



Statens Husdyrbrugsforsøg 1988

Meddelelse

23. JUNI

NR. 709

Indflydelsen af K-vitamin på kalcium-homøostase

D. D. Hall

Afdelingen for forsøg med svin og heste

24 sogrise fik syntetiske foderblandinger indeholdende 0,1, 1,0 og 3,0 pct. Ca med og uden K-vitamin (5 mg menadion/kg foder) for at bestemme indflydelsen af vitamin K på kalcium-homøostase (blodets indhold af kalcium holdes konstant). For at fremkalde K-vitaminmangel blev foderet tilsat terapeutiske mængder af antibiotika.

Fodring i 3 uger fremkaldte en moderat grad af K-vitaminmangel, men der er ikke observeret indre blødninger eller dødsfald, som fundet i USA. Mængden af kalcium i gødning og urin var afhængig af foderets indhold af kalcium og K-vitamin. Det var indholdet af kalcium i plasma også. Kalcium-homøostase synes at være reguleret af proteiner afhængige af K-vitamin. Resultaterne tyder på, at K-vitamin er af stor betydning for grise, der får store mængder antibiotika eller kalcium.

Indledning

Den klassiske fysiologiske sammenhæng mellem vitamin K og kalcium er almindelig kendt ved blodets koagulering eller størkning. Alle proteiner i blodet, der er afhængige af vitamin K, har affinitet (tilbøjelighed til at danne kemiske forbindelser) til kalcium. Et blodkoagel dannes af et Ca-fosfolipid-protein kompleks.

Mange andre proteiner i kroppen er vitamin K afhængige og har ligesom koagulations-proteiner affinitet til kalcium. Hvis vitamin K afhængige proteiner ekstrahepatisk er bærere af kroppens Ca, kan kalcium-homøostase være en vitamin K afhængig proces.

Dr. Stener S. Bernvil og Dr. J. Ingerslev, Koagulationslaboratoriet, Aarhus Kommunehospital, takkes for de udførte analyser og kritisk gennemlæsning af manuskriptet.

Endvidere er formålet med denne undersøgelse at undersøge indflydelsen af vitamin K mangel på kalcium-homøostase hos voksende svin ved hjælp af balanceforsøg.

Materiale og metoder

Forsøgsgrisene

Fire kuld à 6 sogrise fik syntetiske foderblandinger i opsamlingsbure i 3 uger. Begyndelsesvægten var 27 kg, og grisene fik 1 kg foder dagligt. I den sidste uge blev gødning og urin opsamlet til bestemmelse af optagelse og udskillelse af Ca. For at undgå at grisene skulle æde gødning, som indeholder K-vitamin, blev der anvendt bindster.

Forsøgsfoderet

Der er anvendt en syntetisk blanding for at få så lavt et indhold af Ca og K-vitamin som muligt. Fo-

derets sammensætning er vist i tabel 1. Antibiotika (sulfathiazol og tetracyclin) blev tilsat i terapeutiske doser for at fremkalde mangel på vitamin K som vist af Schendel og Johnson (1962, J. Nutr. 76:124). Grundfoderet indeholdt 0,1 pct. Ca. Ved at tilsætte 2,6 eller 7,8 pct. kridt blev der fremstillet to foderblandinger, der indeholdt henholdsvis 1,0 og 3,0 pct. Ca. Halvdelen af foderet blev tilsat 10 mg pr. kg af en 50 pct. menadionblanding (Menadione Sodium Bisulfite, MSB). Menadion er et syntetisk stof med K-vitamin effekt.

Tabel 1. Grundfoderets sammensætning

Fodermiddel	%	Vitamin-mineralbl. indholdt	pr. g
Kasein	20,0	Vitamin A	2000 i.e.
Rørsukker	26,8	Vitamin D	500 i.e.
Dekstrose	26,8	Vitamin B ₁₂	0,01 mg
Cellulose	15,0	Vitamin B ₂	2 mg
Sojaolie	5,0	Pantotensyre	5 mg
Lecitin	0,1	Alfa-tocopherolacetat	20 mg
Mononatriumfosfat	4,5	Zinkoxid	50 mg
Cholinklorid	0,1	Kobbersulfat	40 mg
Kalciumklorid . . .	0,5	Jernsulfat	125 mg
Magnesiumkarbonat	0,4	Manganoxid	18 mg
Sulfathiazol	0,2	Natriumselenit	0,33 mg
Oxytetracyclin . . .	0,01	Kaliumjodid	0,13 mg
Vitamin-mineralbl.	0,5		

Koagulationsprocessens forløb

Blodets koagulering er i korthed følgende: K-vitamin er nødvendigt for at danne protrombin, som ved tilstedeværelse af kalciumioner og enzymet tromboplastin omdannes til trombin. Sidstnævnte omdanner det flydende proteinstof fibrinogen til det faste fibrin. I laboratoriet måles det antal sekunder, det enkelte reaktionstrin tager. En række reaktioner indgår imidlertid i processen. I tabel 3 er således vist, hvilke koagulationsproteiner, der er målt i denne undersøgelse. Her er iøvrigt benyttet den internationale nomenklatur. Følgende navne benyttes også i litteraturen: Faktor II = protrombin, faktor VII = proconvertin, faktor IX = Christmas factor, faktor X = Stuart factor, faktor V = proaccelerin, faktor XI = tromboplastin antecedent factor, faktor XII = Hageman factor.

Ved forsøgets afslutning blev der tilsat citrat til de udtagne plasmaprøver fra 2 gentagelser (kuld). Heri analyseredes for PT (Protrombin tid), APTT (aktiveret partiel tromboplastin tid) samt PP % = Proconvertin - Proaccelerin fraktion. Sidstnævnte test er alene følsom for koagulationsfaktorer, som er K-vitamin afhængige (II, VII og X). PT er den klassiske prøve, der benyttes til at måle K-vitaminmangel og er følsom overfor faktor II, V, VII og X. APTT er en koagulations-test, som er følsom overfor det interne system (K-vitamin afhængige faktorer II, V og X). Som kontrol anvendtes humane plasmaprøver. Kontrolholdets blodprøver fra 6 kuldsøskende blev udtaget ved forsøgets begyndelse. Kontrolgrisene fik en byg-sojaskråblanding med 2 mg menadion pr. kg.

Plasmaprøverne blev som nævnt også analyseret for proteinaktivitet, der er nødvendig for blodets koagulering. Syntesen af faktor II, VII, IX og X er afhængig af vitamin K. Vitamin K er dog ikke en bestanddel af disse proteiner, men er en faktor, som bringer dem på en aktiv form, der er involveret i blodets koagulering.

Protein C blev også målt i plasmaprøverne. Protein C's biokemiske funktion er at inaktivere koagulationsproteinerne V og VII. Imidlertid er protein C et vitamin K afhængigt protein.

Blod- og plasmaprøver blev analyseret ved absorptions-spektrofotometri af perklorisyre fordøjede prøver for indholdet af kalcium ved forsøgets afslutning.

Resultater

Efter 3 uger på forsøgsfoder viste PT og PP (tabel 2), at en moderat grad af K-vitaminmangel var indtrådt. Højt og lavt indhold af Ca forøgede APTT, når foderet ikke indeholdt vitamin K, mens der kun var ringe indflydelse på PT og PP.

Plasmaaktiviteten af vitamin K afhængige proteiner reduceredes efter 3 uger på forsøgsfoder (tabel 3). Store mængder Ca øgede plasmakoncentrationerne af faktor II, VII og X, ligesom faktor V og XII var forøget. Tilskud af vitamin K gav en lille stigning i faktor II, VII og protein C.

Tabel 2. Koaguleringstid

Ca, pct. Vitamin K, mg/kg foder	0,1 0	1,0 0	3,0 0	0,1 5	1,0 5	3,0 5	Kontrol
PT, sek. ^{1,2,3} (Quick)	15,2	14,8	14,0	14,8	14,3	12,1	13,5
PP, pct. ^{1,2,3} (PP%, Owren)	37	40	50	46	47	61	76
APTT, sek. ^{2,3,4}	45	23	41	23	26	23	39

Signifikante værdier: ¹Kontrol vs. vit K = 0 (P<0,05) ²Ca (P<0,06) ³K (P<0,05) ⁴Ca × K (P<0,05).

Sammenlignet med humane kontrolværdier havde grisene langt større koncentrationer af faktor IX, XI og XII samt faktor V. Plasmaaktivite-

ten af faktor II, VII og V var derimod lavere hos grisene end hos mennesker.

Tabel 3. Plasmaaktivitet af koagulationsproteiner og protein C

Ca, pct. Vitamin K, mg/kg foder	0,1 0	1,0 0	3,0 0	0,1 5	1,0 5	3,0 5	Kontrol
<i>K-vitamin afhængige proteiner (enheder pr. ml)¹⁾:</i>							
Faktor II ²⁾	0,19	0,19	0,30	0,24	0,21	0,34	0,51
Faktor VII	0,08	0,08	0,15	0,09	0,10	0,20	0,25
Faktor IX ²⁾	3,8	3,7	4,4	3,9	4,3	3,9	6,0
Faktor X	0,44	0,46	0,69	0,43	0,52	0,52	0,70
Protein C ³⁾	0,41	0,47	0,40	0,62	0,45	0,68	0,46
<i>Ikke K-vitamin afhængige proteiner (enheder pr. ml)¹⁾:</i>							
Faktor V	4,1	4,4	5,6	4,1	3,9	5,5	5,9
Faktor XI	1,8	1,4	1,8	2,0	1,7	1,5	3,3
Faktor XII	5,2	5,2	6,8	5,0	5,4	6,6	7,9

Signifikante værdier: ²Kontrol vs. andre (P<0,05) ³K-vitamin (P<0,05).

¹⁾ Relative enheder i forhold til normal human plasma = 1 enhed pr. ml. Human kontrol var fra standard proceduren ved Aarhus Kommunehospital. Bestemmelse af de enkelte koagulationsfaktorer II, V, VII, IX, X, XI og XII blev foretaget med humane mangelplasma.

Det fremgår af tabel 4, at tilskud af vitamin K øgede Ca-absorptionen hos de grise, der fik høj og normal mængde Ca, men ikke hos de grise, der fik foder med lavt indhold af Ca.

Mens indholdet af Ca i urinen fordobledes ved den høje mængde Ca, var det modsatte tilfældet på den normale mængde Ca.

Kalciumkoncentrationen i plasma steg ved tilskud af Ca og vitamin K. Sidstnævnte havde derimod ingen indflydelse på Ca-koncentrationen i blodet. Grisene på den højeste kalciummængde i foderet havde også forhøjede mængder i blodet.

Diskussion

K-vitaminet blev opdaget af Henrik Dam i 1929-30. Han fandt, at vitaminet var nødvendigt for blodets koagulation, heraf navnet. Ydermere

fandtes, at vitaminet var nødvendigt for dannelsen af protrombin som medvirker til størkningen. Henrik Dam modtog Nobelprisen for dette arbejde i 1943.

Fornylig har man opdaget, at mange andre proteiner med ubestemte biokemiske funktioner i kroppen kræver vitamin K til deres biosynteser. Dette gælder f.eks. enzymet gammaglutamylcarboxylase, der katalyserer processer, som øger proteiners kalciumbindende affinitet.

Man har længe vidst, at vitamin D medvirker ved reguleringen af kalcium-homøostasen. Det er antydnet at vitamin D₃, den aktive metabolit, forøger syntesen af kalciumbindende proteiner, som aktivt transporterer kalcium. Resultaterne af nærværende forsøg antyder, at disse kalciumbærende proteiner i kroppen er K-vitamin afhængige

Tabel 4. Daglig calciumomsætning

Ca, pct. Vitamin K, mg/kg foder	0,1 0	1,0 0	3,0 0	0,1 5	1,0 5	3,0 5
<i>Ca, g/dag:</i>						
Fortæret	1,17	10,83	27,29	1,33	11,28	30,97
I gødning ^{1,3,5)}	0,45	6,07	24,29	0,45	5,71	21,69
I urin ^{1,4)}	0,05	0,25	0,20	0,03	0,14	0,41
<i>Fordøjret:</i>						
Pct. af fortæret ^{1,2)}	64,2	43,8	10,8	66,3	49,8	29,8
g Ca pr. dag ^{1,2,4)}	0,77	4,75	3,00	0,88	5,56	9,27
<i>Aflejret:</i>						
Pct. af fortæret ^{1,2)}	60,5	41,4	10,1	64,4	48,5	28,5
g Ca pr. dag ^{1,2,4)}	0,72	4,50	2,79	0,85	5,42	8,87
<i>mg Ca pr. 100 ml:</i>						
I blod ¹⁾	5,25	5,00	5,75	5,00	5,00	5,50
I plasma ^{1,3)}	8,4	8,1	8,9	8,1	9,1	9,7

Signifikante værdier: ¹⁾Ca (P<0,05) ²⁾K-vitamin (P<0,05) ³⁾K-vitamin (P<0,10) ⁴⁾Ca × K-vitamin (P<0,05) ⁵⁾Ca × K-vitamin (P<0,10).

proteiner. Såvel udskillelsen i urinen som absorptionen fra tarmkanalen ser ud til at være reguleret af sådanne K-vitamin afhængige proteiner.

Tidligere forsøg har vist, at højt calciumindhold i foderet kan fremkalde et hæmorrhagisk syndrom (meget svære blødninger) hos grise, der ikke får K-vitamin (D. D. Hall, Ph.D. afhandling, 1986, Kentucky Universitet). I dette arbejde fandtes, at der hos grisene, der fik foder indeholdende 1,2–2,7 pct. calcium, forekom dødsfald på grund af indre blødninger. Sådanne tilfælde er ikke observeret i nærværende forsøg, sandsynligvis dels

fordi det kun varede i 3 uger, dels fordi vitamin K rutinemæssigt gives til alle svin på Forsøgsanlæg Foulum.

Store mængder Ca i foderet øgede plasmakoncentrationerne af blodkoaguleringsfaktorerne II, VII og X, mens faktor IX ikke påvirkedes. Det fysiologiske grundlag herfor er ikke kendt.

Fra et praktisk synspunkt tyder disse resultater på nødvendigheden af at tilsætte K-vitamin til foder indeholdende store mængder calcium eller antibiotika.