

**Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Effekt von Menthol als Vertreter der bioaktiven Pflanzenlipide
in der Hypokalzämieprophylaxe bei frühlaktierenden Milchkühen
mit besonderer Fokussierung auf das ionisierte Kalzium**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Dorothee Maria Ott
Tierärztin aus Freising**

**Berlin 2023
Journal-Nr.: 4407**

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Effekt von Menthol als Vertreter der bioaktiven Pflanzenlipide
in der Hypokalzämieprophylaxe bei frühlaktierenden Milchkühen
mit besonderer Fokussierung auf das ionisierte Kalzium**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dorothee Maria Ott

Tierärztin aus Freising

Berlin 2023

Journal-Nr.: 4407

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jörg Aschenbach
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Rudolf Staufenbiel
Dritter Gutachter: PD Dr. Christoph Gabler

Deskriptoren (nach CAB Thesaurus):

dairy cows; lactation; hypocalcaemia; metabolism; heparin; menthol; calcium;
calcium absorption; lipids; biological activity

Tag der Promotion: 18.10.2023

Für
Stefan

&

Für
Mama, Papa
Elisabeth,
Hannah

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Definitionen	VIII
1. Einleitung	1
2. Literatur	5
2.1. Physiologische Rolle des Kalziums bei der Milchkuh	5
2.1.1. Verteilung des Kalziums.....	5
2.1.2. Transepithelialer Transport von Kalzium bei Wiederkäuern	6
2.1.2.1. Parazellulärer Transport.....	7
2.1.2.2. Enteraler transzellulärer Transport.....	7
2.1.2.3. Transzellulärer Transport im Pansen	10
2.1.3. Ausscheidung des Kalziums	10
2.1.4. Funktionen des Kalziums	12
2.2. Kalziumhomöostase der Milchkuh.....	12
2.2.1. Parathormon	13
2.2.2. Calcitriol	14
2.2.3. Calcitonin	15
2.3. Auswirkungen von Störungen des Kalziumhaushaltes auf Gesundheit und Leistung	16
2.3.1. Bedeutung und Epidemiologie der Hypokalzämie	16
2.3.2. Ätiologie der Gebärparese	16
2.3.3. Prädisponierende Faktoren.....	17
2.3.4. Klinische und subklinische Hypokalzämie.....	19
2.3.5. Folgeerkrankungen durch Hypokalzämie.....	20
2.4. Therapie und Prophylaxe von Störungen des Kalziumhaushaltes	20
2.4.1. Therapie der Gebärparese	20
2.4.2. Prophylaktische Maßnahmen zur Vermeidung der Hypokalzämie	21
2.4.2.1. Kalziumarme Fütterung in der Trockenstehphase	21
2.4.2.2. Supplementierung von Vitamin D3 oder dessen Metaboliten	22
2.4.2.3. Veränderung der Konzentration von Kalium, Phosphat und Magnesium in der Ration.....	22

2.4.2.4.	Anreicherung des Futters mittels saurer Salze, DCAB	23
2.4.2.5.	Direkte Verabreichung von Kalzium oral oder per Injektion/Infusion.....	24
2.5.	Nicht-selektive Kationenkanäle (TRP-Kanäle) und Menthol.....	24
2.5.1.	TRP-Familie	24
2.5.2.	PBLC, plant bioactive lipid compounds.....	26
2.5.3.	Menthol als PBLC	27
2.5.4.	Aktivierung von TRP-Kanälen durch Menthol	28
2.5.5.	Der Einsatz von PBLC und Menthol in der Nutztierhaltung	29
2.6.	Messung des ionisierten Kalziums und des Gesamtkalziums.....	30
2.6.1.	Diagnose der Hypokalzämie mittels Bestimmung des Blutkalziumgehaltes	30
2.6.2.	Messung des Gesamtkalziums	30
2.6.3.	Messung des ionisierten Kalziums.....	31
2.6.4.	Einfluss des pH-Wertes auf die Konzentration des ionisierten Kalziums.....	31
2.6.5.	Einfluss des Heparins auf die Konzentration des ionisierten Kalziums.....	32
2.6.6.	Korrelation zwischen Gesamtkalzium und ionisiertem Kalzium	32
2.6.7.	Bedeutung in der Praxis.....	33
2.6.8.	Zusammenfassung der Literatur für die eigene Fragestellung.....	34
3.	Veröffentlichungen	37
3.1.	Changes in the relationship between ionized and total calcium in clinically healthy dairy cows in the period around calving.....	37
3.2.	Blood calcium concentration and performance in periparturient and early lactating dairy cows is influenced by plant bioactive lipid compounds	51
4.	Diskussion.....	65
4.1.	Methodenkritik	65
4.1.1.	Tierindividuelle Faktoren	65
4.1.2.	Fütterung.....	66
4.1.3.	Zeitlicher Verlauf und saisonale Änderungen	67
4.1.4.	Blutentnahme und Messung des ionisierten Kalziums.....	68
4.2.	Diskussion der Ergebnisse	69
4.2.1.	Gesamtkalzium und ionisiertes Kalzium, Verlauf um den Geburtszeitraum	70
4.2.2.	Bestimmung des ionisierten Kalziums mittels Gesamtkalzium und weiterer Kennwerte	70

4.2.3.	Einflussfaktoren auf das ionisierte Kalzium.....	72
4.2.3.1.	Chlorid.....	72
4.2.3.2.	pH-Wert.....	72
4.2.3.3.	NEFA, BHB	73
4.2.3.4.	Phosphor.....	73
4.2.3.5.	Cholesterol	74
4.2.3.6.	Albumin	74
4.2.4.	Einfluss von Heparin auf das ionisierte Kalzium	75
4.2.5.	Beeinflussung der Kalziumkonzentration durch PBLC im peripartalen Zeitraum.....	76
4.2.5.1.	Stimulation der Aufnahme über TRPV-Kanäle.....	77
4.2.5.2.	Prävalenz der Hypokalzämie, Einflussfaktoren und Folgen.....	78
4.2.6.	Einfluss der PBLC auf die Milchleistung und Milchzusammensetzung.....	79
4.2.7.	Einfluss der PBLC auf den Body Condition Score (BCS)	80
4.3.	Schlussfolgerung.....	81
4.3.1.	Diagnostischer Nutzen von ionisiertem Kalzium	81
4.3.2.	Einsatz von mentholhaltigen PBLC als Futterzusatzstoff, Einfluss auf den Kalziumhaushalt und Leistungsparameter.....	82
5.	Zusammenfassung	83
6.	Summary	85
7.	Literaturverzeichnis.....	87
	Anhang	IX
	Publikationen.....	XV
	Interessenskonflikte.....	XVII
	Selbständigkeitserklärung	XVIII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung des Kalziums bei einer 600 kg schweren Kuh	5
Abbildung 2: Zustandsformen von Kalzium.....	6
Abbildung 3: Modell bezüglich der Resorption von Kalzium im Darm.....	9
Abbildung 4: Kalziumaufnahme und – abgabe einer Milchkuh	11
Abbildung 5: Hormonelle Regulation des Kalziumhaushaltes.....	13
Abbildung 6: Aufbau eines TRP-Kanals	25
Abbildung 7: Strukturformel von Menthol	28

Tabellenverzeichnis

Tabelle A1: Futterergebnisse der totalen Mischration	IX
Tabelle A2: Futterergebnisse der totalen Mischration.	XII

Abkürzungsverzeichnis

1,25(OH) ₂ D ₃	Calcitriol
a.p.	ante partum
ALKP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BCS	Body Condition Score
BHB	Beta-Hydroxybutyrat
BS	Braunvieh
Ca	Kalzium
DCAB	dietary cation anion balance
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii, et aliae, et alium
HF	Holstein Friesian
IE	Internationale Einheit
iCa	ionized calcium, ionisiertes Kalzium
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
IU	International Unit, internationale Einheit
LKS	Landwirtschaftliche Kommunikations- und Servicegesellschaft mbH
meq	Milliäquivalent
NEFA	non-esterified fatty acids, nicht veresterte freie Fettsäuren
NSBA	Netto-Säure-Basen-Ausscheidung
NRC	National Research Council, Nationaler Forschungsrat der Vereinigten Staaten
PBLC	plant bioactive lipid compounds, bioaktive Pflanzenlipide
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
P _i	inorganic phosphate, anorganisches Phosphat
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PTH	Parathormon
sog.	sogenannt
tCa	total Calcium, Gesamtkalzium
TMR	total mixed ration, totale Mischration
TRP	transient receptor potential
TRPA	transient receptor potential ankyrin
TRPC	transient receptor potential classical oder canonical
TRPM	transient receptor potential melastatin

TRPML	transient receptor potential mucolipin
TRPN	transient receptor potential no mechanoreceptor potential C
TRPP	transient receptor potential polycystin
TRPV	transient receptor potential vanilloid
TS	Trockensubstanz
UV	ultraviolett
Vit D ₃	Vitamin D ₃

Definitionen

Body Condition Score: Parameter zur Beurteilung der Körperkondition, der anhand eines Schemas unter Bewertung bestimmter Körperpunkte bestimmt wird

DCAB, „Saure Salze“: Kationen-Anionen-Bilanz; Kennzahl, die Auskunft über die Bilanz zwischen Mineralstoffen mit einer positiven Ladung (Kationen: Na^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+}) und Elementen mit einer negativen Ladung (Anionen: Cl^- , S^{2-} , SO_4^{4-}) in der Ration gibt. Saure Salze bewirken ein Absenken der DCAB.

Exozytose: Ausschleusung von Substanzen aus der Zelle in den Extrazellularraum mithilfe von Vesikeln

Homöostase: Gleichgewichtszustand eines offenen dynamischen Systems, welcher durch einen internen regelnden Prozess aufrechterhalten wird

Inzidenz: Anzahl neuer Fälle eines gesundheitsbezogenen Ereignisses innerhalb eines bestimmten Zeitraums

Parazellulärer Transport: Transport von Substanzen durch die Zwischenräume der Zellen

PBLC: Pflanzenlipide mit bioaktiver Wirkung (z.B. in ätherischen Ölen enthalten)

Peripartale Phase/ Zeit: Zeitraum unmittelbar um die Geburt

pH-korrigiertes iCa: auf einen pH-Wert von 7,4 korrigierte Konzentration des ionisierten Kalziums

pH-Wert: Maß für den sauren oder alkalischen Charakter einer wässrigen Lösung, definiert als negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration

Prävalenz (in dieser Arbeit als Periodenprävalenz verwendet): Anzahl der Fälle eines gesundheitsbezogenen Ereignisses innerhalb einer Population in einem bestimmten Zeitraum.

Puerperium: Zeitraum nach der Kalbung, 1.-30. Tag post partum

Subklinisch: klinisch nicht oder nur schwer erkennbar

Tight junctions: interzelluläre Verbindungsstellen

Transient-Rezeptor-Potential-Kanäle: Familie von zellulären ligandengesteuerten Ionenkanälen, die bei Aktivierung einen Einstrom von Kationen bewirken.

Transitzeit: Zeitraum von drei Wochen vor der Kalbung bis drei Wochen nach der Kalbung

Transzellulärer Transport: Transport von Substanzen über den Weg durch die Zelle hindurch

1. Einleitung

Die Transitzeit der Milchkühe umfasst den Zeitraum drei Wochen vor bis drei Wochen nach der Kalbung (Grummer 1995). Diese Phase ist gekennzeichnet von Veränderungen auf physischer, endokriner und metabolischer Ebene, die eine verminderte immunologische Reaktionsfähigkeit zur Folge haben (Mallard et al. 1998). Eine hohe Inzidenz für unterschiedliche Produktionskrankheiten ist die Folge (Ingvarsen et al. 2003).

Eine der wichtigsten Krankheiten in der frühen Laktation ist die Hypokalzämie (Degaris und Lean 2008), deren Bedeutung mit Zucht auf steigende Milchleistung zugenommen hat (Oetzel 1988). Laut Reinhardt et al. (2011) kann die Inzidenz der klinischen Hypokalzämie bis zu 7% betragen, die der subklinischen sogar bis zu 50%.

Das für diese Erkrankung entscheidende Mengenelement Kalzium findet sich in diversen Geweben und erfüllt die unterschiedlichsten Funktionen. Durch die Geburt kommt es zu einem plötzlichen Abfall der Kalziumkonzentration im Blut, wobei der dadurch entstehende Mangel zu einem gewissen Grad in dieser Zeit physiologisch ist (Andersen et al. 2005). Kann jedoch der Verlust durch insuffiziente Gegenregulation nicht ausgeglichen werden, so kommt es zu einer Hypokalzämie in subklinischer oder klinischer Form. Das ionisierte Kalzium stellt den biologisch verfügbaren Anteil am Gesamtkalzium dar. Im Zeitraum der Abkalbung scheint sich der prozentuale Anteil des ionisierten Kalziums am Gesamtkalzium zu verschieben (Chamberlin et al. 2013), weshalb die Aussagekraft der alleinigen Gesamtkalziumbestimmung für die Diagnose der Hypokalzämie nicht ausreichend erscheint. Für die direkte Bestimmung des ionisierten Kalziums sollten aufgrund verschiedener Einflussfaktoren, wie z.B. der pH-Wert oder das Antikoagulum, gewisse Bedingungen beachtet werden (Boink et al. 1991; Jafri et al. 2014). Die Komplexität der Wechselwirkungen bzgl. der Einflussfaktoren ist jedoch bisher wenig untersucht.

Einige frühere Studien versuchten Formeln zu entwickeln, mittels derer vom Gesamtkalzium unter Berücksichtigung weiterer Parameter auf das ionisierte Kalzium geschlossen werden kann; jedoch unterscheiden sich diese in ihren Aussagen und wurden zudem meist für den Menschen durchgeführt (Onifade et al. 2005; Björkman et al. 2009). Für laktierende Milchkühe ist bisher keine Formel mit Einbeziehung weiterer Laborkennwerte vorhanden, um den Zusammenhang zwischen ionisiertem Kalzium und Gesamtkalzium unter Berücksichtigung der um den Geburtszeitraum vonstattengehenden Veränderungen näher zu beschreiben.

Für die Vermeidung der Hypokalzämie existieren verschiedene Prophylaxemaßnahmen, die auf eine erhöhte Aufnahme von Kalzium und somit eine Steigerung der Kalziummenge im Organismus abzielen. Bekannt sind vor allem Veränderungen der Trockensteherration mit

dem Fokus auf einen niedrigen Kalziumgehalt oder ein Ansäuern mittels sog. „saurer Salze“ in Form der DCAB-Methode.

Ein neuer Ansatz bedient sich Menthol als Futterzusatzstoff. Es zählt zu den bioaktiven Pflanzenlipiden und ist Bestandteil der sogenannten ätherischen Öle. Neben dem arteigenen Geruch und Geschmack rücken zunehmend weitere Eigenschaften wie antioxidative, antimikrobielle, analgetische und antikarzinogene Fähigkeiten in den Fokus und erweitern den Einsatz dieser Substanzen bis hin in den medizinischen Bereich (Bakkali et al. 2008). Mittlerweile finden ätherische Öle auch Anwendung als Futterzusatzstoffe im Nutztierbereich, da sie Veränderungen in der Mikrobiota im Pansen bewirken und somit Einfluss auf die Fermentation nehmen können (Patra und Yu 2012).

Der bekannteste Effekt von Menthol beruht auf seiner „kühlenden“ Wirkung durch die Aktivierung von Thermorezeptoren. Diese Rezeptoren gehören zur Familie der Transient-Rezeptor-Potential-Kanäle (TRP-Kanäle), nicht-spezifische Kationenkanäle, die u.a. an der Kalziumaufnahme beteiligt sind. Im Gastrointestinaltrakt der Wiederkäuer konnten bisher TRPV6, TRPV3 und TRPA1 als kalziumleitend nachgewiesen werden (Wilkens et al. 2009; Rosendahl et al. 2016; Schrapers et al. 2018).

Menthol kann als Kanalmodulator bei TRPV3, TRPM8 und TRPA1 fungieren (Macpherson et al. 2006; Farco und Grundmann 2013). Vereinzelt liegen Studien vor, die die Relevanz dieser Kationenkanäle beim Wiederkäuer untersuchten. Rosendahl et al. (2016) gelang der Nachweis zunehmender Kalziumfluxraten im Pansengewebe bei Zugabe von Menthol. Schrapers et al. (2018) belegten *in vitro* die Beteiligung von TRPV3 an der Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels bei einem mentholhaltigem Zusatz. *In vivo* zeigten Braun et al. (2019) bei Kühen der mittleren oder späten Laktation eine erhöhte Kalziumkonzentration im Blut durch Zufütterung eines solchen Zusatzes. Versuche, die den Einsatz von Menthol bei Kühen um den Geburtszeitraum beschreiben, wurden bisher nicht durchgeführt. Untersuchungen, die den Einfluss auf Milchleistung, Körperkondition und die Hypokalzämieprävalenz betrachten und eine mögliche Divergenz zwischen der Wirksamkeit bei unterschiedlichen Rassen genauer analysieren, sind zudem kaum vorhanden. Diese sind nötig, um den Einsatz von mentholhaltigem Futter in der Praxis als zielführend abschätzen zu können.

Die vorliegende Dissertation zielt darauf ab, den Effekt von Menthol als Futterzusatzstoff auf die Blut-Kalziumkonzentration auch bei frühlaktierenden Milchkühen der Rassen Holstein Friesian und Braunvieh zu untersuchen. Ferner sollen weitere Wirkungen bei Verfütterung von Menthol auf verschiedene Leistungsparameter beleuchtet werden.

Von Interesse waren in diesem Zusammenhang außerdem eine genauere Betrachtung des ionisierten Kalziums und des Gesamtkalziums und deren Veränderungen im Zeitraum um die Geburt, wenn zuvor keine Prophylaxe in Hinblick auf Hypokalzämie angewendet wurde.

Auch der Versuch ein Modell zur Vorhersage des ionisierten Kalziums unter Berücksichtigung einer möglichen Abhängigkeit von weiteren Laborkennwerten zu erstellen, ist Bestandteil dieser Dissertation. Bereits bekannte Ergebnisse sollten in dieser Studie noch einmal aufgegriffen und miteinbezogen werden.

2. Literatur

2.1. Physiologische Rolle des Kalziums bei der Milchkuh

2.1.1. Verteilung des Kalziums

Kalzium (Ca) ist ein Mengenelement und zählt zu den wichtigsten Mineralstoffen im Organismus (Baird 2011). Im Körper einer ausgewachsenen Kuh befinden sich ca. 10 kg Kalzium (Martín-Tereso und Martens 2014; Mann et al. 2019).

Gebunden in kristallinem Hydroxylapatit und Kalziumphosphat des Knochengewebes liegen 98 - 99,9% des Kalziums vor, die restlichen 0,095 - 2% befinden sich in extrazellulären Kompartimenten (Goff et al. 1991b; El-Samad et al. 2002; Martín-Tereso und Martens 2014; Mann et al. 2019). Bei einer 600 kg schweren Kuh sind ca. 8 g außerhalb des Knochens, davon ca. 4 g in extrazellulären Flüssigkeiten und ca. 3 g im Plasmapool. Der geringste Anteil mit ca. 0,01 g Kalzium findet sich in intrazellulären Flüssigkeiten (Mann et al. 2019) (Abbildung 1). Der schnell verfügbare Anteil des Kalziums beträgt damit nur ca. 0,3% des Gesamtkalziums (total calcium, tCa) (Martig 2006). Die physiologische Konzentration von Kalzium im Serum liegt zwischen 2 – 2,5 mmol/l (Martinez et al. 2012; Goff 2018).

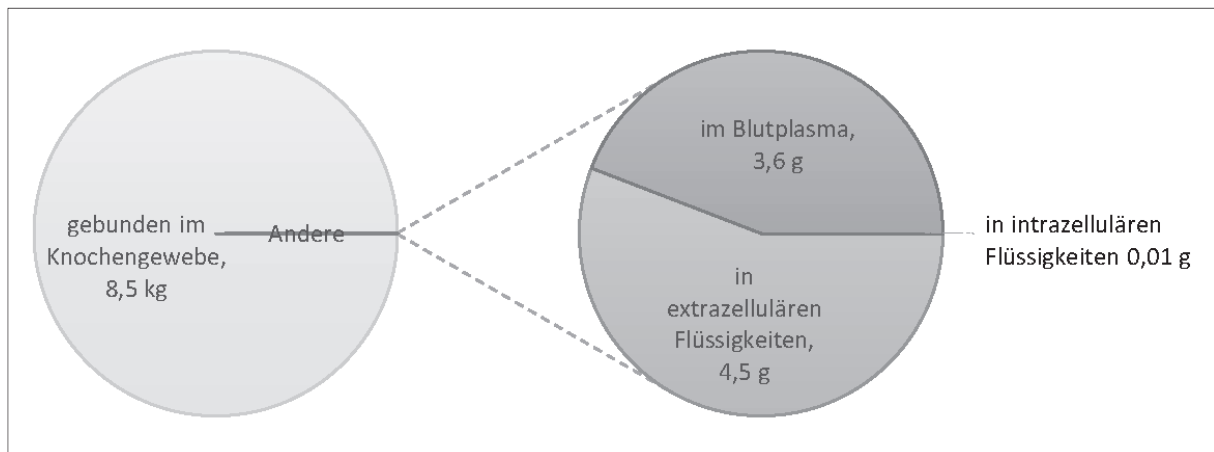


Abbildung 1: Verteilung des Kalziums bei einer 600 kg schweren Kuh. Der Großteil des Kalziums ist im Knochengewebe gebunden. Die übrigen Anteile finden sich in extrazellulären Flüssigkeiten, dem Blutplasma und intrazellulären Flüssigkeiten.

Modifiziert nach Mann et al. (2019).

Kalzium existiert in drei verschiedenen Formen im Plasma: proteingebunden, komplex gebunden an organische und anorganische Säuren wie Citrat und Phosphat sowie in ionisierter Form (Goff 1999; Larsen et al. 2001) (Abbildung 2). Als ungebundenes Kation liegt es im Blutplasma zu ca. 47% vor, gebunden an Proteine zu ca. 43%. Der Rest ist mit organischen und anorganischen Säuren verbunden (Forman und Lorenzo 1991; Dreyer 2011). Zwischen diesen Formen existiert untereinander ein Gleichgewicht, wobei nur die ionisierte Form den biologisch aktiven Zustand beschreibt (Onifade et al. 2005).

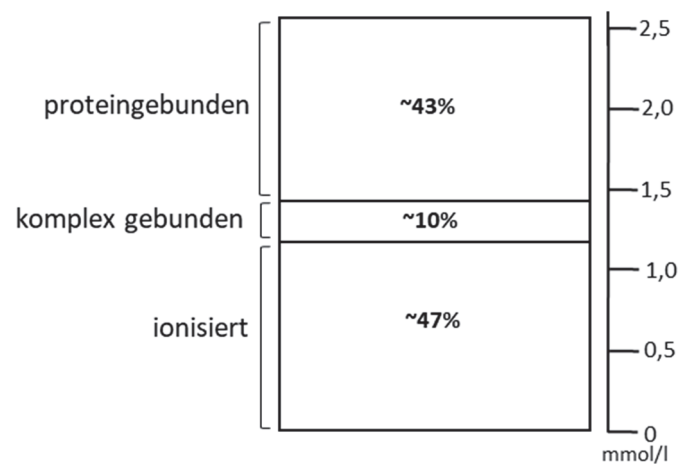


Abbildung 2: Zustandsformen von Kalzium. Kalzium existiert in drei verschiedenen Formen im Blutplasma: proteingebunden, komplex gebunden an anorganische und organische Säuren und ungebunden in ionisierter Form (Goff 1999).

Modifiziert nach Forman und Lorenzo (1991).

2.1.2. Transepithelialer Transport von Kalzium bei Wiederkäuern

Die Resorption von Kalzium findet im Gastrointestinaltrakt statt. Der Gehalt an Kalzium im Futter, die vorliegende Löslichkeit des Substrates, die Aufnahmekapazität und die Höhe des Bedarfs bestimmen die Resorptionsleistung (Bouillon et al. 2003). Der prozentuale Anteil an ionisiertem Kalzium (ionized calcium, iCa) unterscheidet sich in den Bereichen des Gastrointestinaltrakts. Während in der Pansenflüssigkeit ein Anteil von 50% ionisiert vorliegt (Hohls 1990), ist im Labmagen das gesamte Kalzium gelöst. Im Dünndarm nimmt dagegen mit zunehmender Alkalisierung der Ingesta der ionisierte Anteil ab (Storry 1961).

Im Gegensatz zum Monogastrier, bei dem eine Aufnahme im gesamten Darm, v.a. im Dünndarm erfolgt (Bronner 1987; Van Os 1987), wird beim Wiederkäuer auch im Pansen Kalzium aufgenommen (Schröder et al. 1997; Schröder et al. 1999; Breves und Schröder

2005). Da im oberen Dünndarm Kalzium auch mit den Verdauungssäften sezerniert wird, kann von einem bidirektionalen Ca-Weg gesprochen werden (Ricken 2015).

Kalzium kann parazellulär oder transzellulär aufgenommen werden (Bronner und Pansu 1999; Goff und Horst 2003; Horst et al. 2003) (Abbildung 3). Liegt eine hohe Konzentration an verfügbarem Kalzium auf der Ingestaseite des Darms vor, so kann die Resorption zu über 50% parazellulär über einen passiven Mechanismus erfolgen (Goff und Horst 1994; Horst et al. 1994). Bei einer niedrigen Kalziumkonzentration in der Ingesta ist dagegen die aktive Aufnahme über den transzellulären Weg von höherer Bedeutung (Bronner 1987; Liesegang und Risteli 2005).

2.1.2.1. Parazellulärer Transport

Die parazelluläre Aufnahme wird durch einen Ca-Konzentrationsgradienten zwischen dem intestinalen Lumen und dem Interstitium bestimmt (Hoenderop et al. 2005) (Abbildung 3). Die Aufnahme erfolgt somit über einen energieunabhängigen, passiven Weg. Über den gesamten Intestinaltrakt hinweg ist eine passive Resorption möglich (Goff et al. 1995a). Nicht alle Abschnitte des Gastrointestinaltrakts besitzen dabei die gleiche Durchlässigkeit. Im Dünndarm liegt eine hohe Permeabilität vor, wohingegen das Pansengewebe weniger durchlässig ist (Schröder und Breves 2006; Wilkens et al. 2011). Die Durchlässigkeit wird von Tight junctions bestimmt. Tight junctions verbinden die Epithelzellen untereinander. Sie bestehen aus interzellulären Proteinen und verschließen den parazellulären Raum, wodurch sie als parazelluläre Barriere fungieren (Balda und Matter 1998). Je nach Zusammensetzung der Proteine werden ladungs- und grössenselektive Poren im Interzellularspalt gebildet, die die Permeabilität für einzelne Ionen bestimmen (Günzel und Yu 2013).

2.1.2.2. Enteraler transzellulärer Transport

Die aktive Resorption ist gegenüber der passiven sättigbar und unterliegt zudem strengen hormonellen Regulationsmechanismen (Hoenderop et al. 2005; Martín-Tereso und Martens 2014). Die Lokalisation der aktiven Kalziumaufnahme und die beteiligten Kanäle bzw. Proteine unterscheiden sich zwischen den Tierarten. Beim Monogastrier findet die Kalziumresorption vor allem im Duodenum und im proximalen Jejunum statt (Hoenderop et al. 2005) (Abbildung 3). Untersuchungen von Schröder et al. (1997) beim Wiederkäuer zeigten dagegen keine Aufnahme von Kalzium im Duodenum, Ileum und Colon. Weitere Studien bestätigten, dass lediglich das Jejunum eine bedeutsame Rolle in der enteralen Kalziumresorption spielt (Wilkens et al. 2009; Sidler-Lauff et al. 2010; Wilkens et al. 2011;

Wilkens et al. 2012; Nemeth et al. 2017). Beim Wiederkäuer ist zudem über die Pansenschleimhaut eine aktive Resorption möglich (Schröder et al. 1997; Schröder et al. 1999; Breves und Schröder 2005).

Kalzium liegt auf der luminalen Seite durch das saure Milieu in Form von Kalzium-Ionen (Ca^{2+}) vor, was Voraussetzung für die Resorption ist. Oxalsäure oder Phytinsäure, die zur Bildung eines unlöslichen Salzes führen, hemmen die Resorption (Shirzadegan und Jafari 2014).

Ca-Ionen werden über spezifische Ca-Kanäle an der apikalen Seite des Enterozyten aufgenommen, da die Bürstensaummembran, bestehend aus einer Lipiddoppelschicht, undurchlässig für Ca-Ionen ist. Enteral sind beim Monogastrier hauptsächlich die Kationenkanäle TRPV5 bzw. TRPV6 dafür verantwortlich (Clapham et al. 2003; Den Dekker et al. 2003; Hoenderop et al. 2005; Suzuki et al. 2008). TRPV6 wurde auch bereits beim Wiederkäuer nachgewiesen (Wilkens et al. 2009; Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012). Ein starker elektrochemischer Gradient führt zum Einstrom von Ca^{2+} durch die Ca^{2+} -Kanäle der Zellmembran in das Zytoplasma. Voraussetzung dafür ist eine niedrige Konzentration an freiem Kalzium im Lumen des Enterozyts ($<1 \mu\text{mol/l}$) (Tsuchiya et al. 1980; Singer 2006). Im Zytoplasma wird Kalzium reversibel an Calbindin- D_{9k} (Schröder et al. 1997; Schröder et al. 2001; Martín-Tereso und Martens 2014) gebunden, ein Ca^{2+} -bindendes Protein (Christakos et al. 2018). Dadurch wird der nötige, sehr niedrige Gehalt an freiem Kalzium intrazellulär erreicht (Feher et al. 1992) und der Gradient für den apikalen Einstrom erhalten. Beim Rind konnte dieses Protein im Jejunum nachgewiesen werden (Yamagishi et al. 2002). In endozytotischen Vesikeln an der apikalen Membran aufgenommen, wird Kalzium durch Verschmelzen mit Lysosomen zur basolateralen Membran transportiert (Hoenderop et al. 2005). An der basolateralen Membran kann es durch Exozytose freigesetzt werden und liegt wieder in ionisierter Form vor (Hoenderop et al. 2005).

Die Ausschleusung aus der Zelle muss an der basolateralen Seite der Zelle gegen einen elektrochemischen Gradienten erfolgen. Sie ist energieabhängig und wird durch die Hydrolyse von ATP möglich. Eine Ca^{2+} -ATPase, eine durch ATP angetriebene Kalziumpumpe, schleust die Kalziumionen gegen einen 1000-fachen Konzentrationsgradienten aus der Zelle (Ghijsen et al. 1982; Bronner 1990; Wasserman et al. 1992). Yamagishi et al. (2006) konnten beim Wiederkäuer die Isoform 1b der Ca^{2+} -ATPase nachweisen.

Ein $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ist ebenfalls für den Transport der Kalziumionen beschrieben. Kalziumionen werden im Austausch gegen Na^+ auf die serosale Epithelseite gebracht, indem der durch die Na^+/K^+ -ATPase entstandene Natriumgradient genutzt wird (Hoenderop et al. 2005). Die Kapazität dieses Austauschers umfasst jedoch nur $\frac{1}{5}$ im Vergleich zur Ca^{2+} -ATPase und spielt daher nur eine untergeordnete Rolle (Ghijsen et al. 1983; Schröder et al.

1997). Beim Wiederkäuer konnte bisher nur der Nachweis dieses Austauschers auf mRNA-Ebene erbracht werden, nicht jedoch auf Proteinebene (Wilkins et al. 2011).

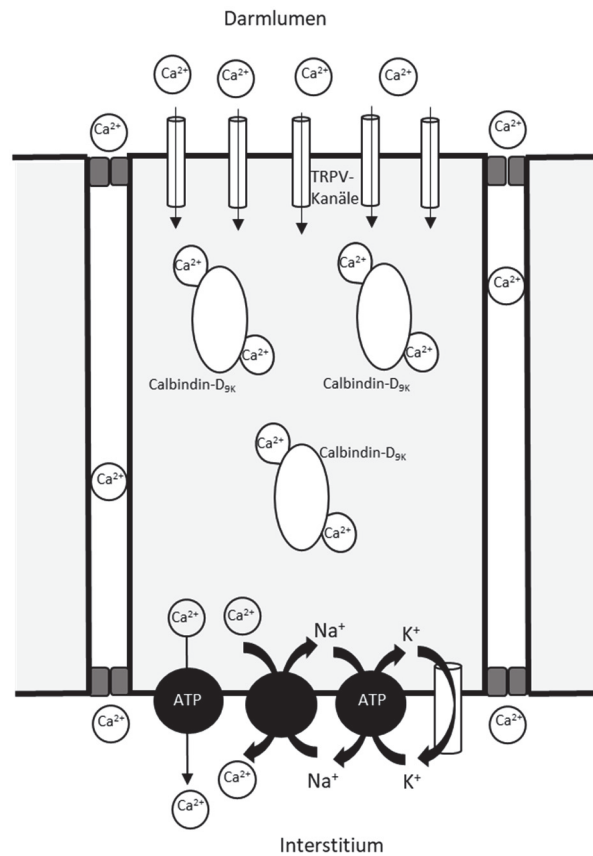


Abbildung 3: Modell bezüglich der Resorption von Kalzium im Darm. Die Aufnahme von Kalzium im Gastrointestinaltrakt kann sowohl parazellulär als auch transzellulär erfolgen. Die parazelluläre Aufnahme erfolgt über Tight junctions entlang eines elektrochemischen Gradienten. Die transzelluläre Resorption ist energieabhängig und erfolgt durch Aufnahme mittels TRPV-Kanäle, Transport durch die Zelle an Calbindin gebunden und Ausschleusung aus der Zelle durch eine Ca^{2+} -ATPase oder einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher.

Modifiziert nach Hoenderop et al. (2005).

2.1.2.3. Transzellulärer Transport im Pansen

Beim Wiederkäuer tragen maßgeblich die Vormägen zur Kalziumresorption bei und stellen somit einen wichtigen Unterschied zum Monogastrier dar (Höller et al. 1988; Schröder und Breves 2006). Eine genaue Angabe zum Anteil der Vormägen an der Gesamtresorption von Kalzium ist nicht eindeutig möglich, da dieser von der Zusammensetzung des Futters abhängig ist (Wilkens und Muscher-Banse 2020). Einige Bilanzstudien gehen jedoch davon aus, dass vor dem Duodenum ein Anteil von nahezu 50% resorbiert werden kann (Ben-Ghedalia et al. 1982; Greene et al. 1983; Wylie et al. 1985; Oehlschlaeger et al. 2014; Wilkens und Muscher-Banse 2020). Der Ablauf der Kalziumaufnahme erfolgt jedoch nicht identisch dem der intestinalen Kalziumaufnahme (Wilkens und Muscher-Banse 2020). Die beteiligten Strukturen sind hierbei noch nicht endgültig identifiziert. In verschiedenen Studien konnten TRPV6 und TRPV5 nicht bzw. nur in sehr geringer Menge im Pansenepithel nachgewiesen werden (Wilkens et al. 2009; Rosendahl et al. 2016). Somit spielen diese Kanäle vermutlich nur eine untergeordnete Rolle (Schröder et al. 2015). Verschiedene Studien konnten dagegen im Pansenepithel TRPA1 und TRPV3 nachweisen (Rosendahl et al. 2016; Rabbani et al. 2018; Liebe et al. 2020). Diese Kanäle sind potentiell an der Aufnahme von Kalzium über das Pansenepithel beteiligt (Schrapers et al. 2018; Braun et al. 2019).

2.1.3. Ausscheidung des Kalziums

Die Ausscheidung erfolgt sowohl renal als auch über den Kot (Littledike und Goff 1987). Bis zu 99,5% des anionengebundenen und ionisierten Kalziums werden in der Niere filtriert (Barrett und Barrett 2016). Anschließend wird davon der Großteil im proximalen Tubulus reabsorbiert. Ein kleinerer Anteil wird zudem in der Henle Schleife und im distalen Tubulus wieder aufgenommen (Bouillon et al. 2003; Schröder und Breves 2006). In der Niere findet die Rückresorption nahezu konform dem Ca^{2+} -Transport im Darm statt. Die molekularen Strukturen und hormonellen Regulationsmechanismen unterscheiden sich jedoch teilweise. Kalzium wird durch einen Ca^{2+} -Kanal, hier TRPV5, aktiv gegen einen Konzentrationsgradienten in die Zelle verbracht (Khanal und Nemere 2008). Dort wird es an Calbindin- $\text{D}_{28\text{k}}$ gebunden (Hoenderop et al. 2005). Die Expression dieses Proteins wird durch PTH gefördert (Van Abel et al. 2005). Die Ausschleusung aus der Zelle ins Blut erfolgt analog der Mechanismen im Darm. Untersuchungen zu den vorliegenden Strukturen sind für den Wiederkäuer kaum vorhanden. Speziesspezifische Unterschiede bzgl. der genauen Lokalisation des Kalziumtransports in der Niere scheinen aufzutreten, was Untersuchungen

an Ratten und Mäusen zeigte (Loffing et al. 2001).

Ein gewisser Anteil kann auch enteral ausgeschieden werden. Im distalen Jejunum wie auch im Ileum wird Ca^{2+} in das Darmlumen durch eine transepitheliale Potenzialdifferenz sezerniert (Greene et al. 1983).

Ein zusätzlicher Bedarf an Kalzium entsteht in der Trächtigkeit durch den Fetus und durch die Milchbildung in der Laktation (Littledike und Goff 1987). In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben, die die einzelnen Mengen beschreiben. Horst et al. (1997) sprechen von 10-20 g/Tag während der Trockenstehzeit und >30 g/Tag bei Einsetzen der Laktation (Goff et al. 1991a). Degaris und Lean (2008) beschreiben dagegen in der Trächtigkeit einen Verlust von ca. 30 g/Tag, dabei 15 g/Tag durch den Fetus und 15 g/Tag durch renale und Ausscheidung über den Kot. Während der Laktation wird ein Verlust von 50 g/Tag angegeben. Allen und Davies (1981) dagegen sprechen von einem Verlust von 8 g/Tag über den Kot, einem Verbrauch von 4-5 g/Tag für die Entwicklung des Fetus und einer Abgabe von 35 g/Tag Kalzium in die Milch (Abbildung 4). Diese Zahlen sind als Richtwerte für die Beschreibung des Kalziumstoffwechsels anzusehen. Genauere Angaben unter Einbeziehung spezifische Einflussfaktoren, wie z. B. Rasse oder Milchmenge und deren Beurteilung für den notwendigen Kalziumbedarf sind durch den NRC (National Research Council) (2021) beschrieben.

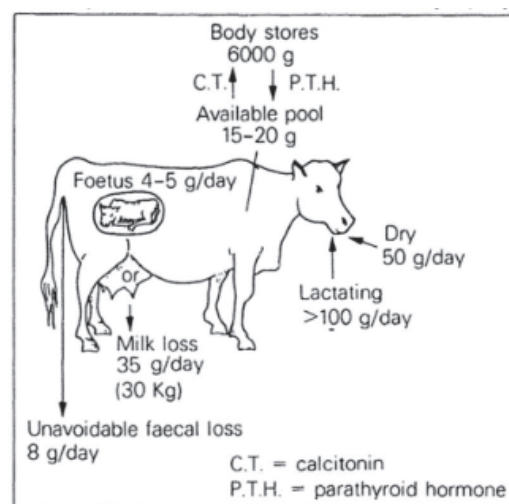


Fig. 2. Calcium metabolism in the cow.

Abbildung 4: Kalziumaufnahme und – abgabe einer Milchkuh während der Trockenstehphase mit Beschreibung des Kalziums in der Ration und des metabolisierbaren Kalziums im Körper nach Allen und Davies (1981). Die Mengenangaben in der Literatur unterscheiden sich je nach Autor und sind als Richtwerte anzusehen.

2.1.4. Funktionen des Kalziums

Die Funktionen von Kalzium sind vielfältig, so dass es sich in allen Geweben finden lässt (Schröder et al. 1996; Puscas et al. 2001; Thévenod 2002; Furie 2005; Rossi und Dirksen 2006; Floyd und Wray 2007). In zahlreichen biochemischen und physiologischen Prozessen ist Kalzium involviert (Ballantine und Herbein 1991).

Extrazellulär spielt es eine wichtige Rolle für die Blutgerinnung, die Kontraktibilität des Herzmuskels, die myoneurale Signalübertragung, die Funktion des Nervengewebes sowie die Aufrechterhaltung von Membranpotenzialen (Littledike und Goff 1987; Ballantine und Herbein 1991; Han et al. 2015; Khol et al. 2020). Intrazellulär werden durch Kalzium Enzyme direkt oder indirekt reguliert, die Freisetzung von Hormonen und Neurotransmittern gesteuert sowie die Muskelkontraktion ausgelöst (Littledike und Goff 1987; El-Samad et al. 2002; Bouillon et al. 2003; Ramasamy 2006; Kovacs und Ojeda 2012). Des Weiteren fungiert Kalzium als wichtiger Baustein für Zähne und in der Knochenstruktur (Bouillon et al. 2003). Kalzium spielt auch eine besondere Rolle für die Kontraktion der glatten Muskulatur, beim Wiederkäuer einschließlich der im Pansen (Jorgensen et al. 1998; Hara et al. 2003).

2.2. Kalziumhomöostase der Milchkuh

Aufgrund der vielfältigen Funktionen des Kalziums in den unterschiedlichsten Geweben bedarf es enger physiologischer Grenzen und eines strengen Regulationssystems (Peacock 2010). Mit Beginn der Laktation entsteht plötzlich ein vielfach höherer Bedarf an Kalzium. Der Verlust des Kalziums durch die einsetzende Milchbildung beträgt ca. $500 \text{ mg/kg}^{0,75}$, wohingegen der zuvor benötigte fetale Bedarf lediglich bei ca. $80 \text{ mg/kg}^{0,75}$ lag (Horst et al. 1994; Goff et al. 1996; Horst et al. 2005). Dadurch reduziert sich der Gehalt des Kalziums in der Extrazellulärflüssigkeit abrupt, was eine Aktivierung der Regulationsmechanismen zur Folge hat, um ein weiteres Absinken zu verhindern (Salewski 1997). Drei Hormone sind maßgeblich für die Regulation der Kalziumhomöostase verantwortlich: Parathormon, Calcitonin und Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) (Littledike und Goff 1987; Goff 2018) (Abbildung 5). Durch sie wird die Aufnahme und Abgabekapazität von Kalzium gesteuert, indem die Resorption über den Gastrointestinaltrakt, die renale Ausscheidung und die Mobilisierung aus dem Knochen moduliert werden (Martín-Tereso und Martens 2014; Wilkens und Muscher-Banse 2020).

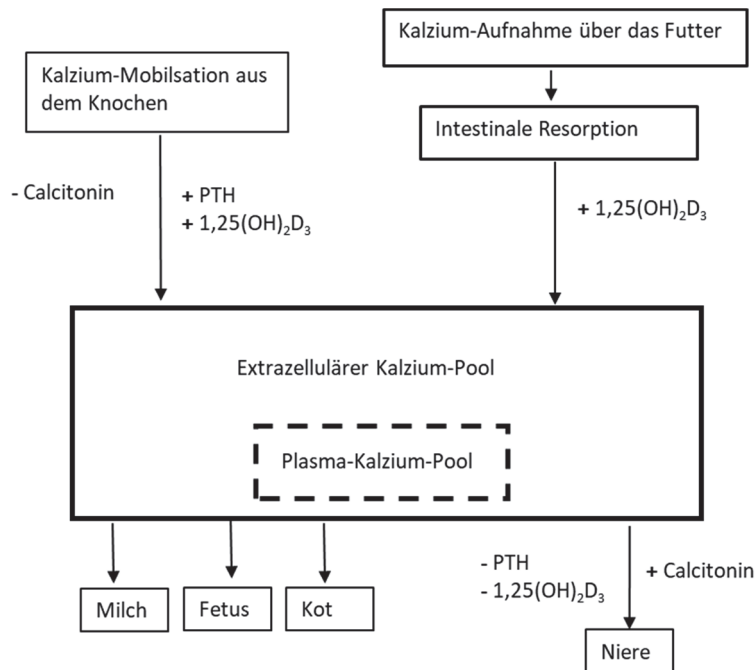


Abbildung 5: Hormonelle Regulation des Kalziumhaushaltes. Parathormon (PTH) und Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) führen zur Steigerung der Kalziumkonzentration, indem sie die intestinale Aufnahme sowie die Mobilisation aus dem Knochen fördern. In der Niere erhöhen sie die Rückresorption, so dass der Verlust von Kalzium über den Harn reduziert wird. Calcitonin dagegen vermindert die Kalziumkonzentration durch vermehrte renale Ausscheidung und Einbau von Kalzium in den Knochen (Kovacs und Ojeda 2012). Modifiziert nach Khol et al. (2020).

2.2.1. Parathormon

Parathormon (PTH) wird in den Epithelkörperchen der Nebenschilddrüse gebildet. Es ist ein Peptidhormon aus 84 Aminosäuren. Calcium-sensing-Rezeptoren auf der Plasmamembran der Epithelzelle reagieren auf ein Absinken von Kalzium im Plasma, was zur Folge hat, dass PTH innerhalb von Sekunden ausgeschüttet wird (Goff et al. 1991a; Hofer und Brown 2003; Kumar und Thompson 2011). Parathormon wird bereits bei einer Blutkalziumkonzentration von unter 10 mg/dl (2,5 mmol/l) freigesetzt (Horst et al. 2003).

Durch PTH wird die renale Ca^{2+} -Resorption gesteigert (Greger et al. 1978), gleichzeitig wird die Phosphatresorption im proximalen Tubulus durch Hemmung von Na^+ - P_i -Cotransportern gehemmt (Bacic et al. 2006).

Im Knochen führt PTH zu einer gesteigerten Osteoklastenaktivität. Diese bilden Salzsäure, was zur Auflösung der Knochensubstanz und damit zur Freisetzung von Ca^{2+} und Phosphat führt (Boyce et al. 2012). Durch Förderung der Synthese von 1,25-Dihydroxicholecalciferol

durch Transkription der 1α -Hydroxylase zeigt PTH eine indirekt stimulierende Wirkung auf die Absorption von Kalzium und Phosphat im Darm (Fraser und Kodicek 1973). Eine aktive PTH-Wirkung im Darm ist bisher nicht beschrieben. Lediglich der immunhistochemische Nachweis von PTH-Rezeptoren bei der Ratte gelang (Gentili et al. 2003). Eine negative Rückkopplung erfolgt durch die Kalziumkonzentration im Zytosol und durch Calcitriol (Littledike und Goff 1987; Ramasamy 2006).

2.2.2. Calcitriol

Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) zählt zu den Steroidhormonen und ist die biologisch aktive Form des Vitamin D_3 (Cholecalciferol) (Jones 2013). Die Menge des gebildeten Calcitriols ist abhängig von der aufgenommenen Konzentration an Vitamin D_3 über den Verdauungstrakt sowie von der körpereigenen Bildung von Vitamin D_3 durch Synthese in der Haut mittels UV-Licht aus 7-Dehydrocholesterol (Holick 1981). Der Wiederkäuer verfügt wie die meisten Säugetiere über die Fähigkeit, mittels UV-Licht Vitamin D_3 zu bilden (Hymøller und Jensen 2010), jedoch wird auch ein beträchtlicher Teil über die Nahrung aufgenommen. Unklar ist aktuell noch, ob eine Fermentation des Vitamin D_3 im Pansen durch Mikroorganismen stattfindet (Eder und Grundmann 2022). Die Expression von Calcitriol erfolgt durch eine erste Hydroxylierung am 25-C-Atom von Vitamin D_3 in der Leber zu 25-Hydroxyvitamin D_3 (25-Hydroxycholecalciferol, $(25(\text{OH})\text{D}_3$, Calcidiol) und einer zweiten in der Niere am C1 durch eine 1α -Hydroxylase zu Calcitriol, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Unter anderem PTH, die vorhandene Menge an Calcitriol sowie die Menge an Kalzium und Phosphat im Serum regulieren die Bildung und Aktivität der 1α -Hydroxylase in der zweiten Hydroxylierung (Bushinsky et al. 1985; Murayama et al. 1999). Die Biosynthese wird durch PTH und Kalzium- oder Phosphatmangel begünstigt, während eine negative Rückkopplung durch Calcitriol und Fibroblast Growth Factor-23 stattfindet (Horst et al. 2003; Martig 2006; Salgado-Hernández et al. 2014).

Die Hauptwirkung von Calcitriol liegt in der Erhöhung des Plasmakalziumspiegels, die durch Wirkung auf Niere, Darm und Knochen erreicht wird. Dabei reagieren die Zielzellen in erster Linie mit einer veränderten Transkription von Genen (Hausler et al. 1995).

Im Darm wird durch Calcitriol die Resorption von Ca^{2+} gesteigert, indem Ca^{2+} -Kanäle, Transportproteine im Zytoplasma und Ca^{2+} -ATPasen sowie die Aktivität von Calbindin induziert werden (Hoenderop et al. 2005).

In der Niere wird die Ca^{2+} -Reabsorption im distalen Teil der Henle-Schleife und im distalen Tubulus gesteigert (Schröder und Breves 2006). Calcitriol steigert dort die Bildung der Transportproteine; eine Steigerung der Aktivität dieser Proteine wird letztendlich aber durch

PTH erreicht (Dusso et al. 2005; Wilkens und Muscher-Banse 2020). Die renale Wirkung von Calcitriol spielt beim Wiederkäuer eine untergeordnete Rolle (Herm et al. 2015; Wilkens und Muscher-Banse 2020).

Im Knochen wird indirekt durch ein erhöhtes Ca^{2+} -Angebot die Synthese der Knochenmatrix und die Knochenmineralisation gefördert. Eine direkte Wirkung besitzt Calcitriol in den Osteoblasten. Diese werden zur Differenzierung angeregt sowie zur Synthese der ALKP (alkalische Phosphatase) und Kollagen. Dadurch entsteht neues Knochengewebe, Kalzium wird in den Knochen eingebaut (Goff 2014). Die Kalziumkonzentration-modulierenden Effekte von Calcitriol setzen in der Regel erst nach 3-6 Stunden aufgrund seiner Wirkung auf genomischer Ebene ein (Kutuzova und Deluca 2004). An Chondrozyten können ohne genomische Wirkung aber auch innerhalb von mehreren Sekunden schon Veränderungen sichtbar werden (Boyan et al. 1994). Die rasche Wirkung von Vitamin D_3 führt dort zu einer Steigerung des Membranlipidumsatzes, einer erhöhten Produktion von Prostaglandinen und einer verstärkten Proteaseaktivität, die zu einer Veränderung der Knochenmatrix und zur Kalzifizierung führen (Boyle et al. 2003).

2.2.3. Calcitonin

Calcitonin ist ein Peptidhormon aus 32 Aminosäuren und wird in den parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse gebildet (Dambacher et al. 2006). Seine Hauptfunktion liegt im Senken des Kalziumspiegels, es fungiert somit als Gegenspieler zu PTH und Calcitriol. Durch Aktivierung eines Calcium-Sensor-Proteins infolge eines zu starken Anstiegs des ionisierten Blutkalziumspiegels wird die Ausschüttung von Calcitonin gefördert (Fudge und Kovacs 2004). Der Effekt wird durch eine Verminderung der Osteoklastenaktivität innerhalb weniger Minuten ausgelöst (Pechet et al. 1967). Außerdem findet bei hohen Calcitonindosen eine Stimulierung der Ca^{2+} -Ausscheidung in der Niere statt, bei physiologischen Calcitonindosen dagegen eine Hemmung (Kurbel et al. 2003). In der Literatur finden sich gespaltene Meinungen über die Wirkung von Calcitonin und machen somit dessen Bedeutung unklar (Bandzaite et al. 2005). Nach Hoff et al. (2002) besitzt es beim Wiederkäuer nur eine untergeordnete Rolle in der Regulation des Kalziumhaushaltes.

2.3. Auswirkungen von Störungen des Kalziumhaushaltes auf Gesundheit und Leistung

2.3.1. Bedeutung und Epidemiologie der Hypokalzämie

Die klinische Hypokalzämie wird auch als Milchfieber oder Gebärparese bezeichnet. Sie ist gekennzeichnet durch ein akutes Absinken des Blutkalziumwertes (Horst et al. 1997; Martig 2006), das meist im peripartalen Zeitraum durch eine insuffiziente Adaptation an den Kalziumverlust durch die einsetzende Laktation gekennzeichnet ist (Horst 1986; Horst et al. 2005). Ein späteres Auftreten ist ebenfalls möglich, aber seltener der Fall (Littledike und Goff 1987; Fürll 2011; Melendez et al. 2023). Die Inzidenz der Gebärparese unterscheidet sich je nach Land zwischen 0% und 10% (Jessen 2011). So wird in Deutschland von Hellerich (2008) eine durchschnittliche Inzidenz von 5,8% für Milchfieber auf die gesamte Herdengröße angegeben. Bekannt ist jedoch, dass mit zunehmender Laktationszahl die Gefahr für Hypokalzämie steigt (Venjakob et al. 2017). So erkrankten Färsen beispielsweise sehr selten. Die Inzidenz für Milchfieber in dieser Gruppe liegt lediglich bei 0,5% (Fleischer et al. 2001). Die Prävalenzwerte der subklinischen Hypokalzämie sind weitaus höher als die der klinischen Form und liegen bei primiparen Tieren zwischen 5,7% und 25%, bei multiparen Tieren bei ca. 50% (Reinhardt et al. 2011; Venjakob et al. 2017). Ursache für die divergierenden Inzidenzen bzw. Prävalenzen sind neben Kuh-assoziierten Faktoren insbesondere betriebseigene Unterschiede, u.a. in Management und Fütterung (Roche 2003; Degaris und Lean 2008; Venjakob et al. 2017); siehe Kap. 2.3.2.

2.3.2. Ätiologie der Gebärparese

Während der Trockenstehphase ist der Bedarf an Kalzium relativ gering. Der tägliche Bedarf an Kalzium im Futter liegt bei ca. 30 g, bestehend aus ca. 15 g für das fetale Wachstum und ca. 15 g aufgrund der Verluste über Kot und Urin (Degaris und Lean 2008). Mit Einsetzen der Laktation erhöht sich der Bedarf schlagartig durch die Anforderung der Kolostrumbildung (Riond 2001; Neves et al. 2018a). Für 10 l Kolostrum werden ca. 23 g Kalzium benötigt, was den extrazellulären Pool um ein Vielfaches übersteigt (Goff et al. 1987). Nach Horst et al. (2005) liegt der Bedarf an metabolischem Kalzium in den ersten Tagen nach der Geburt zwischen 30-50 g Kalzium pro Tag.

Dem Defizit an Kalzium im Organismus kann durch hormonelle Regulationsmechanismen entgegengesteuert werden. Die Freisetzung und Aktivierung von PTH und Calcitriol führen zu einer gesteigerten Kalziumaufnahme über den Gastrointestinaltrakt sowie zur Freisetzung

von Kalzium aus dem Knochengewebe, einer gesteigerten renalen Rückresorption und einer reduzierten Sekretion in den Darm. Die Aufnahme über den Darm hat dabei den größten Einfluss auf die Kalziummenge (Ramberg et al. 1984).

Die Gegenregulation kann in vielen Fällen nicht schnell genug wirksam werden, da sie während der Trockenstehphase kaum nötig ist (Houe et al. 2001; Degaris und Lean 2008). Der Bedarf wird in der Zeit vor der Kalbung fast vollständig über die passive Kalziumabsorption über den Gastrointestinaltrakt gedeckt (Ramberg et al. 1984). Mit der Geburt und dem Einsetzen der Laktation ist eine schnelle Bereitstellung von Kalzium nötig, die hormonelle Adaptation geht jedoch langsam vonstatten (Mahen et al. 2018). Erst nach 24 Stunden führt Calcitriol zu einer gesteigerten Kalziumaufnahme. PTH bewirkt erst nach 48 Stunden eine gesteigerte Freisetzung von Kalzium aus dem Knochen (Martig 2006). Zudem liegt eine Beeinträchtigung der enteralen Aufnahme von Kalzium und die Reduzierung der Abgabe von Kalziumionen aus dem Skelett durch die erhöhten Östrogenkonzentration um die Geburt vor (Riggs et al. 1976; Sechen et al. 1988; Kocabagli 2018). Kann der Organismus die negative Kalziumbilanz nicht in kurzer Zeit ausgleichen, kommt es zur Hypokalzämie.

2.3.3. Prädisponierende Faktoren

Es existieren verschiedene Risikofaktoren für eine Hypokalzämie, die nach Houe et al. (2001) in drei Gruppen eingeteilt werden können .

1. Kuh-assoziierte Faktoren

Multipare Kühe sind häufiger betroffen als primipare Tiere (Martig 2006; Oetzel 2013). Horst et al. (2005) konnten zeigen, dass die Inzidenz ab der dritten Laktation stark zunimmt. Grund dafür ist mit steigendem Alter eine Verminderung der Rezeptoren für Calcitriol (Horst et al. 1990) sowie eine Reduktion der aktiven Osteoblasten und Osteoklasten (Goff 2000; Yamagishi und Kawashima 2022). Auch die Resorptionskapazität von Kalzium über den enteralen Weg nimmt mit steigendem Alter ab (Horst et al. 2005). Neben dem Alter (Kume et al. 2003; Venjakob et al. 2017) wird eine übermäßige Körperkondition (Houe et al. 2001; Mulligan und Doherty 2008) zu den Kuh-assoziierten Risikofaktoren gezählt. Die Kolstrummengenge bzw. Milchmenge wird aktuell nicht als Risikofaktor bewertet. Studien konnten keinen Zusammenhang zwischen hoher Kolostrummengenge und dem Auftreten einer Hypokalzämie zeigen (Klingbeil 2015; Karl und Staufenbiel 2016).

Untersuchungen wiesen zudem nach, dass einige Rinderrassen eine erhöhte Anfälligkeit für Hypokalzämie besitzen, insbesondere Jersey und das Schwedische Rot-Weißvieh (Erb und Grohn 1988; Kusumanti et al. 1993; Goff et al. 1995b; Lean et al. 2006; Roche und Berry 2006). Eine genaue Ursache für die Divergenz zwischen den Rassen ist bisher noch nicht bekannt. Bei der Rasse Jersey wurde eine reduzierte Anzahl an $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -Rezeptoren im Darm angenommen, wodurch auf eine vermehrte Anfälligkeit für Gebärparese rückgeschlossen wurde (Goff et al. 1995b). Dies konnte jedoch in anderen Studien nicht nachgewiesen werden (Quiroz-Rocha et al. 2009; Chapinal et al. 2011; Daros et al. 2017). Eine weitere Hypothese gibt an, dass Jersey-Kühe eine höhere Kalziumkonzentration im Kolostrum aufweisen und somit einen vermehrten Kalziumverlust mit Einsetzen der Laktation erfahren (National Research Council 2021). In einer anderen Studie wird die pro Kilogramm Körpergewicht produzierte Milchmenge als Ursache vermutet, die bei Jersey-Kühen höher ausfällt als bei Holstein Friesian (Capper und Cady 2012). Jawor et al. (2012) und Gild et al. (2015) wiesen sogar eine positive Korrelation der Milchmenge unabhängig vom Körpergewicht mit dem Auftreten von Hypokalzämie nach. Es wird angenommen, dass Kühe mit einer höheren Milchproduktionskapazität auch zu einem größeren Nettoverlust von Kalzium in die Milch kurz nach der Kalbung neigen (Jawor et al. 2012), was die bereits gesättigte Anpassungsfähigkeit des Tieres übersteigt.

Studien für die Rassen Braunvieh und Holstein-Friesian sind kaum vorhanden. Holstein Friesian scheinen im Vergleich mit Vertretern der Rasse Jersey weniger gefährdet für Milchfieber zu sein (Chiwome et al. 2017; Tatone et al. 2017). Das Braunvieh zeigte in Untersuchungen sogar ein noch geringeres Erkranken als Holstein Friesian (Cox et al. 1986). Hier ist weitere Forschung nötig, um eine genaue Aussage über die unterschiedliche Anfälligkeit zwischen den Rassen und den zugrundeliegenden Ursachen zu treffen.

2. Fütterung-assoziierte Faktoren

Risikofaktoren in der Fütterung betreffen v.a. die Menge und Verfügbarkeit von Kalzium, Phosphor und Magnesium. Kalziumreiches Futter vor der Geburt (Goings et al. 1974; Wiggers et al. 1975), eine erhöhte Phosphatkonzentration (Barton et al. 1987; Goff 2006) und niedrige Magnesiumgehalte im Futter (Lean et al. 2006; Mulligan et al. 2006) fördern das Risiko für eine Hypokalzämie. Des Weiteren ist das Verhältnis zwischen Anionen und Kationen in der Ration entscheidend. Ein Überschuss an Kationen und die damit induzierte alkalotische Stoffwechsellage kann eine Hypokalzämie begünstigen (Goff und Horst 2003; Seifi et al. 2004).

3. Umwelt- und Management-assoziierte Faktoren

Hierzu zählen sowohl klimatische Bedingungen als auch bauliche Gegebenheiten (Roche und Berry 2006; Simensen et al. 2010). Auch das Management betreffende Faktoren, wie die Länge der Trockenstehperiode und Zwischenmelkzeit, müssen berücksichtigt werden. Die Empfehlungen hierzu variieren (Houe et al. 2001).

2.3.4. Klinische und subklinische Hypokalzämie

Nahezu jede Kuh kommt in den ersten Stunden nach der Geburt in eine physiologische hypokalzämische Phase, die durch die im Kapitel 2.2. genannten Mechanismen während der ersten Tage ausgeglichen wird (Andersen et al. 2005). Ist der Abfall des Serumkalziumspiegels zu stark oder erfolgt kein Ausgleich, so kann die Hypokalzämie in klinischen Symptomen sichtbar werden (Schröder und Breves 2006). Ein zu niedriger Gehalt liegt bei einem Wert von unter 2,0 mmol/l Kalzium im Blutserum vor (Houe et al. 2001; Goff 2008). Eine subklinische Hypokalzämie liegt dann vor, wenn ein erniedrigter Blutkalziumgehalt vorhanden ist, das Tier jedoch keine Symptome zeigt (Oetzel 2013). Die klinische Hypokalzämie kann in 3 Schweregrade eingeteilt werden (Oetzel 2013; Mann et al. 2019; Oetzel 2022):

- geringgradige klinische Hypokalzämie (Grad 1): Die Kuh kann noch stehen und fällt nur durch minimale klinische Symptome auf, wie erhöhte Nervosität, Übererregbarkeit oder auch Schwäche. Eventuell fällt auch ein leichtes Nachziehen der Hintergliedmaße auf. Herzfrequenz und Rektaltemperatur sind normal.
- mittelgradige klinische Hypokalzämie (Grad 2): Die Kuh liegt bereits in sternaler Lage fest und neigt den Kopf typischerweise zur Seite. Es zeigt sich eine gastrointestinale Stase und eine reduzierte Muskelkontraktilität. Das Allgemeinbefinden erscheint gestört, Hypothermie und Tachykardie liegen vor.
- hochgradige klinische Hypokalzämie (Grad 3): Die Kuh ist in Seitenlage mit stark gestörtem Allgemeinbefinden bis hin zu einem komatösen Zustand. Vollständiger Verlust der Muskelkontraktilität sowie starke Tachykardie und Hypothermie sind der Fall. Ohne Behandlung ist dieses Stadium tödlich verlaufend.

Die Auslenkung der messbaren Kalziumkonzentration im Blut und die klinische Ausprägung zeigen keine gute Korrelation (Martig 2006).

2.3.5. Folgeerkrankungen durch Hypokalzämie

Direkte Schäden können durch das Festliegen bei einer klinischen Hypokalzämie im Muskel- und Nervengewebe entstehen (Cox et al. 1982). Erfolgreiche Aufstehversuche können zu Verletzungen im Bewegungsapparat führen.

Durch den weitreichenden Einfluss des Kalziums kann es während einer Hypokalzämie zu vielen daraus resultierenden Erkrankungen kommen. So steigt bei einem zu niedrigen Blutkalziumgehalt das Risiko für Mastitis (Degaris und Lean 2008), Metritis (Houe et al. 2001), Ketose und Labmagenverlagerung (Østergaard und Gröhn 1999; Rodríguez et al. 2017). Auch der Ablauf der Geburt (Correa et al. 1993) und das Puerperium (Risco et al. 1984; Curtis et al. 1985; Whiteford und Sheldon 2005) können gestört sein. Eine verminderte Fruchtbarkeit ist ebenfalls möglich (Erb et al. 1985; Martinez et al. 2012). Durch das schlechte Allgemeinbefinden ist in vielen Fällen auch die Futteraufnahme reduziert, was ein Risikofaktor für Folgeerkrankungen darstellt (National Research Council 2021).

Der Einfluss insbesondere der subklinischen Hypokalzämie auf die Milchleistung wird bisher noch kontrovers diskutiert. In Studien wurde keine negative Korrelation oder sogar eine gesteigerte Milchmenge beobachtet (Fleischer et al. 2001; Houe et al. 2001; Duffield 2006; Jawor et al. 2012).

2.4. Therapie und Prophylaxe von Störungen des Kalziumhaushaltes

2.4.1. Therapie der Gebärparese

Die Therapie der hypokalzämischen Gebärparese erfolgt in erster Linie durch ein Ausgleichen des Kalziumdefizits im Plasma. Die wirksamste Dosierung liegt bei 2 g Kalzium/100 kg Körpergewicht (Goff 2008). Subklinische Tiere oder Tiere mit einer geringgradigen klinischen Hypokalzämie (Grad 1) erhalten eine orale Kalziumzufuhr, die innerhalb 30 Minuten einen Kalziumausgleich leisten kann (Oetzel 2022). Die Verabreichung von Kalzium erfolgt bei bereits festliegenden Tieren (Grad 2 und 3) in der Regel intravenös. Eine zu hohe Dosis an Kalzium wie auch eine zu schnelle Verabreichung kann dabei jedoch

toxische Effekte zeigen, v.a. in Form von Herzrhythmusstörungen, die bis zum Tod führen können (Goff 1999). Die intravenöse Gabe erhöht den Blutkalziumgehalt ca. 4 Stunden lang (Goff 2008). Circa 12 - 18 Stunden später kann es zu einem erneuten Abfall des Kalziums und somit zu einem Rezidiv kommen (Curtis et al. 1978). Eine perorale Gabe von Kalzium nach einer Kalziuminfusion kann zu einem stabilen Kalziumgehalt im Plasma über die Infusion hinaus führen (Curtis et al. 1978; Thilsing-Hansen et al. 2002; Martig 2006). Maßnahmen wie das Umlagern des Tieres oder das Ermöglichen der Futter- und Wasseraufnahme trotz Festliegen sind zudem unabdingbar. Die Prognose ist gut, wenn keine Sekundärerkrankungen oder Traumata, z.B. durch unzureichendes Stehvermögen, vorliegen.

Von subkutanen Injektionen sollte abgesehen werden, da eine schlechte Aufnahme aufgrund fehlender Durchblutung des Gewebes und Dehydratation vorliegt. Außerdem kann Kalzium subkutan zu Nekrosen führen. Der Kalziumgehalt durch Injektionen steigt zwar an, fällt allerdings innerhalb von 6 Stunden wieder ab (Goff 1999).

2.4.2. Prophylaktische Maßnahmen zur Vermeidung der Hypokalzämie

Präventive Maßnahmen können auf drei verschiedene Regulationsvorgänge abzielen (Horst et al. 1997; Kocabagli 2018).

1. Steigerung der PTH-Empfindlichkeit in den Zielgeweben (Knochen, Niere und Darm)
2. Erhöhung der Freisetzung von Kalzium aus dem Knochen und verstärkte aktive enterale Kalziumabsorption
3. Erhöhung der passiven enteralen Kalziumabsorption

Als präventive Maßnahmen werden verschiedene Methoden angewendet, wobei die Modulation des Futters in der Praxis den größten Stellenwert besitzt.

2.4.2.1. Kalziumarme Fütterung in der Trockenstehphase

Durch Reduktion des Serumkalziums schon 7 - 14 Tage vor der Geburt werden bereits vor Einsetzen der Laktation die Regulationsmechanismen aktiviert (Kichura et al. 1982).

Eine Verfütterung von nicht mehr als 20 g Kalzium pro Tier und Tag in der präpartalen Phase fördert die Regulationsmechanismen der Kalziumhomöostase, somit die aktive Resorption aus dem Darm und die Mobilisierung von Kalzium aus dem Knochen (Goff 2000; Martig 2006). Dieser niedrige Wert kann jedoch kaum mit gängigen Futtermitteln erreicht werden

(Martig 2006), so dass Kalziumbinder wie z.B. Zeolith oder Phytinsäure aus Reiskleie nötig sind (Thilsing-Hansen und Jørgensen 2001; Martín-Tereso und Verstegen 2011). Es werden Richtwerte für die Fütterung von 40-50 g Kalzium pro Tier und Tag angegeben (Horst 1986; Thilsing-Hansen et al. 2002). Eine aktuelle Studie wertet einen Kalziumgehalt von 4 g/kg TM als nicht ausreichend für die negative Kalziumbilanz und eine darauf folgende PTH-Sekretion (Goff und Koszewski 2018).

2.4.2.2. Supplementierung von Vitamin D₃ oder dessen Metaboliten

Eine parenterale Gabe von hochdosiertem Vitamin D₃ (10 x 10⁶ IE) zwei bis acht Tage vor der Geburt zeigte in verschiedenen Studien eine signifikante Reduktion der Gebärpareseinzidenz und eine starke Aktivierung des Ca/P-Stoffwechsels (Gürtler et al. 1977; Horst und Reinhardt 1983). Die rechtzeitige Gabe von Vitamin D₃ führt zu einem ausreichend hohen Wirkspiegel im Zeitraum von 48 Stunden nach der Geburt und verhindert somit die Hypokalzämie (Jessen 2011). Verzögert sich der Kalbetermin, so muss die Behandlung wiederholt werden. Wird diese Methode jedoch über mehrere Jahre angewendet, so steigt das Risiko einer Kalzinose (Martín-Tereso und Martens 2014).

2.4.2.3. Veränderung der Konzentration von Kalium, Phosphat und Magnesium in der Ration

Die Reduzierung der Kaliummenge in der Fütterung der trockenstehenden Tiere, um eine Alkalisierung im Blut zu vermeiden, wurde von Goff und Horst (1998) beschrieben. Als Optimalwert wird eine Konzentration zwischen 1,3 - 1,5% angegeben, die 13 - 15 g Kalium/kg TS entspricht (Hayton et al. 2012).

Eine niedrige Phosphatkonzentration im Futter in der präpartalen Phasen kann ebenfalls zu einer Verringerung der Hypokalzämie führen (Kichura et al. 1982; Singer 2006).

Empfehlungen durch den NRC liegen bei 3,2 g – 4,4 g/kg Trockenmasse, je nach Milchleistung (National Research Council 2021). Teilweise finden sich in der Literatur noch niedrigere vorgeschlagene Werte (2,2 g/kg Trockenmasse) (Keanthao et al. 2021). Die Magnesiumkonzentration sollte dagegen in der Zeit ante partum nicht in eine negative Bilanz gebracht werden (Singer 2006). Die Empfehlung des NRC liegt bei 1,8 g - 2,0 g/kg Trockenmasse (National Research Council 2021). Ein Mangel an Magnesium kann die Gefahr einer Hypokalzämie erhöhen. Bei einer Hypomagnesiämie liegt eine verringerte Ansprechbarkeit des Zielgewebes auf Calcitriol und PTH vor (Reinhardt et al. 1988; Goff

2000). Eine zu hohe Magnesiumkonzentration im Futter sollte ebenfalls vermieden werden. In der Literatur finden sich Hinweise, dass ein zu hoher Magnesiumgehalt der Kalziumresorption entgegen wirken kann (Care et al. 1984).

2.4.2.4. Anreicherung des Futters mittels saurer Salze, DCAB

Die DCAB (Dietary Cation Anion Balance) bezeichnet das Verhältnis zwischen starken Anionen und Kationen im Futter in Milliäquivalent pro Kilogramm Trockenmasse (meq/kg TS). Wird eine negative Differenz erreicht, so überwiegen die starken Anionen (Joyce et al. 1997). Im Körper wird dadurch eine metabolische Azidose ausgelöst (Oetzel et al. 1988; Horst et al. 1997; Goff und Horst 1998; Melendez et al. 2022). Befindet sich die Kuh in einem azidotischen Zustand, so ist die enterale Kalzium-Absorption sowie die Kalziumresorption im Knochen erhöht, da die Sensitivität der Zielgewebe gegenüber PTH erhöht ist (Goff 2014; Goff und Koszewski 2018). Das Risiko für eine Hypokalzämie sinkt (Gaynor et al. 1989; Goff et al. 1991a; Charbonneau et al. 2006; Lean et al. 2006; Hassanien et al. 2022). Mit dieser Methode kann der Prozentsatz von 50% hypokalzämischen Tieren auf 15 - 25% gesenkt werden (Oetzel 2004).

Durch Zugabe von sogenannten „sauren Salzen“, die reich an starken Anionen wie Chlorid oder Sulfat sind, kann im Futter eine negative DCAB erreicht werden. Empfehlenswert ist ein Bereich zwischen -100 bis -150 meq/kg Trockensubstanz (Oetzel et al. 1988; Moore et al. 2000). Diese Ration wird 3 Wochen ante partum gefüttert. Nach folgender Formel lässt sich die DCAB berechnen (Ender et al. 1971; Oetzel 2000):

$$\text{DCAB (meq/kg TS)} = (\text{K}^+ + \text{Na}^+) - (\text{Cl}^- + \text{SO}_4^{2-})$$

Nachteil der Anreicherung des Futters mit sauren Salzen ist eine geringere Schmackhaftigkeit und damit verbunden eine reduzierte Aufnahme an Trockensubstanz (Oetzel et al. 1988; Martig 2006). Eine Überwachung der Futteraufnahme und des DCAB-Wertes ist indiziert (Oetzel 2000). Für die Kontrolle der DCAB eignet sich die Bestimmung des pH-Wertes, der NSBA (Netto-Säure-Basen-Ausscheidung) und der Kalziumkonzentration im Urin (Gelfert et al. 2004; Constable et al. 2009).

2.4.2.5. Direkte Verabreichung von Kalzium oral oder per Injektion/Infusion

Eine weitere prophylaktische Maßnahme zur Bekämpfung der Hypokalzämie ist die 4-malige Verabreichung von Kalziumchlorid oder -propionat in oraler Form (ein Tag vor der Geburt, am Tag der Geburt und die zwei darauffolgenden Tage) mit jeweils ca. 50 g Kalzium (Martig 2006; Oetzel 2013). Kalziumchlorid hat dabei die effektivste Wirkung, da es über eine hohe Bioverfügbarkeit des Kalziums und die Fähigkeit der Induktion eines schwach azidotischen Zustands verfügt, der zusätzlich die Mobilisation der eigenen Kalziumreserven stimuliert (Goff und Horst 1993; Goff und Horst 1994). Durch den damit verbundenen Anstieg des Plasmakalziumgehalts im Blut wird das Risiko einer hypokalzämischen Gebärfähigkeit nach der Geburt signifikant gesenkt (Martig 2006). Verschiedene Firmen bieten hierzu die Verabreichung in Form eines Bolus an (Sampson et al. 2009). In Form organischer oder anorganischer Salze oder in Gelform ist die Verabreichung ebenfalls möglich (Khol et al. 2020). In der Praxis erschwert aber die dafür nötige Kenntnis des genauen Kalbtermins und der hohe Arbeitsaufwand die Umsetzung dieser Methode.

2.5. Nicht-selektive Kationenkanäle (TRP-Kanäle) und Menthol

2.5.1. TRP-Familie

Die TRP-Kanäle (Transient Receptor Potential) sind nicht selektive Kationenkanäle, die in sieben Gruppen eingeteilt werden können: TRPC (classical oder canonical), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPP (polycystin), TRPML (mucolipin), TRPN (no mechanoreceptor potential C), TRPA (ankyrin) (Vennekens et al. 2002; Vriens et al. 2004; Montell 2005; Lezama-García et al. 2022). Die Unterfamilien unterscheiden sich in ihrem strukturellen Aufbau (Clapham et al. 2003). Die Kanäle bestehen aus sechs Transmembransegmenten, die zwischen dem fünften und sechsten Segment jeweils eine Pore aufweisen. Sie besitzen zudem einen zytosolischen Amino- und Carboxylterminus, deren Längen variieren und als Unterscheidungsmerkmal zwischen den Familien gelten (Clapham 2003; Clapham et al. 2003; Vriens et al. 2004; Owsianik et al. 2006) (Abbildung 6). Funktionell zeigen alle Vertreter der TRP-Familie eine Leitfähigkeit für Na-Ionen. In der Leitfähigkeit für andere Kationen und in ihrer Aktivierung variieren sie (Montell 2005; Pedersen et al. 2005). In den verschiedensten Geweben lassen sich TRP-Kanäle nachweisen (Andrade et al. 2006; Van Haute et al. 2010; Holzer 2011b; Holzer 2011a; Nilius und Bíró 2013). Dabei zeigen sich tierartspezifische Unterschiede (Montell 2005). Die Funktionen sind vielfältig. So spielen sie u.a. eine Rolle bei der sensorischen Wahrnehmung

(Lezama-García et al. 2022). Auf zellulärer Ebene erlauben sie eine Reaktion der Zellen auf ihre Umgebung oder sind u.a. an der Regulierung des Kalzium- und Magnesiumhaushaltes beteiligt (Caterina et al. 1997; McKemy et al. 2002; Clapham 2003; Venkatachalam und Montell 2007).

TRPV5 und TRPV6, lokalisiert an der apikalen Membran im Darm, sind für die Aufnahme von Kalzium in das Zytosol, insbesondere beim Monogastrier, essentiell (Den Dekker et al. 2003; Brown et al. 2005; Hoenderop et al. 2005). TRPV6 ist hauptsächlich im Darm zu finden, TRPV5 dagegen hauptsächlich in der Niere (Van Goor et al. 2017).

Beim Wiederkäuer konnten ebenfalls TRP-Kanäle nachgewiesen werden. TRPV3, TRPV4, TRPV6, TRPM6 und TRPM7 ließen sich im Gastrointestinaltrakt von Wiederkäuern identifizieren (Schweigel et al. 2008; Wilkens et al. 2009; Rosendahl et al. 2016; Rabbani et al. 2018; Schrapers et al. 2018; Liebe et al. 2020). Eine wichtige Funktion der TRP-Kanäle beim Rind ist die Kalziumaufnahme. TRPV3 und TRPA1 scheinen im bovinen Pansen als Kalziumkanäle zu fungieren (Rosendahl et al. 2016; Liebe et al. 2020).

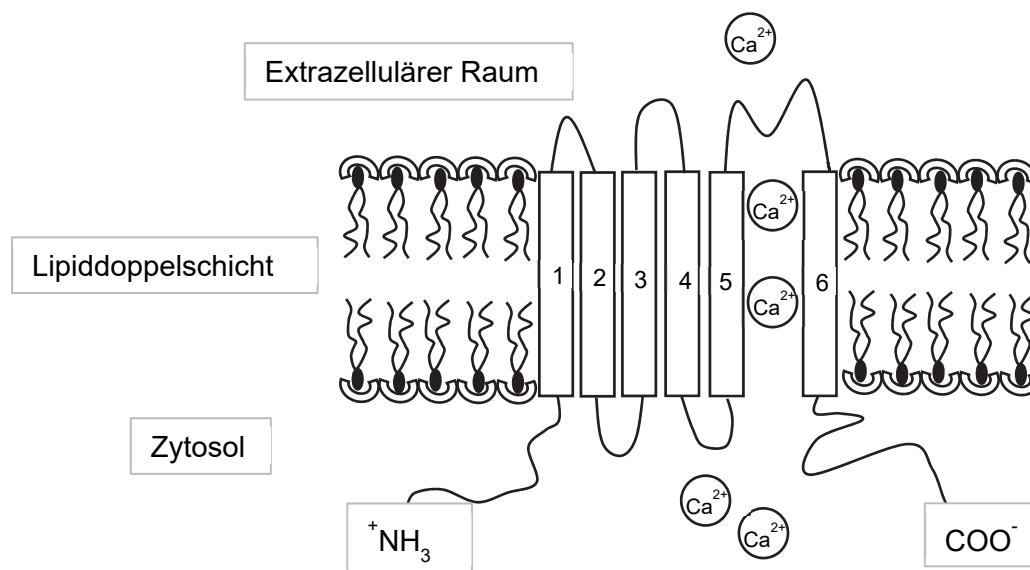


Abbildung 6: Aufbau eines TRP-Kanals (Transient receptor potential-Kanal). Es handelt sich um einen nicht-selektiven Kationenkanal in der Lipiddoppelschicht. Der Kanal besteht aus sechs Transmembransegmenten. Zwischen dem fünften und sechsten Segment ergibt sich eine Pore, die für die Durchlässigkeit von Ionen, wie z.B. Kalzium, ausschlaggebend ist. Anhand des N- und C- Endes unterscheiden sich die Mitglieder der TRP-Familie und lassen sich in Gruppen einteilen (Clapham et al. 2001; Clapham 2003).

Die TRP-Rezeptoren werden durch unterschiedliche Stimuli, wie zum Beispiel Temperatureinwirkung oder verschiedene Liganden, aktiviert (Clapham et al. 2001; Venkatachalam und Montell 2007). Eine Ligandenaktivierung ist bei einigen Vertretern auch durch PBLC (plant bioactive lipid compounds, Bioaktive Pflanzenlipide) möglich (Vogt-Eisele et al. 2007; Boonen et al. 2016).

2.5.2. PBLC, plant bioactive lipid compounds

Bioaktive Pflanzenlipide (PBLC) umfassen vor allem die allgemein als „essentielle Öle“ bekannten chemischen Verbindungen. Sie haben ihren Ursprung in Pflanzen (Dorman und Deans 2000; Prabuseenivasan et al. 2006). Diese bilden PBLC als sekundäre Stoffwechselprodukte (Croteau et al. 2015). Es handelt sich um flüchtige aromatische Verbindungen, die gewöhnlich aus Terpenoiden und Phenylpropanoiden bestehen (Calsamiglia et al. 2007). Der Großteil der PBLC besteht aus Monoterpenen, die sich in ihren funktionellen Gruppen untereinander abgrenzen (Benchaar et al. 2008).

Eine Vielzahl an PBLC bilden zusammen ätherische Öle, wobei nur zwei bis drei den größten Konzentrationsanteil ausmachen (Bakkali et al. 2008). Ätherische Öle können aus Pflanzen extrahiert oder synthetisch erzeugt werden (Daviet und Schalk 2010; Maeda et al. 2012).

Vertreter der PBLC sind z.B. Thymol aus Thymian und Oregano, Eugenol aus der Nelke, Zimtaldehyd aus Cinnamon, Capsaicin aus Peperoni, Terpene aus Teebaum und Allicin aus Knoblauch (Calsamiglia et al. 2007). Auch Menthol zählt zu der Gruppe der PBLC (Bakkali et al. 2008).

Anwendung finden sich sowohl in der Kosmetik, der Lebensmittelindustrie, aber auch der Medizin (Burt 2004). Vielen PBLC wird ein antioxidativer Effekt zugeschrieben, der antimikrobielle, antiseptische oder antikarzinogene Eigenschaften bedingt (Hammer et al. 1999; Burt 2004; Bakkali et al. 2008; Singh et al. 2023). In der Nutztierhaltung erlangten PBLC in den letzten Jahren eine mögliche Bedeutung als Futtermittelzusatzstoffe. Beim Wiederkäuer konnte durch die Zugabe eine Verbesserung des mikrobiellen Stoffwechsels im Pansen festgestellt werden (Roy et al. 2015; Mirzaei-Alamouti et al. 2016). Dadurch wurde eine verbesserte Stärke- und Proteinverwertung, eine erhöhte Fermentationseffizienz und eine Hemmung der Methanogenese erreicht (McIntosh et al. 2003; Calsamiglia et al. 2007; Patra und Yu 2012). Milchkühe zeigten bei Zugabe zudem eine verbesserte Futteraufnahme und eine Steigerung der Milchleistung (Kung et al. 2008; Tassoul und Shaver 2009; Giannenas et al. 2011; Ornaighi et al. 2017; Kholif et al. 2021). Die Wirkung von PBLC ist

jedoch typ- und dosisabhängig (Calsamiglia et al. 2007). Negative Effekte wie eine reduzierte Faserverdauung und -fermentation können je nach eingesetztem PBLC und Menge ebenfalls möglich sein (Macheboeuf et al. 2008).

2.5.3. Menthol als PBLC

Menthol findet sich natürlicherweise in der Pfefferminzpflanze *Mentha x piperita* (*Lamiacea*) und kann aus dieser mit Extraktionstechniken gewonnen werden (Shotipruk et al. 2001; Zhao et al. 2022). Es gehört zu der Gruppe der Monoterpene (Abbildung 7) und besteht aus zwei Isopren-Einheiten (Peier et al. 2002; Vogt-Eisele et al. 2007). In Studien konnte nachgewiesen werden, dass Menthol eine Aktivierung des TRPV3-Rezeptors auslösen kann (Macpherson et al. 2006; Xu et al. 2006; Patel et al. 2007). Menthol ist vor allem als starkes trigeminales und chemosensorisches Stimulans in der Schleimhaut von Mund- und Nase bekannt (Karashima et al. 2007; Gerhold und Bautista 2009). Seine Wirkungen sind weitreichend. Sowohl analgetische und anästhetische (Galeotti et al. 2001; Galeotti et al. 2002; Zhao et al. 2022), aber auch juckreizstillende (Umezu et al. 2001; Anand 2003) und antiinflammatorische Effekte (Santos und Rao 2001; Zhao et al. 2022) können durch Menthol erreicht werden.

Im Bereich der Nutztierhaltung wurde der Effekt von Menthol als Futterzusatzstoff auf die mikrobielle Fermentation und die Futterverwertung untersucht (Ando et al. 2003; Patra und Yu 2012). Eine positive Wirkung bei Supplementierung konnte im Fressverhalten beobachtet werden (Patra et al. 2019a). Rosendahl et al. (2016) konnten durch die Zugabe von Menthol zum Futter von Rindern eine Erhöhung der Kalziumresorption im Pansengewebe des Rindes nachweisen, was von Braun et al. (2019) bestätigt werden konnte. Verantwortlich für die erhöhte Resorption ist vermutlich die Stimulation von TRPV3 durch Menthol (Schrapers et al. 2018).

Menthol zeigte ebenfalls eine positive Wirkung auf die Aufnahme von Kalzium über den parazellulären Weg (Patra et al. 2019b). Werden hohe Dosen an Menthol eingesetzt, so kann eine gesteigerte Bildung von Tight junction-Proteinen beobachtet werden (Zhang et al. 2017). In niedrigen Konzentrationen führt Menthol zu einer gesteigerten Öffnung der Poren in den vorhandenen Tight junctions (Mukaiyama et al. 2020).

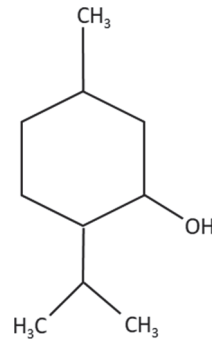


Abbildung 7: Strukturformel von Menthol (Hall et al. 1940)

2.5.4. Aktivierung von TRP-Kanälen durch Menthol

Durch Menthol können TRPM8, TRPA1 und TRPV3 aktiviert werden (Macpherson et al. 2006; Farco und Grundmann 2013). Unter anderem kommt es bei dieser Aktivierung zu einem Einstrom von Kalziumionen (Sarria und Gu 2010; Farco und Grundmann 2013). Im Folgenden soll eine kurze Übersicht über die TRP-Kanäle gegeben werden, die von Menthol aktiviert werden können.

TRPM8

Für TRPM8 konnte die Öffnung der Kanalpore und damit Aktivierung von TRPM8 durch Menthol in verschiedenen Studien beschrieben werden (Tsuzuki 2004; Bautista et al. 2007; Vogt-Eisele et al. 2007; Yin et al. 2018). TRPM8 fungiert als Kälterezeptor in der Haut und konnte zudem in Gefäßmuskulatur, Nervengewebe und Blasenepithel nachgewiesen werden (Nealen et al. 2003; Stein et al. 2004; Bautista et al. 2007; Colburn et al. 2007). Ein Nachweis für das Vorhandensein im Pansen von Wiederkäuern sowie die Beteiligung an transepithelialen Transportvorgängen konnte bisher nicht erbracht werden (Rosendahl et al. 2016). Daher kann diesem Kationenkanal kaum eine Bedeutung in der Kalziumhomöostase der Kuh beigemessen werden.

TRPA1

TRPA1 konnte im Gegensatz zu TRPM8 im Pansenepithel bei Schafen und Rindern konstatiert werden (Rosendahl et al. 2016). Eine Beteiligung an dem transepithelialen Transfer von Kationen ist möglich.

Menthol bewirkt beim TRPA1 eine Ausdehnung der Kanalpore (Karashima et al. 2010). In

niedrigen Dosierungen zeigt sich eine Aktivierung, in hohen Dosen dagegen eine Hemmung (Namer et al. 2005; Karashima et al. 2007; Xiao et al. 2008).

TRPV3

TRPV3 konnte im bovinen Pansen nachgewiesen werden (Rosendahl et al. 2016; Liebe et al. 2020). Diesem Kanal wird eine besondere Bedeutung im transepithelialen Kalziumtransport zugesprochen, da er eine höhere Selektivität für Kalzium besitzt als TRPM8 und TRPA1 und zudem eine deutlich höhere Einzelkanal-Leitfähigkeit zeigt (Owsianik et al. 2006).

Menthol erhöht die Wahrscheinlichkeit der Porenöffnung (Macpherson et al. 2006; Vogt-Eisele et al. 2007). Schrapers et al. (2018) konnten dies auch in einem Zellkulturversuch für das Rind bestätigen. Weitere Studien zeigten eine Beteiligung beim transepithelialen Kalziumtransport beim Wiederkäuer (Braun et al. 2019; Liebe et al. 2020; Liebe et al. 2022). In geringen Mengen fördert Menthol die Aktivität des TRPV3-Kanals, hohe Mengen führen dagegen zu einer Hemmung (Rosendahl et al. 2016).

2.5.5. Der Einsatz von PBLC und Menthol in der Nutztierhaltung

PBLC weisen antimikrobielle, antioxidative und immunmodulierende Eigenschaften auf und besitzen verschiedene pharmakologische Wirkungen (Huyghebaert et al. 2011; Chowdhury et al. 2018). Mit dem Verbot der antibiotischen Wachstumsförderer im Jahr 2006 und den damit verbundenen Produktionseinbußen, wurden zunehmend PBLC als Alternativen erkannt. Beim Wiederkäuer ist bereits eine Modulation der Pansenfermentation und eine Verbesserung der Produktionsleistung und des Gesundheitszustandes bewiesen worden (Patra und Saxena 2010; Mirzaei-Alamouti et al. 2016; Ornaghi et al. 2017; Soltan et al. 2018).

Eine in-vitro-Studie von Schrapers et al. (2018) wies auf einen positiven Effekt von Menthol auf die Öffnung von bovinen Kalziumkanälen hin. In-vivo konnten Braun et al. (2019) in ihrer Studie an mittel- und spätlaktierenden Milchkühen einen positiven Effekt auf die Kalziumkonzentration im Blutplasma bei Verabreichung von Menthol in Form eines Futterzusatzes zeigen. Studien im Geburtszeitraum bei Milchkühen sind bisher noch nicht beschrieben. Untersuchungen zum Einfluss von Menthol auf die Prävalenz der Hypokalzämie sowie verschiedene Leistungsparameter wie Körperkondition, Milchmenge und Gesundheitszustand sind nötig, um einen Einsatz von Menthol bei laktierenden Rindern

in der Praxis genauer zu analysieren. Eine Berücksichtigung der unterschiedlichen Anfälligkeit zwischen den Rassen und eine mögliche Divergenz beim Einsatz und der Wirkung von mentholhaltigen Futtermitteln wurde bisher nicht vorgenommen.

2.6. Messung des ionisierten Kalziums und des Gesamtkalziums

2.6.1. Diagnose der Hypokalzämie mittels Bestimmung des Blutkalziumgehaltes

Der Kalziumwert im Blut bei Milchkühen ändert sich im Zeitraum um die Geburt. So kommt es zu einem Absinken der Blutkonzentration aufgrund der einsetzenden Milchbildung (Chamberlin et al. 2013). Durch Einsetzen der Regulationsmechanismen kann der Verlust ausgeglichen werden.

Für die Diagnose der Hypokalzämie ist die Bestimmung des Kalziumgehaltes im Blut essentiell. Eine klinische Hypokalzämie ist oft schon eindeutig anhand der Symptome erkennbar, eine subklinische jedoch nur durch eine Messung des Blutkalziumgehaltes (Reinhardt et al. 2011; Caixeta et al. 2015).

Die Referenzbereiche für Rinder für die Interpretation unterscheiden sich in der Literatur. Laut Moritz et al. (2014) liegt das tCa zwischen 2,3 - 2,8 mmol/l, das iCa zwischen 0,99 - 1,3 mmol/l. Goff (2008) gibt einen Bereich zwischen 2,1 bis 2,5 mmol/l als Normalbereich für tCa an. Eine subklinische Hypokalzämie liegt bei einer Konzentration unter 2,0 mmol/l vor. Bei einer klinischen Hypokalzämie liegen die Werte häufig unter 1,5 mmol/l (Goff 2008). Chapinal et al. (2011) sprechen von normokalzämischen Werten ab 2,20 mmol/l und darüber, Martinez et al. (2012) legen den Cut-off-Wert bei 2,14 mmol/l fest .

2.6.2. Messung des Gesamtkalziums

Wird tCa bestimmt, so werden alle Fraktionen bestimmt: das proteingebundene Kalzium, das komplex gebundene Kalzium und das iCa (Moore 1970). Die Bestimmung des tCa erfolgt im Regelfall aus dem Serum mittels photometrischer Verfahren. Kalzium bildet mit Arsenazo III einen Komplex (Bauer 1980; Janssen und Helbing 1991). Die Absorption wird anschließend bei 660 nm gemessen (Leary et al. 1992). Der Anstieg der Absorption ist direkt proportional zur enthaltenen Kalziummenge (Leno et al. 2017).

Die Konzentration des tCa ist abhängig von Albumin, bzw. von Zuständen, die eine Veränderung des Albumingehaltes bewirken, z.B. Dehydratation (Payne et al. 1979; Neves

et al. 2018b). Besonders in der Zeit um die Geburt variiert der Albumingehalt im Blut und kann zu veränderten Messergebnissen des tCa führen (Seifi et al. 2005; Piccione et al. 2011). Sinkt beispielsweise der proteingebundene Anteil des Kalziums, so ergibt sich ein niedrigeres tCa, auch wenn der Anteil des iCa normal ist. Aus diesem Grund wurden Vorschläge gemacht das tCa für die Albumin- und Totalproteinkonzentration zu korrigieren, um die diagnostische Interpretation des tCa zu verbessern (Sharp et al. 2009).

2.6.3. Messung des ionisierten Kalziums

Die Bestimmung des iCa kann aus heparinisiertem Vollblut, Heparin-Plasma oder Serum erfolgen (Boink et al. 1991). Dazu werden ionenselektive Elektroden genutzt, die bereits seit den 1990er in der Humanmedizin etabliert sind (Moore 1970; Buckley und Russell 1988; Jafri et al. 2014). Ein empfohlenes Testverfahren für iCa durch Potentiometrie mittels ionenselektiver Elektrode wurde hierzu von der IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) beschrieben (Burnett et al. 2000).

Zu den Einflussfaktoren auf die Konzentration des iCa zählen Albumin-, Globulin-, L-Lactat-, Natrium- und Chloridkonzentrationen sowie Entnahmetechnik, Lagerungsbedingungen (insb. Temperatur) und pH-Wert (Pedersen 1970; Constable et al. 2019).

2.6.4. Einfluss des pH-Wertes auf die Konzentration des ionisierten Kalziums

Mit zunehmendem pH-Wert steigt der gebundene Anteil an Kalzium (Loken et al. 1960; Jafri et al. 2014) sowie die Möglichkeit zur Ausfällung zu Kalziumphosphat oder Kalziumcarbonat (Moore 1970; Boink et al. 1991). Eine pH-Wert-Veränderung nach der Probennahme ergibt sich durch einen Verlust an CO₂, der unter aeroben Bedingungen abläuft, sowie durch einen Anstieg an Laktat infolge der Glycolyse in Erythrozyten und Leukozyten (Boink et al. 1991). Für eine genaue Messung des iCa sollten daher anaerobe Bedingungen zu Grunde liegen sowie die Zentrifugation und Verarbeitung innerhalb einer Stunde geschehen (Unterer et al. 2005). Dadurch können Abweichungen durch Veränderungen in den Kalziumfraktionen durch den pH-Wert vermieden werden.

Die Referenzwerte gelten für einen pH-Bereich von 7,2 bis 7,6 (Siggaard-Andersen et al. 1981; Buckley und Russell 1988; Thode et al. 1990). Ist die Abweichung des pH-Wertes zu hoch, so kann eine Umrechnung zu einem pH-korrigierten ionisierten Kalzium für einen pH-Wert von 7,4 erfolgen (Boink et al. 1991; Larsen et al. 2001). Der Einsatz des pH-korrigierten

iCa wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Thode et al. 1990; Wang et al. 2002; Baird 2011; Lam et al. 2013).

2.6.5. Einfluss des Heparins auf die Konzentration des ionisierten Kalziums

Antikoagulanz der Wahl für die Messung des iCa ist Heparin, entweder in Form von Lithium- oder Natriumheparin (Forman und Lorenzo 1991). Der Gehalt an Heparin sollte dabei 15 IU/ml Blut aufgrund seiner kalziumbindenden Eigenschaft nicht übersteigen (Sachs et al. 1989; Landt et al. 1994; Jafri et al. 2014). Durch die geringe beigeseetzte Menge wird weniger als zwei Prozent des iCa gebunden (Buckley und Russell 1988). Ist der Heparinanteil zu hoch, so wird eine zu große Menge an Kalzium gebunden und der Messwert verfälscht. Standardisierte kommerziell erhältliche heparinisierte Probengefäße sind zu empfehlen (Biswas et al. 1981; Constable et al. 2019). Des Weiteren wird die Zugabe von Heparin in trockener Form empfohlen, um den Verdünnungseffekt zu reduzieren (Boink et al. 1991; Shin et al. 2006).

2.6.6. Korrelation zwischen Gesamtkalzium und ionisiertem Kalzium

Frühere Studien gehen davon aus, dass der Gehalt an iCa 50% des tCa beträgt (Lincoln und Lane 1990). Diese Annahme trifft im Zeitraum um die Geburt nicht zu. Zu diesem Zeitpunkt ist der Anteil des iCa am tCa erhöht (Ballantine und Herbein 1991; Joyce et al. 1997), was dazu führt, dass ein einfacher Rückschluss von tCa auf iCa nicht der tatsächlichen Konzentration des iCa entspricht. Die genaue Korrelation zwischen iCa und tCa wird in verschiedenen Untersuchungen kontrovers bewertet (Moore 1970; Kuart und Larsson 1978; Larsen et al. 2001; Koch et al. 2002; Deniz 2022).

Bemühungen für die Berücksichtigung weiterer Faktoren, um das iCa verlässlich aus der Konzentration des tCa zu bestimmen, wurden in verschiedenen Studien unternommen (Schenck und Chew 2005; Björkman et al. 2009; Takano et al. 2012). Insbesondere in der Humanmedizin wurden Formeln zur Errechnung des Gehaltes an iCa aus dem tCa entwickelt, die jedoch nur für gesunde Menschen gelten und bei krankhaften Zuständen nicht zur Bestimmung des iCa geeignet sind (Onifade et al. 2005; Björkman et al. 2009). Danner et al. (2017) versuchten beim Hund ebenfalls eine Formel zur Vorhersage des iCa zu errechnen und berücksichtigten in dieser Kreatinin, Albumin, Totalprotein, Phosphat, Natrium, Kalium, Chlorid, alkalische Phosphatase, Triglyceride und das Alter des Hundes.

Die errechneten Formeln sind jedoch lediglich auf die in die einzelnen Studien einbezogenen Populationen validiert. Eine Gewährleistung, dass diese Ergebnisse verallgemeinert werden können, ist aufgrund fehlender weiterer Untersuchungen mit diesen Formeln nicht gegeben. Eine allgemein gültige Formel zur Errechnung des iCa aus tCa und möglichen weiteren Parameter liegt aktuell nicht vor. Auch für die Milchkuh ist aktuell keine Formel bekannt, die die Abhängigkeit der iCa-Konzentration von tCa und weiteren Laborkennwerten um den Geburtszeitraum beschreibt.

Untersuchungen bei Wiederkäuer zur Beschreibung der Abhängigkeit von iCa zu tCa ohne Einfluss von Prophylaxemaßnahmen für Hypokalzämie oder Einbeziehung an Milchfieber erkrankter Tiere sind in der Literatur kaum zu finden. Durch prophylaktische Maßnahmen kommt es schnell zu einer Veränderung der Korrelation zwischen iCa und tCa. Die Anwendung der DCAB-Methode führt beispielsweise durch die Variation des pH-Wertes im Blut zu einer veränderten Abhängigkeit zwischen tCa und iCa. Für die Interpretation ist daher der vorliegende pH-Wert im Blut ein wichtiger Faktor. Während einer vorherrschenden Alkalose oder Azidose kann das Gleichgewicht zwischen den Kalzium-Fractionen verändert sein und somit die Korrelation zwischen tCa und iCa variieren. Sinkt der pH-Wert, so konkurrieren mehrere Protonen mit Ca um die Bindungsstellen am Albumin. Die Konzentration von iCa steigt deshalb bei einer Azidose, da mehr proteingebundenes Kalzium in Lösung gebracht wird. Bei einer Alkalose wird die Konzentration von iCa gesenkt (Russell und Roussel 2007).

2.6.7. Bedeutung in der Praxis

Die Messung des iCa ist aufwändiger in der Durchführung und teurer als die Messung des tCa (Forman und Lorenzo 1991; Leno et al. 2017). In der Regel wird sie in einem Labor durchgeführt, wobei jedoch erhöhte logistische Anforderungen berücksichtigt werden müssen, da sich die Kalziumfraktionen bei nicht sachgerechter Lagerung und Transport verändern können (Neves et al. 2018b). Testgeräte, die auf dem Betrieb angewendet werden können, sind mittlerweile verfügbar. Die Kosten für die Messung des iCa sind dennoch höher als bei tCa (Neves et al. 2018b). Des Weiteren sind die Geräte oftmals für die Humanmedizin validiert. Studien für die Verwendung in der Tiermedizin, insbesondere im Bereich der Rinder, sind nur wenig vorhanden (Leno et al. 2017; Neves et al. 2018b). Die direkte Messung des iCa wird jedoch von vielen Autoren empfohlen (Ballantine und Herbein 1991; Seifi et al. 2005; Kimura et al. 2006; Constable et al. 2019). Auch in der Humanmedizin wurden bereits einige Studien durchgeführt mit dem Ergebnis, dass die Messung von iCa

präziser und besser geeignet für die Vorhersage des Kalziumstatus ist (Jafri et al. 2014). Die Verwendung von Formeln zur Korrektur des tCa und damit zum Rückschluss auf iCa wird nicht empfohlen und als ungenau betrachtet (Alavi et al. 2015; Yogeshpriya et al. 2020; Katsoulos et al. 2022).

In der Praxis wird bei Wiederkäuern nach wie vor die Messung des tCa häufiger durchgeführt, da diese kostengünstiger und einfach im Handling ist als die des iCa (Schenck und Chew 2010; Leno et al. 2017).

2.6.8. Zusammenfassung der Literatur für die eigene Fragestellung

Das iCa ist der biologisch aktive Anteil im Organismus (Onifade et al. 2005). Für die Bestimmung des Kalziumhaushaltes bei Milchkühen wird in der Praxis jedoch nach wie vor hauptsächlich tCa genutzt (Leno et al. 2017). Einige Erkenntnisse weisen jedoch darauf hin, dass direkte gemessene iCa-Werte den Kalziumhaushalt genauer beschreiben können als tCa-Werte oder der rechnerische Rückschluss auf iCa mittels tCa. Ein Grund dafür ist, dass sich das Verhältnis des iCa zum tCa im Zeitraum um die Geburt ändert (Ballantine und Herbein 1991). Eine unzureichende Korrelation zwischen tCa und iCa wurde u.a. auch in Studien an Kälber nachgewiesen (Agnes et al. 1993; Constable et al. 2019). Entsprechend der bisher bekannten Erkenntnisse stellt sich die Frage nach der Aussagekraft des über das tCa bestimmten iCa besonders um den Geburtszeitraum. Möglicherweise kann durch die Berücksichtigung weiterer Laborwerte ein genauerer Rückschluss von tCa auf iCa erfolgen, was jedoch noch weiterer Forschung bedarf. Ausgehend von der bisherigen Studienlage wird für die vorliegende Ausarbeitung die Hypothese aufgestellt, dass die Bestimmung des tCa das biologisch verfügbare iCa nur ungenau widerspiegelt. Zudem wurde angestrebt durch Verwendung weiterer gemessener Laborwerte ein Modell zur Vorhersage des iCa aus tCa zu erstellen.

In der Zeit um die Geburt kommt es durch Einsetzen der Milchbildung zu einem starken Kalziumabfall im Blut, der bei einer fehlenden Gegenregulation zu einer klinischen oder einer subklinischen Hypokalzämie führen kann (Martig 2006). Für die klinische Form ist eine Inzidenz von bis zu 10% beschrieben (Jessen 2011), für die subklinische Form sogar bis 50% (Reinhardt et al. 2011). Verschiedene Maßnahmen zur Prophylaxe der Hypokalzämie können eine frühe Gegenregulation aktivieren und somit ein zu starkes Absinken des Kalziumwertes verhindern (Horst et al. 1997; Kocabagli 2018). Eine Zufütterung von mentholhaltigen Futtermitteln, die mittlerweile auf dem Markt sind, soll einem zu starken Kalziumabfall entgegenwirken. Es wird angenommen, dass die Wirkung

auf TRPA1 und TRPV3-Kanäle im Pansenepithel beruht, die u.a. Kalziumionen leiten (Rosendahl et al. 2016; Liebe et al. 2020). TRPA1 und TRPV3 können durch Menthol, ein PBLC, aktiviert werden (Macpherson et al. 2006). In vitro konnte bei einer Zugabe von Menthol eine erhöhte Leitfähigkeit für Kalziumionen durch bovine TRPV3-Kanäle nachgewiesen werden (Schrapers et al. 2018). In vivo führte die Zugabe mentholhaltiger PBCL zum Futter von mittel- bis spätlaktierende Milchkühe zu einem erhöhten Blut-Kalziumspiegel (Braun et al. 2019). Der Einfluss mentholhaltiger Futtermittel auf den Kalziumhaushalt der Kühe im peripartalen Zeitraum wurde jedoch bisher nicht untersucht. In welcher Weise mentholhaltige Futtermittel den Kalziumverlauf, die Gesundheit und die Milchleistung bei Milchkühen im Zeitraum nach der Abkalbung beeinflussen, ist noch unbekannt. Da auch die Rasse als Risikofaktor für Hypokalzämie gilt (Goff et al. 1995b), ist ihr Einfluss auf die Wirkung von mentholhaltigen Futtermittel möglicherweise von Bedeutung. Es wird die Hypothese aufgestellt, dass Menthol als PBLC einen positiven Effekt auf die Kalziumkonzentration im Blutplasma aufweist und so einer Hypokalzämie entgegenwirken kann. Es besteht weiterhin die Annahme, dass die Verabreichung von Menthol einen positiven Effekt auf die Milchleistung und Kondition der Milchkühe zeigen kann.

Im Bereich der Hypokalzämie der Milchkuh besteht nach wie vor Forschungsbedarf. Trotz verfügbarer Prophylaxemaßnahmen ist es eine weit verbreitete Erkrankung. Nicht nur das direkte Erkranken des Einzeltieres, sondern auch die damit verknüpften Folgeerkrankungen und Leistungseinbußen sind ein Problem. Das rechtzeitige Erkennen in Verbindung mit einer zügigen Therapie oder geeignete Prophylaxemaßnahmen sind von entscheidender Bedeutung. Die folgende Dissertation soll sich zum einen der Beschreibung des Kalziumhaushaltes im Zeitraum um die Kalbung widmen sowie einer möglichen Prophylaxe der Hypokalzämie durch Anwendung mentholhaltiger PBLC.

Ausgehend der oben genannten Darlegung wurden folgende Fragestellungen und Ziele für die vorliegende Dissertation formuliert:

1. Welche Beziehung kann zwischen tCa und iCa bei gesunden multiparen Milchkühen um den Geburtszeitraum ohne Anwendung der gängigen Prophylaxestrategien gegen Hypokalzämie angenommen werden?
2. Kann durch die Erstellung eines multivariablen Modells unter Einbeziehung weiterer Laborkennwerte die Vorhersage von iCa durch tCa verbessert werden?
3. Welchen Einfluss zeigt der Einsatz eines handelsüblichen mentholhaltigen Futtermittels während der peripartalen Phase auf den Kalziumverlauf in einer Milchkuhherde?

4. Welchen Einfluss zeigt der Einsatz eines handelsüblichen mentholhaltigen Futtermittels in der periparturalen Phase auf die Prävalenz der Hypokalzämie?
5. Welchen Einfluss zeigt der Einsatz eines handelsüblichen mentholhaltigen Futtermittels in der periparturalen Phase auf die Laktationsleistung?
6. Zeigen sich Unterschiede in der Wirkung eines mentholhaltigen Futtermittels in verschiedenen Rassen, die sich in der Anfälligkeit für Hypokalzämie unterscheiden (Holstein-Friesian vs. Braunvieh)?

3. Veröffentlichungen

3.1. Changes in the relationship between ionized and total calcium in clinically healthy dairy cows in the period around calving

Veröffentlichung in: *Animals* 2021, 11. Jg., Nr. 4, S. 1036

Eingereicht am: 13. März 2021

Akzeptiert am: 04. April 2021

Erste Veröffentlichung am: 06. April 2021

Autoren: Dorothee Ott, Katharina T. Schrapers und Jörg R. Aschenbach

DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11041036>

Lizenz: CC BY 4.0

Beiträge der Autoren:

Konzeption, D.O., K.T.S., und J.R.A.; Methodik, D.O. und K.T.S.;

Validierung, K.T.S. und J.R.A.; formale Analyse, D.O. und K.T.S.;

Versuchsdurchführung, D.O.; Ressourcen, K.T.S.; Datenkuratierung, D.O.;


Erstellung des Originalentwurfs des Manuskriptes, D.O.;

Überprüfung und Überarbeitung des Manuskriptes, alle Autoren; Visualisierung, D.O.;

Supervision, J.R.A.; Projektleitung, K.T.S. and J.R.A.

Article

Changes in the Relationship between Ionized and Total Calcium in Clinically Healthy Dairy Cows in the Period around Calving

Dorothee Ott ^{1,2}, Katharina T. Schrapers ²  and Jörg R. Aschenbach ^{1,*}

¹ Institute of Veterinary Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, 14163 Berlin, Germany; dorothee_ott@web.de

² PerformaNat GmbH, 14163 Berlin, Germany; schrapers@performanat.de

* Correspondence: joerg.aschenbach@fu-berlin.de; Tel.: +49-30-838-62600; Fax: +49-30-838-462601

Simple Summary: Hypocalcemia is a widespread problem in dairy cows in the first days after calving, which increases the risk for secondary diseases. In practice, the measurement of total blood serum or plasma calcium is widely used to diagnose hypocalcemia. The present study demonstrates a high discrepancy between total and ionized calcium specifically around calving, suggesting that only ionized calcium provides an accurate indication of the animal's calcium status during that period. We developed an optimized model for prediction of ionized calcium from total calcium, non-esterified fatty acids, beta-hydroxybutyric acid, cholesterol, and phosphorous. However, the precision of that model is still unsatisfactory.

Abstract: We aimed to establish a model for prediction of iCa from tCa, using multivariable regressions with diverse blood constituents. Blood was taken from 14 cows at days −2, 0, 2, 4, 7, and 14 relative to parturition. Cows were clinically healthy, and no hypocalcaemia prophylaxis and treatment were applied. Total calcium and further parameters were determined from frozen serum. Ionized calcium, blood gases, and electrolytes were determined from heparin-stabilized blood samples. Linear regression between iCa and tCa was estimated. Precision improved only slightly using a multivariable model. Best precision was achieved when estimating the iCa:tCa ratio from other blood constituents. To identify the reason behind the poorly predictive value of tCa for iCa, the relative changes of iCa and tCa around calving were calibrated to the respective values of day −2 (=100%) for each cow. An increase in the iCa:tCa ratio was observed from 0.43 at day −2 to 0.48 at day 0, followed by a gradual decrease towards 0.43 at day 7. We conclude that routine measurement of iCa should be implemented in the diagnosis of hypocalcaemia. An optimized estimate of iCa from tCa with non-esterified fatty acids (NEFA), beta-hydroxybutyric acid, cholesterol, and phosphorous as co-predictors is still poorly satisfying.

Keywords: dairy cows; hypocalcemia; ionized calcium; total calcium; heparin



Citation: Ott, D.; Schrapers, K.T.; Aschenbach, J.R. Changes in the Relationship between Ionized and Total Calcium in Clinically Healthy Dairy Cows in the Period around Calving. *Animals* **2021**, *11*, 1036. <https://doi.org/10.3390/ani11041036>

Academic Editors: David S Beggs and Peter Mansell

Received: 13 March 2021

Accepted: 4 April 2021

Published: 6 April 2021

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



Copyright: © 2021 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

The synthesis and secretion of colostrum by dairy cows in the first days after calving leads to a large demand for Ca^{2+} in the first days postpartum [1]. Several homeostatic mechanisms need to adapt in this period to maintain the Ca^{2+} plasma pool in the light of Ca^{2+} requirements for colostrum and milk [2]. These mechanisms need to be effective because calcium plays a critical role in many physiological processes, including immune status, blood clotting, nerve impulse transmission, and muscle contraction [3]. However, about 5 to 10% of all multiparous cows show clinical signs of hypocalcemia or milk fever in the period after calving, and another 30 to 60% suffer from subclinical hypocalcemia with total serum calcium levels below $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [4,5]. If the mammary need for blood

calcium is not compensated quickly and adequately, hypocalcemia occurs and increases the risk for metritis, displaced abomasum, and other secondary diseases [4].

In blood plasma, calcium exists in three different fractions: about 50% is present in the free ionized form; 40% is protein-bound; and 10% is complexed with anions such as lactate, citrate, inorganic phosphate, and bicarbonate. These three fractions are in balance with each other [6], but only the ionized form is available for the maintenance of calcium homeostasis [7].

In the absence of clinical signs of milk fever, the measurement of blood Ca^{2+} is the key tool to recognize subclinical hypocalcemia [8,9]. Since only the ionized calcium (iCa) is biologically active, the concentration of iCa is more relevant than the concentration of total calcium (tCa) [10]. The determination of plasma iCa concentrations is well established for patient care in human medicine [6]; however, total calcium is usually measured in veterinary medicine [2]. The latter is technically less challenging because tCa can be measured hours after sampling or after freezing serum samples. By contrast, iCa must be measured immediately from gas-tight containers since the proportion of protein-bound calcium decreases with increasing pH, implying that changes in blood gases affect the concentration of iCa [11,12].

Some studies investigated the relationship between ionized calcium and total calcium in calves [13,14] or in dogs [15]. For adult dairy cows, previous studies provided the first indication that the relationship between tCa and iCa may change at the time after calving, so that ionized calcium accounts for a larger proportion of Ca^{2+} postpartum [3,16,17]. However, all those previous studies included cases of clinical milk fever together with measures to prevent or treat hypocalcaemia. In the present study, we tested the hypothesis that a discrepancy between tCa and iCa is evident even in apparently healthy multiparous dairy cows postpartum that received no hypocalcemia prophylaxis from either anionic salts or low-calcium diet prepartum.

2. Materials and Methods

Repeated blood samples around calving were taken from 14 Holstein Friesian cows on a dairy farm in Bavaria, Germany with an average daily milk yield of 37.5 kg/day over the first 14 d of lactation. Five cows were in their second lactation and nine in their third lactation. The farm had not included a management strategy against hypocalcemia like anionic salts or low calcium diet antepartum. Neither calcium infusions nor oral calcium supplementation was used in the study cows. Exclusion criteria included fever, paresis, reduced feed intake, poor condition, mastitis, and metritis.

The composition of the partial mixed ration (PMR) is shown in Table 1. After calving, cows additionally received two different types of concentrate feed in the automatic milking system. The amount of concentrates increased linearly in the first 15 days after calving from 2 kg/d to 4 kg/d for concentrate A and from 0.1 kg/d to 0.3 kg/d for concentrate B. The composition of concentrate feed is also given in Table 1.

Blood was taken at $-2 (\pm 1)$, $0 (+1)$, $+2 (\pm 1)$, $+4 (\pm 1)$, $+7 (\pm 1)$, and $+14 (\pm 1)$ days relative to calving. Day 0 was always the day of calving or, in a few exceptions, the day after calving if cows calved at night. Two consecutive blood samples were drawn from a coccygeal vessel using standard venipuncture without anesthesia into one 9-mL vacutainer with a separator for serum and another 9-mL lithium-heparin vacutainer for whole blood samples (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Austria). To ensure the most anaerobic collection possible, the vacutainer was first removed from the needle and then the needle was removed from the vessel to avoid aspiration of air [18].

Ionized calcium was measured from the heparinized blood sample using an ion-selective electrode (Stat Profile Prime blood gas analyzer, NOVA Biomedical GmbH, Mörfelden-Walldorf, Germany). The first measurement of iCa was taken directly from the anaerobic heparinized vacutainer (iCa_H1) followed by a second measurement from a sodium heparin-coated capillary (Hirschmann Laborgeräte GmbH and Co. KG, Eberstadt, Germany) filled with blood from the same vacutainer to achieve double heparinization

(iCa_H2). The latter procedure was intended to test the impact of the heparinization protocol on the concentration of ionized calcium. Repeatability between subsequent measurements of iCa from the vacutainer had a coefficient of variation (CV) of 0.61%. Furthermore, the Stat Profile Prime blood gas analyzer simultaneously measured pH, pCO₂, pO₂, hematocrit, sodium, potassium, chloride, glucose, and lactate. The Stat Profile Prime additionally calculated the normalized calcium (nCa) for a hypothetical pH of 7.4 using the following formula: $\log [iCa]_{7.4} = \log [Ca^{2+}]_x - 0.24 (7.4 - x)$, where x is the measured pH of the sample, $[Ca^{2+}]_x$ is the concentration of ionized calcium in the sample at the measured pH, and $[iCa]_{7.4}$ is the normalized concentration of ionized calcium at pH 7.4.

Table 1. Diet ingredients and chemical composition of partial mixed ration (PMR) fed to dairy cows antepartum and postpartum, as well as of concentrates supplied by the automatic milking system postpartum.

Feed Items (%)	PMR Antepartum	PMR Postpartum	Concentrate A	Concentrate B
Hay	9.9	6.2	0	0
Maize silage	23.4	24.5	0	0
Grass silage	60.4	63.0	0	0
Maize	1.5	1.5	35	33
Wheat	0	0	10	16
Barley	1.5	1.5	0	14.5
Rapeseed meal	1.5	1.5	20	22.5
Soya extraction meal	0	0	9	10
Maize gluten meal	0	0	7	0
Dried molasses	1.3	1.3	6	0
Malt sprouts	0	0	5	0
Biscuit flour	0	0	3	0
Sugar beet vinasse	0	0	2	2.6
Sugar beet pulp	0.2	0.2	1	0
Mineral mix	0.3 ¹	0.3 ¹	0.1 ²	0.1 ²
Calcium carbonate	0	0	1.5	0.9
Sodium carbonate	0	0	0	0.4
Sodium chloride	0	0	0.4	0
Chemical composition (g/kg dry matter) ³				
Dry matter	417	384	901	899
Crude protein	135	149	215	218
Crude fat	30	34	45	46
Starch	137	145	338	315
NDF	448	406	247	265
ADF	270	247	108	112
ADL	27	24	22	24
Calcium	5.7	6.1	8	10
Magnesium	2.3	2.5	7	8
Phosphorous	3.4	3.9	3	3
DCAD (meq/kg)	+253	+285	+60	+88

¹ The mineral mix contained per kg: 44 g calcium carbonate; 19 g sodium chloride; 16 g calcium sodium phosphate; 12 g magnesium oxide; 3 g magnesium sulphate; 400,000 I.U. vitamin A; 65,000 I.U. vitamin D3; 4000 mg vitamin E; 250 mg vitamin C; 80 mg vitamin B1; 40 mg vitamin B2; 20 mg vitamin B6; 200 µg vitamin B12; 5000 mg niacinamide; 80 mg calcium D-pantothenate; 16,600 µg biotin; 16,500 mg choline chloride; 5000 mg zinc, of which 4500 mg was glycine zinc chelate hydrate (solid) and 500 mg was zinc oxide; 5000 mg manganese, of which 1500 mg was glycine-manganese chelate hydrate and 3500 mg was manganese(II) oxide; 1000 mg copper, 750 mg of which was copper(II) glycine chelate hydrate (solid) and 250 mg of which was copper(II) sulphate pentahydrate; 150 mg iodine as calcium iodate, anhydrous, and 15 mg cobalt as coated cobalt(II) carbonate granules; 25 mg selenium, 3 mg of which was selenium yeast from *Saccharomyces cerevisiae* NCYC R397, inactivated, and 22 mg of which was sodium selenite. ² The mineral mix contained per kg: 9000. I.U. vitamin A; 1000 I.U. vitamin D3; 10 mg vitamin E; 13 mg copper(II) sulphate; pentahydrate; 0.75 mg iodine as calcium iodate, anhydrous; 0.15 mg cobalt as coated cobalt(II) carbonate granules; 30 mg manganese as manganese(II) oxide; 45 mg zinc as zinc oxide; and 0.12 mg selenium as sodium selenite. ³ Chemical composition was analyzed in samples of PMR collected at monthly intervals, and each concentrate was collected three times in the experimental period.

After clotting, blood was centrifuged at $1500\times g$ for 10 min (Centrifuge EBA 270, Andreas Hettich GmbH and Co.KG, Tuttlingen, Germany) and serum aliquots were frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further analysis. In serum samples, concentrations of total calcium were determined photometrically at a wavelength of 660 nm [19] using an automatic biochemistry analyzer (Indiko, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). The following serum parameters were also analyzed by the Indiko system using different photometric methods: phosphorus [20], magnesium [21], non-esterified fatty acids (NEFA) [22], β -hydroxybutyric acid (BHB) [23], aspartate aminotransferase [24], glutamate dehydrogenase [25], alkaline phosphatase [26], bilirubin [27], cholesterol [28], blood urea nitrogen [29], creatinine [30], and creatine kinase [24]. The repeatability for total calcium had a CV of 1.37%. Total protein and albumin concentrations were measured from serum via spectral analysis (Catalyst One, IDEXX GmbH, Ludwigsburg, Germany). Albumin and total protein were determined at wavelengths of 650 and 560 nm, respectively.

To describe the changes of calcium over time relative to baseline, individual values from 2 d before calving were set to 100% for each cow and relative values from other days were calculated as percent of baseline.

Statistical analyses were performed using the software SigmaPlot 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany). Correlation between calcium measurements from different methods were estimated using linear correlation analyses. Time-dependent changes in absolute or relative calcium concentrations around parturition were analyzed by two-way repeated measures (RM) ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' post-hoc test. One-way repeated measures ANOVA and Student-Newman-Keuls' test were used to analyze changes in the ratio between ionized and total calcium around parturition. Data of the blood minerals, biochemicals, and enzymes were tested for normality (Shapiro–Wilk test) and equal variance. On passing both tests, data were compared using RM ANOVA; if one of these tests failed, Friedman's RM ANOVA on ranks was used. Tukey test was used for multiple post-hoc comparison.

A multivariable prediction model for iCa was calculated using the generalized linear mixed effect models (SPSS 26, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All serum and whole blood parameters were included in the first model with subsequent stepwise elimination of non-significant parameters. Only significant parameters were kept, and models were compared using the Akaike information criterion. As the first model did not produce satisfactory results, a second multivariable regression model was tested between all serum and whole blood parameters and the ratio of iCa_H1:tCa to examine the influence of different parameters on the proportion of the free form of calcium in total calcium. Using backward elimination, non-significant parameters were excluded from the model as described for the first model.

3. Results

None of the animals included in the study showed clinical signs of illness; in particular, no signs of hypocalcemia, such as ataxia or paresis, reduced feed intake, tachycardia, or cold extremities were observed. Cows with incomplete data were excluded from the data set, i.e., only cows with complete data sets for each time point were included in the analyses. The supporting parameters analyzed from serum or whole blood (pH, $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, hematocrit, sodium, potassium, chloride, glucose, lactate, phosphorus, magnesium, NEFA, BHB, aspartate aminotransferase, glutamate dehydrogenase, alkaline phosphatase, bilirubin, cholesterol, urea, creatinine, and creatine kinase; Table 2) did not indicate disease, except for five cows that had BHB $> 1.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ on single days, indicating mild subclinical ketosis.

The mean values for tCa, iCa_H1, and iCa_H2 were 2.66 ± 0.041 , 1.18 ± 0.009 , and 1.05 ± 0.011 , respectively. When plotting all values from all measurement days, correlations were identified for iCa_H1 and tCa ($r^2 = 0.35$; $p < 0.01$), iCa_H2 and tCa ($r^2 = 0.18$; $p < 0.01$), and iCa_H2 and iCa_H1 ($r^2 = 0.83$; $p < 0.01$). Linear regressions between ionized and total calcium concentrations were estimated as $\text{iCa_H1} = (0.13 \pm 0.020)\text{ tCa} + (0.82 \pm 0.055)\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $\text{iCa_H2} = (0.11 \pm 0.026)\text{ tCa} + (0.76 \pm 0.071)\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,

with all slopes and intercepts being different from zero ($p < 0.01$; Figure 1A,B). Although the slopes and intercepts of the latter two regressions were not different from each other ($p > 0.1$), the regression between iCa_H2 and iCa_H1 ($iCa_H2 = (1.045 \pm 0.053) iCa_H1 - (0.18 \pm 0.063) \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) had an intercept different from zero ($p < 0.01$), indicating that iCa_H2 was systematically underestimating iCa_H1 (Figure 1C). We also determined the linear regression between the different types of measurements with the pH-corrected (i.e., normalized) values of ionized calcium (nCa). Since no clear difference was visible (Figure 1D–F), we decided to use the uncorrected ionized calcium for all further analyses.

Table 2. Non-esterified fatty acids (NEFA), β -hydroxybutyric acid (BHB), aspartate aminotransferase (AST), glutamate dehydrogenase (GLDH), alkaline phosphatase (ALKP), bilirubin (TBIL), cholesterol (Chol), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Crea), creatine kinase (CK), phosphorus (P), magnesium (Mg), total protein (TP), and albumin (Alb) of cows in the period around calving.

Day	NEFA $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	BHB $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	AST $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	GLDH $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	ALKP $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	TBIL $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Chol $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
−2	290 ^b	686	79 ^c	10.1 ^{b,c}	51.9 ^{a,b}	2.84 ^b	2.02 ^{b,c}
0	490 ^a	757	95 ^b	10.7 ^c	53.4 ^a	5.21 ^a	1.70 ^c
2	387 ^{a,b}	800	108 ^{a,b}	13.2 ^{a,b,c}	50.6 ^{a,b}	3.84 ^{a,b}	1.81 ^c
4	479 ^{a,b}	831	111 ^a	17.2 ^{a,b}	48.1 ^{a,b}	3.84 ^{a,b}	1.99 ^{b,c}
7	448 ^{a,b}	888	112 ^a	22.2 ^a	44.4 ^b	3.69 ^{a,b}	2.44 ^{a,b}
14	411 ^{a,b}	923	101 ^{a,b}	23.9 ^{a,b}	42.7 ^b	3.15 ^b	2.97 ^a
SEM	22.5	31.8	2.6	1.23	1.2	0.177	0.037
<i>p</i> -Value	0.034	0.053	<0.001	<0.001	0.002	0.003	<0.001
Day	BUN, $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	Crea, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CK, $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	P $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	Mg $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	TP $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Alb $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
−2	3.9	101 ^a	146	2.16 ^a	0.98 ^{a,b}	73 ^b	28 ^b
0	3.58	102 ^a	197	1.42 ^b	1.10 ^a	74 ^b	29 ^{a,b}
2	3.5	91 ^{a,b}	194	2.02 ^a	0.95 ^b	73 ^b	28 ^{a,b}
4	3.96	87 ^b	154	2.10 ^a	0.92 ^b	76 ^b	29 ^{a,b}
7	3.89	95 ^{a,b}	138	2.10 ^a	0.97 ^{a,b}	76 ^{a,b}	29 ^{a,b}
14	3.72	78 ^b	150	2.08 ^a	1.05 ^{a,b}	79 ^a	30 ^a
SEM	0.098	1.4	12.6	0.05	0.016	0.6	0.4
<i>p</i> -Value	0.9	<0.001	0.11	<0.001	0.001	<0.001	0.028

Values are means and pooled SEM. a–c values within a row with different superscripts differ significantly at $p < 0.05$.

Because the high intercept and the low r^2 -value for the prediction of iCa_H1 from tCa were not satisfying, a multivariable regression using all further minerals, biochemicals, and enzyme activities was performed with the intention to improve the prediction model. After excluding all non-significant variables, the following equation remained: $iCa_H1 = (0.16 \pm 0.018) tCa \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} - (0.004 \pm 0.0022) Cl^- \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} - (0.28 \pm 0.135) \text{ pH} + (3.3 \pm 1.05) \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r^2 = 0.40$, $p < 0.001$). The similar slopes for tCa (0.16 vs. 0.13) and the only slightly improved r^2 (0.40 vs. 0.35) indicated that predicting iCa_H1 with this more complex equation was only gradually superior to predicting iCa_H1 from tCa alone.

Proceeding from the assumption that other blood biochemicals may complex Ca and thereby affect the ratio of iCa:tCa rather than the absolute values of iCa, we subsequently tested the multivariable regression between the iCa_H1:tCa ratio and all measured blood parameters. After stepwise elimination of non-significant parameters, the ratio of iCa_H1:tCa could be estimated as $iCa_H1:tCa = -(0.058 \pm 0.022) \cdot |NEFA \text{ (mmol}\cdot\text{L}^{-1})| - (0.029 \pm 0.017) \cdot |BHB \text{ (mmol}\cdot\text{L}^{-1})| - (0.039 \pm 0.008) \cdot |\text{cholesterol (mmol}\cdot\text{L}^{-1})| - (0.025 \pm 0.009) \cdot |\text{phosphorous (mmol}\cdot\text{L}^{-1})| + (0.0065 \pm 0.0013) \cdot |\text{albumin (g/L)}| + (0.442 \pm 0.045)$ ($r^2 = 0.58$, $p < 0.001$). Because the positive correlation between iCa_H1:tCa and albumin was not logical, the multivariable correlation was also estimated without consideration of albumin. This resulted in a model with $iCa_H1:tCa = -(0.071 \pm 0.025) \cdot |NEFA \text{ (mmol}\cdot\text{L}^{-1})| - (0.045 \pm 0.019)$

|BHB mmol·L⁻¹)| - (0.033 ± 0.001) |cholesterol (mmol·L⁻¹)| - (0.025 ± 0.001) |phosphorous (mmol·L⁻¹)| + (0.637 ± 0.026) ($r^2 = 0.43, p < 0.001$).

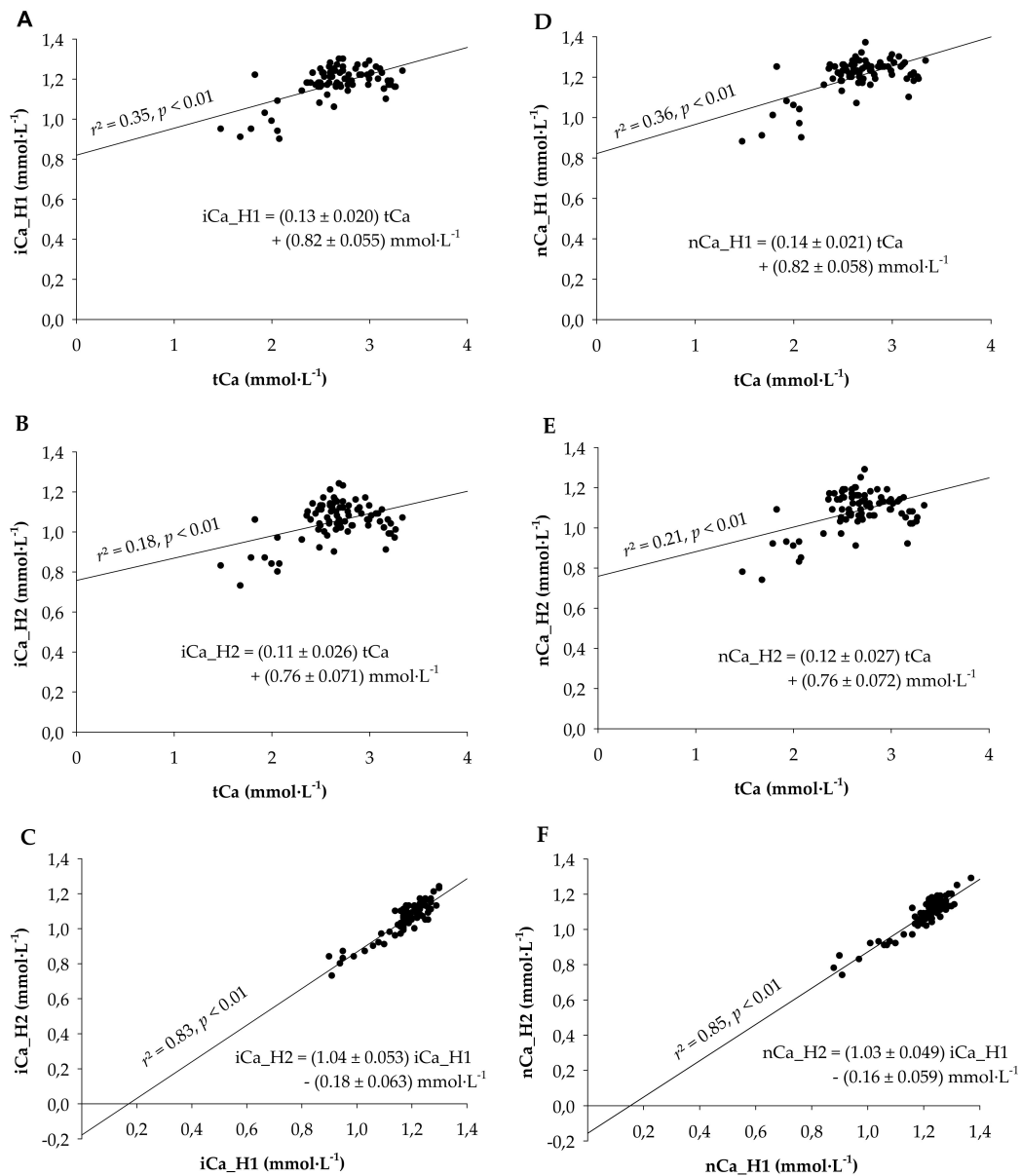


Figure 1. Correlations and regression analyses (A) between plasma ionized calcium measured from a heparinized vacutainer (iCa_H1) and serum total calcium (tCa), (B) between plasma ionized calcium measured from a heparinized capillary filled from a heparinized vacutainer (iCa_H2; double heparinization) and serum total calcium (tCa), and (C) between iCa_H2 and iCa_H1. (D–F) Regression analyses corresponding to graphs A–C where ionized calcium values were replaced by the ionized calcium values normalized to a pH of 7.4. All slopes and intercepts were different from zero ($p < 0.01$). Blood was taken from 14 multiparous Holstein-Frisian cows between -2 and 14 days relative to calving.

To understand the timeline of changes around parturition, mean values for total and ionized calcium were analyzed for each sampling day (Table 3). Two-way RM ANOVA revealed effects of time ($p < 0.01$) and measurement method ($p < 0.01$) with two-way interaction of time \times measurement method ($p < 0.01$). The interaction was based on

generally higher values for tCa > iCa_H1 at all time points and a decrease in calcium concentration at the day of calving, the latter being significant for only tCa ($p < 0.05$). When calculating the ratio iCa_H1:tCa, the mean ratio for iCa_H1:tCa was 0.45 ± 0.002 ; however, the proportion of ionized calcium in total calcium increased sharply at the day of calving ($p < 0.001$) and returned to basal values within 7 d (Table 3).

Table 3. Time- and method-dependent changes in ionized calcium measured from heparinized vacutainer (iCa_H1), total serum calcium (tCa) and the resulting ratio iCa_H1:tCa.

Sampling Day	iCa_H1 (mmol·L ⁻¹)	tCa (mmol·L ⁻¹)	Ratio iCa_H1:tCa
d-2	1.21	2.83 ^a	0.43 ^b
d0	1.07	2.26 ^b	0.48 ^a
d2	1.18	2.65 ^a	0.45 ^{ab}
d4	1.21	2.66 ^a	0.46 ^{ab}
d7	1.21	2.86 ^a	0.43 ^b
d14	1.21	2.83 ^a	0.43 ^b
SEM	0.009	0.041	0.006

Values are least square means (LSM) and pooled standard error of mean (SEM). iCa_H1 = ionized calcium measured from vacutainer, tCa = total serum calcium. Data for iCa_H1 and tCa were affected by time, measurement method, and their two-way interaction ($p < 0.01$, each). The ratio of iCa_H1:tCa was affected by time ($p < 0.01$). a–b different superscripts within one column indicate differences between sampling days at $p < 0.05$. Values for tCa were higher than values for iCa_H1 at all times.

To demonstrate the discrepancy between the time-dependent changes in tCa and iCa_H1 around calving even clearer, the relative changes in tCa (tCa_rel) and iCa_H1 (iCa_H1_rel) were plotted with day -2 before calving as reference (Figure 2). In this model, relative calcium levels were affected by time ($p < 0.01$) with two-way interaction of time × measurement method ($p < 0.05$). The interaction was based on decreases in calcium concentration from day -2 before calving to the day of calving for each measurement method ($p < 0.01$) with recovery to basal values thereafter. However, tCa_rel showed lower relative calcium values than iCa_H1_rel at the day of calving ($p < 0.05$), which was still visible as a trend at day 4 after calving ($p = 0.061$; Figure 2).

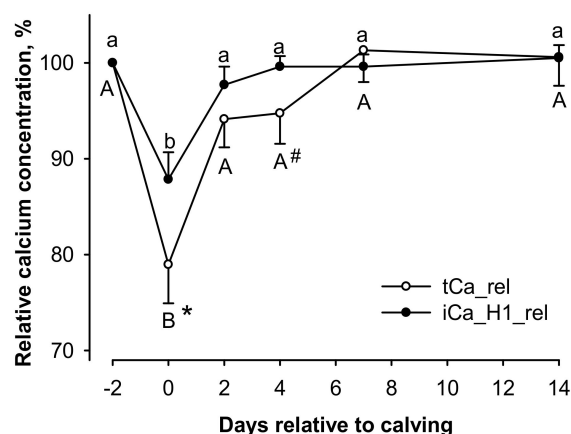


Figure 2. Influence of days in milk on total serum calcium (tCa_rel) and ionized calcium measured from heparinized vacutainer (iCa_H1_rel) relative to the prepartum values at day -2 (100%). Relative values were affected by time ($p < 0.01$) with two-way interaction of time × measurement method ($p < 0.05$). A,B different capital letters and a,b small letters indicate differences for tCa_rel and iCa_H1_rel, respectively ($p < 0.05$, each). #,* hash key and asterisk indicate a trend for difference ($p < 0.1$) and difference to the corresponding value of iCa_H1_rel ($p < 0.05$), respectively.

4. Discussion

A deeper understanding of the calcium dynamics around calving is essential to develop effective prophylactic and therapeutic strategies for hypocalcemia of dairy cows. It has been proposed that iCa provides a more useful and relevant estimate of the calcium gap at calving and helps prevent incorrect prophylactic calcium infusions in treatment regimens of hypocalcemia [31]. This is highly plausible, although clinical benefits and better predictability of disease incidences by diagnostic use of iCa compared to tCa have yet to be proven. To assess the necessity of such research, the present study analyzed the relationship between iCa and tCa, which provides the rationale behind any diagnostic use of those calcium measurements from blood. We also addressed the effect of heparinization on iCa that is rarely considered. Our intention was to describe those effects and relationships without any external bias; hence, the study was performed on dairy cows that were not subject to any hypocalcemia prevention strategy, oral calcium supplementations, or intravenous calcium infusions.

The value of a precise description of the animal's calcium status around calving is evident. Hypocalcemia implies economic losses, primarily due to secondary diseases and decreased fertility [1,32]. Furthermore, cows suffering from subclinical hypocalcemia require longer time for calf delivery with associated risks for calf health and vitality [33]. Reliable detection of subclinical hypocalcemia could improve prophylactic strategies and increase the willingness to introduce them. This could finally lower economic losses and improve herd health status.

The measurement of tCa is routinely used in the diagnosis of suspected subclinical hypocalcemia in dairy cows [2,34]. Only very few studies used iCa [4,35,36], although iCa is more relevant because it represents the biologically available form of calcium. The present study clearly proves that one cannot simply extrapolate iCa from tCa in the period around calving. The linear correlation model between iCa and tCa did not show any satisfying precision, which is in line with studies from human medicine [6]. The use of normalized calcium did not improve the predictive power. The latter is coherent with a similar study by Yogeshpriya et al. where the uncorrected iCa was identified as a more valid and precise marker for calcium homeostasis than nCa [37]. Normalized calcium was thus not considered any further in the present study.

The unsatisfactory precision when predicting iCa from tCa alone originated from different degrees of decrease in tCa and iCa at the day of calving. Previous studies mentioned similar effects and suggested other factors influencing the proportion between iCa and tCa [17,38]. Therefore, we further analyzed a great portfolio of other ions, biochemicals, enzymes, gases, and pH in blood to perform a multivariable correlation analysis. However, the only two other factors that showed significant relationship to iCa (except for tCa) were plasma chloride concentration and pH. Unfortunately, the inclusion of these two variables into a multivariable regression model provided only slight improvement when estimating iCa from tCa, which makes their usability equally questionable as the simple linear model. Moreover, because pH always requires measurement from fresh blood with similar or identical equipment as used for iCa, there is not really an argument for improving the estimate of iCa from serum tCa by correction for pH. Instead of using fresh blood to analyze pH for indirect estimation of iCa, it would be more appropriate to use an anaerobically taken sample immediately for direct measurement of iCa [11,39].

As the lack of precision of the multivariable estimation of iCa from a portfolio of other blood values was rather disappointing, we hypothesized that other blood minerals and biochemicals may not impact on iCa directly but rather impact on the ratio of iCa:tCa. Therefore, we additionally calculated the multivariable regression between iCa:tCa and all measured blood parameters. This model identified several parameters with plausible influences on the amount of biologically available iCa. Among these were NEFA and BHB, which are anions that are able to bind calcium. Especially, long chain fatty acids can complex Ca into Ca soaps [40], which subsequently decreases the fraction of iCa within tCa. High values of NEFA and BHB are signs of a negative energy balance that increase

the risk for secondary diseases like retained placenta [41,42] and milk fever [43]. A novel finding of the present study was that the increased incidence of milk fever after parturition may be partly caused by complexing of plasma calcium by the high levels of BHB and NEFA as suggested by the negative correlation of iCa:tCa with NEFA and BHB.

We further identified negative correlation between iCa:tCa and serum phosphorous. The influence of phosphorus at the level of ionized calcium became visible immediately after calving in the present study. Serum phosphorus concentration dropped sharply, whereas the proportion of ionized calcium showed a significant increase. This is a very interesting finding considering that decreases in serum concentrations of tCa and phosphorus often concur after parturition and are also typical for experimentally induced hypocalcemia [44,45]. The present study suggests that, despite being unfavorable for the cow as such, the decrease in serum phosphorus concentration after parturition helps ameliorating the effects of hypocalcemia due to increases in the fraction of iCa within tCa.

The negative relationship observed between iCa:tCa and serum cholesterol has less obvious explanations. Nonetheless, it is known that cholesterol often co-localizes with Ca-trapping mechanisms, e.g., in human atherosclerosis [46] which makes the negative relationship between iCa:tCa and serum cholesterol, at least, functionally plausible. Serum cholesterol concentration shows great changes around parturition [47] and was proposed to be a good predictor of energy balance status during early lactation [48].

Finally, the positive relationship between the amount of ionized calcium and albumin was unexpected and the only implausible relationship in this model. Almost 50% of calcium is bound to protein, especially albumin [6]. Therefore, higher serum protein levels should decrease the proportion of iCa within tCa, meaning that a negative correlation would have been expected between iCa:tCa and serum albumin. One possible explanation for the observed positive correlation may be that the correlation between ionized calcium and albumin is known to vary greatly between individual cows [49].

Proceeding from the assumption that the observed positive correlation between iCa:tCa and serum albumin was based on artifact, we tested how the multivariable model for iCa:tCa estimation would perform without serum albumin. Unfortunately, the omission of albumin decreased the precision of prediction to $r^2 = 0.43$, which was worse than with inclusion of albumin but better than all other models tested. From this, it may be deduced that iCa may be estimated as $iCa = (0.637 - 0.0714 \cdot |NEFA (mmol \cdot L^{-1})| - 0.0452 \cdot |BHB (mmol \cdot L^{-1})| - 0.0332 \cdot |cholesterol (mmol \cdot L^{-1})| - 0.0253 \cdot |phosphorous (mmol \cdot L^{-1})|) \cdot tCa$ if direct measurement of iCa is not possible under field conditions. However, as the accuracy of the above estimate is still very limited, it needs to be concluded that there is currently no reliable substitute for direct measurement of iCa. Direct measurement of iCa is more demanding because a fresh whole blood sample needs to be sampled in an air-tight container to maintain blood pH and special, preferably on-site equipment with ion-sensitive electrodes is required. Nonetheless, the present study demonstrates that further research needs to take that effort to explore the expectable benefits of iCa for hypocalcemia diagnosis.

A final point for consideration is that blood preservation affects iCa. Whole blood samples are usually collected into containers with anticoagulants like EDTA or heparin [50–52]. EDTA, citrate, and oxalate should be avoided as they effectively chelate calcium [50]. Thus heparin is the anticoagulant of choice for samples dedicated for iCa measurements. However, heparin also binds small amounts of calcium, which is usually not appreciated in routine analysis [53,54]. To demonstrate the partial calcium chelation by heparin [55], we used a double heparinization approach with conventionally available consumables for such measurements. This approach showed a very high correlation of simple and double-heparinization results; however, a significant intercept of $-0.18 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ largely corresponded to the difference in the mean values of iCa_H1 and iCa_H2 ($0.13 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$). It indicated that the second heparinization step systematically reduced iCa by $\sim 0.13 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, which is $\sim 11\%$ of the mean iCa. In order to define reference

ranges and to reliably evaluate results, it is thus necessary to use blood sampling methods with standardized heparinization.

5. Conclusions

Hypocalcemia is a widespread disease in postpartum dairy cows. The present study demonstrates that the proportion of iCa within tCa varies greatly in the critical period around parturition, thus hindering precise estimation of iCa from tCa. Although we demonstrate here that the estimate of iCa from tCa can be improved by implementing NEFA, BHB, cholesterol, and phosphorous in the prediction formula, the precision of the estimate is still far from satisfactory. This implies that direct measurement of iCa cannot really be replaced by other approaches. Therefore, we recommend to thoroughly assess the possible benefits of using iCa in future diagnosis of postpartum hypocalcaemia. Since iCa reflects the biologically available form, it is expected that iCa would be a better predictor of postpartum disease probability than tCa. An extended database on iCa dynamics around calving is desirable for a better understanding of hypocalcemia and milk fever, including their prevention and treatment.

Author Contributions: Conceptualization, D.O., K.T.S., and J.R.A.; methodology, D.O. and K.T.S.; validation, K.T.S. and J.R.A.; formal analysis, D.O. and K.T.S.; investigation, D.O.; resources, K.T.S.; data curation, D.O.; writing—original draft preparation, D.O.; writing—review and editing, all authors; visualization, D.O.; supervision, J.R.A.; project administration, K.T.S. and J.R.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was partially funded by PerformaNat GmbH, Berlin.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board of the District Government of Oberbayern (study ID, ROB-55.2-2532.Vet_03-18-35).

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Conflicts of Interest: K.T.S. and D.O. were employed at PerformaNat GmbH, Berlin, a company focusing on feed additives. J.R.A. is co-author of patent WO2014020067A1 that partly relates to calcium homeostasis in ruminants. These facts had no influence on the content of this manuscript.

References

1. Martinez, N.; Risco, C.A.; Lima, F.S.; Bisinotto, R.S.; Greco, L.F.; Ribeiro, E.S.; Maunsell, F.; Galvão, K.; Santos, J.E.P. Evaluation of Periparturient Calcium Status, Energetic Profile, and Neutrophil Function in Dairy Cows at Low or High Risk of Developing Uterine Disease. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 7158–7172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Goff, J.P. The Monitoring, Prevention, and Treatment of Milk Fever and Subclinical Hypocalcemia in Dairy Cows. *Vet. J.* **2008**, *176*, 50–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ballantine, H.T.; Herbein, J.H. Potentiometric Determination of Ionized and Total Calcium in Blood Plasma of Holstein and Jersey Cows. *J. Dairy Sci.* **1991**, *74*, 446–449. [[CrossRef](#)]
4. Neves, R.C.; Leno, B.M.; Stokol, T.; Overton, T.R.; McArt, J.A.A. Risk Factors Associated with Postpartum Subclinical Hypocalcemia in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 3796–3804. [[CrossRef](#)]
5. Venjakob, P.L.; Borchardt, S.; Heuwieser, W. Hypocalcemia—Cow-Level Prevalence and Preventive Strategies in German Dairy Herds. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 9258–9266. [[CrossRef](#)]
6. Onifade, K.U.; Mohammad, A.A.; Petersen, J.R.; Okorodudu, A.O. Ionized Calcium: Indications and Advantages of Its Measurement. *Lab. Med.* **2005**, *29*, 235–240. [[CrossRef](#)]
7. Forman, D.T.; Lorenzo, L. Ionized Calcium: Its Significance and Clinical Usefulness. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **1991**, *21*, 297–304.
8. Reinhardt, T.A.; Lippolis, J.D.; McCluskey, B.J.; Goff, J.P.; Horst, R.L. Prevalence of Subclinical Hypocalcemia in Dairy Herds. *Vet. J.* **2011**, *188*, 122–124. [[CrossRef](#)]
9. Caixeta, L.S.; Ospina, P.A.; Capel, M.B.; Nydam, D.V. The Association of Subclinical Hypocalcemia, Negative Energy Balance and Disease with Bodyweight Change during the First 30 Days Post-Partum in Dairy Cows Milked with Automatic Milking Systems. *Vet. J.* **2015**, *204*, 150–156. [[CrossRef](#)]
10. Robertson, W.G.; Marshall, R.W.; Bowers, G.N. Ionized Calcium in Body Fluids. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **1981**, *15*, 85–125. [[CrossRef](#)]

11. Boink, A.B.T.J.; Buckley, B.M.; Christiansen, T.F.; Covington, A.K.; Maas, A.H.J.; Müller-Plathe, O.; Sachs, C.; Siggaard-Andersen, O. IFCC Recommendation on Sampling, Transport and Storage for the Determination of the Concentration of Ionized Calcium in Whole Blood, Plasma and Serum. *J. Autom. Chem.* **1991**, *13*, 235–239. [[CrossRef](#)]
12. Moritz, A.; Kraft, W.; Dürr, U.M. (Eds.) *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. In *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*; Schattauer: Stuttgart, Germany, 2014; pp. 327–329. ISBN 978-3-7945-6411-8.
13. Agnes, F.; Sartorelli, P.; Bisso, M.C.; Dominoni, S. Ionized Calcium in Calf Serum: Relation to Total Serum Calcium, Albumin, Total Protein and PH. *J. Vet. Med. Ser. A* **1993**, *40*, 605–608. [[CrossRef](#)]
14. Constable, P.; Trefz, F.M.; Stämpfli, H. Effects of PH and the Plasma or Serum Concentrations of Total Calcium, Chloride, Magnesium, L-lactate, and Albumin on the Plasma Ionized Calcium Concentration in Calves. *J. Vet. Intern. Med.* **2019**, *33*, 1822–1832. [[CrossRef](#)]
15. Danner, J.; Ridgway, M.D.; Rubin, S.I.; Le Boedec, K. Development of a Multivariate Predictive Model to Estimate Ionized Calcium Concentration from Serum Biochemical Profile Results in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **2017**, *31*, 1392–1402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kuart, C.; Larsson, L. Studies on Ionized Calcium in Serum and Plasma from Normal Cows. Its Relation to Total Serum Calcium and the Effects of Sample Storing. *Acta Vet. Scand.* **1978**, *19*, 487–496. [[CrossRef](#)]
17. Joyce, P.W.; Sanchez, W.K.; Goff, J.P. Effect of Anionic Salts in Prepartum Diets Based on Alfalfa. *J. Dairy Sci.* **1997**, *80*, 2866–2875. [[CrossRef](#)]
18. Tinkler, S.H.; Couëtill, L.L.; Constable, P.D. Effect of Sample Handling and Storage Time on the Stability of Total CO₂ in Equine Plasma: Stability of Total CO₂ in Equine Plasma. *Equine Vet. J.* **2012**, *44*, 57–61. [[CrossRef](#)]
19. Janssen, J.W.; Helbing, A.R. Arsenazo III: An Improvement of the Routine Calcium Determination in Serum. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. J. Forum Eur. Clin. Chem. Soc.* **1991**, *29*, 197–201.
20. Daly, J.A.; Ertingshausen, G. Direct Method for Determining Inorganic Phosphate in Serum with the “CentrifChem”. *Clin. Chem.* **1972**, *18*, 263–265. [[CrossRef](#)]
21. Baginski, E.; Marie, S.; Karcher, R.; Zak, B. Magnesium in Biological Fluids (Provisional). In *Selected Methods of Clinical Chemistry*; American Association for Clinical Chemistry: Washington, DC, USA, 1982; Volume 9, pp. 277–281.
22. Aufenanger, J.; Kattermann, R. *Klinisch-Chemische Meßgröße: Freie Fettsäuren (FFS)*; Greiling, H., Grefner, A., Eds.; Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie; Schattauer: Stuttgart, Germany, 1995; pp. 319–320.
23. Li, P.K.; Lee, J.T.; MacGillivray, M.H.; Schaefer, P.A. Direct, Fixed-Time Kinetic Assays for F3-Hydroxybutyrate and Acetoacetate with a Centrifugal Analyzer or a Computer-Backed Spectrophotometer. *Clin. Chem.* **1980**, *26*, 1713–1717. [[CrossRef](#)]
24. Schumann, G.; Bonora, R.; Ceriotti, F.; Clerc-Renaud, P.; Ferrero, C.A.; Féraud, G.; Franck, P.F.H.; Gella, F.-J.; Hoelzel, W.; Jørgensen, P.J.; et al. IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37 °C. Part 2. Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Concentration of Creatine Kinase. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2002**, *40*. [[CrossRef](#)]
25. Thomas, L. *Clinical Laboratory Diagnostics: Use and Assessment of Clinical Laboratory Results*, 1st ed.; TH-books Verlagsgesellschaft: Frankfurt, Germany, 1998; pp. 86–88.
26. Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology Recommended Methods for the Determination of Four Enzymes in Blood. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* **1974**, *33*, 291–306. [[CrossRef](#)]
27. Tietz, N.W. *Fundamentals of Clinical Chemistry*, 4th ed.; Saunders Company: Philadelphia, PA, USA, 1996; pp. 544–545.
28. Allain, C.C.; Poon, L.S.; Chan, C.S.G.; Richmond, W.; Fu, P.C. Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. *Clin. Chem.* **1974**, *20*, 470–475. [[CrossRef](#)]
29. Jansen, J.M.; Burtis, C.A.; Overton, J.B.; Scott, C.D. Enzymatic Kinetic Rate and End-Point Analyses of Substrate by Use of a GeMSAEC Fast Analyzer. *Clin. Chem.* **1972**, *18*, 829–840. [[CrossRef](#)]
30. Mazzachi, B.C.; Peake, M.J.; Ehrhardt, V. Reference Range and Method Comparison Studies for Enzymatic and Jaffé Creatinine Assays in Plasma and Serum and Early Morning Urine. *Clin. Lab.* **2000**, *46*, 53–55.
31. Wilms, J.; Wang, G.; Doelman, J.; Jacobs, M.; Martín-Tereso, J. Intravenous Calcium Infusion in a Calving Protocol Disrupts Calcium Homeostasis Compared with an Oral Calcium Supplement. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 6056–6064. [[CrossRef](#)]
32. Rodríguez, E.M.; Aris, A.; Bach, A. Associations between Subclinical Hypocalcemia and Postparturient Diseases in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 7427–7434. [[CrossRef](#)]
33. Goff, J.P.; Horst, R.L. Physiological Changes at Parturition and Their Relationship to Metabolic Disorders. *J. Dairy Sci.* **1997**, *80*, 1260–1268. [[CrossRef](#)]
34. Oetzel, G.K. Parturient Paresis and Hypocalcemia in Ruminant Livestock. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **1988**, *4*, 351–364. [[CrossRef](#)]
35. Szenci, O.; Chew, B.P.; Bajcsy, A.C.; Szabó, P.; Brydl, E. Total and Ionized Calcium in Parturient Dairy Cows and Their Calves. *J. Dairy Sci.* **1994**, *77*, 1100–1105. [[CrossRef](#)]
36. 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.; et al. Effect of Induced Subclinical Hypocalcemia on Physiological Responses and Neutrophil Function in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 874–887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Yogeshpriya, S.; Selvaraj, P.; Ramkumar, P.; Venkatesan, M.; Saravanan, M.; Jayalakshmi, K. Accuracy of Direct vs. Calculated Ionized Calcium in Treatment Planning for Transition Cow Medical Care: A Review of 104 Dairy Cows. *Int. J. Chem. Stud.* **2020**, *8*, 2009–2011. [[CrossRef](#)]

38. Leno, B.M.; Martens, E.M.; Felipe, M.J.B.; Zanzalari, K.P.; Lawrence, J.C.; Overton, T.R. Short Communication: Relationship between Methods for Measurement of Serum Electrolytes and the Relationship between Ionized and Total Calcium and Neutrophil Oxidative Burst Activity in Early Postpartum Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 9285–9293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Carr, C.W. Studies on the Binding of Small Ions in Rotein Solutions with the Use of Membrane Electrodes. II. The Binding of Calcium Ions in Solutions of Bovine Serum Albumin. *Arch. Biochem. Biophys.* **1953**, 147–156. [[CrossRef](#)]
40. Manoni, M.; Di Lorenzo, C.; Ottoboni, M.; Tretola, M.; Pinotti, L. Comparative Proteomics of Milk Fat Globule Membrane (MFGM) Proteome across Species and Lactation Stages and the Potentials of MFGM Fractions in Infant Formula Preparation. *Foods* **2020**, *9*, 1251. [[CrossRef](#)]
41. Leblanc, S. Monitoring Metabolic Health of Dairy Cattle in the Transition Period. *J. Reprod. Dev.* **2010**, *56*, S29–S35. [[CrossRef](#)]
42. Seifi, H.A.; LeBlanc, S.J.; Leslie, K.E.; Duffield, T.F. Metabolic Predictors of Post-Partum Disease and Culling Risk in Dairy Cattle. *Vet. J.* **2011**, *188*, 216–220. [[CrossRef](#)]
43. Melendez, P.; Marin, M.P.; Robles, J.; Rios, C.; Duchens, M.; Archbald, L. Relationship between Serum Nonesterified Fatty Acids at Calving and the Incidence of Periparturient Diseases in Holstein Dairy Cows. *Theriogenology* **2009**, *72*, 826–833. [[CrossRef](#)]
44. Daniel, R.C.W.; Moodie, E.W. Induced Hypocalcaemia in Cows and Sheep. I. Changes in Plasma Inorganic Phosphorus Levels. *Br. Vet. J.* **1979**, *135*, 440–451. [[CrossRef](#)]
45. Mellau, L.S.B.; Jørgensen, R.J.; Enemark, J.M.D. Plasma Calcium, Inorganic Phosphate and Magnesium during Hypocalcaemia Induced by a Standardized EDTA Infusion in Cows. *Acta Vet. Scand.* **2001**, *42*, 251–260. [[CrossRef](#)]
46. You, A.Y.F.; Bergholt, M.S.; St-Pierre, J.-P.; Kit-Anan, W.; Pence, I.J.; Chester, A.H.; Yacoub, M.H.; Bertazzo, S.; Stevens, M.M. Raman Spectroscopy Imaging Reveals Interplay between Atherosclerosis and Medial Calcification in the Human Aorta. *Sci. Adv.* **2017**, *3*, e1701156. [[CrossRef](#)]
47. Hausmann, J.; Deiner, C.; Immig, I.; Pieper, R.; Starke, A.; Aschenbach, J.R. Effects of Combined Supplementation with Plant Bioactive Lipid Compounds and Biotin on Ruminant Fermentation, Body Condition and Energy Metabolism in Transition Dairy Cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2017**, *225*, 27–37. [[CrossRef](#)]
48. Quiroz-Rocha, G.F.; LeBlanc, S.; Duffield, T.; Wood, D.; Leslie, K.E.; Jacobs, R.M. Evaluation of Prepartum Serum Cholesterol and Fatty Acids Concentrations as Predictors of Postpartum Retention of the Placenta in Dairy Cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2009**, *234*, 790–793. [[CrossRef](#)]
49. Stockham, S.L.; Scott, M.A. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. In *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA; Iowa State Press: Ames, IA, USA, 2013; pp. 401–433. ISBN 978-1-118-68607-2.
50. Buckley, B.M.; Russell, L.J. The Measurement of Ionised Calcium in Blood Plasma. *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Biochem. Lab. Med.* **1988**, *25*, 447–465. [[CrossRef](#)]
51. Sachs, C.; Rabouine, P.; Chaneac, M.; Kindermans, C.; Dechaux, M. Anticoagulant-Induced Preanalytical Errors in Ionized Calcium Determination on Blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1989**, *49*, 647–651. [[CrossRef](#)]
52. D’Orazio, P.; Toffaletti, J.G.; Wandrup, J.; National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Ionized Calcium Determinations: Precollection Variables Specimen Choice Collection and Handling Approved Guideline*, 2nd ed.; CLSI Document C31–A2; National Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, PA, USA, 2001; ISBN 978-1-56238-436-4.
53. Biswas, C.K.; Ramos, J.M.; Kerr, D.N.S. Heparin Effect on Ionised Calcium Concentration. *Clin. Chim. Acta* **1981**, *116*, 343–347. [[CrossRef](#)]
54. Jafri, L.; Khan, A.H.; Azeem, S. Ionized Calcium Measurement in Serum and Plasma by Ion Selective Electrodes: Comparison of Measured and Calculated Parameters. *Ind. J. Clin. Biochem.* **2014**, *29*, 327–332. [[CrossRef](#)]
55. Toffaletti, J.G.; Wildermann, R.F. The Effects of Heparin Anticoagulants and FILL Volume in Blood Gas Syringes on Ionized Calcium and Magnesium Measurements. *Clin. Chim. Acta* **2001**, *5*, S0009–S8981. [[CrossRef](#)]

3.2. Blood calcium concentration and performance in periparturient and early lactating dairy cows is influenced by plant bioactive lipid compounds

Veröffentlichung in: *Journal of Dairy Science*, 106. Jg., Nr. 5, S. 3706-3718

Eingereicht am: 07. Juni 2022

Akzeptiert am: 22. November 2022

Erste Veröffentlichung am: 10. März 2023

Autoren: Dorothee Ott, David Manneck, Katharina T. Schrapers, Julia Rosendahl und Jörg R. Aschenbach

DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22387>

Lizenz: CC BY-NC-ND 4.0

Beiträge der Autoren:

Konzeption, D.O., D.M., K.T.S., J.R. und J.R.A.; Methodik, D.O., D. M., J.R. und K.T.S.;

Validierung, D. M, K.T.S. und J.R.A.; formale Analyse, D.O., D. M. und K.T.S.;

Versuchsdurchführung, D.O.; Ressourcen, K.T.S.; Datenkuratierung, D.O. D. M.;

Erstellen des Originalentwurfs des Manuskripts, D.O., D. M.;

Überprüfung und Überarbeitung des Manuskripts, alle Autoren; Visualisierung, D.O. D. M.;

Supervision, J.R.A.; Projektleitung, J.R. and J.R.A.



J. Dairy Sci. 106:3706–3718
<https://doi.org/10.3168/jds.2022-22387>

© 2023, The Authors. Published by Elsevier Inc. and FASS Inc. on behalf of the American Dairy Science Association®.
 This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Blood calcium concentration and performance in periparturient and early lactating dairy cows is influenced by plant bioactive lipid compounds

D. Ott,^{1,2} D. Manneck,² K. T. Schrapers,² J. Rosendahl,² and J. R. Aschenbach^{1*}

¹Institute of Veterinary Physiology, Freie Universität Berlin, D-14163 Berlin, Germany

²PerformaNat GmbH, D-14163 Berlin, Germany

ABSTRACT

Previous studies *ex vivo* suggested that plant bioactive lipid compounds (PBLC) can increase ruminal calcium absorption. Therefore, we hypothesized that PBLC feeding around calving may potentially counteract hypocalcemia and support performance in postpartum dairy cows. The corresponding aim of the study was to investigate the effect of PBLC feeding on blood minerals in Brown Swiss (BS) and hypocalcemia-susceptible Holstein Friesian (HF) cows during the period from d –2 to 28 relative to calving and on milk performance until d 80 of lactation. A total of 29 BS cows and 41 HF cows were divided each into a control (CON) and PBLC treatment group. The latter was supplemented with 1.7 g/d menthol-rich PBLC from 8 d before expected calving to 80 d postpartum. Milk yield and composition, body condition score and blood minerals were measured. Feeding PBLC induced a significant breed × treatment interaction for iCa, supporting that PBLC increased iCa exclusively in HF cows; the increase was 0.03 mM over the whole period and 0.05 mM from d 1 to 3 after calving. Subclinical hypocalcemia was seen in one BS-CON and 8 HF-CON cows and 2 BS-PBLC and 4 HF-PBLC cows. Clinical milk fever was detected only in HF cows (2 HF-CON and one HF-PBLC). Other tested blood minerals, such as sodium, chloride, and potassium, as well as blood glucose, were neither affected by PBLC feeding nor breed, nor were their 2-way interactions, except for higher sodium levels in PBLC cows on d 21. Body condition score showed no effect of treatment, except for a lower body condition score in BS-PBLC compared with BS-CON at d 14. Dietary PBLC increased milk yield, milk fat yield, and milk protein yield at 2 consecutive dairy herd improvement test days. As indicated by treatment × day interactions, energy-corrected milk yield and milk lactose yield were increased by PBLC on the first test day only, and milk

protein concentration decreased from test d 1 to test d 2 in CON only. The concentrations of fat, lactose, and urea, as well as somatic cell count, were not affected by treatment. The weekly milk yield over the first 11 wk of lactation was 29.5 kg/wk higher for PBLC versus CON across breeds. It is concluded that the applied PBLC induced a small but measurable improvement of calcium status in HF cows in the study period and had additional positive effects on milk performance in both breeds.

Key words: calcium absorption, hypocalcemia, transition dairy cow, phytochemical compounds

INTRODUCTION

The requirement for calcium increases abruptly from ~80 mg/kg^{0.75} during late pregnancy to 500 mg/kg^{0.75} at the beginning of lactation (Horst et al., 2005). This massive increase in demand exerts overt challenges on calcium homeostasis that regularly lead to a decrease in blood calcium levels. If severe enough, hypocalcemia can lead to clinical milk fever with signs such as hyperesthesia, anorexia, weakness, or cold extremities and, finally, downer cow syndrome (Oetzel, 1988).

Subclinical hypocalcemia has also health consequences for the cow. It is associated with higher culling rates, poorer fertility and increased probability of suffering from other diseases, such as metritis or ketosis (Houe et al., 2001; Rodríguez et al., 2017; Venjakob et al., 2018). The risk of subclinical hypocalcemia increases from about 6 to 25% during first lactation to 29 to 60% in multiparous cows (Reinhardt et al., 2011; Venjakob et al., 2017). In addition to parity, breed also seems to be a decisive risk factor. An increased susceptibility to hypocalcemia in the Jersey breed (Erb and Grohn, 1988; Lean et al., 2006; Roche and Berry, 2006) could be due to a reduced expression of the receptor for 1,25(OH)₂D₃ in the intestine (Goff et al., 1995). The Holstein Friesian (HF) breed is known for a higher risk of developing hypocalcemia compared with Brown Swiss (BS; Erb and Grohn, 1988; Saborío-Montero et al., 2017), although no difference could be found in vi-

Received June 7, 2022.

Accepted November 22, 2022.

*Corresponding author: joerg.aschenbach@fu-berlin.de

tamin D receptor expression in the intestine of mid- to late-lactation cows (Liesegang et al., 2008).

Various prophylactic treatments have been developed for hypocalcemia, including the provision of calcium compounds in larger amounts (5–125 g of calcium/dose). Surplus calcium is mainly absorbed by passive enteric diffusion, thereby preventing the deficit due to insufficient active absorption (Goff and Horst, 1993; Pehrson et al., 1998; Goff, 2008). The active absorption of calcium in the intestinal tissue occurs mainly through vitamin 1,25(OH)₂D₃-stimulated channels of the transient receptor potential (TRP) family, especially TRPV6 and possibly TRPV5 (den Dekker et al., 2003; van Goor et al., 2017). By contrast, active absorption from the rumen is not sensitive to stimulation by vitamin 1,25(OH)₂D₃ (Schröder et al., 2001; Wilkens et al., 2009) and likely involves TRPA1 and TRPV3 (Rosendahl et al., 2016; Liebe et al., 2020). The latter channels can be activated by various plant bioactive lipid compounds (PBLC). In vitro, an agonistic effect of the PBLC menthol has been demonstrated for TRPA1, TRPV3, and TRPM8 (Macpherson et al., 2006; Bautista et al., 2007; Vogt-Eisele et al., 2007) and validated for the bovine isoform of TRPV3 (Schrappers et al., 2018). Furthermore, an increased absorption of calcium could be detected in isolated ruminal epithelia of sheep ex vivo after luminal addition of menthol (Rosendahl et al., 2016; Geiger et al., 2021). Finally, feeding PBLC enriched with menthol increased blood calcium levels in mid- to late-lactating dairy cows (Braun et al., 2019) with a similar trend in growing sheep (Patra et al., 2019b).

The cited facts led to the hypothesis that feeding a diet containing menthol-rich PBLC may have a positive influence on calcium homeorhesis during the periparturient phase in dairy cows. We further suspected that this benefit may be dependent on the breed's susceptibility to hypocalcemia and may imply positive influences on lactation performance. Therefore, the aim of the present study was to compare the influence of a commercial mix of menthol-rich PBLC on blood calcium level and lactation performance among the high-performing HF breed, which is highly susceptible to hypocalcemia, and the BS breed, which has a lower milk yield and is less prone to hypocalcemia.

MATERIALS AND METHODS

Animals, Diets, and Feeding

The experiment was conducted on a dairy farm in Bavaria in compliance with the German legislation on the welfare of experimental animals and with the approval of the District Government of Upper Bavaria (Refer-

ence number: ROB-55.2–2532.Vet_03–18–35). The trial began in July 2018 and ran until January 2020. Due to breakdown of the milking robot, the trial had to be interrupted for 3 mo, which divided the experiment into 2 runs. The farm housed ~110 cows. The experiment was performed with cows of multiple parity from the BS (29 animals) and HF breeds (41 animals) in a randomized block design. The cows of each breed were divided into a PBLC-treated group and an untreated control (CON) group by lactation number, calving date (to exclude seasonal effects) and the 305-d milk yield of the previous lactation. Final group sizes were 14 BS-CON, 15 BS-PBLC, 23 HF-CON, and 18 HF-PBLC. Sample size estimation proceeded from the intention to detect a 0.12 mM difference of iCa between treatments upon an assumed standard deviation of 0.22 mM. Each cow entered the trial 8 d before the expected calving date and remained in the trial until 80 d postpartum.

Cows received a TMR antepartum ad libitum (Table 1). A partial mixed ration (PMR) was provided ad libitum postpartum together with 2 different types of concentrated feed supplied by the milking robot as follows: concentrate A increased linearly from 2 to 4 kg/d from d 1 to 15 and remained at 4 kg/d until d 30. Concentrate B was fed at 1 kg/d from d 0 to 30, except for the first run where it increased linearly from 1 to 3 kg/d from d 16 to 30. After d 30, concentrate allocation followed a farm-specific scheme, supplying a total of 0.5 to 10 kg/d of concentrate A and B per cow according to milk yield. The composition and chemical analysis of the feed components can be found in Table 1.

The cows were moved from a barn area with all-season pasture to a separate straw-bedded box 8 d before the calculated calving date. From this time on, each cow in the PBLC group received a commercial PBLC mixture (100 g/d of BTX14; PerformaNat GmbH), containing ground corn cobs mixed with 1.7 g of a PBLC mixture of propylene glycol as carrier and monoterpenes with menthol as the lead compound. To increase the acceptance of the additive, especially during the prepartum phase, 150 g of brewer's yeast was added per day which was also fed to the CON group. Correct dosing during the prepartum period until 2 d after calving was ensured by manual allocation once a day separately from TMR; cows were fixed in a feeding fence during this time and released after intake of the additive. On the third day after parturition, cows were moved to a freestall barn. The barn was divided into 2 areas, which were served by a central double box milking robot (Boumatic Robotics GmbH). The 2 barn areas and the 2 automatic milking systems were equally accessible to all cows. During automatic milking, the concentrated feed mix containing the brewer's yeast was allocated via a dosing unit to each cow. A

Table 1. Feed ingredients and chemical composition of diets fed prepartum and postpartum; the concentrated feed was administered postpartum via the automatic milking system

Item	TMR prepartum	Partial mixed ration postpartum	Concentrate A	Concentrate B
Ingredient (% of DM)				
Hay	19.5	11.0	0	0
Maize silage	21.4	23.7	0	0
Grass silage	34.4	38.0	0	0
Maize	4.3	4.8	35	33
Wheat	0	0	10	16
Barley	4.3	4.8	0	14.5
Rapeseed meal	5.8	6.4	20	22.5
Soy extraction meal	0	0	9	10
Maize gluten meal	0	0	7	0
Dried molasses	3.8	4.1	6	0
Malt sprouts ¹	0	0	5	0
Biscuit flour	0	0	3	0
Sugar beet vinasse	0	0	2	2.6
Sugar beet pulp	5.3	5.9	1	0
Mineral mix	1.2 ²	1.3 ²	0.1 ³	0.1 ³
Calcium carbonate	0	0	1.5	0.9
Sodium carbonate	0	0	0	0.4
Sodium chloride	0	0	0.4	0
Chemical composition (g/kg DM)				
DM	401.7	380.7	899.7	901.2
Crude ash	81.1	82.2	76.2	79.6
Crude fiber	235.8	218.7	79.2	72.4
CP	143.6	150.6	211.5	209.8
Crude fat	31.9	33.9	54.3	45.0
Starch	145.4	156.7	323.2	340.0
Sugar	29.3	30.6	73.2	58.8
aNDFom ⁴	432.3	402.8	261.0	248.4
ADFom ⁴	260.2	241.9	113.2	106.4
ADL	28.3	25.4	18.5	23.2
Calcium	6.08	6.40	9.87	8.42
Magnesium	2.48	2.63	2.97	2.86
Phosphorus	3.68	3.98	7.22	7.14
DCAD (mEq/kg)	+238	+248	+72	+70

¹In the second run, malt sprouts were replaced by 2.5% dextrose and 2.5% palm oil.

²The mineral mix contained (per kg): 44 g of calcium carbonate, 19 g of sodium chloride, 16 g of calcium sodium phosphate, 12 g of magnesium oxide, 3 g of magnesium sulfate, 400,000 IU of vitamin A, 65,000 IU of vitamin D₃, 4,000 mg of vitamin E, 250 mg of vitamin C, 80 mg of vitamin B₁, 40 mg of vitamin B₂, 20 mg of vitamin B₆, 200 µg of vitamin of B₁₂, 5,000 mg of niacinamide, 80 mg of calcium D-pantothenate, 16,600 µg of biotin, 16,500 mg of choline chloride, 5,000 mg of zinc [4,500 mg as solid glycine zinc chelate hydrate (solid) and 500 mg as zinc oxide], 5,000 mg of manganese [1,500 mg as glycine-manganese chelate hydrate and 3,500 mg as manganese(II)-oxide], 1,000 mg of copper [750 mg as copper(II) glycine chelate hydrate (solid) and 250 mg as copper(II) sulfate pentahydrate], 150 mg of iodine as calcium iodate (anhydrous), 15 mg of cobalt as coated cobalt(II) carbonate granules, 25 mg of selenium [3 mg as selenium yeast from *Saccharomyces cerevisiae* NCYC R397 (inactivated) and 22 mg as sodium selenite].

³The mineral mix contained (per kg): 9,000 IU of vitamin A, 1,000 IU of vitamin D₃, 10 mg of vitamin E, 13 mg of copper-(II)-sulfate, pentahydrate, 0.75 mg of iodine as calcium iodate (anhydrous), 0.15 mg of cobalt as coated cobalt(II) carbonate granules, 30 mg of manganese as manganese(II)-oxide, 45 mg of zinc as zinc oxide, and 0.12 mg of selenium as sodium selenite.

⁴aNDFom = neutral detergent fiber corrected for residual ash and analyzed with amylase; ADFom = acid detergent fiber corrected for residual ash.

second dosing unit added the PBLC premix to cows of the treatment group. The daily allocation of the PBLC additive was distributed over 2 or more robot visits, taking care to ensure complete eating under consideration of individual milking frequency. Based on the design of the study with manual allocation of the PBLC-containing concentrate before calving, no effective blinding was possible during the study.

Animal health was checked daily by visual inspection and through data evaluation of the milking robot. In case of a disease, the cow was treated by a veterinarian and the incident was recorded. Calcium infusion was administered to downer cows with clinical hypocalcemia that was classified if the cow was unable to stand up and the ionized calcium (iCa) value was ≤ 0.8 mM. Subclinical hypocalcemia was assumed if the iCa

value was ≤ 1.0 mM (Oetzel et al., 1988; Martinez et al., 2018). During the whole trial, 3 HF cows developed milk fever with recumbency (1 cow fed PBLC, 2 cows fed CON). These cows were removed from further analyses, because serum calcium concentration as the key target variable was modified by calcium infusions.

Blood Sampling and Analyses

Blood samples were targeted for d -2 before calving and d 1, 3, 5, 7, 14, 21, and 28 after calving. For practical reasons, sampling was always performed on Mondays, Wednesdays, and Fridays between 1300 and 1500 h, implying a variation in sampling day by ± 1 d and, in less than 2% of samples, by ± 2 d. Blood samples were taken from coccygeal vessels using a 9-mL lithium-heparin vacutainer (Vacuette, Greiner Bio-One GmbH) and were processed within 30 min. Sodium, potassium, chloride, and iCa were analyzed with ion-selective electrodes and glucose was determined by the glucose oxidase test (Stat Profile Prime blood gas analyzer, NOVA Biomedical GmbH).

Body Condition Score

Body condition score was determined on each sampling day according to Edmonson et al. (1989); BCS was visually evaluated always by the same person. Assessment was performed using the following anatomical locations: the thoracic and spinal regions (chin, loin, and trunk), the ribs, spinous processes (loin), tuber sacrale (hip or hook bones), tuber ischii (pin bones), anterior coccygeal vertebrae (tail head), and femoral regions. The classification was based on a scale of 0 (highly emaciated) to 5 (very fat) with increments of 0.5.

Milk Yield and Milk Composition

The total daily milk yield of each cow was recorded by the software of the milking robot. The milk components fat, CP, lactose, urea and somatic cell count were determined by the monthly DHI testing (Milchprüfung, Wolnzach, Germany). Fat, CP, lactose, and urea were measured by infrared spectrophotometry (MilkoScan 7 RM, FOSS GmbH), whereas SCC was determined by flow cytometry (Fossomatic 7 and Fossomatic FC, FOSS GmbH). To calculate the ECM on measurement days, the 7-d median milk yield was used and extrapolated to 40 g/kg fat and 34 g/kg CP according to the formula of German herd testing organizations (Landwirtschaftliche Kommunikations- und Servicegesellschaft mbH, LKV): $\text{ECM (kg/d)} = \text{milk yield (kg/d)} \times [0.038 \times \text{fat (g/kg)} + 0.021 \times \text{protein (g/kg)} + 1.05]/3.28$.

Feed Analysis

Samples of TMR and PMR were taken every month and analyzed for feed components. Feed concentrates were sampled from each batch and analyzed as one combined sample per concentrate. The chemical composition of feed was determined by an external laboratory (Landwirtschaftliche Kommunikations- und Servicegesellschaft mbH, Niederwiesa, Germany) according to standard protocols (Naumann et al., 2004). The DM was determined in a drying cabinet (UF55, Memmert GmbH + Co. KG; VDLUFA MB III 3.1). Crude fiber, CP, crude fat, crude ash, starch, sugar, NDF after amylase treatment and exclusive of residual ash (**aNDFom**), ADF after ashing (**ADFom**), and ADL were measured by near infrared spectroscopy (VDLUFA MB III 31.2 and 31.3). Calcium, phosphorus, and magnesium were determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-OES; DIN EN ISO 11885:2009–09).

Statistical Analysis

The statistical evaluation of the randomized block design was performed with the software SPSS Statistics 26 (SPSS Inc.) using the MIXED procedure with cow as the experimental unit. During data analysis, group allocation was blinded. Data were tested for normal distribution and homogeneity of variances and, in the case of potassium, a Box-Cox transformation was performed to achieve normality and homogeneity criteria (Box and Cox, 1964). Potassium values were then back transformed for data summary and presentation. Exclusion criteria for further analysis were the administration of calcium infusion and severe disease such as *Escherichia coli* mastitis, PBLC feeding for less than 3 d antepartum due to premature calving, as well as missing milk data caused by the interruption due to the milking robot breakdown. The statistical model for repeated measurements with day as repeated effect included breed, treatment, and day as fixed factors, parity as block (2, 3, ≥ 4), the last 305-d milk yield as block and BCS, as well as all 2- and 3-way interactions between breed, treatment, and day as fixed factors. Cow nested within treatment and run were included in the model as random factors. Because hypocalcemia is essentially relevant in the early postpartum period, iCa in blood was additionally compared between treated and untreated cows for the critical period from d 1 to 3 after calving. For DHI data, 2 tests were included in the analysis. The first test included all cows in the period from d 4 to 40, and the second test from d 41 to 72 postpartum. The 2 tests were analyzed as repeated measures and are given as least squares means over the

whole period from 4 to 72 d. Daily milk yields were summed to weekly yields and evaluated until wk 11 after calving. The covariance structure was selected according to the smallest information criterion of Bayes. To determine the approximate denominator degrees of freedom for the *F*-tests in the models, the Satterthwaite method was used. For post hoc tests, a Bonferroni adjustment was chosen, and statistical significance was assumed at *P* < 0.05. Data are given as least squares means and standard error of the mean.

RESULTS

Whole Blood Concentrations of Minerals and Glucose

During the PBLC feeding period, blood values were monitored from d -2 to 28 relative to calving. Feeding a ration with PBLC induced a significant breed × treatment interaction for iCa (*P* = 0.038). Follow-up of the interaction with Bonferroni post hoc test evidenced a positive effect of PBLC treatment on iCa in HF cows only (*P* = 0.015) whereas iCa of BS cows was not affected by treatment (*P* = 0.51) and not different to that of HF-CON cows (Table 2). Additionally, an effect of day was found with iCa being lower at d 1 compared with all other days (*P* < 0.001; Figure 1). When comparing CON versus PBLC for the critical period d 1 to 3 after calving, iCa values were different only for HF cows (1.14 vs. 1.19 mM; *P* = 0.046) but not for BS cows (1.13 vs. 1.12 mM; *P* = 0.97).

Other tested blood minerals, such as sodium, chloride, and potassium, as well as blood glucose, were affected by neither PBLC feeding nor breed, nor their 2-way interaction (*P* ≥ 0.05). However, an effect of day was observed for all of them (*P* < 0.05). In addition, a significant interaction of treatment × day was found for sodium where sodium levels were increased by PBLC treatment exclusively on d 21 (*P* = 0.018).

Calcium Status

Of the 70 animals examined (14 BS-CON, 15 BS-PBLC, 23 HF-CON, and 18 HF-PBLC), 15 animals developed subclinical hypocalcemia (21.4%). This affected one BS-CON (7.1%), 2 BS-PBLC (13.3%), 8 HF-CON (34.8%), and 4 HF-PBLC cows (22.2%). Clinical milk fever was detected only in HF cows [2 HF-CON (8.7%); one HF-PBLC (5.6%)].

Body Condition Score

Body condition evaluated on each sampling day showed differences among breeds, with BS hav-

Table 2. Effect of feeding plant bioactive lipid compounds (PBLC) on concentrations of selected minerals [ionized calcium (iCa), sodium, chloride, potassium] and glucose in whole blood, as well as BCS in Holstein Friesian and Brown Swiss dairy cows^{1,2}

Item	Brown Swiss		Holstein Friesian		SEM ³	B	T	D	<i>P</i> -value ⁴			
	CON (n = 14)	PBLC (n = 15)	CON (n = 21)	PBLC (n = 17)					B × T	B × D	T × D	B × T × D
iCa (mM)	1.19 ^b	1.19 ^b	1.19 ^b	1.22 ^a	0.01	0.073	0.26	<0.001	0.038	0.20	0.90	0.86
Na (mM)	140.9	140.8	140.4	140.9	0.35	0.39	0.38	<0.001	0.26	0.74	0.042	0.67
Cl (mM)	106.7	107.0	106.9	106.9	0.39	0.84	0.59	<0.001	0.66	0.21	0.80	0.24
K (mM)	4.52	4.45	4.38	4.44	0.05	0.10	0.94	0.014	0.16	0.24	0.47	0.071
Glucose (mM)	3.15	3.18	3.11	3.10	0.08	0.40	0.87	<0.001	0.77	0.99	0.83	0.26
BCS	3.47	3.29	3.10	3.20	0.08	0.01	0.58	<0.001	0.083	<0.001	0.85	0.047

^{a,b}Different letters indicate significant (*P* < 0.05) differences among groups.

¹Feeding cows with the PBLC additive started 3 to 8 d before calving. Whole blood samples were measured on d -2, 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28 (±1) relative to calving.

²CON = control without PBLC.

³Pooled SEM.

⁴B = breed; T = treatment; D = test day.

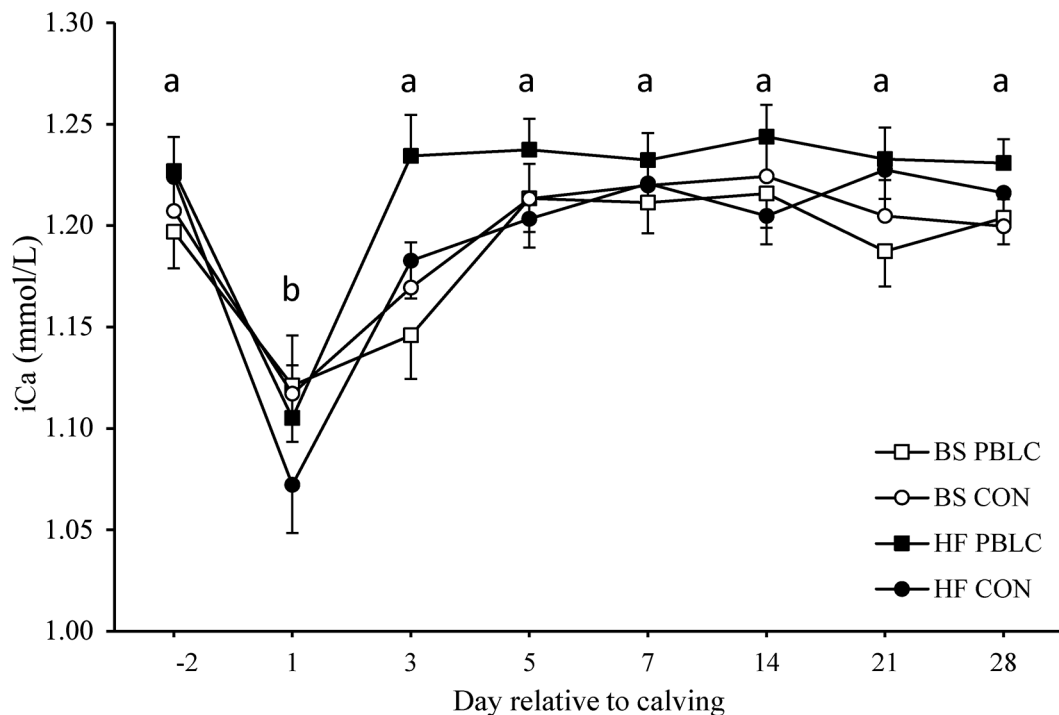


Figure 1. Concentration of ionized calcium (iCa) in whole blood of Holstein Friesian (HF) or Brown Swiss (BS) cows fed a standard ration without (CON) or with additional plant bioactive lipid compounds (PBLC) around calving. Error bars represent SEM. *P*-values are listed in Table 2. Different letters (a, b) indicate that data differ ($P < 0.05$) on different days across groups.

ing higher scores than HF (3.38 vs. 3.15 ± 0.066 ; $P = 0.011$) but no effect of treatment (3.24 vs. 3.29 ± 0.063 for PBLC vs. CON; $P = 0.58$; Table 2, Figure 2). The effect of day ($P < 0.001$) and the interactions breed \times day ($P < 0.001$) and breed \times treatment \times day ($P = 0.047$) were also significant. Follow-up of these interactions identified that BS had consistently higher BCS than HF from d 1 to 28 within CON ($P < 0.05$), except for d 3 ($P = 0.052$) and d 5 ($P = 0.21$). Within PBLC-fed groups, no difference among breeds was detected. The PBLC-treated BS cows showed a lower BCS only at d 14 compared with CON (3.12 vs. 3.44 ± 0.107 for BS-PBLC vs. BS-CON; $P = 0.031$). Treatment in HF cows did not affect BCS (Figure 2).

Milk Yield and Milk Composition

The dietary treatment with PBLC affected daily milk yield at the 2 DHI test days ($P = 0.006$; Table 3). It also affected all other values related to milk quantity, such as ECM ($P = 0.018$), milk fat yield ($P = 0.049$), milk protein yield ($P = 0.026$), and milk lactose yield ($P = 0.006$), whereas the concentrations of individual milk components (fat, protein, and lactose) were not affected by treatment ($P \geq 0.05$). The average increase by PBLC of milk yield was 4.3 and 5.4 kg/d in BS

and HF cows, respectively, which penetrated to proportionate increases in yields of milk fat and milk protein (Table 3). No treatment effects were found for SCC and urea concentrations of milk.

As expected, milk yield was affected by breed ($P < 0.001$), with HF cows producing on average 11.6 ± 0.90 kg/d more milk compared with the BS cows. This further resulted in breed effects for ECM ($P < 0.001$), milk fat yield ($P < 0.002$), milk protein yield ($P < 0.001$) and milk lactose yield ($P < 0.001$) with distinctly higher values in HF cows, because milk constituent concentrations were not affected by breed except for milk protein concentration (3.49 vs. $3.24 \pm 0.132\%$ in BS vs. HF; $P = 0.002$; Table 3).

Regarding the 2 DHI test days, there were significant differences in fat yield (1.71 vs. 1.58 ± 0.62 kg/d; $P = 0.032$) and fat concentration (4.26 vs. $3.90 \pm 0.16\%$; $P = 0.005$), as well as in urea concentration (218.3 vs. 190.7 ± 23.4 mg/kg at DHI test d 1 vs. 2; $P = 0.030$) across breeds. There was also a significant difference in protein concentration at the 2 DHI test days with a treatment \times test day interaction, pointing to an effect of DHI test day on protein concentration exclusively in CON cows (3.50 vs. 3.29 ± 0.133 at test d 1 vs. 2; $P < 0.001$). A treatment \times test day interaction for ECM showed an increased ECM yield

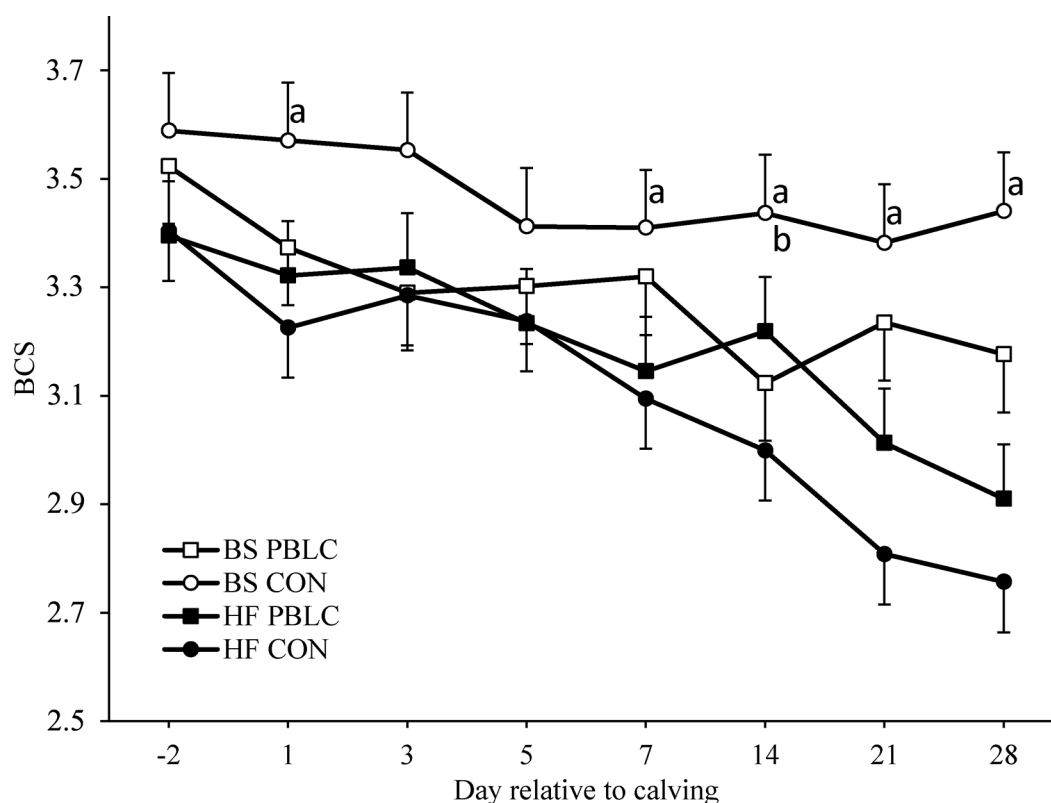


Figure 2. Development of BCS in Holstein Friesian (HF) or Brown Swiss (BS) cows fed a standard ration without (CON) or with additional plant bioactive lipid compounds (PBLC) around calving. Error bars represent SEM. *P*-values are listed in Table 2. The letter a indicates a significant difference between BS-CON and HF-CON ($P < 0.05$), and b indicates a significant difference between BS-CON and BS-PBLC ($P < 0.05$). No significant differences were identified for PBLC versus CON within HF cows or between breeds in PBLC-fed cows. Differences among different days within each group are not shown for reasons of clarity.

as a result of treatment on the first DHI test day (44.6 vs. 38.4 ± 1.46 kg/d, $P = 0.002$) but not on the second DHI test day (41.3 vs. 38.8 ± 1.59 kg/d for PBLC vs. CON; $P = 0.23$). Similarly, a treatment effect on the yield of lactose was also observed only on the first (2.11 vs. 1.80 ± 0.73 kg/d; $P = 0.002$) but not the second DHI test day (2.03 vs. 1.92 ± 0.070 kg/d for PBLC vs. CON; $P = 0.25$).

To exclude the possibility that the difference in DHI-recorded milk yield among PBLC and CON was biased by collection at different days after calving, the weekly milk yield was additionally recorded over the first 11 wk of lactation (Figure 3). Significant effects of breed ($P < 0.001$) and week ($P < 0.001$) with a breed \times week interaction showed that HF cows (321.8 kg/wk) produced on average more milk than BS cows (239.4 ± 12.9 kg/wk). As a result of PBLC treatment, an increase in milk production of 29.5 kg/wk was observed during the measurement period (295.4 vs. 265.9 ± 12.2 kg/wk for PBLC vs. CON; $P = 0.009$) across breeds.

DISCUSSION

With the onset of lactation, dairy cows need large amounts of calcium to support calcium homeorhesis and milk production (Horst et al., 2005; Wilkens et al., 2020). Homeorhesis is the coordinated control of the metabolism of body tissues to support a physiological state. In extension of the homeostatic concept, homeorhesis takes special reference to flexible adaptation and metabolic prioritization to cover changing metabolic needs (Bauman and Bruce Currie, 1980). Given the variety of physiological tasks that require calcium, even small changes in calcium bioavailability can have negative effects on, for example, muscle, endocrine, and immune functions. The main intention of the present field study was to elucidate whether a menthol-rich PBLC supplement could support calcium homeorhesis precisely during the critical period around calving. To proof this, feeding of the supplement commenced 8 d before the predicted calving date. We were able to show a PBLC-induced increase of blood iCa level in

Table 3. Effect of feeding plant bioactive lipid compounds (PBLC) on milk composition and total milk yield in Holstein Friesian and Brown Swiss cows^{1,2}

Item	Brown Swiss		Holstein Friesian		P-value ⁴							
	CON (n = 13)	PBLC (n = 14)	CON (n = 21)	PBLC (n = 13)	SEM ³	B	T	D	B × T	B × D	T × D	B × T × D
Milk yield (kg/d)	32.6	36.9	43.7	49.1	1.82	<0.001	0.006	0.56	0.77	0.47	0.12	0.71
ECM (kg/d)	34.0	38.0	43.2	48.0	1.95	<0.001	0.018	0.13	0.85	0.59	0.048	0.78
Fat (kg/d)	1.39	1.56	1.71	1.91	0.10	0.002	0.049	0.032	0.91	0.87	0.076	0.62
Protein (kg/d)	1.15	1.26	1.42	1.56	0.059	<0.001	0.026	0.38	0.77	0.61	0.38	0.65
Lactose (kg/d)	1.56	1.76	2.16	2.38	0.092	<0.001	0.018	0.56	0.91	0.11	0.013	0.78
Fat (%)	4.28	4.21	3.87	3.97	0.21	0.106	0.96	0.005	0.64	0.69	0.40	0.55
Protein (%)	3.58	3.39	3.21	3.27	0.14	0.002	0.29	0.003	0.70	0.30	0.030	0.22
Lactose (%)	4.80	4.79	4.86	4.83	0.038	0.28	0.55	0.25	0.81	0.29	0.21	0.29
Urea (mg/kg)	215	204	210	189	27.04	0.60	0.32	0.030	0.79	0.049	0.60	0.50
Cell count (cells/mL)	304	263	240	186	119.1	0.56	0.69	0.29	0.96	0.67	0.54	0.71

¹Milk composition values and daily milk yields are LSM computed from 2 consecutive samples per cow on DHI test days in the periods 4 to 40 d and 41 to 80 d of lactation.

²CON = control without PBLC.

³Pooled SEM.

⁴B = breed; T = treatment; D = test day.

HF cows but not in BS cows. The observed increase of iCa in HF cows is in congruence with previous studies from our group, which had evidenced positive effects of a similar PBLC mixture on total calcium in blood serum of HF cows in mid to late lactation (Braun et al., 2019) and, as a trend, in growing sheep (Patra et al., 2019b). In companion experiments to the latter study, we were further able to demonstrate that PBLC feeding increased absorption of calcium from the rumen via TRP channels (Geiger et al., 2021).

It has been well established in monogastric animals, as well as in ruminants, that transcellular calcium absorption in the intestine occurs mainly via TRPV5 and TRPV6 channels (Schröder et al., 2015; Christakos et al., 2016; van Goor et al., 2017). In ruminants, however, calcium absorption in the rumen seems to be of particular importance (Schröder et al., 1999; Leonhard-Marek et al., 2010; Wilkens et al., 2016). Unlike the intestine, TRPV5 and TRPV6 are not or only weakly expressed in the ruminal tissue, implying that ruminal calcium absorption must operate by a different mechanism (Wilkens et al., 2009, 2011; Schröder et al., 2015). In addition to TRPV5 and TRPV6 (Nilius et al., 2002; Hoenderop, 2003; Woudenberg-Vrenken et al., 2012), other nonselective TRP channels are also able to transport cations such as calcium (e.g., TRPV3, TRPM8, or TRPA1; Gees et al., 2010). The mRNA expression of TRPA1 and TRPV3 has been detected in the rumen of sheep and cows (Rosendahl et al., 2016; Geiger et al., 2021) and TRPV3 was also detected at the protein level by western blot and immunohistochemistry in the bovine rumen (Liebe et al., 2020). Furthermore, bovine TRPV3 expressed in HEK cells was shown to be activated by menthol (Schrapers et al., 2018). It was thus proposed that TRPV3 may play a central role in ruminal calcium absorption (Geiger et al., 2021). The PBLC stimulation increased calcium absorption in isolated ruminal epithelium elicited by substances such as menthol (Rosendahl et al., 2016; Geiger et al., 2021). It may thus also explain the PBLC-induced increases in blood calcium levels in mid- to late-lactating HF cows in our previous study (Braun et al., 2019). An outstanding and new finding of the present study is that menthol-rich PBLC also are effective to increase blood calcium level during early lactation in HF cows. The increase in blood calcium may appear quantitatively small. However, it has to be considered that cows experiencing milk fever and requiring calcium infusions were removed from the study, which applied to only one HF-PLBC but 2 HF-CON cows. Furthermore, baseline calcium levels were rather high in the study herd. Therefore, any surplus calcium provision would likely initiate homeorhetic counter-regulation (Martín-Tereso and Verstegen, 2011), especially with prolonged

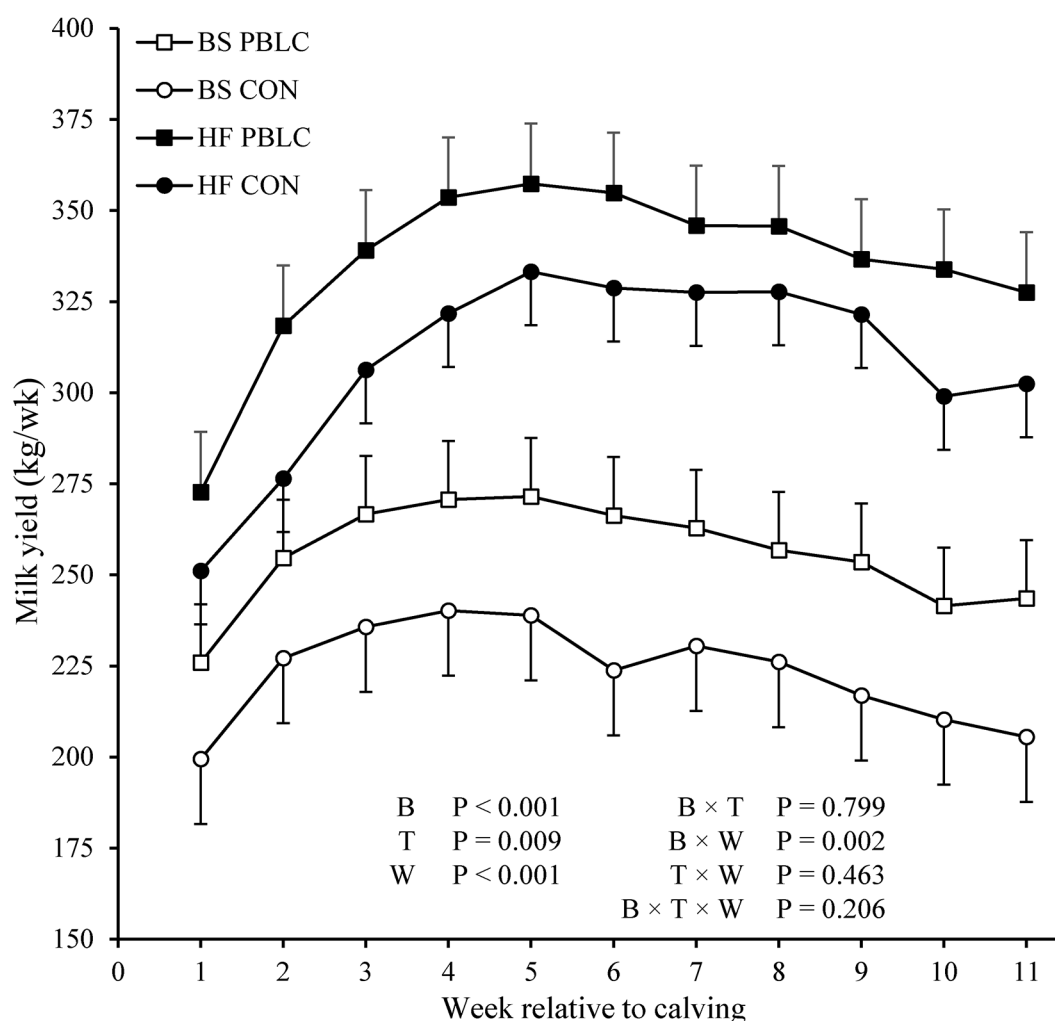


Figure 3. Weekly milk yields of Holstein Friesian (HF) or Brown Swiss (BS) cows fed a standard ration without (CON) or with additional plant bioactive lipid compounds (PBLC). Error bars represent SEM. *P*-values for main effects and interactions are shown in the diagram. Individual differences for the interaction B \times W are not indicated by letter code for reasons of clarity (B = breed; T = treatment; W = week).

application toward the end of the study. Vice versa, this also means that animals in need of surplus calcium would initiate less counter-regulation and benefit from the surplus calcium, especially in the critical days around calving. As outlined above, the source of surplus calcium provision to the system is likely increased ruminal absorption via TRPV3 (and possibly TRPA1) by the menthol-containing PBLC. As TRPV3 and TRPA1 also conduct sodium (Rosendahl et al., 2016; Schrapers et al., 2018), an activation of such channels may additionally explain the increase in plasma sodium at 21 DIM. Alternatively or additionally, it may be speculated that HF cows increased DMI during PBLC supplementation as previously observed in growing sheep (Patra et al., 2019a). Although a similar increase in DMI was not observed in late-lactating cows (Braun et al., 2019), it would include a proportionate increase

in calcium intake if present. Unfortunately, DMI could not be recorded in the current field study.

The prevalence of subclinical hypocalcemia in HF cows appeared relatively low in the study herd compared with literature data. In the study of Venjakob et al. (2017) on cows belonging almost exclusively to the HF breed, a prevalence of 29 and 49.4% was reported for animals in the second and third lactation, respectively. The study by Reinhardt et al. (2011) quoted a prevalence of 41% and 49%, respectively, for the second and third lactation. In our study, the average lactation number of HF cows was about 2.75 (BS = 3.5). Therefore, we expected a prevalence of subclinical hypocalcemia of ~40% or higher, especially, because there were no prophylaxis measures against hypocalcemia on the farm except our treatment. In addition, the DCAD of the basal ration was quite high both prepartum (+238

mEq/kg) and postpartum (+248 mEq/kg); therefore, a promoting effect of diet on hypocalcemia prevalence would have been expected (Charbonneau et al., 2006; Lean et al., 2006; Santos et al., 2019). The reasons why hypocalcemia prevalence was so low in our study compared with previous studies may partly relate to the calcium measurement method. We have shown recently that assessment of calcium status from total calcium may cause overestimation of the prevalence of postpartum hypocalcemia because the functionally relevant iCa shows much less variation around calving than total calcium (Ott et al., 2021). Already previous studies had shown that the direct measurement of ionized calcium is preferable over measurement of total calcium (Wilms et al., 2019). The ionized calcium represents the biologically active fraction in the organism. Around the period of calving, there is a change of the proportion of ionized calcium within total calcium (Ballantine and Herbein, 1991; Joyce et al., 1997). Therefore, an accurate prediction of calcium status can only be achieved by measuring ionized calcium. The low (and probably more precisely determined) prevalence of hypocalcemia based on iCa, might possibly explain why a positive effect of PBLC on blood iCa concentration could not be observed in BS cows. Already previous studies indicated that hypocalcemia is less common in the BS breed compared with others such as HF or Jersey (Erb and Grohn, 1988; Saborío-Montero et al., 2017). The more stable calcium level in BS cows around calving may have possibly blunted an effect of PBLC supplementation on blood calcium concentration in BS cows in the present study. In the high-yielding HF breed, however, a positive effect of PBLC could be observed on iCa, including the days immediately after calving (d 1 and 3). It has been shown recently that such fast return to normal blood calcium concentration is associated with markedly lower incidences for other postpartum diseases such as hyperketonemia, metritis, displaced abomasum, or herd removal in the first 60 DIM (McArt and Neves, 2020).

Previous research on the effect of PBLC in ruminants had already considered effects on health status or milk yield (Khiaosa-ard and Zebeli, 2013). Many of these studies explained PBLC effects by their action on microbiota and fermentation, although this often requires PBLC dosages much higher than that used in the present study (Ando et al., 2003; Calsamiglia et al., 2007). When feeding concentrations of a menthol-based PBLC comparable to the present study to growing sheep, only minor changes in ruminal microbiota and fermentation were detected (Patra et al., 2019c). Thus, other effects of PBLC on sensory perception, inflammation or pain, which are mediated by TRP channels among others, could also play a role for the effects of PBLC on animal

health and productivity (Holzer, 2011; Nilius and Szalasi, 2014; Oh et al., 2017; Oz et al., 2017).

The milk yield and milk composition of the 2 breeds clearly differed in the present study. Holstein Friesian cows produced >10 kg more milk per day than BS cows; whereas, the percentage of milk protein was higher in BS cows. These differences agree with literature findings (Carroll et al., 2006; De Marchi et al., 2008; Visentin et al., 2018). Feeding the PBLC supplement resulted in a marked increase in milk yield by >10% that was comparable in both breeds, whereas milk composition was not affected by feeding. Such noticeable increase in milk yield appears a rather rare occasion in literature. A meta-analysis by Khiaosa-ard and Zebeli (2013) analyzed milk production data from 43 studies in which PBLC were supplemented to dairy cows. They did not identify a general stimulating effect of PBLC on milk production, although some studies identified such positive effects (Hausmann et al., 2018; Kholif et al., 2020). This suggests that stimulation of milk production appears rather specific for certain compositions and concentrations of PBLC mixtures. Of note, the stimulation of milk production by the menthol-rich PBLC used in the present study reproduced the increase in milk production observed in a previous study using a similar PBLC formulation in dairy cows in mid to late lactation, also without changing the milk composition (Braun et al., 2019). We were not able to determine if increased milk production coincided with increased feed intake because measurement of feed intake was not possible in the present study. As mentioned earlier, a similar PBLC mix as used in the present study was shown previously to increase feed intake in growing sheep (Patra et al., 2019a) but not in mid- to late-lactating dairy cows (Braun et al., 2019).

With progressing DIM, the BCS changed significantly in the present study, which was expectable due to the negative energy balance at the onset of lactation (Coffey et al., 2002). Additionally, 3-way interaction between breed \times treatment \times day indicated that the loss of body condition in HF-CON cows was significantly higher, especially toward the end of the study, compared with BS-CON cows. This fits the higher milk yields observed in HF-CON versus BS-CON cows because higher milk yields are commonly associated with greater losses of BW (Domecq et al., 1997) and body condition (Carroll et al., 2006). Of note, there was no such difference among HF-PBLC and BS-PBLC cows, indicating that HF-PBLC cows were able to largely compensate the negative effect of higher milk yield on body condition. The most plausible reason for this compensation would be increased PMR intake (Patra et al., 2019a). That such compensation occurred selectively in the HF breed may relate to the fact that HF were bred

for superiority in roughage intake (Gruber et al., 1991) and feed efficiency (Dickinson et al., 1969).

The present report is about the first study that monitored the effect of PBLC on blood ionized calcium in periparturient dairy cattle. The study was designed to compare such effects in 2 breeds with greatly diverging hypocalcemia prevalence in a field setup with high DCAD diet and no prophylactic measures against hypocalcemia. The latter should have led to a high prevalence of hypocalcemia. Unexpectedly, however, hypocalcemia prevalence was rather low. Thus, an effect of the PBLC on hypocalcemia prevalence could not be properly evaluated and the measured effect of PBLC on blood ionized calcium was rather small. A more prominent effect was observed on milk production. Unfortunately, the field study on a cohort of >70 animals did not allow measurement of individual feed intake for deeper mechanistic evaluation of the latter finding. Thus, further studies are needed to investigate the effect of the menthol-rich PBLC on feed intake and feed efficiency in HF cows around calving more closely.

CONCLUSIONS

The present study demonstrated that feeding a menthol-rich PBLC supplement can increase blood ionized calcium in high-yielding dairy cows of the HF breed in the critical periparturient period. Although this increase was relatively small, an elevation of iCa by ~5% around parturition may become relevant in settings where cows are prone to hypocalcemia and secondary diseases promoted by hypocalcemia. We further observed a marked increase in milk yield during early lactation in both HF and BS cows with almost no changes in milk composition and, especially in HF cows, no negative effects on body condition. The improved calcium homeostasis in HF cows is most likely explainable by enhanced calcium absorption from the rumen. For production effects, other explanations could additionally apply, such as increases in PMR intake and an improved immune or health status, which should be followed up in further studies.

ACKNOWLEDGMENTS

D.O., D.M., K.T.S., and J.R. are or were employed by PerformaNat GmbH (Berlin, Germany), which financed the study. We especially thank Hubert Steinhäuser (Legau, Germany) for the opportunity to conduct the study on his farm and for the great support during preparation and realization of the study. J.R. and J.R.A. are co-authors of patent WO2014020067A1 that relates to the subject of the study. These facts did

not affect the collection and interpretation of data. The authors have not stated any other conflicts of interest.

REFERENCES

- Ando, S., T. Nishida, M. Ishida, K. Hosoda, and E. Bayaru. 2003. Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. *Livest. Prod. Sci.* 82:245–248. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(03\)00012-5](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(03)00012-5).
- Ballantine, H. T., and J. H. Herbein. 1991. Potentiometric determination of ionized and total calcium in blood plasma of Holstein and Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 74:446–449. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78190-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78190-3).
- Bauman, D. E., and W. B. Currie. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J. Dairy Sci.* 63:1514–1529. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(80\)83111-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)83111-0).
- Bautista, D. M., J. Siemens, J. M. Glazer, P. R. Tsuruda, A. I. Basbaum, C. L. Stucky, S.-E. Jordt, and D. Julius. 2007. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448:204–208. <https://doi.org/10.1038/nature05910>.
- Box, G. E. P., and D. R. Cox. 1964. An analysis of transformations. *J. R. Stat. Soc. B* 26:211–252.
- Braun, H.-S., K. T. Schrapers, K. Mahlkow-Nerge, F. Stumpff, and J. Rosendahl. 2019. Dietary supplementation of essential oils in dairy cows: Evidence for stimulatory effects on nutrient absorption. *Animal* 13:518–523. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001696>.
- Calsamiglia, S., M. Busquet, P. W. Cardozo, L. Castillejos, and A. Ferret. 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 90:2580–2595. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>.
- Carroll, S. M., E. J. DePeters, S. J. Taylor, M. Rosenberg, H. Perez-Monti, and V. A. Capps. 2006. Milk composition of Holstein, Jersey, and Brown Swiss cows in response to increasing levels of dietary fat. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:451–473. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2006.06.019>.
- Charbonneau, E., D. Pellerin, and G. R. Oetzel. 2006. Impact of lowering dietary cation-anion difference in nonlactating dairy cows: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 89:537–548. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72116-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72116-6).
- Coffey, M. P., G. Simm, and S. Brotherstone. 2002. Energy balance profiles for the first three lactations of dairy cows estimated using random regression. *J. Dairy Sci.* 85:2669–2678.
- De Marchi, M., G. Bittante, R. Dal Zotto, C. Dalvit, and M. Cassandro. 2008. Effect of Holstein Friesian and Brown Swiss breeds on quality of milk and cheese. *J. Dairy Sci.* 91:4092–4102. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0788>.
- den Dekker, E., J. G. J. Hoenderop, B. Nilius, and R. J. M. Bindels. 2003. The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: From identification towards regulation. *Cell Calcium* 33:497–507. [https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(03\)00065-4](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(03)00065-4).
- Dickinson, F. N., B. T. McDaniel, and R. E. McDowell. 1969. Comparative efficiency of feed utilization during first lactation of Ayrshire, Brown Swiss, and Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 52:489–497. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(69\)86593-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(69)86593-8).
- Domecq, J. J., A. L. Skidmore, J. W. Lloyd, and J. B. Kaneene. 1997. Relationship between body condition scores and milk yield in a large dairy herd of high yielding Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 80:101–112. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)75917-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)75917-4).
- Edmonson, A. J., I. J. Lean, L. D. Weaver, T. Farver, and G. Webster. 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:68–78. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79081-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0).
- Erb, H. N., and Y. T. Grohn. 1988. Epidemiology of metabolic disorders in the periparturient dairy cow. *J. Dairy Sci.* 71:2557–2571. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79845-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79845-8).
- Gees, M., B. Colsoul, and B. Nilius. 2010. The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a003962. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003962>.

- Geiger, S., A. K. Patra, K. T. Schrapers, H. S. Braun, and J. R. Aschenbach. 2021. Menthol stimulates calcium absorption in the rumen but not in the jejunum of sheep. *J. Dairy Sci.* 104:3067–3081. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19372>.
- Goff, J. P. 2008. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Vet. J.* 176:50–57. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.020>.
- Goff, J. P., and R. L. Horst. 1993. Oral administration of calcium salts for treatment of hypocalcemia in cattle. *J. Dairy Sci.* 76:101–108. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77328-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77328-2).
- Goff, J. P., T. A. Reinhardt, and R. L. Horst. 1995. Milk fever and dietary cation-anion balance effects on concentration of vitamin D receptor in tissue of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78:2388–2394. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76867-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76867-9).
- Gruber, L., R. Steinwender, K. Krimberger, and J. Sölkner. 1991. Roughage intake of Simmental, Brown Swiss and Holstein Friesian cows fed rations with 0, 25 and 50% concentrates. *Livest. Prod. Sci.* 27:123–136. [https://doi.org/10.1016/0301-6226\(91\)90091-4](https://doi.org/10.1016/0301-6226(91)90091-4).
- Hausmann, J., C. Deiner, A. K. Patra, I. Immig, A. Starke, and J. R. Aschenbach. 2018. Effects of a combination of plant bioactive lipid compounds and biotin compared with monensin on body condition, energy metabolism and milk performance in transition dairy cows. *PLoS One* 13:e0193685. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193685>.
- Hoenderop, J. G. J. 2003. Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J.* 22:776–785. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg080>.
- Holzer, P. 2011. Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system. *Pharmacol. Ther.* 131:142–170. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.03.006>.
- Horst, R. L., J. P. Goff, and T. A. Reinhardt. 2005. Adapting to the transition between gestation and lactation: Differences between rat, human and dairy cow. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 10:141–156. <https://doi.org/10.1007/s10911-005-5397-x>.
- Houe, H., S. Østergaard, T. Thilising-Hansen, R. J. Jørgensen, T. Larsen, J. T. Sørensen, J. F. Agger, and J. Y. Blom. 2001. Milk fever and subclinical hypocalcemia – An evaluation of parameters on incidence risk, diagnosis, risk factors and biological effects as input for a decision support system for disease control. *Acta Vet. Scand.* 42:1–29.
- Joyce, P. W., W. K. Sanchez, and J. P. Goff. 1997. Effect of anionic salts in prepartum diets based on alfalfa. *J. Dairy Sci.* 80:2866–2875. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76251-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76251-9).
- Khiaoosa-ard, R., and Q. Zebeli. 2013. Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants. *J. Anim. Sci.* 91:1819–1830. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5691>.
- Kholif, A. E., A. A. Hassan, G. M. El Ashry, M. H. Bakr, H. M. El-Zaiat, O. A. Olafadehan, O. H. Matloup, and S. M. A. Sallam. 2021. Phytogetic feed additives mixture enhances the lactational performance, feed utilization and ruminal fermentation of Friesian cows. *Anim. Biotechnol.* 32:708–718. <https://doi.org/10.1080/10495398.2020.1746322>.
- Lean, I. J., P. J. DeGaris, D. M. McNeil, and E. Block. 2006. Hypocalcemia in dairy cows: Meta-analysis and dietary cation anion difference theory revisited. *J. Dairy Sci.* 89:669–684. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72130-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72130-0).
- Liebe, F., H. Liebe, S. Kaessmeyer, G. Sponder, and F. Stumpff. 2020. The TRPV3 channel of the bovine rumen: Localization and functional characterization of a protein relevant for ruminal ammonia transport. *Pflügers Arch.* 472:693–710. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02393-2>.
- Liesegang, A., K. Singer, and A. Boos. 2008. Vitamin D receptor expression across different segments of the gastrointestinal tract in Brown Swiss and Holstein Frisian cows of different age. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 92:316–323. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00782.x>.
- Macpherson, L. J., S. W. Hwang, T. Miyamoto, A. E. Dubin, A. Papatoutian, and G. M. Story. 2006. More than cool: Promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol. Cell. Neurosci.* 32:335–343. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.05.005>.
- Martín-Tereso, J., and M. W. A. Verstegen. 2011. A novel model to explain dietary factors affecting hypocalcaemia in dairy cattle. *Nutr. Res. Rev.* 24:228–243. <https://doi.org/10.1017/S0954422411000126>.
- Martinez, N., R. M. Rodney, E. Block, L. L. Hernandez, C. D. Nelson, I. J. Lean, and J. E. P. Santos. 2018. Effects of prepartum dietary cation-anion difference and source of vitamin D in dairy cows: Health and reproductive responses. *J. Dairy Sci.* 101:2563–2578. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13740>.
- McArt, J. A., and R. C. Neves. 2020. Association of transient, persistent, or delayed subclinical hypocalcemia with early lactation disease, removal, and milk yield in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 103:690–701. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17191>.
- Naumann, K., R. Bassler, R. Seibold, and K. Barth. 2004. Die Chemische Untersuchung von Futtermitteln: Methodenbuch Band III, Loseblattausgabe Mit Ergänzungen 1983, 1988, 1993, 1997 Und 2004. VDLUFA-Verlag.
- Nilius, B., J. Prenen, J. G. J. Hoenderop, R. Vennekens, S. Hoefs, A. F. Weidema, G. Droogmans, and R. J. M. Bindels. 2002. Fast and slow inactivation kinetics of the Ca²⁺ channels ECaC1 and ECaC2 (TRPV5 and TRPV6): Role of the intracellular loop located between transmembrane segments 2 and 3. *J. Biol. Chem.* 277:30852–30858. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202418200>.
- Nilius, B., and A. Szallasi. 2014. Transient receptor potential channels as drug targets: From the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol. Rev.* 66:676–814. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008268>.
- Oetzel, G. R. 1988. Parturient paresis and hypocalcemia in ruminant livestock. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 4:351–364. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)31053-7](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)31053-7).
- Oetzel, G. R., J. D. Olson, C. R. Curtis, and M. J. Fettman. 1988. Ammonium chloride and ammonium sulfate for prevention of parturient paresis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 71:3302–3309. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79935-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79935-X).
- Oh, J., E. H. Wall, D. M. Bravo, and A. N. Hristov. 2017. Host-mediated effects of phytonutrients in ruminants: A review. *J. Dairy Sci.* 100:5974–5983. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12341>.
- Ott, D., K. T. Schrapers, and J. R. Aschenbach. 2021. Changes in the relationship between ionized and total calcium in clinically healthy dairy cows in the period around calving. *Animals (Basel)* 11:1036. <https://doi.org/10.3390/ani11041036>.
- Oz, M., E. G. El Nebrihi, K.-H. S. Yang, F. C. Howarth, and L. T. Al Kury. 2017. Cellular and molecular targets of menthol actions. *Front. Pharmacol.* 8:472. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00472>.
- Patra, A. K., S. Geiger, H.-S. Braun, and J. R. Aschenbach. 2019a. Dietary supplementation of menthol-rich bioactive lipid compounds alters circadian eating behaviour of sheep. *BMC Vet. Res.* 15:352. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2109-0>.
- Patra, A. K., S. Geiger, K. T. Schrapers, H.-S. Braun, H. Gehlen, A. Starke, R. Pieper, A. Cieslak, M. Szumacher-Strabel, and J. R. Aschenbach. 2019b. Effects of dietary menthol-rich bioactive lipid compounds on zootechnical traits, blood variables and gastrointestinal function in growing sheep. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 10:86. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0398-6>.
- Patra, A. K., T. Park, H.-S. Braun, S. Geiger, R. Pieper, Z. Yu, and J. R. Aschenbach. 2019c. Dietary bioactive lipid compounds rich in menthol alter interactions among members of ruminal microbiota in sheep. *Front. Microbiol.* 10:2038. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02038>.
- Pehrson, B., C. Svensson, and M. Jonsson. 1998. A comparative study of the effectiveness of calcium propionate and calcium chloride for the prevention of parturient paresis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:2011–2016. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75775-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75775-3).
- Reinhardt, T. A., J. D. Lippolis, B. J. McCluskey, J. P. Goff, and R. L. Horst. 2011. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Vet. J.* 188:122–124. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.025>.

- Roche, J. R., and D. P. Berry. 2006. Periparturient climatic, animal, and management factors influencing the incidence of milk fever in grazing systems. *J. Dairy Sci.* 89:2775–2783. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72354-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72354-2).
- Rodríguez, E. M., A. Arís, and A. Bach. 2017. Associations between subclinical hypocalcemia and postparturient diseases in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:7427–7434. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12210>.
- Rosendahl, J., H. S. Braun, K. T. Schrapers, H. Martens, and F. Stumpff. 2016. Evidence for the functional involvement of members of the TRP channel family in the uptake of Na⁺ and NH₄⁺ by the ruminal epithelium. *Pflügers Arch.* 468:1333–1352. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1835-4>.
- Saborio-Montero, A., B. Vargas-Leitón, J. J. Romero-Zúñiga, and J. M. Sánchez. 2017. Risk factors associated with milk fever occurrence in grazing dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 100:9715–9722. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13065>.
- Santos, J. E. P., I. J. Lean, H. Golder, and E. Block. 2019. Meta-analysis of the effects of prepartum dietary cation-anion difference on performance and health of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 102:2134–2154. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14628>.
- Schrapers, K. T., G. Sponder, F. Liebe, H. Liebe, and F. Stumpff. 2018. The bovine TRPV3 as a pathway for the uptake of Na⁺, Ca²⁺, and NH₄⁺. *PLoS One* 13:e0193519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193519>.
- Schröder, B., W. Goebel, K. Huber, and G. Breves. 2001. No effect of vitamin D3 treatment on active calcium absorption across ruminal epithelium of sheep. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 48:353–363. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2001.00369.x>.
- van Goor, M. K. C., J. G. J. Hoenderop, and J. van der Wijst. 2017. TRP channels in calcium homeostasis: From hormonal control to structure-function relationship of TRPV5 and TRPV6. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1864:883–893. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2016.11.027>.
- Venjakob, P. L., S. Borchardt, and W. Heuwieser. 2017. Hypocalcemia—Cow-level prevalence and preventive strategies in German dairy herds. *J. Dairy Sci.* 100:9258–9266. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12494>.
- Venjakob, P. L., L. Pieper, W. Heuwieser, and S. Borchardt. 2018. Association of postpartum hypocalcemia with early-lactation milk yield, reproductive performance, and culling in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:9396–9405. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14202>.
- Visentin, G., M. Penasa, G. Niero, M. Cassandro, and M. De Marchi. 2018. Phenotypic characterisation of major mineral composition predicted by mid-infrared spectroscopy in cow milk. *Ital. J. Anim. Sci.* 17:549–556. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1398055>.
- Vogt-Eisele, A. K., K. Weber, M. A. Sherkheli, G. Vielhaber, J. Panten, G. Gisselmann, and H. Hatt. 2007. Monoterpenoid agonists of TRPV3. *Br. J. Pharmacol.* 151:530–540. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707245>.
- Wilkens, M. R., C. Kunert-Keil, H. Brinkmeier, and B. Schröder. 2009. Expression of calcium channel TRPV6 in ovine epithelial tissue. *Vet. J.* 182:294–300. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.06.020>.
- Wilkins, M. R., C. D. Nelson, L. L. Hernandez, and J. A. A. McArt. 2020. Symposium review: Transition cow calcium homeostasis—Health effects of hypocalcemia and strategies for prevention. *J. Dairy Sci.* 103:2909–2927. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17268>.
- Wilms, J., G. Wang, J. Doelman, M. Jacobs, and J. Martín-Tereso. 2019. Intravenous calcium infusion in a calving protocol disrupts calcium homeostasis compared with an oral calcium supplement. *J. Dairy Sci.* 102:6056–6064. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15754>.
- Woudenberg-Vrenken, T. E., A. L. Lameris, P. Weißgerber, J. Olausson, V. Flockerzi, R. J. M. Bindels, M. Freichel, and J. G. J. Hoenderop. 2012. Functional TRPV6 channels are crucial for transepithelial Ca²⁺ absorption. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 303:G879–G885. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00089.2012>.

ORCIDS

D. Manneck  <https://orcid.org/0000-0003-4478-1980>

K. T. Schrapers  <https://orcid.org/0000-0001-8581-8589>

J. R. Aschenbach  <https://orcid.org/0000-0001-5080-1007>

4. Diskussion

Kernstück der vorliegenden Dissertation ist ein Feldversuch mit einem kommerziell erhältlichen mentholhaltigen Futtermittelzusatz. Ziel der Feldstudie war die Analyse des Einflusses der im Futtermittelzusatz enthaltenen bioaktiven Pflanzenlipide auf den Kalziumstoffwechsel in der peripartalen Zeit bei Kühen der Rassen Holstein Friesian und Braunvieh. Des Weiteren wurde die Auswirkung des Futterzusatzes auf die Milchleistung, die Körpermasse in Form des BCS sowie auf die Gesundheit der Kühe näher betrachtet. Von Interesse war zudem die Bedeutung und Messung des iCa insbesondere im peripartalen Zeitraum im Vergleich zum tCa mit Berücksichtigung weiterer Laborparameter.

4.1. Methodenkritik

4.1.1. Tierindividuelle Faktoren

Die ursprünglich geplante Tieranzahl des Fütterungsversuchs umfasste 100 Tiere. Die Kühe wurden in eine Fütterungsgruppe und eine Kontrollgruppe geteilt. Einteilungskriterien stellten die Rasse, das Kalbedatum und die Laktationsnummer dar. Die Verteilung der Rassen im Betrieb betrug ca. 60% Holstein und 40% Braunvieh, was sich auch in der Tieranzahl pro Gruppe widerspiegelte. Insgesamt wurden initial 55 Tiere der Rasse Holstein Friesian und 45 Tiere der Rasse Braunvieh in die Studie aufgenommen. Die Tiere wurden bereits einige Wochen vor der Kalbung anhand der errechneten Kalbedaten den Gruppen zugeteilt. Für die Zuordnung der einzelnen Tiere standen letztendlich 4 Gruppen zur Verfügung:

- Braunvieh-Kontrollgruppe
- Braunvieh-Fütterungsgruppe
- Holstein-Kontrollgruppe
- Holstein-Fütterungsgruppe

Verschiedene Faktoren führten zum Ausfall bzw. Ausschluss einiger Tiere. Eine beachtliche Zahl von Tieren konnte nicht in die Auswertung miteinbezogen werden, da durch einen Ausfall des Melkroboters und den damit verbunden organisatorischen Veränderungen im Betriebsablauf die PBLC-Fütterung und die Erhebung der Datensätze vieler Tiere abgebrochen werden musste. Eine weitere Problematik im Versuchsaufbau war die genaue Vorhersage des Kalbedatums. Das errechnete Kalbedatum war entscheidendes Kriterium für den Beginn der Zufütterung mit dem Futterzusatzstoff. Ziel war es, den mentholhaltigen Futterzusatz mindestens drei Tage vor Kalbung zu verabreichen. Wurde das Kalb früher als

errechnet geboren, so ergab sich in diesen Fällen eine zu kurze präpartale PBLC-Fütterung. Eine deutlich zu frühe Kalbung einiger Tiere führte zudem zu ausbleibenden Blutproben vor der Geburt, wodurch die nachfolgenden Messungen nicht in Relation zu Werten ante partum gesetzt werden konnten.

Eine weitere Schwierigkeit stellten Tiere dar, die eine hypokalzämische Stoffwechsellage erfuhren. Wurde durch eine Therapie in Form einer Kalziuminfusion Einfluss auf die Blutkalziumkonzentration genommen, so war das gemessene Ergebnis für unsere Zwecke unbrauchbar und das Tier konnte nicht weiter in den Versuch eingebunden werden. Zu den Ausschlusskriterien zählten außerdem klinische Krankheitsanzeichen, insbesondere Ataxie, Parese, verminderte Futteraufnahme, Tachykardie oder kalte Extremitäten. Die Überwachung erfolgte während der Versuchsdurchführung subjektiv mittels äußerer Inspektion durch das betreuende Personal und die Versuchsdurchführende. Zudem wurden Aktivitätsdaten des Roboters für eine genauere Einschätzung der Gesundheitslage genutzt, um beispielsweise deutlich verlängerte Liegezeiten zu erkennen. Eine Unsicherheit für unentdeckte Beschwerden und damit Einfluss auf die Messergebnisse ist dennoch vorhanden.

Durch Ausfall bzw. Ausschluss von Tieren aufgrund von Kalziuminfusionen, Krankheitsanzeichen, unvollständigen Datensätzen und zu kurzer Fütterungszeit ante partum kam es zu einer erheblichen Reduktion der Tierzahl pro Gruppe. Für die statistische Auswertung des Fütterungsversuches standen letztendlich 29 Tiere der Rasse Braunvieh (14 Tiere in der Kontrollgruppe, 15 in der Fütterungsgruppe) und 41 Tiere der Rasse Holstein Friesian (23 Tiere in der Kontrollgruppe, 18 Tiere in der Fütterungsgruppe) zur Verfügung. Aufgrund der deutlichen Reduzierung der Stichprobenzahl sollten die Ergebnisse für eine nachhaltige Interpretation in weiteren Versuchen validiert werden.

4.1.2. Fütterung

Gegenstand des Versuchs war die Verabreichung eines mentholhaltigen Futtermittels im peripartalen Zeitraum. Um die Akzeptanz zu steigern, wurde das mentholhaltige Pulver mit Bierhefe gemischt. Die Kontrollgruppe erhielt lediglich die Bierhefe, die Fütterungsgruppe Bierhefe und den mentholhaltigen Futterzusatz. In der Zeit vor der Kalbung wurde die Fütterung manuell durchgeführt. Die Kühe wurden im Fressgitter fixiert und das Futter anschließend vorgelegt. Wenn das Futter vollständig gefressen war, wurde die Fixation gelöst. Nach der Kalbung erhielten die Tiere Kraffutter über den Melkautomat. Mit

zugeschaltetem Dosierer wurde gleichzeitig die jeweilige Portion an Bierhefe oder Bierhefe+ Futterzusatz zugemischt. Schwierigkeit in dieser Verabreichung war die fehlende Rückwaage im Futtertrog des Melkroboters, so dass eine Gewährleistung der genauen aufgenommenen Futtermenge ausblieb. Regelmäßig erfolgte eine Kontrolle des Futterrestes, der in den geprüften Fällen nicht vorhanden war oder extrem gering ausfiel. Eine generelle Überwachung der Futterraufnahme war jedoch nicht lückenlos möglich.

Eine genaue Untersuchung des Einflusses der Bierhefe wurde in unserem Versuch nicht unternommen. Für Bierhefe wird ein Einfluss auf die Milchmenge diskutiert (Aubrey 2017; Jayantha et al. 2020). Um die Behandlungseffekte in den hier dargestellten Untersuchungen der PBLC-Zufütterung zuschreiben zu können, wurde die Bierhefe an beide Gruppen verfüttert. Eine signifikante Interaktion zwischen der Bierhefe- und der PBLC-Applikation wird im vorliegenden Fall für unwahrscheinlich gehalten, wurde jedoch nicht durch gezielte Untersuchungen bestätigt.

Um Menthol in das eingesetzte Pulver einzumischen, wurde beim Herstellungsprozess Propylenglykol verwendet. Da es sich dabei jedoch nur um ein Gramm pro Tier und Tag verabreichtes Propylenglykol handelte, sollte die eingesetzte Menge unter der antiketotisch und milchleistungssteigernden Menge liegen. Zur Prophylaxe einer Ketose werden üblicherweise Mengen zwischen 150 g ante partum und 250 g in der Früh-laktation eingesetzt (Hünninger und Staufenbiel 1999). In unserem Versuch wurde der Einfluss von Propylenglycol daher nicht weitergehend berücksichtigt.

4.1.3. Zeitlicher Verlauf und saisonale Änderungen

Durch die Dauer des Versuches von Juli 2018 bis Januar 2020 ergaben sich saisonale Änderungen in Klima und Futterzusammensetzung der TMR. Die Änderungen der TMR wurden durch regelmäßige Futterproben überwacht, indem sie auf ihre Zusammensetzung hin durch das LKS näher untersucht wurden (Anhang: Tabelle A1, Tabelle A2). Variationen in der Futterzusammensetzung konnten jedoch nicht vermieden werden.

Durch einen Brand des Roboters Ende Januar 2019 musste eine Unterbrechung des Versuches erfolgen. Die Fortsetzung konnte erst im Mai 2019 erfolgen. Durch den völligen Defekt des ursprünglichen Roboters musste der weitere Versuch mit einem neuen Roboter-Modell fortgeführt werden. Eventuelle feine Unterschiede, die sich aufgrund der technischen Neuerung ergaben, können in Hinsicht auf den Dosierungsvorgang und die Messung der Milchmenge nicht sicher ausgeschlossen werden. Da diese Änderungen aber beide

Versuchsgruppen gleichermaßen betrafen, wird hierdurch keine Verfälschung des Untersuchungsergebnisses erwartet.

4.1.4. Blutentnahme und Messung des ionisierten Kalziums

Die Blutentnahme erfolgte über die Schwanzvene, Vena coccygea. Da in dem Bereich der Schwanzvene auch die Arteria coccygea zu finden ist, konnte nicht garantiert werden, dass es sich in jedem Einzelfall um rein venöses Blut handelte. Hinweis konnte die Messung des pH-Wertes liefern, aber eine genaue Einteilung in eine der beiden Arten war schwierig bzw. es bestand sogar die Möglichkeit, dass es sich um Mischblut aus beiden Gefäßen handelte. Die Werte von $p\text{CO}_2$ und HCO_3^- sind im venösen Blut geringgradig höher als im arteriellen (Slanina et al. 1992). Daher ergibt sich eine Verschiebung des pH-Wertes um ca. 0,02-0,04 Einheiten (Brobst 1983). Eine nähere Unterscheidung wurde aufgrund der angenommenen minimalen Unterschiede nicht weiter in die Betrachtung einbezogen.

Die Blutentnahme wurde mittels Vacuetten durchgeführt. Es wurde jeweils eine heparinisierte Vacuette sowie eine Vacuette zur Gewinnung von Serum entnommen. Die Messung erfolgte mittels dem Gerät Stat Profile Prime der Firma Nova Biomedicals in einem Zeitraum von 20 Minuten nach der Entnahme aus heparinisiertem Vollblut. Bei dem gewählten Blutentnahmeverfahren wird überwiegend arteriovenöses Mischblut mit einem höheren Anteil an arteriellem Blut gewonnen (Tvedten et al. 2000). Bestimmt wurden dabei die folgenden Kernwerte: pH, die Partialdrücke von Kohlendioxid und Sauerstoff sowie die Konzentrationen von Natrium, Kalium, Chlorid, $i\text{Ca}$, Glukose und Laktat. Die Messung des $i\text{Ca}$ ist anspruchsvoll. Empfehlungen zur Durchführung der Messung wurden durch die IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) erstellt (Burnett et al. 2000). Entscheidend für die Bestimmung des $i\text{Ca}$ ist eine anaerobe Arbeitsweise, um einen Verlust von CO_2 und eine damit verbundene pH-Änderung zu vermeiden. Für die Messung in unserem Versuch musste jedoch kurz vor der Messung die Vacuette geöffnet werden, um die Probe in das Gerät einzuführen. Die dabei entstehende Abweichung vom realen Wert kann nicht eingeschätzt werden, da keine absolut anaeroben Messungen vorliegen. Von einem vernachlässigbaren Einfluss wird jedoch ausgegangen.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Die Hypokalzämie der Milchkuh ist nach wie vor ein wichtiges und aktuelles Problem in Milchviehbetrieben. Zum einen spielt das direkte Erkranken des Einzeltieres mit verbundenem erhöhten Risiko für Folgeerkrankungen und deren Behandlung, als auch der entstehende ökonomische Schaden durch Leistungsausfälle für den Landwirt eine entscheidende Rolle (Rodríguez et al. 2017).

Um eine Verringerung des Auftretens dieser Stoffwechselstörung zu erreichen, ist es von Bedeutung eine sichere und frühzeitige Diagnose zu stellen, um eine rechtzeitige Behandlung einzuleiten. Von Wichtigkeit für die Reduktion der Prävalenz sind zudem Prophylaxemaßnahmen in den unterschiedlichsten Formen.

Schon lange ist bekannt, dass das iCa den biologisch aktiven Anteil im Organismus darstellt (Onifade et al. 2005). Für die Diagnostik der Hypokalzämie wird iCa jedoch noch nicht routinemäßig bestimmt, sondern in den meisten Fällen tCa. Nur wenige Studien existieren bisher, in denen iCa verwendet wurde (Szenci et al. 1994; Martinez et al. 2014; Neves et al. 2017). Nach unserer Annahme ist iCa jedoch genauer in der Bewertung des Kalziumhaushaltes. Studien, die den klinischen Nutzen und die Vorhersage auf weitere Krankheiten durch Messung von iCa nachweisen, fehlen bzw. sind kaum vorhanden. Entscheidend für die Überprüfung unserer Hypothese ist die Kenntnis über den zeitlichen Verlauf des Kalziums, die Beziehung zwischen iCa und tCa sowie Einflussfaktoren auf beide Parameter. Diese Punkte, wie auch die entscheidenden Kriterien für die Durchführung der Messung des iCa, sollten in unserer Studie mit Milchkühen, die keinerlei Prophylaxe gegen Hypokalzämie erhalten hatten, näher betrachtet werden.

Neben den bekannten Prophylaxemaßnahmen, wie z.B. eine Einflussnahme auf die Futterration in Form der DCAB-Methode oder das Verabreichen von Kalziumpräparaten, gibt es aktuelle Forschungen zum Einsatz von PBLC, um die Kalziumkonzentration im Organismus zu steigern. Unser Interesse galt dabei dem Einsatz eines mentholhaltigen PBLC, das im Zeitraum um die Kalbung eingesetzt wurde. Neben dem Einfluss auf die Kalziumkonzentration wurden zudem Effekte auf die Gesundheit, die Milchleistung und Milchzusammensetzung sowie die Körperkondition erfasst.

4.2.1. Gesamtkalzium und ionisiertes Kalzium, Verlauf um den Geburtszeitraum

Der Zeitraum um die Geburt ist von maßgeblichen Änderungen im Kalziumhaushalt geprägt. Mit Beginn der Laktation kommt es zu einem deutlichen Verlust von Kalzium aus dem Plasmapool. Durch Einsetzen der hormonellen Gegenregulation erholt sich die Kalziumkonzentration in den folgenden Tagen. Diese Veränderung konnte sowohl in der Messung des iCa, wie auch des tCa nachgewiesen werden. In dieser Studie bezog sich die Phase der Regeneration auf ca. 7 Tage. Bleibt eine Gegenregulation aus, so kommt es zu einer Hypokalzämie in subklinischer oder klinischer Ausprägung. Die Grenzwerte hierfür sind in der Literatur unterschiedlich angegeben. In unserer Studie verwendeten wir einen iCa-Grenzwert von $\leq 0,8$ mmol/l für die klinische Hypokalzämie und $\leq 1,0$ mmol/l für die subklinische Form.

Das zeitlich begrenzte Absinken der Kalziumkonzentration im Geburtszeitraum ist als physiologisch zu werten. Mit Verringerung der Kalziumkonzentration ändert sich zudem der Anteil des iCa am tCa. Der Prozentsatz des iCa am tCa erhöht sich in dieser Phase (Ballantine und Herbein 1991; Joyce et al. 1997). Um dies nachzuweisen, nutzten wir die Darstellung der relativen Veränderungen von tCa und iCa um das Kalben. Dabei wurden die Änderungen der Konzentration relativ auf Tag 2 ante partum bezogen. Eine signifikante zeitabhängige Veränderung für beide Messwerte konnte beobachtet werden, wobei sich der Kurvenverlauf für iCa und tCa nicht identisch zeigte. Sowohl das iCa als auch das tCa wiesen einen Abfall nach der Geburt auf. Das tCa zeigte eine stärkere Verringerung am Tag des Kalbens und eine langsamere Erholung als das iCa. Die frühere Annahme, dass sich der Anteil des iCa am tCa auf 50% beläuft, konnte aufgrund der prozentualen Variationen in unserem Versuch nicht bestätigt werden. Der unterschiedliche Verlauf von iCa und tCa liefert einen Hinweis darauf, dass die Ableitung des iCa aus dem tCa ungenau sein kann, da es um die Geburt zu einer deutlichen Verschiebung der Kalziumfraktionen kommt.

4.2.2. Bestimmung des ionisierten Kalziums mittels Gesamtkalzium und weiterer Kennwerte

In der Praxis wird nach wie vor die Diagnostik der Hypokalzämie mittels Bestimmung des tCa durchgeführt. Grundlage dafür sind frühere Annahmen, die davon ausgehen, dass der Anteil des iCa 50% am tCa beträgt und somit ein Rückschluss auf das biologisch aktive iCa möglich ist. Dieser Annahme haben bereits einige Studien v.a. in der Humanmedizin

widersprechen können (Onifade et al. 2005). Unserer Hypothese zufolge liefert das iCa präzisere Ergebnisse, um eine Aussage über den Kalziumstatus der Milchkuh im Zeitraum um das Kalben zu treffen. Ziel unserer Studie sollte daher die genaue Betrachtung der Beziehung zwischen iCa und tCa sein, um eine Einschätzung für die Effizienz dieser beiden Kennwerte in der Diagnostik der Hypokalzämie zu geben. Ein Rückschluss von tCa auf iCa wurde in verschiedenen Herangehensweisen versucht. Dafür wurden 3 verschiedene Modelle betrachtet:

- a) Ein lineares Modell zwischen iCa und tCa
- b) Eine multivariable Regression zwischen iCa und weiteren biochemischen Metaboliten, Enzymen, Ionen, Gasen und dem pH-Wert
- c) Eine multivariable Regression zwischen den unter b) genannten Kennwerten und der Ratio zwischen iCa:tCa

Eine Vorhersage von iCa allein über tCa in Form des linearen Modells erreichte nur eine unbefriedigende Genauigkeit. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Studien überein, die einer Annahme widersprechen, dass das iCa einen 50%igen Anteil am tCa habe (Onifade et al. 2005). Ein Grund für die unbefriedigende Genauigkeit liegt in der unterschiedlichen Veränderung von iCa und tCa nach der Kalbung, wie in 2.1 bereits aufgezeigt wurde.

Anschließend testeten wir 2 weitere Modelle mit Berücksichtigung weiterer Laborkennwerte, um die Vorhersagekraft des iCa aus tCa zu verbessern. In der Literatur wurden bereits Faktoren mit Einfluss auf das Verhältnis von iCa und tCa vorgeschlagen und durch deren Einbeziehung eine verbesserte Voraussage von iCa durch tCa versucht (Leno et al. 2017). Bestimmt wurden in unserer Studie pH-Wert, pCO₂, pO₂, Hämatokrit, Natrium, Kalium, Chlorid, Glucose, Laktat, Phosphor (umfasst Phosphat und Phosphatester), Magnesium, NEFA, BHB, Aspartat-Aminotransferase, Glutamatdehydrogenase, alkalische Phosphatase, Bilirubin, Cholesteroll, Harnstoff, Kreatin, Kreatinin und die Kreatinkinase. Der Einfluss dieser Kennwerte wurde überprüft und bei Signifikanz in das Modell aufgenommen.

Die multivariable Regression unter b) zeigte lediglich einen Einfluss des pH-Wertes und des Chlorids neben der Abhängigkeit zu tCa. Leider wurde mit diesem Modell nur eine minimale Verbesserung der Genauigkeit zur Vorhersage des iCa aus tCa erreicht. Daher wird dieses Modell ebenfalls nicht als sinnvoll erachtet, um für die Bestimmung des iCa genutzt zu werden.

Aufgrund der unzureichenden Genauigkeit der bisherigen Modelle stellten wir die Hypothese auf, dass möglicherweise ein Einfluss der Variablen nicht direkt auf das iCa vorliegt, sondern auf das Verhältnis zwischen iCa und tCa, der Ratio iCa:tCa. Bei der Erstellung einer

multivariablen Regression zwischen den vorliegenden Kennwerten und der Ratio iCa:tCa zeigten sich mehrere Kennwerte mit Hinweis auf einen Einfluss: NEFA, BHB, Phosphor, Cholesterol, Albumin.

Im folgenden Abschnitt sollen die Variablen, die eine Wirkung auf das iCa oder die Ratio iCa:tCa zeigten, näher betrachtet werden.

4.2.3. Einflussfaktoren auf das ionisierte Kalzium

4.2.3.1. Chlorid

Chlorid liegt als negativ geladenes Ion vor und zeigt eine enge Kopplung zum Natriumhaushalt. Seine Hauptfunktionen finden sich im Wasser-, Elektrolyt- und Säuren-Basen-Haushalt (Schwendenwein 2020). Lediglich in der multivariablen Regression zeigte sich Chlorid mit einem Einfluss auf die Vorhersage von iCa aus tCa. Dieses Ergebnis ließ sich in der multivariablen Regression zwischen der iCa_H1: tCa-Ratio und allen bestimmten Serumparameter nicht reproduzieren. Daher kann von einem geringen Vorhersagepotential von iCa durch tCa mit Berücksichtigung von Chlorid ausgegangen werden. In der Literatur lässt sich in den meisten Studien ebenfalls nur eine schwache Abhängigkeit des iCa von Chlorid finden (Schwartau 2011; Winkler 2015). Lediglich vereinzelt sind signifikante Abhängigkeiten nachgewiesen worden (Metzner und Klee 2005).

Änderungen der Chloridkonzentration werden im Rahmen veränderter Darmmotilität oder auch bei festliegenden Kühen mit niedrigeren Phosphat-Werten beschrieben (Pichon 2008; Bäuml 2014).

4.2.3.2. pH-Wert

Kalzium liegt in verschiedenen Formen vor: proteingebunden, an organische und anorganische Salze gebunden und in freier Form (Goff 1999; Larsen et al. 2001). Ändert sich der pH-Wert, so ergibt sich eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen diesen Fraktionen. Ein Abfall des pH-Wertes reduziert den proteingebundenen Anteil und erhöht dadurch die Fraktion des iCa. Wasserstoff-Ionen konkurrieren dabei mit den Kalziumionen um die Bindungsstellen an den Proteinen (Wang et al. 2002). Um diesen Effekt auszuschließen, wird oftmals mit dem pH-korrigierten iCa gearbeitet. In unserer Studie verwendeten wir ausschließlich unkorrigierte Kalziumwerte, da sich bei der linearen

Regression zwischen den Messwerten des iCa und tCa kein eindeutiger Unterschied zwischen der Anwendung pH-korrigierter und unkorrigierter Werte bot. Ein ähnliches Ergebnis erhielten Yogeshpriya et al. (2020). Auch in deren Studie zeigte sich das unkorrigierte iCa-Wert als geeigneter, um die Kalziumhomöostase der Milchkuh zu beschreiben. Den Einfluss des pH-Wertes konnten wir in der multivariablen Regression zwischen iCa und tCa zeigen, wobei sich nur eine geringfügige Verbesserung der Schätzung von iCa aus tCa ergab. Da bei einer Bestimmung des pH-Wertes ähnliche oder gar identische Geräte wie für die Messung des iCa verwendet werden, macht ein Rückschluss des iCa durch das gemessene tCa in Kombination mit dem pH-Wert wenig Sinn. Dagegen sollte darauf geachtet werden, eine frische anaerob entnommene Probe für die direkte Bestimmung des iCa zu nutzen (Boink et al. 1991; Yogeshpriya et al. 2020).

4.2.3.3. NEFA, BHB

NEFA und BHB zeigten sich als Einflussfaktoren bei der Berechnung der multivariablen Regression der Ratio zwischen iCa und tCa.

NEFA und BHB stellen Anionen dar, die eine Bindungsaffinität zu Kalziumionen haben und daher bei erhöhter Konzentration dazu führen, dass der Gehalt an iCa sinkt. NEFA liegen vor allem als langkettige Fettsäuren vor, die eine Komplexbildung von Kalzium zu Kalziumseifen bewirken (Manoni et al. 2020).

Ein erhöhter Gehalt an NEFA und BHB lässt sich bei negativer Energiebilanz finden, die v.a. um den Geburtszeitraum vorliegt. Eine negative Energiebilanz stellt ein erhöhtes Risiko für Sekundärerkrankungen dar, wie beispielsweise Nachgeburtsverhaltung oder auch Milchfieber (Leblanc 2010; Seifi et al. 2011). In mehreren Studien konnte bereits eine negative Korrelation von NEFA und der Serumkalziumkonzentration nachgewiesen werden (Reinhardt et al. 2011; Chamberlin et al. 2013). Unsere Studie liefert Hinweise, dass ein erhöhter Gehalt an NEFA und BHB, insbesondere nach der Kalbung, zu einer vermehrten Komplexbildung von Kalziumionen führt und somit die Prävalenz von Milchfieber steigt. Sichtbar wird dies durch die negative Korrelation zwischen BHB und NEFA sowie der Ratio von iCa:tCa in unserer Studie.

4.2.3.4. Phosphor

Phosphor wies in unserer Studie eine negative Korrelation zu iCa:tCa auf. Direkt nach der Kalbung zeigte sich die Korrelation am eindeutigsten. Der Gehalt an Phosphor sank deutlich, wohingegen die Konzentration des iCa anstieg. Andere Studien zeigten dagegen nach der

Kalbung und insbesondere bei einer experimentell induzierten Hypokalzämie ein gleichzeitiges Absinken der Kalzium- und Phosphorkonzentrationen (Daniel und Moodie 1979; Mellau et al. 2001).

Das Ergebnis unserer Studie kann darauf hindeuten, dass ein Absinken des Phosphorgehaltes zu einem erhöhten Anteil an iCa führt und somit das Risiko für eine Hypokalzämie mindern kann. Weitere Studien insbesondere mit Fokus auf die Veränderungen der Laborwerte im Zeitraum um die Kalbung sind nötig, um eine genaue Aussage treffen zu können.

4.2.3.5. Cholesterol

Ebenfalls eine negative Korrelation zu iCa:tCa hatte Cholesterol. Eine eindeutige Erklärung lässt sich dafür schwer finden. Bei der menschlichen Atherosklerose konnte Cholesterin bei kalziumbindenden Mechanismen colokalisiert werden (You et al. 2017), was möglicherweise die negative Beziehung funktionell erklären lässt.

Cholesterol fungiert als Indikator für die Futteraufnahme und die Energiebilanz.

Insbesondere um den Kalbezeitpunkt und der frühen Laktation (Quiroz-Rocha et al. 2009) kommt es zu starken Veränderungen der Serum-Cholesterinkonzentration aufgrund eines Defizits im Energiehaushalt.

4.2.3.6. Albumin

Albumin zeigte in unserer Studie eine positive Beziehung in der multivariablen Regression zu iCa:tCa, was sich nur schwer erklären lässt. Normalerweise herrscht eine negative Korrelation zwischen den beiden Variablen vor. Gebunden an Albumin ist ca. 50% des Kalziums (Onifade et al. 2005). Ist die Konzentration an Albumin erhöht, so wird mehr Kalzium gebunden und es liegt in der Regel weniger iCa vor. Albumin ist ein aussagekräftiges negatives akute Phase Protein nach dem Kalben, das bei krankhaften Zuständen absinkt (Petersen et al. 2004; Tóthová et al. 2008). Dadurch kann es zu deutlichen Unterschieden in den Albuminwerten der einzelnen Kühe kommen.

Eine mögliche Erklärung für unsere Ergebnisse findet sich daher in den stark divergierenden individuellen Albumingehalten der Kühe (Stockham und Scott 2013). Dadurch könnte eine positive Korrelation vorgetäuscht werden.

Aufgrund der zweifelhaften positiven Korrelation von Albumin zu iCa testeten wir die multivariable Regression ohne den Einfluss von Albumin, was jedoch eine Verschlechterung der Vorhersagegenauigkeit ergab. Die Genauigkeit war indes noch immer höher als in den vorherigen Modellen, was letztendlich zu folgender Formel führte:

$$\text{iCa} = (0.637 - 0.0714 |\text{NEFA (mmol}\cdot\text{L}^{-1})| - 0.0452 |\text{BHB (mmol}\cdot\text{L}^{-1})| - 0.0332 |\text{cholesterol (mmol}\cdot\text{L}^{-1})| - 0.0253 |\text{phosphorous (mmol}\cdot\text{L}^{-1})|)$$

Dieses Modell ersetzt aufgrund mäßiger Schätzgenauigkeit in keiner Weise die direkte Messung des iCa. Eine genaue Aussage über die Konzentration des iCa kann nur durch die direkte und korrekt durchgeführte Messung des iCa erreicht werden.

4.2.4. Einfluss von Heparin auf das ionisierte Kalzium

Entscheidend für die Bestimmung des iCa, ist die Durchführung der Messung, die wesentlich anspruchsvoller ist, als die Messung des tCa.

Ein wichtiger Punkt ist die Verwendung des Antikoagulanz. EDTA, Citrat und Oxalat eignen sich für die Bestimmung nicht, da sie die Eigenschaft besitzen, Kalzium zu chelatieren (Buckley und Russell 1988). Heparin dagegen bindet nur geringer Mengen an iCa und ist daher das Antikoagulanz der Wahl. Die geringe Menge, die durch dieses Antikoagulanz gebunden wird, wird in den meisten Messungen nicht berücksichtigt (Biswas et al. 1981; Jafri et al. 2014). Um den Einfluss des Heparins deutlich zu machen, führten wir eine „doppelte Heparinisierung“ durch. Durch den verstärkten Einfluss des Heparins konnte eine um ca. 11% reduzierte Konzentration an iCa gemessen werden. Aus diesem Grund sollten immer Materialien mit standardisierter Heparinmenge verwendet werden, um die Ergebnisse mit den bekannten Referenzwerten interpretieren zu können.

Eine weitere wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Messung ist eine anaerobe Durchführung. Die Probe sollte mittels eines luftdichten Behälters entnommen werden und zügig analysiert werden. Wird eine Messung nicht anaerob durchgeführt, so verändert sich der pH-Wert durch die Bildung von Laktat und die Veränderung des pCO₂. H⁺-Ionen, die dabei entstehen, konkurrieren mit iCa um die Bindungsstellen am Albumin. Kommt es dabei zu einer Veränderung, so weicht das gemessene Ergebnis von der im Tier vorliegenden Konzentration an iCa ab (Boink et al. 1991; Wang et al. 2002).

4.2.5. Beeinflussung der Kalziumkonzentration durch PBLC im peripartalen Zeitraum

Die Vermeidung der Hypokalzämie spielt in der Praxis eine entscheidende Rolle.

Verschiedene Methoden werden angewendet, um das starke Absinken des Kalziums insbesondere nach der Geburt zu vermeiden oder auszugleichen. Die gängigsten Methoden sind dabei das Ansäuern des Futters mittels saurer Salze nach dem DCAB-Prinzip (Degaris und Lean 2008) und die Verwendung von oralen Kalziumpräparaten (Goff 2008; Venjakob et al. 2017).

Neue Möglichkeiten könnten sich durch den Einsatz von PBLC ergeben. Rosendahl et al. (2016) konnten einen positiven Effekt von Menthol auf die Resorption des Kalziums am isolierten Pansenepithel nachweisen. Die Verfütterung eines mentholhaltigen Futterzusatzes über eine längere Zeit an mittel- und spätlaktierenden Holstein Friesian Kühen führte zu einer Erhöhung der Blutkalziummenge von 2,46 mmol/l auf 2,53 mmol/l (Braun et al. 2019). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen war die Beeinflussung des Kalziumstoffwechsels im peripartalen Zeitraum durch Verfütterung mentholhaltiger PBLC eine der entscheidenden Fragen unserer Studie. Zudem wurde die unterschiedliche Ansprechbarkeit verschiedener Rassen (Holstein Friesian und Braunvieh) untersucht.

Mindestens drei Tage vor Kalbung begann die Fütterung. Sowohl vor als auch nach der Kalbung wurden engmaschig Blutproben entnommen, der Kalziumspiegel im Blut bestimmt und zwischen den Gruppen verglichen. Dabei existierten 4 Gruppen: Fütterungsgruppe der Holstein Friesian, Fütterungsgruppe des Braunviehs, Kontrollgruppe der Holstein Friesian und Kontrollgruppe des Braunviehs.

Kurz nach der Geburt kommt es durch das Einsetzen der Laktation zu einem rasanten Abfall des Kalziums. Durch die Bildung des Kolostrums und den damit verbundenen Kalziumverlust werden Regulationsmechanismen aktiviert, die das Ausgleichen des Defizits bewirken sollen. Da die Regulationsmechanismen teilweise jedoch erst nach einer gewissen Zeitspanne wirksam werden (Kutuzova und Deluca 2004) oder gar eine insuffiziente Adaptation vorliegt, ist die Gefahr einer länger bestehenden Hypokalzämie verbunden mit klinischen Symptomen oder Folgeerkrankungen im Zeitraum kurz nach der Geburt am höchsten (Horst 1986; Horst et al. 2005).

Ziel der Verfütterung eines Futterzusatzstoffes mit mentholhaltigen PBLC war eine vermehrte Resorption des Kalziums und damit ein Entgegenwirken des starken peripartalen Kalziumabfalls. Braun et al. (2019) konnten bereits einen Anstieg der Kalziumkonzentration in der mittleren und späten Laktation bei Verfütterung eines ähnlichen Futterzusatzstoffes beobachten. Diesen Effekt konnten wir durch unsere Studie auch in der frühen Laktation bei

den Tieren der Rasse Holstein Friesian nachweisen. Die Vertreter der Rasse Braunvieh zeigten dagegen keine Steigerung der Kalziumkonzentration durch Verfütterung der PBLC. Eine Erklärung für die Zunahme der Kalziumkonzentration konnten Geiger et al. (2021) in begleitenden Versuchen durch eine zunehmende Resorption von Kalzium über TRP-Kanäle finden.

Die Unterschiede zwischen den beiden Rassen können bisher noch nicht genau begründet werden. Möglicherweise existiert ein Zusammenhang mit einer unterschiedlichen Anfälligkeit der verschiedenen Rassen für die Hypokalzämie (Erb und Grohn 1988; Saborío-Montero et al. 2017). Dabei zeigt sich, dass das Braunvieh deutlich weniger empfänglich ist als Holstein Friesian. Untersuchungen, die Unterschiede bzgl. der beteiligten Strukturen zwischen Holstein Friesian und Braunvieh betrachten, liegen nicht vor. Weitere Studien sind nötig, um eine abschließende Erklärung für die Divergenz zu liefern.

4.2.5.1. Stimulation der Aufnahme über TRPV-Kanäle

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass auch in der frühen Laktationsphase eine Steigerung der Kalziumaufnahme durch die Zugabe des mentholhaltigen Futterzusatzstoffes bewirkt werden kann. Die transzelluläre Kalziumaufnahme wird über nicht selektive Kationenkanäle ermöglicht. Hinreichend bekannt sind TRPV5 und TRPV6 im Magen-Darm-Trakt, sowohl bei Monogastrier als auch zum Teil bei Wiederkäuern (Schröder et al. 2015; Van Goor et al. 2017). Beim Wiederkäuer scheint jedoch dem Pansen eine große Resorptionsleistung zuzuschreiben zu sein (Schröder und Breves 2006; Goff 2018). In der Literatur finden sich Angaben für eine Resorptionsleistung von bis zu 50% vor dem Duodenum (Oehlschlaeger et al. 2014; Wilkens und Muscher-Banse 2020). TRPV5 und TRPV6 werden im Pansen allerdings nicht oder nur in geringer Menge exprimiert (Wilkens et al. 2009; Schröder et al. 2015). Nach der Studie von Geiger et al. (2021) kann darauf rückgeschlossen werden, dass die Steigerung der Kalziumaufnahme durch Aktivierung von TRP-Kanälen im Pansen ausgelöst wird, wobei es sich höchstwahrscheinlich um den TRPV3 handelt. Rosendahl et al. (2016) konnten bereits 2016 die Expression der mRNA von TRPV3-Kanälen im Pansen nachweisen, Liebe et al. (2020) konnten zudem den Nachweis von TRPV3 im Pansen auch auf Proteinebene durch Western Blot und Immunhistochemie bringen. Eine Aktivierung des TRPV3-Kanals durch Menthol zeigten Schrapers et al. (2018). Aus den bereits vorliegenden Ergebnissen kann darauf rückgeschlossen werden, dass Menthol eine aktivierende Wirkung auf die TRPV3-Kanäle im Pansen besitzt und durch die

Verfütterung eines mentholhaltigen Futterzusatzstoffes eine Steigerung der Kalziumkonzentration erreicht werden kann.

Weitere Untersuchungen sind nötig, um eventuelle rassebedingte Unterschiede bezüglich der TRPV-Kanäle zu erörtern.

4.2.5.2. Prävalenz der Hypokalzämie, Einflussfaktoren und Folgen

Entscheidendes Kriterium in unserer Studie war die völlige Abwesenheit von Prophylaxemaßnahmen gegenüber Hypokalzämie, um eine genaue Aussage über die Prävalenz der Hypokalzämie und die Wirkung des mentholhaltigen PBLC geben zu können. Weder eine Änderung der DCAB noch das Verabreichen von kalziumhaltigen Präparaten wurde auf dem Betrieb durchgeführt.

Die Prävalenz der subklinischen Hypokalzämie betrug in unseren Untersuchungen nur 21,4%, die der klinischen nur 5,6%. Das Auftreten der subklinischen Form wurde im Allgemeinen für die durchschnittliche Laktationszahl von 2,75 für Holstein Friesian und 3,5 für Braunvieh deutlich höher erwartet. Nach Reinhardt et al. (2011) finden sich Werte von bis zu 49% für Kühe in der dritten Laktation.

Eine Erklärung für die niedrige Prävalenz könnte in der direkten Messung des iCa liegen. Wie bereits beschrieben, erscheint die Messung des iCa der Messung des tCa in ihrer Aussagekraft über den Kalziumhaushalt präziser. In den meisten Studien wird die Inzidenz bzw. Prävalenz der subklinischen Hypokalzämie durch Bestimmung des tCa ermittelt (Reinhardt et al. 2011; Neves et al. 2017; Venjakob et al. 2017). Da sich jedoch der Anteil des iCa am tCa um die Geburt ändert (Ballantine und Herbein 1991; Joyce et al. 1997), wird eine exakte Bestimmung des biologisch aktiven Anteils durch Messung von iCa erreicht (Ballantine und Herbein 1991; Seifi et al. 2005; Kimura et al. 2006; Constable et al. 2019). Lediglich bei den Holstein Friesian konnte ein positiver Effekt auf iCa durch Verfütterung der PBLC-Mischung erfasst werden. Eine subklinische Hypokalzämie entwickelten doppelt so viele Kontrolltiere (acht Tiere) der Rasse Holstein Friesian als Tiere in der Holstein Friesian-Fütterungsgruppe (vier Tiere). Eine klinische Hypokalzämie entwickelten eine Kuh aus der Fütterungsgruppe und zwei aus der Kontrollgruppe. Auch wenn sich die Unterschiede in der Prävalenz der subklinischen und klinischen Hypokalzämie zwischen Kontroll- und Fütterungsgruppe aufgrund der kleinen Gruppengrößen statistisch nicht belegen lassen, sind diese Ergebnisse zumindest mit einem prophylaktischen Prinzip der angewandten PBLC bei Holstein-Friesian-Tiere kompatibel.

Bei der Rasse Braunvieh dagegen zeigte sich kein Effekt des mentholhaltigen Futtermittels

auf iCa. Vertreter der Braunviehgruppe zeigten folgendes Auftreten für die subklinische Hypokalzämie: zwei Tiere der Fütterungsgruppe und ein Tier aus der Kontrollgruppe. Das klinische Milchfieber trat bei den Tieren der Braunviehgruppe nicht auf.

Ursache für die geringe Ansprechbarkeit auf PBLC beim Braunvieh könnte in der eh schon sehr niedrigen Prävalenz in unserer Studie liegen, die sich aufgrund der genauen Messung über das iCa ergab. Auch ein genetischer Effekt ist möglich, da bereits des Öfteren gezeigt werden konnte, dass die Rasse Braunvieh eher unempfindlich gegenüber Hypokalzämie zu sein scheint (Cox et al. 1986; Erb und Grohn 1988; Saborío-Montero et al. 2017).

Schon lange bekannt ist eine enge Verbindung einer klinischen oder subklinischen Hypokalzämie mit dem Risiko für Folgeerkrankungen wie Labmagenverlagerung, Mastitis, Metritis oder Fruchtbarkeitsstörungen im weiteren Verlauf der Laktation (Houe et al. 2001; Degaris und Lean 2008; Martinez et al. 2012; Rodríguez et al. 2017). Eine schnelle Erholung der Kalziumkonzentration im Blutplasma kann zu einer Reduktion weiterer Folgeerkrankungen wie Labmagenverlagerung oder Metritis führen (McArt und Neves 2020). Von Interesse sind weitere Studien, um den Einfluss eines mentholhaltigen Futtermittels auf die Häufigkeit weiterer Erkrankungen durch Beeinflussung des Kalziumspiegels zu zeigen. Eine Verringerung dieser Erkrankungen durch die erhöhten Kalziumkonzentrationen aufgrund einer durch das Menthol gesteigerten Resorptionsleistung im Pansen ist denkbar.

4.2.6. Einfluss der PBLC auf die Milchleistung und Milchzusammensetzung

Während des Einsatzes des mentholhaltigen Futterzusatzstoffes konnte über den Versuchszeitraum eine deutliche Steigerung der Milchmenge von mehr als 10% beobachtet werden. Die Zusammensetzung der Milch blieb davon unberührt. Obwohl sich die Milchleistung und die Milchzusammensetzung zwischen den beiden Rassen deutlich unterschieden, konnte dieser Effekt in gleicher Weise bei den Tieren der Rassen Holstein Friesian und Braunvieh beobachtet werden.

Der Unterschied in Milchmenge und Milchzusammensetzung zwischen Holstein Friesian und Braunvieh ist bereits bekannt (Glatz-Hoppe 2019). Holstein Friesian zeichnen sich durch eine milchbetonte Zucht aus, was in einer hohen Milchleistung deutlich sichtbar wird. Das Braunvieh zählt dagegen zu den milchbetonten Zweinutzungsrindern, die neben dem Fokus auf Milchleistung auch ein gewisses Potential zur Mastfähigkeit besitzen (Gruber und Stegellner 2015). Ihre Milchleistung ist deutlich geringer, zeichnet sich dagegen durch einen höheren Proteinanteil aus (Carroll et al. 2006). Dies wurde auch in unserer Studie gezeigt.

In einer früheren Studie von Braun et al. (2019), die einen sehr ähnlichen PBLC-haltigen Futterzusatzstoff verwendeten, konnte bei Milchkühen der Rasse Holstein Friesian ebenfalls ein Anstieg der Milchmenge bei gleichbleibenden Milchinhaltsstoffen in der mittleren und späten Laktation beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für die Steigerung der Milchmenge könnte in einer erhöhten Futterraufnahme liegen. Leider konnte dies in unserer Studie nicht überprüft werden, da eine genaue Bestimmung der aufgenommenen Futtermenge nicht möglich war. Bei Verwendung einer ähnlichen Mischung konnte eine Steigerung der Futterraufnahme bei heranwachsenden Schafen beobachtet werden (Patra et al. 2019a). In der Studie von Braun et al. (2019) gab es jedoch keinen Effekt der PBLC auf die Futterraufnahme.

Der Effekt der gesteigerten Milchleistung konnte bisher mit anderen PBLC-haltigen Futterzusatzstoffen nicht grundsätzlich nachgewiesen werden. Khiaosa-Ard und Zebeli (2013) verglichen einige Studien, in denen verschiedene PBLC-haltige Futtermittel gefüttert wurden und konnten keinen signifikanten Effekt auf die Milchleistung feststellen. Entscheidend für eine Veränderung in der Milchleistung bzw. der Milchezusammensetzung ist vermutlich das verwendete PBLC und die angewendete Dosierung, da Hausmann et al. (2018) und Kholif et al. (2021) ebenfalls positive Effekte beobachten konnten. Weitere Studien mit Bestimmung der aufgenommenen Futtermenge und möglichem Einfluss des in der jeweiligen Studie verwendeten PBLC wären nötig, um eine eindeutige Aussage über eine mögliche Veränderung der Futtereffizienz und damit einen Einfluss auf die Milchmenge und Milchinhaltsstoffe treffen zu können.

4.2.7. Einfluss der PBLC auf den Body Condition Score (BCS)

Generell zeigte das Braunvieh in unserem Versuch eine bessere Körperkondition als die Tiere der Rasse Holstein Friesian. Der Grund lässt sich in den Zuchtmerkmalen finden, da das Braunvieh als Zweinutzungsrasse auch eine Berücksichtigung der Mastleistung auf genetischer Ebene erfährt (Gruber und Stegellner 2015). Dahingegen wird die Rasse Holstein Friesian auf Milchleistung gezüchtet, was sich in einer geringeren Körperkondition im Gegensatz zu fleischbetonten Rassen zeigt.

Nach der Kalbung kommt es zum Einsetzen der Milchbildung, was in Abhängigkeit der Milchmenge zu einem Verlust an Körpermasse führt. Grund dafür ist eine entstehende negative Energiebilanz. Die benötigte Energie kann nicht mehr durch die Futterraufnahme

gedeckt werden und es kommt zu einem Einschmelzen der Körperreserven, einer Gewichtsabnahme und somit Reduktion des BCS (Coffey et al. 2002). Dieser Effekt konnte im Allgemeinen für beide Rassen in unserer Studie nachgewiesen werden. Aufgrund der deutlich höheren Milchleistung der Holstein Friesian-Kühe zeigte sich auch eine stärkere Reduzierung des BCS in der Kontrollgruppe dieser Rasse im Gegensatz zu den Kontrolltieren der Rasse Braunvieh. In der Fütterungsgruppe konnte man dagegen keinen Unterschied zwischen den Rassen feststellen, obwohl die Milchmenge in der Gruppe der Holstein Friesian die Menge der Braunvieh-Kühe ebenfalls überstieg. Eine mögliche Erklärung könnte eine bessere Kompensation über eine erhöhte Futterraufnahme durch die Verabreichung der PBLC-Mischung sein. Ist es den Tieren möglich über das Futter mehr Energie aufzunehmen, so kann der Bedarf besser gedeckt werden und ein zu starkes Einschmelzen körpereigener Reserven bleibt aus. Durch die fehlende Möglichkeit, die Futterraufnahme zu bestimmen, war es uns leider in der Studie nicht möglich, diese Hypothese zu überprüfen. Patra et al. (2019a) konnten bei wachsenden Schafen eine höhere Futterraufnahme bei Fütterung einer ähnlichen PBLC-Mischung nachweisen. Bereits bekannt ist zudem, dass Tiere der Rasse Holstein Friesian über höhere Futterraufnahmen und eine bessere Futtereffizienz verfügen als Tiere anderer Rassen (Dickinson et al. 1969; Gruber et al. 1991).

4.3. Schlussfolgerung

4.3.1. Diagnostischer Nutzen von ionisiertem Kalzium

Da das iCa die verfügbare Fraktion des Kalziums darstellt, empfiehlt sich dessen direkte Bestimmung. Das derzeit regelhaft verwendete tCa ist zur Beurteilung der tatsächlichen Verfügbarkeit des Kalziums für das Tier nur bedingt geeignet. Die Annahme, dass iCa 50% des tCa beträgt, ließ sich in unserem Versuch nicht bestätigen. Verschiedene Modelle, die zudem weitere Parameter berücksichtigen, verbessern nur zu einem geringen Teil die Vorsage von iCa aus tCa. Eine präzise Aussage über die biologisch verfügbare Kalziumkonzentration kann durch direkte und korrekt durchgeführte Messung des iCa erhalten werden. Die genauere Bestimmung des Kalziumstatus könnte perspektivisch dazu beitragen, eine Hypokalzämie sicherer zu diagnostizieren und Verbesserungen in den Prophylaxemaßnahmen zu erreichen.

4.3.2. Einsatz von mentholhaltigen PBLC als Futterzusatzstoff, Einfluss auf den Kalziumhaushalt und Leistungsparameter

In mehreren Studien wurde bereits ein positiver Effekt von mentholhaltigen PBLC als Futterzusatzstoff nachgewiesen. Unterschiedliche Untersuchungen zeigten dabei eine Steigerung der Kalziumkonzentration im Blut und einen Einfluss auf Futteraufnahme und Milchmenge. Einige dieser Ergebnisse konnten auch durch unsere Studie bestätigt werden, wobei allerdings ein Rasseeffekt zwischen Holstein Friesian und Braunvieh beachtet werden muss. Einen positiven Effekt auf den Kalziumhaushalt in der frühen Laktationsphase konnten wir bei der Rasse Holstein Friesian nachweisen, nicht jedoch beim Braunvieh. Eine Erhöhung von 0,05 mmol/l zeigte sich beim iCa der Holstein-Tiere durch Verabreichung des PBLC in den ersten drei Tagen nach der Kalbung, 0,03 mmol/L über den gesamten Versuchszeitraum. Insbesondere bei Tieren, die für Hypokalzämie und dadurch bedingten Folgeerkrankungen anfällig sind, könnte sich bereits eine geringe Erhöhung des iCa-Wertes positiv auswirken. Der in unserer Studie schon hohe Kalzium-Grundwert könnte zudem die nur leicht ansteigende Kalziumwerte erklären. Auch bei der Prävalenz für Hypokalzämie war ein positiver Effekt bei Holstein Friesian sichtbar, wenn auch nicht statistisch absicherbar. Die bereits bekannte unterschiedliche Anfälligkeit für Hypokalzämie ist eine mögliche Ursache für die Unterschiede zwischen den Rassen. Als Erklärung für den positiven Effekt auf den Kalziumhaushalt bei den Holstein Friesian dient die in einigen Studien bereits nachgewiesene Steigerung der Resorptionsleistung von Kalzium durch TRP-Kanäle bei Anwendung von Menthol (Rosendahl et al. 2016; Braun et al. 2019; Geiger et al. 2021). Weitere Versuche sind nötig um eine genauere Aussage bzgl. der Unterschiede zwischen Braunvieh und Holstein- Friesian bei Verabreichung eines PBLC-haltigen Futterzusatzstoffes zu treffen.

Bei Holstein Friesian und Braunvieh konnte eine Steigerung der Milchmenge bei gleichbleibender Milchezusammensetzung und ein Einfluss auf den BCS in den Fütterungsgruppen festgestellt werden. Eine mögliche Ursache liegt in der Steigerung der Futteraufnahme durch Menthol, wie es in einigen Studien bereits nachgewiesen wurde. Insgesamt kann man die bereits in der Mittel- und Spätlaktation beschriebenen positiven Effekte von Menthol somit auch in der frühen Laktation nachweisen. Einschränkend muss anerkannt werden, dass die Ergebnisse aufgrund der im Versuch stattgefundenen Reduzierung der Stichprobengröße eine weitere Validierung erfahren sollten. Insbesondere bei Tieren der Rasse Holstein Friesian sollte eine Prävention der Hypokalzämie durch die Verfütterung von Menthol weitergehend untersucht und diskutiert werden.

5. Zusammenfassung

Effekt von Menthol als Vertreter der bioaktiven Pflanzenlipide in der Hypokalzämieprophylaxe bei frühlaktierenden Milchkühen mit besonderer Fokussierung auf das ionisierte Kalzium

Die Hypokalzämie der Milchkuh ist ein großes Problem im peripartalen Zeitraum. Entscheidend für die Diagnostik ist eine sichere Bestimmung der Kalziumkonzentration. In der Praxis ist nach wie vor die Bestimmung des Gesamtkalziums (tCa) weit verbreitet, obwohl einige Studien zu dem Ergebnis kamen, dass eine verlässliche Aussage nur durch die Bestimmung des ionisierten Kalziums (iCa) erbracht werden kann. Einige Untersuchungen wiesen bereits darauf hin, dass es zu einer Änderung des iCa-Anteils am tCa um den Geburtszeitraum kommt. Diese Feststellung sollte in unserer Studie für Kühe ohne gezielte Hypokalzämieprophylaxe geprüft werden. Unser Ziel war es zudem, unter Berücksichtigung verschiedener Blutkennwerte ein Modell zur Vorhersage von iCa aus tCa unter Verwendung multivariabler Regressionen zu erstellen. Dazu wurden die Blutwerte für Blutgase sowie verschiedene Elektrolyte, Enzyme und Metaboliten von 14 Kühen der Rasse Holstein Friesian verwendet. Alle Kühe waren klinisch gesund und erhielten keine Hypokalzämieprophylaxe oder -therapie. Die Blutentnahme erfolgte an den Tagen -2, 0, 2, 4, 7 in Bezug auf die Abkalbung. Bestimmt wurden tCa, iCa, Albumin, Gesamtprotein, Blutgase, einige Enzyme und Elektrolyte. Zunächst wurde eine lineare Regression zwischen iCa und tCa modelliert, deren Vorhersagekraft unbefriedigend war. Eine leichte Verbesserung ergab sich durch die Verwendung eines multivariablen Modells mit weiteren Blutkennwerten. Die Präzision konnte anschließend bei einem multivariablen Modell zur Schätzung des iCa:tCa-Verhältnisses mit Verwendung weiterer Faktoren (nicht veresterte Fettsäuren, Beta-Hydroxybuttersäure, Cholesterin, Phosphor) verbessert werden. Insgesamt zeigte sich die Vorhersagekraft jedoch auch mit dem verbesserten Modell als unbefriedigend. Ursächlich waren relative Veränderungen von iCa und tCa um den Kalbungszeitraum. Dies wurde anhand einer Kalibrierung der relativen Veränderungen von iCa und tCa auf die jeweiligen Werte von Tag -2 (=100%) nachgewiesen. Es konnte eine Zunahme des iCa:tCa-Verhältnisses von 0,43 am Tag -2 auf 0,48 am Tag 0 beobachtet werden, sowie ein langsamer Rückgang auf 0,43 bis zum Tag 7. Damit lässt sich bestätigen, dass es um die Kalbung zu einer Verschiebung des Verhältnisses zwischen iCa und tCa kommt. Die generelle Annahme, dass das iCa 50% des tCa beträgt, erwies sich somit als höchst unpräzise. Auch die Vorhersage durch ein Modell mit Einbeziehung weiterer Blutkennwerte ist unbefriedigend. Um eine genaue Aussage über den Kalziumhaushalt zu treffen, erscheint es sinnvoll direkt das iCa zu bestimmen. Hierbei ist eine standardisierte

Heparinisierung des frischen Vollblutes vorzunehmen, da es durch Erhöhungen der Heparinkonzentration zu erniedrigten Werten für iCa kommt.

In einem weiteren Versuch widmeten wir uns der Prophylaxe der Hypokalzämie mittels eines PBLC-haltigen Futterzusatzstoffes. Einige Studien weisen darauf hin, dass das PBLC Menthol die Eigenschaft besitzt, die Kalziumaufnahme im Pansen zu erhöhen. In der statistischen Auswertung unserer Studie verwendeten wir insgesamt 29 Tiere der Rasse Braunvieh (BS) und 41 Tiere der Rasse Holstein Friesian (HF). Die Tiere wurden nach Rasse in je eine Kontroll- und Fütterungsgruppe geteilt. Letztere erhielt von 8 Tagen vor dem erwarteten Abkalben bis 80 Tage nach dem Abkalben 1,7 g/d mentholreiches PBLC.

Untersucht wurden die Auswirkungen auf Blutmineralien, Milchleistung und Milchezusammensetzung sowie der Effekt auf den Body Condition Score (BCS) in der peripartalen Periode. Eine signifikante Rasse x Behandlungs-Interaktion zeigte sich für iCa, die auf einer Erhöhung des iCa um $0,03 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ausschließlich bei den HF-Tieren beruhte. Bei der Prävalenz für subklinische Hypokalzämie war ebenfalls nur bei den HF-Tieren ein positiver Effekt durch die Fütterung erkennbar, der aufgrund der geringen Gruppengröße jedoch nicht statistisch absicherbar war. Die Beschränkung des Effektes auf den Kalziumhaushalt von HF-Tieren könnte in der geringeren Anfälligkeit des BS gegenüber Hypokalzämie begründet sein. Einen direkten Einfluss auf den BCS konnte die Behandlung nicht zeigen. Auffällig war jedoch, dass sich die PBLC-supplementierten HF- und BS-Gruppen nicht voneinander unterschieden, während die Kontrollgruppe der HF eine deutlichere Abnahme des BCS nach der Kalbung zeigte als die Kontrollgruppe des BS. Dies deutet bei PBLC-supplementierten HF-Tieren auf eine besseren Kompensation der negativen Auswirkungen einer höheren Milchleistung in Bezug auf die Körperkondition hin. Einen positiven Einfluss zeigte die Fütterung des PBLC auf die Milchleistung beider Rassen. Die Milchezusammensetzung blieb davon unberührt. Ursache ist hier wahrscheinlich eine erhöhte Futterraufnahme durch die Zugabe von PBLC, was jedoch einer weiteren Abklärung bedarf.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass der Einsatz des mentholhaltigen PBLC die Kalziumkonzentration im Blut von HF-Kühen im Zeitraum von 4 Wochen nach der Geburt positiv beeinflussen kann. Zudem wird die Milchleistung sowohl bei den HF-Tieren als auch bei den BS-Tieren erhöht.

6. Summary

Effect of menthol from the group of plant bioactive lipid compounds in hypocalcemia prophylaxis of early lactating dairy cows with special focus on ionized calcium

Hypocalcemia of dairy cows is a very important problem in the peripartum period. A reliable determination of the calcium concentration is essential for diagnosis. In practice, the determination of total calcium (tCa) is still frequently used although some studies indicated that a valid assessment can be made only by the determination of ionized calcium (iCa). Some studies already indicated that there is a change in the proportion of iCa in tCa around calving. The latter proposition was to be tested in our study for cows without specific hypocalcemia prophylaxis. Our further aim also to create a model for predicting iCa from tCa using multivariable regressions, considering concentrations of albumin and total protein, blood gases, as well as different electrolytes, enzymes and metabolites. For this study, 14 cows of Holstein Friesian were sampled, all of which were clinically healthy and not receiving hypocalcemia prophylaxis or therapy. Blood sampling was performed on days -2, 0, 2, 4, 7 relative to calving. Initially, linear regression was modelled but its predictive power was unsatisfactory. A slight improvement was obtained by using a multivariable model with additional blood values. In a further attempt, precision was improved in a multivariable model estimating the iCa:tCa ratio with the use of additional factors (nonesterified fatty acids, beta-hydroxybutyric acid, cholesterol, phosphorus).

Overall, however, the predictive power the multivariable models was also unsatisfactory. The reason could be found in relative changes of iCa and tCa around the calving period. This was demonstrated using a calibration of the relative changes of iCa and tCa to the respective values of day -2 (=100%). An increase in the iCa:tCa ratio from 0.43 at day -2 to 0.48 at day 0 was observed, followed by a slow decrease to 0.43 until day 7, suggesting that there is a shift in the ratio between iCa and tCa around calving. Thus, the literature assumption that iCa is 50% of tCa could not be confirmed. Prediction by a model with inclusion of other blood values was also unsatisfactory. In order to make a precise prediction of the calcium status, it seems useful to determine the iCa directly. Decisive for the determination of the iCa is a standardized heparinization of blood because increased heparin concentrations lead to lower measurement values of iCa.

In another experiment, we focused on the prophylaxis of hypocalcemia using a feed additive containing PBLC. Some studies indicated that the PBLC menthol has the effect of increasing calcium absorption in the rumen. In the statistical analysis of our study, we used a total of 29 animals of the Brown Swiss (BS) and 41 animals of the Holstein Friesian (HF) breeds. The

animals of each breed were divided into a control and a feeding group. The latter group received 1.7 g/d of menthol-rich PBLC from 8 days before expected calving to 80 days after calving. The effects on blood minerals, milk yield, and milk composition, as well as the effect on body condition score (BCS) in the peripartum period were analyzed. A significant breed x treatment interaction was seen for iCa, evidenced by a $0.03 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ increase in iCa in HF animals only. A positive effect of PBLC feeding was also indicated regarding the prevalence for subclinical hypocalcemia, in the HF animals; however, this could not be validated statistically because of the low sample size. The restriction of PBLC effects to the calcium balance HF cows could be suspected to be due to the lower predisposition of the BS breed to hypocalcemia. The treatment did not have a direct effect on BCS. However, it was obvious that the PBLC-fed HF and BS feeding groups did not differ from each other whereas the HF control group lost more body condition after calving compared to the BS control group. This may be taken as an indication that PBLC-fed HF animals could better compensate the negative effects of higher milk yield on body condition.

A positive effect was shown by feeding the PBLC on the milk yield of both breeds. The milk composition was unaffected. This is possibly caused by increased feed intake due to the addition of PBLC, but this requires further investigation.

In conclusion, the use of the menthol-containing PBLC can positively influence the blood calcium concentration of HF cows in the period around calving. In addition, it increases milk yield in both HF and BS animals.

7. Literaturverzeichnis

Agnes F, Sartorelli P, Bisso M C und Dominoni S (1993):

Ionized calcium in calf serum: relation to total serum calcium, albumin, total protein and pH. *J. Vet. Med. A* 40, 605-608. doi: 10.1111/j.1439-0442.1993.tb00673.x.

Alavi N, Hussain W, Asghar A, Yasmeen F, Butt T und Mumtaz A (2015):

Comparison of ionized calcium and albumin corrected total calcium concentration in renal failure patients at shalamar hospital lahore. *Pak. J. Med. Health Sci.* 9, 4.

Allen W M und Davies D C (1981):

Milk fever, hypo-magnesaemia and the 'downer cow' syndrome. *Br. Vet. J.* 137, 435-441. doi: 10.1016/S0007-1935(17)31644-5.

Anand P (2003):

Capsaicin and menthol in the treatment of itch and pain: recently cloned receptors provide the key.

Gut 52, 1233-1235. doi: 10.1136/gut.52.9.1233.

Andersen J B, Madsen T G, Larsen T, Ingvarsen K L und Nielsen M O (2005):

The effects of dry period versus continuous lactation on metabolic status and performance in periparturient cows.

J. Dairy Sci. 88, 3530-3541. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)73038-1.

Ando S, Nishida T, Ishida M, Hosoda K und Bayaru E (2003):

Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. *Livest. Prod. Sci.* 82, 245-248. doi: 10.1016/S0301-6226(03)00012-5.

Andrade E L, Ferreira J, André E und Calixto J B (2006):

Contractile mechanisms coupled to TRPA1 receptor activation in rat urinary bladder. *Biochem. Pharmacol.* 72, 104-114. doi: 10.1016/j.bcp.2006.04.003.

Aubrey T C (2017):

Evaluation of supplementing brewer's yeast to lactating dairy cows. *Electronic Theses and Dissertations, South Dakota State University*

ISBN: 1-369-85063-8

Bacic D, LeHir M, Biber J, Kaissling B, Murer H und Wagner C A (2006):

The renal Na⁺/phosphate cotransporter NaPi-IIa is internalized via the receptor-mediated endocytic route in response to parathyroid hormone.

Kidney Int. 69, 495-503. doi: 10.1038/sj.ki.5000148.

Baird G S (2011):

Ionized calcium.

Clin. Chim. Acta 412, 696-701. doi: 10.1016/j.cca.2011.01.004.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D und Idaomar M (2008):

Biological effects of essential oils – a review.

Food. Chem. Toxicol. 46, 446-475. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106.

Balda M S und Matter K (1998):
Tight junctions.

J. Cell Sci. 111, 541-547. doi: 10.1242/jcs.111.5.541.

Ballantine H T und Herbein J H (1991):

Potentiometric determination of ionized and total calcium in blood plasma of holstein and jersey cows.

J. Dairy Sci. 74, 446-449. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78190-3.

Bandzaite V, Klimiene I, Spakauskas V und Matusevicius A (2005):

Interaction between the levels of hormones and minerals in sera of healthy and sick cows. Pol. J. Vet. Sci. 8, 269-274.

Barrett E J und Barrett P (2016):

The parathyroid glands and vitamin D.

In: Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach. W. Boron und E. Boulpaep. Philadelphia, Saunders, Elsevier. 3. Auflage. S. 1054-1071

ISBN: 9781437717532

Barton B A, Jorgensen N A und DeLuca H F (1987):

Impact of prepartum dietary phosphorus intake on calcium homeostasis at parturition.

J. Dairy Sci. 70, 1186-1191. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(87)80130-3.

Bauer P J (1980):

Affinity and stoichiometry of calcium binding by arsenazo III.

Anal. Biochem. 110, 12. doi: 10.1016/0003-2697(81)90112-3.

Bäumli D (2014):

Vorkommen und Bedeutung von Normokalzämien bei post partum festliegenden Kühen. Dissertation, Universität Leipzig

Bautista D M, Siemens J, Glazer J M, Tsuruda P R, Basbaum A I, Stucky C L, Jordt S-E und Julius D (2007):

The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold.

Nature 448, 204-208. doi: 10.1038/nature05910.

Ben-Ghedalia D, Tagari H und Geva A (1982):

Absorption by sheep of calcium, phosphorus and magnesium from a poultry litter supplemented diet.

J. Agric. Sci. 98, 85-88. doi: doi.org/10.1017/S0021859600041137

Benchaar C, Calsamiglia S, Chaves A V, Fraser G R, Colombatto D, McAllister T A und Beauchemin K A (2008):

A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production.

Anim. Feed Sci. Technol. 145, 209-228. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.04.014.

Biswas C K, Ramos J M und Kerr D N S (1981):

Heparin effect on ionised calcium concentration.

Clin. Chim. Acta 116, 343-347. doi: dx.doi.org/10.1016/0009-8981(81)90053-X.

Björkman M P, Sorva A J und Tilvis R S (2009):

Calculated serum calcium is an insufficient surrogate for measured ionized calcium.

Arch. Gerontol. Geriatr. 49, 348-350. doi: 10.1016/j.archger.2008.11.014.

Boink A B T J, Buckley B M, Christiansen T F, Covington A K, Maas A H J, Müller-Plathe O, Sachs C und Siggaard-Andersen O (1991):

IFCC recommendation on sampling, transport and storage for the determination of the concentration of ionized calcium in whole blood, plasma and serum.

J. Automat. Chem. 13, 235-239. doi: 10.1155/S1463924691000391.

Boonen B, Startek J B und Talavera K (2016):

Chemical activation of sensory TRP channels.

In: Taste and Smell. Topics in Medicinal Chemistry Vol. 23. D. Krautwurst, Springer International Publishing. 1. Auflage: S. 73-113

ISBN: 978-3-319-48925-4

Bouillon R, Van Cromphaut S und Carmeliet G (2003):

Intestinal calcium absorption: molecular vitamin D mediated mechanisms.

J. Cell. Biochem. 88, 332-339. doi: 10.1002/jcb.10360.

Boyan B D, Dean D D, Sylvia V L und Schwartz Z (1994):

Nongenomic regulation of extracellular matrix events by vitamin D metabolites.

J. Cell. Biochem. 56, 331-339. doi: 10.1002/jcb.240560309.

Boyce B F, Rosenberg E, de Papp A E und Duong L T (2012):

The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease.

Eur. J. Clin. Invest. 42, 1332-1341. doi: 10.1111/j.1365-2362.2012.02717.x.

Boyle W J, Simonet W S und Lacey D L (2003):

Osteoclast differentiation and activation.

Nature 423, 337-342. doi: 10.1038/nature01658.

Braun H-S, Schrapers K T, Mahlkow-Nerge K, Stumpff F und Rosendahl J (2019):

Dietary supplementation of essential oils in dairy cows: evidence for stimulatory effects on nutrient absorption.

Animal 13, 518-523. doi: 10.1017/S1751731118001696.

Breves G und Schröder B (2005):

Vergleichende Aspekte der gastrointestinalen Calcium-Umsetzungen beim Schwein und Wiederkäuer.

Lohmann Information 26, 1-3.

Brobst D (1983):

Pathophysiologic and adaptive changes in acid-base disorders.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 183, 773.

Bronner F (1987):

Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications.

J. Nutr. 117, 1347-1352. doi: 10.1093/jn/117.8.1347.

Bronner F (1990):

Intestinal calcium transport: the cellular pathway.

Miner. Electrolyte Metab. 16, 94-100.

Bronner F und Pansu D (1999):

Nutritional aspects of calcium absorption.

J. Nutr. 129, 4. doi: 10.1093/jn/129.1.9.

- Brown A J, Krits I und Armbrecht H J (2005):
Effect of age, vitamin D, and calcium on the regulation of rat intestinal epithelial calcium channels.
Arch. Biochem. Biophys. 437, 51-58. doi: 10.1016/j.abb.2005.02.007.
- Buckley B M und Russell L J (1988):
The measurement of ionised calcium in blood plasma.
Ann. Clin. Biochem. 25, 447-465. doi: 10.1177/000456328802500501.
- Burnett R W, Christiansen T F, Covington A K, Fogh-Andersen N, Külpmann W R, Lewenstam A, Maas A H J, Müller-Plathe O, Sachs C, Siggaard-Andersen O, L.VanKessel A und Zijlstra W G (2000):
IFCC recommended reference method for the determination of the substance concentration of ionized calcium in undiluted serum, plasma or whole blood.
Clin. Chem. Lab. Med. 38, 1301-1314. doi: 10.1515/CCLM.2000.206.
- Burt S (2004):
Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review.
Int. J. Food Microbiol. 94, 223-253. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- Bushinsky D A, Riera G S, Favus M J und Coe F L (1985):
Evidence that blood ionized calcium can regulate serum 1,25(OH)₂D₃ independently of parathyroid hormone and phosphorus in the rat.
J. Clin. Invest. 76, 1599-1604. doi: 10.1172/JCI112143.
- Caixeta L S, Ospina P A, Capel M B und Nydam D V (2015):
The association of subclinical hypocalcemia, negative energy balance and disease with bodyweight change during the first 30 days post-partum in dairy cows milked with automatic milking systems.
J. Vet. Med. 204, 150-156. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.01.021.
- Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo P W, Castillejos L und Ferret A (2007):
Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation.
J. Dairy Sci. 90, 2580-2595. doi: 10.3168/jds.2006-644.
- Capper J L und Cady R A (2012):
A comparison of the environmental impact of jersey compared with holstein milk for cheese production.
J. Dairy Sci. 95, 165-176. doi: 10.3168/jds.2011-4360.
- Care A D, Brown R C, Farrar A R und Pickard D W (1984):
Magnesium absorption from the digestive tract of sheep.
Q. J. Exp. Physiol. 69, 577-587. doi: 10.1113/expphysiol.1984.sp002844.
- Carroll S M, DePeters E J, Taylor S J, Rosenberg M, Perez-Monti H und Capps V A (2006):
Milk composition of holstein, jersey, and brown swiss cows in response to increasing levels of dietary fat.
Anim. Feed Sci. Technol. 131, 451-473. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.06.019.
- Caterina M J, Schumacher M A, Tominaga M, Rosen T A, Levine J D und Julius D (1997):
The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway.
Nature 389, 816-824. doi: 10.1038/39807.

- Chamberlin W G, Middleton J R, Spain J N, Johnson G C, Ellersieck M R und Pithua P (2013):
Subclinical hypocalcemia, plasma biochemical parameters, lipid metabolism, postpartum disease, and fertility in postparturient dairy cows.
J. Dairy Sci. 96, 7001-7013. doi: 10.3168/jds.2013-6901.
- Chapinal N, Carson M, Duffield T F, Capel M, Godden S, Overton M, Santos J E P und LeBlanc S J (2011):
The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period.
J. Dairy Sci. 94, 4897-4903. doi: 10.3168/jds.2010-4075.
- Charbonneau E, Pellerin D und Oetzel G R (2006):
Impact of lowering dietary cation-anion difference in nonlactating dairy cows: a meta-analysis.
J. Dairy Sci. 89, 537-548. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72116-6.
- Chiwome B, Kandiwa E, Mushonga B, Sajeni S und Habarugira G (2017):
A study of the incidence of milk fever in jersey and holstein cows at a dairy farm in beatrice, zimbabwe.
J. S. Afr. Vet. Assoc. 88, 1-6. doi: 10.4102/jsava.v88i0.1457.
- Chowdhury S, Mandal G P, Patra A K, Kumar P, Samanta I, Pradhan S und Samanta A K (2018):
Different essential oils in diets of broiler chickens: 2. Gut microbes and morphology, immune response, and some blood profile and antioxidant enzymes.
Anim. Feed Sci. Technol. 236, 39-47. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2017.12.003.
- Christakos S, Mady L J und Dhawan P (2018):
Calbindin-D 28K and calbindin-D 9K and the epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6.
In: Vitamin D. D. Feldman. London, England, Academic Press. 4. Auflage: S. 343-359
ISBN: 978-0-12-809965-0
- Clapham D E (2003):
TRP channels as cellular sensors.
Nature 426, 517-524. doi: 10.1038/nature02196.
- Clapham D E, Montell C, Schultz G und Julius D (2003):
International union of pharmacology. XLIII. compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels.
Pharmacol. Rev. 55, 591-596. doi: 10.1124/pr.55.4.6.
- Clapham D E, Runnels L W und Strübing C (2001):
The trp ion channel family.
Nat. Rev. Neurosci. 2, 387-396. doi: 10.1038/35077544.
- Coffey M P, Simm G und Brotherstone S (2002):
Energy balance profiles for the first three lactations of dairy cows estimated using random regression.
J. Dairy Sci. 85, 2669-2678. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74352-X.
- Colburn R W, Lubin M L, Stone D J, Wang Y, Lawrence D, D'Andrea Michael R, Brandt M R, Liu Y, Flores C M und Qin N (2007):
Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice.
Neuron 54, 379-386. doi: 10.1016/j.neuron.2007.04.017.

- Constable P, Trefz F M und Stämpfli H (2019):
Effects of pH and the plasma or serum concentrations of total calcium, chloride, magnesium, l-lactate, and albumin on the plasma ionized calcium concentration in calves.
J. Vet. Intern. Med. 33, 1822-1832. doi: 10.1111/jvim.15509.
- Constable P D, Gelfert C-C, Füll M, Staufenbiel R und Stämpfli H R (2009):
Application of strong ion difference theory to urine and the relationship between urine pH and net acid excretion in cattle.
Am. J. Vet. Res. 70, 915-925. doi: 10.2460/ajvr.70.7.915.
- Correa M T, Erb H und Scarlett J (1993):
Path analysis for seven postpartum disorders of holstein cows.
J. Dairy Sci. 76, 1305-1312. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(93)77461-5.
- Cox V S, Marsh W E, Steuernagel G R, Fletcher T F und Onapito J S (1986):
Downer cow occurrence in minnesota dairy herds.
Prev. Vet. Med. 4, 249-260. doi: 10.1016/0167-5877(86)90027-9.
- Cox V S, McGrath C J und Jorgensen S E (1982):
The role of pressure damage in pathogenesis of the downer cow syndrome.
Am. J. Vet. Res. 43, 26-31.
- Croteau R, Kutchan T M und Lewis N G (2015):
Natural products In: Biochemistry and molecular biology of plants. B. Buchanan, W. Gruissem und R. L. Jones. Chicester, Wiley-Blackwell 2. Auflage: S. 1132-1205
ISBN: 978-1-118-50219-8
- Curtis C R, Erb H N, Sniffen C J, Smith R D und Kronfeld D S (1985):
Path analysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders, and mastitis in holstein cows.
J. Dairy Sci. 68, 2347-2360. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(85)81109-7.
- Curtis R A, Cote J F, Mclennan M C, Smart J F und Rowe R C (1978):
Relationship of methods of treatment to relapse rate and serum levels of calcium and phosphorous in parturient hypocalcaemia.
Can. Vet J. 19, 4.
- Dambacher M A, Schacht E und Krämer G (2006):
Parathormon–Vitamin D–D-Hormone– Calcitonin.
Zeitschrift für Epileptol. 19, 176-182. doi: 10.1007/s10309-006-0215-z.
- Daniel R C W und Moodie E W (1979):
Induced hypocalcaemia in cows and sheep. I. changes in plasma inorganic phosphorus levels.
Br. Vet. J. 135, 440-451. doi: 10.1016/S0007-1935(17)32790-2.
- Danner J, Ridgway M D, Rubin S I und Le Boedec K (2017):
Development of a multivariate predictive model to estimate ionized calcium concentration from serum biochemical profile results in dogs.
J. Vet. Intern. Med. 31, 1392-1402. doi: 10.1111/jvim.14800.
- Daros R R, Hötzel M J, Bran J A, LeBlanc S J und von Keyserlingk M A G (2017):
Prevalence and risk factors for transition period diseases in grazing dairy cows in brazil.
Prev. Vet. Med. 145, 16-22. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.06.004.

- Daviet L und Schalk M (2010):
Biotechnology in plant essential oil production: progress and perspective in metabolic engineering of the terpene pathway.
Flavour Fragr. J. 25, 123-127. doi: 10.1002/ffj .1981.
- DeGaris P J und Lean I J (2008):
Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles.
J. Vet. Med. 176, 58-69. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.12.029.
- Den Dekker E, Hoenderop J G J, Nilius B und Bindels R J M (2003):
The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation.
Cell Calcium 33, 497-507. doi: 10.1016/S0143-4160(03)00065-4.
- Deniz A (2022):
Blood ions and total calcium in dairy cows: a correlation paradox.
Anat. Physiol. 12, 377.
- Dickinson F N, McDaniel B T und McDowell R E (1969):
Comparative efficiency of feed utilization during first lactation of ayrshire, brown swiss, and holstein cows.
J. Dairy Sci. 52, 489-497. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(69)86593-8.
- Dorman H J D und Deans S G (2000):
Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils.
J. Appl. Microbiol. 88, 308-316. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x.
- Dreyer M (2011):
Serum total calcium, ionised calcium and corrected total calcium concentrations in kwashiorkor and nephrotic syndrome patients.
Med. Technol. SA 25, 29-32. doi: 10.10520/EJC74267.
- Duffield T F (2006):
Minimizing subclinical metabolic diseases in dairy cows.
Adv. Dairy Technol 18, 43-55.
- Dusso A, Brown A und Slatopolsky E (2005):
Vitamin D and renal failure.
Am. J. Physiol. Renal Physiol. 289, F8–F28.
- Eder K und Grundmann S M (2022):
Vitamin D in dairy cows: metabolism, status and functions in the immune system.
Arch. Anim. Nutr. 76, 1-33. doi: 10.1080/1745039X.2021.2017747.
- El-Samad H, Goff J P und Khammash M (2002):
Calcium homeostasis and parturient hypocalcemia: an integral feedback perspective.
J. Theor. Biol. 214, 17-29. doi: 10.1006/jtbi.2001.2422.
- Ender F, Dishington I W und Helgebostad A (1971):
Calcium balance studies in dairy cows under experimental induction and prevention of hypocalcaemic paresis puerperalis.
Z. Tierphysiol., Tierernährg. u. Futtermittelkd. 28, 233-256. doi: 10.1111/j.1439-0396.1971.tb01573.x.

Erb H N und Grohn Y T (1988):

Epidemiology of metabolic disorders in the periparturient dairy cow.
J. Dairy Sci. 71, 2557-2571. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(88)79845-8.

Erb H N, Smith R D, Oltenacu P A, Guard C L, Hillman R B, Powers P A, Smith M C und White M E (1985):

Path model of reproductive disorders and performance, milk fever, mastitis, milk yield, and culling in holstein cows.
J. Dairy Sci. 68, 3337-3349. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(85)81244-3.

Farco J A und Grundmann O (2013):

Menthol – pharmacology of an important naturally medicinal “cool”.
Mini Rev. Med. Chem. 13, 124-131. doi: 10.2174/138955713804484686.

Feher J J, Fullmer C S und Wasserman R H (1992):

Role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption.
Am. J. Physiol. Cell Physiol. 262, C517-C526. doi: 10.1152/ajpcell.1992.262.2.C517.

Fleischer P, Metzner M, Beyerbach M, Hoedemaker M und Klee W (2001):

The relationship between milk yield and the incidence of some diseases in dairy cows.
J. Dairy Sci. 84, 2025-2035. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74646-2.

Floyd R und Wray S (2007):

Calcium transporters and signalling in smooth muscles.
Cell Calcium 42, 467-476. doi: 10.1016/j.ceca.2007.05.011.

Forman D T und Lorenzo L (1991):

Ionized calcium: its significance and clinical usefulness.
Ann. Clin. Lab. Sci. 21, 297-304.

Fraser D R und Kodicek E (1973):

Regulation of 25-hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase activity in kidney by parathyroid hormone.
Nat. New Biol. 241, 163-166.

Fudge N J und Kovacs C S (2004):

Physiological studies in heterozygous calcium sensing receptor (CaSR) gene-ablated mice confirm that the CaSR regulates calcitonin release in vivo.
BMC Physiol. 4.1, 1-6.

Furie B (2005):

Thrombus formation in vivo.
J. Clin. Invest. 115, 3355-3362. doi: 10.1172/JCI26987.

Fürll M (2011):

Prophylaxe von Herden- bzw. Produktionskrankheiten: Abstracts.
1. Auflage, S. 75-79, Leipzig, Merkur
ISBN: 978-3-00-035876-0

Galeotti N, Di Cesare Mannelli L, Mazzanti G, Bartolini A und Ghelardini C (2002):

Menthol: a natural analgesic compound.
Neurosci. Lett. 322, 145-148. doi: 10.1016/S0304-3940(01)02527-7.

- Galeotti N, Ghelardini C, Di Cesare Mannelli L, Mazzanti G, Baghiroli L und Bartolini A (2001):
Local anaesthetic activity of (+)- and (-)-menthol.
Planta Med. 67, 174-176. doi: 10.1055/s-2001-11515.
- Gaynor P J, Mueller F J, Miller J K, Ramsey N, Goff J P und Horst R L (1989):
Parturient hypocalcemia in jersey cows fed alfalfa haylage-based diets with different cation to anion ratios.
J. Dairy Sci. 72, 2525-2531. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79392-9.
- Geiger S, Patra A K, Schrapers K T, Braun H S und Aschenbach J R (2021):
Menthol stimulates calcium absorption in the rumen but not in the jejunum of sheep.
J. Dairy Sci. 104, 3067-3081.
- Gelfert C C, Zarrath M, Eustermann S und Staufenbiel R (2004):
Monitoring the use of acidogenic salts in dairy cow herd by analysis of feed and urine.
Prakt. Tierarzt 85, 422-430.
- Gentili C, Morelli S und Boland A R d (2003):
Characterization of PTH/PTHrP receptor in rat duodenum: effects of ageing.
J. Cell. Biochem. 88, 1157-1167. doi: 10.1002/jcb.10472.
- Gerhold K A und Bautista D M (2009):
Molecular and cellular mechanisms of trigeminal chemosensation.
Ann. N Y Acad. Sci. 1170, 184-189. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.03895.x.
- Ghijzen W E J M, De Jong M D und Van Os C H (1982):
ATP-dependent calcium transport and its correlation with Ca²⁺-ATPase activity in basolateral plasma membranes of rat duodenum.
Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 689, 327-336. doi: 10.1016/0005-2736(82)90266-8.
- Ghijzen W E J M, de Jong M D und van Os C H (1983):
Kinetic properties of Na⁺/Ca²⁺ exchange in basolateral plasma membranes of rat small intestine.
Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 730, 85-94. doi: 10.1016/0005-2736(83)90320-6.
- Giannenas I, Skoufos J, Giannakopoulos C, Wiemann M, Gortzi O, Lalas S und Kyriazakis I (2011):
Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in chios dairy ewes.
J. Dairy Sci. 94, 5569-5577. doi: 10.3168/jds.2010-4096.
- Gild C, Alpert N und Van Straten M (2015):
The influence of subclinical hypocalcemia on production and reproduction parameters in israeli dairy herds.
Isr. J. Vet. Med. 70, 16-21.
- Glatz-Hoppe J S (2019):
Weiterentwicklung von Bewertungswerkzeugen zur Charakterisierung der Versorgungssituation von Milchkühen mittels Daten aus der Milchkontrolle.
Dissertation, Universität Rostock. doi: 10.18453/ROSDOK_ID00002796.
- Goff J P (1999):
Treatment of calcium, phosphorus, and magnesium balance disorders.
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 15, 619-639. doi: 10.1016/S0749-0720(15)30167-5.

- Goff J P (2000):
Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders.
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 16, 319-337. doi: 10.1016/S0749-0720(15)30108-0.
- Goff J P (2006):
Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders.
Anim. Feed Sci. Technol. 126, 237-257. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2005.08.005.
- Goff J P (2008):
The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows.
J. Vet. Med. 176, 50-57. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.12.020.
- Goff J P (2014):
Calcium and magnesium disorders.
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 30, 359-381. doi: 10.1016/j.cvfa.2014.04.003.
- Goff J P (2018):
Invited review: mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status.
J. Dairy Sci. 101, 2763-2813. doi: 10.3168/jds.2017-13112.
- Goff J P und Horst R L (1993):
Oral administration of calcium salts for treatment of hypocalcemia in cattle.
J. Dairy Sci. 76, 101-108. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(93)77328-2.
- Goff J P und Horst R L (1994):
Calcium salts for treating hypocalcemia: carrier effects, acid-base balance, and oral versus rectal administration.
J. Dairy Sci. 77, 1451-1456. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(94)77083-1.
- Goff J P und Horst R L (1998):
Use of hydrochloric acid as a source of anions for prevention of milk fever.
J. Dairy Sci. 81, 2874-2880. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75847-3.
- Goff J P und Horst R L (2003):
Role of acid-base physiology on the pathogenesis of parturient hypocalcaemia (milk fever)–the DCAD theory in principle and practice.
Acta Vet. Scand. Suppl. 97, 51-56.
- Goff J P, Horst R L, Jardon P W, Borelli C und Wedam J (1996):
Field trials of an oral calcium propionate paste as an aid to prevent milk fever in periparturient dairy cows.
J. Dairy Sci. 79, 378-383. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(96)76375-0.
- Goff J P, Horst R L, Mueller F J, Miller J K, Kiess G A und Dowlan H H (1991a):
Addition of chloride to a prepartal diet high in cations increases 1,25-dihydroxyvitamin D response to hypocalcemia preventing milk fever.
J. Dairy Sci. 74, 3863-3871. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78579-2.
- Goff J P, Horst R L und Reinhardt T A (1987):
The pathophysiology and prevention of milk fever.
Vet. Med. 82, 943-950.

- Goff J P und Koszewski N J (2018):
Comparison of 0.46% calcium diets with and without added anions with a 0.7% calcium anionic diet as a means to reduce periparturient hypocalcemia.
J. Dairy Sci. 101, 5033-5045. doi: 10.3168/jds.2017-13832.
- Goff J P, Reinhardt T A, Beitz D C und Horst R L (1995a):
Breed affects tissue vitamin D receptor concentration in periparturient dairy cows: a milk fever risk factor.
J. Dairy Sci. 78, Suppl 1, 184.
- Goff J P, Reinhardt T A und Horst R L (1991b):
Enzymes and factors controlling vitamin D metabolism and action in normal and milk fever cows.
J. Dairy Sci. 74, 4022-4032. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78597-4.
- Goff J P, Reinhardt T A und Horst R L (1995b):
Milk fever and dietary cation-anion balance effects on concentration of vitamin D receptor in tissue of periparturient dairy cows.
J. Dairy Sci. 78, 2388-2394. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(95)76867-9.
- Goings R L, Jacobson N L, Beitz D C, Littledike E T und Wiggers K D (1974):
Prevention of parturient paresis by a prepartum, calcium-deficient diet.
J. Dairy Sci. 57, 1184-1188. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(74)85034-4.
- Greene L W, Fontenot J P und Webb K E (1983):
Site of magnesium and other macromineral absorption in steers fed high levels of potassium.
J. Anim. Sci. 57, 503-510. doi: 10.2527/jas1983.572503x.
- Greger R, Lang F und Oberleithner H (1978):
Distal site of calcium reabsorption in the rat nephron.
Pflügers Arch. 374, 153-157. doi: 10.1007/BF00581296.
- Gruber L und Stegellner M (2015):
Effizienz bei Milchkühen – Einfluss von Rasse, Laktationszahl und Laktationsstadium.
In: Proceedings of the 42nd Viehwirtschaftliche Fachtagung. L. Raumberg-Gumpenstein. Irdning-Donnersbachtal, Austria: S. 25-26
ISBN: 978-3-902849-18-2
- Gruber L, Steinwender R, Krimberger K und Sölkner J (1991):
Roughage intake of simmental, brown swiss and holstein friesian cows fed rations with 0,25 and 50% concentrates.
Livest. Prod. Sci. 27, 123-136. doi: 10.1016/0301-6226(91)90091-4.
- Grummer R R (1995):
Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow.
J. Anim. Sci. 73, 2820. doi: 10.2527/1995.7392820x.
- Günzel D und Yu A S L (2013):
Claudins and the modulation of tight junction permeability.
Physiol. Rev. 93, 525-569. doi: 10.1152/physrev.00019.2012.
- Gürtler H, Seidel H und Leibaug E (1977):
Prophylaxe der Gebärdparese der Milchkuh durch Verabreichung hoher Dosen Vitamin D3.
Monatsh. Veterinaarmed. 32, 664-668.

- Hall R, Holcomb Jr J und Griffin D (1940):
Separation and determination of isometric menthols.
Ind. Eng. Chem. Res. 12, 187-188.
- Hammer K A, Carson C F und Riley T V (1999):
Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts.
J. Appl. Microbiol. 86, 985-990. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x.
- Han P, Trinidad B J und Shi J (2015):
Hypocalcemia-induced seizure: demystifying the calcium paradox.
ASN Neuro 7.2. doi: 10.1177/1759091415578050.
- Hara S, Ikegaya Y, Jørgensen R, Sasaki J, Nakamura M und Tomizawa N (2003):
Effect of induced subclinical hypocalcemia on the motility of the bovine digestive tract.
Acta Vet. Scand. 44, P76. doi: 10.1186/1751-0147-44-S1-P76.
- Hassanien H E M, Galyean M L, Ballou M A, Mahmoud A M M, Abdel-Raouf E M und Eweedah N M (2022):
Effects of altering prepartum and postpartum dietary cation–anion difference on calcium concentrations and blood metabolites of holstein dairy cows.
Anim. Sci. J. 93, e13715. doi: 10.1111/asj.13715.
- Hausmann J, Deiner C, Patra A K, Immig I, Starke A und Aschenbach J R (2018):
Effects of a combination of plant bioactive lipid compounds and biotin compared with monensin on body condition, energy metabolism and milk performance in transition dairy cows.
PLoS One 13, e0193685. doi: 10.1371/journal.pone.0193685.
- Haussler M R, Jurutka P W, Hsieh J-C, Thompson P D, Selznick S H, Haussler C A und Whitfield G K (1995):
New understanding of the molecular mechanism of receptor-mediated genomic actions of the vitamin D hormone.
Bone 17, 33-38. doi: 10.1016/8756-3282(95)00205-R.
- Hayton A, Husband J und Vecqueray R (2012):
Nutritional management of herd health.
In: Dairy Herd Health. G. M. J. Oxfordshire, UK, CAB International. 1. Auflage: S. 227-278
ISBN: 978-1-84593-997-7
- Hellerich B (2008):
Zusammenhänge zwischen Fütterung, Haltung sowie Managementaspekten und der Tiergesundheit in Milchviehbetrieben. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover
- Herm G, Muscher-Banse A S, Breves G, Schröder B und Wilkens M R (2015):
Renal mechanisms of calcium homeostasis in sheep and goats.
J. Anim. Sci. 93, 1608-1621. doi: 10.2527/jas.2014-8450.
- Hoenderop J G J, Nilius B und Bindels R J M (2005):
Calcium absorption across epithelia.
Physiol. Rev. 85, 373-422. doi: 10.1152/physrev.00003.2004.
- Hofer A M und Brown E M (2003):
Extracellular calcium sensing and signalling.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4, 530-538. doi: 10.1038/nrm1154.

Hoff A O, Catala-Lehnen P, Thomas P M, Priemel M, Rueger J M, Nasonkin I, Bradley A, Hughes M R, Ordonez N, Cote G J, Amling M und Gagel R F (2002):
Increased bone mass is an unexpected phenotype associated with deletion of the calcitonin gene.

J. Clin. Invest. 110, 1849-1857. doi: 10.1172/JCI200214218.

Hohls C (1990):

Passage of calcium through the rumen wall of sheep at different concentrations of calcium ions and under influence of inorganic phosphate. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

Holick M F (1981):

The cutaneous photosynthesis of previtamin D₃: a unique photoendocrine system.

J. Invest. Dermatol. 77, 51-58. doi: 10.1111/1523-1747.ep12479237.

Höller H, Breves G, Gerdes H und Kocabatmaz M (1988):

Flux of calcium across the sheep rumen wall in vivo and in vitro.

Q. J. Exp. Physiol. 73, 609-618. doi: 10.1113/expphysiol.1988.sp003180.

Holzer P (2011a):

Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system.

Pharmacol. Ther. 131, 142-170. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.03.006.

Holzer P (2011b):

TRP channels in the digestive system.

Curr. Pharm. Biotechnol. 12, 24-34. doi: 10.2174/138920111793937862.

Horst R L (1986):

Regulation of calcium and phosphorus homeostasis in the dairy cow.

J. Dairy Sci. 69, 604-616. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(86)80445-3.

Horst R L, Goff J P und Reinhardt T A (1990):

Advancing age results in reduction of intestinal and bone 1,25-dihydroxyvitamin D receptor.

Endocrinology 126, 1053-1057. doi: 10.1210/endo-126-2-1053.

Horst R L, Goff J P und Reinhardt T A (1994):

Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow.

J. Dairy Sci. 77, 1936-1951. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(94)77140-X.

Horst R L, Goff J P und Reinhardt T A (2003):

Role of vitamin D in calcium homeostasis and its use in prevention of bovine periparturient paresis.

Acta Vet. Scand. 97, 35-50.

Horst R L, Goff J P und Reinhardt T A (2005):

Adapting to the transition between gestation and lactation: differences between rat, human and dairy cow.

J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 10, 141-156. doi: 10.1007/s10911-005-5397-x.

Horst R L, Goff J P, Reinhardt T A und Buxton D R (1997):

Strategies for preventing milk fever in dairy cattle.

J. Dairy Sci. 80, 1269-1280. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76056-9.

Horst R L und Reinhardt T A (1983):

Vitamin D metabolism in ruminants and its relevance to the periparturient cow.
J. Dairy Sci. 66, 661-678. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(83)81844-X.

Houe H, Østergaard S, Thilising-Hansen T, Jørgensen R J, Larsen T, Sørensen J T, Agger J F und Blom J Y (2001):

Milk fever and subclinical hypocalcaemia-an evaluation of parameters on incidence risk, diagnosis, risk factors and biological effects as input for a decision support system for disease control.

Acta Vet. Scand. 42, 1-29.

Hünninger F und Staufenbiel R (1999):

Einsatz von Propylenglykol in der Milchviehfütterung.
Prakt. Tierarzt 80, 694-697.

Huyghebaert G, Ducatelle R und Immerseel F V (2011):

An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers.
J. Vet. Med. 187, 182-188. doi: 10.1016/j.tvj.2010.03.003.

Hymøller L und Jensen S K (2010):

Vitamin D3 synthesis in the entire skin surface of dairy cows despite hair coverage.
J. Dairy Sci. 93, 2025-2029. doi: 10.3168/jds.2009-2991.

Ingvartsen K L, Dewhurst R J und Friggens N C (2003):

On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper.

Livest. Prod. Sci. 83, 277-308. doi: 10.1016/S0301-6226(03)00110-6.

Jafri L, Khan A H und Azeem S (2014):

Ionized calcium measurement in serum and plasma by ion selective electrodes: comparison of measured and calculated parameters.

Indian J. Clin. Biochem. 29, 327-332. doi: 10.1007/s12291-013-0360-x.

Janssen J und Helbing A (1991):

Arsenazo III: an improvement of the routine calcium determination in serum.
Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 29(3), 197-201.

Jawor P E, Huzzey J M, LeBlanc S J und von Keyserlingk M A G (2012):

Associations of subclinical hypocalcemia at calving with milk yield, and feeding, drinking, and standing behaviors around parturition in holstein cows.

J. Dairy Sci. 95, 1240-1248. doi: 10.3168/jds.2011-4586.

Jayantha W, Priyanwada L, Chandana A und Gamika P (2020):

Supplementation of brewer's yeast slurry improves the performance of dairy cattle.
World J. Biol. Pharm. Health Sci. 1, 001-007. doi: 10.30574/wjbphs.2020.1.1.0007.

Jessen A (2011):

Untersuchungen zur Verbesserung des praktischen Einsatzes von Anionenrationen zur sicheren und wirkungsvollen Prophylaxe der Hypokalzämie auf Herdenebene. Berlin, Dissertation, Freie Universität Berlin, Mensch und Buch Verlag

ISBN: 978-3-86664-958-3

- Jones G (2013):
Extrarenal vitamin D activation and interactions between vitamin D₂, vitamin D₃, and vitamin D analogs.
Annu. Rev. Nutr. 33, 23-44. doi: 10.1146/annurev-nutr-071812-161203.
- Jorgensen R J, Nyengaard N R, Ham S, Enemark J M und Andersen P H (1998):
Rumen motility during induced hyper- and hypocalcaemia.
Acta Vet. Scand. 39, 331-338. doi: 10.1186/BF03547781.
- Joyce P W, Sanchez W K und Goff J P (1997):
Effect of anionic salts in prepartum diets based on alfalfa.
J. Dairy Sci. 80, 2866-2875. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76251-9.
- Karashima Y, Damann N, Prenen J, Talavera K, Segal A, Voets T und Nilius B (2007):
Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1.
J. Neurosci. 27, 9874-9884. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2221-07.2007.
- Karashima Y, Prenen J, Talavera K, Janssens A, Voets T und Nilius B (2010):
Agonist-induced changes in Ca²⁺ permeation through the nociceptor cation channel TRPA1.
Biophys. J. 98, 773-783. doi: 10.1016/j.bpj.2009.11.007.
- Karl M und Staufenbiel R (2016):
Einflussfaktoren auf die Erstkolostrummenge bei Holstein-Friesian-Kühen und deren Beziehungen zur postpartalen Kalziumkonzentration.
Tierarztl. Prax. Ausg. G Grosstiere Nutztiere 44, 345-354. doi: 10.15653/TPG-150855.
- Katsoulos P, Athanasiou L, Dedousi A und Polizopoulou Z (2022):
Prediction of ionized calcium concentration based on total calcium and protein levels in cattle and sheep.
Vet. Res. Forum 13, 475-480. doi: 10.30466/vrf.2021.139252.3096.
- Keanthao P, Goselink R M A, Dijkstra J, Bannink A und Schonewille J T (2021):
Effects of dietary phosphorus concentration during the transition period on plasma calcium concentrations, feed intake, and milk production in dairy cows.
J. Dairy Sci. 104, 11646-11659. doi: 10.3168/jds.2021-20488.
- Khanal R C und Nemere I (2008):
Regulation of intestinal calcium transport.
Annu. Rev. Nutr. 28, 179-196. doi: 10.1146/annurev.nutr.010308.161202.
- Khiaosa-ard R und Zebeli Q (2013):
Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants.
J. Anim. Sci. 91, 1819-1830. doi: 10.2527/jas.2012-5691.
- Khol J L, Moser K, Miklis A, Dirisamer M und Wittek T (2020):
Wesen, Ursachen, Therapie und Prophylaxe der hypokalzämischen Gebärpause beim Rind.
Tierarztl. Prax. Ausg. G Grosstiere Nutztiere 48, 173-182. doi: 10.1055/a-1177-2401.
- Kholif A E, Hassan A A, El Ashry G M, Bakr M H, El-Zaiat H M, Olafadehan O A, Matloup O H und Sallam S M A (2021):
Phytogenic feed additives mixture enhances the lactational performance, feed utilization and ruminal fermentation of Friesian cows.
Anim. Biotechnol. 32, 708-718. doi: 10.1080/10495398.2020.1746322.

Kichura T S, Horst R L, Beitz D C und Littledike E T (1982):
Relationships between prepartal dietary calcium and phosphorus, vitamin D metabolism, and parturient paresis in dairy cows.
J. Nutr. 112, 480-487. doi: 10.1093/jn/112.3.480.

Kimura K, Reinhardt T A und Goff J P (2006):
Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle.
J. Dairy Sci. 89, 2588-2595. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72335-9.

Klingbeil M (2015):
Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Menge, Qualität und den Calciumgehalt des Erstkolostrums bei Holstein Friesian. Dissertation, Freie Universität Berlin

Kocabagli N (2018):
Prevention of milk fever: a herd health approach to dairy cow nutrition.
Arch. Anim. Husb. Dairy Sci. 1. doi: 10.33552/AAHDS.2018.01.000502.

Koch S M, Warters R D und Mehlhorn U (2002):
The simultaneous measurement of ionized and total calcium and ionized and total magnesium in intensive care unit patients.
J. Crit. Care 17, 203-205. doi: 10.1053/jcrc.2002.35813.

Kovacs W J und Ojeda S R (2012):
Textbook of endocrine physiology.
6. Auflage, Oxford, Oxford University Press
ISBN: 978-0-19-974412-1

Kumar R und Thompson J R (2011):
The regulation of parathyroid hormone secretion and synthesis.
J. Am. Soc. Nephrol. 22, 216-224. doi: 10.1681/ASN.2010020186.

Kume S-i, Nonaka K und Oshita T (2003):
Relationship between parity and mineral status in dairy cows during the periparturient period.
Anim. Sci. J. 74, 211-215. doi: 10.1046/j.1344-3941.2003.00107.x.

Kung L, Williams P, Schmidt R J und Hu W (2008):
A blend of essential plant oils used as an additive to alter silage fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows.
J. Dairy Sci. 91, 4793-4800. doi: 10.3168/jds.2008-1402.

Kurbel S, Radić R, Kotromanović Ž, Pušeljčić Ž und Kratošil B (2003):
A calcium homeostasis model: orchestration of fast acting PTH and calcitonin with slow calcitriol.
Med. Hypotheses 61.3, 346-350.

Kusumanti E, Agger J F und Jensen K (1993):
Association between incidence risk of milk fever and lactation number, breed and season.
Acta Vet. Scand. Suppl. 89, 141-142.

Kutuzova G D und DeLuca H F (2004):
Gene expression profiles in rat intestine identify pathways for 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulated calcium absorption and clarify its immunomodulatory properties.
Arch. Biochem. Biophys. 432, 152-166. doi: 10.1016/j.abb.2004.09.004.

- Kuart C und Larsson L (1978):
Studies on ionized calcium in serum and plasma from normal cows. Its relation to total serum calcium and the effects of sample storing.
Acta Vet. Scand. 19, 487-496. doi: 10.1186/BF03547588.
- Lam V, Dhaliwal S S und Mamo J C (2013):
Adjustment of ionized calcium concentration for serum pH is not a valid marker of calcium homeostasis: implications for identifying individuals at risk of calcium metabolic disorders.
Ann. Clin. Biochem. 50, 224-229. doi: 10.1177/0004563212473747.
- Landt M, Hortin G L, Smith C H, McClellan A und Scott M G (1994):
Interference in ionized calcium measurements by heparin salts.
Clin. Chem. 40, 565-570. doi: 10.1093/clinchem/40.4.565.
- Larsen T, Møller G und Bellio R (2001):
Evaluation of clinical and clinical chemical parameters in periparturient cows.
J. Dairy Sci. 84, 1749-1758. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74610-3.
- Lean I J, DeGaris P J, McNeil D M und Block E (2006):
Hypocalcemia in dairy cows: meta-analysis and dietary cation anion difference theory revisited.
J. Dairy Sci. 89, 669-684. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72130-0.
- Leary N O, Pembroke A und Duggan P F (1992):
Single stable reagent (arsenazo III) for optically robust measurement of calcium in serum and plasma.
Clin. Chem. 38, 904-908. doi: 10.1093/clinchem/38.6.904.
- Leblanc S (2010):
Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period.
J. Reprod. Dev. 56, S29-S35. doi: 10.1262/jrd.1056S29.
- Leno B M, Martens E M, Felipe M J B, Zanzalari K P, Lawrence J C und Overton T R (2017):
Short communication: relationship between methods for measurement of serum electrolytes and the relationship between ionized and total calcium and neutrophil oxidative burst activity in early postpartum dairy cows.
J. Dairy Sci. 100, 9285-9293. doi: 10.3168/jds.2017-12971.
- Lezama-García K, Mota-Rojas D, Pereira A M F, Martínez-Burnes J, Ghezzi M, Domínguez A, Gómez J, de Mira Geraldo A, Lendez P, Hernández-Ávalos I, Falcón I, Olmos-Hernández A und Wang D (2022):
Transient receptor potential (TRP) and thermoregulation in animals: structural biology and neurophysiological aspects.
Animals 12, 106. doi: 10.3390/ani12010106.
- Liebe F, Liebe H, Kaessmeyer S, Sponder G und Stumpff F (2020):
The TRPV3 channel of the bovine rumen: localization and functional characterization of a protein relevant for ruminal ammonia transport.
Pflügers Arch. 472, 693-710. doi: 10.1007/s00424-020-02393-2.
- Liebe F, Liebe H, Sponder G, Mergler S und Stumpff F (2022):
Effects of butyrate- on ruminal Ca²⁺ transport: evidence for the involvement of apically expressed TRPV3 and TRPV4 channels.
Pflügers Arch. 474, 315-342. doi: 10.1007/s00424-021-02647-7.

Liesegang A und Risteli J (2005):

Influence of different calcium concentrations in the diet on bone metabolism in growing dairy goats and sheep.

J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 89, 113-119. doi: 10.1111/j.1439-0396.2005.00548.x.

Lincoln S D und Lane V M (1990):

Serum ionized calcium concentration in clinically normal dairy cattle, and changes associated with calcium abnormalities.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 197, 1471-1474.

Littledike E T und Goff J P (1987):

Interactions of calcium, phosphorus, magnesium and vitamin D that influence their status in domestic meat animals.

J. Anim. Sci. 65, 1727-1743. doi: 10.2527/jas1987.6561727x.

Loffing J, Loffing-Cueni D, Valderrabano V, Kläusli L, Hebert S C, Rossier B C, Hoenderop J G J, Bindels R J M und Kaissling B (2001):

Distribution of transcellular calcium and sodium transport pathways along mouse distal nephron.

Am. J. Physiol. Renal Physiol. 281, F1021-F1027. doi: 10.1152/ajprenal.0085.2001.

Loken H F, Havel R J, Gordan G S und Whittington S L (1960):

Ultracentrifugal analysis of protein-bound and free calcium in human serum.

J. Biol. Chem. 235, 3654-3658. doi: 10.1016/S0021-9258(18)64524-7.

Macheboeuf D, Morgavi D P, Papon Y, Mousset J-L und Arturo-Schaan M (2008):

Dose-response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumen microbial population.

Anim. Feed Sci. Technol. 145, 335-350. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.05.044.

Macpherson L J, Hwang S W, Miyamoto T, Dubin A E, Patapoutian A und Story G M (2006):

More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds.

Mol. Cell Neurosci. 32, 335-343. doi: 10.1016/j.mcn.2006.05.005.

Maeda H, Yamada S, Itoh H und Hori Y (2012):

A dual catalyst system provides the shortest pathway for l-menthol synthesis.

Chem. comm. 48, 1772-1774. doi: 10.1039/C2CC16548A.

Mahen P J, Williams H J, Smith R F und Grove-White D (2018):

Effect of blood ionised calcium concentration at calving on fertility outcomes in dairy cattle.

Vet. Rec. 183, 263-263. doi: 10.1136/vr.104932.

Mallard B A, Dekkers J C, Ireland M J, Leslie K E, Sharif S, Vankampen C L, Wagter L und Wilkie B N (1998):

Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health.

J. Dairy Sci. 81, 585-595. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75612-7.

Mann S, McArt J A A und Abuelo A (2019):

Production-related metabolic disorders of cattle: ketosis, milk fever and grass staggers.

In Pract. 41, 205-219. doi: 10.1136/inp.i3041.

- Manoni M, Di Lorenzo C, Ottoboni M, Tretola M und Pinotti L (2020):
Comparative proteomics of milk fat globule membrane (MFGM) proteome across species and lactation stages and the potentials of MFGM fractions in infant formula preparation.
Foods 9, 1251. doi: 10.3390/foods9091251.
- Martig J (2006):
Hypokalzämische Gebärlähmung.
In: Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. G. Dirksen und W. Baumgartner. Stuttgart, Parey. 5. Auflage: S. 1245-1254
ISBN: 978-3-8304-4169-4
- Martín-Tereso J und Martens H (2014):
Calcium and magnesium physiology and nutrition in relation to the prevention of milk fever and tetany (dietary management of macrominerals in preventing disease).
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 30, 643-670. doi: 10.1016/j.cvfa.2014.07.007.
- Martín-Tereso J und Verstegen M W A (2011):
A novel model to explain dietary factors affecting hypocalcaemia in dairy cattle.
Nutr. Res. Rev. 24, 228-243. doi: 10.1017/S0954422411000126.
- Martinez N, Risco C A, Lima F S, Bisinotto R S, Greco L F, Ribeiro E S, Maunsell F, Galvão K und Santos J E P (2012):
Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease.
J. Dairy Sci. 95, 7158-7172. doi: 10.3168/jds.2012-5812.
- 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 und Santos J E P (2014):
Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows.
J. Dairy Sci. 97, 874-887. doi: 10.3168/jds.2013-7408.
- McArt J A A und Neves R C (2020):
Association of transient, persistent, or delayed subclinical hypocalcemia with early lactation disease, removal, and milk yield in holstein cows.
J. Dairy Sci. 103, 690-701. doi: 10.3168/jds.2019-17191.
- McIntosh F M, Williams P, Losa R, Wallace R J, Beaver D A und Newbold C J (2003):
Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism.
Appl. Environ. Microbiol. 69, 5011-5014. doi: 10.1128/AEM.69.8.5011-5014.2003.
- McKemy D D, Neuhausser W M und Julius D (2002):
Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation.
Nature 416, 52-58. doi: 10.1038/nature719.
- Melendez P, Chelikani P K, Patel D und Garbarino E (2022):
Effect of a very low negative dietary cation-anion difference (DCAD) diet on plasma and urine metabolomics of prepartum holstein cows.
JDS Commun. 3, 59-65. doi: 10.3168/jdsc.2021-0154.

- Melendez P, Lopez F, Lama J, Leon B und Pinedo P (2023):
Plasma ionized calcium and magnesium concentrations and prevalence of subclinical hypocalcemia and hypomagnesemia in postpartum grazing holstein cows from southern chile.
Vet. Anim. Sci. 19, 100277. doi: 10.1016/j.vas.2022.100277.
- Mellau L S B, Jørgensen R J und Enemark J M D (2001):
Plasma calcium, inorganic phosphate and magnesium during hypocalcaemia induced by a standardized EDTA infusion in cows.
Acta Vet. Scand. 42, 251-260. doi: 10.1186/1751-0147-42-251.
- Metzner M und Klee W (2005):
Klinische Befunde und Serumparameter bei festliegenden Kühen unter besonderer Berücksichtigung der Serumphosphorkonzentrationen.
Tierarztl. Umsch. 60, 13-22.
- Mirzaei-Alamouti H, Moradi S, Shahalizadeh Z, Razavian M, Amanlou H, Harkinezhad T, Jafari-Anarkooli I, Deiner C und Aschenbach J R (2016):
Both monensin and plant extract alter ruminal fermentation in sheep but only monensin affects the expression of genes involved in acid-base transport of the ruminal epithelium.
Anim. Feed Sci. Technol. 219, 132-143. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2016.06.009.
- Montell C (2005):
The TRP superfamily of cation channels.
Sci. stke 2005, re3. doi: 10.1126/stke.2722005re3.
- Moore E W (1970):
Ionized calcium in normal serum, ultrafiltrates, and whole blood determined by ion-exchange electrodes.
J. Clin. Invest. 49, 318-334. doi: 10.1172/JCI106241.
- Moore S J, VandeHaar M J, Sharma B K, Pilbeam T E, Beede D K, Bucholtz H F, Liesman J S, Horst R L und Goff J P (2000):
Effects of altering dietary cation-anion difference on calcium and energy metabolism in peripartum cows.
J. Dairy Sci. 83, 2095-2104. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)75091-0.
- Moritz A, Kraft W, Dürr U M und Bauer N (2014):
Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin: mit 286 Tabellen
7. Auflage, Stuttgart, Schattauer
ISBN: 978-3-7945-2737-3
- Mukaiyama M, Usui T und Nagumo Y (2020):
Non-electrophilic TRPA1 agonists, menthol, carvacrol and clotrimazole, open epithelial tight junctions via TRPA1 activation.
J. Biochem. 168, 407-415. doi: 10.1093/jb/mvaa057.
- Mulligan F, O'Grady L, Rice D und Doherty M (2006):
Production diseases of the transition cow: milk fever and subclinical hypocalcaemia.
Ir. Vet. J. 59, 3-9.
- Mulligan F J und Doherty M L (2008):
Production diseases of the transition cow.
J. Vet. Med. 176, 3-9. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.12.018.

- Murayama A, Takeyama K-i, Kitanaka S, Koderä Y, Kawaguchi Y, Hosoya T und Kato S (1999):
Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1 α ,25(OH)₂D₃ in intact animals.
Endocrinology 140, 2224-2231. doi: 10.1210/endo.140.5.6691.
- Namer B, Seifert F, Handwerker H O und Maih C (2005):
TRPA1 and TRPM8 activation in humans: effects of cinnamaldehyde and menthol.
Neuroreport 16, 955-959.
- National Research Council (2021):
Nutrient requirements of dairy cattle.
8. Auflage, Washington, DC, The National Academies Press
ISBN: 978-0-309-67777-6
- Nealen M L, Gold M S, Thut P D und Caterina M J (2003):
TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat.
J. Neurophysiol. 90, 515-520. doi: 10.1152/jn.00843.2002.
- Nemeth M V, Wilkens M R und Liesegang A (2017):
Vitamin D status in growing dairy goats and sheep: influence of ultraviolet B radiation on bone metabolism and calcium homeostasis.
J. Dairy Sci. 100, 8072-8086. doi: 10.3168/jds.2017-13061.
- Neves R C, Leno B M, Bach K D und McArt J A A (2018a):
Epidemiology of subclinical hypocalcemia in early-lactation holstein dairy cows: the temporal associations of plasma calcium concentration in the first 4 days in milk with disease and milk production.
J. Dairy Sci. 101, 9321-9331. doi: 10.3168/jds.2018-14587.
- Neves R C, Leno B M, Stokol T, Overton T R und McArt J A A (2017):
Risk factors associated with postpartum subclinical hypocalcemia in dairy cows.
J. Dairy Sci. 100, 3796-3804. doi: 10.3168/jds.2016-11970.
- Neves R C, Stokol T, Bach K D und McArt J A A (2018b):
Method comparison and validation of a prototype device for measurement of ionized calcium concentrations cow-side against a point-of-care instrument and a benchtop blood-gas analyzer reference method.
J. Dairy Sci. 101, 1334-1343. doi: 10.3168/jds.2017-13779.
- Nilius B und Bíró T (2013):
TRPV3: a 'more than skinny' channel.
Exp. Dermatol. 22, 447-452. doi: 10.1111/exd.12163.
- Oehlschlaeger V, Wilkens M, Schroeder B, Daenicke S und Breves G (2014):
Effects of 25-hydroxyvitamin D3 on localisation and extent of gastrointestinal calcium absorption in dairy cattle.
Anim. Prod. Sci. 54, 1394-1398.
- Oetzel G K (1988):
Parturient paresis and hypocalcemia in ruminant livestock.
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 4, 351-364. doi: 10.1016/S0749-0720(15)31053-7.

Oetzel G K (2022):

Non-infectious diseases: milk fever.

In: Encyclopedia of dairy sciences Vol. 1. P. L. McSweeney und J. P. McNamara. San Diego, CA, Academic Press. 3. Auflage: S. 414-422

ISBN: 978-0-12-374402-9

Oetzel G R (2000):

Management of dry cows for the prevention of milk fever and other mineral disorders.

Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 16, 369-386. doi: 10.1016/S0749-0720(15)30110-9.

Oetzel G R (2004):

Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease.

Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 20, 651-674. doi: 10.1016/j.cvfa.2004.06.006.

Oetzel G R (2013):

Oral calcium supplementation in peripartum dairy cows.

Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 29, 447-455. doi: 10.1016/j.cvfa.2013.03.006.

Oetzel G R, Olson J D, Curtis C R und Fettman M J (1988):

Ammonium chloride and ammonium sulfate for prevention of parturient paresis in dairy cows.

J. Dairy Sci. 71, 3302-3309. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(88)79935-X.

Onifade K U, Mohammad A A, Petersen J R und Okorodudu A O (2005):

Ionized calcium: indications and advantages of its measurement.

Lab. Med. 29, 235-240. doi: 10.1515/JLM.2005.032.

Ornaghi M G, Passeti R A C, Torrecilhas J A, Mottin C, Vital A C P, Guerrero A, Sañudo C, del Mar Campo M und Prado I N (2017):

Essential oils in the diet of young bulls: effect on animal performance, digestibility, temperament, feeding behaviour and carcass characteristics.

Anim. Feed Sci. Technol. 234, 274-283. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2017.10.008.

Østergaard S und Gröhn Y T (1999):

Effects of diseases on test day milk yield and body weight of dairy cows from danish research herds.

J. Dairy Sci. 82, 1188-1201. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75342-7.

Owsianik G, Talavera K, Voets T und Nilius B (2006):

Permeation and selectivity of TRP channels.

Annu. Rev. Physiol. 68, 685-717. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040204.101406.

Patel T, Ishiujji Y und Yosipovitch G (2007):

Menthol: a refreshing look at this ancient compound.

J. Am. Acad. Dermatol. 57, 873-878. doi: 10.1016/j.jaad.2007.04.008.

Patra A K, Geiger S, Braun H-S und Aschenbach J R (2019a):

Dietary supplementation of menthol-rich bioactive lipid compounds alters circadian eating behaviour of sheep.

BMC Vet. Res. 15, 352. doi: 10.1186/s12917-019-2109-0.

Patra A K, Geiger S, Schrapers K T, Braun H-S, Gehlen H, Starke A, Pieper R, Cieslak A, Szumacher-Strabel M und Aschenbach J R (2019b):

Effects of dietary menthol-rich bioactive lipid compounds on zootechnical traits, blood variables and gastrointestinal function in growing sheep.

J. Anim. Sci. Biotechnol. 10, 86. doi: 10.1186/s40104-019-0398-6.

- Patra A K und Saxena J (2010):
A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen.
Phytochem. 71, 1198-1222. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.05.010.
- Patra A K und Yu Z (2012):
Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations.
Appl. Environ. Microbiol. 78, 4271-4280. doi: 10.1128/AEM.00309-12.
- Payne R B, Carver M E und Morgan D B (1979):
Interpretation of serum total calcium: effects of adjustment for albumin concentration on frequency of abnormal values and on detection of change in the individual.
J. Clin. Pathol. 32, 56-60. doi: 10.1136/jcp.32.1.56.
- Peacock M (2010):
Calcium metabolism in health and disease.
Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 5, S23-S30. doi: 10.2215/CJN.05910809.
- Pechet M M, Bobadilla E, Carroll E L und Hesse R H (1967):
Regulation of bone resorption and formation.
Am. J. Med. 43, 696-710. doi: 10.1016/0002-9343(67)90112-X.
- Pedersen K O (1970):
Determination of calcium fractions of serum. III. Ionized calcium in ultrafiltrates of normal serum and examination of pertinent variables.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 25, 223-230. doi: 10.3109/00365517009046199.
- Pedersen S F, Owsianik G und Nilius B (2005):
TRP channels: an overview.
Cell Calcium 38, 233-252. doi: 10.1016/j.ceca.2005.06.028.
- Peier A M, Moqrich A, Hergarden A C, Reeve A J, Andersson D A, Story G M, Earley T J, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S und Patapoutian A (2002):
A TRP channel that senses cold stimuli and menthol.
Cell 108, 705-715. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00652-9.
- Petersen H H, Nielsen J P und Heegaard P M H (2004):
Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry.
Vet. Res. 35, 163-187. doi: 10.1051/vetres:2004002.
- Piccione G, Messina V, Schembari A, Casella S, Giannetto C und Alberghina D (2011):
Pattern of serum protein fractions in dairy cows during different stages of gestation and lactation.
J. Dairy Res. 78, 421-425. doi: 10.1017/S0022029911000562.
- Pichon S (2008):
Analyse von Festliegerursachen bei Kühen: eine Praxisstudie. Dissertation, Universität Leipzig
- Prabuseenivasan S, Jayakumar M und Ignacimuthu S (2006):
In vitro antibacterial activity of some plant essential oils.
BMC Complement. Altern. Med. 6, 39. doi: 10.1186/1472-6882-6-39.

Puscas I, Coltau M, Baican M, Domuta G und Hecht A (2001):
Calcium, carbonic anhydrase and gastric acid secretion.
Physiol. Res. 50, 359-364.

Quiroz-Rocha G F, LeBlanc S, Duffield T, Wood D, Leslie K E und Jacobs R M (2009):
Evaluation of prepartum serum cholesterol and fatty acids concentrations as predictors of
postpartum retention of the placenta in dairy cows.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 234, 790-793. doi: 10.2460/javma.234.6.790.

Rabbani I, Braun H-S, Akhtar T, Liebe F, Rosendahl J, Grunau M, Tietjen U, Masood S,
Kaessmeyer S, Günzel D, Rehman H und Stumpff F (2018):
A comparative study of ammonia transport across ruminal epithelia from bos indicus
crossbreds versus bos taurus.
Anim. Sci. J. 89, 1692-1700. doi: 10.1111/asj.13107.

Ramasamy I (2006):
Recent advances in physiological calcium homeostasis.
Clin. Chem. Lab. Med. 44, 237-273. doi: 10.1515/CCLM.2006.046.

Ramberg C F, Johnson E K, Fargo R D und Kronfeld D S (1984):
Calcium homeostasis in cows, with special reference to parturient hypocalcemia.
Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 246, R698-R704. doi:
10.1152/ajpregu.1984.246.5.R698.

Reinhardt T A, Horst R L und Goff J P (1988):
Calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis in ruminants.
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 4, 331-350.

Reinhardt T A, Lippolis J D, McCluskey B J, Goff J P und Horst R L (2011):
Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds.
J. Vet. Med. 188, 122-124. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.03.025.

Ricken G (2015):
Transport von Calcium über das isolierte Pansenepithel des Rindes. Dissertation,
Tierärztliche Hochschule Hannover

Riggs B L, Jowsey J, Kelly P J und Arnaud C D (1976):
Role of hormonal factors in the pathogenesis of postmenopausal osteoporosis.
Isr. J. Med. Sci. 12, 615-619.

Riond J-L (2001):
Animal nutrition and acid-base balance.
Eur. J. Nutr. 40, 245-254. doi: 10.1007/s394-001-8352-2.

Risco C A, Reynolds J P und Hird D (1984):
Uterine prolapse and hypocalcemia in dairy cows.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 185, 1517-1519.

Roche J R (2003):
The incidence and control of hypocalcaemia in pasture-based systems.
Acta Vet. Scand. Suppl. 97, 141-144.

- Roche J R und Berry D P (2006):
Periparturient climatic, animal, and management factors influencing the incidence of milk fever in grazing systems.
J. Dairy Sci. 89, 2775-2783. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72354-2.
- Rodríguez E M, Arís A und Bach A (2017):
Associations between subclinical hypocalcemia and postparturient diseases in dairy cows.
J. Dairy Sci. 100, 7427-7434. doi: 10.3168/jds.2016-12210.
- Rosendahl J, Braun H S, Schrapers K T, Martens H und Stumpff F (2016):
Evidence for the functional involvement of members of the TRP channel family in the uptake of Na⁺ and NH₄⁺ by the ruminal epithelium.
Pflügers Arch. 468, 1333-1352. doi: 10.1007/s00424-016-1835-4.
- Rossi A E und Dirksen R T (2006):
Sarcoplasmic reticulum: The dynamic calcium governor of muscle.
Muscle Nerve 33, 715-731. doi: 10.1002/mus.20512.
- Roy D, Tomar S K und Kumar V (2015):
Rumen modulatory effect of thyme, clove and peppermint oils in vitro using buffalo rumen liquor.
Vet. World. 8, 203-207. doi: 10.14202/vetworld.2015.203-207.
- Russell K E und Roussel A J (2007):
Evaluation of the ruminant serum chemistry profile.
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 23, 403-426. doi: 10.1016/j.cvfa.2007.07.003.
- Saborío-Montero A, Vargas-Leitón B, Romero-Zúñiga J J und Sánchez J M (2017):
Risk factors associated with milk fever occurrence in grazing dairy cattle.
J. Dairy Sci. 100, 9715-9722. doi: 10.3168/jds.2017-13065.
- Sachs C, Rabouine P, Chaneac M, Kindermans C und Dechaux M (1989):
Anticoagulant-induced preanalytical errors in ionized calcium determination on blood.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 49, 647-651. doi: 10.3109/00365518909091540.
- Salewski A (1997):
Ketose und Mineralstoffstörungen beim Rind.
Milchpraxis 35, 156-156.
- Salgado-Hernández E G, Bouda J, Villa-Godoy A, Romano-Muñoz J L, Gutiérrez-Chávez A J und Velásquez-Forero F (2014):
Metabolites of vitamin D and minerals in blood and colostrum of primiparous and multiparous dairy cows postpartum.
Czech J. Anim. Sci. 59, 11-18. doi: 10.17221/7189-CJAS.
- Sampson J D, Spain J N, Jones C und Carstensen L (2009):
Effects of calcium chloride and calcium sulfate in an oral bolus given as a supplement to postpartum dairy cows.
Vet. Ther. 10, 131-139.
- Santos F A und Rao V S N (2001):
1,8-cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats.
Dig. Dis. Sci. 46, 331-337. doi: 10.1023/A:1005604932760.

- Sarria I und Gu J (2010):
Menthol response and adaptation in nociceptive-like and nonnociceptive-like neurons: role of protein kinases.
Mol. Pain 6, 1744-8069-1746-1747. doi: 10.1186/1744-8069-6-47.
- Schenck P A und Chew D J (2005):
Prediction of serum ionized calcium concentration by use of serum total calcium concentration in dogs.
Am. J. Vet. Res. 66, 1330-1336. doi: 10.2460/ajvr.2005.66.1330.
- Schenck P A und Chew D J (2010):
Prediction of serum ionized calcium concentration by serum total calcium measurement in cats.
Can. J. Vet. Res. 74, 209-213.
- Schrapers K T, Sponder G, Liebe F, Liebe H und Stumpff F (2018):
The bovine TRPV3 as a pathway for the uptake of Na⁺, Ca²⁺, and NH₄⁺.
PLoS One 13, e0193519. doi: 10.1371/journal.pone.0193519.
- Schröder B und Breves G (2006):
Mechanisms and regulation of calcium absorption from the gastrointestinal tract in pigs and ruminants: comparative aspects with special emphasis on hypocalcemia in dairy cows.
Anim. Health Res. Rev. 7, 31-41. doi: 10.1017/S1466252307001144.
- Schröder B, Goebel W, Huber K und Breves G (2001):
No effect of vitamin D₃ treatment on active calcium absorption across ruminal epithelium of sheep.
J. Vet. Med. A 48, 353-363. doi: 10.1046/j.1439-0442.2001.00369.x.
- Schröder B, Rittmann I, Pfeffer E und Breves G (1997):
In vitro studies on calcium absorption from the gastrointestinal tract in small ruminants.
J. Comp. Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol. 167, 43-51. doi: 10.1007/s003600050046.
- Schröder B, Schlumbohm C, Kaune R und Breves G (1996):
Role of calbindin-D_{9k} in buffering cytosolic free Ca²⁺ ions in pig duodenal enterocytes.
J. Physiol. 492, 715-722. doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp021340.
- Schröder B, Vössing S und Breves G (1999):
In vitro studies on active calcium absorption from ovine rumen.
J. Comp. Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol. 169, 487-494. doi: 10.1007/s003600050246.
- Schröder B, Wilkens M R, Ricken G E, Leonhard-Marek S, Fraser D R und Breves G (2015):
Calcium transport in bovine rumen epithelium as affected by luminal Ca concentrations and Ca sources.
Physiol. Rep. 3, e12615. doi: 10.14814/phy2.12615.
- Schwartau K (2011):
Peripartale hämatologische und klinisch-chemische Blutuntersuchungen zur Frühdiagnostik der Dislocatio abomasi, Gebärparese, Retentio secundinarum und Mastitis bei Milchkühen.
Disseratation, Universität Leipzig

- Schweigel M, Kolisek M, Nikolic Z und Kuzinski J (2008):
Expression and functional activity of the Na/Mg exchanger, TRPM7 and MagT1 are changed to regulate Mg homeostasis and transport in rumen epithelial cells.
Magnes. Res. 21, 118-123. doi: 10.1684/mrh.2008.0137.
- Schwendenwein I (2020):
Chlorid (Cl-).
In: LaborSkills. A. Moritz. Stuttgart, Georg Thieme Verlag. 2. Auflage: S. 216-218
ISBN: 978-3-13-243922-1
- Sechen S J, Bremel R D und Jorgensen N A (1988):
Prolactin, estradiol, and progesterone changes in parturient and nonparturient cows during the periparturient period.
Am. J. Vet. Res. 49, 411-416.
- Seifi H A, LeBlanc S J, Leslie K E und Duffield T F (2011):
Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle.
J. Vet. Med. 188, 216-220. doi: 10.1016/j.tvj.2010.04.007.
- Seifi H A, Mohri M, Ehsani A, Hosseini E und Chamsaz M (2005):
Interpretation of bovine serum total calcium: effects of adjustment for albumin and total protein.
Comp. Clin. Path. 14, 155-159. doi: 10.1007/s00580-005-0582-2.
- Seifi H A, Mohri M und Kalamati Zadeh J (2004):
Use of pre-partum urine pH to predict the risk of milk fever in dairy cows.
J. Vet. Med. 167, 281-285. doi: 10.1016/S1090-0233(03)00114-X.
- Sharp C R, Kerl M E und Mann F a (2009):
A comparison of total calcium, corrected calcium, and ionized calcium concentrations as indicators of calcium homeostasis among hypoalbuminemic dogs requiring intensive care.
J. Vet. Emerg. Crit. Care 19, 571-578. doi: 10.1111/j.1476-4431.2009.00485.x.
- Shin C S, Chang C H und Kim J-H (2006):
Liquid heparin anticoagulant produces more negative bias in the determination of ionized magnesium than ionized calcium.
Yonsei Med. J. 47, 191. doi: 10.3349/ymj.2006.47.2.191.
- Shirzadegan K und Jafari M A (2014):
The effect of different levels of sesame wastes on performance, milk composition and blood metabolites in holstein lactating dairy cows.
Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res. 2, 1296-1303.
- Shotipruk A, Kaufman P B und Wang H Y (2001):
Feasibility study of repeated harvesting of menthol from biologically viable mentha x piperata using ultrasonic extraction.
Biotechnol. Prog. 17, 924-928. doi: 10.1021/bp010074u.
- Sidler-Lauff K, Boos A, Kraenzlin M und Liesegang A (2010):
Influence of different calcium supplies and a single vitamin D injection on vitamin D receptor and calbindin D9k immunoreactivities in the gastrointestinal tract of goat kids.
J. Anim. Sci. 88, 3598-3610. doi: 10.2527/jas.2009-2682.

Siggaard-Andersen O, Thode J und Wandrup J (1981):
The concentration of free calcium ions in the blood plasma: "ionized calcium".
In: Blood pH, carbon dioxide, oxygen and calcium-ion. Proceedings of the 1980 Meeting of
the IFCC Expert Panel on pH and Blood Gases. O. Siggaard-Andersen. Copenhagen, Private
Pres: p. 163-190
ISBN: 87-88138-00-3

Simensen E, Østerås O, Bøe K E, Kielland C, Ruud L E und Næss G (2010):
Housing system and herd size interactions in norwegian dairy herds; associations with
performance and disease incidence.
Acta Vet. Scand. 52, 14. doi: 10.1186/1751-0147-52-14.

Singer K (2006):
Ca-Fluxe und Vitamin D-Rezeptoren in verschiedenen Darmabschnitten von Kühen: unter
Berücksichtigung der Faktoren Alter und Rasse. Dissertation, Universität Zürich

Singh H, Kumar R, Mazumder A, Salahuddin, Yadav R K, Chauhan B und Abdulah M M
(2023):
Camphor and menthol as anticancer agents: synthesis, structure- activity relationship and
interaction with cancer cell lines.
Anticancer Agents Med. Chem. 23, 614-623. doi: 10.2174/1871520622666220810153735.

Slanina L, Nagy O, Sedovic M und Struharikova J (1992):
Dynamics of the acid-base balance of venous and arterial blood in clinically healthy calves.
Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 99, 182-186.

Soltan Y A, Natel A S, Araujo R C, Morsy A S und Abdalla A L (2018):
Progressive adaptation of sheep to a microencapsulated blend of essential oils: ruminal
fermentation, methane emission, nutrient digestibility, and microbial protein synthesis.
Anim. Feed Sci. Technol. 237, 8-18. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2018.01.004.

Stein R J, Santos S, Nagatomi J, Hayashi Y, Minnery B S, Xavier M, Patel A S, Nelson J B,
Futrell W J, Yoshimura N, Chancellor M B und De Miguel F (2004):
Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract.
J. Urol. 172, 1175-1178. doi: 10.1097/01.ju.0000134880.55119.cf.

Stockham S L und Scott M A (2013):
Fundamentals of veterinary clinical pathology.
2. Auflage, S. 401-433, Iowa State Press, Ames, John Wiley & Sons
ISBN: 978-1-118-68607-2

Storry J E (1961):
Studies on calcium and magnesium in the alimentary tract of sheep I. The distribution of
calcium and magnesium in the contents taken from various parts of the alimentary tract.
J. Agric. Sci. 57, 97-102. doi: 10.1017/S0021859600050061.

Suzuki Y, Landowski C P und Hediger M A (2008):
Mechanisms and regulation of epithelial Ca²⁺ absorption in health and disease.
Annu. Rev. Physiol. 70, 257-271. doi: 10.1146/annurev.physiol.69.031905.161003.

Szenci O, Chew B P, Bajcsy A C, Szabó P und Brydl E (1994):
Total and ionized calcium in parturient dairy cows and their calves.
J. Dairy Sci. 77, 1100-1105. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(94)77045-4.

- Takano S, Kaji H, Hayashi F, Higashiguchi K, Joukei S, Kido Y, Takahashi J und Osawa K (2012):
A calculation model for serum ionized calcium based on an equilibrium equation for complexation.
Anal. Chem. Insights 7, ACI.S9681. doi: 10.4137/ACI.S9681.
- Tassoul M D und Shaver R D (2009):
Effect of a mixture of supplemental dietary plant essential oils on performance of periparturient and early lactation dairy cows.
J. Dairy Sci. 92, 1734-1740. doi: 10.3168/jds.2008-1760.
- Tatone E H, Duffield T F, LeBlanc S J, DeVries T J und Gordon J L (2017):
Investigating the within-herd prevalence and risk factors for ketosis in dairy cattle in ontario as diagnosed by the test-day concentration of β -hydroxybutyrate in milk.
J. Dairy Sci. 100, 1308-1318. doi: 10.3168/jds.2016-11453.
- Thévenod F (2002):
Ion channels in secretory granules of the pancreas and their role in exocytosis and release of secretory proteins.
Am. J. Physiol. Cell Physiol. 283, C651-C672. doi: 10.1152/ajpcell.00600.2001.
- Thilsing-Hansen T und Jørgensen R J (2001):
Hot topic: prevention of parturient paresis and subclinical hypocalcemia in dairy cows by zeolite A administration in the dry period.
J. Dairy Sci. 84, 691-693. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74523-7.
- Thilsing-Hansen T, Jørgensen R J und Østergaard S (2002):
Milk fever control principles: a review.
Acta Vet. Scand. 43, 19.
- Thode J, Holmegaard S N, Transbøl I, Fogh-Andersen N und Siggaard-Andersen O (1990):
Adjusted ionized calcium (at pH 7.4) and actual ionized calcium (at actual pH) in capillary blood compared for clinical evaluation of patients with disorders of calcium metabolism.
Clin. Chem. 36, 541-544. doi: 10.1093/clinchem/36.3.541.
- Tóthová C, Nagy O, Seidel H, Konvičná J, Farkašová Z und Kováč G (2008):
Acute phase proteins and variables of protein metabolism in dairy cows during the pre- and postpartal period.
Acta Vet. Brno. 77, 51-57. doi: 10.2754/avb200877010051.
- Tsuchiya W, Okada Y und Inouye A (1980):
Membrane potential measurements in cultured intestinal villi.
Membr. Biochem. 3, 147-153. doi: 10.3109/09687688009063882.
- Tsuzuki K (2004):
Menthol-induced Ca^{2+} release from presynaptic Ca^{2+} stores potentiates sensory synaptic transmission.
J. Neurosci. 24, 762-771. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4658-03.2004.
- Tvedten H, Kopcica M und Haines C (2000):
Mixed venous and arterial blood in bovine coccygeal vessel samples for blood gas analysis.
Vet. Clin. Pathol. 29, 4-6. doi: 10.1111/j.1939-165X.2000.tb00388.x.

- Umezu T, Sakata A und Ito H (2001):
Ambulation-promoting effect of peppermint oil and identification of its active constituents.
Pharmacol. Biochem. Behav. 69, 383-390. doi: 10.1016/S0091-3057(01)00543-3.
- Unterer S, Gerber B, Glaus T M, Hässig M und Reusch C E (2005):
Evaluation of an electrolyte analyser for measurement of concentrations of ionized calcium
and magnesium in cats.
Vet. Res. Commun. 29, 647-659. doi: 10.1007/s11259-005-3301-1.
- van Abel M, Hoenderop J G J, van der Kemp A W C M, Friedlaender M M, van Leeuwen J P
T M und Bindels R J M (2005):
Coordinated control of renal Ca²⁺ transport proteins by parathyroid hormone.
Kidney Int. 68, 1708-1721. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00587.x.
- van Goor M K C, Hoenderop J G J und van der Wijst J (2017):
TRP channels in calcium homeostasis: from hormonal control to structure-function
relationship of TRPV5 and TRPV6.
Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res. 1864, 883-893. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.11.027.
- Van Haute C, De Ridder D und Nilius B (2010):
TRP channels in human prostate.
Sci. World J. 10, 1597-1611. doi: 10.1100/tsw.2010.149.
- van Os C H (1987):
Transcellular calcium transport in intestinal and renal epithelial cells.
Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 906, 195-222. doi: 10.1016/0304-4157(87)90012-8.
- Venjakob P L, Borchardt S und Heuwieser W (2017):
Hypocalcemia - cow-level prevalence and preventive strategies in german dairy herds.
J. Dairy Sci. 100, 9258-9266. doi: 10.3168/jds.2016-12494.
- Venkatachalam K und Montell C (2007):
TRP channels.
Annu. Rev. Biochem. 76, 387-417. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.
- Vennekens R, Voets T, Bindels R J M, Droogmans G und Nilius B (2002):
Current understanding of mammalian TRP homologues.
Cell Calcium 31, 253-264. doi: 10.1016/S0143-4160(02)00055-6.
- Vogt-Eisele A K, Weber K, Sherkheli M A, Vielhaber G, Panten J, Gisselmann G und Hatt H
(2007):
Monoterpenoid agonists of TRPV3: monoterpenoid agonists of TRPV3.
Br. J. Pharmacol. 151, 530-540. doi: 10.1038/sj.bjp.0707245.
- Vriens J, Owsianik G, Voets T, Droogmans G und Nilius B (2004):
Invertebrate TRP proteins as functional models for mammalian channels.
Pflügers Arch. doi: 10.1007/s00424-004-1314-1.
- Wang S, McDonnell E H, Sedor F A und Toffaletti J G (2002):
PH effects on measurements of ionized calcium and ionized magnesium in blood.
Arch. Pathol. Lab. Med. 126, 947-950. doi: 10.5858/2002-126-0947-PEOMOI.

Wasserman R H, Chandler J S, Meyer S A, Smith C A, Brindak M E, Fullmer C S, Penniston J T und Kumar R (1992):
Intestinal calcium transport and calcium extrusion processes at the basolateral membrane.
J. Nutr. 122, 662-671. doi: 10.1093/jn/122.suppl_3.662.

Whiteford L C und Sheldon I M (2005):
Association between clinical hypocalcaemia and postpartum endometritis.
Vet. Rec. 157, 202-204. doi: 10.1136/vr.157.7.202.

Wiggers K D, Nelson D K und Jacobson N L (1975):
Prevention of parturient paresis by a low-calcium diet prepartum: a field study.
J. Dairy Sci. 58, 430-431. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(75)84584-X.

Wilkens M R, Kunert-Keil C, Brinkmeier H und Schröder B (2009):
Expression of calcium channel TRPV6 in ovine epithelial tissue.
J. Vet. Med. 182, 294-300. doi: 10.1016/j.tvjl.2008.06.020.

Wilkens M R, Mrochen N, Breves G und Schröder B (2011):
Gastrointestinal calcium absorption in sheep is mostly insensitive to an alimentary induced challenge of calcium homeostasis.
Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. 158, 199-207. doi: 10.1016/j.cbpb.2010.11.008.

Wilkens M R und Muscher-Banse A S (2020):
Review: regulation of gastrointestinal and renal transport of calcium and phosphorus in ruminants.
Animal 14, 29-43. doi: 10.1017/S1751731119003197.

Wilkens M R, Richter J, Fraser D R, Liesegang A, Breves G und Schröder B (2012):
In contrast to sheep, goats adapt to dietary calcium restriction by increasing intestinal absorption of calcium.
Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 163, 396-406. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.06.011.

Winkler K R (2015):
Hämatologisch-immunologische Verlaufsuntersuchungen bei Kühen mit Gebärparese.
Dissertation, Universität Leipzig

Wylie M, Fontenot J und Greene L (1985):
Absorption of magnesium and other macrominerals in sheep infused with potassium in different parts of the digestive tract.
J. Anim. Sci. 61, 1219-1229. doi: doi.org/10.2527/jas1985.6151219x.

Xiao B, Dubin A E, Bursulaya B, Viswanath V, Jegla T J und Patapoutian A (2008):
Identification of transmembrane domain 5 as a critical molecular determinant of menthol sensitivity in mammalian TRPA1 channels.
J. Neurosci. 28, 9640-9651. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2772-08.2008.

Xu H, Delling M, Jun J C und Clapham D E (2006):
Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels.
Nat. Neurosci. 9, 628-635. doi: 10.1038/nn1692.

Yamagishi N und Kawashima C (2022):

Prepartum measurement of serum biomarkers reflecting osteoclastic and osteoblastic bone metabolism for predicting the risk of milk fever in dairy cows.

J. Dairy Res. 89, 44-52. doi: 10.1017/S0022029922000218.

Yamagishi N, Miyazaki M und Naito Y (2006):

The expression of genes for transepithelial calcium-transporting proteins in the bovine duodenum.

J. Vet. Med. 171, 363-366. doi: 10.1016/j.tvjl.2004.10.021.

Yamagishi N, Yukawa Y A, Ishiguro N, Soeta S, Lee I H, Oboshi K und Yamada H (2002):
Expression of calbindin-D9k messenger ribonucleic acid in the gastrointestinal tract of dairy cattle.

J. Vet. Med. A 49, 461-465. doi: 10.1046/j.1439-0442.2002.00483.x.

Yin Y, Wu M, Zubcevic L, Borschel W F, Lander G C und Lee S-Y (2018):

Structure of the cold- and menthol-sensing ion channel TRPM8.

Science 359, 237-241. doi: 10.1126/science.aan4325.

Yogeshpriya S, Selvaraj P, Ramkumar P, Venkatesan M, Saravanan M und Jayalakshmi K (2020):

Accuracy of direct vs calculated ionized calcium in treatment planning for transition cow medical care: A review of 104 dairy cows.

Int. J. Chem. Stud. 8, 2009-2011. doi: 10.22271/chemi.2020.v8.i1ad.8560.

You A Y F, Bergholt M S, St-Pierre J-P, Kit-Anan W, Pence I J, Chester A H, Yacoub M H, Bertazzo S und Stevens M M (2017):

Raman spectroscopy imaging reveals interplay between atherosclerosis and medial calcification in the human aorta.

Sci. Adv. 3, e1701156. doi: 10.1126/sciadv.1701156.

Zhang L, Du S-Y, Lu Y, Liu C, Wu H-C, Tian Z-H, Wang M und Yang C (2017):

Puerarin transport across rat nasal epithelial cells and the influence of compatibility with paeoniflorin and menthol.

Drug Des. Devel. Ther. Volume 11, 2581-2593. doi: 10.2147/DDDT.S143029.

Zhao H, Ren S, Yang H, Tang S, Guo C, Liu M, Tao Q, Ming T und Xu H (2022):

Peppermint essential oil: its phytochemistry, biological activity, pharmacological effect and application.

Biomed. Pharmacother. 154, 113559. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113559.

Anhang

Tabelle A1: Futterergebnisse der totalen Mischration (TMR) der trockenstehenden Milchkühe.

Die Proben wurden in regelmäßigen Abständen gezogen und durch das LKS (Landwirtschaftliche Kommunikations- und Servicegesellschaft mbH) analysiert.

Nr. Futterprobe	Datum	Art	Trockensubstanz im kg Futter [g]	Rohasche im kg Trockensubstanz [g]	Rohprotein im kg Trockensubstanz [g]	Rohfaser im kg Trockensubstanz [g]	Rohfett im kg Trockensubstanz [g]	Zucker im kg Trockensubstanz [g]	Stärke im kg Trockensubstanz [g]	Proteinlöslichkeit im kg Futter [% des RPr]
TT-26/18	28.06.2018	TMR	491	88	131	254	27	41	107	48,6
TT-34/18	06.08.2018	TMR	410	86	136	244	29	28	153	44,6
TT-35-18	27.08.2018	TMR	375	54	104	222	34	10	276	54,1
TT-39/18	24.09.2018	TMR	399	85	147	218	33	29	173	48,1
TT-43/18	22.10.2018	TMR	418	84	145	234	33	37	115	54,3
TT-47/18	19.11.2018	TMR	403	93	137	280	30	27	68	55,7
TT-51/18	17.12.2018	TMR	399	81	133	263	28	31	106	48,5
TT-3/19	16.01.2019	TMR	444	81	147	256	28	37	100	47,1
TT-20/19	15.05.2019	TMR	385	87	141	255	28	28	116	43,4
TT-24/19	14.06.2019	TMR	373	88	164	229	36	24	139	45,1
TT-28/19	08.07.2019	TMR	399	92	150	247	35	36	91	48,2
TT-32/19	05.08.2019	TMR	356	90	150	243	38	25	123	40,3
TT-36/19	02.09.2019	TMR	459	69	151	224	33	27	215	30,7
TT-40/19	30.09.2019	TMR	383	75	140	218	32	22	203	50,9
TT-44/19	28.10.2019	TMR	377	80	151	232	32	23	154	46,9
TT-48/19	25.11.2019	TMR	351	76	146	218	32	29	153	50,3
TT-52/19	23.12.2019	TMR	389	77	154	207	32	36	161	49,1
TT-05/20	27.01.2020	TMR	407	77	159	211	33	40	140	47,5

Nr. Futterprobe	Neutral-Deterg.-faser (aNDF)Form im kg Trockensubstanz [g]	saure Deterg.-Faser (ADF)Form im kg Trockensubstanz [g]	saures Deterg.-Lignin (ADL) im kg Trockensubstanz [g]	nicht-Faser-Kohlenhydrat (NFC) im kg Trockensubstanz [g]	Calcium im kg Trockensubstanz [g]	Phosphor im kg Trockensubstanz [g]	Natrium im kg Trockensubstanz [g]	Magnesium im kg Trockensubstanz [g]	Kalium im kg Trockensubstanz [g]	Chlorid im kg Trockensubstanz [g]	Schwefel im kg Trockensubstanz [g]
TT-26/18	466	281	29	289	5,9	3,6	2,0	2,4	21,9	9,0	2,3
TT-34/18	462	272	30	287	6,3	3,7	2,2	2,3	21,5	8,2	2,4
TT-35-18	432	235	22	376	3,4	2,6	0,8	1,6	14,5	4,5	1,5
TT-39/18	397	245	26	338	6,1	3,7	2,2	2,5	20,2	8,9	2,3
TT-43/18	424	259	24	313	5,0	3,6	1,7	2,5	24	9,9	2,3
TT-47/18	475	297	29	265	7,7	3,4	1,8	2,5	23,6	8,6	2,0
TT-51/18	473	289	28	285	5,1	3,5	2,0	2,2	22,2	9,3	2,2
TT-3/19	453	283	31	291	5,7	3,4	1,3	2,0	21,6	7,6	2,2
TT-20/19	468	281	32	276	6,5	3,8	2,8	2,5	21,1	9,4	2,5
TT-24/19	419	263	31	293	7,4	4,3	3,1	2,7	22,6	10,2	2,8
TT-28/19	445	278	29	278	5,2	3,5	1,9	2,0	18,9	9,5	2,7
TT-32/19	476	276	33	247	7,0	3,7	2,3	2,8	21,5	9,8	2,7
TT-36/19	429	254	35	317	6,0	3,6	1,2	2,6	20,6	7,0	2,5
TT-40/19	379	229	25	375	5,8	3,8	3,2	2,9	18,3	8,7	2,4
TT-44/19	418	253	28	320	6,9	3,7	2,4	2,8	21,9	8,8	2,7
TT-48/19	406	239	27	341	6,7	4,2	2,2	2,7	21,4	7,6	2,8
TT-52/19	385	228	26	352	6,9	4,3	1,9	2,9	21,6	7,4	2,8
TT-05/20	390	233	27	341	6,6	4,2	1,9	2,9	21,6	7,3	2,8

Nr. Futterprobe	DCAB im kg Trockensubstanz [meq]	Umsetzbare Energie im kg Trockensubstanz [MJ/kg]	Netto-Energie-Laktation im kg Trockensubstanz [MJ/kg]	nutzbares Rohprotein im kg Trockensubstanz [g]	ruminale N-Bilanz im kg Trockensubstanz [gN]
TT-26/18	252	9,4	5,5	130	0,2
TT-34/18	266	9,8	5,8	135	0,2
TT-35-18	187	10,1	6,0	130	-4,2
TT-39/18	219	10,6	6,4	146	0,2
TT-43/18	269	10,3	6,2	143	0,4
TT-47/18	314	9,2	5,3	129	1,3
TT-51/18	253	9,3	5,5	129	0,6
TT-3/19	261	9,6	5,7	136	1,7
TT-20/19	242	9,5	5,6	134	1,1
TT-24/19	255	10,6	6,4	151	2,2
TT-28/19	134	10,2	6,1	142	1,2
TT-32/19	204	10,3	6,2	144	0,9
TT-36/19	229	10,5	6,3	146	0,7
TT-40/19	211	10,5	6,3	143	-0,5
TT-44/19	250	10,3	6,2	144	1,1
TT-48/19	258	10,5	6,3	145	0,2
TT-52/19	257	10,7	6,5	149	0,8
TT-05/20	256	10,7	6,5	151	1,3

Tabelle A2: Futterergebnisse der totalen Mischration (TMR) der laktierenden Milchkühe.

Die Proben wurden in regelmäßigen Abständen gezogen und durch das LKS (Landwirtschaftliche Kommunikations- und Servicegesellschaft mbH) analysiert.

Nr. Futterprobe	Datum	Art	Trockensubstanz im kg Futter [g]	Rohasche im kg Trockensubstanz [g]	Rohprotein im kg Trockensubstanz [g]	Rohfaser im kg Trockensubstanz [g]	Rohfett im kg Trockensubstanz [g]	Zucker im kg Trockensubstanz [g]	Stärke im kg Trockensubstanz [g]	Proteinlöslichkeit im kg Futter [% des RPr]
TH-26/18	28.06.2018	TMR	399	89	152	214	31	43	139	56,3
TH-34/18	06.08.2018	TMR	399	105	156	209	34	30	156	52,0
TH-35/18	27.08.2018	TMR	382	90	158	211	34	38	146	51,6
TH-39/18	24.09.2018	TMR	401	86	152	219	32	42	132	55,6
TH-43/18	22.10.2018	TMR	368	73	138	231	34	29	165	55,0
TH-47/18	19.11.2018	TMR	384	83	146	260	33	24	91	57,2
TH-51/18	17.12.2018	TMR	387	86	141	225	33	27	178	53,4
TH-3/19	16.01.2019	TMR	353	76	150	225	37	24	153	58,7
TH-20/19	15.05.2019	TMR	363	78	155	214	31	24	179	44,9
TH-24/19	14.06.2019	TMR	389	94	161	233	35	23	126	47,1
TH-28/19	08.07.2019	TMR	375	92	160	227	37	35	132	49,9
TH-32/19	05.08.2019	TMR	333	83	163	222	41	25	142	39,9
TH-36/19	02.09.2019	TMR	414	74	135	200	33	36	230	48,6
TH-40/19	30.09.2019	TMR	419	67	137	206	29	27	230	49,8
TH-44/19	28.10.2019	TMR	385	79	148	220	35	27	145	52,7
TH-48/19	25.11.2019	TMR	364	73	144	208	34	28	178	52,5
TH-52/19	23.12.2019	TMR	360	74	158	205	36	33	141	53,7
TH-05/20	27.01.2020	TMR	391	74	154	197	34	35	182	51,1

Nr. Futterprobe	Neutral-Deterg.-faser (aNDFom) im kg Trockensubstanz [g]	saure Deterg.-Faser (ADFom) im kg Trockensubstanz [g]	saures Deterg.-Lignin (ADL) im kg Trockensubstanz [g]	nicht-Faser-Kohlenhydrat (NFC) im kg Trockensubstanz [g]	Calcium im kg Trockensubstanz [g]	Phosphor im kg Trockensubstanz [g]	Natrium im kg Trockensubstanz [g]	Magnesium im kg Trockensubstanz [g]	Kalium im kg Trockensubstanz [g]	Chlorid im kg Trockensubstanz [g]	Schwefel im kg Trockensubstanz [g]
TH-26/18	388	239	23	341	6,3	3,8	2,0	2,6	23,4	8,6	2,4
TH-34/18	392	239	26	313	6,9	4,0	2,2	2,6	23,1	8,5	2,5
TH-35/18	401	241	25	317	7,3	4,1	2,2	2,5	21,8	8,7	2,5
TH-39/18	387	243	23	343	6,4	3,8	2,0	2,4	20,5	8,5	2,4
TH-43/18	431	254	23	324	5,5	3,9	2,2	2,5	22,8	9,3	2,2
TH-47/18	440	276	26	298	5,7	3,7	2,3	2,6	26,6	10,0	2,2
TH-51/18	410	246	23	231	4,8	3,6	2,2	2,5	22,0	9,2	2,1
TH-3/19	397	238	22	340	5,6	4,2	1,5	2,2	24,4	8,2	2,5
TH-20/19	411	242	30	325	6,8	4,0	2,8	2,7	17,8	7,2	2,5
TH-24/19	416	264	30	294	7,6	4,2	2,7	2,8	24,5	10,6	2,9
TH-28/19	404	255	27	306	6,8	4,1	3,0	2,6	19,2	12,1	2,8
TH-32/19	450	254	32	262	6,0	4,0	2,6	2,6	20,6	10,6	2,8
TH-36/19	375	223	22	384	6,9	3,5	1,4	2,7	18,1	6,8	2,4
TH-40/19	366	219	24	400	6,4	4,0	2,4	3,0	17,6	7,3	2,5
TH-44/19	403	237	26	335	6,4	3,8	1,9	2,6	22,4	8,3	2,7
TH-48/19	391	228	24	359	6,0	3,9	1,9	2,5	20,3	7,4	2,6
TH-52/19	390	223	25	342	6,5	4,4	2,0	2,9	22,2	7,2	2,7
TH-05/20	384	223	24	354	6,6	4,4	1,9	2,9	21,1	6,5	2,8

Nr. Futterprobe	DCAB im kg Trockensubstanz [meq]	Umsetzbare Energie im kg Trockensubstanz [MJ/kg]	Netto-Energie-Laktation im kg Trockensubstanz [MJ/kg]	nutzbares Rohprotein im kg Trockensubstanz [g]	ruminale N-Bilanz im kg Trockensubstanz [gN]
TH-26/18	294	10,5	6,3	147	0,8
TH-34/18	292	10,8	6,6	151	0,8
TH-35/18	254	10,8	6,5	151	1,1
TH-39/18	228	10,6	6,4	147	0,7
TH-43/18	279	10,3	6,2	141	-0,5
TH-47/18	360	9,8	5,8	138	1,3
TH-51/18	268	10,4	6,2	143	-0,3
TH-3/19	307	10,6	6,4	147	0,4
TH-20/19	216	10,6	6,4	148	1,1
TH-24/19	269	10,5	6,3	149	2,0
TH-28/19	106	10,7	6,4	150	1,6
TH-32/19	163	10,9	6,6	153	1,6
TH-36/19	186	10,8	6,5	145	-1,6
TH-40/19	188	10,5	6,3	142	-0,8
TH-44/19	257	10,6	6,4	147	0,2
TH-48/19	230	10,8	6,5	147	-0,5
TH-52/19	283	11,0	6,7	153	0,8
TH-05/20	265	11,0	6,7	152	0,3

Publikationen

Zeitschriftenartikel

Ott, D.; Schrapers, K.T.; Aschenbach, J.R. (2021): Changes in the relationship between ionized and total calcium in clinically healthy dairy cows in the period around calving. *Animals*, 11(4), 1036, <https://doi.org/10.3390/ani11041036>

Ott, D.; Manneck, D.; Schrapers, K.T.; Rosendahl, J.; Aschenbach, J.R. (2023): Blood calcium concentration and performance in periparturient and early lactating dairy cows is influenced by plant bioactive lipid compounds. *Journal of Dairy Science* (2023), <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22387> (zum Zeitpunkt der Einreichung der Dissertation als *Articel in press*)

Konferenzbeiträge

Ott, D.; Rosendahl, J.; Schrapers, K.T.; Aschenbach, J.R. (2020): Comparison of ionized and total calcium level in whole blood and serum, respectively, of multiparous cows around parturition
74. Jahrestagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE)
Göttingen– 03.03.-05.03.2020
In: Proceedings of the Society of Nutrition Physiology – Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (Hrsg.) Band 29, S. 70

Manneck, D.; Ott, D.; Rosendahl, J.; Aschenbach, J. R. (2021): Influence of a menthol-rich feed additive on calcium homeostasis and performance in peripartal dairy cows.
75. Jahrestagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE)
Berlin– 16.03.-18.03.2021
In: Proceedings of the Society of Nutrition Physiology–Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (Hrsg.) Band 30, S. 113

Manneck, D.; Ott, D.; Geiger, S.; Patra, A. K.; Schrapers, K. T.; Rosendahl, J.; Aschenbach, J. R. (2021): Blutkalziumgehalt in der peripartalen Phase und dessen Beeinflussung durch mentholreiche bioaktive Pflanzenlipide.
45. Internationale Leipziger Laborfortbildung
Leipzig– 08.10.-09.10.2021
In: Fürll, M. (ed.): 45. Internationale Leipziger Laborfortbildung: Tradition und Zukunft in der Veterinärmedizin, S. 77-78

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Univ.-Prof. Dr. Jörg Aschenbach für die wissenschaftliche Betreuung. Vom ersten Treffen an fühlte ich mich bestens betreut. Danke für die vielen konstruktiven Denkanstöße, die Ideen, wenn es mal wieder stockte, die Korrekturen und die vielen Stunden, die diese Arbeit benötigt hat.

Herzlichen Dank gilt der gesamten PerformaNat GmbH. Ohne sie wäre die Dissertation niemals entstanden. Nicht nur für die finanzielle Unterstützung, sondern auch für die Erfahrung, die ich mit dieser Arbeit machen konnte, möchte ich mich ganz herzlichen bedanken.

Insbesondere will ich an Dr. Julia Rosendahl danke sagen. Sie war mein erster Kontakt mit PerformaNat. Ich habe mich immer sehr auf die Treffen mit dir gefreut, wofür oft ein langer Weg für dich nötig war. Von Anfang an warst du mir immer eine helfende Hand an meiner Seite.

Besonderer Dank geht auch an Dr. Katharina Schrapers. Ohne die vielen Telefonate mit dir, die vielen Emails und deine Zeit, wäre ich wohl nie durch den Datendschungel gekommen. Danke für die viele Mühe, die du investiert hast. Ich hätte mir keine bessere Person hierfür wünschen können!

Danke auch an Dr. David Manneck. Ohne dein intensives Bemühen mit meinen vielen Daten und die mit dir angefertigte Statistik hätte ich die Arbeit nicht beenden können. Danke auch für die vielen Emails mit ausführlichen Antworten auf meine tausend Fragen. Danke für die unermüdliche Hilfe!

Danke an Dr. Manfred Sommerer. Ohne deine Expertise in Bezug auf computer- oder programmbezogene Probleme wäre ich manchmal fast verzweifelt. Danke für die immer schnelle Hilfe und die stetige Verfügbarkeit, falls sich mal wieder ein Problem offenbart hat.

Danke auch an Hubert Steinhauser. Ohne deine Tiere, deine Hilfe, dein Einverständnis und dein Engagement wären die Versuche nie in dieser Weise zustande gekommen. Es war eine unheimlich schöne Zeit, an die ich mich gerne zurückerinnere.

Danke besonders an meine Familie: Mama, Papa, Hannah und Elisabeth. Ihr seid immer da, wenn ich euch brauche, gebt mir den Rahmen, um das zu tun, was mir Spaß macht und unterstützt mich egal bei welchem Weg. Ohne euch wäre dieser Weg so nicht möglich gewesen.

Besonderen Dank an meinen stetigen Fels in der Brandung! Ohne dich, Stefan, hätte ich diese Arbeit wohl nicht geschafft. Ohne dein Vertrauen, deine Geduld, deine Unterstützung und dein gutes Zureden und auch ohne deinen Verzicht auf gemeinsame Zeit hätte ich diese Arbeit nicht beenden können. Ich danke dir dafür von Herzen!

Interessenskonflikte

Die Arbeiten wurden in Kooperation mit der PerformaNat GmbH angefertigt und finanziell gefördert. Die Subvention durch die PerformaNat GmbH hatte keinen Einfluss auf die Auswertung und Interpretation der Daten. Zu keiner Zeit wurden die gezogenen Schlussfolgerungen durch die Kooperation beeinflusst.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe.
Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch
genommen habe.

Heimertingen, den 18.10.2023

Dorothee Maria Ott

