

Aus dem Institut für Tierernährung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zur Bildung von Vitamin K<sub>2</sub>  
durch die Intestinalflora des Hundes**

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

vorgelegt von  
SUSAN KRÖGER  
Tierärztin  
aus Rahden

Berlin 2009

Journal-Nr.: 3318

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Florian J. Schweigert  
Dritter Prüfer: Prof. Dr. Heike Tönhardt

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

vitamin K, menaquinones, dogs, fermentation, large intestine, digesta

Tag der Promotion: 17.07.2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-653-7

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

*Meinen Eltern*

## **Inhalt**

Abkürzungen	7
Tabellen und Abbildungen	9
1. Einleitung	14
2. Literaturübersicht	15
2.1 Vitamin K	15
2.1.1 Geschichte des Vitamin K	15
2.1.2 Chemische Struktur und Eigenschaften von Vitamin K	16
2.1.2.1 Vitamin K-Zyklus in Leberzellen und extrahepatischen Zellen	17
2.1.2.2 Vitamin K <sub>1</sub>	18
2.1.2.3 Vitamin K <sub>2</sub>	18
2.1.2.4 Vitamin K <sub>3</sub>	19
2.1.3 Vorkommen und Bildung von Vitamin K	20
2.1.3.1 Vitamin K <sub>1</sub>	20
2.1.3.2 Vitamin K <sub>2</sub>	21
2.1.3.3 Vitamin K <sub>3</sub>	23
2.1.4 Resorption und Ausscheidung von Vitamin K	23
2.1.4.1 Vitamin K <sub>1</sub>	23
2.1.4.2 Vitamin K <sub>2</sub>	25
2.1.4.3 Vitamin K <sub>3</sub>	28
2.1.5 Verteilung von Vitamin K im Körper	29
2.1.6 Biologische Funktionen des Vitamin K	31
2.1.7 Vitamin K-Bedarf von Hunden	33
2.1.8 Hypo- und Hypervitaminose	34
2.1.9 Einsatz von Vitamin K in Futtermitteln	37

2.2 In-vitro-Methoden zur Untersuchung der Bildung von Vitamin K <sub>2</sub>	37
2.3 Analytik von Vitamin K	39
3. Material und Methoden	44
3.1 In-vitro-Methoden zur Untersuchung der Bildung von Vitamin K <sub>2</sub>	44
3.1.1 Semikontinuierliches Langzeitinkubationssystem	44
3.1.1.1 Probenmaterial	44
3.1.1.2 Versuchsaufbau	44
3.1.1.3 Versuchsablauf	45
3.1.2 Kurzzeitinkubationssystem	47
3.1.2.1 Probenmaterial	48
3.1.2.2 Versuchsaufbau	48
3.1.2.3 Versuchsablauf	48
3.1.3 Analytik der Fermentationsparameter	49
3.1.3.1 Messung des pH-Wertes	49
3.1.3.2 Messung des Redoxpotentials	50
3.1.3.3 Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren	50
3.1.3.4 Bestimmung von Laktat	51
3.1.3.5 Bestimmung von Ammonium	53
3.2 Bestimmung der Vitamin K <sub>2</sub> -Konzentration in der Digesta von Hunden	53
3.3 Analytik von Vitamin K <sub>2</sub>	54
3.3.1 Referenzstandard und interner Standard	55
3.3.2 Extraktion der Proben	55
3.3.3 Reinigung der Proben	56
3.3.4 HPLC-Analyse	57
3.4 Auswertung der Daten	58

4. Ergebnisse	59
4.1 In-vitro-versuch mit einem semikontinuierlichen Langzeitinkubationssystem	59
4.1.1 pH-Wert	59
4.1.2 Redoxpotential	59
4.1.3 Durchflussrate des Puffers	60
4.1.4 Flüchtige Fettsäuren	61
4.1.4.1 Flüchtige Fettsäuren im Fermenter	61
4.1.4.2 Flüchtige Fettsäuren im Überlauf	62
4.1.5 Laktat	64
4.1.6 Analyse von Vitamin K <sub>2</sub>	64
4.2 In-vitro-Untersuchungen mit einem Kurzzeitinkubationssystem	65
4.2.1 pH-Wert	65
4.2.2 Flüchtige Fettsäuren	65
4.2.3 Ammonium (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	66
4.2.4 Laktat	67
4.2.5 Analyse von Vitamin K <sub>2</sub>	68
4.3 Konzentrationen von Vitamin K <sub>2</sub> im Darminhalt	73
5. Diskussion	77
5.1 Kritik der Methode	77
5.1.1 Wahl des Inokulums für die In-vitro-Versuche	77
5.1.2 Probenmaterial für In-vitro- und Ex-vivo-Versuche	78
5.1.3 Methode der semikontinuierlichen Langzeitinkubation	78
5.1.4 Methode der Kurzzeitinkubation	80
5.1.5 Analyse von Vitamin K <sub>2</sub> (HPLC)	82

# INHALTSVERZEICHNIS

---

5.2 Diskussion der Ergebnisse der Vitamin K <sub>2</sub> -Analyse	84
5.2.1 Ergebnisse des semikontinuierlichen Langzeitinkubationsversuches	84
5.2.2 Ergebnisse der Kurzzeitinkubationsversuche	85
5.2.3 Ergebnisse der Analysen der Digestproben	89
5.3 Schlussfolgerung und Ausblick	90
6. Zusammenfassung	91
7. Summary	93
8. Literaturverzeichnis	94
9. Anhang	115
Publikationsverzeichnis	120
Danksagung	121
Selbständigkeitserklärung	122

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
d	Tag
E	Essigsäure
F	Fermenter
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
Gla	$\gamma$ -Carboxyglutaminsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
i-B	i-Buttersäure
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
l	Liter
min	Minute
MK	Menachinon
MK-n	Menachinon mit variabler Anzahl von Isopreneinheiten in der Seitenkette
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
Ms	Maisstärke
mV	Millivolt
Mw	Mittelwert
NADPH	reduzierte Form des Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
n-B	n-Buttersäure
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium
n	Anzahl
nm	Nanometer
n.n.	nicht nachweisbar
P	Propionsäure
Pep	Fleischpepton
pH	potentia hydrogenii

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

PK	Phyllochinon
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
SPE	Festphasenextraktion (solid-phase extraction)
spp.	Spezies
Tab.	Tabelle
Ü	Überlauf
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol

**Tabellen**

Tab. 1:	Überblick über die von Bakterien im Intestinaltrakt gebildeten Menachinone (MK)	21
Tab. 2:	Empfehlungen bzw. Vorschläge für die tägliche Aufnahme von Vitamin K <sub>1</sub> bzw. K <sub>3</sub> für Hunde und Welpen pro kg Körpermasse (KM)	34
Tab. 3:	Zusammensetzung (mmol/l Aqua bidest.) der für die Langzeitinkubation verwendeten Puffer-lösung (pH = 7,0)	46
Tab. 4:	Zusammensetzung des zugegebenen Nährstoffsubstrats für die semikontinuierliche Langzeitinkubation	47
Tab. 5:	Konzentrationen (g) von Maisstärke und Fleischpepton in den Inkubations-gefäßen (1-9) und in der Kontrolle (K) der Kurzzeitinkubation	48
Tab. 6:	Zusammensetzung (g/l Aqua bidest.) des PRAS-Puffers (“Prereduced Anaerobe Sterilized“ Medium) für die Kurzzeitinkubation	49
Tab. 7:	Zusammensetzung des internen Standards mit 0,5 mmol/l Capronsäure für die Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren	51
Tab. 8:	Zusammensetzung der Standardlösung (0,5 mmol/l) zur Ein-Punkt-Kalibrierung für die Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren	51
Tab. 9:	Rasse, Geschlecht, Alter, Körpermasse und Futter der Hunde, sowie die Lokalisation der entnommenen Digestproben	54
Tab. 10:	Herstellung der Vitamin K <sub>1</sub> -Standardlösung	55
Tab. 11:	Herstellung der Menachinon-Standardlösung	55
Tab. 12:	Zusammensetzung des HPLC-Eluenten	57
Tab. 13:	Tägliche Durchflussrate (ml) in den Fermentern 1-6, Mw ± SD (d = 18)	60
Tab. 14:	Gesamtkonzentration (Mw ± SD) der flüchtigen Fettsäuren (µmol/ml) in den einzelnen Fermentern (F1-F6) während der drei Phasen des Versuches	61
Tab. 15:	Prozentuale Verteilung (Mol. %; Mw ± SD) der Essigsäure (E), Propionsäure (P), i-Buttersäure (i-B) und n-Buttersäure (n-B) in den einzelnen Fermentern (F1-F6) während der drei Phasen des Versuches	62
Tab. 16:	Gesamtkonzentration (Mw ± SD) der flüchtigen Fettsäuren (µmol/ml) in den einzelnen Überläufen (Ü1-Ü6) in den drei Phasen des Versuches	63
Tab. 17:	Prozentuale Verteilung (Mol. %; Mw ± SD) der Essigsäure (E), Propionsäure (P), i-Buttersäure (i-B) und n-Buttersäure (n-B) in den einzelnen Überläufen (Ü1-Ü6) während der drei Phasen des Versuches	63
Tab. 18:	Konzentration von MK-7 (ng/ml) in den Überläufen (Ü1-Ü6) an sieben Tagen der Versuchsphase und im Fermenter (7F) am letzten Versuchstag	64

Tab. 19:	pH-Werte nach der Zugabe verschiedener Konzentrationen (0,1, 0,5 und 1,0 g) von Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)	65
Tab. 20:	Gesamtkonzentration der flüchtigen Fettsäuren ( $\mu\text{mol/ml}$ ) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe verschiedener Konzentrationen (0,1, 0,5 und 1,0 g) von Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)	66
Tab. 21:	Prozentuale Verteilung der Essigsäure (E), Propionsäure (P) und n-Buttersäure (n-B) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe verschiedener Konzentrationen (0,1, 0,5 und 1,0 g) von Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)	67
Tab. 22:	Konzentration von Ammonium ( $\text{mmol/l}$ ) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe verschiedener Konzentrationen (0,1, 0,5 und 1,0 g) von Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)	67
Tab. 23:	Gesamtkonzentrationen ( $\text{Mw}$ ) von MK-4 bis -10 ( $\text{ng/ml}$ ) im Chymus von Duodenum, Jejunum, Ileum, Zäkum und Kolon	76
Tab. 24:	pH-Wert, Gesamtmenge ( $\text{mmol/l}$ ) und Verteilung (%) der flüchtigen Fettsäuren im Kolon von Hunden	79
Tab. 25:	Verteilung der flüchtigen Fettsäuren (%) im Fermenter und Überlauf in der Versuchsphase der Langzeitinkubation ( $\text{Mw} \pm \text{SD}$ )	80
Tab. 26:	Einfluss von Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) auf die In-vitro-Bildung von Menachinon-4 bis -10	86
Tab. 27:	Herstellerverzeichnis der bei den Versuchen und Analysen verwendeten Chemikalien	116
Tab. 28:	pH-Werte ( $\text{Mw} \pm \text{SD}$ ) der einzelnen Fermenter (F1-F6) in den drei Phasen der semikontinuierlichen Langzeitinkubation	117
Tab. 29:	Redoxpotential ( $\text{Mw} \pm \text{SD}$ ) der einzelnen Fermenter (F1-F6) in den drei Phasen der semikontinuierlichen Langzeitinkubation	117
Tab. 30:	Konzentration von MK-4 ( $\text{ng/ml}$ ) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K) der Kurzzeitinkubation	117
Tab. 31:	Konzentration von MK-5 ( $\text{ng/ml}$ ) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K) der Kurzzeitinkubation	118

Tab. 32:	Konzentration von MK-6 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K) der Kurzzeitinkubation	118
Tab. 33:	Konzentration von MK-7 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K) der Kurzzeitinkubation	118
Tab. 34:	Konzentration von MK-8 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K) der Kurzzeitinkubation	119
Tab. 35:	Konzentration von MK-9 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K) der Kurzzeitinkubation	119
Tab. 36:	Konzentration von MK-10 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K) der Kurzzeitinkubation	119
Tab. 37:	Konzentrationen (ng/g) von MK-4 bis -10 im Duodenuminhalt von Hunden	120
Tab. 38:	Konzentrationen (ng/g) von MK-4 bis -10 im Jejunuminhalt von Hunden	120
Tab. 39:	Konzentrationen (ng/g) von MK-4 bis -10 im Zäkuminhalt von Hunden	120
Tab. 40:	Konzentrationen (ng/g) von MK-4 bis -10 im Koloninhalt von Hunden	120

### Abbildungen

Abb. 1:	Vitamin K-Zyklus in Leberzellen und verschiedenen extrahepatischen Gewebezellen	18
Abb. 2:	Chemische Struktur von Vitamin K <sub>1</sub>	18
Abb. 3:	Chemische Struktur von Vitamin K <sub>2</sub>	19
Abb. 4:	Chemische Struktur von Vitamin K <sub>3</sub>	19
Abb. 5:	Schematische Darstellung einer Fermentationseinheit der semi-kontinuierlichen Langzeitinkubation	46
Abb. 6:	pH-Werte (Mw ± SD) der einzelnen Fermenter (1-6) in der Äquilibrierungs- (n = 7), Kontroll- (n = 3) und Versuchsphase (n = 8)	59

Abb. 7:	Redoxpotential (Mw $\pm$ SD) der einzelnen Fermenter (1-6) in der Äquilibrierungs- (n = 7), Kontroll- (n = 3) und Versuchsphase (n = 8)	60
Abb. 8:	Konzentration von MK-4 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)	68
Abb. 9:	Konzentration von MK-5 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)	69
Abb. 10:	Konzentration von MK-6 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)	69
Abb. 11:	Konzentration von MK-7 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)	70
Abb. 12:	Konzentration von MK-8 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)	71
Abb. 13:	Konzentration von MK-9 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)	71
Abb. 14:	Konzentration von MK-10 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)	72
Abb. 15:	Gesamtkonzentrationen (Mw; n = 3) der MK-4 bis -10 (ng/ml) nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)	73
Abb. 16:	Konzentration von MK-4 bis -10 (ng/g) im Duodenuminhalt von Hunden (n=6)	74
Abb. 17:	Konzentration von MK-4 bis -10 (ng/g) im Jejunuminhalt von Hunden (n=5)	74
Abb. 18:	Konzentration von MK-4 bis -10 (ng/g) im Zäkuminhalt von Hunden (n=3)	75
Abb. 19:	Konzentration von MK-4 bis -10 (ng/g) im Koloninhalt von Hunden (n=8)	76
Abb. 20:	Konzentrationen (Mw) von MK-4 bis -10 (ng/g) in den verschiedenen Darmabschnitten von Hunden	90

## 1. Einleitung

Seit der Entdeckung des Vitamin K durch den Dänen Hendrik Dam wurde viel zu dessen Vorkommen, Funktionen und der Bedeutung der verschiedenen Formen geforscht. Bei Vitamin K<sub>1</sub> oder Phyllochinon (PK) und Vitamin K<sub>2</sub>, Menachinon (MK), handelt es sich um natürlich vorkommende Formen. Vitamin K<sub>3</sub> (Menadion) wird synthetisch hergestellt.

Vitamin K dient im menschlichen und tierischen Organismus als Cofaktor für verschiedene Proteine und hat dadurch einen Einfluss auf die Blutgerinnung, den Knochenstoffwechsel und weitere, z.T. noch unbekannte Funktionen.

Das über die Nahrung aufgenommene Vitamin K<sub>1</sub> wird an Mizellen gebunden im Dünndarm resorbiert und hauptsächlich über die Lymphe zur Leber, dem Hauptspeicherort, transportiert. Vitamin K<sub>2</sub> wird im Intestinaltrakt von der dort ansässigen Mikroflora gebildet. In welcher Form und in welchem Umfang diese Vitamin K-Quelle im Darm resorbiert und genutzt werden kann, ist noch weitgehend ungeklärt. Genauso unklar ist, ob durch die intestinale Synthese der tägliche Bedarf an Vitamin K gedeckt werden kann. Bei Tieren, die Koprophagie zeigen, ist dies mit ziemlicher Sicherheit der Fall.

Das synthetisch hergestellte Vitamin K<sub>3</sub> wird seit vielen Jahren als zugelassener Futtermittelzusatzstoff in der Tierernährung eingesetzt. Es findet vor allem in der Ernährung von Geflügel, aber auch im Heimtierfuttermittelbereich seinen Einsatz.

Untersuchungen zur Eigensynthese von Vitamin K<sub>2</sub> bei Hunden liegen nicht vor. Ein Ziel dieser Dissertation ist es deshalb, einen Überblick über die Bildung von Vitamin K<sub>2</sub> im Intestinaltrakt von Hunden zu bekommen. Des Weiteren wurde der Einfluss von Kohlenhydraten und Proteinen auf die mikrobielle Vitamin K<sub>2</sub>-Bildung überprüft.

Um Tierversuche vermeiden zu können, wurden zwei In-vitro-Methoden vergleichend bezüglich ihrer Anwendbarkeit auf die oben genannte Fragestellung getestet. Zum einen handelt es sich hierbei um eine Kurzzeitinkubation, die innerhalb relativ kurzer Zeit (24 Stunden) erste Ergebnisse zur Verfügung stellt. Die zweite ist eine semikontinuierliche Langzeitinkubation, bei welcher Fermentationsprozesse über einen Zeitraum von ca. drei Wochen beobachtet werden können.

Um einen Überblick darüber zu bekommen, wie sich die Vitamin K<sub>2</sub>-Konzentrationen und die Verteilung der einzelnen Metaboliten in den verschiedenen Darmabschnitten des Hundes darstellen, wurde zusätzlich zu den In-vitro-Versuchen die Konzentration von Vitamin K<sub>2</sub> im Darminhalt von Hunden aus Duodenum, Jejunum, Ileum, Zäkum und Kolon bestimmt. Diese Bestimmung dient außerdem als Vergleichsmöglichkeit, in wie weit sich beide In-vitro-Modelle zur Untersuchung der Vitamin K<sub>2</sub>-Synthese eignen.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Vitamin K

#### 2.1.1 Frühere Untersuchungen zum Vitamin K

Vitamin K wurde in den dreißiger Jahren von Hendrik Dam entdeckt. Es war das Ergebnis einiger Experimente über die Rolle von Cholesterol in der Ernährung von Hühnern, bei denen nach dem Verfüttern von fettfreiem Futter eine spontane Blutungsneigung festgestellt werden konnte (Dam, 1929). Es folgten weitere Studien, um die Ursache der Blutungen zu untersuchen. In einem Fütterungsversuch an Hühnern stellte sich heraus, dass die Fütterung bestimmter Futtermittel wie z.B. Schweineleber und verschiedene Getreide- und Gemüsesorten gegen ein Auftreten von Blutungen schützen kann, wohingegen bei anderen (z.B. Reis, Sonnenblumenkerne, Mais und Roggen) Hämorrhagien und verlängerte Blutungszeiten beobachtet werden konnten (Dam, 1935). Das neu entdeckte Vitamin wurde zunächst als antihämorrhagischer oder Koagulationsfaktor bezeichnet, bevor es seinen heute noch gültigen Namen Vitamin K erhielt (Dam, 1935). Im Jahr 1943 wurde Hendrik Dam zusammen mit Edward A. Doisy mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet, für die Entdeckung dieses neuen Vitamins und für die Aufklärung seiner chemischen Beschaffenheit (Zetterström, 2006).

Bald nach der Entdeckung zeigte sich, dass es zwei natürlich vorkommende Formen gibt, das Phyllochinon (Vitamin K<sub>1</sub>) und das Menachinon (Vitamin K<sub>2</sub>). Obwohl schon Ende der dreißiger Jahre herausgefunden wurde, dass es eine Beziehung zwischen einem niedrigen Prothrombingehalt im Blutplasma und einem Mangel an Vitamin K gibt (Shearer, 1992), wurde erst in den fünfziger Jahren entdeckt, dass drei weitere prokoagulatorische Faktoren (VII, IX und X) für ihre biologische Aktivität Vitamin K benötigen. Nach weiteren Jahren wurden neben den gerinnungsfördernden Faktoren weitere Vitamin K-abhängige Proteine identifiziert, welche die Bezeichnung Protein C und Protein S erhielten (Stenflo, 1976; Di Scipio et al., 1977). Die Funktion dieser Proteine war zunächst unklar. Es stellte sich nach weiteren Studien heraus, dass auch sie an der Hämostase beteiligt sind, jedoch einen gerinnungshemmenden Einfluss ausüben (Seegers et al., 1976; Comp et al., 1982; Hackeng et al., 1994). Lange Zeit war die genaue biochemische Funktion von Vitamin K unklar. Diese wurde 1974 herausgefunden, als eine bis dahin unbekannte säurehaltige Aminosäure, die  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure, aus bovinem Prothrombin isoliert wurde, bei welcher das Vitamin K die Rolle eines Mediators bei der Carboxylierung spielt (Stenflo et al., 1974). Gleichzeitig entdeckte man, dass  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure in den funktionell inaktiven Prothrombinmolekülen bei Tieren fehlte, welche nach der Aufnahme von Cumarin Gerinnungsstörungen aufwiesen (Stenflo et al., 1974). Nach der Entdeckung der  $\gamma$ -

Carboxyglutaminsäure dauerte es noch ein halbes Jahrhundert, bis weitere  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure-abhängige Proteine identifiziert wurden, welche nicht an der Hämostase beteiligt sind (Vermeer und Hamulyak, 2004), sondern ihre Funktion in der Kalzifizierung von Gewebe, der Knochenformatierung und bei Zellwachstum und Apoptosis haben. Für andere Proteine sind die Funktionen immer noch nicht geklärt.

### **2.1.2 Chemische Struktur und Eigenschaften von Vitamin K**

Alle Verbindungen mit Vitamin K-Aktivität bestehen aus einem 2-Methyl-1,4-Naphtochinon Ring (NRC, 1987). Vitamin K ist eine allgemeine Bezeichnung sowohl für das 2-Methyl-1,4-Naphtochinon als auch für alle Verbindungen, denen an der dritten Position eine Seitenkette angehängt ist und die eine Gerinnungsstörung verhindern können (NRC, 1987). Bei dieser Seitenkette handelt es sich um Isopreneinheiten mit jeweils fünf Kohlenstoffatomen. Die Anzahl der Isopreneinheiten dient als Grundlage bei der Bezeichnung der Seitenkette (IUPAC-IUB, 1975). Eine Einheit wird als „Prenyl“ bezeichnet, die Hexahydrotetraprenyl-Seitenkette als „Phytyl“ (IUPAC-IUB, 1975).

Der 2-Methyl-1,4-Naphtochinon Ring kann vom Tierkörper nicht synthetisiert werden (Suttie, 1984). Bakterien und Pflanzen sind jedoch in der Lage, den aromatischen Ring über weitere Zwischenstufen aus Shikimisäure zu synthetisieren (Cox und Gibson, 1966; Bentley, 1975). Vitamin K zählt zur Gruppe der fettlöslichen Vitamine (Dam, 1935). Es ist lichtempfindlich und sehr hohe Temperaturen (185 – 190 °C) können zu erheblichen Verlusten führen (Ferland und Sadowski, 1992b). Beim Autoklavieren eines Futters mit zugesetztem PK konnte ein Verlust von bis zu 70 % beobachtet werden (Ronden et al., 1998).

Besonders die Lichtempfindlichkeit, sowohl gegenüber Tageslicht als auch bei fluoreszierendem Licht ist ein limitierender Faktor bei Arbeiten mit Vitamin K. Somit sollte auf eine lichtgeschützte Lagerung von Gemüse und Ölen mit Vitamin K-Gehalt geachtet werden und bei Arbeiten im Labor gedämpfte Lichtverhältnisse herrschen (Ferland und Sadowski, 1992b). Es ist zu empfehlen, Vitamin K bei Laborarbeiten, aber auch Vitamin K-beihaltende Speiseöle (z.B. Raps- und Sojaöl) in lichtgeschützten Behältnissen zu lagern. Es zeigte sich, dass ein zweitägiger Einfluss von Laborlicht bei Raumtemperatur zu einem unbedeutenden Verlust von PK führte, während nach neun Tagen unter gleichen Bedingungen 50 % verloren gingen (Seifert, 1979).

Das ultraviolette Spektrum der oxidierten Form des Vitamin K zeigt im Bereich zwischen 240 und 280 nm vier Peaks und hat eine weniger deutliche Absorption zwischen 320 und 330 nm. Nach einer Reduktion zum Hydrochinon ist das Bild des Absorptionsspektrums deutlich verändert. Der Peak bei 245 nm wird deutlicher und der Peak bei 270 nm verschwindet (Suttie, 1984).

### 2.1.2.1 Der Vitamin K-Zyklus in Leberzellen und extrahepatischen Zellen

Das Vitamin K unterliegt einer ständigen zyklischen Umwandlung (Thijssen und Drittij-Reijnders, 1994). Dieser Vorgang, der so genannte Vitamin K-Zyklus, wurde zunächst nur in den Zellen der Leber vermutet. Es konnten jedoch auch in extrahepatischen Zellen, wie z.B. Niere, Milz Lunge, Hoden und Knochen am Zyklus beteiligte Vitamin K-abhängige Carboxylasen gefunden werden (Friedman und Smith, 1977; Vermeer et al., 1982; Thijssen und Baars, 1991). Die zyklische Umwandlung des Vitamin K findet im endoplasmatischen Retikulum der Zellen statt (Bristol et al., 1996).

Bei der Carboxylierung von Glutamaresten zu  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure dient neben dem Einfluss von Kohlenstoffdioxid ein reduziertes Vitamin K-Molekül, das Vitamin K-Hydrochinon, als Cofaktor, welcher während dieser Reaktion zum Vitamin K-Epoxid umgewandelt wird (Suttie, 1987; Vermeer, 1990; Spronk et al., 2003). Es scheint, dass dieser Vorgang der Oxidation ein eigenständiger Prozess ist, und dass die dabei entstehende Energie für die parallel ablaufende Carboxylierung genutzt wird (Vermeer, 1990). Ohne Carboxylierung können die Vorläuferproteine der Blutgerinnung kein Kalzium binden und sind damit nicht fähig, an der Gerinnungskaskade mitzuwirken (Ramotar et al., 1984). Bevor es wieder verwendet werden kann, muss das Vitamin K-Epoxid durch die Vitamin K-Epoxid-Reduktase wieder zum Vitamin K und danach zu seiner reduzierten, aktiven Form umgewandelt werden (Abb. 1). Es ist jedoch nicht ganz klar, ob die Vitamin K-Epoxid-Reduktase neben der Umwandlung vom Epoxid zum Vitamin K auch die Umwandlung vom Vitamin K zum Hydrochinon selbst katalysiert, ob noch weitere Enzyme beteiligt sind oder ob dieser Schritt eventuell durch andere Enzyme katalysiert wird (Stafford, 2005). Entgegen früherer Vermutungen, dass mehrere in der Leber vorkommende Enzyme an diesem Vorgang beteiligt sind (Suttie, 1987), herrschte später die Meinung, dass es sich um zwei verschiedene Enzyme handelt (Vermeer, 1990), obwohl beide Dithiol-abhängig sind. Ferner gibt es noch eine Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-abhängige K-Reduktase (Vermeer, 1990). Beide Dithiol-abhängigen Reduktasen werden durch Cumarinderivate gehemmt (Fasco und Principe, 1982; Hildebrandt und Suttie, 1982), wohingegen die NADPH-abhängige Reduktase dadurch in ihrer Wirkung nicht beeinflusst wird (Vermeer, 1990). In neueren Übersichtsarbeiten wird davon ausgegangen, dass die Vitamin K-Epoxid-Reduktase für die Umwandlung vom Vitamin K-Epoxid über das Vitamin K bis zu seiner reduzierten Form verantwortlich ist (Garcia und Reitsma, 2008; Tie und Stafford, 2008).

Die Funktion der Enzyme in den extrahepatischen Geweben ist noch nicht vollständig geklärt, da nicht in jedem Organ mit einer Vitamin K-abhängigen Carboxylaseaktivität auch Vitamin K-abhängige Proteine nachgewiesen werden konnten.

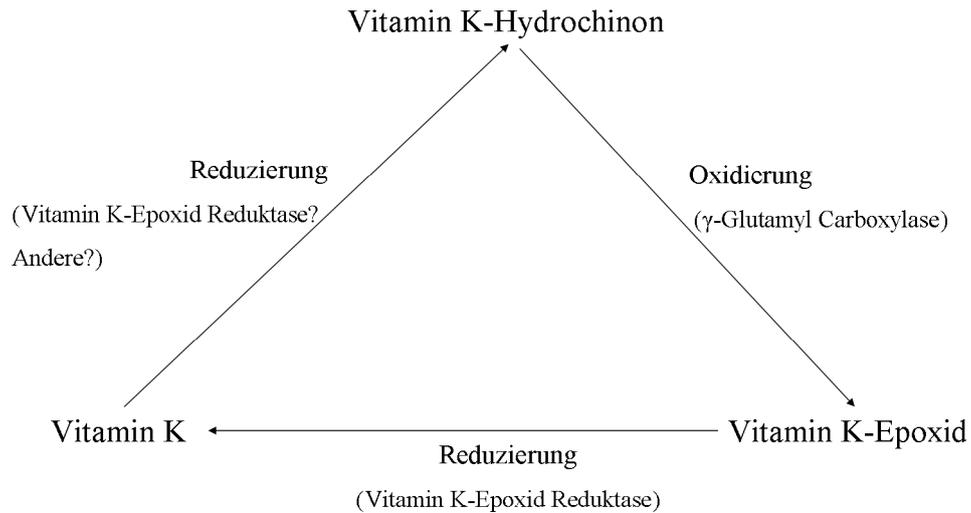


Abb. 1: Vitamin K-Zyklus in Leberzellen und extrahepatischen Gewebezellen

### 2.1.2.2 Vitamin K<sub>1</sub>

Die biochemische Bezeichnung für Phyllochinon lautet 2-Methyl-3-Phytyl-1,4-Naphthochinon (IUPAC-IUB, 1966). PK besitzt an der dritten Position eine Phytyl-Gruppe (Ronden et al., 1998), welche aus vier Isopreneinheiten besteht, von denen drei gesättigt sind (Schurgers et al., 2007) (Abb. 2). Bei Raumtemperatur liegt PK als eine ölige Flüssigkeit vor (Suttie, 1984).

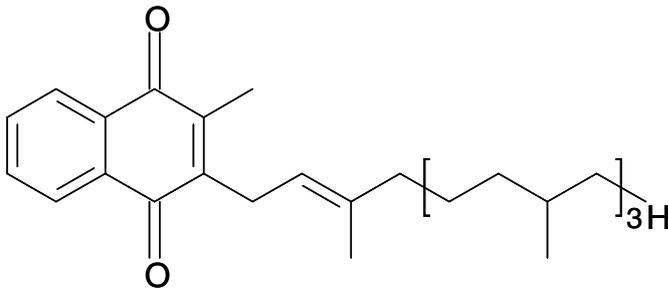


Abb. 2: Chemische Struktur von Vitamin K<sub>1</sub>

### 2.1.2.3 Vitamin K<sub>2</sub>

Vitamin K<sub>2</sub> wird allgemein als Menachinon-n (MK-n) (IUPAC-IUB, 1975) bezeichnet, wobei n die variable Anzahl der Isopreneinheiten in der Seitenkette anzeigt. Seine biochemische Bezeichnung lautet 2-Methyl-3-Multiprenyl-1,4-Naphthochinon (IUPAC-IUB, 1966). Das von Bakterien synthetisierte Menachinon besitzt am dritten Kohlenstoffatom eine ungesättigte Polyisoprenylseitenkette mit variierender Länge (Ronden et al., 1998) (Abb. 3). Die Struktur des pflanzlichen Vitamin K<sub>1</sub> und MK-4 ist sehr ähnlich. Beide besitzen vier Isopreneinheiten

in ihrer Seitenkette. Sie unterscheiden sich dadurch, dass beim PK nur eine der Einheiten ungesättigt ist, beim MK jedoch alle (Groenen-van Dooren et al., 1995; Schurgers et al., 2007).

Es wurden zunächst nur von Mikrokokken und Staphylokokken gebildete MK mit sechs bis neun Isopreneinheiten in der Isoprenylseitenkette gefunden (Jeffries et al., 1967). Kurze Zeit später wurden MK aus *Staphylococcus aureus* mit vier bzw. fünf Einheiten isoliert (Cawthorne et al., 1967). Mittlerweile sind MK mit Seitenketten von dreizehn (Suttie, 1984) bzw. fünfzehn (Sakano et al., 1986; Conly und Stein, 1992b) Isopreneinheiten beschrieben. Bei einer Analyse von Hundefäzes konnten MK mit bis zu vierzehn Isopreneinheiten nachgewiesen werden (Sakano et al., 1986). Der Schmelzpunkt liegt zwischen 35 und 60 °C und ist abhängig von der Seitenkettenlänge (Suttie, 1984).

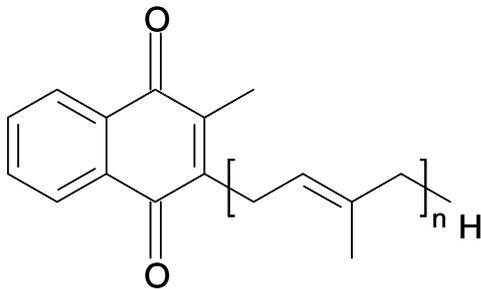


Abb. 3: Chemische Struktur von Vitamin K<sub>2</sub>

#### 2.1.2.4 Vitamin K<sub>3</sub>

Vitamin K<sub>3</sub> trägt den biochemischen Namen 2-Methyl-1,4-Naphthochinon (Conly und Stein, 1992b) und besitzt im Vergleich zu den anderen beiden Formen keine Seitenkette an der dritten Position (Abb. 4). Die Bezeichnung Menadion leitet sich von den zwei enthaltenden Ketogruppen ab (Kolb et al., 1999). Bei der Reinform des Menadions handelt es sich um eine fettlösliche Substanz. In der Tierernährung wird es jedoch als stabile, wasserlösliche und gut resorbierbare Additionsverbindung (siehe unten) eingesetzt (Kolb et al., 1999).

Menadion besitzt keine biologische Aktivität. Um diese zu erlangen, muss eine Seitenkette angefügt werden (NRC, 2006). Aus diesem Grund wird das Menadion in einigen Fällen auch als Provitamin bezeichnet (Ronden et al., 1998).

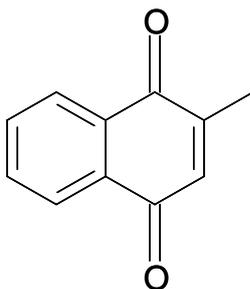


Abb. 4: Chemische Struktur von Vitamin K<sub>3</sub>

Verschiedene wasserlösliche Verbindungen des Menadions kommen in der Tierernährung zum Einsatz: Menadion-Natriumbisulfit besitzt eine  $\text{SO}_3\text{Na}^+ \times 3\text{H}_2\text{O}$ -Gruppe an der zweiten Position. Es gilt in Mischfutter eher als instabil (Suttie, 1984), jedoch stabiler als das reine Menadion (NRC, 2006). Bei der Verbindung, welche kommerziellem Hunde- und Katzenfutter zugefügt wird, handelt es sich in der Regel um Menadion-Natriumbisulfit (NRC, 2006).

Menadion-Natriumbisulfit-Komplex besitzt an der zweiten Position  $\text{SO}_3\text{Na}^+ \times \text{NaHSO}_3 \times 3\text{H}_2\text{O}$  und unterscheidet sich vom Menadion-Natriumbisulfit durch die Zugabe eines weiteren Natriumbisulfitmoleküls. Im Geflügelfutter wird Menadion-Natriumbisulfit-Komplex weitläufig eingesetzt, da ihm eine ähnliche biologische Aktivität wie dem Vitamin  $\text{K}_1$  nachgesagt wird (Suttie, 1984).

Beim Menadion-Dimethylpyrimidinol-Bisulfit wird Menadion-Natriumbisulfit Dimethylpyridinol zugesetzt. Studien haben gezeigt, dass Menadion-Dimethylpyrimidinol-Bisulfit in Geflügelfutter (Dua und Day, 1966) und in Schweinefutter (Suttie, 1984) eine effektivere Wirkung hat als Menadion-Natriumbisulfit-Komplex. Dies zeigt sich in einer Verkürzung der Prothrombinzeit (Dua und Day, 1966; Oduho et al., 1993).

Menadion-Natriumdiphosphat wird teilweise in der Klinik als Vitamin K Substitution eingesetzt, allerdings wird aufgrund der Gefahr einer Hyperbilirubinämie der Einsatz von PK bevorzugt (Suttie, 1984).

Menadion-Nicotinsäureamid-Bisulfid besteht aus 45,7 % Menadion und 32 % Nicotinamid (Oduho et al., 1993). Auch hier zeigte sich bei Vergabe an Hühner eine Verkürzung der Prothrombinzeit und zusätzlich durch die Zugabe von Nicotinamid ein positiver Einfluss auf Gewichtszunahme, Futteraufnahme und Futterverwertung (Oduho et al., 1993). Bei einer den Bedarf von Vitamin K deckenden Fütterung unter Einsatz von Menadion-Nicotinsäureamid-Bisulfid, sowohl bei Hühnern (Oduho et al., 1993) als auch bei Schweinen (Marchetti et al., 2000), sollte allerdings beachtet werden, dass nur ein Teil des täglichen Niacinbedarfs gedeckt wird und dieses zusätzlich ergänzt werden muss.

### **2.1.3 Vorkommen und Bildung von Vitamin K**

#### **2.1.3.1 Vitamin $\text{K}_1$**

Vitamin  $\text{K}_1$  kommt, wie der Trivialname Phyllochinon (griechisch Phyllon = Blatt) andeutet, hauptsächlich in Pflanzen, vor allem in grünblättrigem Gemüse und verschiedenen pflanzlichen Speiseölen vor (Schurgers und Vermeer, 2000). Zu den Pflanzen mit sehr hohem PK-Gehalt zählen unter anderem Grünkohl, Spinat, Blattsalat und Mangold ( $1657 \pm 62$ ,  $1439 \pm 2$ ,  $1180 \pm 247$  bzw.  $917 \pm 137$   $\mu\text{g}/100$  g frischer Probe) (Ferland und Sadowski, 1992a). Wie wichtig der Einfluss der Photosynthese auf die Bildung von PK ist, zeigt eine

Analyse des Vitamin K<sub>1</sub>-Gehalts in Kohl. Hier wurden die äußeren und die inneren Blätter separat analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass in den äußeren Schichten, in denen eine stärkere Photosynthese stattfindet, die PK-Konzentration höher war ( $719 \pm 2 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  frische Probe) als in den weiter innen gelegenen Blättern ( $228 \pm 2 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  frische Probe) (Ferland und Sadowski, 1992a). In Lebensmitteln liegt Vitamin K in der Regel in seiner Chinonform vor. Der Gehalt in den einzelnen Pflanzen hängt vom Ort des Anbaus und den dortigen klimatischen Bedingungen ab, sowie von der Beschaffenheit des Bodens.

### 2.1.3.2 Vitamin K<sub>2</sub>

Vitamin K<sub>2</sub> (Menachinon) wird von Bakterien in den hinteren Darmabschnitten von Säugern und Vögeln und in den Vormägen von Wiederkäuern gebildet. Zu den synthesefähigen Bakterien werden sowohl gramnegative als auch grampositive Arten gezählt. Es handelt sich um eine große Anzahl an fakultativ und obligat anaeroben Bakterien (Suttie, 1995). Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass verschiedene in der Intestinalflora vorkommene Bakterien MK bilden, wobei von den einzelnen Bakterien nicht jeweils alle MK produziert werden (Tab. 1). Es wurde festgestellt, dass auch weitere Bakterien, die keine typischen Vertreter der Darmflora sind, MK bilden. Dazu zählen unter anderen *Mycobacterium* spp. (MK-7 bis -9), *Corynebacterium reatenovorans* (MK-8 bis -10), *Streptomyces* spp. (MK-9), *Flavobacterium* spp. (MK-5, -6), *Bacillus stearothermophilis* (MK-7) (Dunphy et al., 1971) sowie *Micrococcus* spp. (MK-4 bis -8) (Jeffries et al., 1967; Dunphy et al., 1971) und *Staphylococcus aureus* (MK-7 bis 9) (Jeffries et al., 1967; Conly und Stein, 1993; Conly et al., 1994).

Tab. 1: Überblick über die von Bakterien im Intestinaltrakt gebildeten Menachinone (MK)

	Fernandez und Collins (1987)	Kindberg et al. (1987)	Conly und Stein (1993)*	Shearer (1995)
<i>Bacteroides</i> spp.	MK-6, -9, -10, -11	MK-10 (MK-11, -9)	MK-9, -10, -11	MK-10, -11
Enterobakterien		MK-8, (MK-7)		MK-8
<i>Veillonella</i> spp.	MK-7 (MK-6, -8)			MK-7
<i>Eubacterium lentum</i>	MK-6			MK-6
<i>Wolinella</i> spp.	MK-6			

\*genannt sind nur die Formen, die den Hauptteil (>90 %) der gebildeten MK darstellen

Bei Untersuchungen von Darminhalt aus den unterschiedlichen Darmabschnitten beim Menschen wurde festgestellt, dass MK-10 und MK-9 in allen Abschnitten dominieren (Conly und Stein, 1992a). Ähnliche Untersuchungen bei Tieren liegen bisher noch nicht vor. Bei einer vergleichenden Untersuchung des Vitamin K-Gehaltes in menschlichen und tierischen Fäzes wurde festgestellt, dass auch beim Hund die längerkettigen MK dominieren, sich das Muster der MK jedoch sehr verschieden darstellt (Sakano et al., 1986). Bei der Bestimmung der Darmflora aus hinteren Darmabschnitten zeigten sich Bacteroidesarten als vorherrschende Spezies bei Menschen (Conly und Stein, 1992a) und bei Tieren (Davis et al., 1977; Benno et al., 1992). In mehreren Studien wurde festgestellt, dass Bacteroidesarten längerkettige MK, wie MK-9, -10 und -11, bilden (Fernandez und Collins, 1987; Kindberg et al., 1987; Conly und Stein, 1993; Shearer, 1995). Damit reflektiert das Auffinden von MK-10 als dominierende Form im Koloninhalt vermutlich die hohe Anzahl der Bacteroidesarten im Dickdarm (Conly und Stein, 1992a).

Widersprüchlich sind die Aussagen verschiedener Autoren über die Bildung von MK durch Laktobazillen. Zum einen wird berichtet, dass Laktobazillen, Bifidobakterien und Clostridien kein Vitamin K<sub>2</sub> produzieren (Ramotar et al., 1984; Fernandez und Collins, 1987). Andererseits wurde herausgefunden, dass verschiedene Spezies und Subspezies von Laktobazillen fähig sind, MK-7 bis -10 zu bilden (Morishita et al., 1999). Dabei handelt es sich um *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *L. lactis ssp. lactis* und *Leuconostoc lactis*. Andere Milchsäurebakterien, wie *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* und *B. breve*, welche häufig in der Humanernährung als Probiotika eingesetzt werden, besitzen diese Fähigkeit nicht (Morishita et al., 1999).

Offenbar haben bestimmte Lebens- bzw. Futtermittel einen Einfluss auf die MK-Bildung durch Bakterien. Studien an Ratten ergaben, dass eine Fütterung mit Reis die Darmflora verändert und einige MK-bildende Bakterien (*Bacteroides fragilis* und *B. vulgatus*) reduziert (Mathers et al., 1990; Thijssen und Drittij-Reijnders, 1994). Bei Ratten, die mit einer auf Reis basierenden Diät gefüttert wurden, konnte ein verstärktes Auftreten von Blutungen und eine verlängerte Gerinnungszeit beobachtet werden (Mathers et al., 1990).

Neben der Produktion durch Bakterien im Intestinaltrakt kommt MK auch in geringen Mengen in einigen Nahrungsmitteln vor. Es handelt sich hierbei hauptsächlich um solche, die in ihrer Verarbeitung einen Fermentationsprozess durchlaufen, wie z.B. bestimmte Käsesorten und das japanische Sojaprodukt Natto (Schurgers und Vermeer, 2000).

Von allen Menachinonen scheint MK-4 eine Sonderstellung zu haben, da es sowohl im carboxylasereichen als auch -armen Gewebe gefunden wird (Thijssen und Drittij-Reijnders, 1994), allerdings von Bakterien in eher geringer Menge produziert wird (Kindberg et al., 1987). Verschiedene Untersuchungen ergaben, dass nach einer oralen oder intravenösen Supplementierung von PK ein Anstieg von MK-4 im Gewebe zu erkennen ist (Will et al., 1992; Thijssen und Drittij-Reijnders, 1994; Thijssen et al., 1996; Ronden et al., 1998).

### **2.1.3.3 Vitamin K<sub>3</sub>**

Menadion wird in einem synthetischen Vorgang hergestellt und seit vielen Jahren Futtermitteln zugesetzt. Durch eventuell im Futter enthaltene Antibiotika, besonders im Geflügelfutter, wird die intestinale Eigensynthese verringert und ein Zusatz von Menadion ist erforderlich. Ein Einsatz von PK wäre für diese Zwecke zu teuer, zudem besitzen wasserlösliche Vitamine wie das Menadion eine höhere Stabilität im Futter (Suttie, 1984).

### **2.1.4 Resorption und Ausscheidung von Vitamin K**

#### **2.1.4.1 Vitamin K<sub>1</sub>**

Die Absorption von PK findet im Dünndarm statt. In-vitro-Studien an Dünndärmen von Ratten ergaben, dass PK hauptsächlich in den proximalen Abschnitten aufgenommen wird und nur noch ein geringer Teil in den distalen Bereichen (Hollander, 1973). Dieses konnte in vivo nicht bestätigt werden. An isolierten Rattendünndärmen wurde kein Unterschied in der Absorptionsrate zwischen proximalen und distalen Abschnitten beobachtet (Hollander et al., 1977a). Ältere In-vitro- (Hollander, 1973) und In-vivo-Untersuchungen (Hollander et al., 1977a) deuten darauf hin, dass es sich bei der Absorption im Dünndarm um einen energieabhängigen Prozess mit einer Sättigungskinetik handelt. Es zeigte sich bei einer In-vivo-Studie an Ratten mit isolierten proximalen und distalen Dünndarmabschnitten, dass eine Erhöhung der PK-Konzentration in der intestinalen Perfusionslösung im nanomolaren Bereich zu einem linearen Anstieg der Absorption führte. Wurde die Konzentration bis in den mikromolaren Bereich erhöht, deutete die Verlaufskurve der Absorption in beiden Darmabschnitten auf eine Sättigung hin (Hollander et al., 1977a). Dieses bestätigte die Ergebnisse vorangegangener In-vitro-Untersuchungen an Rattendünndärmen (Hollander, 1973). Allerdings konnte hier der Effekt nur in den proximalen Abschnitten beobachtet werden. Sowohl eine Senkung der Inkubationstemperatur und eine Inkubation unter Stickstoff als auch eine Zugabe von metabolischen Hemmstoffen (2,4-Dinitrophenol) führten in vitro zu einer Abnahme der PK-Aufnahme im vorderen Dünndarm und deuten auf einen energieabhängigen Prozess hin (Hollander, 1973). Da diese Beobachtungen einen aktiven Transport vermuten ließen, wurde die Beteiligung von speziellen Carrier-Proteinen, wie z.B. Fettsäuren-bindenden Proteinen, diskutiert (Hollander et al., 1977a). Weitergehende Untersuchungen sind offenbar nicht publiziert worden. Nach der Passage der Darmwand erfolgt der Transport des PK hauptsächlich in der Lymphflüssigkeit und es scheint, dass nur ein kleiner Teil über das Portalblut direkt in die Leber transportiert wird (Hollander and Rim, 1978). Als Haupttransportproteine im Blut gelten die triacylglycerolreichen Lipoproteine (Lamon-Fava et al., 1998).

In verschiedenen In-vitro- und In-vivo-Studien wurde der Einfluss unterschiedlicher Parameter in der Inkubationslösung (Gallensalze, Fettsäuren und pH-Wert) auf die Absorption von PK im Dünndarm von Ratten untersucht. Dabei handelt es sich um Untersuchungen aus den siebziger Jahren. Veröffentlichungen neuerer Studien liegen offenbar nicht vor.

### Gallensalze

Bei einem Austausch der in Form von Natrium-Taurocholsäure vorliegenden Gallensalze gegen ein nichtionisches Detergens (Pluronic F-68) in der Inkubationslösung zeigte sich in vitro keine bzw. nur eine geringe Senkung der PK-Absorption im distalen bzw. proximalen Dünndarm. Nach einer Erhöhung der Konzentration von ursprünglich 10 mmol/l auf 20 mmol/l Natrium-Taurocholsäure war jedoch eine signifikante Abnahme der Resorptionsrate in beiden Dünndarmabschnitten zu verzeichnen (Hollander und Rim, 1976a). In vivo führte weder eine Veränderung der Konzentration der Gallensalze noch der Austausch mit einem nichtionischen Detergens zu einer veränderten Absorption. Eine morphologische Veränderung am Dünndarmgewebe wurde nicht festgestellt (Hollander et al., 1977a). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde zunächst vermutet, dass Gallensalze, außer ihrer Rolle bei der Mizellenbildung, keine weiteren Einflüsse auf die Absorption von PK haben (Hollander und Rim, 1976a). Dieses wurde in einer weiteren In-vivo-Studie allerdings widerlegt. Es kam nach einer Erhöhung der Natrium-Taurocholsäurenkonzentration in der Inkubationsflüssigkeit zu einem Anstieg der PK-Konzentration in der lymphatischen Flüssigkeit, nicht jedoch in der Galle (Hollander und Rim, 1978).

### Fettsäuren und andere fettlösliche Substanzen

Eine Zugabe von kurzkettigen Fettsäuren (Butyrat) zum Inkubationsmedium führte in vitro zu einem geringen (Hollander und Rim, 1976a) bzw. in vivo zu einem deutlichen Anstieg der PK-Absorption (Hollander et al., 1977a). Dieses spiegelte sich auch in vivo in der PK-Konzentration in der Galle wider, welche nach einem Zusatz von Butyrat anstieg. In der Lymphe hingegen war eine Abnahme der Konzentration zu verzeichnen (Hollander und Rim, 1978). Die Zugabe von langkettigen Fettsäuren führte in vitro (Hollander und Rim, 1976a) und in vivo (Hollander et al., 1977a) zu einer Abnahme der Absorption von PK. Allerdings stieg der Gehalt an PK in der Lymphflüssigkeit an, während er in der Galle abnahm (Hollander und Rim, 1978). Durch den Zusatz von Lecithin zur Inkubationslösung kam es in vitro zu einer deutlichen Verringerung der PK-Aufnahme (Hollander und Rim, 1976a). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sowohl die Zusammensetzung der Mizellen als auch die An- bzw. Abwesenheit von anderen fettlöslichen Verbindungen Einfluss auf die Resorption von Vitamin K<sub>1</sub> haben (Hollander und Rim, 1976a). Des Weiteren scheint es, als hätte die Anwesenheit von Fettsäuren mit unterschiedlicher Kettenlänge einen Einfluss

darauf, ob PK aus den Enterozyten in die Lymphe oder über das Portalblut zur Leber transportiert wird (Hollander und Rim, 1978).

### pH-Wert

Wenn der pH-Wert der intestinalen Perfusionslösung, der bei 7,4 lag, auf 8,0 erhöht wurde, führte dies in vivo zu einer Abnahme der PK-Absorption, welche sich in den proximalen Abschnitten des Jejunums deutlicher abzeichnete als in den distalen Abschnitten (Hollander et al., 1977a). Eine Absenkung des pH-Wertes auf 6,0 - 4,5 führte hingegen zu einer verstärkten Absorption in beiden Dünndarmabschnitten (Hollander et al., 1977a). Einer Veränderung des Wertes in den alkalischen oder sauren Bereich führte nicht zu veränderten Konzentrationen von PK in der Lymphe und Galle (Hollander und Rim, 1978).

Somit findet man bei einer erhöhten Wasserstoffkonzentration im Inkubationsmedium eine erhöhte Absorption, aber keine Erhöhung des Vitamin K<sub>1</sub> in Lymphe und Galle. Dieses könnte damit zusammenhängen, dass die Aufnahme in die Enterozyten durch den pH-Wert beeinflusst wird, da die Ladung der Mizellenoberfläche durch die hohe Wasserstoffionen-Konzentration weniger negativ ist und somit eine leichtere Passage durch die ebenfalls negativ geladene luminale Zellmembran möglich ist (Hollander et al., 1977a). Dieses hat jedoch vermutlich keinen Einfluss auf den intrazellulären pH-Wert und es kommt damit nicht zu einem erhöhten Transport von PK aus den Enterozyten in die Lymphe bzw. Galle, sondern führt zu einer verstärkten Akkumulation von PK sowohl an der Oberfläche der Darmzellen als auch in den Enterozyten (Hollander und Rim, 1978).

Die Ausscheidung von Vitamin K<sub>1</sub> aus dem menschlichen Körper erfolgt nach Metabolisierung (Shearer und Barkhan, 1973; Harrington et al., 2005) und konjugiert, hauptsächlich mit Glucuronat, über den Urin (Shearer und Barkhan, 1973) und die Galle. Dabei ist der Anteil, der über die Galle ausgeschieden wird, sehr gering. Nach einer intraperitonealen Injektion von PK bei Ratten wurden nach zwölf Stunden nur 8,5 % der Dosis in der Galle wieder gefunden (Konishi et al., 1973).

### **2.1.4.2 Vitamin K<sub>2</sub>**

Der Transport von MK durch die Darmwand wird als eine passive Diffusion beschrieben (Hollander et al., 1976; Hollander und Rim, 1976b; Hollander et al., 1977b).

Die Resorption von MK wurde sowohl an Dünndarmsegmenten (Hollander und Rim, 1976b) als auch an Dickdarmpräparaten (Hollander et al., 1976) von Ratten am Beispiel von radioaktiv markiertem MK-9 untersucht. Anhand dieser In-vitro-Versuche konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Aufnahme von MK sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm um einen passiven Vorgang handelt, der energieunabhängig ist und keine Carrier benötigt.

Allerdings wurde durch eine autoradiographische Untersuchung der Darmstücke festgestellt, dass MK-9 zwar vom Dünndarm und Kolon aufgenommen, jedoch nicht bis zur serosalen Seite weiter transportiert wurde, sondern eine Akkumulation des Vitamins in den mukosalen und submukosalen Schichten stattfand (Hollander et al., 1976; Hollander und Rim, 1976b). Es wurde vermutet, dass der Grund für den nicht darstellbaren transmuralen Transport bei den In-vitro-Versuchen im Fehlen der lymphatischen (Hollander et al., 1976) bzw. der portalen Zirkulation (Hollander et al., 1977) lag.

Ebenso wie beim PK konnte auch beim MK ein Einfluss des Inkubationsmediums auf die Absorption festgestellt werden.

### Gallensalze

Sowohl im Ileum als auch im Kolon von Ratten wurde bei In-vivo-Versuchen mit erhöhter Natrium-Taurocholsäure (10 und 15 mmol/l) eine höhere Absorption von MK-9 beobachtet (Hollander et al., 1977b). Nach den In-vivo-Versuchen wurde das verwendete Darmgewebe histologisch untersucht. Im Ileum wurden keine morphologischen Veränderungen beobachtet, während im Kolongewebe bei beiden Konzentrationen Abnormalitäten am Epithel festgestellt wurden. Demnach könnte die steigende Absorption von MK im Dünndarm auf die erhöhte Konzentration von Gallensalzen zurückgeführt werden, wohingegen der Anstieg der Absorptionsrate im Dickdarm Folge der Epithelveränderungen sein könnte (Hollander et al., 1977b).

Bei In-vitro-Versuchen an Rattendünndärmen wurde die Natrium-Taurocholsäure der Inkubationsflüssigkeit durch ein deionisiertes Detergens ausgetauscht, was in einer erhöhten Aufnahme des MK resultierte (Hollander und Rim, 1976b).

### Fettsäuren

Während ein Zusatz von gesättigten kurz- (Butyrat) und mittelkettigen Fettsäuren (Octansäure) zum Perfusionsmedium im Rattenileum in vivo eine deutliche Abnahme der MK-Resorption zeigte (Hollander et al., 1977b), wurde in vitro im Dünndarm eine Zunahme beobachtet (Hollander und Rim, 1976b). Im Kolon von Ratten konnte kein Einfluss der beiden Fettsäuren auf die Resorption unter In-vivo-Bedingungen erkannt werden (Hollander et al., 1977b). Sowohl im Ileum als auch im Kolon führte eine Zugabe von Linol- und Ölsäure in vivo zu einer Abnahme der Absorptionsrate (Hollander et al., 1977b). In vitro war keine Änderung im Dünndarm zu erkennen (Hollander und Rim, 1976b).

### pH-Wert

Sowohl im Ileum als auch im Kolon führte eine schrittweise Senkung des pH-Wertes von ursprünglich 7,4 auf 4,5 zu einer Erhöhung der Resorptionsrate (Hollander et al., 1977b).

Die beschriebenen Beobachtungen lassen sich so interpretieren, dass eine Aufnahme von MK im Dickdarm von Säugetieren möglich ist und eine alimentär bedingte Mangelsituation durch die Vitamin K<sub>2</sub>-Synthese im Darm verhindert werden könnte. Allerdings konnte anhand dieser Untersuchungen nicht bewiesen werden, dass es tatsächlich zu einer Aufnahme in das Blut- oder Lymphsystem kommt (Ichihashi et al., 1992).

Dass MK zumindest in geringen Mengen auch noch in hinteren Darmabschnitten resorbiert wird, lässt sich nach einer Studie an Ratten vermuten, bei denen MK in der Leber gefunden wurde, obwohl die Tiere an Koprophagie gehindert wurden (Kindberg et al., 1987).

Auch der Einfluss der Gallensalze bei den Resorptionsvorgängen ist noch nicht ganz geklärt. Es scheint aber, dass sie bei der Absorption, ähnlich wie bei PK, auch bei MK eine Rolle spielen. Während bei In-vitro-Versuchen eine erhöhte Absorptionsrate von MK-9 in Abwesenheit von Natrium-Taurocholsäure festgestellt wurde (Hollander und Rim, 1976b), zeigte sich in vivo das Gegenteil (Hollander et al., 1977b). Eine Erklärung wurde hierfür nicht gegeben. Bei einem Vergleich der Absorption von MK-4 und MK-9 aus dem Jejunum und Kolon in die Lymphe stellte sich heraus, dass beide im Jejunum in Anwesenheit von Galle deutlich besser resorbiert werden als ohne, während im Kolon ohne Galle überhaupt kein Transfer in die Lymphe beobachtet wurde (Ichihashi et al., 1992). Dementsprechend scheint das terminale Ileum eventuell ein wichtiger Ort der Resorption für MK zu sein. Bei diesem Darmabschnitt handelt es sich um einen der Hauptorte, an dem Gallensäuren sowohl aktiv als auch passiv reabsorbiert werden können (Schiff et al., 1972).

Des Weiteren scheint die Länge der Seitenkette bzw. die Struktur des Vitamin K einen Einfluss auf die Absorption zu haben. Je länger die Seitenkette ist, desto mehr nimmt die Resorptionsrate ab. Daher wird Menadion besser resorbiert als MK-4 und MK-9. Letzteres wird mit seiner langen Seitenkette von den drei Verbindungen am schlechtesten aufgenommen (Ichihashi et al., 1992).

Eine Studie an keimfreien und konventionellen Mäusen zeigte, dass die konventionellen Mäuse nach der Fütterung einer Vitamin K-reduzierten Diät keine Mangelsymptome zeigten, wohingegen die keimfreien Mäuse nach der gleichen Fütterung eine Blutungstendenz aufwiesen und schwere hämorrhagische Symptome zeigten (Kimura et al., 1992). Bei den konventionellen Mäusen wurden verschiedene langkettige MK im Zäkum- und Koloninhalt und auch in der Fäzes nachgewiesen. Bei den keimfreien Tieren wurden keine MK gefunden. Dies deutet darauf hin, dass bakteriell produzierte MK den Bedarf an Vitamin K bei Mäusen decken und somit auch in den hinteren Abschnitten des Darmes resorbiert werden.

Die meisten Untersuchungen zur Resorption von MK wurden an Ratten und Mäusen durchgeführt, allerdings lassen auch klinische Studien bei Menschen eine Resorption von MK vermuten. Eine Applikation von MK über eine Nasensonde ins Ileum führte nach längerer Phase einer Vitamin K<sub>1</sub>-reduzierten Diät und zusätzlicher Gabe von Warfarin zu einer Verringerung der Prothrombinzeit und einem Anstieg des Gerinnungsfaktors VII im Serum

(Conly et al., 1994). Auch der postmortale Nachweis von MK-7 bis -10 im Portalblut von Menschen deutet auf eine Absorption im Dickdarm hin (Conly et al., 1994).

Die Ausscheidung von MK erfolgt sehr schnell und zu einem großen Anteil über die Galle. Zwölf Stunden nach einer intraperitonealen Applikation von MK-4 wurden bereits über 70 % der verabreichten Dosis über die Galle ausgeschieden (Konishi et al., 1973).

Trotz der vorliegenden Untersuchungen und obwohl das Auffinden von MK in der Leber auf eine Resorption hindeutet, ist immer noch nicht vollständig geklärt, wie die Absorption im Kolon erfolgt (Van Winckel et al., 2009).

### **2.1.4.3 Vitamin K<sub>3</sub>**

Bei der Absorption von Menadion handelt es sich um einen passiven, konzentrationsgradientenabhängigen und energieunabhängigen Prozess, der sowohl im Dünndarm (Hollander und Truscott, 1974a) als auch im Kolon (Hollander und Truscott, 1974b) stattfindet.

In-vitro-Untersuchungen an Rattendünndärmen haben ergeben, dass der Transport von Menadion im distalen Dünndarm größer ist als im proximalen Abschnitt (Hollander und Truscott, 1974a). Es handelt sich um eine bidirektionale Diffusion, die sowohl von mukosal nach serosal als auch umgekehrt stattfindet und von einem Konzentrationsgradienten abhängt. Allerdings zeigt die Diffusion von mukosal nach serosal eine etwas höhere Transportrate. Sowohl das Fehlen von Gallensäuren, Lipiden und Sauerstoff als auch eine herabgesetzte Inkubationstemperatur und die Addition von 2,4-Dinitriphenol zeigten keinen Einfluss auf die Diffusionsrate von Vitamin K<sub>3</sub> (Hollander und Truscott, 1974a). Ein Austausch der mizellenhaltigen Lösung auf der mukosalen Seite gegen ein nichtionisches Detergens führte zu einer Erhöhung der Transportrate (Hollander und Truscott, 1974a). Ähnliche Beobachtungen wurden bei In-vitro-Versuchen mit Kolonsegmenten der Ratte gemacht. Eine anaerobe Atmosphäre nach Stickstoffbegasung und ein Zusatz der metabolischen Hemmstoffe 2,4-Dinitrophenol und Natriumazid hatten keinen Einfluss auf die Diffusionsrate von Vitamin K<sub>3</sub> (Hollander und Truscott, 1974b). Das lässt darauf schließen, dass im Fall von Leber- oder Gallenerkrankungen und Absorptionsstörungen Vitamin K<sub>3</sub> trotzdem resorbiert werden kann und damit die Blutgerinnung erhalten bleibt (Kolb et al., 1999).

Die Ausscheidung des Menadions erfolgt über den Urin und die Galle in Form von Konjugaten, mit Sulfaten bzw. Glucuronaten des Menadions, wobei auch Metaboliten in das Blut zurückkehren (Losito et al., 1967). Die Hälfte der Dosis von intravenös verabreichtem Menadion wurde nach 24 Stunden über den Urin ausgeschieden. Fast 40 % einer intraperitonealen Menadioninjektion wurden bereits nach zwölf Stunden in der Galle wieder gefunden (Konishi et al., 1973).

### 2.1.5 Verteilung von Vitamin K im Körper

Studien an Ratten (Thijssen et al., 1996; Davidson et al., 1998; Ronden et al., 1998) und Hunden (Duello und Matschiner, 1971a) zeigten, dass PK hauptsächlich in der Leber und im Herz gespeichert wird. Es wird dort recht schnell angereichert, hat jedoch mit einer Halbwertszeit von ca. 17 Stunden keine lange Verweildauer (Thierry et al., 1970). Nach einer intravenösen Applikation von markiertem Vitamin K<sub>1</sub> konnte mit Hilfe einer Ganzkörperradiographie festgestellt werden, dass PK neben der Leber auch in Nebennieren, Lunge, Knochenmark, Niere, Lymphknoten und Milz angereichert wird (Konishi et al., 1973). Nach einer oralen Aufnahme von PK steigt in den verschiedenen Geweben sowohl dessen Konzentration als auch die von MK-4 (Ronden et al., 1998; Okano et al., 2008). Bei beiden ist eine Abhängigkeit zur aufgenommenen Menge zu erkennen (Ronden et al., 1998) bzw. übersteigt die Konzentration von MK-4 sogar die von PK (Okano et al., 2008). Entsprechende Beobachtungen wurden auch nach einer intravenösen Applikation von PK gemacht (Thijssen und Drittij-Reijnders, 1994). Die höchsten Konzentrationen von MK-4 wurden unter anderem in Gehirn, Schilddrüse, Pankreas, Nebenniere, Thymus und Körperfett gefunden (Okano et al., 2008).

Aufgrund der geringen MK-4 Produktion durch Bakterien (Kindberg et al., 1987) und dem Zusammenhang einer PK-Applikation mit dem Konzentrationsanstieg von MK-4 ist anzunehmen, dass eine Umwandlung von PK zu MK-4 stattfindet (Thijssen und Drittij-Reijnders, 1994), bei der zunächst Menadion als Zwischenprodukt gebildet und dann die entsprechende Seitenkette angebaut wird (Billeter et al., 1964; Thijssen und Drittij-Reijnders, 1994; Okano et al., 2008). Nach einer oralen PK-Aufnahme von gesunden Menschen wurde schon nach sehr kurzer Zeit (ca. einer Stunde) eine Ausscheidung von Menadion über den Urin beobachtet (Thijssen et al., 2006). Diese Beobachtung ließ sich jedoch in derselben Studie nach subkutaner Injektion von PK nicht wiederholen. Wo genau sich der Ort der Umwandlung befindet, ist noch nicht ausreichend geklärt. Zwei unterschiedliche Wege werden diskutiert. Der eine ist die Abtrennung der Seitenkette des PK im Darm, ein Transport des entstandenen Menadions über das Blut in die verschiedenen Gewebe und die dort stattfindende Prenylation von Menadion zu MK-4 (Billeter et al., 1964; Okano et al., 2008). Der zweite Erklärungsansatz besteht darin, dass beide Schritte direkt im entsprechenden Speichergewebe ablaufen (Okano et al., 2008).

Schon zu Beginn der sechziger Jahre konnte bei In-vivo-Versuchen eine Umwandlung von PK zu MK-4 beobachtet werden (Billeter und Martius, 1960). Erste Untersuchungen über den genauen Vorgang der Umwandlung ließen vermuten, dass die Dealkylierung von PK durch Bakterien der Darmflora erfolgt (Billeter et al., 1964). Spätere Beobachtungen konnten das wiederum nicht bestätigen, da sowohl in keimfrei gezüchteten Ratten (Davidson et al., 1998; Ronden et al., 1998) und Mäusen (Kimura et al., 1992) als auch in Zellkulturen aus humanen

Nierenzellen (Davidson et al., 1998) eine Ansammlung von MK-4 nach PK-Aufnahme registriert wurde. Da auch nach einer intravenösen Gabe von PK die MK-4 Gehalte im Plasma sehr gering sind, ist anzunehmen, dass die Umwandlung direkt in dem Gewebe stattfindet, in dem es auch nachgewiesen wird und nicht in einem bestimmten einzelnen Gewebe oder Organ (z.B. Leber), um von dort verteilt zu werden (Thijssen und Drittij-Reijnders, 1994). Der genaue Vorgang ist weiter unklar. Es wird jedoch vermutet, dass es sich bei der Abspaltung der Seitenkette um einen intrinsischen katabolischen Vorgang im Körper handelt (Thijssen et al., 2006).

Im Vergleich zum PK unterscheidet sich der Speicherort von MK-4 im Körper. Sowohl das verabreichte MK-4 als auch das aus PK umgewandelte MK-4 sammelt sich vermehrt in Arterien (Spronk et al., 2003) und extrahepatischem Gewebe an (Thijssen et al., 1996; Ronden et al., 1998) bzw. kann dort besser genutzt werden (Thijssen et al., 1996; Ronden et al., 1998), während im Serum und in der Leber die geringsten Konzentrationen von MK-4 gemessen wurden (Ronden et al., 1998). Diese Ergebnisse widersprechen zum Teil früheren Studien, bei denen durch Ganzkörperradiographie intravenös appliziertes MK-4 bei Ratten neben Lunge, Milz, Nebenniere, Niere und Knochenmark auch in der Leber nachgewiesen werden konnte. Die höchsten Konzentrationen wurden jedoch bereits eine Stunde nach Verabreichung im Darminhalt gemessen (Konishi et al., 1973). Dieses spiegelt vermutlich die hohe Ausscheidungsrate über die Galle wider. Ob das PK erst im Gewebe des Speicherortes zu MK-4 umgewandelt wird oder ob dieser Vorgang an nur einem bestimmten Ort stattfindet und das MK-4 von dort in die jeweiligen Organe verteilt wird, konnte noch nicht geklärt werden (Ronden et al., 1998). Die langkettigen Menachinone werden hauptsächlich in der Leber gespeichert (Thijssen und Drittij-Reijnders, 1994) und nur in Spuren in anderen Geweben (Thijssen und Drittij-Reijnders, 1996). Postmortale Untersuchungen an Menschen ergaben eine ähnliche Verteilung von Vitamin K (Thijssen und Drittij-Reijnders, 1996).

Bei einer vergleichenden Supplementierung von PK und MK-9 zum Futter von Ratten zeigte sich, dass PK deutlich schneller in der Leber verstoffwechselt wird und eine deutlich geringere Menge ausreicht, um Anzeichen einer Mangelsituation (verringertes Prothrombingehalt und Erhöhung der Vorstufen von Vitamin K-abhängigen Proteinen im Plasma) zu verhindern (Will und Suttie, 1992). Damit wäre der tägliche Bedarf von Ratten an MK-9 (5,6  $\mu\text{mol/g}$ ) deutlich höher als an PK (1,1  $\mu\text{mol/g}$ ). Als Grund hierfür wird die unterschiedliche Absorption im Intestinaltrakt vermutet (Will und Suttie, 1992). Eine weitere Studie an Ratten konnte diese Beobachtungen zum Teil bestätigen. Es wurde aber auch festgestellt, dass die Wirkung von MK-9 im Vergleich zu PK und MK-4 zwar später einsetzt, die biologische Halbwertszeit jedoch deutlich länger ist (Groenen-van Dooren et al., 1995). Auch für MK-7 konnte nach oraler Verabreichung bei Menschen eine längere Halbwertszeit nachgewiesen werden als für PK (Schurgers et al., 2007). Dieses bestätigt die zuvor genannte schnellere Verstoffwechslung von PK in der Leber und gilt vermutlich auch für die

kurzkettigeren MK. Auch die relative molare Aktivität scheint sowohl nach oraler und subkutaner Applikation (Groenen-van Dooren et al., 1995) als auch nach intrakardialer Injektion (Matschiner und Taggart, 1968) bei den längerkettigen MK höher zu sein als beim PK und den kurzkettigen MK. Neben dieser Feststellung wurde ein ziemlich hoher Gehalt an langkettigen, sehr lipophilen MK in der Leber (Matschiner et al., 1967), unter anderem von Rindern (Matschiner und Amelotti, 1968), beobachtet. Dieses gibt Anlass zu der Vermutung, dass die dort gespeicherten MK auch tatsächlich vom Tier genutzt werden können.

Auch Menadion wird nach Aufnahme in den Körper zu MK-4 umgewandelt (Taggart und Matschiner, 1969; Thierry et al., 1970; Nestor und Conrad, 1990; Ronden et al., 1998). Ratten, deren Futter Menadion zugesetzt wurde, zeigten eine höhere Konzentration von MK-4 in verschiedenen Organen und im Plasma als Ratten, denen eine Ration mit MK-4 gefüttert wurde (Thijssen et al., 1996). Auch bei einer Untersuchung mit Zelllinien aus Leber-, Pankreas- und Nierengewebe konnte eine Umwandlung von Menadion zu MK-4 beobachtet werden (Thijssen et al., 2006). Aus Menadion gebildetes MK-4 findet man in extrahepatischen Geweben stärker vertreten als in der Leber (Thijssen et al., 1996).

Ebenso wie beim PK herrscht auch beim Menadion keine Klarheit über den Ort der Umwandlung. Nach der Verabreichung von  $^{14}\text{C}$  markiertem Menadion wurden PK und MK-4 weder in der Galle (Losito et al., 1965) noch im Urin oder Blut analysiert (Losito et al., 1967). Dieses deutet auf eine Umwandlung im extrahepatischen Gewebe und/oder im Intestinum hin. Die Leber scheint kein Hauptspeicherort des Menadion im Körper zu sein. Eine Studie an Ratten zeigte, dass injiziertes markiertes Menadion nur zu einem kleinen Anteil in der Leber wiederzufinden war und sich sehr schnell über den ganzen Körper in sämtlichen Geweben verteilt. Die höchsten Konzentrationen wurden in der Harnblase und im Darminhalt gefunden (Konishi et al., 1973).

### **2.1.6 Biologische Funktionen des Vitamin K**

Die Aufgaben, die Vitamin K in Pflanzen, Bakterien und Tieren bzw. Menschen erfüllt, unterscheiden sich voneinander. In grünblättrigen Pflanzen kommt PK vor, das am Photosyntheseprozess beteiligt ist. In Bakterien steht deren synthetisiertes MK in enger Verbindung mit der inneren cytoplasmatischen Membran (Conly und Stein, 1992b). Die genaue Funktion, die MK für die Bakterien besitzt, ist nicht exakt geklärt. Eine Funktion als reversible Redoxverbindung im Rahmen des Elektronentransportes wird vermutet (Guest, 1977).

Im menschlichen und tierischen Organismus gibt es Gruppen von Proteinen, die von Vitamin K abhängig sind. Hierbei handelt es sich um die Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren, die Vitamin K-abhängigen Skelettproteine und weitere Vitamin K-abhängige Proteine. Zu den Koagulationsproteinen gehören die Gerinnungsfaktoren II (Prothrombin), VII (Convertin), IX

(Christmas Faktor) und X (Stuart-Prower Faktor), aber auch die Gerinnungshemmer Protein C und S. Ein weiteres Protein, welches an der Blutgerinnung beteiligt ist, ist das Protein Z, dessen genaue Funktion jedoch nicht geklärt ist (Ferland, 1998). Die am Knochenstoffwechsel beteiligten Proteine sind Osteocalcin, Matrix Gla Protein und Protein S. Weitere Vitamin K-abhängige Proteine sind Plaque Gla Protein, Nephrocalcin, Prolin-reiche Gla Proteine 1 und 2 und Growth arrest-specific gene 6. Außer bei letzterem sind die genauen physiologischen Funktionen noch nicht ausreichend bekannt. Das Growth arrest-specific gene 6 wird in verschiedenen Geweben gebildet (Manfioletti et al., 1993). Es wird vermutet, dass es einen förderlichen Einfluss auf die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen hat (Nakano et al., 1995) und deren Zelltod herauszögern kann (Nakano et al., 1996). Es herrscht zwar in einigen Punkten noch Unklarheit, es steht jedoch fest, dass alle genannten Proteine für den aktiven Zustand carboxyliert werden müssen. Bei dem dafür verantwortlichen Enzym handelt es sich um die  $\gamma$ -Glutamatcarboxylase (Stafford, 2005) für welche Vitamin K die Funktion eines Cofaktors hat (Buitenhuis et al., 1990; Ronden et al., 1998). Die  $\gamma$ -Glutamatcarboxylase wandelt peptidgebundene Glutamatreste durch Zufügen einer Carboxylgruppe zu  $\gamma$ -Carboxyglutamat um und ermöglicht ihnen damit, Kalzium zu binden und aktiv zu werden (Stenflo et al., 1974). Bei den Glutamatresten handelt es sich um einen schwachen Kalzium-Chelatbildner, wohingegen  $\gamma$ -Carboxyglutamat hierfür ein deutlich höheres Potential hat. Deshalb wird durch den Vitamin K-abhängigen Schritt der Umwandlung die Kalziumbindungskapazität eines Proteins und damit auch seine Aktivität erhöht (Vermeer, 1990).

Allerdings kann die Carboxylierung durch den z.T. recht geringen Gehalt an Vitamin K in der Nahrung limitiert sein (Stafford, 2005), was zum Beispiel im Fall von Osteocalcin bei Menschen gezeigt wurde (Binkley et al., 2002). Neben der Zufuhr über die Nahrung hat auch die Seitenkette einen Einfluss auf die Aktivität, da diese mit zunehmender Seitenkettenlänge abnimmt (Buitenhuis et al., 1990).

Neben der lebenswichtigen Funktion in der Blutgerinnung hat auch der hemmende Einfluss von Vitamin K auf die Osteoporose und die Arteriosklerose in den letzten Jahren immer mehr Bedeutung in der Humanmedizin gewonnen. Hier scheinen vor allem die MK (besonders MK-4 und MK-7) eine wichtige Rolle zu spielen. Bei mit Warfarin behandelten Ratten konnte festgestellt werden, dass bei einer zusätzlichen Gabe von PK Kalzifikationen in den arteriellen Gefäßen zu sehen waren. Wurde PK durch MK-4 ausgetauscht, konnte keine Arterienverkalkung festgestellt werden (Spronk et al., 2003). Somit scheint MK-4 im Gegensatz zu PK, zumindest im Rattenmodell, einen präventiven Einfluss auf die Verkalkung von Arterien zu haben. Auch in einer niederländischen Studie wurde beobachtet, dass nach einer hohen Aufnahme von MK das Risiko von Myokardinfarkten, Herztod und arteriosklerotischen Verkalkungen bei Menschen reduziert werden konnte (Geleijnse et al., 2004). Bei der Prävention von arteriellen Verkalkungen scheint in erster Linie das Matrix Gla

Protein eine entscheidende Rolle zu spielen (Price et al., 2000). Es wird von vaskulären glatten Muskelzellen und Makrophagen in die Arterie sezerniert und wurde ursprünglich in demineralisiertem Knochengewebe entdeckt. Mittlerweile ist bekannt, dass es von einer Vielzahl an Geweben und Zelltypen gebildet wird (Price et al., 2000). Es wird sogar ein Zusammenhang zwischen dem Verlust von Knochenmasse und dem Auftreten von arteriellen Verkalkungen vermutet, deren genauer Mechanismus jedoch noch nicht geklärt ist (Price et al., 2001).

In Versuchen mit gesunden Frauen in der Postmenopause wurde gezeigt, dass eine mehrjährige tägliche orale Aufnahme von MK-4 im Vergleich zu einem Placebo einen positiven Effekt auf die Gesundheit der Hüftknochen hatte. Es konnten ein erhöhter Knochenmineralgehalt sowie eine erhöhte Breite des Femurkopfes festgestellt werden (Knapen et al., 2007).

Neben dem MK-4 scheint auch MK-7 eine wichtige Rolle vor allem bei der Prävention von Osteoporose zu spielen. In-vitro-Studien an Knochengewebe von Ratten zeigten einen regulierenden Einfluss von MK-7 auf den Knochenstoffwechsel (Tsukamoto, 2004) sowie anabole Effekte auf das Knochengewebe und Osteoblasten (Yamaguchi et al., 2001).

In Japan werden MK bereits seit einiger Zeit in der Behandlung von Osteoporose eingesetzt (Iwamoto et al., 2006).

Dem Vitamin K wird auch ein antitumoröser Effekt zugeschrieben. Dieses belegen verschiedene In-vivo- und In-vitro-Studien, in denen die Wirkung von Vitamin K sowohl alleine als auch in Verbindung mit Bestrahlung, Chemotherapie oder Vitamin C untersucht wurde (Lamson und Plaza, 2003). Bei den meisten Studien lag der Fokus auf dem Menadion, aber auch PK und MK zeigten ähnliche Wirkung. Die Wirkungsweise ist jedoch weitestgehend unklar. Vermutet wird ein Zusammenhang mit der oxidativen Kapazität des Vitamin K, zumindest beim Menadion. Aber auch die Auslösung einer Apoptose der Krebszellen, ein Schrumpfen der Zellen oder ein hemmender Einfluss auf deren Zellzyklus wird diskutiert (Lamson und Plaza, 2003).

### **2.1.7 Vitamin K Bedarf von Hunden**

Bereits Mitte der fünfziger Jahre wurden an Hunden mit Cholecystonephrostomie Versuche durchgeführt, um herauszufinden, wie hoch der tägliche Bedarf an Vitamin K<sub>1</sub> ist, um eine unveränderte Prothrombinzeit zu gewährleisten. Durch eine intravenöse Gabe von 0,5 µl Vitamin K<sub>1</sub>/kg KM konnte ein normaler Prothrombingehalt erreicht werden (Quick et al., 1954). Aber auch durch die Zugabe von hohen Mengen an Galle (5 ml/kg KM) zu einer Vitamin K-haltigen Diät konnte eine zuvor verringerte Menge an Prothrombin wieder zu einer normalen Konzentration erhöht werden (Quick et al., 1954). Es stellte sich heraus, dass wachsende Hunde einen höheren Bedarf an Vitamin K haben als adulte Tiere (Quick et al.,

1962). Im Laufe der Jahre wurden von verschiedenen Institutionen und Autoren Empfehlungen für die Vitamin K-Versorgung bei Hunden ausgesprochen (Tab. 2).

Die Menge der Vitamin K-Aufnahme ist abhängig von dem Gehalt in der Nahrung und der Effizienz der Absorption, von dem Grad der intestinalen Synthese, sowie der Anwesenheit von antagonistischen Faktoren, wie z.B. Dikumarol.

Tab. 2: Empfehlungen bzw. Vorschläge für die tägliche Aufnahme von Vitamin K<sub>1</sub> bzw. K<sub>3</sub> für Hunde und Welpen pro kg Körpermasse (KM)

Empfehlungen bzw. Vorschläge für tägliche Bedarfswerte	Literaturquelle
22 µg K <sub>3</sub> /kg KM per os für adulte Hunde	NRC (2006)
44 µg K <sub>3</sub> /kg KM per os für Welpen	
2-5 µg K <sub>1</sub> /kg KM i.v. für adulte Hunde	Quick et al. (1962)
5-15 µg K <sub>1</sub> /kg KM i.v. für Welpen	

### 2.1.8 Hypo- und Hypervitaminose

Bei einer Vitamin K-Hypovitaminose wird zwischen einem primären und einem sekundären Mangel unterschieden. Ein primärer Mangel kommt sowohl bei ausgewachsenen Tieren als auch bei Menschen äußerst selten vor. Bei Hunden wurde ein solcher Mangel bisher nicht beschrieben (NRC, 2006). Sekundäre Mangelercheinungen werden hingegen öfter beobachtet. Hierzu zählen verschiedene Erkrankungen, welche die Aufnahme des Vitamins beeinträchtigen, die Aufnahme von antagonistisch wirkenden Stoffen und eine Veränderung der physiologischen Darmflora, z.B. durch eine antibiotische Behandlung.

Um ein Defizit an Vitamin K nachweisen zu können, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Die älteste und geläufigste ist die Bestimmung der Prothrombinzeit nach Quick (Quicktest), auch wenn diese von einigen Autoren als nicht sensitiv und unspezifisch beurteilt wird (Kindberg und Suttie, 1989). Es wird zwar die Gerinnungszeit ermittelt, jedoch kann keine Aussage über die tatsächliche Prothrombinkonzentration getroffen werden (Perlick, 1953). Aufgrund der möglichen labor- und testabhängigen Schwankungen wird seit den achtziger Jahren auch der aus dem Quickwert abgeleitete INR-Wert (International Normalized Ratio) angewendet. Eine Analyse des Prothrombins und der anderen Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren im Blut könnte diesen Nachweis ergänzen. Eine weitere Nachweismöglichkeit ist die Konzentrationsmessung der Vorläufer von Vitamin K-abhängigen Proteinen im Blutplasma, welche bei einem Mangel ansteigen (Suttie, 1973).

Chronische Lebererkrankungen (Lisciandro et al., 1998), Störungen der Gallensekretion (Neer und Hedlund, 1989), Erkrankungen des Pankreas sowie Enteropathien wie Maldigestion und

Malabsorption (Edwards und Russell, 1987) können zu einem sekundären Mangel bei Hunden bzw. Katzen führen, da Vitamin K nicht mehr ausreichend resorbiert werden kann.

Die orale Aufnahme von Vitamin K-Antagonisten wie dem im Süßklee (*Melilotus officinales* bzw. *alba*) und einigen Kräutern vorkommenden Cumarin, dem Phenylindandion und anderen antikoagulanten Rodentiziden kann zu einem Vitamin K-Mangel führen.

Bei Pferden (McDonald, 1980) und bei Rindern (Schofield, 1984) konnten nach einer Aufnahme von süßkleeereichem Heu hämorrhagische Erkrankungen festgestellt werden, welche in vielen Fällen zum Tod führten. Der Bestandteil im Süßklee, der zu diesen Veränderungen führte, wurde nach mehreren Studien bereits zwischen 1933 und 1941 als 3,3'-Methyl-bis-(4-Hydroxycoumarin) identifiziert und Dikumarol genannt (Stahmann et al., 1941). Einsatz findet Dikumarol (Cumarin) mittlerweile als Blutverdünner (z.B. Marcumar®) und als Rodentizid (Suttie, 1984).

Ein Zusatz von Warfarin, einem Wirkstoff aus der Gruppe der Cumarine, zu einer Vitamin K-supplementierten Fütterung bei Ratten zeigte, dass die Speicherung sowohl von PK als auch von MK-4 in fast allen Organen deutlich geringer war als bei einer Fütterung ohne den Antagonisten (Thijssen et al., 1996; Spronk et al., 2003). Diese hemmende Wirkung konnte ebenfalls bei In-vitro-Versuchen mit einer humanen Nierenzelllinie beobachtet werden (Davidson et al., 1998). Es ließ sich jedoch eine erhöhte Konzentration von PK-Epoxiden in Plasma, Leber und Sternum und von MK-4-Epoxiden in Leber und Sternum erkennen (Thijssen et al., 1996). Diese Ansammlung erklärt sich dadurch, dass Dikumarol zu einer Hemmung der Vitamin K-Epoxid-Reduktase führt und somit eine Umwandlung von Vitamin K in seine aktive Form verhindert wird (Fasco und Principe, 1982; Hildebrandt und Suttie, 1982).

Ein weiterer Vitamin K-Antagonist ist das Phenylindandion, welches nach oraler Aufnahme zu einer Abnahme der Gerinnungsfaktoren II, V und VII führte (Perlick, 1953).

Auch die Gabe von Antibiotika kann bei gleichzeitiger Verabreichung einer Vitamin K-freien bzw. - reduzierten Diät zu einem Mangel führen, welcher sich in einer Hypoprothrombinämie äußert. Als Ursache könnte eine Veränderung der Darmflora in Frage kommen (Lipsky, 1988). Des weiteren ist es möglich, dass spezielle Antibiotika (z.B. mit Thiotetrazol-Seitenkette) die Umwandlung von Vitamin K-Epoxid zu Vitamin K hemmen (Creedon und Suttie, 1986; Lipsky, 1988). Bestimmungen der Plasma-Prothrombin-Konzentrationen und der Gerinnungszeiten bei keimfreien und konventionellen Ratten nach dreitägiger Fütterung einer Vitamin K-Mangeldiät deuten allerdings darauf hin, dass langkettige MK einen manifesten Mangel an Vitamin K verhindern können (Ronden et al., 1998).

Ein ernährungsbedingter Mangel tritt bei Tieren in der Regel nur beim Geflügel auf, besonders dann, wenn die Tiere in Käfigen gehalten werden und keine Möglichkeit zur Koprophagie haben.

Bei Katzen konnten verlängerte Gerinnungszeiten und verringerte Gehalte an Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren beobachtet werden, nachdem diese mit kommerziellem Dosenfutter auf Fischbasis (Lachs und Thunfisch) gefüttert wurden. Einige Tiere starben und bei der pathologischen Untersuchung konnten Blutungen in Leber und/oder Magendarmtrakt festgestellt werden. Die Ursache konnte bisher nicht geklärt werden, es wird jedoch vermutet, dass ein noch unbekannter Faktor in den Diäten zu den Gerinnungsstörungen führte (Strieker et al., 1996).

Für die Therapie von akuten Vergiftungen mit Rodentiziden ist Vitamin K<sub>1</sub> das Mittel der Wahl. Schon Anfang der sechziger Jahre stellte sich bei Versuchen an keimfreien Ratten mit einem Vitamin K-Mangel heraus, dass PK eine effizientere Wirkung bei der Behandlung einer Hypoprothrombinämie hat als Menadion-Tetranatrium-Diphosphat und Menadion-Natrium-Sulfat (Gustafsson et al., 1962). Menadion muss nach der Aufnahme zunächst metabolisiert werden und hat dadurch einen verzögerten Wirkungseintritt (Fernandez et al., 1984).

Die natürlich vorkommenden Vitamine K<sub>1</sub> und K<sub>2</sub> gelten auch bei Aufnahme in hohen Mengen als nicht toxisch. PK zeigt auch dann keine Nebenwirkungen, wenn es in sehr hohen Mengen aufgenommen wird (NRC, 1987). Einzige beschriebene Ausnahme ist eine Studie, bei der Hunden Vitamin K<sub>1</sub> in verschiedenen Dosierungen (4, 5 bzw. 10 mg/kg KM) entweder subkutan oder oral an fünf aufeinander folgenden Tagen verabreicht wurde. Von sieben Tieren entwickelte nur ein Hund Heinz-Körperchen (Fernandez et al., 1984). Dem Hund wurde die geringste Dosis von 4 mg/kg KM subkutan injiziert.

Dahingegen haben Untersuchungen bei verschiedenen Tierarten und dokumentierte Fallbeispiele gezeigt, dass Menadion in hohen und gemäß den Empfehlungen weit überdosierten Konzentrationen eine toxische Wirkung haben kann. Allerdings haben bis zu tausendfach erhöhte Aufnahmen (bezogen auf den Bedarfswert) von Menadion noch keine schädlichen Auswirkungen (NRC, 1987).

In Untersuchungen mit Hunden wurde beobachtet, dass eine Verabreichung von 26 mg Vitamin K<sub>3</sub>/kg KM an drei aufeinander folgenden Tage zu einer Zerstörung von roten Blutkörperchen durch die Bildung von Heinz-Körperchen und damit zu einer hämolytischen Anämie führte (Fernandez et al., 1984). Es wurde vermutet, dass die Heinz-Körperchen nach hoher Aufnahme von Vitamin K<sub>3</sub> durch eine oxidative Zerstörung der Erythrozyten entstanden sind. Ob das Menadion dabei subkutan oder intramuskulär injiziert wurde, schien keinen Unterschied zu machen.

Bei Rennpferden konnten nach einer hochdosierten intravenösen Injektion von Menadion verschiedene Symptome, wie verringerter Appetit, Schwäche, Muskelverhärtungen, Koliken sowie eine ausgeprägte Azotämie beobachtet werden (Maxie et al., 1992). Eine histopathologische Untersuchung von euthanasierten Tieren ergab verschiedene

Veränderungen an den Nieren, unter anderem blasse und vergrößerte Nieren, marmorierte Nierenrinden, Tubulonephrosen und Nekrosen der Nierenpapillen.

### **2.1.9 Einsatz von Vitamin K in Futtermitteln**

Nach geltendem Futtermittelrecht (Gemeinschaftsregister der Futterzusatzstoffe basierend auf der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung) ist sowohl Vitamin K<sub>1</sub> als auch Vitamin K<sub>3</sub> in vier verschiedenen Verbindungen für alle Tierarten in sämtlichen Futtermitteln zugelassen. Bei den zugelassenen Verbindungen von Menadion handelt es sich um Menadion-Dimethylpyrimidin-Olbisulfit-Präparat, Menadion-Natriumbisulfit-Präparat, Menadion-Natriumbisulfit-Reinsubstanz und Menadion-Nicotinsäureamid-Bisulfit-Präparat.

### **2.2. In-vitro-Methoden zur Untersuchung der Bildung von Vitamin K<sub>2</sub>**

Es gibt verschiedene Studien, bei denen einzelne Mikroorganismen auf ihre Fähigkeit MK zu bilden, untersucht wurden. In-vitro-Studien mit einer komplexen Flora, wie z.B. Fäzes oder Darminhalt, wurden bisher nicht beschrieben.

Es gibt jedoch verschiedene In-vitro-Methoden, die sich dafür eignen könnten, entsprechende Untersuchungen durchzuführen. Zwei dieser Methoden, eine semikontinuierliche Langzeitinkubation und eine über 24 Stunden angelegte Kurzzeitinkubation, werden im Folgenden näher beschrieben. Darüber hinaus existieren für In-vitro-Untersuchungen zahlreiche Modellansätze mit mehr oder weniger großen Modifikationen, auf die aber im Rahmen dieser Arbeit nicht im Detail eingegangen werden kann. Es handelt sich dabei unter anderem um Methoden zur Messung der Gasproduktion, welche ihren Einsatz hauptsächlich zur Evaluierung des ernährungsphysiologischen Wertes verschiedener Futtermittel beim Wiederkäuer finden (Theodorou et al., 1994; Getachew et al., 1998) aber auch beim Monogastrier, besonders beim Schwein, angewendet werden können (Williams et al., 2001). Des Weiteren gibt es verschiedene enzymatische In-vitro-Techniken, welche sich besonders für die Simulation von Verdauungsvorgängen im Magen und Dünndarm eignen (Fuller, 1991).

Bei dem System der Langzeitinkubation handelt es sich um ein In-vitro-Modell, mit welchem mikrobielle Stoffwechselleistungen des monogastrischen Dickdarms durch eine semikontinuierliche Inkubation simuliert werden können. Es ist ein offenes System und ermöglicht die Untersuchung von Fermentationsvorgängen und der Bildung von Fermentationsprodukten. Vorläufer dieses Systems ist die Rumen-Simulationstechnik (Rusitec) (Czerkawski und Breckenridge, 1977), welche für die Anwendung am

Schweinecolon (Colon-Simulationstechnik, auch als „Cositec“ bezeichnet) modifiziert wurde (Dreyer, 1990). Die Unterschiede liegen lediglich in der unterschiedlichen Entnahmestelle des Inokulums und in der Größe der Fermentationsgefäße. Bei der Rumen-Simulationstechnik fassen diese ein Volumen von 1 l (Czerkawski und Breckenridge, 1977), während es bei der Colon-Simulationstechnik 125 ml sind (Dreyer, 1990). Voraussetzung für beide Systeme ist, dass fistulierte Spendertiere zur Verfügung stehen oder die Proben aus frisch geschlachteten Tieren entnommen werden können. Vor wenigen Jahren wurde die Rumen-Simulationstechnik erneut modifiziert und als Zäkum-Simulationstechnik (Caesitec) für die Anwendung beim Pferd genutzt. Es stellte sich heraus, dass Zäkuminhalt als Inokulum verwendet werden kann (Zeyner et al., 2006). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass an Stelle von Zäkuminhalt auch Fäzes vom Pferd verwendet werden kann (Dill et al., 2007; Müller et al., 2008). Bei Hunden wurden ähnliche Studien bisher noch nicht publiziert.

Bei dem Modell der Kurzzeitinkubation handelt es sich um ein geschlossenes, anaerobes In-vitro-Fermentationssystem. Der Hauptunterschied zum oben beschriebenen System liegt darin, dass eine 24-stündige Inkubation in gasdicht verschlossenen Fermentationsgefäßen durchgeführt werden kann. Je nach Fragestellung sollte es zusätzlich möglich sein, ohne Lufteinfuhr Proben aus dem Gefäß zu entnehmen. Eine Kurzzeitfermentation wurde bei verschiedenen Fragestellungen angewendet. Hauptanliegen war es in den meisten Fällen, auf Tierversuche zu verzichten und zugleich eine kosten- und zeitsparende Methode zu entwickeln. Es können zum Beispiel die Einflüsse verschiedener Substrate bzw. Nährstoffe auf die Darmflora untersucht werden (Knarreborg et al., 2002; Tzortzis et al., 2004). Das Inokulum kann von einem fistulierten Tier entnommen werden (Zentek, 1993; Tsukahara et al., 2002), häufig werden jedoch auch Fäzesproben verwendet (Knarreborg et al., 2002; Tzortzis et al., 2004).

Bei beiden In-vitro-Methoden werden in der Regel flüchtige Fettsäuren, pH-Wert, Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) bzw. Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) und z.T. Laktat als Fermentationsparameter bestimmt. Alle genannten Parameter geben Aufschluss darüber, in welchem Umfang eine mikrobielle Fermentation von verschiedenen Nährstoffen im Dickdarm stattgefunden hat. Die Produktion von flüchtigen Fettsäuren ist das Ergebnis der anaeroben mikrobiellen Fermentation von unverdaulichen Kohlenhydraten wie Zellulose, Hemizellulose, Pektin oder Oligosacchariden. Auch leicht verdauliche Kohlenhydrate wie Stärke und Glukose werden fermentiert, wenn diese die Dünndarmpassage unverdaut überstehen. Dieses ist möglich bei einer großen Aufnahme von leicht verdaulichen Kohlenhydraten oder auch bei einer Malabsorption (Bergman, 1990). Auch der mikrobielle Abbau von Proteinen führt zu einer Bildung von flüchtigen Fettsäuren. Der größte Anteil der verzweigtkettigen flüchtigen Fettsäuren wird durch diese Fermentation gebildet (Macfarlane et al., 1992). Eine proteolytische Fermentation führt zusätzlich zu einer Bildung von  $\text{NH}_3$ , welches als ein potentiell toxischer Metabolit gilt (Macfarlane et al., 1992). Laktat ist im Dickdarm ein Zwischenprodukt der Fermentation von

Kohlenhydraten. Es wird nur gebildet, wenn die Produktion von flüchtigen Fettsäuren durch ein saures Milieu mit einem pH unter 5,5 gehemmt wird (Soergel, 1994). Selten wird bei In-vitro-Versuchen und auch in vivo ein so niedriger pH erwartet bzw. erreicht, weshalb nur in wenigen Studien die Laktatkonzentration bestimmt wurde.

### **2.3 Analytik von Vitamin K**

Für die Bestimmung von Vitamin K in verschiedenen Matrices, wie zum Beispiel Lebensmittel, tierischen bzw. menschlichen Gewebe oder Fäzes, wurden seit seiner Entdeckung verschiedene biologische, chemische und chromatographische Methoden angewendet. Heutzutage wird die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) als die Methode der Wahl angesehen (Gao und Ackman, 1995). Durch die verschiedenen Möglichkeiten der Extraktion und Reinigung der Proben bietet die HPLC ein großes Spektrum an Einsatzmöglichkeiten.

Die ersten Untersuchungen zur Wirkung von Vitamin K wurden mit Bioassays durchgeführt, bei denen in der Regel Hühner als Testtiere eingesetzt wurden (Schonheyder, 1936). Dieses Testverfahren wird auch heute noch eingesetzt, um die Bioverfügbarkeit verschiedener Vitamin K-Verbindungen zu untersuchen. Den Tieren wurde zunächst eine Vitamin K-freie Diät gefüttert, um die Körperspeicher zu leeren. Danach wurden die Tiere in Gruppen eingeteilt, verschiedene Konzentrationen von Vitamin K verabreicht (Koivu-Tikkanen, 2001) und der Einfluss auf die Gerinnungszeit überprüft (Schonheyder, 1936).

Die am meisten genutzten chemischen Methoden sind colorimetrische Analysen (Koivu-Tikkanen, 2001). Allerdings sind diese nicht Vitamin K-spezifisch, da auch andere Chinone in einer ähnlichen Weise reagieren.

Es wurde auch ein möglicher Einsatz der Gaschromatographie zur Bestimmung von Vitamin K betrachtet, jedoch hat diese Methode nie eine große Bedeutung erlangt (Koivu-Tikkanen, 2001). Trotz einiger Probleme wurde die Methode nach Extraktion mit n-Hexan und Reinigung auf einer Aluminiumsäule bei der Analyse von PK in verschiedenen Gemüsesorten verwendet, da sie als relativ einfach und leicht durchführbar galt (Seifert, 1979).

Die Bestimmung von Vitamin K mit Hilfe der HPLC gehört heute zu den geläufigsten Methoden, da sie als sehr sensibel angesehen wird. Durch die ständige Wiederverwertung des Vitamin K im Körper von Säugetieren werden nur geringe Mengen benötigt, um den täglichen Bedarf zu decken. Dadurch muss eine Nachweismethode in der Lage sein, kleinste Mengen in Gewebe und Blut aber auch in Lebens- bzw. Futtermitteln nachweisen zu können. Bei einer Analyse mit HPLC ist dieses der Fall. Aus diesem Grund wird diese Technik mit unterschiedlichen Methoden heutzutage fast ausschließlich angewendet (Cranenburg et al., 2007). Als Vorteile gelten das verminderte Risiko von Veränderungen durch Temperatureinflüsse, der Lichtschutz während der Analyse und die große Vielseitigkeit, da

verschiedene Säulen und Detektoren verwendet werden können (Koivu-Tikkanen, 2001). Dennoch treten auch bei dieser relativ ausgereiften Methode diverse Probleme auf. Ein großer Nachteil von HPLC-Methoden mit Fluoreszenz- oder Ultraviolett-Detektion ist häufig die Unzulänglichkeit des Systems zur selektiven und sensitiven Bestimmung von geringen Konzentrationen in biologischen Proben (Wakabayashi et al., 2003). So stellen bei der Analyse von Lebensmitteln einige Komponenten trotz vorheriger Reinigung Störfaktoren dar und bei sehr geringen Gehalten an Vitamin K scheint die Methode nicht sensitiv genug zu sein.

Der derzeit geläufigste Ablauf ist die Extraktion und Aufreinigung der zu analysierenden Probe mit anschließender HPLC Analyse, Nachsäulenreduktion und Fluoreszenzdetektion (Cranenburg et al., 2007).

Vitamin K ist gegenüber alkalischen Bedingungen instabil, weshalb eine ansonsten bei fettlöslichen Vitaminen gängige Extraktionsmethode der Verseifung in diesem Fall nicht anzuwenden ist (Gao und Ackman, 1995; Koivu-Tikkanen, 2001). Stattdessen werden die für die Fettextraktion üblichen Methoden verwendet. Verschiedene Extraktionsgemische wurden für verschiedene Matrices beschrieben, wobei Extraktionen mit 2-Propanol und n-Hexan und mit Ethanol und n-Hexan am häufigsten verwendet werden. Das Grundprinzip ist bei beiden Methoden dasselbe. Es erfolgt eine Denaturierung der Proteine und eine Extraktion des fettlöslichen Vitamins. 2-Propanol/n-Hexan wurde für die Extraktion von Vitamin K aus tierischen Gewebe (Hirauchi et al., 1989), Darminhalt bzw. Fäzes (Sakano et al., 1986; Koivu-Tikkanen et al., 2000a) und Nahrungsmitteln sowohl tierischen (Koivu-Tikkanen et al., 2000b) als auch pflanzlichen Ursprungs (Koivu et al., 1997) verwendet. Ethanol/n-Hexan kam hauptsächlich bei der Analysenvorbereitung für Blutserum (Kirk und Fell, 1989; Wakabayashi et al., 2003) und Blutplasma (Haroon et al., 1986; Hirauchi et al., 1988; Kamao et al., 2005; Suhara et al., 2005) zum Einsatz, diente aber auch der Extraktion von Darminhalt- und Fäzesproben (Koivu-Tikkanen et al., 2000a). Entscheidend für die Wahl der Methode ist die Matrix der zu untersuchenden Probe und ihre Menge. Kleine Proben, wie sie aus In-vitro-Inkubationen gewonnen werden, können effektiv extrahiert werden, indem die wässrige Suspension mit einer Mischung aus 2-Propanol und Hexan extrahiert wird. Durch anschließende Zentrifugation entsteht eine Phasentrennung, wobei die obere Phase direkt analysiert werden kann (Suttie, 1984). Aus tierischem Gewebe, Blut oder auch verschiedenen Lebensmitteln gestaltet sich die Extraktion umfangreicher.

Die meisten Studien haben sich mit der Extraktion von PK aus Blut bzw. pflanzlichen Nahrungsmitteln beschäftigt und Methoden speziell für MK oder tierische Produkte sind bisher noch nicht ausreichend entwickelt worden (Koivu-Tikkanen, 2001), obwohl entsprechende Untersuchungen angestellt wurden (Haroon et al., 1981).

Abhängig vom Probenmaterial sollte entschieden werden, ob die Probe nach der Extraktion einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen wird. Besonders bei vorher unbehandeltem Rohmaterial wird dieses empfohlen, da PK und MK in erheblich geringeren Konzentrationen auftreten als andere fettlösliche Bestandteile (Koivu-Tikkanen, 2001). Eine Reinigung hat den Vorteil, dass störende Substanzen eliminiert werden und so die Gefahr von Peaküberschneidungen im Chromatogramm verringert werden. Eventuelle Störsubstanzen werden bereits vorher entfernt und damit die Lebensdauer der Säule verlängert (Gao und Ackman, 1995).

Für die Reinigung werden verschiedene Methoden angewendet. Die gebräuchlichste ist eine enzymatische Vorbehandlung mit Lipase, eine Festphasenextraktion oder eine semipräparative HPLC.

Eine Lipasebehandlung wird hauptsächlich bei sehr fetthaltigen Proben, wie z.B. Milchprodukten oder bestimmten Fischarten (Koivu-Tikkanen et al., 2000a) angewendet. Bereits vor der Extraktion werden hierbei die enthaltenden Triglyzeride enzymatisch hydrolysiert. Dieser Vorgang wird entweder allein (Indyk und Woollard, 1997; Indyk und Woollard, 2000) oder mit einer weiteren Reinigungsmethode durchgeführt (Gao und Ackman, 1995).

Die Festphasenextraktion ist die zurzeit wohl geläufigste Methode und wird unter anderem zur Reinigung von Proben aus tierischem Gewebe (Haroon und Hauschka, 1983; Hirauchi et al., 1989), Darminhalt bzw. Fäzes (Koivu-Tikkanen et al., 2000a), Serum (Kirk und Fell, 1989) und Plasma (Haroon et al., 1986; Hirauchi et al., 1988; Kamao et al., 2005; Suhara et al., 2005) angewendet. In den meisten Fällen handelt es sich um mit Kieselsäure gefüllte Kartuschen, auf welche die Probe aufgetragen wird. PK und MK binden an die Matrix der Kieselsäure und nichtpolare hydrophobe Bestandteile werden durch eine Spülung mit n-Hexan von der Säule entfernt (Hodges, 1997). Nachfolgend werden Lösungsmittel mit einer höheren Polarität, wie z.B. Hexan/Diethylether (Hirauchi et al., 1989; Kamao et al., 2005; Suhara et al., 2005) auf die Kartusche gegeben und das Vitamin K eluiert. Bei der Nutzung von C18-Kartuschen wird in der Regel zunächst mit Methanol und Wasser gewaschen und das Vitamin K anschließend mit einer Mischung aus Methanol und Ethanol (Wakabayashi et al., 2003) oder Methanol und Dichlormethan (Koivu-Tikkanen, 2001) eluiert. Obwohl die Festphasenextraktion derzeit als Methode der Wahl angesehen wird, gibt es auch Berichte, dass bei sehr fettreichem Material eine alleinige Reinigung mit der Säule für eine anschließende HPLC-Analyse nicht ausreicht (Gao und Ackman, 1995). Die fettreichen Substanzen sollten bereits vorher entfernt werden (Iwase, 2000). Des Weiteren wird bei einigen beschriebenen Methoden noch ein nachfolgender Schritt, z.B. eine Dünnschichtchromatographie, beschrieben (Hirauchi et al., 1989).

Die semipräparative HPLC wird je nach Fettgehalt der Probe als alleiniger Reinigungsschritt nach der Extraktion (Koivu et al., 1997; Koivu-Tikkanen et al., 2000b) oder nach vorheriger

Lipasebehandlung (Koivu-Tikkanen et al., 2000b) angewendet. Bei dieser Methode werden die K-Vitamine auf der Säule fraktioniert, isoliert detektiert und nach dem Lauf in den einzelnen Fraktionen aufgesammelt, um mit diesen weiter zu arbeiten (Koivu-Tikkanen, 2001).

Bei einer HPLC-Analyse von Vitamin K handelt es sich in den meisten Fällen um eine Umkehr- oder reversed-phase Chromatographie (Haroon und Hauschka, 1983; Haroon et al., 1986; Sakano et al., 1986; Hirauchi et al., 1989; Kirk und Fell, 1989; Hodges, 1997; Koivu-Tikkanen et al., 2000a; Koivu-Tikkanen et al., 2000b). Hierbei erfolgt die Auftrennung der Proben an einer unpolaren Säulenoberfläche und als Laufmittel wird ein organisches Lösungsmittel oder eine Kombination aus organischem Lösungsmittel und Wasser verwendet (Jenke, 2002). Es sind verschiedene Füllmaterialien erhältlich, die C18 Säule ist die geläufigste (Koivu-Tikkanen, 2001). Eine Normalphasenchromatographie ist ebenfalls möglich, jedoch ist die Durchführung komplizierter und die Ergebnisse vergleichsweise schlechter (Langenberg und Tjaden, 1984). In Bezug auf die stationäre Phase sind sich die meisten beschriebenen Methoden sehr ähnlich, bei der mobilen Phase gibt es jedoch viele Variationen, in der Regel sind Methanol (Haroon et al., 1986; Hodges, 1997; Koivu et al., 1997; Koivu-Tikkanen et al., 2000b; Woollard et al., 2002; Kamao et al., 2005; Suhara et al., 2005) und/oder Ethanol (Sakano et al., 1986; Hirauchi et al., 1989; Iwase, 2000; Wakabayashi et al., 2003) als Hauptbestandteil enthalten. Sollen sowohl PK als auch MK analysiert werden, wird eine andere mobile Phase benötigt als wenn nur PK analysiert werden soll.

Bei einer Vitamin K-Analyse mit HPLC können verschiedene Detektionsmethoden durchgeführt werden. Eine Detektion von PK und MK ist möglich mit Ultraviolett- (Haroon und Hauschka, 1983; Kirk und Fell, 1989), elektrochemischen (Koivu et al., 1997; Wakabayashi et al., 2003) und Fluoreszenzdetektoren (Haroon et al., 1986; Sakano et al., 1986; Hirauchi et al., 1988; Hirauchi et al., 1989; Indyk und Woollard, 1997; Indyk und Woollard, 2000; Iwase, 2000; Koivu-Tikkanen et al., 2000b; Woollard et al., 2002; Kamao et al., 2005), welche z.T. mit einem Massenspektrometer gekoppelt sind (Suhara et al., 2005). Fluoreszenzdetektoren werden derzeit am häufigsten verwendet, aber auch Ultraviolett-Detektoren kommen noch zum Einsatz, auch wenn diesen eine geringere Sensitivität und Selektivität nachgesagt wird (Koivu-Tikkanen, 2001). Vitamin K hat keine natürliche Fluoreszenz und muss zu seiner Hydrochinonform reduziert werden, um fluorometrisch detektiert werden zu können (Langenberg und Tjaden, 1984; Haroon et al., 1986; Sakano et al., 1986). Die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase (Haroon et al., 1987) und auch deren Elektrolytgehalt haben nur einen sehr geringen Einfluss auf die Fluoreszenzstärke, wohingegen die Zusammensetzung des Laufmittels deutliche Effekte hat (Langenberg und Tjaden, 1984). Verschiedene Reduktionsmethoden wurden bisher beschrieben und beinhalten

chemische und elektrochemische Vorgänge. Bei der chemischen Reduktion wurden zunächst nasschemische Systeme eingesetzt. Diese Verfahren wurden jedoch aufgrund einiger Probleme bei der Durchführung nicht weiter angewendet (Koivu-Tikkanen, 2001). Stattdessen wird eine chemische Festphasen-Nachsäulenreduktion mit Zink (Haroon et al., 1986; Indyk und Woollard, 2000; Koivu-Tikkanen et al., 2000b; Woollard et al., 2002; Ferreira et al., 2006) oder Platinoxid (Iwase, 2000; Wakabayashi et al., 2003; Kamao et al., 2005) beschrieben. Diese sind schneller und erlauben eine sensitivere Detektion, auch im Vergleich zur elektrochemischen Methode (Haroon et al., 1986). Ein Unterschied zwischen der Verwendung von Zink und Platin liegt darin, dass bei der Zinkreduktion dem Laufmittel noch Reagenzien zugefügt werden müssen, während dieses bei Platin nicht notwendig ist (Koivu-Tikkanen, 2001). Es handelt sich dabei um Zinkchlorid, Natriumazetat und Eisessig (Haroon et al., 1986; Indyk und Woollard, 2000; Koivu-Tikkanen et al., 2000b; Woollard et al., 2002; Ferreira et al., 2006).

Die Massenspektrometrie wird bei der Analyse von Vitamin K hauptsächlich dazu verwendet, Ergebnisse von anderen Methoden zu bestätigen (Sakano et al., 1986).

Unabhängig von der gewählten Methode wird aufgrund der vielen verschiedenen Schritte der Einsatz eines geeigneten internen Standards empfohlen (Haroon et al., 1982).

### **3. Material und Methode**

Für die Untersuchung der MK-Bildung im Intestinaltrakt von Hunden wurden zwei verschiedene In-vitro-Systeme verwendet. In beiden Systemen diente eine Fäzessuspension als Inkubationsansatz, welche die Dickdarmflora des Hundes darstellen soll. Um die Vitamin K-Konzentrationen im Intestinaltrakt zu bestimmen, wurden post mortem entnommene Digestaprobe aus verschiedenen Darmabschnitten von Hunden auf ihren Gehalt an MK untersucht.

Die Herstellerangaben für die verwendeten Chemikalien werden im Anhang in Tabelle 27 zusammengefasst.

#### **3.1 In-vitro-Methoden zur Untersuchung der Bildung von Vitamin K<sub>2</sub>**

##### **3.1.1 Semikontinuierliches Langzeitinkubationssystem**

Bei der eingesetzten Langzeitinkubation handelt es sich um ein geschlossenes, semikontinuierliches Durchfluss-System, mit welchem mikrobielle Stoffwechsellleistungen nach Äquibrierung über ca. acht Tage qualitativ und z.T. quantitativ erfasst werden können. Es handelte sich bei dem hier verwendeten Modell um ein modifiziertes System der Rumen-Simulations-Technik (Rusitec) (Czerkawski und Breckenridge, 1977), in dem unter anaeroben Bedingungen und bei konstantem pH-Wert eine Fermentation stattfindet. Vom Aufbau und der Durchführung gleicht es der Colon-Simulations-Technik (Cositec) (Dreyer, 1990), mit dem Unterschied, dass Fäzes anstelle von Koloninhalt als Inokulum verwendet wurde.

###### **3.1.1.1 Probenmaterial**

Die Fäzesproben für den Hauptversuch stammten von einer gesunden zweieinhalbjährigen Hovawarthündin aus Privatbesitz, welche mit einem kommerziellen Alleinfuttermittel für Hunde gefüttert wurde, dem kein Menachinon zugesetzt wurde.

Um das System zu starten, wurde einmalig frische Fäzes verwendet. Für die tägliche Befüllung des Cositec wurde die Fäzes in einem Gefriertrockner (Christ Alpha 1-4, Osterode) lyophilisiert, in einer Mühle (Retsch Grindomix GM 200, Haan) homogenisiert und dann bis zum Gebrauch bei -20 °C tiefgefroren.

###### **3.1.1.2 Versuchsaufbau**

Das System bestand aus sechs baugleichen Fermentationseinheiten mit einem Volumen von je 125 ml und sechs Überlaufgefäßen (1 Liter Saugflasche Erlenmeyerform mit Kunststoffolive und vorgebohrtem Gummistopfen, Fa. Omnilab, Bremen). Die Fermenter wurden in der

institutseigenen Werkstatt angefertigt. Eine Fermentationseinheit bestand aus einem Plexiglaszylinder, der mit einem Deckel und mit Hilfe von Gummidichtungen gasdicht verschlossen werden konnte. In dem Deckel befanden sich zwei Öffnungen. Eine war durch einen Schraubverschluss zu verschließen, an der zweiten war ein Schlauch (Silikonschlauch 4 mm Innendurchmesser, 1,5 mm Wanddurchmesser, Fa. Omnilab, Bremen) angeschlossen, welcher zu dem dazugehörigen Überlaufgefäß führte. Durch eine Öffnung im Boden der Fermenter wurde über einen Schlauch (Silikonschlauch 3 mm Innendurchmesser, 1 mm Wanddurchmesser, Fa. Omnilab, Bremen) aus einem Kanister kontinuierlich Puffer in den Fermenter gepumpt. Der Pufferfluss wurde durch eine Sechskanalschlauchpumpe (Typ 104 Ole Dich Instrumentmakers, Hvidovre, DK) reguliert. In die Schlauchpumpe war ein Schlauch (Peripren-Schlauch 0,51 mm Innendurchmesser, 0,8 mm Wanddurchmesser, Fa. Petro Gas, Berlin) eingespannt, welcher mit dem zum Fermenter führenden Schlauch verbunden war. Der verdrängte Fermenterinhalt wurde in den Überlaufbehälter geleitet, an dem ein Gasbeutel (Linde AG, Pullach) angeschlossen war, um entstehende Gase aufzufangen. In jedem Fermenter befand sich ein Innengefäß aus Plexiglas, das sowohl am Deckel als auch am Boden perforiert war und in dem sich zwei ca. 35 x 60 mm große Nylonbeutel (Bar Diamond, Inc., Idaho, USA) mit einer Porengröße von 50 µm befanden. Am Deckel des Gefäßes war eine Führungsstange befestigt, welche mit einem Hubmotor verbunden war und das Innengefäß somit kontinuierlich auf und ab bewegen konnte.

Alle sechs Fermenter waren parallel in einem 39 °C warmen Wasserbad angeordnet und wurden über eine Schraubvorrichtung fixiert. Um eine Verdunstung zu verhindern, war die Wasseroberfläche mit Styropor abgedeckt.

### **3.1.1.3 Versuchsablauf**

Der Versuchsablauf unterteilte sich in eine siebentägige Äquilibrationsphase, eine darauf folgende dreitägige Kontrollphase und eine abschließende achttägige Versuchsphase. Während eines Versuchsdurchganges wurden täglich folgende Parameter gemessen: pH-Wert, Redoxpotential, Ammoniakgehalt, Laktatgehalt und flüchtige Fettsäuren als Fermentationsparameter und die Überlaufmenge zur Überprüfung des täglichen Pufferflusses. Vor Versuchsbeginn wurden alle Einzelteile sorgfältig gereinigt. Nach der Reinigung wurde das gesamte System zusammgebaut und das Wasserbad mit einer Umwälzpumpe (Haake D8, Berlin) auf 39 °C erwärmt. Die Sechskanalschlauchpumpe wurde auf eine Perfusionsrate von 125 ml/Tag justiert. 750 ml des bereits vorbereiteten modifizierten Puffers (Dreyer, 1990; Bender et al., 2001; Meister, 2004) (Tab. 3) wurden auf 39 °C erwärmt mit 30 g frisch gewonnener Hundefäzes gemischt und durch ein handelsübliches Teesieb filtriert. Ein Aliquot dieses Gemisches wurde zur späteren Analyse bei -20 °C tiefgefroren.

Zwei zuvor autoklavierte Nylonbeutel wurden mit 1,5 g frisch gewonnener Hundefäzes, bzw. 0,2 g Substrat, bestehend aus Kohlenhydraten, Proteinen und Rohfaser (Tab. 4), befüllt und

fest verschlossen. Sie wurden in das Innengefäß gegeben, welches zusammengesraubt und in den Fermenter gesetzt wurde. Der Fermenter wurde bis zum Rand mit ca. 125 ml flüssigem Inokulum gefüllt, fest verschlossen und in das System eingebaut. Nachdem die Führungsstange mit dem Elektromotor verbunden und die Puffer- und Überlaufschläuche angeschlossen wurden, wurden Pumpe und Elektromotor gestartet.

- A: Pufferbehältnis
- B: Schlauchpumpe
- C: perforiertes Innengefäß
- D: Fermenter
- E: Wasserbad
- F: Führungsstange mit Hubmotor
- G: Überlaufbehälter
- H: Gasbeutel

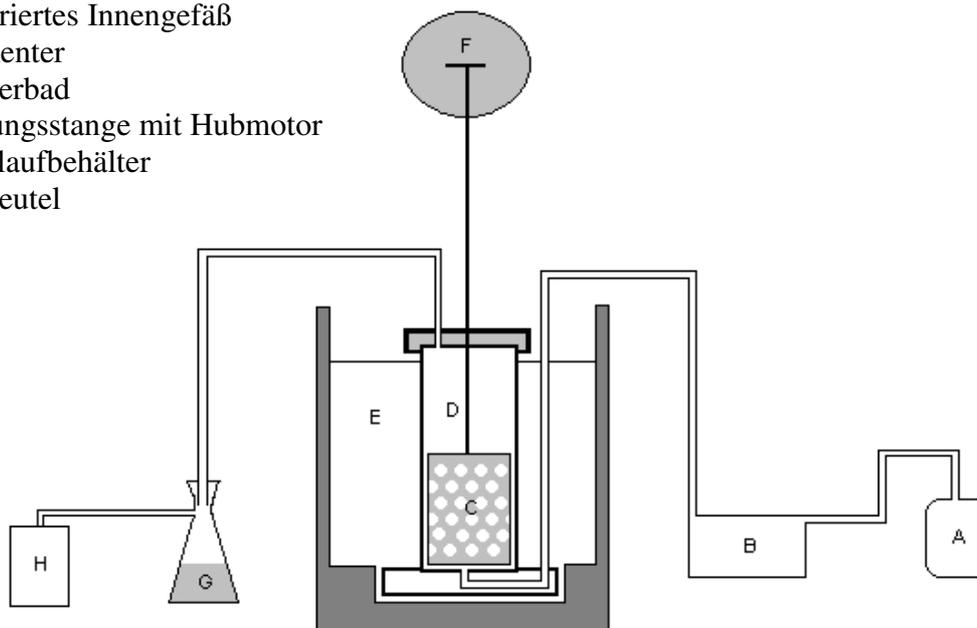


Abb. 5: Schematische Darstellung einer Fermentationseinheit für die semikontinuierliche Langzeitinkubation

Tab. 3: Zusammensetzung (mmol/l Aqua bidest.) der für die Langzeitinkubation verwendeten Pufferlösung (pH = 7,0)

Bestandteile	mmol/l Aqua bidest.
NaCl (Natriumchlorid)	115,0
KCl (Kaliumchlorid)	10,0
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O (Magnesiumchlorid-Hexahydrat)	2,5
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Kalziumchlorid-Dihydrat)	2,5
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O (Natriumdihydrogenphosphat)	2,0
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Natriumsulfat)	1,0
NaHCO <sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat)	5,0
NH <sub>4</sub> Cl (Ammoniumchlorid)	5,0

Tab. 4: Zusammensetzung des zugegebenen Nährsubstrats für die semikontinuierliche Langzeitinkubation

<b>Bestandteile</b>	<b>%</b>
Maisstärke (Kohlenhydrat)	55
Fleischpepton (Protein)	25
Cellulose (Rohfaser)	20

Täglich wurden die Bedingungen im Fermenter kontrolliert, Proben entnommen und Substrat nachgegeben. Durch die tägliche Zugabe von Substrat und gefriergetrockneter Fäzes wurde versucht, konstante Bedingungen zu schaffen. Jeder Fermenter wurde einzeln vom System abgetrennt und für die weiteren Arbeitsschritte zum Schutz vor Auskühlung in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 39 °C gestellt. Es wurden der pH-Wert und das Redoxpotential gemessen, die zwei Nylonbeutel entnommen und durch zwei neue Beutel mit 0,5 g gefriergetrockneter Fäzes bzw. 0,2 g Substrat ersetzt. Die Beutel blieben für jeweils 24 Stunden im Fermenter. Die entnommenen Beutel wurden sorgfältig mit 5 ml vorgewärmtem Puffer ausgewaschen. Bevor diese Flüssigkeit in den Fermenter zurückgegeben wurde, wurden 4 ml Probenmaterial aus dem Fermenter entnommen. Der Fermenter wurde wieder zusammengesetzt und in das System eingebaut. Aus dem abgemessenen Überlauf wurden 4 ml für die Analyse von flüchtigen Fettsäuren und Laktat entnommen und ab dem 10. - 11. Versuchstag zusätzlich 100 ml an Probenmaterial für die Analyse von Vitamin K<sub>2</sub>. Der Rest wurde verworfen und der Gasbeutel geleert. Bevor das Überlaufgefäß wieder an das System angeschlossen wurde, fand eine Begasung mit Stickstoff statt.

Da Vitamin K eine Lichtempfindlichkeit aufweist, stand die Apparatur der Langzeitinkubation während der gesamten Versuchszeit in einem abgedunkelten Raum. Sie wurde zu den Messungen und anderen täglichen Arbeiten so wenig wie möglich einem indirekten Lichteinfluss ausgesetzt.

### 3.1.2 Kurzzeitinkubationssystem

Bei der zweiten eingesetzten In-vitro-Variante handelte es sich um eine Kurzzeitinkubation in gasdicht verschlossenen Gläsern. In den Inkubationsansätzen wurde eine Fäzessuspension zusammen mit Substrat über einen bestimmten Zeitraum inkubiert. Für den Inkubationsansatz diente frische Hundefäzes, welche in einem Puffer (Tab. 5) verdünnt wurde. Zunächst wurde in Vorversuchen der Frage nachgegangen, in wie weit sich die Inkubationsdauer und die Verdünnung der Hundefäzes auf die Reproduzierbarkeit auswirkt. Aufgrund der Ergebnisse wurden für den Hauptversuch eine Inkubationsdauer von 24 Stunden und eine Gesamtverdünnung von 1:100 gewählt.

### 3.1.2.1 Probenmaterial

Bei den Spendertieren für die Fäzes als Inokulum handelte es sich um Hunde verschiedenen Alters aus privater Haltung. Zu den Tieren zählten zwei Hündinnen (Weimaraner, 1 <sup>3</sup>/<sub>4</sub> Jahre und großer Mischling, 4 <sup>1</sup>/<sub>2</sub> Jahre) und ein Rüde (Deutsch Kurzhaar, 11 Jahre). Alle Tiere waren gesund und bekamen keine Medikamente oder Futterzusatzstoffe, welche einen Einfluss auf die Darmflora gehabt hätten. Die Hunde erhielten kommerzielle Alleinfuttermittel für Hunde, denen kein Menachinon zugesetzt war.

### 3.1.2.2 Versuchsaufbau

Als Inkubationsgefäße wurden medizinische Infusionsflaschen mit Chlorbutylstopfen und Schraubdeckel mit Loch (Afnor-Schraubflaschen, Stopfen und Kappen mit Loch, Zscheile & Klinger, Hamburg) und einem Volumen von 125 ml verwendet.

### 3.1.2.3 Versuchsablauf

Um den Einfluss zwei verschiedener Nährstoffe auf die Bildung von Vitamin K<sub>2</sub> zu untersuchen, wurden jeweils eine Kohlenhydrat- und eine Proteinquelle sowohl einzeln als auch gemeinsam in verschiedenen Konzentrationen zusammen mit der Fäzessuspension verdünnt. Als Kohlenhydrat wurde Maisstärke (Ms) und als Protein Fleischpepton (Pep) verwendet. Das jeweilige Substrat wurde dem Inkubationsansatz in drei verschiedenen Konzentrationen zugesetzt (Tab. 5).

Tab. 5: Konzentrationen (g) von Maisstärke und Fleischpepton in den Inkubationsgefäßen (1-9) und in der Kontrolle (K) der Kurzzeitinkubation

Substrat	Ansatz									K
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Maisstärke (g)	0,1	0,5	1,0	-	-	-	0,05	0,25	0,5	-
Fleischpepton (g)	-	-	-	0,1	0,5	1,0	0,05	0,25	0,5	-

Zur Herstellung der Fäzessuspension wurde die frisch gewonnene Fäzesprobe 1:10 bei 37-40 °C in einer vorreduzierten Pufferlösung gelöst. Somit waren in jedem Inkubationsgefäß 0,5 g Fäzes enthalten. Als Puffer wurde ein PRAS-Puffer ("Prereduced Anaerobe Sterilized" Medium) mit Cysteinhydrochlorid als Reduktionsmittel verwendet (Tab. 6). Der pH-Wert des Puffers lag in den drei Versuchen bei 6,47, 6,72 bzw. 6,74. Das Gemisch wurde zunächst durch ein grobmaschiges Metallsieb gesiebt und danach durch ein Baumwollsieb gefiltert und bis zur weiteren Verwendung mit Hilfe einer Heizplatte warm gehalten.

Tab. 6: Zusammensetzung (g/l Aqua bidest.) des PRAS-Puffers (“Prerduced Anaerobe Sterilized“ Medium) für die Kurzzeitinkubation

<b>Bestandteile</b>	<b>g/l Aqua bidest.</b>
Cysteinhydrochlorid	5,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat)	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Di-Kaliumhydrogenphosphat)	0,5
NaHCO <sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat)	5,0
NaCl (Natriumchlorid)	1,0
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (Kalziumchlorid-Dihydrat)	0,1324
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (Magnesiumsulfat-Heptahydrat)	0,1
Resazurin	0,001

Im Inkubationsgefäß wurde das jeweilige Substrat in 45 ml der Pufferlösung gelöst. Das Gemisch wurde mit Stickstoff begast, um eine anaerobe Atmosphäre zu schaffen und luftdicht verschlossen. Mit einer Spritze wurden 5 ml der erwärmten Kotsuspension durch den Gummistopfen in jedes Glas injiziert. Somit lag eine Gesamtverdünnung von 1:100 vor. Zum Schutz vor Lichteinstrahlung wurden die aus Weißglas bestehenden Inkubationsgefäße in Alufolie gewickelt. Zur Inkubation wurden alle Gefäße für 24 Stunden bei 37 °C und 100 Umdrehungen pro Minute in einen Schüttelinkubator (Typ 3033, GFL, Burgwedel) gegeben.

Die Durchführung der Kurzzeitinkubation bestand jeweils aus einem Doppelansatz. Ein Doppelansatz enthielt kein Substrat und lief als Kontrollprobe mit.

Vor der Inkubation wurde eine Probe im Doppelansatz nur mit Puffer und Suspension als Nullprobe (Vitamin K<sub>2</sub>-Gehalt des Ansatzes ohne Substrat nach null Stunden) bis zur Analyse bei -20 °C tiefgefroren.

Nach Ende der Inkubation wurde der pH-Wert gemessen und 4 ml der Inkubationslösung wurden für die Bestimmung von flüchtigen Fettsäuren, Ammonium und Laktat in Eppendorfgefäßen bei -20 °C tiefgefroren. Die restlichen 46 ml wurden bis zur Bestimmung der MK ebenfalls bei -20 °C tiefgefroren.

### **3.1.3 Analytik der Fermentationsparameter**

#### **3.1.3.1 Messung des pH-Wertes**

Der pH-Wert wurde bei der Langzeitinkubation alle 24 Stunden vor dem Wechsel des Futterbeutels in den einzelnen Fermentern gemessen. Als Messgerät diente ein pH-Meter WTW (series inoLab 730; WTW, Weilheim) mit einer pH-Einstabmesskette (Sen Tix 81; WTW, Weilheim).

Bei der Kurzzeitinkubation wurden die Inkubationsgefäße nach 24 Stunden einzeln aus dem Brutschrank genommen und der pH-Wert gemessen. Als pH-Meter diente das Gerät Mettler Toledo Seven Multi mit einer pH Einstabmesskette (InLab 410; beides Mettler Toledo, Gießen).

### **3.1.3.2 Messung des Redoxpotentials**

Bei der Langzeitinkubation wurde das Redoxpotential alle 24 Stunden vor dem Futterbeutelwechsel gemessen. Die Bestimmung erfolgte über 60 Sekunden. Zum Messen des Redoxpotentials diente das bereits oben genannte pH-Meter mit einer Redox-Messkette (Sen Tix ORP; WTW, Weilheim).

### **3.1.3.3 Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren**

Die Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren erfolgte gaschromatographisch. Die täglich aus dem Fermenter und dem Überlauf entnommenen Proben und auch die Proben aus der Kurzzeitinkubation wurden bis zur Analyse in 2 ml Eppendorf-Gefäßen bei -20 °C aufbewahrt.

Als interner Standard wurde Capronsäure (Tab. 7) in einer Konzentration von 0,5 mmol/l verwendet.

Zur Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend bei 14000 rpm für drei Minuten in einer Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415C, Hamburg) zentrifugiert. Von den Fermenterproben der Langzeitinkubation und den Proben aus der Kurzzeitinkubation wurden jeweils 100 µl in ein Glas-Gaschromatograph-Fläschchen (2 ml snaptop vial mit snap cap, Agilent Technologies, Böblingen) überführt und 900 µl des internen Standards hinzu gegeben. Dadurch entstanden eine zehnfache Verdünnung und eine Konzentration der Capronsäure von 0,455 mmol/l. Bei den Proben aus dem Überlauf wurden 250 µl der Probe mit 750 µl des internen Standards verdünnt. Daraus ergab sich eine vierfache Verdünnung und die Capronsäurekonzentration betrug 0,376 mmol/l.

Der Gaschromatograph (Agilent Technologies 6890N mit dem Autosampler G2614A und dem Injektionsturm G2613A, Network GC Systems, Böblingen) wurde vor den Analysen mit einer 0,5 mmol/l Standardlösung (Tab. 8) kalibriert. Nach jedem Proben- bzw. Standarddurchlauf lief eine Leerprobe (Aqua dest.) zur Reinigung.

Tab. 7: Zusammensetzung des internen Standards mit 0,5 mmol/l Capronsäure für die Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren

<b>Bestandteile</b>	<b>Menge</b>
Aqua dest. (HPLC-/GC-grade)	950 ml
Stammlösung *	50 ml
Natriumazid	2,5 g
Oxalsäure-Dihydrat	10,0 g

\* die Stammlösung (10 mmol/l Capronsäure) setzt sich zusammen aus 200 ml Aqua dest. (HPLC-/GC-grade), 250 µl Hexansäure (= Capronsäure) und 2 g Oxalsäure-Dihydrat

Tab. 8: Zusammensetzung der Standardlösung (0,5 mmol/l) zur Ein-Punkt-Kalibrierung für die Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren

<b>Bestandteile</b>	<b>Menge</b>
Stammlösung*	50 µl
Oxalsäure-Dihydrat	10 mg
Aqua dest. (HPLC-/GC-grade)	950 µl

\*SUPELCO 4-6975 „Volatile Acids Standard Mix“ mit 10 mmol/l Capronsäure

Die chromatographische Trennung wurde durchgeführt mit einer Agilent 19095N-123 HP-INNOWAX Säule mit einer Polyethylenglycol-Beschichtung. Als Trägergas wurde Wasserstoff mit einer Fließgeschwindigkeit von 20 ml/min verwendet, welcher über einen Parker Gasgenerator 9150 (Parker Hannifin Corporation, Tewksbury, MA, USA) generiert wurde. Als Detektor diente ein Flammenionisationsdetektor. Die Injektionsspritze (FN 23-26/42/HP, konisch) hatte ein Fassungsvermögen von 10 µl, das Probenvolumen war 1 µl bei einem Split-Verhältnis von 1:1 und einem Fluss von 30 ml/min auf die Säule. Während der Injektion wurde der Injektor von 100 °C auf 250 °C aufgeheizt. Das Erhitzen des Säulenofens lief über ein Temperaturprogramm. Eine Starttemperatur von 70 °C wurde für 0,5 min gehalten, gefolgt von einer Aufheizung (15 °C/min) auf 140 °C. Nach 1,5 min erhöhte sich Temperatur des Ofens (120 °C/min) auf 190 °C. Diese Temperatur wurde für 4 min gehalten, im Anschluss kühlte der Ofen wieder auf 70 °C runter.

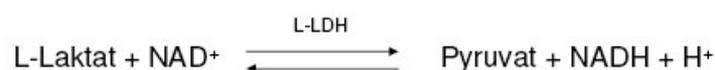
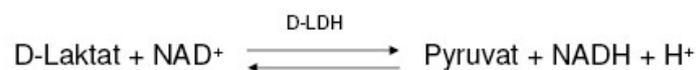
### 3.1.3.4 Bestimmung von Laktat

Die direkt nach der Probenentnahme aus Fermenter und Überlauf tiefgefrorenen Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Von der Probe wurde 1 g mit 2 ml Perchlorsäure (1 mol/l) verdünnt, verschlossen und zehn Sekunden intensiv gemischt (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA). Daraufhin wurde die Probe zehn Minuten bei 3200 g und Raumtemperatur zentrifugiert (Heraeus Multifuge 1.0R, Thermo Fisher Scientific, Osterode). Mit Hilfe von Kaliumhydroxid wurde der pH des Überstandes auf einen Wert

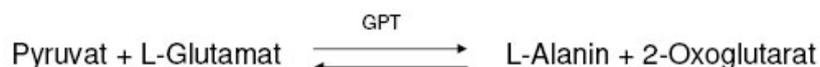
größer neun eingestellt. Direkt nach der Zugabe von Kaliumhydroxid wurde kräftig geschüttelt und anschließend zehn Minuten bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert (Heraeus Fresco 17 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Osterode). Der Überstand wurde abgenommen und ein aliquoter Anteil zur pH-Kontrolle auf einen handelsüblichen Teststreifen gegeben. Falls der pH-Wert unter neun lag wurde er mit 4-molarem Kaliumhydroxid eingestellt, wobei das verwendete Volumen in die spätere Berechnung mit einbezogen wurde.

Von den Proben der Kurzzeitinkubation wurde jeweils 1 ml zehn Minuten bei 3200 g und Raumtemperatur zentrifugiert (Heraeus Multifuge 1.0R, Thermo Fisher Scientific, Osterode). Ein definiertes Volumen des Überstandes wurde abgenommen und der pH mit Hilfe von 4N KOH auf 7,5 bis 8,0 eingestellt. Um die Eigenfärbung der Proben zu verringern, wurde eine Carrez-Fällung durchgeführt. 100 µl Carrez I-Lösung (85 mM  $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O$ ) wurden zu dem Überstand hinzugegeben, die Probe durchmischt (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA) und weitere 100 µl von Carrez II-Lösung (250 mM  $ZnSO_4 \times 7 H_2O$ ) hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 13000 g und 4 °C (Heraeus Fresco 17 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Osterode). Der Überstand wurde abgenommen und auf einen pH zwischen 8 und 10 eingestellt. Die zugegebenen Volumina wurden notiert und später in die Berechnung als Verdünnungsfaktor mit einbezogen.

Die Analyse des Laktats erfolgte für alle Proben mit einem enzymatischen Testkit (D-Milchsäure/L-Milchsäure, Boehringer Mannheim) gemäß der Anleitung des Herstellers. Grundlage ist die photometrische Messung des Reduktionsproduktes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH). Das Prinzip der Messung besteht darin, dass D-Milchsäure durch D-Lactat-Dehydrogenase (D-LDH) zu Pyruvat oxidiert wird. Ebenso findet durch L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH) eine Oxidation von L-Milchsäure zu Pyruvat statt. Gleichzeitig wird bei dieser Reaktion das oxidierte Nicotinamid-adenin-dinucleotid ( $NAD^+$ ) zu NADH reduziert.



Das Gleichgewicht bei dieser Reaktion verschiebt sich auf die Laktatseite. Um dieses zu verhindern wird durch eine nachgeschaltete Reaktion mit Hilfe von Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und in Gegenwart von L-Glutamat durch Abfangen der Pyruvats das Verhältnis auf die Seite von Pyruvat und NADH verschoben.



Die gebildete Menge NADH verhält sich proportional zur Ausgangsmenge der Milchsäure und wurde photometrisch (Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrometer, Pharmacia Biotech, GE Healthcare, München) bei 365 nm gemessen.

### **3.1.3.5 Bestimmung von Ammonium**

Die Messung der  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration in den wässrigen Proben des Kurzzeitinkubationssystems erfolgte mit dem Messgerät SevenMultiIon S80 einer ionenselektiven Halbzellenelektrode DC218- $\text{NH}_4^+$  und einer pH-Elektrode (InLab 410; Mettler Toledo, Gießen). Vor der Messung, welche im mV-Modus erfolgte, musste eine Kalibriergrade erstellt werden. Dazu wurde zunächst eine Stammlösung mit 55,56 mmol/l  $\text{NH}_4^+$  angesetzt (0,5944 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in 200 ml Aqua bidest.). Aus dieser wurde durch Zugabe von Aqua bidest. eine Verdünnungsreihe über zehn Schritte bis zu einer Konzentration von 0,056 mmol/l hergestellt und nach der Messung der einzelnen Konzentrationen eine Regressionsgrade ermittelt.

Die zu messenden Proben wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und dann im Eisbad kühl gehalten. Von jeder Probe wurden 0,5 g abgewogen und 0,5 ml Aqua bidest. zugegeben. Die Proben wurden homogenisiert (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA) und zehn Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Heraeus Fresco 17 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Osterode). Anschließend wurden 0,5 ml des Überstandes in ein Szintillationsröhrchen (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) überführt und 200  $\mu\text{l}$  ISA-Lösung, 9,5 ml Aqua bidest. und ein kleiner Rührfisch hinzugegeben. Das Röhrchen wurde auf einen langsam eingestellten Magnetprüher gestellt und die Messelektrode in die Probenlösung getaucht. Die Messung erfolgte bis zur Konstanz des Wertes. Abschließend wurden von jeder Probe der pH-Wert und die Temperatur gemessen.

## **3.2. Bestimmung der Vitamin K<sub>2</sub>-Konzentration in der Digesta von Hunden**

Zusätzlich zu den In-vitro-Versuchen wurden Digestaprobe aus unterschiedlichen Darmabschnitten von neun Hunden auf ihren Vitamin K<sub>2</sub>-Gehalt untersucht. Die Proben wurden von gesunden Hunden gewonnen, die mit einem Standardfutter gefüttert wurden. Die Digesta wurden im Rahmen anderer Versuche zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden nach der Entnahme bis zur Analyse bei -20 °C tiefgefroren. In Tabelle 9 werden die Daten zu den einzelnen Hunden zusammengefasst.

## MATERIAL UND METHODE

Tab. 9: Rasse, Geschlecht, Alter, Körpermasse und Futter der Hunde, sowie die Lokalisation der entnommenen Digestproben

Nr. des Hundes	Rasse	Geschlecht <sup>2</sup>	Alter (Jahre)	Körpermasse (kg)	Futter <sup>3</sup>	Digestproben
1	Beagle	m	1 1/4	9,2	Trockenfutter und Feuchtfutter	Zäkum Kolon
2	Beagle	w	1 1/4	5,9	s.o.	Kolon
3	Beagle	w	1 1/4	7,1	s.o.	Jejunum Kolon Duodenum
4	Beagle	m	1 1/4	17,0	Harlan Teklad T2021	Jejunum Ileum Kolon Duodenum
5	Beagle	m	1 1/4	17,3	s.o.	Jejunum Zäkum Kolon
6	Beagle	m	1	16,2	s.o.	Duodenum Kolon
7	DSH <sup>1</sup>	m	6 3/4	30,1	s.o.	Duodenum Duodenum
8	DSH	m	7	37,3	s.o.	Jejunum Kolon Duodenum
9	DSH	m	7	34,1	s.o.	Jejunum Zäkum Kolon

<sup>1</sup> Deutscher Schäferhund

<sup>2</sup> m = männlich, w = weiblich

<sup>3</sup> Trocken- und Feuchtfutter = handelsübliches Hundefutter, dem kein Menachinon zugesetzt war; Harlan Teklad T2021: 2,3 mg/kg Vitamin K<sub>3</sub>

### 3.3 Analytik von Vitamin K<sub>2</sub>

Um den Gehalt der Menachinone in den verschiedenen Probenmatrizes zu ermitteln, wurden zunächst die fettlöslichen Bestandteile aus der Probe extrahiert, ggf. gereinigt und dann mit Hilfe eines HPLC-Verfahrens analysiert. Alle Extraktionen und Analysen wurden im

Doppelansatz durchgeführt, sofern das Probenmaterial ausreichte. Sämtliche Arbeiten fanden unter weitgehendem Lichtausschluss statt.

### 3.3.1 Referenzstandard und interner Standard

Als interner Standard wurde Phyllochinon (PK) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) verwendet und für die Kalibrierung Menachinon-4 bis -10 (Eisai Co., Tokio, Japan).

Die Herstellung der Vitamin K<sub>1</sub>-Standardlösung aus den Stammlösungen I und II mit einer Konzentration von 200 ng/ml wird in Tabelle 10 beschrieben.

Tab. 10: Herstellung der Vitamin K<sub>1</sub>-Standardlösung

	Verdünnung	Konzentration
Stammlösung I	100 mg PK in 100 ml 2-Propanol lösen (auf Magnetprüher)	1 mg/ml
Stammlösung II	1 ml der Stammlösung I auf 100 ml mit Methanol verdünnen	10 µg/ml
Standardlösung	1 ml der Stammlösung II auf 50 ml mit Methanol verdünnen	200 ng/ml

Aufgrund der geringeren Gesamtmenge der Menachinone variierte die Herstellung des MK-Standards von der des K<sub>1</sub>-Standards (Tab. 11).

Tab. 11: Herstellung der Menachinon-Standardlösung

	Verdünnung	Konzentration
Stammlösung I	1 mg MK in 10 ml 2-Propanol lösen (im Ultraschallbad)	100 µg/ml
Stammlösung II	1 ml der Stammlösung I auf 10 ml mit Methanol verdünnen	10 µg/ml
Standardlösung	0,2 ml der Stammlösung II auf 10 ml mit Methanol verdünnen	200 ng/ml

### 3.3.2 Extraktion der Proben

Die Vorbereitung der Proben zur Analyse erfolgte durch eine Extraktion mit 2-Propanol/Hexan 3:2 (v/v) (Ferreira et al., 2006).

Alle Arbeiten fanden in abgedunkelten Räumen statt. Zusätzlich waren alle Gefäße zum Schutz vor Lichteinstrahlung mit Alufolie umwickelt.

Die Proben der Lang- und Kurzzeitinkubationsversuche wurden nach Auftauen bei 2490 g über zehn Minuten zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3 S-R, Thermo Fisher Scientific,

Karlsruhe). 10 ml des Überstandes wurden zusammen mit 15 ml 2-Propanol/Hexan 3:2 (v/v) und 1 ml Vitamin K<sub>1</sub> (200 ng/ml) als internem Standard in ein 50 ml Plastikröhrchen gegeben. Dieses Gemisch wurde drei Minuten geschüttelt, kam für zwei Minuten in ein Ultraschallbad (Bandelin Electronic KG, Berlin) und wurde noch mal für zwei Minuten geschüttelt (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA). Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Probe über fünf Minuten bei 1800 g (Heraeus Multifuge 3 S-R, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe). Die Hexan-Phase wurde abpipettiert und in ein Glasröhrchen überführt. In das Extraktionsgefäß wurden erneut 2 ml Hexan gegeben, es wurde 30 Sekunden geschüttelt und fünf Minuten bei 1800 g zentrifugiert. Anschließend wurde erneut die Hexanphase abpipettiert und zu der im vorherigen Schritt bereits entnommenen zugegeben. Die Hexan-Phase in den Glasröhrchen wurde in einem Vakuumverdampfer (Christ RVC 2-18, Osterode) bei 60 °C und einem Unterdruck von 600-700 bar vollständig eingeeengt. Die Extraktion von Fäzes- und Digestaprobe verlief nach der gleichen Methode. Sie unterschied sich nur in der Vorbereitung und Einwaage der Proben. Von den Digestaprobe wurden jeweils 500 mg für die Extraktion verwendet und von der lyophilisierten Fäzes wurden 200 mg verwendet. Die eingewogene Probenmenge wurde mit 10 ml Aqua bidest., 15 ml 2-Propanol/Hexan 3:2 (v/v) und 1 ml Vitamin K<sub>1</sub> wie oben beschrieben extrahiert.

### **3.4.3 Reinigung der Proben**

In Vorversuchen wurde untersucht, ob eine Reinigung der Proben durch eine Festphasenextraktion, bzw. eine Flüssig-Flüssig-Extraktion zu einer besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse führt. Es zeigte sich, dass eine Reinigung der Proben nicht notwendig war, da die extrahierten Proben gar nicht bzw. nur minimal verunreinigt waren. Die Fäzes- und Digesta-Proben wurden durch Filtration in Zentrifugen-Filtereinheiten (Microcon-30; Millipore Corporation, Bedford, USA) gereinigt. Die vollständig eingeeengte Probe wurde in 0,5 ml HPLC-Eluens (siehe 3.4.4) aufgenommen, durch schütteln gelöst (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA) und dann in die Zentrifugen-Filtereinheit gegeben. Diese wurde in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C und 11000 rpm für 25 Minuten zentrifugiert (Heraeus Fresco 17 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Osterode). Nach der Zentrifugation wurde das Filtrat direkt in ein lichtundurchlässiges HPLC-Analysengläschen (2 ml, Amber) mit einem Snap Verschluss (snap cap, beides Agilent Technologies, Waldbronn) gegeben. In einigen Fällen war das Filtrat aufgrund einer starken Verschmutzung der Probe und einer dadurch unzureichenden Filtration für eine Analyse quantitativ nicht ausreichend. Um dennoch eine Analyse durchführen zu können wurde ein Inlet (Vial Insert, Agilent Technologies, Böblingen) mit einem Volumen von 250 µl in das Vial gegeben bzw. es wurden die Filtrate der Doppelansätze zusammengegeben.

### 3.3.4 HPLC – Analyse

Zur Quantifizierung des Vitamin K<sub>2</sub> wurde sowohl ein interner als auch ein externer Standard verwendet. Als interner Standard diente Vitamin K<sub>1</sub> in einer Konzentration von 200 ng/ml. Über diesen wurde die Wiederfindung berechnet. Der externe Standard bestand aus MK-4 bis -10 und diente zur Berechnung der Konzentration der MK in den Proben.

Die am Ende der Extraktion eingeeengten Proben wurden in 0,5 ml HPLC-Eluens (Tab. 12) aufgenommen, geschüttelt und in ein Vial überführt. Das Eluens wurde vor der Verwendung 10-15 Minuten in einem Ultraschallbad (Bandelin Electronic KG, Berlin) entgast.

Tab. 12: Zusammensetzung des HPLC-Eluenten

<b>Bestandteil</b>	<b>Gehalt</b>
Methanol	73 %
Ethanol	17 %
n-Hexan	10 %
Zinkchlorid	10 mM
Natriumacetat	5 mM
Eisessig (100 %-ig)	5 mM

Für die Analyse stand ein HPLC der HP Series 1050 bestehend aus einem Lösemittelkabinett, einem Vakuumentgaser, einer quaternären Pumpe und einem Autosampler (Agilent Technologies, Waldbronn) zur Verfügung.

Die Analyse der Proben erfolgte isokratisch mit einer reverse-phase Säule Eurospher 100-5 C18, 250 x 4 mm mit Vorsäule (Knauer, Berlin). Das Injektionsvolumen betrug 50 µl, die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase 0,8 ml/min. Nach acht Minuten wurde die Flussrate über vier Minuten schrittweise auf 1,5 ml/min erhöht. Die Laufzeit pro Probe betrug 35-45 Minuten mit einer Nachlaufzeit (0,8 ml/min) von fünf Minuten. Der Hauptsäule folgte eine Nachsäule. Diese 7 cm lange Säule war mit einem Zinkchloridpulver mit einer Korngröße <45 µm (Fa. Merck, Darmstadt) gefüllt. Als Detektor wurde ein Fluoreszenzdetektor Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn) verwendet. Die Messung erfolgte bei 246 nm Exzitations- und 430 nm Emissionswellenlänge.

Die Identifizierung der einzelnen MK erfolgte über die Retentionszeiten des jeweiligen Standards. Die Quantifizierung erfolgte über den direkten Vergleich der Peakflächen vom Standard und der von den Proben. Um mögliche Veränderungen während eines Analysenlaufes mit in die Berechnung einzubeziehen, wurde jeweils nach zwei bis drei Proben erneut ein Standard analysiert. Der interne Standard diente zur Überprüfung der Wiederfindung.

Da beim Langzeitinkubationsversuch jeden Tag eine definierte Menge (0,5 g) lyophilisierte Fäzes hinzugegeben wurde, wurde deren Gehalt an MK ebenfalls bestimmt und von der

Menge der MK in der Probe subtrahiert um die Konzentration des neu gebildeten MK zu ermitteln.

In der Kurzzeitinkubation wurde ebenfalls über die Fäzes, die als Inokulum diente, MK in das System eingetragen. Um die Nettobildung der MK in 24 Stunden Inkubation zu bestimmen, wurde eine Probe des Ansatzes ohne Zusatz von Substrat vor der Inkubation auf ihren MK-Gehalt analysiert und dieser von den anderen Proben subtrahiert.

### **3.4 Auswertung der Daten**

Die Auswertung der Daten erfolgte deskriptiv, auf eine Überprüfung der möglichen statistischen Unterschiede wurde aufgrund der geringen Probenzahl verzichtet. Für die Berechnung des arithmetischen Mittels (Mw) und der Standardabweichung (SD) als Maß für die Streuung sowie zur Darstellung der Versuchsergebnisse wurde Microsoft Office Excel 2003, USA, verwendet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 In-vitro-Untersuchungen mit einem semikontinuierlichem Langzeitinkubationssystem

#### 4.1.1 pH-Wert

Der pH-Wert zeigte sich während der Äquilibrierungsphase in allen Fermentern ziemlich konstant ( $6,54 \pm 0,08$  bis  $6,59 \pm 0,13$ ). In der dreitägigen Kontrollphase wurden in den einzelnen Fermentern unterschiedliche pH-Werte gemessen ( $6,52 \pm 0,03$  bis  $6,68 \pm 0,03$ ), allerdings waren sie innerhalb einer Fermentereinheit konstant. In der Versuchsphase kam es zu größeren Differenzen zwischen den einzelnen Fermentern. Zusätzlich zeigte sich eine deutliche Abnahme des Wertes ( $6,24 \pm 0,11$  bis  $6,48 \pm 0,09$ ) im Vergleich zu den vorherigen Phasen (Abb. 6). Die einzelnen Werte sind in Tabelle 28 im Anhang zusammengefasst.

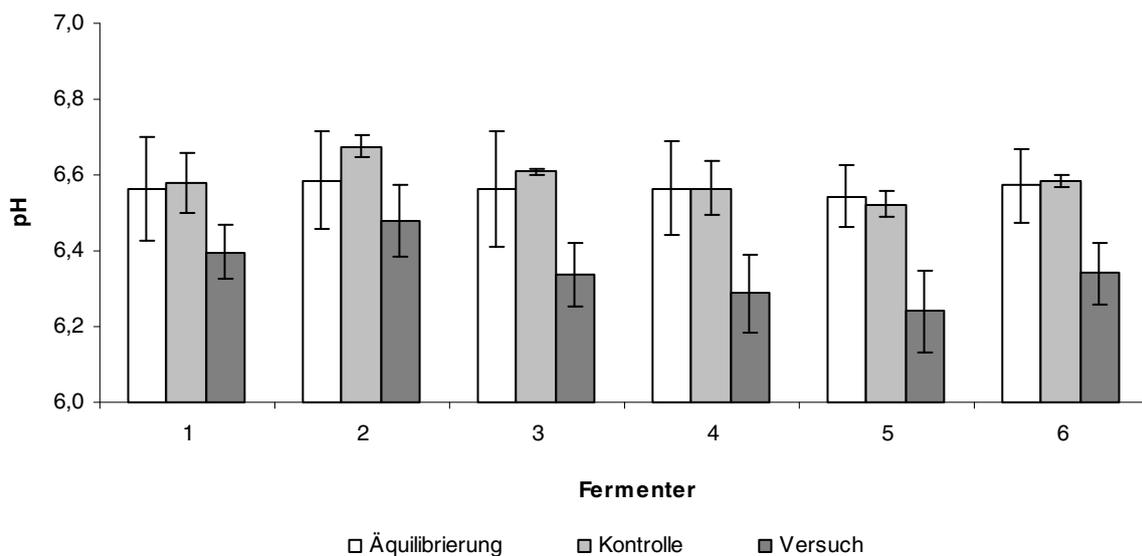


Abb. 6: pH-Werte (Mw  $\pm$  SD) der einzelnen Fermenter (1-6) in der Äquilibrierungs- (n = 7), Kontroll- (n = 3) und Versuchsphase (n = 8)

#### 4.1.2 Redoxpotential

Die Messwerte des Redoxpotentials waren in der Äquilibrierungsphase in den einzelnen Fermentern sehr ähnlich ( $-232,8 \pm 32,8$  bis  $-272,2 \pm 47,0$  mV) wohingegen an den einzelnen Tagen deutliche Schwankungen festgestellt werden konnten. In der Kontrollphase lagen die Werte insgesamt deutlicher im negativen Bereich als in den vorherigen Tagen und die Unterschiede zwischen den Fermentern waren deutlich ( $-286,6 \pm 37,9$  bis  $-343,2 \pm 0,9$  mV). In der Versuchsphase war das Redoxpotential höher als in der Äquilibrierungs- und

Kontrollphase und es traten Schwankungen innerhalb der acht Tage auf ( $-190,3 \pm 23,3$  bis  $-217,1 \pm 33,6$  mV) (Abb. 7). Die einzelnen Werte sind in Tabelle 29 im Anhang zusammengefasst.

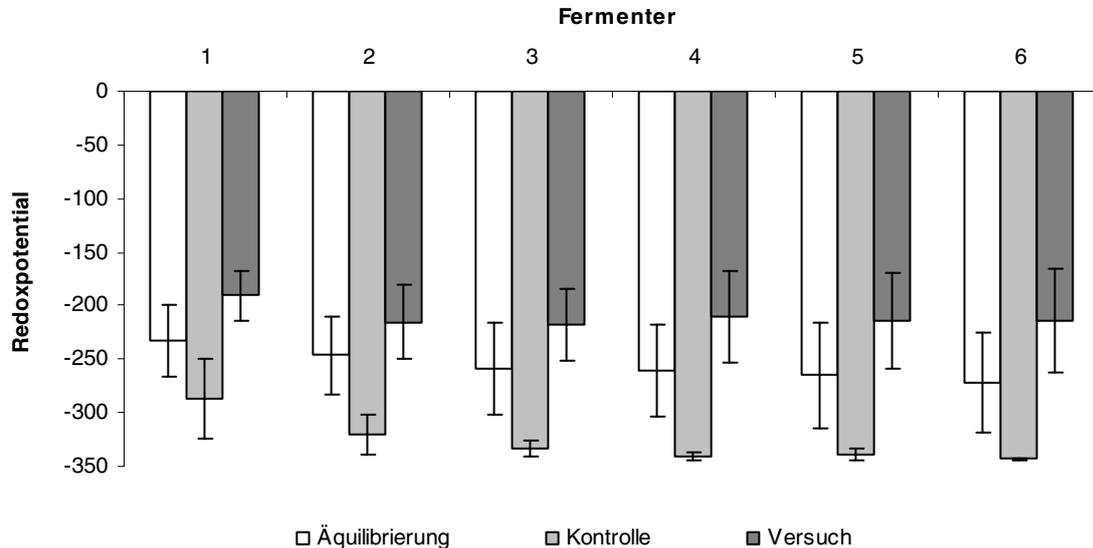


Abb. 7: Redoxpotential ( $Mw \pm SD$ ) der einzelnen Fermenter (1-6) in der Äquilibrierungs- ( $n = 7$ ), Kontroll- ( $n = 3$ ) und Versuchsphase ( $n = 8$ )

#### 4.1.3 Durchflussrate des Puffers

Die Überlaufmenge wurde alle 24 Stunden gemessen. Durch einen kontinuierlichen Pufferfluss sollte täglich ein kompletter Austausch des flüssigen Fermenterinhalt mit einem Volumen von 125 ml stattfinden.

Die Durchlaufzeiten ( $Mw \pm SD$ ) an den 18 Tagen lagen bei den einzelnen Fermentern zwischen  $122,2 \pm 11,9$  und  $128,6 \pm 2,7$  ml/d (Tab. 13). Mit Ausnahme von drei Tagen, an denen relativ große Schwankungen in der Überlaufmenge der einzelnen Fermenter auftraten ( $110 \pm 16,1$ ,  $108,7 \pm 52,0$  bzw.  $139,5 \pm 46,9$  ml/d), lief die Schlauchpumpe sehr konstant ( $120,2 \pm 10,4$  bis  $133,3 \pm 6,1$  ml/d).

Tab. 13: Tägliche Durchflussrate (ml) in den Fermentern 1-6,  $Mw \pm SD$  ( $d = 18$ )

	Fermenter					
	1	2	3	4	5	6*
ml/d	$126 \pm 8,35$	$122 \pm 11,9$	$122 \pm 5,35$	$126 \pm 5,13$	$129 \pm 5,72$	$124 \pm 3,44$

\*d = 16

#### 4.1.4 Flüchtige Fettsäuren

Sowohl im Fermenter als auch im Überlauf wurden die Gehalte von Acetat, Propionat, n- und i- Butyrat und n- und i- Valeriat täglich analysiert. Die Bildung von n- und i- Valeriat war so gering, dass sie nicht weiter berücksichtigt wurde.

##### 4.1.4.1 Flüchtige Fettsäuren im Fermenter

Die Gesamtproduktion der flüchtigen Fettsäuren war innerhalb der sechs Fermenter ähnlich und nahm kontinuierlich im Laufe der Versuchsdauer zu. Während die Werte in der Äquilibrierungsphase zwischen  $5,59 \pm 1,08$  und  $6,02 \pm 0,90$   $\mu\text{mol/ml}$  lagen, stieg die Gesamtmenge während der dreitägigen Kontrollphase auf  $8,33 \pm 0,75$   $\mu\text{mol/ml}$  bis  $9,88 \pm 0,50$   $\mu\text{mol/ml}$  und erreichte in der Versuchsphase Werte zwischen  $9,81 \pm 1,08$   $\mu\text{mol/ml}$  und  $13,6 \pm 1,31$   $\mu\text{mol/ml}$  (Tab. 14).

Tab. 14: Gesamtkonzentration ( $M_w \pm SD$ ) der flüchtigen Fettsäuren ( $\mu\text{mol/ml}$ ) in den einzelnen Fermentern (F1-F6) während der drei Phasen des Versuches

F1	F2	F3	F4	F5	F6
Äquilibrierungsphase; d = 7					
$5,71 \pm 1,12$	$5,59 \pm 1,08$	$5,64 \pm 1,59$	$5,98 \pm 1,05$	$6,02 \pm 0,90$	$5,99 \pm 0,74$
Kontrollphase; d = 3					
$8,33 \pm 0,75$	$7,72 \pm 0,62$	$8,56 \pm 0,34$	$9,27 \pm 0,79$	$9,88 \pm 0,50$	$8,83 \pm 0,40$
Versuchsphase; d = 8					
$10,3 \pm 1,08$	$9,81 \pm 1,08$	$11,8 \pm 1,06$	$12,7 \pm 1,41$	$13,6 \pm 1,31$	$12,6 \pm 1,12$

Die prozentuale Verteilung der flüchtigen Fettsäuren während der drei Phasen des Versuches wird in Tab. 15 dargestellt. Es zeigte sich, dass während der Äquilibrierungsphase ein fast ausgeglichenes Verhältnis zwischen Essigsäure ( $37,7 \pm 11,49$  bis  $46,3 \pm 5,63$  %) und Propionsäure ( $40,9 \pm 2,48$  bis  $46,9 \pm 10,32$  %) vorlag. In allen Fermentern dominierte zwischen den Tagen vier und sieben an mindestens einem Tag die Bildung der Propionsäure. Ab dem Beginn der Kontrollphase überwog mit einem Anteil von über 50 % die Bildung von Essigsäure, gefolgt von Propionsäure ( $22,6 \pm 2,42$  bis  $31,0 \pm 1,81$  %) und n-Buttersäure ( $11,5 \pm 1,39$  bis  $17,6 \pm 1,04$  %). Die verzweigtkettige Buttersäure wurde in allen drei Phasen am wenigsten gebildet. Ihre Konzentration nahm von der Äquilibrierungsphase ( $3,7 \pm 0,51$  %) bis zur Versuchsphase ( $1,4 \pm 0,17$  %) ab.

## ERGEBNISSE

Tab. 15: Prozentuale Verteilung (Mol. %; Mw  $\pm$  SD) der Essigsäure (E), Propionsäure (P), i-Buttersäure (i-B) und n-Buttersäure (n-B) in den einzelnen Fermentern (F1-F6) während der drei Phasen des Versuches

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Äquilibrierungsphase; d = 7						
E	45,8 $\pm$ 2,69	37,7 $\pm$ 11,5	43,7 $\pm$ 5,23	46,3 $\pm$ 5,63	44,5 $\pm$ 2,90	43,4 $\pm$ 3,49
P	42,0 $\pm$ 1,81	46,9 $\pm$ 10,3	42,4 $\pm$ 3,36	40,9 $\pm$ 2,48	41,4 $\pm$ 2,15	42,0 $\pm$ 2,31
i-B	3,23 $\pm$ 0,74	3,63 $\pm$ 0,27	3,68 $\pm$ 0,51	3,37 $\pm$ 0,39	3,57 $\pm$ 0,28	3,65 $\pm$ 0,41
n-B	8,93 $\pm$ 2,10	11,8 $\pm$ 2,74	10,3 $\pm$ 3,20	9,42 $\pm$ 3,99	10,6 $\pm$ 2,94	11,1 $\pm$ 2,54
Kontrollphase; d = 3						
E	58,4 $\pm$ 0,76	51,1 $\pm$ 0,84	52,7 $\pm$ 1,33	56,6 $\pm$ 1,86	57,7 $\pm$ 2,04	53,4 $\pm$ 0,74
P	27,8 $\pm$ 1,69	31,0 $\pm$ 1,81	29,8 $\pm$ 2,00	26,0 $\pm$ 1,55	24,2 $\pm$ 2,79	27,0 $\pm$ 3,39
i-B	2,27 $\pm$ 0,38	2,60 $\pm$ 0,14	2,26 $\pm$ 0,26	2,18 $\pm$ 0,35	2,16 $\pm$ 0,25	2,35 $\pm$ 0,24
n-B	11,5 $\pm$ 1,4	15,4 $\pm$ 1,3	15,3 $\pm$ 1,2	15,2 $\pm$ 0,1	16,0 $\pm$ 1,8	17,3 $\pm$ 2,9
Versuchsphase; d = 8						
E	57,6 $\pm$ 1,88	51,9 $\pm$ 1,10	55,4 $\pm$ 1,66	59,3 $\pm$ 3,26	59,6 $\pm$ 2,16	57,4 $\pm$ 2,84
P	26,2 $\pm$ 1,31	29,8 $\pm$ 1,39	27,9 $\pm$ 2,4	24,2 $\pm$ 2,54	22,6 $\pm$ 2,42	23,5 $\pm$ 2,16
i-B	1,87 $\pm$ 0,08	2,28 $\pm$ 0,15	1,87 $\pm$ 0,16	1,44 $\pm$ 0,23	1,42 $\pm$ 0,17	1,55 $\pm$ 0,25
n-B	14,4 $\pm$ 0,74	16,1 $\pm$ 1,15	14,8 $\pm$ 1,33	15,1 $\pm$ 0,91	16,3 $\pm$ 1,62	17,6 $\pm$ 1,04

### 4.1.4.2 Flüchtige Fettsäuren im Überlauf

Die Gesamtmenge der flüchtigen Fettsäuren war in den Überläufen (Ü1-Ü6) geringer als in den Fermentern. Aber auch hier zeigte sich im Laufe des Versuches eine Zunahme. Die Gesamtmenge ( $\mu\text{mol/ml}$ ) lag in der Äquilibrierungsphase zwischen  $1,37 \pm 1,02$  und  $3,13 \pm 1,65$  und stieg in der Versuchsphase auf  $3,16 \pm 0,93$  bis  $6,83 \pm 4,20$  (Tab. 16). Anhand der Standardabweichung (SD) lässt sich erkennen, dass in den einzelnen Überläufen z.T. große tägliche Schwankungen bei der Bildung der flüchtigen Fettsäuren auftraten.

Bei der prozentualen Verteilung der einzelnen Fettsäuren machte in der Äquilibrierungsphase die Propionsäure mit über 50 % den größten Anteil aus, gefolgt von der Essigsäure und der i-Buttersäure. Die n-Buttersäure lag unter 5 %. In der Kontrollphase änderte sich in einigen Überläufen (Ü1, Ü4, Ü5) das Verteilungsbild und es wurde mehr Essigsäure als Propionsäure gebildet. Bei der Buttersäure war außer in Ü6 weiterhin die verzweigt-kettige Form stärker vertreten. Dieses änderte sich in der Versuchsphase, in der in allen Überläufen mehr n-Buttersäure gebildet wurde. Das Verhältnis zwischen Essigsäure und Propionsäure war je nach Überlauf verschieden. In Ü4, Ü5 und Ü6 wurde im Mittel (Mw) mehr Essigsäure

## ERGEBNISSE

gebildet und in Ü1, Ü2 und Ü3 mehr Propionsäure. Die genaue Verteilung der flüchtigen Fettsäuren wird in Tabelle 17 dargestellt.

Tab. 16: Gesamtkonzentration ( $M_w \pm SD$ ) der flüchtigen Fettsäuren ( $\mu\text{mol/ml}$ ) in den einzelnen Überläufen (Ü1-Ü6) in den drei Phasen des Versuches

Ü1	Ü2	Ü3	Ü4	Ü5	Ü6
Äquilibrationsphase; d = 7					
$1,37 \pm 1,02$	$1,91 \pm 0,89$	$1,90 \pm 1,13$	$1,57 \pm 1,02$	$2,05 \pm 1,26$	$3,13 \pm 1,65$
Kontrollphase; d = 3					
$2,87 \pm 0,98$	$2,71 \pm 0,64$	$3,41 \pm 0,66$	$3,44 \pm 0,84$	$3,93 \pm 0,58$	$4,45 \pm 0,70$
Versuchsphase; d = 8					
$4,31 \pm 0,97$	$3,16 \pm 0,93$	$4,58 \pm 0,70$	$4,33 \pm 0,86$	$6,07 \pm 1,06$	$6,83 \pm 4,20$

Tab. 17: Prozentuale Verteilung (Mol. %;  $M_w \pm SD$ ) der Essigsäure (E), Propionsäure (P), i-Buttersäure (i-B) und n-Buttersäure (n-B) in den einzelnen Überläufen (Ü1-Ü6) während der drei Phasen des Versuches

	Ü1	Ü2	Ü3	Ü4	Ü5	Ü6
Äquilibrationsphase; d = 7						
E	$21,2 \pm 10,4$	$22,6 \pm 13,3$	$22,8 \pm 14,1$	$30,7 \pm 7,04$	$37,2 \pm 9,10$	$28,5 \pm 14,9$
P	$51,2 \pm 22,8$	$61,3 \pm 12,0$	$57,1 \pm 13,3$	$52,1 \pm 8,53$	$50,7 \pm 8,12$	$57,5 \pm 10,2$
i-B	$12,1 \pm 6,12$	$14,1 \pm 4,60$	$17,5 \pm 19,0$	$13,6 \pm 6,18$	$9,30 \pm 3,26$	$9,94 \pm 6,50$
n-B	$1,17 \pm 1,35$	$2,02 \pm 1,09$	$2,59 \pm 4,71$	$3,65 \pm 4,07$	$2,84 \pm 3,23$	$4,02 \pm 2,57$
Kontrollphase; d = 3						
E	$46,0 \pm 6,46$	$32,1 \pm 3,20$	$36,4 \pm 6,47$	$45,8 \pm 5,59$	$49,5 \pm 3,38$	$42,8 \pm 2,97$
P	$43,6 \pm 4,11$	$53,6 \pm 4,11$	$52,0 \pm 6,31$	$43,7 \pm 4,52$	$39,8 \pm 3,38$	$42,5 \pm 6,19$
i-B	$9,01 \pm 3,02$	$10,1 \pm 1,69$	$8,12 \pm 1,48$	$7,56 \pm 1,82$	$6,91 \pm 1,27$	$6,27 \pm 1,23$
n-B	$1,38 \pm 0,56$	$4,27 \pm 2,60$	$3,52 \pm 1,56$	$2,88 \pm 0,87$	$3,72 \pm 1,94$	$8,38 \pm 4,43$
Versuchsphase; d = 8						
E	$41,6 \pm 5,70$	$26,0 \pm 7,43$	$33,2 \pm 6,23$	$44,2 \pm 8,22$	$46,9 \pm 4,15$	$44,9 \pm 3,32$
P	$45,5 \pm 4,07$	$56,7 \pm 5,4\beta$	$51,1 \pm 4,84$	$43,1 \pm 5,82$	$37,5 \pm 3,12$	$35,6 \pm 2,49$
i-B	$5,73 \pm 1,28$	$8,30 \pm 1,77$	$5,87 \pm 0,92$	$4,79 \pm 1,10$	$3,96 \pm 0,77$	$3,84 \pm 0,71$
n-B	$7,15 \pm 3,47$	$9,02 \pm 5,15$	$9,86 \pm 4,28$	$7,94 \pm 2,79$	$11,7 \pm 2,63$	$15,7 \pm 1,83$

#### 4.1.5 Laktat

Die Laktatkonzentrationen lagen sowohl im Fermenter als auch im Überlauf unter der Nachweisgrenze.

#### 4.1.6 Analyse von Vitamin K<sub>2</sub>

Nach Abzug der durch den lyophilisierten Kot zugegebenen MK war nahezu ausschließlich eine Bildung von MK-7 in den Überläufen 3 bis 6 (Tab. 18) beobachten. In Überlauf 3 wurde an zwei Tagen eine Bildung von MK-10 mit 3,45 bzw. 20,13 ng/ml analysiert und in Überlauf 4 und 6 an jeweils einem Tag. Die Konzentration betrug 2,62 bzw. 1,70 ng/ml. MK-9 konnte nur an Tag 4 der Versuchsphase mit 0,02 ng/ml in Überlauf 3 gemessen werden. In Überlauf 1 konnte nur an einem Tag (0,11 ng/ml) und in Überlauf 2 nur an vier Tagen (0,01, 0,42, 0,10 bzw. 0,30 ng/ml) MK-7 analysiert werden (Tab. 18).

Am letzten Versuchstag wurden auch Proben aus den sechs Fermentern auf ihren MK-Gehalt analysiert. Außer MK-7 in den Fermentern 3 bis 6 konnte keine messbare Bildung von MK nachgewiesen werden. Die MK-7-Konzentrationen betragen 0,20, 0,20, 0,12 bzw. 0,80 ng/ml in der Fermentern 3, 4, 5 bzw. 6 (Tab. 18).

Die Wiederfindung von Vitamin K<sub>1</sub> als interner Standard lag im Mittel bei  $78,0 \pm 6,5 \%$  mit einer minimalen Wiederfindung von 66,3 % und einer maximalen von 91,7 %.

Tab. 18: Konzentration von MK-7 (ng/ml) in den Überläufen (Ü1-Ü6) an sieben Tagen der Versuchsphase und im Fermenter (7F) am letzten Versuchstag

Tag	Ü1	Ü2	Ü3	Ü4	Ü5	Ü6
1	n.n.*	n.n.	0,33	0,16	0,20	0,23
2	n.n.	n.n.	0,41	0,60	0,94	0,22
3	0,11	0,01	1,06	0,67	1,18	0,66
4	n.n.	n.n.	0,64	0,91	1,61	0,72
5	n.n.	0,42	0,02	0,37	0,77	0,79
6	n.n.	0,10	0,03	0,50	0,70	n.n.
7	n.n.	0,30	1,19	0,45	0,61	1,12
7F	n.n.	n.n.	0,20	0,20	0,12	0,80

\*n.n. = nicht nachweisbar

## 4.2 In-vitro-Untersuchungen mit einem Kurzzeitinkubationssystem

Es wurden drei Versuchsdurchgänge im Doppelansatz durchgeführt. Die nachfolgenden Ergebnisse beziehen sich jeweils auf den Mittelwert der Doppelansätze. Vor Versuchsbeginn wurde jeweils eine Probe des Versuchsansatzes genommen. Diese wurde auf ihre MK-Konzentration analysiert, welche später von den MK-Konzentrationen der anderen Proben abgezogen wurde, um den Nettowert der MK-Bildung zu erhalten.

### 4.2.1 pH-Wert

In allen Versuchsdurchgängen war sowohl bei dem Zusatz von Maisstärke (Ms) als auch bei der Mischung aus Maisstärke und Pepton (Ms/Pep) mit zunehmender Substratmenge eine Abnahme des pH-Wertes zu erkennen. Der Unterschied war zwischen 0,1 und 0,5 g jeweils größer als der zwischen 0,5 und 1,0 g. Bei Peptonzulage gab es geringfügige Abnahmen der Werte. Im Vergleich der drei Substrate mit der Kontrolle waren die pH-Wert bei der Zugabe von Pepton (Pep) am stabilsten, bei reiner Maisstärken zeigte sich die größten pH-Wert Abnahmen (Tab. 19).

Tab. 19: pH-Werte nach der Zugabe verschiedener Konzentrationen (0,1, 0,5 und 1,0 g) von Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)

	Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Substrat (g)	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0
Ms	6,57	5,36	5,29	6,34	5,56	5,23	6,40	4,83	4,63
Pep	6,93	6,90	6,83	6,75	6,65	6,57	6,76	6,75	6,73
Ms/Pep	6,71	5,90	5,40	6,54	5,98	5,72	6,63	5,78	5,40
K		7,17			6,78			6,97	

### 4.2.2 Flüchtige Fettsäuren

Als flüchtige Fettsäuren wurden Essigsäure, Propionsäure, n- und i- Buttersäure und n- und i- Valeriansäure analysiert, allerdings war die Bildung von verzweigtkettiger Buttersäure und von n- und i- Valeriansäure durchgehend so gering, dass diese nicht in die Auswertung einbezogen wurden.

Bei allen drei Substraten war mit Zunahme der Substratmenge und im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Bildung von Fettsäuren zu beobachten. Die höchste Gesamtfettsäurenmenge wurde bei der Zugabe von Pep beobachtet. Bei der Zugabe von Ms

## ERGEBNISSE

war sowohl die Gesamtmenge als auch die Bildung aller drei relevanter Fettsäuren am geringsten (Tab. 20).

Tab. 20: Gesamtkonzentration der flüchtigen Fettsäuren ( $\mu\text{mol/ml}$ ) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe verschiedener Konzentrationen (0,1, 0,5 und 1,0 g) von Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)

Substrat (g)	Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0
Ms	13,3	11,7	27,0	15,0	15,3	17,0	17,2	23,7	24,2
Pep	19,7	58,1	96,5	23,5	50,9	82,2	26,8	60,6	94,5
Ms/Pep	28,5	47,4	71,2	24,1	40,4	53,6	27,6	56,3	76,8
K	9,44			16,6			9,85		

Die prozentuale Verteilung der Fettsäuren wird in Tabelle 21 dargestellt. Bei allen drei Substraten überwog der Anteil an Essigsäure. Dieser nahm mit Zunahme des Substrats ab und lag zwischen 75 und 52 %, bei Ms/Pep reduzierten sich die Werte am stärksten. Bei der Zulage von Ms stieg der Anteil der Propionsäure mit der Menge des Substrats. Bei zwei von drei Versuchen wurde nach Zugabe von Ms mehr Propionsäure als n-Buttersäure gebildet. Ansonsten entstand mehr n-Buttersäure.

Die Bildung von Propionsäure war in zwei Versuchen geringfügig höher beim Zusatz von Ms/Pep, als beim reinen Pep. Bei der Konzentration von n-Buttersäure waren zwischen Pep und Ms/Pep keine Unterschiede zu erkennen.

### 4.2.3 Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ )

Im Vergleich der drei Substrate Ms, Pep und Ms/Pep zeigte sich bei Zugabe von Pep deutlich mehr  $\text{NH}_4^+$  als bei Ms, Ms/Pep und in der Kontrolle. Sowohl bei Pep als auch bei Ms/Pep nahm die  $\text{NH}_4^+$ -Bildung mit steigender Menge des Substrates zu. Die geringste Bildung wurde nach Zulage von Ms beobachtet. Diese war sogar geringer als die Bildung in der Kontrolle und nahm mit höheren Substratkonzentrationen ab. Bei Konzentrationen von 0,5 und 1,0 g Ms war z.T. keine messbare Bildung zu beobachten. Die Einzelwerte der  $\text{NH}_4^+$ -Messung sind in Tabelle 22 dargestellt.

## ERGEBNISSE

Tab. 21: Prozentuale Verteilung der Essigsäure (E), Propionsäure (P) und n-Buttersäure (n-B) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe verschiedener Konzentrationen (0,1, 0,5 und 1,0 g) von Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)

Substrat (g)	Essigsäure (%)			Propionsäure (%)			n-Buttersäure (%)		
	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0
Versuch 1									
Ms	75,2	71,0	71,0	13,2	14,8	15,7	11,6	14,2	13,3
Pep	73,0	67,7	69,0	6,25	10,3	11,2	20,7	22,0	19,8
Ms/Pep	70,0	53,7	52,5	9,41	18,6	19,7	20,6	27,7	27,9
K		84,6			2,01			13,2	
Versuch 2									
Ms	70,9	64,7	62,8	8,93	12,9	14,9	20,1	22,5	22,3
Pep	67,2	66,4	66,6	5,84	10,0	12,1	27,0	23,6	21,3
Ms/Pep	67,7	64,7	65,7	5,73	8,97	10,5	26,6	26,3	23,8
K		82,0			1,57			16,5	
Versuch 3									
Ms	71,2	66,6	65,8	16,4	24,5	25,4	12,4	8,61	8,80
Pep	68,9	67,3	67,4	6,66	10,3	12,2	24,4	22,4	20,5
Ms/Pep	64,7	54,8	54,8	9,97	19,1	20,2	25,3	26,1	24,9
K		87,8			3,46			8,75	

Tab. 22: Konzentration von Ammonium (mmol/l) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe verschiedener Konzentrationen (0,1, 0,5 und 1,0 g) von Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)

Substrat (g)	Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0
Ms	5,01	4,36	4,37	6,95	0,50	0,34	3,65	0,00	0,00
Pep	28,7	76,0	134	27,4	63,1	99,2	26,3	63,8	108
Ms/Pep	27,3	40,7	56,5	20,7	39,2	66,1	24,9	38,6	18,2
K		9,69			17,1			8,36	

### 4.2.4 Laktat

Die Laktatkonzentrationen lagen in allen Proben unter oder im Bereich der Nachweisgrenze.

#### 4.2.5 Analyse von Vitamin K<sub>2</sub>

Die Wiederfindung von Vitamin K<sub>1</sub> als internem Standard lag in den drei Versuchen im Mittel bei  $98,6 \pm 23,4$ ,  $122 \pm 26,8$  bzw.  $89,6 \pm 14,2$  %.

Die Bildung von MK-4 (Abb. 8) war in zwei Versuchen am höchsten nach der Zugabe von Pep und in einem nach der Zugabe von Ms/Pep. Bei der alleinigen Gabe von Ms war die geringste Bildung zu erkennen. Ein konzentrationsbedingter Anstieg oder Abfall war in den drei Versuchen nicht einheitlich zu erkennen. Es war z.T. mit Zunahme der Substratmenge eine erhöhte (Ms/Pep in Versuch 2) oder auch verringerte (Ms/Pep in Versuch 3) MK-4-Bildung zu erkennen. Bei anderen Substraten wurde die höchste (Pep in Versuch 3) bzw. niedrigste Konzentration (Pep in Versuch 1 und 2) von MK-4 nach Zulage der mittleren Menge erreicht.

Die stärkste Bildung von MK-5 (Abb. 9) wurde in Versuch 3 mit Ms/Pep beobachtet. Zusätzlich war hier eine deutliche Abhängigkeit von der Substratmenge zu erkennen, ebenso auch bei Pep im zweiten Versuch. Im Vergleich zu den anderen beiden Durchgängen war hier auch die Bildung von MK-5 am stärksten. Die Zugabe von Ms führte zu keiner starken Produktion und auch nach dem Zusatz von Pep in den Durchgängen 1 und 3 war die Bildung gering. In allen drei Versuchen war nach der Zugabe von Pep eine, wenn auch z.T. nur geringe, Erhöhung der MK-5-Bildung mit erhöhter Substratkonzentration zu sehen.

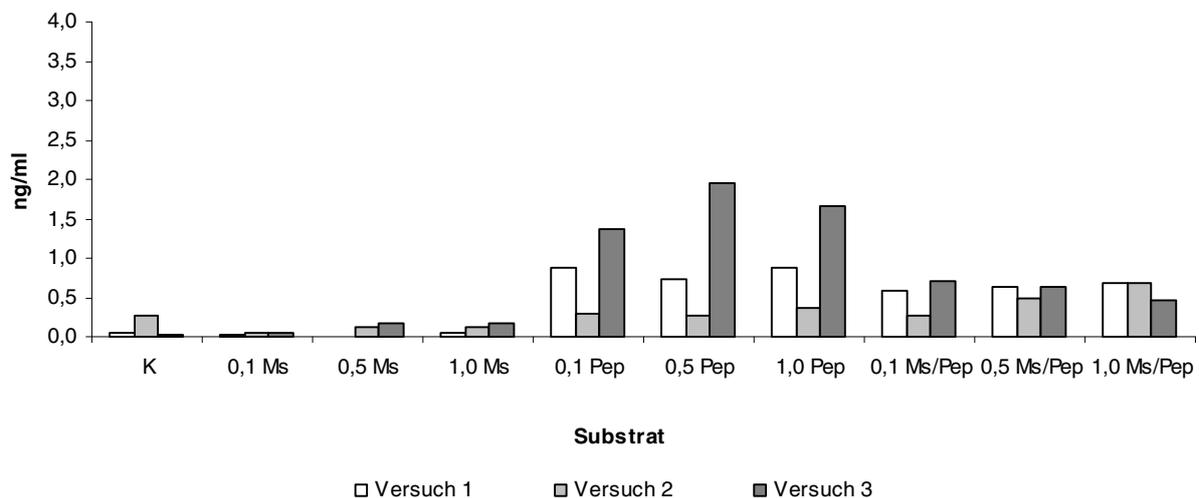


Abb. 8: Konzentration von MK-4 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)

## ERGEBNISSE

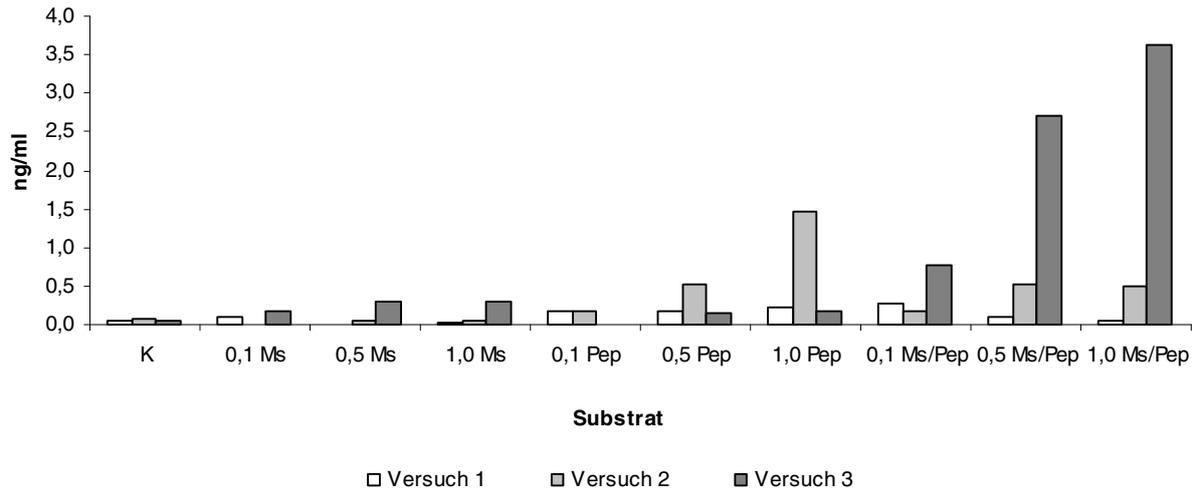


Abb. 9: Konzentration von MK-5 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)

Die höchste Konzentration von MK-6 wurde durchgehend in Versuch 3 beobachtet, wobei nach Zusatz von Ms/Pep die größten Mengen analysiert wurden und zwischen Ms und Pep kein großer Unterschied zu erkennen war. Eine Konzentrationszunahme nach Erhöhung der Substratmenge war in Versuch 2 und 3 nach Zusatz von Ms und in Versuch 3 nach Zusatz von Pep zu erkennen. In Versuch 1 wurde mit Ms die geringste Menge MK-6 analysiert, während Pep und Ms/Pep sich nicht erheblich voneinander unterschieden. Ein Einfluss der Substratmenge war nicht zu erkennen. Im zweiten Versuch wurden nach Zusatz von Ms und Ms/Pep ähnlich hohe Konzentrationen gemessen und mit Pep die geringsten (Abb. 10).

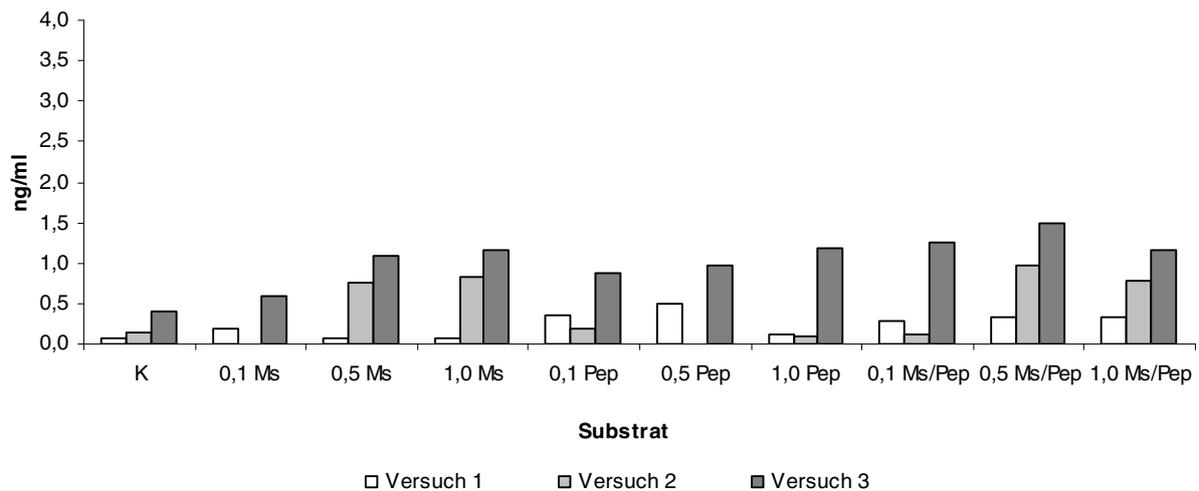


Abb. 10: Konzentration von MK-6 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)

Die Bildung von MK-7 (Abb. 11) war im Vergleich zu den anderen MK am geringsten. In Versuch 1 lagen die Werte unter der Nachweisgrenze und im 2. Versuch waren messbare Werte nur nach Zugabe von 0,5 und 1,0 g Ms zu beobachten. Nur im dritten Durchgang konnte eine Bildung von MK-7 nach Zugabe von Ms und Ms/Pep und in der Kontrolle beobachtet werden. Bei Zusatz von Pep zeigte sich eine Bildung nur nach Zulage der höchsten Konzentration.

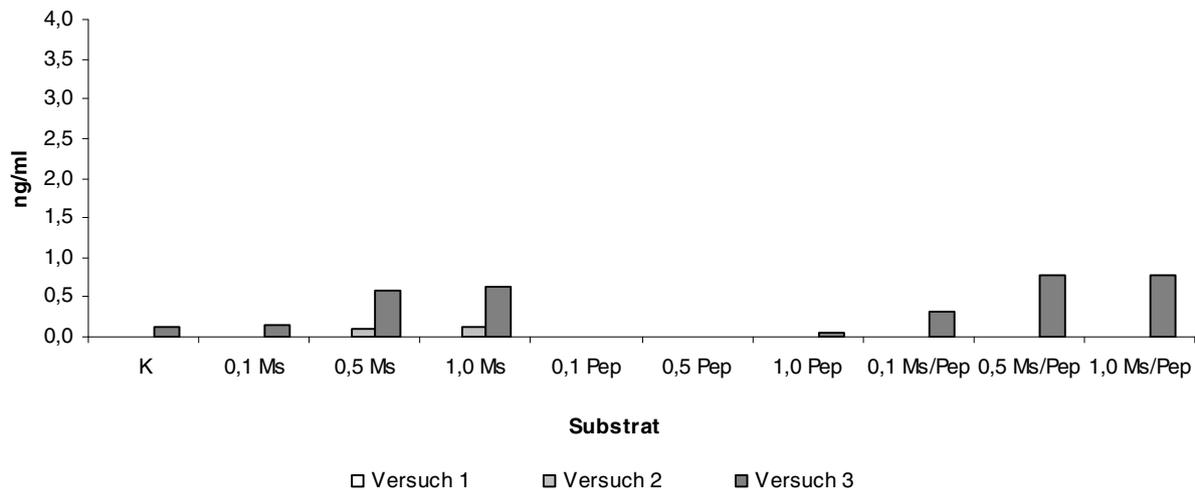


Abb. 11: Konzentration von MK-7 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)

MK-8 war nach Zusatz von Pep in etwas höheren Konzentrationen als bei Inkubation mit den anderen Substraten festzustellen, zudem gelang der Nachweis nicht in allen Ansätzen (Abb. 12).

Die Bildung von MK-9 (Abb. 13) war in allen drei Versuchen nachweisbar, jedoch war der Einfluss des Substrates unterschiedlich. Nach Zusatz von Ms und Ms/Pep wurde mehr MK-9 gebildet als mit Pep. Im ersten und zweiten Versuch wurden die höchsten Werte nach Zugabe von Ms beobachtet und im dritten beim Zusatz von Ms/Pep.

## ERGEBNISSE

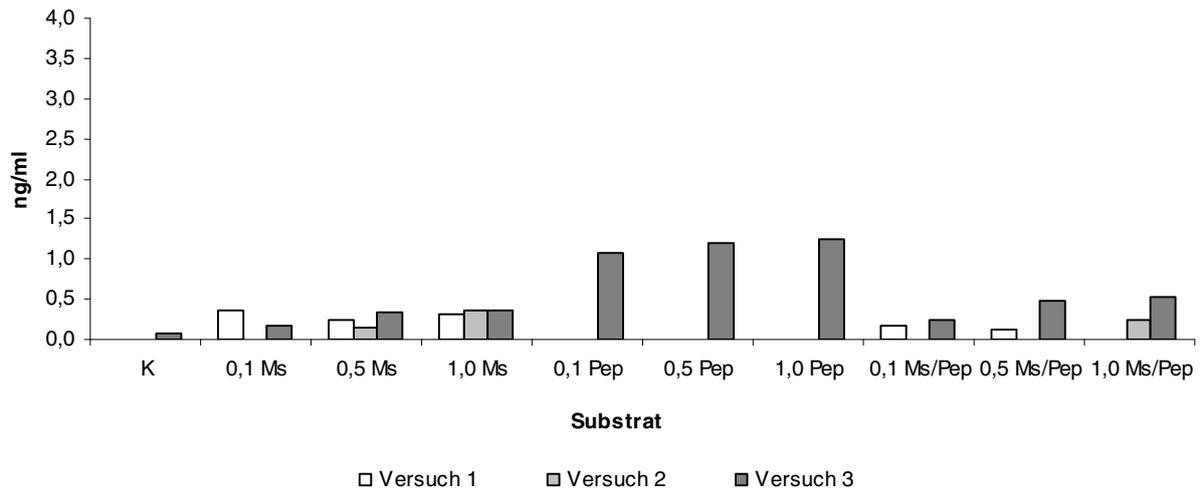


Abb. 12: Konzentration von MK-8 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)

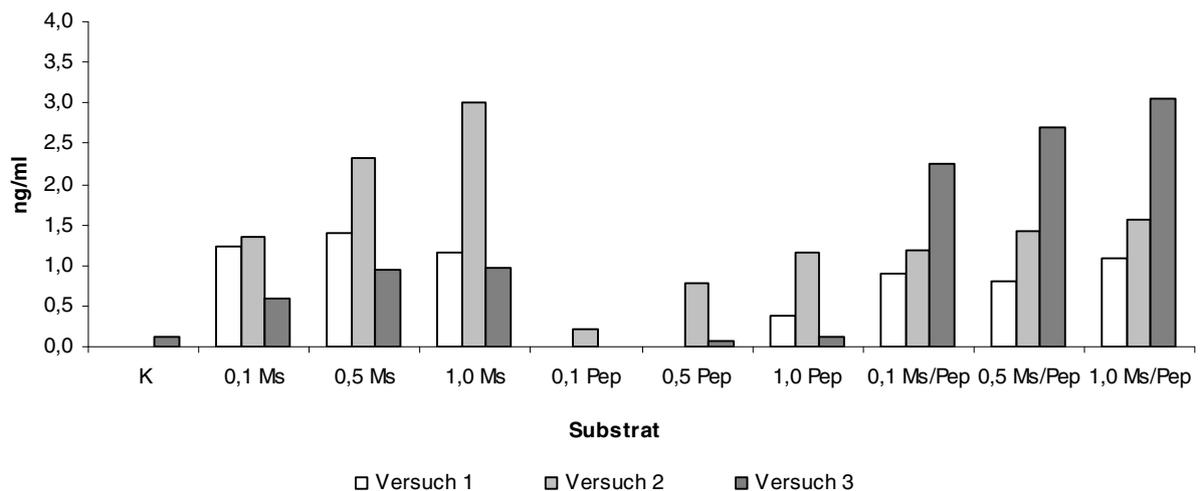


Abb. 13: Konzentration von MK-9 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)

MK-10 (Abb. 14) zeigte mit Abstand in allen drei Durchgängen die höchsten Konzentrationen (bis über 40,0 ng/ml). Außer im zweiten Versuch bei Ms/Pep war eine konzentrationsabhängige Steigerung zu erkennen, welche sich besonders deutlich in Versuch 2 beim Zusatz von Pep zeigte. Ansonsten scheinen Ms und Ms/Pep einen ähnlich großen Einfluss auf die Bildung von MK-10 zu haben. Beim Zusatz von Pep zeigten sich große Unterschiede in den einzelnen Durchgängen. In Durchgang 1 wurde bei 1,0 g die höchste Konzentration von allen MK gemessen, wohingegen im zweiten und dritten Versuch nur eine geringe Bildung festgestellt wurde bzw. lagen die Konzentrationen unter der Nachweisgrenze.

## ERGEBNISSE

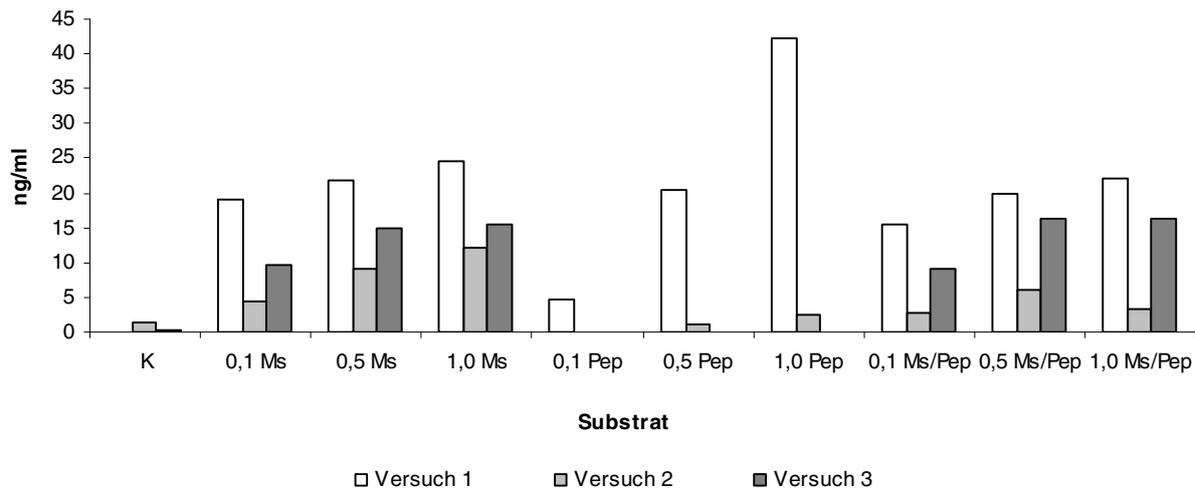


Abb. 14: Konzentration von MK-10 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)

Die Gesamtkonzentration von MK zeigte eine Abhängigkeit von der Menge des Substrats. Geringste Konzentrationen traten nach Zusatz von 0,1 g und 0,5 g Pep, 0,1 g Ms/Pep und 0,1 g Ms auf. Diese lagen bei 3,44, 9,60, 12,3 bzw. 12,7 ng/ml. Höhere Konzentrationen wurden erreicht nach Zulage von 0,5 g (18,2 ng/ml) und 1,0 g (20,7 ng/ml) Ms, 1,0 g (18,0 ng/ml) Pep, 0,5 g (18,9 ng/ml) und 1,0 g (19,0 ng/ml) Ms/Pep (Tab. 15). Im Durchschnitt wurden  $14,8 \pm 5,67$  ng MK/ml gebildet. Im Vergleich zu der Kontrolle, in der im Mittel mit 1,04 ng/ml nur eine geringe Menge an MK gebildet wurde, zeigte sich eine höhere Bildungsrate bei Substratzugabe, besonders bei Pep. Die Gesamtmenge von MK lag nach Zugabe der Substrate bei der jeweils höchsten Dosierungsstufe mit 20,7, 18,0 und 19,0 ng/ml für Ms, Pep und Ms/Pep dicht beieinander (Tab. 15).

Die einzelnen Konzentrationen für MK-4 bis -10 in den drei verschiedenen Versuchen können den Tabellen 30 bis 36 im Anhang entnommen werden.

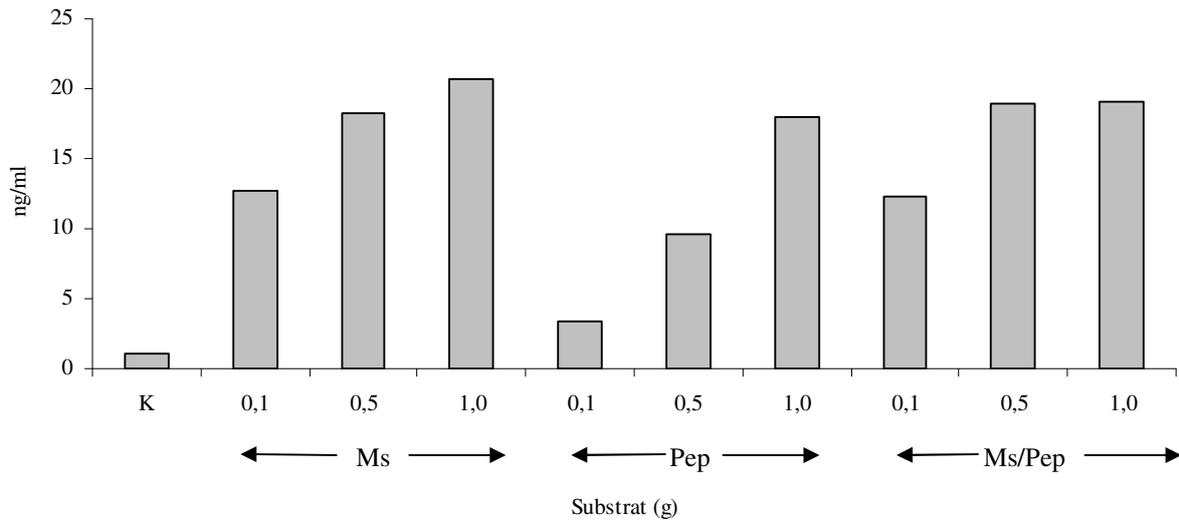


Abb. 15: Gesamtkonzentrationen (Mw; n = 3) der MK-4 bis -10 (ng/ml) nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K)

#### 4.3 Konzentrationen von Vitamin K<sub>2</sub> im Darminhalt von Hunden

Zusätzlich zu den In-vitro-Versuchen wurde die Konzentration von MK-4 bis -10 im Inhalt von fünf verschiedenen Darmabschnitten (Duodenum, Jejunum, Ileum, Zäkum und Kolon) untersucht. Die Digestaprobe konnten nicht bei allen neun Hunden aus jedem der Abschnitte entnommen werden, da z.T. keine bzw. zu geringe Mengen an Inhalt enthalten waren.

Die Wiederfindung von Vitamin K<sub>1</sub> als interner Standard lag im Mittel bei  $77,1 \pm 33,1 \%$ .

Im Duodenuminhalt war in sechs untersuchten Proben nur wenig MK zu messen bei großen Unterschieden zwischen den einzelnen Tieren. Bei Hund 4 konnten alle MK außer MK-8 nachgewiesen werden mit sehr hohen Konzentrationen von MK-9 und -10 (110 bzw. 130 ng/g). Bei den restlichen fünf Proben waren zwischen ein und vier verschiedenen MK zu finden, wobei deren Konzentrationen unter bzw. nur gering über 20,0 ng/g lagen (Abb. 16).

MK-4 konnte bei allen sechs Proben analysiert werden und lag zwischen 0,77 und 6,67 ng/g. MK-6 wurde bei fünf der sechs Proben nachgewiesen (6,48 bis 24,2 ng/g). MK-5 und MK-10 konnten nur bei zwei Hunden bestimmt werden (1,09 und 1,46 bzw. 130 und 12,5 ng/g) und MK-7, -8 und -9 nur bei jeweils einem Hund (10,4, 10,6 und 110 ng/g).

## ERGEBNISSE

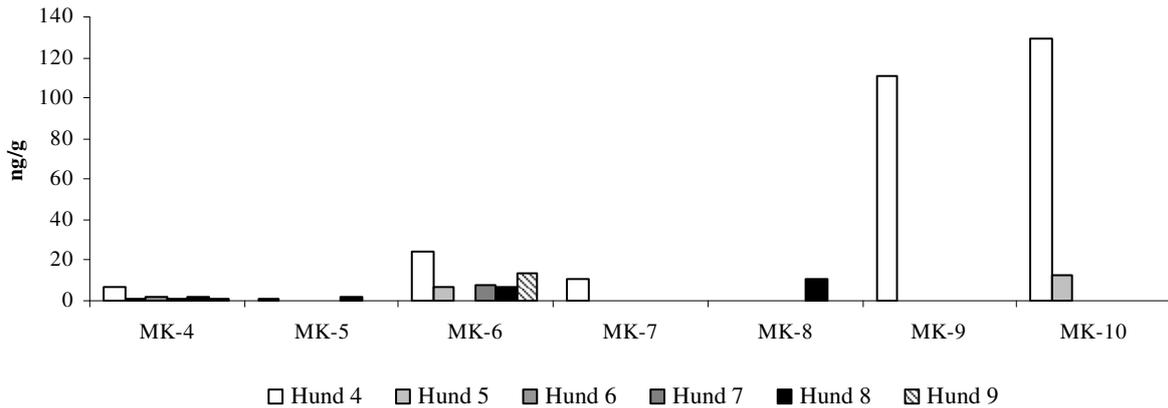


Abb. 16: Konzentration von MK-4 bis -10 (ng/g) im Duodenuminhalt von Hunden (n=6)

Die Konzentrationen der MK im Jejunum waren denen im Duodenum sehr ähnlich. Nur bei zwei Hunden wurden jeweils einmal größere Mengen an MK-8 (124 ng/g) und MK-9 (64,8 ng/g) gefunden. Ansonsten lagen auch hier alle weiteren MK-Konzentrationen unter 20,0 ng/g. Im Jejunuminhalt von Hund 4 konnten alle analysierten MK nachgewiesen werden, bei Hund 3 alle außer MK-5 und bei Hund 8 alle außer MK-5 und -9. Bei Hund 5 und 9 konnten jeweils nur MK-4 und -6 gemessen werden (Abb. 17).

Auch im Jejunum waren MK-4 (0,65 – 4,93 ng/g) und MK-6 (3,4 – 9,7 ng/g) diejenigen Menachinone, die in allen analysierten Proben nachgewiesen werden konnten. MK-7, -8 und -10 konnten in drei Proben gemessen werden (1,14 – 5,28 ng MK-7/g, 0,97 – 124 ng MK-8/g und 0,91 – 10,9 ng MK-10/g), wobei es sich hierbei jeweils um Proben von den gleichen drei Hunden handelte (Hund 3, 4 und 8). Bei zwei Hunden konnte MK-9 im Jejunum nachgewiesen werden (4,07 und 64,3 ng/g) und MK-5 war nur einmal in geringer Konzentration zu messen (0,98 ng/g).

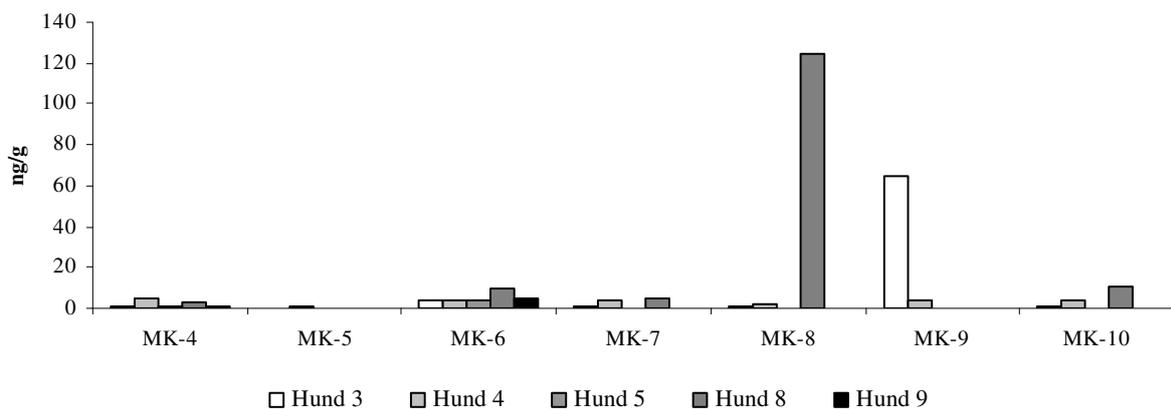


Abb. 17: Konzentration von MK-4 bis -10 (ng/g) im Jejunuminhalt von Hunden (n=5)

Darminhalt aus dem Ileum wurde nur von einem Hund gewonnen. In dieser Probe konnten MK-4 mit 6,08, MK-6 mit 3,99, MK-7 mit 3,81, MK-8 mit 3,97 und MK-9 mit 7,04 ng/g analysiert werden. MK-5 und -10 waren nicht nachweisbar.

Bei drei Hunden wurden Proben aus dem Zäkum entnommen. In jeder Probe konnten alle sieben MK nachgewiesen werden. Zwischen den einzelnen Hunden waren z.T. erhebliche Unterschiede in den Konzentrationen zu erkennen. Bei allen drei Proben war MK-10 mit 161, 225 bzw. 392 ng/g dominierend. Hohe Konzentrationen konnten auch für MK-6 (71,3–327 ng/g), MK-4 (25,2–171 ng/g) und MK-9 (6,36–121 ng/g) beobachtet werden. Die Gehalte von MK-5 (1,11–51,0 ng/g), MK-7 (6,1–31,6 ng/g) und MK-8 (6,78–32,6 ng/g) waren deutlich geringer (Abb. 18).

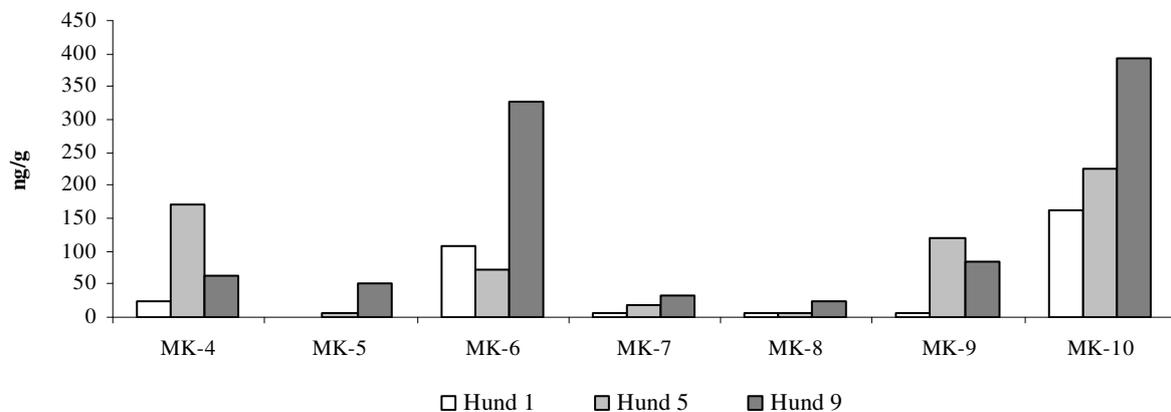


Abb. 18: Konzentration von MK-4 bis -10 (ng/g) im Zäkuminhalt von Hunden (n=3)

Koloninhalt konnte von allen Hunden außer Hund 7 entnommen werden. In vier Proben (Hund 2, 5, 8 und 9) konnten alle MK nachgewiesen werden. In den Proben von Hund 3 und 6 konnte kein MK-8 analysiert werden und bei Hund 4 kein MK-5. Im Koloninhalt von Hund 1 lagen MK-7 und -8 unter der Nachweisgrenze.

Bei der Messung der MK-Gehalte dominierten MK-6 (12,1–1774 ng/g) und MK-10 (2,12–1188 ng/g). Weiterhin waren hohe Gehalte an MK-9 (3,49–290 ng/g) und MK-4 (3,12–110 ng/g) zu ermitteln. MK-7 (5,01–68,3 ng/g), MK-5 (3,59–23,4 ng/g) und MK-8 (4,81–19,1 ng/g) traten in deutlich geringeren Konzentrationen auf (Abb. 19).

## ERGEBNISSE

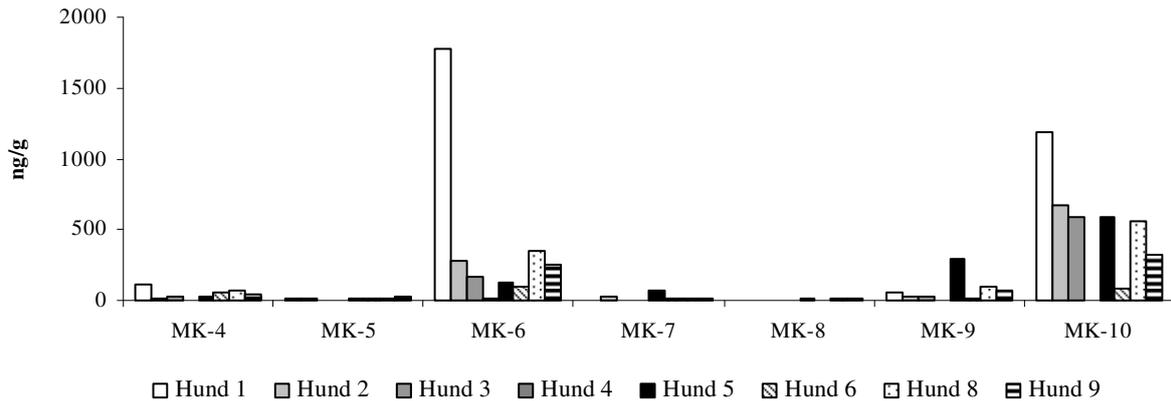


Abb. 19: Konzentration von MK-4 bis 10 (ng/g) im Koloninhalt von Hunden (n=8)

Bei der Betrachtung der Mittelwerte der Gesamtkonzentrationen von MK-4 bis -10 in den einzelnen Darmabschnitten ließ sich feststellen, dass die höchsten Konzentrationen im Kolon und Zäkum gefunden wurden und die MK im Verlauf des Dünndarms eher abnahmen (Tab. 23). Dabei ist allerdings die geringe Probenzahl insbesondere im Ileum einschränkend zu erwähnen.

Tab. 23: Gesamtkonzentrationen (Mw ± SD) von MK-4 bis -10 (ng/g) im Chymus von Duodenum, Jejunum, Ileum, Zäkum und Kolon

	Duodenum (n = 6)	Jejunum (n = 5)	Ileum (n = 1)	Zäkum (n = 3)	Kolon (n = 8)
ng/ml	218 ± 82,8	93,5 ± 5,09	24,9	635 ± 119	1045 ± 372

Die einzelnen Konzentrationen für MK-4 bis -10 in den verschiedenen Darmabschnitten können den Tabellen 37 bis 40 im Anhang entnommen werden.

## 5. Diskussion

Das Ziel der Studie war, die Bildung von Vitamin K<sub>2</sub> im Intestinaltrakt von Hunden zu untersuchen. Hintergrund dieser Arbeit war es zudem herauszufinden, ob durch bestimmte Substratzugaben die MK-Bildung beeinflussbar ist. Limitiert ist die Aussagekraft dadurch, dass nicht geklärt ist, ob das bakterielle Vitamin K ausreichend aus dem Darm resorbiert werden kann. Die Antwort auf diese Frage muss offen bleiben, da im Rahmen dieser Arbeit keine Resorptionsmessungen durchgeführt werden konnten.

Ein wesentliches Element dieser Arbeit war, eine geeignete In-vitro-Methode zu etablieren, um mit dieser die Vitamin K<sub>2</sub>-Bildung zu untersuchen. Zwei unterschiedliche Methoden wurden auf ihre Anwendbarkeit bezüglich dieser Fragestellung geprüft, die sich hinsichtlich der Ergebnisse deutlich unterschieden und von denen schließlich nur eine geeignet erschien, im Sinne der Fragestellung eingesetzt zu werden.

### 5.1 Kritik der Methode

#### 5.1.1 Wahl des Inokulums für die In-vitro-Versuche

In dieser Arbeit sollten In-vitro-Modelle etabliert und geprüft werden. Wenn invasive Eingriffe am Tier vermieden werden sollen, kann nur auf frisch abgesetzte Fäzes als Inokulum zurückgegriffen werden. Für eine semikontinuierliche Langzeitinkubation, ähnlich der Colon-Simulationstechnik (Dreyer, 1990), existieren bisher keine Untersuchungen, inwieweit der Einsatz von Hundefäzes an Stelle von Kolondigesta zu repräsentativen Ergebnissen führt. Allerdings wurde für eine Kurzzeitinkubation schon mehrfach Hundefäzes als Inokulum beschrieben (Sunvold et al., 1995a; Sunvold et al., 1995b; Swanson et al., 2001; Tzortzis et al., 2004). Nachteil dieser Arbeiten ist, dass ausschließlich Fäzes als Inokulum verwendet wurden und keine Vergleichsmöglichkeiten zu Digesta der verschiedenen Kolonabschnitte bestanden. In einer jüngeren Studie wurde dieser Aspekt allerdings detaillierter untersucht. Die Autoren kamen zu der Schlussfolgerung, dass Fäzes als Inokulum für In-vitro-Fermentationen eingesetzt werden kann. Die dabei beobachteten mikrobiellen Fermentationsaktivitäten, maximale Gasproduktion und Bildung von flüchtigen Fettsäuren und Laktat, sind im Vergleich zu den Abläufen bei Verwendung von Inokulum aus den vorderen Abschnitten des Kolons intensiver (Bosch et al., 2008).

Weitere Untersuchungen wurden bei anderen Tierarten durchgeführt, die bei Verwendung von Fäzes als Inokulum qualitativ vergleichbare Befunde wie bei Verwendung von Darminhalt ermittelt haben. Versuche mit dem Ziel einer Simulation von zäkalen Fermentationsprozessen mittels modifiziertem Rusitec bei Pferden konnten zeigen, dass Darminhalt aus der *Ampulla*

*recti* (Dill et al., 2007) oder direkt nach dem Absetzen gewonnene Fäzes (Müller et al., 2008) eine mögliche Alternative darstellen und zu vergleichbaren Ergebnissen führen.

Eine vergleichende Analyse von Bakterienggehalten in Kolon und Rektum (Benno et al., 1992) bzw. Kolon und Fäzes (Amtsberg et al., 1989) ergab keine großen Unterschiede in der Anzahl der für die Vitamin K-Bildung relevanten Mikroorganismen, wie *Bacteroides* spp., *Eubacterium* spp. und Enterobakterien. Die Anzahl der Bakterien war in der Tendenz etwas höher im Rektum bzw. in der Fäzes als im Chymus vom Kolon.

### **5.1.2 Probenmaterial für In-vitro- und Ex-vivo-Versuche**

Alle Hunde, von denen Fäzes als Inokulum für Lang- und Kurzzeitinkubation genommen wurden, bekamen kommerzielles Hundefutter. Der Vitamin K-Gehalt des Futters war nicht deklariert. Sollte Vitamin K zugesetzt worden sein, handelt es sich um Menadion. Auch wenn Vitamin K<sub>1</sub> futtermittelrechtlich eingesetzt werden darf, wird Vitamin K<sub>3</sub> im Heimtierfutter aufgrund der deutlich geringeren Kosten vorgezogen. Beide werden, wie in Kapitel 2.1.6 beschrieben, zu MK-4 umgewandelt (Taggart und Matschiner, 1969; Ronden et al., 1998; Okano et al., 2008). Wo genau dieser Vorgang im Körper stattfindet, ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Umwandlung im Darm oder direkt in dem Gewebe, in welchem das Vitamin gespeichert wird, wird diskutiert (Okano et al., 2008). Sollte dieses im Darm erfolgen, wäre es durchaus möglich, dass ein Teil des in Fäzes und Darminhalt enthaltenen MK-4 diesen Ursprungs ist.

Um eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse auszuschließen, wurde jeweils der MK-Gehalt im Inkubationsansatz analysiert und von den Analysendaten der Proben abgezogen, so dass die Nettobildung der MK ermittelt werden konnte.

Die Digestaprobe wurden von Hunden entnommen, die im Rahmen von anderen Studien euthanasiert wurden. Es handelte sich um gesunde Hunde verschiedenen Alters, welche Alleinfuttermittel erhielten. Bei einem Futter war bekannt, dass 2,3 mg Vitamin K<sub>3</sub> pro kg Futter enthalten waren. Da quantitative Daten zur Umwandlung von Menadion zu MK-4 nicht vorliegen, ist es nicht möglich, eine genauere Einschätzung der MK-4-Bildung aus Menadion vorzunehmen.

### **5.1.3 Methode der semikontinuierlichen Langzeitinkubation**

Das hier eingesetzte System der semikontinuierlichen Langzeitinkubation soll mikrobielle Vorgänge im Dickdarm simulieren. Das Prinzip wurde ursprünglich für die Untersuchung von mikrobiellen Stoffwechselfvorgängen im Pansen (Rusitec) entwickelt (Czerkawski und Breckenridge, 1977), später auch für die Anwendung am Schweinekolon (Cositec) modifiziert (Dreyer, 1990).

Das System soll nach einer Äquilibrierungsphase Fermentationsprozesse semikontinuierlich über einen längeren Zeitraum unter konstanten Bedingungen ermöglichen. Dieses wurde in vorliegender Arbeit anhand der Messung verschiedener Fermentationsparameter überprüft. Täglich wurden im Fermenter pH-Wert, Redoxpotential, flüchtige Fettsäuren und Laktat und im Überlauf flüchtige Fettsäuren und Laktat gemessen.

Die Messung von Laktat erfolgte enzymatisch mit einem Testkit. Die gemessenen Konzentrationen lagen unter bzw. im Bereich der Nachweisgrenze. Sowohl der pH-Wert als auch das Redoxpotential waren während der Kontrollphase in den einzelnen Fermentern konstant, fielen in der Versuchsphase jedoch ab bzw. stiegen an und zeigten in gewissem Umfang Schwankungen. Dabei lagen die pH-Werte in der Versuchsphase mit  $6,35 \pm 0,08$  in einem Bereich, der demjenigen im Kolon von Hunden entspricht (Tab. 24). Das Redoxpotential lag mit mittleren Werten von  $-210 \pm 10,0$  mV in der Versuchsphase im anaeroben Bereich, wodurch grundsätzlich geeignete Lebensbedingungen für anaerobe Bakterien vorgelegen haben.

Tab. 24: pH-Wert, Gesamtmenge (mmol/l) und Verteilung (%) der flüchtigen Fettsäuren im Kolon von Hunden

	Schünemann et al. (1989) <sup>1</sup>	Bergman (1990) <sup>2</sup>
pH-Wert	5,6 – 6,9	
Gesamtmenge der flüchtigen Fettsäuren (mmol/l)	108 – 317	ca. 30 – 240 (meist 70 – 120)
Verteilung der flüchtigen Fettsäuren	56 – 77 % Essigsäure	70 % Essigsäure
	16 – 34 % Propionsäure	20 % Propionsäure
	4 – 18 % Buttersäure	10 % Buttersäure

<sup>1</sup> Ergebnisse nach Fütterung von unterschiedlich zusammengesetzten Rationen

<sup>2</sup> Durchschnittswerte aus der Zusammenfassung mehrerer Studien mit unterschiedlichen Tierarten

Bei der Messung der flüchtigen Fettsäuren ließen sich Unterschiede zwischen Fermenter und Überlauf, sowohl in der Verteilung der Fettsäuren (Tab. 25) als auch in der Gesamtmenge, erkennen. Während die molare Verteilung der Fettsäuren im Fermenter denen in vivo weitestgehend entspricht (Tab. 24), zeigen sie im Überlauf ein deutlich verschobenes Muster, es wurde mehr Propionsäure als Essigsäure gemessen. Die Gesamtmenge der Buttersäure variierte kaum (Tab. 25). Auch die Gesamtmenge der flüchtigen Fettsäuren war während der Versuchsphase in den Überläufen ( $4,88 \pm 1,33$  mmol/l) geringer als in den Fermentern ( $11,8 \pm 1,47$  mmol/l). Ein Vergleich mit der Konzentration von flüchtigen Fettsäuren unter In-vivo-Verhältnissen war in diesem Fall kein Kriterium, entsprechend ähnliche Mengen wurden nicht erwartet. Eine weitere bestehende mikrobiologische Aktivität im Überlauf ist auszuschließen,

da diese entweder durch stetige Kühlung mit Eis oder durch die Zugabe von Natriumazid verhindert wurde.

Tab. 25: Verteilung der flüchtigen Fettsäuren (%) im Fermenter und Überlauf in der Versuchsphase (n = 8) der semikontinuierlichen Langzeitinkubation (Mw ± SD)

	Essigsäure	Propionsäure	n-Buttersäure	i-Buttersäure
Fermenter	56,9 ± 2,86	25,7 ± 2,76	15,7 ± 1,17	1,74 ± 0,33
Überlauf	39,5 ± 8,16	44,9 ± 8,04	10,2 ± 3,10	5,42 ± 1,65

Neben den Fermentationsparametern war der kontinuierliche Pufferdurchfluss ein weiteres Kriterium zur Kontrolle des In-vitro-Systems. Ziel war, jeden Tag das Fermentervolumen (125 ml) auszutauschen. Dieses war während des gesamten Versuches mit 125 ± 7,22 ml weitgehend gewährleistet.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich schließen, dass sich das Modell der semikontinuierlichen Langzeitinkubation mit Fäzes als Inokulum prinzipiell dazu eignet, mikrobielle Fermentationsprozesse im Dickdarm von Hunden über längere Zeiträume nachzustellen. Die Ursache der unterschiedlichen Verhältnisse im Fermenter und Überlauf sollte weiter geklärt werden. Da in dieser Studie keine Bestimmung der Zusammensetzung der Mikrobiota vorgenommen wurde, wäre es eine Überlegung, diese bei nachfolgenden Versuchen durchzuführen, um eine weitere Verbesserung des Systems zu erreichen.

#### 5.1.4 Methode der Kurzzeitinkubation

Im Vorfeld der Versuche wurden die Inkubationszeit und die geeignete Verdünnung des Inokulums untersucht. Eine hundertfache Verdünnung der Fäzes mit Puffer und eine Inkubation von 24 Stunden führte zu reproduzierbaren Ergebnissen. Zusätzlich entsprachen die 24 Stunden annähernd der Verweildauer des Chymus im Dickdarm von Hunden (Meyer und Zentek, 2005). Bei der Kurzzeitinkubation wurde die mikrobielle Fermentation ebenfalls anhand verschiedener Parameter überprüft. Direkt nach Ende der Inkubationszeit wurde der pH-Wert gemessen und Proben für die Bestimmung von flüchtigen Fettsäuren, Laktat und Ammonium entnommen.

Der pH-Wert lag in den Kontrollansätzen nach 24 Stunden Inkubation mit 7,17, 6,78 bzw. 6,97 in den drei Versuchsdurchgängen im physiologischen Bereich bzw. geringfügig darüber. Der Zusatz von den Substraten führte zu einer Senkung der pH-Werte. Diese waren bei Pep am geringsten und stellten sich bei reiner Ms am ausgeprägtesten dar. Dieses entsprach den Beobachtungen früherer In-vivo-Versuche, bei denen die Verfütterung einer getreidereichen Ration an Hunde zu einem stärkeren Abfall des pH-Wertes im Kolon (Banta et al., 1979) bzw. in Fäzes führte (Zentek, 1995a), als bei einer Ration mit höherem Proteinanteil.

Die Gesamtmenge der flüchtigen Fettsäuren war nach Zugabe von Pepton am höchsten und am niedrigsten nach der Zugabe von Kohlenhydraten. Bei früheren Fütterungsversuchen mit Hunden konnten ähnliche Beobachtungen in Ileumchymus gemacht werden (Zentek, 1995b), bzw. war im Kolonchymus eine entsprechende Tendenz zu erkennen (Banta et al., 1979).

Bei dem Vergleich der Verteilung der flüchtigen Fettsäuren anhand der Mittelwerte aller drei Versuche ist zu erkennen, dass das Verteilungsmuster nicht vollständig den In-vivo-Verhältnissen entspricht. Essigsäure war zwar die dominierende Fettsäure, das Verhältnis von Propion- und n-Buttersäure war zugunsten des Butyrats verschoben. Einzige Ausnahme war der Zusatz von 0,5 und 1,0 g Ms, als geringfügig mehr Propionsäure gebildet wurde. Allerdings lag das verschobene Verhältnis auch bei den Kontrollansätzen vor, so dass eventuell auch andere Einflüsse bestehen könnten. Berücksichtigt werden muss bei den flüchtigen Fettsäuren und auch bei  $\text{NH}_4^+$  und Laktat, dass in beiden In-vitro-Systemen eine Bildung simuliert werden kann, nicht jedoch die Absorption. Des Weiteren fand keine Bestimmung der mikrobiellen Flora in den jeweiligen Ansätzen statt und somit entfiel auch die Möglichkeit, eine schlüssige Erklärung für das verschobene Verhältnis der flüchtigen Fettsäuren zu finden.

Die Analyse von  $\text{NH}_4^+$  zeigte eine sehr geringe und z.T. nicht messbare Bildung mit Ms, eine höhere mit Ms/Pep und die höchste nach Zusatz von Pep. Dieses entsprach den Erwartungen, da  $\text{NH}_4^+$  hauptsächlich beim bakteriellen Abbau von stickstoffhaltigen Verbindungen entsteht. Die Messung von  $\text{NH}_4^+$  erfolgte mit einer ammoniumselektiven Elektrode. Um eine Methode für diesen Nachweis zu prüfen, wurde zusätzlich eine photometrische Bestimmung mittels Berthelot-Reaktion durchgeführt. Diese eignete sich jedoch nicht für die Proben aus der Kurzzeitinkubation, da sich eine anfängliche Färbung nach Zusatz der Reagenzien innerhalb von Minuten wieder auflöste und somit eine photometrische Messung nicht möglich war. Die Ursache hierfür konnte nicht herausgefunden werden. Ein Einfluss des in der Lösung enthaltenen Sauerstoffindikators Resazurin wurde im Vorfeld ausgeschlossen, indem die Kalibrierung mit der gleichen Pufferlösung erfolgte und sich hierbei das Problem nicht zeigte. Bei der Bestimmung von Laktat verhielt es sich wie bereits bei der Langzeitinkubation unter 4.1.3 beschrieben. Auch in diesem Versuchansatz lagen die Konzentrationen unter bzw. im Bereich der Nachweisgrenze. Erhöhte Konzentrationen von Laktat sind im Dickdarm dann zu erwarten, wenn der pH-Wert unter 5,5 fällt (Soergel, 1994). Dieses war nur nach Zugabe hoher Konzentrationen von Ms geringfügig der Fall.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei allen drei messbaren Parametern ein Einfluss sowohl vom Substrat selber als auch von der eingesetzten Menge zu erkennen war. Daraus lässt sich schließen, dass Fermentationsvorgänge stattgefunden haben und sich die Kurzzeitinkubation grundsätzlich eignet, solche Vorgänge im Hundekolon zu simulieren.

Anhand der Ergebnisse der Fermentationsversuche lässt sich zusammenfassend sagen, dass sich die in dem vorliegenden Versuch durchgeführte Kurzzeitinkubation dazu eignet, mikrobielle Vorgänge beim Hund nachzustellen. Die Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen früherer Studien, bei denen ebenfalls eine vergleichbare Simulation durchgeführt wurde (Sunvold et al., 1995a; Sunvold et al., 1995b; Swanson et al., 2001). Ein großer Vorteil gegenüber der Langzeitinkubation wäre der geringere Zeit- und Arbeitsaufwand, so dass nach kurzer Zeit schon Ergebnisse vorliegen.

### **5.1.5 Analyse von Vitamin K<sub>2</sub> (HPLC)**

Die MK wurden mit einer HPLC-Methode analysiert, derzeit die geläufigste Methode bei der Vitamin K-Analyse. Die Extraktion erfolgte mit 2-Propanol/n-Hexan. Dieses Lösungsmittelgemisch wurde auch schon in früheren Studien erfolgreich zur Extraktion von Vitamin K aus Darminhalt und tierischen Geweben verwendet (Sakano et al., 1986; Hirauchi et al., 1989; Koivu-Tikkanen et al., 2000a) und als eine einfach durchführbare und gut reproduzierbare Methode bewertet (Koivu-Tikkanen et al., 2000b). Auf einen weiteren Reinigungsschritt nach der Extraktion konnte bei den flüssigen Proben aus Lang- und Kurzzeitinkubation verzichtet werden. Diese Proben waren bereits so stark verdünnt, dass nur geringe Gehalte von kontaminierenden Lipiden nach der Extraktion zu erwarten waren. Die Methode der Extraktion gilt als sehr zuverlässig, wichtig ist aber, die Hexanphase nach der Zentrifugation sauber abzunehmen, damit sie nach der Einengung direkt analysiert werden kann (Suttie, 1984).

Bei den Digestaprobe reichte dieses nicht aus und eine weitere Reinigung war erforderlich. Die Methode der Extraktion wurde ohne Reinigung mit Festphasenextraktion durchgeführt. Die Methode erwies sich in Vorversuchen als schlecht durchführbar. Das Vitamin K wurde bereits im Waschschrift ausgespült und nach der eigentlichen Elution waren nur noch geringe Mengen wieder zu finden. Deshalb wurden die Proben in einer Zentrifugen-Filtereinheit zentrifugiert. Dieser Schritt erwies sich als ausreichend effektiv, es wurden keine störenden Peaks im Chromatogramm festgestellt. Zudem handelte es sich um eine schnelle Methode, welche einfach durchzuführen war. Ein Problem dabei war, dass bei wenigen Proben, die in ihrem ursprünglichen Zustand sehr mukös waren, wie z.B. aus dem Duodenum, keine ausreichende Filtration stattfinden konnte, da die Poren verstopften.

Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenzdetektor. Da Vitamin K keine natürliche Fluoreszenz hat, muss es vorher reduziert werden. Dieses erfolgte durch eine Nachsäulenreduktion mit Zink, welche als eine schnelle und sensitive Methode gilt (Haroon et al., 1986; Haroon et al., 1987). Dadurch ergab sich, dass dem Laufmittel bestimmte Reagenzien zugefügt werden mussten (Koivu-Tikkanen, 2001), bei denen es sich um Zinkchlorid, Natriumazetat und Eisessig handelte (Koivu-Tikkanen et al., 2000b; Woollard et

al., 2002; Ferreira et al., 2006). Als Eluens wurde eine Mischung aus Methanol, Ethanol und n-Hexan mit den oben genannten Zusätzen eingesetzt. Das Laufmittel lief isokratisch über 40 Minuten mit einer Erhöhung der Fließgeschwindigkeit während des Laufs. Zur Etablierung der Methode wurden verschiedenen Vorversuche durchgeführt. Dabei wurde neben der Zusammensetzung des Laufmittels auch das Mischungsverhältnis variiert, ebenso liefen die verschiedenen Lösungsmittel auch in einem Gradientenprogramm. Anlass hierfür war, die Retentionszeit von MK-9 und -10 zu verkürzen. Ein Gradient wurde für eine schnellere und effizientere Trennung der MK in früheren Studien beschrieben (Haroon et al., 1981). In dieser Studie zeigte sich jedoch keine ausreichende Reproduzierbarkeit bzw. keine zufrieden stellende Trennung der einzelnen Peaks. Der Zusatz von 10 % n-Hexan zu der anfänglichen Mischung aus Methanol und Ethanol führte zwar nicht zu einer Verkürzung der Laufzeit, die Peaks von MK-9 und -10 konnten allerdings gut getrennt dargestellt werden. Ein ähnliches Problem lag bei Vitamin K<sub>1</sub> und MK-5 vor. Sie haben dicht nacheinander folgende Retentionszeiten und konnten im Chromatogramm nicht vollständig getrennt dargestellt werden. Eine Abgrenzung der jeweiligen Peakflächen war jedoch möglich, deshalb wurde diese Unzulänglichkeit akzeptiert.

Die Detektion erfolgte bei einer Exzitation von 246 nm und einer Emission von 430 nm. Durch eigene Untersuchungen wurde festgestellt, dass bei den genannten Einstellungen eine gute Darstellung der Peaks erfolgte und sich die Chromatogramme als reproduzierbar darstellten. Des Weiteren handelte es sich um Wellenlängen, die mit minimalen Varianten für die Vitamin K-Analyse geläufig sind (Indyk und Woollard, 2000; Woollard et al., 2002).

Während der Versuche wurde beobachtet, dass sich im Verlaufe eines Analysendurchgangs die Peakflächen des Standards zum Teil bis zu 20 % reduzierten. Aufgrund der Laufzeiten standen die Proben bis zu zwölf Stunden im Autosampler, bevor sie analysiert wurden. Es musste damit gerechnet werden, dass während dieser Zeit auch hier Änderungen in der MK-Konzentration auftreten würden. Um Fehler in der Berechnung der Konzentration möglichst gering zu halten, wurde jeweils nach zwei bis drei Proben erneut ein Standard analysiert. Da die Berechnung der MK-Konzentrationen in den Proben über die Peakfläche des Standards erfolgte, wurde immer der Mittelwert des jeweils vorher und nachher gelaufenen Standards für die Berechnung herangezogen. Die Ursache für den Konzentrationsverlust konnte nicht identifiziert werden. Verschiedene Möglichkeiten wurden jedoch ausgeschlossen: durch Gewichtsüberprüfung der Vials wurde nachgewiesen, dass der Injektor immer die gleiche Probenmenge auf die Säule gab und somit variierende Probenmengen nicht die Ursache sein konnten. Es wurden Unterschiede zwischen Proben mit 4 °C und Raumtemperatur festgestellt. Diese zeigten, dass die Verluste bei Kühlschranktemperatur höher waren. Eine Erwärmung der Säule auf 35 °C zeigte wiederum keine weitere Verbesserung im Vergleich zur Raumtemperatur. Die Proben wurden daher bei Raumtemperatur gemessen, so dass ein Einfluss der Temperatur ausgeschlossen bzw.

konstant gehalten werden konnte. Eine Konzentrationsminderung durch Lichteinfluss ist unwahrscheinlich. Es wurden vor Licht schützende Vials aus Braunglas verwendet und sämtliche vorangegangenen Arbeiten fanden unter gedämpften Lichtverhältnissen statt. Eine wichtige Voraussetzung zur Gewährleistung der Analysenbedingungen war die regelmäßige Neubefüllung der Zinkreduktionssäule. Somit konnten die Konzentrationsabnahmen von zuvor ca. 20 % auf ca. 6-10 % reduziert werden.

Für die Zuordnung der Peaks und für eine Quantifizierung der MK-Konzentration, war der Referenzstandard von großer Bedeutung. Als Kalibrierstandard wurden MK-4 bis -10 eingesetzt. Als interner Standard diente PK. Das Vitamin K<sub>1</sub> eignete sich sehr gut, da sich die Untersuchungen auf die Bildung von bakteriellem Vitamin K bezogen. PK wird nicht von Bakterien gebildet und in der Fäzes enthaltene Mengen wurden durch die Analyse der Ansatzlösung bei der Berechnung berücksichtigt. Somit konnte durch die Messung der PK-Konzentration die Wiederfindung beurteilt werden. Diese lag bei den drei Versuchsansätzen mit Kurzzeitinkubation bei  $98,6 \pm 23,4$ ,  $121,6 \pm 26,8$  bzw.  $89,6 \pm 14,2$  %, bei der Analyse der Proben aus dem Langzeitinkubationssystem bei  $78,1 \pm 6,5$  % und in den Digestproben bei  $77,1 \pm 33,1$  %.

Bei kritischer Einschätzung der Analytik lässt sich sagen, dass die verwendete Methode und der Standard gut geeignet waren, Aussagen über den MK-Gehalt, sowohl in den Proben aus Lang- und Kurzzeitinkubation als auch in den Digestproben, zu treffen. Die Problematik zeitabhängiger Veränderungen in den Peakflächen ließ sich aufgrund des regelmäßig mitlaufenden Standards weitgehend minimieren.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse der Vitamin K<sub>2</sub>-Analyse**

### **5.2.1 Ergebnisse des semikontinuierlichen Langzeitinkubationsversuches**

Die Analyse der MK erfolgte außer am letzten Versuchstag, an welchem auch der Fermenterinhalt analysiert wurde, ausschließlich von Proben aus dem Überlauf. Um MK nachweisen zu können, war ein Probenvolumen von 10 ml erforderlich. Zusätzlich musste noch Material für die Bestimmung von flüchtigen Fettsäuren und Laktat entnommen werden. Bei einem Gesamtvolumen von 125 ml pro Fermenter hätte das bei Untersuchungen aus dem Fermenterinhalt bedeutet, dass täglich ca. 10 % der gesamten Menge aus dem Inkubationsgefäß entnommen werden müssten. Der Fermenter hätte wieder mit Puffer aufgefüllt werden müssen, was zu einer zu großen Verdünnung in den Behältnissen geführt hätte. Somit wurde die tägliche Analyse des Fermenterinhalt auf flüchtige Fettsäuren und Laktat beschränkt.

Die gemessenen MK-Konzentrationen waren sowohl an den Versuchstagen im Überlauf als auch am letzten Tag im Fermenter äußerst gering und nicht alle MK konnten nachgewiesen werden. MK-4, -5, -6 und -8 lagen unter der Nachweisgrenze. Dominiert wurde das Bild von

MK-7, auch wenn dieses nur in sehr geringen Konzentrationen (bis zu 1,61 ng/ml) nachgewiesen werden konnte. Zweimal während der Versuchsphase war MK-10 nachweisbar, wobei einmal die höchste Konzentration von 20,1 ng/ml gemessen werden konnte. MK-9 wurde während der gesamten Versuchsphase nur einmal analysiert. Insgesamt waren diese Ergebnisse nicht gut reproduzierbar.

Daraus ergab sich die Konsequenz, mit dieser Methode nicht weiterzuarbeiten, sondern stattdessen ein System zu etablieren, das über 24 Stunden als Kurzzeitinkubation lief. Gemessen an den Fermentationsparametern eignet sich die semikontinuierliche Langzeitinkubation möglicherweise dazu, mikrobielle Stoffwechselforgänge im Hundekolon nachzustellen. Für In-vitro-Untersuchungen zur Bildung von Vitamin K<sub>2</sub> erschien diese Methode als wenig geeignet.

In-vitro-Untersuchungen zur Vitamin-Bildung mit einer vergleichbaren semikontinuierlichen Methode wurden bisher nur mit der Rumen-Simulationstechnik durchgeführt. Es wurde die mikrobielle Synthese von Vitamin B<sub>1</sub> (Thiamin) im Pansen untersucht und es zeigte sich, dass mit dem verwendeten System eine messbare Bildung von Thiamin möglich war (Alves de Oliveira et al., 1996; Krause, 2002).

### **5.2.2 Ergebnisse der Kurzzeitinkubationsversuche**

Mit der Kurzzeitinkubation konnte eine höhere Bildung von Vitamin K<sub>2</sub> beobachtet werden. Diese war jedoch mit wenigen Ausnahmen, wie z.B. der Bildung von MK-10 nach der Zugabe von Ms, innerhalb der drei Durchgänge wenig reproduzierbar. Zum Teil war eine deutliche Abhängigkeit von der Substratmenge zu beobachten, wobei dieses je nach Zusammensetzung sowohl fördernde als auch hemmende Einflüsse hatte. Es wurden aber auch höchste oder niedrigste Konzentrationen nach Zugabe der mittleren Substratmenge beobachtet. Das Verteilungsmuster der MK variierte in den drei Durchgängen zum Teil sehr stark. Um Anhaltspunkte über die In-vitro-Bildung von MK zu erhalten, können die Mittelwerte der drei Versuche betrachtet werden.

Das verwendete Substrat wurde nicht vorverdaut und spiegelte somit annähernd eine Situation wieder, in der präzäkal unverdaute Proteine oder Kohlenhydrate in den Dickdarm einströmen und dort mikrobiell fermentiert werden. Ms wird, sofern es nicht im Überschuss vorliegt, unter In-vivo-Bedingungen fast vollständig im Dünndarm verdaut (Williams et al., 2001), wohingegen rohe Kartoffelstärke, mit einem hohen Anteil an Amylase-resistenter Stärke, eine geringe präzäkale Verdaulichkeit aufweist und die Dünndarmpassage weitgehend übersteht. Dadurch entstehen erhebliche Rückwirkungen auf die Bildung der flüchtigen Fettsäuren und den pH-Wert im Dickdarm (Mallett et al., 1988).

## DISKUSSION

---

Bei der Betrachtung der Mittelwerte aus den drei Versuchen ließ sich der Einfluss von Ms, Pep und Ms/Pep auf die MK-Bildung genauer definieren. Es wurde deutlich, dass die geringste Bildung von MK-4 und -5 nach dem Zusatz von Ms erfolgte. Die stärkste Bildung von MK-4 wurde nach Addition von Pep beobachtet. Beim MK-5 führte Ms/Pep zu den höchsten Werten. MK-6 wurde relativ konstant nach Zugabe aller drei Substrate gebildet, etwas höhere Konzentrationen waren mit Ms/Pep zu erkennen. Die Bildung von MK-7 und MK-8 war durchgehend sehr gering, doch führten Ms und Ms/Pep zumindest noch zu einer messbaren Konzentration, während bei Zusatz von Pep die Werte z.T. unter oder sehr nahe an der Nachweisgrenze lagen. Die Bildung von MK-9 war mit Pep am geringsten und beim MK-10 zeigte Ms den größten Einfluss. Ms/Pep war wiederum höher als Pep. Nach Zusatz von Ms und Pep war zudem ein Einfluss der Substratmenge zu erkennen.

In der Zusammenfassung dieser Ergebnisse (Tab. 26) fällt auf, dass die längerkettigen MK vermehrt bei der Zugabe von Ms gebildet wurden und die Produktion der kurzkettigen MK-4 und -5 stärker von Pep beeinflusst wurde.

Tab. 26: Einfluss von Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) auf die In-vitro-Bildung von Menachinon-4 bis -10

---

Menachinon	Einfluss des Substrats
MK-4	Pep > Ms/Pep > Ms
MK-5	Ms/Pep > Pep > Ms
MK-6	Ms/Pep > Ms = Pep
MK-7	Ms = Ms/Pep > Pep
MK-8	Ms = Ms/Pep > Pep
MK-9	Ms = Ms/Pep > Pep
MK-10	Ms > Ms/Pep > Pep

---

Das In-vitro-System zeigte, dass die Gesamtkonzentration und auch die Verteilung der MK substratabhängig waren. Dieses erscheint plausibel, da die verschiedenen MK von unterschiedlichen Bakterien gebildet werden (Tab. 1). Diese Bakterien wiederum fermentieren die Nährstoffe in unterschiedlichem Maße, so dass deren Wachstum und damit auch die Bildung der jeweiligen MK gefördert werden.

Ein deutlicheres Bild ergab sich beim Verteilungsmuster der verschiedenen MK. Beim Vergleich der Mittelwerte der einzelnen MK aus den drei Versuchen war festzustellen, dass MK-10 dominierte, gefolgt von MK-9 und MK-4. Nach Zusatz von Ms/Pep konnten zusätzlich höhere Konzentrationen von MK-5 gemessen werden. MK-6 wurde relativ konstant gebildet, jedoch in vergleichsweise kleinen Konzentrationen, ebenso MK-8. MK-7 wurde am wenigsten gebildet.

Die Variabilität zwischen den einzelnen Versuchsdurchgängen ist vermutlich auf die Zusammensetzung der Hundefäzes, welche als Inokulum dienten, zurückzuführen. Die spezifische Syntheseleistung für die MK kann auf das Keimspektrum der individuellen Tiere bzw. Inokula zurückzuführen sein, da die Aktivität der Intestinalflora recht spezifisch ist (siehe Tab. 1 in Kapitel 2.1.3.2). Die hohen Konzentrationen von MK-10, aber auch von MK-9 könnten darauf hinweisen, dass *Bacteroides* spp. unter den gegebenen Bedingungen eine hohe Aktivität hatten (Fernandez und Collins, 1987; Kindberg et al., 1987; Conly und Stein, 1993; Shearer, 1995). Frühere Untersuchungen zeigten, dass *Bacteroides* spp. zu den Hauptvertretern der Mikrobiota des Dickdarms gehören (Davis et al., 1977; Benno et al., 1992) und auch im Rektum bzw. in der Fäzes (Balish et al., 1977; Benno et al., 1992) in vergleichsweise großen Zahlen auftreten. Der Versuchsaufbau und die Versuchsdurchführung der Kurzzeitinkubation waren so konzipiert, dass möglichst anaerobe Verhältnisse vorlagen, um anaeroben Vitamin K-Bildnern entsprechende Bedingungen zu schaffen.

Beim Vergleich dieser Ergebnisse der Kurzzeitinkubation mit der Verteilung der MK aus den Digestaprobe n lassen sich einige Übereinstimmungen erkennen. Obwohl auch im Dünndarm nicht unerhebliche Mengen an MK nachgewiesen wurden, erscheint für eine vergleichende Darstellung nur die Gegenüberstellung der In-vitro- und Ex-vivo-Ergebnisse von Zäkum und Kolon relevant, da diese Abschnitte als Hauptbildungsort des Vitamin K<sub>2</sub> gelten. Sowohl bei der Kurzzeitinkubation als auch im Zäkum- und Koloninhalt war das MK-10 die dominierende Form. MK-9 stand aus quantitativer Sicht bei der Kurzzeitinkubation an zweiter Stelle, während es ex vivo erst hinter MK-6 die dritthöchste Konzentration zeigte.

Um einen Überblick über die MK-Bildung zu erhalten, wurde die in vitro gebildete Gesamtmenge der MK mit den im Kolon gemessenen Ex-vivo-Konzentrationen verglichen. Bei Annahme eines relativen Anteils des Dickdarminhalts von 1 % der Körpermasse (Breves und Diener, 2000) wäre bei einem 10 kg schweren Hund zu unterstellen, dass ca. 100 g Kolondigesta vorliegen. Die vorliegende Analyse der Digestaprobe n hat ergeben, dass im Mittel pro Gramm Koloninhalt ca. 1000 ng Vitamin K<sub>2</sub> (Abb. 20) enthalten sind. Bezogen auf den gesamten Inhalt ergäbe sich somit eine Menge von 100 µg MK. Bei der Kurzzeitinkubation wurden im Durchschnitt ca. 15 ng MK/ml bzw. 750 ng MK/50 ml gebildet. Da in jedem Inkubationsgefäß mit 50 ml Inhalt 0,5 g Fäzes als Inokulum verwendet wurden, ergibt sich damit eine MK-Konzentration von 750 ng/0,5 g. Bei überschlägiger Berechnung auf den Koloninhalt bei einem 10 kg schweren Hund würde eine Menge von 150 µg MK zu erwarten sein. Insofern könnte die In-vitro-Simulation ein recht realistisches Bild der Situation im Tier geben. Bei diesem Vergleich ist zu bedenken, dass unter In-vivo-Bedingungen eine Resorption der MK stattfinden dürfte, die bei der Kurzzeitinkubation nicht möglich war.

Um diese Ergebnisse in einen Vergleich mit den Versorgungsempfehlungen für Hunde zu setzen, können die Empfehlungen des National Research Council (NRC, 2006) als Orientierung dienen. Diese liegen für adulte Tieren bei 22 µg Vitamin K<sub>3</sub>/kg KM bzw. extrapoliert für einen 10 kg schweren Hund bei 220 µg Vitamin K<sub>3</sub> pro Tag. Unter der Annahme, dass aus 100 g Dickdarminhalt ca. 100 µg Vitamin K<sub>2</sub> synthetisiert werden könnten, wäre dadurch ein erheblicher Teil des Bedarfs abzudecken. Dieses setzt voraus, dass der im Dickdarm gebildete Anteil resorbiert wird und dem Körper zur Verfügung steht. Als unbekannter Faktor ist unter In-vivo-Bedingungen die enterohepatische Rezyklierung des Vitamin K zu nennen. Außerdem sollte bedacht werden, dass es sich bei den Versorgungsempfehlungen um Menadion handelt und dieses eventuell eine relativ geringere Wirksamkeit hat als MK. Bei Zusammenfassung dieser Befunde und Annahmen könnte die Eigensynthese von Vitamin K<sub>2</sub> den täglichen Bedarfs eines Hundes durchaus decken.

Um diese Aussage weiter zu untermauern, müsste der Vorgang und die Kapazität der Resorption von MK vollständig geklärt sein, was bisher nicht der Fall ist (Van Winkel et al., 2009). Verschiedene Befunde deuten jedoch auf eine postileal stattfindende Absorption hin. MK wurde in mehreren Studien in der Leber verschiedener Tierarten vorgefunden (Duello und Matschiner, 1971b; Hirauchi et al., 1989). Dabei handelte es sich hauptsächlich um langkettige MK und nicht um MK-4. Somit kann eine Umwandlung von PK oder Menadion ausgeschlossen werden. Bei Wiederkäuern ist anzunehmen, dass MK bereits im Pansen gebildet wird und somit die Möglichkeit besteht, dass dieses schon im Dünndarm resorbiert wird. Wie die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, wird MK sowohl im Dünndarm, wenn auch in geringeren Konzentrationen, als auch im Dickdarm gebildet. Es ist daher anzunehmen, dass im gesamten Gastrointestinaltrakt Synthese und Absorption stattfinden, allerdings ist bislang unklar, in welchem Darmabschnitt das in der Leber vorgefundene MK resorbiert wurde.

Ein weiteres Argument dafür, dass eine Resorption stattfindet, ist die Beobachtung, dass bei Ratten mit Vitamin K-restriktiver Diät keine Mangelerscheinungen auftreten (Ronden et al., 1998). Bei Hunden wurde dieses bisher nicht untersucht. Berichte über alimentäre Mangelzustände sind jedoch nicht bekannt (NRC, 2006).

Die Resorption anderer fettlöslicher Vitamine ist nur teilweise mit der von Vitamin K vergleichbar und Analogieschlüsse sind daher nicht zweifelsfrei möglich. Vitamin A, D und E werden nicht durch körpereigene Synthese hergestellt, sie müssen, ebenso wie Vitamin K<sub>1</sub>, über die Nahrung aufgenommen werden. Anders als beim Vitamin K<sub>2</sub> besteht also kein enger Bezug zu einer Resorption im Kolon. Entsprechende Resorptionsversuche liegen für Hunde nicht vor. Auch für die Resorption von Vitamin K<sub>1</sub> existieren keine Untersuchungen am Dickdarm von Hunden. Eine entsprechende Versuchsanstellung könnte PK und andere fettlöslichen Vitaminen einbeziehen, war aber nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

### 5.2.3 Ergebnisse der Analysen der Digestproben

Ebenso wie bei der Kurzzeitinkubation, zeigte sich ein variables Bild bei der Analyse der MK in den Digestproben. Hier waren ebenfalls deutliche individuelle Unterschiede zu erkennen. Überraschend war die beobachtete Abnahme der MK-Konzentration im Verlauf des Dünndarms, auch wenn das Ergebnis vom Ileum mit nur einer Stichprobe nicht repräsentativ war. Die Ex-vivo-Untersuchungen könnten so interpretiert werden, dass MK im Verlauf des Dünndarms resorbiert wurde und somit zu abnehmenden Konzentrationen führte. Damit würden frühere In-vitro-Versuche mit Dünndärmen von Ratten bestätigt, bei denen eine Absorption von MK im Dünndarm beobachtet wurde (Hollander und Rim, 1976b). Erwartungsgemäß wurden die höchsten Gesamtkonzentrationen mit 1045 ng/g im Kolon und mit 635 ng/g im Zäkum gefunden (Abb. 20). Bei der Verteilung der MK war ein Unterschied zwischen Dünn- und Dickdarm zu erkennen. Im Duodenum wurde das Verteilungsmuster von MK-9 dominiert, gefolgt von MK-10 (Abb. 20). Im Zäkum und Kolon dominierten MK-10, gefolgt von MK-6, -9 und -4. Es wurden jeweils nur geringe Konzentrationen von MK-5, -7 und -8 festgestellt (Abb. 20). Diese Ergebnisse bestätigen Beobachtungen bei Menschen (Conly und Stein, 1992a). Beim Vergleich der Gesamtmenge lassen sich jedoch Unterschiede feststellen, obwohl dieses aufgrund der unterschiedlichen Gewichtangaben nicht uneingeschränkt zu vergleichen sind. Im Koloninhalt von Hunden wurden in der hier vorliegenden Untersuchung im Mittel  $1,04 \pm 0,94 \mu\text{g/g}$  frische Probe gemessen. Das Minimum bzw. Maximum lag bei 0,03 bzw.  $3,14 \mu\text{g/g}$ . Bei Menschen wurden im Kolon Konzentrationen von  $19,9 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$  Trockensubstanz (TS) analysiert (Conly und Stein, 1992a). Werden die Mittelwerte der Hunde auf die TS umgerechnet (TS-Gehalt von 25 % unterstellt) (Meyer und Zentek, 2005), ergeben sich Konzentrationen von  $4,16 \mu\text{g/g}$  TS. Entsprechende Befunde deuten sich auch bei einer vergleichenden Betrachtung der MK-Gehalte von Fäzes an. Bei Menschen wurden deutlich mehr MK analysiert als bei Hunden (Sakano et al., 1986). Somit scheinen speziesbedingte Unterschiede zu bestehen bzw. auch ernährungsabhängige Effekte.

Bei der Bewertung von MK-4 muss bedacht werden, dass dieses von Bakterien eher in geringeren Mengen produziert wird (Kindberg et al., 1987), so dass es sich bei den vorgefundenen Mengen eventuell auch um umgewandeltes PK oder Menadion handeln konnte.

In den Chromatogrammen der Zäkum- und Kolonproben zeigte sich ein zusätzlicher, dem MK-10 folgender Peak. Dieser konnte mit der gleichen Retentionszeit auch bei einigen Proben nach Kurzzeitinkubation beobachtet werden. Möglicherweise handelte es sich dabei um MK-11. Dieses bestätigt Beobachtungen aus früheren Studien (Conly und Stein, 1992a). Auch dort konnte der Peak nicht zugeordnet werden, da ein entsprechender Referenzstandard nicht zur Verfügung stand.

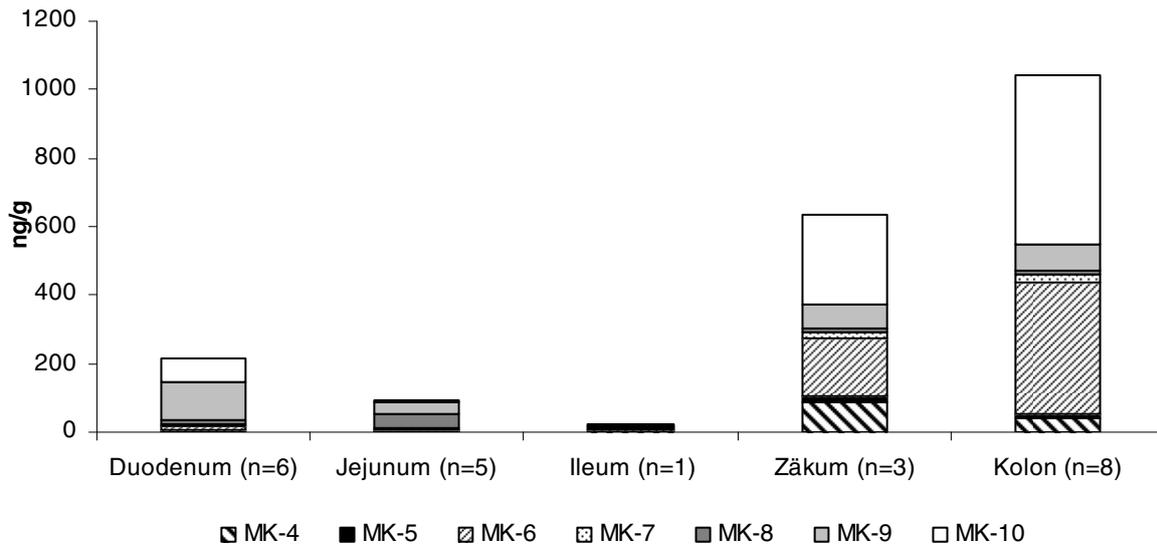


Abb. 20: Konzentrationen (Mw) von MK-4 bis -10 (ng/g) in den verschiedenen Darmabschnitten von Hunden

### 5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Intestinaltrakt von Hunden MK gebildet wird und dass ein Substrateinfluss auf das Muster der mikrobiellen Bildung von Vitamin K<sub>2</sub> besteht. Bisher ist wenig darüber bekannt, ob die verschiedenen MK unterschiedliche Funktionen haben bzw. wie sich ihre biologische Aktivität relativ zueinander verhält. Bei Menschen und Ratten gibt es Hinweise, dass MK-4 (Spronk et al., 2003; Knapen et al., 2007) und MK-7 (Yamaguchi et al., 2001; Tsukamoto, 2004) einen größeren Einfluss auf bestimmte Vitamin K-abhängige Proteine haben als andere MK. Sollte dieses auch für den Hunde zutreffen, ist die mit dieser Arbeit erhaltene Erkenntnis eine wichtige Grundlage weiterer Untersuchungen.

Die Untersuchung der Darminhaltsproben zeigte, dass der hintere Verdauungstrakt quantitativ große Bedeutung für die Bildung von MK hat.

Weiterer Forschungsbedarf besteht in der Definierung des Resorptionswegs der MK. Es wäre zu ermitteln, inwieweit die im Dickdarm gebildeten verschiedenen MK in den Körper aufgenommen werden und biologisch aktiv sind.

Es gibt keine Hinweise, dass ein nicht mit Vitamin K ergänztes Futter zu einem Mangel führen würde. Bei Hunden wurde von Mangelzuständen aufgrund einer alimentären Unterversorgung bisher nicht berichtet. Daher könnte auch beim Hund das in den Futterkomponenten enthaltene Vitamin K sowie die zusätzliche mikrobielle Eigensynthese den Bedarf decken.

## 6. Zusammenfassung

### Untersuchungen zur Bildung von Vitamin K<sub>2</sub> durch die Intestinalflora des Hundes

Vitamin K kommt in zwei unterschiedlichen Formen vor. Vitamin K<sub>1</sub>, Phyllochinon (PK), ist in grünblättrigen Pflanzen und verschiedenen Pflanzenölen vorzufinden. Vitamin K<sub>2</sub>, Menachinon (MK), wird im Intestinaltrakt von Säugetieren und Vögeln von der dort ansässigen Darmflora gebildet. Die Menachinone unterscheiden sich in der Länge ihrer Seitenkette und werden je nach Anzahl der Isopreneinheiten numerisch gekennzeichnet (MK-n). Ziel dieser Arbeit war es, die Bildung von MK durch die Intestinalflora von Hunden und den Einfluss von Substraten (Protein und Stärke) anhand von zwei In-vitro-Methoden zu untersuchen. Ergänzend wurde bei Hunden die MK-Konzentration im Chymus verschiedener Darmabschnitte (Duodenum, Jejunum, Ileum, Zäkum und Kolon) bestimmt (Analyse von Ex-vivo-Proben).

Zunächst wurden zwei In-vitro-Systeme, eine als semikontinuierliche Langzeitinkubation und eine 24stündige Kurzzeitinkubation auf ihre Eignung als methodischer Ansatz für die Fragestellung getestet. Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche wurde die 24stündige Kurzzeitinkubation als geeignete Methode ausgewählt. Es wurden drei Versuchsdurchgänge mit jeweils zehn gasdicht verschlossenen Inkubationsgefäßen durchgeführt. Als Inkubationsansatz diente Fäzes von Hunden, welche mit einem anaeroben vorreduzierten Puffer verdünnt (1:100) wurde. Um den Einfluss von Proteinen und Kohlenhydraten auf die Bildung von MK zu überprüfen, wurde pro Versuchsdurchgang jeweils verschiedene Konzentrationen (0,1, 0,5 und 1,0 g) von Maisstärke (Ms), Fleischpepton (Pep) bzw. Maisstärke/Fleischpepton (Ms/Pep; 50:50) hinzugefügt. Als Kontrolle diente eine Inkubationseinheit ohne Substrat. Alle Gefäße wurden für 24 Stunden, bei 37 °C und bei leichter Rotation unter Lichtschutz inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der pH-Wert gemessen und Proben für die Bestimmung von flüchtigen Fettsäuren, Ammonium und Laktat als Fermentationsparameter sowie für die Vitamin K Analyse per Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) entnommen.

Die Bestimmungen von MK-4 bis -10 ergaben, dass MK-10 das Verteilungsmuster dominierte, gefolgt von MK-9 und MK-4. Am geringsten war die Bildung von MK-7. Ein Einfluss der Substrate war sowohl bei der Gesamtkonzentration als auch bei der Bildung der einzelnen MK zu erkennen. Es zeigte sich, dass die höchsten Konzentrationen von MK-7 bis -10 nach der Zugabe von MS bzw. Ms/Pep gemessen werden konnten und MK-5 und -6 nach dem Zusatz von Ms/Pep. Nach Zugabe von Pep waren die höchsten Konzentrationen von MK-4 zu beobachten.

Die Analyse der Digestaprobe ergab ein ähnliches Verteilungsmuster. Im Zäkum und Kolon dominierte MK-10, gefolgt von MK-6, -9 und -4. In den Dünndarmproben wurde mehr MK-9

als MK-10 gemessen. Die höchsten Gesamtkonzentrationen wurden im Zäkum (635 ng/g) und Kolon (1045 ng/g) analysiert. Im Dünndarm nahmen die Konzentrationen vom Duodenum zum Ileum ab. Die durchschnittliche Gesamtkonzentrationen der Kurzzeitinkubation und im Koloninhalt ergaben vergleichbare Werte, allerdings muss beachtet werden, dass bei den In-vitro-Versuchen keine Resorption der gebildeten MK stattfinden konnte.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine mikrobielle MK-Bildung im Intestinaltrakt von Hunden stattfindet und somit ein Beitrag zur Vitamin K-Versorgung durch diese Synthese geleistet werden dürfte. Fragen zur Resorption und biologischen Wirkung der verschiedenen MK bedürfen weiterer Untersuchungen, um die physiologische Bedeutung genauer schätzen zu können.

## 7. Summary

### **Investigations on the formation of vitamin K<sub>2</sub> by the canine intestinal microbiota**

The term Vitamin K refers to at least two different types of quinones. Vitamin K<sub>1</sub>, phylloquinone (PK), is found in green leafy plants and several vegetable oils. Vitamin K<sub>2</sub>, menaquinone (MK), is produced by the intestinal microbiota of mammals and birds. MK differ in the length of their side chain and the common nomenclature is MK-n, “n” representing the number of isoprenoids. The objective of this study was to investigate the production of MK by the canine intestinal microbiota and the influence of substrate (protein and starch) in two different in-vitro-fermentation systems. Additionally, MK concentrations were determined in the chyme of different parts of the intestinal tract of dogs (duodenum, jejunum, ileum, caecum and colon).

For the in-vitro-study, a semicontinuous long-term- and a 24h short-term incubation system were tested for their suitability. Based on the results of these tests, the 24h short-term incubation system was chosen as method. The trial was performed with three repetitions, each with ten airtight fermentation flasks. Faeces was obtained from dogs and diluted 1:100 in an anaerobic pre-reduced buffer with different amounts (0.1, 0.5 and 1.0 g) of maize starch (Ms), peptone (Pep) and a mixture of both (Ms/Pep; 50:50) including a control. The bottles were incubated with slow rotation for 24 hours at 37°C under subdued light. The pH was measured after incubation and samples were taken for the determination of volatile fatty acids, ammonium and lactate as fermentation parameters, as well as for the detection of MK by high-performance liquid chromatography (HPLC).

The pattern of MK-4 to -10 was dominated by MK-10 followed by MK-9 and MK-4. Lowest concentrations were found for MK-7. An influence of the substrates could be observed regarding the total MK-concentration and the production of the different MK. The concentration of MK-7 to -10 increased after the addition of Ms and Ms/Pep and for MK-5 and -6 after Ms/Pep. Highest concentrations of MK-4 were found after the addition of Pep.

The analysis of the chyme samples revealed similar MK-pattern. MK-10 was predominant in the caecal and colonic chyme followed by MK-6, -9 and -4. In the small intestine contents the formation of Vitamin K<sub>2</sub> was dominated by MK-9. Highest total MK concentrations were measured in caecum and colon with an average of 635 ng/g and 1045 ng/g, respectively. The concentration in the small intestine decreased from duodenum to the ileum.

The MK pattern of the short-term incubation and in the colon digesta was similar.

In conclusion, the results pointed out that a production of MK takes place in the intestinal tract of dogs and might therefore contribute to cover the requirements of vitamin K. Further investigations about the mechanism of absorption and the biological activity are needed to obtain a better understanding about the physiological importance of MK.

## 8. Literaturverzeichnis

Alves de Oliveira, L., Jean-Blain, C., Durix, A., Komisarczuk-Bony, S., Durier, C. (1996):  
Use of a semi-continuous culture system (RUSITEC) to study the effect of pH on microbial  
metabolism of thiamin (Vitamin B1).

Arch Tierernähr 49: 193-202

Amtsberg, G., Stock, V., Treschnak, E., Ringel, U. (1989):  
Untersuchungen zur Zusammensetzung der Darmflora des Hundes unter dem Einfluß  
verschiedener Futterrationen und zur Dekontamination des Darmkanals mit verschiedenen  
antibakteriell wirksamen Substanzen.

Fortschr Tierphysiol Tierernähr 19: 120-130

Balish, E., Cleven, D., Brown, J., Yale, C. E. (1977):  
Nose, throat, and fecal flora of beagle dogs housed in "locked" or "open" environments.

Appl Environ Microbiol 34: 207-221

Banta, C. A., Clemens, E. T., Krinsky, M. M., Sheffy, B. E. (1979):  
Sites of organic acid production and patterns of digesta movement in the gastrointestinal tract  
of dogs.

J Nutr 109: 1592-1600

Bender, A., Breves, G., Stein, J., Leonhard-Marek, S., Schroder, B., Winckler, C. (2001):  
Colonic fermentation as affected by antibiotics and acidic pH: Application of an in vitro  
model.

Z Gastroenterol 39: 911-918

Benno, Y., Nakao, H., Uchida, K., Mitsuoka, T. (1992):  
Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of beagle dogs.

J Vet Med Sci 54: 703-706

Bentley, R. (1975):  
Biosynthesis of vitamin K and other natural naphthoquinones.

Pure Appl Chem 41: 47-68

Bergman, E. N. (1990):  
Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species.

Physiol Rev 70: 567-590

Billeter, M., Bolliger, W., Martius, C. (1964):  
Studies on the Transformation of the K Vitamins Given Orally by Exchange of Side Chains  
and the Role of Intestinal Bacteria Therein.

Biochem Z 340: 290-303

- Billeter, M., Martius, C. (1960):  
Über die Umwandlung von Phyllochinon (Vitamin K<sub>1</sub>) in Vitamin K<sub>2(20)</sub> im Tierkörper.  
Biochem Z 333: 430-439
- Binkley, N. C., Krueger, D. C., Kawahara, T. N., Engelke, J. A., Chappell, R. J., Suttie, J. W. (2002):  
A high phylloquinone intake is required to achieve maximal osteocalcin gamma-carboxylation.  
Am J Clin Nutr 76: 1055-1060
- Bosch, G., Pellikaan, W. F., Rutten, P. G., van der Poel, A. F., Verstegen, M. W., Hendriks, W. H. (2008):  
Comparative in vitro fermentation activity in the canine distal gastrointestinal tract and fermentation kinetics of fiber sources.  
J Anim Sci 86: 2979-2989
- Breves, G., Diener, M. (2000):  
Funktionen des Dickdarmes.  
In: Physiologie der Haustiere. / W. von Engelhardt, G. Breves (Hrsg.).  
Stuttgart: Enke. S. 394-408.
- Bristol, J. A., Ratcliffe, J. V., Roth, D. A., Jacobs, M. A., Furie, B. C., Furie, B. (1996):  
Biosynthesis of prothrombin: intracellular localization of the vitamin K-dependent carboxylase and the sites of gamma-carboxylation.  
Blood 88: 2585-2593
- Buitenhuis, H. C., Soute, B. A., Vermeer, C. (1990):  
Comparison of the vitamins K1, K2 and K3 as cofactors for the hepatic vitamin K-dependent carboxylase.  
Biochim Biophys Acta 1034: 170-175
- Cawthorne, M. A., Jeffries, L. R., Harris, M., Price, S. A., Diplock, A. T., Green, J. (1967):  
Menaquinone-4 and -5 in a bacterium.  
Biochem J 104: 35c-36c
- Comp, P. C., Jacocks, R. M., Ferrell, G. L., Esmon, C. T. (1982):  
Activation of protein C in vivo.  
J Clin Invest 70: 127-134
- Conly, J. M., Stein, K. (1992a):  
Quantitative and qualitative measurements of K vitamins in human intestinal contents.  
Am J Gastroenterol 87: 311-316

- Conly, J. M., Stein, K. (1992b):  
The production of menaquinones (vitamin K<sub>2</sub>) by intestinal bacteria and their role in maintaining coagulation homeostasis.  
Prog Food Nutr Sci 16: 307-343
- Conly, J. M., Stein, K., Worobetz, L., Rutledge-Harding, S. (1994):  
The contribution of vitamin K<sub>2</sub> (menaquinones) produced by the intestinal microflora to human nutritional requirements for vitamin K.  
Am J Gastroenterol 89: 915-923
- Conly, J. M., Stein, K. E. (1993):  
The absorption and bioactivity of bacterially synthesized menaquinones.  
Clin Invest Med 16: 45-57
- Cox, G. B., Gibson, F. (1966):  
The role of shikimic acid in the biosynthesis of vitamin K<sub>2</sub>.  
Biochem J 100: 1-6
- Cranenburg, E. C., Schurgers, L. J., Vermeer, C. (2007):  
Vitamin K: the coagulation vitamin that became omnipotent.  
Thromb Haemost 98: 120-125
- Creedon, K. A., Suttie, J. W. (1986):  
Effect of N-methyl-thiotetrazole on vitamin K epoxide reductase.  
Thromb Res 44: 147-153
- Czerkawski, J. W., Breckenridge, G. (1977):  
Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec).  
Br J Nutr 38: 371-384
- Dam, H. (1929):  
Cholesterinstoffwechsel in Hühnereiern und Hühnchen.  
Biochem Z 215: 475 - 492
- Dam, H. (1935):  
The antihæmorrhagic vitamin of the chick.  
Biochem J 29: 1273-1285
- Davidson, R. T., Foley, A. L., Engelke, J. A., Suttie, J. W. (1998):  
Conversion of dietary phylloquinone to tissue menaquinone-4 in rats is not dependent on gut bacteria.  
J Nutr 128: 220-223

- Davis, C. P., Cleven, D., Balish, E., Yale, C. E. (1977):  
Bacterial association in the gastrointestinal tract of beagle dogs.  
*Appl Environ Microbiol* 34: 194-206
- Di Scipio, R. G., Hermodson, M. A., Yates, S. G., Davie, E. W. (1977):  
A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor),  
and protein S.  
*Biochemistry* 16: 698-706
- Dill, B., Engelmann, W., Markuske, K. D., Zeyner, A. (2007):  
Comparison of equine caecum content and faeces as inocula in a modified 'Rumen Simulation  
Technique'.  
In: *Proc. Soc. Nutr. Physiol.*; 16.
- Dreyer, J. (1990):  
In vitro-Untersuchungen mit der Colon-Simulations-Technik (Cositec) zum mikrobiellen  
Stoffwechsel im Dickdarm von Schweinen.  
Göttingen, Georg-August-Universität. Dissertation. 116 S.
- Dua, P. N., Day, E. J. (1966):  
Vitamin K activity of menadione dimethylpyrimidinol bisulfite in chicks.  
*Poult Sci* 45: 94-96
- Duello, T. J., Matschiner, J. T. (1971a):  
The relationship between the storage forms of vitamin K and dietary phylloquinone in the  
dog.  
*Int J Vitam Nutr Res* 41: 180-188
- Duello, T. J., Matschiner, J. T. (1971b):  
Characterization of vitamin K from pig liver and dog liver.  
*Arch Biochem Biophys* 144: 330-338
- Dunphy, P. J., Phillips, P. G., Brodie, A. F. (1971):  
Separation and identification of menaquinones from microorganisms.  
*J Lipid Res* 12: 442-449
- Edwards, D. F., Russell, R. G. (1987):  
Probable vitamin K--deficient bleeding in two cats with malabsorption syndrome secondary to  
lymphocytic-plasmacytic enteritis.  
*J Vet Intern Med* 1: 97-101

Fasco, M. J., Principe, L. M. (1982):  
R- and S-Warfarin inhibition of vitamin K and vitamin K 2,3-epoxide reductase activities in the rat.  
J Biol Chem 257: 4894-4901

Ferland, G. (1998):  
The vitamin K-dependent proteins: an update.  
Nutr Rev 56: 223-230

Ferland, G., Sadowski, J. A. (1992a):  
Vitamin K1 (Phylloquinone) Content of Green Vegetables: Effects of Plant Maturation and Geographical Growth Location.  
J Agric Food Chem 40: 1874-1877

Ferland, G., Sadowski, J. A. (1992b):  
Vitamin K1 (Phylloquinone) Content of Edible Oils: Effects of Heating and Light Exposure.  
J Agric Food Chem 40: 1869-1873

Fernandez, F., Collins, M. D. (1987):  
Vitamin K composition of anaerobic gut bacteria.  
FEMS Microbiol Lett 41: 175-180

Fernandez, F. R., Davies, A. P., Teachout, D. J., Krake, A., Christopher, M. M., Perman, V. P. (1984):  
Vitamin K-induced Heinz Body Formation in dogs.  
J Am Anim Hosp Assoc 20: 711-720

Ferreira, D. W., Haytowitz, D. B., Tassinari, M. A., Peterson, J. W., Booth, S. L. (2006):  
Vitamin K Contents of Grains, Cereals, Fast-Food Breakfast, and Baked Goods.  
Journal of Food Science 71: S66-70

Friedman, P. A., Smith, M. W. (1977):  
A survey of rat tissues for phylloquinone epoxidase activity.  
Biochem Pharmacol 26: 804-805

Fuller, M. F. (1991):  
In vitro digestion for pigs and poultry.  
Wallingford, UK: CAB International.

- Gao, Z. H., Ackman, R. G. (1995):  
Determination of vitamin K1 in canola oils by high performance liquid chromatography with menaquinone-4 as an internal standard.  
*Food Res Int* 28: 61-69
- Garcia, A. A., Reitsma, P. H. (2008):  
VKORC1 and the vitamin K cycle.  
*Vitam Horm* 78: 23-33
- Geleijnse, J. M., Vermeer, C., Grobbee, D. E., Schurgers, L. J., Knapen, M. H., van der Meer, I. M., Hofman, A., Witteman, J. C. (2004):  
Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study.  
*J Nutr* 134: 3100-3105
- Getachew, G., Blümmel, M., Makkar, H. P. S., Becker, K. (1998):  
In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review.  
*Anim Feed Sci Technol* 72: 261-281
- Groenen-van Dooren, M. M., Ronden, J. E., Soute, B. A., Vermeer, C. (1995):  
Bioavailability of phylloquinone and menaquinones after oral and colorectal administration in vitamin K-deficient rats.  
*Biochem Pharmacol* 50: 797-801
- Guest, J. R. (1977):  
Menaquinone biosynthesis: mutants of *Escherichia coli* K-12 requiring 2-succinylbenzoate.  
*J Bacteriol* 130: 1038-1046
- Gustafsson, B. E., Daft, F. S., Mc, D. E., Smith, J. C., Fitzgerald, R. J. (1962):  
Effects of vitamin K-active compounds and intestinal microorganisms in vitamin K-deficient germfree rats.  
*J Nutr* 78: 461-468
- Hackeng, T. M., van 't Veer, C., Meijers, J. C., Bouma, B. N. (1994):  
Human protein S inhibits prothrombinase complex activity on endothelial cells and platelets via direct interactions with factors Va and Xa.  
*J Biol Chem* 269: 21051-21058
- Haroon, Y., Bacon, D. S., Sadowski, J. A. (1986):  
Liquid-chromatographic determination of vitamin K1 in plasma, with fluorometric detection.  
*Clin Chem* 32: 1925-1929

- Haroon, Y., Bacon, D. S., Sadowski, J. A. (1987):  
Chemical reduction system for the detection of phylloquinone (vitamin K1) and menaquinones (vitamin K2).  
J Chromatogr 384: 383-389
- Haroon, Y., Hauschka, P. V. (1983):  
Application of high-performance liquid chromatography to assay phylloquinone (vitamin K1) in rat liver.  
J Lipid Res 24: 481-484
- Haroon, Y., Shearer, M. J., Barkhan, P. (1981):  
Resolution of menaquinones (Vitamin K2) by high-performance liquid chromatography.  
J Chromatogr 206: 333-342
- Haroon, Y., Shearer, M. J., Rahim, S., Gunn, W. G., McEnery, G., Barkhan, P. (1982):  
The Content of Phylloquinone (Vitamin K1) in Human Milk, Cows' Milk and Infant Formula Foods Determined by High-Performance Liquid Chromatography.  
J Nutr 112: 1105-1117
- Harrington, D. J., Soper, R., Edwards, C., Savidge, G. F., Hodges, S. J., Shearer, M. J. (2005):  
Determination of the urinary aglycone metabolites of vitamin K by HPLC with redox-mode electrochemical detection.  
J Lipid Res 46: 1053-1060
- Hildebrandt, E. F., Suttie, J. W. (1982):  
Mechanism of coumarin action: sensitivity of vitamin K metabolizing enzymes of normal and warfarin-resistant rat liver.  
Biochemistry 21: 2406-2411
- Hirauchi, K., Sakano, T., Nagaoka, T., Morimoto, A. (1988):  
Simultaneous determination of vitamin K1, vitamin K1 2,3-epoxide and menaquinone-4 in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection.  
J Chromatogr 430: 21-29
- Hirauchi, K., Sakano, T., Notsumoto, S., Nagaoka, T., Morimoto, A., Fujimoto, K., Masuda, S., Suzuki, Y. (1989):  
Measurement of K vitamins in animal tissues by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection.  
J Chromatogr 497: 131-137
- Hodges, S. J. (1997):  
Assay of menaquinones in plasma utilizing dual-electrode electrochemical detection.  
Methods Enzymol 282: 434-438

Hollander, D. (1973):

Vitamin K1 absorption by everted intestinal sacs of the rat.

Am J Physiol 225: 360-364

Hollander, D., Muralidhara, K. S., Rim, E. (1976):

Colonic absorption of bacterially synthesized vitamin K2 in the rat.

Am J Physiol 230: 251-255

Hollander, D., Rim, E. (1976a):

Factors affecting the absorption of vitamin K-1 in vitro.

Gut 17: 450-455

Hollander, D., Rim, E. (1976b):

Vitamin K2 absorption by rat everted small intestinal sacs.

Am J Physiol 231: 415-419

Hollander, D., Rim, E. (1978):

Effect of luminal constituents on vitamin K1 absorption into thoracic duct lymph.

Am J Physiol 234: E54-59

Hollander, D., Rim, E., Muralidhara, K. S. (1977a):

Vitamin K1 intestinal absorption in vivo: influence of luminal contents on transport.

Am J Physiol 232: E69-74

Hollander, D., Rim, E., Ruble, P. E., Jr. (1977):

Vitamin K2 colonic and ileal in vivo absorption: bile, fatty acids, and pH effects on transport.

Am J Physiol 233: E124-129

Hollander, D., Rim, E., Ruble, P. E., Jr. (1977b):

Vitamin K2 colonic and ileal in vivo absorption: bile, fatty acids, and pH effects on transport.

Am J Physiol 233: E124-129

Hollander, D., Truscott, T. C. (1974a):

Mechanism and site of vitamin K-3 small intestinal transport.

Am J Physiol 226: 1516-1522

Hollander, D., Truscott, T. C. (1974b):

Colonic absorption of vitamin K-3.

J Lab Clin Med 83: 648-656

Ichihashi, T., Takagishi, Y., Uchida, K., Yamada, H. (1992):  
Colonic absorption of menaquinone-4 and menaquinone-9 in rats.  
*J Nutr* 122: 506-512

Indyk, H. E., Woollard, D. C. (1997):  
Vitamin K in milk and infant formulas: determination and distribution of phylloquinone and menaquinone-4.  
*Analyst* 122: 465-469

Indyk, H. E., Woollard, D. C. (2000):  
Determination of vitamin K in milk and infant formulas by liquid chromatography: collaborative study.  
*J AOAC Int* 83: 121-130

IUPAC-IUB (1966):  
Commission on Biochemical Nomenclature  
Tentative Rules.  
*J Biol Chem* 241: 2987-2994

IUPAC-IUB (1975):  
Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Nomenclature of Quinones with Isoprenoid Side-Chains.  
*Eur J Biochem* 53: 15-18

Iwamoto, J., Takeda, T., Sato, Y. (2006):  
Menatetrenone (vitamin K2) and bone quality in the treatment of postmenopausal osteoporosis.  
*Nutr Rev* 64: 509-517

Iwase, H. (2000):  
Determination of vitamin K1 in emulsified nutritional supplements by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with postcolumn reduction on a platinum catalyst and fluorescence detection.  
*J Chromatogr A* 881: 261-266

Jeffries, L., Cawthorne, M. A., Harris, M., Diplock, A. T., Green, J., Price, S. A. (1967):  
Distribution of menaquinones in aerobic Micrococcaceae.  
*Nature* 215: 257-259

Jenke, M. (2002):  
Die  $\alpha$ -Untereinheiten von Ionenkanälen assemblieren durch eine Tetramerisierung von Coiled-Coils.  
Frankfurt am Main, Johann Wolfgang Goethe Universität. Dissertation. 79 S.

- Kamao, M., Suhara, Y., Tsugawa, N., Okano, T. (2005):  
Determination of plasma Vitamin K by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using Vitamin K analogs as internal standards.  
J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 816: 41-48
- Kimura, S., Satoh, H., Komai, M. (1992):  
The roles of intestinal flora and intestinal function on vitamin K metabolism.  
J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) Spec No: 425-428
- Kindberg, C., Suttie, J. W., Uchida, K., Hirauchi, K., Nakao, H. (1987):  
Menaquinone production and utilization in germ-free rats after inoculation with specific organisms.  
J Nutr 117: 1032-1035
- Kindberg, C. G., Suttie, J. W. (1989):  
Effect of various intakes of phylloquinone on signs of vitamin K deficiency and serum and liver phylloquinone concentrations in the rat.  
J Nutr 119: 175-180
- Kirk, E. M., Fell, A. F. (1989):  
Analysis of supplemented vitamin K1(20) in serum microsamples by solid-phase extraction and narrow-bore HPLC with multichannel ultraviolet detection.  
Clin Chem 35: 1288-1292
- Knapen, M. H., Schurgers, L. J., Vermeer, C. (2007):  
Vitamin K2 supplementation improves hip bone geometry and bone strength indices in postmenopausal women.  
Osteoporos Int 18: 963-972
- Knarreborg, A., Miquel, N., Granli, T., Jensen, B. B. (2002):  
Establishment and application of an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets.  
Anim Feed Sci Technol 99: 131-140
- Koivu, T. J., Piironen, V. I., Henttonen, S. K., Mattila, P. H. (1997):  
Determination of Phylloquinone in Vegetables, Fruits, and Berries by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection.  
J Agric Food Chem 45: 4644-4649
- Koivu-Tikkanen, T. (2001):  
Determination of phylloquinone and menaquinones in foods by HPLC.  
Helsinki, University of Helsinki. Academic Dissertation. 82 S.

Koivu-Tikkanen, T. J., Ollilainen, V., Piironen, V. I. (2000b):  
Determination of phylloquinone and menaquinones in animal products with fluorescence detection after postcolumn reduction with metallic zinc.  
J Agric Food Chem 48: 6325-6331

Koivu-Tikkanen, T. J., Schurgers, L. J., Thijssen, H. H., Vermeer, C. (2000a):  
Intestinal, hepatic, and circulating vitamin K levels at low and high intakes of vitamin K in rats.  
Br J Nutr 83: 185-190

Kolb, E., Weiser, H., Seehawer, J. (1999):  
Verwertung, Stoffwechsel, Bedeutung und Anwendung der K-Vitamine bei Haustieren.  
Tierärztl. Umschau 54: 258-265

Konishi, T., Baba, S., Sone, H. (1973):  
Whole-body autoradiographic study of vitamin K distribution in rat.  
Chem Pharm Bull (Tokyo) 21: 220-224

Krause, P. (2002):  
Untersuchungen zum Thiamingehalt und seinen Derivaten im Pansensaft des Rindes nach Verfü tterung von mit *Ulocladium chartarum* verpilztem Heu unter Thiaminzulage (in vitro).  
Hannover, Tierärztliche Hochschule. Inaugural-Dissertation. 220 S.

Lamon-Fava, S., Sadowski, J. A., Davidson, K. W., O'Brien, M. E., McNamara, J. R., Schaefer, E. J. (1998):  
Plasma lipoproteins as carriers of phylloquinone (vitamin K1) in humans.  
Am J Clin Nutr 67: 1226-1231

Lamson, D. W., Plaza, S. M. (2003):  
The anticancer effects of vitamin K.  
Altern Med Rev 8: 303-318

Langenberg, J. P., Tjaden, U. R. (1984):  
Determination of (endogenous) vitamin K1 in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography using fluorometric detection after post-column electrochemical reduction. Comparison with ultraviolet, single and dual electrochemical detection.  
J Chromatogr 305: 61-72

Lipsky, J. J. (1988):  
Antibiotic-associated hypoprothrombinaemia.  
J Antimicrob Chemother 21: 281-300

- Lisciandro, S. C., Hohenhaus, A., Brooks, M. (1998):  
Coagulation abnormalities in 22 cats with naturally occurring liver disease.  
*J Vet Intern Med* 12: 71-75
- Losito, R., Millar, G. J., Jaques, L. B. (1965):  
Isolation and partial identification of [<sup>14</sup>C] vitamin K3 metabolites from the bile of the dog.  
*Biochim Biophys Acta* 107: 123-125
- Losito, R., Owen, C. A., Jr., Flock, E. V. (1967):  
Metabolism of [<sup>14</sup>C]menadione.  
*Biochemistry* 6: 62-68
- Macfarlane, G. T., Gibson, G. R., Beatty, E., Cummings, J. H. (1992):  
Estimation of short-chain fatty acid production from protein by human intestinal bacteria based on branched chain fatty acid measurements.  
*FEMS Microbiol Ecol* 101: 81-88
- Mallett, A. K., Bearne, C. A., Young, P. J., Rowland, I. R., Berry, C. (1988):  
Influence of starches of low digestibility on the rat caecal microflora.  
*Br J Nutr* 60: 597-604
- Manfioletti, G., Brancolini, C., Avanzi, G., Schneider, C. (1993):  
The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade.  
*Mol Cell Biol* 13: 4976-4985
- Marchetti, M., Tassinari, M., Marchetti, S. (2000):  
Menadione nicotinamide bisulphite as a source of vitamin K and niacin activities for the growing pig.  
*Animal Science* 71: 111-117
- Mathers, J. C., Fernandez, F., Hill, M. J., McCarthy, P. T., Shearer, M. J., Oxley, A. (1990):  
Dietary modification of potential vitamin K supply from enteric bacterial menaquinones in rats.  
*Br J Nutr* 63: 639-652
- Matschiner, J. T., Amelotti, J. M. (1968):  
Characterization of vitamin K from bovine liver.  
*J Lipid Res* 9: 176-179

Matschiner, J. T., Taggart, W. V. (1968):

Bioassay of vitamin K by intracardial injection in deficient adult male rats.

J Nutr 94: 57-59

Matschiner, J. T., Taggart, W. V., Amelotti, J. M. (1967):

The vitamin K content of beef liver. Detection of a new form of vitamin K.

Biochemistry 6: 1243-1248

Maxie, G., van Dreumel, T., McMaster, D., Baird, J. (1992):

Ontario. Menadione (vitamin K(3)) toxicity in six horses.

Can Vet J 33: 756-757

McDonald, G. K. (1980):

Moldy sweetclover poisoning in a horse.

Can Vet J 21: 250-251

Meister, E. (2004):

Organic farming and the impact of fiber-related digestive processes in pigs.

Göttingen, Georg-August-Universität. Inaugural-Dissertation zum Doktor der Veterinärmedizin. 136 S.

Meyer, H., Zentek, J. (2005):

Ernährung des Hundes. - 5. Auflage.

Stuttgart: Parey Verlag.

Morishita, T., Tamura, N., Makino, T., Kudo, S. (1999):

Production of menaquinones by lactic acid bacteria.

J Dairy Sci 82: 1897-1903

Müller, A.-M., Gall, D., Bremer, S., Zeyner, A. (2008):

Suitability of differently harvested and prepared equine faeces as inoculum in the semi-continuous fermentation technique Caesitec.

In: Proceedings of the 12th ESVCN Congress.

Nakano, T., Higashino, K., Kikuchi, N., Kishino, J., Nomura, K., Fujita, H., Ohara, O., Arita, H. (1995):

Vascular smooth muscle cell-derived, Gla-containing growth-potentiating factor for Ca(2+)-mobilizing growth factors.

J Biol Chem 270: 5702-5705

Nakano, T., Kawamoto, K., Higashino, K., Arita, H. (1996):  
Prevention of growth arrest-induced cell death of vascular smooth muscle cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6.  
FEBS Lett 387: 78-80

Neer, T. M., Hedlund, C. S. (1989):  
Vitamin K-dependent coagulopathy in a dog with bile and cystic duct obstructions.  
J Am Anim Hosp Assoc 25: 461-464

Nestor, K. E., Jr., Conrad, H. R. (1990):  
Metabolism of vitamin K and influence on prothrombin time in milk-fed preruminant calves.  
J Dairy Sci 73: 3291-3296

NRC (1987):  
Vitamin K.  
In: Vitamin Tolerance of Animals. / N. R. Council (Hrsg.).  
Washington, D.C.: National Academy Press. S. 31-35.

NRC (2006):  
Vitamins.  
In: Nutrient Requirements of Dogs and Cats. / N. R. Council (Hrsg.).  
Washington, D.C.: The National Academies Press. S. 193-245.

Oduho, G. W., Chung, T. K., Baker, D. H. (1993):  
Menadione nicotinamide bisulfite is a bioactive source of vitamin K and niacin activity for chicks.  
J Nutr 123: 737-743

Okano, T., Shimomura, Y., Yamane, M., Suhara, Y., Kamao, M., Sugiura, M., Nakagawa, K. (2008):  
Conversion of phylloquinone (Vitamin K1) into menaquinone-4 (Vitamin K2) in mice: two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice.  
J Biol Chem 283: 11270-11279

Perlick, E. (1953):  
The effect of phenylindanedione on the coagulation factors prothrombin, factor V and factor VII and the question of vitamin K resistance.  
Klin Wochenschr 31: 261-263

Price, P. A., Faus, S. A., Williamson, M. K. (2000):  
Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol 20: 317-327

Price, P. A., Faus, S. A., Williamson, M. K. (2001):  
Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 817-824

Quick, A. J., Collentine, G. E., Jr., Hussey, C. V. (1962):  
Vitamin K requirements of the growing pup.  
*J Nutr* 77: 28-32

Quick, A. J., Hussey, C. V., Collentine, G. E., Jr. (1954):  
Vitamin K requirements of adult dogs and the influence of bile on its absorption from the intestine.  
*Am J Physiol* 176: 239-242

Ramotar, K., Conly, J. M., Chubb, H., Louie, T. J. (1984):  
Production of menaquinones by intestinal anaerobes.  
*J Infect Dis* 150: 213-218

Ronden, J. E., Drittij-Reijnders, M. J., Vermeer, C., Thijssen, H. H. (1998):  
Intestinal flora is not an intermediate in the phylloquinone-menaquinone-4 conversion in the rat.  
*Biochim Biophys Acta* 1379: 69-75

Sakano, T., Nagaoka, T., Morimoto, A., Hirauchi, K. (1986):  
Measurement of K vitamins in human and animal feces by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection.  
*Chem Pharm Bull (Tokyo)* 34: 4322-4326

Schiff, E. R., Small, N. C., Dietschy, J. M. (1972):  
Characterization of the kinetics of the passive and active transport mechanisms for bile acid absorption in the small intestine and colon of the rat.  
*J Clin Invest* 51: 1351-1362

Schofield, F. W. (1984):  
A Brief Account of a Disease in Cattle Simulating Hemorrhagic Septicaemia due to Feeding Sweet Clover.  
*Can Vet J* 25: 453-455

Schonheyder, F. (1936):  
The quantitative determination of vitamin K. I.  
*Biochem J* 30: 890-896

Schünemann, C., Mühlum, A., Junker, S., Wilfarth, H., Meyer, H. (1989):  
Praecaecale und postileale Verdaulichkeit verschiedener Stärken sowie pH-Werte und Gehalte  
an organischen Säuren in Darmchymus und Fäces.  
Fortschr Tierphysiol Tierernährg Beiheft 19: 44-58

Schurgers, L. J., Teunissen, K. J., Hamulyak, K., Knapen, M. H., Vik, H., Vermeer, C.  
(2007):  
Vitamin K-containing dietary supplements: comparison of synthetic vitamin K1 and natto-  
derived menaquinone-7.  
Blood 109: 3279-3283

Schurgers, L. J., Vermeer, C. (2000):  
Determination of phylloquinone and menaquinones in food. Effect of food matrix on  
circulating vitamin K concentrations.  
Haemostasis 30: 298-307

Seegers, W. H., Novoa, E., Henry, R. L., Hassouna, H. I. (1976):  
Relationship of "new" vitamin K-dependent Protein C and "old" autoprothrombin II-a.  
Thromb Res 8: 543-552

Seifert, R. M. (1979):  
Analysis of vitamin K1 in some green leafy vegetables by gas chromatography.  
J Agric Food Chem 27: 1301-1304

Shearer, M. J. (1992):  
Vitamin K metabolism and nutrition.  
Blood Rev 6: 92-104

Shearer, M. J. (1995):  
Vitamin K.  
Lancet 345: 229-234

Shearer, M. J., Barkhan, P. (1973):  
Studies on the metabolites of phylloquinone (vitamin K1) in the urine of man.  
Biochim Biophys Acta 297: 300-312

Soergel, K. H. (1994):  
Colonic fermentation: metabolic and clinical implications.  
Clin Investig 72: 742-748

Spronk, H. M., Soute, B. A., Schurgers, L. J., Thijssen, H. H., De Mey, J. G., Vermeer, C. (2003):

Tissue-specific utilization of menaquinone-4 results in the prevention of arterial calcification in warfarin-treated rats.

J Vasc Res 40: 531-537

Stafford, D. W. (2005):

The vitamin K cycle.

J Thromb Haemost 3: 1873-1878

Stahmann, M. A., Huebner, C. F., Link, K. P. (1941):

Studies on the Hemorrhagic sweet clover disease;

V. Identification and synthesis of the hemorrhagic agent.

J Biol Chem 138: 513-527

Stenflo, J. (1976):

A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization.

J Biol Chem 251: 355-363

Stenflo, J., Fernlund, P., Egan, W., Roepstorff, P. (1974):

Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin.

Proc Natl Acad Sci U S A 71: 2730-2733

Strieker, M. J., Morris, J. G., Feldman, B. F., Rogers, Q. R. (1996):

Vitamin K deficiency in cats fed commercial fish-based diets.

J Small Anim Pract 37: 322-326

Suhara, Y., Kamao, M., Tsugawa, N., Okano, T. (2005):

Method for the determination of vitamin K homologues in human plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Anal Chem 77: 757-763

Sunvold, G. D., Fahey, G. C., Jr., Merchen, N. R., Reinhart, G. A. (1995b):

In vitro fermentation of selected fibrous substrates by dog and cat fecal inoculum: influence of diet composition on substrate organic matter disappearance and short-chain fatty acid production.

J Anim Sci 73: 1110-1122

Sunvold, G. D., Fahey, G. C., Jr., Merchen, N. R., Titgemeyer, E. C., Bourquin, L. D., Bauer, L. L., Reinhart, G. A. (1995a):

Dietary fiber for dogs: IV. In vitro fermentation of selected fiber sources by dog fecal inoculum and in vivo digestion and metabolism of fiber-supplemented diets.

J Anim Sci 73: 1099-1109

Suttie, J. W. (1973):

Mechanism of action of vitamin K: demonstration of a liver precursor of prothrombin.

Science 179: 192-194

Suttie, J. W. (1984):

Vitamin K.

In: Handbook of Vitamins: nutritional, biochemical and clinical aspects. / L. J. Machlin (Hrsg.).

New York: Marcel Dekker. S. 147-198.

Suttie, J. W. (1987):

Recent advances in hepatic vitamin K metabolism and function.

Hepatology 7: 367-376

Suttie, J. W. (1995):

The importance of menaquinones in human nutrition.

Annu Rev Nutr 15: 399-417

Swanson, K. S., Grieshop, C. M., Clapper, G. M., Shields, R. G., Jr., Belay, T., Merchen, N. R., Fahey, G. C., Jr. (2001):

Fruit and vegetable fiber fermentation by gut microflora from canines.

J Anim Sci 79: 919-926

Taggart, W. V., Matschiner, J. T. (1969):

Metabolism of menadione-6,7-3H in the rat.

Biochemistry 8: 1141-1146

Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., France, J. (1994):

A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds.

Anim Feed Sci Technol 48: 185-197

Thierry, M. J., Hermodson, M. A., Suttie, J. W. (1970):

Vitamin K and warfarin distribution and metabolism in the warfarin-resistant rat.

Am J Physiol 219: 854-859

- Thijssen, H. H., Baars, L. G. (1991):  
Tissue distribution of selective warfarin binding sites in the rat.  
*Biochem Pharmacol* 42: 2181-2186
- Thijssen, H. H., Drittij-Reijnders, M. J. (1994):  
Vitamin K distribution in rat tissues: dietary phylloquinone is a source of tissue menaquinone-4.  
*Br J Nutr* 72: 415-425
- Thijssen, H. H., Drittij-Reijnders, M. J. (1996):  
Vitamin K status in human tissues: tissue-specific accumulation of phylloquinone and menaquinone-4.  
*Br J Nutr* 75: 121-127
- Thijssen, H. H., Drittij-Reijnders, M. J., Fischer, M. A. (1996):  
Phylloquinone and menaquinone-4 distribution in rats: synthesis rather than uptake determines menaquinone-4 organ concentrations.  
*J Nutr* 126: 537-543
- Thijssen, H. H., Vervoort, L. M., Schurgers, L. J., Shearer, M. J. (2006):  
Menadione is a metabolite of oral vitamin K.  
*Br J Nutr* 95: 260-266
- Tie, J. K., Stafford, D. W. (2008):  
Structure and function of vitamin K epoxide reductase.  
*Vitam Horm* 78: 103-130
- Tsukahara, T., Koyama, H., Okada, M., Ushida, K. (2002):  
Stimulation of butyrate production by gluconic acid in batch culture of pig cecal digesta and identification of butyrate-producing bacteria.  
*J Nutr* 132: 2229-2234
- Tsukamoto, Y. (2004):  
Studies on action of menaquinone-7 in regulation of bone metabolism and its preventive role of osteoporosis.  
*Biofactors* 22: 5-19
- Tzortzis, G., Goulas, A. K., Baillon, M. L., Gibson, G. R., Rastall, R. A. (2004):  
In vitro evaluation of the fermentation properties of galactooligosaccharides synthesised by alpha-galactosidase from *Lactobacillus reuteri*.  
*Appl Microbiol Biotechnol* 64: 106-111

Van Winckel, M., De Bruyne, R., Van De Velde, S., Van Biervliet, S. (2009):  
Vitamin K, an update for the paediatrician.  
*Eur J Pediatr* 168: 127-134

Vermeer, C. (1990):  
Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase.  
*Biochem J* 266: 625-636

Vermeer, C., Hamulyak, K. (2004):  
Vitamin K: lessons from the past.  
*J Thromb Haemost* 2: 2115-2117

Vermeer, C., Hendrix, H., Daemen, M. (1982):  
Vitamin K-dependent carboxylases from non-hepatic tissues.  
*FEBS Lett* 148: 317-320

Wakabayashi, H., Onodera, K., Yamato, S., Shimada, K. (2003):  
Simultaneous determination of vitamin K analogs in human serum by sensitive and selective high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.  
*Nutrition* 19: 661-665

Will, B. H., Suttie, J. W. (1992):  
Comparative metabolism of phylloquinone and menaquinone-9 in rat liver.  
*J Nutr* 122: 953-958

Will, B. H., Usui, Y., Suttie, J. W. (1992):  
Comparative metabolism and requirement of vitamin K in chicks and rats.  
*J Nutr* 122: 2354-2360

Williams, B. A., Verstegen, M. W., Tamminga, S. (2001):  
Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health.  
*Nutr Res Rev* 14: 207-228

Woollard, D. C., Indyk, H. E., Fong, B. Y., Cook, K. K. (2002):  
Determination of vitamin K1 isomers in foods by liquid chromatography with C30 bonded-phase column.  
*J AOAC Int* 85: 682-691

Yamaguchi, M., Sugimoto, E., Hachiya, S. (2001):  
Stimulatory effect of menaquinone-7 (vitamin K2) on osteoblastic bone formation in vitro.  
*Mol Cell Biochem* 223: 131-137

Zentek, J. (1993):

Untersuchungen zum Einfluß der Fütterung auf den mikrobiellen Stoffwechsel im Intestinaltrakt des Hundes.

Hannover, Tierärztliche Hochschule. Habilitationsschrift. 236 S.

Zentek, J. (1995a):

Influence of diet composition on the microbial activity in the gastro-intestinal tract of dogs. I. Effects of varying protein intake on the composition of the ileum chyme and the faeces.

J Anim Physiol Anim Nutr 74: 43-52

Zentek, J. (1995b):

Influence of diet composition on the microbial activity in the gastro-intestinal tract of dogs. II. Effects on the microflora in the ileum chyme.

J Anim Physiol Anim Nutr 74: 53-61

Zetterström, R. (2006):

H. C. P. Dam (1895-1976) and E. A. Doisy (1893-1986): the discovery of antihemorrhagic vitamin and its impact on neonatal health.

Acta Paediatr 95: 642-644

Zeyner, A., Dill, B., Engelmann, W., Markuske, K. D. (2006):

Suitability of equine caecum content as inoculum in a modified "rumen simulation technique".

In: Proceedings of the 10th ESVCN Congress.

**9. Anhang**

Tab. 27: Herstellerverzeichnis der bei den Versuchen und Analysen verwendeten Chemikalien

		Hersteller
NaCl	Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
KCl	Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Kalziumchlorid-Hexahydrat	Riedel-de Haën, Seelze
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Natriumsulfat, wasserfrei	Merck, KGaA, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid	Riedel-de Haën, Seelze
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> SHCl x H <sub>2</sub> O	L-Cysteinhydrochlorid Monohydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>4</sub> Na	Resazurin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
	Pepton aus Fleisch peptisch verdaut „granuliert“	Merck KGaA, Darmstadt
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	Hexansäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
	Oxalsäure-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt
KOH	Kaliumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
HClO <sub>4</sub>	Perchlorsäure	Merck KGaA, Darmstadt
K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] x 3H <sub>2</sub> O	Carrez I-Lösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Carrez II-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
	ISA-Lösung	Mettler Toledo AG, Urdorf, CH
C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	2-Propanol HPLC gradient grade	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
CH <sub>4</sub> O	Methanol HPLC gradient grade	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	Ethanol HPLC gradient grade	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	n-Hexan HPLC	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
ZnCl <sub>2</sub>	Zinkchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
CH <sub>3</sub> COONa	Natriumazetat	Merck KGaA, Darmstadt
CH <sub>3</sub> COOH	Eisessig (100 %-ig)	Merck KGaA, Darmstadt

ANHANG

Tab. 28: pH-Werte (Mw ± SD) der einzelnen Fermenter (F1-F6) in den drei Phasen der semikontinuierlichen Langzeitinkubation

F1	F2	F3	F4	F5	F6
Äquilibrierungsphase; d=7					
6,56 ± 0,14	6,59 ± 0,13	6,56 ± 0,15	6,56 ± 0,12	6,54 ± 0,08	6,57 ± 0,10
Kontrollphase; d=3					
6,58 ± 0,08	6,68 ± 0,03	6,61 ± 0,01	6,56 ± 0,07	6,52 ± 0,03	6,58 ± 0,02
Versuchsphase; d=8					
6,40 ± 0,07	6,48 ± 0,09	6,34 ± 0,08	6,29 ± 0,10	6,24 ± 0,11	6,34 ± 0,08

Tab. 29: Redoxpotential (Mw ± SD) der einzelnen Fermenter (F1-F6) in den drei Phasen der semikontinuierlichen Langzeitinkubation

F1	F2	F3	F4	F5	F6
Äquilibrierungsphase; d=7					
-232,8 ± 32,8	-246,2 ± 36,0	-259,1 ± 43,0	-260,9 ± 43,0	-264,8 ± 49,5	-272,2 ± 47,0
Kontrollphase; d=3					
-286,6 ± 37,9	-320,4 ± 18,3	-333,2 ± 7,3	-341,0 ± 3,3	-338,8 ± 5,3	-343,2 ± 0,9
Versuchsphase; d=8					
-190,3 ± 23,3	-215,2 ± 34,2	-217,1 ± 33,6	-210,6 ± 33,6	-213,8 ± 45,0	-214,7 ± 48,4

Tab. 30: Konzentration von MK-4 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K) der Kurzzeitinkubation; n.n. = nicht nachweisbar

Substrat (g)	Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0
Ms	0,02	n.n.	0,04	0,06	0,12	0,13	0,05	0,17	0,18
Pep	0,88	0,72	0,88	0,30	0,26	0,37	1,36	1,96	1,65
Ms/Pep	0,58	0,63	0,68	0,26	0,50	0,68	0,70	0,63	0,46
K	0,06			0,27			0,03		

ANHANG

Tab. 31: Konzentration von MK-5 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K) der Kurzzeitinkubation; n.n. = nicht nachweisbar

	Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Substrat (g)	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0
Ms	0,11	n.n.	0,02	n.n.	0,06	0,06	0,17	0,30	0,31
Pep	0,17	0,17	0,23	0,17	0,52	1,46	0,01	0,16	0,17
Ms/Pep	0,27	0,11	0,06	0,17	0,52	0,50	0,76	2,71	3,62
K	0,04			0,07			0,06		

Tab. 32: Konzentration von MK-6 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K) der Kurzzeitinkubation; n.n. = nicht nachweisbar

	Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Substrat (g)	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0
Ms	0,19	0,08	0,08	n.n.	0,75	0,83	0,58	1,08	1,17
Pep	0,35	0,50	0,12	0,18	n.n.	0,09	0,88	0,96	1,18
Ms/Pep	0,28	0,32	0,33	0,13	0,96	0,77	1,25	1,50	1,16
K	0,07			0,15			0,40		

Tab. 33: Konzentration von MK-7 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K) der Kurzzeitinkubation; n.n. = nicht nachweisbar

	Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
Substrat (g)	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0
Ms	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,10	0,13	0,14	0,59	0,62
Pep	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,04
Ms/Pep	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,32	0,77	0,77
K	n.n.			n.n.			0,12		

ANHANG

Tab. 34: Konzentration von MK-8 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K) der Kurzzeitinkubation; n.n. = nicht nachweisbar

Substrat (g)	Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0
Ms	0,37	0,25	0,31	n.n.	0,14	0,35	0,16	0,34	0,36
Pep	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1,07	1,20	1,24
Ms/Pep	0,16	0,11	n.n.	n.n.	n.n.	0,23	0,24	0,49	0,52
K	n.n.			n.n.			0,06		

Tab. 35: Konzentration von MK-9 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K) der Kurzzeitinkubation; n.n. = nicht nachweisbar

Substrat (g)	Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0
Ms	1,24	1,39	1,15	1,35	2,33	3,00	0,60	0,95	0,98
Pep	n.n.	n.n.	0,39	0,22	0,79	1,15	n.n.	0,07	0,13
Ms/Pep	0,89	0,80	1,09	1,18	1,43	1,56	2,26	2,69	3,05
K	1,09			1,56			3,05		

Tab. 36: Konzentration von MK-10 (ng/ml) in den drei Versuchsansätzen nach der Zugabe von 0,1, 0,5 und 1,0 g Maisstärke (Ms), Pepton (Pep) und Maisstärke/Pepton (Ms/Pep) und im Kontrollansatz (K) der Kurzzeitinkubation; n.n. = nicht nachweisbar

Substrat (g)	Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0
Ms	19,1	21,8	24,5	4,44	9,14	12,3	9,59	15,0	15,5
Pep	4,72	20,5	42,2	n.n.	0,97	2,62	n.n.	n.n.	n.n.
Ms/Pep	15,5	20,0	22,2	2,85	6,00	3,18	9,03	16,4	16,3
K	n.n.			1,41			0,26		

ANHANG

Tab. 37: Konzentrationen (ng/g) von MK-4 bis -10 im Duodenuminhalt von Hunden;

n.n. = nicht nachweisbar

	MK-4	MK-5	MK-6	MK-7	MK-8	MK-9	MK-10
Hund 4	6,67	1,09	24,2	10,4	n.n.	110	130
Hund 5	1,29	n.n.	6,48	n.n.	n.n.	n.n.	12,5
Hund 6	1,90	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Hund 7	1,32	n.n.	7,73	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Hund 8	1,76	1,46	7,28	n.n.	10,6	n.n.	n.n.
Hund 9	0,77	n.n.	13,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Tab. 38: Konzentrationen (ng/g) von MK-4 bis -10 im Jejunuminhalt von Hunden;

n.n. = nicht nachweisbar

	MK-4	MK-5	MK-6	MK-7	MK-8	MK-9	MK-10
Hund 3	0,65	n.n.	3,41	1,14	0,97	64,3	0,91
Hund 4	4,93	0,98	3,46	3,65	2,03	4,07	4,30
Hund 5	0,74	n.n.	3,83	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Hund 8	3,05	n.n.	9,66	5,28	124	n.n.	10,9
Hund 9	1,24	n.n.	5,21	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Tab. 39: Konzentrationen (ng/g) von MK-4 bis -10 im Zäkuminhalt von Hunden;

n.n. = nicht nachweisbar

	MK-4	MK-5	MK-6	MK-7	MK-8	MK-9	MK-10
Hund 1	25,2	1,11	107	6,19	7,36	6,36	161
Hund 5	170	7,29	71,3	17,1	6,78	120	226
Hund 9	62,4	51,0	327	31,6	23,6	82,6	293

Tab. 40: Konzentrationen (ng/g) von MK-4 bis -10 im Koloninhalt von Hunden;

n.n. = nicht nachweisbar

	MK-4	MK-5	MK-6	MK-7	MK-8	MK-9	MK-10
Hund 1	110	9,32	1774	n.n.	n.n.	58,4	1188
Hund 2	17,6	7,60	279	28,8	6,56	30,7	665
Hund 3	24,2	3,59	173	5,01	n.n.	23,3	584
Hund 4	3,12	n.n.	12,1	5,65	4,81	3,49	2,12
Hund 5	27,8	7,34	122	68,3	13,3	290	589
Hund 6	50,1	9,40	99,4	17,9	n.n.	20,4	85,4
Hund 8	69,7	15,5	347	19,6	15,2	94,5	558
Hund 9	40,0	23,4	255	15,2	19,1	75,7	324

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits bei Tagungen als Poster oder als Vortrag vorgestellt.

**Poster:**

Kröger, S., Schäfer, K., Hellweg, P., Zentek J.

*In vitro*-Untersuchungen zur Bildung von Vitamin K<sub>2</sub> im Colon von Hunden

2. Doktoranden-Symposium Berlin, 08.06.2007

Berlin: Mensch und Buch, 2007. S. 67

ISBN: 978-3-86664-235-5

Kröger, S., Hellweg, P., Schäfer, K., Zentek J.

Comparison between the *in vivo* and *in vitro* formation of vitamin K<sub>2</sub> by the canine intestinal microbiota (Vergleich zwischen der *in vivo* und *in vitro* Bildung von Vitamin K<sub>2</sub> durch die intestinale Mikroflora des Hundes).

63. Jahrestagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. Göttingen, 10.-12.03.2009

Proceedings of the Society of Nutrition Physiology; Band 18, S. 102

Frankfurt am Main: DLG-Verlag, 2009.

ISBN: 978-3-7690-4102-6

**Vortrag:**

Kröger, S.; Hellweg, P.; Schäfer, K.; Zentek, J.:

In vitro investigations on the formation of vitamin K<sub>2</sub> by the canine intestinal microbiota.

12th ESVCN-Congress. Vienna, Austria, 25.9. - 27.9.2008

Proceedings of the 12th ESVCN Congress 2008. S. 21

ISBN: 978-3-200-01193-9

### **Mein besonderer Dank gilt...**

... Prof. Dr. Jürgen Zentek für die Überlassung des Themas, die persönliche Unterstützung und Betreuung und für das Wissen, welches er mir neben dem Vitamin K über die Tierernährung vermittelt hat.

... Dr. Petra Hellweg für die ausdauernde und freundschaftliche Unterstützung und Hilfe während der gesamten Zeit, auch dann noch, als sie nicht mehr an Ort und Stelle war.

... Dr. Klaus Schäfer für die Einführung in die Durchführung und Technik chromatographischer Bestimmungen und die Bereitschaft immer wieder diverse Berechnungen mit mir durchzuführen.

... Paula für spontane Korrektüreinsätze, Transporte von Proben und die schöne gemeinsame Zeit im Wintergarten. Und Inga, die so tapfer das für sie thematisch fremde Manuskript gelesen hat.

... meinen Freunden dafür, dass sie immer akzeptiert haben, wenn ich mich zum Schreiben zurückgezogen habe.

... meinen Eltern! Die mich immer und bei allem großzügig und mit ganzem Herzen unterstützen und es mir so ermöglichen den Weg zu gehen, den ich mir ausgesucht habe.

## SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

---

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

Berlin, den 08.06.2009

Susan Kröger