

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchstiere, Haltung und vorbereitende Maßnahmen**

Die experimentellen Untersuchungen wurden in der Klinik für Klauentiere der FU Berlin an N = 11 pansenfistulierten Rindern der Rasse Deutsche-Schwarz-Bunte x Holstein Friesian durchgeführt. Alle 11 Tiere befanden sich in einem Alter zwischen 4 und 10 Jahren, waren weiblichen Geschlechts, nicht tragend, nicht laktierend und hatten mindestens zwei Laktationsstadien durchlaufen.

Alle Tiere waren während der gesamten Versuchsdauer in Anbindehaltung auf Stroheinstreu aufgestellt. Die Wasseraufnahme erfolgte über Selbsttränken ad libitum. Durch Installation jeweils einer, vom Nachbarn getrennten Tränke pro Standplatz und zugehöriger Wasseruhr konnte der tägliche Verbrauch je Tier bestimmt werden. Das Futter wurde im Steinguttrug angeboten. Durch die Installation von Metallwänden zwischen den Futtertrögen konnte gewährleistet werden, dass jedes Tier ausschließlich die ihm zugedachte, abgewogene Ration aufnahm.

Nach einer Phase der Eingewöhnung wurde allen Tieren durch operativen Eingriff eine permanente Pansenfistel angelegt. Dazu wurde eine Extraperitonealisierung des Pansens nach Goetze (*Rosenberger 1977*) vorgenommen. Nach Rasur, Desinfektion und lokaler Anästhesie der linken Hungergrube wurden Haut und Musculus obliquus externus in der Form einer Kreisfläche ( $\varnothing = 10 \text{ cm}$ ) entfernt. Dies entsprach der späteren Fistelöffnung. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde der Pansen durch eine nicht perforierende Zirkulärnaht an Bauchfell und Muskulatur adaptiert. Anschließend wurde der Pansen durch einen ca. 10 cm langen Längsschnitt eröffnet und die Pansenwand mit der Haut vernäht. Danach wurde die Pansenfistel<sup>1</sup> eingesetzt. Als Antibiose erhielten die Tiere an den folgenden fünf Tagen systemisch Procain-Penicillin<sup>2</sup>. Eine sich anschließende Rekonvaleszenzphase von vier Wochen diente der Wundheilung sowie der weiteren Adaptation der Tiere an die für sie neuen Haltungsbedingungen.

Durch regelmäßige klinische Untersuchung aller Versuchstiere wurden Atmung, Puls, Temperatur und Pansenkontraktionen sowie durch 14-tägiges Wägen das Körpergewicht erfasst und dokumentiert.

---

<sup>1</sup> Bar Diamond Inc., Parma, Illinois, USA

<sup>2</sup> Proc-PenG, Fa. Albrecht, Aulendorf, Deutschland

### 3.2 Versuchskonzeption

Die Nutzung nicht tragender Kühe in Hinsicht auf den Einsatz saurer Salze als prophylaktische Maßnahme zur Verhinderung der Gebärpause erschien gerechtfertigt, da durch den Versuch nicht der Nachweis einer wirksamen Gebärpauseprophylaxe erbracht werden sollte, sondern die metabolischen Effekte der sauren Salze/Salzmischungen auf den Rinderorganismus, insbesondere die Veränderungen der Harnzusammensetzung von Interesse waren.

Als saure Salze werden Mineralsalze bezeichnet, die sich aus starken Anionen und schwachen Kationen zusammensetzen und deren Verhalten in Lösung durch vollständige Dissoziation eine azidogene (saure) Wirkung zur Folge hat.

Es sollte der Einfluss von acht Einzelsalzen, zwei Salzkombinationen und Aqua dest. als elektrolytfreies Wasser (Negativkontrolle) getestet werden (Tab. 14). NaCl (Kochsalz) gehört nicht zu den anionischen Salzen, soll aber der Einfachheit halber nachfolgend zur Gruppe der sauren Salze hinzugefügt werden, wissend, dass es sich dabei um keine chemisch korrekte Bezeichnung handelt. Die Kalziumsulfatverbindungen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Reinheitsgrades: CaSO<sub>4</sub> als chemisch reine Laborvariante gegenüber einem natürlichen Produkt aus der Gipsgewinnung (CaSO<sub>4</sub>-D10) mit einem Körnungsgrad von 10 µm. Neben den in Tab. 14 genannten Verbindungen sollte zusätzlich HCl (Salzsäure) getestet werden. In einem Vorversuch führte die intraruminale Applikation von 1,5 Eq HCl/Tier\*d<sup>-1</sup> zu einer massiven Reizung der Pansenschleimhaut mit folgender Inappetenz des Rindes. Aus diesem Grund wurde die Anionenkomponente aus dem Versuchsplan gestrichen.

Tab. 14: Übersicht der Testsubstanzen

Einzelsalze (8)	Magnesiumsulfat (Bittersalz), Kalziumsulfat (Gips), Kalziumsulfat D10 (Körnungsgrad 10 µm), Ammoniumsulfat, Magnesiumchlorid, Kalziumchlorid, Ammoniumchlorid, Natriumchlorid (Kochsalz)
Salzkombinationen (2)	Kalziumchlorid + Magnesiumsulfat, Ammoniumchlorid + Kalziumsulfat
Negativkontrolle (1)	Aqua dest.

Sowohl die Positionierung der Tiere als auch die Zuordnung der Testsubstanzen erfolgten nach dem Zufallsprinzip (11x11 Lateinisches Quadrat) mit Hilfe eines Zufallsgenerators. Diese Versuchsanordnung ermöglichte auf Grund der Randomisierung die Reduzierung der systematischen Versuchsfehler. Risiken einer möglichen Beeinflussung von Merkmalen bei geordneter Reihenfolge der Salzbehandlung wurden dadurch minimiert. Grundsätzlich wurde der Ablauf des gesamten Versuchsvorhabens in 11 sich wiederholende Perioden

untergliedert. Das Muster der sich wiederholenden Perioden wurde eingeteilt in eine 14-tägige Salzphase, in der jedes Tier eine Tagesdosis von zwei Equivalenten anionisches Salz bzw. die Negativkontrolle erhielt. Dies geschah nebenher der Fütterung zu den Zeiten 07.00 Uhr und 14.00 Uhr. Die Dosis von  $2 \text{ Eq/Tier} \cdot \text{d}^{-1}$  wurde gewählt, weil sie die Maximaldosis repräsentiert, bei der alle zu testenden Salze gleich dosiert werden können, ohne potentiell toxisch zu wirken (NRC, 1978). Zur Anwendung kam ein entwickeltes Tropfsystem, welches die Menge des in zwei Liter Aqua dest. gelösten Salzes zu jeder Mahlzeit direkt und zeitlich steuerbar intraruminal überführte. Dadurch wurde eine gleichzeitige Aufnahme der Salze mit dem übrigen Futter imitiert und die vollständige Aufnahme verabreichter Substanzen sichergestellt. Kalziumsulfat und das Salzgemisch Ammoniumchlorid/Kalziumsulfat wurden auf Grund ihrer verminderten Löslichkeit unter wiederholtem Aufschütteln der Lösungsmenge manuell über die Pansenfistel in den Pansen verbracht.

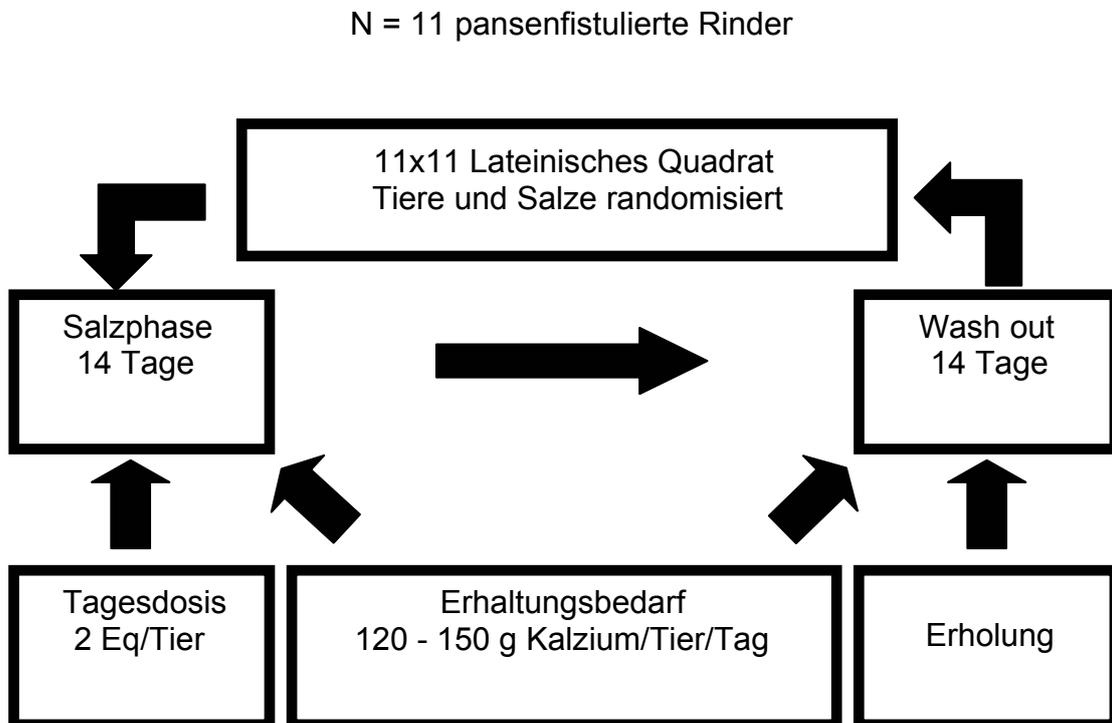


Abb. 3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes

Die sich anschließende 14-tägige Wash-out-Phase sollte sicherstellen, dass sich durch die Behandlung veränderte Untersuchungsparameter vor Beginn der nächsten Testphase wieder im Bereich der Ausgangswerte befanden. Die Dauer der Wash-out-Phase richtete sich nach dem Tier, das als letztes den Bereich der Ausgangswerte erreicht hatte und konnte nach dem ersten Durchgang für alle weiteren übernommen werden, da nach dem ersten Durchgang jedes Salz einmal verabreicht wurde. Damit war die erste Versuchsperiode beendet, die nächste begann mit demselben Aufbau unter neuer Tierzuordnung. Am Ende

### 3 Material und Methoden

des Versuches hatten alle 11 Tiere jede der 11 Salzvarianten bzw. Negativkontrolle einmal erhalten (Tab. 15 u. Abb. 3). Die Negativkontrolle Aqua dest. wird im folgenden Text sowie in den Abbildungen und Tabellen dieser Arbeit als Wasser (H<sub>2</sub>O) bezeichnet.

Tab. 15: Übersicht der Testsubstanzen und deren randomisiertes Verteilungsmuster

**1**= MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O      **4**=CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O      **7**=CaSO<sub>4</sub>-D10 (Körnungsgrad 10 µm)  
**2**=MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O      **5**=NH<sub>4</sub>Cl      **8**=H<sub>2</sub>O      **10**=CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O+MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
**3**=CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O      **6**=(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>      **9**=NaCl      **11**= NH<sub>4</sub>Cl+CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

Tier-Nummer	Periode 1	Periode 2	Periode 3	Periode 4
505	4	1	3	10
510	9	6	8	4
396	7	4	6	2
421	5	2	4	11
420	2	10	1	8
397	8	5	7	3
400	10	7	9	5
401	6	3	5	1
394	1	9	11	7
403	3	11	2	9
404	11	8	10	6
Tier-Nummer	Periode 5	Periode 6	Periode 7	Periode 8
505	8	5	9	6
510	2	10	3	11
396	11	8	1	9
421	9	6	10	7
420	6	3	7	4
397	1	9	2	10
400	3	11	4	1
401	10	7	11	8
394	5	2	6	3
403	7	4	8	5
404	4	1	5	2
Tier-Nummer	Periode 9	Periode 10	Periode 11	
505	11	2	7	
510	5	7	1	
396	3	5	10	
421	1	3	8	
420	9	11	5	
397	4	6	11	
400	6	8	2	
401	2	4	9	
394	8	10	4	
403	10	1	6	
404	7	9	3	

### 3.3 Fütterung

Während des gesamten Versuchszeitraumes wurden die Rinder gemäß Erhaltungsbedarf rationiert gefüttert. Die Tagesration bestand aus 8 kg Heu und 2,5 kg eines kommerziellen Konzentratfutters (Tab. 16) mit bedarfsgerechtem Zusatz an Vitaminen, Spuren- und Mengenelementen verteilt auf zwei Gaben (07.00 Uhr und 14.00 Uhr). Die anfänglich vorgesehene Rückwaage nicht aufgenommenen Futters konnte unterbleiben, weil alle Tiere entsprechend vorgelegte Futtermengen vollständig verzehrten.

Um der Forderung einer forcierten Kalziumzufuhr beim Einsatz saurer Salze gerecht zu werden, wurde zusätzlich Futterkalk verabreicht. Zusammen mit der Heu-Krafftutter-Ration konnte somit die tägliche Aufnahme von 120 – 150 g Kalzium/Tier gewährleistet werden.

Tab. 16: Zusammensetzung des Krafftuttermittels,  $DCAB \text{ (meq/kg TS)} = (\text{Na}^+ + \text{K}^+) - (\text{Cl}^- + \text{S}^{2-})$

Komponenten	Inhalt (%)
Trockensubstanz	88,1
Rohasche	6,3
Rohprotein	19,0
Rohfett	3,0
Rohfaser	8,6
Kalzium	0,75
Magnesium	0,33
Natrium	0,38
Kalium	1,09
Phosphor	0,62
Schwefel	0,12
Chlorid	0,5
<b>DCAB (meq/kg TS)</b>	<b>+ 228</b>

### 3.4 Proben und Parameter

An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass das Versuchsvorhaben ein Gemeinschaftsprojekt der Klinik für Kleintiere, des Instituts für Veterinär-Physiologie und des Instituts für Tierernährung der Freien Universität Berlin war. Dem entsprechend sollen im Folgenden auch Aspekte genannt werden, die nicht ausschließlich auf das Ziel dieser Arbeit ausgerichtet sind wohl aber unter Berücksichtigung aller Manipulationen an den

Versuchstieren den Umfang des abgeschlossenen Versuchsvorhabens und die Aufwand-Nutzen-Relation widerspiegeln.

Die Tabellen 17 und 18 geben einen Überblick über die Gesamtheit des für das Gemeinschaftsprojekt relevanten Probenmaterials, die Art der Probengewinnung, die Behandlungszeiten und das Parameterspektrum. Dabei sollten nicht nur spezifisch veränderbare Untersuchungsgrößen sondern auch allgemeine klinisch-chemische Parameter zur Tiergesundheitskontrolle während des Versuches Beachtung finden.

Weitere Ergebnisse der im Rahmen dieser Studie erfolgten Untersuchungen werden in den Dissertationen von Engel (2005) und Löffler (2005) beschrieben.

Tab. 17: Übersicht der Proben, Probenentnahme und Untersuchungsgrößen

<b>Probe</b>	<b>Probengewinnung</b>	<b>Parameterspektrum</b>
Blut	Punktion der Vena jugularis ext.	<i>Blutgasanalyse:</i> pH, pCO <sub>2</sub> , pO <sub>2</sub> , Bikarbonat, Basenüberschuss <i>Hämatologie:</i> Hb, Hk, RBC, WBC, Thrombozyten <i>Enzymaktivitäten:</i> ASAT, CK, GGT, GLDH <i>Mengen- und Spurenelemente:</i> Natrium, Kalium, Chlorid, Kalzium, ionisiertes Kalzium, Phosphor, Magnesium, ionisiertes Magnesium, Eisen, Kupfer, Zink, Selen <i>Metaboliten:</i> Bilirubin, Harnstoff, Kreatinin, Albumin, Gesamteiweiß <i>Osmolalität</i>
Harn	Spontanurin durch manuelle Stimulation	<i>Fraktionierte Netto-Säuren-Basen-Ausscheidung:</i> pH, NSBA, Basen, Säuren, Ammoniumionen, Basen-Säuren-Quotient <i>Elektrolyte:</i> Natrium, Kalium, Chlorid, Kalzium, Phosphor, Magnesium <i>Metaboliten:</i> Kreatinin <i>Osmolalität</i>
Pansensaft	über Pansenfistel	pH, Chlorid, Konzentration flüchtiger Fettsäuren
Futtermitteln		Futtermittelaufnahme, Wasseraufnahme, DCAB, Kalzium, Phosphor, Magnesium

Tab. 18: Übersicht der zeitlichen Manipulationen während der Salzphase

Behandlungsablauf in Tagen		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Uhrzeit	Behandlung														
07.00	Fütterung	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
07.00-09.00	Anionenzuführung über Pansenfistel	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10.00-11.00	Urinprobenentnahme Spontanharn				X			X				X			X
11.00-11.30	Blutprobenentnahme Punktion der Halsvene				X			X				X			X
10.00-11.00	Pansensaftentnahme über Pansenfistel				X			X				X			X
14.00	Fütterung	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
14.00-16.00	Anionenzuführung über Pansenfistel	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

### 3.4.1 Futterproben

Unter den Bedingungen sich über den Versuchszeitraum ändernder Heuchargen wurden im Abstand von 14 Tagen (jeweils zum Beginn der Salz- bzw. Wash-out-Phase) zwei repräsentative Heuproben entnommen und deren DCAB-Werte in einem Fremdlabor<sup>3</sup> bestimmt. Die berechneten DCAB-Werte unter Berücksichtigung der Anionenrationen in der Salzphase, der unbehandelten Kontrolltiere sowie der Wash-out-Phase aller 11 Versuchsperioden werden in Tab. 19 dargestellt.

### 3.4.2 Blutproben

Innerhalb der Versuchsperioden wurden zweimal wöchentlich Blutproben entnommen. Die Entnahme erfolgte in der Zeit zwischen 11.00 – 11.30 Uhr, somit etwa zwei Stunden nach Beendigung der Salzgabe. Das aus der Vena jugularis externa entnommene Blut wurde in Röhrchen für Serum (10 ml; Fa. Kabe Labortechnik) aufgefangen, innerhalb der folgenden zwei Stunden zentrifugiert (10 Minuten, 4000 g, 4 °C) und das so gewonnene Serum bis zur Analyse bei -20 °C tiefgefroren.

<sup>3</sup> Bgg Deutschland, Parchim

Tab. 19: DCAB-Werte der 11 Versuchsperioden,  $DCAB \text{ (meq/kg TS)} = (Na^+ + K^+) - (Cl^- + S^{2-})$ ; kalkuliert wurden Heu, Kraffutter sowie 2 Eq saures Salz in der Salzphase; Aufschlüsselung der Salzphase nach Rindern mit Salzapplikation und Kontrolltieren (Aqua dest.)

Versuchsperiode	DCAB *		
	Salz-Phase Kontrolltiere	Salz-Phase	Wash-out-Phase
1	+301	+86	+301
2	+455	+242	+455
3	+270	+59	+298
4	+448	+236	+399
5	+259	+50	+63
6	+54	-155	+54
7	+54	-155	+281
8	+281	+72	+281
9	+360	+139	+360
10	+360	+139	+172
11	+172	-42	+172
<b>DCAB (<math>\bar{x}</math>) *</b>	<b>+274</b>	<b>+61</b>	<b>+258</b>

\* in meq/kg TS

### 3.4.3 Harnproben

#### 3.4.3.1 Wöchentliche Harnproben

Die Entnahme der Harnproben erfolgte ebenfalls zweimal wöchentlich (Tab. 18). Nach gründlicher Reinigung der Scham und ihrer Umgebung mit warmem Wasser erfolgte über manuelle Stimulation der spontane Harnabsatz, bei dem Mittelstrahlurin in 100 ml-Versandgefäßen (Fa. Sarstedt) aufgefangen wurde. Von jeder Probe wurden ca. 20 ml entnommen, zentrifugiert (10 Minuten, 3000 g), dekantiert und anschließend alle Proben bei -20 °C tiefgefroren.

#### 3.4.3.2 Tagesprofil

Zusätzlich zu den wöchentlichen Probenentnahmen fand einmal im Monat ein „24h-Profil“ statt. Dies erfolgte am Tag 14 aller Versuchsperioden, somit jeweils am letzten Tag der Salzgabe. Dazu wurde der Harn der 11 Rinder über 24 Stunden gesammelt. Um den Urin

möglichst vollständig zu gewinnen, wurden alle Tiere in kurzen Zeitabständen nach Reinigung der Scham manuell zum Harnabsatz stimuliert. In Zeitabständen von jeweils vier Stunden (11.00, 15.00, 19.00, 23.00, 03.00 und 07.00 Uhr) wurde der bis dahin aufgefangene Urin gewogen, die Dichte bestimmt und über die Gleichung:

$$\frac{\text{Masse}}{\text{Dichte}} = \text{Volumen}$$

die Harnmenge (Liter) errechnet. Des Weiteren wurde jeweils eine Vier-Stunden-Sammelharnprobe entnommen (100 ml), davon ca. 20 ml abgefüllt, zentrifugiert (10 Minuten, 3000 g), dekantiert und bis zur Untersuchung bei -20°C tiefgefroren.

### 3.4.4 Laboranalytische Methoden in Blut und Harn

#### 3.4.4.1 Elektrolyte

Die Bestimmung von Natrium, Kalium, Chlorid, Kalzium, Phosphor und Magnesium in Serum und Harn erfolgte im Labor der Klinik für Kleintiere der FU Berlin.

Die Messung der Konzentrationen von ionisiertem Kalzium im Serum wurden im Labor des Instituts für Veterinär-Physiologie der FU Berlin vorgenommen (Tab. 19).

Tab. 19: Analysemethoden der Parameter

Medium	Parameter	Analysemethode
Blut	Natrium	Potentiometrie <sup>5</sup>
	Kalium	Potentiometrie <sup>5</sup>
	Kalzium	AAS <sup>6</sup>
	Ionisiertes Kalzium	ionensensitive Elektrode <sup>7</sup>
	Magnesium	AAS <sup>6</sup>
	Ionisiertes Magnesium	ionensensitive Elektrode <sup>7</sup>
	Chlorid	Potentiometrie <sup>5</sup>
	Phosphor	Molybdat-Reaktion <sup>8</sup>
Harn	Natrium	AAS <sup>6</sup>
	Kalium	AAS <sup>6</sup>
	Kalzium	AAS <sup>6</sup>
	Magnesium	AAS <sup>6</sup>
	Chlorid	Potentiometrie <sup>5</sup>
	Phosphor	Molybdat-Reaktion <sup>8</sup>

<sup>5</sup> Synchron EL-ISE Electrolyte Sys., Beckman

<sup>6</sup> Atomabsorptionsspektrophotometrie (PU 9200 atomic absorption spectrophotometer, Philips)

<sup>7</sup> Electrolyte 8 Analyzer, Fa. NOVA biomedical

<sup>8</sup> Hitachi 704 Automatic Analyzer

### 3.4.4.2 Fraktionierte Elektrolytausscheidung

Die renale fraktionierte Elektrolytausscheidung (FE) gibt unabhängig von Schwankungen der Diurese den mit dem Harn ausgeschiedenen prozentualen Anteil der untersuchten Substanz zur korrespondierenden Kreatininausscheidung des Organismus an. Sie bezieht sich ausschließlich auf die filtrierenden Nephrone und dient somit als Maß der tubulären Sekretions- und Reabsorptionsvorgänge bzw. der Filtrationsleistung. Die FE der Parameter Natrium, Kalium, Chlorid, Kalzium, Phosphor und Magnesium wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$FE_x (\%) = (U_x/S_x) \times (S_{Crea}/U_{Crea}) \times 100$$

Dabei ist zu verstehen:

$FE_x$  = Clearance der betreffenden Substanz im Verhältnis zur Kreatinin-Clearance

$U_x$  = Harnkonzentration der betreffenden Substanz zum Zeitpunkt a

$S_x$  = Serumkonzentration der betreffenden Substanz zum Zeitpunkt a

$U_{Crea}$  = Harnkonzentration des Kreatinins zum Zeitpunkt a

$S_{Crea}$  = Serumkonzentration des Kreatinins zum Zeitpunkt a

### 3.5 Statistische Methoden

Die Erfassung und statistische Auswertung der erzielten Werte erfolgt mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS (Version 11.5. für Windows) und unter Beratung durch das Institut für Biometrie der FU Berlin.

Als statistisches Modell wird ein **11x11 Lateinisches Quadrat** gewählt.

Vorausgehende Analysen der Rohdaten des Tages s0 (Ausgangswerte) durch die Berechnung von Residuen und Nutzung des **KOLMOGOROV-SMIRNOV-Tests** ( $p \leq 0,05$ ) zeigen keine Normalverteilung für die Harnparameter Natrium, Chlorid, Kalzium, Phosphor sowie Magnesium. Sie werden deshalb einer **logarithmischen** (Basis 10) **Transformation** unterzogen. Die transformierten Daten bilden die Grundlage der statistischen Berechnungen aller Mehrfachvergleiche zu diesen Variablen in dieser Arbeit. Auf Grund des besseren Verständnisses und zum Vergleich mit Ergebnissen anderer Studien werden in den Abbildungen und Tabellen die nicht transformierten Daten verwendet.

Von Interesse ist der Einfluss verschiedener saurer Salze auf die Mengenelemente im Harn. Dabei geht es sowohl um den Nachweis von Unterschieden salzbehandelter Tiere zu den Kontrolltieren ( $H_2O$ ) als auch von Unterschieden einzelner Probenstage zum Ausgangswert ( $s_0$ ) anhand der Parameterresultate. Dies dient unter anderen dem Zweck, eventuelle Schwankungen der Kontrolltiere innerhalb der Perioden nachzuweisen. Als Nullhypothese gilt: Die Ergebnisse aller Salze ( $+H_2O$ ) bzw. Probenstage des zu beobachtenden Parameters an den einzelnen Probenstagen bzw. für jedes Salz ( $+H_2O$ ) sind gleich. Für entsprechende statistische Untersuchungen werden parametrische Tests genutzt. Da nicht davon ausgegangen werden kann, dass keine Wechselwirkungen innerhalb des Modells vorhanden sind, werden die sauren Salze getrennt nach Probenstag (Faktor Salz) bzw. die Probenstage pro Salz (Faktor Zeit) getestet. Zum Vergleich der Parameterresultate wird eine **zweifaktorielle Varianzanalyse** durchgeführt. Es fließen ein das Salz bzw. der Probenstag als fester Faktor und das Individuum Kuh als Zufallsfaktor (gemischtes Modell). Im Falle eines signifikanten Ergebnisses der Varianzanalyse wird der **post-hoc Test nach DUNNETT** angeschlossen, um aufzuzeigen, zu welchen Zeitpunkten sich welche Salze bzw. Probenstage von den Kontrolltieren ( $H_2O$ ) bzw. zum Ausgangswert ( $s_0$ ) unterscheiden.

Das Signifikanzniveau wird grundsätzlich auf  $\alpha = 1\%$  ( $p \leq 0,01$ ) eingestellt und signifikante Unterschiede je nach Vergleich mit „\*\*\*“ (Vergleich zu den Kontrolltieren) oder „a“ (Vergleich zum Ausgangswert  $s_0$ ) gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  werden mit „\*“ gekennzeichnet. Davon abweichende Darstellungen sind unter der jeweiligen Abbildung/Tabelle angegeben.

Die Auswertungen zur zirkadianen Rhythmik im Tagesprofil für die Harnparameter Kalzium und Chlorid verlaufen ähnlich den oben beschriebenen Verfahren. Ziel dieser Untersuchungen ist es, Unterschiede der salzbedingten Parameterresultate eines Tages anhand des Vergleiches der fünf Probenentnahmezeitpunkte zum 07.00 Uhr-Wert nachzuweisen. Als Nullhypothese gilt: Die Ergebnisse aller Probenzeitpunkte des zu beobachtenden Parameters für jedes Salz ( $+H_2O$ ) sind gleich.

Die Untersuchungen zu den Tagesgesamtausscheidungen an Kalzium und Chlorid im Harn, zu den Parametern des Säuren-Basen-Haushaltes Harn-pH und NSBA sowie zum 24h-Harnvolumen werden ebenso mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und anschließend post-hoc Test nach DUNNETT durchgeführt.

Um den Fütterungseinfluss (DCAB) mit und ohne Salzwirkung auf Parameter des Harns aufzuzeigen, werden Gruppen gebildet. In Abhängigkeit der Rations-DCAB ohne Salzapplikation werden die Kontrolltiere ( $H_2O$ ) den Gruppen 1 (+50 bis +300 meq/kg TS) und 2 ( $> +300$  meq/kg TS) zugeteilt. In die Auswertungen zum DCAB-Effekt mit Salzwirkung fließen alle Messwerte der Tiere ein, die eines der sauren Salze erhalten haben ( $s_4$ - $s_{14}$ ). Es werden fünf DCAB-abhängige Gruppen gebildet: Gruppe A:  $< -100$  meq/kg TS, Gruppe B:

-100 bis 0, Gruppe C: 0 bis +100, Gruppe D: +100 bis +200 und Gruppe E: > +200 meq/kg TS. Alle fünf Gruppen werden in einer Varianzanalyse sowie anschließendem **post-hoc Test nach SCHEFFÉ** bzw. bei nur zwei Gruppen mittels **t-Test** auf das Vorhandensein signifikanter Gruppenunterschiede geprüft.

Zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen den Harnparametern NSBA, pH, Kalzium und Chlorid untereinander und der Harn-Mengenelemente Kalzium und Chlorid zur DCAB werden die **Korrelationskoeffizienten nach PEARSON** berechnet.

Als grafische Darstellung des Einflusses verschiedener saurer Salze auf die Mengenelemente im Harn sowie der Ergebnisse zur zirkadianen Rhythmik innerhalb des Tagesprofils werden **Liniendiagramme** gewählt. Jede Linie stellt den zeitlichen Verlauf der Mittelwerte eines Salzes bzw. der Negativkontrolle über 11 Perioden dar. Auf der x-Achse werden die Probenstage (s = Salzphase, w = Wash-out-Phase; 4, 7, 11, 14 = Versuchstage der Phase; s0 = Ausgangswert) bzw. Probenzeitpunkte (11.00, 15.00, 19.00, 23.00, 03.00 und 07.00 Uhr) angeführt. Zur besseren Orientierung in der Grafik werden Salz- und Wash-out-Phase durch eine gestrichelte Linie getrennt. Jedem Diagramm wird eine Tabelle mit den statistischen Ergebnissen zum Mehrfachvergleich der Mittelwerte zu allen Zeiten angefügt.

Die Ergebnisse ausgewählter Harnparameter und des 24h-Harnvolumens werden in Form von **Balkendiagrammen** dargestellt und sind für jedes saure Salz (+H<sub>2</sub>O) getrennt anhand von arithmetischem Mittelwert ( $\bar{x}$ ), Standardabweichung (s), größten und kleinsten Wert ( $x_{\max}$ ,  $x_{\min}$ ), mittlere Differenz zu H<sub>2</sub>O sowie Irrtumswahrscheinlichkeit (p) tabellarisch aufgeführt.

Als Darstellungsform der Ergebnisse zum Einfluss der DCAB auf ausgewählte Harnparameter werden **Box-and-Whisker-Plots** genutzt. Die Box wird vom ersten und dritten Quartil begrenzt und umfasst 50% der Werte. Die waagerechte Linie repräsentiert den Median. Die von der Box ausgehenden Linien erstrecken sich bis zum größten und kleinsten Wert, so fern es sich nicht um Ausreißer handelt. Als Ausreißer („o“) werden Fälle definiert, deren Werte 1,5 bis 3 Boxenlängen vom oberen oder unteren Boxenrand entfernt sind. Extremwerte („\*“) sind mehr als 3 Boxenlängen vom oberen oder unteren Boxenrand entfernt. Zusätzlich werden die vom Untersuchungslabor empfohlenen Referenzwerte für das Rind durch waagerechte Linien eingezeichnet und signifikante Gruppenunterschiede durch unterschiedliche Kleinbuchstaben gekennzeichnet.

In angeschlossenen Tabellen sind arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ ), Standardabweichung (s), Median ( $x_{0,5}$ ), 25. und 75. Perzentil sowie größter und kleinster Wert ( $x_{\max}$ ,  $x_{\min}$ ) für die entsprechenden Gruppenwerte aufgeführt.

Aus Gründen der Übersicht wird in den Abbildungen auf das Einzeichnen der Standardabweichung verzichtet, diese kann dem Anhang aus entsprechenden Tabellen entnommen werden.