

# LITERATURÜBERSICHT

---

## 2.1 PHYSIOLOGIE DER CALCIUMHOMÖOSTASE

Für höheres Leben ist das Mengenelement Calcium essentiell. In seiner ionisierten Form ist Calcium Bestandteil von vielen lebenswichtigen physiologischen Prozessen. So spielen Calciumionen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung, Enzymaktivitäten, der Nervenerregbarkeit, der Muskelkontraktion, der Hormonfreisetzung und der Membranpermeabilität.

Aufgrund dieser multiplen Funktionen ist es für den Organismus wichtig, die Calciumkonzentration im Blut in engen Grenzen konstant zu halten. Eine Dysbalance im Blutcalciumgehalt, wie z.B. ein zu starker Abfall der Calciumionenkonzentration, stellt einen lebensbedrohlichen Zustand dar. Durch entsprechende Mobilisierung von körpereigenem Calcium bzw. durch eine erhöhte Calciumabsorption aus der Nahrung kann dies verhindert werden.

An der Aufrechterhaltung eines konstanten Blutcalciumspiegels sind vier Organe (Magen-Darmtrakt, Niere, Knochen und Nebenschilddrüse) beteiligt, deren Zusammenspiel von drei Hormonen (Parathormon, Vitamin-D-Hormon und Calcitonin) synchronisiert werden.

Im folgenden Abschnitt wird zunächst dargestellt, welche Wirkung Vitamin D und dessen Metabolite auf die klassischen Zielorgane haben und wie dadurch die Calciumhomöostase, insbesondere beim Wiederkäuer, beeinflusst werden kann.

### 2.1.1 Stoffwechsel von Vitamin D

Die D-Vitamine (Calciferole, antirachitische Faktoren) gehören zu der Gruppe der fettlöslichen Vitamine.

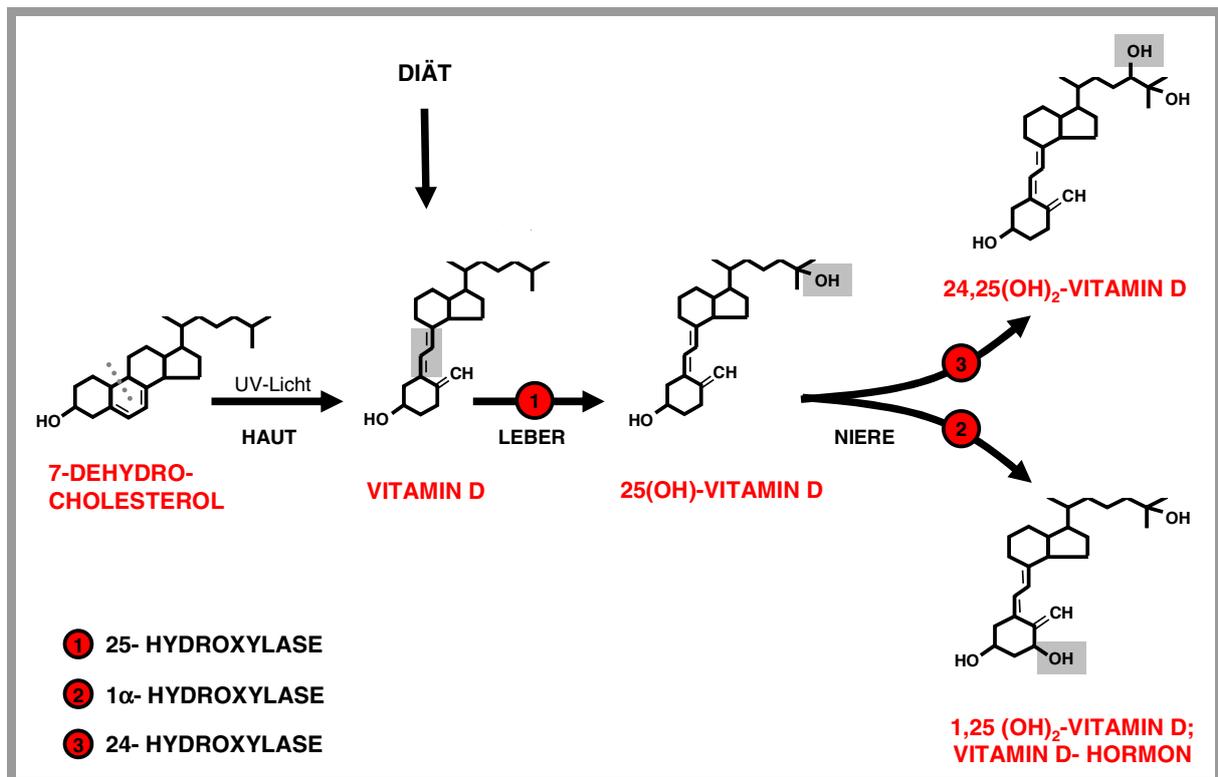
*Vorkommen:* Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol) und seine Vorstufe Ergosterol kommen vor allem in pflanzlicher Nahrung und Mikroorganismen vor. Tierische Produkte enthalten Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) und seine Vorstufe 7-Dehydrocholesterol. Vitamin D<sub>2</sub> und D<sub>3</sub> sind beim Säugetier, im Gegensatz zum Vogel, in ihrer Leistungsfähigkeit identisch (Bachmann u. Kormann, 1996). Im Folgenden steht deshalb Vitamin D stellvertretend für beide Formen. Das lipophile Vitamin wird im Dünndarm mit Hilfe von Gallensäuren absorbiert.

*Synthese:* Neben dieser direkten intestinalen Vitamin-D-Absorption kann das Vitamin auch in der Haut mit Hilfe von UV-Strahlung endogen synthetisiert werden (Neer, 1975). Als Substrate für diese Biosynthese dienen die entsprechenden aufgenommenen Vorstufen oder Cholesterin, das zuvor in der Leber zu 7-Dehydrocholesterin umgewandelt wurde. In einem ersten Schritt wird der B-Ring des Sterangerüsts der Substrate durch die Wechselwirkung mit Photonen aufgespalten und Prävitamin D entsteht (Photoisomerisierung). Anschließend entsteht Vitamin D durch eine rein thermische Umwandlung (Thermoisomerisierung). Diese Reaktionen finden in den basalen Zellen der Epidermis bei einer effektiven Wellenlänge von 290 bis 315 nm statt (Holick, 1981). Die Bezeichnung „Vitamin“ D ist demzufolge nach heutigem Wissen unkorrekt, da der Körper es selbst synthetisieren kann – dies gilt aber nur bei ausreichender UV-B-Exposition (Hollis, 2005).

*Transport:* Vitamin D aus Haut oder Nahrung wird an das Blut abgegeben und dort an DBP (Vitamin D bindendes Protein) oder Albumin reversibel gebunden (Haddad *et al.*, 1993). Das so im Plasma gebundene Vitamin stellt beim Säugetier neben der Einlagerung im Fettgewebe eine wesentliche Speicherungsform von Vitamin D dar (Frank *et al.*, 1977).

*Metabolismus:* Vitamin D selbst ist inert und muss zwei Hydroxylierungsschritte durchlaufen, bevor es biologisch wirksam werden kann (**Abb. 1**).

Der erste Metabolisierungsschritt findet in der Leber statt. Hier katalysiert nach neusten Erkenntnissen nicht nur ein mitochondrielles, sondern auch ein mikrosomales Cytochrom P-450-Enzym die Hydroxylierung an der C<sub>25</sub>-Position zu 25(OH)D<sub>3</sub> (Calcidiol, 25-Hydroxycholecalciferol) (Cheng *et al.*, 2003; DeLuca, 2004). Diese Reaktion ist allein von der Substratmenge abhängig und unterliegt keiner bekannten Regulation durch den Organismus (Brown *et al.*, 1999).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des Stoffwechsels sowie der Strukturen von Vitamin D und dessen Metaboliten

Bei der zweiten Metabolisierungsstufe wird eine Hydroxylgruppe am C<sub>1</sub>-Atom eingebaut. Das entstandene 1,25(OH)<sub>2</sub>D (Vitamin-D-Hormon, Calcitriol, 1,25-Dihydroxycholecalciferol) ist die biologisch aktive Form des Vitamin-D-Hormon-Systems. Die Reaktion ist in den Nieren lokalisiert und findet mit Hilfe des Enzyms 1α-Hydroxylase statt (siehe 2.1.2). Die Aktivität der 1α-Hydroxylase wird streng reguliert (Dusso *et al.*, 2005). Fehlen die stimulierenden Signale, kommt es zur Inaktivierung der Vitamin D-Metabolite durch die Hydroxylierung an der C<sub>24</sub>-Position (DeLuca, 2004). Es sind zahlreiche weitere Metabolite von Vitamin D identifiziert, die

durch die Oxidation in der Seitenkette entstehen (z.B. Oxidation an der C<sub>23</sub>- und/oder C<sub>26</sub>- Position). Diese Metabolite haben keine bekannte biologische Funktion und man nimmt an, dass sie von kataboler Natur sind (Horst *et al.*, 2003).

*Wirkungsmechanismus:* Die biologischen Effekte von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> beruhen hauptsächlich auf der Beeinflussung der Gentranskription via Vitamin-D-Rezeptor (VDR). Durch seinen lipophilen Charakter kann das Vitamin-D-Hormon wie alle Steroidhormone durch die Zellmembran diffundieren und sich direkt an den nukleären Rezeptor binden. Der Vitamin D-Rezeptor hat eine hohe Affinität zu 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (**Tab. 1**) und liegt als Heterodimer mit einem Retinoidrezeptor vor.

Vitamin D-Metabolit	Relative Bindung zum	
	VDP	VDR
<b>D<sub>3</sub> (Cholecalciferol)</b>	<0,033	1 x 10 <sup>-4</sup>
<b>D<sub>2</sub> (Ergocalciferol)</b>	0,025	-
<b>25(OH)D<sub>3</sub></b>	1,00	1,11 x 10 <sup>-3</sup>
<b>1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub></b>	0,10	1,00
<b>24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub></b>	-	2 x 10 <sup>-4</sup>

**Tab. 1:** Relative Bindung der einzelnen Vitamin D-Metabolite zum Vitamin-D-bindenden-Protein (VDP) im Plasma und zum intestinalen Vitamin-D-Rezeptor (VDR) (Bachmann u. Kormann, 1996)

Der Komplex, bestehend aus 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und VDR, kann sich nun an ein Vitamin-D-response-element (VDRE) in der Promoterregion von Zielgenen binden und so zu einer Veränderung der Gentranskription führen (Freedman u. Lemon, 1997). Neben der Fähigkeit, die Transkription zu beeinflussen, kann 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auch schnelle und direkte Membranreaktionen auslösen. So kann das Vitamin-D-Hormon gen-unabhängig Ionenfluxe stimulieren oder Proteinkinasen aktivieren (Fleet, 2004).

*Vitamin-D-Stoffwechsel beim Rind:* Normalerweise werden bei frei lebenden Säugetieren 80 - 90% des Vitamin-D-Bedarfes durch kutane Synthese gedeckt (Erben, 2005). Bei geringer UV-Exposition (Stallhaltung) muss Vitamin D entsprechend über die Nahrung supplementiert werden. Die tägliche Ration von laktierenden Milchrindern sollte 10.000 IU (1 IU entspricht 0,025 µg Vitamin D<sub>3</sub>) nicht unterschreiten (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie/ Ausschuss für Bedarfsnormen, 2001).

Metabolit	Serum-Konzentration	Halbwertszeit (Serum)
Vitamin D <sub>3</sub>	20-50 ng/ml*	2,1 Tage**
25(OH)D <sub>3</sub>	30-50 ng/ml*	10 Tage***
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	20-65 pg/ml (human)*	6 - 8 Stunden (human)****

**Tab. 2:** Referenzwerte für die Konzentration von Vitamin D<sub>3</sub>, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> im Serum sowie dessen Halbwertszeit von Rindern bzw. Menschen (\*Horst *et al.*, 2003;\*\*Karges *et al.*, 2001; \*\*\*Frank *et al.*, 1977;\*\*\*\*Bringinghurst *et al.*, 1998)

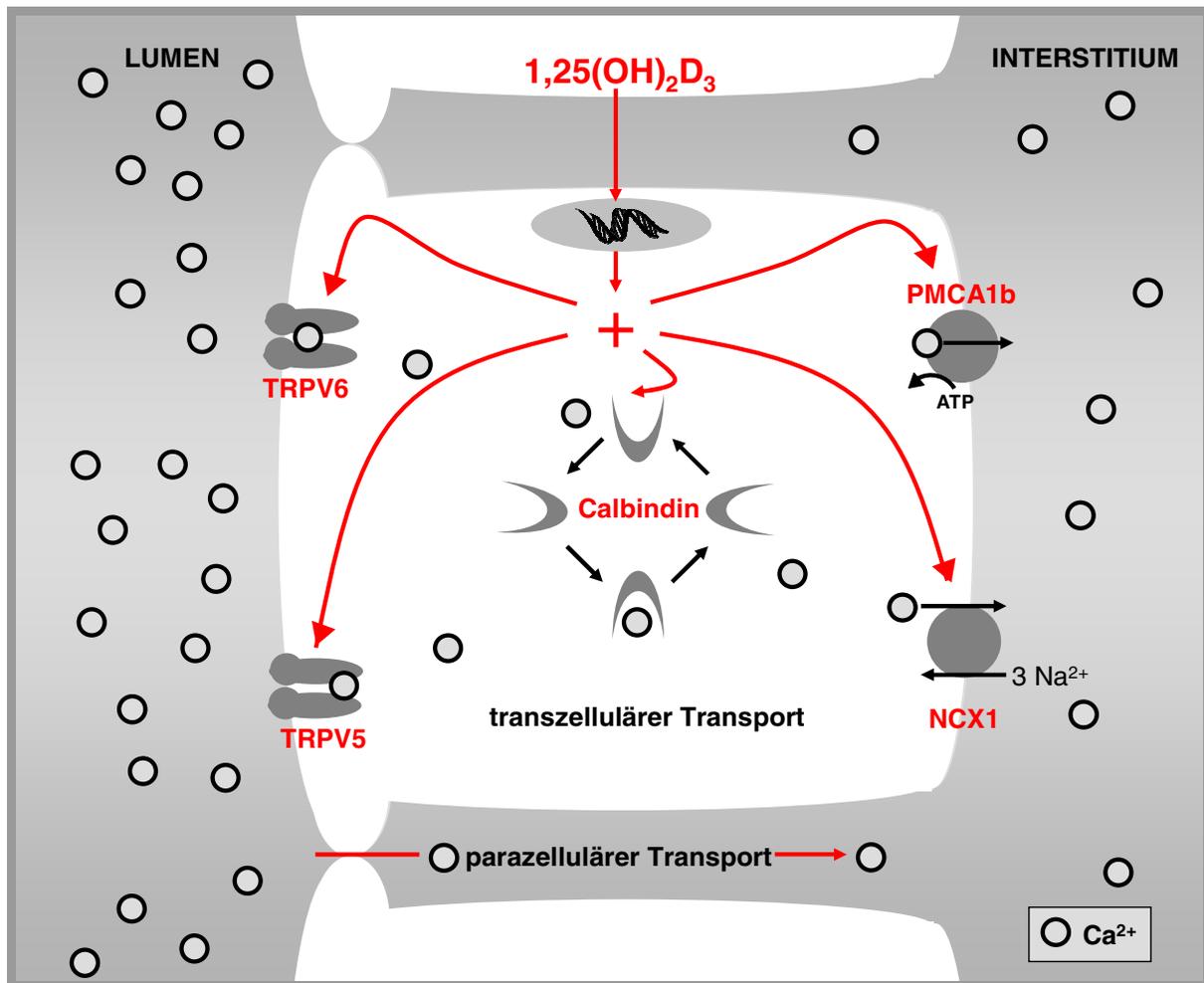
### 2.1.2 Biologische Wirkung von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> im Intestinaltrakt

Eine der Hauptfunktionen des Vitamin-D-Hormons in der Calciumhomöostase ist die Stimulation der intestinalen Calciumabsorption. Bereits 1970 entdeckten Orr und Mitarbeiter, dass Vitamin D notwendig ist, um Calcium aus der Nahrung aufzunehmen (Gillespie *et al.*, 1970). Der Transport von Calciumionen aus der Nahrung in den Extrazellulärraum erfolgt entweder passiv parazellulär oder die Ionen werden aktiv durch die Zellen des Magen-Darm-Traktes befördert.

*Aktiver Transport:* Die biologische Rolle des Vitamin-D-Hormons beim aktiven Transport von Calciumionen gilt heute als gut erforscht (Hoenderop *et al.*, 2005b). Bei dieser aktiven Calciumabsorption werden drei Transportmechanismen in Reihe geschaltet (siehe **Abb. 2**). Zunächst gibt es die mukosalen Calciumkanäle TRPV5 und TRPV6, die den Eintritt von Calciumionen aus dem Darmlumen in die Enterozyten ermöglichen. Intrazellulär finden sich sogenannte Calbindins (Calcium-bindende Proteine), die Calcium mit hoher Affinität binden. Basolateral sind schließlich die Calciumpumpe PMCA1b oder der Natrium-Calcium-Ionenaustauscher NCX1 lokalisiert, die Calciumionen aus den Enterozyten in die extrazelluläre Flüssigkeit der *lamina propria* überführen (Wasserman, 2004).

*Calciumkanäle:* Im Darm herrscht der Calciumkanal TRPV6 vor. Die initiale Aufnahme von Calcium durch den Kanal ist in der gesamten Calciumabsorption der Prozess limitierende Schritt. Mäuse, bei denen der Kanal nicht exprimiert wird, zeigen eine starke Malabsorption von Calcium (Nijenhuis *et al.*, 2005). Calciumionen gelangen entlang eines steilen elektrochemischen Gradienten durch die Kanäle in

die Enterozyten, da die Konzentration von freiem Calcium im Cytoplasma sehr niedrig ist ( $< 1 \mu\text{mol/l}$ ) (Scharrer u. Wolfram, 2005). Weil die Kanäle bei physiologischen Membranpotentialen konstant geöffnet sind, ist es wichtig, dass die Anzahl der Kanäle und damit die luminal Calciumaufnahme an der Zelloberfläche streng reguliert wird.



**Abb. 2** Schematische Darstellung der Absorption von Calciumionen aus dem Darmlumen in die extrazelluläre Flüssigkeit der *lamina propria* (modifiziert nach van de Graaf *et al.*, 2006)

Zahlreiche Experimente konnten klar nachweisen, dass die Expression des Kanals hauptsächlich durch Vitamin D reguliert wird (van Cromphaut *et al.*, 2001; Bouillon *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2003; Hoenderop *et al.*, 2005a). Als wirksames Modell dafür dienen Mäuse, bei denen das entsprechende Gen ausgeschaltet wird. So sind bei Tieren ohne VDR die Calciumkanäle TRPV5 bzw. 6 deutlich reduziert (Dusso *et al.*, 2005). Auf der anderen Seite kann durch eine Einzeldosis von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  der TRPV6 im Duodenum auf das sechsfache hochreguliert werden (van Cromphaut

*et al.*, 2001). Die Induktion der TRPV6-mRNA erfolgt hier 3 bis 6 Stunden nach Verabreichung von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Song *et al.*, 2003; van Abel *et al.*, 2003). Neben Vitamin D beeinflussen PTH, Östrogene (van Abel *et al.*, 2002), Androgene, Calcium selbst sowie mindestens fünf unterschiedliche Proteine (u.a. Calmodulin, S100A10/Annexin) die Ausbildung von TRPV5 und TRPV6. Dies geschieht durch Genregulation oder indem sie z.B. den intrazellulären Transport des Kanals an die Zelloberfläche stimulieren oder auch direkt mit dem Kanal interagieren (van de Graaf *et al.*, 2006).

*Calbindins:* Nach der Aufnahme von Calcium in das Zytoplasma der Enterozyten werden die Calciumionen reversibel an Calbindins (Calcium-bindende Proteine) gebunden. Von den zwei bekannten Subklassen des Proteins herrscht im bovinen Intestinaltrakt das Calbindin- $\text{D}_{9k}$  vor (Yamagishi *et al.*, 2002). Calbindin erfasst die Calciumionen und kann sie so zur serosalen Seite transportieren. Durch die Bindung der Calciumionen an Calbindin wird weiterhin die Zellapoptose verhindert, die durch einen Anstieg der intrazellulären, freien Calciumionen sonst ausgelöst würde (Christakos *et al.*, 2003). Die Calbindin-Synthese wird maßgeblich durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  stimuliert (Binder u. Reuben, 2003).

*Calciumpumpe und Ionenaustauscher:* Schließlich werden die Calciumionen an der basolateralen Seite in die Extrazellulärflüssigkeit überführt. Dies geschieht entweder durch die ATP-abhängige Calciumpumpe PMCA1b oder durch den Natrium-Calcium-Ionenaustauscher NCX1. In den Enterozyten von Säugetieren dominiert die Calciumpumpe (Hoenderop *et al.*, 2005b). Der Ionenaustauscher wird von dem transmembranalen Natriumgradienten getrieben (Stöchiometrie:  $3 \text{Na}^+ : 1 \text{Ca}^{2+}$ ). Auch in diesem Fall stimuliert das Vitamin-D-Hormon die Synthese der PMCA1b-Pumpe (van Abel *et al.*, 2003).

*Passiver Transport:* Neben dem aktiven Transport von Calciumionen durch die Zellen können die Ionen auch passiv parazellulär durch den *microspace* zwischen den Zellen diffundieren. Der passive Transport von Calciumionen ist nicht sättigbar, sondern allein von der luminalen Calciumkonzentration abhängig. Die Nettoabsorption über diese Route benötigt eine luminal Calciumionenkonzentration von ca. 2-6 mmol/l, um die Energiebarriere bzw. das transepitheliale, elektrische

Potential (Blutseite positiv) zu überwinden (Wasserman, 2004). Beweise häufen sich, dass  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nicht nur den transzellulären Transport von Calcium, sondern auch den parazellulären Transport stimuliert (Brown *et al.*, 1999; Wasserman, 2004). Ungeklärt ist jedoch bisher, wie hoch der tatsächliche Anteil dieses nicht-genetischen Pfades *in vivo* für die Calciumhomöostase ist (Dusso *et al.*, 2005).

*Calciumabsorption beim Rind:* Die biologische Verfügbarkeit von Calcium beträgt beim Wiederkäuer weniger als 50% (Martz *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu den meisten untersuchten Spezies weist der Wiederkäuer die Besonderheiten seines Vormagensystems auf. Calcium wird beim Wiederkäuer auch im Pansen absorbiert (Care *et al.*, 1989; Wadhwa u. Care, 2000). Bemerkenswert ist, dass offensichtlich der Anteil der vor dem Dünndarm ablaufenden Calcium-Nettoabsorption mit steigender, täglicher Calciumaufnahme zunimmt (Breves u. Schröder, 2005). Diesen *set-point* setzen Schröder und Breves (im Druck) bei 120 g Calcium pro Kuh pro Tag. Ungeklärt ist, welchen Einfluss die ruminale Calciumabsorption auf die Calciumhomöostase hat (Martens, 2005). Bei der Untersuchung, ob die Calciumabsorption im Pansen Vitamin-D-abhängig ist, gibt es Speziesunterschiede. Bei Ziegen führte die Induktion von hohen  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Serumkonzentrationen durch eine calciumarme Fütterung zu einer 50% Stimulation der Calciumfluxe in Ussing-Kammer-Versuchen (Schröder *et al.*, 1997). Keine Stimulation konnte dagegen mit gleichem Versuchsansatz bei Schafen beobachtet werden (Schröder *et al.*, 2001). Der Hauptanteil der Calciumabsorption findet jedoch trotz Vormagensystem im oberen Dünndarm statt (Horst, 1986). Sowohl passiver parazellulärer als auch aktiver transzellulärer Transport sind für das Rind beschrieben (Goff *et al.*, 1991). Im bovinen Duodenum konnten Calbindins- $\text{D}_{9\text{k}}$  (Yamagishi *et al.*, 2002), VDR und PMCA1 isoliert werden (Yamagishi *et al.*, 2006).

*Phosphatabsorption:* Zusätzlich zu den Effekten auf die Calciumabsorption erhöht  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  den aktiven Phosphattransport. Das Vitamin-D-Hormon stimuliert die Expression des Na/P-Cotransporters (Yagci *et al.*, 1992) und beeinflusst die Zusammensetzung der Plasmamembran der Enterozyten (erhöhte Fluidität, erhöhte Phosphat-Aufnahme).

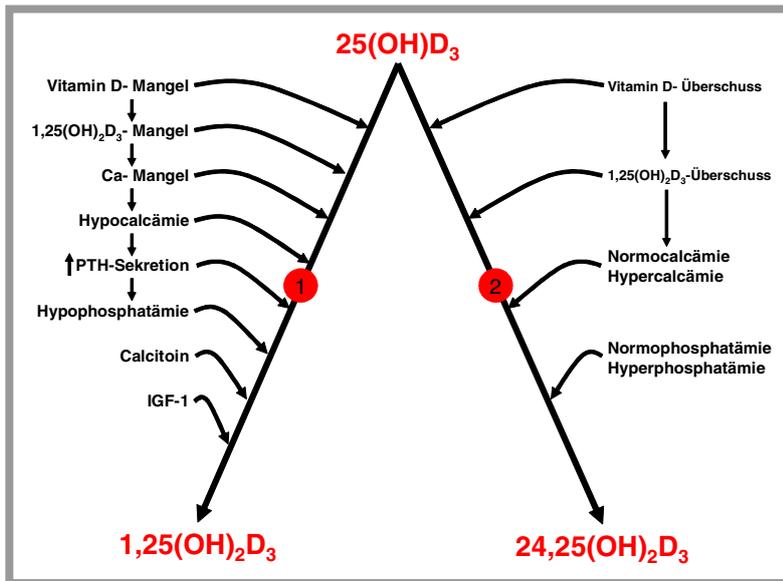
### 2.1.3 Biologische Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Niere

Die Niere nimmt in der Calciumhomöostase aus zwei Gründen eine zentrale Rolle ein. Zunächst dient die Niere als fein reguliertes Ausscheidungsorgan für Calcium und zweitens stellt sie, unter physiologischen Bedingungen, die wichtigste Quelle für das Vitamin-D-Hormon dar.

*Calciumresorption:* Aufgrund seiner Proteinbindung wird Calcium nicht ungehindert filtriert, sondern nur zu 50-60 %. Die Resorption des filtrierte Calciums findet zum größten Teil im proximalen Tubulus statt, weniger im dicken Teil der aufsteigenden Henle-Schleife und nur gering, aber kontrolliert in den distalen Segmenten (Hoenderop *et al.*, 2000). Der größte Anteil des Calciums wird passiv parazellulär resorbiert. Wie im Dünndarm gibt es aber auch im distalen Tubulus der Niere einen aktiven Transport unter der Kontrolle von Vitamin D. Die transzellulären Transport- und Regulationsmechanismen entsprechen denen im Dünndarm (siehe **2.1.2** und **Abb. 2** und Lambers *et al.*, 2006). In der Niere dominiert der Calciumkanal TRPV5 (ECaC1) (Hoenderop *et al.*, 2005b). Mäuse, bei denen TRPV5 nicht exprimiert wird, haben eine starke Hypercalcurie, eine kompensatorische Calciumhyperabsorption sowie eine reduzierte Knochendichte (Hoenderop *et al.*, 2003; Renkema *et al.*, 2005). Der TRPV5-Kanal wird auch durch das Hormon Klotho stimuliert, indem Klotho die extrazellulären Zuckerreste von TRPV5 hydrolysiert, wodurch der Kanal an der Zelloberfläche verstrickt wird (Chang *et al.*, 2005). Interessanterweise sind hohe Konzentrationen von Klotho bei der Maus mit Langlebigkeit verknüpft, während geringe Konzentrationen zum vorzeitigen Altern führen. Die Genexpression von TRPV5 und Klotho werden beide positiv durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  reguliert (Chang *et al.*, 2005). Der basolaterale Calciumtransport in das Interstitium findet hauptsächlich durch den Ionenaustauscher NCX1 statt (siehe **2.1.2**).

*Synthese von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ :* Die Nieren sind der Hauptort für die  $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Hydroxylierung zu  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Die Reaktion wird durch ein mitochondriales Enzym katalysiert, dessen Aktivität streng reguliert wird (siehe **Abb. 3**).

Die Genexpression der  $1\alpha$ -Hydroxylase wird durch PTH, sinkende Phosphatkonzentration und Calcitonin (Shinki *et al.*, 1999) stimuliert und durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  selbst (vermittelt durch den VDR) gehemmt (Murayama *et al.*, 1999).

**Abb. 3:**

Regulierende Faktoren für die enzymatische Umwandlung von  $25(\text{OH})\text{D}_3$  entweder zu Vitamin-D-Hormon ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) oder zu  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (modifiziert nach Genuth, 2004)

- ① 1 $\alpha$ -Hydroxylase
- ② 24-Hydroxylase

Eine weitere Einflussgröße ist der *insulin-like growth factor-I* (IGF-I) wie Studien *in vivo* (Nesbitt u. Drezner, 1993) und *in vitro* (Mena *et al.*, 1995) klar nachweisen konnten. So führte eine IGF-I-Infusion bei Mäusen dosisabhängig zu einem maximalen Anstieg der 1 $\alpha$ -Hydroxylase nach 24 Stunden (Nesbitt u. Drezner, 1993). Signifikante Aktivität von 1 $\alpha$ -Hydroxylase gibt es nur in der Niere, obwohl das Enzym auch extrarenal, v.a. in der Plazenta vorkommt (Murayama *et al.*, 1999).

*Synthese von 24,25(OH)<sub>2</sub>D*: Neben der Hydroxylierung von  $25(\text{OH})\text{D}_3$  zum Vitamin-D-Hormon, kann der Metabolit in den Nieren auch an der C<sub>24</sub>-Position hydroxyliert werden (siehe **Abb. 3**). Diese Reaktion ist von kataboler Natur, da die biologische Aktivität von  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ca. 10.000-mal geringer als die des  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ist (Erben, 2005). Neben  $25(\text{OH})\text{D}_3$  kann auch das Vitamin-D-Hormon durch diese Hydroxylierung inaktiviert werden (zu  $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ). Die 24 $\alpha$ -Hydroxylase wird durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Phosphat stimuliert und durch PTH gehemmt (Tryfonidou *et al.*, 2003). Das Enzym ist u. a. auch intestinal lokalisiert, wahrscheinlich um einer möglichen Vitamin-D-Intoxikation entgegenzuwirken. Bei Mäusen wird die intestinale 24 $\alpha$ -Hydroxylase durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  stimuliert und durch Calcitonin gehemmt (Beckman *et al.*, 1994).

Der Metabolit  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  dient vermutlich nicht nur dem Abbau von Vitamin D, sondern hat auch eine autonome Wirkung im Knochenstoffwechsel. Das  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  spielt eine Rolle bei der chondralen Osteogenese, indem es junge Chondrozyten reguliert und reifen lässt (Boyan *et al.*, 2001).

*Calciumexcretion beim Rind:* Die renale Calciumausscheidung ist beim Rind mit weniger als 1 g Calcium pro Tag gegenüber der aufgenommenen Gesamtmenge bemerkenswert gering (Goff *et al.*, 1987).

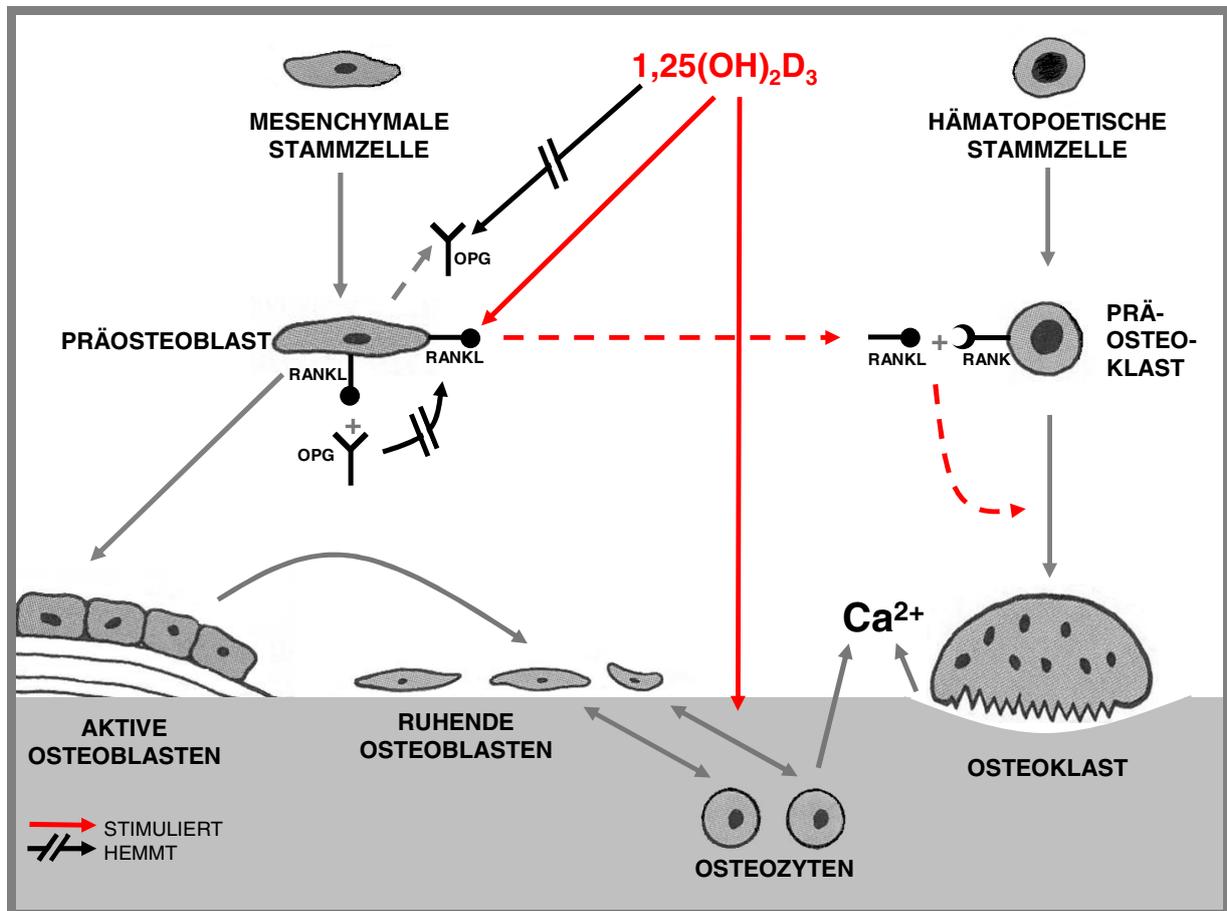
*Synthese von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  beim Rind:* Die renale Synthese und Inaktivierung des Vitamin-D-Hormons ist beim Rind ausgiebig untersucht worden und entspricht den bereits bekannten Regulationsmechanismen anderer Säugetiere. Die renalen Hydroxylaseenzyme sind beim Rind identifiziert worden (Bort u. Crivello, 1988).

#### **2.1.4 Biologische Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Knochen**

Vitamin D ist für normales Knochenwachstum und physiologische Mineralisierung des Knochengewebes essentiell. Vitamin D-Mangel führt bei wachsenden Tieren zu Rachitis und bei Adulten zu Osteomalazie. Im Skelettsystem sind ca. 99 % des gesamten Körpercalciums enthalten (Silbernagel u. Despopulos, 1991). Die tatsächliche Masse der Knochen verändert sich bei einem gesunden, adulten Tier kaum, da Knochenauf- und -abbau sich in einem stabilen Gleichgewicht befinden. Im Zusammenspiel mit PTH fördert  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Knochenmobilisierung und so die Freisetzung von Calciumionen. Das Krankheitsbild der Knochenerweichung bei Vitamin D-Mangel ist also nicht auf die direkte  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Wirkung am Knochen zurückzuführen, sondern beruht auf der indirekten Wirkung der Förderung der Calciumabsorption und somit der Bereitstellung der Calciumionen im Blut (Barrett u. Barrett, 2003). Vitamin D hat also – obwohl direkt eine katabole – als Nettofunktion eine anabole Wirkung im Knochenstoffwechsel (Duque *et al.*, 2005). Im folgenden Kapitel soll die direkte Wirkung des Vitamin-D-Hormons – die Freisetzung von Calciumionen durch Knochenmobilisierung – näher betrachtet werden.

*Schnelle Calciumfreisetzung:* Der relativ schnell verfügbare Calciumpool der Knochen ist vergleichsweise klein und existiert als gelöstes Calcium in der Flüssigkeit, die die Knochenzellen umgeben. Dieser ossäre Calciumpool ist sehr labil und dient als eine unmittelbar mobilisierbare Calciumreserve. Ein Synzytium von Osteozyten und Knochenbelegzellen trennt diesen Calciumpool von der

extrazellulären Flüssigkeit des Körpers. Durch Stimulation von PTH und  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wird das Calcium schnell in die Extrazellulärflüssigkeit transportiert.



**Abb. 4:** Darstellung des *remodeling-systems* des Knochens und dessen Beeinflussung durch das Vitamin-D-Hormon ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ). OPG: Osteoprotegerin; RANKL: Ligand des *receptor activator of NF- $\kappa$ B*; RANK: *receptor activator of NF- $\kappa$ B* (modifiziert nach Genuth, 2004 und Khosla, 2001)

*Langsame Calciumfreisetzung; das OPG/RANK/ RANKL-System:* Das Calcium in der dichten Knochenmatrix ist zeitlich verzögert verfügbar und dient als eine langsam zu mobilisierende Calciumquelle.

Die Knochenmatrix setzt sich aus drei Zelltypen zusammen, den Knochenzellen (Osteozyten), den knochenbildenden Zellen (Osteoblasten) und den knochenabbauenden Zellen (Osteoklasten). Osteoblasten und Osteoklasten interagieren über das RANK/RANKL/OPG-System miteinander, um Knochen-*remodeling* kontrolliert ablaufen zu lassen (siehe **Abb. 4**) (Khosla, 2001). Osteoblasten exprimieren den Liganden des *receptor activator of NF- $\kappa$ B* (RANKL) an

ihrer Oberfläche. Dieser Ligand kann sich entweder an den Rezeptor (RANK) von osteoklastischen Vorläuferzellen oder an Osteoprotegerin (OPG) binden. OPG ist ein löslicher Rezeptor osteoblastischer Herkunft, der durch Bindung an RANKL die Wirkung von RANK neutralisieren kann. Die Bindung von RANKL mit RANK induziert eine Signalkaskade, die Osteoklasten differenzieren und reifen lässt (Teitelbaum, 2000; Boyle *et al.*, 2003).  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Kitazawa *et al.*, 2003), PTH und Prostaglandine stimulieren die Expression von RANKL. Weiterhin hemmt  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Bildung von OPG, wodurch die Osteoklastogenese ungehindert ablaufen kann (Kondo *et al.*, 2004). Das heißt, dass durch das Vitamin-D-Hormon die Reifung, Differenzierung und Rekrutierung der Osteoklasten gefördert wird, wodurch Knochenmatrix abgebaut und vermehrt Calcium mobilisiert wird. An der bürstensaumartigen Zytoplasmamembran von murinen Osteoklasten wurde kürzlich TRPV5 identifiziert (van der Eerden *et al.*, 2005). Beim Menschen kann unter Hormoneinwirkung 1-2 % des Gesamtkörpercalciums innerhalb einiger Tage mobilisiert und an den extrazellulären Calciumpool abgegeben werden (Cundy u. Reid, 1995).

*Calciummobilisierung aus dem Knochen beim Rind:* Die Größe der schnell verfügbaren Calciumreserve wird bei der adulten Kuh auf 6-10 g geschätzt (Vagg u. Payne, 1970). Liesegang und Mitarbeiter (1998) untersuchten den Knochenstoffwechsel bei Milchkühen mit Hilfe von Knochenmarkern im Serum nach der Geburt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Knochenmobilisierung aus der dichten Knochenmatrix nach einer Hypocalcämie nicht Stunden, sondern ein paar Tage benötigt.

### 2.1.5 Biologische Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Nebenschilddrüse und die C-Zellen der Schilddrüse

In der Schilddrüse (*Glandula thyroidea*) und in der Nebenschilddrüse (Parathyroidea) werden zwei calcitrophe Hormone gebildet. Die Epithelkörperchen produzieren Parathormon (PTH). Calcitonin wird in den parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse gebildet. Das Vitamin-D-Hormon-System ist ein potenter Modulator der Parathyroidea und Thyreoideafunktion.

*PTH:* Das Parathormon ist für die Aufrechterhaltung physiologischer Calciumkonzentration von essentieller Bedeutung. Die PTH-Freisetzung zielt auf einen Anstieg der Calciumkonzentration in der extrazellulären Flüssigkeit bzw. im Blut ab. Dieser Effekt wird durch die Steigerung der tubulären Resorption von Calcium in der Niere und der Förderung des osteoklastischen Knochenabbaus erreicht. Weiterhin stimuliert PTH die renale  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese und hemmt die  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese, wodurch die Calciumfreisetzung indirekt weiterhin gefördert wird. Ferner fördert PTH die renale Phosphatausscheidung. Der primäre Stimulus für die PTH-Sekretion ist ein Abfall der Plasmakonzentration an ionisiertem Calcium, die über einen so genannten *calcium-sensing-receptor* (CaSR) (Brown *et al.*, 1993) in der Membran der PTH-sezernierenden Zellen gemessen wird (Chen u. Goodman, 2004). An den Promoterregionen der Gene, die für den CaSR codieren, sind VDREs identifiziert.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wirkt fördernd auf die Genexpression des CaSR (Canaff u. Hendy, 2002). Weiterhin werden die VDR-Gehalte in der Nebenschilddrüse durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hochreguliert. Die Aktivierung des CaSR durch Calciumionen führt zur Hemmung der PTH-Freisetzung (Chattopadhyay, 2006). *In vivo* verursacht Vitamin D-Mangel eine Nebenschilddrüsenhyperplasie mit verstärkter PTH-Synthese und Sekretion (Brown *et al.*, 1995, Dusso *et al.*, 2005).

*PTH beim Rind:* Die Nebenschilddrüse von Rindern reagiert innerhalb von wenigen Minuten auf einen hypocalcämischen Stimulus mit der Ausschüttung von PTH (Blum *et al.*, 1974 und 1983).

*Calcitonin:* Calcitonin kann im Organismus als Gegenspieler zu PTH aufgefasst werden. Die Ausschüttung von Calcitonin erfolgt via CaSR bei einer Erhöhung des Blutcalciumspiegels (Ramasamy, 2006). Um der Hypercalcämie entgegenzuwirken, verhindert Calcitonin weiteren Knochenabbau durch Bindung an spezifische Calcitonin-Rezeptoren auf Osteoklasten. Weiterhin wird die schnelle Calciumfreisetzung aus dem Knochen gehemmt. Renal inhibiert Calcitonin die Calcium- und Phosphatreabsorption und fördert die Synthese der  $1\alpha$ -Hydroxylase (Shinki *et al.*, 1999). Die Effekte von Calcitonin zur Konservierung von Calcium treten allerdings meist erst bei unphysiologisch hohen Konzentrationen auf (Erben, 2005). Calcitonin ist jedoch nur über eine kurze Zeitspanne als PTH-Antagonist anzusehen. Bei chronischer Hypercalcämie sinkt die Mehrproduktion von Calcitonin und die Calcitoninrezeptoren in den Endorganen verlieren ihre Sensitivität (das sog. *Escape-Phänomen*) (Ziegler, 2001). So zeigen weder Mäuse, denen Calcitonin fehlt (Thyroidea-Resektion oder Gen-Knockout), noch Mäuse mit dauerhaft hohen Calcitonin-Gehalten permanente Störungen des Calciumstoffwechsels (Genuth, 2004). *In vivo*- (Naveh-Many u. Silver, 1988) und *in vitro*- (Peleg *et al.*, 1993) Studien haben gezeigt, dass  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  durch Hemmung der Gentranskription die Calcitonin m-RNA-Gehalte herunterreguliert.

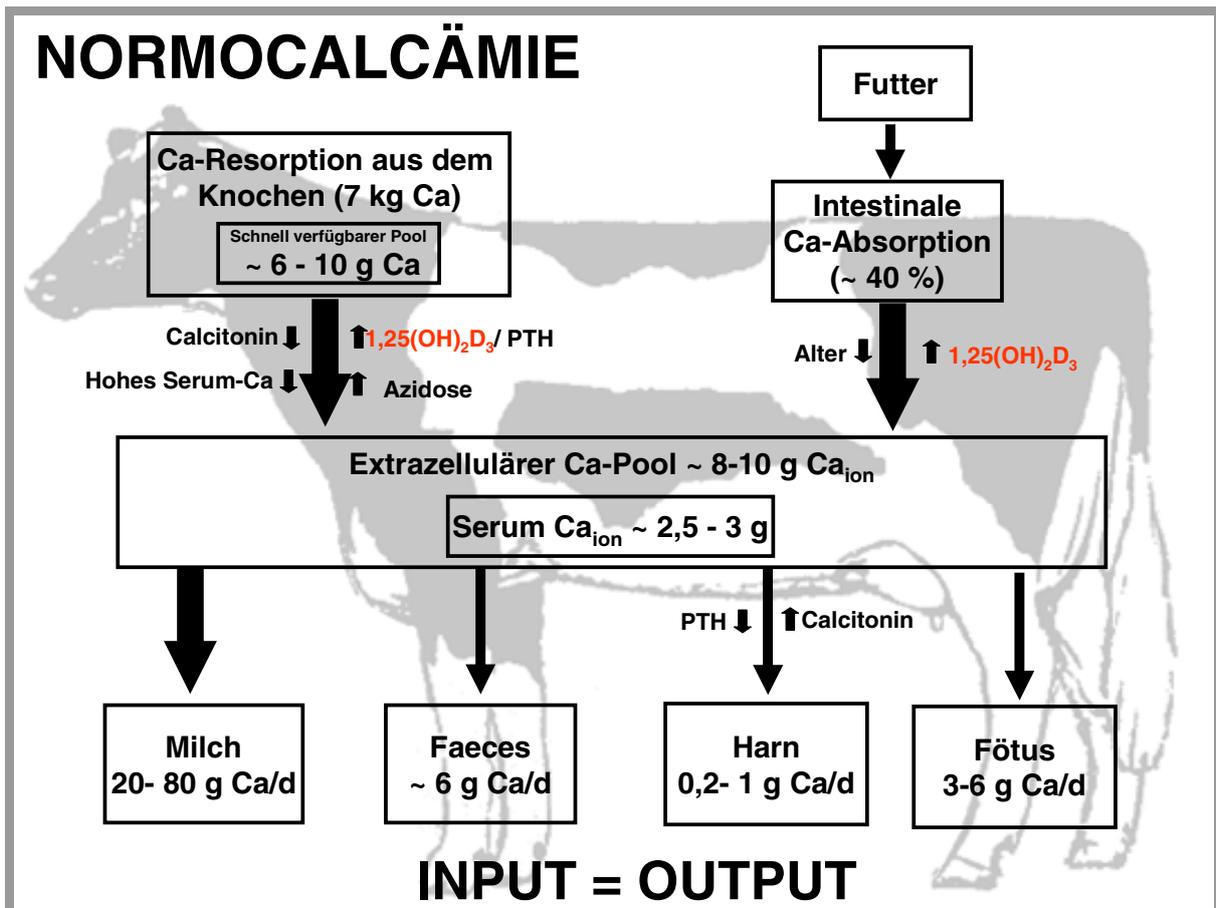
*Calcitonin beim Rind:* Die physiologische Rolle von Calcitonin ist beim Säugetier noch nicht ausreichend erforscht (Erben, 2005). Durch Calcitonin-Injektionen konnte bei Kühen eine durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Injektionen provozierte Hypercalcämie verhindert werden (Barlet, 1980).

### 2.1.6 Calciumhomöostase

Bei einem Gewicht von 600 kg KM besitzt die Kuh ca. 7 kg Calcium und davon 99 % in Knochen und Zähnen (**Abb. 5**). Der restliche extraossäre Calciumanteil befindet sich gebunden an Zellmembranen und in endoplasmatischen Retikula (0,9 %), in der extrazellulären Flüssigkeit (0,1 %) und im Zytosol (0,00002 %) (MacDowell, 1992).

In der extrazellulären Flüssigkeit (Blut) liegt Calcium in drei Fraktionen vor (Oberleithner, 2001):

- ↳ 38 % sind proteingebunden (vor allem an Albumin und Globulin),
- ↳ 12 % gebunden als lösliche Komplexe mit anorganischen Säuren (Phosphat, Citrat und Sulfat) und
- ↳ 50 % liegen als freie Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) vor.



**Abb. 5:** Die Calciumhomöostase bei einer gesunden, laktierenden Kuh mit ca. 600 kg Lebendgewicht. Calciumaufnahme und Calciumabgabe befinden sich im Gleichgewicht, wenn Calcium aus dem Futter entsprechend absorbiert wird (modifiziert nach Horst *et al.*, 2005)

Physiologisch wirksam sind allein die freien Calciumionen. Da  $\text{H}^+$ -Ionen mit den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen um die Bindungsstellen an Plasmaalbumin konkurrieren, ist der Anteil an biologisch aktiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen pH-abhängig (Oberleithner, 2001). Eine Alkalose reduziert den Pool an Calciumionen, während eine Azidose den Anteil erhöht. Die Konzentration des Gesamtcalciums bleibt jedoch konstant.

## 2.2 PATHOLOGIE DER CALCIUMHOMÖOSTASE

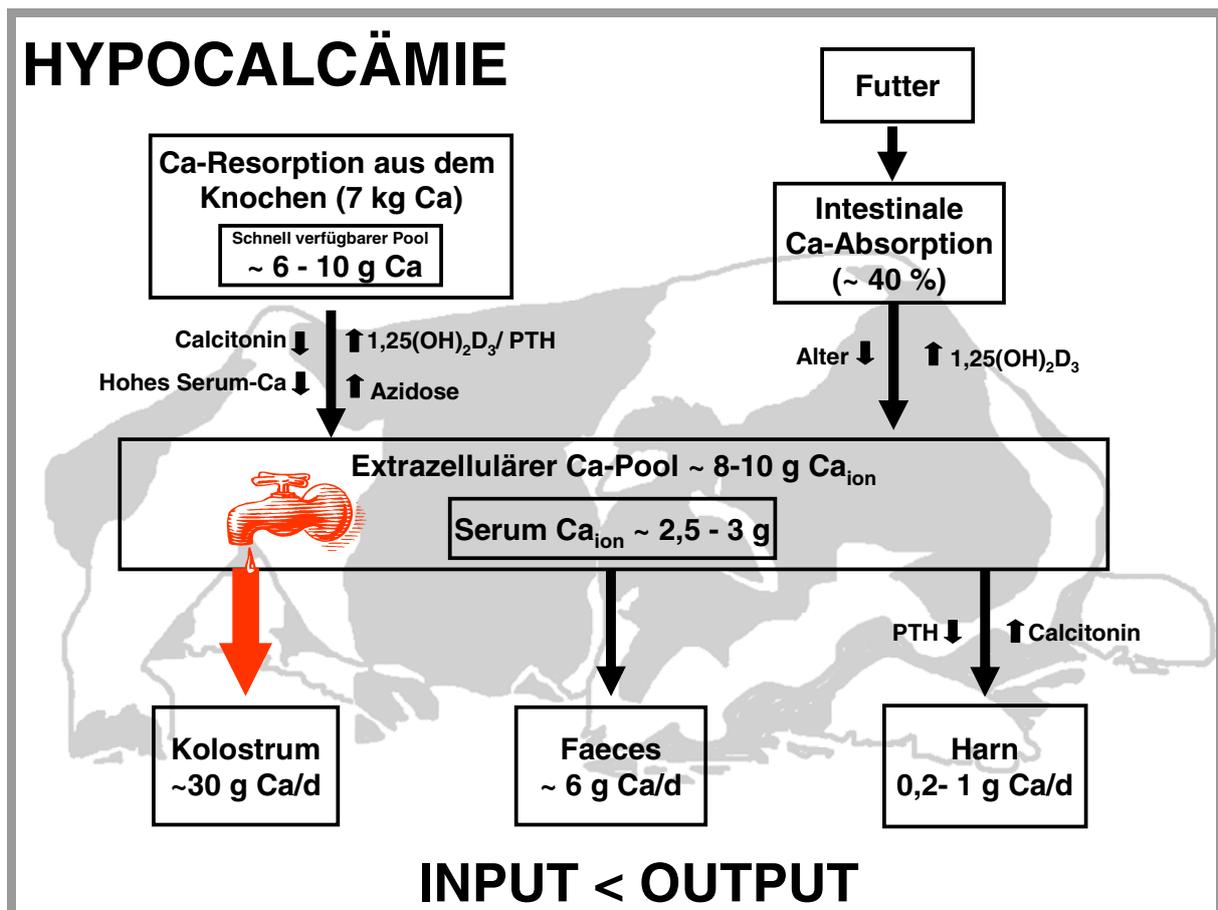
Der Organismus hat das Bestreben, die Calciumkonzentration im Plasma konstant zu halten. Versagt die Calciumhomöostase, gibt es beim Säuger zwei pathologische Erscheinungsbilder, einerseits das Absinken des Calciumspiegels (Hypocalcämie) und andererseits den Anstieg der Calciumkonzentration über physiologische Normalwerte (Hypercalcämie). Im Hinblick auf die Zielstellung der Arbeit sollen die beiden pathologischen Zustände vor allem bei der Milchkuh erläutert werden.

### 2.2.1 Hypocalcämie, speziell die hypocalcämische Gebärparese der Milchkuh

*Hypocalcämie:* Ein Absinken der Calciumkonzentration im Blutplasma unter physiologische Normalwerte bezeichnet man als Hypocalcämie. Betroffen von dieser Erkrankung sind neben Graupapageien, Schweinen, Ziegen und Schafen vor allem die Milchkuhe. Ein verminderter Calciumspiegel im Blut im Zusammenhang mit klinischen Symptomen wird bei der Kuh als hypocalcämische Gebärparese bezeichnet. Weitere Synonyme sind Milchfieber, Festliegen, Kalbefieber, Gebärkoma, *paresis puerperalis* oder *parturient paresis*.

*Pathogenese:* Die hypocalcämische Gebärparese der Milchkuh steht ursächlich und damit zeitlich mit dem Laktationsbeginn in Zusammenhang (**Abb. 6**). Mit Einsetzen der Laktation werden bis zu 30 g Calcium pro Tag mit dem Kolostrum (62-75 mmol/l, bzw. 1,5–2 g/l, Bojkovski *et al.*, 2005) ausgeschieden. Die Gesamtmenge des extrazellulären Calciumpools beträgt dagegen nur 8-10 g, die im Blutplasma (2,5 mmol/l) vorhandenen Calciumreserven belaufen sich sogar nur auf ca. 3 g (Horst *et al.*, 1997b; Goff *et al.*, 2005). Übersteigt der Calciumverlust infolge der Kolostralmilchbildung die Calciummobilisierungsfähigkeit des Organismus, entwickelt sich die Hypocalcämie mit subklinischem (. 1,9 mmol/l) oder klinischem Erscheinungsbild (. 1,5 mmol/l).

Es gibt viele Theorien über die Ursache des Milchfiebers. Grundvoraussetzung ist laut Niedermeier (1949) und Goff *et al.* (2002) das Vorhandensein eines Euters. Die Mastectomie eliminiert jeglichen Calciumabfall während der Geburt. Dabei ist anscheinend nicht die Größe des Calciumverlustes ausschlaggebend, sondern vielmehr die Schnelligkeit der Calciumabgabe, d.h. die Calciumverlustrate pro Zeiteinheit (Allen u. Davies, 1981).



**Abb. 6:** Pathogenese der hypocalcämischen Gebärparese am Beispiel einer peripartalen Kuh mit ca. 600 kg Lebendgewicht und ca. 10 l Kolostrum. Der Calciumverlust mit dem Kolostrum übersteigt die intestinale Calciumabsorption und die ossäre Mobilisierungsfähigkeit. (modifiziert nach Horst *et al.*, 2005)

*Prädisposition:* Aus **Tabelle 3** sind die tierindividuellen oder haltungsbedingten Risikofaktoren für die Gebärpareseerkrankung ersichtlich. Der Faktor „Alter“ ist hervorzuheben, denn während Erstkalbinnen nur selten an Gebärparese erkranken (Gelfert *et al.*, 2005), steigt die Erkrankungswahrscheinlichkeit bis zum sechsten Lebensjahr linear an (Martig, 2002).

**Tab 3:** Prädisponierende Faktoren für das Auftreten der hypocalcämischen Gebärparese.

Parädisponierender Faktor	Referenzen
Zunehmendes <b>Alter</b> (v. a. ab der dritten Laktation)	Curtis <i>et al.</i> , 1984; Goff <i>et al.</i> , 1987; Bostedt, 1993; Grunert u. Andresen, 1996; Radostitis, 2000; Martig, 2002; Fürll, 2005
Hohe <b>Milchleistung</b> (v. a. mit steiler Laktationskurve)	Radostitis, 2000; Martig, 2002; Fürll, 2005
Vorhergegangene <b>Gebärparese</b>	Danuser <i>et al.</i> , 1988; Radostitis, 2000; Fürll, 2005
<b>Stallhaltung</b>	Hardeng u. Edge, 2001
<b>Klimafaktoren</b>	Roche u. Berry, 2006
<b>Futterdepression</b> a.p. ... infolge Überkonditionierung	Allen u. Davies, 1981; Rukkwamsuk <i>et al.</i> , 1999; Thilsing-Hansen <i>et al.</i> , 2002; Fürll, 2005
infolge Östrogenanstieg a.p.	Allen u. Davies, 1981; Sechen <i>et al.</i> , 1988; Goff u. Horst, 1997
<b>Rasse</b> (v. a. Channel Island, Withe and Red Swedish, Jersey, weniger Holstein)	Allen u. Davies, 1981; Erb u. Grohn, 1988; Horst <i>et al.</i> , 1997b; Radostitis, 2000
<b>Fütterung</b> mit... calciumreicher Diät	Boda u. Cole, 1954; Belyea <i>et al.</i> , 1976; Barlet u. Ross, 1984; Goff <i>et al.</i> , 1987; Fürll, 2005; Goff <i>et al.</i> , 2005; Goff, 2006b
phosphatreicher Diät	Kichura <i>et al.</i> , 1982; Curtis <i>et al.</i> , 1985; Barton <i>et al.</i> , 1987; Goff <i>et al.</i> , 1987; Peterson <i>et al.</i> , 2005; Fürll, 2005; Goff <i>et al.</i> , 2005
ungünstigem Calcium-Phosphat-Verhältnis	Allen u. Davies, 1981
magnesiumarmer Diät (bzw. kaliumreicher Diät)	Contreras <i>et al.</i> , 1982; van Mosel <i>et al.</i> , 1991; Ram <i>et al.</i> , 1998, Goff <i>et al.</i> , 2005; Goff, 2006a u. 2006b; Lean <i>et al.</i> , 2006
schwefelarmer Diät	Goff 2006b
chloridarmer Diät (bzw. kaliumreicher Diät)	Goff <i>et al.</i> , 1991; Goff, 2006b

*Prädisposition auf hormoneller Ebene:* Bei der Suche nach dem Grund für das Auftreten der Gebärparese lag die Vermutung nahe, dass die Erkrankung Folge einer endokrinen Fehlfunktion ist. So wurde untersucht, ob die Hypocalcämie aus einer reduzierten Bildung von PTH bzw. einer Störung im Vitamin-D-Hormonsystem resultiert. Kausal wäre auch eine Calcitonin-Überproduktion möglich. Diese Thesen konnten verworfen werden, da sowohl PTH- als auch Vitamin-D-Hormonspiegel bei erkrankten Tieren genauso hoch oder sogar über denen von nicht erkrankten Tieren

liegen (Mayer *et al.*, 1969; Horst *et al.*, 1977; Goff *et al.*, 1986b). Weiterhin konnte keine abnorme Calcitoninproduktion bei paretischen Kühen festgestellt werden (Mayer *et al.*, 1975; Shappell *et al.*, 1987). Untersuchungen an Ratten zeigten, dass die Fähigkeit von PTH, die renale Vitamin-D-Hormonsynthese zu stimulieren, bei alten Tieren im Vergleich zu jungen Tieren reduziert ist, obwohl die PTH-Konzentrationen identisch sind (Armbrecht *et al.*, 1987 und 2003a). Als weiteren hormonellen Einflussfaktor auf das Auftreten der Gebärparese wurde von Smith und Mitarbeitern (1982) der Vitamin D-Metabolit 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> diskutiert. Sie zeigten eine negative Korrelation zwischen steigenden 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Konzentrationen und sinkendem Calciumspiegel bei erkrankten Kühen nach der Geburt. Die Untersuchung von Horst und Mitarbeitern (1979) konnte diesen Zusammenhang nicht bestätigen.

*Prädisposition auf systemischer Ebene:* Der Calciumhaushalt wird durch den Säure-Basen-Status beeinflusst. Wie bereits erwähnt, erhöht eine acidotische Stoffwechsellage den Anteil der freien Calciumionen am Gesamtcalcium im Serum (siehe **2.2.6**). Weiterhin wird der ossäre Calciumefflux durch Stimulation der osteoklastischen Knochenresorption bei gleichzeitig verringerter osteoblastischer Kollagensynthese gefördert (Bushinsky *et al.*, 2000 u. 2003; Frick *et al.*, 2005). Bei Induktion einer milden Acidose durch Fütterung mit einer anionreichen Diät konnten im Vergleich zu Kontrolltieren erhöhte Vitamin-D-Hormon-Spiegel im Serum analysiert werden (Abu Damir *et al.*, 1994; Phillippo *et al.*, 1994).

*Prädisposition auf zellulärer Ebene:* Auch bei der Untersuchung der zellulären Transportproteine zeigt sich, dass Tiere mit zunehmendem Alter nicht mehr so effizient Calcium absorbieren können. Bei Ratten sinkt die Expression aller Schlüsselproteine (TRPV5+6, Calbindin und Calciumpumpe) der intestinalen Calciumabsorption mit dem Alter (Armbrecht *et al.*, 2003b, Brown *et al.*, 2005; van Abel *et al.*, 2006). In Bezug auf die Calbindinexpression ist dies auch für das Rind nachgewiesen (Yamagishi *et al.*, 2002).

Ferner ist der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) im Intestinaltrakt eine wichtige Stellgröße in der Calciumhomöostase, weshalb die VDR-Gehalte ätiologisch und pathogenetisch für das Entstehen der Gebärparese von Bedeutung sind. Bereits 1990 konnte die Arbeitsgruppe um Horst und Goff zeigen, dass der VDR-Gehalt mit dem Alter abnimmt. Die VDR-Konzentrationen im Darm verändern sich auch innerhalb eines

Reproduktionszyklus der Kühe. In Trächtigkeit und Hochlaktation wurden höhere VDR-Gehalte festgestellt als zum Zeitpunkt der Geburt (Goff *et al.*, 1991 u. 1997; Horst *et al.*, 1997a; Liesegang *et al.*, im Druck). Ein Vergleich der intestinalen Rezeptorzahl von Jersey- und Holsteinkühen zeigte, dass Kühe der Rasse Jersey geringere Konzentrationen aufweisen (Goff *et al.*, 1995a). Mit dem Alter vermindert sich auch der VDR-Gehalt auf den Osteoblasten (Goff *et al.*, 1991).

*Inzidenz und Ökonomie:* Ein Großteil aller Kühe erfährt in den ersten Tagen nach der Abkalbung einen mehr oder weniger starken Abfall der Blutcalciumkonzentration (Horst *et al.*, 1994). Das geht so weit, dass sich ein Absinken des Calciumspiegels auf bis zu 2 mmol/l im peripartalen Zeitraum als physiologisch betrachten lässt (Kraft *et al.*, 1999). Bei einem Teil der Kühe ist die Hypocalcämie so stark, dass sie festliegen (meist unterhalb von 1,25 mmol/l; Martig, 2002; Horst *et al.*, 2005). Die Gebärpareseinzidenz bewegt sich laut Literaturangaben zwischen 5-10 % (Houe *et al.*, 2001), womit Milchfieber die häufigste Stoffwechselerkrankung von Rindern ist. Ohne Behandlung sterben 60-70 % der erkrankten Tiere (Horst *et al.*, 2005). Auch mit Behandlung ist die Letalität von bis zu 10 % der betroffenen Tiere sehr hoch (Martig, 2002; Fürll, 2005). Als direkte Folge des Festliegens können sich Muskel- und Nervenquetschungen, Dekubitus, Phlegmone und druckischämische Muskeldegenerationen entwickeln (Martig, 2002). Häufig führen auch Aufstehversuche der betroffenen Tiere zu folgeschweren Verletzungen mit Ausgrätschen oder Frakturen der Gliedmaßen (Fürll, 2005).

In Abhängigkeit vom klinischen Verlauf betragen die wirtschaftlichen Einbußen zwischen 50 und 200 € pro erkranktem Tier, bei Verlust der Kuh noch mehr (Staufenbiel, 2004). Neben der tierärztlichen Behandlung kommt es in den ersten zehn Wochen zu einer Minderung des Milchertrags (Staufenbiel, 2004), die sich bei fortschreitender Laktation jedoch wieder aufhebt. Der Milchertrag liegt im statistischen Jahresdurchschnitt sogar über dem von nicht erkrankten Tieren (Rajala-Schultz *et al.*, 1999). Neben den direkten wirtschaftlichen Verlusten kommen die indirekten Einbußen hinzu, da die Gebärparese selbst für Folgeerkrankungen prädisponiert. Zu den Erkrankungen zählen: Nachgeburtsverhaltung, Wehenschwäche, Dystokie, Ketose, Hepatose, Mastitis, Labmagenverlagerung und Uterusprolaps (Curtis *et al.*, 1985; Houe *et al.*, 2001; Gelfert *et al.*, 2006).

Leider gibt es keine relevanten Untersuchungen zu den Effekten der subklinischen Gebärparese in Bezug auf Folgeerkrankungen, Milcheinbußen und Ökonomie. Goff *et al.* (1986a) und Houe *et al.*, (2001) sind sich einig, dass Präventionsmaßnahmen nicht nur auf festliegende Kühe abzielen sollten, sondern vermehrtes Augenmerk auch auf die subklinischen Hypocalcämie gerichtet werden soll.

*Klinik:* Typischerweise treten die klinischen Symptome 1-2 Tage nach dem Abkalben auf, aber es ist auch nicht ungewöhnlich, dass Kühe bereits vor oder in der Geburt festliegen. In Ausnahmefällen kann Milchfieber auch bis zu 10 Tagen *postpartum* auftreten. Der Krankheitsverlauf der Gebärparese wird je nach Schweregrad in drei Phasen eingeteilt (Radostitis, 2000). Zunächst kann die Kuh noch stehen, aber Appetit, Rumination (Daniel, 1983) und Defäkation sind reduziert (Stadium I). An den großen Muskelpartien wie Schulter und Hüfte zeigt sich Muskelzittern. Verschlechtert sich der Zustand, sind die Kühe nicht mehr in der Lage aufzustehen (Stadium II). Sie liegen in Brust-Bauchlage, oft in autauskultatorischer Stellung, mit getrübttem Sensorium. Weiterhin kann man verminderte Körperinnen- und Oberflächentemperatur und einen Anstieg der Herzfrequenz (dumpfe Töne) feststellen. Im dritten Stadium liegen die Tiere in Seitenlage und reagieren nicht mehr auf äußere Reize. Die Atmung ist oberflächlich und oft unregelmäßig (Martig, 2002). Kühe, die sich trotz wiederholter Behandlung nicht erholen, werden als *downer cows* bezeichnet (Barlet u. Davicco, 1992).

*Laborparameter:* Die Blutmineralstoffkonzentrationen einer festliegenden Kuh zeigen neben der Hypocalcämie häufig auch eine Hypophosphatämie. Der Magnesiumspiegel ist meist geringfügig erhöht, kann aber je nach Fütterungsart (Düngereinsatz) auch mit einer Hypomagnesämie einhergehen. Der verminderte Phosphatspiegel sowie der Anstieg der Magnesiumkonzentration sind Folgen der durch die Hypocalcämie ausgelösten PTH-Sekretion. PTH reduziert die renale Ausscheidung von Magnesium und stimuliert andererseits die des Phosphats (Martig, 2002). Aufgrund der Schädigung der Muskulatur erhöhen sich die Enzyme Kreatinkinase (CK) und Aspartat-Aminotransferase (AST) im Serum.

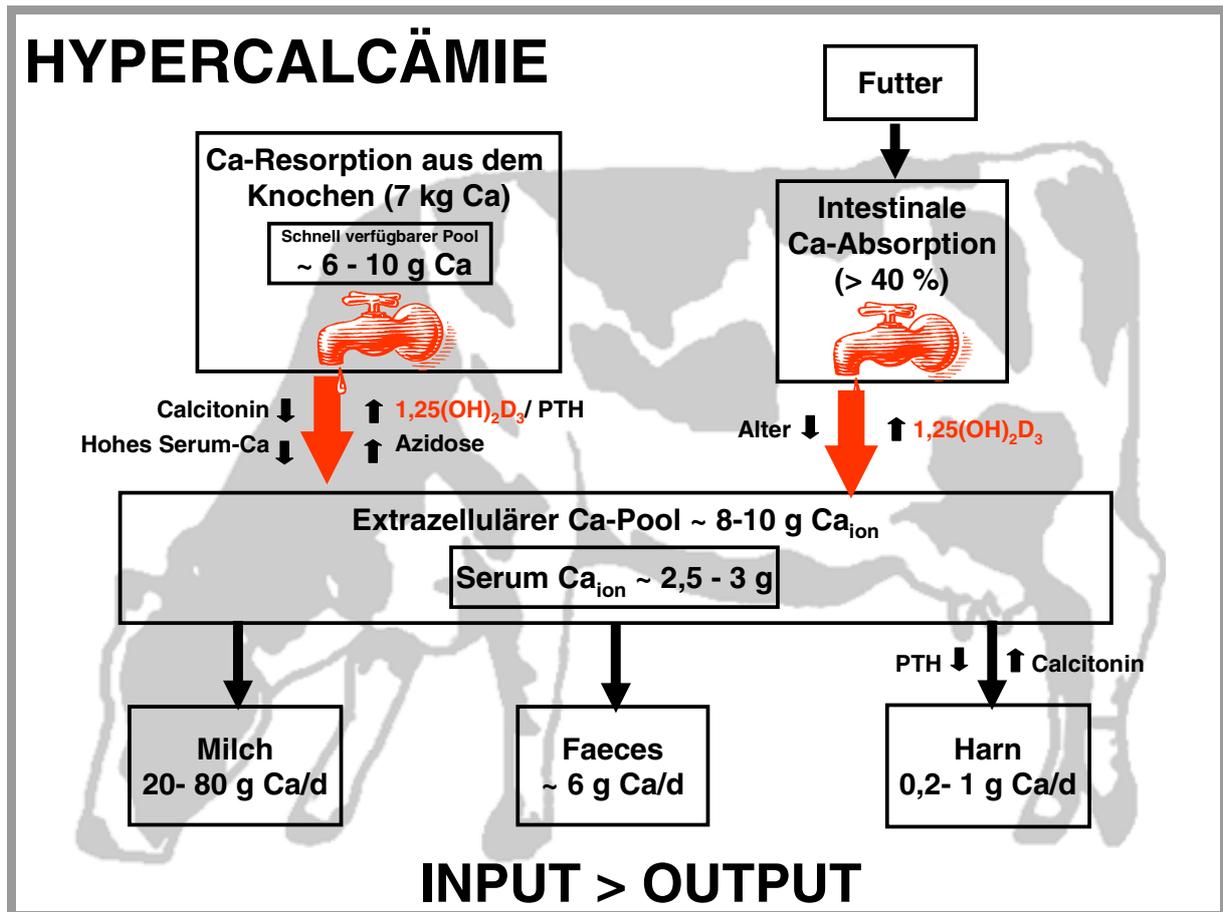
*Therapie:* Die erste dokumentierte erfolgreiche Behandlung wurde 1897 von Schmidt (Hibbs, 1950) durchgeführt, indem er unterschiedliche Flüssigkeiten in das so

vermutete „infizierte Euter“ spritzte. Diese Behandlung führte durch den erhöhten Euterdruck zu einer signifikanten Reduktion der Milchproduktion. Später wurde die Luftinsufflation das Mittel der Wahl. Im Jahr 1925 beobachteten Little und Wright, dass bei erkrankten Tieren der Calciumspiegel erniedrigt ist (Horst *et al.*, 1997b). Seitdem werden Calciuminfusionen therapeutisch mit großem Erfolg eingesetzt. Die intravenöse Infusion mit einer 23 %igen Calciumborogluconatlösung ist heutzutage die meist benutzte Behandlungsmethode, jedoch ist die intravenöse Calciuminfusion nicht ganz problemlos. Einerseits können zu hohe Calciumkonzentrationen zu Herzstillstand führen, andererseits benötigen 25 % der behandelten Tiere innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Infusion eine Wiederholungsbehandlung (Horst *et al.*, 1997b).

### **2.2.2 Hypercalcämie, speziell die Hypervitaminose D der Milchkuh**

*Hypercalcämie:* Die Erhöhung des Calciumspiegels im Blutplasma über die obere Grenze des physiologischen Bereiches bezeichnet man als Hypercalcämie. Dieser Konzentrationsanstieg von Calcium ist selten, kann aber infolge von tumoröser Entartung der Parathyreoidea, bei chronischen Nierenerkrankungen oder durch Vitamin D-Intoxikationen auftreten.

*Hypervitaminose D:* Die orale oder parenterale Überversorgung mit Vitamin D bzw. dessen Metaboliten führt beim Rind zum Krankheitsbild der Kalzinose, der Verkalkung des Weichteilgewebes. Die Erkrankungsursache ist oft iatrogen, kann aber auch durch die chronische Aufnahme von sogenannten calcinogenen Pflanzen hervorgerufen werden. Zu diesen Pflanzen zählen hauptsächlich Arten der Familie Solanaceae (Nachtschattengewächse) und *Trisetum flavescens* (Goldhafer) aus der Familie der Süßgräser. Die Vitamin-D-Intoxikation mit Goldhafer ist eine enzootische Erkrankung (= Enzootische Kalzinose) in Süddeutschland, der Schweiz und Österreich und naturgemäß eine Gruppenerkrankung (Braun *et al.*, 2000; Dirksen, 2002).



**Abb. 7:** Pathogenese der Hypercalcämie am Beispiel einer laktierenden Kuh mit ca. 600 kg Lebendgewicht. Die Calciumaufnahme übersteigt den Calciumverlust (nach Horst *et al.*, 2005).

*Klinik/Laborparameter:* 2-3 Wochen nach der Überdosierung (mit Vitamin D!) magern die betroffenen Tiere stark ab und fallen durch vermehrtes Liegen und längeres Verharren auf den Karpalgelenken auf. Sie zeigen Fressunlust, raues Haarkleid und Koteindickung. Bei der Sektion der betroffenen Tiere knirschen die großen Gefäße (Aorta, *A. iliaca*, *A. pulmonalis*) im Anschnitt. Verkalkungen lassen sich am Herz, der Niere und in Extremfällen in der Lunge feststellen (Stöber, 2002). Im Serum sind die Konzentrationen an Calcium und anorganischem Phosphat deutlich erhöht (Radostitis, 2000).

*Toxitätsstudien:* Dass die Verabreichung von hohen Dosen Vitamin D toxisch wirkt, konnte klar nachgewiesen werden und ist seit langem bekannt (Manston u. Payne, 1964; Capen *et al.*, 1966; Julien *et al.*, 1977). Sowohl eine einmalige massive Überdosierung als auch wiederholte Applikationen geringerer Dosierungen kann letal enden. Doch nicht nur die Dosierung sondern auch der akute Reproduktionszustand

der Kuh ist von Bedeutung, wie Littledike und Horst (1982) zeigen konnten. Sie verabreichten Kühen bis zu 20 Millionen IU Vitamin D<sub>3</sub> i.m. (!) vier Wochen vor der errechneten Kalbung und wiederholten die Injektion nach einer Woche mit 2 Millionen IU Vitamin D<sub>3</sub>. Zwei Drittel der behandelten, trächtigen Tiere starben an Vitamin D-Intoxikation. Nichtträchtige und nichtlaktierende Kühe zeigten dagegen bei gleicher Behandlung weder im klinischen Bild noch im pathologischen Befund Anzeichen einer Vitamin-D-Vergiftung. Die trächtigen Tiere antworteten auf diese Vitamin-D-Applikation weiterhin mit vergleichsweise höheren Gehalten an 25(OH)D<sub>3</sub> und 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> im Serum.

### **2.3 Prophylaxe der hypocalcämischen Gebärpause**

Das weltweite Auftreten von Milchfieber und dessen große ökonomische Bedeutung haben zu vielen Anstrengungen geführt, entsprechende Prophylaxemaßnahmen zu ergreifen (Goff *et al.*, 2005). Heutzutage haben sich vier prophylaktische Methoden durchgesetzt, die mehr oder weniger erfolgreich eingesetzt werden (Staufenbiel u. Engelhard, 1999; Thilsing-Hansen *et al.*, 2002). Die Gebärpauseprophylaxe mit Vitamin D und dessen Metaboliten (vor allem mit 25(OH)D<sub>3</sub>) wird unter dem Aspekt der Arbeitshypothese detaillierter beschrieben.

*Gebärpauses-Prophylaxe mit Calciumapplikationen um den Geburtszeitpunkt:* Die Verabreichung hoher Dosen von leicht absorbierbaren Calciumsalzen zielt darauf ab, die passive Calciumabsorption zu erhöhen (siehe **2.1.2.** passiver Transport). Geburtsnah wird Calcium in Form von Boli (Pehrson *et al.*, 1998), Gelen (Oetzel, 1996), Lösungen (Goff u. Horst, 1993), oder Pasten (Goff *et al.*, 1996) verabreicht. Mit Hilfe dieser Methode wird der Calciumspiegel schnell angehoben (< 30 min). Der Effekt ist jedoch leider nur kurzlebig (< 24 h) und kann zu Ulzerationen im oberen Verdauungstrakt führen (Horst *et al.*, 2005).

*Gebärpauses-Prophylaxe durch anionenreiche Fütterung a.p.:* Das Verfahren beruht auf der Beeinflussung des Säure-Basen-Haushaltes der gebärenden Kuh. Durch die Fütterung sogenannter saurer Salze vor der Geburt wird eine milde metabolische Azidose erzeugt. Diese Stoffwechsellage hat einen calciumfördernden Effekt in der

Calciumhomöostase (siehe **2.2.1** Prädisposition auf systemischer Ebene). Es gibt zahlreiche Untersuchungen und Darstellungen dieser Art der Gebärpäresese prophylaxe hinsichtlich der eingesetzten Salze (u.a. Sanchez *et al.*, 1997; Schonewille *et al.*, 1994; Fürll *et al.*, 1996; Wang u. Beede 1992), Managementstrategien (Staufenbiel u. Engelhard, 1999; Oetzel, 2000), den Effekten auf den Organismus (Goff *et al.*, 1995b; Goff, 2006b) und deren Effizienz (Lean *et al.*, 2006; Charbonneau *et al.*, 2006). Der Nachteil dieser Methode ist, dass mit Einsatz der sauren Salze sich die Palatabilität des Futters reduziert, wodurch die Kühe eine geringere Trockenmasseaufnahme haben (Thilsing-Hansen *et al.*, 2002).

*Gebärparese-Prophylaxe durch Calcium-restriktive Fütterung a.p.:* Durch eine calciumarme Diät vor der Geburt sollen die homöostatischen Mechanismen der Kuh aktiviert werden, um so nach der Abkalbung Calcium effizienter zu absorbieren. Bei Fütterungsversuchen mit weniger als 20 g Ca/d konnte die Gebärpäreseseinzidenz drastisch reduziert werden (Green *et al.*, 1981; van de Braak *et al.*, 1986; Wiggers *et al.*, 1975; Wang *et al.*, 1994). Leider ist so eine calciumarme Fütterung mit den konventionellen Futtermitteln nicht möglich. Thilsing-Hansen und Jorgensen (2001) umgingen diese Problematik durch einen Calciumbinder, der der Ration zugesetzt wird.

### **2.3.1 Prophylaxe der hypocalcämischen Gebärpäresese durch Applikation von Vitamin D<sub>3</sub> und dessen Metabolite**

Bereits kurz nach der Entdeckung von Vitamin D und dessen Metaboliten wurde das Potential dieses Vitamins in der Gebärpäresese prophylaxe erkannt. Eine Vielzahl an Untersuchungen mit Vitamin D-Substitutionen begann variationsreich in Dauer, Applikationsart und Menge. Bei Verwendung von Vitamin D und den unterschiedlichen Metaboliten muss beachtet werden, dass zwischen der Verabreichung und dem Auftreten von biologischen Effekten eine entsprechend zeitliche Verzögerung („lag time“) für die Metabolisierungsschritte benötigt wird.

*Prophylaxe mit Vitamin D<sub>3</sub>:* Die anfänglichen Untersuchungen mit Vitamin D selbst (Cholecalciferol) zeigten ziemlich schnell, dass der prophylaktische Effekt erst bei

nahezu toxischen Dosen auftritt. So supplementierten Hibbs und Pouden (1955) hochträchtige Tiere oral täglich mit bis zu 30 Millionen IU Vitamin D bis zur Geburt. Damit erreichten sie zwar eine deutliche Senkung der Gebärpareseinzidenz, allerdings bei maximal zehntägiger Supplementierungsdauer. Längere Vitamin-D-Applikation zeigte keinen prophylaktischen Effekt mehr und führte zusätzlich zur Vitamin-D-induzierter Weichteilverkalkung (siehe Toxizitätsstudien **2.2.2**). Bei geringeren Dosierungen (5 Millionen IU Vitamin D oral) konnte entweder kein Effekt oder sogar eine Erhöhung der Inzidenzrate festgestellt werden (Hibbs u. Pouden 1955; Littledike u. Horst 1980). Eine erfolgreichere Methode, die Gebärparesehäufigkeit zu reduzieren, war die einmalige Verabreichung von 10 Millionen IU i.m. fünf Tage vor dem errechneten Geburtstermin. Bei Geburtsverzögerung wurde die Injektion wöchentlich wiederholt (Gürtler *et al.*, 1977).

*Prophylaxe mit dem Vitamin-D-Hormon (1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>):* Das eigentliche Vitamin-D-Hormon erwies sich für die prophylaktische Verwendung als ebenfalls aussichtsreich. Gast und Mitarbeiter (1979) injizierten 400 µg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> fünf Tage vor dem errechneten Geburtstermin und wiederholten die Injektion alle fünf Tage bis zum Partus. Hove und Kristiansen (1984) schlugen die tägliche orale Supplementierung (in fettiger Matrix) von bis zu 200 µg/d Vitamin-D-Hormon vor. Startpunkt war wiederum fünf Tage vor der erwarteten Kalbung, bis einen Tag p.p. wurde weiter gefüttert. Die einmalige orale Supplementierung mit 500 µg drei Tage a.p. war, vor allem des schwer voraussagbaren Geburtstermins wegen, wenig erfolgreich (Hove u. Kristiansen, 1982).

*Prophylaxe mit 1α(OH)D<sub>3</sub>:* Das synthetische 1α-Hydroxyvitamin D ist ein Analogon des Vitamin-D-Hormons. Zur Bioaktivierung muss es noch mit Hilfe des unregulierten 25-Hydroxylase-Enzyms in der Leber metabolisiert werden. Zahlreiche Autoren untersuchten den prophylaktischen Effekt dieses Steroids (Bar *et al.*, 1985; Sachs *et al.*, 1987a+b; Hodnett *et al.*, 1992; Zepperitz *et al.*, 1994). Dosierungen von 70 bis 700 µg 1α(OH)D<sub>3</sub> wurden injiziert, entweder einmalig oder in Wiederholung, auch in Kombination mit 25(OH)D<sub>3</sub> (Hodnett *et al.*, 1992; Zepperitz *et al.*, 1994). Die Experimentatoren konnten innerhalb eines Zeitfensters (1-7 Tage) *post injectionem* einen positiven Effekt auf die Gebärpareseinzidenz feststellen. Yamagishi und

Mitarbeiter (2005) „lösten“ das Problem des unbekanntes Geburtszeitpunktes durch Geburtseinleitung mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$ .

*Prophylaxe mit 24F-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>*: Ein weiteres Analogon des Vitamin D- Hormons ist das synthetische 24-Fluoro-1,25-Dihydroxyvitamin D. Durch das mit Fluor abgesättigte C<sub>24</sub>-Atom wird an dieser Stelle die Hydroxylierung blockiert, wodurch das Vitaminanalog nicht so schnell katabolisiert wird. 24F-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> besitzt also längere biologische Aktivität als das Vitamin-D-Hormon (Goff *et al.*, 1986a). Von den durchgeführten Versuchen mit dieser untersuchten Substanz war ein „slow-release“-Implantat am Erfolg versprechendsten (Goff u. Horst, 1990).

### 2.3.2 Prophylaxe der hypocalcämischen Gebärpause, speziell mit 25(OH)D<sub>3</sub>

In den siebziger Jahren galt der Vitamin-D-Metabolit 25(OH)D<sub>3</sub> als der primäre Kandidat für die Gebärpauseprophylaxe (Horst *et al.*, 2003). Der Effekt der 25(OH)D<sub>3</sub>-Applikation auf die Gebärpauseinzidenz wurde damals von der Forschergruppe um DeLuca und Jorgensen in Wisconsin (USA) untersucht (Bringe *et al.*, 1971; Olsen *et al.*, 1973; Frank *et al.*, 1977; Jorgensen *et al.*, 1978).

**Tab. 4:** Versuchsbedingungen und Resultate der Untersuchungen des Effektes der 25(OH)D<sub>3</sub>-Applikation auf die Gebärpauseinzidenz (GP-Inzidenz)

	<b>Versuchstiere</b> <b>Anzahl/ Rasse</b> <b>Alter</b> <b>GP-Inzidenz der</b> <b>Herde</b>	<b>25(OH)D<sub>3</sub></b> <b>Dosis</b> <b>Vehikel</b> <b>ZP der 1ten</b> <b>Appl.</b> <b>Wdh.- ZP</b>	<b>Fütterung</b>	<b>GP-Inzidenz</b>
<b>BRINGE et al (1971)</b>	n/a > 3 Laktation 100%	200 µg <i>i.v.</i> 1ml Ethanol 24 h- 3 d <i>a.p.</i> <sup>Δ</sup> keine Wdh	n/a	Versuch: 0%
	22 Holstein n/a 50%	250 µg <i>oral</i> Ölkapsel 18 h <i>a.p.</i> <sup>Δ</sup> alle 3 d	n/a	Kontrolle: 72% Versuch: 45%
	35 Jersey n/a 50%	250 µg <i>oral</i> Ölkapsel 18 h <i>a.p.</i> <sup>Δ</sup> alle 3 d	n/a	Kontrolle: 63% Versuch: 36%
	n/a	1000 µg oral Ölkapsel 18 h <i>a.p.</i> <sup>Δ</sup> alle 3 d	n/a	Versuch: 18%

	<b>Versuchstiere</b> <b>Anzahl/ Rasse</b> <b>Alter</b> <b>GP-Inzidenz der</b> <b>Herde</b>	<b>25(OH)D<sub>3</sub></b> <b>Dosis</b> <b>Vehikel</b> <b>ZP der 1ten</b> <b>Appl.</b> <b>Wdh.- ZP</b>	<b>Fütterung</b>	<b>GP-Inzidenz</b>
<b>OLSON et al (1973)</b>	29 Holstein+ 8 Jersey > 3 Laktation 100%	2 mg s.c. 5 ml Sesamöll < 48 h <i>a.p.</i> keine Wdh.	n/a	Kontrolle: 33% Versuch: 26%
	21 Holstein+ 8 Brown Swiss > 2 Laktation 50%	4 mg i.m. 5 ml Sesamöl < 48 h <i>a.p.</i> keine Wdh.	Getreide, Ca- carbonat <i>ad lib.</i> , Grassilage Ca:P-ratio 5:1# 15000 IU Vit D <sub>3</sub> /d	Kontrolle: 33% Versuch: 10%*
	20 Holstein > 2 Laktation 50%	4 mg i.m. 5 ml Sesamöl < 48 h <i>a.p.</i> keine Wdh.	Grassilage, Maissilage, Maisschrot Ca:P-ratio 2-3:1 15000 IU Vit D <sub>3</sub> /d	Kontrolle: 33% Versuch: 44%*
	16 Holstein n/a 30%	8 mg i.m. 5 ml Sesamöl < 48 h <i>a.p.</i> keine Wdh.	Maissilage, Grassilage, 36% Protein-Vitamin-u. Mineralgemisch Ca:P-ratio 2-3:1 15000 IU Vit. D <sub>3</sub> /d	Kontrolle: 25% Versuch: 13%*
	14 Holstein n/a 55%	8 mg i.m. 5 ml Sesamöl < 48 h <i>a.p.</i> keine Wdh.	Maisilage, Alfalfagrasheu, Getreidemix Ca:P-ratio:2,5:1 15000 IU Vit. D <sub>3</sub> /d	Kontrolle: 50% Versuch: 0%
	14 Holstein n/a 65%	8 mg i.m. 5 ml Sesamöl < 48 h <i>a.p.</i> keine Wdh.	Alfalfagrasheu, Gras- u. Maissilage, Getreidemix 2,5:1 15000 IU Vit. D <sub>3</sub> /d	Kontrolle: 86% Versuch: 43%*
<b>FRANK et al (1977)</b>	571+ 260+ 374+ 359 Holstein u. Jersey > 3 Laktation n/a	0+ 2+ 4+ 8 mg i.m. Maisöl 5-11 d <i>a.p.</i> <sup>Δ</sup> alle 7 d, max. 3x	variabel	0 mg: 42% <sup>+</sup> 2 mg: 28% <sup>+</sup> 4 mg: 20% <sup>+</sup> 8 mg: 20% <sup>+</sup>
<b>JOERGENSEN et al (1978)</b>	94 Holstein > 3 Laktation n/a	4+ 8 mg <i>i.m.</i> 5 ml Sesamöl 2 d <i>a.p.</i> <sup>Δ</sup>	Grassilage <i>ad lib.</i> 1,8 kg Getreide/ d 210 g Ca; 42 g P 15000 IU Vit D <sub>3</sub> /d	Kontrolle: 29% Versuch: 16%*
	175+ 27+ 173+ 79 Holstein u. Brown swiss >3 Laktation n/a	0+ 2+ 4+ 8 mg <i>i.m.</i> 5 ml Maisöl 5 d <i>a.p.</i> <sup>Δ</sup> alle 7 d, max 3x	variabel	0 mg: 43% <sup>o+</sup> 2 mg: 15% <sup>o+</sup> 4 mg: 10% <sup>o+</sup> 8 mg: 6% <sup>o+</sup>

## Legende der Tabelle 4:

- $\Delta$  vor dem errechneten Abkalbedatum
- \*kein Tier innerhalb 72 h bis 10 d *post injektionem*
- #führte zu höherer Gebärpareseinzidenz
- +geringere Inzidenz bei phosphatarmer Diät
- °Tiere, die 72 h bevor oder 10 d nach Injektion gekalbt haben, wurden ausgeschlossen

Gemein ist allen Versuchen, dass die Gebärpareseinzidenz zwar deutlich verringert werden konnte, allerdings auch hier nur in einem gewissen Zeitfenster nach der Verabreichung. Erfolgte die Geburt innerhalb von 72 Stunden nach der Applikation, konnte kein prophylaktischer Effekt nachgewiesen werden (lag time), ebenso wenn mehr als 10 Tage zwischen der 25(OH)D<sub>3</sub>-Gabe und der Geburt lagen. Die Versuchsbedingungen und Resultate dieser Untersuchungen sind in **Tabelle 4** dargestellt. Jorgensen und Mitarbeiter (1978) berichteten, dass der prophylaktische Effekt mit einer phosphorarmen Ration zusätzlich gesteigert werden konnte. Bei den verwendeten Dosierungen zeigte kein Tier Anzeichen einer Vitamin D-Intoxikation. In der Praxis konnte sich diese Art der Gebärpareseprophylaxe aufgrund des unbekanntes Geburtszeitpunkts nicht durchsetzen.

## 2.4 Infusion von Na<sub>2</sub>EDTA als experimentelles Modell für die hypocalcämische Gebärparese

Bereits 1963 wurden intravenöse Infusionen von Na<sub>2</sub>EDTA mit dem Ziel angewendet, die hypocalcämische Gebärparese bei Rindern künstlich zu induzieren (Smith u. Brown, 1963). Obwohl mit der gleichen Zielsetzung auch andere Komplexe, wie EGTA (Blum *et al.*, 1983, Voumard *et al.*, 1984), oder Calciumbinder, wie Natriumcitrat (Naylor u. Forsyth, 1986) und Natriumoxalat, eingesetzt wurden, ist keine dieser Reagenzien im gleichen Ausmaß wie Na<sub>2</sub>EDTA zur Bindung von Calcium in Infusionsexperimenten verwendet worden.

*Chemische Grundlage der EDTA-Infusion:* Das Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure (Na<sub>2</sub>EDTA) ist eine Verbindung, die unter den von Schwarzenbach geprägten Sammelbegriff der Komplexe fällt. Komplexe besitzen die Fähigkeit der Chelatbildung, das heißt, sie können mit Metallkationen

einen stabilen, ringförmigen Komplex bilden. Die Affinität von  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  zu divalenten Kationen ist hoch. Die Komplexstabilität wird durch den pK-Wert der einzelnen Ionen in Lösung bei entsprechendem pH-Wert definiert. Calciumionen haben einen pK-Wert von 10,70, Magnesiumionen von 8,69, Eisenionen 14,4, Kupferionen 18,8 (Harris, 2002). Der pK-Wert ergibt sich aus einem logarithmischen Zusammenhang. Daraus ist ersichtlich, dass unter physiologischen Bedingungen wie im Blut EDTA eine hundertfach höhere Affinität zu Calciumionen im Vergleich zu Magnesiumionen hat. Diese Eigenschaft von  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  wird *in vivo* unter anderem dazu benutzt, Calciumionen aus dem Blut zu chelieren, wobei gut lösliches, ungiftiges Calciummethylen-diamin-tetraacetat ( $\text{CaEDTA}$ ) entsteht. Das so gebundene Calcium steht dem Organismus für physiologische Prozesse nicht mehr zur Verfügung, eine artifizielle Hypocalcämie wird induziert.

*Infusionstechnik:* Bei den durchgeführten  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -Infusionen an Rindern variieren die angewandten Infusionstechniken der einzelnen Autoren stark, so wurden die Tiere bis zum Festliegen infundiert oder sogar bis in das komatöse Stadium überführt. Als Versuchstiere dienten neben Jungrindern auch Bullen sowie laktierende wie nichtlaktierende Kühe.

*Beeinflussung des Calciumspiegels durch die EDTA-Infusion:* Neben der infundierten  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -Gesamtmenge ist die Antwort des Blutcalciumspiegels abhängig von Geschwindigkeit und der Länge der Infusion. Zahlreiche Experimente zeigten, dass der Abfall des Blutcalciumspiegels bei konstanter Infusionsrate einem dreiphasigen Muster folgt. Zu Beginn der Infusion kommt es zunächst zu einem starken Abfall des Blutcalciumspiegels. Anschließend folgt ein Plateau der Calciumkonzentration und bei entsprechend langer Infusion kommt es kurz vor dem Festliegen der Tiere noch einmal zu einem relativ starken Abfall (Desmecht *et al.*, 1995). Der Calciumspiegel folgt diesem Muster vor allem bei Experimenten, die zum Festliegen nach drei bis vier Stunden führten. Bei Verkürzung der Infusionsdauer mit gleicher Infusionsmenge fällt der Blutcalciumspiegel linear ab (Schröter u. Seidel, 1976).

*Beeinflussung des Phosphatspiegels durch die EDTA-Infusion:* Durch die  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -Infusion kommt es nicht nur zum Abfall des Blutcalciumspiegels, sondern auch zur Beeinflussung weiterer Blutparameter. Zahlreiche Autoren berichten von einem

Konzentrationsabfall von anorganischem Phosphat während der Infusion (Payne, 1964; Ramberg *et al.*, 1967; Berger u. Gerber, 1977; Daniel, 1979; Fenwick u. Daniel, 1992; Desmecht *et al.*, 1995; Riond *et al.*, 1997), was den natürlichen Effekten von Milchfieber entspricht (Littledike *et al.*, 1969). Ein möglicher direkter Einfluss von Na<sub>2</sub>EDTA auf den Phosphatgehalt des Blutes wurde ausgeschlossen, da der Phosphatspiegel bei Kühen unverändert bleibt, die simultan mit Na<sub>2</sub>EDTA und Calciumchlorid infundiert wurden (Ramberg *et al.*, 1967). Erklärt wird der Konzentrationsabfall von Phosphat bei hypocalcämischen Kühen durch die Wirkung von PTH auf die renale Phosphatclearance (Blum *et al.*, 1974).

*Beeinflussung des Magnesiumspiegels durch die EDTA-Infusion:* Uneinigkeit herrscht bezüglich des Verhaltens des Magnesiumspiegels. In der Mehrzahl der Infusionsversuche wurde entweder eine unveränderte Konzentration (Payne, 1964; Ramberg *et al.*, 1967; Berger u. Gerber, 1977; Daniel, 1980b; Riond *et al.*, 1997) oder ein geringfügiger Abfall innerhalb der Referenzgrenzen festgestellt (Fenwick u. Daniel, 1992).

*Beeinflussung von Hormonen durch die EDTA-Infusion:* Zwischen Calciumkonzentration und PTH-Spiegel konnte sowohl bei induzierter Hypocalcämie (Ramberg *et al.*, 1967) als auch bei natürlichem Milchfieber (Mayer *et al.*, 1969) ein reziprokes Verhältnis festgestellt werden. Blum und Mitarbeiter (1983) untersuchten den Effekt einer zehnstündigen EGTA-Infusion auf die 1,25(OH)<sub>2</sub>D-Konzentration. Die Autoren konnten einen Anstieg des Vitamin-D-Hormons 12 - 24 Stunden nach Infusionsbeginn nachweisen.

*Sonstige Beeinflussung durch die EDTA-Infusion:* Andere untersuchte Blutparameter und Hormone zeigten keine wesentlichen Konzentrationsänderungen durch die Infusion. Die Konzentrationen von Natrium und Chlorid blieben während spontaner und induzierter Hypocalcämie unverändert (Fenwick u. Daniel, 1992; Desmecht *et al.*, 1995). Festgestellt werden konnte ein erniedrigter Kaliumspiegel (Daniel, 1980a). Der Autor erklärt dieses Phänomen als Folge von hypocalcämischem Stress, bei dem durch einen Anstieg an ACTH nachfolgend neben Glucocorticoiden auch Mineralocorticoide ausgeschüttet werden. Diese vermehrte Freisetzung verursacht eine vermehrte Kaliumeliminierung über die Nieren.

*Klinische Erscheinungen der EDTA-Infusion:* Die typischen klinischen Symptome des Milchfiebers wie Muskelzittern, Anorexie, Obstipation, Reduktion bzw. Fehlen der Vormagenmotilität, Ataxie, Parese und Koma sind in der induzierten Hypocalcämie jederzeit reproduzierbar (Fenwick u. Daniel, 1990).

*Eliminierung der EDTA-Infusion:* Nahezu 100 % des CaEDTA-Komplexes werden durch glomeruläre Filtration mit einer ähnlichen Clearance wie Inulin über die Nieren ausgeschieden. Experimente mit einer extrem schnellen Infusionsrate zeigen, dass die Hälfte der verabreichten Menge des CaEDTA (110 mg/kg) bereits innerhalb von 65 min nach Infusionsbeginn ausgeschieden wird (Aronson u. Ahrens, 1971).

## **2.5 Zusammenfassung der Literatur und daraus resultierende Aufgabenstellung**

Calciumionen spielen im Organismus bei vielen physiologischen Prozessen eine essentielle Rolle. Für höheres Leben ist es deshalb lebensnotwendig, die Blutcalciumkonzentration in engen Grenzen konstant zu halten (siehe **2.1**).

Ein potenter Modulator der Calciumhomöostase ist das Vitamin-D-Hormonsystem. Die Applikation von Vitamin D bzw. dessen Metaboliten führt - zumindest initial - zu einem Anstieg der Blutcalciumkonzentration. Dieser Effekt beruht auf einer erhöhten enteralen Calciumabsorption (siehe **2.1.2**), der Förderung der renalen Reabsorption (siehe **2.1.3**) sowie der Stimulation der ossären Calciummobilisierung (siehe **2.1.3**).

Ferner ist heute bekannt, dass durch das Bestreben des Organismus, den Blutcalciumspiegel konstant zu halten, das Vitamin-D-Hormonsystem durch *feed-forward*-Regulationsmechanismen einer weiteren Eigensynthese aktiv entgegenwirkt (u. a. durch Stimulation der 24 $\alpha$ -Hydroxylase) (siehe **2.1.3**).

Bei der Milchkuh gibt es zwei pathologische Zustände des Calciumstoffwechsels: einerseits ein Abfall des Calciumspiegels (Hypocalcämie) und andererseits ein Anstieg der Calciumkonzentration über physiologische Normalwerte (Hypercalcämie) (siehe **2.2**). Die hypocalcämische Gebärparese der peripartalen Milchkuh stellt aufgrund ihrer hohen Inzidenzrate, deren Prädisposition für Folgeerkrankungen sowie den daran gekoppelten wirtschaftlichen Verlusten ein großes Problem in der modernen Landwirtschaft dar (siehe **2.1.2**). Heutzutage werden mehrere Methoden

für die Prophylaxe der Gebärpause mehr oder weniger erfolgreich eingesetzt (siehe **2.3**). Eine der Methoden beruht auf dem calciumfördernden Effekt des Vitamin-D-Hormonsystems (siehe **2.3.1**). Der Erfolg dieser Prophylaxemethode ist allerdings auf ein spezifisches „Zeitfenster“ nach der Applikation limitiert. Fällt die Abkalbung nicht in diesen Zeitraum, kann keine prophylaktische Wirkung erzielt werden.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Hypothese konzipiert, dass der limitierende Faktor dieser Prophylaxemethode in einer Überdosierung zu suchen ist und dementsprechend die zum heutigen Zeitpunkt aus der Literatur bekannte Gegenregulation vom Organismus einleitet wird.

In den vorliegenden Versuchen sollen zunächst mit Hilfe einer Dosis-Wirkungs-Kurve zwei 25(OH)D<sub>3</sub>-Dosierungen gesucht werden. Eine tägliche Dosierung soll noch nicht oder nur marginal zu einem Anstieg der Blutcalciumkonzentration führen. Dabei wird angenommen, dass diese Dosierung die Calciumhomöostase positiv unterstützt, ohne im bovinen Organismus eine Gegenregulation zu induzieren. Zusätzlich wird eine weitere Dosierung ausgewählt, die entsprechend der Literatur einen deutlichen Effekt auf dem Blutcalciumspiegel hat (Induktion einer Hypercalcämie).

Im zweiten Versuchsabschnitt sollen die ermittelten Dosierungen auf ihre Wirksamkeit überprüft werden. Der Effekt der 25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung bei den unterschiedlichen Dosierungen auf die Calciummobilisierungsfähigkeit soll mit Hilfe von Na<sub>2</sub>EDTA-Infusionen kontrolliert werden. Die Infusion mit Na<sub>2</sub>EDTA induziert eine artifizielle Hypocalcämie und dient als experimentelles Modell der hypocalcämischen Gebärpause (siehe **2.4**).

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Arbeitshypothese zu prüfen, dass die mögliche prophylaktische Wirkung von Vitamin D bzw. dessen Metaboliten maßgeblich durch die Dosis bestimmt wird. Bei einer Verifizierung der Arbeitshypothese ergibt sich ein neuer Ansatz für diese Prophylaxemethode.