

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

Einfluss bioaktiver Pflanzenlipide auf Kalziumresorptionsmechanismen im Gastrointestinaltrakt von Schafen

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

vorgelegt von
Sebastian Dietmar Geiger
Tierarzt aus Lahr/Schwarzwald

Berlin 2021
Journal-Nr.: 4293

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

**Einfluss bioaktiver Pflanzenlipide auf Kalziumresorptionsmechanismen im
Gastrointestinaltrakt von Schafen**

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

**vorgelegt von
Sebastian Dietmar Geiger
Tierarzt
aus Lahr/Schwarzwald**

Berlin 2021

Journal-Nr.: 4293

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jörg R. Aschenbach
Zweiter Gutachter: PD Dr. Friederike Stumpff
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Breves

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

sheep, nutrition, biological activity, lipids, digestion, digestive absorption,
digestive system, digestive tract, rumen digestion, calcium, calcium absorption

Tag der Promotion: 05.10.2021

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

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

ISBN: 978-3-96729-137-7

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2021

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

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 2021 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

**Gewidmet meinen Großeltern
Helmut & Maria Hebding**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Definitionen	VIII
1. Einleitung	1
2. Literaturteil	3
2.1 Kalzium.....	3
2.1.1 Kalziumverteilung im Körper.....	3
2.1.2 Physiologische Rolle von Kalzium.....	3
2.1.3 Hormonelle Regulation der Kalziumhomöostase	4
2.2 Hypokalzämie der Milchrinder	4
2.2.1 Formen der Hypokalzämie	4
2.2.2 Tiergesundheitliche und wirtschaftliche Bedeutung	5
2.2.3 Präventionskonzepte.....	6
2.3 Transepithelialer Kalziumtransport des Wiederkäuers.....	7
2.3.1 Parazelluläre Permeation	7
2.3.2 Transzellulärer Transport	9
2.3.2.1 Transzellulärer Kalziumtransport im Darm	11
2.3.2.1.1 Apikaler Einstrom	11
2.3.2.1.2 Intrazellulärer Transport	12
2.3.2.1.3 Basolaterale Abgabe ins Blut	12
2.3.2.2. Transzellulärer Transport im Pansen	13
2.3.2.2.1 Histologische Besonderheiten der ruminalen Epithelauskleidung.....	15
2.3.2.2.2 Unterschiede der ruminalen und intestinalen Kalziumresorption.....	15
2.3.2.2.3 Putativ beteiligte Transportproteine	16
2.4. Bioaktive Pflanzenlipide (PBLC).....	18
2.4.2 Anwendungsgebiete in der Nutztierhaltung.....	19
2.4.3 TRP-Kanäle als Zielgruppe bioaktiver Pflanzenlipide.....	19
2.4.3.1 TRPM8	21
2.4.3.2 TRPA1	22
2.4.3.3 TRPV3	22
2.5 Bedeutung der Literatur für die eigene Fragestellung	23
3. Material und Methoden	25

3.1 Tiere	25
3.2 Gruppeneinteilung und Vorfütterung	26
3.3 Rationsgestaltung	26
3.5 Lebendmassezunahme und Futteraufnahme	28
3.6 <i>In-vivo</i> -Blutanalysen	28
3.7 Gewebegewinnung	30
3.7.1 Gewebegewinnung für funktionelle <i>Ex-vivo</i> -Untersuchungen	30
3.7.2 Gewebegewinnung für molekularbiologische Untersuchungen	30
3.8 RNA-Isolierung	31
3.9 cDNA-Synthese	32
3.10 Primer-Design	33
3.11 Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)	37
3.12 Funktionelle Bestimmung der Epitheleigenschaften <i>ex vivo</i>	38
3.12.1 Inkubationslösungen der Ussing-Kammern	40
3.12.2 Elektrophysiologische Messungen (P_d , I_{sc} , G_t)	41
3.12.3 Messung der unidirektionalen Fluxraten (J_{ms} und J_{sm})	43
3.12.3.1 Kalziumfluxraten	43
3.12.3.2 Fluoresceinfluxraten	45
3.12.4 Versuchsablauf der funktionellen Untersuchungen	46
3.13 Statistik und Darstellung der Ergebnisse	47
4. Ergebnisse	49
4.1 Bestimmung ausgewählter <i>In-vivo</i> -Parameter	49
4.1.1 Lebendmassezunahme und Futteraufnahme	49
4.1.2 Serummetabolite im Blutplasma	50
4.1.3 Konzentration freier Aminosäuren	51
4.2 RT-qPCR	53
4.2.1 TRP-Kanal mRNA-Expression im Pansen und Jejunum	53
4.2.2 Tight junction mRNA-Expression im Pansen und Jejunum	53
4.3. Funktionelle Untersuchungen in der Ussing-Kammer	56
4.3.1 Auswirkung bioaktiver Pflanzenlipide und mukosaler Natriumverfügbarkeit auf elektrophysiologische Eigenschaften	56
4.3.1.1 Langzeit- und akute Effekte im Pansen	56
4.3.1.2 Langzeit- und akute Effekte im Jejunum	57
4.3.2 Auswirkung bioaktiver Pflanzenlipide und mukosaler Natriumverfügbarkeit auf Kalziumfluxraten	60
4.3.2.1 Langzeit- und akute Effekte im Pansen	60
4.3.2.2 Langzeit- und akute Effekte im Jejunum	63

4.3.3 Auswirkung bioaktiver Pflanzenlipide und mukosaler Natriumverfügbarkeit auf Fluoresceinfluxraten	65
4.3.3.1 Fluoresceinfluxraten im Pansen	66
4.3.3.2. Fluoresceinfluxraten im Jejunum	66
4.3.4 Korrelationsanalysen	69
4.3.4.1 Beziehung unidirektionaler Kalzium- und Fluoresceinfluxraten	69
4.3.4.2 Beziehung der Gewebeleitfähigkeit und Fluoresceinfluxraten	71
5. Diskussion	73
5.1 Kritische Betrachtung der angewandten Methoden	73
5.2 Diskussion der Ergebnisse	75
5.2.1 Kalziumtransport im Pansen	75
5.2.1.1 Allgemeine Betrachtung des ruminalen Kalziumtransports	75
5.2.1.2 Funktionelle Expression eines Ca ²⁺ /H ⁺ -Austauschers	76
5.2.1.3 Rolle von TRP-Kanälen	76
5.2.2 Auswirkung bioaktiver Pflanzenlipide	79
5.2.2.1 Einfluss auf ausgewählte <i>In-vivo</i> -Parameter	79
5.2.2.2 Einfluss auf den ruminalen Kalziumtransport	80
5.2.3 Kalziumtransport im Darm	82
5.2.4 Parazelluläre Kalziumpermeation	84
5.2.4.1 Auswirkungen von bioaktiven Pflanzenlipiden auf die gastrointestinale Barrierefunktion	84
5.2.4.2 Einsatz des parazellulären Markers Fluorescein im Pansen und Darm	87
5.2.5 Einsatz bioaktiver Pflanzenlipide zur Hypokalzämieprävention	89
5.2.6 Schlussfolgerung	90
5.2.7 Ausblick	93
6. Zusammenfassung	94
7. Summary	96
8. Literaturverzeichnis	98
Publikationsverzeichnis	IX
Danksagung	XI
Finanzierungsquellen	XII
Selbstständigkeitserklärung	XIII

Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung 1</u> : Transzellulärer Kalziumtransport im Darm	13
<u>Abbildung 2</u> : Strukturformel ausgewählter bioaktiver Pflanzenlipide.....	18
<u>Abbildung 3</u> : Strukturelle Organisation eines TRP-Protomers.	20
<u>Abbildung 4</u> : Schematische Darstellung einer Ussing-Kammer	39
<u>Abbildung 5</u> : Chronogramm des Ussing-Kammer-Versuchs.....	47
<u>Abbildung 6</u> : TRP-Kanal mRNA-Expression im Pansen und Jejunum.....	54
<u>Abbildung 7</u> : Tight junction mRNA-Expression im Pansen und Jejunum.....	55
<u>Abbildung 8</u> : Basale Kalziumfluxraten im Pansen.....	61
<u>Abbildung 9</u> : Mentholinduzierte Änderungen der Kalziumfluxraten im Pansen.....	62
<u>Abbildung 10</u> : Basale Kalziumfluxraten im Jejunum	64
<u>Abbildung 11</u> : Mentholinduzierte Änderung der Kalziumfluxraten im Jejunum.	65
<u>Abbildung 12</u> : Fluoresceinfluxraten im Pansen	67
<u>Abbildung 13</u> : Fluoresceinfluxraten im Jejunum.....	68
<u>Abbildung 14</u> : Beziehung der Kalzium- und Fluoresceinfluxraten im Pansen.....	69
<u>Abbildung 15</u> : Beziehung der Kalzium- und Fluoresceinfluxraten im Jejunum	70
<u>Abbildung 16</u> : Beziehung der Fluoresceinfluxraten und Gewebeleitfähigkeit im Pansen.	71
<u>Abbildung 17</u> : Beziehung der Fluoresceinfluxraten und Gewebeleitfähigkeit im Jejunum	72
<u>Abbildung 18</u> : Kalziumresorptionsmodell des Pansens	82

Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1</u> : Kalziumfluxraten im Pansen	14
<u>Tabelle 2</u> : Inhaltsstoffe und Zusammensetzung der verwendeten Futtermittel	27
<u>Tabelle 3</u> : Primer- und Sondensequenzen der Ziel- und Referenzgene	36
<u>Tabelle 4</u> : Chemische Zusammensetzung der Inkubationslösungen	41
<u>Tabelle 5</u> : Beispielhafte Ussing-Kammer-Paarung anhand eines Versuchstieres	43
<u>Tabelle 6</u> : Lebendmasse, Lebendmassezunahme und Trockenmasseaufnahme	50
<u>Tabelle 7</u> : Ausgewählte Serummetabolite im Blutplasma	51
<u>Tabelle 8</u> : Konzentration freier Aminosäuren im Blutplasma	52
<u>Tabelle 9</u> : Elektrophysiologische Parameter im Pansen	58
<u>Tabelle 10</u> : Elektrophysiologische Parameter im Jejunum.....	59

Abkürzungsverzeichnis

1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-Dihydroxyvitamin D, Calciferol
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
cDNA	complementary DNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
Cldn	Claudin
C _t -Wert	<i>cycle threshold</i> -Wert (Zyklus-Schwellwert)
DCAD	<i>dietary cation anion difference</i> (Fütterung anionenreicher Rationen)
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
Eq	Equivalent (Einheit des Kurzschlussstromes); Strom, welcher dem Transport von 1 mol einfach positiv geladenen Ionen entspricht
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G _t	Gewebeleitfähigkeit
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
I.E.	Internationale Einheiten
I _c	Klemmstrom
I _{sc}	Kurzschlussstrom
J	Fluxrate
k-PCR	konventionelle Polymerasekettenreaktion
LSM	Least square means (Mittelwert der kleinsten Quadrate)
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)Ethansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
ms	mukoserosal (von mukosal nach serosal)
NHE	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
NMDG	<i>N</i> -Methyl-D-Glucamin
NXC	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
Occl	Occludin
PBLC	<i>plant bioactive lipid compounds</i> (bioaktive Pflanzenlipide)
PBLC-H	<i>plant bioactive lipid compounds feeding group high</i> (160 mg/d)
PBLC-L	<i>plant bioactive lipid compounds feeding group low</i> (80 mg/d)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P _d	transepitheliale Potentialdifferenz
PMCA	Plasmamembran-Kalzium-ATPase
PTH	Parathormon

RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro min)
RT-qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
SCFA	<i>short chain fatty acids</i> (kurzkettige Fettsäuren)
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
sm	seromukosal (von serosal nach mukosal)
TJ	<i>tight junction</i> (Epithelschlussleiste)
TRP-Kanal	<i>transient receptor potential-Kanal</i> (Transiente Rezeptor-Potentialkanäle)
TRPA	<i>transient receptor potential-Kanal</i> der Unterfamilie ANKTM1
TRPM	<i>transient receptor potential-Kanal</i> der Unterfamilie Melastatin
TRPV	<i>transient receptor potential-Kanal</i> der Unterfamilie Vanilloid
UPLC	<i>ultra performance liquid chromatography</i> (Ultra-Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie)
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
YWHAZ	14-3-3 Protein Zeta/Delta
ZO	Zonula Occludens-Protein

Definitionen

Subklinische Hypokalzämie: Gesamtkalziumkonzentration des Blutes $< 2,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($< 8 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$) ohne klinisch ersichtliche Symptome.

Klinische Hypokalzämie: Hypokalzämische Stoffwechsellage mit klinisch ersichtlichen Symptomen.

PBLC: Bioaktive Pflanzenlipide als Komponenten der ätherischen Öle.

Mentholreiche PBLC: Mischung verschiedener PBLC (OAX17, PerformaNat GmbH, Berlin, Deutschland) mit einem Hauptbestandteil an Menthol ($> 90\%$) und geringeren Anteilen an Thymol und Zimtaldehyd.

Supplementierung: Vorfütterung einer Mischung mentholreicher PBLC, welche dem Kraftfutter zugesetzt wurden.

Epithel: Funktionell aus einer Zellschicht bestehende Lage gastrointestinaler Epithelzellen der *Lamina epithelialis mucosae* der *Tunica mucosa*.

Mukosal: Apikale, dem Lumen zugewandte Seite des Epithels.

Serosal: Basolaterale, dem Blut zugewandte Seite des Epithels.

Resorption: Transepithelialer Transport eines Stoffes in mukoserosaler Richtung.

Sekretion: Transepithelialer Transport eines Stoffes in seromukosaler Richtung.

Tracer: Radioaktiv oder fluoreszenzmarkierter Stoff zur Detektion epithelialer Transportraten.

Heisse Probe: Probennahme erfolgt auf derselben Seite der Tracerzugabe.

Kalte Probe: Probennahme erfolgt auf der gegenüberliegenden Seite der Tracerzugabe.

Fluxrate: Die Bewegung eines Tracers über ein Epithel pro Fläche und Zeiteinheit.

Fluxperiode: Zeitspanne zwischen zwei Probenahmen in der Ussing-Kammer, um den epithelialen Transport eines Tracers messbar zu machen.

Tight junction (TJ)-Proteine: Proteine der Epithelschlussleisten, darunter Claudine (Cldn), Occludin (Occl) und Zonula Occludens (ZO).

1. Einleitung

Der Kalziumhaushalt des Wiederkäuers wird mit dem plötzlichen Einsetzen der Laktation nach der Kalbung stark beansprucht, da jegliche Kalziumreserven für die Milchbildung aufgewendet werden (Neves et al. 2018). Kann der Entzug von Blutkalzium nicht kompensiert werden, kommt es zur Hypokalzämie (Reinhardt et al. 2011; Venjakob et al. 2017) mit weitreichenden tiergesundheitslichen und ökonomischen Folgen (Martinez et al. 2014). Gängige Präventionskonzepte zielen unter anderem auf eine gesteigerte gastrointestinale Kalziumresorption ab (Venjakob et al. 2017; Wilkens et al. 2020), was jedoch ein grundlegendes Verständnis der beteiligten Transportmechanismen unabdingbar macht.

Die Mechanismen des Kalziumtransports im Darm des Wiederkäuers sind hinreichend belegt und bestehen aus einem dreistufigen Prozess (Goff 2018; Wilkens et al. 2020). Der Pansen des Wiederkäuers trägt zu einem wesentlichen Teil der Kalziumresorptionsleistung bei (Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b; Schröder et al. 2015; Klinger et al. 2016; Rosendahl et al. 2016). Dabei besteht jedoch noch weitreichende Unklarheit über die involvierten Mechanismen (Schröder und Breves 2006; Wilkens et al. 2009; Wilkens et al. 2011; Wilkens und Muscher-Banse 2020).

Bioaktive Pflanzenlipide (PBLC) sind als Agonisten diverser nicht-selektiver *transient receptor potential* (TRP)-Kanäle bekannt (Nilius und Szallasi 2014; Moran 2018). TRPA1 und TRPV3 wurden kürzlich im Pansen des Wiederkäuers nachgewiesen (Rosendahl et al. 2016; Liebe et al. 2020), besitzen Leitfähigkeiten für Kalzium (Chung et al. 2005; Wang et al. 2008; Karashima et al. 2010; Qu et al. 2019) und werden von dem PBLC Menthol stimuliert (Vogt-Eisele et al. 2007; Karashima et al. 2010; Kim et al. 2016). Eine direkte Mentholapplikation resultierte *ex vivo* in einer gesteigerten Kalziumresorption des Pansens (Rosendahl et al. 2016). Dieselbe Mentholkonzentration führte *in vitro* über eine Öffnung von TRPV3-Kanälen zu erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentrationen (Schrapers et al. 2018). *In vivo* wurde gezeigt, dass sich eine mehrwöchige Supplementierung mit mentholreichen PBLC in erhöhten Kalziumblutspiegeln bei Rindern niederschlägt (Braun et al. 2019), was eine Beteiligung von mentholaktivierbaren TRP-Kanälen beim Kalziumtransport im Pansen plausibel erscheinen lässt.

Kurzkettige Fettsäuren (SCFA) können in protonierter Form die Zellmembran des Pansens passieren (Walter und Gutknecht 1986) und deprotonieren anschließend im Intrazellularraum (Gäbel et al. 2002; Aschenbach et al. 2011). Diese intrazelluläre Ansäuerung stimuliert

höchstwahrscheinlich die Kalziumtransportraten des Pansenepithels und lässt die Beteiligung eines $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Austauschers bei der ruminalen Kalziumaufnahme als denkbar erscheinen (Schröder et al. 2001; Schröder et al. 2015).

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen hat das eigene Versuchsvorhaben zwei wesentliche Zielsetzungen. Zum einen soll untersucht werden, ob sich der beim Rind beobachtete positive Effekt einer akuten mentholinduzierten Kalziumfluxstimulation (Rosendahl et al. 2016) auch beim Modelltier Schaf reproduzieren lässt und sich gleichsam in einer Erhöhung des Kalziumblutspiegels niederschlägt (Braun et al. 2019). Zum anderen soll geklärt werden, ob die funktionelle Expression des $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Austauschers neben der Expression von mentholaktivierbaren TRP-Kanälen denkbar ist und ob sich etwaige funktionelle Änderungen des Kalziumtransports auch auf struktureller Ebene bestätigen lassen.

Schlussendlich sollen die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zur Klärung der grundlegenden physiologischen Frage nach den im Pansen involvierten Kalziumtransportmechanismen beitragen und darüber hinaus den Einsatz von mentholreichen PBLC als Alternative oder Ergänzung zu gängigen Hypokalzämieprophylaxemaßnahmen beurteilen.

2. Literaturteil

2.1 Kalzium

2.1.1 Kalziumverteilung im Körper

Kalzium liegt zu 99% als Strukturelement vor und bildet die substantielle Masse der Knochen (Flynn 2003). Die verbleibenden 1% befinden sich extraossär und damit in den intra- und extrazellulären Flüssigkeiten (Peacock 2010). Der Intrazellularraum weist mit 10^{-4} mmol·l⁻¹ eine äußerst geringe Kalziumkonzentration auf. In den extrazellulären Flüssigkeiten, allen voran dem Blut, kommt Kalzium beim Wiederkäuer in einem Konzentrationsbereich von 2 – 2,5 mmol·l⁻¹ vor (Roche und Berry 2006; Martinez et al. 2012; Goff 2018). Ausgehend von einem Körpergewicht von 600 kg und einem Blutvolumen von 7% des Körpergewichts (von Engelhardt 2015) entspricht die im Blut eines Rindes befindliche Kalziummenge \approx 4 g.

2.1.2 Physiologische Rolle von Kalzium

Das frei im Körper vorkommende Kalzium besitzt für grundlegende physiologische Prozesse eine vielfältige sowie entscheidende Rolle (Robertson und Marshall 1981). Beim Wiederkäuer sei hierbei hervorzuheben, dass Kalzium bei der Kontraktion glatter Muskelzellen, beispielsweise zur Pansenmotilität (Jorgensen et al. 1998; Hara et al. 2003), der Gebärmutterkontraktion (Curtis et al. 1983; Rodriguez et al. 2017) oder zum Verschluss des Strichkanals des Euters (Goff und Kimura 2004; Paulrud 2005) eine wichtige Funktion einnimmt. Darüber hinaus ist Kalzium auch bei der Kontraktion quergestreifter Muskelzellen (Rossi und Dirksen 2006; Floyd et al. 2008; Han et al. 2015), der Transmitterfreisetzung im synaptischen Spalt (Santafe et al. 2005) und bei der Aktivierung des Immunsystems beim Wiederkäuer essentiell (Kimura et al. 2006; Immler et al. 2018). Dabei sind die von Kalzium ausgehenden Effekte bereits durch geringste Konzentrationsänderungen auslösbar (Leo et al. 2005; Ramasamy 2006) und es erscheint vor diesem Hintergrund selbsterklärend, dass die Kalziumkonzentration innerhalb enger Grenzen reguliert werden muss (Robertson und Marshall 1981).

2.1.3 Hormonelle Regulation der Kalziumhomöostase

Um die Kalziumhomöostase langfristig aufrechtzuerhalten, müssen sich Aufnahme-, Freisetzungs- und Exkretionsmechanismen bedarfsgerecht an den jeweiligen Stoffwechsel- und Leistungszustand des Körpers anpassen (Nordin 1976; Peacock 2010). Die Regulation der Kalziumhomöostase wird durch ein Zusammenspiel mehrerer Hormone gesteuert, welche gastrointestinale Absorption, renale Retention und Mobilisierung von Knochenkalzium beeinflussen (Herm et al. 2015; Nemeth et al. 2017; Wilkens und Muscher-Banse 2020).

Calcitriol ($1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$) wird bei erniedrigter Blutkalziumkonzentration aus 25-Hydroxy-Vitamin D_3 gebildet und vermittelt eine kalziumsteigernde Wirkung (Dittmer und Thompson 2011; Jones 2013). Calcitriol führt beim Wiederkäuer auf genomischem Wege, nach einer Zeitverzögerung von ca. 3–6 h (Kutuzova und Deluca 2004), zu einer Kalziumtransportstimulation im Darm (Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b; Elfers et al. 2016). Calcitriol führt darüber hinaus zu einer verstärkten renalen Kalziumretention (Dusso et al. 2005; Vieira-Neto et al. 2017), welche allerdings beim Wiederkäuer von geringer Bedeutung zu sein scheint (Herm et al. 2015; Firmenich et al. 2018; Wilkens und Muscher-Banse 2020). Eine sinkende Blutkalziumkonzentration führt innerhalb weniger Sekunden zur Freisetzung von **Parathormon** (PTH) (Kumar und Thompson 2011), welches die Kalziummobilisierung aus dem Knochenspeicher stimuliert (Ma et al. 2001; Ben-Awadh et al. 2014; Kovacs 2017). Gleichzeitig fördert PTH die Bildung von Calcitriol und trägt so indirekt zu einer erhöhten intestinalen Kalziumresorption bei (Fraser und Kodicek 1973). PTH stimuliert beim Monogastrier die renale Kalziumretention, eine ähnliche Wirkweise wird auch bei Wiederkäuern vermutet (van Abel et al. 2005b; Firmenich et al. 2018). **Calcitonin** wird bei erhöhter Kalziumkonzentration ausgeschüttet und ist für eine Senkung des Blutkalziums verantwortlich (Hoff et al. 2002). Aufgrund widersprüchlicher Studienergebnisse ist die Bedeutung von Calcitonin beim Wiederkäuer jedoch noch unklar (Shappell et al. 1987; Bandzaite et al. 2005).

2.2 Hypokalzämie der Milchrinder

2.2.1 Formen der Hypokalzämie

Die **klinische Hypokalzämie** der Milchkuh, auch Milchfieber oder Gebärpause genannt, wird durch eine sinkende Blutkalziumkonzentration ausgelöst (Martin-Tereso und Martens 2014). Die Symptome reichen von leichten Bewegungsstörungen bis zum Festliegen (Chapinal et al.

2011; Roberts et al. 2012). Das Auftreten der hypokalzämischen Stoffwechselsituation ist eng an das plötzliche Einsetzen der Laktation nach der Kalbung geknüpft (Neves et al. 2018). Mit dem Einsetzen der Milchbildung steigt der Kalziumbedarf sprunghaft auf bis zu $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-0,75}$ an (Horst et al. 2005), was an einem Tag extrapoliert dem ≈ 10 -fachen des im Blut befindlichen Kalziums entspricht (Goff et al. 1991; Mann et al. 2016). Um eine Hypokalzämie zu vermeiden, muss dieser Kalziumverlust durch eine Aktivierung der gastrointestinalen Resorption und Knochenmobilisierung kompensiert werden. Eine unzureichende Aktivierung dieser kalziumhomöostatischen Wirkmechanismen wird durch die Inzidenz des klinischen Milchfiebers bei Erstkalbinnen von 0–1%, welche auf bis zu 10–16,1% bei Kühen der vierten Laktation ansteigt (Reinhardt et al. 2011; Venjakob et al. 2017) belegt. Das Erkrankungsrisiko steigt dabei mit jeder neuen Laktationsperiode um 9% (DeGaris und Lean 2008).

Sind keine klinischen Symptome bei erniedrigtem Blutkalziumgehalt ($< 2,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) (Houe et al. 2001; Roche und Berry 2006) feststellbar, spricht man von einer **subklinischen Hypokalzämie**. Wie auch beim klinischen Milchfieber kommt es zu einer starken Inzidenzzunahme mit zunehmender Laktationszahl. Bei Erstkalbinnen sind 5,7–25% der Kühe betroffen. Bereits in der zweiten Laktation steigt die Inzidenz auf 29–41%, während über die Hälfte der Kühe ab der vierten Laktation von einer subklinischen Hypokalzämie betroffen sind (Reinhardt et al. 2011; Venjakob et al. 2017).

2.2.2 Tiergesundheitliche und wirtschaftliche Bedeutung

Absolut betrachtet sind mehr Tiere von der subklinischen als von der klinischen Form der Hypokalzämie betroffen (Reinhardt et al. 2011; Venjakob et al. 2017). Bereits ein subklinisches Absinken des Kalziumspiegels macht die Tiere um 3- bis 5-mal empfänglicher für postpartale Erkrankungen (Seifi et al. 2011; Chapinal et al. 2011) und ein abgesenkter Blutkalziumspiegel stellt das größte Risiko für eine frühzeitige Schlachtung dar (Probo et al. 2018), wobei hypokalzämische Tiere um 50–69% häufiger geschlachtet werden (Roberts et al. 2012; Venjakob et al. 2018). Somit ist die tiergesundheitliche und damit eng verknüpfte wirtschaftliche Bedeutung der Hypokalzämie als sehr hoch einzustufen (Rodriguez et al. 2017), wobei die ökonomischen Verluste durch die subklinische Erkrankungsform überwiegen (Oetzel 2011). Der wirtschaftliche Gewinn eines Betriebes kann beispielsweise durch die Einführung von Präventionsmaßnahmen um 3–5 US-Dollar je Kalbung erhöht werden (McArt und Oetzel 2015).

2.2.3 Präventionskonzepte

Gegenwärtig gibt es diverse Hypokalzämiepräventionskonzepte (DeGaris und Lean 2008; Goff 2008; Venjakob et al. 2017). Die Beeinflussung der gastrointestinalen Absorptionsmechanismen ist dabei besonders hervorzuheben, da alternative Wege zur Aufrechterhaltung der Normokalzämie beim Wiederkäuer eingeschränkt sind (Schröder und Breves 2006; Wilkens und Muscher-Banse 2020). Gerade die Prävention der subklinischen Erkrankungsform bedarf dabei der Entwicklung neuer Strategien (Wilkens et al. 2020).

Die Fütterung von anionenreichen Rationen (*dietary anion cation difference* (DCAD)-Konzept) vor der Geburt ist als wirkungsvolle Präventionsmaßnahme weitreichend anerkannt (Moore et al. 2000; Santos et al. 2019). Dabei wird im Futter ein Anionenüberschuss erzeugt, indem der Ration proportional mehr starke Anionen wie Chlorid und Schwefel als starke Kationen wie Natrium und Kalium zugegeben wird, was zu einer kompensierten metabolischen Azidose führt (Gelfert et al. 2007). Diese Ansäuerung des Blutes führt zu einer verstärkten renalen Kalziumausscheidung (Yeh et al. 2003), welche eine Kalziummobilisierung aus den Körperspeichern nach sich zieht. Eine alternative Erklärungshypothese geht von einer verstärkten Sensitivität des Gewebes gegenüber PTH in einer azidotischen Stoffwechsellage aus, was ebenfalls die Knochenkalziummobilisation stimuliert (Wilkens et al. 2012a; Goff et al. 2014). Damit wird die Kalziumhomöostase bereits vor der Geburt auf einen erhöhten postpartalen Kalziumbedarf vorbereitet und die Kompensationsmechanismen des Körpers auf eine Kalziumbereitstellung sensibilisiert. Mögliche negative Langzeiteffekte einer DCAD-Fütterung sind nur unzulänglich beschrieben (Gelfert et al. 2007).

Eine prophylaktische Verabreichung von Vitamin D₃ und/oder Calcitriol (Wilkens et al. 2020) steigert die intestinale Kalziumresorption und letztendlich die Blutkalziumkonzentration (Wilkens et al. 2010, 2011). Mehrere Untersuchungen stellen jedoch die Wirksamkeit zur Hypokalzämieprophylaxe in Frage, da es nach der Gabe zu einer Hemmung der 25-Hydroxilierung von Vitamin D₃ kommt (Hollis et al. 1977), was einen Rebound-Effekt mit verringerter intestinaler Kalziumresorption nach sich zieht (Taylor et al. 2008; Wilkens et al. 2012a; Weiss et al. 2015; Vieira-Neto et al. 2017). Darüber hinaus ist die Plasmahalbwertszeit von Calcitriol beschränkt und eine Injektion muss in einem engen Zeitfenster vor der Geburt erfolgen, was eine effektive Anwendung anspruchsvoll gestaltet (Wilkens et al. 2020). Nicht zuletzt müssen Konzentrationen verabreicht werden, die an der Grenze zur Toxizität liegen (Littledike und Horst 1982).

Ziel einer oralen Kalziumgabe um den Geburtszeitraum ist es, die Dauer des akuten Kalziummangels zu überbrücken, bis hormonelle Mechanismen der Kalziumhomöostase greifen (Goff und Horst 1993; Oetzel 1996; Wilkens et al. 2020). Kalzium soll über einen längeren Zeitraum im Gastrointestinaltrakt absorbiert werden, was zu einer anhaltenden Stabilisation des Blutkalziumspiegles führt (Leno et al. 2018; Valdecabres et al. 2018). Kalzium wird nach oraler Supplementierung zu großen Teilen im Pansen resorbiert (Schröder und Breves 2006). Die dabei beteiligten Transportproteine und Absorptionswege sind bislang nur unzureichend identifiziert (Wilkens und Muscher-Banse 2020; Wilkens et al. 2020), weswegen im nachfolgenden Abschnitt auf den gastrointestinalen Kalziumtransport beim Wiederkäuer eingegangen wird.

2.3 Transepithelialer Kalziumtransport des Wiederkäuers

Um in den Körperkreislauf zu gelangen, muss Kalzium im Gastrointestinaltrakt resorbiert werden. Die Epithelzellen werden durch interzelluläre Schlussleisten (*tight junctions*, **TJ**) zu einem geschlossenen Zellverband verbunden (Turner 2009; Shen et al. 2011), welcher die Digesta vom Blutkreislauf trennt. Die Kompartimentierung in ein luminales und ein basolaterales Segment ist für den Stoffaustausch mit der Umwelt grundlegend (Fakler und Fahlke 2010; Goff 2015). Abhängig von den vorherrschenden Eigenschaften der TJ und der Ausstattung der Epithelzellen mit Transportproteinen schlägt Kalzium vornehmlich den **para-** oder **transzellulären** Absorptionsweg ein (Bronner 1987; Thews und Vaupel 2005; Penner et al. 2014), welche nachfolgend veranschaulicht werden sollen.

2.3.1 Parazelluläre Permeation

Die **parazelluläre** Kalziumpermeation ist ein **passiver** Prozess und erfolgt durch den Zwischenzellraum. Treibende Kraft ist dabei ein chemischer Gradient (Hoenderop et al. 2005), welcher maßgeblich von der Kalziumkonzentration der Digesta bestimmt wird. Das zwischen dem Lumen des Gastrointestinaltraktes und dem Blut herrschende positive elektrische Potential wirkt für sich betrachtet einer Resorption des positiv geladenen Kalziumions entgegen (Wilkens et al. 2016). Dieser entgegengerichtete elektrische Gradient wird nach der Nernst-Gleichung ab einer luminalen Kalziumkonzentration von $6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ durch den chemischen Gradienten kompensiert (Bronner 1987; Höller et al. 1988; Wilkens und Muscher-Banse 2020). Da die parazelluläre Kalziumpermeation von der luminalen Kalziumkonzentration abhängt, erfordert eine parazelluläre Nettoresorptionsbewegung eine

hohe luminale Kalziumkonzentration (Bronner und Pansu 1999), wie sie beispielsweise nach einer oralen Kalziumsupplementierung im Pansen erreicht wird (Goff und Horst 1993).

Die Permeabilität der TJ, welche eine grundlegende Voraussetzung für die parazelluläre Permeation darstellt, ist stark gewebeabhängig (Schultz 1972; Bronner und Pansu 1999). Das Epithel des Dünndarmes wird als vergleichsweise *leaky* (durchlässig) bezeichnet, weshalb die Kalziumpermeation in bestimmten Segmenten fast vollständig auf parazellulärem Wege erfolgen kann (Liebich 2010; Wilkens et al. 2011). Das Pansenepithel nimmt eine Sonderrolle im Gastrointestinaltrakt ein und wird als *tight* (dicht) charakterisiert und ist für eine parazelluläre Permeation weniger durchlässig (Schröder und Breves 2006). Studien, welche die Barrierefunktion verschiedener Abschnitte des Gastrointestinaltraktes von Schafen und Ziegen untersuchten, zeigten eine vielfach höhere parazelluläre Durchlässigkeit von Jejunum- gegenüber Pansenepithelien (Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b; Elfers et al. 2015; Klinger et al. 2016). Dabei korrelierten unidirektionale Mannitol- und Kalziumfluxraten im Duodenum und Colon unabhängig von ihrer Richtung signifikant, was als Indiz für eine nahezu vollständige Kalziumpermeation auf parazellulärem Wege interpretiert wurde. Im Jejunum und Pansen hingegen korrelierten lediglich die Fluxraten in seromukosaler Richtung, was Grund zu der Vermutung gibt, dass der Kalziumtransport in mukoserosaler Richtung (zumindest teilweise) durch transzelluläre Mechanismen vermittelt werden muss (Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b; Elfers et al. 2015).

Tight junctions werden durch das Zusammenspiel einer heterogenen Gruppe von interzellulären Proteinen geformt, welche ladungs- und gröÙenselektive Poren zwischen den Epithelzellen bilden (Van Itallie und Anderson 2004) und somit für die charakteristische parazelluläre Permeabilität der jeweiligen Epithelien verantwortlich sind (Günzel und Fromm 2012; Penner et al. 2014). Zu diesen interzellulären Proteinen werden Occludin (**Occl**), Claudine (**Cldn**) und Zonula Occludens (**ZO**)-Proteine gezählt (Markov et al. 2015; Stumpff et al. 2011). Cldn1, -3, -4 und Occl gelten als barriereverstärkend und gehören somit zu den abdichtenden TJ-Proteinen (Van Itallie et al. 2001; Furuse et al. 2002). Cldn2 formt eine parazelluläre Pore, die ionenkanalähnliche Eigenschaften besitzt und für Kalzium selektiv ist (Fujita et al. 2008) und wird deshalb zu den kalziumpermeabilitätssteigernden TJ-Proteinen gezählt (Amasheh et al. 2002; Rosenthal et al. 2010; Elfers et al. 2016). Cldn7 besitzt ambivalente Eigenschaften, wobei abdichtende und auflockernde Eigenschaften beschrieben wurden (Kirschner et al. 2009; Markov et al. 2015). Occl vermittelt die epitheliale Permeabilität für Makromoleküle (Al-Sadi et al. 2011). In Occl-knock-out Mäusen konnte eine Erhöhung des kalziumpermeablen Cldn2 festgestellt werden, was zu einer funktionell gesteigerten Kalziumpermeabilität beitrug (Wong und Gumbiner 1997; Al-Sadi et al. 2011). Dieser

Zusammenhang wurde im Jejunum von Ziegen bestätigt, was darauf hindeutet, dass Occl bei der Bestimmung der Zusammensetzung von TJ in regulatorischer Weise eine Rolle spielt (Elfers et al. 2016). ZO1 und -2 sind stabilisierende Proteine, die eine Verbindung von Occl und/oder Cldn zum Zytoskelett der Zelle herstellen (Itoh et al. 1999) und so den korrekten Zusammenbau der TJ gewährleisten (Stevenson et al. 1986; Fanning und Anderson 2009; Van Itallie et al. 2009; Rodgers et al. 2013). Eine Depletion von entweder ZO1 oder -2 in kultivierten Zellen hat lediglich subtile Auswirkungen auf die Struktur und Funktion der Grenzflächen (Umeda et al. 2004; McNeil et al. 2006; Hernandez et al. 2007), während die Depletion von ZO1 und -2 zu einem vollständigen Struktur- und Funktionsverlust führt (Umeda et al. 2006).

Die Durchlässigkeit der parazellulären Barriere lässt sich durch die Fütterung modulieren (Amasheh et al. 2002; Alexander et al. 2014; Elfers et al. 2016; Zhang et al. 2019). Mit dem Futter verabreichte bioaktive Pflanzenlipide (*plant bioactive lipid compounds*, **PBLC**) können die epitheliale Barriere des Gastrointestinaltraktes bei Nutztieren beeinflussen (Patra et al. 2018). Das PBLC Menthol erhöht die Permeabilität der parazellulären Barriere durch zwei Wirkweisen. Zum einen moduliert Menthol in hohen Konzentrationen die Expression bestimmter TJ-Proteine (Zhang et al. 2017), was eine parazelluläre Permeabilitätssteigerung nach sich zieht (Yu et al. 2013). Zum anderen bewirkt Menthol in niedrigeren Konzentrationen über mehrere Zwischenschritte die Öffnung von TJ-Proteinen und erhöht damit die parazelluläre Durchlässigkeit (Mukaiyama et al. 2020). Die Auswirkungen einer mentholreichen PBLC-Supplementierung in moderater Dosierung auf strukturelle und funktionelle Epitheleigenschaften beim Wiederkäuer sind gegenwärtig nicht bekannt.

2.3.2 Transzellulärer Transport

Transzelluläre Transportmechanismen sind vorwiegend an dichten Epithelien zu beobachten und lassen sich in passive und aktive Transportprozesse gliedern (Bronner und Pansu 1999; Schröder und Diener 2015). Der **passive transzelluläre Transport** erfolgt immer entlang eines Gradienten, welcher durch einen chemischen Konzentrationsunterschied oder eine elektrische Spannung erzeugt wird. Kalziumionen sind zweifach positiv geladen und können die Zellmembran nicht über einfache Diffusion passieren. Um einen Transport zu ermöglichen, müssen Transmembranproteine, z.B. Ionenkanäle, in der Zellmembran exprimiert werden. Einige Ionenkanäle besitzen eine ausgeprägte Selektivität für Kalzium, während nicht-selektive Kanäle Permeabilitäten für alle Kationen aufweisen können (Owsianik et al. 2006; Schröder und Diener 2015).

Der **aktive transzelluläre Transport** findet hingegen unter der Hydrolyse von ATP statt. Dabei können Ionen entgegen eines elektrochemischen Gradienten transportiert werden. Aktive Transportmechanismen lassen sich dabei in einen primär und sekundär aktiven Transport einteilen (Korbmacher et al. 2019).

Beim **primär** aktiven Transport sind Proteine beteiligt, welche die Energie direkt aus der Hydrolyse von ATP gewinnen. Im Gastrointestinaltrakt von Wiederkäuern befindet sich auf der basolateralen Zellmembran die Ca^{2+} -ATPase, die Kalziumionen entgegen eines starken Konzentrationsgradienten aus der Epithelzelle ins Blut befördert (Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b). Ein weiteres Beispiel für den primär aktiven Transport stellt die Na^+/K^+ -ATPase dar, welche sich in der basolateralen Membran der Epithelzelle befindet und pro gespaltenem ATP drei Na^+ -Ionen aus der Zelle herauspumpt, während zwei K^+ -Ionen in die Zelle hineingepumpt werden. Zum einen tritt dabei ein Ladungsnettotransport auf, der zur Aufrechterhaltung des negativen Membranpotentials beiträgt. Zum anderen entsteht ein Natriumgradient, der als grundlegende Triebkraft zahlreicher **sekundär** aktiver Transportprozesse, wie dem im Pansen vorkommenden Na^+/H^+ -Austauscher (**NHE**) fungiert (Graham et al. 2007; Yang et al. 2012). Dabei werden elektroneutral Protonen gegen Natrium aus der Pansenepithelzelle ausgetauscht. Ein weiterer sekundärer Transportprozess wird durch den in der Niere und dem Gastrointestinaltrakt vorkommenden $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (**NCX1**) vermittelt, wobei der Natriumgradient genutzt wird, um Kalzium aus der Epithelzelle auszuschleusen (Hoenderop et al. 2002; Wilkens und Muscher-Banse 2020).

Metaanalysen und Literaturarbeiten kamen übereinstimmend zu dem Ergebnis, dass das hinreichend belegte monogastrische Kalziumresorptionsmodell größtenteils auf den Darm des Wiederkäuers anwendbar ist (Schröder und Breves 2006; Wilkens und Muscher-Banse 2020; Wilkens et al. 2020). Im Vergleich zum Monogastrier wird der Gastrointestinaltrakt des Wiederkäuers um ein Vormagensystem ergänzt, das einen erheblichen Teil sowohl des Volumens (Purser und Moir 1966; Reynolds et al. 2004) als auch der Kalziumresorptionskapazität bedingt (Schröder und Breves 2006; Goff 2018) und sich grundlegend vom Darm unterscheidet (Schröder et al. 2001; Wilkens et al. 2009; Wilkens et al. 2011). Die grundlegenden funktionellen und lokalen Unterschiede der gastrointestinalen Kalziumresorptionsmechanismen beim Wiederkäuer begründen die nachfolgend getrennte Beschreibung der Mechanismen im Darm und Pansen.

2.3.2.1 Transzellulärer Kalziumtransport im Darm

Schröder et al. (1997) untersuchten in einem Ussing-Kammer-Versuch erstmalig den Kalziumtransport in verschiedenen Abschnitten des Darmes beim Wiederkäuer. Diese Methodik erlaubt neben der Ermittlung der Gewebeleitfähigkeit die Messung von Ionenbewegungen über dem Epithel (Clarke 2009). Darüber hinaus ermöglicht die Ussing-Kammer eine Epithelinkubation unter gradientenfreien Bedingungen, was die Triebkraft für passive Permeationsprozesse vollständig eliminiert. Werden unter diesen gradientenfreien Bedingungen Nettoionenbewegungen messbar, sind diese von aktiver und damit transzellulärer Natur (Ussing 1949; Li et al. 2004). In der Untersuchung von Schröder et al. (1997) war dabei lediglich das Jejunum zum Kalziumnettotransport befähigt, wobei keine Nettotransportleistung im Duodenum, Ileum und Colon gemessen werden konnte. Die Abwesenheit einer aktiven Resorption im Duodenum sowie Colon des Wiederkäuers wurde in mehreren sich anschließenden Studien bestätigt (Sidler-Lauff et al. 2010; Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b; Nemeth et al. 2017), die das Jejunum ins Zentrum der intestinalen Kalziumresorption rückten (Wilkens et al. 2009). Frühe Studien belegen den stimulierenden Effekt einer alimentären Kalziumrestriktion auf die jejunale Kalziumnettoresorption des Schafes, was die Autoren der Studie über eine hormonelle Regulierung spekulieren ließ (Abdel-Hafeez et al. 1982). Eine Regulierbarkeit der Kalziumfluxraten im Jejunum wurde nach Injektion von exogenem Calcitriol in einem Versuch an Schafen bestätigt; dabei war ein ähnlicher Effekt weder im Duodenum noch im Colon messbar (Wilkens et al. 2011). Somit unterliegt die Kalziumresorption im Jejunum bei Wiederkäuern, wie die Kalziumabsorption im Duodenum des Monogastriers (Favus 1985; DeLuca 1988), einer hormonellen Regulation durch Vitamin D₃, wobei identische Transportproteine involviert sind (Schröder und Breves 2006; Wilkens und Muscher-Banse 2020). Folglich wird für die Kalziumresorption im Jejunum des Wiederkäuers angenommen, dass sie weitestgehend nach dem monogastrischen Modell abläuft und aus einem dreistufigen Prozess besteht (Abbildung 1, S. 13).

2.3.2.1.1 Apikaler Einstrom

Im **ersten Teilschritt** der intestinalen Kalziumresorption sind Kanäle der *transient receptor potential (TRP)*-Familie der Untergruppe Vanilloid (TRPV5 und TRPV6) beteiligt, die Kalzium über die apikale Membran in das Zytosol der Darmenterozyten transportieren (den Dekker et al. 2003; Hoenderop et al. 2005; Brown et al. 2005). Im Zytosol wird die ionisierte Kalziumkonzentration auf niedrigem Niveau eng reguliert und es herrscht ein zum Darmlumen negatives Transmembranpotential (siehe Kap. 2.3.2) (Tsuchiya et al. 1980). Dies bedingt eine starke elektrochemische Triebkraft für den passiven Kalziumeinstrom in die Zelle. Aufgrund

der Kalziumselektivität (Peng et al. 2018) und der geschwindigkeitslimitierenden Rolle (van Abel et al. 2005a) beim transzellulären Kalziumtransport werden TRPV5 und TRPV6 als Türhüter der Kalziumresorption bezeichnet (Hoenderop et al. 2000; van Goor et al. 2017), wobei beide Kanäle stark strukturverwandt sind. Die TRPV5-Isoform ist hauptsächlich in der Niere anzutreffen, während die TRPV6-Isoform vorwiegend im Darm zu finden ist (den Dekker et al. 2003; van Goor et al. 2017). Beide Kanäle werden jedoch co-exprimiert, wobei Mischformen aus TRPV5 und TRPV6 (Heterotetramere) beschrieben sind (Nijenhuis et al. 2005). Wilkens et al. (2009) wiesen erstmalig die Expression von TRPV6 im Jejunum von Wiederkäuern nach, was durch nachfolgende Studien verifiziert wurde (Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b). Die Expression beider Kanäle unterliegt beim Wiederkäuer einer hormonellen Kontrolle durch Vitamin D₃. Eine Calcitriolapplikation steigerte dabei sowohl die jejunale mRNA- als auch Proteinexpression und wurde auf funktioneller Ebene von einer gesteigerten Kalziumresorption begleitet (Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b; Elfers et al. 2015).

2.3.2.1.2 Intrazellulärer Transport

Um die intrazelluläre Konzentration freier Kalziumionen auf niedrigem Niveau zu halten, werden diese nach apikalem Eintritt unmittelbar von Proteinen gebunden. Dieser abpuffernde Effekt beschreibt den **zweiten Teilschritt** des transzellulären Kalziumtransportes (Feher et al. 1992; Wasserman und Fullmer 1995). Zu den kalziumbindenden Proteinen werden die Calbindin-Proteine gezählt (Bronner 1987; Feher et al. 1992; Christakos et al. 2018). **Calbindin-D_{9k}** bindet zwei Kalziumionen und wurde im Jejunum des Wiederkäuers auf mRNA- und Proteinexpressionsebene nachgewiesen (Schröder et al. 2001; Yamagishi et al. 2002; Nelson et al. 2002; Sidler-Lauff et al. 2010; Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b).

2.3.2.1.3 Basolaterale Abgabe ins Blut

Die basolaterale Ausschleusung vervollständigt als **dritter Teilschritt** den transzellulären Kalziumtransport. Da Kalzium entgegen eines elektrochemischen Gradienten aus der Zelle gepumpt werden muss, verläuft dieser Schritt unter der Hydrolyse von ATP (Bronner 1987; Hoenderop et al. 2005). Die Plasmamembran-Ca²⁺-ATPase Isoform 1b (**PMCA1b**) wurde auf mRNA- und Proteinexpressionsebene beim Wiederkäuer nachgewiesen (Yamagishi et al. 2006; Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b; Schröder et al. 2015). Dabei wurde eine erhöhte Proteinexpression der PMCA1b nach Calcitriolstimulation im Jejunum festgestellt (Wilkens et al. 2011). Der NCX1 nutzt den durch die Na⁺/K⁺-ATPase erzeugten

Natriumgradienten, um Kalzium aus der Epithelzelle auszuschleusen und ist beim dritten Teilschritt des Kalziumtransports bei vielen Spezies beteiligt (Hoenderop et al. 2005). Im Dünndarm des Wiederkäuers gelang jedoch lediglich der Nachweis auf mRNA-Ebene, während NCX1 auf Proteinexpressionsebene im Jejunum nicht nachweisbar war (Wilkins et al. 2011). Es wurde daraufhin geschlossen, dass PMCA1b im Gastrointestinaltrakt als bedeutendstes basolaterales Transportprotein anzusehen ist (Hoenderop et al. 2005; Diaz de Barboza et al. 2015; Wilkins und Muscher-Banse 2020), was durch Versuche mit Na^+/K^+ -ATPase-Inhibitoren beim Wiederkäuerdarm bestätigt wurde (Schröder et al. 1997).

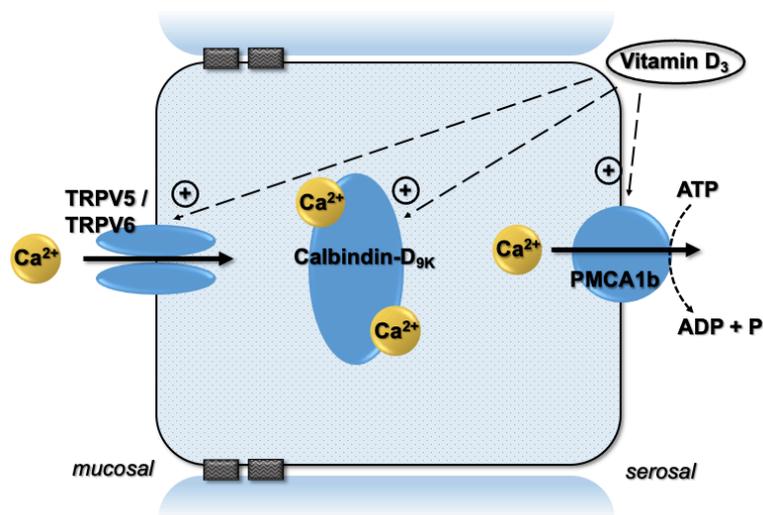


Abbildung 1: Transzellulärer Kalziumtransport im Darm.

Die Kalziumresorption teilt sich in einen apikalen Einstrom über Ionenkanäle (Peng et al. 1999; Wilkins et al. 2011), den intrazellulären Transfer über kalziumbindende Proteine (Bronner 1987; Wilkins et al. 2012b) und eine basolaterale Ausschleusung auf (van Abel et al. 2003; Wilkins et al. 2011). Insgesamt stellt der dreistufige Transport einen aktiven Transportprozess dar (Goff 2018). Die apikale bzw. lumenale Seite des Epithels wird als mukosal bezeichnet, die basolaterale, dem Blut zugewandte Seite als serosal.

Die intestinale Kalziumresorptionsleistung des Wiederkäuers fällt im Vergleich zu monogastrischen Spezies deutlich geringer aus (Schröder und Breves 2006; Wilkins und Muscher-Banse 2020). Um die Kalziumhomöostase langfristig aufrechtzuerhalten, muss Kalzium in einem weiteren Abschnitt des Gastrointestinaltraktes absorbiert werden können.

2.3.2.2. Transzellulärer Transport im Pansen

Die Vormägen tragen zu einem wichtigen Anteil der Kalziumresorptionsleistung von Wiederkäuern bei (Schröder und Breves 2006; Wilkins et al. 2020). Höller et al. (1988)

machten in einem *Ex-vivo*-Versuch erstmals darauf aufmerksam, dass der Pansen zur aktiven Resorption von Kalzium befähigt ist. In der Folge wurde wiederholt nachgewiesen, dass Kalziumfluxraten im Pansen von Wiederkäuern in mukoserosaler Richtung die Fluxraten in entgegengesetzter seromukosaler Richtung deutlich übersteigen (Schröder und Breves (2006); Tabelle 1).

Tabelle 1: Kalziumfluxraten im Pansen¹.

	Kalziumfluxrate in nmol·cm ⁻² ·h ⁻¹ ± SEM		
	J_{ms}^2	J_{sm}^3	J_{net}^4
Leonhard-Marek et al. (2007) ^a	20,3 ± 1,4	2,3 ± 0,4	18,0 ± 1,1
Sidler-Lauff et al. (2010) ^b	14,18 ± 2,38	6,78 ± 2,68	9,92 ± 2,23
Wilkens et al. (2011) ^a	11,9 ± 2,20	1,86 ± 0,73	10,04 ± 2,25
Wilkens et al. (2012) ^b	12,93 ± 2,36	1,01 ± 2,51	11,93 ± 2,51
Schröder et al. (2015) ^c	25,08 ± 3,10	11,33 ± 2,24	13,75 ± 1,8
Wilkens et al. (2015) ^a	7,76 ± 1,23	1,21 ± 0,57	-. ⁵
Rosendahl et al. (2016) ^c	15,03 ± 1,22	6,42 ± 0,86	8,60 ± 1,43
	13,95 ± 1,94	5,26 ± 0,38	8,68 ± 1,68
Klinger et al. (2016) ^a	7,52 ± 0,54	2,07 ± 0,44	5,45 ± 0,86
	9,60 ± 0,83	2,05 ± 0,34	7,56 ± 0,66
Nemeth et al. (2017) ^a	-. ⁶	-. ⁶	5,8 ± 0,6
Nemeth et al. (2017) ^b	-. ⁶	-. ⁶	5,5 ± 0,6

¹ Für Kalziumfluxraten, die vor 2007 gemessen wurden, siehe Schröder und Breves (2006)

² Mukoserosale Fluxrichtung.

³ Seromukosale Fluxrichtung.

⁴ Unterscheiden sich J_{ms} und J_{sm} signifikant, wurde eine Nettoresorptionsleistung (J_{net}) berechnet.

⁵ Statistische Unterschiede der J_{ms} und J_{sm} sind der Publikation nicht zu entnehmen.

⁶ In der Publikation ist jeweils nur J_{net} aufgeführt.

Gewebeursprung: ^a Schaf, ^b Ziege, ^c Rind

Die signifikante Nettoresorptionsleistung gibt Anlass zu der Annahme, dass die Kalziumresorption im Pansen überwiegend als aktiver und damit transzellulärer Transportprozess abläuft (Schröder et al. 1997; Schröder et al. 1999; Schröder et al. 2001; Leonhard-Marek et al. 2007; Sidler-Lauff et al. 2010; Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b; Schröder et al. 2015; Klinger et al. 2016; Rosendahl et al. 2016; Nemeth et al. 2017). In der Literatur wurde wesentlichen Unterschieden der ruminalen zur intestinalen Kalziumresorption immer wieder Bedeutung beigemessen, sodass das monogastrische Resorptionsmodell der

Kalziumresorption für den Pansen lediglich bedingt zutreffend scheint (Schröder und Breves 2006; Wilkens und Muscher-Banse 2020).

2.3.2.2.1 Histologische Besonderheiten der ruminalen Epithelauskleidung

Bereits histologisch unterscheidet sich das Epithel des Dünndarms grundlegend vom Pansenepithel. Der Pansen ist Teil des Vormagensystems, welches sich ontogenetisch aus dem spindelförmigen Anteil des embryonalen Darmrohres entwickelt hat (Martens 2015). Im Gegensatz zum einschichtigen Dünndarmepithel besteht das Pansenepithel aus einem mehrschichtigen, verhornenden und drüsenlosen Plattenepithel (Liebich 2010) und so erscheinen funktionelle Unterschiede der beteiligten Resorptionsmechanismen wenig überraschend.

Nach erfolgter Teilung der Zellen des *Stratum basale*, der tiefsten Epithelschicht, werden die älteren Zellen in Richtung Lumen geschoben und bilden das *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* (Steven und Marshall 1969). Mit dem Absterben der Zellen des *Stratum granulosum* verhornen diese und bilden das abschließende *Stratum corneum* (Lavker und Matoltsy 1970), das die Pansenschleimhaut gegen mechanische Einflüsse schützt (Steven und Marshall 1969; Graham und Simmons 2005). TJ-Proteine kommen gehäuft im *Stratum granulosum* vor, das die abschließende Schicht der lebenden Epithelzellen bildet und so für die Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere ausschlaggebend ist (Stumpff et al. 2011; Meissner et al. 2017). Unterhalb des *Stratum corneum* sind die Zellen des Pansenepithels über *gap junctions* (Zell-Zell-Kanäle) miteinander verbunden, die den schnellen Austausch von Soluten ermöglichen (Graham und Simmons 2005). Das mehrschichtige Pansenepithel bildet so ein funktionelles Synzytium, das beim transzellulären Transport als einzige Zelleinheit agiert (Gäbel et al. 2002; Goff 2018).

2.3.2.2.2 Unterschiede der ruminalen und intestinalen Kalziumresorption

Neben histologischen Unterschieden gehen zahlreiche Studien und Literaturarbeiten von drei wesentlichen Diskrepanzen zwischen der ruminalen und intestinalen Kalziumresorption aus. Eine zentrale Rolle spielen hierbei die involvierten Transportproteine und die Beteiligung hormoneller Regelkreise (Schröder und Breves 2006; Schröder et al. 2015; Hyde et al. 2019; Wilkens und Muscher-Banse 2020; Wilkens et al. 2020).

Schröder et al. (1997) untersuchten erstmalig die Abhängigkeit ruminaler Kalziumtransportraten von der alimentären Kalziumaufnahme bei Wiederkäuern und

beobachteten nach kalziumarmer Fütterung einen Anstieg der mukoserosalen Kalziumtransportraten um über 50% unter gradientenfreien Bedingungen. Die seromukosalen Transportraten blieben dabei unbeeinflusst. Die Autoren der Studie machten eine Änderung des Calcitriolspiegels für diesen Befund verantwortlich. Unterstützend wurde in einem weiteren Versuch ein Trend für erhöhte mukoserosale Kalziumfluxraten im Pansen laktierender Schafe gemessen; ob dies jedoch durch Änderungen des Calcitriolspiegels hervorgerufen wurde, blieb unbeantwortet (Klinger et al. 2016). Eine kalziumarmer Fütterung führte zu einem erhöhten Calcitriolspiegel, der sich jedoch, abweichend von früheren Beobachtungen, nicht in erhöhten mukoserosalen Transportraten im Pansen widerspiegelte (Schröder et al. 1999). Dieser Befund wurde in einer Folgestudie bestätigt, bei der Vitamin-D₃-Rezeptoren (**VDR**) im Pansen nachgewiesen wurden und die Calcitriolkonzentration nach einer intramuskulären Vitamin D₃-Injektion anstieg, sich jedoch nicht auf die mukoserosalen Kalziumfluxraten des Pansens auswirkte. Die Autoren der Studie gingen daher von einer Vitamin D₃-unabhängigen ruminalen Kalziumresorption aus (Schröder et al. 2001). Diese Unabhängigkeit von hormonellen Wirkkreisen wurde in mehreren Folgeuntersuchungen bestätigt, bei denen die mukoserosalen Kalziumfluxraten im Pansen weder nach alimentärer Kalziumdepletion noch nach Injektion von Vitamin D₃ oder Calcitriol stimulierbar waren (Sidler-Lauff et al. 2010; Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b) und ein VDR im Pansen nicht nachweisbar war (Sidler-Lauff et al. 2010).

Der **TRPV6**-Kanal, welcher den apikalen Eintritt von Kalzium in die Zelle vermittelt (Hoenderop et al. 2005), wurde von Wilkens et al. (2009) im Pansen auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen. Die Expression war jedoch im Vergleich zum Darm äußerst gering und es konnte im Epithel kein polares Verteilungsmuster festgestellt werden. Die Autoren vermuteten daher, dass TRPV6 nicht zur ruminalen Kalziumresorption beiträgt. Dieser Verdacht bestätigte sich in weiteren Studien, die im Pansen von Wiederkäuern weder TRPV6 noch TRPV5 auf mRNA- und Proteinebene im Pansen von Wiederkäuern detektieren konnten und die Vermutung offenlegten, dass alternative Transportproteine für den ersten Schritt des transzellulären Kalziumtransport im Pansen zuständig sein müssen (Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b; Schröder et al. 2015; Rosendahl et al. 2016).

2.3.2.2.3 Putativ beteiligte Transportproteine

Schröder et al. (1997) untersuchten den Einfluss kurzkettiger Fettsäuren (*short chain fatty acids*, **SCFA**) auf den ruminalen Kalziumtransport und beobachteten das Ausbleiben eines Kalziumnettotransportes unter SCFA-freier mukosaler Inkubation. Wurden hingegen SCFA zugegeben, waren signifikante Nettoresorptionsleistungen messbar. Diese Abhängigkeit des

ruminalen Kalziumtransportes von SCFA wurde in einem anschließenden Versuch bestätigt (Schröder et al. 1999). Die Resorptionsstimulation ging dabei auf eine Steigerung der mukoserosalen Transportraten zurück, während der Kalziumtransport in entgegengesetzte Richtung unbeeinflusst blieb (Uppal et al. 2003b; Schröder et al. 2015). SCFA setzen sich im Pansen hauptsächlich aus Acetat (45–70%), Propionat (15–40%) und Butyrat (5–20%) zusammen (Aschenbach et al. 2011), sind schwache Säuren, liegen mit absinkendem pH-Wert zunehmend in protoniertem Zustand vor und können aufgrund ihrer Lipophilie ins Zytosol des Pansenepithels diffundieren, um anschließend zu deprotonieren (Walter und Gutknecht 1986; Allen 1997; Gäbel et al. 2002; Aschenbach et al. 2011). Um der toxischen Wirkung der intrazellulären Protonenakkumulierung vorzubeugen, müssen diese durch den NHE entfernt werden (Sehested et al. 1996; Storeheier et al. 2003; Graham et al. 2007; Rabbani et al. 2011; Yang et al. 2012). Aufgrund der stimulierenden Wirkung der SCFA auf mukoserosale Kalziumtransportraten im Pansen wurde von verschiedenen Autoren die funktionelle Expression eines apikalen **Ca²⁺/H⁺-Austauschers** postuliert, welcher neben dem NHE Protonen aus dem Intrazellulärraum auszuschleusen vermag (Schröder et al. 1997; Schröder et al. 1999; Wadhwa und Care 2000; Schröder et al. 2015). Ferner führte die Zugabe eines NHE-Inhibitors (Martens et al. 1991) zu einer Erhöhung der mukoserosalen Kalziumfluxraten, während die seromukosalen Fluxraten unbeeinflusst blieben (Schröder et al. 1999). Auch nach Hemmung des NHE ist mit einer intrazellulären Ansäuerung zu rechnen.

Diverse Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Kalziumresorption im Pansen neben einem putativen Ca²⁺/H⁺-Austauscher durch einen weiteren Mechanismus vermittelt wird (Höller et al. 1988; Schröder et al. 1997; Wadhwa und Care 2000; Wilkens et al. 2016). Da eine ausschlaggebende Beteiligung von TRPV5 und TRPV6 beim ruminalen Kalziumtransport ausgeschlossen werden kann, der Pansen aber zum transzellulären Transport befähigt ist, müssen andere Kanäle den ersten Teilschritt der transzellulären Kalziumresorption vermitteln. Benn et al. (2008) lösten sich durch experimentelle Beobachtungen vom Dogma der essentiellen TRPV6-Beteiligung bei der aktiven gastrointestinalen Kalziumresorption. Darüber hinaus wurde im Pansenepithel eine nicht-selektive Kationenleitfähigkeit gemessen, die auch für die Absorption von Kalzium ausschlaggebend sein könnte (Leonhard-Marek 2002; Leonhard-Marek et al. 2005; Leonhard-Marek et al. 2010). Eine neuere Untersuchung zeigte die akute Stimulation von Kalziumtransportraten im Rinderpansen nach mukosaler Mentholapplikation (Rosendahl et al. 2016). Menthol ist als Agonist nicht-selektiver Kationenkanäle aus der TRP-Familie bekannt und stimuliert die Öffnungswahrscheinlichkeit von TRPA1, TRPV3 und TRPM8 (Macpherson et al. 2006; Karashima et al. 2007). Von diesen Kanälen wurden TRPA1 und TRPV3 auf mRNA-Ebene (Rosendahl et al. 2016; Rabbani et al. 2018) und TRPV3 zusätzlich auf Proteinebene im Pansenepithel nachgewiesen (Liebe et al.

2020). In einem Zellkulturversuch stimulierte eine akute Mentholapplikation den Stromfluss durch TRPV3-Kanäle und steigerte die Kalziumströme (Schrapers et al. 2018). Dies lässt eine Beteiligung des TRPV3-Kanals beim ruminalen Kalziumtransport plausibel erscheinen (Schrapers et al. 2018; Braun et al. 2019; Wilkens et al. 2020).

2.4. Bioaktive Pflanzenlipide (PBLC)

Ätherische Öle sind flüchtige und heterogene Stoffgemische, die aus verschiedenen PBLC bestehen und von Pflanzen als Sekundärmetabolite gebildet werden (Guenther 1972; Croteau et al. 2000; Bakkali et al. 2008). Die synonyme Bezeichnung „essentielle Öle“ geht auf die Herstellungsweise aus Pflanzenteilen zurück, wobei die Öle das Essentielle des jeweiligen Pflanzenduftes beinhalten (Figueiredo et al. 2008). Bis zu 20–60 verschiedene PBLC bilden ein ätherisches Öl, wobei zwei bis drei PBLC in einer höheren Konzentration (>70%), die restlichen Komponenten in einer geringeren Konzentration vorliegen (Bakkali et al. 2008). So sind die PBLC Thymol und Carvacrol die Hauptbestandteile des ätherischen Öls des *Origanum compactum* (Bouhdid et al. 2008) und das PBLC Menthol ist der Hauptbestandteil des ätherischen Öls der *Mentha x piperita* (Mimica-Dukić et al. 2003). Neben der natürlichen Extraktion aus Pflanzen können PBLC synthetisch hergestellt werden (Mathela et al. 2010; Negoj et al. 2010; Maeda et al. 2012; Chen et al. 2020) und umfassen zwei Gruppen unterschiedlicher biosynthetischer Herkunft. Dabei bilden Terpene und Terpenoide die Hauptgruppe der PBLC, während sich eine Nebengruppe aus aromatischen und aliphatischen Verbindungen zusammensetzt (Frohne und Jensen 1994; Pichersky et al. 2006; Patra und Yu 2012). 90% aller PBLC sind Monoterpene, welche sich in ihren funktionellen Gruppen mitunter stark voneinander unterscheiden. Zu den Monoterpenen mit Alkoholgruppe zählt Menthol, zu den Monoterpenen mit Phenolgruppe Thymol (Kamatou et al. 2013). Einer der bekanntesten PBLC aus der Gruppe der aromatischen Verbindungen ist Zimtaldehyd, das eine Aldehydgruppe besitzt (Abbildung 2) (Bakkali et al. 2008).

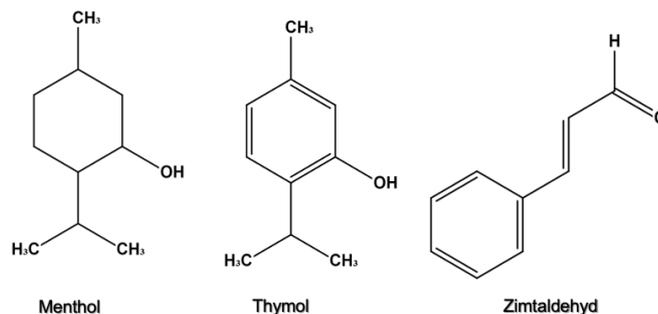


Abbildung 2: Strukturformel ausgewählter bioaktiver Pflanzenlipide (PBLC) (Bakkali et al 2008).

2.4.2 Anwendungsgebiete in der Nutztierhaltung

Antibiotische Wachstumsförderer sind aufgrund der stetig steigenden Anzahl antibiotikaresistenter Bakterien (Russell und Houlihan 2003) und der Rückstandsproblematik in Lebensmitteln tierischen Ursprungs in vielen Ländern verboten (Woolhouse et al. 2015; Brown et al. 2017). Dieses Verbot führte zu einer Verringerung der Produktivität und einem gehäuftem Auftreten von Erkrankungen, was eine Entwicklung wirkungsvoller Alternativen erforderte (Wierup 2001; Zhu et al. 2012). Um den Leistungsverlust in der Nutztierhaltung zu kompensieren und nicht zuletzt aufgrund der steigenden Beliebtheit natürlich vorkommender Substanzen, konzentrieren sich neuere Forschungsschwerpunkte auf die Wirkweise von PBLC (Rivaroli et al. 2016; Patra et al. 2018). Es wurde gezeigt, dass sich PBLC beim Wiederkäuer positiv auf Lebendmassezunahme, Futteraufnahme, Futterverwertung, Milchleistung, Milchfett- und Milchproteingehalt auswirken (Ornaghi et al. 2017; Braun et al. 2019; Kholif et al. 2020). Zudem besitzen PBLC in höheren Konzentrationen eine modulierende Wirkung auf die Fermentationsleistung der Pansenmikrobiota (Vakili et al. 2013; Roy et al. 2015; Mirzaei-Alamouti et al. 2016) und verringern die Anzahl der methanproduzierenden Bakterien im Pansensaft (Roy et al. 2015). Eine Langzeitsupplementierung mit mentholreichen PBLC in niedrigeren Konzentrationen wirkte sich hingegen nicht auf die ruminale Fermentationsleistung aus (Patra et al. 2019b). Rosendahl et al. (2016) untersuchte erstmalig die Auswirkung von Menthol auf die Kalziumtransporteigenschaften des nativen Pansenepithels beim Rind und stellte eine Resorptionsstimulation fest. Die Langzeitsupplementierung einer Mischung mentholreicher PBLC führte bei laktierenden Kühen zu einer Steigerung der Blutkalziumkonzentration (Braun et al. 2019). Dieser Befund wurde von den Autoren der Studie in einen engen Zusammenhang mit der zuvor beobachteten Mentholstimulation ruminaler Kalziumnettotransportraten gebracht und als höchstwahrscheinlich durch einen TRP-Kanal bedingt interpretiert (Rosendahl et al. 2016; Braun et al. 2019), welcher sich durch PBLC, allen voran Menthol, stimulieren lässt (Schrapers et al. 2018). Daten zur Reproduzierbarkeit dieser Beobachtungen beim Modelltier Schaf liegen derzeit nicht vor.

2.4.3 TRP-Kanäle als Zielgruppe bioaktiver Pflanzenlipide

Der TRP-Superfamilie gehören 28 Kationenkanäle an, welche durch ihre Strukturhomologien zu einem transient öffnenden Kanalprotein im Auge der *Drosophila melanogaster* zusammengefasst wurden (Montell und Rubin 1989; Montell 2011). Die TRP-Kanäle werden in sieben Unterfamilien eingeteilt: TRPA (Ankyrin), TRPC (Canonical), TRPM (Melastatin), TRPML (Mucolipin), TRPP (Polycystin), TRPV (Vanilloid) und TRPN (NOMPC). Mit Ausnahme

des TRPN konnten beim Säugetier Vertreter aller Unterfamilien nachgewiesen werden (Vennekens et al. 2002; Clapham et al. 2005; Rosasco und Gordon 2017).

Ein Kanal setzt sich aus vier TRP-Protomeren (Abbildung 3) zusammen (Pedersen et al. 2005), wobei üblicherweise vier identische Protomere ein Homotetramer bilden. Darüber hinaus wurde eine Heterotetramerisierung einiger TRP-Kanäle mit verschiedenen Protomeren beschrieben (Nijenhuis et al. 2005; Moran 2018). Jedes Protomer besteht aus sechs Transmembran- und einer zytosolischen Domäne, wovon sich letztere in einen intrazellulären Amino- und Carboxyl-Terminus aufteilt (Yin et al. 2018). Die Länge der zytosolischen Enden variiert stark und dient als wichtiges Kriterium für die Einteilung der Unterfamilien (Clapham 2003). Ebenso stark variieren die strukturellen und funktionellen Domänen, worauf ihre Kationenleitfähigkeit und Aktivierungsmechanismen beruhen. Es wird davon ausgegangen, dass die Porenregion des Kanals durch die 5. und 6. Transmembrandomäne gebildet wird, welche die kanalspezifische Ionenselektivität bestimmt (Nilius und Szallasi 2014). Die Kalziumselektivität wird in der Literatur als Quotient der Kalzium- und Natriumpermeabilität (P_{Ca}/P_{Na}) angegeben und beträgt bei TRP-Kanälen zwischen 0,1 und >100 (Owsianik et al. 2006).

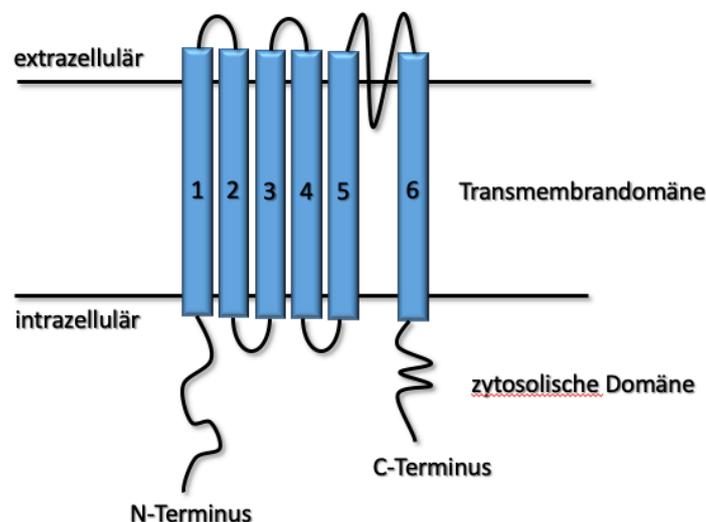


Abbildung 3: Strukturelle Organisation eines TRP-Protomers nach Pedersen et al. (2005).

Ein TRP-Protomer besteht aus 6 Transmembrandomänen mit zytosolischem Amino- und Carboxyl-Terminus. Vier Protomere lagern sich zu einem TRP-Kanal zusammen. Zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne eines jeden Protomers befindet sich eine hydrophobe Aminosäuresequenz, welche die Kanalpore bildet (Rosasco und Gordon 2017).

Bisherige Forschungsbemühungen konzentrierten sich hauptsächlich auf die polymodale Rolle der TRP-Kanäle in sensorischen Signalkaskaden, wie sie beispielsweise bei Entzündungsreaktionen, der Nozizeption oder der Thermorezeption beteiligt sind (McKemy et al. 2002; Damann et al. 2008; Balemans et al. 2017). Darüber hinaus sind TRP-Kanäle beim epithelialen Transport divalenter Kationen von übergeordneter Bedeutung (Nijenhuis et al. 2005; van Goor et al. 2017; Martens et al. 2018). Einige Vertreter aus der Familie der TRP-Kanäle wurden im Gastrointestinaltrakt des Wiederkäuers nachgewiesen (Rosendahl et al. 2016; Rabbani et al. 2018; Liebe et al. 2020). Sie werden durch PBLC stimuliert, was eine Kanalöffnung mit anschließendem Kationeneinstrom nach sich zieht (Peier et al. 2002; Vriens et al. 2008; Moran 2018; Schrapers et al. 2018). Da das PBLC Menthol eine stimulierende Wirkung auf die Kalziumresorption im Gastrointestinaltrakt von Wiederkäuern besitzt, wird nachfolgend auf mentholaktivierbare TRP-Kanäle eingegangen, die für diese Stimulation als ursächlich erscheinen.

2.4.3.1 TRPM8

TRPM8 ist ein nicht-selektiver Kationenkanal mit einer P_{Ca}/P_{Na} von 1 bis 3 (McKemy et al. 2002; Janssens et al. 2016). Menthol wird als klassischer Agonist des TRPM8-Kanals beschrieben (Nealen et al. 2003; Bautista et al. 2007; Yin et al. 2018) und stabilisiert den geöffneten Zustand der Kanalpore. Dabei entfaltet Menthol seine Wirkung wahrscheinlich durch eine Bindung an die *voltage-sensor-like* (Spannungssensor-ähnliche) Domäne oder eine Interaktion mit der 2. Transmembrandomäne (Bandell et al. 2006; Yin et al. 2018). TRPM8 wird als Kälte-detektor der afferenten Nervenfasern der Haut beschrieben (Bautista et al. 2007; Colburn et al. 2007) und kommt darüber hinaus in der Gefäßmuskulatur, im Blasenepithel und in Fasern des *Nervus trigeminus* vor (Nealen et al. 2003; Stein et al. 2004). Zur TRPM8-Expression im Gastrointestinaltrakt von Monogastriern liegen widersprüchliche Ergebnisse vor (Zhang et al. 2004; Mustafa und Oriowo 2005; Penuelas et al. 2007). TRPM8 war weder in bovinem noch ovinem Pansenepithel auf mRNA-Ebene nachweisbar (Rosendahl et al. 2016). Auch der funktionelle TRPM8-Nachweis misslang, da eine Stimulation mit dem hochselektiven TRPM8-Agonisten Icilin zu keiner Änderung des Stromflusses im Pansen führte, weshalb die Autoren der Studie eine TRPM8-Expression im Pansen ausschlossen (Rosendahl et al. 2016). Die gastrointestinale Rolle von TRPM8 wird daher eher in der Nozizeption und Entzündungsreaktion vermutet (Ramachandran et al. 2013; Hosoya et al. 2014), weniger bei der Beteiligung an transepithelialen Transportvorgängen.

2.4.3.2 TRPA1

Die P_{Ca}/P_{Na} von TRPA1 wird zwischen 0,84 und 5,71 angegeben (Story et al. 2003; Wang et al. 2008; Karashima et al. 2010). Im niedrig-mikromolaren Bereich aktiviert Menthol den TRPA1, während es bei höheren Konzentrationen zu einer Hemmung kommt (Namer et al. 2005, Karashima et al. 2007). Zimtaldehyd gilt hingegen als klassischer Agonist des TRPA1 und man findet auch bei 1 mM noch eine Aktivierung (Bandell et al. 2004), während bei hoher Konzentration (3mM) eine Hemmung beobachtet wurde (Alpizar et al. 2013). Menthol bindet dabei nonkovalent zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne (Xiao et al. 2008) und führt zu einer Dilatation der Kanalpore (Karashima et al. 2010). TRPA1 wurde auf der gesamten Länge des Gastrointestinaltraktes nachgewiesen (Kondo et al. 2010; Brozmanova et al. 2011; Kondo et al. 2013), insbesondere im *Epithelium mucosae* des Darms von Mensch und Maus (Purhonen et al. 2008; Brierley et al. 2009; Nozawa et al. 2009; Cattaruzza et al. 2010), und spielt im Gastrointestinaltrakt bei der Nozizeption und Steuerung der Darmmotorik eine wichtige Rolle (Yang et al. 2008; Brierley et al. 2009). Beim Wiederkäuer konnte TRPA1 im Pansen von Schafen und Rindern detektiert werden. Eine Applikation des TRPA1-Modulators Zimtaldehyd in einer Konzentration von $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ verminderte den über den Pansen gemessenen Stromfluss und ließ die Autoren eine mögliche Beteiligung von TRPA1 beim transepithelialen Kationentransport vermuten (Rosendahl et al. 2016).

2.4.3.3 TRPV3

TRPV3 besitzt mit einer P_{Ca}/P_{Na} von 0,5 bis 12 (Xu et al. 2002; Chung et al. 2005; Schrapers et al. 2018) nicht nur eine höhere Kalziumselektivität als TRPA1 und TRPM8, sondern auch eine deutlich höhere *single-channel conductance* (Einzelkanal-Leitfähigkeit) (Owsianik et al. 2006). Monoterpene mit sekundären Hydroxylgruppen, beispielsweise Menthol und Thymol, wirken agonistisch und steigern die Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanalpore (Macpherson et al. 2006; Vogt-Eisele et al. 2007). Menthol erhöhte die über den bovinen TRPV3-Kanal gemessenen Stromflüsse und führte in einem Zellkulturversuch zu erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentrationen (Schrapers et al. 2018). Zur gastrointestinalen TRPV3-Expression des Monogastriers gibt es verschiedene, teilweise widersprüchliche Angaben (Zhang et al. 2004; Ueda et al. 2009) und über die Funktion ist wenig bekannt (Holzer 2011). TRPV3 wird vermehrt in Keratinozyten exprimiert (Hamamoto et al. 2008; Cao et al. 2012; Li et al. 2016) und wurde im verhornenden Plattenepithel des Pansens auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen (Rosendahl et al. 2016; Liebe et al. 2020). In einem *ex-vivo*-Versuch mit Rinderpansenepithel führte die mukosale Applikation von Thymol in höheren Konzentrationen zu einem initialen Anstieg der NH_4^+ -vermittelten Ströme, welche von stark unter dem

Ausgangswert liegenden Strömen gefolgt wurden. Eine ähnliche transiente Epithelantwort wurde auch für Menthol in höheren Konzentrationen beobachtet. Bereits die Applikation geringer Mentholdosierungen führte hingegen zu einer stimulierten ruminalen Kalziumresorption, während höhere Dosierungen hemmend wirkten (Rosendahl et al. 2016). Diese agonistenvermittelte und konzentrationsabhängige Stimulierbarkeit bietet Grund zu der Annahme, dass TRPV3 am transepithelialen Transport von Kalzium im Pansen beteiligt ist (Rosendahl et al. 2016; Schrapers et al. 2018; Braun et al. 2019; Liebe et al. 2020).

2.5 Bedeutung der Literatur für die eigene Fragestellung

Der Pansen trägt in bedeutendem Maße zur gastrointestinalen Kalziumresorption bei (Wilkins et al. 2020). Trotzdem besteht noch Unklarheit über beteiligte Transportmechanismen. PBLC sind für ihre agonistischen Effekte auf TRP-Kanäle bekannt, die im Pansen nachgewiesen wurden (Rosendahl et al. 2016; Liebe et al. 2020). Eine Applikation von Menthol führte nicht nur zur akuten Stimulation von Kalziumtransportraten über bovine TRPV3-Kanäle *in vitro* (Schrapers et al. 2018), sondern auch zu einer *Ex-vivo*-Stimulation der Kalziumresorption im Pansen von Rindern (Rosendahl et al. 2016). In einer darauffolgenden *In-vivo*-Studie führte eine Langzeitsupplementierung mit mentholreichen PBLC zu einer Erhöhung der Blutkalziumkonzentrationen bei Rindern (Braun et al. 2019). Diese Beobachtungen lassen die Beteiligung eines TRP-Kanals bei der ruminalen Kalziumresorption als denkbar erscheinen.

SCFA können in protonierter Form in die Pansenepithelzellen diffundieren (Aschenbach et al. 2011), deprotonieren im Zytosol und stimulieren schließlich über eine intrazelluläre Ansäuerung die ruminale Kalziumresorption (Schröder et al. 1999; Uppal et al. 2003b). Dies lässt vermuten, dass ein $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Austauscher am Kalziumtransport im Pansen beteiligt sein könnte (Schröder et al. 2015).

Ausgehend von der dargestellten Sachlage lag das Ziel der vorliegenden Dissertation in der Überprüfung der Hypothese, dass mentholreiche PBLC beim Modelltier Schaf positive Effekte auf Kalziumresorption und -blutkonzentration haben. Darüber hinaus sollten die Ergebnisse der Dissertation die Rolle von TRP-Kanälen und des $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Austauschers bei der gastrointestinalen Kalziumresorption beleuchten. Dies schloss die Klärung folgender Fragestellungen ein, die auf der Grundlage von *in vivo*, *ex vivo* und molekularbiologischen Untersuchungen überprüft wurden:

- 1) Lässt sich der im Pansen des Rindes beobachtete positive Effekt einer akuten mentholindizierten Kalziumnettofluxstimulation auch beim Modelltier Schaf reproduzieren?
- 2) Lässt sich der beim Rind beobachtete positive Effekt einer Langzeitsupplementierung mit mentholreichen PBLC auf die Blutkalziumkonzentration auch beim Modelltier Schaf reproduzieren?
- 3) Hat eine Langzeitsupplementierung mit mentholreichen PBLC in verschiedenen Dosierungen Auswirkungen auf die akute mentholindizierte Kalziumfluxstimulation im Pansen und auch im Jejunum?
- 4) Kommt es durch eine Langzeitsupplementierung mit mentholreichen PBLC in verschiedenen Dosierungen zu einer Erhöhung der basalen Kalziumfluxraten im Pansen und Jejunum?
- 5) Ist eine Stimulierbarkeit der Kalziumnettoresorption durch Änderungen des trans- oder parazellulären Transportweges bedingt und lässt sich dies auf struktureller Ebene verifizieren?
- 6) Lässt sich die mögliche Existenz eines $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Austauschers über eine mukosale Natriumdepletion nachweisen?
- 7) Stellt eine Fütterung mit mentholreichen PBLC eine Alternative zu den gängigen Hypokalzämiepräventionskonzepten dar?

3. Material und Methoden

Die integrativ physiologischen Experimente zum Einfluss einer mentholreichen PBLC-Supplementierung auf Kalziumtransportmechanismen im Pansen- und Jejunumepithel des Schafes beinhaltete *in vivo*, *ex vivo* und molekularbiologische Untersuchungen:

1. Bestimmung ausgewählter *In-vivo*-Parameter
 - a. Lebendmassezunahme und Futteraufnahme
 - b. Blutanalysen ausgewählter Serummetabolite und Aminosäuren
2. *Ex-vivo*-Bestimmung der Epitheleigenschaften
 - a. Elektrophysiologische Eigenschaften
 - b. Kalziumfluxraten
 - c. Fluoresceinfluxraten
3. Molekularbiologische Quantifizierung der mRNA-Expression von Genen des trans- und parazellulären Transportes
 - a. TRP-Kanal-Gene
 - b. TJ-Gene

Das Dissertationsvorhaben wurde mit der Genehmigung des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin (LaGeSo) nach deutschen Tierschutz- und Ethikvorschriften durchgeführt (Aktenzeichen G0141/17).

3.1 Tiere

Es wurden vierundzwanzig heranwachsende Suffolk-Schafe im Alter von $121 \pm 3,7$ d von einem kommerziellen landwirtschaftlichen Betrieb erworben. Der Gesundheitsstatus der 15 weiblichen und 9 männlichen Tiere wurde mittels Blut- und parasitologischen Kotproben untersucht. Anschließend wurden die Tiere in einem geschlossenen Stallabteil der Klinik für Klauentiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin über einen Zeitraum von 14 d in Quarantäne gehalten. Während der Quarantäneperiode wurden die Tiere durch tägliches Betreten und den gezielten physischen Kontakt mit Versuchspersonal an die im Dissertationsvorhaben folgenden Manipulationen gewöhnt.

3.2 Gruppeneinteilung und Vorfütterung

Nach der Quarantäneperiode wurden die Tiere, um das gleiche Geschlechterverhältnis und durchschnittliche Körpergewicht in jeder Gruppe zu erzielen, nach einem randomisierten Blockverfahren in drei Gruppen aufgeteilt. Dabei betrug das initiale Körpergewicht der drei Gruppen $35,5$, $34,3$ und $35,9 \pm 3,44$ kg, wobei jeder Gruppe fünf männliche und drei weibliche Tiere zugeordnet wurden. Alle Tiere erhielten Heu *ad libitum*. Trinkwasser war über automatische Drucktränkebecken jederzeit verfügbar. Die Kontrollgruppe (**Kon**) erhielt ein Kraftfutter ohne bioaktive Pflanzenlipide (**PBLC**). Tiere der niedrigdosierten Fütterungsgruppe (**PBLC-L**) erhielten 80 mg/d eines mentholreichen PBLC über das Kraftfutter, während Tiere der höherdosierten Fütterungsgruppe (**PBLC-H**) 160 mg/d desselben mentholreichen PBLC erhielten. Um eine gruppenspezifische Supplementierung zu gewährleisten, wurden die Schafe mit Transponderhalsbändern ausgestattet, mit denen sich eine tierindividuelle druckluftbetriebene Futterklappe (Hütter GbR, Marktbergel, Germany) öffnen ließ. Die Tiere wurden nach der Gruppenzuweisung drei Tage an das automatische Fütterungssystem adaptiert, um ein zielgerichtetes Auffinden ihrer individuellen Futterklappen sicherzustellen. Im Institut für Veterinär-Physiologie standen vier gleich große Stallabteile (Stallabteil 1, 2, 3 und 4) mit jeweils drei automatischen Futterklappen zur Verfügung, weshalb der Versuch in zwei vierwöchige experimentelle Durchläufe mit jeweils 12 Schafen aufgeteilt wurde. Die Belegung der Stallabteile mit Tieren der verschiedenen Fütterungsgruppen wurde im zweiten experimentellen Durchlauf rotiert. Jedes Stallabteil war mit einem Betonboden mit Sägemehl als Einstreu ausgestattet. Der Stall wurde durch Fensterflächen natürlich beleuchtet, zusätzliche künstliche Lichtquellen wurden von 6:00 bis 18:00 Uhr eingeschaltet. Um eine vierundzwanzigstündige Funktionsfähigkeit der Futterklappen zu gewährleisten, wurden die vier Stallpartitionen per internetverknüpftem Videostream überwacht und die Öffnungszeiten der Futterklappen fortwährend protokolliert.

3.3 Rationsgestaltung

Während der dreitägigen Adaptationszeit erhielten alle Tiere 400 g/d eines mais-, gerste- und sojabasierten, pelletierten Kraftfutters ohne PBLC-Zusätze (Kon). Nachfolgend wurde den drei Fütterungsgruppen das entsprechende Kraftfutter in ansteigender Menge verabreicht, sodass die Energie- und Nährstoffanforderungen heranwachsender Schafe erfüllt wurden (National Research Council 2007). Dabei erhielten die Tiere am ersten Versuchstag 450 g Kraftfutter, an den darauffolgenden drei Tagen jeweils 525 g/d und danach bis zum Versuchsende nach vier Wochen 600 g/d. Die PBLC-Konzentration im Kraftfutter der PBLC-L-Gruppe betrug 133,3

mg/kg und die PBLC-Konzentration der PBLC-H-Gruppe 266,7 mg/kg. Der hauptaktive Bestandteil der PBLC war Menthol (CAS-Nummern 2216-51-5, 89-78-1, 15356-60-2, 1490-04-6) in einer Konzentration von 900 g/kg, weswegen das Krafftutter beider PBLC-Gruppen im Rahmen der Dissertation als eine Mischung mentholreicher PBLC bezeichnet wird. Die tägliche Krafftuttermenge wurde in drei Rationen von 200 g um 7:00, 11:00 und 15:00 Uhr verfüttert. Die genauen Inhaltsstoffe der verwendeten Futtermittel sind Tabelle 2 zu entnehmen. Zur Analyse der Inhaltsstoffe wurden in beiden experimentellen Durchläufen wöchentlich Krafftutter- und Heuproben entnommen und bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 2: Inhaltsstoffe und chemische Zusammensetzung der verwendeten Futtermittel.

	Krafftutter ¹			Heu
	Kon	PBLC-L	PBLC-H	
Inhaltsstoffe (g/kg)				
Mais	305	295	285	
Gerste	305	305	305	
Sojamehl	348	348	348	
Melasse	30	30	30	
Mineral- und Vitaminvormischung ²	5	5	5	
Salz	2	2	2	
Kalkstein	5	5	5	
Zusatz ³	0	10	20	
Chemische Zusammensetzung				
Trockenmasse (TM; g/kg)	914	915	912	923
Rohprotein (g/kg TM)	259	257	259	108
NDF ⁴ (g/kg TM)	125	140	152	641
ADF ⁵ (g/kg TM)	65,4	74,6	70,7	374
Rohfaser (g/kg TM)	48,9	41,7	43,0	332
Kalzium (g/kg TM)	5,31	5,36	5,83	3,11
Phosphor (g/kg TM)	5,09	4,81	4,74	2,08

¹ Bioaktive Pflanzenlipide (PBLC) wurden dem Krafftutter in einer Konzentration von 0 mg/kg (Kon), 133,3 mg/kg (PBLC-L) oder 266,7 mg/kg (PBLC-H) zugemischt.

² Die Mineral- und Vitaminvormischung (Spezialfutter Neuruppin Ltd., Neuruppin, Deutschland) enthält pro kg TM: 160 g Kalzium, 40 g Phosphor, 100 g Natrium, 30 g Magnesium, 500.000 I.E. Vit. A, 50.000 I.E. Vit. D₃, 500 mg Vitamin E, 4500 mg Zink, 500 mg Mangan, 20 mg Cobalt, 20 mg Iod, 35 mg Selen.

³ Zusatz enthielt 13,3 g PBLC/kg.

⁴ *Neutral detergent fiber* (Neutral-Detergenz-Faser).

⁵ *Acid detergent fiber* (Säure-Detergenz-Faser).

Um einem Entmischen der PBLC vom Kraftfutter vorzubeugen sowie eine vollständige Aufnahme durch die Tiere zu gewährleisten, wurden die PBLC vor dem Pelletiervorgang beigemischt. Um Vaporationsverluste bei der Herstellung des Kraftfutters zu vermeiden, wurden diese mit einer Temperatur von $< 50\text{ °C}$ pelletiert und bis zur Fütterung in luft- und lichtdichten Säcken gelagert.

3.5 Lebendmassezunahme und Futteraufnahme

Das Körpergewicht der Schafe wurde im Abstand von 7 d zwischen 9:30 und 10:00 Uhr gemessen. Um Effekte der geänderten Pansenfüllung auf das Körpergewicht durch die Futterumstellung zu minimieren, wurden die Messwerte der ersten Woche zur Berechnung der durchschnittlichen täglichen Lebendmassezunahme nicht berücksichtigt. Die aufgenommene Kraftfuttermenge wurde täglich dokumentiert, wobei alle Tiere über den gesamten Fütterungszeitraum das gesamte Kraftfutter aufnahmen. Zur Bestimmung der Heuaufnahme wurde das nicht aufgenommene Heu täglich um 7:00 Uhr entnommen und pro Tier in einem Plastiksack gesammelt. Die wöchentliche Heutrockenmasseaufnahme wurde durch die Subtraktion des nicht aufgenommenen Heus von der verabreichten Heumenge berechnet und in Trockenmasse (Tabelle 2) umgerechnet. Zur Berechnung der täglichen Heutrockenmasseaufnahme wurden, wie auch zur Berechnung der täglichen Lebendmassezunahme, die Werte der ersten Woche nicht berücksichtigt.

3.6 *In-vivo*-Blutanalysen

Die Blutproben wurden mit zwei 9-ml-Blutentnahmeröhrchen (Vacuette Greiner Bio-One GmbH, Kremsmüster, Österreich) zwischen 9:30 und 10:00 Uhr, also 2,5 h nach der morgendlichen Kraftfuttergabe, an Tag 0 (1 Tag vor dem eigentlichen Versuchsbeginn) und an Tag 27 aus der *Vena jugularis* entnommen. Die Blutentnahmeröhrchen enthielten Gerinnungsaktivatoren und wurden für die Serumgewinnung verwendet, die nach der Blutentnahme 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Das Serum wurde durch Zentrifugation (1.500 rpm bei 4 °C für 10 min) innerhalb von 1 h nach der Blutentnahme abgetrennt und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Die Serumkonzentrationen von Glukose, Triglyzeriden, Bilirubin, Cholesterin, Harnstoff, Kalzium und Magnesium wurden mit einem Coba C 311 (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim) im Labor der Klinik für Innere Tiermedizin der Universität Leipzig mit gebrauchsfertigen e-Pack-Reagenzien (Roche Diagnostics Deutschland GmbH) gemessen.

Die Konzentrationen der freien Aminosäuren in den Serumproben wurden durch das ACQUITY Ultra Performance Flüssigkeitschromatographieverfahren (UPLC, Waters, Milford, MA, USA) bestimmt (Waters 2007) und wurde nach dem Handbuch des AccQTag-Reagenz-Kits (Waters, Milford, Ma, USA) im Institut für Tierernährung an der Universität für Biowissenschaften in Posen (Wolynska 33, 60-637 Posen, Polen) durchgeführt. Dabei wurden 50 µl der Serumprobe in Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss (Waters, Milford, MA, USA) überführt, 20 µl des borathaltigen Puffers (AccQTag Ultra Borate Buffer) hinzugegeben und die Lösung durch kurzes Vortexen gemischt. Danach wurden 20 µl eines Aminosäurestandards (amino acid standard H; ThermoScientific, Rockford, IL, USA), 90 µl Salzsäure (100 mmol/l) und 20 µl 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidylcarbamate (10 mmol/l) in die Reaktionsgefäße gegeben und die Lösung erneut für 10 s durch Vortexen gemischt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße mittels Thermoblock (MD-02 M, Major Sciences, Saratoga, Ca, USA) für 10 min bei 55 °C erhitzt. Der Aminosäurestandard enthielt 2,5 mmol/l der Aminosäuren Histidin (His), Serin (Ser), Arginin (Arg), Glycin (Gly), Asparaginsäure (Asp), Glutaminsäure (Glu), Threonin (Thr), Alanin (Ala), Prolin (Pro), Lysin (Lys), Tyrosin (Tyr), Valin (Val), Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Phenylalanin (Phe) und Methionin (Met). Die Konzentration von Cystein (Cys) betrug 1,25 mmol/l. Die UPLC-Methode erlaubte keine getrennte Analyse von Glutamin (Gln) und Glutaminsäure sowie Asparagin (Asn) und Asparaginsäure, weswegen diese zusammen ausgewertet wurden. DL-2-Aminobuttersäure (Sigma-Aldrich; St- Louis, MO, USA) wurde als interner Standard verwendet. Für die Bestimmung der freien Aminosäuren wurde ein Photodiodenarray-Detektor (PDA) verwendet und die chromatographische Trennung erfolgte mittels AccQ-Tag Ultra C-18-Säule (2,1 mm x 100 mm; 1,8 µm) mit einer Flussrate von 0,6 ml/min. Zur Auftrennung wurde ein binäres Gradientensystem mit zwei Eluenten verwendet (Eluent A, 25 ml AccQTag Ultra in 500 ml MilliQ-Wasser; Eluent B, Aminosäureanalyse-Eluent (AccQTag Ultra, Waters, Milford, USA)). Das Gradientensystem wurde nach nachfolgendem Zeitablauf aufgebaut: 0–0,64 min: 99,9% Eluent A, 0,64–6,71 min: 90,9% Eluent A, 6,71–7,74 min: 78,8% Eluent A, 7,74–10,11 min: 40,4% Eluent A, 10,11–12 min: 99,9% Eluent A. Das Probeninjektionsvolumen betrug 1 µl und die Säulentemperatur wurde auf 55 °C eingestellt. Die Aminosäure-Peaks der Proben wurden durch Vergleiche mit den Retentionszeiten der Aminosäure-Peaks der Standardlösung abgeglichen und identifiziert. Danach wurden die Konzentrationen der Aminosäuren aus den Proben mittels der Fläche unter dem Peak der Aminosäurestandards berechnet (Software Empower 2; Waters).

3.7 Gewebegewinnung

Die Versuchstiere wurden in der sich auf den 28. Fütterungstag anschließenden Woche mit einem Bolzenschussgerät betäubt und der Tod durch Blutzug mittels Kehlstich herbeigeführt. Täglich wurden zwei Tiere geschlachtet, das erste 2 h nach der morgendlichen Fütterung um 9:00 Uhr und das zweite Tier 2 h nach der Mittagsfütterung um 13:00 Uhr. Dabei wurden die Tiere in alternierender Reihenfolge zwischen den Fütterungsgruppen geschlachtet. Unmittelbar nach dem Einsetzen des Todeszeitpunktes wurde das gesamte Magen-Darm-Konvolut zur Gewebegewinnung aus dem Bauchraum der Tiere entfernt.

3.7.1 Gewebegewinnung für funktionelle *Ex-vivo*-Untersuchungen

Für die *Ex-vivo*-Untersuchungen des epithelialen Transportes wurden Gewebeproben des Pansens und Jejunums entnommen. Dabei wurde unmittelbar nach dem Entfernen des Magen-Darm-Konvolutes aus dem Bauchraum ein etwa 25 x 25 cm großes Stück des ventralen Pansensackes sowie ein etwa 1,5 m langes Segment aus dem mittleren Jejunum mit einer Schere entfernt. Die Gewebeproben wurden unmittelbar in 38 °C warmer Transportinkubationslösung (Tabelle 4, S.41) von gröberen Bestandteilen der Ingesta befreit. Anschließend wurde die für die transportphysiologischen Untersuchungen relevante *Tunica mucosa* – im Zuge der Dissertationsschrift vereinheitlicht als Epithel bezeichnet – von den angrenzenden Gewebsschichten per Hand abgelöst („strippen“). Darauffolgend wurde das Epithel von Pansen und Jejunum in einem Dewargefäß mit auf 38 °C temperierter und kontinuierlich mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begaster Transportinkubationslösung innerhalb von 20 min in die Laboreinrichtung verbracht.

3.7.2 Gewebegewinnung für molekularbiologische Untersuchungen

Die Gewebeproben für die RNA-Isolierung wurden aus der *Tunica mucosa* vom ventralen Pansensack und mittleren Jejunum entnommen. Nach dem Entnehmen wurde das Epithel in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung von gröberen Bestandteilen der Ingesta befreit, ca. 10 x 3 x 2 mm große Stücke in *RNA/later* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gegeben und bei 4 °C für 12 h und danach bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

3.8 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus den Epithelproben vom ventralen Pansensack und mittleren Jejunum wurde mittels Nucleospin RNA II Kit (Macherey-Nagel Nucleospin[®]RNA, Düren, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden gemäß dem Handbuch des Isolationskits die enthaltenen Puffersubstanzen RA1 (Lyse-Puffer), MDB (Membranentsalzungspuffer), DNase reaction mixture (Reaktionspuffer zum DNA-Verdau), RAW2 (Waschpuffer) und RA3 (verdünnter Waschpuffer) eingesetzt. Alle Versuchsschritte wurden mit Nitril-Einmalhandschuhen auf eisgekühlter Unterlage ausgeführt.

Im ersten Schritt wurden 100 mg der Epithelproben in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf Safe-Lock Tubes 2 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) gegeben und mit 350 µl RA1 sowie 3,5 µl β-Mercaptoethanol versetzt. Zudem wurden zwei gereinigte Stahlkugeln hinzugegeben und die Proben in einer Schwingmühle (Retsch MM200, Haan, Deutschland) 3-mal für 45 s homogenisiert. Jeder Homogenisationsdurchlauf wurde von einer einminütigen Pause unterbrochen, um eine übermäßige Erhitzung der Proben zu vermeiden. Nach der Homogenisation wurden die Reaktionsgefäße für 30 s bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Bei der RNA-Isolation aus dem Pansenepithel wurde zusätzlich eine Phenol-Chloroform-Fällung zur Proteindenaturation und -entfernung durchgeführt. Hierfür wurden 700 µl Roti[®]-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in das 2 ml-Reaktionsgefäß mit dem Homogenisationsprodukt pipettiert und anschließend durchmischt. Danach wurden die Proben bei 15.000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Mit dem oberen flüssigen Überstand wurde im Anschluss wie mit den Proben des Jejunums weiterverfahren.

Der flüssige Überstand wurde auf eine Filtersäule (NucleoSpin[®] Filter, pink) übertragen und bei 11.000 rpm für 1 min zentrifugiert, um eine Reduktion der Viskosität sowie eine Reinigung von Zelltrümmern zu erreichen. Nach abgeschlossener Zentrifugation wurden die Filter verworfen und das homogenisierte Lysat zur Schaffung von RNA-Bindungsbedingungen mit 350 µl Ethanol (70%) versetzt und durch Vortexen gemischt. Anschließend wurde das Gemisch auf eine Kieselgelmembran (NucleoSpin[®] RNA Colum, blau) transferiert und bei 11.000 rpm für 30 s zentrifugiert, um eine Bindung der isolierten RNA an die Säulenmatrix zu erwirken. Im darauffolgenden Schritt wurde 350 µl Membranentsalzungspuffer (MDB) auf die Kieselgelsäule gegeben und bei 11.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Dieser Entsalzungsschritt wurde durchgeführt, um die Effektivität des darauffolgenden DNA-Verdaus zu steigern, bei dem pro Probe mit 10 µl rDNase und 90 µl rDNase Puffer (DNase reaction mixture) vermischt

wurden und anschließend in das Zentrum der Kieselgelsäule aufgetragen wurden. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min wurde zuerst durch die Zugabe von 200 µl Waschpuffer (RAW2) auf die Säule der DNA-Verdau durch eine Zentrifugation bei 11.000 rpm für 30 s gestoppt und der entstandene Durchfluss verworfen. Im nächsten Schritt wurden 600 µl des verdünnten Waschpuffers (RA3) auf die Säule hinzugegeben und bei 11.000 rpm für 30 s zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 250 µl verdünntem Waschpuffer (RA3) und bei dreiminütiger Zentrifugation bei 11.000 rpm wiederholt, um die Säule vollständig vom RAW2-Puffer zu befreien. Im letzten Schritt wurde die an die Kieselgelmembran gebundene RNA mittels einminütiger Zentrifugation bei 11.000 rpm in 55 µl RNase-freiem Wasser eluiert und der Durchfluss in einem nukleasefreien Reaktionsgefäß aufgefangen.

Nach Abschluss der Isolierung wurde die RNA-Konzentration photometrisch quantifiziert (Nanophotometer P330, Implen, München, Deutschland) sowie eine zweiminütige Denaturierung der RNA-Stränge (Thermomixer 5436, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 70 °C durchgeführt. Die Qualität der erhaltenen RNA wurde anschließend mittels NanoChip (RNA 6000 Nano, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) analysiert und nur Proben weiterverwendet, die eine *RNA integrity number* (RIN) von > 8,5 aufwiesen. Anschließend wurde die isolierte RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

3.9 cDNA-Synthese

Um die isolierte RNA in cDNA umzuschreiben, wurde das iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) benutzt und gemäß Herstellerhandbuch angewendet. Zur Normalisierung der RNA-Menge jeder Probe wurden zwei Ansätze je 200 ng RNA in cDNA umgeschrieben, anschließend gepooled und mit 160 µl RNase-freiem Wasser auf 200 µl aufgefüllt, um eine cDNA-Konzentration von 2 ng/µl in jeder Probe zu erhalten. Dazu wurde die von der photometrisch bestimmten RNA-Konzentration (Nanophotometer P330, Implen, München, Deutschland) abhängige Probenmenge mit 1 µl reverser Transkriptase und 4 µl iScript Mastermix gemischt und anschließend mit nukleasefreiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Das Reaktionsprotokoll zur cDNA-Synthese im Thermocycler (Mastercycler nexus gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) umfasste drei Temperaturstufen. Die Primeranlagerung (Initialisierung) erfolgte bei 25 °C für 5 min, gefolgt von der reversen Transkription der RNA in cDNA bei 46 °C für 20 min und endete mit der Inaktivierung der reversen Transkriptaseaktivität bei 95 °C für 1 min. Nach erfolgter Umschreibung der RNA des Pansen- und Jejunumepithels wurde diese bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

3.10 Primer-Design

Für die meisten im Zuge der Dissertationsarbeit untersuchten Gensequenzen (Tabelle 3, S.36) lagen am Institut bereits passende Primer- und Sondenkombinationen vor. Die Sequenzen für TRPV6 (Wilkens et al. 2009), Cldn1, -4, -7, Occl und YWHAZ (Meissner et al. 2017) sowie Cldn2 (Elfers et al. 2016) wurden aus der Literatur entnommen. Primer für TRPA1, TRPV3, TRPV5 und TRPM6-M8 wurden im Zuge des Dissertationsprojektes für die Spezies Schaf (*ovis aries*) neu designed und etabliert. Dazu wurden die Sequenzen aufeinanderfolgender codierender Exons, welche von mindestens 500 Basenpaaren (bp) langen Introns unterbrochen wurden, aus einer Gendatenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) entnommen. Dieses Design schließt aus, dass genomische DNA quantifiziert wird. Anschließend wurde die Sekundärstruktur der aneinandergereihten Gensequenzen mittels webbasierter Software berechnet (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>), um Haarnadel-Pins und andere Sekundärstruktur motive zu identifizieren, welche die Primeranlagerung beeinträchtigen könnten. Die Sequenz der entsprechenden Gene wurde in die Software PrimerQuest Tool (IDT, Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, USA) übertragen, um Primerpaare und Sondensequenzen generieren zu lassen. Es wurde dabei darauf geachtet, dass die Schmelztemperaturen der Primer ca. 10 °C über der Anlagerungstemperatur und der Guanin-Cytosin-Gehalt bei ca. 50% liegt. Die Primer- und Sondenkombinationen wurden über NCBI Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) auf Genspezifität überprüft und über ein kommerzielles bioanalytisches Dienstleistungslabor erworben (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland). Nach Erhalt der Primer wurden diese in nukleasefreiem Wasser gelöst, um eine normierte Endkonzentration von 100 pmol/µl für alle Primer zu erreichen. Anschließend wurden die Primerlösungen aliquotiert und im Verhältnis 1:4 mit nukleasefreiem Wasser zu einer Arbeitslösung (25 pmol/µl) verdünnt.

Die Spezifität der Primer wurde in einer konventionellen Polymerasekettenreaktion (k-PCR) mit anschließender Gelelektrophorese und Sequenzierung des Amplifikates überprüft. Dazu wurden 7,6 µl cDNA aus einer gepoolten cDNA-Probe, in der das gesuchte Gen nachgewiesenermaßen transkribiert wird (Positivprobe), eingesetzt. Für TRPA1, TRPV3 und TRPM6-7 wurde cDNA des Pansens und für TRPM8 cDNA der Leber eingesetzt. Für die Etablierung von TRPV5 wurde cDNA aus RNA der Niere umgeschrieben und verwendet. Die k-PCR wurden in 200 µl PCR-Reaktionsgefäßen (Biozym GmbH, Oldendorf, Deutschland) in Doppelbestimmung durchgeführt und alle vorbereitenden Schritte auf eisgekühlter Unterlage durchgeführt. Zu der cDNA-Positivprobe wurde jeweils 1,2 µl des Sense- (forward-) und Antisense- (reverse-) Primers zugegeben. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße mit 10 µl des TaqPCR MasterMix (Qiagen, Hilden, Deutschland) auf insgesamt 20 µl

Reaktionsvolumen aufgefüllt. Letzterer enthielt als wesentliche Bestandteile Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs) und das Enzym Taq-DNA-Polymerase. Das Reaktionsprotokoll der konventionellen PCR im Thermocycler (Mastercycler nexus gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) umfasste nachfolgende Temperaturstufen:

Phase 1: Initiale Denaturierung 3 min bei 94 °C

Phase 2: Phase der Elongation (40 Zyklen)

Denaturierung 1 min bei 94 °C

Initialisierung 1 min im Temperaturgradienten

Elongation 1,5 min bei 72 °C

Phase 3: Ende der Zyklen

Finale Verlängerung 10 min bei 72 °C

Wartephase bei 4 °C

Zur Ermittlung der optimalen, primerspezifischen Anlagerungstemperatur wurden verschiedene Temperaturen in der Primeranlagerungsphase der k-PCR gewählt. Der so entstandene Temperaturgradient reichte von 59 °C bis 62 °C. Wird die Temperatur dieser Phase zu gering gewählt, können Primer an nicht vollständig komplementäre cDNA-Abschnitte binden, was zu unspezifischen Amplifikationsprodukten führt. Wird hingegen die Anlagerungstemperatur zu hoch gewählt, können sich die Primer durch die mit steigender Temperatur auftretende verstärkte Eigenbewegung nicht adäquat anheften, sodass es zu ineffizienter oder keiner Produktamplifizierung kommt. Das Temperaturoptimum der Anlagerung liegt üblicherweise zwischen 5 und 10 °C unter der Schmelztemperatur der entsprechenden Primersequenzen (Abd-Elsalam 2003).

Nach erfolgter k-PCR wurden 10 µl des Reaktionsproduktes in 2 µl DNA Gel Loading Dye 6x (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) suspendiert und auf ein 1,5%-iges TAE (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer) Agarosegel mit DNA-Fluoreszenzfarbstoff (MidoriGreen 1 µl/mL Agarosegel, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) aufgetragen. Zum Gel in der horizontalen Elektrophoresekammer wurde 1x TAE Pufferlösung bis ca. 5 mm über die Geloberfläche zugegeben. Anschließend wurde das Amplifikat mittels Gelelektrophorese bei einer Spannung von 90 mV (PowerPac, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) parallel zu einem DNA-Größenstandard mit Fragmenten der Größe von 25–500 bp aufgetrennt. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Exposition abfotografiert (ChemiDoc Imaging System, Bio-Rad, Hercules, USA) und die Größe der entstandenen Bande mit der

Längenangabe des PCR-Produktes verglichen. Zudem wurde die stärkste und am deutlichsten hervortretende Bande identifiziert und die Temperatur der Primeranlagerungsphase als Optimaltemperatur für das jeweilige Primerpaar dokumentiert. Anschließend wurde die Bande unter UV-Exposition mittels sterilem Skalpell als Gelblock entfernt. Danach wurde der ausgeschnittene Gelblock gewogen und die enthaltene DNA mittels NucleoSpin Gel und PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) extrahiert. Dazu wurde die doppelte Menge der NTI-Pufferlösung zum ausgeschnittenen Gelblock gegeben und 5–10 min bei 50 °C unter stetigem Schütteln inkubiert (Thermomixer compact, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), um das Gel und das darin enthaltene PCR-Amplifikat im Puffer zu lösen. Anschließend wurde die Probe auf eine im Kit enthaltene NucleoSpin Gel and PCR Clean-up-Säule gegeben und bei 11.000 rpm für 30 s zentrifugiert, um die DNA von restlichen Gelbestandteilen zu trennen und an die Membran zu binden. Im nachfolgenden Schritt wurde die Membran durch die Zugabe von 700 µl des Puffers NT3 und anschließende Zentrifugation bei 11.000 rpm für 30 s von Gelbestandteilen gereinigt. Das Zentrifugat wurde verworfen und der vorherige Schritt wiederholt. Anschließend wurde die Säule bei 11.000 rpm für 1 min zentrifugiert, um restliche Bestandteile des Puffers NT3 zu entfernen. 20 µl des NE-Puffers wurden anschließend auf die Membran gegeben und bei Raumtemperatur für 1 min inkubiert, worauf ein letzter einminütiger Zentrifugationsschritt bei 11.000 rpm folgte. Das entstandene Zentrifugat wurde erneut auf die Säule pipettiert und der vorhergegangene Schritt wiederholt, um das gesamte DNA-Amplifikat zu eluieren.

Zur Überprüfung der Spezifität des entstandenen PCR-Produktes wurde die eluierte DNA in einem bioanalytischen Dienstleistungslabor (Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland) nach Sanger (Franca et al. 2002) sequenziert und die analysierte Basensequenz mittels Gendatenbank auf Genspezifität abgeglichen.

Tabelle 3: Primer- und fluoreszenzmarkierte Sondensequenzen der Ziel- und Referenzgene.

Gen	Sense ¹	Primersequenz (5' → 3')	Länge (bp)
TRPA1	Fwd	GCGCATTATTTCTCAGTGACC	135
	Rev	TGTTCCCTTCTTCATCTAGCC	
	Probe	FAM_GCTGGACTGCTTTGCATCATGCTTCCTT_BHQ	
TRPV3	Fwd	CTACAACACCAACATTGACAAC	116
	Rev	AGCAGAAGGACAGGAAGAAC	
	Probe	FAM_CACACGCTGCTGCATATGAAGTGGAAAGA_BHQ	
TRPV5	Fwd	GAGATCATTTCGTCGCAACAC	85
	Rev	ACTGATAAACCCGATCCTCTC	
	Probe	FAM_TGGGACACGTGAATCTCGGACTGGA_TAMR	
TRPV6	Fwd	TGATGGGAGACACTCACTGG	96
	Rev	GCAGCTTCTTCTCCAGCATC	
	Probe	FAM_TGGCTACAACCTGCGCCCT_TAMR	
TRPM6	Fwd	CACATTGGTCTCCTGCTTC	142
	Rev	ACTTTTCCACACACTGTTCTTC	
	Probe	FAM_CAGCACCAAGCTCCAAATGACCAAGAA_BHQ	
TRPM7	Fwd	TCAACAGGCAGGACCTTATG	150
	Rev	GCAAGAGTCCAAGATGGTG	
	Probe	FAM_GTTCCCAGAAAGGCAATACTTTATCCTCGT_BHQ	
TRPM8	Fwd	ACCCTGAGGTTGATTCACATT	108
	Rev	GGCAAAGAGGAACAGGAAGA	
	Probe	FAM_TGTTGCAGAGGATGCTGATCGACGTGTTCT_BHQ	
Cldn1	Fwd	TGCCAGGTATGAATTTGGTC	133
	Rev	GGGATAGGGCCTGGGTGTTG	
	Probe	FAM_TCTTCATTGGCTGGGCTGCTGCTTCT_TRMR	
Cldn2	Fwd	CCAAAGACAGAGTGCGGGT	139
	Rev	TCAAATTTTCATGCTGTCAGGCAC	
	Probe	FAM_TCCTGGGCTTCATCCCYGTTGC-BHQ	
Cldn3	Fwd	TCATCGGCAGCAGCATCATC	99
	Rev	CGTACACCTTGCACTGCATC	
	Probe	FAM_AGATCACCTGGGAGGGCCTGTGGATGAACTG_BHQ	
Cldn4	Fwd	TTCATCGGCAGCAACATC	99
	Rev	GTACACCTTGCACTGCATC	
	Probe	FAM_AGACCATCTGGGAG GGCCTATGGATGAACT_BHQ	
Cldn7	Fwd	ATAGCTTGCTCCTGGTACGG	129
	Rev	CAGGATGATCAGAGCAGACC	
	Probe	FAM_ATAACCCGTTGGTCCCATGAATGTTAAGTATGAA_TAMR	
Occl	Fwd	TCAGGGAATATCCACCTATCAC	147
	Rev	CATCCAGTTCTTTATCCAGACG	
	Probe	FAM_GAGCCTACAAGCAGAACTTGATGAGGTCAATAAA_TAMR	
ZO1	Fwd	CATAAGAGAAGAAGCTGTCCTC	109
	Rev	ATCGGATTCTACAATGCGAC	
	Probe	FAM_AGAAGTGACCATATTGGCTCAGAAGAAGAAGGA_BHQ	
ZO2	Fwd	AGAATATGGTCTCCGGCTT	81
	Rev	AGGTTGCCATCTTTAGTTGC	
	Probe	FAM_GAGTCAGATCTTCATAAAGGAAATGACCAGAACC_BHQ	
β-Actin	Fwd	GCCAACCGTGAGAAGATGAC	124
	Rev	AGTCCATCACGATGCCAGTG	
	Probe	FAM_CCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCTGC_TAMR	
GAPDH	Fwd	AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC	144
	Rev	CTGTTGAAGTTCGAGGAGAC	
	Probe	FAM_GGCATTCTAGGCTACACTGAGGACCAGGTTG_TAMR	
YWHAZ	Fwd	AGAGAGAAAATAGAGACCGAGC	89
	Rev	AGCCAAGTAGCGGTAGTAG	
	Probe	FAM_CCAACGCTTCACAAGCAGAGAGCAAA_TAMR	

¹ Richtung der Primersequenz, Fwd; Vorwärts-, Rev; Rückwärtssequenz, Probe; Sondensequenz.

3.11 Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR (*real time quantitative* PCR, RT-qPCR) ist eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR, die es ermöglicht, das mRNA-Expressionsniveau einer Probe relativ zu einer Bezugsprobe zu quantifizieren. In dieser Arbeit wurde die RT-qPCR mit fluoreszenzmarkierten Sonden durchgeführt, welche die Reaktionsspezifität erhöhen. Die Sonde ist ein zu den Primerpaaren zusätzliches Oligonukleotid, das spezifisch an die bei der PCR entstandene Matrize bindet. Sie wird mit einem am 5'-Ende befestigten Reporter-Farbstoff versehen, während am 3'-Ende der sog. Quencher-Farbstoff, TAMR oder BHQ befestigt ist. Durch die räumliche Nähe von Reporter und Quencher wird die Fluoreszenz unterdrückt. Während der Elongationsphase der RT-qPCR stößt die Taq-Polymerase auf die an die Matrize angelagerte Sonde, welche durch die fortschreitende Aktivität der Taq-Polymerase fragmentiert wird. Die Trennung der räumlichen Nähe von Reporter und Quencher-Farbstoff führt zu einem Fluoreszenzsignal, das mit der Anzahl der synthetisierten PCR-Produkte korreliert und detektiert werden kann (Rodríguez et al. 2015).

Die optimale Konzentration beider Primerpaare sowie der fluoreszenzmarkierten Sonden wurde vor der eigentlichen Versuchsdurchführung mit cDNA der Versuchstiere bestimmt. Dabei wurden drei verschiedene Konzentrationen der Primerpaare mit drei verschiedenen Sondenkonzentrationen kombiniert und in einer RT-qPCR mit cDNA einer Positivprobe eingesetzt. Die Kombination mit niedrigstem *threshold cycle*-Wert (C_t -Wert) spiegelt dabei die optimalen Reaktionsbedingungen wider, da hier die Produktbildung am schnellsten und stärksten erfolgt. Diese Konzentrationen wurden dokumentiert und für nachfolgende Untersuchungen herangezogen.

Zur eigentlichen RT-qPCR wurden der ViiA7 Cyclyer (Applied Biosystems/Life technologies, USA) und die QuantStudio Real-Time PCR Software v.1-3 (Thermo Fisher, Waltham, USA) verwendet. Die Reaktion wurde auf einer 384-Loch-Platte (Biozym GmbH, Oldendorf, Deutschland) durchgeführt und alle Vorbereitungen erfolgten auf eisgekühlter Unterlage. Die dem Sondenetablierungsprotokoll entnommene optimale Konzentration der Primer und Sonde wurde mit 3,7 μ l TaqPCR Mastermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) sowie nukleasefreiem Wasser zu einem RT-qPCR-Mastermix angesetzt. Anschließend wurden 3,7 μ l cDNA pro Probenbestimmung vorgelegt und mit 6,3 μ l des zuvor angesetzten Mastermix in einer Dreifachbestimmung auf die 384-Loch-Platte aufgetragen. Danach wurde die Platte mittels Klebefilm geschlossen und für 2 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Die zweistufige RT-qPCR wurde nach folgendem Temperaturprotokoll durchgeführt:

Phase 1: Initiale Denaturierung 5 min bei 95 °C

Phase 2: Phase der Elongation (40 Zyklen)

Denaturierung 1 s bei 95 °C

Initialisierung & Elongation 20 s bei 60 °C

Nach abgeschlossener RT-qPCR wurde der Schwellenwert für die C_t -Werte von der Cyclersoftware automatisch festgelegt. Proben, die einen C_t -Wert von > 32 aufwiesen oder deren C_t -Wert nicht mindestens um fünf Zyklen niedriger war als die der Negativkontrolle, wurden als nicht detektierbar betrachtet. Anschließend wurden alle Probentriplets auf mögliche Pipettierfehler untersucht, die bei größerer Standardabweichung vom Mittelwert als Outlier markiert und nicht in die weitere Berechnung einbezogen wurden. Die so erhaltenen Rohdaten wurden in die Analysesoftware qBasePLUS (Biogazelle NV, Zwijnaarde, Belgien) überführt, in der die Daten zur Erkennung und Beseitigung von Schwankungen zwischen den Durchläufen auf einen *inter run Calibrator* (IRC), welcher bei jedem RT-qPCR-Durchlauf mit aufgebracht wurde, kalibriert wurden (Hellemans et al. 2007). Für jedes Ziel-Gen wurde die Reaktionseffizienz mittels 1:4-cDNA-Standardverdünnungsreihe ermittelt, welche für alle Gene zwischen 85 und 100% lag. Zusätzlich wurden für jede Probe die Expression der Housekeeper β -Actin, GAPDH und YWHAZ bestimmt, wobei sich im Pansen GAPDH und YWHAZ und im Jejunum β -Actin, GAPDH und YWHAZ als Housekeeper mit einem adäquaten geNorm-Expressionsstabilitätswert (M-Wert) darstellten (Vandesompele et al. 2002). Das mRNA-Expressionsniveau der Proben wurde nachfolgend unter Einbeziehung der Reaktionseffizienz auf die Housekeeper normiert und die so ermittelte kalibrierte normalisierte relative Quantität (CNRQ-Wert) für statistische Analysen verwendet.

3.12 Funktionelle Bestimmung der Epitheleigenschaften ex vivo

Die funktionelle *Ex-vivo*-Untersuchung der Epitheleigenschaften erfolgte in der nach Ussing und Zerahn (1951) modifizierten Ussing-Kammer. Diese Methodik wird am Institut für Veterinär-Physiologie der Freien Universität Berlin seit Jahrzehnten für transportphysiologische Fragestellungen im Gastrointestinaltrakt bei Schafen, Rindern und Schweinen herangezogen und folgt etablierten Verfahrensmustern (Rosendahl et al. 2016; Meissner et al. 2017; Rabbani et al. 2018; Greco et al. 2018).

Das Epithel von Pansen und Jejunum wurde für die Inkubation in der Ussing-Kammer in passende Stücke geschnitten (2,5 x 2,5 cm für die Inkubation in 0,95 cm² großen Kammern

und 4,5 x 4,5 cm für die Inkubation in 3,14 cm² großen Kammern). Die Epithelstücke wurden anschließend zum Schutz vor Epithelschäden an den Kontaktstellen (*edge damage*) mit Hilfe von Silikonringen in die Ussing-Kammer eingespannt, sodass durch den polaren Epithelaufbau ein mukosales und ein serosales Kompartiment entstand. Beide Kompartimente besaßen zwei Öffnungen, durch die mittels Silikonschläuchen (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) eine Verbindung zu jeweils einem darüberliegenden, doppelwandigen, mit Inkubationslösung befüllten Glasreservoir hergestellt wurde. Durch ein carbogenbetriebenes Gasliftsystem wurden die Inkubationslösungen stetig umgewälzt und durch das innerhalb des doppelwandigen Glasreservoirs zirkulierende Wasser auf 38 °C erwärmt. Eine mit Epithel bespannte Ussing-Kammer ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

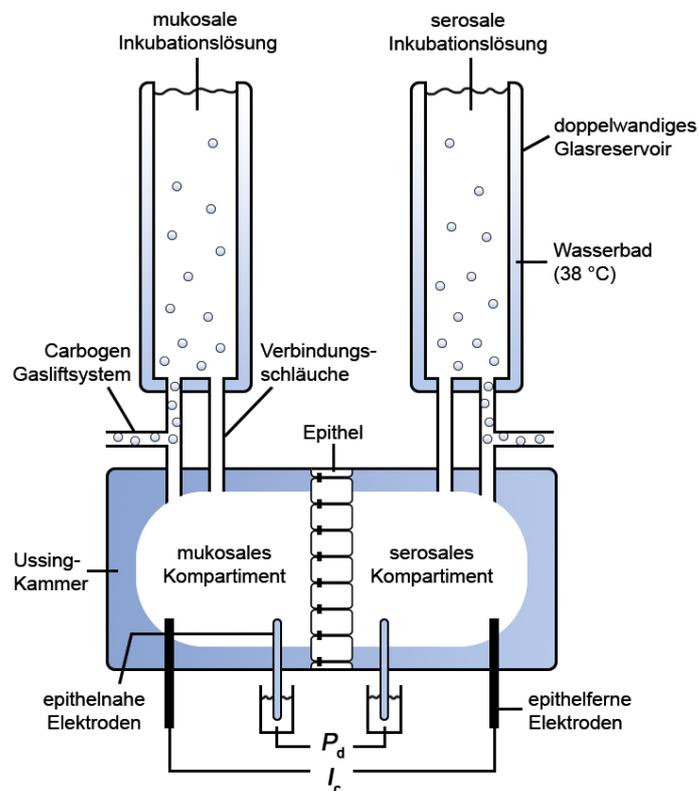


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Ussing-Kammer.

Über zwei gewebe-nahe Agarbrücken wurde die Potentialdifferenz (P_d) über dem Epithel abgegriffen, während die gewebe-fernen Platinelektroden der Applikation von Strom (I_c) dienen. Die Vitalität des Epithels wurde durch ein Erwärmen der Inkubationslösung auf 38 °C und eine stetige Carbogenbegasung (95% O₂, 5% CO₂) sichergestellt. Letztere diente zusätzlich zur permanenten Umwälzung und Durchmischung der Inkubationslösungen zwischen Kammerinnerem und Glasreservoir.

Im Versuch wurden Ussing-Kammern mit einer Fläche von 3,14 cm² für Pansenepithelien und einer Fläche von 0,95 cm² für Jejunumepithelien verwendet. Die über den Kammern befindlichen Glasreservoirs waren ständig von oben zugänglich, was die Applikation von chemischen Substanzen und eine Probennahme ermöglichte. Das zirkulierende Inkubationslösungsvolumen betrug pro Kammerhälfte für Pansenepithel 16 ml und pro Kammerhälfte der Jejunumepithelien 12 ml.

3.12.1 Inkubationslösungen der Ussing-Kammern

Um die *Ex-vivo*-Untersuchung des Kalziumtransports in der Ussing-Kammer möglichst detailliert und realitätsgetreu zu simulieren, wurden verschiedene Inkubationslösungen im mukosalen und serosalen Kompartiment verwendet. Die genauen chemischen Bestandteile der Inkubationslösungen sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Die Zusammensetzung der serosalen Inkubationslösung war für das Pansen- und das Jejunumepithel identisch. Der pH-Wert betrug 7,4 und die Osmolarität wurde auf 288 mOsmol/l adjustiert. Die mukosale Inkubationslösung der Pansenepithelien hatte einen pH-Wert von 6,4 und eine Osmolarität von 288 mOsmol/l. Diese Inkubationslösung enthielt 40 mmol/l SCFA (25 mmol/l Acetat, 10 mmol/l Propionat und 5 mmol/l Butyrat). Die mukosale Inkubationslösung des Jejunumepithels beinhaltete keine SCFA und hatte einen pH-Wert von 7,4 bei 288 mOsmol/l. Für die Hälfte der mukosalen Inkubationslösungen des Pansens und Jejunums wurde Natrium durch *N*-Methyl-D-Glucamin (NMDG⁺) ersetzt, um natriumfreie mukosale Inkubationsbedingungen zu schaffen und eine Untersuchung des natriumabhängigen Kalziumtransportes zu ermöglichen. Zusätzlich waren alle mukosalen Inkubationslösungen magnesiumfrei, um potentielle Wechselwirkungen von Ca²⁺ und Mg²⁺ in der Kanalpore von Ionenkanälen zu unterbinden.

Tabelle 4: Chemische Zusammensetzung der Inkubationslösungen (in mM).

	Transport & serosal	mukosal Pansen		mukosal Jejunum	
		Na ⁺ -haltig	Na ⁺ -frei	Na ⁺ -haltig	Na ⁺ -frei
CaCl ₂	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
MgCl ₂	1.0	0	0	0	0
HEPES ¹	10	0	0	10	10
MES ²	0	10	10	0	0
NaCl	70	70	0	70	0
HCl	0	17	87	2	72
Natriumacetat	0	25	0	0	0
Essigsäure	0	0	25	0	0
Natriumpropionat	0	10	0	0	0
Propionsäure	0	0	10	0	0
Natriumbutyrat	0	5	0	0	0
Buttersäure	0	0	5	0	0
Natriumgluconat	40	0	0	40	0
Glucuronsäure	0	0	0	0	40
NMDG ³	5	20	112	7	117
KH ₂ PO ₄	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
K ₂ HPO ₄	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
NaHCO ₃	25	25	0	25	0
Cholin-HCO ₃	0	0	25	0	25
Enrofloxacin	0,0278	0,0278	0,0278	0,0278	0,0278
Mannitol	0	19	19	9	9
Glucose	10	0	0	0	0
mOsmol/l	288	288	288	288	288
pH	7,4	6,4	6,4	7,4	7,4

¹ HEPES: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure.

² MES: 2-(*N*-Morpholino)-Ethanesulfonsäure.

³ NMDG: *N*-Methyl-D-Glucamin.

3.12.2 Elektrophysiologische Messungen (Pd, I_{sc} , G_i)

Die elektrophysiologischen Parameter wurden mithilfe einer computergesteuerten Spannungs-Strom-Klemm-Anlage (Voltage-Current-Clamp, Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany) gemessen. Die Potentialdifferenz zwischen der mukosalen und serosalen Epithelseite wurde mit zwei epithelnahen Ag/AgCl-Elektroden gemessen, welche jeweils über

in 3 mol·l⁻¹ KCl-Lösung getränkten Agarbrücken mit den Kompartimenten der Ussing-Kammer verbunden waren. Diese Salzbrücken wurden zur Vermeidung der Exposition des Epithels gegenüber den gewebetoxischen Effekten von Silberionen verwendet, da die Potentialmessung in unmittelbarer Epithelnähe ablaufen muss (Clarke 2009). Zusätzlich waren zwei epithelferne Platinelektroden in jeder Ussing-Kammer verbaut. Die zwischen den Ag/AgCl-Elektroden herrschende Potentialdifferenz (im Idealfall 0 mV) wurde vor dem Einspannen des Gewebes ermittelt und um die im Versuch gemessenen elektrophysiologischen Werte anschließend korrigiert.

Werden Ionen über das eingespannte Epithel transportiert, führt dies zu einem elektrischen Stromfluss und einer Ladungsverschiebung, die zu einer transepithelialen Potenzialdifferenz (P_d) führt. Diese Spannung wurde kontinuierlich im Abstand von 6 s durch die epithelnahe Agarbrücken gemessen. Bei dem im Versuch angewendeten *Short-circuit*-(Kurzschluss)-Verfahren wird über die epithelfernen Elektroden ein Klemmstrom angelegt (I_c), welcher genau dem Strom in entgegengesetzter Richtung entspricht, der vom Epithel selbst generiert wird (I_{sc}). Der dem I_{sc} entgegengesetzte Klemmstrom bezeichnet alle elektrogenen Ionenbewegungen.

$$I_{sc} = - I_c$$

Der Klemmstrom klemmt die Potentialdifferenz auf 0 mV, was eine Ausschaltung der elektrischen Gradienten zur Folge hat. Werden unter der Abwesenheit eines elektrischen Gradienten zusätzlich die chemischen Gradienten (durch die Anwendung von identischen mukosalen und serosalen Inkubationslösungen, Tabelle 4) ausgeschaltet, herrschen über dem Epithel keine Triebkräfte, von denen passive Ionenbewegungen ausgehen könnten.

Zusätzlich wurden in regelmäßigen Abständen über die zwei epithelfernen Elektroden kurzzeitig (300 ms) Stromimpulse (ΔI) von definierter Größe (100 μ A) abgegeben. Die vorübergehende Änderung der transepithelialen Potentialdifferenz (ΔP_d) konnte genutzt werden, um die Gewebeleitfähigkeit (G_t ; Reziprokwert des Widerstandes) nach dem Ohmschen Gesetz zu bestimmen.

$$G_t = \Delta I * \Delta P_d^{-1}$$

Die G_t -Werte wurden um den Eigenwiderstand der Messapparatur korrigiert, der vor dem jeweiligen Versuchsbeginn ermittelt wurde.

3.12.3 Messung der unidirektionalen Fluxraten (J_{ms} und J_{sm})

Nach 20-minütiger Gewebeequilibration in der Ussing-Kammer wurden innerhalb der gleichen mukosalen Inkubationslösung (Na^+ -haltig oder Na^+ -frei) jeweils zwei Kammern von Pansen bzw. Jejunum anhand der zu diesem Zeitpunkt gemessenen Gewebeleitfähigkeit (G_t) gepaart (Tabelle 5). Eine Kammer jedes Paares diente dabei zur Bestimmung der Kalziumfluxraten in mukoserosaler, die zweite Kammer in seromukosaler Richtung.

Tabelle 5: Beispielhafte Ussing-Kammer-Paarung anhand eines Versuchstieres.

Epitheltyp	mukosale Inkubationslösung ¹	Kammer	G_t ²	⁴⁵ Ca ²⁺ -Zugabe ³		
Pansen	Na ⁺ -haltig	B3	2,5	mukosal		
		B4	2,2	serosal		
		B5	3,6	serosal		
		B6	3,4	mukosal		
	Na ⁺ -frei	C1	2,5	mukosal		
		C2	1,7	serosal		
		C3	1,7	mukosal		
		C4	1,9	serosal		
		Jejunum	Na ⁺ -haltig	C5	8,5	mukosal
				C6	5,1	serosal
D1	14,1			mukosal		
Na ⁺ -frei	D2		13,2	serosal		
	D3		10,5	mukosal		
	D4		9,3	serosal		
		D5	11,1	serosal		
		D6	10,4	mukosal		

¹ Die chemische Zusammensetzung der Inkubationslösungen ist Tabelle 4 zu entnehmen.

² G_t : Gewebeleitfähigkeit der jeweiligen Epithelien unter *short-circuit*-Bedingungen.

³ ⁴⁵Ca²⁺-Zugabe: Um unidirektionale Kalziumfluxraten zu ermitteln, wurde ⁴⁵Ca²⁺ entweder auf der mukosalen oder serosalen Seite des Epithels zugegeben.

3.12.3.1 Kalziumfluxraten

Die unidirektionalen Fluxraten wurden mit Hilfe der Radioisotopen-Tracer-Technik bestimmt. Hierzu wurde innerhalb der gepaarten Epithelien entweder in das mukosale oder serosale

Kompartiment der Ussing-Kammern das Radioisotop $^{45}\text{Ca}^{2+}$ hinzugegeben (~ 50 kBq für Pansenepithelien, ~ 70 kBq für Jejunumepithelien), die in Folge jeweils als „heiße Seite“ bezeichnet wurde. Um eine radioaktive Bezugsprobe zu erhalten, wurden der heißen Seite $100\ \mu\text{l}$ zu Beginn und Ende des Experiments entnommen. Im weiteren Versuchsverlauf wurden in Zeitabständen von 45 min (P_0 bis P_3) $600\text{-}\mu\text{l}$ -Proben von der gegenüberliegenden „kalten Seite“ entnommen. Um hydrostatischen Kräften entgegenzuwirken, wurde die entnommene Probemenge unmittelbar durch die Zugabe der entsprechenden Inkubationslösung ersetzt. Die Zeitperiode zwischen zwei Probennahmen wurde als Fluxperiode (Fluxperiode 1–3) definiert. Eine Übersicht über den Versuchsablauf ist Abbildung 5 (S. 47) zu entnehmen.

Um Rückschlüsse auf den unidirektionalen Kalziumtransport ziehen zu können, wurde unmittelbar nach Probennahme die β -Strahlungsaktivität gemessen. Dazu wurden allen Proben 3 ml eines Flüssigszintillators (Aquasafe®300, Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt, Deutschland) beigegeben und die entstandene Lichtemission nach Volumenkorrektur in einem Flüssigszintillationszähler (LKB Wallace-Perkin-Elmer, Überlingen, Germany) gemessen.

Die unidirektionalen Kalziumfluxraten wurden anhand der gemessenen radioaktiven Strahlungsaktivität mit der nach Schultz und Zalusky (1964) modifizierten Formel berechnet:

$$J_{unidir.}^S = \frac{\frac{V_g}{V_p} * cpm_n - (\frac{V_g}{V_p} * cpm_{(n-1)} - cpm_{(n-1)})}{\frac{cpm_H}{S} * \Delta t * A}$$

$J_{unidir.}^S$: Fluxrate in unidirektionale Richtung	[nmol * cm ⁻² * h ⁻¹]
V_g	: Volumen der Inkubationslösung der kalten Seite	[μl]
V_p	: Probevolumen der kalten Seite	[μl]
cpm_n	: Radioaktivität der zum Zeitpunkt t_n entnommenen kalten Probe	[counts per minute]
cpm_H	: Radioaktivität der heißen Bezugsprobe (Mittelwert der zu Versuchsanfang und -ende genommenen heißen Proben)	[cpm]
S	: Substanzmenge in der heißen Bezugsprobe	[nmol]
Δt	: Zeitdauer der Fluxperiode (zwischen den Probennahmen)	[h]
A	: Epitheloberfläche	[cm ²]

Nach mukosaler Zugabe der radioaktiven Kalziumisotope konnte so die Fluxrate des unmarkierten Kalziums (J) in mukoserosaler Richtung (J_{ms}) und bei serosaler Zugabe die Fluxrate in seromukosaler Richtung (J_{sm}) ermittelt werden. Unterscheiden sich J_{ms} und J_{sm} signifikant, kann durch eine Subtraktion beider Werte der Kalziumnetttransport über das Epithel (J_{net}) bestimmt werden.

$$J_{net}^S = J_{ms}^S - J_{sm}^S$$

Positive Nettofluxraten sind hierbei als Kalziumresorption, negative Nettofluxraten als Kalziumsekretion zu interpretieren.

3.12.2.2 Fluoresceinfluxraten

Neben der Kalziumfluxbestimmung wurden in den Ussing-Kammern unidirektionale Fluoresceinfluxraten zur Charakterisierung der parazellulären Permeation gemessen. Fluorescein wurde im Pansen als Marker für die parazelluläre Permeation bereits mehrfach am Institut für Veterinär-Physiologie verwendet und es liegen etablierte Protokolle vor (Meissner et al. 2017; Greco et al. 2018).

Dazu wurde Na⁺-Fluorescein (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in einer Endkonzentration von 100 µM in das Ussing-Kompartiment der heißen Seite des Epithels gegeben. Die heiße Seite des Epithels wurde durch die parallel durchgeführte Kalziumfluxmessung definiert. Um eine Bezugsprobe zu erhalten, wurde von der heißen Seite eine 100 µl-Probe entnommen. Danach wurden parallel zu den Kalziummessungen in drei 45-minütigen Intervallen jeweils 300 µl von der kalten Seite entnommen und in lichtundurchlässigen Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert. Um hydrostatische Drücke auf das Epithel zu vermeiden, wurde das entfernte Probenvolumen unmittelbar mit der entsprechenden Inkubationslösung aufgefüllt. Das Licht wurde während der gesamten Durchführung aller Experimente gedimmt.

Die Fluoreszenzmessung wurde in für fluoreszenzbasierte Analysen entwickelten 96-Loch-Platten (Greiner Fluotrac 200, Kremsmünster, Österreich) in Duplikaten ausgeführt. Um gleiche Fluoreszenzbedingungen zu schaffen, wurde der pH-Wert der Proben durch die Zugabe von 10 µl einer 0,1 M Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tromethamin oder TRIS-Puffer)-Lösung auf 8 angehoben. Danach wurden die Proben in einer dreistufigen Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:10 und 1:100) bei 485 nm (Extinktion) und 535 nm (Emission) mittels Plattenlesegerät (TriStar² LB 942 Multimode Reader, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) ausgewertet.

Die Fluoresceinfluxraten wurden nach Kalibrierung der Fluoreszenzintensität der kalten Proben mit der Intensität der heißen Proben aus derselben Kammer ausgewertet und mit einer Standardkurve (5000, 1000, 500, 100 und 50 nmol·l⁻¹) kalibriert. Der Anstieg der Gesamtmenge an Fluorescein, korrigiert um das Fluorescein, das durch das Probenahmeverfahren selbst entzogen wurde, stellte die unidirektionale Fluoresceinfluxrate in mukoserosaler (J_{ms}) oder seromukosaler (J_{sm}) Richtung dar.

3.12.4 Versuchsablauf der funktionellen Untersuchungen

Es standen zur Durchführung der funktionellen Untersuchungen 16 Ussing-Kammern pro Tier zur Verfügung. Die Hälfte der Pansen- und Jejunumepithelien wurde unter natriumhaltigen mukosalen Inkubationsbedingungen bzw. unter natriumfreien mukosalen Inkubationsbedingungen gemessen. Dabei wurden sowohl mukoserosale als auch seromukosale Kalzium- und Fluoresceinfluxraten in jeweils zwei Ussing-Kammer-Paaren gemessen (Tabelle 5).

Der Versuchsablauf ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Nach 20-minütiger Epitheläquibrierung wurde ein Klemmstrom (I_{sc}) angelegt, um *Short-circuit*-Bedingungen in allen Ussing-Kammern zu schaffen. Nach erfolgter Epithelpaarung wurde ⁴⁵Ca²⁺ sowie Fluorescein auf die heiße Seite der Kammern zugegeben. Nach Zugabe erfolgte unmittelbar eine Kalzium- und Fluoresceinprobennahme (P_0) zum Zeitpunkt 0 min, was den Beginn der Messungen definierte. Es erfolgten drei Kalzium- und Fluoresceinprobennahmen (P_{1-3}) im Abstand von 45 min, welche drei Fluxperioden eingrenzten. Die initiale Fluxperiode (Fluxperiode 1) zielte darauf ab, den Basalwert der elektrophysiologischen Epitheleigenschaften und der Kalzium- und Fluoresceinfluxraten ohne akute Mentholstimulation zu bestimmen.

Mit Beginn der zweiten Fluxperiode wurde Menthol in das mukosale Kompartiment aller Ussing-Kammern appliziert, wobei die erreichte Endkonzentration 50 µM betrug. Nach einer 45-minütigen Äquibrierungsphase in Fluxperiode 2 wurden die elektrophysiologischen Epitheleigenschaften und Kalziumfluxraten unter akuter Mentholstimulation in Fluxperiode 3 gemessen. Diese Vorgehensweise erlaubte die Unterscheidung zwischen der langfristigen Anpassung der Epithelien des Pansens und Jejunums an die vierwöchige PBLCSupplementation, gemessen in der initialen Fluxperiode, und den akuten Änderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften und Kalziumfluxraten nach direkter Mentholapplikation bei den verschiedenen Fütterungsgruppen. Die akuten Effekte der Mentholstimulation wurden

durch die Subtraktion der Basalwerte der initialen Fluxperiode von den Werten unter Mentholstimulation in Fluxperiode 3 berechnet und fortwährend als ΔG_t und ΔI_{sc} für Änderungen der Gewebeleitfähigkeit und Kurzschlussstrom sowie als ΔJ_{ms} , ΔJ_{sm} für Änderungen der unidirektionalen Kalziumfluxraten angegeben.

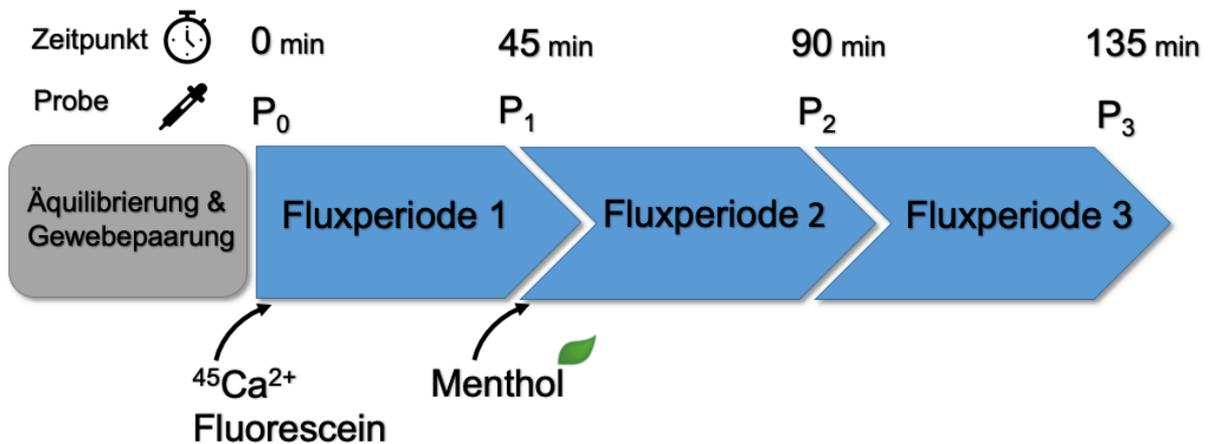


Abbildung 5: Chronogramm des Ussing-Kammer-Versuchs.

Nach Äquilibrierung und Gewebepaarung wurden $^{45}\text{Ca}^{2+}$ und Fluorescein entweder der mukosalen oder der serosalen Seite zugegeben, um unidirektionale Fluxraten zu bestimmen. Um akute, mentholinduzierte Effekte zu detektieren, wurden zu Beginn der zweiten Fluxperiode 50 μM Menthol auf der mukosalen Seite der Epithelien zugegeben. Der Zeitraum zwischen zwei Probenahmen wurde als Fluxperiode definiert.

3.13 Statistik und Darstellung der Ergebnisse

Die elektrophysiologischen Eigenschaften (G_t und I_{sc}) jedes Epithels wurden, um Mittelwerte für die weitere Berechnung zu erhalten, arithmetisch über jede Fluxperiode gemittelt. Die elektrophysiologischen Werte sowie die Kalzium- und Fluoresceinfluxraten wurden anschließend mit dem *mixed model procedure* von SAS (Cary, USA) in einer 3 (PBLC-Dosierung: 0, 80 und 160 mg/d) x 2 (Na^+ : mukosale Anwesenheit oder Abwesenheit) faktoriellen Anordnung ausgewertet. Das Modell beinhaltete die *fixed effects* (konstante Effekte) PBLC-Dosierung, Na^+ , Interaktion zwischen PBLC-Dosierung und Na^+ , Stallabteil (1, 2, 3 und 4), Geschlecht (männlich und weiblich) und experimenteller Durchlauf (1 und 2) sowie den *random effect* (zufälliger Effekt) der Ussing-Kammerbelegung innerhalb eines Tiers. Die tägliche Lebendmassezunahme, Futteraufnahme und die molekularbiologischen Daten wurden mit demselben *mixed model procedure* ausgewertet, wobei die Faktoren Na^+ und die Interaktion zwischen PBLC-Dosierung und Na^+ nicht mit in die statistische Berechnung

einbezogen wurde. Zur Analyse der Blutproben hinsichtlich der Serummetabolite und Aminosäuren an Tag 28 wurden die Werte von Tag 0 als Kovariate hinzugezogen. Da die Rohproteinaufnahme eine Einflussgröße auf die Aminosäurenkonzentration im Blut darstellen kann, wurden alle Aminosäuren mit $P < 0.10$ erneut ausgewertet und dabei die Rohproteinaufnahme als Kovariate hinzugezogen, um abzugrenzen, ob diese Aminosäurekonzentrationen aufgrund einer veränderten Rohproteinaufnahme oder aufgrund der PBLC-Supplementierung unterschiedlich waren. Zusätzlich wurde bei allen statistischen Auswertungen eine polynomische Kontrastanalyse zur Identifizierung von linearen und quadratischen Effekten der PBLC-Dosierung durchgeführt. Die Effekte einer dosisunabhängigen PBLC-Supplementierung wurde durch eine Zusammenlegung (Poolung) beider PBLC-Fütterungsgruppen und deren Vergleich mit der Kontrollgruppe erreicht (Kon vs. PBLC).

Alle elektrophysiologischen Werte sowie Kalzium- und Fluoresceinfluxraten sind als *least square mean* (LSM)-Wert angegeben und werden zusammen mit dem Standardfehler (*standard error of the mean* (SEM)) dargestellt. Grafisch dargestellte Korrelationsanalysen stellen lineare Abhängigkeiten der jeweils verglichenen Versuchsdaten dar. Als statistisch signifikant wurden P -Werte $< 0,05$ betrachtet, während bei $0,05 \leq P < 0,1$ von einem Trend ausgegangen wurde. Die Anzahl der verwendeten Versuchstiere für eine Beobachtung ist als N angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Bestimmung ausgewählter *In-vivo*-Parameter

4.1.1 Lebendmassezunahme und Futteraufnahme

Der Einfluss einer mentholreichen PBLC-Supplementierung auf die Lebendmasse, tägliche Lebendmassezunahme und Trockenmasseaufnahme von Heu und Gesamtfutter ist in Tabelle 6 dargestellt. Weder die finale Lebendmasse noch die durchschnittliche tägliche Lebendmassezunahme wurde von der PBLC-Supplementierung beeinflusst. Die PBLC-Supplementierung führte mit ansteigender PBLC-Dosierung zu einem linearen Trend ($P = 0,090$) erhöhter Heuaufnahme. Da alle Schafe die tägliche Kraffutterration komplett aufnahmen, führte dies auch zu dem Trend eines linearen Anstiegs der Gesamtfutteraufnahme ($P = 0,094$). Die PBLC-Supplementierung erhöhte die Rohproteinaufnahme linear ($P = 0,022$) und führte darüber hinaus zu einem Trend für eine erhöhte Rohproteinaufnahme für Tiere beider gepoolter PBLC-Gruppen verglichen mit der Kontrollgruppe (Kon vs. PBLC, $P = 0,096$). Tiere der PBLC-H-Gruppe nahmen signifikant mehr Rohprotein auf als Tiere der Kontrollgruppe ($P < 0,05$).

Die tägliche Trockenmasseaufnahme an Heu pro kg Lebendmasse war in den gepoolten PBLC-Gruppen höher als in der Kontrollgruppe (Kon vs. PBLC, $P = 0,047$). Auch die tägliche Gesamttrockenmasseaufnahme pro kg Lebendmasse war in den gepoolten PBLC-Gruppen höher als in der Kontrollgruppe (Kon vs. PBLC, $P = 0,041$).

Ergebnisse

Tabelle 6: Lebendmasse (LM), Lebendmassezunahme und Trockenmasseaufnahme.

	PBLC-Dosierung ¹			SEM	Kontraste ²		
	Kon	PBLC-L	PBLC-H		Linear	Quad.	Kon vs. PBLC
Initiale LM ³ , kg	35,5	34,3	35,9	0,83	0,69	0,18	0,71
Finale LM, kg	39,1	38,4	39,7	0,63	0,47	0,43	0,84
LM-Zunahme, g·d ⁻¹	170	195	180	12,8	0,61	0,32	0,34
Heuaufnahme, g·d ⁻¹	660	707 [#]	725 [#]	25,6	0,090	0,65	0,091
Heuaufnahme, g·d ⁻¹ ·kg ⁻¹ LM	17,6	19,1 [#]	19,0 [#]	0,55	0,091	0,25	0,047
Gesamtfutteraufnahme, g·d ⁻¹	1209	1255 [#]	1272 [#]	25,0	0,094	0,64	0,093
Gesamtfutteraufnahme, g·d ⁻¹ ·kg ⁻¹ LM	32,4	34,1 [#]	33,4 [#]	0,51	0,17	0,073	0,041
Rohproteinaufnahme, g·d ⁻¹	213	215 [#]	225 [*]	3,58	0,022	0,40	0,096
NDF-Aufnahme ⁴ , g·d ⁻¹	532	552	578	19,5	0,12	0,77	0,13

¹ Bioaktive Pflanzenlipide (PBLC) wurden in einer Dosierung von 0 mg/d (Kon; N = 8), 80 mg/d (PBLC-L; N = 7) oder 160 mg/d (PBLC-H; N = 8) verfüttert.

² Linear: linearer Effekt; Quad.: quadratischer Effekt; Kon vs. PBLC: Kontroll- vs. gepoolte PBLC-L- und PBLC-H-Gruppen.

³ LM: Lebendmasse.

⁴ NDF-Aufnahme: *neutral detergent fiber* (Neutral-Detergenz-Faser)-Aufnahme.

[#]/^{*} Mittelwerte unterscheiden sich von der Kontrollgruppe mit $P < 0,10 / 0,05$.

4.1.2 Serummetabolite im Blutplasma

Der Einfluss einer mentholreichen PBLC-Supplementierung auf die Konzentration ausgewählter Serummetabolite ist in Tabelle 7 dargestellt. Die PBLC-Supplementierung hatte keinen Einfluss auf die Konzentration von Glucose, Magnesium, Harnstoff, Bilirubin, Triglyceriden und Cholesterol. Lediglich Kalzium zeigte einen linearen Trend ($P = 0,089$) für erhöhte Kalziumkonzentrationen mit steigender PBLC-Dosierung. Dieser Effekt spiegelte sich

auch in einem Trend ($P < 0,10$) für erhöhte Serumkalziumwerte in der PBLC-H gegenüber der Kontrollgruppe wider.

Tabelle 7: Ausgewählte Serummetabolite im Blutplasma.

	PBLC-Dosierung ¹			SEM	Kontraste ²		
	Kon	PBLC-L	PBLC-H		Linear	Quad.	Kon vs. PBLC
Glucose, mmol·l ⁻¹	4,04	3,95	3,98	0,065	0,49	0,43	0,32
Kalzium, mmol·l ⁻¹	2,62	2,62	2,68 [#]	0,022	0,089	0,41	0,26
Magnesium, mmol·l ⁻¹	1,00	1,01	1,01	0,018	0,90	0,99	0,91
Harnstoff, mmol·l ⁻¹	9,38	10,10	9,61	0,382	0,67	0,21	0,32
Bilirubin, µmol·l ⁻¹	0,76	0,86	0,81	0,107	0,74	0,57	0,57
Triglyceride, mmol·l ⁻¹	0,23	0,22	0,24	0,022	0,81	0,63	0,98
Cholesterol, mmol·l ⁻¹	1,60	1,65	1,64	0,044	0,53	0,44	0,41

¹ Bioaktive Pflanzenlipide (PBLC) wurden in einer Dosierung von 0 mg/d (Kon; N = 8), 80 mg/d (PBLC-L; N = 8) oder 160 mg/d (PBLC-H; N = 8) verfüttert.

² Linear: linearer Effekt; Quad.: quadratischer Effekt; Kon vs. PBLC: Kontroll- vs. gepoolte PBLC-L- und PBLC-H-Gruppen.

[#] Mittelwerte unterscheiden sich von der Kontrollgruppe mit $P < 0,10$.

4.1.3 Konzentration freier Aminosäuren

Der Einfluss einer mentholreichen PBLC-Supplementierung auf die Konzentration freier Aminosäuren im Blutplasma ist in Tabelle 8 dargestellt. Der Vergleich der Kontrollgruppe mit den gepoolten PBLC-Gruppen resultierte in einem Trend zur erhöhten Prolinkonzentration ($P = 0,07$) in PBLC-vorgefütterten Tieren, während die Glycinkonzentration mit zunehmender PBLC-Dosierung einen Trend zum quadratischen Anstieg ($P = 0,06$) mit numerisch höchsten Konzentrationen der PBLC-L-Gruppe zeigte. Die Lysinkonzentration wies einen Trend zum linearen Anstieg ($P = 0,054$) mit steigender PBLC-Dosierung auf. Die Konzentration von Aspartat + Asparagin sowie Glutamat + Glutamin stieg mit ansteigender PBLC-Dosierung linear an ($P = 0,005$ und $P = 0,041$). Verglichen mit der Kontrollgruppe war die Konzentration

dieser Aminosäuren in den gepoolten PBLC-Gruppen höher ($P = 0,009$ für Asp+Asn; $P = 0,020$ für Glu+Gln).

Die Einbeziehung der Rohproteinaufnahme als Kovariate in der statistischen Berechnung zeigte für Aspartat + Asparagin eine lineare Zunahme mit steigender PBLC-Dosierung ($P = 0,034$). Verglichen mit der Kontrollgruppe zeigten die gepoolten PBLC-Gruppen höhere Aspartat + Asparagin- (Kon vs. PBLC; $P = 0,041$) sowie Glutamat + Glutamin-Konzentrationen (Kon vs. PBLC; $P = 0,041$). Die Glycinkonzentration zeigte einen Trend für eine quadratische Abhängigkeit mit steigender PBLC-Dosierung ($P = 0,071$). Die Konzentrationen von Prolin und Lysin waren nach der Einbeziehung der Rohproteinaufnahme in das statistische Modell nicht durch die Fütterung verändert.

Tabelle 8: Konzentration freier Aminosäuren (in $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) im Blutplasma.

	PBLC-Dosierung ¹			SEM	Kontraste ²		
	Kon	PBLC-L	PBLC-H		Linear	Quad.	Kon vs. PBLC
Ala	60	61	61	0,6	0,30	0,45	0,20
Val	118	120	118	2,4	0,96	0,50	0,70
Leu	133	137	137	1,8	0,14	0,49	0,11
Ile	133	136	136	1,3	0,19	0,46	0,14
Phe	223	227	228	2,5	0,17	0,63	0,15
Met	154	154	154	0,6	0,75	0,92	0,82
Pro	103	105 [#]	105	1,0	0,12	0,32	0,07
Gly	60	66 [#]	59	2,5	0,85	0,06	0,41
Ser	82	82	84	1,7	0,42	0,72	0,60
Cys	200	200	201	0,7	0,13	0,39	0,37
Thr	113	115	115	1,2	0,30	0,50	0,22
Tyr	289	298	290	4,3	0,84	0,11	0,32
Asp+Asn	121	125 [#]	128 [*]	1,4	0,005	0,79	0,009
Glu+Gln	160	174 [*]	174 [*]	4,5	0,041	0,22	0,020
Lys	147	148	152 [*]	1,5	0,054	0,50	0,17
His	171	171	168	1,9	0,31	0,62	0,52
Arg	345	353	341	11,9	0,81	0,41	0,83
Total	2611	2672	2651	32,0	0,42	0,52	0,68

¹ Bioaktive Pflanzenlipide (PBLC) wurden in einer Dosierung von 0 mg/d (Kon; N = 8), 80 mg/d (PBLC-L; N = 8) oder 160 mg/d (PBLC-H; N = 8) verfüttert.

² Linear: linearer Effekt; Quad.: quadratischer Effekt; Kon vs. PBLC: Kontroll- vs. gepoolte PBLC-L- und PBLC-H-Gruppen.

[#]/^{*} Mittelwerte unterscheiden sich von der Kontrollgruppe mit $P < 0,10 / 0,05$.

4.2 RT-qPCR

4.2.1 TRP-Kanal mRNA-Expression im Pansen und Jejunum

Die TRP-Kanal mRNA-Expression ist in Abbildung 6 (S. 54) dargestellt. Im Pansen war keine mRNA-Expression von TRPV5, TRPV6 und TRPM8 nachweisbar. Die mRNA-Expression der übrigen TRP-Kanäle konnte in der Reihenfolge TRPV3 \approx TRPM6 > TRPM7 > TRPA1 quantifiziert werden. Die PBLC-Supplementierung wirkte sich dabei nicht auf die Expression aus.

Im Jejunum war keine mRNA-Expression von TRPV3 und TRPM8 nachweisbar. Die mRNA-Expression der übrigen TRP-Kanäle konnte in der Reihenfolge TRPM7 > TRPA1 \geq TRPM6 \geq TRPV6 > TRPV5 quantifiziert werden. Von diesen verringerte die mentholreiche PBLC-Supplementierung die mRNA-Expression von TRPA1 (Kon vs. PBLC; $P = 0,043$) und TRPV5 (Kon vs. PBLC; $P = 0,027$) beim Vergleich der gepoolten PBLC-Fütterungsgruppen mit der Kontrollgruppe. Darüber hinaus nahm das TRPV5-mRNA-Expressionsniveau mit steigender PBLC-Dosierung linear ab ($P = 0,01$). Ein Trend für eine lineare Abnahme wurde für TRPA1 ($P = 0,054$) und TRPV6 ($P = 0,062$) festgestellt.

4.2.2 Tight junction mRNA-Expression im Pansen und Jejunum

Die Tight junction mRNA-Expression ist in Abbildung 7 dargestellt (S. 55). Im Pansen war keine mRNA-Expression von Cldn2 nachweisbar. Die mRNA der übrigen TJ-Gene war in der Reihenfolge Cldn1 \approx Cldn4 > Occl > ZO1 > Cldn3 \approx Cldn7 > ZO2 quantifizierbar. Davon erhöhte die mentholreiche PBLC-Supplementierung die mRNA-Expression von Cldn7 (Kon vs. PBLC, $P = 0,010$) beim Vergleich der Kontrollgruppe mit den gepoolten PBLC-Gruppen. Die PBLC-Supplementierung beeinflusste außerdem die mRNA-Expression von ZO2 auf quadratische Weise mit der höchsten mRNA-Expression in der PBLC-L-Fütterungsgruppe ($P = 0,005$).

Im Jejunum war die mRNA-Expression der TJ-Gene in der Reihenfolge Cldn2 > Cldn7 > Cldn3 \approx Occl > Cldn1 \approx ZO1 \approx Cldn4 > ZO2 quantifizierbar. Von diesen verringerte die mentholreiche PBLC-Supplementierung das mRNA-Expressionsniveau von Cldn4 (Kon vs. PBLC, $P = 0,012$) und ZO2 (Kon vs. PBLC; $P = 0,006$) beim Vergleich beider gepoolter PBLC-Fütterungsgruppen mit der Kontrollgruppe.

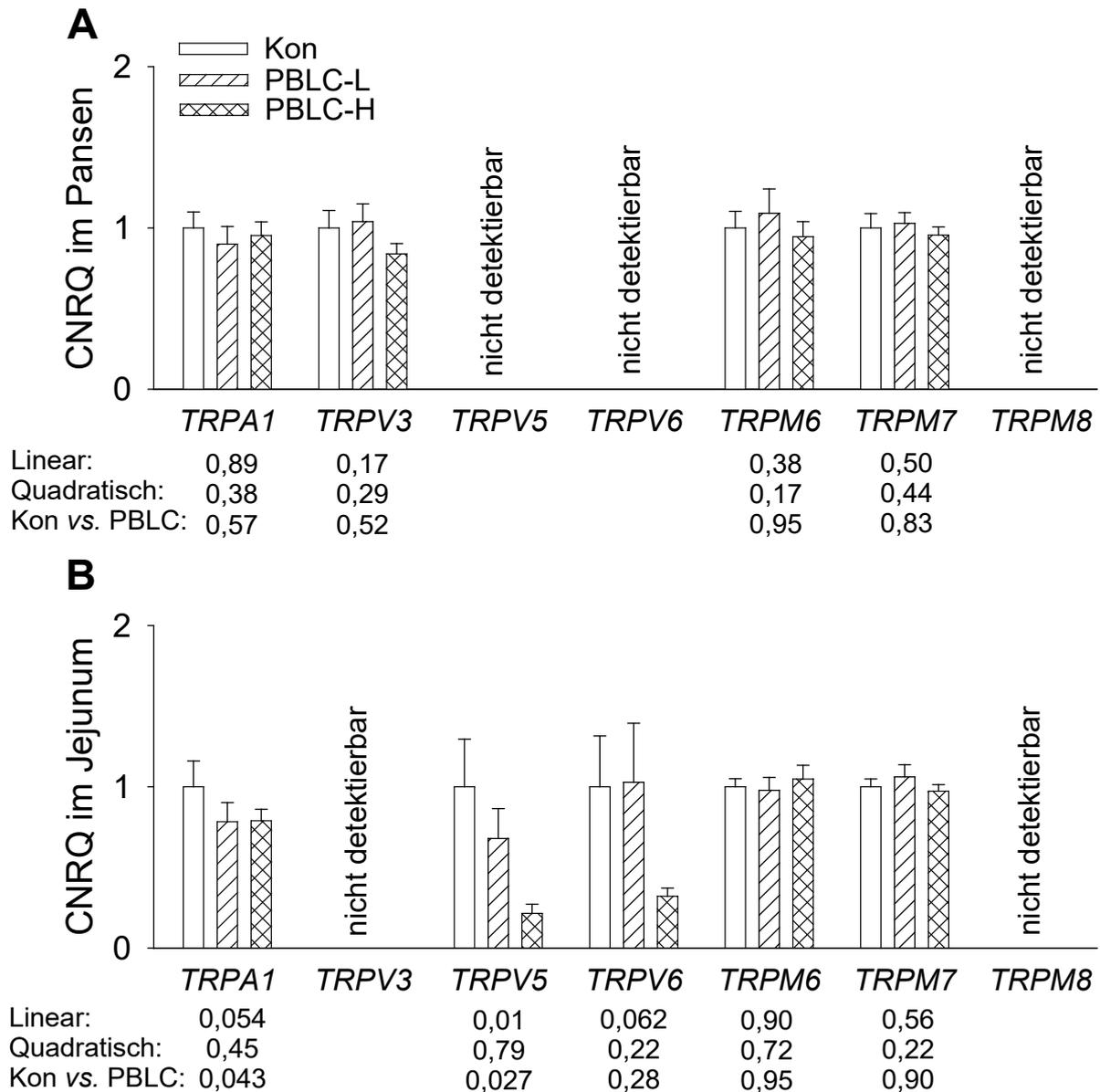


Abbildung 6: TRP-Kanal mRNA-Expression im Pansen und Jejunum.

Die Abbildung zeigt die kalibrierte normalisierte relative Quantität (CNRQ) der mRNA-Expression von TRP-Kanälen in Epithelien des (A) Pansens und (B) Jejunums von Schafen, die mit einer Mischung mentholreicher bioaktiver Pflanzenlipide (PBLC) in einer Konzentration von 0 mg/d (Kon), 80 mg/d (PBLC-L) oder 160 mg/d (PBLC-H) vorgefüttert wurden. *P*-Werte für lineare und quadratische Effekte und Kontroll- vs. gepoolte PBLC-L- und PBLC-H-Gruppen (Kon vs. PBLC) sind unter jedem Gentranskript angegeben. Werte sind als LSM ± SEM von N = 8 Schafen pro Gruppe angegeben.

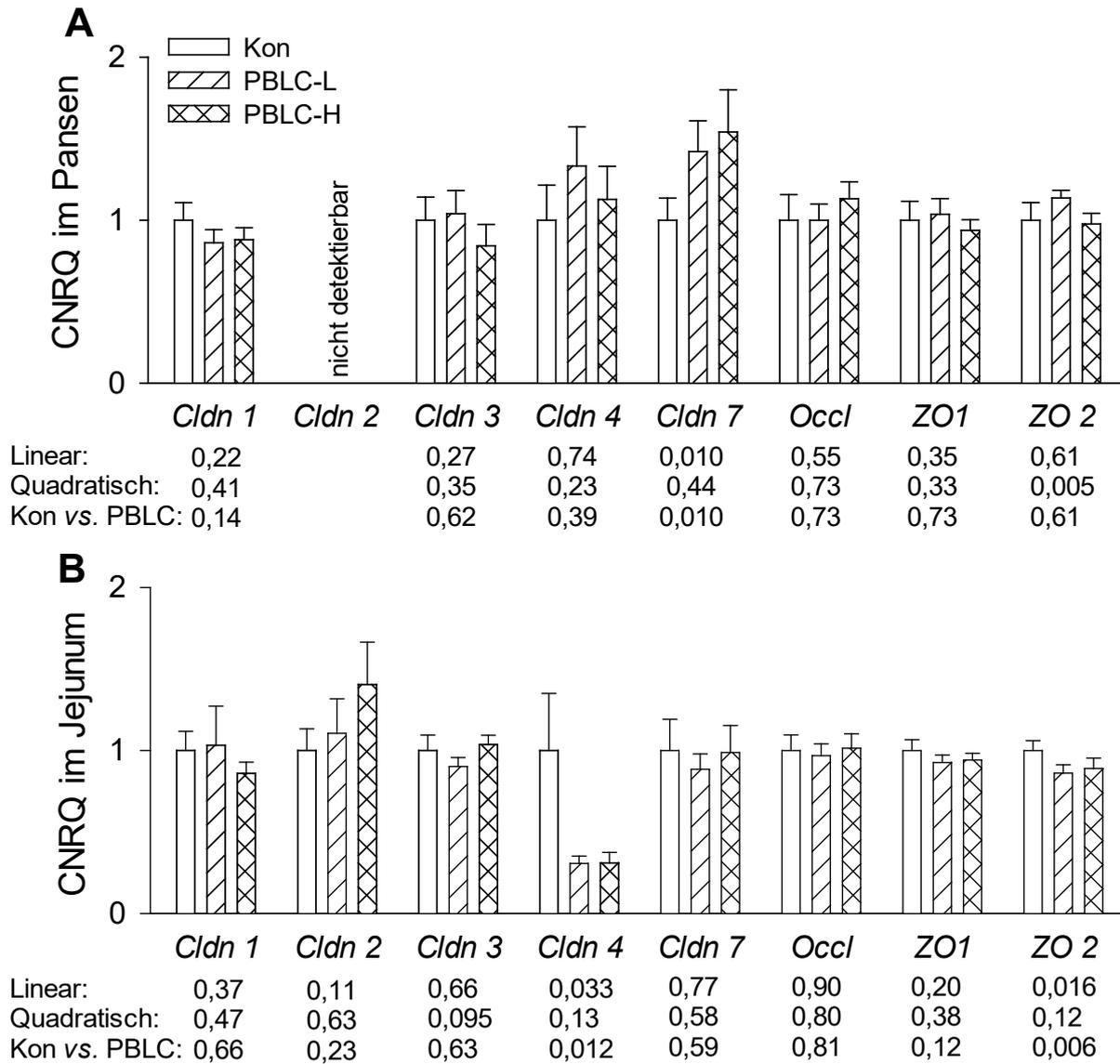


Abbildung 7: Tight junction mRNA-Expression im Pansen und Jejunum.

Die Abbildung zeigt die kalibrierte normalisierte relative Quantität (CNRQ) der mRNA-Expression von Tight Junction-Protein-Genen in Epithelien des (A) Pansens und (B) Jejunums von Schafen, die mit einer Mischung mentholreicher bioaktiver Pflanzenlipiden (PBLC) in einer Konzentration von 0 mg/d (Kon), 80 mg/d (PBLC-L) oder 160 mg/d (PBLC-H) vorgefüttert wurden. *P*-Werte für lineare und quadratische Effekte und Kontroll- vs. gepoolte PBLC-L- und PBLC-H-Gruppen (Kon vs. PBLC) sind unter jedem Gentranskript angegeben. Werte sind als LSM ± SEM von N = 8 Schafen pro Gruppe angegeben.

4.3. Funktionelle Untersuchungen in der Ussing-Kammer

4.3.1 Auswirkung bioaktiver Pflanzenlipide und mukosaler Natriumverfügbarkeit auf elektrophysiologische Eigenschaften

Die Basalwerte der elektrophysiologischen Eigenschaften (I_{sc} und G_t) der Epithelien wurden in der initialen Fluxperiode (Fluxperiode 1) erhoben. Die akuten Effekte der direkten Mentholapplikation auf die elektrophysiologischen Eigenschaften (ΔI_{sc} und ΔG_t) wurden durch eine Subtraktion der Messwerte unter Mentholstimulation aus der dritten Fluxperiode (Fluxperiode 3) mit dem Basalwert aus der initialen Fluxperiode (Fluxperiode 1) ermittelt. Alle Messungen erfolgten unter *Short-circuit*-Bedingungen.

4.3.1.1 Langzeit- und akute Effekte im Pansen

Die Langzeiteffekte einer PBLC-Supplementierung sowie die akuten Effekte einer direkten Mentholapplikation auf die elektrophysiologischen Epitheleigenschaften im Pansen sind in Tabelle 9 (S. 58) zusammengefasst. Die basale Gewebeleitfähigkeit (G_t) betrug unter natriumhaltiger mukosaler Inkubation 3,80, 3,74 und 3,94 \pm 0,11 mS \cdot cm $^{-2}$ bei der Kontroll-, PBLC-L- bzw. PBLC-H-Gruppe. Der Basalwert des Kurzschlussstromes (I_{sc}) betrug unter natriumhaltiger mukosaler Inkubation 12,3, 20,0 und 21,0 \pm 0,77 μ Eq \cdot cm $^{-2}\cdot$ h $^{-1}$. Eine natriumfreie mukosale Inkubation (NMDG $^{+}$ -haltige mukosale Inkubation) verringerte sowohl G_t als auch I_{sc} (jeweils $P < 0,001$) im Pansen. Die PBLC-Supplementierung hatte keinen Einfluss auf die G_t . Mit zunehmender PBLC-Dosierung stieg I_{sc} linear an ($P < 0,001$). Dabei wiesen die gepoolten PBLC-Gruppen einen höheren I_{sc} als die Kontrollgruppe auf (Kon vs. PBLC; $P < 0,001$).

Nach direkter mukosaler Mentholapplikation betrug die Änderung der Gewebeleitfähigkeit (ΔG_t) unter natriumhaltiger mukosaler Inkubation 0,34, 0,52 und 0,57 \pm 0,04 mS \cdot cm $^{-2}$ bei der Kontroll-, PBLC-L- bzw. PBLC-H-Gruppe. Die Änderung des Kurzschlussstromes nach mukosaler Mentholapplikation (ΔI_{sc}) betrug unter natriumhaltiger mukosaler Inkubation -2,33, -2,91 und 0,36 \pm 0,31 bei Kontroll-, PBLC-L- bzw. PBLC-H-Gruppe. Eine natriumfreie mukosale Inkubation (NMDG $^{+}$ -haltige mukosale Inkubation) erhöhte ΔG_t ($P < 0,001$), was auf einen geringeren zeitabhängigen Anstieg der G_t (von Fluxperiode 1–3) in der mukosalen Präsenz von Na $^{+}$ zurückzuführen ist. Das ΔG_t stieg mit zunehmender PBLC-Dosierung linear an ($P = 0,043$). Dabei wiesen die gepoolten PBLC-Gruppen ein höheres ΔG_t als die Kontrollgruppe auf (Kon vs. PBLC; $P = 0,011$). Das ΔI_{sc} stieg mit zunehmender PBLC-

Dosierung linear an ($P < 0,001$). Dabei wiesen die gepoolten PBLC-Gruppen nach mukosaler Mentholapplikation ein höheres ΔI_{sc} als die Kontrollgruppe auf (Kon vs. PBLC; $P = 0,015$). Die natriumfreie mukosale Inkubation wirkte sich nicht auf ΔI_{sc} im Pansen aus. Es war eine signifikante PBLC \times Na⁺-Interaktion für ΔI_{sc} ($P < 0,001$) mit niedrigsten Werten für die Kontrollgruppe unter natriumfreier Inkubation und höchsten Werten für PBLC-H unter natriumhaltiger mukosaler Inkubation messbar.

4.3.1.2 Langzeit- und akute Effekte im Jejunum

Die Langzeiteffekte einer PBLC-Supplementierung und die akuten Effekte einer direkten Mentholapplikation auf die elektrophysiologischen Epitheleigenschaften im Jejunum sind in Tabelle 10 (S. 59) zusammengefasst. Die basale Gewebeleitfähigkeit (G_t) unter natriumhaltiger mukosaler Inkubation betrug 17,0, 16,1 und $16,1 \pm 0,33$ mS·cm⁻² bei der Kontroll-, PBLC-L- bzw. PBLC-H-Gruppe. Der Basalwert des Kurzschlussstromes (I_{sc}) betrug unter natriumhaltiger mukosaler Inkubation 9,49, 8,05 und $4,84 \pm 1,63$ μ Eq·cm⁻²·h⁻¹. Eine natriumfreie mukosale Inkubation (NMDG⁺-haltige mukosale Inkubation) verringerte sowohl G_t als auch I_{sc} ($P < 0,001$) im Jejunum. Die PBLC-Supplementierung wirkte sich weder auf G_t noch I_{sc} aus.

Nach mukosaler Mentholapplikation betrug die Änderung der Gewebeleitfähigkeit (ΔG_t) unter natriumhaltiger mukosaler Inkubation -1,51, -0,86 und $-1,32 \pm 0,26$ mS·cm⁻² bei der Kontroll-, PBLC-L- bzw. PBLC-H-Gruppe. Die Änderung des Kurzschlussstromes nach mukosaler Mentholapplikation (ΔI_{sc}) betrug unter natriumhaltiger mukosaler Inkubation -0,37, 2,59 und $2,77 \pm 0,77$ bei Kontroll-, PBLC-L- bzw. PBLC-H-Gruppe. Eine natriumfreie mukosale Inkubation führte zu einem weniger negativen ΔG_t ($P = 0,003$) und zu einem negativen ΔI_{sc} ($P < 0,001$). Die PBLC-Supplementation wirkte sich nicht auf das ΔG_t aus, wobei das ΔI_{sc} mit zunehmender PBLC-Dosierung tendentiell linear schwächer abfiel ($P < 0,079$).

Ergebnisse

Tabelle 9: Auswirkungen einer mentholreichen PBLC-Supplementierung und Präsenz mukosalen Natriums auf die Basalwerte der Gewebeleitfähigkeit (G_t) und des Kurzschlussstrom (I_{sc}), sowie akute Änderungen elektrophysiologischer Eigenschaften (ΔG_t und ΔI_{sc}) nach direkter mukosaler Mentholapplikation *ex vivo* im Pansen von Schafen.

	Faktor	PBLC-Dosierung ³			LSM (Na ⁺) ⁵	Kontraste				
		Kon	PBLC-L	PBLC-H		Linear	Quad	Kon vs. PBLC ⁶	Na ⁺	PBLC × Na ⁺
G_t^1 , mS·cm ⁻²	Na ⁺	3,80	3,74	3,94	3,83 ± 0,11	0,14	0,30	0,46	< 0,001	0,76
	NMDG ⁺	2,73	2,72	3,11	2,85 ± 0,11					
	LSM (PBLC) ⁴	3,27 ± 0,12	3,23 ± 0,14	3,52 ± 0,13						
I_{sc}^1 , µEq·cm ⁻² ·h ⁻¹	Na ⁺	12,3	20,0	21,0	17,8 ± 0,77	< 0,001	0,039	< 0,001	< 0,001	0,072
	NMDG ⁺	-11,4	-9,24	-8,91	-9,85 ± 0,79					
	LSM (PBLC) ⁴	0,46 ± 1,13	5,39 ± 0,82	6,03 ± 0,84						
ΔG_t^2 , mS·cm ⁻²	Na ⁺	0,34	0,52	0,57	0,48 ± 0,04	0,043	0,065	0,011	< 0,001	0,34
	NMDG ⁺	0,67	0,84	0,73	0,75 ± 0,04					
	LSM (PBLC) ⁴	0,51 ± 0,05	0,68 ± 0,05	0,65 ± 0,05						
ΔI_{sc}^2 , µEq·cm ⁻² ·h ⁻¹	Na ⁺	-2,33 ^{bc}	-2,91 ^{bc}	0,36 ^a	-1,63 ± 0,31	< 0,001	0,46	0,015	0,14	< 0,001
	NMDG ⁺	-3,10 ^c	-1,41 ^b	-2,23 ^{bc}	-2,25 ± 0,32					
	LSM (PBLC) ⁴	-2,71 ± 0,40	-2,16 ± 0,40	-0,94 ± 0,33						

¹ G_t and I_{sc} beschreiben die Basalwerte der initialen Fluxperiode (Fluxperiode 1).

² ΔG_t and ΔI_{sc} beschreiben Änderungen von G_t und I_{sc} nach direkter, mukosaler Mentholapplikation zwischen der initialen Fluxperiode (0–45 min) und der dritten Fluxperiode (90–135 min).

³ Bioaktive Pflanzenlipide (PBLC) wurden in einer Dosierung von 0 mg/d (Kon; N = 8), 80 mg/d (PBLC-L; N = 7) oder 160 mg/d (PBLC-H; N = 8) verfüttert.

⁴ LSM (PBLC) beschreibt den *least square mean*-Wert beider Na⁺- und NMDG⁺-Inkubationsbedingungen innerhalb einer Fütterungsgruppe.

⁵ LSM (Na⁺) beschreibt den *least square mean*-Wert aller Fütterungsgruppen (Kon, PBLC-L, PBLC-H) unter einer Inkubationsbedingung.

⁶ Kon vs. PBLC beschreibt den Vergleich beider gepoolter PBLC-Fütterungsgruppen (PBLC-L und PBLC-H) mit der Kontrollgruppe.

^{a-c} $P < 0,05$ für Individualwerte innerhalb eines Messwertes.

Ergebnisse

Tabelle 10: Auswirkungen einer mentholreichen PBLC-Supplementierung und Präsenz mukosalen Natriums auf die Basalwerte der Gewebeleitfähigkeit (G_t) und des Kurzschlussstrom (I_{sc}), sowie akute Änderungen elektrophysiologischer Eigenschaften (ΔG_t und ΔI_{sc}) nach direkter mukosaler Mentholapplikation *ex vivo* im Jejunum von Schafen.

	Faktor	PBLC-Dosierung ³			LSM (Na ⁺) ⁵	Kontraste				
		Kon	PBLC-L	PBLC-H		Linear	Quad	Kon vs. PBLC ⁶	Na ⁺	PBLC × Na ⁺
G_t^1 , mS·cm ⁻²	Na ⁺	17,0	16,1	16,1	16,4 ± 0,33	0,37	0,12	0,12	<0,001	0,73
	NMDG ⁺	10,8	9,74	10,6	10,4 ± 0,33					
	LSM (PBLC) ⁴	13,9 ± 0,40	12,9 ± 0,39	13,4 ± 0,41						
I_{sc}^1 , µEq·cm ⁻² ·h ⁻¹	Na ⁺	9,49	8,05	4,84	7,46 ± 1,63	0,72	0,32	0,91	<0,001	0,079
	NMDG ⁺	-12,9	-14,7	-6,05	-11,2 ± 1,66					
	LSM (PBLC) ⁴	-1,69 ± 2,02	-3,35 ± 1,68	0,60 ± 2,29						
ΔG_t^2 , mS·cm ⁻²	Na ⁺	-1,51	-0,86	-1,32	-1,23 ± 0,26	0,30	0,39	0,19	0,003	0,70
	NMDG ⁺	-0,55	-0,075	0,19	-0,14 ± 0,26					
	LSM (PBLC) ⁴	-1,03 ± 0,32	-0,47 ± 0,31	-0,56 ± 0,33						
ΔI_{sc}^2 , µEq·cm ⁻² ·h ⁻¹	Na ⁺	-0,37	2,59	2,77	1,66 ± 0,77	0,079	0,20	0,056	<0,001	0,85
	NMDG ⁺	-8,01	-5,81	-6,33	-6,72 ± 0,76					
	LSM (PBLC) ⁴	-4,19 ± 1,18	-1,61 ± 0,84	-1,78 ± 0,71						

¹ G_t and I_{sc} beschreiben die Basalwerte der initialen Fluxperiode (Fluxperiode 1).

² ΔG_t and ΔI_{sc} beschreiben Änderungen von G_t und I_{sc} nach direkter, mukosaler Mentholapplikation zwischen der initialen Fluxperiode (0-45 min) und der dritten Fluxperiode (90-135 min).

³ Bioaktive Pflanzenlipide (PBLC) wurden in einer Dosierung von 0 mg/d (Kon; N = 8), 80 mg/d (PBLC-L; N = 7) oder 160 mg/d (PBLC-H; N = 8) verfüttert.

⁴ LSM (PBLC) beschreibt den *least square mean*-Wert beider Na⁺- und NMDG⁺- Inkubationsbedingungen innerhalb einer Fütterungsgruppe.

⁵ LSM (Na⁺) beschreibt den *least square mean*-Wert aller Fütterungsgruppen (Kontrolle, PBLC-L, PBLC-H) unter einer Inkubationsbedingung.

⁶ Kon vs. PBLC beschreibt den Vergleich beider gepoolter PBLC-Fütterungsgruppen (PBLC-L und PBLC-H) mit der Kontrollgruppe.

4.3.2 Auswirkung bioaktiver Pflanzenlipide und mukosaler Natriumverfügbarkeit auf Kalziumfluxraten

Die Basalwerte der unidirektionalen Kalziumfluxraten in mukoserosaler (J_{ms}) und seromukosaler (J_{sm}) Richtung wurden in der initialen Fluxperiode (Fluxperiode 1) erhoben. Die akuten Effekte der direkten Mentholapplikation auf die Kalziumfluxraten (ΔJ_{ms} und ΔJ_{sm}) wurden durch eine Subtraktion der Messwerte unter Mentholstimulation aus der dritten Fluxperiode (Fluxperiode 3) von dem Basalwert aus der initialen Fluxperiode (Fluxperiode 1) ermittelt. Alle Messungen erfolgten unter *Short-circuit*-Bedingungen.

4.3.2.1 Langzeit- und akute Effekte im Pansen

Die Auswirkungen einer mentholreichen PBLC-Supplementierung auf die Basalwerte der unidirektionalen Kalziumfluxraten im Pansen sind in Abbildung 8 dargestellt. Im Pansen war die basale J_{ms} höher ($P < 0,001$) als die entsprechende J_{sm} , was in einer positiven J_{net} resultierte. Letztere stieg von $41,0 \pm 1,82 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ in der Kontrollgruppe auf $46,7 \pm 2,05$ in der PBLC-L- und $39,5 \pm 1,91 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ in der PBLC-H-Gruppe quadratisch ($P = 0,043$) an. Diese quadratische Beeinflussung der PBLC-Supplementierung auf J_{net} wurde von einem Trend für denselben Effekt für J_{ms} getragen ($P = 0,067$). J_{sm} tendierte zu einem linearen Anstieg mit steigender PBLC-Supplementierung ($P = 0,053$).

Eine natriumfreie mukosale Inkubation (NMDG⁺-haltige mukosale Inkubation) verringerte die basale J_{ms} ($P < 0,001$) und J_{net} ($P < 0,001$) in allen Fütterungsgruppen, während ein Anstieg für J_{sm} beobachtbar war ($P < 0,001$).

Die akuten Auswirkungen einer direkten mukosalen Mentholapplikation auf Änderungen der unidirektionalen Kalziumfluxraten im Pansen sind Abbildung 9 zu entnehmen. Die direkte mukosale Mentholapplikation wirkte sich nicht auf ΔJ_{sm} aus. Die Fluxrate in entgegengesetzte Richtung ΔJ_{ms} erhöhte sich linear in allen Fütterungsgruppen ($P = 0,008$). Dies führte zu einem linearen Anstieg von ΔJ_{net} ($P = 0,038$). Beim Vergleich der gepoolten PBLC-L- und PBLC-H-Gruppen mit der Kontrollgruppe war die mentholinduzierte Stimulierbarkeit von ΔJ_{net} bei den gepoolten PBLC-Tieren höher als bei der Kontrollgruppe (Kon vs. PBLC; $P = 0,008$).

Eine natriumfreie mukosale Inkubation führte nach einer akuten Mentholapplikation zu erhöhten ΔJ_{sm} ($P = 0,002$). ΔJ_{ms} und ΔJ_{net} blieben hingegen unbeeinflusst.

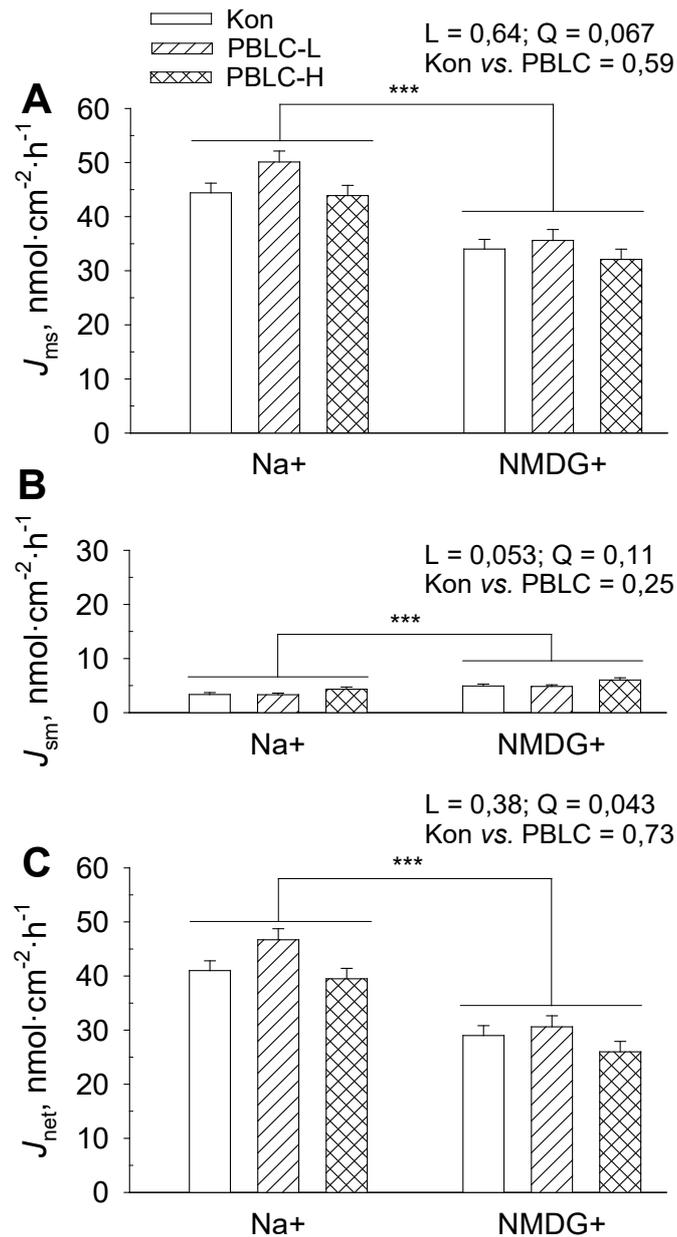


Abbildung 8: Basale Kalziumfluxraten im Pansen.

Die Abbildung zeigt die Auswirkungen der Supplementierung einer Mischung von mentholreichen bioaktiven Pflanzenlipiden (PBLC) in einem Dosisbereich von 0 mg/d (Kon), 80 mg/d (PBLC-L) und 160 mg/d (PBLC-H) auf die Basalwerte der Kalziumfluxraten in (A) mukoserosaler Richtung (J_{ms}), (B) seromukosaler Richtung (J_{sm}) und (C) daraus resultierende Nettofluxraten (J_{net}) in Anwesenheit (links) und Abwesenheit (rechts) von mukosalem Na^+ (ersetzt durch NMDG^+). J_{ms} tendierte zu einer quadratischen Zunahme (Q, $P = 0,067$), während J_{sm} linear zunahm (L, $P = 0,053$), was zu einem quadratischen Effekt des J_{net} führte (Q, $P = 0,043$). Eine natriumfreie mukosale Inkubation verringerte J_{ms} und J_{net} und erhöhte J_{sm} mit $P < 0,001$ (***). P -Werte für lineare (L) und quadratische Effekte (Q) und Kontroll- vs. gepoolte PBLC-L- und PBLC-H-Gruppen (Kon vs. PBLC) sind für jedes Diagramm angegeben. Werte sind als $\text{LSM} \pm \text{SEM}$ von $N = 8, 7$ bzw. 8 Schafen der Kon-, PBLC-L- bzw. PBLC-H-Gruppe angegeben.

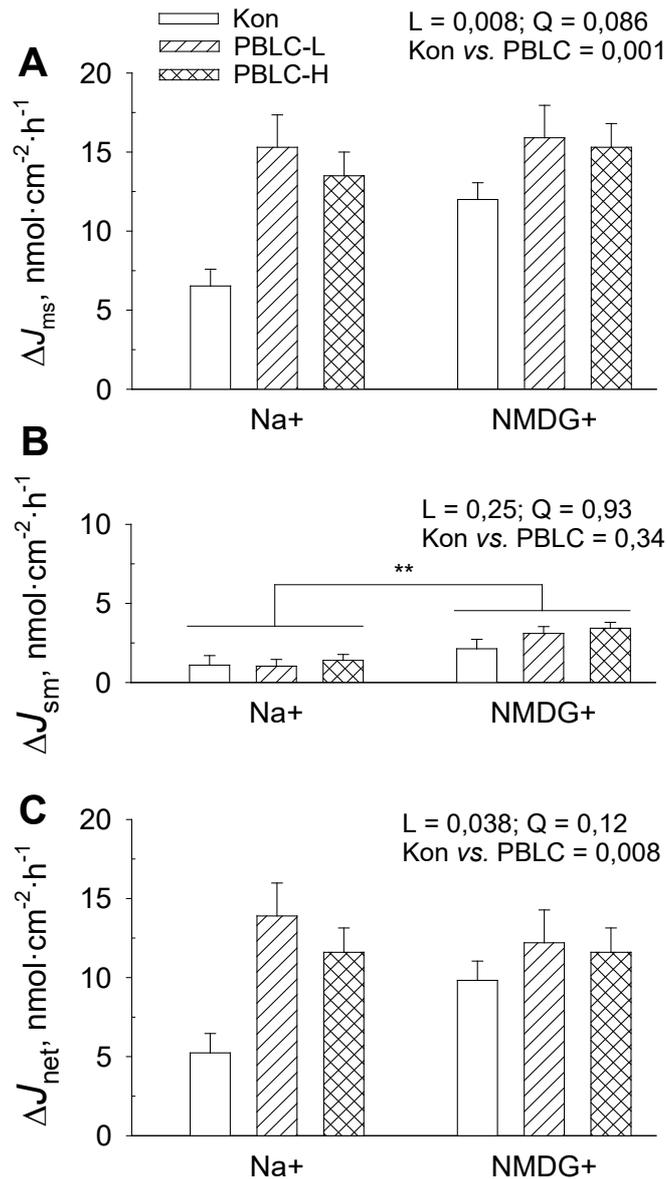


Abbildung 9: Mentholinduzierte Änderungen der Kalziumfluxraten im Pansen.

Die akuten Auswirkungen einer direkten mukosalen Mentholapplikation auf Änderungen der (A) mukoserosalen (ΔJ_{ms}), (B) seromukosalen (ΔJ_{sm}) und resultierenden (C) Nettfluxrate (ΔJ_{net}) von Kalzium in der Anwesenheit (links) und Abwesenheit (rechts) von mukosalem Na^+ (ersetzt durch NMDG⁺) über das Pansenepithel von Schafen, die mit mentholreichen bioaktiven Pflanzenlipiden in einem Dosisbereich von 0 mg/d (Kon), 80 mg/d (PBLC-L) und 160 mg/d (PBLC-H) vorgefüttert wurden. Tiere, die mit PBLC vorgefüttert wurden, reagierten auf die akute Mentholapplikation mit einer höheren Stimulation des ΔJ_{ms} (Kon vs. PBLC, $P = 0,001$), was sich auch im ΔJ_{net} widerspiegelte (Kon vs. PBLC, $P = 0,008$). Eine natriumfreie mukosale Inkubation hatte keine Auswirkungen auf ΔJ_{ms} und ΔJ_{net} , während ein Anstieg für ΔJ_{sm} beobachtet wurde (**, $P = 0,002$). P -Werte für lineare (L) und quadratische Effekte (Q) und Kontroll- vs. gepoolte PBLC-L- und PBLC-H-Gruppen (Kon vs. PBLC) sind für jedes Diagramm angegeben. Die akuten Änderungen der Kalziumfluxraten wurden aus der Differenz der Fluxperiode 3 und Fluxperiode 1 berechnet und sind als LSM \pm SEM von N = 8, 7 bzw. 8 Schafen der Kon-, PBLC-L- bzw. PBLC-H-Gruppe angegeben.

4.3.2.2 Langzeit- und akute Effekte im Jejunum

Die Auswirkungen einer mentholreichen PBLC-Supplementierung auf die Basalwerte der unidirektionalen Kalziumfluxraten im Jejunum sind in Abbildung 10 dargestellt. Dabei war kein statistischer Unterschied zwischen J_{ms} und J_{sm} erkennbar, weswegen kein signifikanter J_{net} berechnet wurde. Weder die PBLC-Supplementierung noch eine natriumfreie mukosale Inkubation hatten Einfluss auf J_{ms} und J_{sm} .

Die akuten Auswirkungen einer direkten mukosalen Mentholapplikation auf Änderungen der unidirektionalen Kalziumfluxraten im Jejunum sind Abbildung 11 zu entnehmen. Eine direkte mukosale Mentholapplikation wirkte sich nicht auf ΔJ_{ms} und ΔJ_{sm} aus. Eine natriumfreie mukosale Inkubation erhöhte ΔJ_{ms} ($P = 0,025$) und ΔJ_{sm} ($P = 0,015$) unabhängig von der PBLC-Supplementierung.

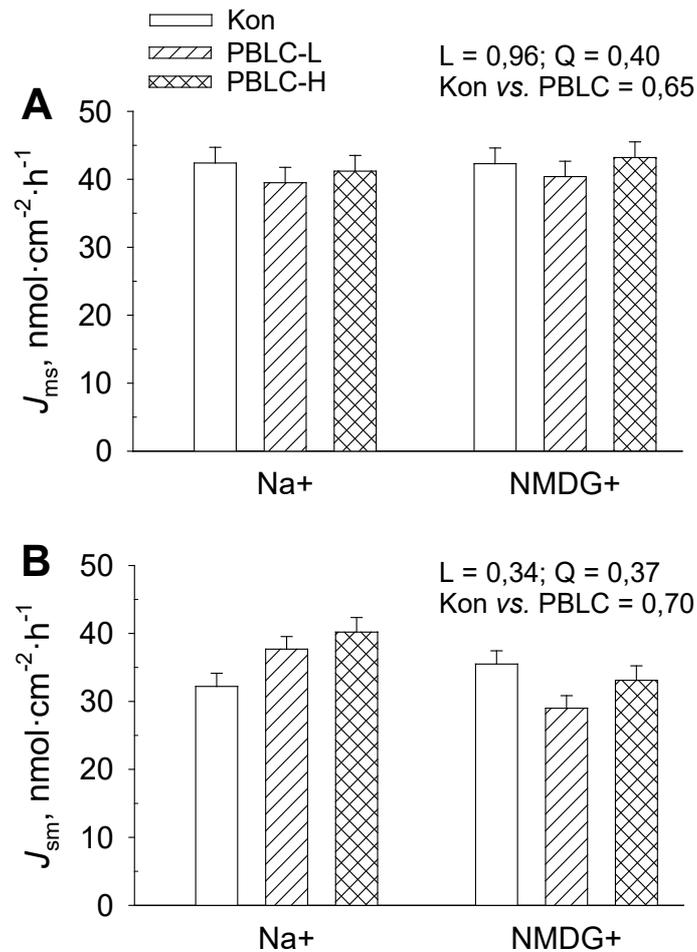


Abbildung 10: Basale Kalziumfluxraten im Jejunum.

Die Abbildung zeigt die Auswirkungen der Supplementierung einer Mischung von mentholreichen bioaktiven Pflanzenlipiden (PBLC) in einem Dosisbereich von 0 mg/d (Kon), 80 mg/d (PBLC-L) und 160 mg/d (PBLC-H) auf die Basalwerte der Kalziumfluxraten in (A) mukoserosaler Richtung (J_{ms}) und (B) seromukosaler Richtung (J_{sm}) in Anwesenheit (links) und Abwesenheit (rechts) von mukosalem Na^+ (ersetzt durch NMDG^+) im Jejunum. J_{ms} und J_{sm} unterschieden sich nicht signifikant, daher konnte kein signifikanter J_{net} berechnet werden. Eine Supplementierung mit mentholreichen PBLC hatte weder Einfluss auf J_{ms} noch J_{sm} . Die natriumfreie mukosale Inkubation hatte keine Auswirkungen auf die jejunalen Kalziumfluxraten. P -Werte für lineare (L) und quadratische Effekte (Q) und Kontroll- vs. gepoolte PBLC-L- und PBLC-H-Gruppen (Kon vs. PBLC) sind für jedes Diagramm angegeben. Werte sind als $\text{LSM} \pm \text{SEM}$ von $N = 8, 7$ bzw. 8 Schafen der Kon-, PBLC-L- bzw. PBLC-H-Gruppe angegeben.

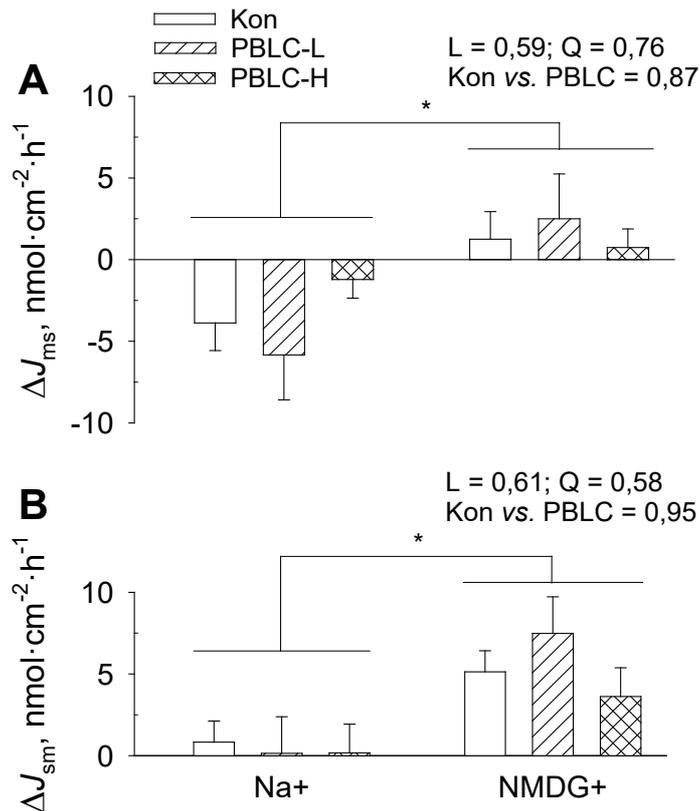


Abbildung 11: Mentholinduzierte Änderung der Kalziumfluxraten im Jejunum.

Die akuten Auswirkungen einer direkten mukosalen Mentholapplikation auf Änderungen der (A) mukoserosalen (ΔJ_{ms}) und (B) seromukosalen (ΔJ_{sm}) Kalziumfluxrate in der Anwesenheit (links) und Abwesenheit (rechts) von mukosalem Na^+ (ersetzt durch NMDG^+) über das Jejunumepithel von Schafen, die mit mentholreichen bioaktiven Pflanzenlipiden in einem Dosisbereich von 0 mg/d (Kon), 80 mg/d (PBLC-L) und 160 mg/d (PBLC-H) vorgefüttert wurden. Eine Supplementierung mit einer Mischung aus mentholreichen PBLC hatte keine Auswirkungen auf ΔJ_{ms} und ΔJ_{sm} . Eine natriumfreie mukosale Inkubation erhöhte ΔJ_{ms} (*, $P = 0,026$) und ΔJ_{sm} (*, $P = 0,015$). P -Werte für lineare (L) und quadratische Effekte (Q) und Kontroll- vs. gepoolte PBLC-L- und PBLC-H-Gruppen (Kon vs. PBLC) sind für jedes Diagramm angegeben. Die akuten Änderungen der Kalziumfluxraten wurden aus der Differenz der Kalziumfluxraten der Fluxperiode 3 und Fluxperiode 1 berechnet und sind als $\text{LSM} \pm \text{SEM}$ von $N = 8, 7$ bzw. 8 Schafen der Kon-, PBLC-L- bzw. PBLC-H-Gruppe angegeben.

4.3.3 Auswirkung bioaktiver Pflanzenlipide und mukosaler Natriumverfügbarkeit auf Fluoresceinfluxraten

Die parazelluläre Barrierefunktion des Pansen- und Jejunumepithels wurde unter Ausschaltung eines elektrochemischen Gradienten unter *Short-circuit*-Bedingungen mittels Fluorescein als Tracer für die parazelluläre Durchlässigkeit in der initialen Fluxperiode (Fluxperiode 1) gemessen.

4.3.3.1 Fluoresceinfluxraten im Pansen

Die Auswirkungen einer mentholreichen PBLC-Supplementierung auf die Fluoresceinfluxraten im Pansen sind in Abbildung 12 dargestellt. Dabei war J_{ms} höher ($P < 0,001$) als J_{sm} , was zu einer positiven J_{net} führte. Die mentholreiche PBLC-Supplementierung wirkte sich nicht auf die Fluoresceinfluxraten aus.

Eine natriumfreie mukosale Inkubation (NMDG⁺-haltige mukosale Inkubation) verminderte J_{ms} in allen Fütterungsgruppen ($P < 0,001$), während J_{sm} in allen Fütterungsgruppen anstieg ($P < 0,001$). Dies führte zu einer signifikant negativen J_{net} ($P < 0,001$).

4.3.3.2. Fluoresceinfluxraten im Jejunum

Die Auswirkungen einer mentholreichen PBLC-Supplementierung auf die Fluoresceinfluxraten im Jejunum sind in Abbildung 13 dargestellt. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen J_{ms} und J_{sm} feststellbar. Beim Vergleich der gepoolten PBLC-Tiere mit der Kontrollgruppe verringerte eine mentholreiche PBLC-Supplementierung J_{ms} (Kon vs. PBLC; $P = 0,006$). Ein Trend für denselben Effekt für die entgegengesetzten J_{sm} wurde beim Vergleich der gepoolten PBLC-Tiere mit der Kontrollgruppe sichtbar (Kon vs. PBLC; $P = 0,095$).

Eine natriumfreie mukosale Inkubation senkte J_{ms} tendentiell ($P = 0,089$) und erhöhte J_{sm} ($P = 0,004$).

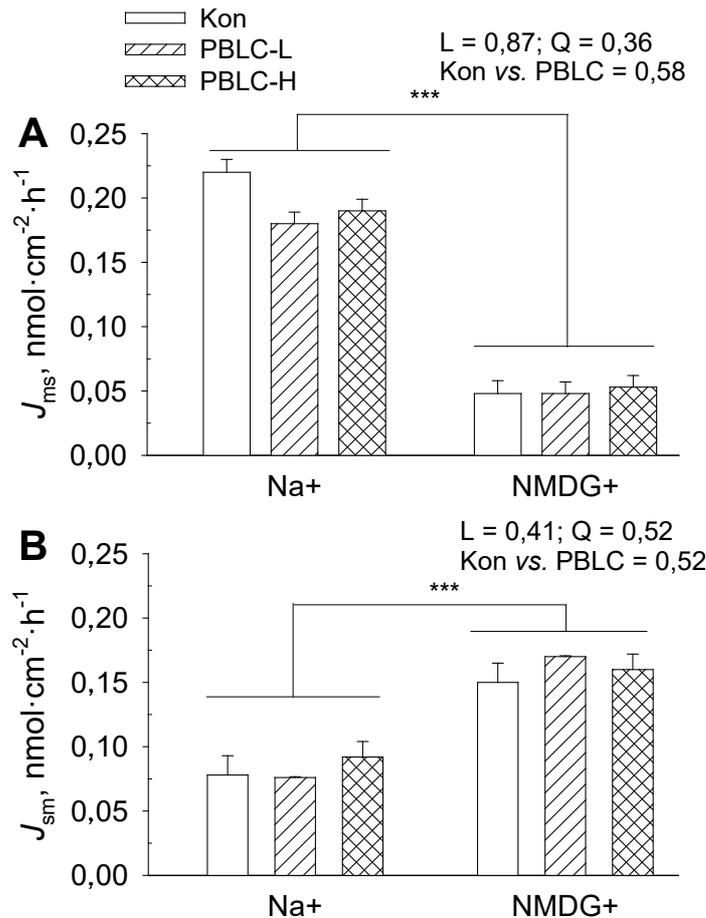


Abbildung 12: Fluoresceinfluxraten im Pansen.

Die Abbildung zeigt die Auswirkungen der Supplementierung einer Mischung von mentholreichen bioaktiven Pflanzenlipiden (PBLC) in einem Dosisbereich von 0 mg/d (Kon), 80 mg/d (PBLC-L) und 160 mg/d (PBLC-H) auf Fluoresceinfluxraten in (A) mukoserosaler Richtung (J_{ms}) und (B) seromukosaler Richtung (J_{sm}) in Anwesenheit (links) und Abwesenheit (rechts) von mukosalem Na^+ (ersetzt durch NMDG⁺). J_{ms} und J_{sm} unterschieden sich signifikant voneinander ($P < 0,001$). Eine Supplementierung mit einer Mischung aus mentholreichen PBLC hatte keine Auswirkungen auf J_{ms} und J_{sm} . Eine natriumfreie mukosale Inkubation verringerte J_{ms} (***, $P < 0,001$) und erhöhte J_{sm} (***, $P < 0,001$). P -Werte für lineare (L) und quadratische Effekte (Q) und Kontroll- vs. gepoolte PBLC-L- und PBLC-H-Gruppen (Kon vs. PBLC) sind für jedes Diagramm angegeben. Werte sind als LSM \pm SEM von N = 6, 7 bzw. 8 Schafen der Kon-, PBLC-L- bzw. PBLC-H-Gruppe angegeben.

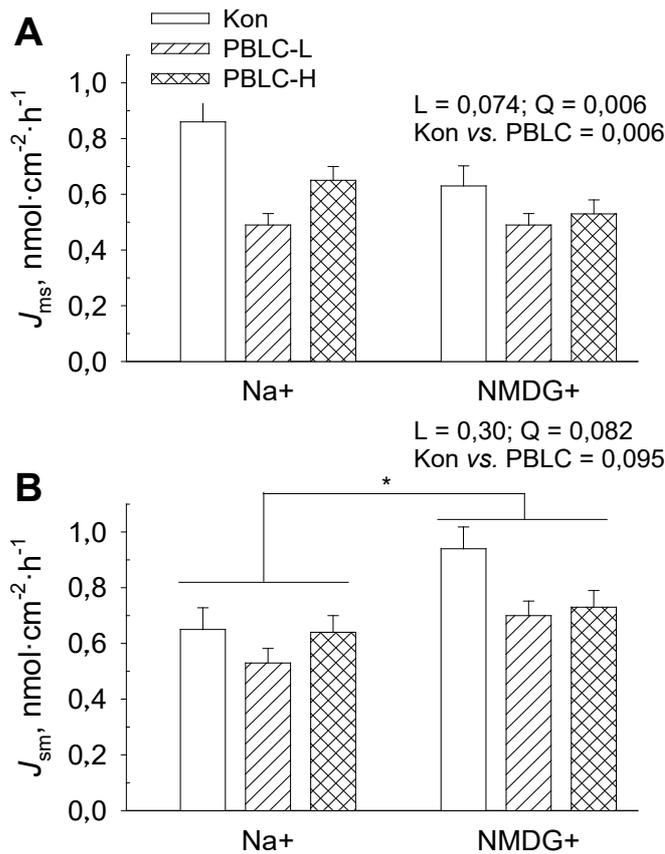


Abbildung 13: Fluoresceinfluxraten im Jejunum.

Die Abbildung zeigt die Auswirkungen der Supplementierung einer Mischung von mentholreichen bioaktiven Pflanzenlipiden (PBLC) in einem Dosisbereich von 0 mg/d (Kon), 80 mg/d (PBLC-L) und 160 mg/d (PBLC-H) auf Fluoresceinfluxraten in (A) mukoserosaler Richtung (J_{ms}) und (B) seromukosaler Richtung (J_{sm}) in Anwesenheit (links) und Abwesenheit (rechts) von mukosalem Na^+ (ersetzt durch NMDG⁺). Eine Supplementierung mit einer Mischung aus mentholreichen PBLC verringerte J_{ms} (Kon vs. PBLC, $P = 0,006$) und bewirkte einen ähnlichen Trend für J_{sm} (Kon vs. PBLC, $P = 0,095$). Eine natriumfreie mukosale Inkubation erhöhte J_{sm} (*, $P = 0,004$). P -Werte für lineare (L) und quadratische Effekte (Q) und Kontroll- vs. gepoolte PBLC-L- und PBLC-H-Gruppen (Kon vs. PBLC) sind für jedes Diagramm angegeben. Werte sind als LSM \pm SEM von $N = 6, 8$ bzw. 8 Schafen der Kon-, PBLC-L- bzw. PBLC-H-Gruppe angegeben.

4.3.4 Korrelationsanalysen

Alle Korrelationsanalysen wurden aus den aufgeführten Daten der initialen Fluxperioden (Fluperiode 1) in der Anwesenheit von mukosalem Natrium berechnet.

4.3.4.1 Beziehung unidirektionaler Kalzium- und Fluoresceinfluxraten

Die Beziehungen zwischen den unidirektionalen Kalzium- und Fluoresceinfluxraten im Pansen sind in Abbildung 14 dargestellt. Es bestand keine Beziehung zwischen den Kalzium- und Fluoresceinfluxraten in mukoserosaler Richtung ($r^2 = 0,002$). Die beiden Fluxraten für die seromukosale Permeation korrelierten signifikant ($P < 0,001$) nach folgender Gleichung:

$$J_{sm}^{Ca^{2+}} = (23,6 \pm 6,50) \times J_{sm}^{Fluo} + (1,5 \pm 0,65) \quad (r^2 = 0,26)$$

Der Achsenabschnitt dieser Regressionsgleichung unterschied sich von Null nicht signifikant.

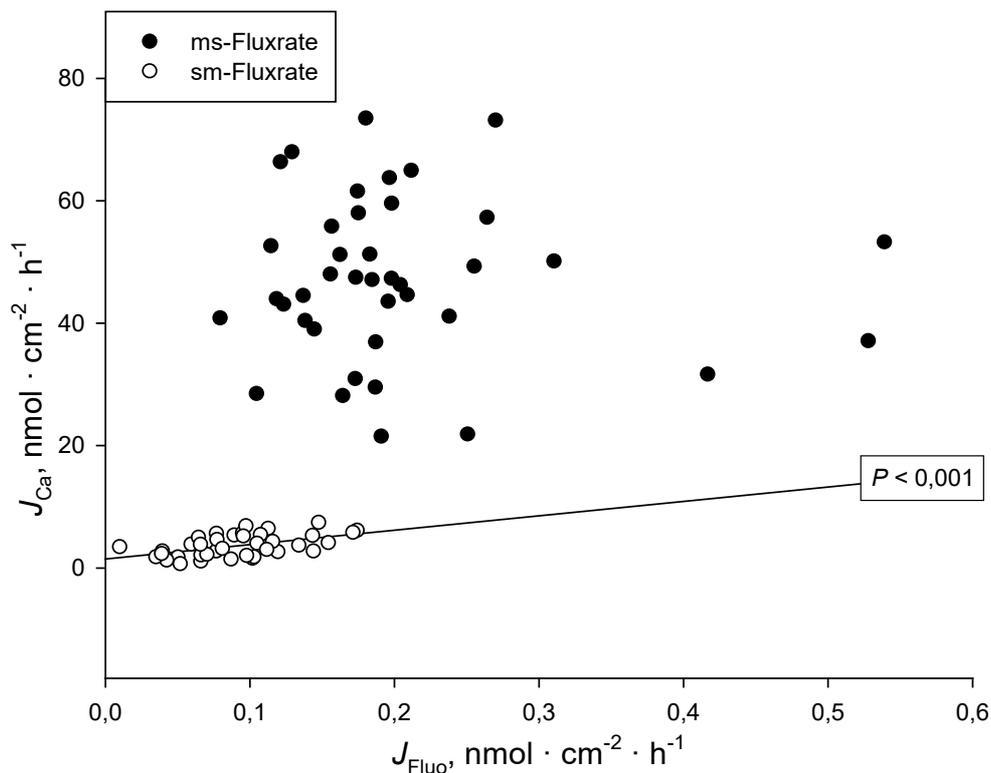


Abbildung 14: Beziehung der Kalzium (J_{Ca})- und Fluoresceinfluxraten (J_{Fluo}) im Pansen.

ms-Fluxrate: mukoserosal gerichtete Fluxrate.

sm-Fluxrate: seromukosal gerichtete Fluxrate.

Die Beziehungen zwischen den unidirektionalen Kalzium- und Fluoresceinfluxraten im Jejunum sind in Abbildung 15 dargestellt. Sowohl in mukoserosaler als auch in seromukosaler Richtung standen die entsprechenden Fluxraten in signifikanter Beziehung (jeweils $P < 0,001$).

$$J_{ms}^{Ca^{2+}} = (15,9 \pm 3,86) \times J_{ms}^{Fluo} + (31,9 \pm 3,19) \quad (r^2 = 0,30)$$

$$J_{sm}^{Ca^{2+}} = (21,7 \pm 4,32) \times J_{sm}^{Fluo} + (26,3 \pm 3,30) \quad (r^2 = 0,39)$$

Dabei waren sowohl die Steigungen als auch y-Achsenabschnitte beider Regressionsgeraden statistisch nicht voneinander verschieden. Die y-Achsenabschnitte beider Regressionsgeraden waren signifikant verschieden von Null. Die Steigung beider Regressionsgeraden der seromukosalen Fluxraten von Pansen und Jejunum unterschieden sich statistisch nicht signifikant.

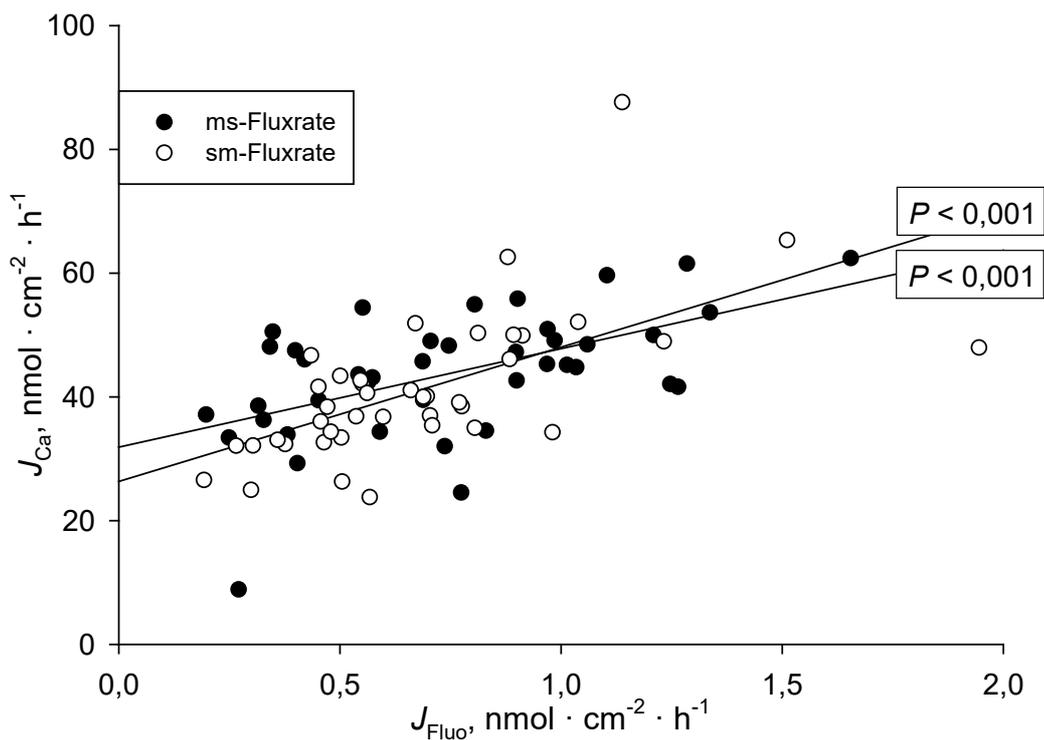


Abbildung 15: Beziehung der Kalzium- (J_{Ca}) und Fluoresceinfluxraten (J_{Fluo}) im Jejunum.

ms-Fluxrate: mukoserosal gerichtete Fluxrate.

sm-Fluxrate: seromukosal gerichtete Fluxrate.

4.3.4.2 Beziehung der Gewebeleitfähigkeit und Fluoresceinfluxraten

Weder die mukoserosalen ($r^2 = 0,02$) noch die seromukosalen ($r^2 = 0,001$) Fluoresceinfluxraten korrelierten mit der entsprechenden G_t im Pansen (Abbildung 16).

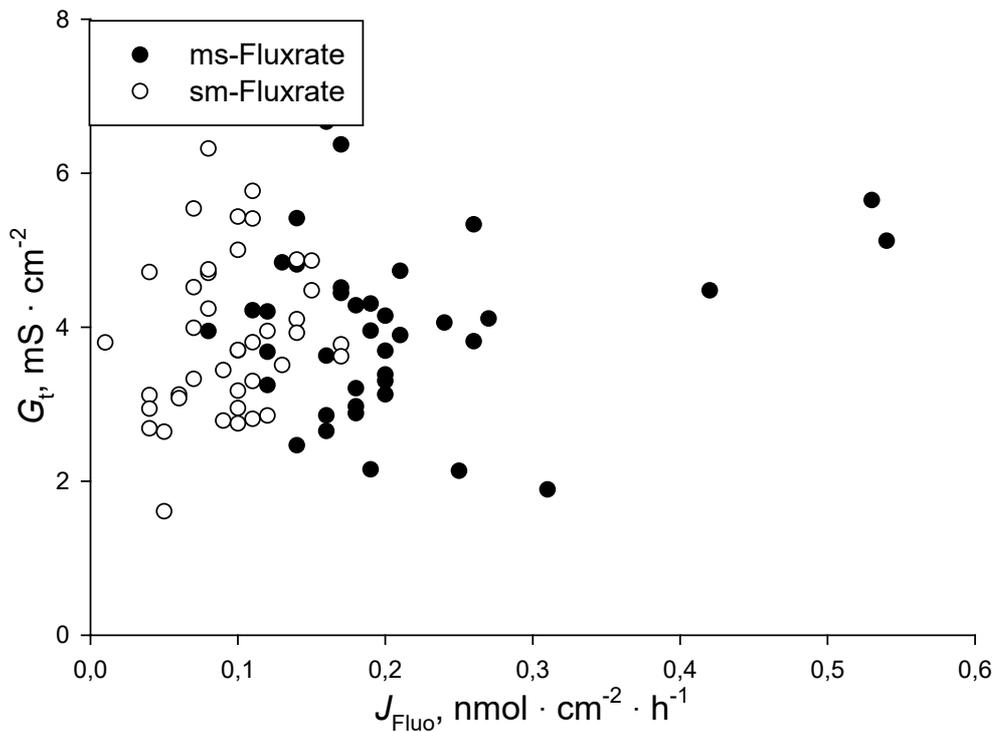


Abbildung 16: Beziehung von Fluoresceinfluxraten (J_{Fluo}) und Gewebeleitfähigkeit (G_t) im Pansen.
 ms-Fluxrate: mukoserosal gerichtete Fluxrate.
 sm-Fluxrate: seromukosal gerichtete Fluxrate.

Die Beziehung zwischen den unidirektionalen Fluoresceinfluxraten und der G_t im Jejunum sind in Abbildung 17 dargestellt. Sowohl in mukoserosaler ($P < 0,001$) als auch in seromukosaler ($P = 0,004$) Richtung standen die entsprechenden Fluxraten in Beziehung mit der G_t :

$$G_t = (4,4 \pm 1,41) \times J_{ms}^{Fluo} + (12,6 \pm 1,17) \quad (r^2 = 0,22)$$

$$G_t = (6,2 \pm 1,49) \times J_{sm}^{Fluo} + (11,3 \pm 1,05) \quad (r^2 = 0,34)$$

Dabei waren sowohl die Steigungen als auch y-Achsenabschnitte beider Regressionsgeraden statistisch nicht voneinander verschieden und die y-Achsenabschnitte unterschieden sich jeweils signifikant von Null.

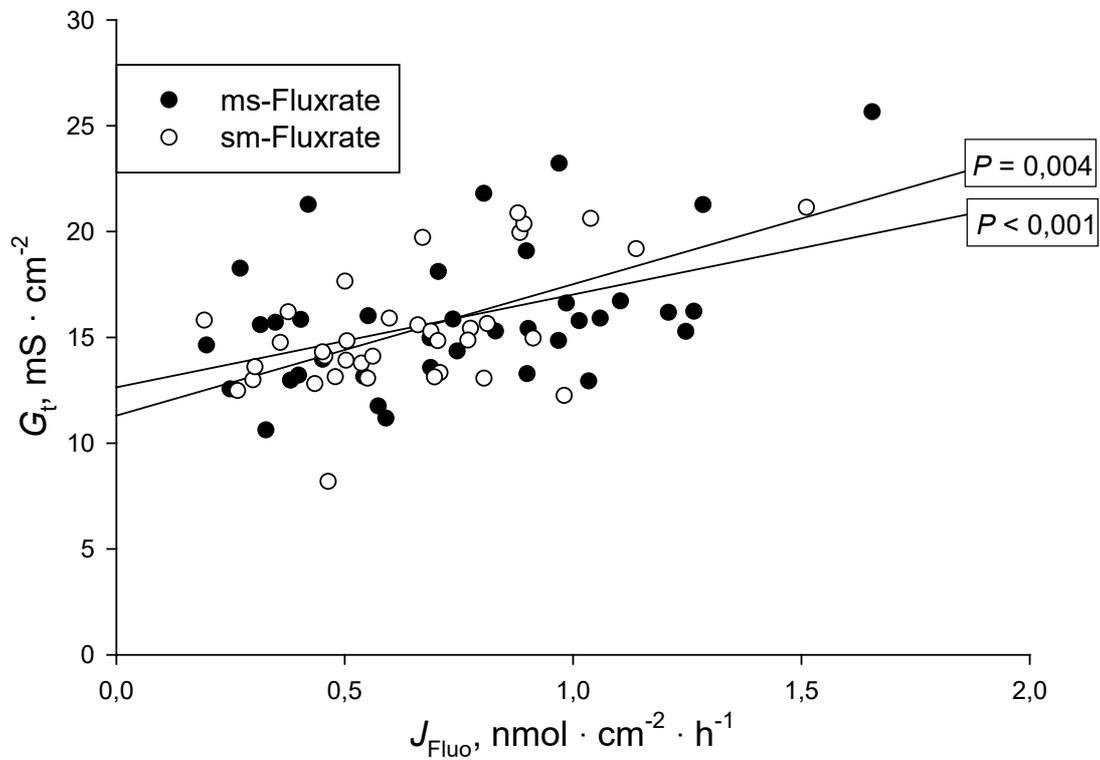


Abbildung 17: Beziehung von Fluoresceinfluxraten (J_{Fluo}) und Gewebeleitfähigkeit (G_t) im Jejunum.

ms-Fluxrate: mukoserosal gerichtete Fluxrate.

sm-Fluxrate: seromukosal gerichtete Fluxrate.

5. Diskussion

5.1 Kritische Betrachtung der angewandten Methoden

Tiere, Versuchsdurchführung und Probennahme

Die Wahl der im Versuch verwendeten Spezies Schaf als Modelltier für den Wiederkäuer, insbesondere die Milchkuh, ist gängige Praxis und wurde in diversen Untersuchungen zum epithelialen Transport herangezogen (Aschenbach et al. 2000; Uppal et al. 2003a; Lu et al. 2014; Wilkens et al. 2016). Zwar unterscheiden sich Rind und Schaf durch ihre Körpergröße deutlich, jedoch ist das Pansenvolumen relativ zum Körpergewicht als ähnlich anzusehen (Purser und Moir 1966; Reynolds et al. 2004). Die beteiligten Proteine und die hormonelle Steuerung der Kalziumresorption werden bei beiden Spezies als identisch beschrieben (Taylor et al. 2009; Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b, Rosendahl et al. 2016). In der Literatur wurden zeitliche Unterschiede beim Auftreten der hypokalzämischen Stoffwechselsituation beschrieben, wobei der Blutkalziumgehalt der Schafe bereits präpartal abfällt, während es bei Milchkuhen erst unmittelbar nach der Geburt zu einem Absinken kommt (Oetzel 1988; Wilkens et al. 2014). Eine Durchführung des Versuchsvorhabens an Rindern kam aufgrund des experimentellen Designs und der auf kleine Wiederkäuer ausgerichteten Stallungen nicht in Frage. Zudem wurden an allen Versuchstieren in einem weiteren Teilversuch dieser Studie wöchentlich Manipulationen durchgeführt, die eine einfache Handhabung der Tiere notwendig machte. Die Gewebepreparation für die *Ex-vivo*-Untersuchungen gestaltet sich bei Rindern deutlich anspruchsvoller als beim Schaf. Bei letzterem ist erheblich weniger Kraftaufwand nötig, um das Epithel von den darunterliegenden Schichten abzulösen, was Epithelschäden verringert (persönliche Beobachtung). Darüber hinaus vergeht beim Schlachtvorgang des Schafes weitaus weniger Zeit, bis der Gastrointestinaltrakt aus dem Tier entfernt und beprobt werden kann. Da die Gewebektivität mit zunehmender Dauer zwischen Todeseintritt und dem Verbringen des Epithels in die begaste Transportinkubationslösung rapide abnimmt (persönliche Beobachtung), lassen sich transportphysiologische Untersuchungen mit Schafepithelien weitaus besser durchführen.

Eine tierindividuelle PBLC-Supplementierung war zentraler Gegenstand des Versuchsvorhabens. Es sind diverse Extraktionsweisen beschrieben, durch die sich PBLC gewinnen lassen können. Ihre Qualität und Zusammensetzung sind stark von klimatischen Bedingungen, Bodenzusammensetzung, Pflanzenalter und Erntezeitpunkt der Ausgangspflanze abhängig (Angioni et al. 2006; Settanni et al. 2014), weswegen die im

Versuch eingesetzten PBLC aus synthetischer Herstellung bezogen wurden. Um eine fehlerfreie Handhabung bei der Fütterung zu gewährleisten, wurden die PBLC bereits vor dem Pelletiervorgang dem Kraftfutter zugemischt. Dies beugt einem Entmischen der Futterbestandteile vor und gewährleistet die vollständige Aufnahme aller Futterkomponenten. Da PBLC leicht flüchtig sind, wurde eine Pelletiertemperatur von $< 50\text{ °C}$ gewählt, es ist jedoch nicht vollständig auszuschließen, dass ein geringer prozentualer Anteil der PBLC durch Vaporationsverluste verloren gegangen ist.

Funktionelle Messungen in Ussing-Kammern

Die Ussing-Kammer wird zur Messung transepithelialer Transportprozesse des Wiederkäuers und Schweins seit Jahrzehnten am Institut verwendet (Radloff et al. 2017; Meissner et al. 2017; Lodemann et al. 2017; Greco et al. 2018). Um die Gewebektivität zu überprüfen, wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften aller Epithelien über die gesamte Dauer des Experiments kontinuierlich gemessen und beurteilt. Um eine akute Stimulierbarkeit der Kalziumfluxraten möglichst gut sichtbar zu machen, wurde die mukosale Seite des Epithels unter magnesiumfreien Bedingungen inkubiert. Dies führt zu einer Steigerung der *in vitro* gemessenen Kalziumfluxraten, welches bei der Übertragung der Ergebnisse auf physiologische Transportprozesse im Tier berücksichtigt werden muss.

Polymerasekettenreaktion

Die RNA-Extraktion aus Pansenepithel gestaltet sich unter Umständen schwierig. Die Konzentration und Qualität wurde nach Extraktion photometrisch und mittels RIN (RNA Integrity Number) Micro Chip überprüft und nur solche RNA in cDNA umgeschrieben, die einen RIN-Wert von $> 8,5$ aufwies. Da für jede RT-qPCR die gleiche Menge an cDNA eingesetzt wurde und die Ergebnisse auf die im jeweiligen Gewebe stabil exprimierten Gene normiert wurden, können semiquantitative Aussagen über den Grad der Expression gemacht werden. Eine Aussage zum Expressionsniveau der untersuchten Zielsequenz ist mit alleiniger Ermittlung des mRNA-Expressionsniveaus (ohne Untersuchungen der Proteinexpression) allerdings mit Vorsicht zu interpretieren. Die Amplifikation der RT-qPCR-Reaktion verläuft exponentiell, d.h. relativ geringe Pipettierfehler und Änderungen der Reaktionseffizienz können zu großen Unterschieden führen. Daher wurde jede Probe in einer Dreifachbestimmung untersucht und die Reaktionseffizienz der jeweiligen Primer-Sondenkombination bei jeder Genexpressionsberechnung einbezogen.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Mit einsetzender Laktation steigt der Kalziumbedarf von Hochleistungsmilchkühen abrupt auf bis zu $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-0.75}$ an (Horst et al. 2005), was zu einer hohen Inzidenz der Hypokalzämie führt (Reinhardt et al. 2011; Venjakob et al. 2017). Die Hypokalzämie resultiert aus einer verzögerten und teilweise unzureichenden Aktivierung kalziumhomöostatischer Mechanismen, wie beispielsweise der Kalziumfreisetzung aus internen Speichern (z.B. Knochen) und einer unzureichenden Forcierung der gastrointestinalen Kalziumresorption (Horst et al. 2005; Reinhardt et al. 1988). Da bereits eine subklinische Reduktion der Blutkalziumkonzentration negative tiergesundheitliche und ökonomische Folgen hat (Chapinal et al. 2011; McArt und Oetzel 2015), ist eine effektive Unterstützung der kalziumhomöostatischen Mechanismen durch Managementstrategien von größter Bedeutung. Eine solche Strategie kann darin bestehen, die Kalziumresorptionskapazität des Pansens auszunutzen (Schröder und Breves 2006; Hyde et al. 2019), welche *ex vivo* durch PBLC, allen voran Menthol, bei Rindern erhöht werden kann (Rosendahl et al. 2016). Eine Langzeitsupplementierung mit mentholreichen PBLC schlägt sich *in vivo* in einer Erhöhung der Blutkalziumkonzentration von Milchkühen nieder, und es wird davon ausgegangen, dass dafür die durch mentholreiche PBLC ausgelöste Stimulation der Kalziumresorption verantwortlich ist (Braun et al. 2019). Ob sich diese Beobachtungen beim Modelltier Schaf reproduzieren lassen, ist gegenwärtig nicht bekannt und wurde als Hauptziel der vorliegenden Dissertation formuliert. Darüber hinaus sollten die Ergebnisse dazu beitragen, den aktuellen Wissensstand über die im Pansen beteiligten Kalziumtransportmechanismen zu erweitern und den Einsatz von mentholreichen PBLC als Hypokalzämiepräventionsmaßnahme zu beurteilen.

5.2.1 Kalziumtransport im Pansen

5.2.1.1 Allgemeine Betrachtung des ruminalen Kalziumtransports

Im Pansen wurde in Abwesenheit eines elektrochemischen Gradienten eine hohe aktive Kalziumresorptionskapazität gemessen, was durch zahlreiche vorhergehende Untersuchungen bestätigt wird (Sidler-Lauff et al. 2010; Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b; Schröder et al. 2015; Klinger et al. 2016; Rosendahl et al. 2016; Wilkens et al. 2016; Nemeth et al. 2017) und die Wichtigkeit des Pansens für die gastrointestinale Kalziumresorption verdeutlicht. Aktive Transportprozesse sind transzellulärer Natur, weswegen die Kalziumresorption im Pansen als transzellulär charakterisiert werden kann. Unterstützend dazu konnte keine Beziehung der mukoserosalen Kalziumfluxraten und des

parazellulären Markers Fluorescein festgestellt werden. Lediglich die seromukosalen Kalziumfluxraten korrelierten mit den entsprechenden Fluoresceinfluxraten. Dies gibt Grund zu der Vermutung, dass die quantitativ geringe Kalziumsekretion im Pansen zu großen Teilen parazellulär abläuft. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in einer früheren Studie getroffen, bei welcher die mukoserosalen Fluxraten von Kalzium und einem parazellulären Marker in keiner Beziehung standen und lediglich die seromukosalen Fluxraten miteinander korrelierten (Wilkens et al. 2011). In einer weiteren Studie konnten weder in mukoserosaler noch seromukosaler Richtung Beziehungen zwischen Kalzium und den Fluxraten eines parazellulären Markers festgestellt werden (Wilkens et al. 2012b).

5.2.1.2 Funktionelle Expression eines $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Austauschers

Die ruminale Kalziumresorption wird durch die Präsenz mukosaler SCFA stark stimuliert, was zur Postulierung eines $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Austauschers als apikalen Eintrittsmechanismus des transepithelialen Kalziumtransportes im Pansen führte (Schröder et al. 1999; Uppal et al. 2003b; Schröder et al. 2015). Dabei wird angenommen, dass protonierte SCFA aus dem Lumen in die Epithelzellen gelangen und aufgrund der intrazellulären Ansäuerung die Triebkraft für den mutmaßlichen $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Austauscher liefern (Schröder et al. 2015). Ein ähnlicher Mechanismus wird für die Stimulation der Natriumabsorption im Pansen angenommen, bei der ein NHE auf molekularer Ebene identifiziert wurde (Rabbani et al. 2011). Werden jedoch der $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Austauscher und der NHE parallel durch SCFA über eine intrazelluläre Ansäuerung stimuliert, sollte eine natriumfreie (jedoch SCFA-haltige) mukosale Inkubation die Protonenextrusion über den NHE stoppen und dadurch die Protonenextrusion über den putativen $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Austauscher stimulieren. Dies sollte sich in erhöhten mukoserosalen und letztendlich erhöhten Kalziumnettofluxen widerspiegeln. In den Untersuchungen des vorliegenden Dissertationsprojektes wurde jedoch eine deutliche Abnahme der mukoserosalen Fluxraten unter natriumfreier mukosaler Inkubation beobachtet. Dies stellt eine funktionelle Beteiligung des $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Austauschmechanismus bei der Kalziumresorption im Pansen stark in Frage.

5.2.1.3 Rolle von TRP-Kanälen

Nicht-selektive Kationenkanäle stellen eine akzeptierte Alternative für den apikalen Eintrittsmechanismus von Kalzium in die Pansenepithelzelle dar (Leonhard-Marek et al. 2010; Wilkens und Muscher-Banse 2020). Basierend auf der mentholinduzierten Stimulation der Stromflüsse und Kalziumfluxraten im Pansen wurden diese Kanäle als Mitglieder der TRP-Familie identifiziert (Rosendahl et al. 2016; Schrapers et al. 2018). In der vorliegenden

Dissertation stimulierte die Supplementierung mit mentholreichen PBLC und auch die direkte Applikation von Menthol die Stromflüsse und die mukoserosalen Kalziumfluxraten über das Pansenepithel und unterstützen somit das Konzept einer TRP-vermittelten ruminalen Kalziumresorption.

Bereits in früheren Untersuchungen beim Rind und Schaf misslang der Nachweis des mentholsensitiven und kalziumdurchlässigen TRPM8-Kanals im Pansen (Rosendahl et al. 2016), was von den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation bestätigt wird. TRPM8 wurde in der Vergangenheit durchaus im Epithel des Gastrointestinaltraktes anderer Spezies nachgewiesen. Funktionen wurden aber eher in der mechano-sensorischen Transduktion, Nozizeption und Entzündungsreaktion vermutet (Ramachandran et al. 2013; Hosoya et al. 2014; Yu et al. 2016). Es erscheint daher äußerst unwahrscheinlich, dass sich TRPM8 am ruminalen Kalziumtransport beteiligt. In ähnlicher Weise schließen die Ergebnisse der Dissertation eine Beteiligung von TRPV5 und TRPV6 beim ruminalen Kalziumtransport aus. Beide Kanalproteine konnten, wie auch in früheren Studien (Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b; Rosendahl et al. 2016), nicht auf mRNA-Expressionsebene im Pansen nachgewiesen werden. Auch der Nachweis von TRPV5 und TRPV6 auf Proteinniveau misslang (Wilkens et al. 2011), was die ruminale Kalziumresorption von den klassischen intestinalen und renalen Kalziumkanälen TRPV5 und TRPV6 löst.

Rosendahl et al. (2016) schlugen erstmalig TRPV3 als potenzielles Kandidaten-Gen für einen mentholstimulierbaren Kalziumtransport im Pansen vor. In der vorliegenden Dissertation konnten im Pansenepithel mRNA-Signale für die kalziumleitenden TRPV3- und TRPA1-Kanäle nachgewiesen werden, welche sich beide durch PBLC wie Menthol stimulieren lassen (Vogt-Eisele et al. 2007; Karashima et al. 2007). Von allen untersuchten TRP-Kanälen wies TRPV3 die stärkste mRNA-Expression im Pansen auf. Darüber hinaus wurde in einer kürzlich durchgeführten Studie eine stabile TRPV3-Proteinexpression im Pansenepithel des Rindes nachgewiesen (Liebe et al. 2020).

Eine intrazelluläre Ansäuerung führt zur Stimulation der Öffnungswahrscheinlichkeit und damit zur Erhöhung der Leitfähigkeit von TRPV3 (Cao et al. 2012). Dies alleine könnte, ungeachtet der Präsenz eines $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Austauschers, den in früheren Studien beobachteten stimulierenden Effekt der SCFA auf die Kalziumfluxraten mittels TRPV3 erklären. Um in den Ussing-Kammern natriumfreie mukosale Inkubationsbedingungen zu schaffen, wurde Natrium durch NMDG^{+} ersetzt. Da die Kalziumströme des TRPV3-Kanals durch NMDG^{+} gehemmt werden (Schrapers et al. 2018), könnte die Postulierung des TRPV3-Kanals als wichtigstes apikales Kalziumtransportprotein im Pansen auch den Rückgang der mukoserosalen und

Nettotransportraten von Kalzium plausibel erklären, wie es durch das Ersetzen von Natrium durch NMDG⁺ in der vorliegenden Dissertation gemessen wurde.

Ein weiteres Argument für die wesentliche Beteiligung von TRPV3 an der Kalziumresorption im Pansen ist die Beobachtung, dass die mukoserosalen und Kalziumnettotransportraten in der vorliegenden Dissertation im Vergleich zu allen früheren Studien (Tabelle 1, S.14) deutlich höher ausfielen (Leonhard-Marek et al. 2007; Schröder et al. 2015; Klinger et al. 2016; Wilkens et al. 2016; Nemeth et al. 2017). Der wesentliche Unterschied zu diesen früheren Untersuchungen besteht darin, dass die mukosale Inkubation aller Epithelien im Dissertationsprojekt unter dem Ausschluss von Magnesium stattfand. Es ist gut belegt, dass Kalziumströme über TRPV3 aufgrund von Interferenzen in der Porenregion durch Magnesium gehemmt werden (Schrapers et al. 2018). Daher spricht eine höhere Kalziumresorption in Abwesenheit von Magnesium für eine TRP-vermittelte Permeation. Zugegebenermaßen könnte die Absenkung des mukosalen pH-Wertes auf 6,4 (statt pH 7,4) aufgrund eines erhöhten Anteils an ionisiertem Kalzium zu höheren mukoserosalen Kalziumfluxraten beigetragen haben. Allerdings wurde bereits in einer früheren Studie zum ruminalen Kalziumtransport ein mukosaler pH-Wert von 6,4 verwendet, bei dem ähnliche seromukosale, aber deutlich kleinere mukoserosale und Kalziumnettofluxraten gemessen wurden (Rosendahl et al. 2016). Somit stellt die Vermeidung einer Magnesiuminterferenz in der Porenregion des TRPV3 die geeignetste Erklärung für die hohen Transportraten in der vorliegenden Dissertation dar und unterstreicht die funktionelle Beteiligung von TRPV3 beim ruminalen Kalziumtransport.

Gluconat wird in Ussing-Kammer-Versuchen als inerte Ersatz für permeable Anionen wie Chlorid oder SCFA eingesetzt (Schröder et al. 1997; Wilkens et al. 2011; Rabbani et al. 2018). Dabei führt Gluconat zu einer Kalziumkomplexierung und senkt die Fraktion des für den Transport verfügbaren ionisierten Kalziums. Wird Gluconat, wie im vorliegenden Versuch, auf der serosalen Seite zugegeben, führt dies zu einem serosalen Kalziumtrapping und damit zu einer Erhöhung der mukoserosalen und Kalziumnettotransportraten, was zusätzlich zu einer Erklärung der quantitativ höheren Transportraten beiträgt (Leonhard-Marek et al. 2007).

Zusammengenommen unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation die Postulierung einer wesentlichen Rolle des TRPV3-Kanals bei der Kalziumresorption im Pansen (Abbildung 18, S. 82). Darüber hinaus scheint eine zusätzliche Beteiligung von TRPA1 möglich. Als Nebenbefund des Dissertationsprojektes wurden im Pansenepithel auf mRNA-Ebene TRPM6 und TRPM7 nachgewiesen, die eine zentrale Rolle beim Magnesiumtransport spielen (Schweigel et al. 2008; Holzer 2011; Martens et al. 2018).

5.2.2 Auswirkung bioaktiver Pflanzenlipide

5.2.2.1 Einfluss auf ausgewählte *In-vivo*-Parameter

Die Supplementierung mit mentholreichen PBLC führte zu einer höheren Heuaufnahme der Versuchstiere und erhöhte somit auch die Gesamtfuttermittelaufnahme. Es wurde gezeigt, dass PBLC durch olfaktorische als auch gustatorische Effekte die Futtermittelaufnahme beim Wiederkäuer beeinflussen können (Simitzis et al. 2005; Van Bibber-Krueger et al. 2016). Erst kürzlich wurde dabei eine stimulierte Futtermittelaufnahme durch mentholreiche PBLC gezeigt, welche weit über den Fütterungszeitpunkt anhielt, an dem das mentholreiche Futtermittel angeboten wurde (Patra et al. 2019a). Dies könnte die erhöhte Heuaufnahme in der vorliegenden Dissertation erklären.

Die Supplementierung mentholreicher PBLC führte in einer vorhergegangenen Studie zu einer Erhöhung der Kalziumblutkonzentration bei Kühen *in vivo* (Braun et al. 2019), und eines der Hauptziele der vorliegenden Dissertation war die Reproduktion dieser Beobachtung beim Schaf als Modelltier für den Wiederkäuer. Wenn auch kein signifikanter PBLC-Effekt auf die Kalziumblutkonzentration gemessen werden konnte, so ließ der lineare Trend für erhöhte Kalziumwerte mit steigender PBLC-Supplementierung erkennen, dass mentholreiche PBLC einen positiven Effekt auf die Kalziumhomöostase von Wiederkäuern besitzen. Die Reproduzierbarkeit dieses Befundes beim Schaf lässt sich, wie auch beim Rind, über eine agonistische Stimulation von PBLC auf TRP-Kanäle im Gastrointestinaltrakt erklären (Rosendahl et al. 2016; Schrapers et al. 2018). Die PBLC-Supplementierung über mehrere Wochen führt zu einer anhaltenden bzw. mit jeder Fütterung wiederkehrenden Stimulation der Kalziumresorption. Da die Schafe im Dissertationsprojekt im Unterschied zu den Rindern der vorherigen Studie keinem erhöhten Kalziumbedarf durch die Laktation ausgesetzt waren, ist es mehr als wahrscheinlich, dass der Kalziumblutspiegel durch ein Gegenwirken kalziumhomöostatischer Mechanismen herunterreguliert wurde. Dies dient zugleich als Erklärung für das Ausbleiben einer statistischen Signifikanz für erhöhte Kalziumblutkonzentrationen in den PBLC-Fütterungsgruppen.

Die Serumkonzentration mehrerer Aminosäuren wurde durch die Langzeitsupplementierung mentholreicher PBLC erhöht. Im Hinblick auf die agonistische Stimulation von TRP-Kanälen erscheint vor allem die selektive Erhöhung von Glutamat und Glutamin sowie Aspartat und Asparagin interessant. Da mentholaktivierbare TRP-Kanäle nicht-selektive Kationenkanäle darstellen, besitzen sie neben Kalzium auch eine hohe Leitfähigkeit für NH_4^+ (Schrapers et al. 2018). Um der zytotoxischen Wirkung einer erhöhten NH_4^+ -Absorption nach PBLC-Stimulation

zu entgehen, zieht diese über eine Aktivierung der hepatischen Glutamat-Ammonium-Ligase eine erhöhte Glutamin-Synthese nach sich. Glutamin ist ein wichtiges Substrat für die Aspartat-Aminotransferase zur Synthese von Aspartat aus Oxalacetat, welches schließlich über die Asparagin-Synthetase zu Asparagin verstoffwechselt wird (Murray et al. 2014). Diese biochemischen Umwandlungen können den selektiven Anstieg der Vorläuferaminosäuren des Harnstoffzyklus (Glu, Gln, Asp) plausibel erklären, obwohl die Harnstoffkonzentration im Plasma nicht messbar verändert wurde. Zusammenfassend könnte die Erhöhung der beschriebenen Aminosäuren als Indiz für eine wirksame Stimulation mentholreicher PBLC auf gastrointestinale TRP-Kanäle zu werten sein. Hier besteht jedoch noch weiterer Forschungsbedarf.

5.2.2.2 Einfluss auf den ruminalen Kalziumtransport

Die Supplementierung mentholreicher PBLC beeinflusste die im Pansen gemessenen Stromflüsse mit zunehmender Dosierung quadratisch. Erhöhte Stromflüsse deuten in epithelialen Transportuntersuchungen entweder auf eine erhöhte Sekretion von Anionen oder eine erhöhte Absorption von Kationen hin. In Anbetracht dessen sind die Stromdaten mit einer erhöhten Öffnung der TRP-Kationenkanäle vereinbar (Xu et al. 2002; Schrapers et al. 2018). Dabei sei angemerkt, dass die Stromwerte nicht von einer erhöhten Kalziumresorption allein getragen werden können. Zwar ist die Kalziumleitfähigkeit der TRP-Kanäle hoch, es kommt nach einer Kanalöffnung jedoch zu einem weitaus höheren Natriumeinstrom, da die Natriumkonzentrationen in den mukosalen und serosalen Inkubationslösungen weit über den Kalziumkonzentrationen lagen und somit der Natriumtransport eine wesentliche Ursache für die Änderungen des Stromflusses darstellen kann.

Auf molekularbiologischer Ebene war kein Einfluss der mentholreichen PBLC-Supplementierung auf das Expressionsniveau der TRP-Kanäle im Pansenepithel erkennbar. Dies schließt jedoch eine geänderte TRP-Proteinexpression nicht aus, da Unstimmigkeiten zwischen mRNA- und Proteinexpression, gerade bei TRP-Kanälen im Gastrointestinaltrakt des Wiederkäuers, bereits dokumentiert wurden (Wilkens et al. 2011; Cheng et al. 2016; Greco et al. 2018). Alternativ deutet eine unveränderte TRP-Kanalexpression darauf hin, dass eine permanente Exposition des Pansenepithels gegenüber TRP-Kanalagonisten zu einer verstärkten Translokation der Kanäle in die apikale Zellmembran und/oder zu einer anhaltenden Stimulation mit oder ohne Beeinträchtigung der Kanalexpression geführt haben könnte. Ob Menthol weitere zelluläre Effekte im Pansen besitzt, ist nicht hinreichend bekannt und erfordert nähere Beleuchtung in zukünftigen Studien.

Der quadratische Anstieg des Stromflusses mit steigender PBLC-Dosierung ging mit einem Trend zu einem quadratischen Anstieg des mukoserosalen und einem quadratischen Anstieg des Nettotransports von Kalzium einher. Dies ist als weiteres Indiz für eine erhöhte basale TRP-Kanalaktivität nach der PBLC-Supplementierung zu werten. Das Ausmaß des Anstiegs des basalen Kalziumtransports war jedoch so gering, dass es den *in vivo* gemessenen Anstieg der Kalziumblutkonzentrationen der Versuchstiere oder den zuvor beobachteten Blutkalziumanstieg bei Rindern (Braun et al. 2019) quantitativ möglicherweise nicht erklärt.

PBLC besitzen antimikrobielle Eigenschaften, welche die ruminale Fermentation beeinflussen können (Patra et al. 2018). Gerade in höheren Konzentrationsbereichen übt Menthol weitreichende Effekte auf die Pansenmikrobiota aus und kann eine Änderung der Fermentationsprodukte hervorrufen (Roy et al. 2015; Cobellis et al. 2016). Da die Resorption von Kalzium im Pansen über SCFA stimuliert wird (Schröder et al. 2015), könnte aus einer geänderten SCFA-Zusammensetzung eine Beeinflussung der Kalziumresorption hervorgehen. Die in diesem Versuch eingesetzten Konzentrationen an PBLC war jedoch weitaus geringer als in den zuvor beschriebenen Studien. Dabei kam es bei den hier angewendeten Konzentrationsbereichen lediglich zu minimalen Änderungen der Mikrobiota, die sich jedoch nicht auf die Fermentationsleistung und damit auch nicht auf das SCFA-Muster des Pansens auswirkten (Patra et al. 2019b). Dies schließt eine indirekte Kalziumresorptionsbeeinflussung über SCFA während der vierwöchigen PBLC-Supplementierung nahezu aus. Um eine Kalziumfluxstimulation durch geänderte SCFA-Muster während des Ussing-Kammer-Versuchs auszuschließen, wurden die Pansenepithelien von jeglichem Nahrungsbrei befreit und in mukosaler Inkubationslösung mit definierten SCFA-Zusammensetzungen inkubiert (Tabelle 4, S.41).

Eine Stimulation der elektrophysiologischen Parameter sowie der Kalziumresorption nach direkter Mentholapplikation im Pansen des Rindes (Rosendahl et al. 2016) konnte in der vorliegenden Dissertation beim Schaf reproduziert und somit bestätigt werden. Der höhere Anstieg der Gewebeleitfähigkeit, der geringere zeitabhängige Abfall des Stromflusses und die wesentlich höhere Stimulierbarkeit der mukoserosalen Kalziumtransportraten bei unbeeinflussten seromukosalen Transportraten war in den mit PBLC vorgefütterten Individuen nach direkter Mentholapplikation ein auffallender Befund. Die Kalziumnettofluxraten in beiden PBLC-Fütterungsgruppen nach akuter Mentholzugabe überstiegen die Kalziumnettofluxraten der Kontrollgruppe um annähernd das Doppelte. Dies deutet stark darauf hin, dass eine erhöhte Reaktionsfähigkeit der Kalziumresorption im Pansen auf eine Mentholstimulation den Hauptmechanismus darstellt, durch den eine Langzeitfütterung mit mentholreichen PBLC die Kalziumkonzentration des Blutes erhöht.

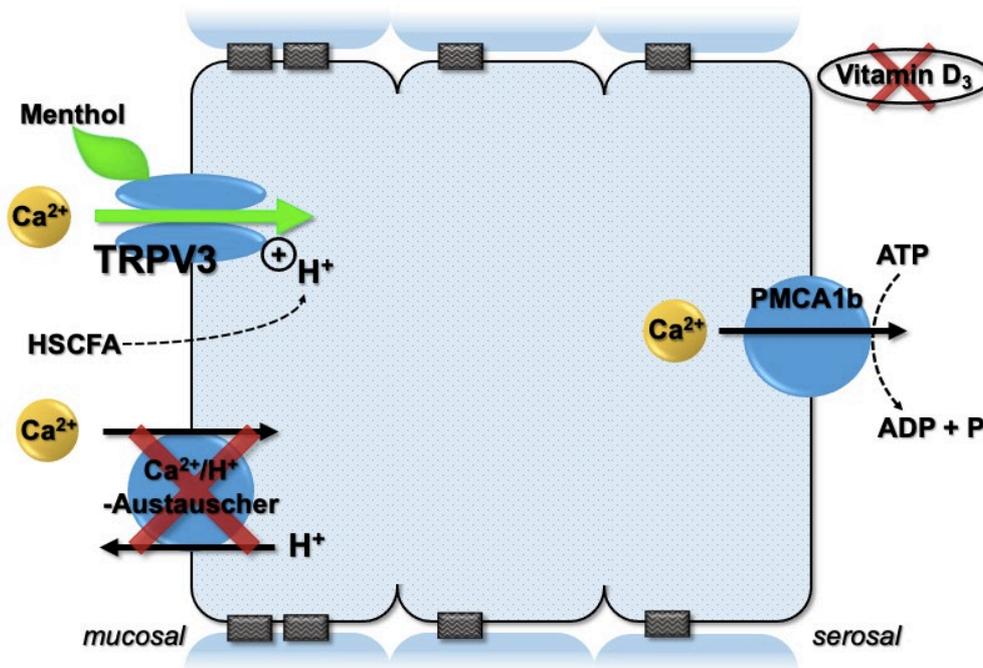


Abbildung 18: Kalziumresorptionsmodell des Pansens modifiziert nach Liebe et al. (2020).

Kalzium wird Vitamin D₃-unabhängig, aktiv und transzellulär resorbiert (Wilkins und Muscher-Banse 2020). Der apikale Kalziumeintritt wird durch einen mentholstimulierbaren nicht-selektiven Kationenkanal vermittelt, höchstwahrscheinlich TRPV3, welcher durch eine intrazelluläre Ansäuerung, beispielsweise durch im Zytosol deprotonierende SCFA, stimuliert werden kann (Cao et al. 2012). Die funktionelle Expression eines Ca²⁺/H⁺-Austauschers (Schröder et al. 2015) wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation in Frage gestellt, da eine natriumfreie mukosale Inkubation zu keiner Steigerung der Kalziumresorption führte. Der intrazelluläre Kalziumtransport bleibt ungeklärt (Wilkins und Muscher-Banse 2020), während die basolaterale Extrusion über die Plasmamembran Ca²⁺-ATPase 1b (PMCA1b) vermittelt wird (Schröder und Breves 2006; Wilkins et al. 2011).

5.2.3 Kalziumtransport im Darm

Im Jejunum unterschieden sich bei allen Fütterungsgruppen die mukoserosalen und seromukosalen Kalziumtransportraten statistisch nicht signifikant. Somit konnte im Jejunum unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen weder eine Kalziumresorption noch -sekretion gemessen werden. In der Literatur ist die Datenlage zur Kalziumresorption im Jejunum widersprüchlich. So stimmt das gemessene Ausbleiben signifikanter Nettotransportraten im Jejunum mit den Ergebnissen früherer Studien überein (Wilkins et al. 2011; Klinger et al. 2016), wohingegen in anderen Studien eine signifikante Kalziumresorptionsleistung im Jejunum von Schafen dokumentiert wurde (Schröder et al. 1997; Klinger et al. 2016).

Durch eine Korrelation der Kalziumfluxraten mit den entsprechenden Fluxraten des parazellulären Markers Fluorescein konnte die Fraktion an para- und transzellulärem Transport abgeschätzt werden. Übereinstimmend mit früheren Arbeiten beim Wiederkäuer korrelierten die seromukosalen Kalziumfluxraten mit den verwendeten parazellulären Markern signifikant, was von den Autoren der Studien als Indiz für eine nicht unwesentliche parazelluläre Kalziumsekretion gesehen wurde (Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b). Darüber hinaus, und im Gegensatz zum Pansen, standen im vorliegenden Versuch auch die mukoserosalen Fluxraten von Kalzium und Fluorescein in enger Beziehung, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass unter den gegebenen Bedingungen auch der resorptive Kalziumtransport im Jejunum zu großen Teilen auf parazellulärem Wege stattfindet. Der y-Achsenabschnitt der Korrelationsanalysen kann als transzellulär transportierte Fraktion des Kalziums interpretiert werden. Darüber hinaus unterscheidet sich der y-Achsenabschnitt statistisch signifikant von Null, was darauf schließen lässt, dass neben parazellulärer Kalziumpermeation in mukoserosal und seromukosaler Richtung ein nicht unerheblicher Teil im Jejunum auf aktivem und damit transzellulärem Wege transportiert wird.

Das Jejunum wurde als repräsentatives Segment für den intestinalen Kalziumtransport gewählt, da es die wichtigste Lokalisation der intestinalen Kalziumresorption beim Wiederkäuer darstellt (Wilkens et al. 2009). Dieses Postulat basiert auf der Stimulierbarkeit jejunaler Kalziumresorptionsraten durch Calcitriol und durch die Laktation bzw. einem Ausbleiben der Stimulierbarkeit der Kalziumresorption im Duodenum (Schröder et al. 1997; Wilkens et al. 2011; Klinger et al. 2016). Calcitriol beeinflusst mehrere Schritte der transzellulären Kalziumresorption, einschließlich des apikalen Eintritts über TRPV5 und TRPV6 (Diaz de Barboza et al. 2015; Christakos et al. 2016). Diese TRP-Kanäle wurden im Jejunum von Wiederkäuern nachgewiesen (Wilkens et al. 2009; Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b), was von den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation bestätigt wird. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Dissertationsarbeit im Jejunum keine Signale für die mentholsensitiven Kanäle TRPV3 und TRPM8 auf mRNA-Expressionsebene nachweisen werden; lediglich der mentholsensitive TRPA1-Kanal war nachweisbar. Auf funktioneller Ebene hatte eine Langzeitfütterung mentholreicher PBLC sowie die akute Zugabe von Menthol auf die mukosale Seite des Epithels keinen Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften und die Kalziumtransportraten im Jejunum, was die funktionelle Bedeutung beim transepithelialen Stofftransport des TRPA1 im Jejunum von Schafen in Frage stellt. Darüber hinaus scheint eine funktionelle Bedeutung von TRPV5 und TRPV6 unter den angewandten experimentellen Bedingungen ebenso fragwürdig, da keine Nettokalziumresorption beobachtet werden konnte. Hier sei jedoch anzumerken, dass TRPV5 und TRPV6 auf vergleichsweise niedrigem Expressionsniveau detektiert wurden. Bereits in

früheren Studien wurden bei Schafen und Ziegen in Abwesenheit eines großen Kalziumbedarfs wie beispielsweise durch Trächtigkeit oder Laktation ein niedrigeres TRPV5- und TRPV6-mRNA-Expressionsniveaus im Jejunum beobachtet (Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b).

Durch die Supplementierung mit mentholreichen PBLC tendierte die mRNA-Expression von TRPA1, TRPV5 und TRPV6 zu einer linearen Abnahme, bei welcher die Expression von TRPA1 und TRPV5 in den gepoolten Fütterungsgruppen (PBLC-L und PBLC-H) im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt war. Angesichts der Tatsache, dass diese Kanäle unter Kontrollbedingungen funktionell keinen Kalziumnettotransport auslösten, erscheint ihre Herunterregulierung nach der PBLC-Supplementierung ebenfalls funktionell nachrangig. Auf physiologischer Ebene erscheint eine solche Herunterregulierung jedoch sinnvoll. Da eine Supplementierung mentholreicher PBLC die Blutkalziumkonzentration von Schafen im vorliegenden Dissertationsprojekt tendentiell erhöhte, sollte der Kalziumüberschuss zu einer verminderten Aktivierung von Vitamin D₃ führen. Dies wiederum könnte zumindest als plausible Erklärung für die gesenkte Expression von TRPV5 und TRPV6 dienen, da diese unter der Kontrolle von Vitamin D₃ und seiner Metaboliten steht (van de Graaf et al. 2004; Wilkens et al. 2012b; Na und Peng 2014).

5.2.4 Parazelluläre Kalziumpermeation

Neben der aktiven und transzellulären Resorption kann Kalzium auch über den parazellulären Weg das Epithel passieren. Um die Permeabilität der gastrointestinalen Barriere charakterisieren zu können, wurde – wie bereits mehrfach für den Pansen beschrieben – Fluorescein als parazellulärer Marker verwendet (Meissner et al. 2017; Greco et al. 2018; Greco et al. 2019). Verglichen mit Pansenepithelien wurde die ca. 4-fach höhere Fluoresceinpermeabilität des Jejunums von einer ca. 4-fach höheren Gewebeleitfähigkeit des Jejunums begleitet. Dies spiegelt die niedrigere Barrierefunktion des Jejunums im Vergleich zum relativ dichten Pansenepithel wider (Schröder et al. 1997; Wilkens et al. 2011; Wilkens et al. 2012b; Penner et al. 2014).

5.2.4.1 Auswirkungen von bioaktiven Pflanzenlipiden auf die gastrointestinale Barrierefunktion

Es liegen gegenwärtig keine Daten vor, welche die Auswirkungen einer Langzeitsupplementierung mentholreicher PBLC auf die Barrierefunktion von Pansen und Jejunum des Wiederkäuers beschreiben. PBLC, allen voran Menthol, können sich durch zwei

Mechanismen auf die epitheliale Barrierefunktion auswirken. In einem Zellkulturexperiment führte Menthol durch eine agonistische Bindung an TRPA1 zu einer intrazellulären Kalziumkonzentrationssteigerung, die über die Kontraktion des Zytoskeletts zu einer Öffnung der TJ und damit zu einer Steigerung der parazellulären Durchlässigkeit sowie der Gewebeleitfähigkeit führte (Mukaiyama et al. 2020). In höheren Konzentrationen als im Dissertationsprojekt angewendet, ruft Menthol eine barrierelockernde Wirkung (Zhang et al. 2016; Zhang et al. 2017; Yang et al. 2018) durch einen Verlust der Kontinuität von TJ-Proteinen hervor (Yu et al. 2013; Zhang et al. 2017). In Übereinstimmung mit diesen Untersuchungen nahm in der vorliegenden Dissertation bei weitaus niedrigeren Mentholkonzentrationen die jejunale Cldn4-Expression mit zunehmender PBLC-Supplementierung ab. Cldn4 ist als strukturverstärkendes TJ-Protein beschrieben (Bergmann et al. 2013; Pasternak et al. 2015) und eine Abnahme von Cldn4 führt folglich zu einer Auflockerung und damit Permeabilitätserhöhung der intestinalen Barriere. Darüber hinaus nahm die ZO2-Expression ab. Dieser Befund passt strukturell zu einer verminderten Cldn4-Expression, da ZO2 für die korrekte Kopplung von TJ-Proteinen an das Zytoskelett zuständig ist (Itoh et al. 1999). Werden weniger Cldn4-Proteine in die TJ eingebaut, benötigt dies folglich eine geringere ZO2-Expression. Bei dieser Argumentation ist zu berücksichtigen, dass die absolute mRNA-Expression von ZO2 die niedrigste aller gemessenen TJ-Gene war. Ferner ist die ausschließlich auf mRNA-Ebene erfolgende Genexpression mit Vorsicht zu bewerten, da Inkonsistenzen zwischen Protein- und mRNA-Expression, insbesondere für Cldn4, dokumentiert sind (Connor et al. 2010; Greco et al. 2018). Die molekularbiologischen Indizien für eine Auflockerung des Jejunumepithels nach PBLC-Supplementierung konnten auf funktioneller Ebene durch eine Messung der Fluoresceinfluxraten nicht bestätigt werden. Interessanterweise führte die PBLC-Supplementierung zu einer Abnahme sowohl des mukoserosalen als auch des seromukosalen Fluoresceintransportes. Nehmen die Fluxraten eines parazellulären Markers in beide Richtungen ab, ist dies als phänotypisch sichtbare Verstärkung der transepithelialen Barriere zu interpretieren. Hier sei jedoch angemerkt, dass die Supplementierung keine Auswirkungen auf die elektrophysiologischen Eigenschaften im Jejunum hatte. Insbesondere die Gewebeleitfähigkeit sollte mit verstärkter intestinaler Barriere abnehmen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass PBLC im Jejunum von Wiederkäuern entweder keine Auswirkungen auf die parazellulären Epitheleigenschaften besitzen oder vielmehr die Fütterungsdosierung der PBLC zu niedrig gewählt wurde, um direkte Effekte auf das Jejunumepithel auszuüben.

Gegenwärtig gibt es keine Studien, welche die Resorption von PBLC im präduodenalen Segment von Wiederkäuern beschreiben. Es ist lediglich bekannt, dass Menthol schnell resorbiert, metabolisiert und ausgeschieden wird (Eccles 1994; Gelal 2008). Folglich ist

anzumerken, dass durch den vorliegenden Versuchsaufbau unklar bleibt, welche Menge der PBLC nach der Passage durch die Vormägen und das Duodenum in das Jejunum gelangen konnten, um direkte Auswirkungen auf die Epithelien auszuüben. Darüber hinaus führte die Supplementierung mit mentholreichen PBLC zu erhöhten Kalziumblutspiegeln. Auf gastrointestinaler Ebene finden sich hormonelle Einflüsse der Kalziumhomöostase bei Wiederkäuern hauptsächlich im Jejunum (Wilkins et al. 2011; Wilkins et al. 2012b). So konnte gezeigt werden, dass Calcitriol Cldn2 als kalziumpermeables TJ-Protein (Amasheh et al. 2002) im Jejunum erhöht (Elfers et al. 2016). Umgekehrt sollten die erhöhten Blutkalziumkonzentrationen zu einer Abnahme des Calcitriols führen, was den phänotypisch beobachteten barrierestärkenden Effekt im Jejunum erklären könnte. Dieser Effekt spiegelte sich jedoch nicht in einer verminderten Cldn2-Expression wider, was höchstwahrscheinlich auf den nur subtilen Anstieg der Kalziumblutkonzentration der Versuchstiere nach Fütterung mentholreicher PBLC zurückzuführen ist.

Im Pansen führte die mentholreiche PBLC-Supplementierung zu einem Anstieg der Cldn7-Expression. Cldn7 ist charakteristisch für die terminale Differenzierung von Pansenepithelzellen im *Stratum corneum*, verknüpft die verhornten Zellen, und stellt so einen stabilisierenden Faktor für das Epithel dar (Stumpff et al. 2011; Greco et al. 2018). Cldn7 trägt dabei aber weniger zur Abdichtung des Epithels bei (Stumpff et al. 2011). Der quadratische Effekt der ZO2-Expression wurde von der numerisch höchsten Expression in der PBLC-L-Gruppe getragen. Dies spiegelte sich in der vermehrten Cldn7-Expression wider, da ZO2 den korrekten Zusammenbau von TJ-Proteinen vermittelt. Es ist daher wenig überraschend, dass sich die Effekte auf struktureller Ebene nicht in einer Änderung der Gewebeleitfähigkeit niederschlugen und auch zu keinem phänotypisch sichtbaren Effekt der Fluorescein-Permeation führten. Die fehlende Expression von Cldn2 im Pansen stimmt mit früheren Untersuchungen überein (Stumpff et al. 2011).

Es lässt sich zusammenfassen, dass die mit der Fütterung verabreichten PBLC in den vorliegenden Konzentrationen lediglich geringe Effekte auf die Barrierefunktion des Jejunums und Pansens ausübten. Ob diese Effekte durch eine direkte Wirkung der PBLC auf das Epithel entstanden sind, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend beantworten. Der Gesamtzusammenhang lässt darauf schließen, dass die mentholinduzierte Kalziumfluxstimulation im Pansen nicht para-, sondern transzellulärer Natur ist.

5.2.4.2 Einsatz des parazellulären Markers Fluorescein im Pansen und Darm

Die mukoserosalen Fluoresceinfluxraten dienen in zahlreichen Studien als Marker für die Durchlässigkeit und Integrität der ruminalen und intestinalen Epithelbarrieren (Lindmark et al. 1998; Legen und Kristl 2002; Meissner et al. 2017; Greco et al. 2018). Beim physiologischen pH-Wert liegt Fluorescein zweifach negativ geladen vor (Zanker und Peter 1958; Diehl et al. 1986) und der Transport erfolgt primär parazellulär (Chang und Karasov 2004; Cvenkel et al. 2015; Sanchez et al. 2016).

In der vorliegenden Studie wurde Fluorescein zum ersten Mal als Marker für die parazelluläre Permeation im Jejunum des Schafs herangezogen. Dabei unterschieden sich unter gradientenfreien Bedingungen die mukoserosalen und seromukosalen Fluxraten nicht, wie es für passive Transportvorgänge typisch ist. Die Fluoresceinfluxraten stehen, unabhängig von ihrer Richtung, in enger Beziehung zur gemessenen Gewebeleitfähigkeit, was als Indiz für eine hauptsächlich parazelluläre Permeation zu verstehen ist. Dabei sei hervorgehoben, dass sich die Steigung der mukoserosalen und seromukosalen Regressionsgeraden nicht voneinander unterscheiden und daher davon ausgegangen werden kann, dass sowohl die mukoserosalen als auch die seromukosalen Fluxraten in derselben Beziehung zur Gewebeleitfähigkeit stehen, die maßgeblich von der parazellulären Epitheldichtigkeit beeinflusst wird. Somit ist Fluorescein als adäquater parazellulärer Marker im Jejunum des Schafs zu klassifizieren.

Interessanterweise wurde im Pansen eine signifikante Fluoresceinresorption gemessen. In früheren Studien wurden lediglich unidirektionale Flussraten eruiert, was die Bestimmung einer vermeintlichen Nettoresorption unmöglich machte (Meissner et al. 2017; Greco et al. 2018; Greco et al. 2019). Im Versuch wurden alle elektrochemischen Gradienten egalisiert. Unter diesen vorherrschenden Bedingungen deuten signifikante Nettofluxraten auf aktive Transportmechanismen hin, die transzellulärer Natur sein müssen. Eine geringe aktive Transportrate wurde im Pansen bereits für den parazellulären Marker Mannitol beschrieben. Die Autoren dieser Studie stellen jedoch die physiologische Bedeutung dieser Mannitoltransportleistung infrage (Wilkens et al. 2011). Demgegenüber ist die im Zuge dieser Dissertation gemessene ruminale Fluoresceinresorptionsleistung deutlich höher. Im Unterschied zum Jejunum konnte eine Korrelation der Gewebeleitfähigkeit des Epithels mit den Fluoresceinfluxraten weder in mukoserosaler noch in seromukosaler Richtung festgestellt werden. Dies spricht gegen eine vorrangig parazelluläre Permeation.

Bei näherer Beleuchtung der eingesetzten Inkubationslösungen wird deutlich, dass sich die pH-Werte der mukosalen von der serosalen Inkubationslösung im Pansen, im Gegensatz zum Jejunum, unterscheiden (pH 6,4 vs. 7,4). In einem Zellkulturexperiment wurde gezeigt, dass Fluorescein sowohl durch passive Permeation als auch im Rahmen aktiver Transportvorgänge das Epithel passieren kann. In einer sauren Umgebung ($\text{pH} < 2$) liegt Fluorescein als ungeladenes Molekül vor; es findet eine nicht sättigbare passive Permeation statt. Steigt der pH-Wert an, wird Fluorescein zunächst zu einem Monoanion und schließlich zu einem Dianion ($\text{pK}_{a1} = 4,36$, $\text{pK}_{a2} = 6,38$) (Lindqvist 1960; Kuwayama et al. 2002). Bei pH 5,5 liegt Fluorescein nahezu vollständig als Monoanion vor und in einem Zellkulturexperiment wurde gezeigt, dass bei diesem pH-Wert die Resorptionskapazität von Fluorescein ein Maximum erreicht, weswegen die Autoren der Studie die Beteiligung eines Monocarboxylat-Transporters (MCT) bei der aktiven Fluoresceinresorption vermuteten. Zudem verringern spezifische MCT-Inhibitoren die Fluoresceinresorption, was die Beteiligung eines MCT denkbar erscheinen lässt (Kuwayama et al. 2002; Berginc et al. 2007). Bei dem im Pansen verwendeten mukosalen pH-Wert (6,4) liegt die Hälfte der Fluoresceinmoleküle als transportables Monoanion vor und MCT1 und MCT4 wurden im Pansen wiederholt nachgewiesen (Kirat et al. 2006; Kirat et al. 2007; Aschenbach et al. 2009; Aschenbach et al. 2011), was zur aktiven Fluoresceinresorption im Pansen beigetragen haben könnte. Ungeachtet des aktiven Transportes über MCT1/MCT4 war der pH-Wert der serosalen Inkubationslösung deutlich höher. Dies bewirkte eine Verschiebung des Verhältnisses in Richtung der nicht transportierbaren Dianionform von Fluorescein. Möglicherweise führte der erhöhte pH-Wert der serosalen Inkubationslösung damit zu einem serosalen Fluorescein-Trapping, was zur signifikanten Fluoresceinnettoresorption beigetragen haben könnte. Dieser Sachverhalt wurde bereits im Jejunum der Ratte experimentell bestätigt, wobei es bei unterschiedlichen pH-Werten der mukosalen (pH 6,5) und serosalen (pH 7,4) Inkubationslösungen zu einer signifikanten Fluorescein-Resorption kam. Im Unterschied dazu wurde bei identischen pH-Werten auf beiden Seiten keine signifikante Resorptionsleistung festgestellt (Berginc et al. 2007).

Zusätzlich wurde ein über einen Anionenaustauscher vermittelter Fluoresceintransport in der Niere beschrieben (Masereeuw et al. 1996; Masereeuw et al. 1999) und Fluoresceinfluxraten wurden in einem weiteren Experiment durch einen nicht-selektiven Inhibitor des Anionenaustauschers (DIDS) verringert (Berginc et al. 2007). Im Pansen ist ein Anionenaustauscher funktionell und strukturell belegt (Aschenbach et al. 2009), welcher neben einem MCT als Fluoresceintransportprotein in Frage kommt.

Interessanterweise bot sich unter natriumfreien mukosalen Inkubationsbedingungen ein umgekehrtes Bild, bei welchem eine signifikante Nettosekretion von Fluorescein gemessen wurde. Dieser Befund deutet auf eine zumindest teilweise Beteiligung eines natriumabhängigen Transportsystems hin, wie bereits in der Literatur beschrieben (Masereeuw et al. 1996; Masereeuw et al. 1999). Im Pansen wurde ein natriumabhängiger MCT1 (SMCT1) nachgewiesen (Bilk et al. 2005), der zur Umkehr von Fluoresceinresorption zu Sekretion, unter natriumfreien Bedingungen beigetragen haben könnte und zwar ungeachtet der unveränderten pH-Werte in mukosaler und serosaler Inkubationslösung (Ganapathy et al. 2008). Um eine natriumfreie mukosale Inkubation zu schaffen, wurde Natrium durch das impermeable Kation NMDG⁺ ersetzt. Ob NMDG⁺ über eine Inhibition des MCTs oder Anionentauschers in den Fluoresceintransport im Pansen eingreift, lässt sich mit den vorliegenden Ergebnissen nicht beantworten und lädt zu weiteren Untersuchungen ein.

Abschließend ist zu bemerken, dass der Einsatz von Fluorescein als parazellulärer Marker im Pansen eine genaue Abwägung der Inkubationsbedingungen voraussetzt. Inwieweit der Fluoresceintransport im Pansen von transzellulären Transportproteinen beeinflusst wird, erfordert weiterführende Untersuchungen.

5.2.5 Einsatz bioaktiver Pflanzenlipide zur Hypokalzämieprävention

Wilkins et al. (2020) sahen die Entwicklung alternativer Maßnahmen zur Prävention der subklinischen Hypokalzämie als notwendig an, da lediglich 44% der Milchviehbetriebe einer Studie aus Deutschland zufolge auf gängige Präventionskonzepte zurück greifen (Venjakob et al. 2017). Eine zentrale Fragestellung der vorliegenden Dissertation war die Bewertung des Einsatzes von PBLC als alternative Maßnahme zur Hypokalzämieprävention. Es wurde erstmalig beobachtet, dass eine Langzeitsupplementierung mit mentholreichen PBLC zu einer funktionellen Sensibilisierung der Kalziumaufnahmekapazität des Pansens führt. Folgt nach dieser mehrwöchigen Sensibilisierungsphase ein akuter Mentholstimulus, reagiert das Pansenepithel mit einer stark erhöhten transzellulären Kalziumresorption. Dieser *Ex-vivo*-Befund war bei den verwendeten Versuchstieren *in vivo* durch die Erhöhung der Blutkalziumkonzentration messbar und bestätigt damit die zuvor getroffene Beobachtung erhöhter Blutkalziumkonzentrationen beim Rind nach mentholreicher PBLC-Fütterung (Braun et al. 2019) auch beim Modelltier Schaf. Als zugrundeliegender Wirkmechanismus wurde in der Vergangenheit eine TRP-Kanalstimulation durch Menthol vermutet, höchstwahrscheinlich von TRPV3 (Rosendahl et al. 2016; Schrapers et al. 2018; Braun et al. 2019), was durch die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation bestätigt wird.

Diese agonistische Stimulation der ruminalen Kalziumaufnahmekapazität stellt ein neuartiges Konzept dar, bei welchem es im Gegensatz zu gängigen Hypokalzämieprophylaxemaßnahmen zu keiner Aktivierung kalziumhomöostatischer Maßnahmen kommt. Bereits im Pansen vorhandene Kanäle werden in ihrer Öffnungswahrscheinlichkeit und somit Kalziumdurchlässigkeit stimuliert. Ob dabei TRPV3 vermehrt in die apikale Zellmembran verlagert wird oder die gesteigerte Aktivierbarkeit der ruminalen Kalziumfluxraten von weiteren Proteinen der transepithelialen Kalziumresorption abhängig ist, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend beantworten, ist aber für die Bewertung des Einsatzes von PBLC zur Hypokalzämieprävention von nebensächlicher Bedeutung. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation lassen jedoch eine präpartale Fütterung mit mentholreichen PBLC in Kombination mit einer akuten Mentholapplikation, etwa in Verbindung mit einem Kalziumbolus um den Geburtszeitraum, als aussichtsreiche und wirkungsvolle Hypokalzämiepräventionsstrategie erscheinen. Ob die dadurch erreichte Steigerung der Kalziumaufnahmekapazität ausreicht, um den Kalziummehrbedarf gerade bei Kühen in der Frühlaktation zu decken, erfordert abschließende Untersuchungen.

5.2.6 Schlussfolgerung

Potter (1890) machte bereits 1890 auf Menthol aufmerksam und beschrieb es als einen Stoff, der in Zukunft möglicherweise von großem Nutzen sein werde, dessen Wirkmechanismen jedoch noch sorgfältig zu untersuchen und aufzuklären seien. Über 120 Jahre später und nach intensiven Forschungsbemühungen wurde von Andersen et al. (2014) zusammengefasst, dass Menthol ein interessanter Stoff sei, jedoch über die Wirkmechanismen und Anwendbarkeit nur begrenztes Wissen bestehe. Diese beiden sinngleichen Aussagen im zeitlichen Abstand von über einem Jahrhundert lassen die Komplexität der Mechanismen und Einsatzmöglichkeiten der PBLC um Menthol erahnen. In der vorliegenden Dissertation wurde durch *In-vivo*-, *Ex-vivo*- und molekularbiologische Untersuchungen erstmalig die positive Wirkung einer Langzeitsupplementierung mit mentholreichen PBLC auf die Mechanismen der Kalziumresorption von Schafen charakterisiert und mit der Beantwortung der initial gestellten Fragen ein weiterer Schritt zur Aufklärung der Wirkmechanismen von PBLC im Gastrointestinaltrakt beigetragen:

1) Lässt sich der im Pansen des Rindes beobachtete, positive Effekt einer akuten, mentholinduzierten Kalziumnettofluxstimulation auch beim Modelltier Schaf reproduzieren?

Eine direkte Mentholapplikation führte beim Schaf zu einer Stimulation der elektrophysiologischen Parameter sowie der Kalziumnettoresorption im Pansen. Somit lässt sich der Effekt auch beim Modelltier Schaf reproduzieren.

2) Lässt sich der beim Rind beobachtete positive Effekt einer Langzeitsupplementierung mit mentholreichen PBLC auf die Blutkalziumkonzentration auch beim Modelltier Schaf reproduzieren?

Die Langzeitsupplementierung führte auch beim Modelltier Schaf zumindest tendenziell zu einer Erhöhung der Blutkalziumkonzentration.

3) Hat eine Langzeitsupplementierung mit mentholreichen PBLC in verschiedenen Dosierungen Auswirkungen auf die akute mentholinduzierte Kalziumfluxstimulation im Pansen und auch im Jejunum?

PBLC-supplementierte Tiere zeigten eine deutlich höhere Stimulation elektrophysiologischer Parameter und reagierten mit einem stärkeren Anstieg der Kalziumnettoresorption im Pansen. Im Jejunum waren keine Effekte sichtbar.

4) Kommt es durch eine Langzeitsupplementierung mit mentholreichen PBLC in verschiedenen Dosierungen zu einer Erhöhung der basalen Kalziumfluxraten im Pansen und Jejunum?

Die elektrophysiologischen Parameter und die basalen Kalziumfluxraten waren im Pansen leicht positiv beeinflusst. Dieser Effekt scheint aber von niedrigerer Relevanz zu sein als die akute mentholinduzierte Stimulation. Im Jejunum kam es zu keiner Beeinflussung der basalen Kalziumfluxraten.

5) Ist eine Stimulierbarkeit der Kalziumnettoresorption durch Änderungen des trans- oder parazellulären Transportweges bedingt und lässt sich dies auf struktureller Ebene verifizieren?

Der parazelluläre Absorptionsweg konnte weder auf struktureller noch funktioneller Ebene durch eine Supplementierung mit mentholreichen PBLC modifiziert werden. Die Stimulierbarkeit der Kalziumfluxraten im Pansen ist transzellulärer Natur. Die Genexpression der für den transzellulären Absorptionsweg verantwortlichen Gene wurde jedoch nicht beeinflusst.

6) Lässt sich die mögliche Existenz eines $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Austauschers über eine mukosale Natriumdepletion nachweisen?

Die mukosale Natriumdepletion führte zu keiner Stimulation der mukoserosalen und Kalziumnettofluxraten, was eine funktionelle Expression des $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Austauschers im Pansen in Frage stellt.

7) Stellt eine Fütterung mit mentholreichen PBLC eine Alternative zu den gängigen Hypokalzämiepräventionskonzepten dar?

Es wurde gezeigt, dass die alleinige Langzeitsupplementierung mit mentholreichen PBLC positive Auswirkungen auf die Kalziumtransportleistung besitzt. Dies erscheint jedoch zur Begründung einer wirksamen Hypokalzämiepräventionsmaßnahme als nicht ausreichend. Vielmehr resultiert die Kombination einer Langzeitsupplementierung mit einer akuten Mentholapplikation in einer stark stimulierten ruminalen Kalziumnettoresorption. Diese Sensibilisierung der ruminalen Kalziumresorption erscheint zugleich für die tendentiell erhöhte Blutkalziumkonzentration ursächlich und spricht für einen potentiellen Nutzen des Einsatzes mentholreicher PBLC zur Hypokalzämieprävention.

5.2.7 Ausblick

Als Nebenbefund der vorliegenden Dissertation wurde Fluorescein im Pansen aktiv transportiert, wobei sich über involvierte Transportproteine lediglich mutmaßen lässt. Zukünftige Untersuchungen sollten sich auf die Aufklärung des dahinterstehenden Transportmechanismus, beispielsweise durch den Einsatz selektiver Inhibitoren, konzentrieren. Ob der Fluoresceintransport maßgeblich von Transportproteinen oder von Unterschieden im pH-Wert der Inkubationslösungen beeinflusst wird und inwiefern der Fluoresceintransport Natrium- bzw. NMDG⁺-abhängig ist, erfordert weitere Studien und sollte bei der Planung zukünftiger Experimente mit Pansenepithelien berücksichtigt werden.

Die Auswirkungen der Lanzeitsupplementierung auf das Expressionsniveau der Gene der trans- und parazellulären Permeation wurde in der vorliegenden Dissertation lediglich auf mRNA-Expressionsebene quantifiziert. Gerade die Effekte im Jejunum laden zur Spekulation um die Wirkweise der PBLC ein. Da das Jejunum beim Wiederkäuer eine wichtige Rolle beim Kalziumtransport spielt, sollten sich zukünftige Forschungsbemühungen neben der direkten Wirkweise von PBLC auf das Jejunumepithel auch auf indirekte PBLC-Effekte, beispielsweise über das Hormonsystem, konzentrieren. Dabei sollten neben dem mRNA-Expressionsniveau auch die Proteinexpression und histologische Unterschiede in der Proteinlokalisierung untersucht werden.

PBLC besitzen positive Effekte auf die Kalziumhomöostase des Wiederkäuers. Eine abschließende Beurteilung der Wirksamkeit des Einsatzes von mentholreichen PBLC zur Hypokalzämieprävention erfordert jedoch Untersuchungen unter Bedingungen, die den Kalziumhaushalt beanspruchen. Dies ließe sich beim Modelltier Schaf während der späten Trächtigkeit bzw. beim Rind zu Beginn der Laktation verwirklichen. Ob die Quantität einer alleinigen mentholinduzierten akuten Kalziumfluxstimulation ausreicht, um dem Abfall der Blutkalziumkonzentration entgegenzuwirken, oder ob zusätzlich eine Sensibilisierung der ruminalen Kalziumresorptionsmechanismen durch eine vorherige Langzeitsupplementierung mit mentholreichen PBLC erforderlich ist, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nur schwer abschätzen und erfordert dahingehende Untersuchungen.

6. Zusammenfassung

Titel: Einfluss bioaktiver Pflanzenlipide auf Kalziumresorptionsmechanismen im Gastrointestinaltrakt von Schafen

Die Stimulation der Kalziumresorption kann der Hypokalzämie von Milchkühen in der Frühlaktation entgegenwirken. Bioaktive Pflanzenlipide (PBLC), allen voran Menthol, sind als Agonisten für nicht-selektive Kationenkanäle aus der transienten receptor potential (TRP)-Familie bekannt und wurden kürzlich im Pansen von Wiederkäuern nachgewiesen. PBLC stimulierten akut die ruminale Kalziumresorption *ex vivo* und zogen *in vivo* höhere Blutkalziumkonzentrationen bei Rindern nach sich. Das Ziel der vorliegenden Dissertation war der Nachweis der Reproduzierbarkeit der positiven mentholinduzierten Effekte vom Rind beim Modelltier Schaf und darüber hinaus die Aufklärung der Kalziumresorptionsmechanismen im Gastrointestinaltrakt. Dazu wurden 24 Schafe in eine Kontroll- (Kon-), PBLC-L- und PBLC-H-Gruppe aufgeteilt, welche 0, 80 und 160 mg/d einer Mischung mentholreicher PBLC erhielten. Nach vier Wochen wurden allen Versuchstieren Blutproben entnommen und auf spezifische *In-vivo*-Parameter untersucht. Das Epithel des Pansens und Jejunums wurde auf mRNA-Expressionsniveau von TRPA1, TRPV3, TRPV5-6 und TRPM6-8 sowie Claudin (Cldn)1, -2, -3, -4, -7, Occludin (Occl) und Zonula Occludens (ZO)1 und -2 analysiert. Kalzium- und Fluoresceinfluxraten und die elektrophysiologischen Eigenschaften von Pansen- und Jejunumepithelien wurden in Ussing-Kammern in An- und Abwesenheit von mukosalem Natrium sowie in Abwesenheit von Magnesium gemessen. Akute Veränderungen der Kalziumfluxraten wurden nach mukosaler Applikation von 50 µM Menthol gemessen. Die mentholreiche PBLC-Supplementierung resultierte in einem Trend zu erhöhten Kalziumblutkonzentrationen. Im Pansen stieg die Cldn7-Expression mit steigender PBLC-Dosis linear, während ZO2 quadratisch anstieg. Im Jejunum tendierten TRPA1, TRPV5, TRPV6, Cldn4 und ZO2 mit zunehmender PBLC-Dosis dazu, linear abzunehmen. Im Pansen kam es zu einer Kalziumnettoabsorption, während das Jejunum eine hohe passive Kalziumpermeabilität, aber keinen Nettotransport zeigte. Die Kalziumnettofluxraten im Pansen stiegen mit der PBLC-Fütterung quadratisch an und verringerten sich unter natriumfreier mukosaler Inkubation. Die Fluoresceinfluxraten im Pansen wurden nicht von der Fütterung beeinflusst. Im Jejunum verminderte sich der Fluoresceintransport in mukoserosale Richtung. Im Pansen stieg der Stromfluss in beiden PBLC-Fütterungsgruppen an. Die akute Mentholapplikation stimulierte die mukoserosale Kalziumfluxraten lediglich im Pansen, wobei die Stimulation beider PBLC-Gruppen höher ausfiel. Es lässt sich zusammenfassen, dass der Kalziumtransport im Pansen als aktiver und transzellulärer Prozess abläuft. Dabei ist

höchstwahrscheinlich der durch Menthol stimulierbare TRPV3 maßgeblich beteiligt. Die Supplementierung mit mentholreichen PBLC erhöht die transzelluläre Kalziumresorption im Pansen und sensibilisiert diese für eine akute Stimulation durch Menthol. Im Gegensatz dazu ist sowohl ein funktioneller als auch struktureller PBLC-Effekt in den verabreichten Dosierungen im Jejunum nicht nachweisbar. Der Einsatz einer Kombination aus PBLC-Langzeitsupplementierung mit akuter Mentholgabe um den Geburtszeitraum erscheint als vielversprechende Alternative oder Ergänzung zu den gängigen Hypokalzämiepräventionsmaßnahmen. Eine abschließende Beurteilung erfordert weitere Untersuchungen an Kühen um den Geburtszeitraum.

7. Summary

Title: **Influence of plant bioactive lipid compounds on calcium absorption mechanisms in the gastrointestinal tract of sheep**

Stimulation of calcium absorption can counteract hypocalcemia of dairy cows in early lactation. Plant bioactive lipid compounds (PBLC), most notably menthol, are known as agonists for non-selective cation channels of the transient receptor potential (TRP) family and were recently detected in the ruminal epithelium. PBLC acutely stimulated ruminal calcium absorption *ex vivo* and resulted in higher blood calcium concentrations in cattle *in vivo*. The present thesis aimed at reproducing the positive menthol-induced effects from cattle in the model animal sheep and, furthermore, at elucidating calcium absorption mechanisms in the gastrointestinal tract. For this purpose, 24 sheep were divided into a control (Kon), PBLC-L and PBLC-H group, which received 0, 80 and 160 mg/d of a blend of menthol-rich PBLC. After four weeks, blood samples were taken from all animals and specific *in vivo* parameters were analyzed. The ruminal and jejunal epithelium was analyzed for mRNA expression levels of TRPA1, TRPV3, TRPV5-6, and TRPM6-8, as well as claudin (Cldn)1, -2, -3, -4, -7, occludin (Occl), and zonula occludens (ZO)1 and -2. Calcium and fluorescein flux rates as well as electrophysiological properties of rumen and jejunum epithelia were measured in Ussing chambers in the presence and absence of mucosal sodium, and also in the absence of magnesium. Acute changes in calcium flux rates were measured after mucosal application of 50 μ M menthol. Menthol-rich PBLC supplementation resulted in a trend for increased blood calcium concentrations. In the rumen, Cldn7 expression increased linearly with increasing PBLC dose, while ZO2 increased quadratically. In the jejunum, TRPA1, TRPV5, TRPV6, Cldn4, and ZO2 tended to decrease linearly with increasing PBLC dose. Significant calcium net absorption occurred in the rumen, whereas the jejunum showed high passive calcium permeability but no net transport. Ruminal calcium net flux rates increased quadratically with PBLC feeding and decreased under sodium-free mucosal incubation. Ruminal fluorescein flux rates were not affected by feeding. In the jejunum, fluorescein transport decreased in the mucoserosal direction. In the rumen, short-circuit current increased in both PBLC feeding groups. Acute menthol application stimulated mucoserosal and calcium net flux rates only in the rumen, with higher stimulation responses in both PBLC groups. It can be summarized that calcium transport in the rumen occurs as an active and transcellular process. TRPV3 is most likely significantly involved in this process, which can be stimulated by menthol. Supplementation with menthol-rich PBLC increases transcellular calcium resorption in the rumen and sensitizes it to acute stimulation by menthol. In contrast, both a functional and structural PBLC effect is not detectable in the jejunum at the

doses administered. The use of a combination of long-term PBLC supplementation with acute menthol administration around the parturition period appears to be a promising alternative or complement to current hypocalcemia prevention measures, although final evaluation requires studies in cows around the parturition period.

8. Literaturverzeichnis

- Abd-Elsalam K A (2003): Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African J. Biotechnol.* 2:91-95. <https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1019>
- Abdel-Hafeez H M, Manas-Almendros M, Ross R, Care A D, Marshall D H (1982): Effects of dietary phosphorus and calcium on the intestinal absorption of Ca in sheep. *Br. J. Nutr.* 47:69-77. <https://doi.org/10.1079/bjn19820010>
- Al-Sadi R, Khatib K, Guo S, Ye D, Youssef M, Ma T (2011): Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300:G1054-1064. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00055.2011>
- Alexander R T, Rievaj J, Dimke H (2014): Paracellular calcium transport across renal and intestinal epithelia. *Biochem. Cell Biol.* 92:467-480. <https://doi.org/10.1139/bcb-2014-0061>
- Allen M S (1997): Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *J. Dairy Sci.* 80:1447-1462. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76074-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76074-0)
- Alpizar Y A, Gees M, Sanchez A, Apetrei A, Voets T, Nilius B, Talavera K (2013): Bimodal effects of cinnamaldehyde and camphor on mouse TRPA1. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* 465:853-864. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1204-x>
- Amasheh S, Meiri N, Gitter A H, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke J D, Fromm M (2002): Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.* 115:4969-4976. <https://doi.org/10.1242/jcs.00165>
- Andersen H H, Olsen R V, Moller H G, Eskelund P W, Gazerani P, Arendt-Nielsen L (2014): A review of topical high-concentration L-menthol as a translational model of cold allodynia and hyperalgesia. *Eur. J. Pain.* 18:315-325. <https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2013.00380.x>
- Angioni A, Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P (2006): Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J. Agric. Food Chem.* 54:4364-4370. <https://doi.org/10.1021/jf0603329>

- Aschenbach J R, Bilk S, Tadesse G, Stumpff F, Gabel G (2009): Bicarbonate-dependent and bicarbonate-independent mechanisms contribute to nondiffusive uptake of acetate in the ruminal epithelium of sheep. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296:G1098-1107. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90442.2008>
- Aschenbach J R, Oswald R, Gabel G (2000): Transport, catabolism and release of histamine in the ruminal epithelium of sheep. *Pflugers Arch.* 440:171-178. <https://doi.org/10.1007/s004240000285>
- Aschenbach J R, Penner G B, Stumpff F, Gabel G (2011): Ruminant nutrition symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *J. Anim. Sci.* 89:1092-1107. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3301>
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Waomar M (2008): Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem. Toxicol.* 46:446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Balemans D, Boeckxstaens G E, Talavera K, Wouters M M (2017): Transient receptor potential ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades underlying visceral hypersensitivity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 312:G635-G648. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00401.2016>
- Bandell M, Story G M, Hwang S W, Viswanath V, Eid S R, Petrus M J, Earley T J, Patapoutian A (2004): Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron.* 41:849-857. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00150-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00150-3)
- Bandell M, Dubin A E, Petrus M J, Orth A, Mathur J, Hwang S W, Patapoutian A (2006): High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol. *Nat. Neurosci.* 9:493-500. <https://doi.org/10.1038/nn1665>
- Bandzaite V, Klimiene I, Spakauskas V, Matusевичius A (2005): Interaction between the levels of hormones and minerals in sera of healthy and sick cows. *Pol. J. Vet. Sci.* 8:269-274.
- Bautista D M, Siemens J, Glazer J M, Tsuruda P R, Basbaum A I, Stucky C L, Jordt S-E, Julius D (2007): The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature.* 448:204. <https://doi.org/10.1038/nature05910>
- Ben-Awadh A N, Delgado-Calle J, Tu X L, Kuhlenschmidt K, Allen M R, Plotkin L I, Bellido T (2014): Parathyroid hormone receptor signaling induces bone resorption in the adult skeleton by directly regulating the RANKL gene in osteocytes. *Endocrinology.* 155:2797-2809. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1046>

- Benn B S, Ajibade D, Porta A, Dhawan P, Hediger M, Peng J B, Jiang Y, Oh G T, Jeung E B, Lieben L, Bouillon R, Carmeliet G, Christakos S (2008): Active intestinal calcium transport in the absence of transient receptor potential vanilloid type 6 and calbindin-D9k. *Endocrinology*. 149:3196-3205. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1655>
- Berginc K, Zakelj S, Levstik L, Ursic D, Kristl A (2007): Fluorescein transport properties across artificial lipid membranes, Caco-2 cell monolayers and rat jejunum. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66:281-285. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.10.023>
- Bergmann K R, Liu S X, Tian R, Kushnir A, Turner J R, Li H L, Chou P M, Weber C R, De Plaen I G (2013): Bifidobacteria stabilize claudins at tight junctions and prevent intestinal barrier dysfunction in mouse necrotizing enterocolitis. *Am. J. Pathol.* 182:1595-1606. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.01.013>
- Bilk S, Huhn K, Honscha K U, Pfannkuche H, Gabel G (2005): Bicarbonate exporting transporters in the ovine ruminal epithelium. *J. Comp. Physiol. B.* 175:365-374. <https://doi.org/10.1007/s00360-005-0493-1>
- Bouhdid S, Skali S, Idaomar M, Zhiri A, Baudoux D, Amensour M, Abrini J (2008): Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. *African J. Biotechnol.* 7.
- Braun H S, Schrapers K T, Mahlkow-Nerge K, Stumpff F, Rosendahl J (2019): Dietary supplementation of essential oils in dairy cows: evidence for stimulatory effects on nutrient absorption. *Animal*. 13:518-523. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001696>
- Brierley S M, Hughes P A, Page A J, Kwan K Y, Martin C M, O'Donnell T A, Cooper N J, Harrington A M, Adam B, Liebrechts T, Holtmann G, Corey D P, Rychkov G Y, Blackshaw L A (2009): The ion channel TRPA1 is required for normal mechanosensation and is modulated by algescic stimuli. *Gastroenterology*. 137:2084-2095 e2083. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.07.048>
- Bronner F (1987): Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications. *J. Nutr.* 117:1347-1352. <https://doi.org/10.1093/jn/117.8.1347>
- Bronner F, Pansu D (1999): Nutritional aspects of calcium absorption. *J. Nutr.* 129:9-12. <https://doi.org/10.1093/jn/129.1.9>
- Brown A J, Krits I, Armbrrecht H J (2005): Effect of age, vitamin D, and calcium on the regulation of rat intestinal epithelial calcium channels. *Arch. Biochem. Biophys.* 437:51-58. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.02.007>

- Brown K, Uwiera R R E, Kalmokoff M L, Brooks S P J, Inglis G D (2017): Antimicrobial growth promoter use in livestock: a requirement to understand their modes of action to develop effective alternatives. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 49:12-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.006>
- Brozmanova M, Ru F, Surdenikova L, Mazurova L, Taylor-Clark T, Kollarik M (2011): Preferential activation of the vagal nodose nociceptive subtype by TRPA1 agonists in the guinea pig esophagus. *Neurogastroent. Motil.* 23:E437-E445. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2011.01768.x>
- Cao X, Yang F, Zheng J, Wang K (2012): Intracellular proton-mediated activation of TRPV3 channels accounts for the exfoliation effect of alpha-hydroxyl acids on keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 287:25905-25916. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.364869>
- Cattaruzza F, Spreadbury I, Miranda-Morales M, Grady E F, Vanner S, Bunnett N W (2010): Transient receptor potential ankyrin-1 has a major role in mediating visceral pain in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298:G81-91. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00221.2009>
- Chang M H, Karasov W H (2004): Absorption and paracellular visualization of fluorescein, a hydrosoluble probe, in intact house sparrows (*Passer domesticus*). *Zoology (Jena).* 107:121-133. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2004.03.001>
- Chapinal N, Carson M, Duffield T F, Capel M, Godden S, Overton M, Santos J E, LeBlanc S J (2011): The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *J. Dairy Sci.* 94:4897-4903. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4075>
- Chen G Q, Sun D, Yang J M, Zhang S, Tian Y E, Che Z P, Liu S M, Jiang J, Lin X M (2020): Synthesis of sulfonate derivatives of carvacrol and thymol as anti-oomycetes agents. *J. Asian Nat. Prod.* 23:692-702. <https://doi.org/10.1080/10286020.2020.1758675>
- Cheng Z, Teo G, Krueger S, Rock T M, Koh H W, Choi H, Vogel C (2016): Differential dynamics of the mammalian mRNA and protein expression response to misfolding stress. *Mol. Syst. Biol.* 12:855. <https://doi.org/10.15252/msb.20156423>
- Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G (2016): Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiol. Rev.* 96:365-408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2015>
- Christakos S, Mady L J, Dhawan P. (2018): Calbindin-D28K and calbindin-D9K and the epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6. *Biochemistry, Physiology and Diagnostics (Elsevier Inc.)*.

- Chung M K, Guler A D, Caterina M J (2005): Biphasic currents evoked by chemical or thermal activation of the heat-gated ion channel, TRPV3. *J. Biol. Chem.* 280:15928-15941. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500596200>
- Clapham D E (2003): TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 426:517-524. <https://doi.org/10.1038/nature02196>
- Clapham D E, Julius D, Montell C, Schultz G (2005): International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol. Rev.* 57:427-450. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.6>
- Clarke L L (2009): A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296:G1151-1166. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90649.2008>
- Cobellis G, Trabalza-Marinucci M, Yu Z (2016): Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Sci. Total Environ.* 545-546:556-568. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.103>
- Colburn R W, Lubin M L, Stone D J, Jr., Wang Y, Lawrence D, D'Andrea M R, Brandt M R, Liu Y, Flores C M, Qin N (2007): Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron.* 54:379-386. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.017>
- Connor E E, Li R W, Baldwin R L, Li C (2010): Gene expression in the digestive tissues of ruminants and their relationships with feeding and digestive processes. *Animal.* 4:993-1007. <https://doi.org/10.1017/S1751731109991285>
- Croteau R, Kutchan T M, Lewis N G (2000): Natural products (secondary metabolites). *Biochem. Mol. Biol. Plants.* 24:1250-1319.
- Curtis C R, Erb H N, Sniffen C J, Smith R D, Powers P A, Smith M C, White M E, Hillman R B, Pearson E J (1983): Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183:559-561.
- Cvenkel B, Stunf S, Srebotnik Kirbis I, Strojjan Flezar M (2015): Symptoms and signs of ocular surface disease related to topical medication in patients with glaucoma. *Clin. Ophthalmol.* 9:625-631. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S81247>

- Damann N, Voets T, Nilius B (2008): TRPs in our senses. *Curr. Biol.* 18:R880-889. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.063>
- DeGaris P J, Lean I J (2008): Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles. *Vet. J.* 176:58-69. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.029>
- DeLuca H F (1988): The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J.* 2:224-236.
- den Dekker E, Hoenderop J G, Nilius B, Bindels R J (2003): The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium.* 33:497-507. [https://doi.org/10.1016/s0143-4160\(03\)00065-4](https://doi.org/10.1016/s0143-4160(03)00065-4)
- Diaz de Barboza G, Guizzardi S, Tolosa de Talamoni N (2015): Molecular aspects of intestinal calcium absorption. *World J. Gastroenterol.* 21:7142-7154. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i23.7142>
- Diehl H, Horchak-Morris N, Hefley A J, Munson L F, Markuszewski R (1986): Studies on fluorescein—III: The acid strengths of fluorescein as shown by potentiometric titration. *Talanta.* 33:901-905. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(86\)80220-X](https://doi.org/10.1016/0039-9140(86)80220-X)
- Dittmer K E, Thompson K G (2011): Vitamin D metabolism and rickets in domestic animals: A review. *Vet. Pathol.* 48:389-407. <https://doi.org/10.1177/0300985810375240>
- Dusso A S, Brown A J, Slatopolsky E (2005): Vitamin D. *Am. J. Renal Physiol.* 289:F8-F28. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00336.2004>
- Eccles R (1994): Menthol and related cooling compounds. *J. Pharm. Pharmacol.* 46:618-630.
- Elfers K, Marr I, Wilkens M R, Breves G, Langeheine M, Brehm R, Muscher-Banse A S (2016): Expression of tight junction proteins and cadherin 17 in the small intestine of young goats offered a reduced N and/or Ca diet. *PLoS One.* 11:e0154311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154311>
- Elfers K, Wilkens M R, Breves G, Muscher-Banse A S (2015): Modulation of intestinal calcium and phosphate transport in young goats fed a nitrogen- and/or calcium-reduced diet. *Br. J. Nutr.* 114:1949-1964. <https://doi.org/10.1017/S000711451500375X>

- Fakler B, Fahlke C (2010): Grundlagen zellulärer Erregbarkeit. In: Physiologie des Menschen. Springer Medizin Verlag. 29. Auflage. 49-75. Heidelberg. ISBN - 9783540218821
- Fanning A S, Anderson J M (2009): Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1165:113-120. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04440.x>
- Favus M J (1985): Factors that influence absorption and secretion of calcium in the small intestine and colon. *Am. J. Physiol.* 248:G147-157. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1985.248.2.G147>
- Feher J J, Fullmer C S, Wasserman R H (1992): Role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption. *Am. J. Physiol.* 262:C517-526. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1992.262.2.C517>
- Figueiredo A C, Barroso J G, Pedro L G, Scheffer J J (2008): Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragrance J.* 23:213-226. <https://doi.org/10.1002/ffj.1875>
- Firmenich C S, Elfers K, Wilkens M R, Breves G, Muscher-Banse A S (2018): Modulation of renal calcium and phosphate transporting proteins by dietary nitrogen and/or calcium in young goats. *J. Anim. Sci.* 96:3208-3220. <https://doi.org/10.1093/jas/sky185>
- Floyd R V, Borisova L, Bakran A, Hart C A, Wray S, Burdyga T V (2008): Morphology, calcium signaling and mechanical activity in human ureter. *J. Urol.* 180:398-405. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.02.045>
- Flynn A (2003): The role of dietary calcium in bone health. *Proc. Nutr. Soc.* 62:851-858. <https://doi.org/10.1079/Pns2003301>
- Franca L T, Carrilho E, Kist T B (2002): A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys.* 35:169-200. <https://doi.org/10.1017/s0033583502003797>
- Fraser D R, Kodicek E (1973): Regulation of 25-hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase activity in kidney by parathyroid-hormone. *Nature-New Biol.* 241:163-166. <https://doi.org/10.1038/newbio241163a0>
- Frohne D, Jensen U (1994): Das System der Pflanzen. In: Systematik des Pflanzenreiches unter besonderer Berücksichtigung chemischer Merkmale und pflanzlicher Drogen. 5. Auflage. 57-99. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. Stuttgart. ISBN - 3804715842

- Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, Yamamoto Y, Wada T, Kojima T, Yokozaki H, Yamashita T, Kato S, Sawada N, Chiba H (2008): Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca²⁺ absorption between enterocytes. *Mol. Biol. Cell.* 19:1912-1921. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-09-0973>
- Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S (2002): Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.* 156:1099-1111. <https://doi.org/10.1083/jcb.200110122>
- Gäbel G, Aschenbach J R, Muller F (2002): Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations. *Anim. Health Res. Rev.* 3:15-30. <https://doi.org/10.1079/ahrr200237>
- Ganapathy V, Thangaraju M, Gopal E, Martin P M, Itagaki S, Miyauchi S, Prasad P D (2008): Sodium-coupled monocarboxylate transporters in normal tissues and in cancer. *AAPS J.* 10:193-199. <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9022-y>
- Gelal A (2008): Influence of menthol on first pass elimination. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 7:119-124.
- Gelfert C C, Leonie Löffler S, Fromer S, Engel M, Hartmann H, Manner K, Baumgartner W, Staufienbiel R (2007): The impact of dietary cation anion difference (DCAD) on the acid-base balance and calcium metabolism of non-lactating, non-pregnant dairy cows fed equal amounts of different anionic salts. *J. Dairy Res.* 74:311-322. <https://doi.org/10.1017/S0022029907002439>
- Goff J P (2008): The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Vet. J.* 176:50-57. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.020>
- Goff J P (2015): 44 Digestion and absorption of nutrients. In: *Dukes Physiology of Domestic Animals*. 13th Edition. 467-567. Wiley-Blackwell. Hoboken. ISBN - 9781118501399.
- Goff J P (2018): Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid-base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. *J. Dairy Sci.* 101:2763-2813. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13112>
- Goff J P, Horst R L (1993): Oral administration of calcium salts for treatment of hypocalcemia in cattle. *J. Dairy Sci.* 76:101-108. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77328-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77328-2)

- Goff J P, Kimura K (2004): Metabolic diseases and their effect on immune function and resistance to infectious disease. Periparturient Diseases of Cattle Research Unit. Ames, IA, USA.
- Goff J P, Liesegang A, Horst R L (2014): Diet-induced pseudohypoparathyroidism: A hypocalcemia and milk fever risk factor. *J. Dairy Sci.* 97:1520-1528. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7467>
- Goff J P, Reinhardt T A, Horst R L (1991): Enzymes and factors controlling vitamin D metabolism and action in normal and milk fever cows. *J. Dairy Sci.* 74:4022-4032. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78597-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78597-4)
- Graham C, Gatherer I, Haslam I, Glanville M, Simmons N L (2007): Expression and localization of monocarboxylate transporters and sodium/proton exchangers in bovine rumen epithelium. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Physiol.* 292:R997-R1007. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00343.2006>
- Graham C, Simmons N L (2005): Functional organization of the bovine rumen epithelium. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Physiol.* 288:173-181. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00425.2004>
- Greco G, Amasheh S, Shen Z, Lu Z, Aschenbach J R (2019): Effects of glucagon-like peptides 1 and 2 and epidermal growth factor on the epithelial barrier of the rumen of adult sheep. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. <https://doi.org/10.1111/jpn.13200>
- Greco G, Hagen F, Meissner S, Shen Z, Lu Z, Amasheh S, Aschenbach J R (2018): Effect of individual SCFA on the epithelial barrier of sheep rumen under physiological and acidotic luminal pH conditions. *J. Anim. Sci.* 96:126-142. <https://doi.org/10.1093/jas/skx017>
- Guenther E (1972): The production of essential oils: Methods of distillation, effleurage, maceration and extraction with volatile solvent. History-Origin in plants production analysis Vol 1. Krieger Publ. Malabar. 87-226.
- Günzel D, Fromm M (2012): Claudins and other tight junction proteins. *Compr. Physiol.* 2:1819-1852. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110045>
- Hamamoto T, Takumida M, Hirakawa K, Takeno S, Tatsukawa T (2008): Localization of transient receptor potential channel vanilloid subfamilies in the mouse larynx. *Acta Oto-Laryngol.* 128:685-693. <https://doi.org/10.1080/00016480701669489>

- Han P C, Trinidad B J, Shi J (2015): Hypocalcemia-Induced Seizure: Demystifying the calcium paradox. *Asn. Neuro.* 7. <https://doi.org/10.1177/1759091415578050>
- Hara S, Ikegaya Y, Jørgensen R J, Sasaki J, Nakamura M, Tomizawa N (2003): Effect of induced subclinical hypocalcemia on the motility of the bovine digestive tract. *Act. Vet. Scand.* 44:1-1. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-44-S1-P76>
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007): qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8:1-14. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>
- Herm G, Muscher-Banse A S, Breves G, Schröder B, Wilkens M R (2015): Renal mechanisms of calcium homeostasis in sheep and goats. *J. Anim. Sci.* 93:1608-1621. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8450>
- Hernandez S, Chavez Munguia B, Gonzalez-Mariscal L (2007): ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture. *Exp. Cell Res.* 313:1533-1547. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.01.026>
- Hoenderop J G, Dardenne O, Van Abel M, Van Der Kemp A W, Van Os C H, St.-Arnaud R, Bindels R J (2002): Modulation of renal Ca^{2+} transport protein genes by dietary Ca^{2+} and 1,25-dihydroxyvitamin D_3 in 25-hydroxyvitamin D_3 -1alpha-hydroxylase knockout mice. *FASEB J.* 16:1398-1406. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0225com>
- Hoenderop J G, Muller D, Suzuki M, van Os C H, Bindels R J (2000): Epithelial calcium channel: gate-keeper of active calcium reabsorption. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 9:335-340. <https://doi.org/10.1097/00041552-200007000-00003>
- Hoenderop J G, Nilius B, Bindels R J (2005): Calcium absorption across epithelia. *Physiol. Rev.* 85:373-422. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2004>
- Hoff A O, Catala-Lehnen P, Thomas P M, Priemel M, Rueger J M, Nasonkin I, Bradley A, Hughes M R, Ordonez N, Cote G J, Amling M, Gagel R F (2002): Increased bone mass is an unexpected phenotype associated with deletion of the calcitonin gene. *J. Clin. Invest.* 110:1849-1857. <https://doi.org/10.1172/Jci200214218>
- Höller H, Breves G, Kocobatmaz M, Gerdes H (1988): Flux of calcium across the sheep rumen wall in vivo and in vitro. *Q. J. Exp. Physiol.* 73:609-618.

- Hollis B W, Conrad H R, Hibbs J W (1977): Changes in plasma 25-hydroxycholecalciferol and selected blood parameters after injection of massive doses of cholecalciferol or 25-hydroxycholecalciferol in non-lactating dairy cows. *J. Nutr.* 107:606-613. <https://doi.org/10.1093/jn/107.4.606>
- Holzer P (2011): TRP channels in the digestive system. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12:24-34.
- Horst R L, Goff J P, Reinhardt T A (2005): Adapting to the transition between gestation and lactation: differences between rat, human and dairy cow. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 10:141-156. <https://doi.org/10.1007/s10911-005-5397-x>
- Hosoya T, Matsumoto K, Tashima K, Nakamura H, Fujino H, Murayama T, Horie S (2014): TRPM8 has a key role in experimental colitis-induced visceral hyperalgesia in mice. *Neurogastroent. Motil.* 26:1112-1121. <https://doi.org/10.1111/nmo.12368>
- Houe H, Ostergaard S, Thilsing-Hansen T, Jorgensen R J, Larsen T, Sorensen J T, Agger J F, Blom J Y (2001): Milk fever and subclinical hypocalcaemia--an evaluation of parameters on incidence risk, diagnosis, risk factors and biological effects as input for a decision support system for disease control. *Acta. Vet. Scand.* 42:1-29.
- Hyde M L, Wilkens M R, Fraser D R (2019): In vivo measurement of strontium absorption from the rumen of dairy cows as an index of calcium absorption capacity. *J. Dairy Sci.* 102:5699-5705. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16052>
- Immler R, Simon S I, Sperandio M (2018): Calcium signalling and related ion channels in neutrophil recruitment and function. *Eur. J. Clin. Invest.* 48 Suppl 2:e12964. <https://doi.org/10.1111/eci.12964>
- Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S (1999): Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J. Cell Biol.* 147:1351-1363. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.6.1351>
- Janssens A, Gees M, Toth B I, Ghosh D, Mulier M, Vennekens R, Vriens J, Talavera K, Voets T (2016): Definition of two agonist types at the mammalian cold-activated channel TRPM8. *Elife.* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.17240>
- Jones G (2013): Extrarenal vitamin D activation and interactions between vitamin D-2, vitamin D-3, and vitamin D analogs. *Annu. Rev. Nutr. Vol 33.* 33:23-44. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161203>

- Jorgensen R J, Nyengaard N R, Hara S, Enemark J M, Andersen P H (1998): Rumen motility during induced hyper- and hypocalcaemia. *Acta. Vet. Scand.* 39:331-338.
- Kamatou G P, Vermaak I, Viljoen A M, Lawrence B M (2013): Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry.* 96:15-25. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.08.005>
- Karashima Y, Damann N, Prenen J, Talavera K, Segal A, Voets T, Nilius B (2007): Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J. Neurosci.* 27:9874-9884. <https://doi.org/10.1523/Jneurosci.2221-07.2007>
- Karashima Y, Prenen J, Talavera K, Janssens A, Voets T, Nilius B (2010): Agonist-induced changes in Ca²⁺ permeation through the nociceptor cation channel TRPA1. *Biophys. J.* 98:773-783. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.11.007>
- Kholif A E, Hassan A A, El Ashry G M, Bakr M H, El-Zaiat H M, Olafadehan O A, Matloup O H, Sallam S M A (2020): Phytogenic feed additives mixture enhances the lactational performance, feed utilization and ruminal fermentation of Friesian cows. *Anim. Biotechnol.* published online. <https://doi.org/10.1080/10495398.2020.1746322>
- Kim H J, Wie J, So I, Jung M H, Ha K T, Kim B J (2016): Menthol Modulates Pacemaker Potentials through TRPA1 Channels in Cultured Interstitial Cells of Cajal from Murine Small Intestine. *Cell. Physiol. Biochem.* 38:1869-1882. <https://doi.org/10.1159/000445549>
- Kimura K, Reinhardt T A, Goff J P (2006): Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89:2588-2595. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72335-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72335-9)
- Kirat D, Masuoka J, Hayashi H, Iwano H, Yokota H, Taniyama H, Kato S (2006): Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short-chain fatty acids absorption in caprine rumen. *J. Physiol.* 576:635-647. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.115931>
- Kirat D, Matsuda Y, Yamashiki N, Hayashi H, Kato S (2007): Expression, cellular localization, and functional role of monocarboxylate transporter 4 (MCT4) in the gastrointestinal tract of ruminants. *Gene.* 391:140-149. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.12.020>
- Kirschner N, Poetzl C, von den Driesch P, Wladykowski E, Moll I, Behne M J, Brandner J M (2009): Alteration of tight junction proteins is an early event in psoriasis: putative involvement of proinflammatory cytokines. *Am. J. Pathol.* 175:1095-1106. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080973>

- Klinger S, Schröder B, Gemmer A, Reimers J, Breves G, Herrmann J, Wilkens M R (2016): Gastrointestinal transport of calcium and glucose in lactating ewes. *Physiol. Rep.* 4:1-14. <https://doi.org/10.14814/phy2.12817>
- Kondo T, Oshima T, Obata K, Sakurai J, Knowle C H, Matsumoto T, Noguchi K, Miwa H (2010): Role of transient receptor potential A1 in gastric nociception. *Digestion.* 82:150-155. <https://doi.org/10.1159/000310836>
- Kondo T, Sakurai J, Miwa H, Noguchi K (2013): Activation of p38 MAPK through transient receptor potential A1 in a rat model of gastric distension-induced visceral pain. *Neuroreport.* 24:68-72. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32835c7df2>
- Korbmacher C, Brenner B, Scholz T. (2019): Funktion und Interaktion von Zellen. In: *Physiologie.* 9. Auflage. 41-89. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York. ISBN - 3132423912
- Kovacs C S (2017): The skeleton is a storehouse of mineral that is plundered during lactation and (fully?) replenished afterwards. *J. Bone Miner. Res.* 32:676-680. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3090>
- Kumar R, Thompson J R (2011): The regulation of parathyroid hormone secretion and synthesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22:216-224. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010020186>
- Kutuzova G D, Deluca H F (2004): Gene expression profiles in rat intestine identify pathways for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulated calcium absorption and clarify its immunomodulatory properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 432:152-166. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.09.004>
- Kuwayama K, Miyauchi S, Tateoka R, Abe H, Kamo N (2002): Fluorescein uptake by a monocarboxylic acid transporter in human intestinal Caco-2 cells. *Biochem. Pharmacol.* 63:81-88. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(01\)00853-x](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(01)00853-x)
- Lavker R M, Matoltsy A G (1970): Formation of horny cells: the fate of cell organelles and differentiation products in ruminal epithelium. *J. Cell Biol.* 44:501-512. <https://doi.org/10.1083/jcb.44.3.501>
- Legen I, Kristl A (2002): Ketoprofen-induced intestinal permeability changes studied in side-by-side diffusion cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 54:1419-1422. <https://doi.org/10.1211/002235702760345527>

- Leno B M, Neves R C, Louge I M, Curler M D, Thomas M J, Overton T R, McArt J A A (2018): Differential effects of a single dose of oral calcium based on postpartum plasma calcium concentration in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 101:3285-3302. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13164>
- Leo S, Bianchi K, Brini M, Rizzuto R (2005): Mitochondrial calcium signalling in cell death. *FEBS J.* 272:4013-4022. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04855.x>
- Leonhard-Marek S (2002): Divalent cations reduce the electrogenic transport of monovalent cations across rumen epithelium. *J. Comp. Physiol. B.* 172:635-641. <https://doi.org/10.1007/s00360-002-0292-x>
- Leonhard-Marek S, Becker G, Breves G, Schröder B (2007): Chloride, gluconate, sulfate, and short-chain fatty acids affect calcium flux rates across the sheep forestomach epithelium. *J. Dairy Sci.* 90:1516-1526. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71637-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71637-5)
- Leonhard-Marek S, Stumpff F, Brinkmann I, Breves G, Martens H (2005): Basolateral Mg^{2+}/Na^{+} exchange regulates apical nonselective cation channel in sheep rumen epithelium via cytosolic Mg^{2+} . *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288:G630-645. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00275.2004>
- Leonhard-Marek S, Stumpff F, Martens H (2010): Transport of cations and anions across forestomach epithelia: conclusions from in vitro studies. *Animal.* 4:1037-1056. <https://doi.org/10.1017/S1751731110000261>
- Li H, Sheppard D N, Hug M J (2004): Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *J. Cyst. Fibros.* 3 Suppl 2:123-126. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2004.05.026>
- Li X, Zhang Q, Fan K, Li B, Li H, Qi H, Guo J, Cao Y, Sun H (2016): Overexpression of TRPV3 correlates with tumor progression in non-small cell lung cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 17:437. <https://doi.org/10.3390/ijms17040437>
- Liebe F, Liebe H, Kaessmeyer S, Sponder G, Stumpff F (2020): The TRPV3 channel of the bovine rumen: localization and functional characterization of a protein relevant for ruminal ammonia transport. *Pflugers Arch.* <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02393-2>
- Liebich H G (2010): Verdauungsapparat. In: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. 5. Auflage. 110-133. Schattauer Verlag. ISBN - 9783794526925

- Lindmark T, Kimura Y, Artursson P (1998): Absorption enhancement through intracellular regulation of tight junction permeability by medium chain fatty acids in Caco-2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284:362-369.
- Lindqvist L (1960): A flash photolysis study of fluorescein. Almquist & Wiksell. Uppsala. Hochschulschrift (Dissertation) University of Uppsala.
- Littlelike E T, Horst R L (1982): Vitamin D3 toxicity in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 65:749-759. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82263-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82263-7)
- Lodemann U, Amasheh S, Radloff J, Kern M, Bethe A, Wieler L H, Pieper R, Zentek J, Aschenbach J R (2017): Effects of ex vivo infection with ETEC on jejunal barrier properties and cytokine expression in probiotic-supplemented pigs. *Dig. Dis. Sci.* 62:922-933. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4413-x>
- Lu Z, Stumpff F, Deiner C, Rosendahl J, Braun H, Abdoun K, Aschenbach J R, Martens H (2014): Modulation of sheep ruminal urea transport by ammonia and pH. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307:R558-570. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00107.2014>
- Ma Y L, Cain R L, Halladay D L, Yang X, Zeng Q, Miles R R, Chandrasekhar S, Martin T J, Onyia J E (2001): Catabolic effects of continuous human PTH (1--38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology.* 142:4047-4054. <https://doi.org/10.1210/endo.142.9.8356>
- Macpherson L J, Hwang S W, Miyamoto T, Dubin A E, Patapoutian A, Story G M (2006): More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol. Cell. Neurosci.* 32:335-343. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.05.005>
- Maeda H, Yamada S, Itoh H, Hori Y (2012): A dual catalyst system provides the shortest pathway for L-menthol synthesis. *Chem. Commun. (Camb).* 48:1772-1774. <https://doi.org/10.1039/c2cc16548a>
- Mann S, Leal Yepes F A, Overton T R, Lock A L, Lamb S V, Wakshlag J J, Nydam D V (2016): Effect of dry period dietary energy level in dairy cattle on volume, concentrations of immunoglobulin G, insulin, and fatty acid composition of colostrum. *J. Dairy Sci.* 99:1515-1526. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9926>
- Markov A G, Aschenbach J R, Amasheh S (2015): Claudin clusters as determinants of epithelial barrier function. *IUBMB Life.* 67:29-35. <https://doi.org/10.1002/iub.1347>

- Martens H. (2015): Entwicklung der Vormägen. In: Physiologie der Haustiere. 5. Auflage. 387-402. Enke Verlag. Stuttgart. 347-348. ISBN - 9783830412687
- Martens H, Gabel G, Strozyk B (1991): Mechanism of electrically silent Na and Cl transport across the rumen epithelium of sheep. *Exp. Physiol.* 76:103-114.
- Martens H, Leonhard-Marek S, Rontgen M, Stumpff F (2018): Magnesium homeostasis in cattle: absorption and excretion. *Nutr. Res. Rev.* 31:114-130. <https://doi.org/10.1017/S0954422417000257>
- Martin-Tereso J, Martens H (2014): Calcium and magnesium physiology and nutrition in relation to the prevention of milk fever and tetany (dietary management of macrominerals in preventing disease). *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 30:643-670. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.07.007>
- Martinez N, Risco C A, Lima F S, Bisinotto R S, Greco L F, Ribeiro E S, Maunsell F, Galvao K, Santos J E (2012): Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J. Dairy Sci.* 95:7158-7172. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5812>
- Martinez N, Sinedino L D, Bisinotto R S, Ribeiro E S, Gomes G C, Lima F S, Greco L F, Risco C A, Galvao K N, Taylor-Rodriguez D, Driver J P, Thatcher W W, Santos J E (2014): Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97:874-887. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7408>
- Masereeuw R, Moons M M, Toomey B H, Russel F G, Miller D S (1999): Active lucifer yellow secretion in renal proximal tubule: evidence for organic anion transport system crossover. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289:1104-1111.
- Masereeuw R, Russel F G, Miller D S (1996): Multiple pathways of organic anion secretion in renal proximal tubule revealed by confocal microscopy. *Am. J. Physiol.* 271:F1173-1182. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1996.271.6.F1173>
- Mathela C S, Singh K K, Gupta V K (2010): Synthesis and in vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol derivatives. *Acta Pol. Pharm.* 67:375-380. PMID: 20635533
- McArt J A, Oetzel G R (2015): A stochastic estimate of the economic impact of oral calcium supplementation in postparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:7408-7418. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9479>

- McKemy D D, Neuhausser W M, Julius D (2002): Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*. 416:52-58. <https://doi.org/10.1038/nature719>
- McNeil E, Capaldo C T, Macara I G (2006): Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Mol. Biol. Cell*. 17:1922-1932. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-07-0650>
- Meissner S, Hagen F, Deiner C, Gunzel D, Greco G, Shen Z, Aschenbach J R (2017): Key role of short-chain fatty acids in epithelial barrier failure during ruminal acidosis. *J. Dairy Sci*. 100:6662-6675. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12262>
- Mimica-Dukić N, Božin B, Soković M, Mihajlović B, Matavulj M (2003): Antimicrobial and antioxidant activities of three mentha species essential oils. *Planta Med*. 69:413-419. <https://doi.org/10.1055/s-2003-39704>
- Mirzaei-Alamouti H, Moradi S, Shahalizadeh Z, Razavian M, Amanlou H, Harkinezhad T, Jafari-Anarkooli I, Deiner C, Aschenbach J R (2016): Both monensin and plant extract alter ruminal fermentation in sheep but only monensin affects the expression of genes involved in acid-base transport of the ruminal epithelium. *Anim. Feed Sci. Technol*. 219:132-143. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.06.009>
- Montell C (2011): The history of TRP channels, a commentary and reflection. *Pflug. Arch. Eur. J. Phy*. 461:499-506. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0920-3>
- Montell C, Rubin G M (1989): Molecular characterization of the drosophila trp locus - a putative integral membrane-protein required for phototransduction. *Neuron*. 2:1313-1323. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90069-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90069-X)
- Moore S J, VandeHaar M J, Sharma B K, Pilbeam T E, Beede D K, Bucholtz H F, Liesman J S, Horst R L, Goff J P (2000): Effects of altering dietary cation-anion difference on calcium and energy metabolism in peripartum cows. *J. Dairy Sci*. 83:2095-2104. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75091-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75091-0)
- Moran M M (2018): TRP channels as potential drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 58:309-330. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052832>
- Mukaiyama M, Usui T, Nagumo Y (2020): Non-electrophilic TRPA1 agonists, menthol, carvacrol and clotrimazole, open epithelial tight junctions via TRPA1 activation. *J. Biochem*. 168:407-415. <https://doi.org/10.1093/jb/mvaa057>

- Murray R K, Granner D K, Mayes P A, Rodwell V W (2014): Metabolism of proteins & amino acids. In: Harper's illustrated biochemistry. 31st Edition. 701-799. Macgraw Hill Book Co. New York. ISBN - 1259837939
- Mustafa S, Oriowo M (2005): Cooling-induced contraction of the rat gastric fundus: mediation via transient receptor potential (TRP) cation channel TRPM8 receptor and Rho-kinase activation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 32:832-838. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2005.04273.x>
- Na T, Peng J B (2014): TRPV5: a Ca²⁺ channel for the fine-tuning of Ca²⁺ reabsorption. *Handb. Exp. Pharmacol.* 222:321-357. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_13
- Namer B, Seifert F, Handwerker H O, Maihofner C (2005): TRPA1 and TRPM8 activation in humans: effects of cinnamaldehyde and menthol. *Neuroreport.* 16:955-959. <https://doi.org/10.1097/00001756-200506210-00015>
- National Research Council. (2007): Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. The National Academies Press. Washington, DC. <https://doi.org/10.17226/11654>
- Nealen M L, Gold M S, Thut P D, Caterina M J (2003): TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat. *J. Neurophysiol.* 90:515-520. <https://doi.org/10.1152/jn.00843.2002>
- Negoi A, Wuttke S, Kemnitz E, Macovei D, Parvulescu V I, Teodorescu C M, Coman S M (2010): One-pot synthesis of menthol catalyzed by a highly diastereoselective Au/MgF₂ catalyst. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 49:8134-8138. <https://doi.org/10.1002/anie.201002090>
- Nelson M R, Thulin E, Fagan P A, Forsen S, Chazin W J (2002): The EF-hand domain: a globally cooperative structural unit. *Protein Sci.* 11:198-205. <https://doi.org/10.1110/ps.33302>
- Nemeth M V, Wilkens M R, Liesegang A (2017): Vitamin D status in growing dairy goats and sheep: Influence of ultraviolet B radiation on bone metabolism and calcium homeostasis. *J. Dairy Sci.* 100:8072-8086. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13061>
- Neves R C, Leno B M, Bach K D, McArt J A A (2018): Epidemiology of subclinical hypocalcemia in early-lactation Holstein dairy cows: The temporal associations of plasma calcium concentration in the first 4 days in milk with disease and milk production. *J. Dairy Sci.* 101:9321-9331. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14587>

- Nijenhuis T, Hoenderop J G, Bindels R J (2005): TRPV5 and TRPV6 in Ca²⁺ (re)absorption: regulating Ca²⁺ entry at the gate. *Pflügers Arch.* 451:181-192. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1430-6>
- Nilius B, Szallasi A (2014): Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol. Rev.* 66:676-814. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008268>
- Nordin B E C (1976): Calcium Phosphate and Magnesium Metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 35:163.
- Nozawa K, Kawabata-Shoda E, Doihara H, Kojima R, Okada H, Mochizuki S, Sano Y, Inamura K, Matsushime H, Koizumi T, Yokoyama T, Ito H (2009): TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 106:3408-3413. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805323106>
- Oetzel G R (1988): Parturient paresis and hypocalcemia in ruminant livestock. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 4:351-364. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)31053-7](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)31053-7)
- Oetzel G R (1996): Effect of calcium chloride gel treatment in dairy cows on incidence of periparturient diseases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209:958-961.
- Oetzel G R (2011): Non-Infectious Diseases: Milk Fever. *Diseases of Dairy Animals*. Elsevier Ltd. Abgerufen am 09.10.2020 um 13.15 Uhr, von https://www.academia.edu/11909930/Non_Infectious_Diseases_Milk_Fever.
- Ornaghi M G, Passetti R A C, Torrecilhas J A, Mottin C, Vital A C P, Guerrero A, Sanudo C, Campo M D, Prado I N (2017): Essential oils in the diet of young bulls: Effect on animal performance, digestibility, temperament, feeding behaviour and carcass characteristics. *Anim. Feed Sci. Technol.* 234:274-283. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.10.008>
- Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B (2006): Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* 68:685-717. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.101406>
- Pasternak J A, Kent-Dennis C, Van Kessel A G, Wilson H L (2015): Claudin-4 undergoes age-dependent change in cellular localization on pig jejunal villous epithelial cells, independent of bacterial colonization. *Mediators Inflamm.* 2015:263629. <https://doi.org/10.1155/2015/263629>

- Patra A K, Amasheh S, Aschenbach J R (2018): Modulation of gastrointestinal barrier and nutrient transport function in farm animals by natural plant bioactive compounds - A comprehensive review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*:1-30. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1486284>
- Patra A K, Geiger S, Braun H S, Aschenbach J R (2019a): Dietary supplementation of menthol-rich bioactive lipid compounds alters circadian eating behaviour of sheep. *BMC Vet. Res.* 15:352. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2109-0>
- Patra A K, Park T, Braun H S, Geiger S, Pieper R, Yu Z, Aschenbach J R (2019b): Dietary bioactive lipid compounds rich in menthol alter interactions among members of ruminal microbiota in sheep. *Front. Microbiol.* 10:2038. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02038>
- Patra A K, Yu Z (2012): Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:4271-4280. <https://doi.org/10.1128/AEM.00309-12>
- Paulrud C O (2005): Basic concepts of the bovine teat canal. *Vet. Res. Commun.* 29:215-245. <https://doi.org/10.1023/b:verc.0000047496.47571.41>
- Peacock M (2010): Calcium metabolism in health and disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 5 Suppl. 1:S23-30. <https://doi.org/10.2215/CJN.05910809>
- Pedersen S F, Owsianik G, Nilius B (2005): TRP channels: an overview. *Cell Calcium.* 38:233-252. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.028>
- Peier A M, Moqrich A, Hergarden A C, Reeve A J, Andersson D A, Story G M, Earley T J, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2002): A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell.* 108:705-715. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00652-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00652-9)
- Peng J B, Chen X Z, Berger U V, Vassilev P M, Tsukaguchi H, Brown E M, Hediger M A (1999): Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J. Biol. Chem.* 274:22739-22746.
- Peng J B, Suzuki Y, Gyimesi G, Hediger M A (2018): TRPV5 and TRPV6 calcium-selective channels. In: *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells.* 241-274. CRC Press/Taylor & Francis. Boca Raton. USA. ISBN - 9781498752725

- Penner G B, Aschenbach J R, Wood K, Walpole M E, Kanafany-Guzman R, Hendrick S, Campbell J (2014): Characterising barrier function among regions of the gastrointestinal tract in Holstein steers. *Anim. Prod. Sci.* 54:1282-1287. <https://doi.org/10.1071/AN14285>
- Penuelas A, Tashima K, Tsuchiya S, Matsumoto K, Nakamura T, Horie S, Yano S (2007): Contractile effect of TRPA1 receptor agonists in the isolated mouse intestine. *Eur. J. Pharmacol.* 576:143-150. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.08.015>
- Pichersky E, Noel J P, Dudareva N (2006): Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science*. 311:808-811. <https://doi.org/10.1126/science.1118510>
- Potter F H (1890): The usage of menthol in diseases of the upper air-passages. *J. Am. Med. Assoc.* 14(5):147-149. <https://doi.org/10.1001/jama.1890.02410050003001a>
- Probo M, Pascottini O B, LeBlanc S, Opsomer G, Hostens M (2018): Association between metabolic diseases and the culling risk of high-yielding dairy cows in a transition management facility using survival and decision tree analysis. *J. Dairy Sci.* 101:9419-9429. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14422>
- Purhonen A K, Louhivuori L M, Kiehne K, Kerman K E, Herzig K H (2008): TRPA1 channel activation induces cholecystokinin release via extracellular calcium. *FEBS Lett.* 582:229-232. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.12.005>
- Purser D B, Moir R J (1966): Rumen volume as a factor involved in individual sheep differences. *J. Anim. Sci.* 25:509-515. <https://doi.org/10.2527/jas1966.252509x>
- Qu Y, Wang G, Sun X, Wang K (2019): Inhibition of the warm temperature-activated Ca²⁺ permeable transient receptor potential vanilloid TRPV3 channel attenuates atopic dermatitis. *Mol. Pharmacol.* 96:393-400. <https://doi.org/10.1124/mol.119.116962>
- Rabbani I, Braun H S, Akhtar T, Liebe F, Rosendahl J, Grunau M, Tietjen U, Masood S, Kaessmeyer S, Gunzel D, Rehman H, Stumpff F (2018): A comparative study of ammonia transport across ruminal epithelia from *Bos indicus* crossbreds versus *Bos taurus*. *Anim. Sci. J.* 89:1692-1700. <https://doi.org/10.1111/asj.13107>
- Rabbani I, Siegling-Vlitakis C, Noci B, Martens H (2011): Evidence for NHE3-mediated Na transport in sheep and bovine forestomach. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301:R313-319. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00580.2010>

- Radloff J, Zakrzewski S S, Pieper R, Markov A G, Amasheh S (2017): Porcine milk induces a strengthening of barrier function in porcine jejunal epithelium in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1397:110-118. <https://doi.org/10.1111/nyas.13340>
- Ramachandran R, Hyun E, Zhao L N, Lapointe T K, Chapman K, Hirota C L, Ghosh S, McKemy D D, Vergnolle N, Beck P L, Altier C, Hollenberg M D (2013): TRPM8 activation attenuates inflammatory responses in mouse models of colitis. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 110:7476-7481. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217431110>
- Ramasamy I (2006): Recent advances in physiological calcium homeostasis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 44:237-273. <https://doi.org/10.1515/Cclm.2006.046>
- Reinhardt T A, Horst R L, Goff J P (1988): Calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis in ruminants. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 4:331-350. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)31052-5](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)31052-5)
- Reinhardt T A, Lippolis J D, McCluskey B J, Goff J P, Horst R L (2011): Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Vet. J.* 188:122-124. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.025>
- Reynolds C K, Durst B, Lupoli B, Humphries D J, Beever D E (2004): Visceral tissue mass and rumen volume in dairy cows during the transition from late gestation to early lactation. *J. Dairy Sci.* 87:961-971. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73240-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73240-3)
- Rivaroli D C, Guerrero A, Velandia Valero M, Zawadzki F, Eiras C E, Campo M D M, Sanudo C, Mendes Jorge A, Nunes do Prado I (2016): Effect of essential oils on meat and fat qualities of crossbred young bulls finished in feedlots. *Meat Sci.* 121:278-284. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.06.017>
- Roberts T, Chapinal N, Leblanc S J, Kelton D F, Dubuc J, Duffield T F (2012): Metabolic parameters in transition cows as indicators for early-lactation culling risk. *J. Dairy Sci.* 95:3057-3063. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4937>
- Robertson W G, Marshall R W (1981): Ionized calcium in body fluids. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 15:85-125. <https://doi.org/10.3109/10408368109105869>
- Roche J R, Berry D P (2006): Periparturient climatic, animal, and management factors influencing the incidence of milk Fever in grazing systems. *J. Dairy Sci.* 89:2775-2783. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72354-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72354-2)

- Rodgers L S, Beam M T, Anderson J M, Fanning A S (2013): Epithelial barrier assembly requires coordinated activity of multiple domains of the tight junction protein ZO-1. *J. Cell Sci.* 126:1565-1575. <https://doi.org/10.1242/jcs.113399>
- Rodríguez A, Rodríguez M, Córdoba J J, Andrade M J (2015): Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *Methods Mol. Biol.* 1275:31-56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3
- Rodriguez E M, Aris A, Bach A (2017): Associations between subclinical hypocalcemia and postparturient diseases in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:7427-7434. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12210>
- Rosasco M G, Gordon S E (2017): TRP channels: What do they look like? In: *Neurobiology of TRP Channels*. CRC Press Taylor & Francis Boca Raton. USA. <https://doi.org/10.4324/9781315152837-1>
- Rosendahl J, Braun H S, Schrapers K T, Martens H, Stumpff F (2016): Evidence for the functional involvement of members of the TRP channel family in the uptake of Na⁺ and NH₄⁺ by the ruminal epithelium. *Pflugers Arch.* 468:1333-1352. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1835-4>
- Rosenthal R, Milatz S, Krug S M, Oelrich B, Schulzke J D, Amasheh S, Gunzel D, Fromm M (2010): Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J. Cell Sci.* 123:1913-1921. <https://doi.org/10.1242/jcs.060665>
- Rossi A E, Dirksen R T (2006): Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. *Muscle Nerve.* 33:715-731. <https://doi.org/10.1002/mus.20512>
- Roy D, Tomar S K, Kumar V (2015): Rumen modulatory effect of thyme, clove and peppermint oils in vitro using buffalo rumen liquor. *Vet. World.* 8:203-207. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.203-207>
- Russell J B, Houlihan A J (2003): Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:65-74. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00019-6](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00019-6)
- Sanchez J M, Cacace V, Kusnier C F, Nelson R, Rubashkin A A, Iserovich P, Fischbarg J (2016): Net fluorescein flux across corneal endothelium strongly suggests fluid transport is due to electro-osmosis. *J. Membr. Biol.* 249:469-473. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9887-0>

- Santafe M M, Lanuza M A, Garcia N, Tomas J (2005): Calcium inflow-dependent protein kinase C activity is involved in the modulation of transmitter release in the neuromuscular junction of the adult rat. *Synapse*. 57:76-84. <https://doi.org/10.1002/syn.20159>
- Santos J E P, Lean I J, Golder H, Block E (2019): Meta-analysis of the effects of prepartum dietary cation-anion difference on performance and health of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 102:2134-2154. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14628>
- Schrapers K T, Sponder G, Liebe F, Liebe H, Stumpff F (2018): The bovine TRPV3 as a pathway for the uptake of Na⁺, Ca²⁺, and NH₄⁺. *PLoS One*. 13:e0193519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193519>
- Schröder B, Breves G (2006): Mechanisms and regulation of calcium absorption from the gastrointestinal tract in pigs and ruminants: comparative aspects with special emphasis on hypocalcemia in dairy cows. *Anim. Health Res. Rev.* 7:31-41. <https://doi.org/10.1017/S1466252307001144>
- Schröder B, Diener M (2015): Grundlagen der Zellphysiologie. In: *Physiologie der Haustiere*. 5. Auflage. 29-31. Enke Verlag. Stuttgart. ISBN - 9783830412687
- Schröder B, Goebel W, Huber K, Breves G (2001): No effect of vitamin D3 treatment on active calcium absorption across ruminal epithelium of sheep. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 48:353-363. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2001.00369.x>
- Schröder B, Rittmann I, Pfeffer E, Breves G (1997): In vitro studies on calcium absorption from the gastrointestinal tract in small ruminants. *J. Comp. Physiol. B.* 167:43-51. <https://doi.org/10.1007/s003600050046>
- Schröder B, Vossing S, Breves G (1999): In vitro studies on active calcium absorption from ovine rumen. *J. Comp. Physiol. B.* 169:487-494. <https://doi.org/10.1007/s003600050246>
- Schröder B, Wilkens M R, Ricken G E, Leonhard-Marek S, Fraser D R, Breves G (2015): Calcium transport in bovine rumen epithelium as affected by luminal Ca concentrations and Ca sources. *Physiol. Rep.* 3:1-7 <https://doi.org/10.14814/phy2.12615>
- Schultz S G (1972): Electrical potential differences and electromotive forces in epithelial tissues. *J. Gen. Physiol.* 59:794-798. <https://doi.org/10.1085/jgp.59.6.794>

- Schultz S G, Zalusky R (1964): Ion transport in isolated rabbit ileum. I. short-circuit current and Na fluxes. *J. Gen. Physiol.* 47:567-584. <https://doi.org/10.1085/jgp.47.3.567>
- Schweigel M, Kolisek M, Nikolic Z, Kuzinski J (2008): Expression and functional activity of the Na/Mg exchanger, TRPM7 and MagT1 are changed to regulate Mg homeostasis and transport in rumen epithelial cells. *Magnes. Res.* 21:118-123.
- Sehested J, Diernaes L, Moller P D, Skadhauge E (1996): Transport of sodium across the isolated bovine rumen epithelium: interaction with short-chain fatty acids, chloride and bicarbonate. *Exp. Physiol.* 81:79-94. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1996.sp003920>
- Seifi H A, LeBlanc S J, Leslie K E, Duffield T F (2011): Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle. *Vet. J.* 188:216-220. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.007>
- Settanni L, Randazzo W, Palazzolo E, Moschetti M, Aleo A, Guarrasi V, Mammina C, San Biagio P L, Marra F P, Moschetti G, Germana M A (2014): Seasonal variations of antimicrobial activity and chemical composition of essential oils extracted from three Citrus limon L. Burm. cultivars. *Nat. Prod. Res.* 28:383-391. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.871544>
- Shappell N W, Herbein J H, Deftos L J, Aiello R J (1987): Effects of dietary calcium and age on parathyroid-hormone, calcitonin and serum and milk minerals in the periparturient dairy-cow. *J. Nutr.* 117:201-207. <https://doi.org/10.1093/jn/117.1.201>
- Shen L, Weber C R, Raleigh D R, Yu D, Turner J R (2011): Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu. Rev. Physiol.* 73:283-309. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142150>
- Sidler-Lauff K, Boos A, Kraenzlin M, Liesegang A (2010): Influence of different calcium supplies and a single vitamin D injection on vitamin D receptor and calbindin D9k immunoreactivities in the gastrointestinal tract of goat kids. *J. Anim. Sci.* 88:3598-3610. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2682>
- Simitzis P, Feggeros K, Bizelis J, Deligeorgis S (2005): Behavioral reaction to essential oils dietary supplementation in sheep. *Biotechnol. Anim. Husb.* 21:97-103. <https://doi.org/10.3923/ijps.2010.401.405>
- Stein R J, Santos S, Nagatomi J, Hayashi Y, Minnery B S, Xavier M, Patel A S, Nelson J B, Futrell W J, Yoshimura N, Chancellor M B, De Miguel F (2004): Cool (TRPM8) and hot

- (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *J. Urol.* 172:1175-1178. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000134880.55119.cf>
- Steven D H, Marshall A B (1969): Organization of the rumen epithelium. *Physiology of digestion and metabolism in the ruminant. Proceeding of the III. international symposium.* Oriel Press Ltd. 80-100. Record Number: 19712202092
- Stevenson B R, Siliciano J D, Mooseker M S, Goodenough D A (1986): Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.* 103:755-766. <https://doi.org/10.1083/jcb.103.3.755>
- Storeheier P V, Sehested J, Diernaes L, Sundset M A, Mathiesen S D (2003): Effects of seasonal changes in food quality and food intake on the transport of sodium and butyrate across ruminal epithelium of reindeer. *J. Comp. Physiol. B.* 173:391-399. <https://doi.org/10.1007/s00360-003-0345-9>
- Story G M, Peier A M, Reeve A J, Eid S R, Mosbacher J, Hricik T R, Earley T J, Hergarden A C, Andersson D A, Hwang S W, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A (2003): ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell.* 112:819-829. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00158-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00158-2)
- Stumpff F, Georgi M I, Mundhenk L, Rabbani I, Fromm M, Martens H, Gunzel D (2011): Sheep rumen and omasum primary cultures and source epithelia: barrier function aligns with expression of tight junction proteins. *J. Exp. Biol.* 214:2871-2882. <https://doi.org/10.1242/jeb.055582>
- Taylor M S, Knowlton K F, McGilliard M L, Seymour W M, Herbein J H (2008): Blood mineral, hormone, and osteocalcin responses of multiparous Jersey cows to an oral dose of 25-hydroxyvitamin D3 or vitamin D3 before parturition. *J. Dairy Sci.* 91:2408-2416. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0750>
- Taylor M S, Knowlton K F, McGilliard M L, Swecker W S, Ferguson J D, Wu Z, Hanigan M D (2009): Dietary calcium has little effect on mineral balance and bone mineral metabolism through twenty weeks of lactation in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 92:223-237. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1345>
- Thews G, Vaupel P. (2005): Epitheliale Transportprozesse. In: *Vegetative Physiologie.* . 5. Auflage. 314-345. Springer Berlin. ISBN - 9783540263135

- Tsuchiya W, Okada Y, Inouye A (1980): Membrane potential measurements in cultured intestinal villi. *Membr. Biochem.* 3:147-153. <https://doi.org/10.3109/09687688009063882>
- Turner J R (2009): Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9:799-809. <https://doi.org/10.1038/nri2653>
- Ueda T, Yamada T, Ugawa S, Ishida Y, Shimada S (2009): TRPV3, a thermosensitive channel is expressed in mouse distal colon epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383:130-134. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.143>
- Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S (2006): ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell.* 126:741-754. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.043>
- Umeda K, Matsui T, Nakayama M, Furuse K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (2004): Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J. Biol. Chem.* 279:44785-44794. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406563200>
- Uppal S K, Wolf K, Khahra S S, Martens H (2003a): Modulation of Na⁺ transport across isolated rumen epithelium by short-chain fatty acids in hay- and concentrate-fed sheep. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 87:380-388. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2003.00448.x>
- Uppal S K, Wolf K, Martens H (2003b): The effect of short chain fatty acids on calcium flux rates across isolated rumen epithelium of hay-fed and concentrate-fed sheep. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 87:12-20. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2003.00401.x>
- Ussing H (1949): The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies. *Acta Physiol. Scand.* 17:1-37. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1949.tb00550.x>
- Ussing H, Zerahn K (1951): Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 23:110-127. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1951.tb00800.x>
- Vakili A R, Khorrami B, Mesgaran M D, Parand E (2013): The effects of thyme and cinnamon essential oils on performance, rumen fermentation and blood metabolites in holstein calves consuming high concentrate diet. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 26:935-944. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12636>

- Valdecabres A, Pires J A A, Silva-Del-Rio N (2018): Effect of prophylactic oral calcium supplementation on postpartum mineral status and markers of energy balance of multiparous Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 101:4460-4472. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12917>
- van Abel M, Hoenderop J G, Bindels R J (2005a): The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: regulation and implications for disease. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 371:295-306. <https://doi.org/10.1007/s00210-005-1021-2>
- van Abel M, Hoenderop J G, van der Kemp A W, Friedlaender M M, van Leeuwen J P, Bindels R J (2005b): Coordinated control of renal Ca^{2+} transport proteins by parathyroid hormone. *Kidney Int.* 68:1708-1721. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00587.x>
- van Abel M, Hoenderop J G, van der Kemp A W, van Leeuwen J P, Bindels R J (2003): Regulation of the epithelial Ca^{2+} channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285:G78-85. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00036.2003>
- Van Bibber-Krueger C L, Miller K A, Aperce C C, Alvarado-Gilis C A, Higgins J J, Drouillard J S (2016): Effects of crystalline menthol on blood metabolites in Holstein steers and in vitro volatile fatty acid and gas production. *J. Anim. Sci.* 94:1170-1178. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-8779>
- van de Graaf S F, Boullart I, Hoenderop J G, Bindels R J (2004): Regulation of the epithelial Ca^{2+} channels TRPV5 and TRPV6 by $1\alpha,25\text{-dihydroxy Vitamin D}_3$ and dietary Ca^{2+} . *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 89-90:303-308. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.03.029>
- van Goor M K C, Hoenderop J G J, van der Wijst J (2017): TRP channels in calcium homeostasis: from hormonal control to structure-function relationship of TRPV5 and TRPV6. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* 1864:883-893. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.11.027>
- Van Itallie C, Rahner C, Anderson J M (2001): Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J. Clin. Invest.* 107:1319-1327. <https://doi.org/10.1172/JCI12464>
- Van Itallie C M, Anderson J M (2004): The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology (Bethesda)*. 19:331-338. <https://doi.org/10.1152/physiol.00027.2004>

- Van Itallie C M, Fanning A S, Bridges A, Anderson J M (2009): ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell.* 20:3930-3940. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-04-0320>
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3:0034.1-0034.11. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Venjakob P L, Borchardt S, Heuwieser W (2017): Hypocalcemia-cow-level prevalence and preventive strategies in german dairy herds. *J. Dairy Sci.* 100:9258-9266. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12494>
- Venjakob P L, Pieper L, Heuwieser W, Borchardt S (2018): Association of postpartum hypocalcemia with early-lactation milk yield, reproductive performance, and culling in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:9396-9405. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14202>
- Vennekens R, Voets T, Bindels R J, Droogmans G, Nilius B (2002): Current understanding of mammalian TRP homologues. *Cell Calcium.* 31:253-264. [https://doi.org/10.1016/s0143-4160\(02\)00055-6](https://doi.org/10.1016/s0143-4160(02)00055-6)
- Vieira-Neto A, Lima I R P, Lopes F, Jr., Lopera C, Zimpel R, Sinedino L D P, Jeong K C, Galvao K, Thatcher W W, Nelson C D, Santos J E P (2017): Use of calcitriol to maintain postpartum blood calcium and improve immune function in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:5805-5823. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12506>
- Vogt-Eisele A K, Weber K, Sherkheli M A, Vielhaber G, Panten J, Gisselmann G, Hatt H (2007): Monoterpenoid agonists of TRPV3. *Br. J. Pharmacol.* 151:530-540. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707245>
- von Engelhardt W. (2015): Verteilung und Regulation des Blutvolumens. In: *Physiologie der Haustiere*. 5. Auflage. 212-213. Enke Verlag. Stuttgart. ISBN - 9783830412687
- Vriens J, Nilius B, Vennekens R (2008): Herbal compounds and toxins modulating TRP channels. *Curr. Neuropharmacol.* 6:79-96. <https://doi.org/10.2174/157015908783769644>
- Wadhwa D R, Care A D (2000): The absorption of calcium ions from the ovine reticulo-rumen. *J. Comp. Physiol. B.* 170:581-588. <https://doi.org/10.1007/s003600000137>

- Walter A, Gutknecht J (1986): Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer membranes. *J. Membr. Biol.* 90:207-217. <https://doi.org/10.1007/BF01870127>
- Wang Y Y, Chang R B, Waters H N, Mckemy D D, Liman E R (2008): The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions. *J. Biol. Chem.* 283:32691-32703. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803568200>
- Wasserman R H, Fullmer C S (1995): Vitamin D and intestinal calcium transport: facts, speculations and hypotheses. *J. Nutr.* 125:1971S-1979S. https://doi.org/10.1093/jn/125.suppl_7.1971S
- Waters (2007): UPLC amino acid analysis application solution system guide revision: Instruction manual. Waters Corporation. Milford, USA. Abgerufen am 01.08.2020 um 7.00Uhr auf <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500082502rc.pdf>
- Weiss W P, Azem E, Steinberg W, Reinhardt T A (2015): Effect of feeding 25-hydroxyvitamin D3 with a negative cation-anion difference diet on calcium and vitamin D status of periparturient cows and their calves. *J. Dairy Sci.* 98:5588-5600. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9188>
- Wierup M (2001): The Swedish experience of the 1986 year ban of antimicrobial growth promoters, with special reference to animal health, disease prevention, productivity, and usage of antimicrobials. *Microb. Drug Resist.* 7:183-190. <https://doi.org/10.1089/10766290152045066>
- Wilkens M R, Kunert-Keil C, Brinkmeier H, Schröder B (2009): Expression of calcium channel TRPV6 in ovine epithelial tissue. *Vet. J.* 182:294-300. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.06.020>
- Wilkens M R, Liesegang A, Richter J, Fraser D R, Breves G, Schröder B (2014): Differences in peripartal plasma parameters related to calcium homeostasis of dairy sheep and goats in comparison with cows. *J. Dairy Res.* 81:325-332. <https://doi.org/10.1017/S002202991400020X>
- Wilkens M R, Mrochen N, Breves G, Schröder B (2010): Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on calcium and phosphorus homeostasis in sheep fed diets either adequate or restricted in calcium content. *Domest. Anim. Endocrinol.* 38:190-199. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2009.10.003>
- Wilkens M R (2011): Gastrointestinal calcium absorption in sheep is mostly insensitive to an alimentary induced challenge of calcium homeostasis. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 158:199-207. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.11.008>

- Wilkens M R, Muscher-Banse A S (2020): Review: Regulation of gastrointestinal and renal transport of calcium and phosphorus in ruminants. *Animal*. 14:S29-S43. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003197>
- Wilkens M R, Nelson C D, Hernandez L L, McArt J A A (2020): Symposium review: Transition cow calcium homeostasis-Health effects of hypocalcemia and strategies for prevention. *J. Dairy Sci.* 103:2909-2927. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17268>
- Wilkens M R, Oberheide I, Schröder B, Azem E, Steinberg W, Breves G (2012a): Influence of the combination of 25-hydroxyvitamin D3 and a diet negative in cation-anion difference on peripartal calcium homeostasis of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:151-164. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4342>
- Wilkens M R, Praechter C, Breves G, Schröder B (2016): Stimulating effects of a diet negative in dietary cation-anion difference on calcium absorption from the rumen in sheep. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr (Berl)*. 100:156-166. <https://doi.org/10.1111/jpn.12296>
- Wilkens M R, Richter J, Fraser D R, Liesegang A, Breves G, Schröder B (2012b): In contrast to sheep, goats adapt to dietary calcium restriction by increasing intestinal absorption of calcium. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 163:396-406. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.06.011>
- Wong V, Gumbiner B M (1997): A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J. Cell Biol.* 136:399-409. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.2.399>
- Woolhouse M, Ward M, van Bunnik B, Farrar J (2015): Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 370:20140083. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0083>
- Xiao B, Dubin A E, Bursulaya B, Viswanath V, Jegla T J, Patapoutian A (2008): Identification of transmembrane domain 5 as a critical molecular determinant of menthol sensitivity in mammalian TRPA1 channels. *J. Neurosci.* 28:9640-9651. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2772-08.2008>
- Xu H X, Ramsey I S, Kotecha S A, Moran M M, Chong J H A, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano P S, Curtis R, Clapham D E (2002): TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature*. 418:181-186. <https://doi.org/10.1038/nature00882>

- Yamagishi N, Miyazaki M, Naito Y (2006): The expression of genes for transepithelial calcium-transporting proteins in the bovine duodenum. *Vet. J.* 171:363-366. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.10.021>
- Yamagishi N, Yukawa Y A, Ishiguro N, Soeta S, Lee I H, Oboshi K, Yamada H (2002): Expression of calbindin-D9k messenger ribonucleic acid in the gastrointestinal tract of dairy cattle. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 49:461-465. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2002.00483.x>
- Yang B, Du S, Lu Y, Jia S, Zhao M, Bai J, Li P, Wu H (2018): Influence of paeoniflorin and menthol on puerarin transport across MDCK and MDCK-MDR1 cells as blood-brain barrier in vitro model. *J. Pharm. Pharmacol.* 70:349-360. <https://doi.org/10.1111/jphp.12853>
- Yang J, Li Y, Zuo X, Zhen Y, Yu Y, Gao L (2008): Transient receptor potential ankyrin-1 participates in visceral hyperalgesia following experimental colitis. *Neurosci. Lett.* 440:237-241. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.05.093>
- Yang W, Shen Z, Martens H (2012): An energy-rich diet enhances expression of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 and 3 messenger RNA in rumen epithelium of goat. *J. Anim. Sci.* 90:307-317. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-3854>
- Yeh B I, Sun T J, Lee J Z, Chen H H, Huang C L (2003): Mechanism and molecular determinant for regulation of rabbit transient receptor potential type 5 (TRPV5) channel by extracellular pH. *J. Biol. Chem.* 278:51044-51052. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306326200>
- Yin Y, Wu M, Zubcevic L, Borschel W F, Lander G C, Lee S Y (2018): Structure of the cold- and menthol-sensing ion channel TRPM8. *Science.* 359:237-241. <https://doi.org/10.1126/science.aan4325>
- Yu Q, Wang Z, Li P, Yang Q (2013): The effect of various absorption enhancers on tight junction in the human intestinal Caco-2 cell line. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 39:587-592. <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.692376>
- Yu X, Yu M, Liu Y, Yu S (2016): TRP channel functions in the gastrointestinal tract. *Semin. Immunopathol.* 38:385-396. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0528-y>
- Zanker V, Peter W (1958): Die prototropen Formen des Fluoresceins. *Chemische Berichte.* 91:572-580. <https://doi.org/10.1002/cber.19580910316>

- Zhang K, Meng M, Gao L, Tu Y, Bai Y (2019): Rumen-derived lipopolysaccharide induced ruminal epithelium barrier damage in goats fed a high-concentrate diet. *Microb. Pathog.* 131:81-86. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.007>
- Zhang L, Du S Y, Lu Y, Liu C, Tian Z H, Yang C, Wu H C, Wang Z (2016): Puerarin transport across a Calu-3 cell monolayer - an in vitro model of nasal mucosa permeability and the influence of paeoniflorin and menthol. *Drug. Des. Devel. Ther.* 10:2227-2237. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S110247>
- Zhang L, Du S Y, Lu Y, Liu C, Wu H C, Tian Z H, Wang M, Yang C (2017): Puerarin transport across rat nasal epithelial cells and the influence of compatibility with peoniflorin and menthol. *Drug. Des. Devel. Ther.* 11:2581-2593. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S143029>
- Zhang L, Jones S, Brody K, Costa M, Brookes S J (2004): Thermosensitive transient receptor potential channels in vagal afferent neurons of the mouse. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286:G983-991. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00441.2003>
- Zhu Z, Mao S, Zhu W (2012): Effects of ruminal infusion of garlic oil on fermentation dynamics, Fatty Acid profile and abundance of bacteria involved in biohydrogenation in rumen of goats. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 25:962-970. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11442>

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

GEIGER, S., A.K. PATRA, K.T. SCHRAPERS, H.-S. BRAUN & J.R. ASCHENBACH (2020): Menthol stimulates calcium absorption in the rumen but not in the jejunum of sheep. *Journal of Dairy Science*. 104:3067. DOI: 10.3168/jds.2020-19372

PATRA, A.K., S. GEIGER, H.-S. BRAUN & J.R. ASCHENBACH (2019): Dietary supplementation of menthol-rich bioactive lipid compounds alters circadian eating behaviour of sheep. *BMC Veterinary Research*. 15:352. DOI: 10.1186/s12917-019-2109-0

PATRA, A.K., S. GEIGER, K.T. SCHRAPERS, H.-S. BRAUN, H. GEHLEN, A. STARKE, R. PIEPER, A. CIESLAK, M. SZUMACHER-STRABEL & J.R. ASCHENBACH (2019): Effects of dietary menthol-rich bioactive lipid compounds on zootechnical traits, blood variables and gastrointestinal function in growing sheep. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 10:86. DOI: 10.1186/s40104-019-0398-6

PATRA, A.K., T. PARK, H.-S. BRAUN, S. GEIGER, R. PIEPER, Z. YU & J.R. ASCHENBACH (2019): Dietary bioactive lipid compounds rich in menthol alter interaction among members of ruminal microbiota in sheep. *Frontiers in Microbiology*. 10:2038. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02038

Abstracts

GEIGER, S., A.K. PATRA, K.T. SCHRAPERS & J.R. ASCHENBACH (2021): Influence of supplementing menthol-rich plant bioactive lipid compounds on the epithelial barrier in ruminal and jejunal epithelia of sheep. 75. Tagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE 2021), 16-18 März 2021 Göttingen, Germany. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology* 30:107

GEIGER, S., A.K. PATRA, K.T. SCHRAPERS, H.-S. BRAUN & J.R. ASCHENBACH (2021): Effects of menthol on epithelial calcium channel expression and functional calcium absorption in the gastrointestinal tract of sheep. 75. Tagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE 2021), 16-18 März 2021 Göttingen, Germany. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology* 30:106

GEIGER, S., A.K. PATRA, K.T. SCHRAPERS & J.R. ASCHENBACH (2020): Influence of luminal sodium availability and menthol prefeeding on ruminal calcium transport in growing sheep. 74. Tagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE 2020), 3-5 März 2020 Göttingen, Germany. Proceedings of the Society of Nutrition Physiology 29:67.

SCHULTE, J.N., H.-S. BRAUN, S. GEIGER, A.K. PATRA & J.R. ASCHENBACH (2020): A menthol-containing feed additive induces transcriptomic changes in sheep ruminal epithelium. Proceedings, XIIIth International Symposium on Ruminant Physiology (ISRP 2019), 3-6 September 2019 Leipzig, Germany: 22:527.

SCHULTE, J.N., A.K. PATRA, T. PARK, S. GEIGER, Z. YU, K.T. SCHRAPERS & J.R. ASCHENBACH (2020): First insight into the mode of action of menthol regulating the transcriptome of ruminal epithelium and modulating the rumen microbiota of sheep. 74. Tagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE 2020), 3-5 März 2020 Göttingen, Germany. Proceedings of the Society of Nutrition Physiology 29:147

GEIGER, S., A.K. PATRA, K.T. SCHRAPERS & J.R. ASCHENBACH (2019): Ruminal and intestinal calcium absorption in growing sheep: acute and long-term effects of a menthol-containing feed additive. Proceedings, XIIIth International Symposium on Ruminant Physiology (ISRP 2019), 3-6 September 2019 Leipzig, Germany: 22:389.

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Univ-Prof. Dr. Jörg R. Aschenbach für die Überlassung des Themas und die gesamte wissenschaftliche Betreuung. Ohne seine ständige Hilfsbereitschaft und konstruktive Kritik wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Auch für sein Engagement bei der finanziellen Absicherung des Dissertationsprojektes und dem entgegengebrachten Vertrauen möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Ein großes Dankeschön geht auch an Dr. Katharina T. Schrapers für die Unterstützung bei der Einarbeitung der Versuchskonzeptionen sowie fachliche Betreuung bei der Datenauswertung und Interpretation.

Mein Dank geht auch an Amlan K. Patra, PhD für die stets hervorragende Zusammenarbeit bei der Organisation, Versuchsdurchführung und der Datenauswertung.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei Katharina Söllig für die Einarbeitung im Labor bedanken. Sie war stets für fachliche und private Belange ansprechbar und eine große Stütze während der molekularbiologischen Arbeiten.

Vielen Dank an das Stallpersonal in der Koserstrasse für die Unterstützung während der Fütterungsperiode.

Bei Jasper N. Schulte bedanke ich mich für die Hilfe und Mitarbeit im Labor während der gesamten Arbeit. Er hat mich rund um die Uhr unterstützt und mir die molekularbiologischen Feinheiten beigebracht und war Ansprechpartner für jegliche Angelegenheiten.

Bei Dr. Hannah S. Braun möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit während des Fütterungsversuches und die Einarbeitung in molekularbiologische Methodiken bedanken.

Bei Martin Grunau bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der Ussing-Kammer-Versuche.

Bei Frau PD Dr. Friederike Stumpff bedanke ich mich für die Denkanstöße aus zahlreichen angeregten Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Dietmar und Sabine. Ihr habt mir meinen Lebensweg geebnet und das Tiermedizinstudium in Berlin und Paris ermöglicht. Nur durch eure Unterstützung stehe ich jetzt an diesem Punkt, ohne euch wäre alles nicht möglich gewesen. Danke für euer grenzenloses Vertrauen und die noch größere Geduld!

Finanzierungsquellen

Die Arbeiten wurde finanziell unterstützt durch das Elsa-Neumann-Stipendium des Landes Berlin, die Alexander von Humboldt-Stiftung und die PerformaNat GmbH. Es besteht kein Interessenskonflikt durch die finanzielle Unterstützung der Arbeiten.

Selbstständigkeitserklärung

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 05.10.2021

Sebastian Dietmar Geiger



9 783967 291377
mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-137-7