



Ca-Fluxe und Vitamin D-Rezeptoren in verschiedenen Darmabschnitten von Kühen : unter Berücksichtigung der Faktoren Alter und Rasse

Singer, Karin

Abstract: Das Ziel dieser Arbeit war die Messung von Ca-Fluxen in verschiedenen Darmabschnitten von Kühen unter Berücksichtigung der Faktoren Alter und Rasse sowie der Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren (VDR) im Gastrointestinaltrakt (GIT). 36 Schlachtkühe ohne klinische Symptome von Ca-Mangel wurden in 4 Gruppen à 9 Tiere aufgeteilt: Brown Swiss und Holstein Friesian Kühe im Alter von < 4,5 (BSJ HFJ) und > 5,5 Jahren (BSA HFA). Folgende Proben wurden entnommen: aus Duodenum und Colon zur Bestimmung der Ca-Fluxe mittels Ussing-Kammer- Technik, aus dem gesamten GIT zur immunhistochemischen VDR-Bestimmung sowie Chymus und Serum zur Messung von Ca, Mg und P. Alle Gruppen wiesen eine Ca-Nettosekretion im Duodenum und im Colon auf. Zwischen den Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied. In den Vormägen und im Labmagen konnten keine VDR nachgewiesen werden. Das Duodenum wies signifikant mehr VDR auf als die nachfolgenden Darmabschnitte. Die tiefsten VDR-Konzentrationen wurden im Ileum und im Cäcum gefunden. Im Duodenum war der VDR-Gehalt 2,3 mal höher als im Colon. Die VDR waren vor allem in den basalen und mittleren Drüsenschichten vorzufinden. HFJ wies gegenüber alle anderen Gruppen einen signifikant tieferen P-Gehalt im Chymus auf. Tendenziell stiegen die Ca-, Mg- und P-Gehalte nach aboral an. Alle Blutparameter lagen im Referenzbereich. Sämtliche Kühe befanden sich in einer Phase der Laktation, während der mit keinen grösseren Ca-Störungen gerechnet werden muss. The purpose of this study was to investigate the influence of the factors age and breed on Ca-fluxes in different intestine segments of cows. Vitamin D-receptors (VDR) were determined in the entire gastrointestinal tract (GIT). 36 cows without any clinical signs of Ca-deficiency were divided into 4 groups: Brown Swiss and Holstein Friesian at the age of < 4,5 (BSJ HFJ) and > 5,5 years (BSA HFA). The following samples were collected: duodenum and colon segments in order to measure Ca-flux by Ussing-Chamber technique, samples of the whole GIT for determination of immuno-histochemical VDR as well as chyme and blood serum to measure Ca, Mg and P. All groups showed a Ca net-secretion in both the duodenum and colon segments, but no significant differences between groups were seen. No VDR were detected in forestomach and abomasus. The duodenum showed significantly higher VDR amounts than the other intestinal segments. The least VDR amount was found in ileum and caecum. 2,3 times higher VDR amounts were determined in duodenum compared to colon. Strongest immunoreactions were observed in the basal and intermediate glandular layer. HFJ showed significantly lower P concentrations in chyme compared to each other group. A tendency to higher Ca-, Mg- and P-concentration was seen aborally. All blood parameters were within reference range. All cows were in a state of the lactation, where no disturbances in Ca homeostasis are expected.

Originally published at:

Singer, Karin. Ca-Fluxe und Vitamin D-Rezeptoren in verschiedenen Darmabschnitten von Kühen : unter Berücksichtigung der Faktoren Alter und Rasse. 2006, University of Zurich, Vetsuisse Faculty.

Aus dem Institut für Tierernährung
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor Prof. Dr. M. Wanner

Arbeit unter Leitung von Dr. A. Liesegang

**Ca-Fluxe und Vitamin D-Rezeptoren in verschiedenen
Darmabschnitten von Kühen unter Berücksichtigung
der Faktoren Alter und Rasse**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Karin Singer

Tierärztin
von Langenbruck BL

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. M. Wanner, Referent

Prof. Dr. A. Boos, Korreferent

Zürich 2006

**FÜR
S' MUTTI
UND
DR DÄTTI**



INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ZUSAMMENFASSUNG	VI
SUMMARY	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Ziel der Arbeit	1
1.2. Der Kalziumstoffwechsel bei der Kuh	1
1.2.1. Regulation des Ca-Stoffwechsels	2
1.2.2. Ca-Absorption im Darm	4
1.3. Hypokalzämische Gebärpause („Milchfieber“)	7
1.3.1. Bedeutung	7
1.3.2. Erkrankung	7
1.3.3. Ätiologie – eine multifaktorielle Erkrankung	9
1.3.4. Prophylaxemassnahmen	14
1.4. Vitamin D	17
1.4.1. Nomenklatur	17
1.4.2. Biotransformation	17
1.4.3. Wirkungsmechanismus	18
1.5. Vitamin D-Rezeptor (VDR)	19
1.5.1. Lokalisation, Molekulargewicht und Vorkommen	19
1.5.2. Struktur und Funktion des VDR	21
1.5.3. VDR beim Rind	23
1.5.4. VDR-Nachweismethoden	24

2. TIERE, MATERIAL UND METHODEN	26
2.1. Versuchstiere	26
2.2. Probeentnahmen	26
2.2.1. Für die Blutanalyse	26
2.2.2. Für die Messung der Ca-Fluxe	27
2.2.3. Für den Nachweis des Vitamin D-Rezeptors (VDR) mittels Immunhistologie	27
2.2.4. Für die Chymus-Analysen	28
2.3. Ussing-Kammer Versuche	28
2.3.1. Elektrolytlösungen	28
2.3.2. Gewebepräparation	29
2.3.3. Aufbau der Ussing-Kammer	29
2.3.4. Elektrischen Messungen	32
2.3.5. Messung unidirektionaler Ionenflüsse	33
2.4. Immunhistologischer Nachweis des Vitamin D- Rezeptors (VDR)	34
2.4.1. Probenaufarbeitung	34
2.4.2. Immunhistochemische Färbungen	35
2.4.3. Auszählverfahren und Auswertung	37
2.5. Chymus-Analysen	39
2.5.1. Weender-Analyse	39
2.5.2. Auswertungen	39
2.6. Blutanalysen	40
2.7. Statistische Auswertungen	40

3. RESULTATE	41
3.1. Ca-Flux Messung im Duodenum und im Colon	41
3.2. Immunhistologischen Nachweises der Vitamin D-Rezeptoren	44
3.2.1. Histomorphologische Beschreibung	44
3.2.2. Vergleich der vier Gruppen	50
3.2.3. Vergleich der einzelnen Darmabschnitte	51
3.2.4. Vergleich der einzelnen Drüsenschichten	53
3.3. Ca-, Mg- und P-Gehalt im Chymus	58
3.3.1. Ca-Gehalt im Chymus	58
3.3.2. Mg-Gehalt im Chymus	61
3.3.3. P-Gehalt im Chymus	64
3.4. Blutanalyse	68
4. DISKUSSION	69
4.1. Ca-Fluxe im Gastrointestinaltrakt	69
4.2. Verteilung der Vitamin D-Rezeptoren im Gastrointestinaltrakt	74
4.3. Chymus-Analysen	78
4.4. Schlussfolgerungen	80
5. LITERATURVERZEICHNIS	82
6. DANKSAGUNG	94
7. CURRICULUM VITAE	96

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung	G_t	Gewebeleitfähigkeit
ABC	Avidin-Biotin-Complex	H₂O₂	Wasserstoffperoxid
AgCl	Silberchlorid	Ha	Haube
ANOVA	Varianzanalyse	HF_A	Holstein Friesan, "alt"
ATP	Adenosintriphosphat	HF_J	Holstein Friesan, "jung"
BCS	Body Condition Score	IE	Internationale Einheit
BD	basale Drüsenschicht	IHS	Initial hot side
Bm	Blättermagen	I_{Klemm}	Stromimpuls
bp	Basenpaare	II	Ileum
BS_A	Brown Swiss, "alt"	IRS	Immunreaktiver Score
BS_J	Brown Swiss, "jung"	I_{sc}	Kurzschlussstrom
Ca	Kalzium	Je	Jejunum
Cä	Cäcum	J_{ms}	Unidirektionaler Flux von mukosal nach serosal
CaCl₂	Kalziumchlorid	J_{net}	Nettoflux
CAD	Cation Anion Difference	J_{sm}	Unidirektionaler Flux von serosal nach mukosal
Cl	Chlor	K	Kalium
Co	Colon	KCl	Kaliumchlorid
CO₂	Kohlendioxid	LF	Labmagen, Fundusteil
CT	Kalzitonin	Lm	Labmagen
DAB	Chromogen 3-3` Diaminobenzidin	LP	Labmagen, Pylorusteil
DCAB	Dietary Cation Anion Difference	MD	mittlere Drüsenschicht
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Mg	Magnesium
DnP	Duodenum, nach Pankreas	MgSO₄	Magnesiumsulfat
DvP	Duodenum, vor Pankreas	ms	mukosal nach serosal
EP	Oberflächenepithel	MW	Mittelwert
F	Faktor	n	Anzahl
FHS	Final hot side	Na	Natrium
FI	Farbintensität	Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
GIT	Gastrointestinaltrakt	NaCl	Natriumchlorid

NaH₂PO₄	Natriumdihydrogenphosphat	RXR	Retinoid-X-Rezeptor
NaHCO₃	Natriumbicarbonat	S	Schwefel
ns	nicht signifikant	SF	Standardfehler
O₂	Sauerstoff	sm	serosal nach mukosal
OD	oberflächliche Drüsenschicht	T₀	Zeitpunkt 0 min
P	Phosphor	T₈₀	Zeitpunkt 80 min
p	Irrtumswahrscheinlichkeit	Tab.	Tabelle
Pa	Pansen	TBS	Tris gepufferte NaCl-Lösung
PD	Potentialdifferenz	TR	Thyroid Hormon
PTH	Parathormon	TS	Trockensubstanz
PTHrP	Parathormon-related Protein	U_{Klemm}	Spannung
RAR	Retinoid Acid Rezeptor	VDR	Vitamin D-Rezeptor
Re	Rektum	VDRE	Vitamin D Response Element
RNA	Ribonukleinsäure		

ZUSAMMENFASSUNG

Ca-Fluxe und Vitamin D-Rezeptoren in verschiedenen Darmabschnitten von Kühen unter Berücksichtigung der Faktoren Alter und Rasse

Das Ziel dieser Arbeit war die Messung von Ca-Fluxen in verschiedenen Darmabschnitten von Kühen unter Berücksichtigung der Faktoren Alter und Rasse sowie der Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren (VDR) im Gastrointestinaltrakt (GIT). 36 Schlachtkühe ohne klinische Symptome von Ca-Mangel wurden in 4 Gruppen à 9 Tiere aufgeteilt: Brown Swiss und Holstein Friesian Kühe im Alter von < 4,5 (BS_J & HF_J) und > 5,5 Jahren (BS_A & HF_A). Folgende Proben wurden entnommen: aus Duodenum und Colon zur Bestimmung der Ca-Fluxe mittels Ussing-Kammer-Technik, aus dem gesamten GIT zur immunhistochemischen VDR-Bestimmung sowie Chymus und Serum zur Messung von Ca, Mg und P.

Alle Gruppen wiesen eine Ca-Nettosekretion im Duodenum und im Colon auf. Zwischen den Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied.

In den Vormägen und im Labmagen konnten keine VDR nachgewiesen werden. Das Duodenum wies signifikant mehr VDR auf als die nachfolgenden Darmabschnitte. Die tiefsten VDR-Konzentrationen wurden im Ileum und im Cäcum gefunden. Im Duodenum war der VDR-Gehalt 2,3 mal höher als im Colon. Die VDR waren vor allem in den basalen und mittleren Drüsenschichten vorzufinden.

HF_J wies gegenüber alle anderen Gruppen einen signifikant tieferen P-Gehalt im Chymus auf. Tendenziell stiegen die Ca-, Mg- und P-Gehalte nach aboral an. Alle Blutparameter lagen im Referenzbereich.

Sämtliche Kühe befanden sich in einer Phase der Laktation, während der mit keinen grösseren Ca-Störungen gerechnet werden muss.

SUMMARY

Ca-flux and vitamin D-receptors in different intestine segments of cows in consideration of the factors age and breed

The purpose of this study was to investigate the influence of the factors age and breed on Ca-fluxes in different intestine segments of cows. Vitamin D-receptors (VDR) were determined in the entire gastrointestinal tract (GIT).

36 cows without any clinical signs of Ca-deficiency were divided into 4 groups: Brown Swiss and Holstein Friesian at the age of < 4,5 (BS_J & HF_J) and > 5,5 years (BS_A & HF_A). The following samples were collected: duodenum and colon segments in order to measure Ca-flux by Ussing-Chamber technique, samples of the whole GIT for determination of immuno-histochemical VDR as well as chyme and blood serum to measure Ca, Mg and P.

All groups showed a Ca net-secretion in both the duodenum and colon segments, but no significant differences between groups were seen.

No VDR were detected in forestomach and abomasus. The duodenum showed significantly higher VDR amounts than the other intestinal segments. The least VDR amount was found in ileum and caecum. 2,3 times higher VDR amounts were determined in duodenum compared to colon. Strongest immunoreactions were observed in the basal and intermediate glandular layer.

HF_J showed significantly lower P concentrations in chyme compared to each other group. A tendency to higher Ca-, Mg- and P-concentration was seen aborally. All blood parameters were within reference range.

All cows were in a state of the lactation, where no disturbances in Ca homeostasis are expected.

1. EINLEITUNG

1.1. Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Ca-Fluxe in verschiedenen Darmabschnitten von Kühen unter Berücksichtigung der Faktoren Rasse und Alter zu messen. Zudem wurde der ganze Gastrointestinaltrakt (GIT) dieser Kühe auf das Vorhandensein von Vitamin D-Rezeptoren (VDR) untersucht.

1.2. Der Kalziumstoffwechsel bei der Kuh

Kalzium (Ca) ist einer der wichtigsten Mineralstoffe im Körper. Der Organismus einer Milchkuh enthält durchschnittlich 7,03 kg Ca (Weiss, 1993), wovon ca. 99 % im Knochen gespeichert sind (Weiss, 1993; Kaune, 2000). Ca spielt eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung in der Zelle, z. B. bei der Nervenleitung, bei Muskelkontraktion und als „second messenger“ bei der Hormonregulation im Endokrinum.

Die Ca-Konzentration im Blut wird durch verschiedene Regulationsmechanismen in engen Grenzen (2,5 - 3 mmol/l) gehalten. Eine Störung der Ca-Homöostase führt langfristig zu schwerwiegenden Erkrankungen verschiedener Organsysteme. Aber auch kurzfristige Veränderungen im Ca-Stoffwechsel, wie beispielsweise die Gebärpause des Rindes, können fatale Folgen haben.

Um den normalen Ca-Spiegel aufrechterhalten zu können, bedarf es mehrerer Regulationsmechanismen. Sinkt der Ca-Spiegel des Blutes, kann dieser durch eine erhöhte Mobilisation von Ca aus dem Knochen oder durch eine vermehrte Absorption aus dem Darm ausgeglichen werden. In der Regel muss die Kuh nur jenes Ca ersetzen, welches über Kot und Urin ausgeschieden und für den Aufbau bzw. Umbau des Skeletts benötigt wird. Diese Situation ändert sich jedoch während Trächtigkeit und Laktation. Zusätzliche „Verluste“ an Ca für das Wachstum des Fötus bzw. für die Milchbildung müssen ersetzt werden.

1.2.1. Regulation des Ca-Stoffwechsels

Die drei wichtigsten Hormone, welche den Ca-Stoffwechsel regulieren, sind das Parathormon (PTH) aus den Hauptzellen der Nebenschilddrüse, das Vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃), welches vom Säuger teilweise selber synthetisiert wird oder als Vorstufe über das Futter aufgenommen wird und das Kalzitinin (CT) aus den C-Zellen der Schilddrüse. In Abbildung 1 werden diese drei Hormone und deren Regulation vereinfacht dargestellt. Daneben können auch andere Hormone, wie Geschlechtshormone, Kortikosteroide, Thyroxin und Somatotropin in den Ca-Stoffwechsel eingreifen (Kraft, 1999).

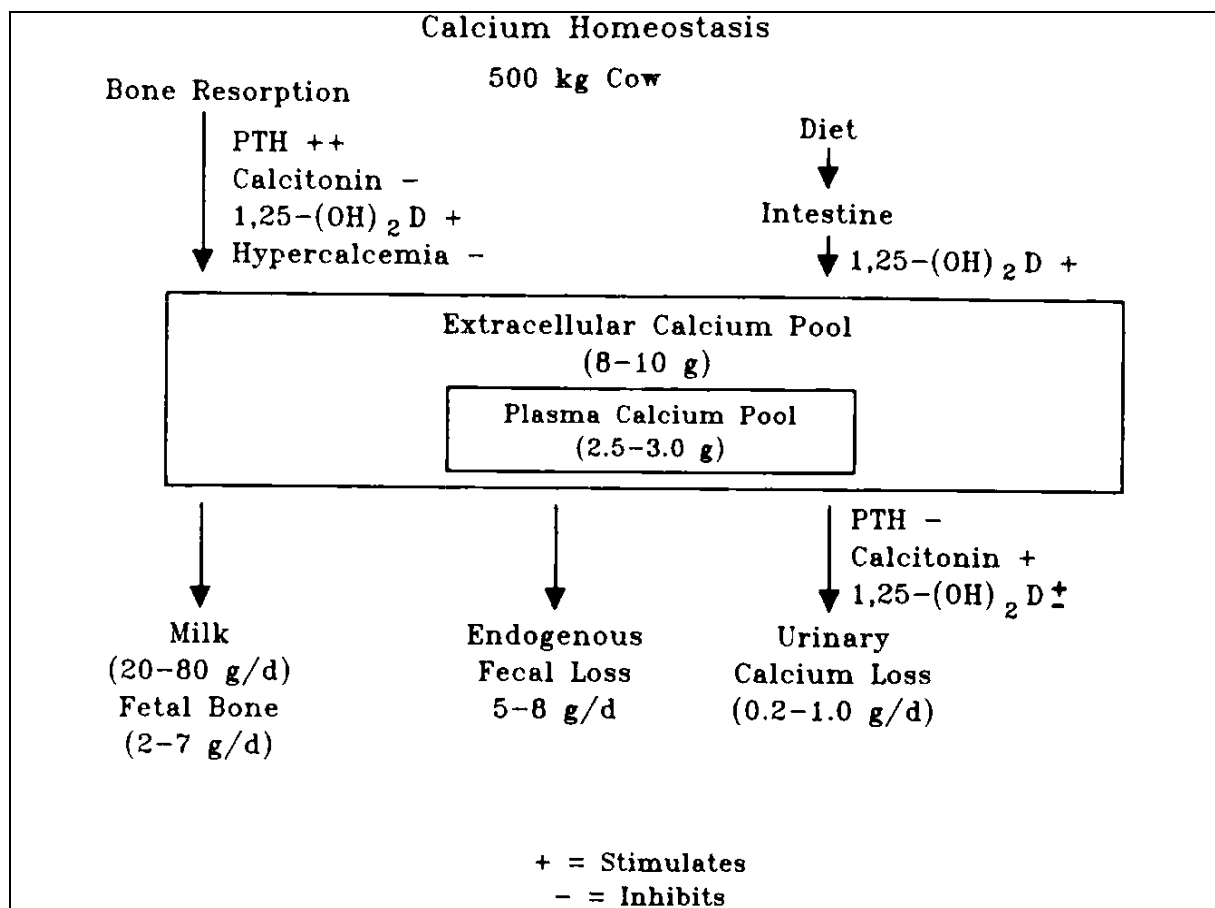


Abb. 1: Regulation der Ca-Homeostase einer 500 kg schweren Kuh (Reinhardt et al., 1988)

Das PTH ist ein Peptidhormon, welches in der Nebenschilddrüse gebildet und von dieser bei erniedrigter Ca-Konzentration ins Blut sezerniert wird (Goff et al., 1991b). Nach Kraft (1999) mobilisiert PTH Ca und Phosphat (P) aus dem Knochen und führt in der Niere zu einer Steigerung der tubulären Ca-Rückresorption sowie zu einer Steigerung der tubulären P-Ausscheidung. Die renale Bildung der aktiven Form des Vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) aus dessen

Vorstufe (25-(OH)D₃) wird zudem durch PTH stimuliert (Kaune, 2000; Horst et al., 2003).

Das CT ist ein Peptidhormon, welches bei einem hohen Ca-Spiegel aus der Schilddrüse ausgeschüttet wird und einen Antagonisten zum PTH darstellt (Kaune, 2000). Die Freisetzung von Ca wird durch Hemmung der Osteoklasten vermindert. Somit verstärkt das CT die Einlagerung von Ca in das Skelett durch Förderung der Proliferation der Osteoblasten (Goff et al., 1991b; Kraft, 1999; Kaune, 2000). Allgemein führt es also zu einem Absinken des Blut-Ca-Spiegels.

Vitamin D (siehe Kapitel 1.4.), ein Prohormon, stimuliert die Resorption von Ca in der Niere sowie die Absorption von Ca und P im GIT durch zunehmende Bildung des Ca-bindenden Proteins (Calbindin). Zudem wird die Aktivität der Osteoblasten vermindert und die Bildung der Osteoklasten verstärkt (Kaune, 2000; Horst et al., 1994).

Durch einen Rückkopplungsmechanismus beim Absinken des P-Spiegels kommt es zu einer Aktivierung des 25(OH)D₃ (inaktive Vorstufe) zu 1,25(OH)₂D₃ (aktive Form); dieses System wird allerdings erst bei relativ niedrigen P-Werten stimuliert. Die Bedeutung des P-Mangels bei festliegenden Kühen ist noch umstritten. Vermutlich kommt es zu einem Unvermögen, ATP als Energieträger zu bilden (Goff, 2000).

Das bei Ca-Mangel ausgeschüttete PTH erhöht in der Niere zusätzlich die tubuläre Rückresorption von Magnesium (Mg), so dass daraus eine Hypermagnesämie resultiert (Allen und Sansom, 1985).

Eine Hypomagnesämie wirkt hemmend auf die Knochenmobilisierung und somit auch auf die Ca-Mobilisation (Reinhardt et al., 1988; van Mosel et al., 1991). Da Mg ein Bestandteil des second messengers der Rezeptoren im Zielgewebe ist (Goff, 2000), nimmt bei niedrigem Mg-Spiegel die Reaktivität der Zielgewebe auf 1,25(OH)₂D₃ und PTH ab (Reinhardt et al., 1988; Goff, 2000). Nach Van Mosel et al. (1991) ist je nach Dauer der Hypomagnesämie sogar die PTH-Ausschüttung gestört. Die Effizienz der Ca-Mobilisation ist bereits bei einer leichten Hypomagnesämie reduziert, was möglicherweise wegen einer inadäquaten Reaktion der Nebenschilddrüse ausgelöst wird (Contreras et al., 1982).

1.2.2. Ca-Absorption im Darm

In einer Studie von Breves und Schröder (2005), welche die vergleichenden Aspekte der gastrointestinalen Ca-Umsetzungen bei Schwein und Wiederkäuer untersuchten, wurde gezeigt, dass der zelluläre Mechanismus der Ca-Absorption, welcher im Allgemeinen für monogastrische Tierarten gilt, beim Wiederkäuer noch genauer untersucht werden muss.

Die Ca-Absorption findet beim Säuger über die ganze Länge des Darmtraktes statt (Bronner, 1987; Van Os, 1987), primär jedoch im Dünndarm; beim Wiederkäuer wird Ca zusätzlich noch über die Pansenschleimhaut aufgenommen (Schröder et al., 1997, 1999; Breves und Schröder, 2005). Der Ca-Transport durch das Darmepithel erfolgt in beide Richtungen – er ist bidirektional. Oberleitner (1996) weist darauf hin, dass Ca im oberen Dünndarm sowohl resorbiert als auch mit den Verdauungssäften sezerniert wird.

Das aktuelle Wissen über die Mechanismen des gastrointestinalen Ca-Transportes basiert überwiegend auf Untersuchungen am Dünndarm von Nichtwiederkäuern. Dabei wird zwischen aktiven und passiven Transportmechanismen im Darm unterschieden. Für den passiven Transport, welcher hauptsächlich parazellulär erfolgt, braucht es einen elektrochemischen Gradienten zwischen der luminalen und der basolateralen Seite des Epithels. Dieser Resorptionsweg wird von Goff et al. (1995b) auf der gesamten Länge des Darmtraktes der Kuh beschrieben. Bei verschiedenen Studien (Nellans, 1988; 1990; Goff und Horst 1994; Horst et al., 1994) konnte nachgewiesen werden, dass Tiere, welche hohe Ca-Gaben erhielten, mehr als 50 % des Ca passiv via parazellulären Transportweg aufnehmen. Zu einem ähnlichen Resultat kamen auch Wasserman und Fullmer (1983), welche zeigten, dass die Bedeutung des parazellulären Transportes für die Ca-Absorption mit steigender Konzentration an freiem Ca im Chymus zunimmt. Ist hingegen wenig Ca im Darmtrakt der Tiere vorhanden, wird Ca v.a. aktiv absorbiert (Bronner, 1987). Untersuchungen am Dünndarm von Ratten zeigten auf, dass diese parazelluläre Ca-Absorption durch das Einwirken von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gesteigert werden kann (Karbach, 1992).

Der aktive Transport (Abb. 2) erfolgt transzellulär. Dieser Prozess ist im Gegensatz zum passiven Transport sättigbar und beim Monogastrier mehr oder weniger auf das Duodenum und das proximale Jejunum beschränkt (Kaune, 2000; Hoenderop et al., 2005). Der aktive Transport lässt sich funktionell in drei Teilschritte unterteilen:

1. Ca-Eintritt durch die Bürstensaummembran in die Enterozyten

Die aus einer Lipiddoppelschicht bestehende Bürstensaummembran ist primär für Ca-Ionen undurchlässig. Allerdings kann Ca über spezifische Ca-Membrankanäle (Typ TRPV5 bzw. TRPV6: Clapham et al., 2003; Hoenderop et al., 2005) in das Zytoplasma der Enterozyten passiv aufgenommen werden. Diese Aufnahme wird durch einen starken elektrochemischen Gradienten getrieben, da die Konzentration an freiem Ca im Zytoplasma sehr gering ist ($< 1 \mu\text{mol/l}$). Die Öffnung dieser Ca-Kanäle wird durch Bindung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an die spezifischen, intrazellulär gelegenen Vitamin D-Rezeptoren (VDR) vermittelt (Oberleitner, 1996).

2. Ca-Transport durch das Zytosol

Der Ca-Transport durch die Zelle kann nicht in Form des freien Ca stattfinden. Dies würde eine unverträgliche Erhöhung der intrazellulären freien Ca-Konzentration mit sich bringen. Das Ca wird intrazellulär reversibel an Calbindin- D_{9k} bei Säugetieren und an Calbindin- D_{28k} bei Vögeln gebunden. Calbindin ist ein Ca-bindendes Protein, dessen Expression von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ abhängig ist und aus Enterozyten von Säugetieren (Ratten, Schafen etc.) isoliert werden konnte (Wasserman und Taylor, 1966; Kallfelz et al., 1967; Schröder et al., 1997, 2001; Wasserman, 2004).

Bei der von Nemere et al. (1984) und Nemere und Norman (1990) eingeführten Bezeichnung „Transcaltachia“ handelt es sich um einen binnen Minuten einsetzenden, stimulierenden Effekt („fast response“) von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Ca-Absorption (Nemere et al., 1984, Nemere und Norman, 1990). Auch durch andere Substanzen, wie Forskulin oder PTHrP liess sich dieses Phänomen auslösen (Zhou et al., 1992). Nach bisherigen Erkenntnissen wird Ca dabei apikal in endozytotische Vesikel aufgenommen und nach Verschmelzen mit Lysosomen zur basolateralen Membran transportiert, wo es durch Exozytose freigesetzt wird (Hoenderop et al., 2005). Der Transport durch die Zelle soll dabei entlang der Mikrotubuli stattfinden. Hervorzuheben ist, dass in den oben genannten Untersuchungen der Transcaltachia-Effekt an Tieren mit physiologischem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Status gefunden wurde. Bei Vitamin-D-defizienten Tieren war dieser Effekt nicht auslösbar (Nemere et al., 1984).

3. Ca-Abgabe an der basolateralen Membran und Ausschleusung aus der Zelle

Den letzten Schritt schliesslich stellt die Ca-Extrusion an der basolateralen Membran dar. Im Gegensatz zur apikalen Aufnahme liegt dieser ein energieabhängiger Prozess zugrunde, da die Ca-Ausschleusung gegen einen elektrochemischen Gradienten erfolgt. An der basolateralen Membran der Enterozyten ist eine ATP-abhängige Ca-Pumpe vorhanden, die Ca-ATPase (Bronner, 1990; Wasserman et al., 1992a), die gegen einen 1000-fachen Konzentrationsgradienten arbeitet. Die Aktivität dieser Pumpe ist im proximalen Dünndarm höher als im distalen Dünndarm und in den Villuszellen höher als in den Zellen der Krypten (Wasserman et al., 1992a). Zudem befindet sich ein Na/Ca-Austauscher an der basolateralen Membran, dessen Kapazität aber nur ca. $\frac{1}{5}$ der Ca-ATPase ausmacht (Ghijsen et al., 1983). Die beiden Transportsysteme scheinen sich bei Geflügel und Ratten durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulieren zu lassen (Wasserman et al., 1992a, 1992b; Horst et al., 1997a; van Abel et al., 2003), obwohl dazu teilweise widersprüchliche Resultate vorliegen (Ghijsen et al., 1983; van Corven et al., 1987; Kaune et al., 1990; van Cromphaut et al., 2001).

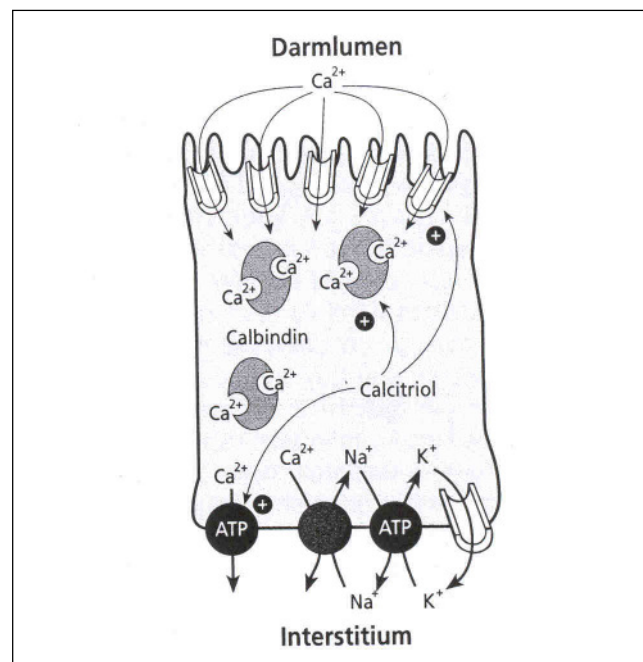


Abb. 2: Darstellung des aktiven Ca-Transportes im Dünndarm
 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Calcitriol) fördert die aktive Ca-Resorption durch Stimulierung der Synthese des Ca-bindenden Proteins Calbindin (Kaune, 2000).

1.3. Hypokalzämische Gebärparese („Milchfieber“)

1.3.1. Bedeutung

Verschiedene Stoffwechselstörungen im peripartalen Zeitraum nehmen in der Milchviehhaltung einen hohen Stellenwert ein. Einige Primärerkrankungen bewirken das Auftreten von Begleit- oder Folgekrankheiten, die wiederum sekundäre Erkrankungen und Stoffwechselstörungen auslösen können. Beispielsweise kann die Gebärparese Risikofaktor für Nachgeburtsverhalten, Labmagenverlagerung, Ketose, Mastitis und Uterusprolaps bei der Kuh sein (Bethard et al., 1998). Für den Landwirt bedeutet dieser „Circulus viciosus“ nicht nur erhebliche finanzielle Einbussen für Therapie und Prophylaxe, sondern auch Folgekosten durch Milchleistungseinbussen, die um ein Vielfaches höher sein können und Verluste durch Abgänge.

1.3.2. Erkrankung

Die hypokalzämische Gebärparese tritt meistens 24 - 48 Stunden post partum auf (Allen und Sansom, 1985; Horst et al., 1994), seltener vor dem Abkalben oder gerade während der Geburt. Häufig sind Milchkühe mit hoher Leistung betroffen, selten Mastrassen (Staufenbiel und Engelhard, 1999).

Beim Rind beträgt der rasch verfügbare Anteil des im Körper vorhandenen Ca ungefähr 0,3 %, d.h. 15 - 20 g. Dieser Pool wird durch Ca, welches aus dem Darm aufgenommen und/oder aus dem Knochen resorbiert wird, ergänzt. Das im Darm absorbierte Ca wird während der Trächtigkeit unter anderem für die Skelettentwicklung des Fötus verwendet. Während der Trockenstehphase ist der Ca-Bedarf mit 10 – 12 g pro Tag minimal. Zusätzlich zu den fäkalen und urinären Verlusten kommen 4 - 5 g/Tag für die Skelettentwicklung des Föten dazu (Horst et al., 2003). Kurz vor der Geburt beginnt die Milchdrüse mit der Synthese und Sekretion des Kolostrums. Grosse Mengen Ca gelangen, gebunden an Kasein und Zitrat, ins Kolostrum (1,8 - 2,5 g/l) (Horst et al., 1997a) und in die Milch (1,25 g/l) (Weiss, 1993). Eine Kuh, welche beispielsweise 10 l Kolostrum produziert, verliert 18 – 25 g Ca bei einer einzigen Melkung. Diese Menge übersteigt den Plasma-Ca-Pool um das 6- bis 8-fache (Abb. 1).

Kurz ante partum werden dem Blut also grosse Mengen an Ca entzogen, so dass die Anforderungen an den Stoffwechsel, während einer kurzen Anpassungszeit schnell Ca zu mobilisieren, sehr gross sind. Unter dem Einfluss von PTH und

1,25(OH)₂D₃, welche eine Steigerung der Ca-Absorption aus dem Darm, eine renale Ca-Rückresorption und eine Ca-Mobilisation aus den Knochen bewirken, muss dieser massive Ca-Verlust in kürzester Zeit korrigiert werden. Trotz einer sofortigen Freisetzung der Hormone braucht der Organismus eine Adaptationszeit von ungefähr 48 h (Goff et al., 1987), bis die angestrebten Effekte eintreffen. Dies führt unweigerlich zu einem Ca-Abfall im Blut der Kühe. Diese physiologisch negative Ca-Bilanz kurz post partum (Horst et al., 1994; Goff und Horst, 1997) mit einer Ca-Konzentration von etwa 1,9 mmol/l im Serum, liegt nicht wesentlich unter dem Normalwert von 2,3 - 2,8 mmol/l (Kraft, 1999) für Kühe. Bei Kühen aber, die an der Gebärpause erkranken, sinkt die Ca-Konzentration im Serum meist unter 1,5 mmol/l.

Es kommt zu den typischen klinischen Symptomen, die von Staufenbiel et al. (2002) in drei Stadien unterteilt werden. Im Stadium 1 sind mit über 20 % viele Kühe vertreten, die durch einen ataktischen Gang, Muskeltremor und eine Kyphosestellung auffallen, aber noch stehen. Bei diesen Tieren ist die Blutserumkonzentration an Ca und P nur geringgradig erniedrigt. Mit über 60 % dominieren die Kühe, die in Brustlage festliegen, aber keine Störungen des Sensoriums zeigen (Stadium 2). Die Ca- und P-Konzentrationen im Blut sind mittelgradig abgefallen. Bei einem weiteren Abfall der Blut-Ca-Konzentration kommt es zu einem fließenden Übergang mit allmählicher Zunahme der Störungen des Sensoriums, verbunden mit Schläfrigkeit, Kopfseitenhaltung, Umfallen in Seitenlage. Am Ende tritt das Stadium des Gebärkomas ein (Stadium 3). Mit 12 % ist der Anteil an Kühen mit gestörtem Sensorium relativ klein. Zusätzlich zur Hypokalzämie finden sich als typische Laborbefunde eine Hypophosphatämie sowie eine Hypermagnesiämie. Prognostisch gesehen haben Kühe in den Stadien 1 und 2 bei unkomplizierten Fällen und frühzeitiger Therapie eine günstige Prognose, jedoch eine hohe Rezidivrate. Langdauerndes Festliegen und Kühe im Stadium 3 der Erkrankung sind als prognostisch ungünstig zu bewerten.

Differentialdiagnostisch sollte vor allem an folgende Ursachen gedacht werden: Festliegen traumatischer Genese, Festliegen infolge Schock, Peritonitis infolge Geburtsverletzungen im Abdomen, Fettmobilisationssyndrom, andere Störungen im Mineralstoffwechsel, Botulismus.

1.3.3. Ätiologie – eine multifaktorielle Erkrankung

Eine geringgradige postpartale Hypokalzämie wird bei vielen Wiederkäuern gesehen und ist eine physiologische Erscheinung. Die Inzidenz liegt nach verschiedenen Autoren zwischen 5 und 10 % (Oetzel, 1988; Houe et al., 2001). Die Ursache der pathologischen Hypokalzämie liegt in der extremen Steigerung des Ca-Bedarfs durch die beginnende Laktation. Viele Faktoren spielen dabei eine mehr oder weniger grosse Rolle.

Alter

Das Risiko, an Gebärpause zu erkranken nimmt mit zunehmendem Alter (Gürtler et al., 1977; Shappell et al., 1987; Rüscher und Rusch, 1996; Kamphues, 1996; Horst et al., 1997b; Staufenbiel und Engelhard, 1999) und Anzahl der Abkalbungen (Tran, 1997) deutlich zu.

Die Anzahl der Vitamin D-Rezeptoren (VDR) an den Zielorganen (Darm-, Nieren- und Knochenzellen) ist vom Alter abhängig (Reinhardt et al., 1988; Goff et al., 1995b; Horst et al., 1989, 1994). Altkühe haben eine weitaus niedrigere Anzahl von VDR als Jungrinder. Goff et al. (1995b) fanden jedoch heraus, dass es zwischen Kühen, die Milchfieber entwickelten, und denen, die nicht erkrankten, keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Anzahl der VDR im Colon zum Zeitpunkt vor, während und nach der Geburt gab. Die Zahl der VDR steigt bei allen Kühen während der Trächtigkeit, sinkt unerklärlicherweise bei der Geburt um 20 – 30 % ab und erreicht in der frühen Laktation wieder höhere Werte.

Alte Kühe weisen zudem eine verminderte Anzahl an Osteoblasten auf, welche über Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und PTH verfügen (Reinhardt et al., 1988; Horst et al., 1994; Goff, 2000). In einer Studie von Johnson et al. (1995) wurde gezeigt, dass die Aktivität der C24-Hydroxylase, ein Enzym welches $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inaktiviert, bei älteren Tieren stark erhöht ist.

Zusätzlich könnte auch der geringere Futterverzehr älterer Kühe für eine verminderte Ca-Aufnahme durch Absorption aus dem Darm verantwortlich sein. Im Vergleich zu primiparen Kühen steigt mit zunehmendem Alter die Milchproduktion, was einen erhöhten Ca-Bedarf mit sich zieht (Horst et al., 1997b).

Fütterung

Während der Trockenstehphase zeigen die Tiere wegen der Hochträchtigkeit einen Verzehrsrückgang (Studer, 1998) und reduzierte Pansen- und Darmtätigkeit, was zu einer verschlechterten Ca-Absorption im Darm führt. Studer (1998) zeigte auf, dass überkonditionierte Tiere mit einem „Body Condition Score“ (BCS) von über 4 ein erhöhtes Risiko besitzen, an Gebärpause zu erkranken.

Eine Ca-reiche Fütterung drei Wochen ante partum (Transitphase) hat einen negativen Einfluss auf die Ca-Mobilisierungsfähigkeit der Kuh (Van de Braak et al., 1986; Olson, 1991; Fürll et al., 1996). Je mehr Ca die Kuh mit der Futterration aufnimmt, desto höher ist die passive Ca-Absorption im Pansen (nach Breves und Schröder, 2005). Diese hohe Ca-Versorgung führt zu einer erniedrigten PTH-Produktion, was wiederum eine Hemmung der Ca-Resorption aus dem Knochen und eine Verminderung der renalen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Produktion bewirkt. Um den Geburtszeitraum ist dann der Stoffwechsel der Kuh nicht fähig, das vor allem über den Fötus und das Kolostrum verloren gehende Ca rasch genug zu ersetzen.

Vereinfacht gesagt, handelt es sich bei der hypokalzämischen Gebärpause um eine Adaptationskrankheit (Hallgren, 1965; Gaynor et al., 1989) und nicht um eine Ca-Mangel-Erkrankung.

In den Abbildungen 3 und 4 wird jeweils die Situation des Ca-Metabolismus einer „gesunden Kuh“ bzw. einer Kuh, welche an Gebärpause erkrankt, dargestellt. Der extrazelluläre Ca-Pool wird durch Ca-Resorption aus dem Knochen sowie Ca-Absorption aus dem Darm aufgefüllt (Inputs). Auf der anderen Seite verliert der Organismus Ca in Milch, Faeces und Urin. Bei der Gebärpause-Kuh, mit einem stark erhöhten Ca-Verlust über die Milch, sind die Ca-Inputs ungenügend.

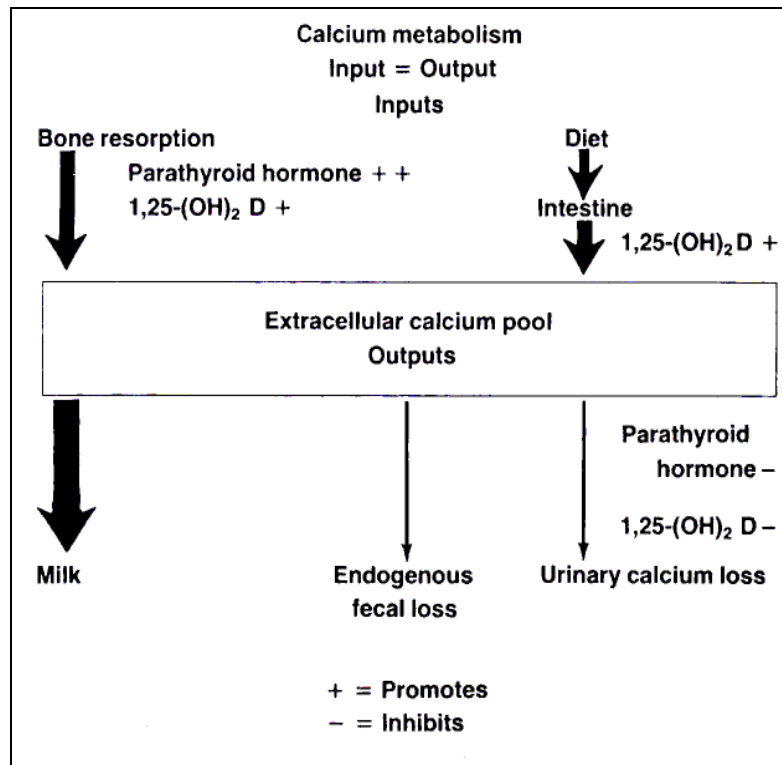


Abb. 3: Ca-Metabolismus einer „gesunden Kuh“ während der Laktation (Goff et al., 1987)

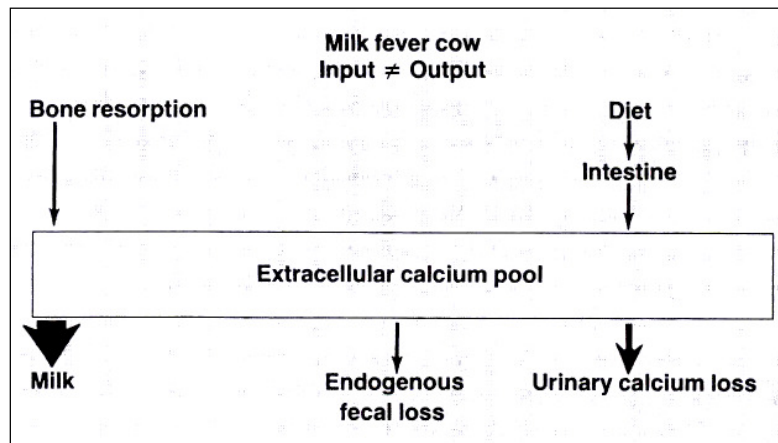


Abb. 4: Ca-Metabolismus einer Kuh mit Gebärpause (Goff et al., 1987)

Ein weiterer fütterungstechnischer Grund, welcher zu gehäufte Gebärpause-Erkrankung führen könnte, ist die Fütterung der Kühe mit kationenreichen Rationen, die eine hohe Alkalinität aufweisen. Dies gilt besonders bei hohem Gehalt an K^+ (selten Na^+) relativ zu Cl^- , S^- (und P^-) im Futter. In vitro Studien (Bushinsky, 1996; Goff, 2000) zeigten nämlich, dass bei einer metabolischen Alkalose die Ca-Resorption aus dem Knochen gehemmt ist. Diese pH-Veränderung im Blut führt dazu, dass sich die Konformation des PTH-Rezeptors an den Osteoklasten derart verändert, dass dieser nicht mehr effektiv seinen Liganden PTH binden kann (Abb. 5).

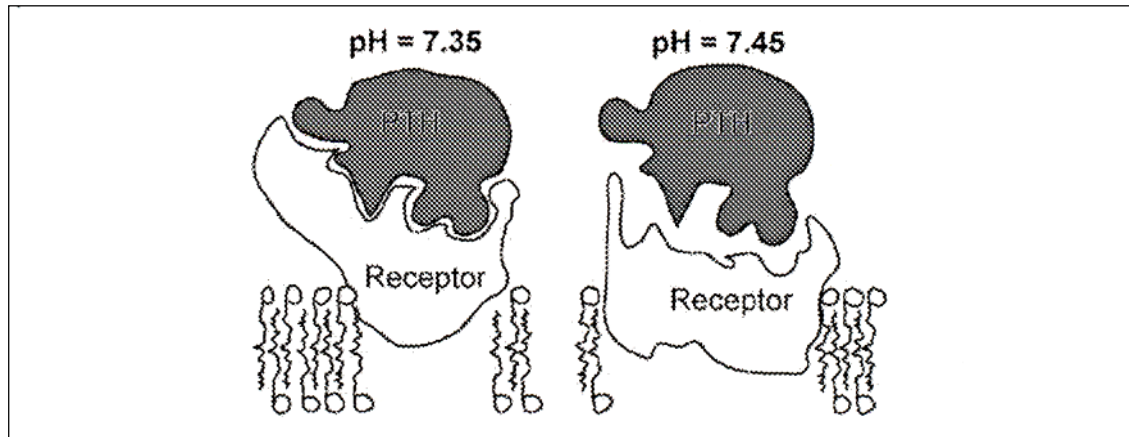


Abb. 5: Effekt des Blut-pHs auf die PTH-Rezeptor-Konformation (Goff, 2000)

Zusätzlich muss darauf geachtet werden, dass Kühe in der Trockenstehperiode keine zu hohen Mengen an P aufnehmen. Kichura et al. (1982) zeigten, dass Jersey-Kühe, welche ante partum mit 82 g P pro Tag (im Vergleich zu den Kontrolltieren, welche mit 10 g P pro Tag) gefüttert wurden, einen tieferen Plasma-1,25(OH)₂D₃-Spiegel ante partum aufwiesen als die Kontrolltiere und somit das Risiko an Gebärpause zu erkranken höher lag. Hohe P-Konzentrationen im Blut hemmen zudem die Aktivität der renalen α -1-Hydroxylase.

Rasse

Die Inzidenz für eine hypokalzämische Gebärpause ist bei den Jersey-Kühen höher als bei den Holstein-Kühen (Bethard et al., 1998). Gründe dafür sind, dass die Zahl der VDR im Colon von Jersey-Kühen signifikant um ca. 15 % tiefer ist als jene der Holstein-Kühe (Goff et al., 1995b).

Die Heritabilität für Gebärpause ist je nach Studie unterschiedlich. In Schweden (Dyrendahl et al., 1972) wurde für die Erkrankung eine Heritabilität von 0,13 errechnet. Im Nachbarland Finnland steigt dieser Wert auf 0,204 an. In der Schweiz wurde gezeigt, dass die Frequenz der Gebärpause bei Red Holstein-Kreuzungen im Vergleich zu reinen Simmentalern erhöht war (Danuser et al., 1988; Danuser und Gaillard, 1990). Am seltensten betroffen sind Kühe der Brauvieh-Rasse (Danuser et al., 1988). Die Erkrankungshäufigkeit liegt nach verschiedenen Studien bei 5 – 10 % der adulten Milchkühe (Oetzel, 1988; Houe et al., 2001), wobei in einzelnen Beständen bis zu 30 % der Kühe betroffen sind (Houe et al., 2001). Dabei waren vor allem die Rassen Jersey und Guernsey betroffen (Houe et al., 2001), gefolgt von Holstein Frisian und Brown Swiss. Die

Ayrshires und Shorthorns zeigten eine niedrigere Inzidenz (Oetzel, 1988). Andere Rinderrassen, beispielsweise die Channel Island, schwedische Rotbunte und weisse Rassen zeigen ebenfalls ein erhöhtes Risiko an Gebärpause zu erkranken (Kusumanti et al. 1993).

Leistung und Laktationsnummer

Das vermehrte Auftreten der Krankheit bei Hochleistungskühen ist mit der hohen Milchleistung verbunden (Allen und Sansom, 1985; Horst et al., 1997b). Festliegen tritt nach Beede et al. (1992) und Horst et al. (1994) vermehrt nach der 3. und darauf folgenden Laktation auf. Allerdings wurde vermehrtes Festliegen auch erst ab der 4. Laktation beobachtet (Rüsch und Rusch, 1996; Zepperitz, 1990; Danuser et al., 1988).

Magnesium-Stoffwechsel

Auch die Bedeutung von Magnesium (Mg) für den Ca-Metabolismus darf nicht vernachlässigt werden. Mg steigert die PTH-Sekretion, fördert Ca-Mobilisierung aus dem Skelett und erhöht die Bildung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in den Nieren. Mg ist zudem Bestandteil des second messengers der Rezeptoren im Zielgewebe (Goff, 2000). Ein Mangel an Mg (Hypomagnesiämie) ist daher stets mit einer verminderten Reaktivität der Zielgewebe auf das $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und das PTH verbunden, was die Gefahr einer Hypokalzämie erhöht (Reinhardt et al., 1988; Goff, 2000).

Östrogene

Östrogene blockieren die Ca-Resorption aus dem Knochen (Hollis et al., 1981; Allen und Sansom, 1985; Reinhardt et al., 1988; Goff, 2000). Der Plasma-Östrogenspiegel steigt beim Rind in den letzten Tagen vor der Geburt dramatisch an (Rings et al., 1997). Aus diesem Grund wurde in verschiedenen Studien (Hollis et al., 1981; Pyörälä et al., 1992) die Meinung vertreten, dass Kühe mit einem höheren Östrogenspiegel ein grösseres Gebärpause-Risiko haben. Die Untersuchungen von Pyörälä et al. (1992) ergaben eine negative Korrelation des Serum-Östradiolspiegels zur Serum-Ca-Konzentration. Zusätzlich beeinflusst ein hoher Östrogenspiegel die Futteraufnahme negativ und somit wird auch weniger Ca über den Darm aufgenommen.

Gebärparese-Vorgeschichte

In den Studien von Danuser et al. (1988) und Danuser und Gaillard (1990) konnten aufgezeigt werden, dass das Risiko für eine erneute Erkrankung in der nächsten Laktation relativ hoch ist. Auch Oetzel (1988) stellte fest, dass Gebärparese häufiger bei Tieren mit einer bestehenden Gebärparese-Vorgeschichte vorkommt.

Erkrankungen

Eine Kuh kann auch sekundär an Hypocalzämie erkranken, wenn sie aufgrund einer Anorexie zu wenig Ca aufnimmt (Rings et al., 1997)

1.3.4. Prophylaxemassnahmen

Nach Horst et al. (1997b) und Rossow (2002) basieren die Möglichkeiten der Gebärpareseprophylaxe auf der Unterstützung von drei Regulationsmechanismen (Abb. 6):

1. Erhöhung der Ansprechbarkeit der Zielorgane (Dünndarm, Niere, Knochen) auf PTH
2. Ca-Mobilisierung aus dem Skelett und verstärkte aktive intestinale Ca-Absorption
3. Steigerung der passiven intestinalen Ca-Absorption

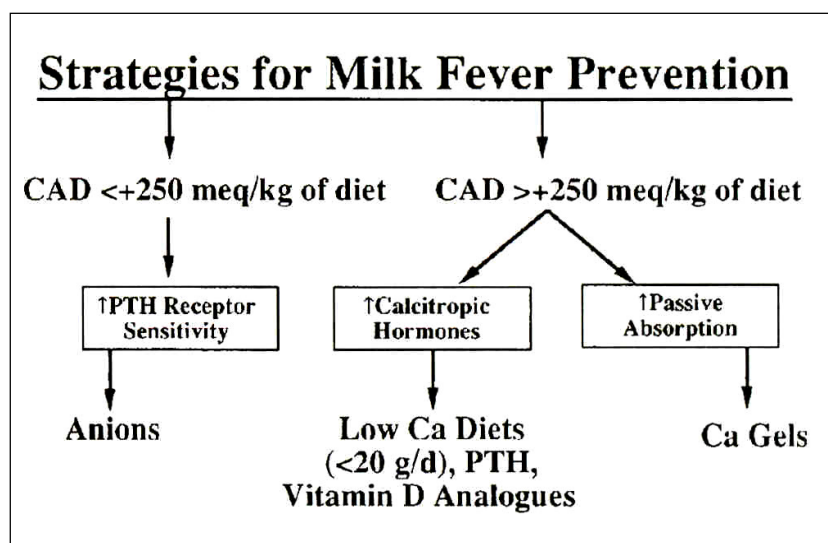


Abb. 6: Strategien zur Prävention der Gebärparese bei der Milchkuh
Die Abhängigkeit der Kation-Anion Differenz (CAD) im Futter auf die Präventionsmassnahmen. (Horst et al., 1997b)

Ca-arme Fütterung während der Transitphasephase

Die Restriktion von Ca in der Futtermittelration während der präpartalen Phase kann die Inzidenz von Milchfieber signifikant reduzieren (Kichura et al., 1982).

Das Verfüttern einer Ca-armen Diät über mindestens 10 bis 14 Tage vor der Geburt führt nach einer anfänglichen Reduktion des Plasma-Ca-Spiegels zu dessen Anstieg durch eine gesteigerte intestinale Ca-Resorption und durch die vermehrte Mobilisation aus dem Knochen. Dies basiert auf einer durch die vorübergehende, fütterungsbedingte Hypokalzämie induzierten Aktivitätssteigerung des PTH (Goff, 2000).

Gegen Ende der Trächtigkeit benötigt eine Kuh pro Tag 30 g Ca und 25 g P. Zu hohe Ca-Gehalte im Futter wirken sich negativ auf die intestinale Ca-Resorption aus, gleichzeitig hemmen hohe P-Gehalte die Bildung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in den Nieren (Goff, 2000).

K-arme Fütterung sowie Fütterung mit weiteren Mineralstoffen während der Trockenstehphase

Goff und Horst (1998) beschrieben die Möglichkeit, K in der Fütterung zu reduzieren, um eine Alkalisierung des Blutes zu verhindern.

Eine Prophylaxe der Gebärpause kann zusätzlich durch eine niedrige P-Versorgung vor dem Abkalben erreicht werden. Wichtig dabei ist, dass das P-Angebot weder das Ca-Angebot unterschreiten noch mehr als 80 g pro Kuh und Tag betragen darf (Rossow, 2002).

Bei der Mg-Versorgung ist darauf zu achten, dass die Tiere während der Trockenstehphase in keine negative Bilanz geraten.

Verabreichung hoher Dosen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder von dessen Metaboliten

Gürtler et al. (1977) konnten durch die intramuskuläre Applikation von 10 Mio. IE $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zwei bis acht Tage vor der Geburt die Häufigkeit der Gebärpauseinzidenz um 91 % senken, wobei die Injektion nach sieben Tagen zu wiederholen ist, wenn die Kühe nicht innerhalb einer Woche nach Erstbehandlung abgekalbt haben. Durch eine hyperdosierte Vitamin-D₃-Behandlung genau eine Woche vor dem errechneten Abkalbetermin konnten Horst und Reinhardt (1983) eine starke Aktivierung des Ca/P-Stoffwechsels provozieren.

Da das Vitamin D aber nicht zielgerichtet, sondern auf den Gesamtorganismus wirkt, kann es allerdings nach wiederholter Applikation zu einer Verkalkung von Weichteilgeweben, insbesondere Gefäßwandungen, kommen (Goff, 2000).

Prophylaxe mit Hilfe von sauren Salzen

DCAB steht für „Dietary Cation Anion Balance“ gleichbedeutend mit CAD (Cation-Anion Difference) und meint die Differenz der Summe der Kationen (Na und K) minus der Summe der Anionen (Cl und S). DCAB induziert durch Zufütterung von Anionen („saure Salze“) eine leichte metabolische Azidose (Oetzel et al., 1988; Horst et al., 1997b; Goff und Horst, 1998; Bethard et al., 1998). Diese Verbindungen bestehen v.a. aus Cl und S („starke Anionen“) und erhöhen den Anteil saurer Ionen in der Futterration. Dadurch soll die DCAB der Ration in einen negativen Bereich um -100 bis -150 meq/kg Trockensubstanz (TS) abgesenkt werden (Oetzel et al., 1988). Diese Ration mit sauren Salzen wird 3 Wochen ante partum bis zur Geburt der Kuh verfüttert. Die DCAB einer Ration wird nach folgender Formel errechnet werden:

$$\text{DCAB (meq/kg TS)} = (\text{K}^+ + \text{Na}^+) - (\text{Cl}^- + \text{S}^{2-})$$

Eine erniedrigte DCAB lässt die Konzentration des Ca-Spiegels im Blut ansteigen, die Ca-Absorption im Darm nimmt zu und die Ca-Resorption im Knochen steigt an. Das Zufügen von sauren Salzen in die Futterration von Kühen in der Trockenstehphase reduziert den Blut- sowie den Urin-pH, was mit einer Reduktion der Gebärpareserate gekoppelt ist (Gaynor et al., 1989; Goff et al., 1991a). Werden hingegen der Ration Na und K beigelegt, so steigen Blut- und Urin-pH und somit auch die Erkrankungsrate (Goff und Horst, 1997).

Die vorher aufgeführte Formel ist allerdings nur eine Annäherung, denn auch Ca, Mg und P haben Einfluss auf den pH-Wert des Blutes (Goff, 2000).

Verabreichung von Ca-Gel kurz vor und nach dem Kalben

Die Gabe von Ca-Gelen unmittelbar vor und nach dem Kalben dient dem Ziel, die passive Ca-Resorption im Darm zu steigern und dadurch die Hypokalzämie zu vermeiden (Rossow, 2002).

1.4. Vitamin D

1.4.1. Nomenklatur

Vitamin D bzw. Calciferole sind ein Sammelbegriff für verschiedene Stoffe (Steroide), die im eigentlichen Sinn den Hormonen zuzuschreiben sind. Nähere Erkenntnisse über die Metabolisierung von Vitamin D sowie die Fähigkeit des Organismus zur Eigensynthese lassen mittlerweile den Begriff „Vitamin“ als nicht mehr ganz korrekt erscheinen. De Luca (1981) schlägt deshalb den Begriff „Prohormon“ vor, da die D-Vitamine über zytosolische Rezeptorproteine unmittelbar am Zellkern angreifen und ihre Synthese endokrin kontrolliert wird (Kaune, 2000).

Calciferole können vom Säuger-Organismus aus Cholesterol in der Haut bei Sonneneinstrahlung (UV-Licht) gebildet werden. Das in der Haut durch Sonneneinstrahlung gebildete Vitamin aus Cholesterol ist das Vitamin D₃ oder auch Cholecalciferol genannt. Das aus Pflanzen stammende Provitamin D, Ergosterin, wird ebenfalls durch Photolyse in der Haut umgewandelt. Es trägt die Bezeichnung Ergocalciferol bzw. Vitamin D₂. Gemäss Horst et al. (1994) besitzen Cholecalciferol und Ergocalciferol bei den meisten Säugetieren dieselbe biologische Aktivität.

1.4.2. Biotransformation

Wie in Abbildung 7 veranschaulicht wird, wird Vitamin D₃ (Cholecalciferol), selbst biologisch nicht aktiv, unter Einfluss von UV-Strahlen der Wellenlänge 290-315 nm (Holick, 1995) und Thermoisomerisierung aus 7-Dehydrocholesterol in der Haut gebildet. Das in der Haut gebildete oder mit der Nahrung aufgenommene Vitamin D₃ wird mittels Chylomikronen zur Leber transportiert und dort am C25 hydroxyliert. Das so gebildete 25(OH)D₃ (Calcidiol) bindet wie andere Steroidhormone an spezifische Proteine (Vitamin D-Binding Protein = DBP) und wird anschließend in die Niere transportiert und am C1-Atom zur aktiven Form 1,25(OH)₂D₃ (Calcitriol, Vitamin D-Hormon) hydroxyliert. Im Gegensatz zur 25-Hydroxylase in der Leber ist die Aktivität der 1- α -Hydroxylase der Niere streng reguliert. PTH sowie sinkende Ca- und P-Konzentrationen im Blut stimulieren deren Aktivität, während sie durch 1,25(OH)₂D₃ selbst gehemmt wird (Kaune, 2000).

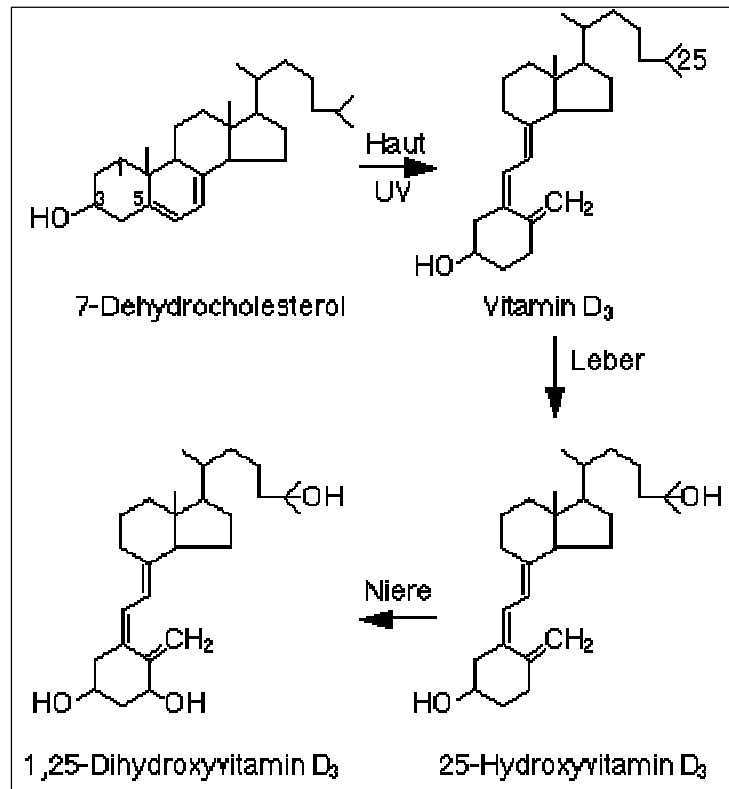


Abb. 7: Biosynthese von 1,25(OH)₂D₃ (Trachsel, 1999)

1.4.3. Wirkungsmechanismus

1,25(OH)₂D₃ kommt im Blut gebunden an ein Vitamin D-bindendes Protein (DPB) vor (Bikle et al., 1985). Nur gerade 5 % des Hormones zirkulieren in freier Form (Bikle et al., 1984). Das freie 1,25(OH)₂D₃ interagiert mit Rezeptorproteinen in Darmepithelzellen und Osteoblasten. Rezeptoren für Vitamin D₃ sind im Zellkern der Zielzelle lokalisiert und werden, wie Steroidhormon-Rezeptoren, zu aktiven Transkriptionsfaktoren, wenn das Hormon bindet. Die Reaktionen der Zielzelle auf das Hormon sind in erster Linie die veränderte Transkription von Genen. In Darmepithelzellen wird die Synthese eines Ca-bindenden Proteins, Calbindin-D_{9k} beim Säuger und Calbindin-D_{28k} beim Vogel (Wasserman und Taylor, 1966; Kallfelz et al., 1967, Schröder, 1996; Wasserman, 2004) induziert und damit die Aufnahme von Ca (und P) aus dem Darm ermöglicht. Osteoblasten werden zur Differenzierung und zur Synthese von Kollagen und alkalischer Phosphatase angeregt. Dies führt zur Synthese von neuem Knochengewebe und dem Einbau von Ca in die Knochen.

Neben den klassischen Zielorganen Darm, Niere, Knochen und Nebenschilddrüse sind weitere Vitamin D-Effekte in einer Vielzahl von Organen

beschrieben worden. Hierzu gehören unter anderem die antiproliferative, prodifferenzierende Wirkung in der Haut, dem Muskel, dem Knorpel und den Zellen des blutbildenden Gewebes. Ferner fördert $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ das Nervenwachstum sowie die neuronale Regeneration im Gehirn und hat darüber hinaus Einfluss auf verschiedene Vorgänge im Zusammenhang mit Immunabwehr und Fertilität (Brown, 1991).

1.5. Vitamin D-Rezeptor (VDR)

1.5.1. Lokalisation, Molekulargewicht und Vorkommen

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist, wie andere Steroidhormone auch, ein lipophiler Ligand, der in den Zellkern gelangen kann und dort an einen DNA-assoziierten Rezeptor bindet (Haussler et al., 1988).

Seit 1994 ist bekannt, dass für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auch Rezeptoren in der Zellmembran von Zielzellen (siehe Kapitel 1.4.3.) existieren. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist im Gegensatz zu anderen Steroidhormonen ein flexibles Molekül (Abb. 8), das verschiedene Konformationen annehmen kann (Norman et al., 2001). Der transmembrane Rezeptor und der intrazelluläre Rezeptor bevorzugen unterschiedliche Konformationen des von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

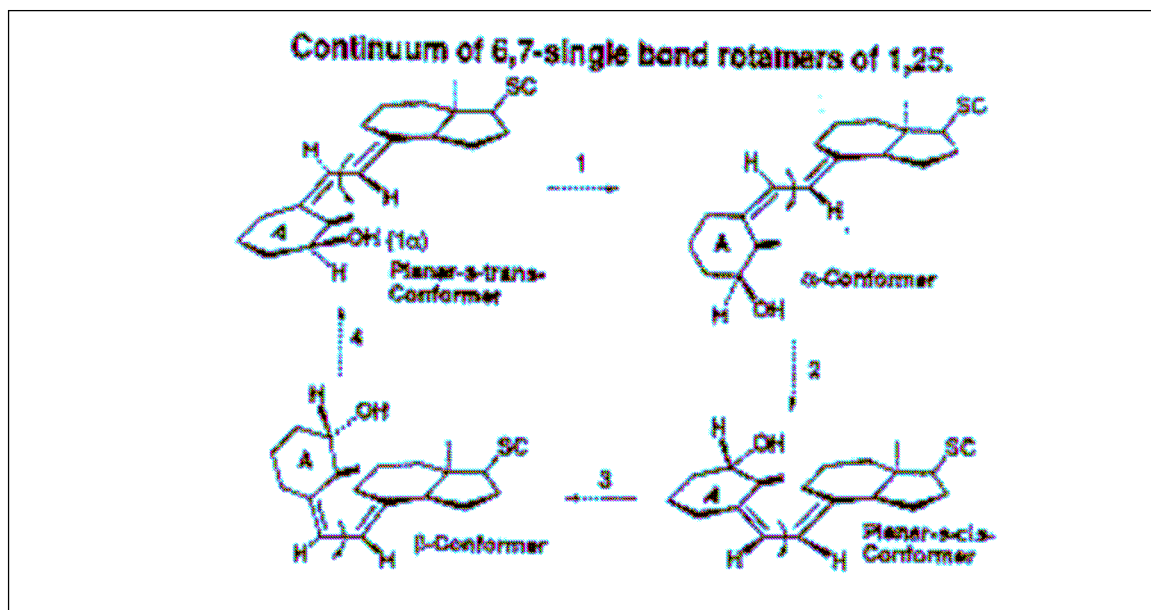


Abb. 8: Darstellung der Konformationsflexibilität des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. 360° Rotation an der 6,7 Carbon-Carbon Bindung. Gezeigt sind vier Schritte mit jeweils 90° Rotation. (Norman et al., 2001)

Abbildung 9 veranschaulicht die beiden Aktivierungskaskaden, welche aufgrund der verschiedenen Konformationen des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zustande kommen. Nimmt das $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die 6-s-trans-Form an, so wird der intrazelluläre VDR aktiviert, was am Ende zur Synthese neuer Proteine wie Calbindin führt. Bei der 6-s-cis-Form kommt der transmembrane VDR zum Zuge, welcher für die Aktivierung von Enzymen verantwortlich ist. Im Gegensatz zum intrazellulären VDR handelt es sich bei der Aktivierung des transmembranen VDR um einen schnellen Prozess (Norman et al., 2001).

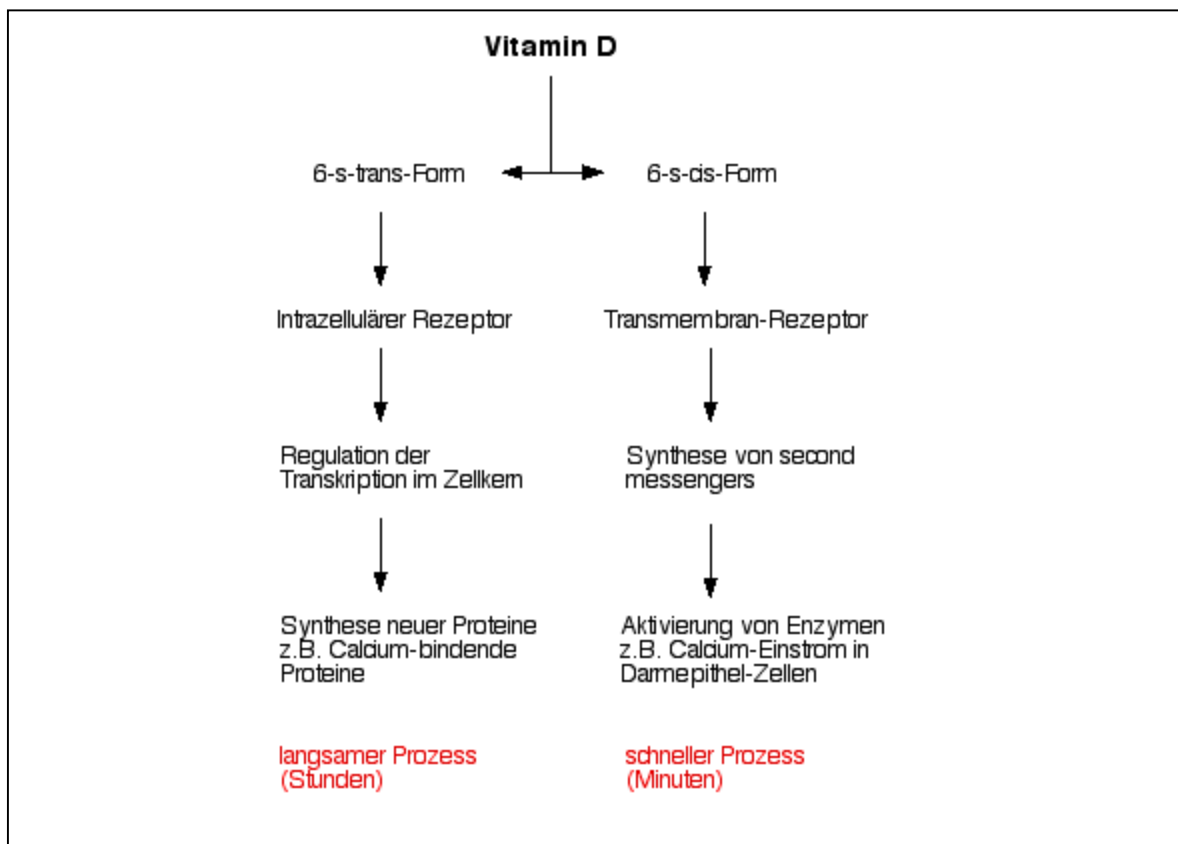


Abb. 9: Darstellung der Aktivierungskaskade der beiden VDR (intrazellulär und transmembran) sowie deren Folgen (Trachsel, 2002)

Der intrazelluläre VDR befindet sich zusammen mit dem Thyroid-Hormon-Rezeptor (TR) und den Retinoid-Acid-Rezeptoren (RAR) im unbesetzten Zustand direkt im Zellkern und wird innerhalb der Steroidrezeptor-Superfamilie der Subfamilie (Klasse II) der Schilddrüsenhormonrezeptoren zugeordnet.

Tabelle 1 zeigt, dass je nach Spezies der VDR ein Molekulargewicht zwischen 48 kDa und 60 kDa besitzt (Bronner, 1987; Haussler et al., 1988).

Tab. 1: VDR-Molekulargewichte bei verschiedenen Spezies

Spezies	Molekulargewicht
Rind	48 kDa
Affe	52 kDa
Mensch	52 kDa
Ratte	54 kDa
Schwein	54 kDa
Maus	54,5 kDa
Vogel	60/58 kDa

VDR bindet mit einer sehr hohen Affinität ($K_d = 10^{-11} \text{M}$) und sehr hoher Selektivität an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Horst et al., 2003).

Haussler et al. (1988) zeigten auf, dass beim Vergleich der Molekülgrösse des VDR von Vögeln und verschiedenen Säugern ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen der molekularen Masse des Rezeptors und der phylogenetischen Entwicklungsstufe der einzelnen Spezies deutlich wird.

Mittlerweile ist bekannt, dass das $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Endokrine System nicht nur die traditionellen Zielorgane Darm, Knochen und Niere umfasst, sondern dass auch in den β -Zellen des Pankreas, in der Hypophyse, in der Plazenta, im Ovar, in den Sertolizellen der Tubuli seminiferi des Hodens, im Gesäuge, in der Haut, sowie in aktivierten B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Keratinozyten und vielen Tumorzellen VDR vorkommen (Bouillion et al., 1995).

1.5.2. Struktur und Funktion des VDR

Der VDR ist ein Phosphoprotein, welches nach der Bindung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine weitere Phosphorylierung erfährt (Haussler et al., 1988). Der Rezeptor besitzt zwei funktionelle Domänen: am N-terminalen Ende ist die stark konservierte DNA-Bindungsdomäne, welche aus zwei „Zinkfingern“ besteht (Abb. 10). Jeweils vier Cysteinmoleküle, die durch ein Zinkatom fixiert sind, bilden den Grundstock für diese fingerähnliche Aminosäureschleife (Kaune, 2000). Diese Zinkfinger werden durch ein Protein verdeckt. Der C-terminale Bereich des Moleküls umfasst die Hormonbindungsdomäne (Haussler et al., 1988). Da der Rezeptor nicht sehr stabil ist, zerfallen beide Bindungsstellen zeit- und temperaturabhängig (Horst et al., 2003).

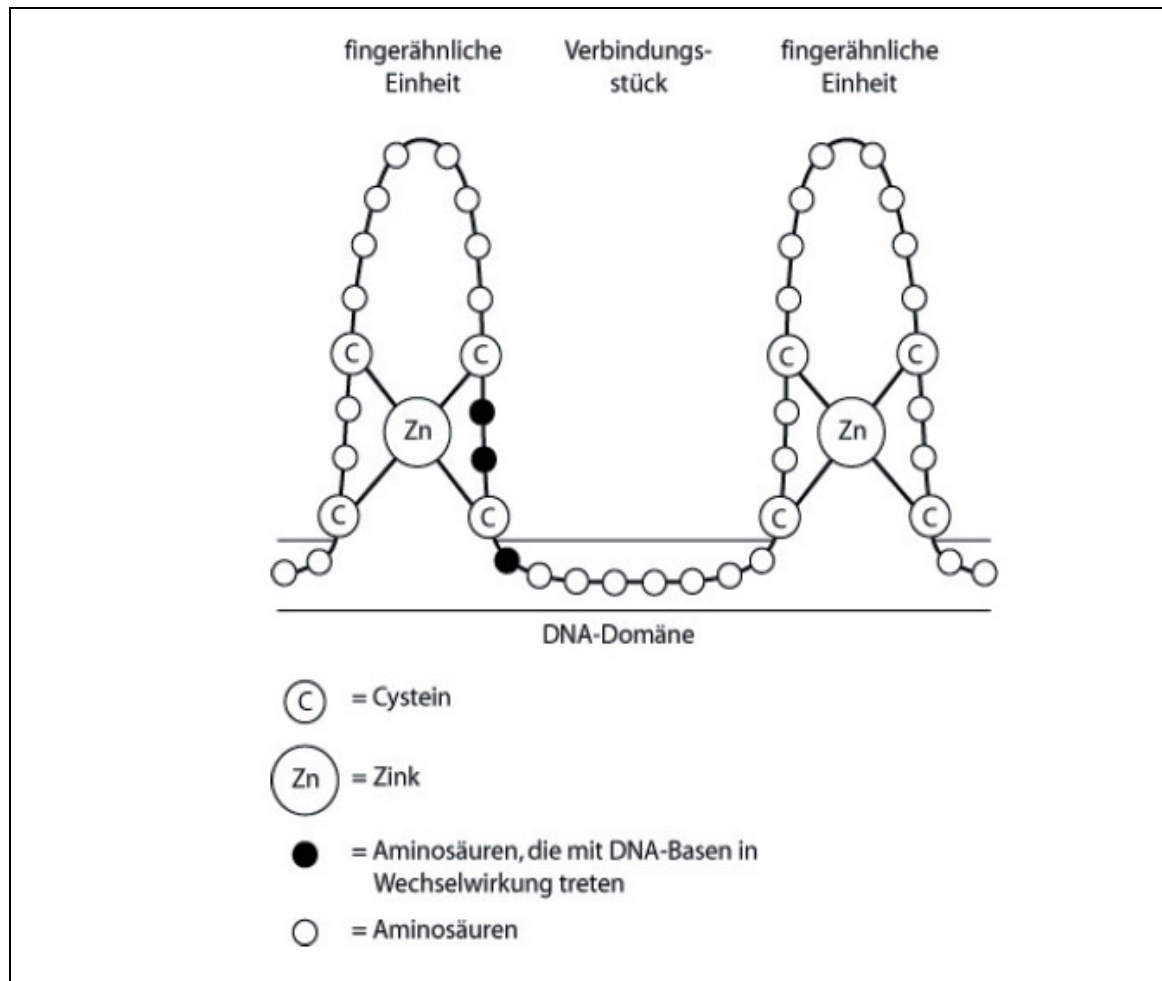


Abb. 10: DNA-Domäne des Vitamin D-Rezeptors (VDR) mit ihren Zinkfingern (Kaune, 2000)

Eine typische Eigenschaft der Schilddrüsenhormon-Rezeptorgruppe ist die Fähigkeit mit verwandten Rezeptoren Heterodimere zu bilden. Die Ligandenbindung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit dem VDR fördert den Zusammenschluss mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR). Gemeinsam bilden beide das VDR/RXR Heterodimer. Dieses Heterodimer besitzt eine hohe Affinität zu einer spezifischen regulatorischen Sequenz der DNA, dem Vitamin-D-Response-Element (VDRE), welches in der Promotorregion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -kontrollierten Zielgenen liegt (MacDonald et al., 1993). Das Andocken des VDR/RXR-Heterodimers an das VDRE bewirkt wiederum das Binden der RNA-Polymerase an diesen Komplex und in der Folge die Transkription der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -abhängigen Gene (Nelson und Cox, 2001). Somit bewirkt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine erhöhte Syntheserate unter anderem von 24-Hydroxylase, alkalischer Phosphatase, Calbindin- D_{9k} und Calbindin- D_{28k} , Osteocalcin, Ca-ATPase und VDR (Haussler et al., 1995) (Abb. 11). Diese Proteine regeln vorwiegend den Ca-Stoffwechsel in den klassischen Zielgeweben Darm, Niere und Knochen (Haussler, 1986).

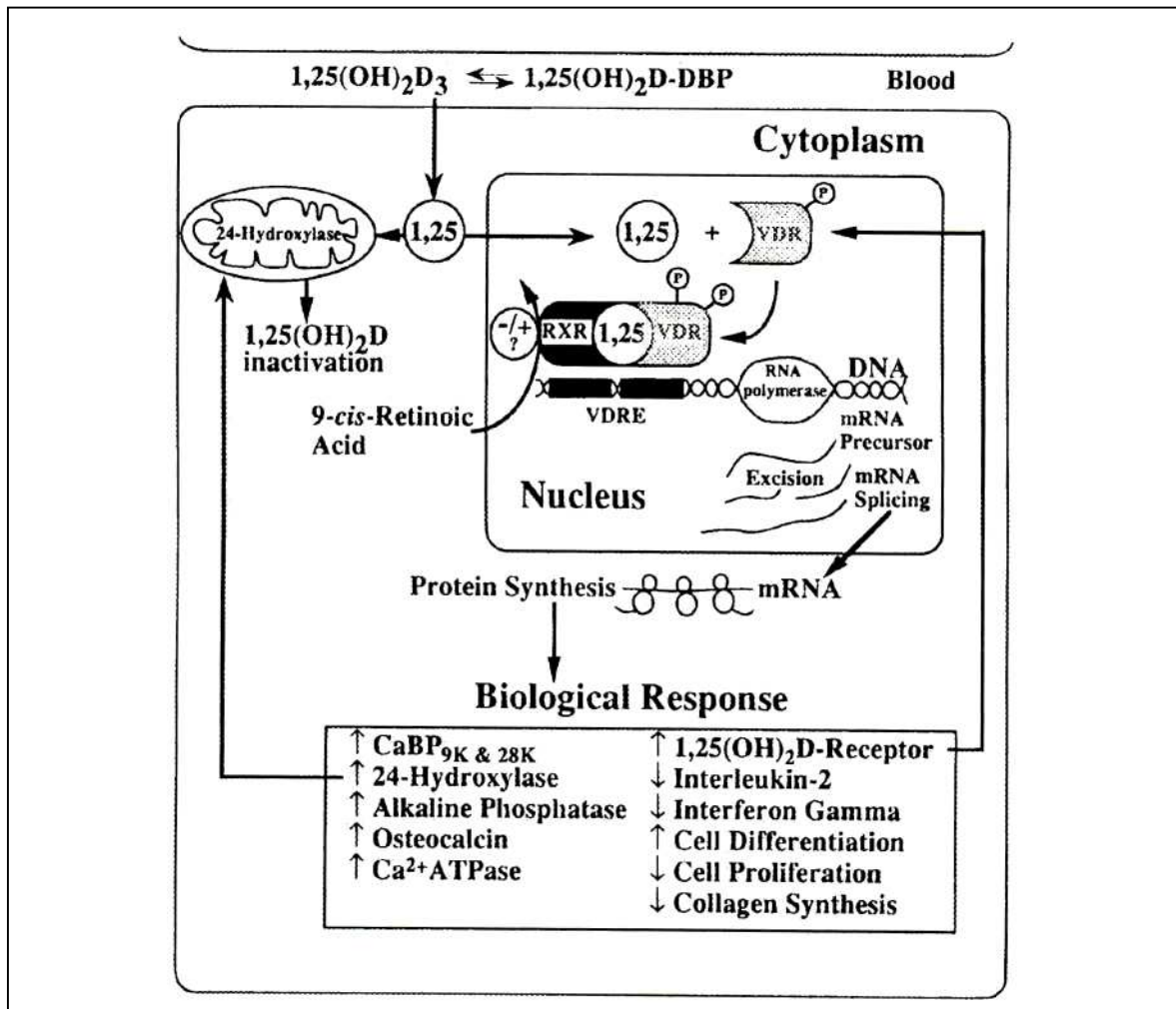


Abb. 11: Zellulärer Mechanismus von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$
 RXR = Retinoid-X-Rezeptor, VDR = Vitamin D-Rezeptor, VDRE = Vitamin-D-Response-Element, CaBP = Ca bindendes Protein (= Calbindin $\text{D}_{9\text{K}}$ & $\text{D}_{28\text{K}}$)
 (Horst et al., 1997a)

1.5.3. VDR beim Rind

Es gibt mehrere Untersuchungen zum Vorkommen und zur Verteilung von VDR bei verschiedenen Tierarten und beim Menschen. Unter anderem wurden VDR beim Huhn, Schwein, Ratte und Rind untersucht.

Neibergs et al. (1996) zeigten, dass der VDR des Rindes aus 3 Aminosäuren weniger als beim Menschen, also aus 424 Aminosäuren besteht. Folgende Erkenntnisse bezüglich des VDR wurden nach Durchführung eines „basic local alignment search tool“ (BLAST) gewonnen: die bovine VDR-cDNA ist zu 99 % homolog mit jener des menschlichen VDR, zu 85 % homolog mit der der Ratte, 86 % homolog mit der der Maus und zu 81 % homolog mit jener des Vogels (Neibergs et al., 1996). Nach Riner (2006) beläuft sich die VDR-Grösse auf 48 kD. Die grösste Ähnlichkeit zwischen dem VDR des Rindes und jenem des

Menschen besteht im Bereich der ersten 1064 bp, welche die DNA-Bindungsdomäne und die Liganden-Bindungsdomäne beinhalten. Diese Domänen sind bei Ratte und Vogel bis auf 3 Aminosäuren zu 100 % konserviert (Neibergs et al., 1996).

1.5.4. VDR-Nachweismethoden

Immunhistochemie ist ein Sammelbegriff für verschiedene Methoden, die zur Sichtbarmachung von zell- und gewebespezifischen Antigenen verwendet werden, indem diese mit Hilfe von Antikörpern in situ markiert und visualisiert werden. Man unterscheidet direkte und indirekte immunhistochemische Methoden (Abb. 12). In dieser Arbeit wurde nur mit der indirekten Methode gearbeitet, bei welcher mehrere biotinylierte (= mit Biotin markierte) sekundäre Antikörper an verschiedenen Epitopen des primären Antikörpers binden, was zu einer Signalverstärkung und damit zu einer deutlich höheren Sensitivität führt.

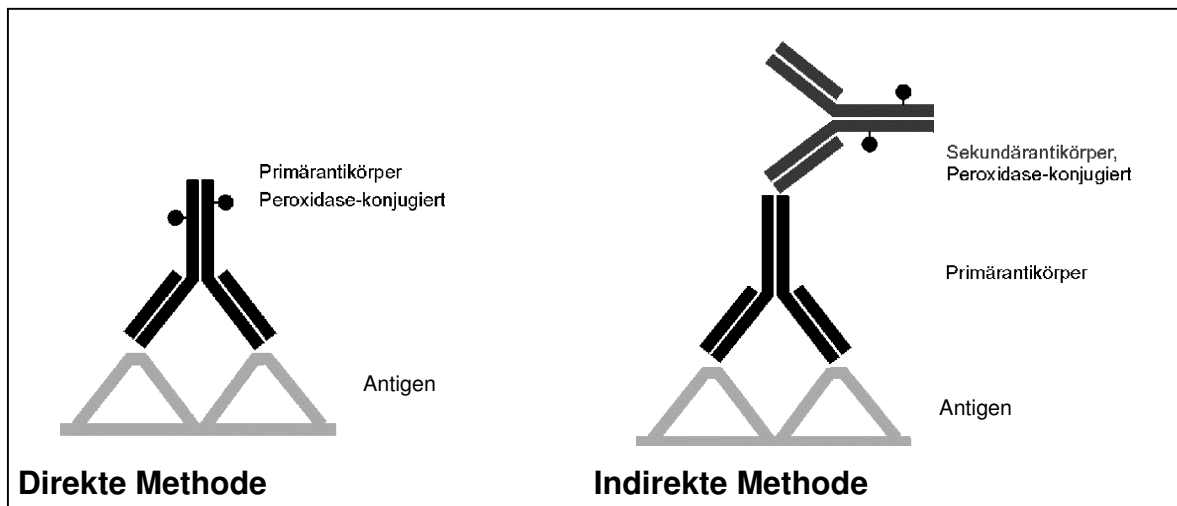


Abb. 12: Immunhistochemische Methoden (Herbst und Hübner, 2003)

Die in unseren Untersuchungen gewählte ABC-Methode (**A**vidin-**B**iotin-**C**omplex) (Abb. 13) macht sich die enorme Affinität von Avidin zu Biotin zu nutze, welche bis eine Million mal stärker als bei einer gewöhnlichen Antigen-Antikörper-Bindung sein kann und somit fast irreversibel ist. Das Glykoprotein Avidin hat vier Bindungsstellen für Biotin, welches sich einerseits mit diversen Proteinen (z.B. sekundärer Antikörper) inklusive Enzymen (z.B. Meerrettichperoxidase) konjugieren lässt. Diese Eigenschaften können zur Bildung makromolekularer Komplexe bestehend aus durch Avidin quervernetzter biotinylierter Peroxidase genutzt werden. Obwohl die dreidimensionale Struktur des Avidin noch nicht

ganz verstanden ist, ist klar, dass mindestens eine Biotinbindungsstelle pro Komplex frei bleibt. Diese Bindungsstelle ist es, die an die biotinylierten sekundären Antikörper bindet und somit die für die Farbreaktion wichtigen Enzyme in unmittelbare Nähe zu den Antigenen bringt.

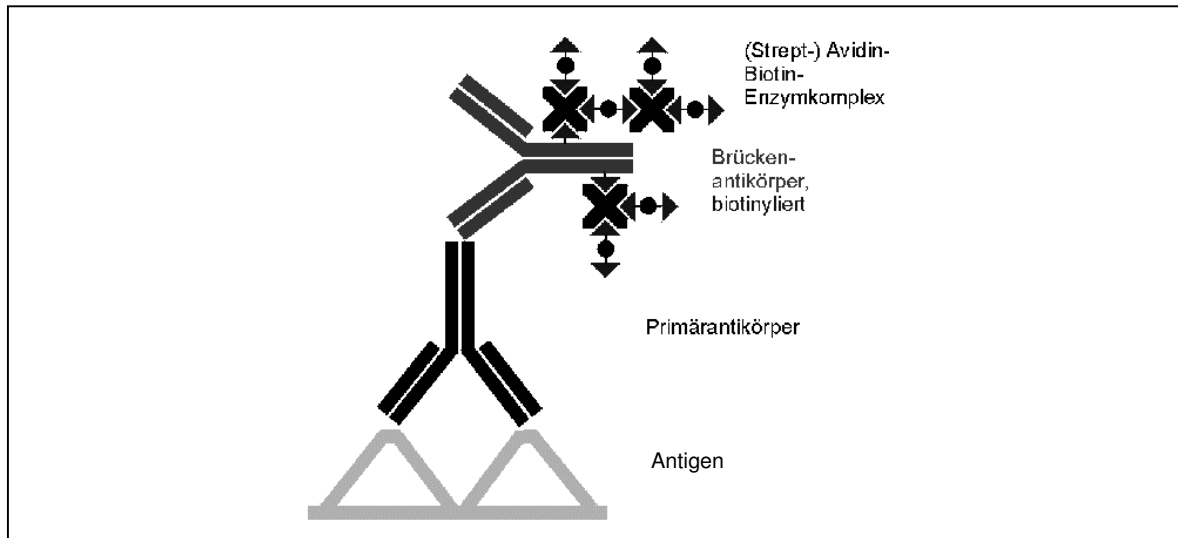


Abb. 13: **ABC-Methode** (Herbst und Hübner, 2003)

Mittels dem Chromogen 3-3'-Diaminobenzidin (DAB) kann die Lokalisation der Antigene sichtbar gemacht werden. Das auf dem zu färbenden Schnitt als Elektronendonator wirkende Chromogen aktiviert die reversibel blockierte Meerrettichperoxidase. Diese setzt das DAB in ein braunes, in Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln unlösliches Farbprodukt um.

Der *Western Blot* dient der Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen. Dabei können einzelne Proteine aus Virus-Präparationen, Gesamt-Zell-Protein oder Gewebe-Lysaten nachgewiesen werden. Nach Auftrennung der Proteine, abhängig von ihrer Größe, im elektrischen Feld werden sie auf eine Membran transferiert und dadurch immobilisiert. Auf der Membran erfolgt der Nachweis des Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers. Der gebundene erste Antikörper wird durch einen zweiten Antikörper, der entweder radioaktiv markiert oder an ein Enzym (Peroxidase, Phosphatase etc.) gekoppelt ist, detektiert. Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren oder Proteine aufgetrennt werden. Dabei wandern die zu untersuchenden Moleküle in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix.

2. TIERE, MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchstiere

Die Untersuchung wurde mit 36 Kühen durchgeführt, die von Schlachtviehmärkten im Grossraum Zürich, aus der Ostschweiz sowie aus Graubünden stammten. Die Tiere gehörten den Rassen Brown Swiss und Holstein Friesian an. Die eine Hälfte der Tiere war jünger als 4,5 Jahre, die andere älter als 5,5 Jahre. Die Tiere wurden in vier Gruppen à 9 Tiere eingeteilt (Tab. 2).

Tab. 2: Gruppendefinition

Gruppe	Rasse	Alter	Laktation-Nr.
BS _J	Brown Swiss	< 4,5 Jahre	1
BS _A	Brown Swiss	> 5,5 Jahre	2 bis 6
HF _J	Holstein Friesian	< 4,5 Jahre	1
HF _A	Holstein Friesian	> 5,5 Jahre	2 bis 7

Die Tiere wurden jeweils am Schlachtttag oder einen Tag früher angeliefert und einer kurzen klinischen Untersuchung unterzogen.

2.2. Probeentnahmen

2.2.1. Für die Blutanalyse

Die Blutentnahme erfolgte jeweils nach Anlieferung der Tiere am Tierspital in Zürich. Die Blutproben wurden mittels Vacutainer-System (Venojet®, Terumo, Leuven, Belgium) an der Vena jugularis (linke Halsseite) entnommen und anschliessend zentrifugiert (10 min mit 1580 g). Das Serum wurde abpipetiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2. Für die Messung der Ca-Fluxe

Die Kühe wurden mit einem handelsüblichen Bolzenschussapparat betäubt und anschliessend durch Ausbluten aus der Carotis getötet.

Für die Versuche in den Ussing-Kammern wurde ungefähr 10 min nach dem Tod der Kuh je ein Segment aus dem Duodenum (ca. 1 m aboral des Pylorus) sowie aus dem Colon (ca. 1 m oral des Anus) entnommen. Die herausgeschnittenen Darmstücke wurden sofort in eisgekühlte und mit Oxycarbon begaste Parson-Puffer-Lösung (Tab. 4) gelegt und ins Labor gebracht.

2.2.3. Für den Nachweis des Vitamin D-Rezeptors (VDR) mittels Immunhistologie

Nach der Entnahme der Proben für die Ussing-Kammer-Versuche wurden an insgesamt 12 Stellen des Gastrointestinaltraktes (GIT) Proben für die Immunhistologie herauspräpariert (Tab. 3).

Tab. 3: Entnahmestellen der Immunhistologie- sowie Western Blot-Proben

Pansen	Pa	ventraler Pansensack; vom Grund
Haube	Ha	vom Grund
Blättermagen	Bm	Grund der Blätter
Labmagen, Fundusteil	LF	grosse Krümmung, Mitte, inkl. Faltenbasis
Labmagen, Pylorusteil	LP	kurz vor Pylorus
Duodenum, vor Pankreas	DvP	ca. 10 cm aboral des Pylorus, antimesenterial → <i>vor</i> der Pankreaseinmündung
Duodenum, nach Pankreas	DnP	ca. 100 cm aboral des Pylorus, antimesenterial → <i>nach</i> der Pankreaseinmündung
Jejunum	Je	ca. in der Mitte, antimesenterial
Ileum	Il	ca. in der Mitte, antimesenterial
Cäcum	Cä	ca. in der Mitte, antimesenterial
Colon descendens	Co	ca. 100 cm oral des Anus, antimesenterial
Rektum	Re	ca. 20 cm oral des Anus, antimesenterial

Die Proben wurden stets von den gleichen Personen gewonnen, um zu gewährleisten, dass die Proben immer von denselben anatomischen Stellen entnommen wurden. Die Proben wurden mit physiologischer NaCl-Lösung vom

Chymus befreit und gespült. Das Fettgewebe wurde wegpräpariert. Unmittelbar danach wurden die Gewebestücke (ca. 1 cm x 2 cm) für 24 Stunden in 4 %iges neutral gepuffertes Formalin verbracht.

2.2.4. Für die Chymus-Analysen

Aus dem GIT jeder Kuh wurde an insgesamt neun Stellen Chymus entnommen: Pansen, Haube, Blättermagen, Labmagen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Cäcum und Colon. Bei einigen Kühen war der Ileum-Abschnitt leer.

Die Proben wurden in beschrifteten Plastikbechern gesammelt und anschliessend bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren.

2.3. Ussing-Kammer Versuche

2.3.1. Elektrolytlösungen

Für die Präparation des Duodenums und des Colons sowie für die Versuche wurde ein Standardpuffer (Parsons und Paterson, 1965; Tab. 4) verwendet. Der Puffer wurde vor Versuchsbeginn frisch aus der Stocklösung hergestellt und mit Oxycarbon (95% O₂ und 5% CO₂) begast und der pH auf 7,4 eingestellt.

Tab. 4: Bestandteile des Parson-Puffers

Substrat	mmol/l
NaCl	107,00
NaH ₂ PO ₄	0,20
Na ₂ HPO ₄	1,80
KCl	4,50
NaHCO ₃	25,00
CaCl ₂	1,25
MgSO ₄	1,00
Glukose	122,0

2.3.2. Gewebepräparation

Die in eisgekühlte und mit Oxycarbon begaste Parson-Puffer-Lösung eingelegten Darmstücke wurden aufgeschnitten, der Kot entfernt und ausgiebig mit Puffer gespült. Anschliessend wurde das Gewebe mit Hilfe einer Schere von der Muskularisschicht befreit und in Stücke von ca. 1 cm x 2 cm geschnitten. Mit Hilfe zweier Pinzetten wurden die Darmstücke auf einer Ussing-Kammerhälfte fixiert, indem die äusseren Geweberänder über die 10 Nadelspitzen gespannt wurden. Die Kammerhälften wurden anschliessend verschraubt und jede Hälfte mit 3,5 ml Parson-Puffer gefüllt. Diese Lösung umspülte somit während der gesamten Versuchsdauer das Gewebe auf den mukosalen und serosalen Seiten.

Es wurden jeweils je vier Kammern mit Duodenum- bzw. mit Colonschleimhaut gefüllt (Tab. 5). Die Ca-Fluxe der beiden Darmabschnitte (Duodenum und Colon) wurden jeweils zweimal von serosal nach mukosal (sm) und zweimal von mukosal nach serosal (ms) gemessen.

Tab. 5: Einteilung der acht Kammern

Kammer	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8
Gewebe	Duod.	Duod.	Duod.	Duod.	Colon	Colon	Colon	Colon
Richtung	sm	sm	ms	ms	sm	sm	ms	ms

2.3.3. Aufbau der Ussing-Kammer

Die Experimente wurden in modifizierten Ussing-Kammern (Ussing und Zehran, 1951; Abb. 14 und 15) mit isoliertem Dünn- und Dickdarmgewebe durchgeführt. Diese Versuchskammern bestanden aus zwei miteinander verschraubbaren Plexiglashälften. Sie wurden mit einer zirkulierenden Wasserummantelung mit Hilfe eines Wasserbades auf 37 °C temperiert. Die zu untersuchenden Darmstücke wurden zwischen den Acrylhälften über einer 1 cm² grossen, ovalen Öffnung eingespannt, wobei das Gewebe zunächst mit Hilfe von 10, um die Öffnung angeordneten Nadelspitzen fixiert wurde. Auf der Oberseite jeder Kammerhälfte befand sich eine mit einem ca. 2 cm hohen Kamin versehene Öffnung. Diese diente zum Einfüllen der Pufferlösung, zur Applikation der Testsubstanzen und zur Probeentnahme. Die Pufferlösung konnte von der Unterseite her kontinuierlich mit Oxycarbon (95 % O₂ und 5 % CO₂) begast

werden. Ein Flowmeter diente der Regulation der Begasung, welche für die Aufrechterhaltung des pH-Wertes der Pufferlösung und der Sauerstoffversorgung des Gewebes sorgte. In unmittelbarer Nähe des Gewebes war bei jeder Kammerhälfte eine Bohrung für die Agarbrücken zur Messung der transepithelialen Potentialdifferenz (PD) vorhanden. An den Stirnseiten der Kammerhälften befand sich mittig gegenüber dem Gewebe eine weitere Bohrung für Elektroden zur Einspeisung und Messung des Kurzschlussstroms (I_{sc}).

Zum Abdichten der mit zwei rostfreien Metallschrauben verschlossenen Kammerhälften diente eine Silikonpaste. Jede Kammer wurde mit 3,5 ml einer auf 37 °C temperierten Pufferlösung gefüllt. Die exponierte Gewebefläche von 1 cm² wurde somit beidseitig von der begasten Lösung umspült.

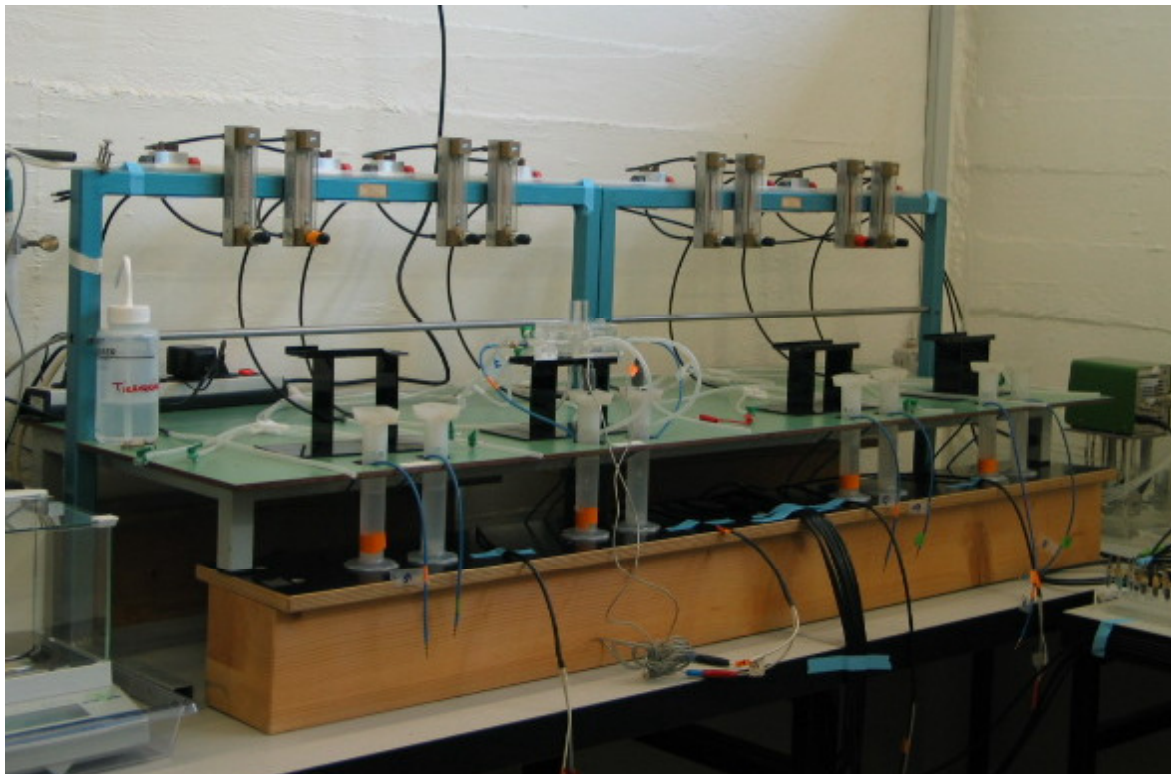


Abb. 14: Anordnung der Ussing-Kammern

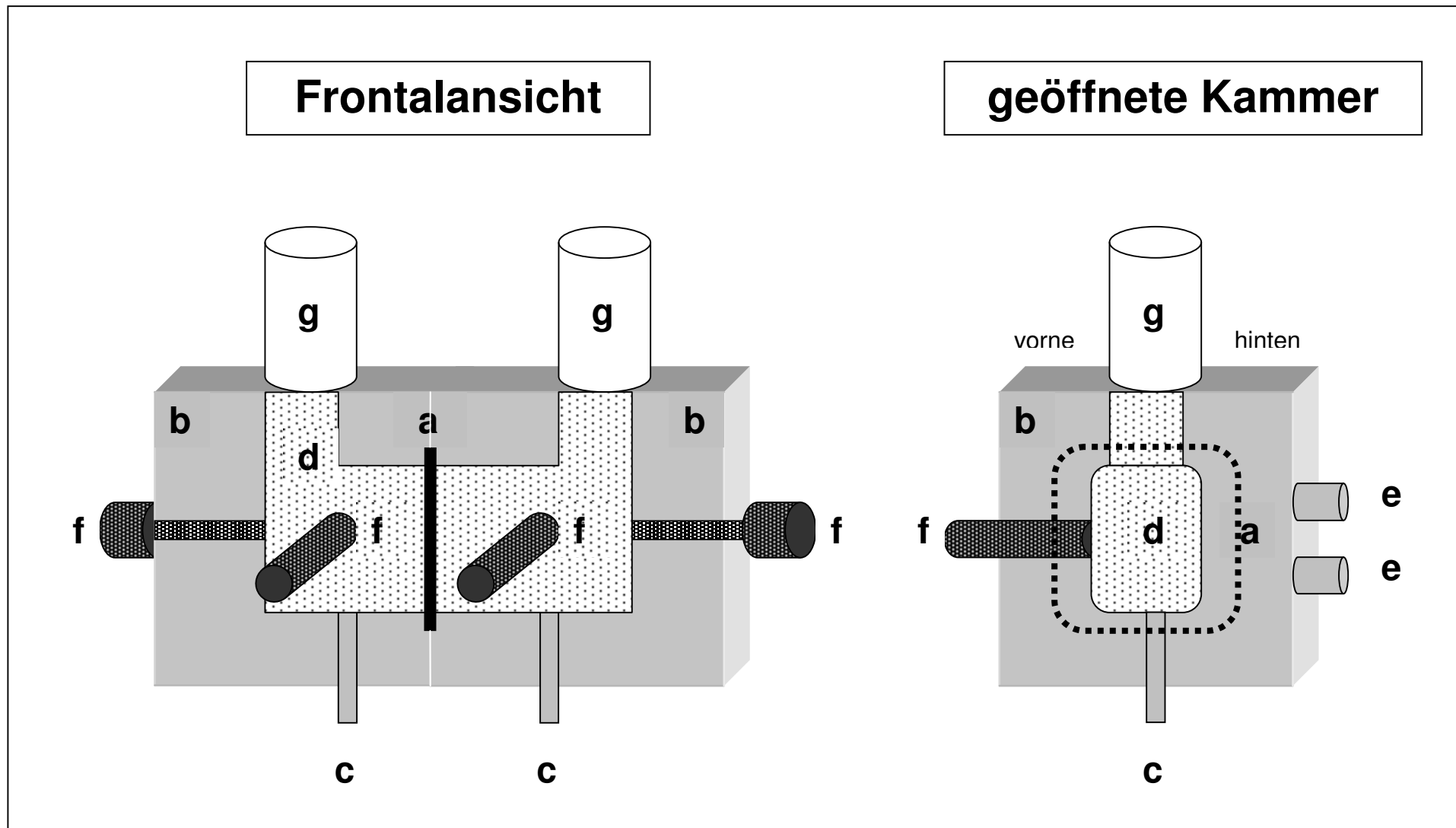


Abb.15: Graphische Darstellung der Ussing-Kammern

Das Darmstück (a) wird zwischen den Plexiglashälften (b) eingespannt und beidseitig von der begasten (c) Pufferlösung (d) umspült. Mittels einer Wasserummantelung (e: Wasseranschlüsse) werden die Kammern auf 37 °C temperiert. Über die Agarbrücken (f) werden die Kammern mit den Elektroden zur Messung der PD und des I_{sc} verbunden. Der Kamin (g) dient zum Einfüllen der Pufferlösung und zur Applikation der Testsubstanzen.

2.3.4. Elektrische Messungen

Die elektrischen Messungen wurden mit einer Computer-kontrollierten, automatischen voltage-clamp-Anlage (AC Microclamp, Ingenieurbüro Mussler, Aachen, Deutschland) durchgeführt. Mit Hilfe von zwei in gesättigter KCl-Lösung getauchten Kalomelelektroden (Ingold 303, Steinbach/Ts, Deutschland), die über Agarbrücken mit der Kammerlösung verbunden waren, wurde die transepitheliale PD bestimmt. Über an der Stirnseite der Kammer befindliche Ag^+/AgCl -Elektroden in 3 molarer KCl-Lösung, die ebenfalls über Agarbrücken mit der Kammer in Verbindung standen, wurde durch die voltage-clamp-Anlage Strom in das System eingespeist, so dass die PD zwischen Mukosa und Serosa auf Null eingestellt wurde. Der dazu notwendige Strom wird als Kurzschlussstrom (short-circuit current = I_{sc}) bezeichnet. Durch diesen Kurzschluss des Gewebes lag kein elektrischer Gradient zwischen mukosaler und serosaler Seite vor. Da sowohl auf der serosalen wie auf der mukosalen Seite das Gewebe vom selben Volumen der gleichen Lösung umspült wurde, existierte auch kein Ionen- oder Druckgradient. Daher war der applizierte I_{sc} ein Mass für die Netto-Ionenbewegung durch das Gewebe, welche auf aktiven Transportprozessen beruhen musste, da für passive Netto-Ionenverschiebungen keine treibenden Kräfte vorlagen.

Zusätzlich zum Kurzschlussstrom bestimmte die Messanlage die Gewebeleitfähigkeit G_t . Hierzu wurde nach jeweils 5 sec I_{sc} -Messung für eine Sekunde ein Stromimpuls (I_{Klemm}) von abwechselnd $I_{sc} + 100 \mu\text{A}$ und $I_{sc} - 100 \mu\text{A}$ angelegt und aus der daraus resultierenden Spannung (U_{Klemm}) nach dem Ohmschen Gesetz die Leitfähigkeit des Gewebes berechnet:

$$G_t = I_{Klemm} / U_{Klemm}$$

In einer Leermessung, bei der die Kammern mit Standardpuffer gefüllt wurden, aber kein Gewebe eingespannt war, wurde vor Versuchsbeginn die PD der Elektroden und der Serienwiderstand der Messanlage und der Kammerflüssigkeit zwischen den Elektroden bestimmt. Die während des Versuchs ausgegebenen Werte wurden automatisch um diese Beträge korrigiert.

Der I_{sc} wurde kontinuierlich auf einem Analogschreiber (SE 120, Goerz Instruments Ges. m. b. H., Wien, Österreich) aufgezeichnet. Ausserdem wurden

die über jeweils eine Minute gemittelten Werte für I_{sc} und G_t ausgedruckt (Drucker: 8510 RN, C. Itho Electronics).

Der Kurzschlussstrom wird üblicherweise als positiv definiert, wenn positive Ladungsträger von mukosal nach serosal transportiert werden. Das kann durch eine Kationen-Nettoresorption oder Anionen-Nettosekretion verursacht werden. Bei umgekehrten Verhältnissen ist der I_{sc} negativ. Die Messung des Kurzschlussstromes erfolgte in $\mu A\ cm^{-2}$. Um eine übersichtlichere Darstellung zu erhalten, wurde der Strom direkt in die pro Zeit und Fläche transportierte Menge einwertiger Ladungsträger umgerechnet ($\mu Eq\ h^{-1}\ cm^{-2}$). Dabei entspricht ein Strom von $26,9\ \mu A\ cm^{-2}$ dem Transport von einem μmol eines einwertigen Ions pro Stunde über eine Gewebefläche von einem cm^2 .

2.3.5. Messung unidirektionaler Ionenflüsse

In den Versuchen wurden die unidirektionalen Flüsse von ^{45}Ca (PerkinElmer, Schwerzenbach, Schweiz) bestimmt. Sowohl der mukosal-serosale als auch der serosal-mukosale Fluss wurde gemessen. 10 bis 20 min nach Aufspannen des Gewebes wurden $10\ \mu l$ ^{45}Ca -Lösung in eine Kammerhälfte (markierte Seite) einpipettiert. Zur Bestimmung der Mukosa-nach-Serosa-Fluxe (J_{ms}) wurde der Marker auf der mukosalen Seite zugegeben, zur Bestimmung der Serosa-nach-Mukosa-Fluxe (J_{sm}) dagegen auf der serosalen Seite. Nach einer Äquilibrationszeit von weiteren 60 min wurde mit der Fluxmessung begonnen. Zunächst wurde von der markierten Seite eine Doppelprobe von je $100\ \mu l$ gezogen (IHS = initial hot side). Danach war ein Ersetzen des entnommenen Volumens mit Parson-Puffer nötig. Direkt nach der Probeentnahme von der markierten Seite wurde eine Doppelprobe von je $250\ \mu l$ von der gegenüberliegenden, nicht markierten Seite gezogen. Dieses Vorgehen diente der Bestimmung der Ausgangsaktivität der initial nicht markierten Seite. Das entnommene Volumen ($500\ \mu l$) wurde wiederum durch Parson-Puffer ersetzt. Diese Probeentnahme (= T_0) legte den Beginn der Zeitskala fest. Im Abstand von 20 min wurden die nächsten Doppelproben von je $250\ \mu l$ von der nicht markierten Seite gezogen und das entnommene Volumen ersetzt. Am Ende des Versuchs (nach T_{80}) wurde nochmals eine Doppelprobe von $100\ \mu l$ von der markierten Seite gezogen (FHS = final hot side). Am Schluss wurden durch Zugabe von jeweils $4\ \mu l$ Carbachol ($5 \times 10^{-5}\ mol/l$ in AD, Sigma, Buchs, Schweiz) auf der serosalen Seite die Vitalität der Darmstücke überprüft.

Zur Bestimmung des exakten Probenvolumens wurden die Szintillationsfläschchen, in die die Proben gefüllt wurden, vor und nach Zugabe der Proben gewogen, bevor sie mit je 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Quicksafe A, Zinsser Analytic, Frankfurt, Deutschland) versetzt wurden. Die Aktivität der Proben wurde anschliessend im Beta-Zähler (TRI-CARB[®] Liquid Scintillation Analyzer, Packard, Zürich, Schweiz) gemessen.

Für jeden Versuch wurde die Hintergrundaktivität bestimmt, indem 4 Proben der unmarkierten Parson-Puffer-Lösung als „Leerwert“ entnommen und mitgezählt wurden. Der Mittelwert dieser Proben wurde dann von allen Proben subtrahiert.

Die Differenz der beiden unidirektionalen Fluxe ergibt den Nettoflux ($J_{\text{net}} = J_{\text{ms}} - J_{\text{sm}}$). Ein negativer J_{net} weist auf eine Netto-Sekretion von Ca-Ionen von serosal nach mukosal hin, ein positiver J_{net} auf eine Netto-Absorption.

Alle Daten der Ussing-Kammer Versuche wurden als $\text{MW} \pm \text{SF}$ dargestellt.

2.4. Immunhistologischer Nachweis des Vitamin D-Rezeptors (VDR)

2.4.1. Probenaufarbeitung

Nach einer 24-stündigen Aufbewahrung in 4 %igem neutral gepuffertem Formalin wurden die Proben während 24 Stunden in Einbettkassetten (Jet Kassetten[®], Leica, Nussloch, Deutschland) unter fliessendem Wasser gespült. Es folgte eine 24-stündige Lagerung in 50 %igem Ethanol. Danach wurden die Proben in 70 %igem Ethanol aufbewahrt, bis sie weiter verarbeitet wurden.

Die darauffolgende Paraffineinbettung konnte maschinell mittels des Gewebeinfiltrationsautomaten (Leica, TP1020[®], Nussloch, Deutschland; Protokoll Tab. 6) und der Paraffinausgiesstation (Leica, EG1160[®], Nussloch, Deutschland) vorgenommen werden.

Tab. 6: Protokoll der Entwässerung und Infiltration der Gewebeproben mit Paraffin

Dauer (h)		Reagens
1.	4	70% Ethanol
2.	4	70% Ethanol
3.	4	96% Ethanol
4.	4	96% Ethanol
5.	4	100% Ethanol
6.	4	100% Ethanol
7.	4	Methylbenzoat
8.	4	Methylbenzoat
9.	4	Xylol
10.	4	Xylol
11.	4	Paraffin
12.	4	Paraffin

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem Rotationsmikrotom (Leica, RM1160[®], Nussloch, Deutschland) 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, welche anschliessend auf permanent positiv geladene Objektträger (SuperFrost Plus[®] Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen wurden. Die Trocknung während ungefähr 12 Stunden bei 37 °C fand in einem Brutschrank (BE 400/3 TWW, Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland) statt.

2.4.2. Immunhistochemische Färbungen

Für die Visualisierung des VDR wurde wie bereits in Kapitel 1.5.4. besprochen, die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) gewählt. Beim VDR Ab-1 (Clone 9A7γ.E10.E4) handelt es sich nach Angaben des Herstellers um einen monoklonalen Antikörper, welcher sowohl mit der unbesetzten wie auch besetzten Form des VDR reagiert. Er zeigt keine Interaktionen mit dem Östrogen- und Glukortikoid-Rezeptor.

Die Entparaffinierung, Rehydrierung und der anschliessende immunhistochemische Ablauf wurden gemäss Tabelle 7 vorgenommen.

Tab. 7: Immunhistologie-Protokoll
TBS = Tris gepufferte NaCl-Lösung; H₂O₂ = Wasserstoffperoxid;
DAB = Chromogen 3-3'-Diaminobenzidin

Arbeitsgang	Dauer
1. waschen in Xylol	2 x 10 min
2. waschen in 100 % Ethanol	2 x 3 min
3. waschen in 96 % Ethanol	3 min
4. waschen in 70 % Ethanol	3 min
5. spülen mit TBS	2 min
6. kochen in Citratpuffer (Mikrowelle: bei 600 W)	3 x 5 min
7. abkühlen in Citratpuffer (Kaltwasserbecken)	20 min
8. waschen in 3 % H ₂ O ₂	10 min
9. spülen mit TBS und auf Coverplates bringen	
10. spülen mit TBS	3 min
11. inkubieren mit 100 µl Avidin D -Blockierungslösung	20 min
12. spülen mit TBS	3 min
13. inkubieren mit 100 µl Biotin -Blockierungslösung	20 min
14. spülen mit TBS	3 min
15. inkubieren mit 100 µl Protein-Block, Serum-free	10 min
16. spülen mit TBS	3 min
17. inkubieren mit 100 µl biotinmarkiertem Ak 9A7Gamma (Verdünnung 1:100)	Nacht bei 4 °C
18. spülen mit TBS	3 min
19. inkubieren mit StrepABComplex/HRP	30 min
20. spülen mit TBS	3 min
21. entwickeln mit DAB	3 min
22. spülen mit TBS	3 min
23. kernfärben mit Hämalaun	3 min
24. bläuen unter fließendem Wasser	10 min
25. waschen in 70 % Ethanol	reindippen
26. waschen in 96 % Ethanol	reindippen
27. waschen in 100 % Ethanol	2 min
28. waschen in Xylol	5 min
29. eindecken mit Pertex®	

Um allfällige unspezifische Bindungen auszuschliessen wurde bei jedem Färbedurchgang eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle dienten zuvor überprüfte Duodenumsschnitte einer Kuh.

Die in diesem Arbeitsablauf verwendeten Wirkstoffe und Chemikalien sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tab. 8: Wirkstoffe und Chemikalien sowie deren Herkunft

Vitamin D-Receptor Ab-1 (Clone 9A7γ.E10.E4)	P. H. Stehelin&Cie AG, Basel, CH
ProTaq Citrat-Puffer-Konzentrat	quartett, Berlin, D
Avidin / Biotin-Blocking-Kit	Vector Laboratories, Genf, CH
Protein-Block, Serum-free	Dakocytomation, Zug, CH
StrepABComplex/HRP	Dakocytomation, Zug, CH
Chromogen 3-3` Diaminobenzidin (DAB)	medite Medizinaltechnik AG, Nunningen, CH
Pertex®	medite Medizinaltechnik AG, Nunningen, CH

2.4.3. Auszählverfahren und Auswertung

Alle immunhistochemisch angefärbten Schnitte wurden unter dem Mikroskop (Leica DMLB®, Heerbrugg, Schweiz) bei 400 facher Vergrösserung beurteilt und ausgewertet. Bei der Beurteilung wurde vor allem auf eine homogene Anfärbung über den ganzen Schnitt geachtet. Für die Auswertung wurden im Oberflächenepithel, sowie in den oberflächlichen, mittleren und basalen Drüsenschichten der Lamina propria je 500 Zellen aus verschiedenen Gesichtsfeldern angeschaut und je nach Braunfärbung in 5 Kategorien eingeteilt: negativ, sehr schwach, schwach, mittelmässig und stark angefärbte Zellkerne (Abb. 16).

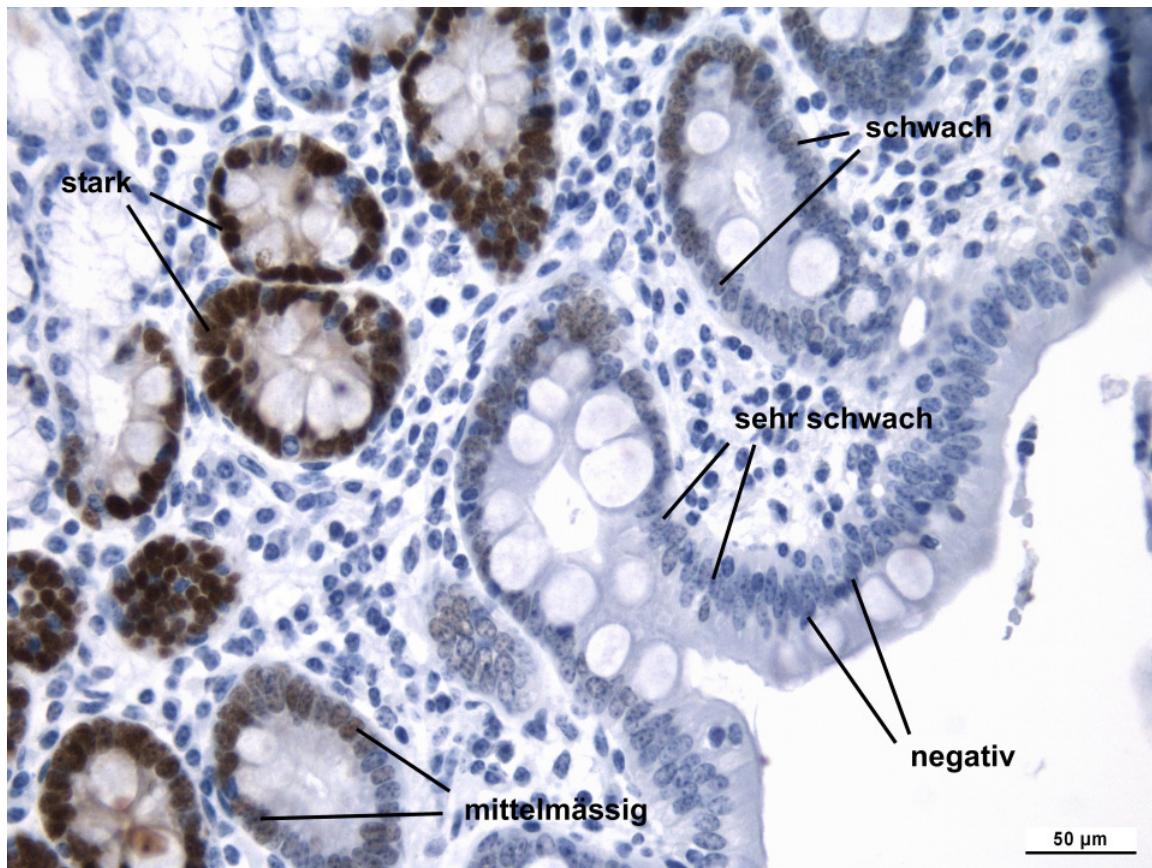


Abb. 16: Die fünf verschiedenen Farbintensitäten der immunreaktiven Enterozyten-Kerne im Duodenum, vor Pankreas, einer Kuh (HF_A)

Nach dem Erfassen der Farbintensitäten (FI) und deren Häufigkeiten wurden diese zum Immunreaktiven Score (IRS) umgerechnet. Dazu wurde die Anzahl (n) der negativen Zellkerne mit **0** multipliziert, sehr schwach angefärbte Zellkerne mit **0,25**, schwach angefärbte Zellkerne mit **1**, mittelmässig angefärbte Zellkerne mit **4** und schliesslich die Zahl der stark angefärbten mit **9** (FI₀ – FI₉). Der IRS errechnet sich durch Addition der einzelnen Produkte und setzt sich also aus der Summe der Einzelprodukte zusammen, die sich aus der Multiplikation des exponentiellen Umrechnungsfaktors für die Farbintensität mit der jeweiligen Anzahl gemessener Zellen ergeben (Kohtes, 1998).

$$\text{IRS} = 0 \times n(\text{FI}_0) + 0,25 \times n(\text{FI}_{0,25}) + 1 \times n(\text{FI}_1) + 4 \times n(\text{FI}_4) + 9 \times n(\text{FI}_9)$$

Tab. 9: Immunreaktiver Score (IRS) in Abhängigkeit von der Anfärbung der Zellkerne.

IRS	Mittlere Anfärbung der Zellkerne
0	negativ
1 – 125	sehr schwach positiv
126 – 500	schwach positiv
501 – 2000	mittel positiv
2000 – 4000	stark positiv

Tabelle 9 zeigt, dass bei einem IRS von Null sämtliche Kerne negativ angefärbt sind, es sind also keine Rezeptoren vorhanden. Liegt der IRS aber beispielsweise bei 3000, so ist die durchschnittliche Färbeintensität stark positiv. Dies bedeutet, dass ein grosser Teil der Zellkerne stark positiv angefärbt ist, obwohl auch negative, sehr schwach, schwach und mittelgradig positiv angefärbte Zellkerne vorkommen können.

Zum Fotografieren einzelner Schnitte stand eine Digitalkamera (DC 480, Leica, Heerbrugg, Schweiz) zur Verfügung.

2.5. Chymus-Analysen

2.5.1. Weender-Analyse

Die Weender-Analyse der aufgetauten Chymusproben wurde nach gängiger Methode von Naumann und Bassler (1997) durchgeführt. Dabei wurden Trockensubstanz, Rohasche-, Rohfaser- und Rohprotein-Gehalt sowie die Mengenelemente Kalzium (Ca), Phosphor (P) und Magnesium (Mg) bestimmt. Einige Proben mussten aufgrund von Kieselsteinen oder anderen Fremdkörpern ausgeschlossen werden.

2.5.2. Auswertungen

Statistisch ausgewertet wurden nur die Ca-, Mg- und P-Resultate. Diese drei Mengenelemente wurden auf % Trockensubstanz (TS) umgerechnet.

2.6. Blutanalysen

Zur Kontrolle des Mineralstoffwechsels der Tiere wurden die in Tabelle 10 aufgelisteten Parameter bestimmt. Die Analysen wurden mit dem Autoanalyser COBAS MIRA (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) durchgeführt.

Tab. 10: Bestimmung der blutchemischen Parameter

Parameter	Testkit	Methode
Kalzium	ABX Diagnostics A11A00112	Farbtest
Magnesium	Roche 1489330	Farbtest
Phosphor	ABX Diagnostics A11A00098	UV-Test

2.7. Statistische Auswertungen

Alle Resultate werden als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SF) dargestellt.

Die statistische Auswertung der Versuchsdaten erfolgte mittels des Systat-Programmes (Systat 11, Systat Software, Inc., Point Richmond, CA 94804-2028, USA). Zur Prüfung der Resultate wurde eine wiederholte Varianzanalyse ANOVA mit dem Faktor „Group“ verwendet. Als Folgetest wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

Das Signifikanzniveau wurde bei allen Prüfverfahren bei $\alpha = 0,05$ festgelegt. Differenzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p > 0,05$ werden als nicht signifikant (ns) und solche mit einem $p < 0,05$ als signifikant (*) bezeichnet.

3. RESULTATE

Die folgenden Resultate sind als Mittelwerte (MW) der Gruppen mit Standardfehler (SF) dargestellt. Für die 36 Kühe, die in vier Gruppen eingeteilt wurden, gelten die Definitionen nach Tabelle 11.

Tab. 11: Gruppendefinition

Gruppe	Rasse	Alter	Laktation-Nr.
BS _J	Brown Swiss	< 4,5 Jahre	1
BS _A	Brown Swiss	> 5,5 Jahre	2 bis 6
HF _J	Holstein Friesian	< 4,5 Jahre	1
HF _A	Holstein Friesian	> 5,5 Jahre	2 bis 7

3.1. Ca-Flux Messung in Duodenum und Colon

Die Differenz der beiden unidirektionalen Fluxe ergibt den Netto-Flux ($J_{\text{net}} = J_{\text{ms}} - J_{\text{sm}}$). Ein negativer J_{net} weist auf eine Netto-Sekretion von Ca-Ionen hin, ein positiver J_{net} auf eine Netto-Absorption.

Tab. 12: Ca-Fluxe im **Duodenum**
sm = serosal nach mukosal; ms = mukosal nach serosal

Gruppe Fluxe	BS _J	BS _A	HF _J	HF _A
sm-Fluxe	37,67 ± 4,82	42,05 ± 3,28	29,47 ± 3,19	52,93 ± 2,41
ms-Fluxe	21,81 ± 3,39	29,17 ± 2,47	18,97 ± 2,20	39,80 ± 3,11
Netto-Fluxe	-14,81 ± 2,19	-12,88 ± 4,29	-10,76 ± 1,76	-13,83 ± 3,83

Tab. 13: Ca-Fluxe im **Colon**
sm = serosal nach mukosal; ms = mukosal nach serosal

Gruppe Fluxe	BS _J	BS _A	HF _J	HF _A
sm-Fluxe	37,45 ± 2,62	39,88 ± 5,29	35,24 ± 1,52	36,66 ± 1,88
ms-Fluxe	29,64 ± 2,52	34,54 ± 3,71	25,35 ± 1,56	24,08 ± 1,66
Netto-Fluxe	-7,53 ± 1,94	-6,33 ± 3,93	-8,97 ± 2,09	-12,57 ± 2,37

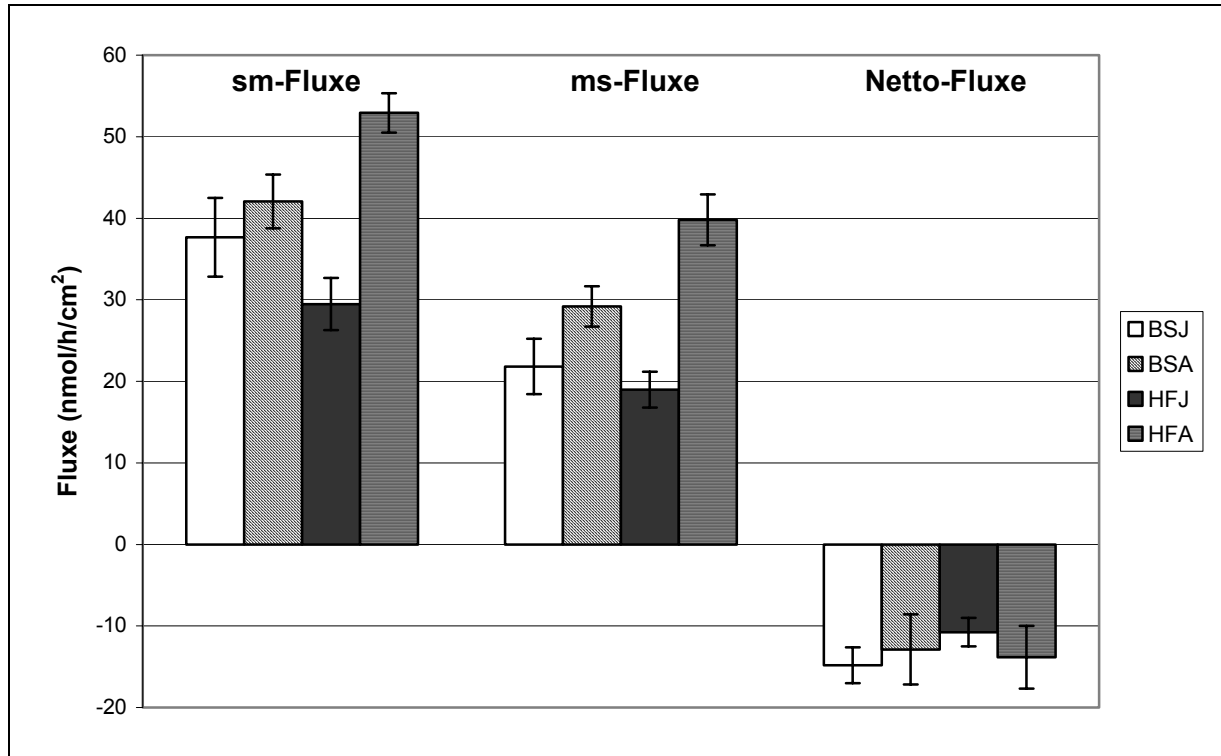


Abb. 17: Ca-Fluxe im Duodenum der 36 Kühe
Dargestellt sind die unidirektionalen Fluxe von serosal nach mukosal (J_{sm} = sm-Fluxe), von mukosal nach serosal (J_{ms} = ms-Fluxe) sowie die Netto-Fluxe (J_{net}) in der Messperiode $T_0 - T_{80}$ (MW \pm SF).

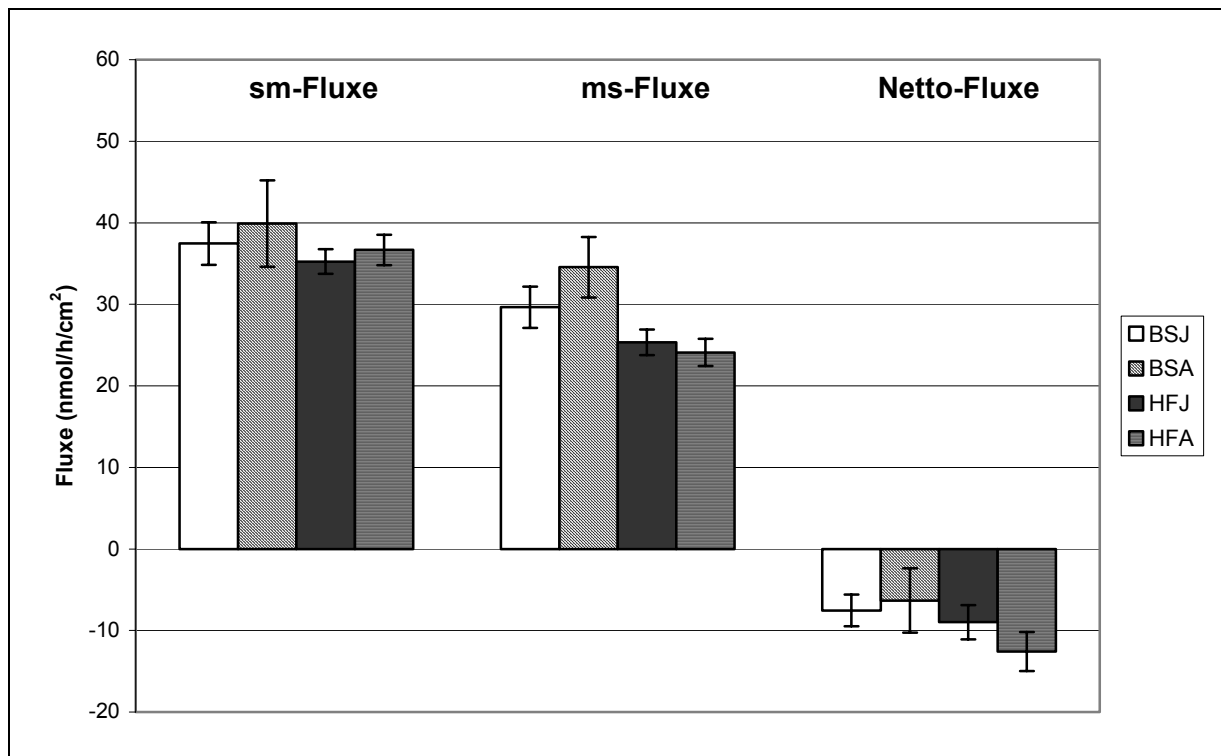


Abb. 18: Ca-Fluxe im Colon der 36 Kühe
Dargestellt sind die unidirektionalen Fluxe von serosal nach mukosal (J_{sm} = sm-Fluxe), von mukosal nach serosal (J_{ms} = ms-Fluxe) sowie die Netto-Fluxe (J_{net}) in der Messperiode $T_0 - T_{80}$ (MW \pm SF).

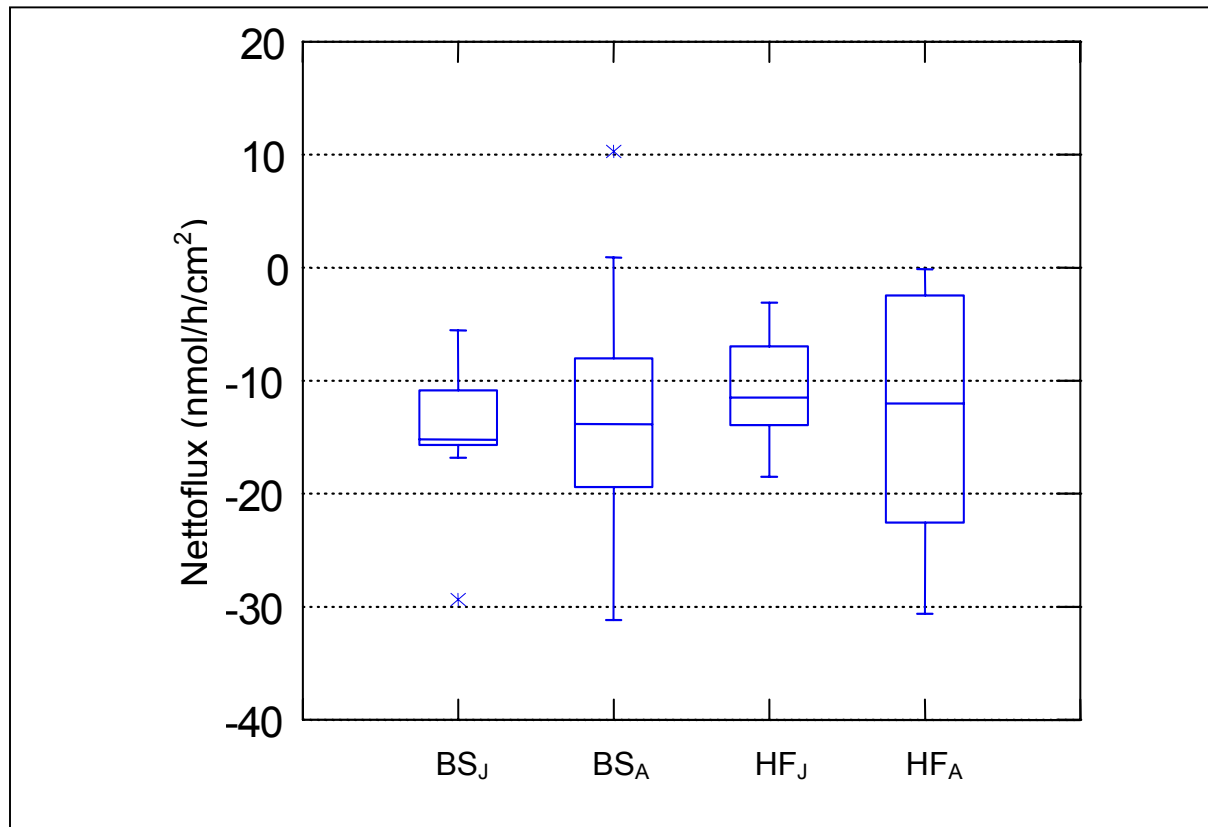


Abb. 19: Vergleich der Ca-Nettofluxe im Duodenum der vier Gruppen
In den Box Plots dargestellt sind jeweils der Median und das 25 %- und 75 %-Quantile; die „Whiskers“ begrenzen das 10 %- und das 90 %-Quantil. Ausreisser werden als Sterne dargestellt.

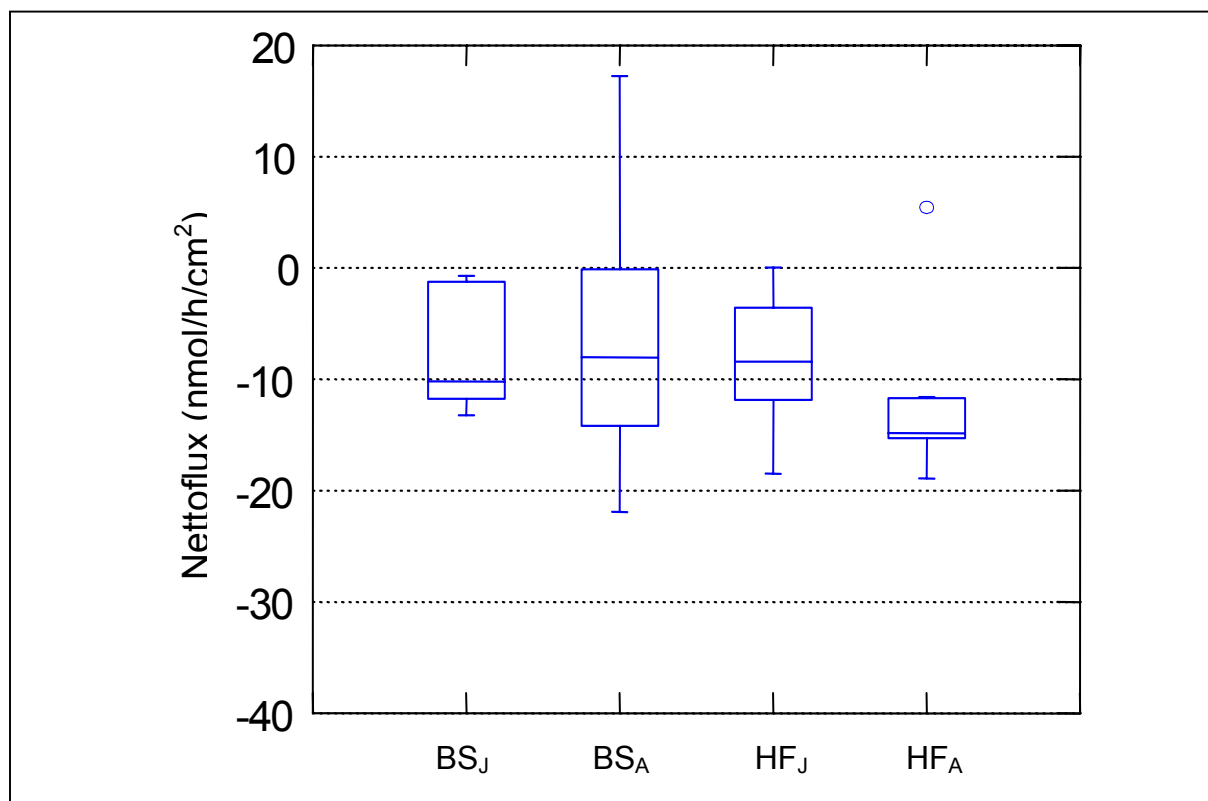


Abb. 20: Vergleich der Ca-Nettofluxe im Colon der vier Gruppen
In den Box Plots dargestellt sind jeweils der Median und das 25 %- und 75 %-Quantile; die „Whiskers“ begrenzen das 10 %- und das 90 %-Quantil. Extreme Ausreisser werden als Kreise dargestellt.

In beiden hier untersuchten Darmabschnitten (Duodenum und Colon) wurde eine Netto-Sekretion festgestellt (Tab. 12 und 13; Abb. 17 und 18). Die Abbildungen 19 und 20 veranschaulichen die Ca-Netto-Fluxe bei den verschiedenen Gruppen. Alle Box Plots liegen im negativen Bereich; nur einige wenige Ausreisser sind positiv, was für eine Ca-Absorption im Darm spricht. Ein signifikanter Gruppenunterschied konnte weder im Duodenum ($p = 0,831$) noch im Colon ($p = 0,411$) festgestellt werden.

3.2. Immunhistochemischer Nachweis der Vitamin D-Rezeptoren

In den Vormägen (Pansen, Haube, Blättermagen) und im Labmagen (Labmagen Fundus, Labmagen Pylorus) waren keine Vitamin D-Rezeptoren (VDR) nachweisbar (Abb. 21).

3.2.1. Histomorphologische Beschreibung

Die Anfärbung der Kerne liess sich, wie in Kapitel 2.3.4. beschrieben, in fünf Kategorien einteilen: „negativ“, „sehr schwach“, „schwach“, „mittelmässig“ und „stark“ positiv. Im Mikroskop stellen sich die negativ angefärbten Kerne blau (Gegenfärbung mit Hämalun nach Mayer (Böck, 1989)), die sehr schwach angefärbten grau bis beige, die schwach angefärbten hellbraun, die mittelmässig angefärbten braun, die stark angefärbten dunkelbraun dar.

In den beiden Duodenumabschnitten (Duodenum vor und nach Pankreas) zeigten die Enterozyten der basalen Drüsenschicht eine stark positive Farbreaktion. Die Abbildungen 22 und 23 zeigen, dass auch das Zytoplasma dieser Zellen eine mittelmässige Anfärbung aufweist. Daneben kamen aber auch Kerne mit negativer und mittelmässiger Färbung vor. Die mittleren und oberflächlichen Drüsenschichten zeigten eine abgeschwächte Farbintensität; eine zytoplasmatische Anfärbung kam hier nicht mehr vor. Das Oberflächenepithel zeigte vorwiegend negativ, aber auch einige sehr schwach bis schwach angefärbte Zellkerne.

Im Jejunum konnte ein ähnliches Anfärbemuster innerhalb der Schichten wie im Duodenum erkannt werden (Abb. 24). Unterschiedlich war jedoch die Farbintensität. In der basalen Drüsenschicht fanden sich vorwiegend mittelmässig angefärbte Zellkerne, stark angefärbte waren in der Minderheit. Zudem gab es nur noch eine

ganz schwache zytoplasmatische Farbreaktion in den basalen Drüsenschichten. Gegen das Oberflächenepithel hin nahm die Farbintensität der Zellkerne wiederum ab.

Bei der Betrachtung des Ileums fiel auf, dass zwischen den Gruppen kein einheitliches Bild vorhanden war. Die Gruppe HF_J wies in der basalen Drüsenschicht vermehrt schwach bis mittelmässig angefärbte Enterozytenkerne auf, die mittlere und oberflächliche Drüsenschicht zeigte eine schwächere Anfärbung. Somit wies diese Schicht eine höhere Dichte an positiven Zellkernen auf als die apikal gelegenen Schichten. Bei den anderen drei Gruppen (BS_J, BS_A und HF_A) trat die stärkste Farbreaktion in der mittleren Drüsenschicht auf. Das Oberflächenepithel zeigte nur noch vereinzelte immunreaktive Zellkerne, welche sehr schwach bis schwach angefärbt waren. Die Farbintensität der Zellkerne fiel aber einheitlich bei allen Kühen im Vergleich zu den weiter oral gelegenen Darmabschnitten ab. Im ganzen Ileum zeigte sich das Zytoplasma der Enterozyten als negativ.

Das Cäcum war jener Darmabschnitt mit der schwächsten Farbreaktion. In der basalen Drüsenschicht waren wenige sehr schwach bis schwach positive Enterozytenkerne zu erkennen, mehrheitlich waren aber die Zellkerne blau, also negativ gefärbt. Die mittlere Drüsenschicht wies eine höhere Dichte an schwach bis mittelmässig gefärbten Kernen auf, sogar einige stark angefärbte Zellkerne wurden gefunden. Die Farbintensität nahm zu der oberflächlichen Drüsenschicht und zum Oberflächenepithel hin stark ab.

Die grösste Dichte der immunpositiven Zellkerne des Colons war in der mittleren Drüsenschicht lokalisiert (Abb. 25). Viele dieser Kerne waren mittelmässig bis stark angefärbt, dazwischen waren aber auch immer negative Zellkerne zu finden. In der basalen und oberflächlichen Drüsenschicht kamen v.a. negative Enterozyten vor, aber auch wenige positive Zellkerne mit Anfärbung aller Abstufungen konnten vorgefunden werden. Im Oberflächenepithel waren neben den vielen negativen auch vereinzelte sehr schwach bis schwach angefärbte Zellkerne zu erkennen. Das Enterozyten-Zytoplasma war nicht angefärbt.

Die Anfärbung im Rektum zeigte ein dem vorhergehenden Darmabschnitt ähnliches Verteilungsmuster, allerdings mit einer leichten Abschwächung der Immunreaktion (Abb. 26). Mehrheitlich waren mittelmässig angefärbte Enterozytenkerne in der mittleren und schwach gefärbte Zellkerne in der basalen und der oberflächlichen Drüsenschicht vorzufinden.

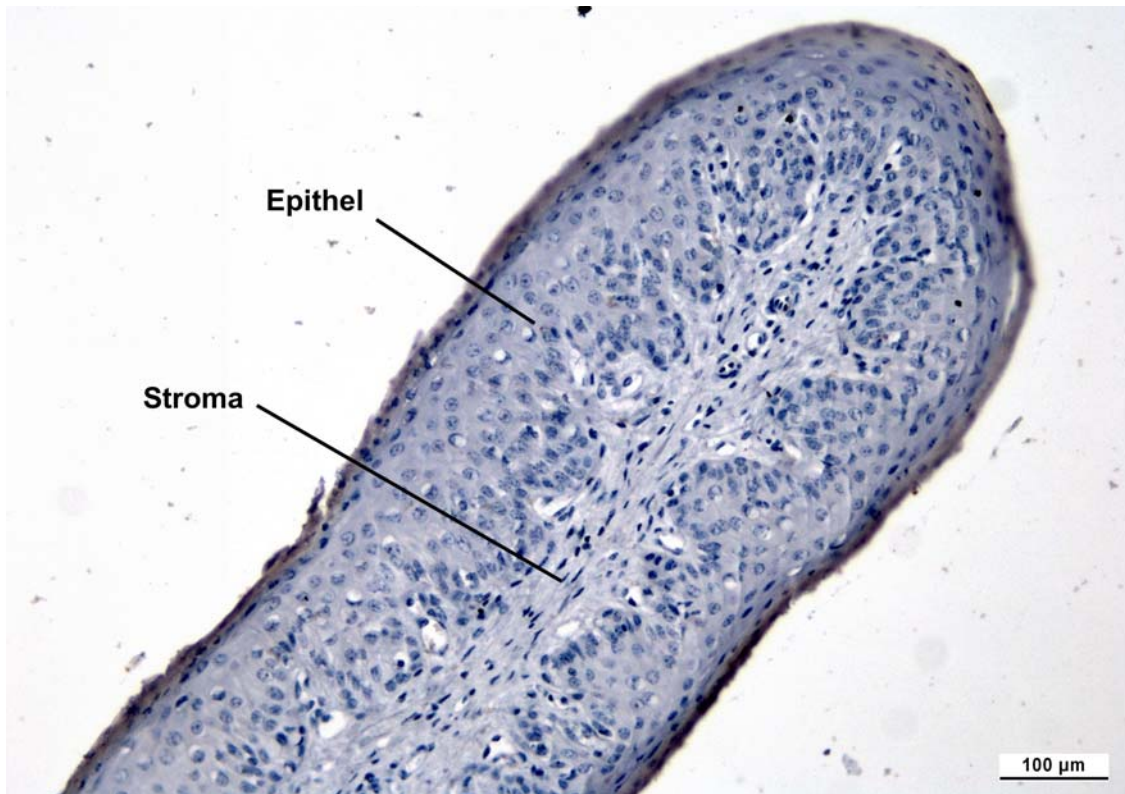


Abb. 21: Pansenzotte einer Kuh
Alle Zellkerne des Epithels und des Stromas sind blau, d.h. negativ gefärbt. Somit konnte kein immunhistologischer Nachweis des VDR im Pansen gefunden werden.

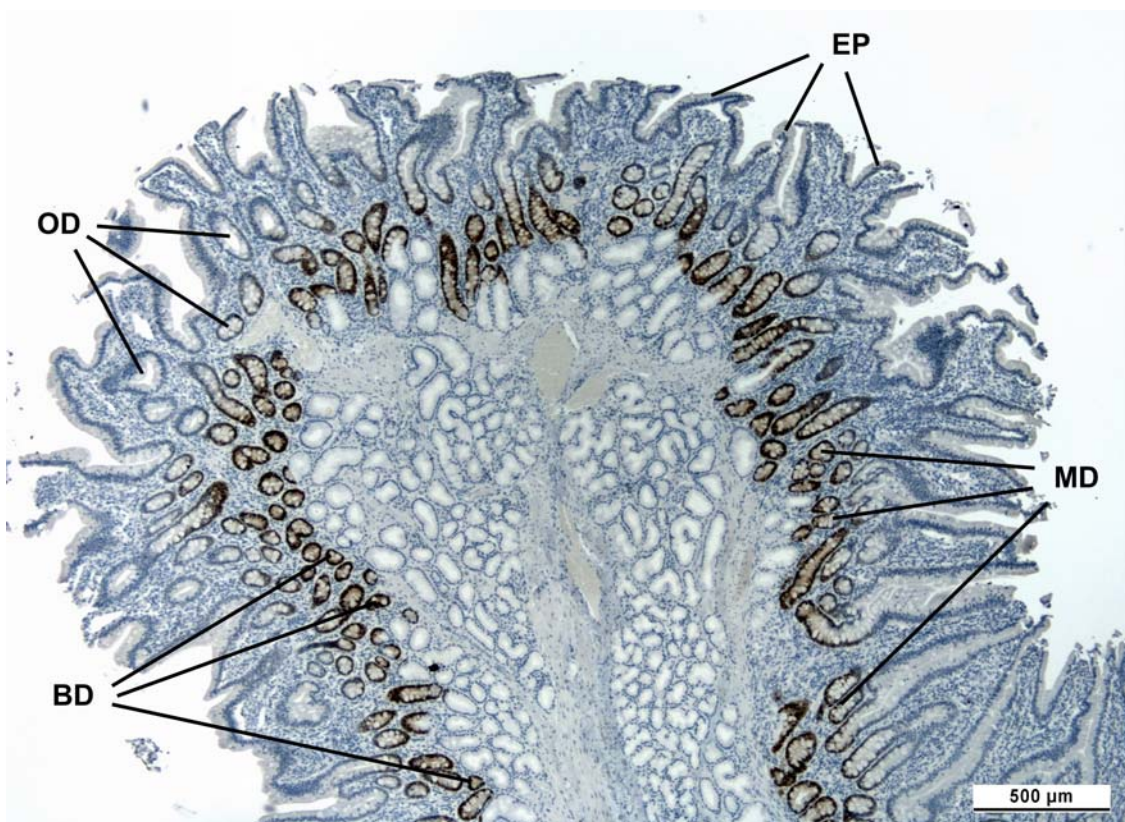


Abb. 22: Immunhistologischer Nachweis des VDR im Duodenum vor Pankreas (DvP) einer Kuh (HF_j)
HF_j = Holstein Friesian „jung“; BD = basale Drüsenschicht; MD = mittlere Drüsenschicht; OD = oberflächliche Drüsenschicht; EP = Oberflächenepithel

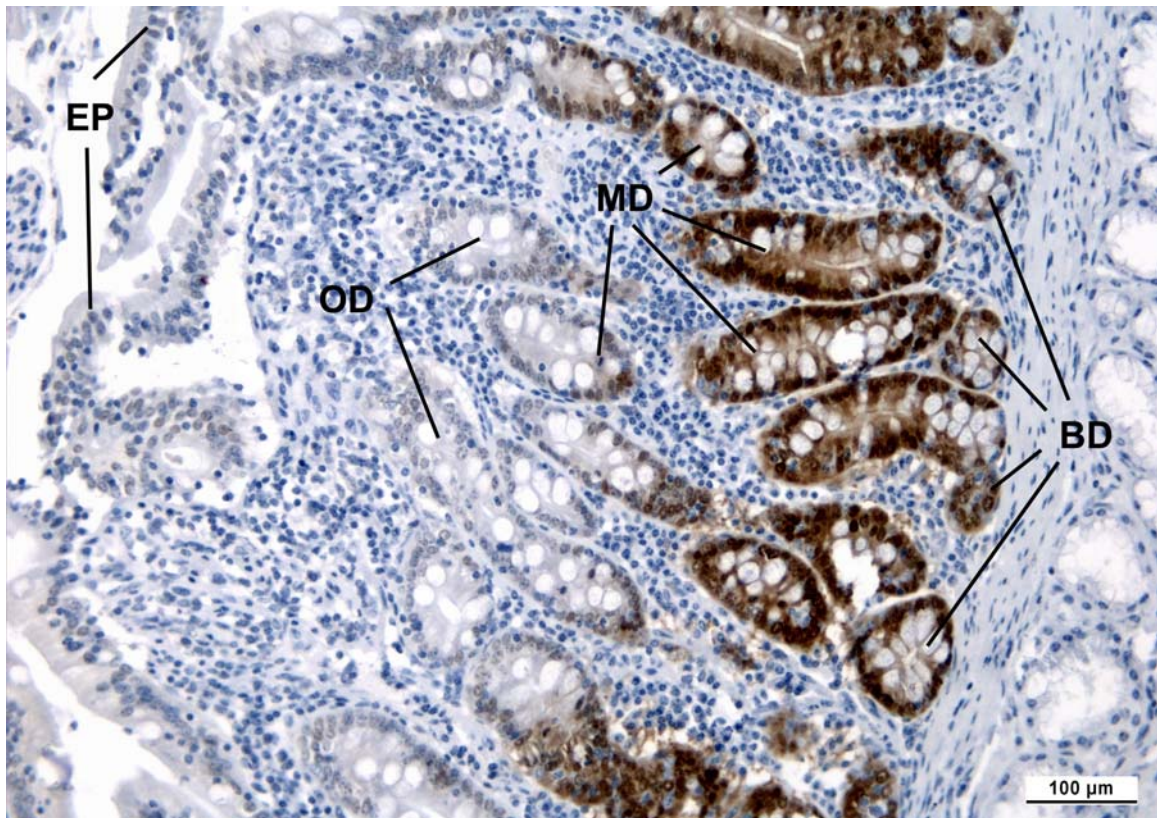


Abb. 23: Immunhistologischer Nachweis des VDR im Duodenum nach Pankreas (DnP) einer Kuh (HF_A)
 HF_A = Holstein Friesian „alt“; BD = basale Drüsenschicht; MD = mittlere Drüsenschicht; OD = oberflächliche Drüsenschicht; EP = Oberflächenepithel

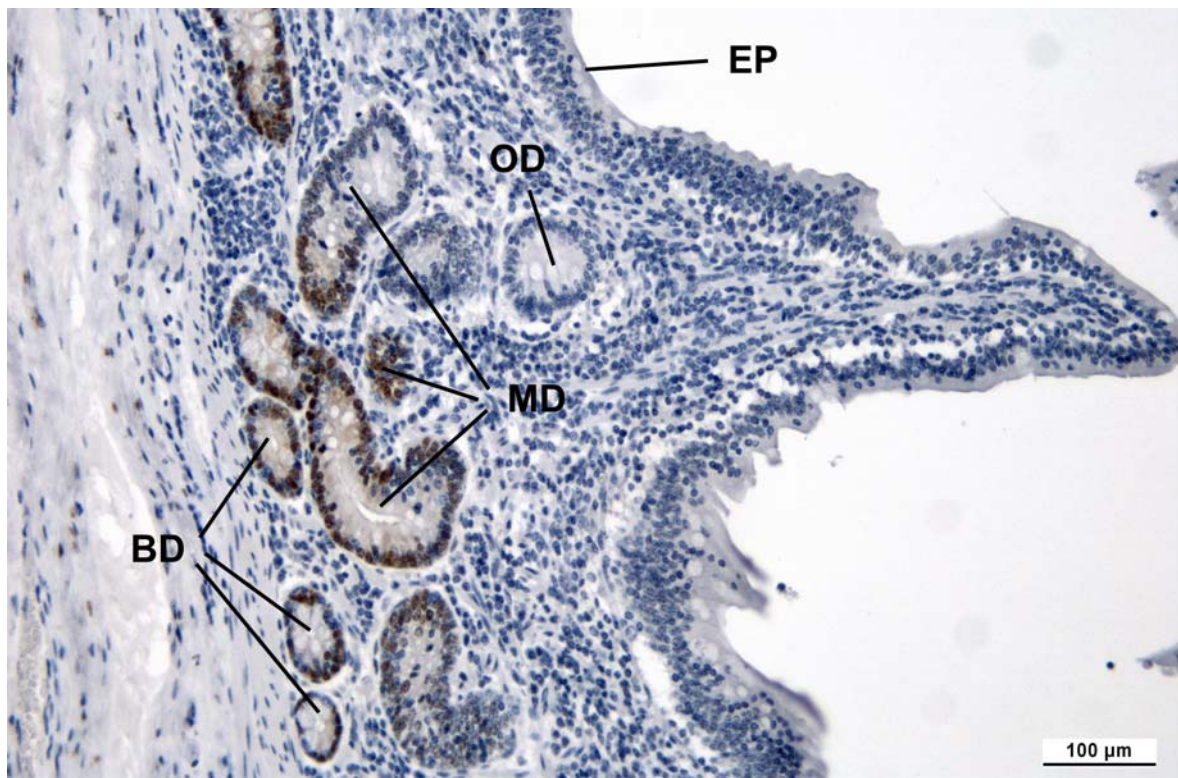


Abb. 24: Immunhistologischer Nachweis des VDR im Jejunum (Je) einer Kuh (BS_A)
 BS_A = Brown Swiss „alt“; BD = basale Drüsenschicht; MD = mittlere Drüsenschicht; OD = oberflächliche Drüsenschicht; EP = Oberflächenepithel

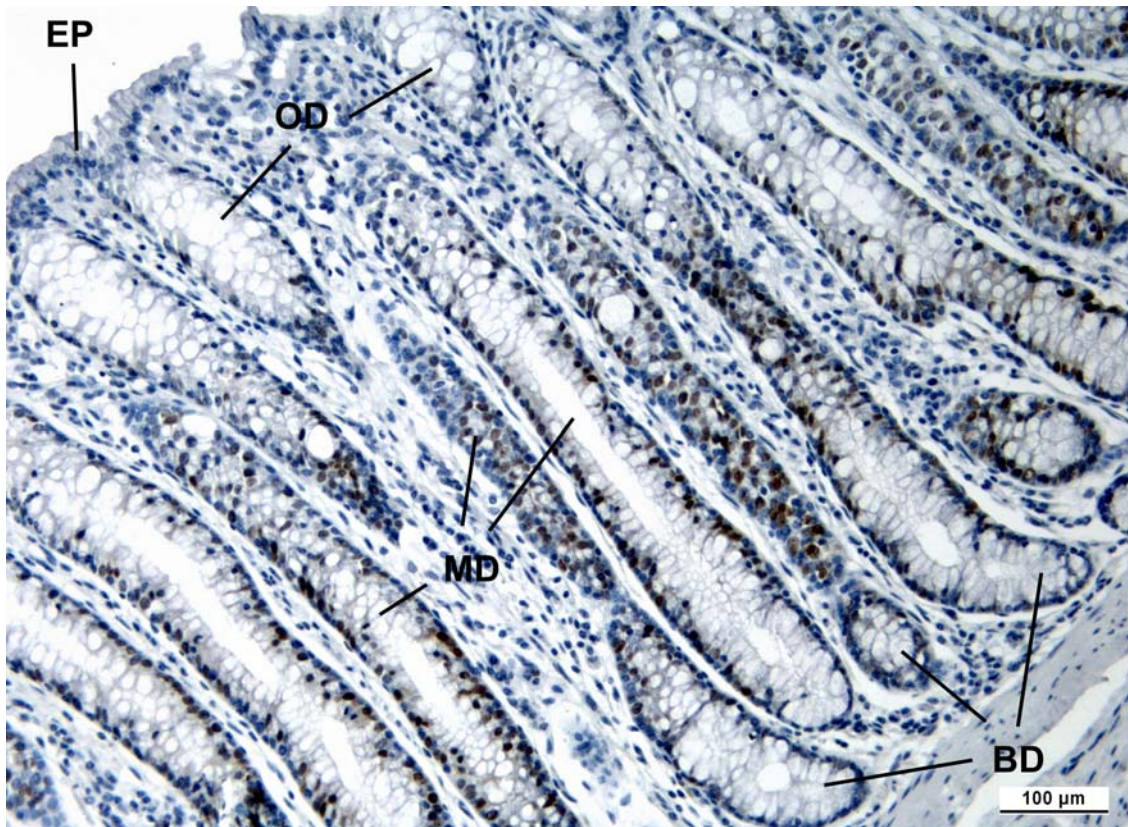


Abb. 25: Immunhistologischer Nachweis des VDR im Colon (Co) einer Kuh (BS_A)
 BS_A = Brown Swiss „alt“; BD = basale Drüsenschicht; MD = mittlere Drüsenschicht;
 OD = oberflächliche Drüsenschicht; EP = Oberflächenepithel

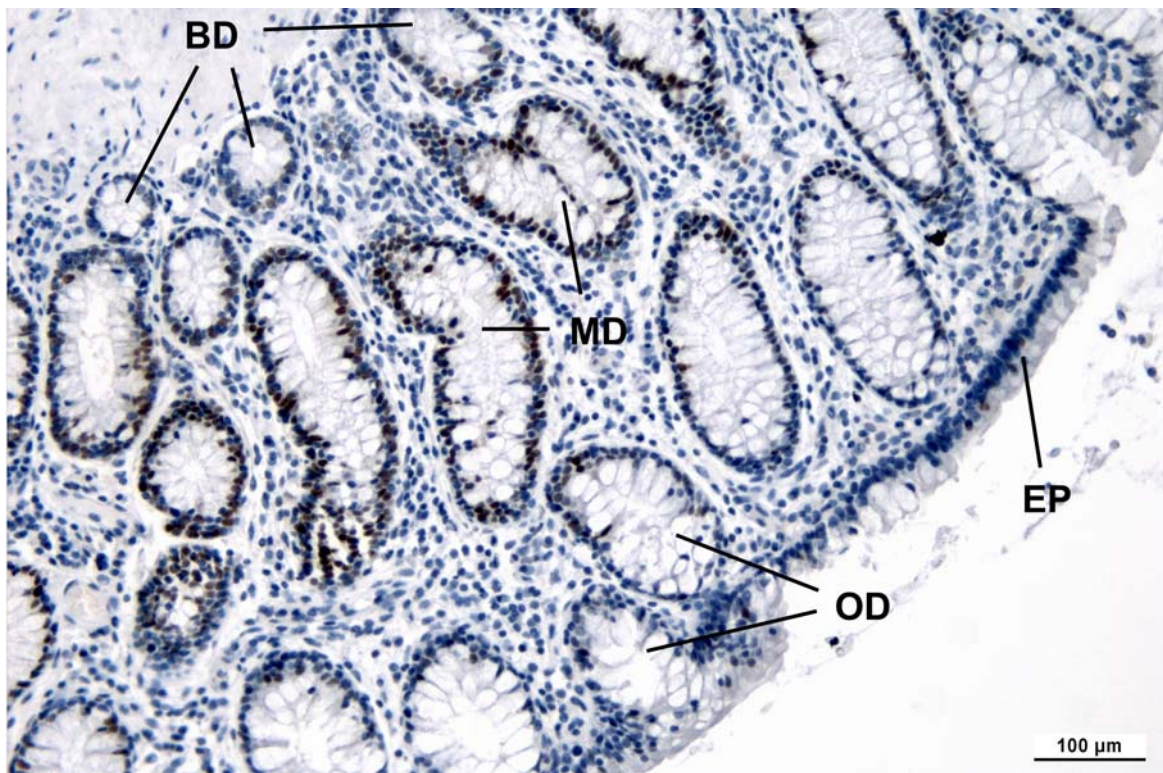


Abb. 26: Immunhistologischer Nachweis des VDR im Rektum (Re) einer Kuh (BS_A)
 BS_A = Brown Swiss „alt“; BD = basale Drüsenschicht; MD = mittlere Drüsenschicht;
 OD = oberflächliche Drüsenschicht; EP = Oberflächenepithel

Tab. 14: Immunreaktiver Score (IRS) der sieben Darmabschnitte und der Drüschenschichten

DvP = Duodenum vor Pankreas; DnP = Duodenum nach Pankreas; Je = Jejunum; II = Ileum; Cä = Cäcum; Co = Colon; Re = Rektum; BD = basale Drüschenschicht; MD = mittlere Drüschenschicht; OB = oberflächliche Drüschenschicht; EP = Oberflächenepithel

Darmabschnitt Schicht	BS _J	BS _A	HF _J	HF _A	TOTAL
DvP BD	3174 ± 201	2887 ± 179	3266 ± 144	3256 ± 98	3146 ± 155
DvP MD	2479 ± 159	2275 ± 212	2514 ± 179	2600 ± 144	2467 ± 173
DvP OD	212 ± 70	197 ± 35	238 ± 61	291 ± 37	235 ± 50
DvP EP	98 ± 43	162 ± 76	70 ± 24	48 ± 17	682 ± 72
Total DvP	1491 ± 261	1380 ± 704	1522 ± 805	1549 ± 809	1485 ± 776
Summe DvP	5963	5520	6088	6195	5942
DnP BD	3005 ± 109	2495 ± 192	2997 ± 130	2965 ± 56	2866 ± 121
DnP MD	2694 ± 180	2495 ± 116	2639 ± 125	2718 ± 82	2637 ± 126
DnP OD	366 ± 64	331 ± 47	515 ± 98	310 ± 59	381 ± 67
DnP EP	401 ± 107	376 ± 107	447 ± 104	189 ± 51	872 ± 102
Total DnP	1617 ± 715	1424 ± 618	1650 ± 679	1546 ± 750	1559 ± 690
Summe DnP	6466	5697	6599	6182	6236
Je BD	1680 ± 265	1338 ± 234	1998 ± 161	1673 ± 208	1673 ± 217
Je MD	1422 ± 233	1377 ± 154	1384 ± 141	1461 ± 174	1411 ± 176
Je OD	165 ± 49	157 ± 37	122 ± 20	160 ± 52	151 ± 39
Je EP	63 ± 25	47 ± 20	68 ± 15	32 ± 6	381 ± 58
Total Je	833 ± 419	730 ± 363	893 ± 478	831 ± 428	822 ± 420
Summe Je	3331	2920	3573	3326	3287
II BD	507 ± 212	662 ± 109	1136 ± 268	479 ± 109	696 ± 175
II MD	881 ± 164	790 ± 150	912 ± 215	709 ± 117	823 ± 162
II OD	132 ± 38	86 ± 17	97 ± 19	106 ± 31	106 ± 26
II EP	54 ± 36	42 ± 13	58 ± 21	34 ± 12	218 ± 57
Total II	394 ± 190	395 ± 193	551 ± 277	332 ± 159	418 ± 199
Summe II	1575	1581	2204	1328	1672
Cä BD	184 ± 65	142 ± 33	297 ± 71	193 ± 63	204 ± 58
Cä MD	401 ± 109	622 ± 91	890 ± 138	808 ± 160	680 ± 125
Cä OD	85 ± 25	222 ± 49	255 ± 66	337 ± 99	225 ± 60
Cä EP	33 ± 15	40 ± 10	40 ± 7	65 ± 19	140 ± 32
Total Cä	176 ± 81	257 ± 127	370 ± 182	351 ± 162	288 ± 137
Summe Cä	703	1027	1481	1404	1154
Co BD	592 ± 179	666 ± 228	527 ± 116	303 ± 65	522 ± 147
Co MD	1259 ± 234	1971 ± 135	1681 ± 121	1795 ± 131	1677 ± 155
Co OD	338 ± 146	317 ± 63	322 ± 115	333 ± 53	327 ± 94
Co EP	167 ± 109	115 ± 41	104 ± 29	67 ± 18	353 ± 82
Total Co	589 ± 240	767 ± 417	658 ± 352	625 ± 395	698 ± 349
Summe Co	2356	3069	2634	2499	2639
Re BD	488 ± 121	437 ± 102	478 ± 116	317 ± 71	430 ± 102
Re MD	1420 ± 233	1645 ± 109	1489 ± 155	1648 ± 224	1551 ± 180
Re OD	315 ± 43	332 ± 41	286 ± 31	390 ± 88	331 ± 51
Re EP	125 ± 54	114 ± 34	108 ± 29	58 ± 12	101 ± 56
Total Re	587 ± 287	632 ± 344	590 ± 309	603 ± 355	603 ± 323
Summe Re	2349	2529	2361	2413	2413

3.2.2. Vergleich der vier Gruppen

Tabelle 14 zeigt die Ergebnisse des IRS in den sieben Darmabschnitten und in den Drüsenschichten. Es gibt keine einheitliche Gruppen-Reihenfolge beim Vergleich der IRS-Summen (Tab. 15). Häufig zeigten die Kühe der Brown Swiss Rasse (BS_J und BS_A) weniger starke Reaktionen beim immunhistochemischen Nachweis des VDR als die Kühe der Holstein Friesian Rasse (HF_J und HF_A).

Tab. 15: Vergleich der Summe der IRS zwischen den vier Gruppen in den verschiedenen Darmabschnitten
DvP = Duodenum vor Pankreas; DnP = Duodenum nach Pankreas; Je = Jejunum; Il = Ileum; Cä = Cäcum; Co = Colon; Re = Rektum

Darmabschnitt	Gruppenvergleich
DvP	BS _A < BS _J < HF _J < HF _A
DnP	BS _A < HF _A < BS _J < HF _J
Je	BS _A < HF _A < BS _J < HF _J
Il	HF _A < BS _J < BS _A < HF _J
Cä	BS _J < BS _A < HF _A < HF _J
Co	BS _J < HF _A < HF _J < BS _A
Re	BS _J < HF _J < HF _A < BS _A

Die statistische Auswertung des IRS in den verschiedenen Darmabschnitten zeigte zwischen den vier Gruppen keinen signifikanten Unterschied (Tab. 16).

Tab. 16: Statistischer Vergleich zwischen den vier Gruppen

Gruppenvergleich	p-Wert
BS _J ↔ BS _A	0,483
BS _J ↔ HF _J	0,078
BS _J ↔ HF _A	0,633
BS _A ↔ HF _J	0,291
BS _A ↔ HF _A	0,771
HF _J ↔ HF _A	0,170

3.2.3. Vergleich der einzelnen Darmabschnitte

In allen sieben Darmabschnitten (Abb. 27; Tab. 14) waren immunhistochemische Farbreaktionen festzustellen.

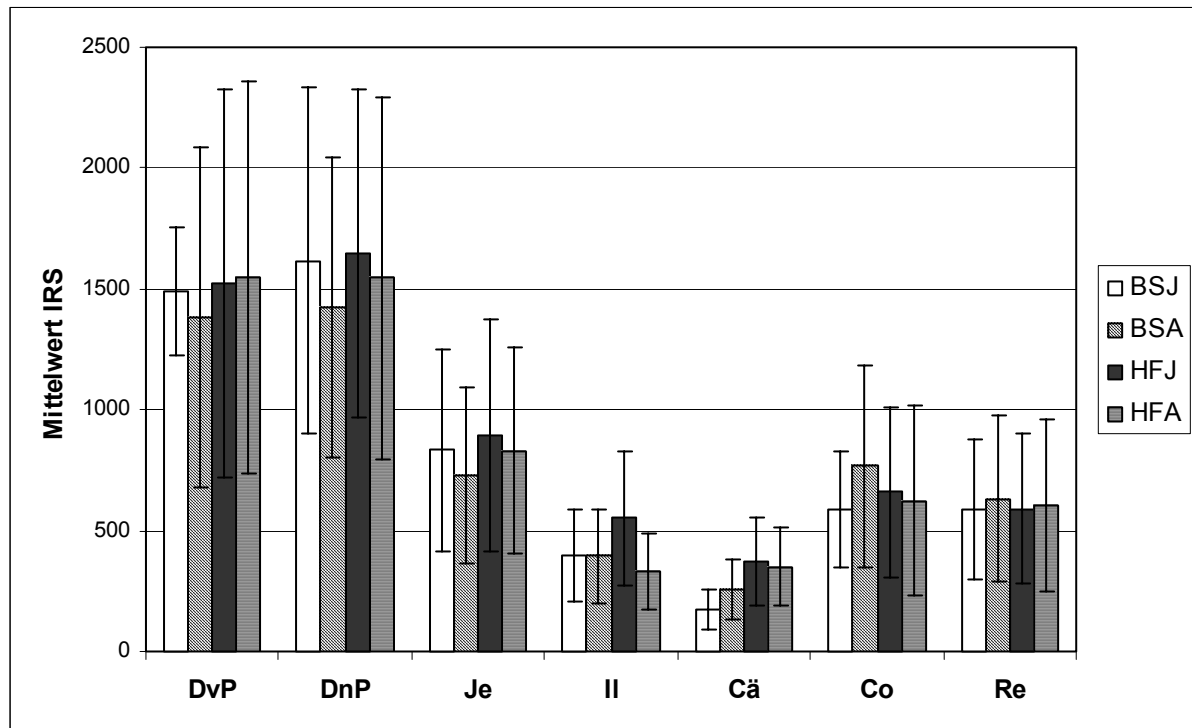


Abb. 27: Immunreaktiver Score (IRS) der einzelnen Darmabschnitte
DvP = Duodenum vor Pankreas; DnP = Duodenum nach Pankreas; Je = Jejunum; Il = Ileum; Cä = Cäcum; Co = Colon; Re = Rektum

Die Immunreaktiven Scores (IRS) zeigten, dass die stärkste Farbreaktion in den beiden Duodenumabschnitten (Summe des IRS: DvP: 5942 und DnP: 6236; mit einem p-Wert von 0,081) auftrat. In allen weiteren Abschnitten wurden dagegen signifikant weniger VDR als in den beiden Duodenumsabschnitten verzeichnet (p-Wert jeweils < 0,001).

Der IRS im Jejunum zeigte gegenüber demjenigen von Ileum und Cäcum einen signifikanten Unterschied (p jeweils < 0,001), jedoch keinen gegenüber dem Colon (p = 0,385) und dem Rektum (p = 0,372). Das Ileum wies einen signifikant niedrigeren IRS-Mittelwert gegenüber dem Colon (p = 0,004) und dem Rektum (p = 0,003) auf, jedoch keinen gegenüber dem Cäcum (p = 0,328). Einen signifikanten Anstieg des IRS gab es zwischen Cäcum und Colon (p < 0,001) sowie zwischen Cäcum und Rektum (p < 0,001). Keinen signifikanten Unterschied im IRS gab es zwischen Colon und Rektum (p = 0,921). Folgende IRS-Reihenfolge mit jeweils abgestuften Intensitäten wurde festgestellt: Duodenum vor und nach Pankreas > Jejunum > Colon, Rektum > Ileum, Cäcum (Abb. 27; Tab. 14)

Wie in Tabelle 17 dargestellt, zeigten die Darmabschnitte Duodenum vor Pankreas zu Duodenum nach Pankreas sowie Colon zu Rektum nahezu dieselbe Reaktivität bei den einzelnen Gruppen ($F = 1,00$). Der grösste Faktor wurde jeweils zwischen Duodenum vor und nach Pankreas und dem Cäcum ($F > 4,11$) ermittelt. Das heisst, die MW des Duodenums vor und nach Pankreas lagen bei allen Gruppen um den Faktor 4,11 (und mehr) höher als die MW des Cäcums.

Tab. 17: Faktorenberechnung: Division der MW (Tab. 14) der jeweiligen Darmabschnitte

DvP = Duodenum vor Pankreas; DnP = Duodenum nach Pankreas; Je = Jejunum; II = Ileum; Cä = Cäcum; Co = Colon; Re = Rektum

Faktor	BS _J	BS _A	HF _J	HF _A
DvP / DnP	0,92	0,97	0,92	1,00
DvP / Je	1,79	1,89	1,70	1,86
DvP / II	3,79	3,49	2,76	4,66
DvP / Cä	8,48	5,37	4,11	4,41
DvP / Co	2,53	1,80	2,31	2,48
DvP / Re	2,54	2,18	2,58	2,57
DnP / Je	1,94	1,95	1,85	1,86
DnP / II	4,11	3,60	2,99	4,66
DnP / Cä	9,20	5,55	4,46	4,40
DnP / Co	2,74	1,86	2,51	2,47
DnP / Re	2,75	2,25	2,80	2,56
Je / II	2,11	1,85	1,62	2,50
Je / Cä	4,74	2,84	2,41	2,37
Je / Co	1,41	0,95	1,36	1,33
Je / Re	1,42	1,15	1,51	1,38
II / Cä	2,24	1,54	1,49	0,95
II / Co	0,67	0,52	0,84	0,53
II / Re	0,67	0,63	0,93	0,55
Cä / Co	0,30	0,33	0,56	0,56
Cä / Re	0,30	0,41	0,63	0,58
Co / Re	1,00	1,21	1,12	1,04

3.2.4. Vergleich der einzelnen Drüsenschichten

Das Verteilungsmuster der VDR war von Darmabschnitt zu Darmabschnitt verschieden. Abbildung 28 zeigt, dass in den ersten drei Darmabschnitten (DvP, DnP, Je) die grösste VDR-Menge in den basalen Drüsenschicht (BD) zu finden war. Ab dem Ileum nach aboral verlagerten sich die stärkste VDR-Immunreaktion in die mittlere Drüsenschicht (MD). Cäcum, Colon und Rektum zeigten sogar einen prozentualen VDR-Anteil von $\geq 50\%$ in der mittleren Drüsenschicht. Einen weitaus geringeren Anteil an VDR wiesen die oberflächliche Drüsenschicht (OD) und das Oberflächenepithel (EP) auf.

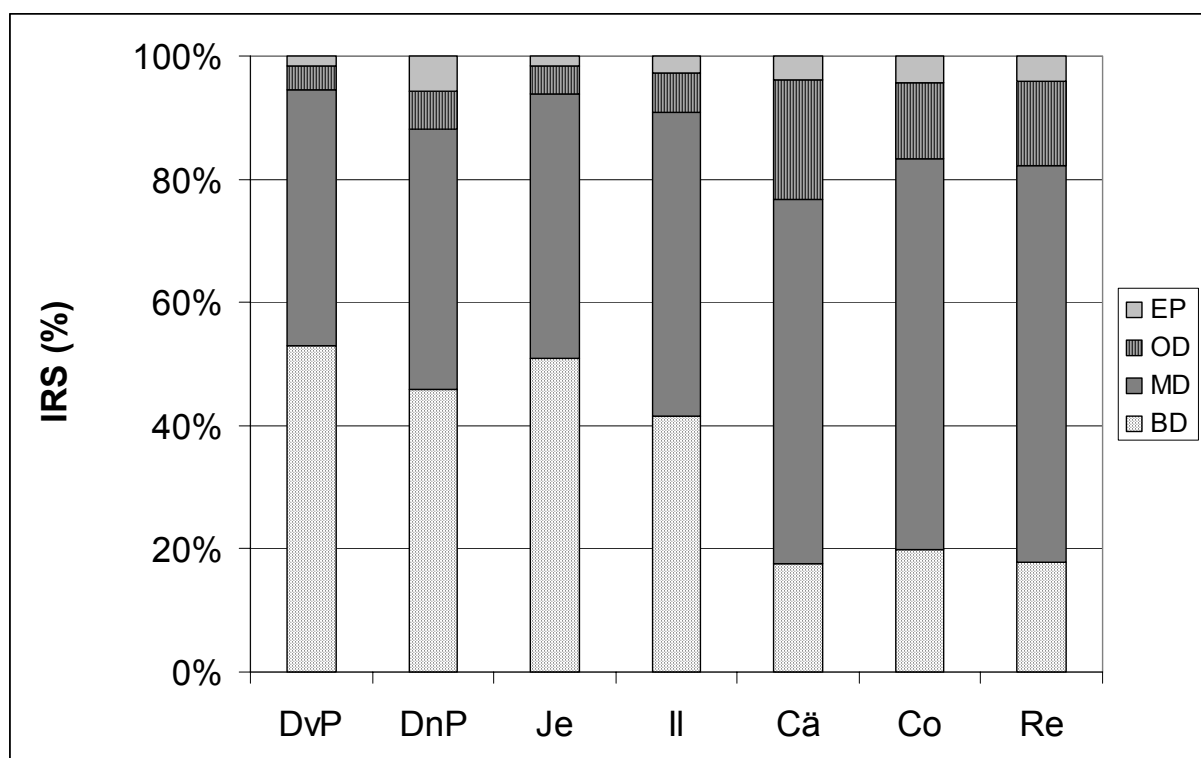


Abb. 28: Prozentuale Verteilung der VDR in den vier Drüsenschichten
 DvP = Duodenum vor Pankreas; DnP = Duodenum nach Pankreas; Je = Jejunum; Il = Ileum; Cä = Cäcum; Co = Colon; Re = Rektum; BD = basale Drüsenschicht; MD = mittlere Drüsenschicht; OD = oberflächliche Drüsenschicht; EP = Oberflächenepithel

Die statistische Überprüfung (Faktor „Group“) des IRS der vier Drüsenschichten (BD, MD, OD, EP) ergab bei allen 36 Kühe ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$).

Für die statistische Auswertung wurden die Gruppen einzeln untersucht. Zudem wurden jeweils nur die Drüsenschichten, die aneinandergrenzten, analysiert (Tab. 18): Basale gegen mittlere Drüsenschicht (a), mittlere gegen oberflächliche Drüsenschicht (b) und oberflächliche Drüsenschicht gegen Oberflächenepithel (c) (Abb. 29 bis 32). In allen Darmabschnitten wurde ein signifikanter Unterschied zwischen mittlerer und oberflächlicher Drüsenschicht (b) aufgezeigt. Das Rektum

zeigte bei allen Gruppen einen signifikanten Unterschied zwischen den aneinandergrenzenden Drüsenschichten auf (abc).

Tab. 18: Statistische Auswertung zwischen den einzelnen Drüsenschichten: Angabe des p-Wertes

DvP = Duodenum vor Pankreas; DnP = Duodenum nach Pankreas; Je = Jejunum; Il = Ileum; Cä = Cäcum; Co = Colon; Re = Rektum; BD = basale Drüsenschicht; MD = mittlere Drüsenschicht; OB = oberflächliche Drüsenschicht; EP = Oberflächenepithel

Darm-Abschnitt	Drüsenschicht-vergleich	BS _J	BS _A	HF _J	HF _A
DvP	BD ↔ MD	0,019	ns	0,004	0,005
	MD ↔ OD	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	OD ↔ EP	ns	ns	0,012	< 0,001
DnP	BD ↔ MD	ns	ns	ns	0,031
	MD ↔ OD	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	OD ↔ EP	ns	ns	ns	ns
Je	BD ↔ MD	ns	ns	0,019	ns
	MD ↔ OD	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	OD ↔ EP	ns	0,007	0,024	0,003
Il	BD ↔ MD	ns	ns	ns	ns
	MD ↔ OD	0,001	< 0,001	< 0,001	0,001
	OD ↔ EP	ns	0,027	ns	ns
Cä	BD ↔ MD	ns	0,001	0,005	0,002
	MD ↔ OD	0,016	0,005	0,004	0,019
	OD ↔ EP	ns	0,002	0,003	0,002
Co	BD ↔ MD	ns	0,003	< 0,001	< 0,001
	MD ↔ OD	0,002	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	OD ↔ EP	0,031	0,019	0,038	0,001
Re	BD ↔ MD	0,004	< 0,001	0,001	0,001
	MD ↔ OD	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,002
	OD ↔ EP	0,019	0,003	0,003	0,002

Bei der Gruppe BS_J (Abb. 29) gab es im Duodenum vor Pankreas einen signifikanten Unterschied zwischen der basalen und der mittleren sowie zwischen der mittleren und der oberflächlichen Drüsenschicht. In den darauf folgenden Abschnitten (DnP, Je, Il und Cä) wies nur die mittlere gegenüber der oberflächlichen Drüsenschicht einen signifikant höheren IRS Wert auf. Im Colon bestand zwischen der mittleren und der oberflächlichen Drüsenschicht und auch zwischen der oberflächlichen

Drüsenschicht und dem Oberflächenepithel ein signifikanter Unterschied. Das Rektum, wies, wie schon erwähnt, zwischen allen aufeinander folgenden Schichten eine Signifikanz auf.

Die statistische Auswertung der immunpositiven Zellen bei der Gruppe BS_A (Abb. 30) ergab in beiden Duodenumabschnitten jeweils einen signifikanten Unterschied zwischen der mittleren gegenüber der oberflächlichen Drüsenschicht. In den beiden nachfolgenden Darmabschnitten wurde jeweils zwischen der mittleren und der oberflächlichen sowie zwischen der oberflächlichen Drüsenschicht und dem Oberflächenepithel eine signifikante Differenz festgestellt. In den letzten drei Darmabschnitten gab es folgende signifikanten Unterschiede: basale zu mittlerer; mittlere zu oberflächlicher und oberflächliche Drüsenschicht zum Oberflächenepithel.

Bei der Gruppe HF_J (Abb. 31) ergaben sich im Duodenum nach Pankreas und im Ileum keine signifikanten Unterschiede des IRS zwischen den jeweiligen Drüsenschichten. Ausnahme war die Signifikanz zwischen der mittleren und der oberflächlichen Drüsenschicht. Alle anderen Darmabschnitte wiesen eine signifikante Differenz des IRS zwischen den jeweils vorangegangenen Drüsenschichten auf.

In der Gruppe HF_A (Abb. 32) konnte im Duodenum vor Pankreas, Cäcum, Colon und Rektum zwischen allen aufeinander folgenden Drüsenschichten signifikante IRS-Unterschiede festgestellt werden. Das Duodenum nach Pankreas wies zwischen basaler und mittlerer sowie mittlerer und oberflächlicher Drüsenschicht signifikante Differenzen auf. Einen signifikant tieferen IRS gab es im Jejunum in der oberflächlichen Drüsenschicht und Oberflächenepithel gegenüber der vorangegangenen Drüsenschicht. Im Ileum bestand nur zwischen mittlerer und oberflächlicher Drüsenschicht eine signifikante Differenz.

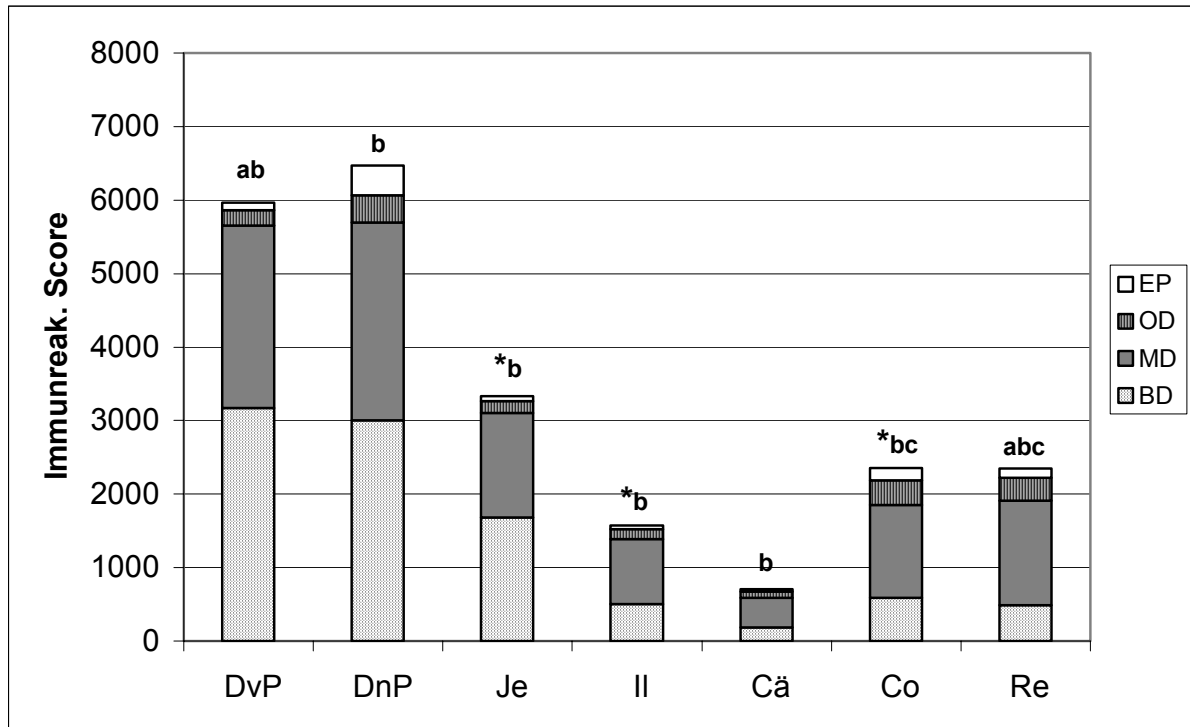


Abb. 29: Immunreaktiver Score (IRS) der verschiedenen Darmabschnitte sowie die jeweilige Drüsenschichtverteilung bei der Gruppe BS_J

* bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0.05$) vom IRS des vorangehenden Darmabschnittes.

a bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0.05$) zwischen der basalen (BD) und der mittleren Drüsenschicht (MD).

b bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0.05$) zwischen der mittleren (MD) und der oberflächlichen Drüsenschicht (OD).

c bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0.05$) zwischen der oberflächlichen Drüsenschicht (OD) und dem Oberflächenepithel (EP).

DvP = Duodenum vor Pankreas; DnP = Duodenum nach Pankreas; Je = Jejunum; Il = Ileum; Cä = Cäcum; Co = Colon; Re = Rektum; BD = basale Drüsenschicht; MD = mittlere Drüsenschicht; OB = oberflächliche Drüsenschicht; EP = Oberflächenepithel

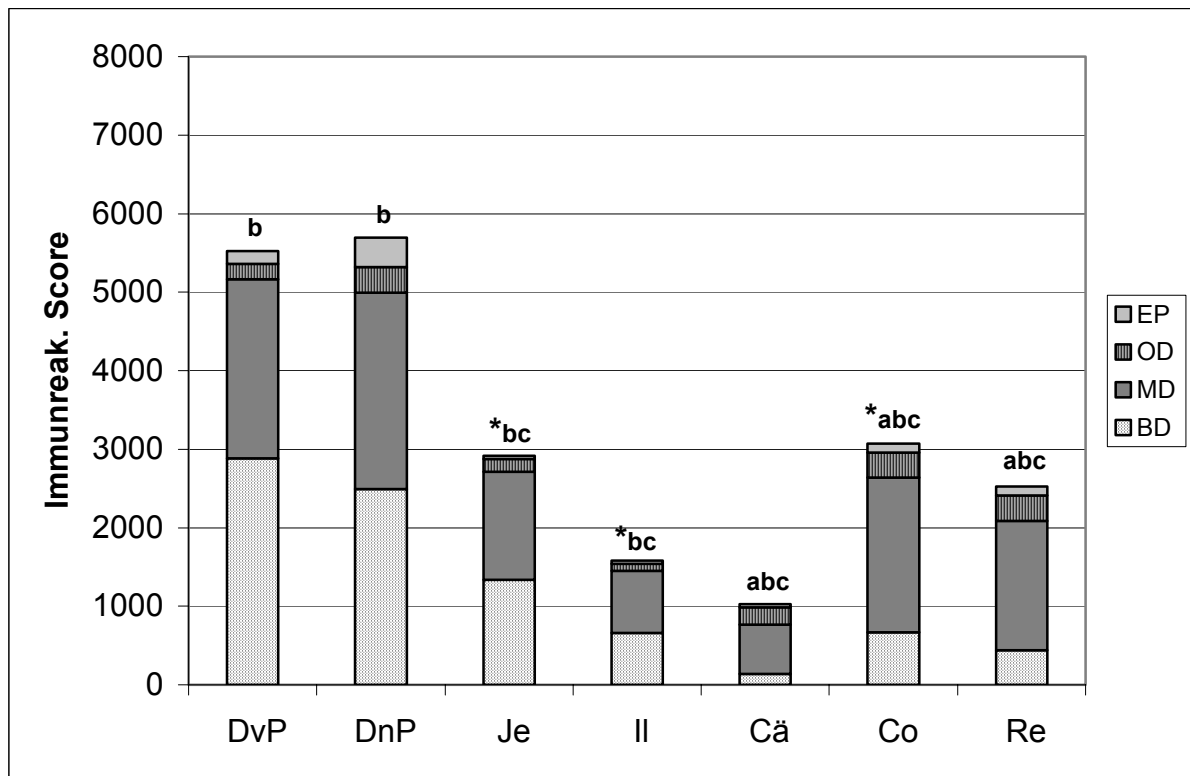


Abb. 30: Immunreaktiver Score (IRS) der verschiedenen Darmabschnitte sowie die jeweilige Drüsenschichtverteilung bei der Gruppe BS_A
(Legende: Vergleich Abb. 29)

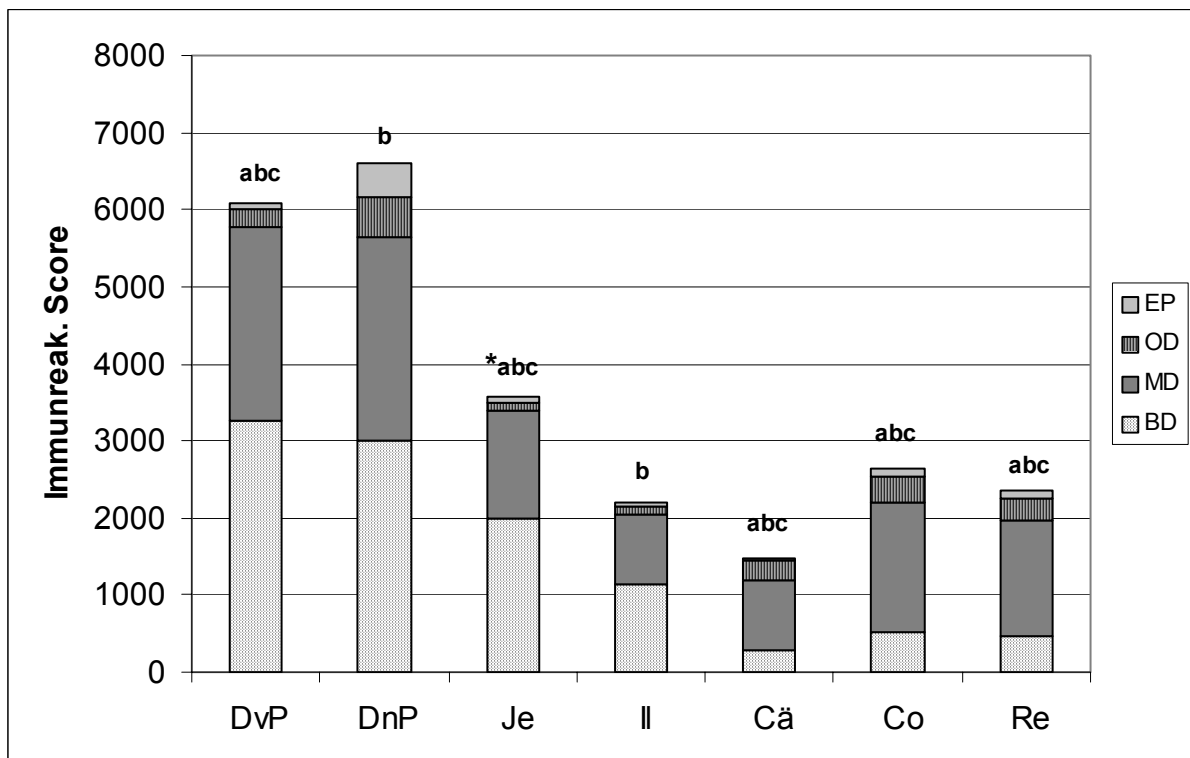


Abb. 31: Immunreaktiver Score (IRS) der verschiedenen Darmabschnitte sowie die jeweilige Drüsenschichtverteilung bei der Gruppe HF_J
(Legende: Vergleich Abb. 29)

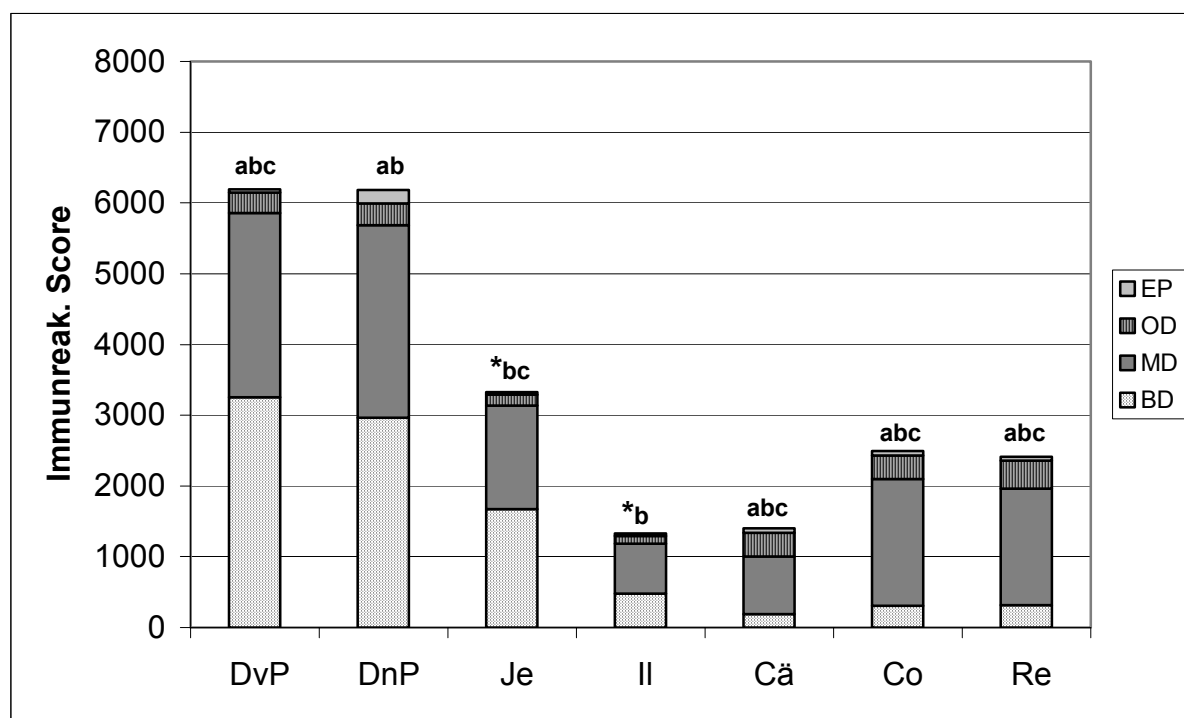


Abb. 32: Immunreaktiver Score (IRS) der verschiedenen Darmabschnitte sowie die jeweilige Drüsenschichtverteilung bei der Gruppe HF_A
(Legende: Vergleich Abb. 29)

3.3. Ca-, Mg- und P-Gehalt im Chymus

Die Daten der Chymusanalysen sind auf % Trockensubstanz (TS) umgerechnet.

3.3.1. Ca-Gehalt im Chymus

Tab. 19: Ca-Gehalt im Chymus der verschiedenen GIT-Abschnitte.

Gruppe Abschnitt	BS _J	BS _A	HF _J	HF _A
Pansen	0,633 ± 0,078	0,785 ± 0,108	0,686 ± 0,076	0,575 ± 0,038
Haube	2,320 ± 0,634	1,061 ± 0,163	2,385 ± 0,791	1,357 ± 0,188
Blättermagen	1,401 ± 0,178	1,295 ± 0,141	1,226 ± 0,142	1,240 ± 0,106
Labmagen	0,401 ± 0,062	0,540 ± 0,107	0,648 ± 0,179	0,505 ± 0,105
Duodenum	0,454 ± 0,110	0,689 ± 0,073	0,693 ± 0,088	0,482 ± 0,099
Jejunum	0,935 ± 0,172	1,426 ± 0,243	1,053 ± 0,194	0,744 ± 0,126
Ileum	1,323 ± 0,265	1,630 ± 0,155	1,083 ± 0,244	1,521 ± 0,582
Cäcum	1,936 ± 0,245	1,898 ± 0,146	1,743 ± 0,141	1,725 ± 0,126
Colon	2,083 ± 0,214	2,118 ± 0,234	1,833 ± 0,157	1,700 ± 0,262

Die Abbildungen 33 und 34 zeigen den Ca-Gehalt (Tab. 19) in den einzelnen GIT-Abschnitten der vier Gruppen. Der Ca-Gehalt im Chymus steigt in der Haube und im Blättermagen an und fällt anschliessend im Labmagen wieder stark ab (Abb. 33). Im Darmtrakt nimmt der Ca-Gehalt nach aboral zu (Abb. 34).

Die statistische Überprüfung des Ca-Gehaltes im Chymus zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen, jedoch einige signifikante Abweichungen zwischen den verschiedenen Darmabschnitten (Tab. 20).

Tab. 20: Ca-Gehalt im Chymus: p-Werte zwischen den Darmabschnitten
Pa = Pansen; Ha = Haube; Bm = Blättermagen; Lm = Labmagen; Du = Duodenum;
Je = Jejunum; Il = Ileum; Cä = Cäcum; Co = Colon

Darmabschnitts- vergleiche	p-Wert	Darmabschnitts- vergleiche	p-Wert
Pa ↔ Ha	< 0,001	Pa ↔ Bm	< 0,001
Pa ↔ Lm	0,001	Pa ↔ Du	ns
Pa ↔ Je	0,004	Pa ↔ Il	< 0,001
Pa ↔ Cä	< 0,001	Pa ↔ Co	< 0,001
Ha ↔ Bm	ns	Ha ↔ Lm	< 0,001
Ha ↔ Du	< 0,001	Ha ↔ Je	0,033
Ha ↔ Il	ns	Ha ↔ Cä	0,008
Ha ↔ Co	0,003	Bm ↔ Lm	< 0,001
Bm ↔ Du	< 0,001	Bm ↔ Je	0,030
Bm ↔ Il	ns	Bm ↔ Cä	< 0,001
Bm ↔ Co	< 0,001	Lm ↔ Du	ns
Lm ↔ Je	< 0,001	Lm ↔ Il	< 0,001
Lm ↔ Cä	< 0,001	Lm ↔ Co	< 0,001
Du ↔ Je	0,001	Du ↔ Il	< 0,001
Du ↔ Cä	< 0,001	Du ↔ Co	< 0,001
Je ↔ Il	0,033	Je ↔ Cä	< 0,001
Je ↔ Co	< 0,001	Il ↔ Cä	0,008
Il ↔ Co	0,001	Cä ↔ Co	ns

Abbildung 33 stellt den Ca-Gehalt in den Vormägen und im Labmagen bei den vier Gruppen dar. Der Ca-Gehalt im Pansen zeigt signifikant niedrigere Werte gegenüber Haube, Blättermagen, Jejunum, Ileum, Cäcum und Colon und signifikant höhere gegenüber dem Labmagen. Der Ca-Gehalt im Duodenum unterschied sich nicht signifikant (ns) von dem im Pansen.

Gegenüber der Haube wiesen Labmagen, Duodenum, Jejunum, Cäcum und Colon signifikant unterschiedliche Ca-Werte auf. Im Vergleich zum Blättermagen waren die Ca-Gehalte in Labmagen, Duodenum und Jejunum signifikant niedriger. Im Cäcum und Colon stieg der Ca-Gehalt signifikant an. Einen signifikanten Ca-Gehalt von $p < 0,001$ besaß der Labmagen gegenüber Jejunum, Ileum, Cäcum und Colon.

Im Duodenum gab es gegenüber den nachfolgenden Darmabschnitten einen signifikant niedrigeren des Ca-Gehalt. Abbildung 34 zeigt, dass auch das Jejunum gegenüber seinen nachfolgenden Darmabschnitten einen signifikant tieferen Ca-Gehalt aufweist. Zwischen Ileum und Cäcum sowie Ileum und Colon zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Ca-Gehaltes im Chymus. Keinen signifikanten Unterschied im Ca-Gehalt gab es zwischen Cäcum und Colon.

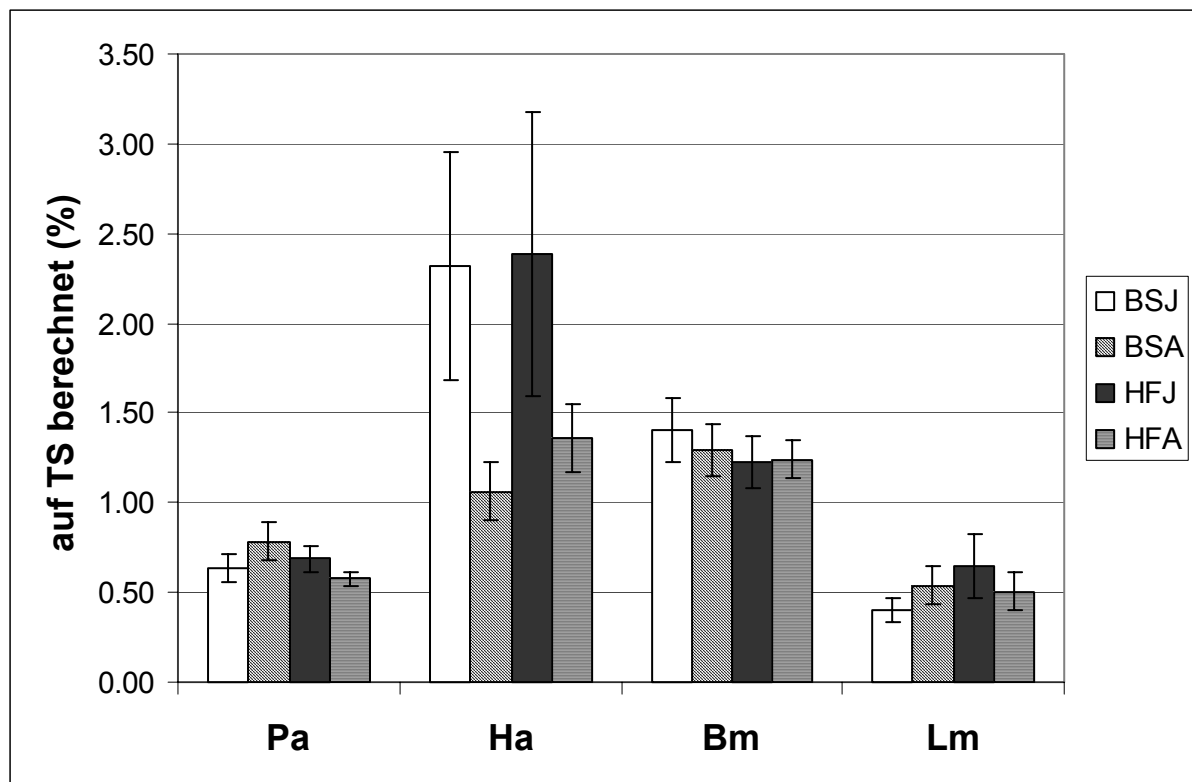


Abb. 33: Ca-Gehalt im Chymus der Vormägen und des Labmagens
Pa = Pansen; Ha = Haube; Bm = Blättermagen; Lm = Labmagen

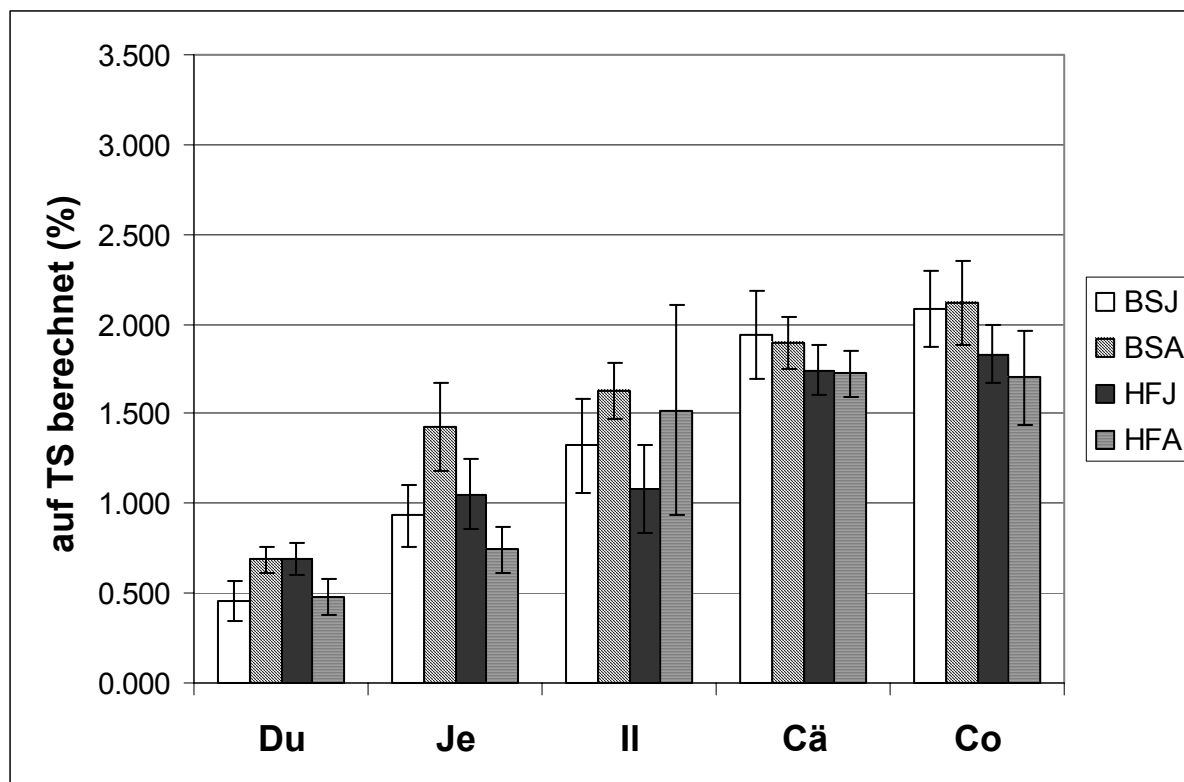


Abb. 34: Ca-Gehalt im Chymus der verschiedenen Darmabschnitte
Du = Duodenum; Je = Jejunum; Il = Ileum; Cä = Cäcum; Co = Colon

3.3.2. Mg-Gehalt im Chymus

Tab. 21: Mg-Gehalt im Chymus der verschiedenen GIT-Abschnitte

Gruppe Abschnitt	BS _J	BS _A	HF _J	HF _A
Pansen	0,078 ± 0,010	0,072 ± 0,013	0,124 ± 0,024	0,109 ± 0,031
Haube	0,179 ± 0,050	0,094 ± 0,023	0,140 ± 0,025	0,166 ± 0,023
Blättermagen	0,101 ± 0,013	0,079 ± 0,011	0,101 ± 0,013	0,255 ± 0,153
Labmagen	0,049 ± 0,013	0,068 ± 0,016	0,107 ± 0,015	0,186 ± 0,089
Duodenum	0,100 ± 0,017	0,111 ± 0,021	0,152 ± 0,011	0,165 ± 0,064
Jejunum	0,193 ± 0,025	0,232 ± 0,040	0,224 ± 0,036	0,190 ± 0,031
Ileum	0,259 ± 0,036	0,253 ± 0,038	0,184 ± 0,070	0,247 ± 0,025
Cäcum	0,295 ± 0,020	0,241 ± 0,022	0,286 ± 0,029	0,301 ± 0,029
Colon	0,317 ± 0,025	0,267 ± 0,027	0,284 ± 0,046	0,326 ± 0,015

Der Mg-Gehalt im Chymus (Tab. 21) zeigte einen ähnlichen Verlauf wie jener des Ca-Gehaltes. Der Mg-Gehalt hielt sich in den Vormägen und im Labmagen mehr oder weniger konstant zwischen 0,05 und 0,15 auf (die Gruppe der HF_A wies vor allem im Blättermagen höhere Werte auf) (Abb. 35), aber in den Darmabschnitten konnte ein allmählicher Anstieg des Mg-Gehaltes auf über 0,30 festgestellt werden (Abb. 36).

Auch hier lag kein signifikanter Unterschied im Mg-Gehalt zwischen den vier Gruppen vor. Dafür konnten wiederum signifikante Abweichungen des Mg-Gehaltes zwischen den einzelnen Darmabschnitten gefunden werden (Tab. 22).

Tab. 22: Mg-Gehalt im Chymus: p-Werte zwischen den Darmabschnitten
Pa = Pansen; Ha = Haube; Bm = Blättermagen; Lm = Labmagen; Du = Duodenum;
Je = Jejunum; Il = Ileum; Cä = Cäcum; Co = Colon

Darmabschnitts- vergleiche	p-Wert
Pa ↔ Ha	0,005
Pa ↔ Lm	ns
Pa ↔ Je	< 0,001
Pa ↔ Cä	< 0,001
Ha ↔ Bm	0,020
Ha ↔ Du	ns
Ha ↔ Il	0,003
Ha ↔ Co	< 0,001
Bm ↔ Du	ns
Bm ↔ Il	< 0,001
Bm ↔ Co	< 0,001
Lm ↔ Je	< 0,001
Lm ↔ Cä	< 0,001
Du ↔ Je	< 0,001
Du ↔ Cä	< 0,001
Je ↔ Il	ns
Je ↔ Co	< 0,001
Il ↔ Co	0,022

Darmabschnitts- vergleiche	p-Wert
Pa ↔ Bm	ns
Pa ↔ Du	0,015
Pa ↔ Il	< 0,001
Pa ↔ Co	< 0,001
Ha ↔ Lm	0,001
Ha ↔ Je	0,005
Ha ↔ Cä	< 0,001
Bm ↔ Lm	ns
Bm ↔ Je	< 0,001
Bm ↔ Cä	< 0,001
Lm ↔ Du	0,004
Lm ↔ Il	< 0,001
Lm ↔ Co	< 0,001
Du ↔ Il	< 0,001
Du ↔ Co	< 0,001
Je ↔ Cä	0,001
Il ↔ Cä	ns
Cä ↔ Co	ns

Der Mg-Gehalt im Pansen besass gegenüber demjenigen der Haube eine signifikante Abweichung von $p = 0,005$. Gegenüber allen Darmabschnitten gab es im Pansen einen signifikant höheren Mg-Gehalt. Die Haube zeigte sowohl gegenüber dem Blättermagen und dem Labmagen, aber auch gegenüber den Darmabschnitten Jejunum, Ileum, Cäcum und Colon eine signifikante Differenz im Mg-Gehalt. Eine signifikante Erhöhung des Mg-Gehaltes von $p < 0,001$ besass der Blättermagen gegenüber dem Jejunum, Ileum, Cäcum und Colon. Der Mg-Gehalt im Labmagen unterschied sich signifikant gegenüber allen nachfolgenden Darmabschnitten. Die graphische Darstellung der Vormägen und des Labmagens wird in Abbildung 35 veranschaulicht.

Einen signifikanten p-Wert von $p < 0,001$ zeigte der Mg-Gehalt im Duodenum gegenüber demjenigen im Jejunum, Ileum, Cäcum und Colon. Signifikant tiefere Mg-Gehalte wies das Jejunum gegenüber dem Cäcum und dem Colon auf. Der Mg-Gehalt im Ileum zeigt signifikant niedrigere Werte gegenüber Colon (Abb. 36).

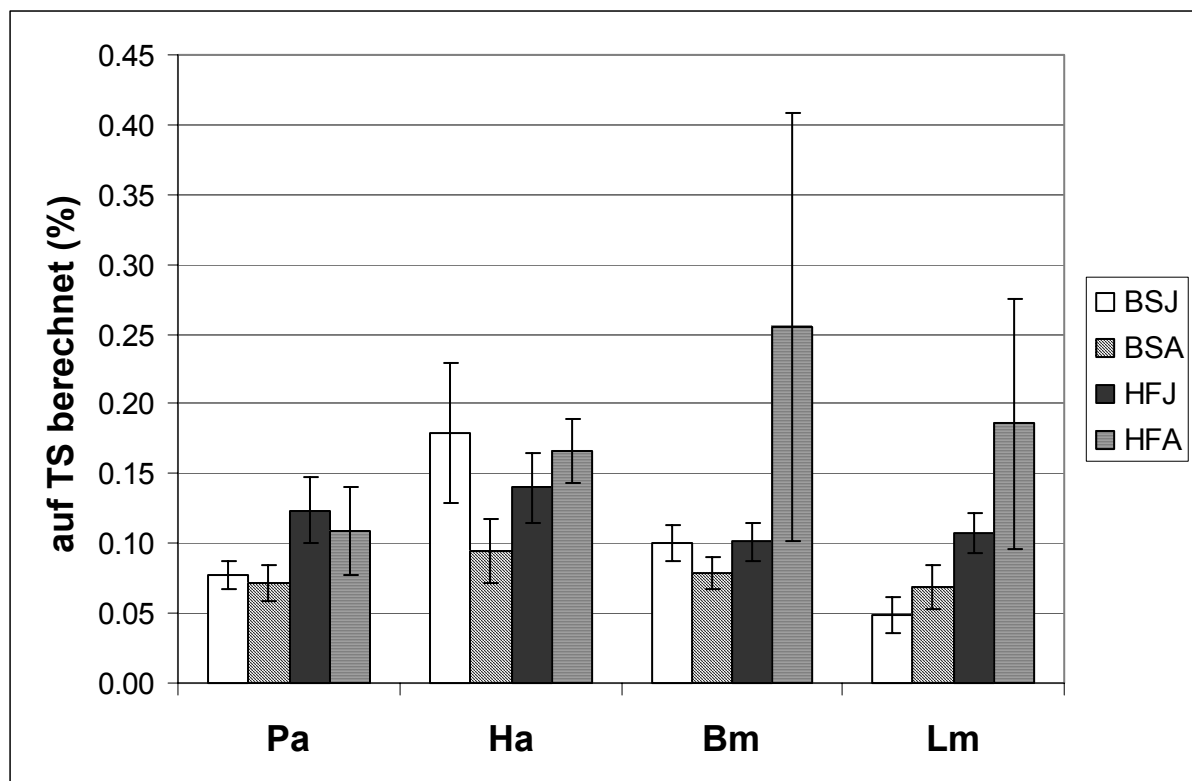


Abb. 35: Mg-Gehalt im Chymus der Vormägen und des Labmagens
Pa = Pansen; Ha = Haube; Bm = Blättermagen; Lm = Labmagen

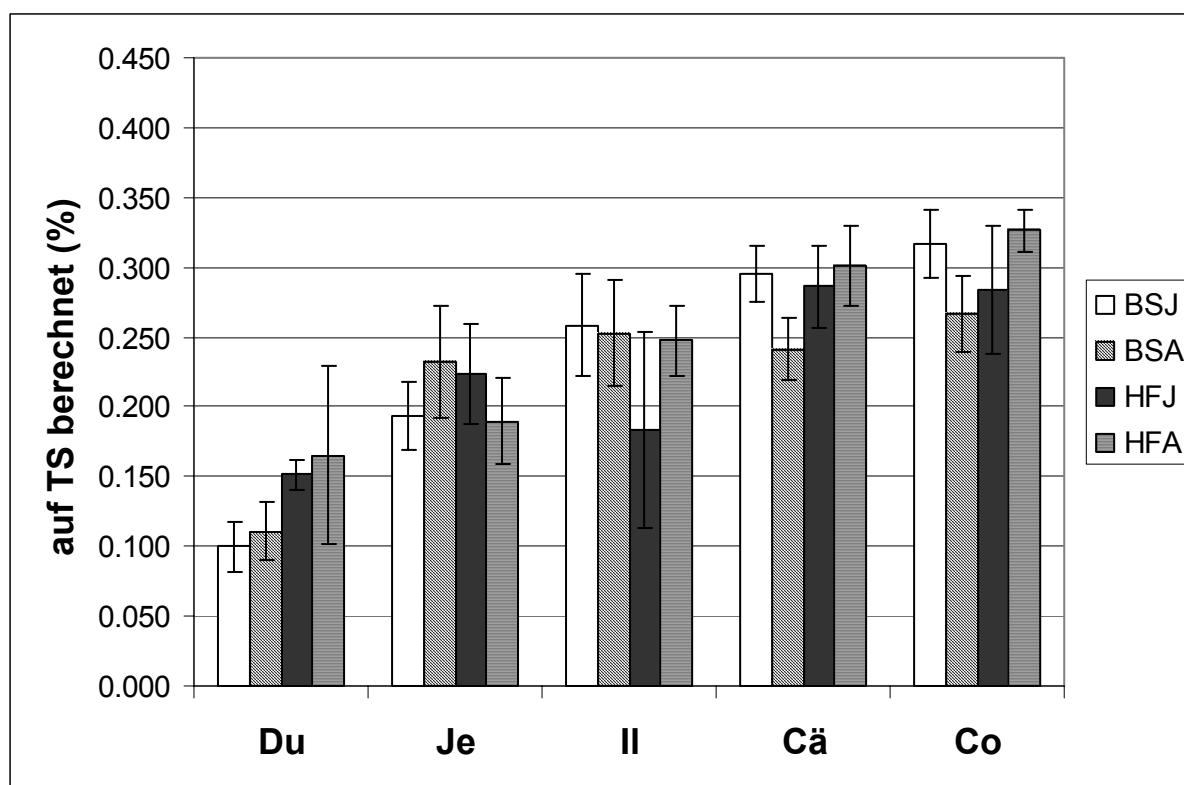


Abb. 36: Mg-Gehalt im Chymus der verschiedenen Darmabschnitte
Du = Duodenum; Je = Jejunum; Il = Ileum; Cä = Cäcum; Co = Colon

3.3.3. P-Gehalt im Chymus

Die MW des P-Gehaltes im Chymus der 36 Kühe variierten zwischen 0,557 und 1,016 % TS. Anders als beim Ca- und Mg-Gehalt, gab es im Chymus der Kühe keine grossen Schwankungen im P-Gehalt.

Tab. 23: P-Gehalt im Chymus der verschiedenen GIT-Abschnitte

Gruppe Abschnitt	BS _J	BS _A	HF _J	HF _A
Pansen	0,637 ± 0,050	0,803 ± 0,106	0,614 ± 0,055	0,758 ± 0,089
Haube	0,851 ± 0,065	1,016 ± 0,211	0,700 ± 0,052	0,946 ± 0,090
Blättermagen	0,905 ± 0,118	0,940 ± 0,065	0,737 ± 0,092	0,896 ± 0,068
Labmagen	0,611 ± 0,060	0,673 ± 0,066	0,557 ± 0,087	0,648 ± 0,087
Duodenum	0,877 ± 0,116	0,944 ± 0,079	0,818 ± 0,071	0,745 ± 0,081
Jejunum	0,703 ± 0,083	0,694 ± 0,065	0,635 ± 0,081	0,631 ± 0,074
Ileum	0,661 ± 0,104	0,647 ± 0,065	0,592 ± 0,122	0,745 ± 0,268
Cäcum	0,803 ± 0,083	0,693 ± 0,050	0,646 ± 0,070	0,779 ± 0,064
Colon	0,934 ± 0,103	0,762 ± 0,091	0,696 ± 0,086	0,936 ± 0,084

Im Gegensatz zu den anderen beiden Mineralstoffelementen, zeigte sich beim P-Gehalt im Chymus ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Tab. 24). Die Gruppe HF_J zeigte gegenüber allen anderen Gruppen einen signifikanten Unterschied.

Tab. 24: Statistischer Vergleich des P-Gehaltes im Chymus (Kruskal-Wallis Test)

Gruppenvergleich	p-Wert
BS _J ↔ BS _A	ns
BS _J ↔ HF _J	0,024
BS _J ↔ HF _A	ns
BS _A ↔ HF _J	0,013
BS _A ↔ HF _A	ns
HF _J ↔ HF _A	0,050

Zwischen den einzelnen Vormagen- (Abb. 37) und Darmabschnitten (Abb. 38) zeigten sich folgende signifikante Unterschiede des P-Gehaltes (Tab. 25):

Der Pansen besass eine signifikante Differenz im P-Gehalt gegenüber demjenigen der Haube, des Blättermagens, des Duodenum und dem Colon. Der P-Gehalt in der Haube zeigt signifikant höhere Werte gegenüber Labmagen, Jejunum, Ileum und Cäcum. Der P-Gehalt im Blättermagen wies eine signifikante Abweichung gegenüber demjenigen im Labmagen, im Jejunum, im Ileum und im Cäcum auf. Im Vergleich zum Labmagen waren die P-Gehalte im Duodenum, Cäcum und Colon signifikant unterschiedlich.

Mit Ausnahme des Colons, besass das Duodenum gegenüber den nachfolgenden Darmabschnitten eine signifikante Differenz im P-Gehalt. Einen signifikanten Unterschied im P-Gehalt bestand auch zwischen Jejunum und Colon sowie Ileum und Colon.

Tab. 25: P-Gehalt im Chymus: p-Werte zwischen den Darmabschnitten
 Pa = Pansen; Ha = Haube; Bm = Blättermagen; Lm = Labmagen; Du = Duodenum;
 Je = Jejunum; Il = Ileum; Cä = Cäcum; Co = Colon

Darmabschnitts- vergleiche	p-Wert
Pa ↔ Ha	0,004
Pa ↔ Lm	ns
Pa ↔ Je	ns
Pa ↔ Cä	ns
Ha ↔ Bm	ns
Ha ↔ Du	ns
Ha ↔ Il	0,005
Ha ↔ Co	ns
Bm ↔ Du	ns
Bm ↔ Il	0,004
Bm ↔ Co	ns
Lm ↔ Je	ns
Lm ↔ Cä	0,015
Du ↔ Je	0,004
Du ↔ Cä	0,026
Je ↔ Il	ns
Je ↔ Co	0,020
Il ↔ Co	0,014

Darmabschnitts- vergleiche	p-Wert
Pa ↔ Bm	0,003
Pa ↔ Du	0,002
Pa ↔ Il	ns
Pa ↔ Co	0,014
Ha ↔ Lm	< 0,001
Ha ↔ Je	0,004
Ha ↔ Cä	0,050
Bm ↔ Lm	< 0,001
Bm ↔ Je	0,002
Bm ↔ Cä	0,026
Lm ↔ Du	< 0,001
Lm ↔ Il	ns
Lm ↔ Co	< 0,001
Du ↔ Il	0,005
Du ↔ Co	ns
Je ↔ Cä	ns
Il ↔ Cä	ns
Cä ↔ Co	ns

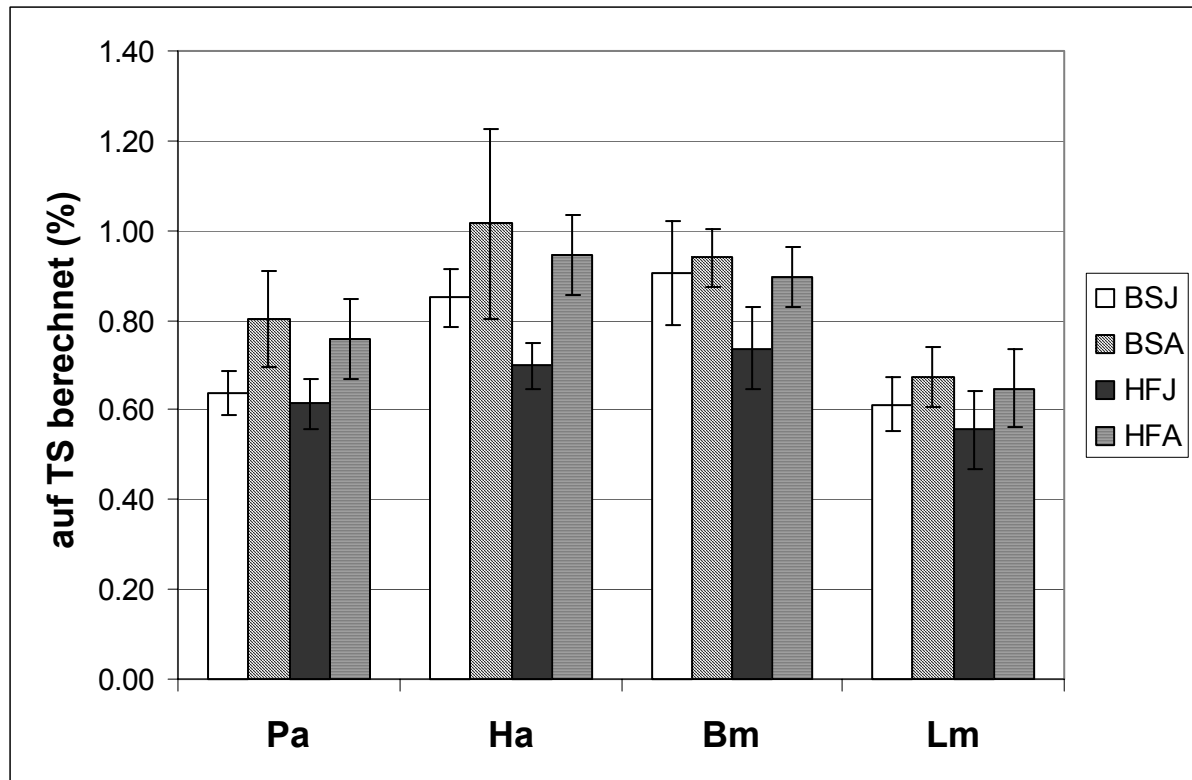


Abb. 37: P-Gehalt im Chymus der Vormägen und des Labmagens
Pa = Pansen; Ha = Haube; Bm = Blättermagen; Lm = Labmagen

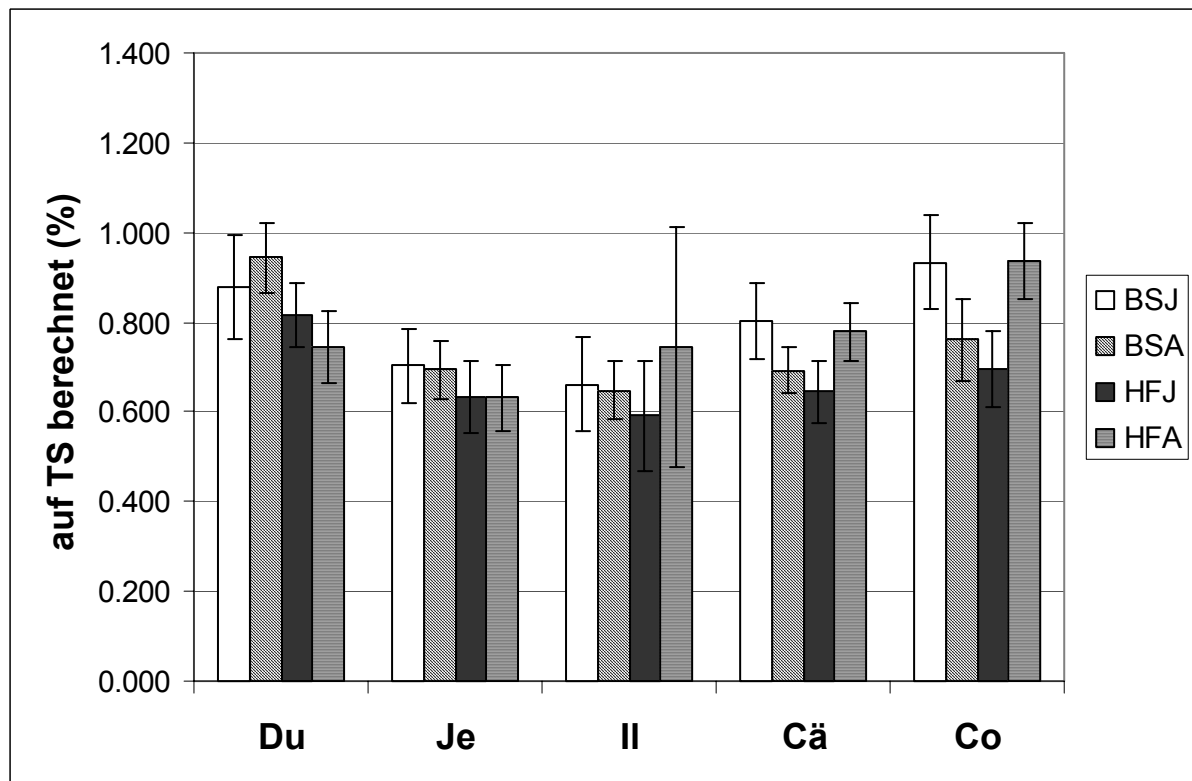


Abb. 38: P-Gehalt im Chymus der verschiedenen Darmabschnitte
Du = Duodenum; Je = Jejunum; Il = Ileum; Cä = Cäcum; Co = Colon

3.4. Blutanalyse

Die Daten der drei Parametern Ca, Mg und P werden als MW \pm SF dargestellt.

Tab. 26: Mittlere Ca-, Mg- und P-Konzentration (\pm SF) im Blutserum

	BS_J	BS_A	HF_J	HF_A
Ca (mmol/l)	2,43 \pm 0,09	2,44 \pm 0,05	2,52 \pm 0,07	2,41 \pm 0,08
Mg (mmol/l)	0,89 \pm 0,03	0,95 \pm 0,03	0,96 \pm 0,03	0,94 \pm 0,05
P (mmol/l)	1,54 \pm 0,07	1,63 \pm 0,12	1,50 \pm 0,14	1,35 \pm 0,13

Die von uns gemessenen Konzentrationen an Ca, Mg und P im Blut der Tiere (Tab. 26) lagen alle im Referenzbereich (Referenzwerte für Rinder (3 – 11 Jahre) aus der Veterinärmedizinische Klinik der Universität Zürich; auf COBAS MIRA[®] bestimmt).

4. DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit war die Messung von Ca-Fluxen in verschiedenen Darmabschnitten von Kühen unter Berücksichtigung der Faktoren Alter und Rasse sowie der Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren (VDR) im Gastrointestinaltrakt (GIT). Im Rahmen der Untersuchungen wurden Schlachtkühe verwendet, welche alle laktierend waren. Die Fütterung, ein wichtiger Faktor der Gebärparese-Erkrankung (Kapitel 1.3.3.) konnte nicht weiter abgeklärt werden, da es nicht möglich war, Rücksprache mit den Besitzern zu halten.

4.1. Ca-Fluxe im Gastrointestinaltrakt

Zur Messung der unidirektionalen Ca-Fluxraten wurde eine modifizierte Form der Ussing-Kammer-Methode nach Ussing und Zehran (1951) angewendet. In dieser modifizierten Form wurde sie seit Jahrzehnten zur Erforschung intestinaler Transportprozesse sowohl beim Monogastrier als auch beim Wiederkäuer eingesetzt.

In Tabelle 27 sind verschiedene Studien zusammengefasst, die zeigen, dass beim Rind in den GIT-Abschnitten sowohl eine Ca-Absorption als auch eine Ca-Sekretion möglich ist. Allerdings wurde nicht zwischen aktiven und passiven Transportvorgängen differenziert. Bei allen aufgeführten Studien handelt es sich um Untersuchungen, bei welchen die Ca-Bilanz beim Rind miterfasst wurde. Es wurden sowohl die alimentäre Ca-Aufnahme als auch die fäkalen Ca-Verluste gemessen.

Wasserman und Fullmer (1983) zeigten, dass die Bedeutung des parazellulären Transportes für die Ca-Absorption mit steigender Konzentration an freiem Ca im Chymus zunimmt. Bei verschiedenen anderen Studien (Nellans, 1988, 1990; Goff und Horst, 1994; Horst et al., 1994) konnten ähnliche Resultate erzielt werden. Tiere, welche hohe Ca-Gaben erhielten, nahmen mehr als 50 % des Ca passiv über den parazellulären Transportweg auf. Ist hingegen wenig Ca im Darmtrakt der Tiere vorhanden, wird Ca v.a. aktiv absorbiert (Bronner, 1987).

Tab. 27: Ca-Bewegungen im Gastrointestinaltrakt von Rindern (alle Angaben in g/d).
(positive Werte bedeuten Nettoabsorption, negative eine Nettosekretion)

alimentäre Aufnahme	Vor-mägen	Dünn-darm	Dick-darm	Faeces	Bilanz	Autor
		Intestinal				
15,2 14,7 14,3	2,8 4,0 2,2	-0,5 -2,4 -0,5	1,4 1,5 0,9		3,7 3,0 2,7	Greene et al., 1983 ¹
14,4 23,0 27,7 63,6		16,9 31,3 30,9 110,2		3,1 4,6 4,1 8,3		Goetsch und Owens, 1985 ²
34,7 32,8	3,1 5,8	-1,0 -2,7	-0,8 -1,0	33,3 30,4	1,5 2,4	Greene et al., 1988 ³
24,9 25,1 25,2 51,4 48,2 51,7 33,6 37,1	1,2 1,8 1,1 20,9 14,5 19,8 1,6 5,4	3,7 2,5 2,9 -0,8 1,4 -3,3 -4,1 -1,1	-3,9 0,1 -1,4 -0,4 0,5 -1,0 4,5 -0,2	23,9 20,7 22,6 31,7 31,8 36,2 31,6 33,0	0,2 3,5 2,1 18,2 17,4 13,8 1,0 4,4	Khorasani und Armstrong, 1992 ⁴
170,0 189,8 199,5 189,5 199,7	14,6 6,8 13,8 -13,3 15,9	-1,8 6,6 -13,1 27,9 6,6		157,2 176,5 198,7 174,9 177,2	12,8 13,9 0,7 14,6 22,5	Rahnema et al., 1994 ⁵
18,0 17,6 39,5 40,3 17,8 39,9 28,8 28,9	-5,0 -5,9 3,3 -4,6 -5,5 -0,7 -0,9 -5,2	11,6 12,9 13,7 16,6 12,2 15,1 12,7 14,7		11,5 10,6 22,6 28,3 11,0 25,4 17,0 19,5	6,6 7,0 17,0 12,0 6,8 14,5 11,8 9,5	Zinn und Shen, 1996 ⁵
231,0 150,0 118,0 115,0	49,8 19,1 6,5 -0,9	24,6 28,0 28,6 36,8		156,5 107,4 83,6 78,6	74,4 40,9 34,7 35,9	Khorasani et al., 1997 ⁶
		-14,8 -12,9 -10,8 -13,8	-7,5 -6,3 -9,0 -12,6			eigene Versuche

¹ Die Ration der Tiere enthielt verschieden hohe Kalium-Mengen.

² Die Ration der Tiere bestand zu 88 % aus Konzentrat.

³ Die Ration der Tiere enthielt Monensin.

⁴ Es wurden verschiedene Diäten verfüttert

⁵ Die Ration der Tiere enthielt hohe Fettgehalte.

⁶ Es wurden verschiedene Silagen verfüttert.

Die Ergebnisse dieser Studien (Tab. 27) lassen ein gewisses Muster erkennen. Die mit der Futterration aufgenommene Menge an Ca spielt eine entscheidende Rolle bei der Ca-Absorption: je mehr Ca darin enthalten ist, desto höher war die präintestinale Nettoabsorption. Ricken (2005) veranschaulichte in ihrer Dissertation die präintestinale Resorption von Ca bei Rindern in Abhängigkeit von der täglichen Ca-Aufnahme (Abb. 39). Ihre Daten basieren auf denselben Literaturangaben, wie sie in Tabelle 27 aufgelistet sind. Zu beachten ist, dass es sich bei den genannten Studien (Tab. 27) um sehr inhomogenes Tiermaterial handelt.

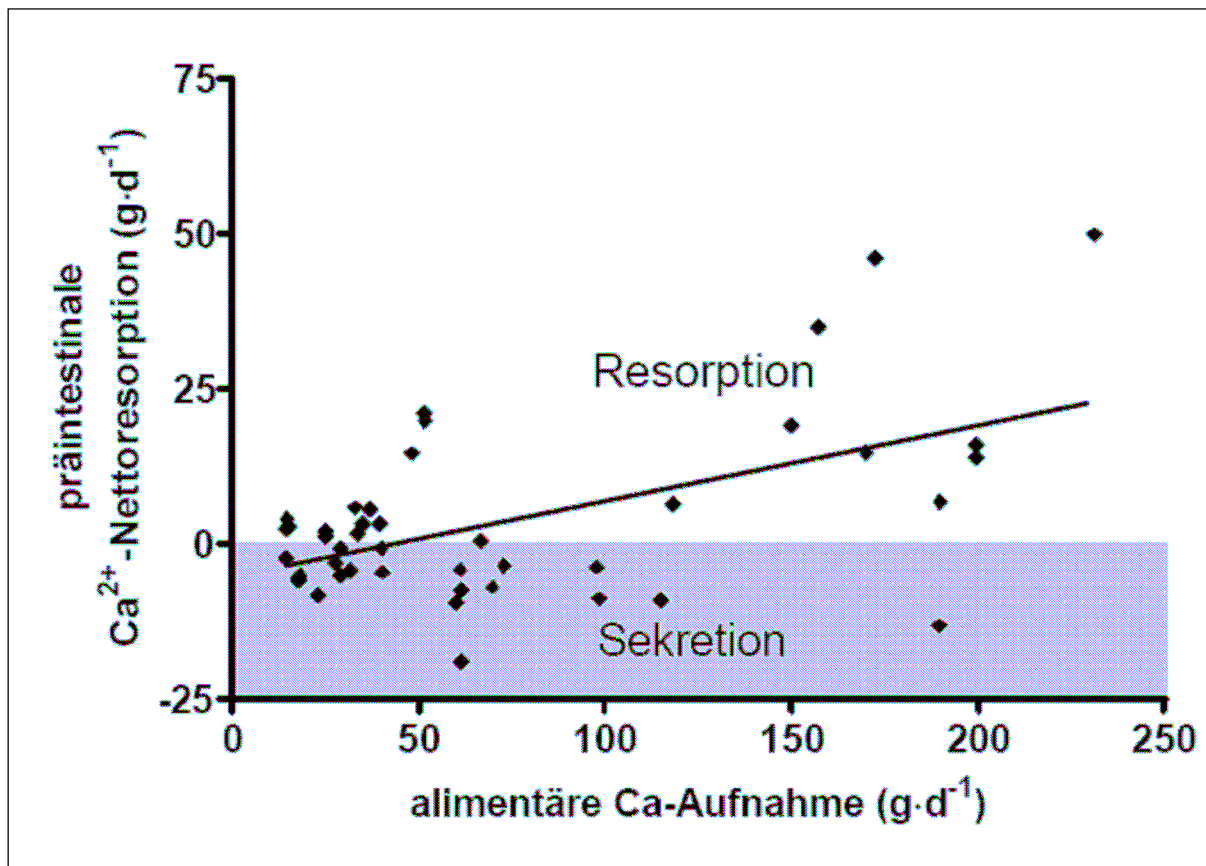


Abb. 39: Präintestinale Ca-Resorption in Abhängigkeit von den täglichen alimentären Ca-Aufnahmen. (Ricken, 2005)

In der Studie von Breves und Schröder (2005) zeigte sich ein übereinstimmendes Bild (Abb. 40) mit jenen Ergebnissen von Ricken (2005): eine erhöhte präduodenale Ca-Nettoabsorption wurde bei laktierenden Milchkühen mit einer hohen täglichen Ca-Aufnahme gemessen. Die Milchkühe wurden mit Duodenalkanülen ausgestattet, wobei aber hier keine Unterscheidung zwischen aktiven und passiven Ca-Fluxen möglich war.

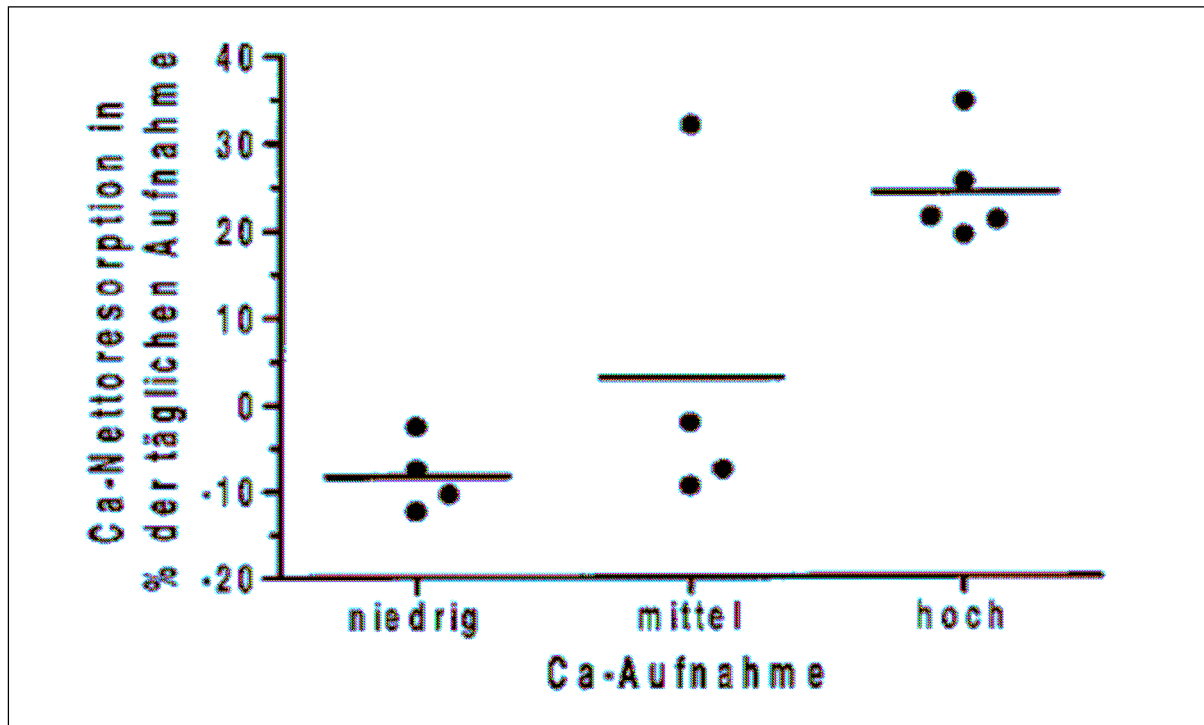


Abb. 40: Präduodenale Ca-Nettoabsorption bei laktierenden Milchkühen mit unterschiedlicher täglicher Ca-Aufnahme.
niedrig = 62 g; mittel = 98 g; hoch = 165 g (Breves und Schröder, 2005)

Bei Ziegen bewirkte eine Verminderung der Ca-Zufütterung einen Anstieg der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Plasma Konzentration und löste dadurch eine signifikante Erhöhung der aktiven Ca-Nettoabsorption im Pansen um 50 % aus. Der gleiche Versuchsansatz bei Schafen löste wiederum eine Steigerung des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Plasma-Spiegels aus. Aber im Gegensatz zu den Ziegen rief es keine Stimulation der Ca-Absorption im Pansen hervor (Schröder et al., 1997, Breves und Schröder, 2005). Zwischen den einzelnen Spezies bestehen Unterschiede im Ca-Stoffwechsel und somit können nicht immer Verknüpfungen von einer Wiederkäuerspezies auf die andere hergestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ca-Fluxe im Duodenum und Colon gemessen. Bei beiden untersuchten Darmabschnitten wurde eine Nettosekretion festgestellt. Einige Studien, welche ebenfalls eine Ca-Nettosekretion beschreiben, sind in Tabelle 27 aufgelistet. So beobachteten Greene et al. (1983), dass bei sechs jungen Stieren (Angus x Simmentaler; in 3 Gruppen unterteilt) eine Ca-Nettoabsorption in den Vormägen und im Dickdarm, im Dünndarm hingegen eine Ca-Nettosekretion erfolgte. Bei einer späteren Studie fanden Greene et al. (1988) bei der Überprüfung des

Effektes von Monensin auf die Mg- und Ca-Resorption, dass bei acht Bullen (Angus x Hereford; in 2 Gruppen unterteilt) ausschliesslich die Vormägen für die Ca-Nettoabsorption verantwortlich waren. Der intestinale Bereich zeigte eine Ca-Nettosekretion. Ähnliche Resultate zeigten Khorasani und Armstrong (1992), welche den Einfluss verschieden hoher Ca-Konzentrationen im Futter auf die Ca-Nettobewegungen im GIT von allerdings nur vier Jersey Rindern (2 Kühe, 2 Stiere) analysierten. Eine Ca-Nettoabsorption fand wiederum in den Vormägen statt, im Dünn- und Dickdarm wurden hingegen nur kleine Mengen an Ca absorbiert oder sezerniert.

Zu beachten ist, dass die beiden Studien von Greene et al. (1983; 1988) mit männlichen Tieren gemacht wurden. Sie können somit lediglich als Modell für nicht-laktierende, nicht-trächtige Kühe angesehen werden, welche kein Ca über die Milch oder den Fötus verlieren. In allen in Tabelle 27 aufgeführten Studien wurden zudem relativ wenig Tiere verwendet ($n < 8$). Ausserdem wurden die Ca-Fluxe mittels Kanülen im jeweiligen GIT-Segment erfasst. Mit dieser Methodik ist es nicht möglich, zwischen aktiven und passiven Transportvorgängen zu differenzieren. Bei den meisten Studien wurden zusätzlich zu den fäkalen auch die urinären Ca-Verluste gemessen.

Die Arbeitsgruppe von Schröder et al. (1997) untersuchte die Ca-Absorption im GIT von kleinen Wiederkäuern mittels Ussing-Kammer-Methode. Sie stellten fest, dass mit Ausnahme des Duodenums beim Schaf, die Mukosa-zu-Serosa-Fluxe (J_{ms}) die gegenrichtige Fluxrate (J_{sm}) bei Schaf und Ziege in allen Darmsegmenten überstiegen. Gemessen wurden Ca-Nettofluxe ($J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$) beim Schaf zwischen -2 und $9 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ und 10 und $15 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ bei der Ziege. Die adulten Schafe zeigten eine Ca-Nettosekretion ($-2,4 \pm 2,1 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) im Duodenum, wie dies auch in der vorliegenden Studie der Fall war. Eine Verminderung der Ca- Zufütterung bei Ziegen bewirkte einen Anstieg der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Plasma Konzentration und löste dadurch eine signifikante Erhöhung der aktiven Ca-Nettoabsorption im Pansen um 50 % aus. Der gleiche Versuchsansatz bei Schafen, löste zwar wiederum eine Steigerung des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Plasma-Spiegels aus, aber im Gegensatz zu den Ziegen rief es keine Stimulation der Ca-Absorption im Pansen hervor (Schröder et al., 1997, Breves und Schröder, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Altersklassen von jeweils zwei Rassen verglichen, wobei keine Unterschiede bezüglich Rasse und Alter auf die Ca-

Fluxe nachgewiesen werden konnten. Schröder et al. (1997) kam beim kleinen Wiederkäuern bezüglich Alter zu übereinstimmenden Resultaten.

Zusammenfassend kann angenommen werden, dass beim Rind, genauso wie beim kleinen Wiederkäuer, durch Ca-Absorption im präintestinalen Bereich des GIT bei einem ausreichend hohen Ca-Angebot in der Ration, ein grosser Anteil des täglichen Ca-Bedarfs gedeckt werden kann. Bei einer Erhöhung des Ca-Angebotes in der Futterration wird vor allem über passive Transportmechanismen Ca im GIT aufgenommen. Aktive Ca-Absorption im Darm findet vor allem bei einer tiefen Ca-Konzentration im Futter statt.

4.2. Verteilung der Vitamin D-Rezeptoren im Gastrointestinaltrakt

Die immunhistochemische Methode zum Nachweis des VDR im GIT des Rindes hat gegenüber der biochemischen Technik den Vorteil der eindeutigen topographischen Zuweisung der rezeptortragenden Zellen im Gewebeverband (Krüdwagen, 1996). Die Auswertung der immunpositiven Zellen (visuelle Bestimmung der Farbtintensität und des Prozentsatzes der positiv angefärbten Zellen) ist in einem gewissen Masse sowohl vom Untersucher als auch von der Interassay-Varianz selbst abhängig (Kohtes, 1998).

Erkenntnisse bezüglich des Verteilungsmusters der VDR einer Wiederkäuerspezies dürfen nicht hundertprozentig auf andere Ruminantia übertragen werden. Aus Gründen der Praktikabilität lassen sich Studien am Wiederkäuer jedoch prinzipiell leichter mit Schafen oder Ziegen als mit Rindern durchführen. Riner (2006) führte Untersuchungen zum Verteilungsmuster der VDR im GIT am kleinen Wiederkäuer durch. Die Arbeitsgruppe von Goff, Horst und Reinhardt untersuchten in ihren Studien neben Ratten auch Rinder auf den VDR-Gehalt im GIT (Goff et al., 1988, 1995a, 1995b; Horst et al., 1989, 1990, 1994; Reinhardt et al., 1988).

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde das Vormagen- und Labmagengewebe mittels immunhistochemischer Methoden auf das Vorhandensein der VDR überprüft. Die Nachweise waren aber alle negativ. Das lässt vermuten, dass die Ca-Absorption

beim Rind im präintestinalen Bereich (v.a. Pansen) nicht $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -abhängig ist, sondern als passive Ca-Absorption (transzellulär) vonstatten geht. Schröder et al. (1997, 1999, 2001) konnten jedoch die Existenz der aktiven Ca-Absorption ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -abhängig) im Pansen von Schafen mittels Ussing-Kammer Technik bestätigen. 2001 konnten Schröder et al. zudem die Existenz der VDR im Pansen von Schafen mittels Western Blot-Analyse sowie RT-PCR aufzeigen. Horst (persönliche Mitteilung, Schröder et al., 1997) wies VDR im Pansen von Kühen nach. In der vorliegenden Arbeit war die Stärke der immunhistochemischen Reaktion der Zellkerne in den verschiedenen Darmabschnitten signifikant unterschiedlich. Die beiden Duodenumsabschnitte (DvP und DnP) wiesen bei allen Tieren die stärkste Reaktion auf. Goff et al. (1995a) zeigten in einer ihrer Studien, dass bei Jersey-Kühen ebenfalls im Duodenum die stärkste intestinale Ca-Absorption stattfindet. Wie aber bereits erwähnt, konnte in anderen Studien (Schröder et al., 1997; 1999; 2001) mit Schafen und Ziegen gezeigt werden, dass die stärkste Ca-Nettoabsorption im Pansen stattfindet.

Folgendes VDR-Verteilungsmuster ergibt sich aus den vorliegenden Resultaten: Duodenum vor/nach Pankreas > Jejunum > Colon, Rektum > Ileum, Cäcum. Goff et al. (1988) untersuchten die VDR-Menge im Duodenum und Colon von Ratten während der Laktation. Sie stellten fest, dass die Anzahl VDR im Duodenum deutlich ($r = 80$; $p < 0,06$) mit der Anzahl VDR im Colon korreliert. Die Anzahl VDR im Colon entspricht etwa 60 – 70 % der VDR-Zahl im Duodenum. Diese prozentuale VDR-Verteilung wurde hier nicht ganz erreicht. Die beiden Duodenumsabschnitte (Summe IRS: DvP = 5942; DnP = 6236) standen in einem Verhältnis von 2,3 : 1 zum Colon (Summe IRS: Co = 2639), d.h. die Anzahl VDR im Colon entspricht ca. 43,5 % jener im Duodenum. Zu einem fast gleichen Resultat kam Riner (2006) bei der Untersuchung kleiner Wiederkäuer auf den VDR-Gehalt in den jeweiligen Darmabschnitten. Im Duodenum von Schlachtschafen war der VDR-Gehalt 2,55 mal höher als im Colon, die Schlachtziegen zeigten einen Faktor 3,2 zwischen Duodenum und Colon. Es handelte sich dabei um nicht-tragende, nicht-laktierende Tiere.

In einer weiteren Studie (Goff et al., 1995a) wurden bei Jersey-Kühen während jeweils zwei Wochen ante und post partum die VDR Zahl im Colon mittels Ligand-Binding-Assay bestimmt. Die VDR-Anzahl im Colon war während der späten Trächtigkeit 3 – 4 mal höher als die VDR-Menge im Colon von nicht-laktierenden

Kühen. Während der Früh-laktation war die VDR-Zahl im Colon ähnlich jener der späten Trächtigkeit. Die Autoren fanden jedoch heraus, dass es zwischen Kühen, die Milchfieber entwickelten, und denen, die nicht erkrankten, keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Anzahl der VDR im Colon zum Zeitpunkt vor, während und nach der Geburt gab. Die Zahl der VDR steigt bei allen Kühen während der Trächtigkeit und sinkt bei der Geburt um 20 – 30 % ab. Sie erreicht dann in der frühen Laktation wieder höhere Werte. Auch Liesegang et al. (2006) beobachteten bei Ziegen und Schafen post partum einen signifikanten Abfall der VDR-Zahl in der Colonschleimhaut (Biopsien). Anschliessend kam es im Verlauf der Laktation bei beiden Spezies wieder zu einem signifikanten Anstieg der VDR-Menge.

Unsere Tiere standen alle in Laktation. Die VDR-Menge der einzelnen Darmabschnitte wurde somit zu einem Zeitpunkt gemessen, bei welchem anzunehmen ist, dass bei allen der Ca-Bedarf gedeckt war. In der Regel treten in diesem Zeitraum keine Störungen des Ca-Haushaltes bei der Kuh auf.

Die Anzahl der VDR in den Zielorganen (Darm-, Nieren- und Knochenzellen) ist gemäss mehrerer Studien vom Alter abhängig (Reinhardt et al., 1988; Horst et al., 1989, 1990, 1994; Goff et al., 1995b). Altkühe haben demnach eine weitaus niedrigere Anzahl an VDR als Jungrinder. Ca kann bei Kühen in der ersten Laktation viel schneller aus dem Darm und dem Skelett mobilisiert werden. Die Effizienz der intestinalen Ca-Absorption ist während der Trächtigkeit und der Laktation erhöht, weil in dieser Phase die VDR-Anzahl im Darm zunimmt (Horst et al., 1989, 1994). Untersuchungen an Ratten und Kühen haben gezeigt, dass die Anzahl VDR im Darm (Duodenum und Colon) bei laktierenden und trächtigen Tieren signifikant höher ist, als bei nicht-trächtigen, nicht-laktierenden Tieren (Horst und Reinhardt, 1988; Goff et al., 1988; Horst et al., 1989, 1994)

Die Resultate aus unseren Untersuchungen zeigten dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Faktoren Rasse und Alter). Die Tiere standen in einer Phase der Laktation, bei welcher keine Störungen des Ca-Stoffwechsels zu erwarten waren und somit auch die Anzahl VDR im GIT eine untergeordnete Rolle spielte. Auch bei Riner (2006) konnten in Bezug auf das Alter keine entsprechenden Differenzen bei Schafen und Ziegen gefunden werden.

Die Lokalisation der VDR in den einzelnen Drüsenschichten wurde zusätzlich als Parameter in unsere Untersuchungen einbezogen. Die basalen und mittleren

Drüsenschichten zeigten in allen Darmabschnitten im Vergleich zu der oberflächlichen Drüsenschicht und zum Oberflächenepithel die stärkste immunpositive Farbreaktion. Diese Resultate können mit Hilfe der Erkenntnisse aus verschiedenen Studien über die Differenzierung der Enterozyten interpretiert werden. Man weiss, dass sich die aus den Stammzellen entwickelten Tochterzellen im Dünndarm in vier Zellgruppen differenzieren: die an Zahl vorherrschenden Enterozyten, mukus-sezernierende Becher-Zellen, Paneth-Zellen (seröse Drüsenzellen) und enteroendokrine Zellen (Marshman et al. 2002). Die Ausdifferenzierung der zukünftigen Paneth-Zellen und enteroendokrinen Zellen geschieht im Verlaufe einer abwärts gerichteten Wanderung zur Kryptenbasis, wo sie dann für ca. 20 Tage verbleiben. Die zukünftigen Enterozyten und Becher-Zellen wandern in ca. 3 - 5 Tagen an die Kryptenoberfläche. Auf diesem Weg teilen sie sich mehrmals und bilden eine Transitzell-Population (Ferraris et al., 1992; Marshman et al., 2002; Pinto und Clevers, 2005). Sobald die Enterozyten und Becher-Zellen die intestinale Oberfläche erreichen, wird Ca in die Zellen aufgenommen. Dies ist nicht mehr unter strenger Kontrolle des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Folglich wird die Vitamin D-abhängige Ca-Absorption in der Tiefe der Krypten reguliert, wo die Zellen herandifferenzieren. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kann die Funktion der Zellen im Dünndarm somit nur an diesem Ort und zu einer nur kurzen Zeit regulieren. Im Dickdarm sind die Stammzellen an der Kryptenbasis lokalisiert. Alle Tochterzellen wandern während ihrer Reifung aufwärts Richtung Kryptenoberfläche (Marshman et al., 2002; Pinto und Clevers, 2005). Die hauptsächliche Zelldifferenzierung, welche durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reguliert wird, ist in diesen Darmabschnitten (Colon und Rektum) vor allem in den mittleren Drüsenschichten anzutreffen (stärkste immunreaktive Färbung).

Clemens et al. (1988) konnte mittels Immunhistochemie an Hühnerenterozyten zeigen, dass die Kerne verstärkt in den Krypten und weniger deutlich an den Zotten reagierten. Ein möglicher Grund könnte darin liegen, dass bereits weiter differenzierte Zellen andere Stoffwechselaufgaben übernehmen und deshalb andere Proteine verstärkt exprimiert werden.

Folgendes Fazit kann gezogen werden: die Expression der VDR könnte mit der zellulären Differenzierung der Enterozyten korreliert sein. Zellen in einem frühen Wachstumsstadium weisen eine grössere Anzahl VDR auf, als Zellen welche bereits fortgeschritten differenziert sind.

In der vorliegenden Arbeit, so wie bei den Untersuchungen von Riner (2006) konnten sowohl bei Kühen, Schafen als auch bei Ziegen kein Altersunterschied in Bezug auf die intestinale VDR-Menge gefunden werden. Da aber in verschiedenen anderen Studien (Reinhardt et al., 1988; Horst et al., 1989, 1990, 1994; Goff et al., 1995b) der Faktor Alter eine Rolle in Bezug auf die Anzahl der VDR in den Zielorganen zu spielen scheint, sind weitere Überprüfungen erforderlich.

4.3. Chymus-Analysen

Die Verweilzeit des Chymus im GIT der Rinder ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie Futtermenge, Zusammensetzung der Ration, Futterstruktur, Abstand der letzten Futteraufnahme und Leistung der Tiere (Kolb, 1989). Im Pansen und in der Haube spielen die Organgrösse, die Futtermenge und die Abbaurate des Futters eine entscheidende Rolle bei der Passagegeschwindigkeit des Chymus. Die mittlere Verweildauer von Futterpartikeln (18 – 72 h) ist viel länger als jene von Flüssigkeit (ca. 12 h). Dieses Phänomen wird selektive Retention der Partikel genannt (Kaske, 2000). Bei der Passage des Chymus von der Haube in den Blättermagen werden weitgehend verdaute, kleine Futterpartikel mit hoher Dichte transportiert. Die Verweildauer des Chymus im Blättermagen ist mit 0,5 – 3 h kurz. Der Zufluss von Chymus (Flüssigkeit, Mikroorganismen, kleine Partikel) in den Labmagen erfolgt weitgehend kontinuierlich. Die mittlere Verweilzeit im Labmagen liegt bei weniger als einer Stunde, wobei in dieser Zeit noch eine wesentliche Volumenzunahme infolge der Sekretionstätigkeit des Labmagens stattfindet. Der Chymustransport ins Duodenum erfolgt in einzelnen Schüben (ca. 10 pro Stunde). Die Chymuspassage durch Dünn- und Dickdarm schliesslich wird durch peristaltische Darmkontraktionen bewirkt, die Transitzeit liegt etwa bei 15 h. Im Dickdarm verweilen die Futterreste beim Schaf nach einer relativ raschen Passage durch den Dünndarm (2,25 – 4,5 h) längere Zeit (10,2 – 26,5 h). In beiden Abschnitten verhält sich die Retentionszeit umgekehrt proportional zur Aufnahme an Trockenmasse. Dieses Verhalten steht im Gegensatz zur Aufenthaltsdauer der Futtermittel im Pansen-Hauben-Raum, aus dem diejenigen mit hoher Verdaulichkeit rascher ausgeschleust werden als solche mit niedriger Verdaulichkeit (Kolb, 1989).

Die im Vergleich zu den Monogastriern etwas längere Passagedauer durch den GIT beim Wiederkäuer kommt dadurch zustande, dass das Futter längere Zeit in den Vormägen verweilt (Wiederkauen).

Beim Rind liegt der prozentuale Anteil des absorbierten Ca von der mit dem Futter aufgenommenen Ca-Menge bei 30 – 35 %, doch erfolgt aufgrund einer Ca-Sekretion die Netto-Absorption nur zu 20 – 25 % (Fromm und Gäbel, 2000).

Aus versuchstechnischen Gründen war es nicht möglich, die Tiere immer im gleichen zeitlichen Abstand zur letzten Futteraufnahme zu töten. Dadurch war der Füllungszustand des GIT zum Zeitpunkt der Tötung bei den einzelnen Tieren sehr unterschiedlich. Der Ca-Gehalt der Chymusmasse variierte stark zwischen den einzelnen GIT-Abschnitten. Dennoch war eine gewisse Tendenz feststellbar. Die Ca-Konzentration im Pansen war bei allen Tieren tiefer als in der Haube. Der Ca-Gehalt in der Haube schwankte je nach Gruppe sehr stark. Der Durchtritt des Chymus vom Pansen in die Haube richtet sich nach der Futterpartikelgrösse und –beschaffenheit. Da bei unseren Tieren die Futteraufnahme nicht eruiert werden konnte, können diese Gruppenunterschiede nicht genau abgeklärt werden. Im Mittel zeigte der Ca-Gehalt im Blättermagen höhere Werte als in den vorangehenden Vormagenabschnitten. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Kühe hier vermehrt Ca sezerniert haben, da sie sich in einer ausgeglichenen Ca-Stoffwechselphase befanden. Alle Tiere zeigten danach einen signifikanten Ca-Gehalt-Abfall im Labmagen-Chymus. Dies überrascht, da die Konzentration an ionisiertem Ca im Magen von Monogastriern im Mittel erheblich höher ist als im Darm. Grund dafür ist die bessere Löslichkeit der Ca-Salze bei niedrigem pH-Wert. Der pH-Wert im Labmagen-Chymus der Wiederkäuer ($\text{pH} \approx 3$) ist aber nicht so niedrig wie jener im Magen der Monogastrier ($\text{pH} \approx 1-2$). Grundsätzlich kann der Ca-Abfall vom Blättermagen in den Labmagen folgendermassen erklärt werden: Der Labmagen produziert viel Sekret, das Chymusvolumen nimmt zu und infolge dessen wird der Ca-Gehalt im Labmageninhalt verdünnt.

Die Konzentration an Gesamt-Ca nahm anschliessend im Chymus vom Dünn- zum Dickdarm stetig zu. Die Kühe zeigten demnach eine kontinuierliche Ca-Sekretion, was zu einer Steigerung des Ca-Gehaltes im Chymus führte.

Die Passagegeschwindigkeit im Dickdarm ist langsamer als im Dünndarm. Über eine Beziehung zwischen der Ca-Verweildauer und der Anzahl VDR im GIT-Segment wird

daher spekuliert. Eine verminderte Anzahl VDR könnte mit einer langsameren Darmpassage kompensiert werden. Beispielsweise ist die Verweilzeit des Ca im Colon länger als jene im Duodenum. Es stellt sich daher die Frage, ob gerade deshalb die Anzahl VDR im Colon niedriger ist als im Duodenum.

Der Mg-Gehalt im Chymus war in den Vormägen und im Labmagen tiefer als in den nachfolgenden Darmabschnitten. Im Verdauungskanal der Wiederkäuer wird 80 % des oral aufgenommenen Mg überwiegend in den Vormägen (Pansen) absorbiert (Kolb, 1989; Martens, 2000). Dies führt zur Annahme, dass auch in diesen Untersuchungen der Mg-Haushalt der Kühe ausgeglichen war, denn das Ansteigen des Mg-Gehaltes im Darmchymus weist auf eine vermehrte Sekretion von Mg in den Darm hin.

Etwa 20 – 80 % des P in der Futterration wird im Dünndarm (v.a. Jejunum) aufgenommen. Aber auch in den Vormägen ist eine P-Absorption möglich. In den Vormägen der Kühe war die P-Konzentration hoch. Der Labmagen wies anschliessend einen signifikanten P-Abfall auf, worauf wieder ein signifikanter P-Anstieg im Duodenumschymus folgte. Eine signifikante Verminderung des P-Gehaltes im Jejunum, dem Ort der grössten P-Absorption, wurde anschliessend beobachtet. Da im Dickdarm kein oder nur ein geringer Anteil an P aus dem Inhalt aufgenommen werden kann, lässt sich das leichte Ansteigen des P-Gehaltes in aborale Richtung des Darmtraktes erklären.

4.4. Schlussfolgerungen

Die gastrointestinale Ca-Absorption beim Säuger beinhaltet zwei Prozesse: 1. eine sättigbare, Vitamin D-abhängige transzelluläre und somit aktive Ca-Absorption. Diese findet vor allem im Duodenum und proximalen Jejunum statt und wird bei tiefem Ca-Gehalt im Futter aktiviert. 2. der nicht-sättigbare, parazelluläre und somit passive Ca-Transportweg im GIT ist weitgehend unabhängig vom Alter und Hormonstatus des Tieres (Bronner, 1987). Zudem nimmt die passive Ca-Absorption mit steigender Konzentration an freiem Ca im Chymus zu.

Bei all unseren Tieren konnten keine Ca-Stoffwechselstörungen festgestellt werden. Die Blutparameter waren alle im Referenzbereich. Die von uns gemessenen Ca-Fluxe im Duodenum und Colon waren alle negativ, das heisst, bei allen Tieren wurde eine Ca-Nettosekretion aufgezeigt. Auch die Analysen des Chymus aus dem gesamten GIT der Kühe zeigten, dass die Ca-Versorgung ausreichend war. Die Tiere wiesen eine Netto-Ca-Sekretion in den Darm auf. Das Verteilungsmuster der VDR in den verschiedenen Darmsegmenten bestätigte die Resultate, die aus der Literatur bereits bekannt sind.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich alle unsere Kühe in einer Phase der Laktation befanden, in der mit keinen grösseren Ca-Schwankungen gerechnet werden muss. Der Ca-Bedarf ist zu dieser Zeit minimal, da die Tiere noch kein zusätzliches Ca für den Föten oder die Milchbildung mobilisieren müssen. Das für den Bedarf notwendige Ca wird in dieser Phase hauptsächlich über den passiven, Vitamin D-unabhängigen Transportweg aufgenommen. Aus diesem Grund wurden beim VDR-Nachweis auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Rassen und den unterschiedlichen Altersklassen festgestellt.

5. LITERATURVERZEICHNIS

Allen W.M. und Sansom B.F. (1985)

Milk fever and calcium metabolism.
J. vet. Pharmacol. Therap. 8: 19-29

Beede D.K., Risco C. A., Donovan G. A., Wand C., Archbald L. G. und Sanchez W. K. (1992)

Nutritional management of the late pregnant dry cow with particular reference to dietary cation-anion difference and calcium supplementation.
Proc. 24th ann. Convention Am. Assoc. Bovine Practitioners, Orlando, FL. /the bovine proceedings 24: 51-55

Bethard G., Verbeck R. und Smith J.F. (1998)

Controlling milk fever and hypocalcemia in dairy cattle: use of dietary cation-anion difference (DCAD) in formulating dry cow rations.
Technical Support 31: 1-5

Bikle D.D., Gee E., Halloran B. und Haddad J.G. (1984)

Free 1,25-dihydroxyvitamin D levels in serum from normal subjects, pregnant subjects, and subjects with liver disease.
J. Clin. Invest. 74: 1966-1971

Bikle D.D., Siiteri P.K., Ryzen E., Haddad G. und Gee E. (1985)

Serum protein binding of 1,25-dihydroxyvitamin D: A reevaluation by direct measurement of free metabolite levels.
J. Clin. Endocr. Metab. 61: 969-975

Böck P. (1989)

Mikroskopische Technik.
In: Böck P. (Hrsg): *Romeis Mikroskopische Technik. 17. Auflage*, Urban & Schwarzenberg, München

Bouillon, R., Okamura, W.H. und Norman A.W. (1995)

Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system.
Endocr. Rev. 16: 200-257

Breves G. und Schröder B. (2005)

Vergleichende Aspekte der gastrointestinalen Calcium-Umsetzungen beim Schwein und Wiederkäuer.
Lohmann Information, April – Juni, 1-3

Bronner F. (1987)

Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications.
J. Nutr. 117(8): 1347-1352

Bronner F. (1990)

Intestinal calcium transport: the cellular pathway.
Miner. Electrolyte Metab. 16(2-3): 94-100

Brown E.M. (1991)

Extracellular Ca sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca and other ions as extracellular (first) messengers.

Physiol. Rev. 71(2): 371-411

Bushinsky D.A. (1996)

Metabolic alkalosis decreases bone calcium efflux by suppressing osteoclasts and stimulating osteoblasts.

Am. J. Physiol. 271(1 Pt 2): F216-222

Clapham D.E., Montell C., Schultz G. und Julius D. (2003)

International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels.

Pharmacol. Rev. 55(4): 591-596

Clemens T.L., Garrett K.P., Zhou X.Y., Pike J.W., Haussler M.R. und Dempster D.W. (1988)

Immunocytochemical localization of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in target cells.

Endocrinology 122(4): 1224-1230

Contreras P.A., Manston R. und Sansom B.F. (1982)

Calcium mobilisation in hypomagnesaemic cattle.

Res. Vet. Sci. 33(1): 10-16

Danuser J. und Gaillard C. (1990)

Krankheiten und Abgänge bei schweizerischen Milchkühen: 2. Abgänge und Beziehungen zwischen Krankheiten und Milchleistungsparametern.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 132 : 301-310

Danuser J., Luginbühl J. und Gaillard C. (1988)

Krankheiten und Abgangsursachen bei schweizerischen Milchkühen:

1. Häufigkeiten und „Wiederholbarkeiten“ von Krankheiten.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 130 : 149-163

De Luca H.F. (1981)

Metabolism and molecular mechanism of action of vitamin D: 1981

Biochem. Soc. Trans. 10 (3): 147-158

Dyrendahl I, Henricson B. und Jonsson G. (1972)

Clinical puerperal paresis and hypocalcaemia in cattle. A statistical and genetic investigation.

Zentralbl. Veterinarmed. A. 19(8): 621-638

Ferraris R.P., Villenas S.A. und Diamond J. (1992)

Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine.

Am. J. Physiol. 262(6 Pt 1): G1047-1059

Fromm M. und Gäbel G. (2000)

Niere: Calcium und Magnesium, Phosphat und Sulfat

In: von Engelhardt W. und Breves G. (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*, Enke, Stuttgart

Fürll M., Jäkel L., Bauerfeld J. und Groppel B. (1996)

Gebärpareseprophylaxe mit „Anionenrationen“.

Collegium veterinarium XXVI: 31-34

Gaynor P.J., Mueller F.J., Miller J.K., Ramsey N., Goff J.P. und Horst R.L. (1989)

Parturient hypocalcemia in jersey cows fed alfalfa haylage based diets with different cation to anion rations.

J. Dairy Sci. 72: 2525-2531

Ghijsen W.E., DeJong M.D. und Van Os C.H. (1983)

Kinetic properties of Na/Ca exchange in basolateral plasma membranes of rat small intestine.

Biochem. Biophys. Acta 730(1): 85-94

Goetsch A.L. und Owens F.N. (1985)

Effects of calcium source and level on site of digestion and calcium levels in the digestive tract of cattle fed high-concentrate diets.

J. Anim. Sci. 61(4): 995-1003

Goff J.P. (2000)

Pathophysiology of Calcium and Phosphorus Disorders.

Vet. Clin. North America: Food Animal Practice 16(2): 319-337

Goff J.P. und Horst R.L. (1994)

Calcium salts for treating hypocalcemia: carrier effects, acid-base balance, and oral versus rectal administration.

J. Dairy Sci. 77(5):1451-1456

Goff J.P. und Horst R.L. (1997)

Effects of the addition of potassium or sodium, but not calcium, to prepartum rations on milk fever in dairy cows.

J. Dairy Sci. 80(1):176-186

Goff J.P. und Horst R.L. (1998)

Use of hydrochloric acid as a source of anions for prevention of milk fever.

J. Dairy Sci. 81(11): 2874-2880

Goff J.P., Horst R.L. und Reinhardt T.A. (1987)

The pathophysiology and prevention of milk fever.

Vet. Med. 943-950

Goff J.P., Horst R.L. und Reinhardt T.A. (1988)

Duodenum and colon 1,25-dihydroxyvitamin D receptor concentration is increased during lactation in the rat.

Seventh Workshop on Vitamin D, Rancho Mirage, CA. In: Norman AW, Shaefer K, Grigoleit HG, Herrath DV (eds) Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology. de Gruyter & Co., Berlin + N.Y., 246-247

Goff J.P., Horst R.L., Mueller F.J., Miller J.K., Kiess G.A. und Dowlen H.H. (1991a)

Addition of chloride to a prepartal diet high in cations increases 1,25-dihydroxyvitamin D response to hypocalcemia preventing milk fever.

J. Dairy Sci. 74: 3863-3871

Goff J.P., Reinhardt T.A. und Horst R.L. (1991b)

Enzymes and factors controlling vitamin D metabolism and action in normal and milk fever cows.

J. Dairy Sci. 74(11): 4022-4032

Goff J.P., Reinhardt T.A. und Horst R.L. (1995a)

Milk fever and dietary cation-anion balance effects on concentration of vitamin D receptor in tissue of periparturient dairy cows.

J. Dairy Sci. 78(11): 2388-2394

Goff J.P., Reinhardt T.A., Beitz C. und Horst R.L. (1995b)

Breed affects tissue vitamin D receptor concentration in periparturient dairy cows: a milk fever risk factor?

J. Dairy Sci. 78 (Suppl 1): 184

Greene L.W., Fontenot J.P. und Webb K.E. Jr. (1983)

Site of magnesium and other macromineral absorption in steers fed high levels of potassium.

J. Anim. Sci. 57(2): 503-510.

Greene L.W., May B.J., Schelling G.T. und Byers F.M. (1988)

Site and extent of apparent magnesium and calcium absorption in steers fed monensin.

J. Anim. Sci. 66(11): 2987-2991

Gürtler H., Seidel H. und Liebaug E. (1977)

Prophylaxe der Gebärpause der Milchkuh durch Verabreichung hoher Dosen Vitamin D3.

Monatsheft Vet. Med. 32: 664-668

Hallgren W. (1965)

„Gebärpause“ Begriff, Name, Behandlung, Verhütung.

Wien tierärztl. Mschr. 52: 359-369

Haussler M.R. (1986)

Vitamin D Receptor: Nature and Function

Ann. Rev. Nutr. 6: 527-562

Haussler M.R., Jurutka P.W., Hsieh J.C., Thompson P.D., Selznick S.H., Haussler C.A. und Whitfield G.K. (1995)

New understanding of the molecular mechanism of receptor-mediated genomic actions of the vitamin D hormone.

Bone 17(2 Suppl): 33S-38S

Haussler M.R., Mangelsdorf D.J., Komm B.S., Terpening C.M., Yamaoka K., Allegretto A.E., Baker A.R., Shine J., McDonell D.P., Hughes M., Weigel N.L., O'Malley B.W. und Piker J.W. (1988)

Molecular biology of the vitamin D hormone.

Recent. Prog. Horm. Res. 44: 263-305

Herbst H. und Hübner J.H (2003)

Methoden und Untersuchungstechniken in der Pathologie: Immunhistologie (Abbildungen von Dr. C. Henne (DAKO, Hamburg) zur Verfügung gestellt)

In: Herbst H. und Hübner J.H. (2003) (Hrsg): *Pathologie-Online*

<http://www.pathologie-online.de/meth/immunhisto.php>

Hoenderop J.G.J., Nilius B. und Bindels R.J.M. (2005)

Calcium absorption across epithelia.
Physiol. Rev. 85: 373-422

Holick M.F. (1995)

Vitamin D: photobiology, metabolism and clinical applications.
In: Endocrinology (3. ed.). DeGroot L. et al, Eds. Philadelphia: Saunders:
990-1013

Hollis B.W., Draper H.H., Burton J.H. und Etches R.J. (1981)

A hormonal assessment of bovine parturient paresis: Evidence for a role of oestrogen.
J. Endo. 88: 161-171

Horst R.L. und Reinhardt T.A. (1983)

Vitamin D metabolism in ruminants and its relevance to the periparturient cow.
J. Dairy Sci. 66(4): 661-678

Horst R.L. und Reinhardt T.A. (1988)

Changes in intestinal 1,25 dihydroxyvitamin D receptor during aging, gestation and pregnancy in rats.
Seventh Workshop on Vitamin D, Rancho Mirage, CA. In: Norman AW, Shaefer K, Grigoleit HG, Herrath DV (eds) Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology. de Gruyter & Co., Berlin + N.Y.: 229-230

Horst R.L., Goff J.P. und Reinhardt T.A. (1989)

Age reduces, while pregnancy and lactation increase, intestinal 1,25-dihydroxyvitamin D receptor concentration in the rat and cow.
Proceedings: Seventh International Conference on Production Disease in Farm Animals. Cornell University, Ithaca, New York, USA: 224-227

Horst R.L., Goff J.P. und Reinhardt T.A. (1990)

Advancing age results in reduction of intestinal and bone 1,25-dihydroxyvitamin D receptor.
Endocrinology 126(2):1053-1057

Horst R.L., Goff J.P. und Reinhardt T.A. (1994)

Calcium and Vitamin D metabolism in the dairy cow.
J. Dairy Sci. 77(7): 1936-1951

Horst R.L., Goff J.P. und Reinhardt T.A. (1997a)

Calcium and Vitamin D Metabolism During Lactation.
J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia 2(3): 253-263

Horst R.L., Goff J.P. und Reinhardt T.A. (2003)

Role of vitamin D of Calcium homeostasis and its use in prevention of bovine periparturient paresis.
Acta Vet. Scand. Suppl. 97: 35-50

Horst R.L., Goff J.P., Reinhardt T.A. und Buxton D.R. (1997b)

Strategies for preventing milk fever in dairy cattle.
J. Dairy Sci. 80: 1269-1280

Houe H., Ostergaard S., Thilsing-Hansen T., Jorgensen R.J., Larsen T., Sorensen J.T., Agger J.F. und Blom J.Y. (2001)

Milk fever and subclinical hypocalcaemia--an evaluation of parameters on incidence risk, diagnosis, risk factors and biological effects as input for a decision support system for disease control.

Acta Vet. Scand. 42(1): 1-29

Johnson J.A., Beckman M.J., Pansini-Porta A., Christakos S., Bruns M.E., Beitz D.C., Horst R.L. und Reinhardt T.A. (1995)

Age and gender effects on 1,25-dihydroxyvitamin D₃-regulated gene expression.

Exp. Gerontol. 30(6): 631-643

Kallfelz F.A., Taylor A.N. und Wasserman T.H. (1967)

Vitamin D-induced calcium binding factor in rat intestinal mucosa.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125(1): 54-58

Kamphues J. (1996)

Das DCAB-Konzept in der Gebärpäresese prophylaxe.

Übersicht. Tierernähr. 24: 129-135

Karbach U. (1992)

Paracellular calcium transport across the small intestine.

J. Nutr. 122(3 Suppl): 672-677

Kaske M. (2000)

Motorik des Magen-Darm-Kanals.

In: von Engelhardt W. und Breves G. (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*, Enke, Stuttgart

Kaune R. (2000)

Knochenstoffwechsel.

In: von Engelhardt W. und Breves G. (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*, Enke, Stuttgart

Kaune R., Schröder B. und Harmayer J. (1990)

Binding properties of plasma vitamin D-binding protein and intestinal 1,25 dihydroxyvitamin D₃ in piglets with pseudo-vitamin D-deficiency rickets, type I: treatment effects with pharmacological doses of vitamin D₃.

Arch. Biochem. Biophys. 282 (2): 326-332

Khorasani G.R. und Armstrong D.G. (1992)

Calcium, phosphorus, and magnesium absorption and secretion in the bovine digestive tract as influenced by dietary concentration of these elements.

Livest. Prod. Sci. 31: 271-286

Khorasani G.R., Janzen R.A., McGill W.B. und Kennelly J.J. (1997)

Site and extent of mineral absorption in lactating cows fed whole-crop cereal grain silage or alfalfa silage.

J. Anim. Sci. 75: 239-248

Kichura T.S., Horst R.L., Beitz D.C. und Littledike E.T. (1982)

Relationship between prepartal dietary calcium and phosphorus, vitamin D metabolism and parturient paresis in dairy cows.

J. Nutr. 112: 480-487

Kohtes J. (1998)

Immunhistochemische Untersuchungen zum Vorkommen und zur Verteilung von Steroidhormonrezeptoren in den Fruchthüllen und in der Uteruswand des Rindes.

Hannover, Tierärztliche Hochschule, Dissertation

Kolb E. (1989)

Die Durchgangszeiten des Futters durch den Verdauungskanal.

In: Kolb E. (Hrsg.): *Lehrbuch der Physiologie der Haustiere (Band 1) bearbeitet von Gürtler H., Verlag Urban & Fischer, München*

Kraft W. (1999)

Skelettmuskulatur, Knochen, Kalzium-, Phosphor-, Magnesiumstoffwechsel.

In: Kraft W. und Dürr U. (Hrsg.): *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York*

Krüdewagen E.M. (1996)

Untersuchungen zum Oestrogenrezeptornachweis im Pferdeendometrium – Vergleich verschiedener Methoden.

Hannover, Tierärztliche Hochschule, Dissertation

Kusumanti E., Agger J.F. und Jensen K. (1993)

Association between incidence risk of milk fever and lactation number, breed and season.

Acta Vet. Scand. Suppl. 89: 141-142

Liesegang A., Riner K. und Boos A. (2006)

Effects of Gestation and Lactation on Vitamin D Receptor Amounts in Goats and Sheep.

Domestic Animal Endocrinology (in press)

MacDonald P.N., Dowd D.R., Nakajima S., Galligan M.A., Reeder M.C., Hausser C.A., Ozato K., und Hausser M.R. (1993)

Retinoid X receptors stimulate and 9cis retinoic acid inhibits 1,25 dihydroxyvitamin D₃ activated expression of the rat osteocalcin gen.

Mol. Cell. Biol. 13: 5907-5917

Marshman E., Booth C. und Potten C.S. (2002)

The intestinal epithelial stem cell.

Bioessays 24: 91-98

Martens H. (2000)

Funktionen der Vormägen: Resorptionsvorgänge.

In: von Engelhardt W. und Breves G. (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere, Enke, Stuttgart*

Naumann K. und Bassler R. (1997)

Die chemische Untersuchung von Futtermitteln.

Verlag Neumann-Neudamm. 4. Ergänzungslieferung 1997, bearbeitet von Dr. H. Buchholz, VDLUFA-Verlag, Darmstadt

Neibergs H.L., Bosworth B.T. und Reinhardt T.A. (1996)

Nucleotide sequences of the bovine vitamin D₃ receptor.

J. Dairy Sci. 79, 1313-1315

Nellans H.N. (1988)

Contributions of cellular and paracellular pathways to transepithelial intestinal calcium transport.

Prog. Clin. Biol. Res. 252: 269-276

Nellans H.N. (1990)

Intestinal calcium absorption. Interplay of paracellular and cellular pathways.

Miner. Electrolyte Metab. 16(2-3): 101-108

Nelson D. und Cox M. (2001)

Lipide.

In: Nelson D. und Cox M. (Hrsg.): *Lehninger Biochemie*, 381-410, Springer, Berlin

Nemere I. und Norman A.W. (1990)

Transcaltachia, vesicular calcium transport, and microtubule-associated calbindin D_{28k}: emerging view of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-mediated intestinal calcium absorption.

Miner. Electrolyte Metab. 16(2-3): 109-114

Nemere I., Yoshimoto Y. und Norman A.W. (1984)

Calcium transport in perfused duodena from normal chicks. Enhancement with 14 minutes of exposure to 1,25-Dihydroxyvitamin D₃.

Endocrinology 115 (4): 1476-1483

Norman A.W., Ishizuka S. und Okamura W.H. (2001)

Ligands for the vitamin D endocrine system: different shapes function as agonists and antagonists for genomic and rapid response receptors or as a ligand for the plasma vitamin D binding protein.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 76(1-5): 49-59

Oberleitner H. (1996)

Salz- und Wasserhaushalt.

In: Klinker R. und Silbernagl S. (Hrsg.): *Lehrbuch der Physiologie*, Thieme, Stuttgart

Oetzel G.R. (1988)

Parturient Paresis and Hypocalcemia in Ruminant Livestock.

Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract. 4(2): 351-364

Oetzel G.R., Olson J.D., Curtis C.R. und Fettman M.J. (1988)

Ammonium chloride and ammonium sulfate for prevention of parturient paresis in dairy cows.

J. Dairy Sci. 71(12): 3302-3309

Olson D.J. (1991)

Relationship of nutrition to abomasal displacement and parturient paresis.

The Bovine Prac. 26: 88-91

Parsons D.S. und Paterson C.R. (1965)

Fluid and solute transport across rat colonic mucosa.

Q. J. Exp. Physiol. 50: 220-231

Pinto D. und Clevers H. (2005)

Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium.
Exp. Cell. Res. 306(2): 357-363

Pyörälä E., Pyörälä S., Mero M. und Adlercreutz H. (1992)

Oestrogens and milk fever – is there a link?
Acta Vet. Scand. 33(4): 335-339

Rahnema S., Wu Z., Ohajuruka O.A., Weiss W.P. und Palmquist D.L. (1994)

Site of mineral absorption in lactating cows fed high-fat diets.
J. Anim. Sci. 72: 229-235

Reinhardt T.A., Horst R.L. und Goff J.P. (1988)

Calcium, phosphorus and magnesium homeostasis in ruminants.
Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract. 4: 331-350

Ricken G.E. (2005)

Transport von Calcium über das isolierte Pansenepithel des Rindes.
Hannover, Tierärztliche Hochschule, Dissertation

Riner K. (2006)

Immunhistochemische Untersuchungen zur Verteilung von Vitamin D-Rezeptoren im Darm von Schaf und Ziege.
Zürich, Vetsuisse-Fakultät Zürich, Dissertation

Rings M.B., Rings D.M. und Welker B. (1997)

Milk fever: seeking new solutions to an old problem.
The compendium 19: 175-180

Rossow N. (2002)

Calciumstoffwechsel im geburtsnahen Zeitraum - Prophylaxe und Therapie von Hypocalcämie und Gebärpause.
PORTAL-RIND: <http://www.portal-rind.de/portal/artikel/detail.php?artikel=3>

Rüsch P. und Rusch J. (1996)

Untersuchungen bei Kühen mit Milchfieber.
Schweizerische Tierärztschweizer, Biel GST: 1-3

Schröder B. (1996)

Vergleichende Physiologie der gastrointestinalen Calcium- und Phosphorabsorption bei Schweinen und kleinen Wiederkäuern.
Giessen, Univ., Habil.-Schr.

Schröder B., Goebel W., Huber K. und Breves G. (2001)

No effect of vitamin D3 treatment on active calcium absorption across ruminal epithelium of sheep.
J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med. 48(6): 353-363

Schröder B., Rittmann I., Pfeffer E. und Breves G. (1997)

In vitro studies on calcium absorption from the gastrointestinal tract in small ruminants.
J. Comp. Physiol.[B]. 167(1): 43-51

Schröder B., Vossing S. und Breves G. (1999)

In vitro studies on active calcium absorption from ovine rumen.
J. Comp. Physiol. [B]. 169(7): 487-494

Shappell N.W., Herbein J.H., Deftos L.J. und Aiello R.J. (1987)

Effects of dietary calcium and age on parathyroid hormone, calcitonin and serum and milk minerals in the periparturient dairy cow.

J. Nutr. 117(1): 201–207

Staufenbiel R. und Engelhard T. (1999)

Vier Strategien gegen Milchfieber.

Top Agrar 9: R16-R19

Staufenbiel R., Dallmeyer M. Horner S. und Gelfert C.-C. (2002)

Gebärparese des Rindes - Neue Aspekte zum klinischen Bild und zur Therapie.

In: *Vortragsband / Bundesverband Praktizierender Tierärzte. Frankfurt a. M.:*

BPT-Akad.: 61-66

Studer E. (1998)

A veterinary perspective of on-farm evaluation of nutrition and reproduction.

J. Dairy Sci. 81(3): 872-876

Trachsel H. (1999)

Biosynthese von 1,25(OH)₂D₃

<http://ntbiouser.unibe.ch/trachsel/teaching/Hormone/Kasten.html#SyntheseVit.D>

Trachsel H. (2002)

Oberflächenrezeptoren für Vitamin D.

<http://ntbiouser.unibe.ch/trachsel/teaching/vitamine/VitDRezeptoren.html>

Tran T.D. (1997)

Mit Elektrolyten-Balance gegen Milchfieber.

Rinderwelt 6: 26-28

Ussing H.H. und Zehran K. (1951)

Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.

Acta Physiol. Scand. 23: 110-127

Van Abel M., Hoenderob J.G.J., Van der Kemp A.W.C.M., Van Leeuwen J.P.T.M. und Bindels R.J.M. (2003)

Regulation of the epithelial Ca-channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection.

Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 285: G78-G85

Van Corven E.J.J.M., De Jong M.D. und Van Os C.H. (1987)

The adenosine triphosphat-dependet calcium pump in rat small intestine.

Effects of vitamin D deficiency and cell isolation methods.

Endocrinology 120(3): 868-873

Van Cromphaut S.J., Dewerchin M., Hoenderop J.G.J., Stockmans I., Van Herck E., Kato S., Bindels R.J.M., Collen D., Carmeliet P., Bouillon R. und Carmeliet G. (2001)

Duodenal calcium absorption in vitamin D-receptor-knockout mice: functional and molecular aspects.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(23): 13324-13329

Van de Braak A.E., Van 't Klooster A.T. und Malestein A. (1986)

Influence of prepartum calcium intake on calcium mobilization rate around parturition in dairy cows fed at a high prepartum feeding level.
Vet. Q. 8(1): 24-37

Van Mosel M., Van 't Klooster A.T. und Wouterse H.S. (1991)

Effects of a deficient magnesium supply during the dry period on bone turnover of dairy cows at parturition.
Vet. Q. 13(4):199-208

Van Os C.H. (1987)

Transcellular calcium transport in intestinal and renal epithelial cells.
Biochim. Biophys. Acta. 906(2):195-222

Wasserman R.H. (2004)

Vitamin D and the Dual Processes of Intestinal Calcium Absorption.
J. Nutr. 134(11): 3137-3139

Wasserman R.H. und Fullmer C.S. (1983)

Calcium transport proteins, calcium absorption, and vitamin D.
Annu. Rev. Physiol. 45: 375-390

Wasserman R.H. und Taylor A.N. (1966)

Vitamin D₃ induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa.
Sci. 152: 791-793

Wasserman R.H., Chandler J.S., Meyer S.A., Smith C.A., Brindak M.E., Fullmer C.S., Penniston J.T. und Kumar R. (1992a)

Intestinal calcium transport and calcium extrusion processes at the basolateral membrane.
J. Nutr. 122(3 Suppl): 662-671

Wasserman R.H., Smith C.A., Brindak M.E., De Talamoni N., Fullmer C.S., Penniston J.T. und Kumar R. (1992b)

Vitamin D and mineral deficiencies increase the plasma membrane calcium pump of chicken intestine.
Gastroenterology 102(3): 886-894

Weiss J. (1993)

Zur Kalzium- und Phosphorversorgung der Milchkühe – Neue Erkenntnisse erfordern neue Strategien.
Milchpraxis 31: 213-217

Zepperitz H. (1990)

Untersuchungen zur klinischen und klinisch-chemischen Diagnostik der Gebärpause.
Mh. Vet. Med. 45: 859-864

Zhou L.X., Nemere I. und Norman A.W. (1992)

A parathyroid-related peptide induces transcaltachia (the rapid, hormonal stimulation of intestinal ca²⁺ transport).
Biochem. Biophys. Res. Commun. 186 (1): 69-73

Zinn R.A., und Shen Y. (1996)

Interaction of dietary calcium and supplemental fat on digestive function and growth performance in feedlot steers.

J. Anim. Sci. 74: 2303-2309

6. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen und mich stets unterstützt haben, ganz herzlich danken. Ich bedanke mich besonders bei:

Herrn **Prof. Dr. M. Wanner** für das interessante Thema, die grosse Unterstützung und die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit

Herrn **Prof. Dr. A. Boos** für die Übernahme des Korreferates und die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit

Frau **Dr. A. Liesegang** für die Planung, für fachliche Hilfe und Unterstützung, die Mithilfe bei den Probeentnahmen und für die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit

Die Tierernährungs-Laborantinnen **B. Küffer** und **B. Schneider** für die Durchführung der Analysen und die netten Gespräche

Herrn **J. Duss** aus Neuägeri für die Bereitstellung und Lieferung der Schlachtkühe

Den Metzgern **B. Gerzner**, **P. Müller** und **V. Burger** für die schnelle und unkomplizierte Abwicklung der Schlachtung der Kühe

Den **Tierpflegern der Nutztierklinik** für die Betreuung meiner Schlachtkühe im Stall und auf dem letzten Gang ins Schlachtlokal

Den Herren **B. Bärtschi** und **R. Zraggen** für die nette und unkomplizierte Zusammenarbeit bei den Probeentnahmen in der Sektionshalle

Meinen Kolleginnen **C. Füglistaller**, **S. Nater** und **T. Staub** für die tatkräftige Mithilfe bei den Probeentnahmen

Frau **G. Kuhn** für Demonstration der Ussing-Kammer sowie die Mithilfe bei den Versuchen

Herrn **B. Grenacher** für die Bereitstellung der Substanzen und Mithilfe im C-Labor

Den Anatomie-Laborantinnen **J. Leclerc**, **V. Horvat** und **E. Bohrer** für die Mithilfe bei den immunhistochemischen Analysen sowie die gute Zusammenarbeit

Den Damen **K. Riner** und **I. Weingart** für die Unterstützung bei der Durchführung der immunhistochemischen Analysen und ihre sympathische Art

Meinen Mitdoktorandinnen **C. Füglistaller**, **M. Isenegger**, **L. Müller**, **S. Nater** **S. Schär** und **T. Staub** für die tolle Kameradschaft und die gute Stimmung im Büro

Frau **Dr. B. Wichert** und Frau **G. Eger** für die guten Tipps und die gute Zusammenarbeit im Büro

Und ganz besonders meinen **Eltern** für die tolle Unterstützung während des Studiums und während meiner Dissertation.

7. CURRICULUM VITAE

Name	Karin Singer
Geburtsdatum	13. Januar 1979
Geburtsort	Liestal
Nationalität	Schweizerin
Heimatort	Langenbruck

1987 – 1991	Primarschule Reigoldswil
1991 – 1995	Progymnasium Reigoldswil
1995 – 1998	Gymnasium Liestal
1998	Eidgenössischer Maturitätsabschluss Typus D

1999 – 2004	Studium der Veterinärmedizin an der Universität Bern, Schweiz
2004	Eidgenössisches Staatsexamen als Tierärztin an der Universität Bern, Schweiz

2005 – 2006	Assistentin am Institut für Tierernährung der Vetsuisse Fakultät Universität Zürich
-------------	---

Juni 2006