1967) Effects of vitamin D on magnesium metabolism in rats. *Endocrinology* 81, 849-853.
13. Lips, P. (2006): Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol.* 92, 4-8.
14. Muller, J. (2002): Analytik von freien Sterolen und Entwicklung einer Screening-Methode zur Charakterisierung des Inhibitionsverhaltens neuer Sterolbiosyntheseinhibitoren. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München
15. Piotrowska A., Burlikowska, K., Szymeczko, R. (2011): Changes in blood chemistry in Broiler Chickens during the Fattening Period. *Folia biologica (Kraków)*. 59, 183-187.
16. Stanford, M. D. (2005): Calcium metabolism in grey parrots: the effects of husbandry. Thesis submitted in accordance with the requirements of The Royal College of Veterinary Surgeons for the Diploma of Fellowship by Michael David Stanford.
17. Stojević, Z., Emanović, D., Milinković-Tur, S., Đuzel, S. (1993): Magnesium absorption from the swine caecum. 1. Effects of different magnesium and ammonium concentrations in the contents on the intensity of magnesium absorption. *Vet. Arhiv.* 63, 265-272.
18. Stojević, Z., Milinković-Tur, S., Poljičak-Milas, N. (2003): Hipomagnezijemija u domaćih životinja-uzroci i posljedice. *Prax. Vet.* 51, 197-201.
19. Stojević, Z., Timet, D. (1989): Influence of calcium ions on gastric absorption of magnesium ions in cattle. *Vet. Arhiv.* 59, 71-76.

## SUMMARY

We investigated the effect of the application of 1.25-dihydroxycalciferol on the level of magnesium in the serum of light breed cockerels. Investigation was carried out on 78 cockerels, in three separate experiments. The first experiment aimed to determine the effects of single dose administration of high doses of calcitriol, the second experiment aimed to determine the effects of repeated low doses of calcitriol and the third the effects of a single high dose calcitriol after 48-h fast. The magnesium concentration was determined in the serum using an automatic analyzer. High doses of calcitriol led to reduced levels of magnesium in the serum and in stress induced fasting, while low doses did not lead to significant changes. The results show that high-dose calcitriol, when using mineral balance diets, leads to reduced levels of magnesium in the blood. Further research is needed to determine the effect of calcitriol on the metabolism of magnesium during impaired supply of poultry with magnesium and to determine the importance of the stimulatory effect of vitamin D on the intestinal absorption of magnesium.

Key words: roosters, calcitriol, magnesium, stress