

## DISKUSSION

---

Die Zielstellung der Arbeit zentriert sich um die Fragestellung einer qualitativen und nicht zuletzt auch quantitativen Auswirkung von 25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung auf die Calciummobilisierungsfähigkeit der Versuchstiere. Die unter diesem Gesichtspunkt geführte Diskussion der aus den Versuchen gewonnenen Erkenntnisse erfolgt in drei Abschnitten.

1. Als erstes wird der Effekt der zehntägigen Supplementierung auf die analysierten Serumparameter näher betrachtet (siehe **5.1**). Hierzu dienen die gewonnenen Resultate aus den Versuchsreihen der Dosis-Wirkungskurven und den Calciummobilisierungsversuchen (Gesamttag).
2. Im zweiten Abschnitt wird die hier verwendete Methode diskutiert, die benutzt wurde, um die Calciummobilisierungsfähigkeit der Versuchstiere zu überprüfen (Induktion der Hypocalcämie durch Na<sub>2</sub>EDTA) (siehe **5.2**).
3. Im dritten Abschnitt sollen die Auswirkungen der beiden gewählten Dosierungen auf die Calciummobilisierungsfähigkeit besprochen werden, d. h. die Calciummobilisierungsversuche am dritten und zehnten Supplementierungstag (siehe **5.3**).

## 5.1 Effekt der oralen Supplementierung von 25(OH)D<sub>3</sub> über zehn Tage auf untersuchte Serumbestandteile

Die orale Supplementierung von 25(OH)D<sub>3</sub> beeinflusst die Serumkonzentrationen von Calcium, Phosphat und Magnesium sowie 25(OH)D<sub>3</sub> selbst. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Dosis-Wirkungskurven- und Calciummobilisierungsversuche über den gesamten zehntägigen Versuchszeitraum diskutiert. In den Versuchsserien wurden vor, während und nach einer Supplementierungsphase Blutproben entnommen und analysiert. Zu beachten ist dabei, dass die Versuchstiere in den Calciummobilisierungsversuchen am dritten und zehnten Tag mit der Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion belastet wurden. Im folgenden Kapitel wird das Verhalten der Elektrolytkonzentrationen nach 25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung anhand der Mittelwerte der Elektrolytkonzentrationen beider Versuchsreihen gemeinsam besprochen.

### 5.1.1 Effekt der 25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung auf die *Calcium*-Konzentration

Die Ausgangs- und Kontrollwerte lagen im Mittel für alle Tiere nahe bei 2,45 mmol/l und somit im physiologischen Referenzbereich (Kraft *et al.*, 1999; Radostitis *et al.*, 2000; Hofmann, 2005; Hartmann u. Meyer, 1994).

Die Supplementierung mit 25(OH)D<sub>3</sub> beeinflusste die Calciumkonzentration im Serum in beiden Versuchsserien. Erhielten die Kühe 25(OH)D<sub>3</sub> mit dem Futter, wurde ein Anstieg der Calciumkonzentration im Serum festgestellt. Dass die Applikation von Vitamin D bzw. dessen Metaboliten zu einem Anstieg der Calciumkonzentration im Serum führt, ist allgemein bekannt. So konnte ein Calciumkonzentrationsanstieg im Serum nach Applikation von Vitamin D (Hibbs u. Pouden, 1955; Gürtler *et al.*, 1977; Karatzias, 1992, Karges *et al.*, 2001), von 25(OH)D<sub>3</sub> (Olson *et al.*, 1973; Frank *et al.*, 1977; Jorgensen *et al.*, 1978) oder 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Gast *et al.*; 1979; Hove u. Kristiansen, 1982 u. 1984) bei Milchkühen festgestellt werden.

Der Anstieg der mittleren Calciumkonzentration wurde in der vorliegenden Arbeit bereits bei der ersten Blutprobenentnahme nach Beginn der Supplementierung (Tag 2) bei den Versuchstieren beobachtet. Dies entspricht der von Horst *et al.*

(2003) für 25(OH)D<sub>3</sub> beschriebenen *lag time* von 8-10 Stunden nach oraler Administration. Diese als *lag time* bezeichnete metabolitspezifische Zeitverzögerung ist die Zeitspanne zwischen Applikation und der biologischen Antwort des Organismus (hier: Anstieg der Calciumkonzentration).

Statistisch signifikante Unterschiede nach Wilcoxon konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe erst ab dem vierten Supplementierungstag festgestellt werden. Dieser statistische Unterschied zeigte sich in den Calciummobilisierungsversuchen sowohl in der 15-mg-Gruppe, als auch bei den Tieren, die täglich 40 mg 25(OH)D<sub>3</sub> erhielten. Es gibt in der Literatur bisher keine Untersuchungen an Rindern, die wie in der vorliegenden Arbeit täglich 25(OH)D<sub>3</sub> mit dem Futter erhalten haben. Dagegen verzeichneten Frank *et al.* (1977) bei einer einmaligen, intramuskulären Verabreichung von 4 bzw. 8 mg 25(OH)D<sub>3</sub> drei Tage nach der Applikation einen maximalen Blutcalciumspiegel. Bei der Untersuchung von Foote und Mitarbeitern (2004), die ebenfalls nur einmalig eine hohe 25(OH)D<sub>3</sub>-Dosis oral verabreichten, war der Calciumspiegel vier Tage nach Applikation maximal angestiegen.

Sowohl bei den Untersuchungsergebnissen der Dosis-Wirkungskurven-Versuche als auch bei den Calciummobilisierungsversuchen war der Blutcalciumanstieg der Versuchstiere von der täglich supplementierten 25(OH)D<sub>3</sub>-Dosis abhängig. Dies geht mit Ergebnissen von Rivera und Mitarbeitern (2005) konform, dass mit höher supplementierter Dosis (10 mg, 100 mg bzw. 1000 mg 25(OH)D<sub>3</sub>) auch eine höhere Calciumkonzentration im Serum nachgewiesen werden konnte.

Nach Beendigung der Supplementierung fällt der mittlere Calciumspiegel bei den Calciummobilisierungsversuchen nicht sofort mit der am folgenden Tag genommenen nächsten Probe wieder ab. Vielmehr ist ein weiterer Anstieg im Mittel an Tag 11 für die 15-mg-Gruppe und an Tag 11 und 12 für die 40-mg-Gruppe zu verzeichnen. Erklärt werden kann der Effekt wiederum durch die *lag time* von 25(OH)D<sub>3</sub>.

*Physiologischer Hintergrund des Effektes von 25(OH)D<sub>3</sub> auf den Calciumspiegel:* Der Anstieg des Calciumspiegels ist Folge der Stimulation der intestinalen Calciumabsorption (siehe **2.1.2**), der ossären Calciummobilisierung (siehe **2.1.4**) bei gleichzeitiger Hemmung der renalen Calciumexkretion (siehe **2.1.3**) durch das Vitamin-D-Hormonsystem. Dieser Effekt von Vitamin D und dessen Metaboliten auf den Calciumspiegel ist seit langem bekannt und wird ausführlich in der Literaturübersicht erläutert.

**Fazit:** Die Supplementierung von 25(OH)D<sub>3</sub> führt zu einem Anstieg der Calciumkonzentration im Serum. Der Anstieg ist dosisabhängig und weist in Abhängigkeit von der Dosis einen unterschiedlichen zeitlichen Verlauf auf.

### 5.1.2 Effekt der 25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung auf die *Phosphat*-Konzentration

Mit der Supplementierung von 25(OH)D<sub>3</sub> stieg neben der Calcium- auch die Phosphatkonzentration im Blutplasma. Die Ausgangs- und Kontrollwerte der Tiere lagen innerhalb von Referenzgrenzen (Kraft *et al.*, 1999; Radostitis *et al.*, 2000; Hofmann, 2005). Der Anstieg war für die 40-mg-Gruppe bei den Calciummobilisierungsversuchen ab dem dritten Supplementierungstag signifikant, für die 15-mg-Gruppe dagegen erst nach Beendigung der Supplementierung. Grundsätzlich schwanken die Phosphatkonzentrationen für einen Versuchszeitpunkt der einzelnen Tiere relativ zueinander, was sich in der Standardabweichung der einzelnen Werte niederschlägt. Die Schwankungsbreiten gelten auch für die Kontrollgruppen. Im Mittel haben die Phosphatanalysen aller Versuchsgruppen ab dem fünften Supplementierungstag Werte über der oberen Referenzgrenze von Kraft *et al.* (1999). Der Effekt, dass durch die Supplementierung von 25(OH)D<sub>3</sub> auch der Phosphatspiegel der Versuchstiere steigt, zeigt sich auch in den Untersuchungen von Olsen *et al.* (1971 u. 1972), Frank *et al.* (1977), Jorgensen *et al.* (1978), Rivera *et al.* (2005), und Cho *et al.* (2006). Ferner dokumentieren die genannten Untersuchungen auch die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Dosisabhängigkeit.

#### *Physiologischer Hintergrund des Effektes von 25(OH)D<sub>3</sub> auf den Phosphatspiegel:*

Die zu erwartende Erhöhung der Phosphatkonzentration im Blut ist eine Folge des komplexen Zusammenspiels der Phosphat- und Calciumhomöostase. Seit langem ist bekannt, dass das Vitamin-D-Hormon sowohl die intestinale Phosphatabsorption (Chen *et al.*, 1974; Yagci *et al.*, 1992) (siehe 2.1.2) als auch die Phosphatfreisetzung aus dem Knochen (Castillo *et al.*, 1975; Ziegler, 2001) stimuliert. Ursprünglich hat man angenommen, dass die Phosphathomöostase durch die calcitropen Hormone quasi „mitreguliert“ wird. Seit kurzem weiß man aber, dass der Phosphatstoffwechsel auch eigene Faktoren zur Regulation besitzt (Quarles, 2003; Blumsohn, 2004). Als

ein Hauptkandidat dieser so genannten „Phosphatonins“ gilt der *fibroblast growth factor 23* (FGF-23) (Ito *et al.*, 2005).

Die Überexpression des FGF-23-Gens führt zu reduzierten Phosphat- und  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen, während sich bei Ausschaltung des Gens bei Mäusen Hyperphosphatämie und Weichteilgewebeverkalkung diagnostizieren lässt (Razzaque *et al.*, 2005).

Als funktioneller Angriffspunkt dient die Niere. So hemmt FGF-23 einerseits die renale Phosphatreabsorption durch Aktivitätshemmung des Natrium-Phosphat-Cotransporters (Saito *et al.*, 2003; Cunningham *et al.*, 2005). Und andererseits zeigen *in vivo* Versuche an Mäusen, dass eine FGF-23-Injektion zur Reduktion der Vitamin-D-Hormonkonzentration führt, indem die Expression der entsprechenden Schlüsselenzyme reguliert wird (Shimada *et al.*, 2004 u. 2005).

Dagegen wird durch das Vitamin-D-Hormon die FGF-23-Genexpression in Osteoblasten erhöht (Kolek *et al.*, 2005), was wiederum der weiteren Eigensynthese entgegenwirkt (*feed-forward-loop*).

Allerdings ist das exakte Zusammenspiel der drei Hormone Vitamin D, PTH und FGF-23 sowie dessen relativer biologischer Beitrag in der Phosphathomöostase heutzutage noch nicht vollständig geklärt (Berndt *et al.*, 2005).

**Fazit:** Die Supplementierung von  $25(\text{OH})\text{D}_3$  führt zu einem Anstieg der Phosphatkonzentration im Serum. Der Anstieg ist dosisabhängig.

### 5.1.3 Effekt der $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Supplementierung auf die *Magnesium*-Konzentration

Im Gegensatz zu der Calcium- bzw. Phosphatkonzentration fällt die Magnesiumkonzentration innerhalb der zehntägigen Supplementierungsperiode bei den Versuchstieren tendenziell ab. Ausgangs- und Kontrollwerte lagen in den von Kraft *et al.* (1999); Radostitis *et al.* (2000) und Hartmann u. Meyer, (1994) definierten Referenzbereichen.

Mit steigender  $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Dosis und Verlängerung der Supplementierungsdauer fällt der Magnesiumgehalt im Serum. So ist in den Calciummobilisierungsversuchen bei der höchsten Supplementierung von 40 mg  $25(\text{OH})\text{D}_3$  eine mittlere Magnesium-

konzentration von 0,68 mmol/l an Tag 10 der Supplementierung zu verzeichnen. Dieser Wert stellt den minimalsten Wert von Magnesium dar und ist statistisch betrachtet der einzige signifikante Unterschied. Er liegt unterhalb der von Kraft *et al.* (1999) festgelegten unteren Referenzgrenze, befindet sich jedoch immer noch oberhalb der unteren Referenzgrenzen von Hofmann (2005). Nach Hofmann ist ein Magnesiumwert von 0,6 mmol/l, die untere Referenzgrenze. Dieser Wert wird in der vorliegenden Arbeit im Mittel nie unterschritten. Der Effekt der 25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung auf den Magnesiumspiegel bei Rindern war im Gegensatz zur Calcium- und Phosphatkonzentration weit seltener Gegenstand von Untersuchungen. Aber ähnliche Tendenzen zeigten sich auch in den Arbeiten von Olsen *et al.* (1971 u. 1972), Frank *et al.* (1977) und Karges *et al.* (2001), ohne aber statistisch signifikant zu sein.

*Physiologischer Hintergrund des Effektes von 25(OH)D<sub>3</sub> auf den Magnesiumspiegel:* Calcium- und Magnesiumhomöostase sind ebenso miteinander verknüpft wie die homöostatische Verknüpfung von Calcium und Phosphat. Die Aufgrund des Unvermögens der Niere zwischen den beiden zweiwertigen Kationen zu unterscheiden (Giebisch u. Windhager, 2003), sinkt die Magnesiumkonzentration im Plasma mit steigender Calciumkonzentration. Der Hauptort für die Magnesiumausscheidung ist der dicke aufsteigende Ast der Henle-Schleife (Quamme u. Rouffignac, 2000). Hier wird Magnesium wahrscheinlich parazellulär durch das *tight junction*-Protein Claudin-16 reabsorbiert. Neuesten Erkenntnissen zufolge moduliert ein basolateral liegender CaS-Rezeptor die Magnesiumreabsorption via Claudin-16 (Günzel, 2006). An diesen CaS-Rezeptor können sowohl Ca<sup>2+</sup>- als auch Mg<sup>2+</sup>-Ionen binden. Als Folge reduzieren sowohl hohe Magnesiumkonzentrationen als auch hohe Calciumkonzentrationen im Plasma die Magnesiumreabsorption in der Niere (Giebisch u. Windhager, 2003). Aufgrund einer Hypercalcämie kommt es folglich zu einer vermehrten Magnesiumausscheidung mit dem Harn.

Doch die Elektrolyte beeinflussen sich nicht nur gegenseitig. Die calcitropen Hormone besitzen auch einen eigenständigen Einfluss im Magnesiumhaushalt. Von PTH ist bekannt, dass das Hormon die renale Reabsorption, die enterale Absorption und die Freisetzung von Magnesium aus dem Knochen stimuliert (Dua *et al.*, 1994; Zofkova u. Kancheva, 1995). Auch Vitamin D und dessen Metabolite besitzen einen

geringen, aber direkten Effekt im Magnesiumhaushalt. So zeigten Versuche an Ratten, dass Vitamin D-Metabolite die intestinale Magnesiumabsorption geringfügig stimulieren (Levine *et al.*, 1980). Entsprechend war die Magnesiumresorption in Vitamin D-Mangel-Ratten reduziert (reversibel) (Kimura, 2007). Aufgrund der hier vorliegenden Resultate sowie den oben erwähnten Untersuchungen scheint dieser Effekt von Vitamin D in der Magnesiumhomöostase aber von untergeordneter Rolle zu sein.

*Die Rolle von Magnesium in der Gebärpareseprophylaxe:* Die Rolle von Magnesium in der Calciumhomöostase war Gegenstand von Untersuchungen mit induzierter Hypocalcämie. Dabei zeigte sich, dass hypomagnesämische Rinder in ihrer Calciummobilisierungsfähigkeit im Vergleich zur Kontrolle eingeschränkt waren (Davies *et al.*, 1978; Contreras *et al.*, 1982; van Braak *et al.*, 1986).

Von hypomagnesämischen Patienten ist bekannt, dass die Freisetzung von PTH vermindert ist (Kimura, 2007). Ferner ist die biologische Antwort auf PTH in den Zielorganen Niere und Knochen eingeschränkt (MacManus *et al.*, 1971, Oberleithner, 2001). Ratten, in deren Diät der Magnesiumgehalt um 50 % reduziert wurde, zeigten reduzierte Mineralisierung und vermindertes Volumen der trabekulären Knochen sowie signifikant niedrigere Vitamin-D-Hormonspiegel als die Kontrolltiere (Rude *et al.*, 2006). Van Mosel *et al.* (1991) zeigte, dass ein Magnesiummangel in der Trockenstehphase eine Reduktion der ossären *turn over*-Rate zur Folge hat.

Lean und Mitarbeiter (2006) konnten in einer aktuellen Meta-Analyse mit über 2500 Milchkühen einen statistischen Zusammenhang dergestalt zeigen, dass mit steigender Magnesiumkonzentration in der Ration die Gebärpareseinzidenz sank.

Von Menschen mit Hypoparathyreose, Rachitis oder Malabsorptionssyndrom ist bekannt, dass der calcämische Effekt des Vitamin-D-Hormonsystems (auch in hohen Dosen) bei Magnesiummangelernährung deutlich abgeschwächt wird (Kimura, 2007).

**Fazit:** Die Supplementierung von 25(OH)D<sub>3</sub> führt zu einem Abfall der Magnesiumkonzentration im Serum. Der Abfall ist dosisabhängig.

#### 5.1.4 Effekt der 25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung auf die 25(OH)D<sub>3</sub>-Konzentration

Der Effekt der 25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung auf dessen Plasmaspiegel wurde exemplarisch nur für ein Versuchstier untersucht. Allein bei der ersten entnommenen Blutprobe befand sich die 25(OH)D<sub>3</sub>-Konzentration dieser Kuh innerhalb der von Horst *et al.* (2003) definierten Referenzgrenze von 30-50 ng/ml. Ebenso hatten unbehandelte Kühe bei Frank *et al.* (1977) eine 25(OH)D<sub>3</sub>-Serumkonzentration von 43 ng/ml, bei Koshy *et al.* (1976) 48 ng/ml und bei Hollis *et al.* 45 ng/ml (1977).

In der vorliegenden Untersuchung konnte die 25(OH)D<sub>3</sub>-Konzentration durch die Supplementierung von 25(OH)D<sub>3</sub> wie erwartet im Plasma angehoben werden. Bei einer Untersuchung an vier Kühen erreichte die Serumkonzentration an Tag 2 ihren Maximalwert und war 40 Tagen nach einer einmaligen, oralen 25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung auf Normalniveau (Frank *et al.*, 1977). Der Anstieg ist dosisabhängig von der 25(OH)D<sub>3</sub>-Konzentration, was sich auch in der Untersuchung von Wertz und Mitarbeitern (2004) zeigte. Um *carry-over*-Effekte zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit zwischen den einzelnen Versuchsabschnitten eine Pause von 21 Tagen eingehalten. Das Ergebnis der 25(OH)D<sub>3</sub>-Analyse zeigt, dass diese Zeitspanne für die untersuchte Kuh nicht ausgereicht hat, um die 25(OH)D<sub>3</sub>-Serumkonzentration wieder auf ihr entsprechendes Ausgangsniveau absinken zu lassen. So scheinen die einzelnen Supplementierungen einen aufschaukelnden bzw. additiven Effekt zu verursachen. Das Versuchsdesign des nicht zuletzt aus diesem Grund gewählten lateinischen Quadrates sorgt jedoch für eine weitgehende Durchmischung des Effektes, so dass er in der Gesamtauswertung in erster Näherung vernachlässigt werden kann. Es muss aber betont werden, dass sich die 25(OH)D<sub>3</sub>-abhängigen Veränderungen der Konzentrationen von Calcium, Phosphat und Magnesium in jedem Fall vor Beginn der nächsten Supplementierung wieder normalisiert hatten.

*Physiologischer Hintergrund des Effektes der 25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung auf den 25(OH)D<sub>3</sub>-Spiegel:* Wie in der Literaturübersicht (2.1.1) beschrieben, ist die 25(OH)D<sub>3</sub>-Serumkonzentration einerseits abhängig von der Fütterung und andererseits von der endogenen Synthese mit Hilfe von UV-Exposition. Im Freien gehaltene Kühe hatten bei äquivalenter Fütterung in den Sommermonaten im



Vergleich zu den Wintermonaten mehr als doppelt so hohe Konzentrationen (Hidioglou *et al.*, 1979, Flachowsky *et al.*, 1993).

**Fazit:** Die Supplementierung von 25(OH)D<sub>3</sub> führt bei dem untersuchten Versuchstier zu einem Anstieg der 25(OH)D<sub>3</sub>-Konzentration im Serum. Der Anstieg ist dosisabhängig.

## 5.2 Die Infusion von Na<sub>2</sub>EDTA als Modell der hypocalcämischen Gebärparese

Nachfolgend soll diskutiert werden, wie die analysierten Serumparameter sich im Allgemeinen während und nach der Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion verhalten. Ferner soll ein kritischer Blick auf die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode geworfen werden.

### 5.2.1 Allgemeines Verhalten der untersuchten Serumparameter während und nach der Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion

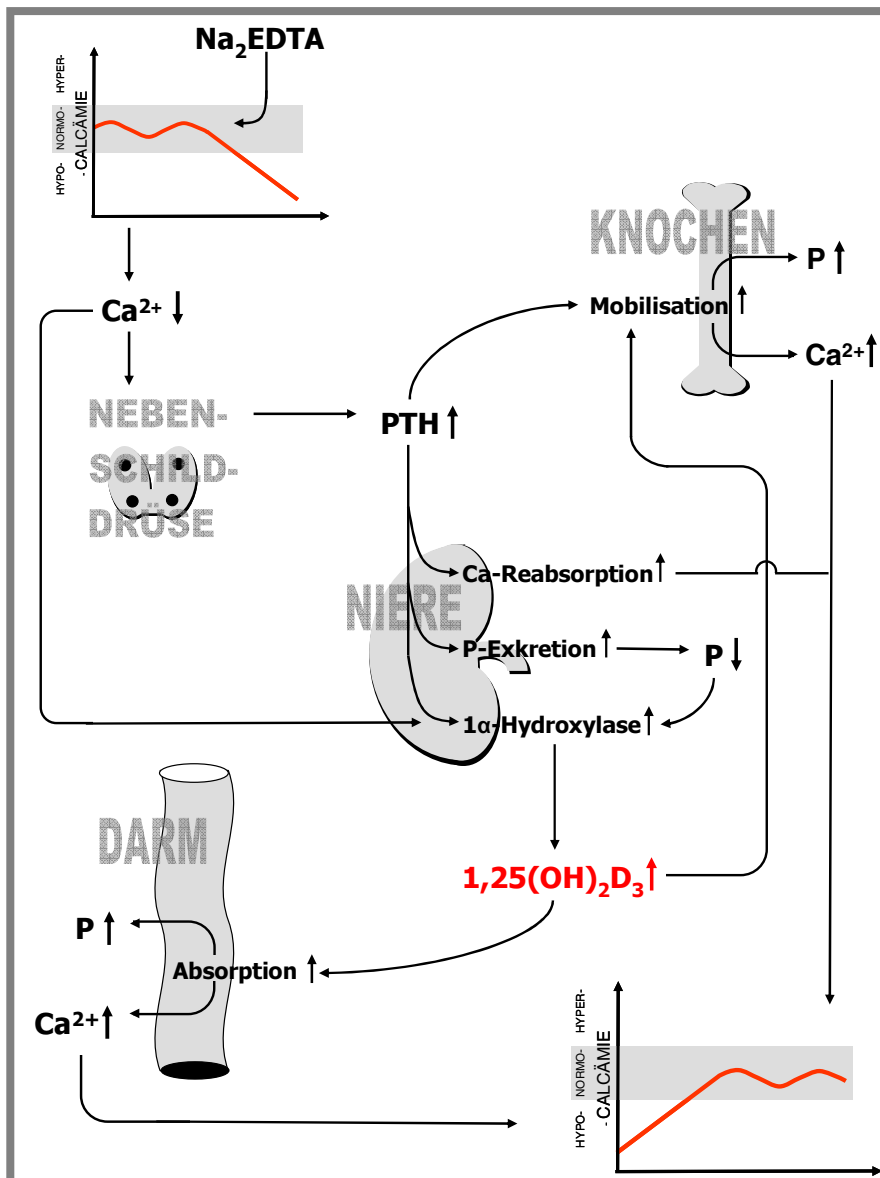
*Calcium:* Na<sub>2</sub>EDTA ist ein Komplexon und cheliert Calciumionen im Blut der Versuchstiere. So gebunden stehen die Calciumionen dem Organismus für physiologische Prozesse nicht mehr zur Verfügung und es entsteht eine artifizielle Hypocalcämie. Entstandenes CaEDTA wird mit dem Harn schnell ausgeschieden.

Die Na<sub>2</sub>EDTA-Infusionen wurden erfolgreich mit der Motivation eingesetzt, die Calciumkonzentration im Serum zu senken. In allen 48 durchgeführten Infusionsversuchen konnte der Calciumspiegel im Blut der Kühe gesenkt werden. Dieser Effekt der Infusionsversuche wurde bereits zahlreich untersucht und dokumentiert (siehe **2.4**).

Der Organismus reagiert bereits während der Infusion mit dem Ziel, die Calciumkonzentration in engen Grenzen konstant zu halten, Calcium zu mobilisieren und dadurch den Calciumspiegel wieder zu heben (**Abb. 54**). Dementsprechend steigt die Calciumkonzentration mit der Beendigung der Infusion sowohl in den

Experimenten der vorliegenden Arbeit als auch in den aus der Literatur bekannten Studien an.

In vorliegender Studie fällt der Calciumspiegel der Tiere mit der Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion und steigt nach Beendigung der Infusion wieder an. Der Grad des Konzentrationsabfalls während der Infusion sowie die Geschwindigkeit des Anstieges nach Infusionsende sind Indikatoren für die Calciummobilisierungsfähigkeit des Versuchstiers. Je mehr Calcium durch endogene Mobilisierung aus dem Knochen bzw. enteraler Absorption zur Verfügung steht, umso geringer ist der hypocalcämische Effekt der Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion. Das allgemeine Verhalten während und nach der Infusion war in den hier durchgeführten Infusionsversuchen identisch. Die Versuchstiere zeigten jedoch unterschiedliche Grade der endogenen Calciummobilisierungsfähigkeit (siehe 5.4).



**Abb. 54:** Schematische Darstellung der regulierenden Mechanismen des Calcium- und Phosphathaushaltes nach einem Abfall der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Serum. Es ist jedoch nicht bekannt welche Mechanismen direkt zur akuten Kompensation während des Versuches beitragen (siehe 5.2.3).

*Phosphat:* Auch die Phosphatkonzentration im Serum der Versuchstiere nahm innerhalb der dreistündigen Infusion ab. Den Effekt erklärt Blum *et al.* (1974) durch die renale Wirkung von PTH. Die Nebenschilddrüse antwortet auf den durch die Infusion sinkenden Calciumspiegel mit vermehrter Ausschüttung von PTH. In der Niere hemmt dann das PTH-Hormon u.a. die tubuläre Rückresorption von Phosphat (**Abb. 53**). Indirekt eingeleitet durch die EDTA-Infusion sinkt dementsprechend der Phosphatspiegel, einen direkten Effekt der Infusion auf die Phosphatkonzentration konnten Ramberg *et al.* (1967) ausschließen. Ein Absinken des Phosphatgehaltes während einer Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion entspricht den Beobachtungen aller Studien mit ähnlichem Versuchsaufbau (Payne, 1964; Ramberg *et al.*, 1967; Berger u. Gerber, 1977; Daniel, 1979; Fenwick u. Daniel, 1992; Desmecht *et al.*, 1995; Riond *et al.*, 1997).

Nach Infusionsende steigt die mittlere Phosphatkonzentration nur langsam wieder an. Physiologischer Hintergrund dieses Effekts ist die Reduktion der renalen PTH-Wirkung, da mit steigender Calciumkonzentration entsprechend die PTH-Freisetzung sinkt. Zeitlich verzögert ist die Freisetzung von Phosphatverbindungen aus dem Knochen sowie die durch das Vitamin-D-Hormon vermittelte, erhöhte Phosphatabsorption aus dem Darm an dem Anstieg der Phosphatkonzentration beteiligt (**Abb. 53**).

*Magnesium:* Während und nach der Infusion konnten in dieser Studie kaum Veränderungen beim Magnesiumspiegel beobachtet werden. Dies entspricht den Untersuchungen von zahlreichen anderen Autoren (Payne, 1964; Ramberg *et al.*, 1967; Berger u. Gerber, 1977; Daniel, 1980b; Riond *et al.*, 1997). Ein geringfügiger Abfall der Magnesiumkonzentration innerhalb der Referenzgrenzen, wie von Fenwick und Daniel (1992) berichtet, konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden.

**Fazit:** Durch Infusion mit Na<sub>2</sub>EDTA sinkt die Calcium- und Phosphatkonzentration im Serum.

Nach Infusionsende steigt der Calciumspiegel durch endogene Calciummobilisierung. Der Grad des Calciumabfalls während der Infusion sowie der des Calciumanstieges danach entsprechen der Calciummobilisierungsfähigkeit des Versuchstiers.

Auf die Magnesiumkonzentration konnte kein Effekt der Infusion nachgewiesen werden.

## 5.2.2 Die Beeinflussung der Calciumhomöostase durch die Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion - Eine numerische Abschätzung

Im Folgenden soll am Beispiel einer 700 kg schweren Kuh abgeschätzt werden, welchen relativen Einfluss die Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion auf den Calciumstoffwechsel hat.

**Frage:** Wie viel Gramm Calciumionen wird dem Calciumstoffwechsel durch die Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion entzogen?

**Rechnung:**

- In der vorliegenden Arbeit wurde den Versuchstieren 1 ml einer 4,7%ige Na<sub>2</sub>EDTA-Lösung pro Kilogramm Körpergewicht über drei Stunden infundiert.
- Die Kuh wiegt 700 kg, d. h. sie erhält 700 ml Infusionslösung in drei Stunden.
- Da die Infusionslösung 4,7% Na<sub>2</sub>EDTA enthält, erhält die Kuh über 3 Stunden 32,90 g Na<sub>2</sub>EDTA.
- Na<sub>2</sub>EDTA (Na<sub>2</sub> plus C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) hat eine Molmasse von 338,23 g/mol. Folglich entsprechen 32,90 g Na<sub>2</sub>EDTA 97,27 mmol.
- Ein Mol Na<sub>2</sub>EDTA cheliert ein Mol Calciumionen. Gebunden werden also 97,27 mmol Calciumionen. Calcium hat eine Atommasse von 40,08 u, entsprechend werden 3,89 g Calciumionen durch die Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion cheliert.

**Antwort:** Durch die dreistündige Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion werden bei einer Kuh mit 700 kg Körpergewicht knapp 4 g ionisiertes Calcium gebunden. Das entspricht 1,3 g ionisiertes Calcium pro Stunde. Sie stehen dem bovinen Organismus für physiologische Prozesse nicht mehr zur Verfügung. Das entstandene CaEDTA wird schnell über den Harn ausgeschieden.

Um die Belastung des Calciumstoffwechsels durch die Infusion mit dem Calciumverlust einer peripartalen Kuh in Relation zu setzen, wurde nachfolgend der durchschnittliche Calciumverlust über das Kolostrum berechnet. Laut Huth (1995) produziert eine Schwarzbunkuh in den ersten 24 Stunden nach der Geburt durchschnittlich 15 l Kolostrum. Dieser Wert gilt für eine Kuh in der zweiten Laktation

mit einer 305-Tageleistung von lediglich 6000 l. Ältere Kühe mit höherer Leistung produzieren entsprechend größere Mengen an Biestmilch.

**Frage:** Wie viel Gramm Calcium wird dem Calciumstoffwechsel einer peripartalen Kuh durch Kolostralmilchbildung entzogen?

**Rechnung:**

- Ein Liter Kolostralmilch enthält ca. 2 g Calcium (Bojkovski *et al.*, 2005).
- Folglich muss der bovine Organismus 30 g Calcium in den ersten 24 Stunden für die Kolostralmilchbildung zur Verfügung stellen. Das entspricht 1,3 g Calcium pro Stunde.

**Antwort:** Durch den peripartalen Einsatz der Laktation verliert die Mutterkuh ca. 1,3 g Calcium pro Stunde.

Die Calciumverlusten (1,3 g Calcium pro Stunde) während der Infusion bzw. der Kolostralmilchbildung stimmen in der oben durchgeführten numerischen Approximation überein. Entsprechend konnte in der vorliegenden Arbeit durch bzw. während der dreistündigen Infusion der Calciumverlust einer peripartalen Kuh gut nachgeahmt werden.

**Fazit:** Der Calciumverlust während der Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion entspricht in Abschätzung der Calciumverluste für eine peripartale Kuh, die 15 l Kolostrum produziert.

### 5.2.3 Überlegungen zur Herkunft des mobilisierten Calciums

Normalerweise befindet sich der Calciumstoffwechsel bei gesunden, adulten Tieren im Gleichgewicht, d.h. die Calciumaufnahme entspricht den Calciumverlusten. Mit Beginn der Laktation bzw. der Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion steigt der Calciumverlust abrupt an und führt so zu einer Dysbalance im Calciumhaushalt. Theoretisch gibt es für den Organismus drei Möglichkeiten, um den Calciumverlust auszugleichen. Denkbar wäre eine Erhöhung der exogenen Calciumzufuhr über die Nahrung sowie eine

Steigerung der endogenen Mobilisation aus dem Knochen. Ferner könnte der Organismus den Calciumspiegel wieder normalisieren, indem die Calciumverluste reduziert werden, also durch Förderung der renalen Calciumretention oder Reduktion des endogenen, fäkalen Calciumverlustes. Die folgenden Überlegungen dienen dazu, die Herkunft des mobilisierten Calciums nach der Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion näher einzugrenzen.

Im Darm erfolgt die Steuerung der Calciumabsorptionsrate - und somit der exogenen Calciumaufnahme - durch Regulation der Gentranskription der Calciumtransportproteine (siehe 2.1.1). Ein Auffüllen des Calciumpools über diesen Weg kann also nur mit zeitlicher Verzögerung eintreten. Die renale Calciumausscheidung ist beim Rind mit weniger als ein Gramm Calcium pro Tag *per se* nur eine Stellgröße mit geringem Einfluss (Goff *et al.*, 1987). Der endogene fäkale Calciumverlust ist laut Martz *et al.* (1999) eine konstante Größe und kaum beeinflussbar. Folglich ist die Mobilisierung von Calciumionen aus dem Knochen der dominierende Faktor in der schnellen Calciumfreisetzung. Die relativ schnell verfügbare össäre Calciumreserve wird bei der adulten Kuh auf 6 - 10 g geschätzt (Vagg u. Payne, 1970).

**Fazit:** Höchstwahrscheinlich ist die Quelle des mobilisierten Calciums nach der Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion der schnell verfügbare, labile Calciumpool des Knochengewebes.

#### 5.2.4 Unterschied zwischen der Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion und der Gebärparese

Die Elektrolytkonzentrationen in der hier induzierten Hypocalcämie und in natürlichen Fällen der Gebärparese verhalten sich identisch (siehe 5.2.1 und 2.2.1)

In der Praxis erkranken Milchkühe peripartal an Milchfieber. Die Mutterkuh unterliegt geburtsnah komplexen, hormonellen Veränderungen. So steigen unter anderem die Konzentrationen an Östrogen und Wachstumshormonen (GH), während der Progesterongehalt im Serum fällt. Von diesen drei Hormonen ist bekannt, dass sie die Calciumhomöostase beim Menschen beeinflussen.

Gut beschrieben ist die Tatsache, dass ein Mangel an Östrogenen zu einem erhöhten össären *turn-over* mit anschließendem Knochensubstanzabbau führt. Dieser Mechanismus führt bei der postmenopausalen Frau zum Krankheitsbild der

Osteoporose (Michael *et al.*, 2005). Es wurden auch entsprechende Untersuchungen an Kühen durchgeführt. Muir und Mitarbeiter (1972) untersuchten den Effekt von Östrogen- und Progesteronapplikationen auf die Knochenresorption während der Na<sub>2</sub>EDTA-induzierten Hypocalcämie. Kühe, die eine Woche vor der Infusion mit diesen Hormonen behandelt wurden, zeigten keinen Effekt auf die Knochenresorption, dargestellt durch die renale Hydroxyprolinexkretion. Sechen und Mitarbeiter (1988) zeigten bei der Untersuchung von 14 Kühen, dass die Tiere, die festlagen, eine Tendenz zu höheren Estradiol-Konzentrationen hatten. Ferner ist auf zellulärer Ebene bekannt, dass Östrogene die Gentranskription der enteralen Calciumtransporter stimulieren (Van Cromphaut *et al.*, 2003).

Versuche an hypophysenektomierten Mäusen zeigten, dass anscheinend auch das Wachstumshormon eine Rolle spielt. Bei Phosphatmangelernährung von ektomierten Mäusen konnte die 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Konzentration nur durch GH-Applikation aufrecht gehalten werden, da scheinbar dadurch die renale 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Synthese stimuliert wurde (Gray u. Garthwaite, 1985).

In der vorliegenden Arbeit entsprach das klinische Bild mit Muskelzittern dem der beginnenden Gebärparese. Spätere klinische Anzeichen konnten nicht verglichen werden, da in diesem Fall die Infusion vorzeitig abgebrochen wurde. Bei einem Vergleich von Fenwick und Daniel (1990) konnten jedoch identische klinische Anzeichen bei natürlicher und induzierter Hypocalcämie festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich durch Na<sub>2</sub>EDTA gut eine artifizielle Hypocalcämie induzieren lässt. Die Hochträchtigkeit, die Geburt und der Beginn der Laktation mit all deren komplexen, hormonellen Veränderungen lassen sich durch diesen Versuchsaufbau mit trockenstehenden Tieren allerdings nicht simulieren.

Der Vorteil des gewählten Versuchsdesigns ist, dass durch die Wahl trockenstehender Versuchskühe die Tiere sowohl als Versuchskühe als auch als Kontrolltiere dienen können. Dadurch ist es möglich, die Calciummobilisierungsfähigkeit einer Kuh mit und ohne 25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung direkt miteinander zu vergleichen.

**Fazit:** Die Infusion von Na<sub>2</sub>EDTA induziert in adäquater Weise eine artifizielle Hypocalcämie. Der Elektrolytstatus entspricht dem der an Gebärparese erkrankten Kuh. Der komplexe Hormonstatus zum Zeitpunkt der Geburt kann dabei aber nicht simuliert werden.

### 5.2.5 Die Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion als Stimulans für Calciumhomöostase

Seit langem ist bekannt, dass eine Calciumreduktion im Futter *a.p.* eine wirksame, aber in der Praxis kaum umsetzbare Gebärpareseprophylaxe darstellt (Goff *et al.*, 1987). Diese Methode bringt die Kuh in eine negative Calciumbalance, wodurch die Mechanismen der Calciumhomöostase direkt stimuliert werden. Die Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion selbst kann demnach ebenso ein Stimulus für homöostatische Mechanismen darstellen, was bei wöchentlicher Wiederholung der Infusion am selben Versuchstier durch eine höhere Calciummobilisierungsrate bei der Wiederholung zum Ausdruck kommen würde (Mellau u. Jorgensen, 2003).

Vergleicht man die Kontrollgruppen in der hier vorliegenden Arbeit von Tag 3 und Tag 10, läßt sich feststellen, dass die Kontrolltiere tendenziell an Tag 10 nach der Infusion schneller Calcium mobilisieren als am Tag 3 der Supplementierung. Dieser Trend zur höheren Mobilisierungsrate ist jedoch nicht statistisch signifikant.

**Fazit:** Grundsätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion die Calciumhomöostase selbst stimuliert. Die Infusion mit Na<sub>2</sub>EDTA ist in der Fachwelt als experimentelles Modell der Gebärparese akzeptiert (Jorgensen *et al.*, 1999).



### **5.3 Einfluss der oralen Supplementierung von 25(OH)D<sub>3</sub> auf die Calciummobilisierungsfähigkeit**

Der Einfluss der oralen Supplementierung auf die Calciummobilisierungsfähigkeit wurde mit Hilfe von Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion überprüft. Dabei wurde untersucht, wie der Calciumspiegel der Versuchsgruppen sich im Vergleich zu dem der Kontrolltiere während und nach dem Versuch verhält. Ferner wurde kontrolliert, ob klinische Anzeichen der Gebärpause auftreten. Gegebenenfalls wurde die Infusion abgebrochen. Bedingt durch das Versuchsdesign wurde jede Kuh sowohl in der 15 mg-, der 40-mg-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe als Versuchstier genutzt. Die Versuchsgruppen wurden jeweils an Tag 3 und an Tag 10 der Supplementierung auf ihre Calciummobilisierungsfähigkeit untersucht. Im Folgenden wird, sofern nicht anders erwähnt, von Mittelwerten gesprochen. Die Einzeltiere sind detailliert im Ergebnisteil aufgeführt.

#### **5.3.1 Effekt der 15-mg-25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung auf die Calciummobilisierungsfähigkeit**

Mit Hilfe der Dosis-Wirkungskurve wurde eine tägliche 25(OH)D<sub>3</sub>-Dosierung gesucht, die den Calciumspiegel nur geringfügig anhebt. Als maximale Grenze wurde dabei der obere physiologische Referenzwert von Kraft *et al.* (1999) von 2,80 mmol/l gewählt. Der mittlere Calciumspiegel der vier Tiere in den Dosis-Wirkungskurven-Versuchen hatte für 25(OH)D<sub>3</sub>-Dosis von 10 mg einen Maximalwert von 2,70 mmol/l und für 20 mg 25(OH)D<sub>3</sub> einen von 2,83 mmol/l. Zur Überprüfung der Calciummobilisierungsfähigkeit wurde schlussendlich eine tägliche Supplementierung von 15 mg 25(OH)D<sub>3</sub> gewählt. Die 15 mg-Dosis wurde in der Erwartung gewählt, dass ein Calciumspiegel innerhalb der Referenzgrenzen keine Gegenregulation induziert.

*Effekt der 15 mg-25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung am dritten Supplementierungstag:* Am dritten Supplementierungstag war der Calciumspiegel der Versuchstiere, die täglich 15 mg 25(OH)D<sub>3</sub> mit dem Futter erhalten haben, im Vergleich zu dem der Kontrolltiere nur gering angestiegen. So hatten an diesem Tag zu Beginn der Na<sub>2</sub>EDTA-Infusion die 15-mg-Gruppe eine mittlere Calciumkonzentration von 2,43 mmol/l, die der Kontrolle lag dagegen bei 2,35 mmol/l.

Die Calciumkonzentration der 15 mg-Kühe ist durch die anschließende dreistündige Infusion im Mittel um 0,37 mmol/l gesunken. Für die Kontrolltiere konnte dagegen ein Absinken des Calciumgehaltes um 0,48 mmol/l festgestellt werden. Damit betrug der Minimalwert der 15-mg-Gruppe 2,06 mmol/l, wogegen der Calciumgehalt der Kontrolltiere auf bis zu 1,87 mmol/l absank. In der vorliegenden Arbeit wurde der dimensionslose Koeffizient  $\epsilon_{\text{Calcium}}$  eingeführt, um einen aussagekräftigen Zahlenwert hinsichtlich des Verhaltens des Calciumspiegels während und nach der Infusion zu haben (siehe 3.5). Für den dritten Supplementierungstag hatte die 15-mg-Gruppe *intra infusionem (I.I.)* einen  $\epsilon_{\text{Calcium,I.I.}} = 0,11$ , während sich der Koeffizient der stärker abfallenden Kontrollgruppe zu  $\epsilon_{\text{Calcium,I.I.}} = 0,14$  bestimmen ließ. Die Kuh Nr. 8 zeigte nach 90 min Infusion klinische Anzeichen der Hypocalcämie, weshalb die Infusion zu diesem Zeitpunkt abgebrochen wurde.

Nach Infusionsende erholte sich der Calciumspiegel der Versuchstiere, die mit 15 mg supplementiert worden waren, im Mittel schneller als die Kontrolle. Bereits drei Stunden *post infusionem (P.I.)* haben die supplementierten Kühe nahezu ihren Ausgangswert von 2,40 mmol/l vor Beginn der Infusion erreicht. Dagegen erreicht der Calciumspiegel der Kontrolle innerhalb der untersuchten sieben Stunden *P.I.* nicht mehr seinen Ausgangswert. Dieser Effekt wird auch in dem günstigen  $\epsilon_{\text{Calcium,P.I.}} = 0,03$  der 15-mg-Gruppe verdeutlicht. Im Vergleich dazu indiziert der  $\epsilon_{\text{Calcium,P.I.}} = 0,10$  der Kontrollgruppe einen langsameren Anstieg. Vergleicht man die einzelnen Kühe individuell hinsichtlich des Calciumkoeffizienten *P.I.* bei Supplementierung von 15 mg 25(OH)D<sub>3</sub> und als Kontrolltier, so zeigt sich eine statistische Signifikanz nach Wilcoxon. Die Versuchskühe zeigten also am dritten Tag eine signifikant höhere Calciummobilisierungsfähigkeit bei einer Supplementierung von 15 mg 25(OH)D<sub>3</sub>.

Physiologisch ist davon auszugehen, dass die Supplementierung mit dem Vitamin D-Metaboliten die calciumfördernden bzw. mobilisierenden Mechanismen hier positiv unterstützen konnte. Im Hinblick auf die Gebärpareseprophylaxe ist genau diese Erhöhung der Calciummobilisierungsfähigkeit für die peripartale Kuh wünschenswert.

*Effekt der 15 mg 25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung am zehnten Supplementierungstag:*

Der positive Effekt der 15 mg Supplementierung auf die Calciummobilisierungsfähigkeit der Versuchstiere am dritten Supplementierungstag lässt sich nach zehn Tagen Supplementierung nicht mehr beobachten. An diesem Versuchstag hatten die 15 mg-Kühe im Mittel eine Calciumkonzentration von 2,65 mmol/l zum Zeitpunkt  $t = 0$  min und damit 0,21 mmol/l höher als die Kontrolle. Kühe Nr. 7 und 8 zeigten während der Infusion Zittern an Schulter und Flanke, weshalb die Infusion vorzeitig abgebrochen wurde. Die minimale mittlere Calciumkonzentration betrug bei der 15-mg-Gruppe 2,13 mmol/l und lag somit über dem entsprechenden Kontrollwert von 1,94 mmol/l. Bei Betrachtung der Calciummobilisierungsfähigkeit zeigten sich keine Unterschiede zwischen der 15-mg-Gruppe,  $\epsilon_{\text{Calcium,I.I.}} = 0,11$  bzw.  $\epsilon_{\text{Calcium,P.I.}} = 0,08$ , und der Kontrollgruppe,  $\epsilon_{\text{Calcium,I.I.}} = 0,12$  bzw.  $\epsilon_{\text{Calcium,P.I.}} = 0,08$ . Die zehntägige Zufütterung von 15 mg 25(OH)D<sub>3</sub> führte dementsprechend zu keiner höheren Calciummobilisierungsrate der Versuchskühe.

**Fazit:** Die Supplementierung mit 15 mg 25(OH)D<sub>3</sub> hatte einen positiven Effekt auf die Calciummobilisierungsfähigkeit der Versuchstiere am dritten Tag der Supplementierung. Dieser Effekt konnte an Tag 10 nicht mehr beobachtet werden.

### 5.3.2 Effekt der 40-mg-25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung auf die Calciummobilisierungsfähigkeit

Mit Hilfe der Dosis-Wirkungskurve wurde eine tägliche 25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung gesucht, die den Calciumspiegel deutlich über die Referenzgrenzen anhebt. Eine tägliche Supplementierung von 40 mg 25(OH)D<sub>3</sub> wurde als Dosierung gewählt, die einen deutlichen Effekt in der Calciumhomöostase hat. Diese Dosis wurde in den anschließenden Calciummobilisierungsversuchen auf eine eventuell auslösende Gegenregulation im bovinen Organismus untersucht.

*Effekt der 40 mg 25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung am dritten Supplementierungstag:* Die mit 40 mg 25(OH)D<sub>3</sub> supplementierten Kühe zeigten an diesem Versuchstag mit durchschnittlich 2,60 mmol/l die höchste Calciumkonzentration zum Zeitpunkt  $t = 0$  min. Mit einem Minimalwert von 2,06 mmol/l nach der Infusion sinkt der Calciumspiegel im Mittel für diese Gruppe tiefer als bei der 15-mg-Gruppe. Der Calciumkoeffizient während der Infusion entspricht mit  $\epsilon_{\text{Calcium, I.I}} = 0,14$  dem der Kontrollgruppe.

Nach Beendigung der Infusion steigt die Calciumkonzentration nach sieben Stunden auf maximal 2,53 mmol/l, ohne seinen Ausgangswert wieder zu erreichen. In ihrer Calciummobilisierungsfähigkeit unterscheiden sich die 40-mg-Gruppe,  $\epsilon_{\text{Calcium, P.P.}} = 0,09$ , kaum von der Kontrolle,  $\epsilon_{\text{Calcium, P.P.}} = 0,10$ . Im Hinblick auf die Gebärpareseprohylaxe konnte für diesen Supplementierungstag im Gegensatz zur 15-mg-Dosierung kein positiver Effekt auf die Calciummobilisierungsfähigkeit der Versuchstiere festgehalten werden.

*Effekt der 40 mg 25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung am zehnten Supplementierungstag:* Auch am zehnten Tag der Supplementierung unterschied sich die 40-mg-Gruppe von der Kontrolle lediglich durch höhere Ausgangswerte, 2,76 mmol/l bzw. 2,44 mmol/l. Trotz insgesamt höherer Calciumkonzentrationen musste bei vier Kühen in dieser Gruppe die Infusion vorzeitig abgebrochen werden, während nur eine Kontrollkuh klinische Anzeichen zeigte.

Die effektive Calciummobilisierung von Versuchs- und Kontrollgruppe nach der Infusion dargestellt durch den Calciumkoeffizienten  $\epsilon_{\text{Calcium, P.P.}} = 0,07$  bzw.  $\epsilon_{\text{Calcium, P.P.}} = 0,08$ , unterschied sich in einer vernachlässigbaren Größenordnung.

**Fazit:** Die Supplementierung von 40 mg 25(OH)D<sub>3</sub> zeigte am dritten und zehnten Tag keinen Effekt auf die Calciummobilisierungsfähigkeit der Supplementierungsperiode.

### 5.3.3 Zusammenfassung der Effekte der 25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung auf die Calciumhomöostase

Die Gebärpause ist eine hypocalcämische Erkrankung, deren komplexe Pathogenese bis heute nicht vollständig geklärt ist. Betroffene Tiere zeigen sowohl in der Praxis als auch bei induzierter Hypocalcämie große Schwankungen der effektiven Calciumkonzentration, bei der klinische Symptome auftreten. Laut Allen und Davies (1981) ist nicht der quantitative Calciumverlust ausschlaggebend, sondern vielmehr der Calciumverlust pro Zeiteinheit. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von peristaltischen Pumpen gesteuerten Na<sub>2</sub>EDTA-Infusionen der hypocalcämische Stimulus für die Versuchstiere standardisiert. So erfuhren die individuellen Kühe sowohl als Kontroll- als auch als Versuchstier den identischen Calciumverlust. Dennoch war der Calciumverlust pro Zeiteinheit für das individuelle Tier verschieden. Die Geschwindigkeit der zeitlichen Veränderung der Calciumkonzentration korrelierte nicht mit dem Auftreten klinischer Symptome (siehe 4.3).

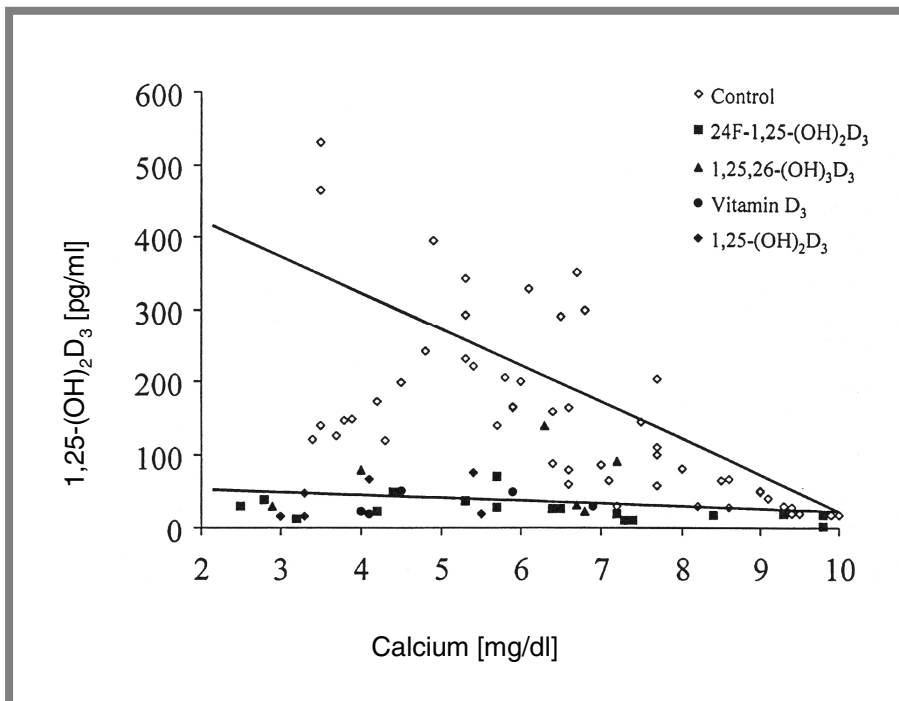
Tiere, die 25(OH)D<sub>3</sub> mit dem Futter erhielten, zeigten im Laufe der zehntägigen Supplementierung eine kontinuierlich ansteigende Blutcalciumkonzentration. Trotz maximaler Calciumspiegel bei der 40-mg-Gruppe am zehnten Supplementierungstag zeigten vier Kühe die klinische Symptomatik des Milchfiebers. Aufgrund dieser Umstände ist das frühe Auftreten klinischer Symptome nicht zu erklären. Ferner ist auch nicht klar, ob das frühe Auftreten der beobachteten Symptome in der Konsequenz zum Festliegen führen würde.

Versuche an Kleinnagern und jungen Hunden zeigten, dass hohe Vitamin-D-Supplementierungen vom Organismus aktiv gegenreguliert werden (Vieth *et al.*, 2000; Tryfonidou *et al.*, 2002 u. 2003). Um eine Vitamin-D-Intoxikation zu verhindern,

wird vor allem die Expression und Aktivität des  $1\alpha$ -Hydroxylase-Enzym erhöht. Ferner reduzierte sich die Sensivität der Nebenschilddrüse bzw. Schilddrüse, so dass die Versuchstiere bei identischen Blutcalciumspiegeln Hypoparathyreodismus bzw. Hypercalcitonismus zeigten. Erkenntnisse einer *in vitro* Studie von Ritter *et al.* (2006) an bovinen Nebenschilddrüsenzellen veranlassen die Autoren zur Vermutung, dass  $25(\text{OH})\text{D}_3$  - ohne weitere Metabolisierung - die PTH-Synthese und -Sekretion via VDR unterdrückt.

Überträgt man die gewonnenen Erkenntnisse auf das Rind, so ist folgende Feststellung von Horst *et al.* (2003) gut zu erklären. Die Autoren zeigten, dass Kühe, denen Vitamin D bzw. dessen Metabolite *a.p.* appliziert worden war, bei der Geburt nur reduzierte Vitamin-D-Hormonspiegel aufwiesen (**Abb. 54**).

Die niedrige  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration um die Geburt bei den Versuchstieren legt nahe, dass die behandelten Tiere nicht in der Lage waren,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  adäquat zu synthetisieren. Die Kontrolltiere zeigten eine deutlich negative Korrelation zwischen Calciumplasmaspiegel und  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration. Die behandelten Tiere waren somit von dem exogen zugeführten Vitamin D abhängig (Horst *et al.*, 2003).



**Abb. 55:** Diagramm des Vitamin-D-Hormonspiegels im Blut über der Calciumkonzentration bei peripartalen Kühen. Dargestellt sind neben Kontrolltieren Kühe, denen Vitamin D, dessen Metabolite oder Vitamin-D-Hormon *a.p.* injiziert wurde (aus Horst *et al.*, 2003).

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Resultate unterstützen oben erwähnte Erkenntnisse für das Rind. Ein positiver Effekt auf die Calciummobilisierungsfähigkeit der Versuchstiere konnte allein für die 15-mg-Gruppe am dritten Supplementierungstag festgestellt werden. Bei dieser Supplementierung erholte sich der Calciumspiegel der Kühe nach der Infusion im Vergleich zur Kontrolle und mit

40 mg-Dosierung statistisch schneller. Für Tag 10 konnte dieser positive Effekt nicht mehr festgestellt werden, da wahrscheinlich der Organismus bereits zu diesem Zeitpunkt begonnen hatte, einer eventuellen Vitamin-D-Intoxikation entgegenzuwirken. Entsprechendes gilt für die 40-mg-Supplementierung, wofür auch das Auftreten klinischer Symptomatik trotz hoher Calciumspiegel bei dieser Dosierung spricht.

**Fazit:** Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse gehen mit Beobachtungen sowohl beim Rind als auch bei anderen Versuchstieren anderer Autoren konform. In dieser Arbeit war es möglich, einen experimentellen Nachweis für die aus der Literatur bekannten Limitierungen der Gebärpauseprophylaxe mit Vitamin D bzw. dessen Metaboliten zu erbringen (Induktion der Gegenregulation). Dementsprechend ergibt sich ein neuer Ansatz für diese Prophylaxemethode.

## 5.4 Schlussfolgerungen

Zielsetzung der Arbeit war es, den Effekt der oralen Supplementierung von 25(OH)D<sub>3</sub> auf die Calciummobilisierungsfähigkeit bei nicht laktierenden Kühen näher zu charakterisieren. Der Studie lag dabei folgende Arbeitshypothese zugrunde:

- 1) Eine *niedrige*, tägliche 25(OH)D<sub>3</sub>-Dosis stimuliert die Mechanismen der Calciumhomöostase und erhöht so die Calciummobilisierungsfähigkeit der Versuchstiere.
- 2) Eine *hohe*, tägliche 25(OH)D<sub>3</sub>-Dosis induziert im Organismus eine Gegenregulation und beeinträchtigt dadurch die Calciummobilisierungsfähigkeit der Versuchstiere.

Mit Hilfe von Dosis-Wirkungskurven-Versuchen wurden zwei entsprechende Dosierungen bestimmt. Eine tägliche Dosis von 15 mg 25(OH)D<sub>3</sub> wurde als „niedrige“ Dosierung gewählt unter der Annahme, dass der Calciumspiegel während der zehntägigen Supplementierung innerhalb der Referenzgrenzen gehalten und aufgrund dessen keine Gegenregulation induziert wird. Die tägliche Supplementierung von 40 mg 25(OH)D<sub>3</sub> induzierte bei den Versuchstieren Hypercalcämie und wurde deshalb als „hohe“ Dosierung gewählt.

Die ermittelten Dosierungen wurden in den anschließenden Calciummobilisierungsversuchen mit Hilfe von Na<sub>2</sub>EDTA-Infusionen auf ihre Wirksamkeit überprüft. Die durchgeführten Versuchsserien zeigten dabei im Hinblick auf die Arbeitshypothese folgende Resultate:

- ad 1) Am dritten Supplementierungstag zeigte eine tägliche Dosis von 15 mg einen durch den Calciumkoeffizienten abgeleiteten, positiven Effekt auf die Calciummobilisierungsfähigkeit der Versuchstiere. Dieser Effekt konnte an



Tag 10 nicht mehr beobachtet werden. Vermutlich wurde die Dosierung zu hoch gewählt und induzierte deshalb an Tag 10 im Organismus bereits eine Gegenregulation.

ad 2) Sowohl an Tag 3 als auch an Tag 10 konnte die Supplementierung von 40 mg 25(OH)D<sub>3</sub> die Calciummobilisierungsfähigkeit der Versuchstiere nicht fördern. Am Tag 10 musste bei vier Kühen wegen klinischer Anzeichen der Hypocalcämie die Infusion vorzeitig abgebrochen werden. Die Induktion einer Gegenregulation durch diese Dosierung ist wahrscheinlich.

**Fazit:** Die dieser Arbeit zugrunde liegende Arbeitshypothese konnte mit Hilfe der ermittelten Resultate verifiziert werden. Im Hinblick auf eine praktikable Gebärparesprophylaxe sollten fortführende Versuche auf eine geeignete 25(OH)D<sub>3</sub>-Dosierung mit praktikabler Supplementierungsdauer fokussieren. Der komplexe Hormonstatus peripartaler Kühe sollte bei der Wahl geeigneter zukünftiger Versuchstiere nicht vernachlässigt werden.