

Aus dem Institut für  
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Geschäftsführender Vorstand:  
Univ.- Prof. Dr. H. J. Gabius

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. W. A. Rambeck

**Der Wachteleischaltest zur Bestimmung der biologischen  
Aktivität von Vitamin D- Metaboliten in Extrakten von *Trisetum  
flavescens* und *Solanum glaucophyllum***

Inaugural- Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig- Maximilians- Universität München

von  
Konstanze Sophie Heimstädt  
aus Bad Aibling

München 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig- Maximilians- Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Rambeck

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. André

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

## **Meinen Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2. Literatur</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Vitamin D</b>	<b>3</b>
2.1.1 Die Historie des Vitamin D	3
2.1.2 Struktur und Bildung	5
2.1.3 Metabolisierung	6
2.1.4 Bedarf in der Tierwelt und dessen Deckung	7
2.1.5 Besonderheiten der Vitamin D- Versorgung beim Vogel	9
<b>2.2 Wirkung des Vitamin D</b>	<b>12</b>
2.2.1 Wirkung auf zellulärer Ebene	12
2.2.2 Physiologische Zellantwort	13
2.2.3 Wirkung auf den Knochenstoffwechsel	14
<b>2.3 Weitere Wirkungsbereiche von Vitamin D<sub>3</sub></b>	<b>17</b>
2.3.1 Immunsystem	17
2.3.2 Tumorzellen	18
2.3.3 Haut und ihre Anhangsorgane	19
2.3.4 Zentrales Nervensystem (ZNS)	20
2.3.5 Herz- Kreislauf-System	20
2.3.6 Nebenschilddrüse	21
2.3.7 Autoimmuner Diabetes Typ I	21
2.3.8 Vitamin D- Mangel und dessen Auswirkungen	22
<b>2.4 Kalzinogene Pflanzen</b>	<b>23</b>
<b>2.4.1 Geographisches Vorkommen</b>	<b>23</b>
2.4.1.1 Südamerika	23
2.4.1.2 Nordamerika	24
2.4.1.3 Indien	24
2.4.1.4 Afrika	24
2.4.1.5 Ozeanien	24
2.4.1.6 Karibik	25
2.4.1.7 Mitteleuropa	25
<b>2.4.2 Vertreter der kalzinogenen Pflanzen</b>	<b>26</b>
2.4.2.1 Solanum glaucophyllum	27
2.4.2.2 Trisetum flavescens	30
<b>2.5 Kalzinose</b>	<b>33</b>

2.5.1	Mechanismus	33
2.5.2	Klinik	34
2.5.3	Pathologisch- anatomische Befunde	35
2.5.4	Histologie	35
2.5.5	Prophylaxe und Behandlung	36
2.6	Therapeutische Ansätze in der Tiermedizin	37
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>41</b>
3.1	Versuchstiere	41
3.2	Versuchstierhaltung, Pflege der Tiere	41
3.3	Versuchsaufbau	42
3.4	Versuchsgruppen	43
3.5	Fütterung, eingesetzte Präparate und deren Dosierungen	43
3.6	Untersuchte Parameter	46
3.6.1	Mortalitätsrate	46
3.6.2	Futtermverzehr	47
3.6.3	Tiergewicht	47
3.6.4	Legeleistung	47
3.6.5	Eischalentrockengewicht	48
3.6.6	Knochenaschegehalt	48
3.6.7	Kalziumgehalt der Knochenasche	49
3.6.8	Kalziumgehalt im Serum	50
3.6.9	Aschegehalt der Leber	50
3.6.10	Kalziumgehalt der Leber	50
3.6.11	ALP - Aktivität im Serum	51
3.7	Weender- Analyse	52
3.7.1	Trockensubstanz- Bestimmung	52
3.7.2	Rohfaser- Bestimmung	52
3.7.3	Rohasche- Bestimmung	53
3.7.4	Rohprotein- Bestimmung	54
3.7.5	Rohfett- Bestimmung	54
3.8	Statistische Auswertung	55
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
4.1	Versuch 1	57
4.1.1	Mortalität	57
4.1.2	Futtermverzehr	57
4.1.3	Tiergewichte	59
4.1.4	Legeleistung	61
4.1.5	Eischalentrockengewicht	64
4.1.6	Knochenaschegehalt	68

4.1.7 Kalzium in der Knochenasche	70
4.1.8 Kalziumgehalt im Serum	72
4.1.9 Aschegehalt der Leber	74
4.1.10 Kalziumgehalt der Leber	75
4.1.11 ALP im Serum	77
4.2 Versuch 2	79
4.2.1 Mortalität	79
4.2.2 Futterverzehr	79
4.2.3 Legeleistung	82
4.2.4 Eischalentrockengewicht	86
4.2.5 Knochenaschegehalt	90
4.2.6 Kalzium in der Knochenasche	92
4.2.7 Kalzium im Serum	94
4.2.8 ALP im Serum	96
4.3 Weender- Analyse	98
4.4 Schätzung der biologischen Aktivität der verwendeten Extrakte	99
<b>5. Diskussion</b>	<b>102</b>
5.1 Kritik der Methoden	102
5.1.1 Haltung und Unterbringung der Tiere	102
5.1.2 Der Wachteleischalentest	102
5.1.3 Versuchsdurchführung	104
5.2 Versuchspräparate	105
5.3 Vergleichende Betrachtung der einzelnen Parameter	105
5.3.1 Mortalität	106
5.3.2 Tiergewichte	106
5.3.3 Futterverzehr	107
5.3.4 Legeleistung	108
5.3.5 Eischalentrockengewicht	112
5.3.6 Knochenasche und Kalzium in der Knochenasche	116
5.3.7 Kalzium in der Leberasche	117
5.3.8 Kalzium im Serum	117
5.3.9 ALP im Serum	118
5.4 Schätzung der biologischen Aktivität der verwendeten Extrakte	120
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>122</b>
<b>7. Summary</b>	<b>124</b>
Literaturverzeichnis	126
Tabellenverzeichnis	155

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>156</b>
<b>Danksagung</b>	<b>157</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

$\alpha$	Alpha
ALP	Alkalische Phosphatase
ANOVA	Analysis of Variance, Varianzanalyse
Art. Nr.	Artikelnummer
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$	Beta
Best. Nr.	Bestellnummer
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Kohlenstoff
ca.	ungefähr, circa
Ca	Kalzium
CaBP	Kalziumbindendes Protein
Calcitriol	1,25- Dihydroxycholecalciferol
Cat. No.	Katalognummer
Ch.-B.	Chargennummer
D	Deutschland
dest.	Destilliert
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinsäure
et al.	und Mitarbeiter
Fa.	Firma
g	Gramm
ges.	gesamt
h	Stunde
HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure



H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IE	Internationale Einheiten
IL	Interleukin
Inc.	Incorporated
K	Kalium
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
l	Liter
Lot. Nr.	Chargennummer
μ	Mikro
ME	Metabolisierbare Energie
μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
Mio.	Millionen
MJ	Megajoule
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
Na	Natrium
NADPH	Reduziertes Nicotinamid- Adenin- Dinucleotid- Phosphat
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
Nr.	Nummer
ODF	Osteoklastendifferenzierender Faktor
OH	Hydroxy
(OH) <sub>2</sub>	Dihydroxy

(OH) <sub>3</sub>	Trihydroxy
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P	Phosphor
p.a.	pro analysi
PGE	Prostaglandin E
%	Prozent
PTH	Parathormon
Ra	Rohasche
Rfa	Rohfaser
Rfe	Rohfett
Rp	Rohprotein
RNA	Ribonucleinsäure
±s	Standardabweichung
S.	Solanum
sec	Sekunde
Std.	Stunde
TCA	Trichloressigsäure
TS	Trockensubstanz
U/l	Einheiten pro Liter
U/min.	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VDR	Vitamin D- Rezeptor
vgl.	vergleiche
$\bar{x}$	Mittelwert
z.B.	zum Beispiel
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1 $\alpha$ ,25- Dihydroxycholecalciferol
25(OH)D <sub>3</sub>	25-Hydroxycholecalciferol

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Vitamin D stellt einen wichtigen Baustein des lebenden Organismus dar. Es ist als Steroidhormon im Zusammenspiel mit anderen Regulatoren an der Homöostase der Mineralstoffe Kalzium und Phosphor beteiligt und somit an der Funktion von Muskeln und Nerven sowie des Knochenaufbaus. Es kommen zwei verschiedenen Formen des Vitamin D vor, Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol) und Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol), wobei bei Vögeln nur das letztere eine ausreichende biologische Aktivität aufweist.

Kalzium wiederum spielt besonders in der Phase der Milchproduktion bei Säugetieren eine maßgebliche Rolle, ebenso bedeutend ist es für die Ei- und Schalenbildung beim Geflügel. Daher finden sich klinisch auftretende Vitamin D-Mangelkrankungen beim Milchproduzenten Rind in Form der Gebärpause und beim Geflügel, gekennzeichnet durch vermehrtes Auftreten von Brucheiern bei älteren Legehennen.

Es existieren bestimmte Pflanzen, denen eine biologische Aktivität von Vitamin D zugesprochen wird. Sie finden sich zum einen in südamerikanischen Ländern, wie *Solanum glaucophyllum*, aber auch im europäischen Raum, wie der Goldhafer (*Trisetum flavescens*). Kennzeichnend für so genannte kalzinogene Pflanzen ist der biologisch aktive Inhaltsstoff. Es handelt sich dabei um 1,25-Dihydroxycholecalciferol, der bereits aktivierten Form des Vitamin D<sub>3</sub>.

Bei Weidetieren, die auf mit kalzinogenen Pflanzen bewachsenen Weiden grasten, fanden sich die klinischen Symptome der Kalzinose, bei der es u.a. durch einen Eingriff in die Kalziumhomöostase zu Verkalkungen der Weichgewebe kommt. Aufgrund dieser Eigenschaften zog man in Betracht, derartige Pflanzen als Therapie und Prophylaxe bei Vitamin D- Mangelzuständen einzusetzen.

Der Wachteleischalentest stellt seit längerer Zeit eine Methode dar, um die biologische Wirksamkeit von Vitamin D und seinen Metaboliten genauer zu untersuchen. Er erlaubt das Herausstellen einer Korrelation zwischen dem Vitamin D<sub>3</sub>- Gehalt im Futter und der damit ansteigenden Kalziumausscheidung über die Eischale.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, mittels des Wachteleischalentests eine Aussage über die biologische Aktivität von *Solanum glaucophyllum* und *Trisetum*

flavescens zu treffen. Es wurden hierzu zwei Versuchsdurchläufe mit Vitamin D<sub>3</sub>, 1,25-Dihydroxycholecalciferol und verschiedenen Dosierungen von Solanum glaucophyllum und Trisetum flavescens durchgeführt.

## 2 Literatur

### 2.1 Vitamin D

#### 2.1.1 Die Historie des Vitamin D

Bereits vor Jahrtausenden beschäftigte die Gelehrten der Zusammenhang zwischen der Knochenstärke und dem Sonnenlicht. In seinem Werk "Thalia" beschreibt Herodot, der 484-425 v. Chr. lebte, seine Beobachtung, dass die Schädeldecken der ägyptischen Krieger härter seien als die der persischen Krieger. Er verband diese Erkenntnis damit, dass die Erstgenannten im Gegensatz zu den Persern keine Kopfbedeckungen trugen und ihre kahlgeschorenen Köpfe unmittelbar dem Sonnenlicht ausgesetzt waren (APPELBOOM und BODY, 1993).

Anfang des 20. Jahrhunderts stand die Krankheit Rachitis und deren bis dato noch nicht mögliche Heilung im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses.

Schon 1895 hatte SNOW in Frage gestellt, ob nicht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Erkrankung und der verminderten Sonneneinstrahlung in Städten bestünde. Unabhängig voneinander konnten einige Jahre später zwei Arbeitsgruppen zeigen, dass durch den Einfluss von Sonnenlicht oder künstlichem ultraviolettem Licht eine Heilung bei an Rachitis erkrankten Kindern erreicht werden konnte (HULDSHINSKY, 1919; CHICK et al. 1923).

Die Wissenschaftler nahmen damals an, dass die Krankheitsbilder der Xerophthalmie und der Rachitis mit einem fettlöslichen Stoff, dem Vitamin A aus Lebertran, geheilt werden könnte (OSBORNE und MENDEL, 1913).

In einem Tierversuch konnte MELLANBY (1919) durch eine gezielte Diät, nämlich dem damals in Schottland üblichen Haferbrei, bei Hunden eine Rachitis auslösen. Nach Verfütterung von Lebertran verschwand die Rachitis. Daraus zog auch er den Schluss, dass das im Lebertran enthaltene Vitamin A eine positive Auswirkung auf den Knochenstoffwechsel hätte.

Um diese Annahmen über Vitamin A zu verifizieren, inaktivierte McCOLLUM et al. (1922) das Vitamin durch Erhitzung von Lebertranlösung im Wassersprudelbad.

Im Anschluss konnte keine heilende Wirkung gegenüber der Xerophthalmie ausgemacht werden, die antirachitische Wirkung jedoch blieb erhalten. Man nahm an, dass neben dem Vitamin A ein zweiter Stoff enthalten sein müsse und benannte ihn mit Vitamin D.

Nachdem er aus Reiskleie einen Stoff isolieren konnte, der in der Lage war, die heute als Beriberi bezeichnete Vitamin-B1-Mangelkrankheit zu heilen, stellte FUNK (1912) nach Analyse dessen fest, dass es sich dabei um eine stickstoffhaltige Verbindung, ein Amin handelte. Seiner Schlussfolgerung nach musste jeder lebensnotwendige Stoff eine  $\text{NH}_2$ -Gruppe enthalten. Daraus entstand als Bezeichnung für derartige Stoffe das Wort "Vitamin" (lat. vita  $\approx$  Leben; lat. amin  $\approx$  stickstoffhaltig). Bis zu diesem Zeitpunkt waren derartige Bestandteile der Nahrung noch als "accessory food factors" bezeichnet worden, da sie den synthetischen Diäten fehlten.

Einen großen Stellenwert in der Erforschung des Vitamin D hatten die Versuche von STEENBOCK und BLACK (1924). Sie konnten zeigen, dass Rachitis bei Tieren nicht nur durch die Bestrahlung der Haut verhindert werden konnte, sondern auch durch die Bestrahlung der aufgenommenen Nahrung. Daran knüpften auch andere Arbeitsgruppen an und bewiesen eine Heilung bei erkrankten Ratten durch die Verfütterung bestrahlter Rattenlebern (GOLDBLATT und SOAMES, 1923). Damit wurde die biochemische Ära in der Ergründung des Vitamin D eingeläutet.

Wenig später konnte neben der Struktur von Vitamin  $\text{D}_2$  aus pflanzlichen Lebensmitteln (ASKEW et al., 1931) auch das Vitamin  $\text{D}_3$  aus Fischlebertran isoliert werden (WINDAUS et al. 1936).

Nachdem die Herstellung einer radioaktiven Markierung von Vitamin D gelungen war (NORMAN und DELUCA, 1963) kamen dieselben Wissenschaftler wenig später (1966) zu der Erkenntnis, dass Vitamin D im Körper zuerst umgesetzt werden musste, damit das eigentliche biologisch aktive Substrat entsteht. In kurzer Zeit wurden das durch Hydroxylierung entstandene  $25(\text{OH})\text{D}_3$  (PONCHON et al. 1969) und der biologisch aktive Metabolit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (HOLICK et al. 1971) entdeckt.

Mit dem weiteren Nachweis von Vitamin D in Nieren und im Darm sowie der Wirkung auf den Knochenstoffwechsel konzentrierten sich nachfolgende Untersuchungen auf die oben genannten Zielorgane. Im Laufe der Zeit stellte sich

heraus, dass auch noch andere Organsysteme unter dem Einfluss von Vitamin D stehen. So wird nicht nur die Kalzium- Phosphor- Homöostase durch Vitamin D beeinflusst, sondern auch der Knochenumbau, die Muskelgesundheit und ebenso die Immunmodulation zum Schutz vor autoimmunen Krankheiten und der Schutz von Zellen vor Entartung (Krebs).

Auch heute noch ist Vitamin D als Vitamin klassifiziert, obwohl zahlreiche Untersuchungen in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts ergeben haben, dass es sich dabei eher um ein Prohormon handelt als um ein Vitamin.

### 2.1.2 Struktur und Bildung

Vitamin D zählt zusammen mit den Vitaminen E, K und A zu den fettlöslichen Vitaminen, weist aber auch eine strukturelle Verwandtschaft zu den Steroidhormonen auf. Zu den Gemeinsamkeiten zählt ebenso, dass die aktive Form des Vitamin D (1,25(OH)<sub>2</sub>-Cholecalciferol) endogen aus Cholesterol gebildet wird.

Der erste Syntheseschritt des Vitamin D findet in der Haut statt, in der durch eine Hydroxylierung des Cholesterols 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) entsteht. Durch die Absorption der freiwerdenden Energie beim Auftreffen von UV-Strahlen auf der Haut wird der B- Ring des 7- DHC aufgebrochen. Dabei entsteht Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>). Schon früher war auf den Zusammenhang zwischen der Behandlung von Rachitis und der Einwirkung des Sonnenlichts geschlossen worden (LUCAS, 1933). Nach weiteren Versuchen, die die Entstehung von Cholecalciferol in Abhängigkeit von UV-Strahlen zeigten (WINDAUS et al. 1938), konnte 7-DHC in der Haut von verschiedenen Lebewesen (Schwein FESTENSTEIN und MORTON, 1955; Maus und Meerschwein KANDUTSCH et al. 1956; Mensch REINERTSON und WHEATLEY, 1959; Ratte GAYLOR und SAULT, 1964) nachgewiesen und als essentiell für die weitere Bildung von Vitamin D<sub>3</sub> bezeichnet werden. Man weiß heute auch, dass sich der Vorgang des Ringaufbruchs im Str. spinosum und Str. germinativum der Haut abspielt (STAMP, 1975). Weiter konnte gezeigt werden, dass Wellenlängen zwischen 290 nm und 315 nm (HAVINGA et al. 1960) sowie der Energiegehalt des Lichtes (KOBAYASCHI und YASUMURA, 1973) einen positiven Einfluss auf die Vitamin D-Synthese ausüben, hingegen sich ein hoher Ozongehalt der Luft, Wolken vor

der Sonne, starke Pigmentierung der Haut (CLEMENS et al. 1982) und Sonnencreme (MATSUOKA et al. 1987) negativ auswirken.

Das mit der Nahrung aufgenommene bzw. in der Haut synthetisierte Vitamin D<sub>3</sub> muss, damit es in den Stoffwechsel eingreifen kann, nun in verschiedenen Organen umgewandelt werden (RAMBECK, 1997).

Untersuchungen konnten zeigen, dass die Entstehung von Vitamin D in Pflanzen dem Reaktionsweg bei Säugetieren gleicht. Bereits eine dreiminütige UV-Exposition der Pflanze reichte aus, um eine Vitamin D- Aktivität von messbarer Größe zu erzeugen (ZUCKER et al., 1980). Auf diesem Weg entsteht aus dem Ergosterin das Ergocalciferol, welches als Vitamin D<sub>2</sub> bezeichnet wird. Es unterscheidet sich von Vitamin D<sub>3</sub> durch eine zusätzliche Methylgruppe am Kohlenstoff C-24 sowie eine Doppelbindung zwischen C-22 und C-23. Ergosterol kommt in höheren Pflanzen vor, sowie in Hefen und Pilzen. Vitamin D<sub>2</sub> unterliegt im Organismus denselben Umwandlungsprozessen wie Vitamin D<sub>3</sub> (JONES et al. 1976) und bindet an die gleichen Rezeptoren.

### 2.1.3 Metabolisierung

Sowohl das in der Haut gebildete Cholecalciferol als auch das mit der Nahrung aufgenommene Vitamin D<sub>3</sub> werden nun wieder, an DBP gebunden, zur Leber zurück transportiert. Hier erfolgt der erste Schritt zur biologischen Aktivierung von Vitamin D (PONCHON et al. 1969). Durch die Calciferol-25-Hydroxylase entsteht unter Beteiligung von Magnesium, NADPH, molekularem Sauerstoff und einem cytoplasmatischen Faktor (YOON und DELUCA, 1980) 25-Hydroxycholecalciferol (JONES et al. 1998). Dieses Zwischenprodukt hat nach heutiger Ansicht keine physiologische Funktion und bildet nur eine Zwischenstufe bei der Bildung von biologisch aktivem Vitamin D (DELUCA et al. 1990). Nach erneuter Bindung an DBP erfolgt der Transport in die Niere.

Hier kommt es zu einer weiteren Umsetzung des 25-Hydroxycholecalciferol durch das Enzym 25(OH)D-1 $\alpha$ -Hydroxylase. Dabei entsteht die physiologisch wirksame Form des Vitamin D, das 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Dieser Vorgang läuft vor allem in den proximalen Tubuluszellen der Nierenrinde statt (BRUNETTE et al. 1978). Die Aktivität der 1 $\alpha$ -Hydroxylase unterliegt, im Gegensatz zur 25-Hydroxylase, einem straffen Regulationsmechanismus. Eine erhöhte



Parathormonkonzentration, ausgelöst durch eine Hypocalciämie (KREMER und GOLTZMANN, 1982), und eine Hypophosphatämie (BAXTER und DELUCA, 1976; DELUCA und GHAZARIAN, 1980) bedingen eine erhöhte Aktivität der  $1\alpha$ -Hydroxylase. Auch Hormone nehmen stimulierenden Einfluss auf die Enzymaktivität, wie die Vertreter der gonadotropen Hormone Östrogen, Progesteron und Testosteron sowie Insulin und Prolaktin. Die Überproduktion von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wird durch eine Produkthemmung verhindert, dabei wird ein anderes Enzym, die 24-Hydroxylase aktiviert, die nun zu einer Entstehung von  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  führt. Die physiologische Bedeutung dieser Verbindung konnte noch nicht genau geklärt werden, wohl wurde aber eine synergistische Wirkung im Falle einer Kombination mit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  beobachtet (RAMBECK und ZUCKER, 1985a).

Seit Mitte der 80er Jahre ist bekannt, dass nicht nur die Niere über die Fähigkeit verfügt, mittels  $1\alpha$ -Hydroxylase  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zu bilden. Sie konnte auch in Keratinozyten (BIKLE et al. 1986), im Prostatagewebe (SCHWARTZ et al. 1998) sowie in aktivierten Makrophagen, vor allem denen des Knochenmarks (REICHEL und NORMAN, 1989) nachgewiesen werden.

Bei den Untersuchungen, die das Ziel hatten, den genauen Ablauf der Metabolisierungsprozesse festzustellen, konnten über 30 Verbindungen gefunden werden (HENRY and NORMAN, 1984), deren genaue Rolle als Metaboliten allerdings noch nicht geklärt werden konnte.

#### **2.1.4 Bedarf in der Tierwelt und dessen Deckung**

Hauptquellen zur Bedarfsdeckung sind bei Mensch und Tier gleichermaßen die Aufnahme des Vitamins über die Nahrung und die UV-Strahlen abhängige Bildung im Organismus.

Wildtiere oder deren domestizierten Artgenossen, die ausreichende Zeit im Freien verbringen, können ihren Vitamin D Bedarf durch die Synthese in der Haut und auch über die Nahrung decken. Bei Nutztieren in Intensiv- oder Stallhaltung ist dies nicht ausreichend, um eine hohe Leistung gepaart mit guter Tiergesundheit zu erreichen. Es müssen Vitamin D-Quellen zugefüttert werden. Dazu wurden in Untersuchungen Richtwerte zur Bedarfsdeckung für die einzelnen Tierarten erarbeitet (KAMPHUES et al., 1999). Zusätzlich muss bei Tieren im Wachstum,

während der Gravidität und in der Laktation ein erhöhter Bedarf an Vitamin D berücksichtigt werden (s. Tab. 2.1).

Die Bildungskapazitäten sind bei Mensch und Tier unterschiedlich. So ist die Bildung von Vitamin D<sub>3</sub> beim Menschen eng gekoppelt an die Intensität sowie an die Dauer der Einstrahlung. Wie schon erwähnt, hat eine starke Pigmentierung der Haut negativen Einfluss auf die Umsetzung von 7-DHC (CLEMENS et al., 1982). Auch mit zunehmendem Alter des Menschen wird die Syntheseleistung der Haut für Vitamin D<sub>3</sub> vermindert (MacLAUGHLIN und HOLICK, 1985).

Bei Tieren fanden sich hingegen andere Gründe für eine verminderte Vitamin D<sub>3</sub>-Synthese. In Versuchen mit verschiedenen Tierspezies konnte eine direkte Korrelation der Felldichte mit einer reduzierten Syntheseleistung beobachtet werden. So wurde festgestellt, dass bei einer Ratte unter normalen Verhältnissen nur an Bauch und Beinen, wo weniger Fellwuchs vorliegt, Vitamin D synthetisiert wurde (HOLICK et al., 1975). Dieses Phänomen wurde auch bei Hühnern beobachtet, die folglich nur an Stellen in der Haut Synthese betrieben, die nicht mit Federn bedeckt waren, wie die Beine (KOCH und KOCH, 1941). Das Hausschwein weist aufgrund seines spärlichen Haarbewuchses eine hohe Vitamin D-Syntheseleistung der Haut auf. Eine große Ausnahme machen hier Hund und Katze. Ihnen fehlt vollständig die Fähigkeit, körpereigenes Vitamin D zu bilden (HOW et al., 1994) und sind somit auf die adäquate Zufuhr des Vitamins über die Nahrung angewiesen. Man nimmt an, dass dies durch eine Überaktivität eines Enzyms, der 7-DHC-Reduktase bedingt ist (MORRIS, 1997). Es scheint, dass die Fleischfresser durch die Aufnahme von Kalzium- und Vitamin D-reicher Nahrung, nämlich in Form von Knochen und Fleisch, einige physiologische Mechanismen der Kalzium-Homöostase verloren haben (EDWARDS 2000).

Zur Deckung des Bedarfs an Vitamin D<sub>3</sub> über die Nahrung eignen sich Fischöle, vor allem Fischleberöle, da sie einen besonders hohen Gehalt haben. Durch genaue Untersuchungen konnte z.B. in 1g Thunfischleberöl ein Vitamin D<sub>3</sub>-Gehalt von 16200 IE nachgewiesen werden (TAKEUSHI et al., 1984). Ansonsten ist der Gehalt von unbehandelten Nahrungsmitteln an Vitamin D<sub>3</sub> eher gering.

Den Tieren kann über pflanzliche Nahrung Vitamin D<sub>2</sub> zugeführt werden, Ausnahme bilden hier die Vögel (s. 2.1.5). Vitamin D<sub>2</sub> kann auch aus ergosterolreichen Hefen mit Hilfe von UV- Bestrahlung gewonnen werden

(FRASER, 1995). Vitamin D<sub>3</sub> ist mit Ausnahme der kalzinogenen Pflanzen rein tierischen Ursprungs.

**Tabelle 2.1:** Empfehlung zur optimalen Versorgung mit Vitamin D (modifiziert nach KAMPHUES et al., 2004)

Tierspezies	Täglicher Bedarf an Vitamin D In IE/kg KM/Tag (IE≈0,025µg Vit D <sub>2</sub> bzw. Vit D <sub>3</sub> )
Pferd	10 - 20
Rind	5 - 10
Schaf	5
Schwein	5 - 20
Hund	10 - 20
Katze	15 - 35
Huhn (Küken, Legehennen, Zuchthenne)	450*

\* Einheit IE/Kg Futter; ohne Auslauf, mit Auslauf geringerer Bedarf

### 2.1.5 Besonderheiten der Vitamin D-Versorgung beim Vogel

Wie die Milchproduktion bei Säugetieren, so ist die Bildung von Ei und Schale beim Geflügel derjenige biologische Prozess, der das meiste Kalzium benötigt. Der Bedarf pro Ei beträgt bei einer Legehennen circa 2,3 g, bei einer Wachtel circa 350 mg Kalzium. Die Ausscheidung von Kalzium über das Ei ist bei der Wachtel in Relation zu ihrem Körpergewicht doppelt so hoch wie bei einer Legehennen (ZUCKER et al., 1967). Da das Kalzium für das Ei sehr schnell zur Verfügung stehen und der Blutspiegel trotzdem konstant gehalten werden muss, liegt bei den Vögeln eine besondere anatomische Bauweise des Knochens vor. Der so genannte medulläre Knochen wird 10 bis 14 Tage vor Legebeginn bei weiblichen Tieren (SIMKISS, 1961) in den Markräumen von Rippen und Röhrenknochen eingelagert. Ausgelöst wird dieser Prozess durch die Geschlechtshormone. Medullärer Knochen ähnelt in der röntgenologischen Untersuchung normalem Ersatzknochen, ohne allerdings dessen mechanisch stützende Funktion zu erfüllen. Um nun diese Knochenformation trotz verändertem Mineralisationsgrad in der Legephase zu erhalten, weisen Osteoklasten und Osteoblasten eine

synchronisierte Aktivität auf (van der VELDE et al., 1985). Genauere Untersuchungen über die Herkunft des Kalziums im Ei ergaben, dass 40 % des Kalziums über den medullären Knochen bereitgestellt werden, 60 % jedoch direkt aus der Nahrung stammen (JOWSEY et al. , 1956).

Um nun eine verbesserte Resorption des Kalziums über den Darm zu erreichen, verfügt der Vogel, wie auch andere Lebewesen, über eine gesteigerte duodenale Expression und Aktivität des Calbindins. Zusätzlich findet sie sich aber auch im Uterus, wo sie eine Woche vor dem Legen des ersten Eis deutlich ansteigt (MUSSER et al., 1977). Dadurch verfügt dieser als "egg shell gland" bezeichnete Abschnitt des weiblichen Geschlechtstraktes, wie auch der Darm, über die Fähigkeit, große Mengen an Kalzium innerhalb kürzester Zeit zu transportieren (HURWITZ, 1978).

Zusätzlich zu den  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ - Rezeptoren an den bei anderen Lebewesen bekannten Stellen (Haut, Parathyreoidea, Darm, Hypophyse, u.a.) verfügen Vögel über diese Rezeptoren auch im Uterus und der Chorioallantoismembran (PIKE, 1985).

Zur genaueren Beurteilung des Hormoneinflusses wurden männliche und weibliche Tiere vergleichend betrachtet. Dabei zeigte sich deutlich die stimulierende Wirkung von Östrogen auf die  $1\alpha$ -Hydroxylase. Ebenso zeigte sich bei legenden Vögeln eine deutlich erhöhte Konzentration der  $1\alpha$ -Hydroxylase (TANAKA et al., 1978). Die unterstützende Wirkung der Geschlechtshormone ist unbedingt notwendig, um einerseits dem hohen Kalziumbedarf durch eine über das endokrine Vitamin D- System forcierte Resorption über die Nieren entsprechen zu können, andererseits um Vitamin D in seine aktiven Metaboliten überführen zu können (DELUCA, 1978).

Aufgrund des hohen Bedarfs werden beim Vogel scheinbar alle Mechanismen optimal ausgenutzt. Auch hier werden synergistische Effekte der Vitamin  $\text{D}_3$ - Metabolite angenommen (NORMAN et al., 1983). RAMBECK und ZUCKER (1985a) konnten zeigen, dass  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Wirkung von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf das duodenale Calbindin verstärken konnte und damit eine höhere Kalziumausscheidung über die Eischale stattfand. Bei genauer Untersuchung möglicher synergistischer Effekte bezüglich der Schlupfrate konnte beobachtet werden, dass bei normaler Befruchtungsrate unter reiner Fütterung des  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Schlupfrate gering war, nach Zusatz von  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  jedoch

anstieg (NORMAN et al., 1983). Des Weiteren zeigte sich, dass Vitamin D<sub>3</sub> in Form von 25(OH)D<sub>3</sub> über ein Transportprotein ins Ei gelangt. Dort ist ab dem achten Bebrütungstag die 1 $\alpha$ -Hydroxylase aktiv (KUBOTA et al., 1981), die dann in der Lage ist, 25(OH)D<sub>3</sub> in 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> umzuwandeln. Dieses erlaubt nun den Transport des Kalziums aus der Schale in das Skelettsystem des Kükenembryos (SOARES et al., 1995).

Als weitere Unterschied zum Mensch und anderen Tierarten stehen im Vogelblut zwei Globuline ( $\alpha$ - und  $\beta$ - Globulin) zum Transport von Vitamin D und seinen Metaboliten zur Verfügung (EDELSTEIN et al., 1973). Sie unterscheiden sich durch die Affinität zu ihrem Substrat: während das eine stärker 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> bindet, zeigt das andere eine höhere Affinität zu 25(OH)D<sub>3</sub>. Offensichtlich ist der letztgenannte Komplex in der Lage, in das Ei einzudringen und dadurch dem Embryo zur Verfügung zu stehen (LAWSON und DAVIES, 1979). Somit hat die Aufnahme und die Produktion verschiedener Vitamin D<sub>3</sub>- Abkömmlinge durch das Muttertier eine besondere Bedeutung für die Entwicklung des Kükens (EDWARDS, 2000).

Haben Cholecalciferol und Ergocalciferol bei den Säugern eine annähernd gleiche biologische Wirksamkeit, so liegt der Fall bei Vögeln anders. Diese sind, im Gegensatz zu den anderen Tierspezies, nicht in der Lage, ihren Vitamin D-Bedarf über die Aufnahme von pflanzlichem Vitamin D<sub>2</sub> zu decken. Vögel und Neuweltaffen diskriminieren Vitamin D<sub>2</sub> gegenüber Vitamin D<sub>3</sub> in der biologischen Wirksamkeit (HAY und WATSON, 1975). Schon 1964 wurde in Versuchen festgestellt, dass die biologische Aktivität von Vitamin D<sub>2</sub> nur 1/10 der biologischen Aktivität von Vitamin D<sub>3</sub> betrug (CHEN und BOSMAN, 1964). Später wurde diese Beobachtung sogar noch berichtigt: nach Versuchen an rachitischen Hühnerküken wurde eine um eine Zehnerpotenz niedrigere biologische Aktivität von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> gegenüber der von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> festgestellt, sowie gleichzeitig eine um zwei Zehnerpotenzen verminderte Aktivität von D<sub>2</sub> gegenüber D<sub>3</sub> (RAMBECK et al., 1984a). Somit muss bei Vögeln sowohl vor als auch nach der Metabolisierung zu 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> eine Störung im Stoffwechselweg vorliegen. Folglich ist bei der Supplementierung des Geflügelfutters darauf zu achten, dass Vitamin D<sub>3</sub> und nicht Vitamin D<sub>2</sub> zugesetzt wird. In Versuchen konnte dargestellt werden, dass der alleinige Zusatz von 25(OH)D<sub>3</sub> im Futter zur Deckung des Vitamin D<sub>3</sub> - Bedarfs ausreichend ist (TERRY et al., 1999).

## 2.2 Wirkung des Vitamin D

### 2.2.1 Wirkung auf zellulärer Ebene

Auf molekularer Basis wird die Wirkung von  $1,25(\text{OH})_2$ - Vitamin  $\text{D}_3$  durch einen Rezeptor vermittelt. Dieser so genannte Vitamin D- Rezeptor (VDR) hat ein Molekulargewicht zwischen 60 und 70 Kilodalton und bindet  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  mit einer höheren Spezifität als die anderen Vitamin  $\text{D}_3$ - Metaboliten wie  $25(\text{OH})\text{D}_3$  oder auch Vitamin  $\text{D}_3$  (PIKE, 1984). Bei dem spezifischen Transportprotein, dem DBP, verhält es sich genau umgekehrt, so dass  $25(\text{OH})\text{D}_3$  als auch  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  stärker gebunden werden als  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Dies erlaubt den intrazellulären Rezeptoren,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in den Vitamin D- Zielzellen zurückzuhalten und es dadurch zu konzentrieren (MANOLAGAS und DEFTOS, 1981). Die Rezeptoren befinden sich im Zytoplasma und im Zellkern fast aller Kerntragender Zellen des Körpers, wodurch die Zahl der potentiellen Zielzellen sehr hoch ist.

An das Rezeptorprotein gebunden gelangt  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in den Zellkern, wo es nun durch Vermittlung der DNA- bindenden Domäne des VDR an die Promotorregion des chromosomalen DNA- Stranges bindet (NORMAN et al., 1992).

Der Mechanismus mittels dessen das Vitamin D- Hormon die Kalzium-Homöostase regelt, wird von FRASER (1995) ähnlich dem beschrieben, dessen sich die klassischen Glucocorticoide und Steroidhormone bedienen. Durch die Komplexbildung mit dem Rezeptor an der Promotorregion eines Gens wird die Transkription spezifischer messenger- RNA ausgelöst, welche wiederum bestimmte Proteine codieren, welche dann in die Regulation des Kalziumhaushalts eingreifen. Diese Art der Regulation konnte für über 60 Gene beschrieben werden, die somit auf direktem und indirektem Weg in den Kalzium- und Phosphorhaushalt eingreifen (MINGHETTI und NORMAN, 1988).

Eine gut untersuchte Genregulation stellt neben die der Expression von Osteocalcin, einem extrazellulären Knochenmatrixprotein (POSER und PRICE, 1979), die Expression von Calbindin (CaBP) dar. Dabei handelt es sich um ein durch Vitamin D- induziertes, Kalziumbindendes Protein (MINGHETTI et al., 1988). Es wird hauptsächlich in Darm und Nieren exprimiert und stellt dort den Kalziumtransport sicher. Es schleust Kalzium durch die Zelle hindurch zur

Basolateralmembran, wo es nun über eine Kalziumpumpe aktiv aus der Zelle herausgeschleust wird. (CHRISTAKOS et al., 2003). Eine weitere Wirkung entfaltet Calbindin an den Langerhans'schen Inselzellen des Pankreas, wo es die Freisetzung des Hormons Insulin steuert (SOOY et al., 1999). Des Weiteren ist es in der Lage, Kalzium in der Zelle abzapuffern und spielt damit eine wichtige Rolle beim Schutz vor zellulären Schädigungen (CHRISTAKOS et al., 2003) und dem apoptotischen Zelltod (GUO et al., 1998).

Zum heutigen Zeitpunkt kennt man zwei Arten des CaBP: Calbindin- D28<sub>k</sub> im Vogeldarm, Pankreas, Gehirn und Säuger- und Vogelniere sowie Calbindin- D9<sub>k</sub>, das im Darm von Säugern und in Mäuselebern (CHRISTAKOS et al., 1992) vorkommt.

### **2.2.2 Physiologische Zellantwort**

Das Vitamin D-Hormon ist in der Lage, auch über einen anderen Reaktionsweg als die Bindung an den VDR eine Zellreaktion auszulösen. Solche Reaktionen umgehen die Einbindung des Genoms in den Aktivierungsprozess und werden als "Rapid Responses" bezeichnet. Sie setzen wesentlich schneller ein als eine über den VDR ablaufende Zellantwort, bei denen die Transkription von Proteinen erst nach 60 Minuten einsetzt. Durch die "Rapid Responses" kann innerhalb von wenigen Sekunden bis Minuten ein Zellantwort verzeichnet werden. Die Resorption von Kalzium aus dem Darm stellt eine gut untersuchte Form der schnellen physiologischen Zellantwort dar und wird als Transcaltachia bezeichnet (NEMERE und NORMAN, 1988). Dabei kommt es durch die Bindung von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  an einen zellständigen Rezeptor zur Freisetzung von second-messenger-Botenstoffen, die dann regulierend in die Zellfunktion eingreifen (NORMAN et al., 1999).

Ebenso zu den "Rapid Responses" wird die Aktivierung der Kalziumkanäle der Darmwand gezählt. Durch sie wird eine gesteigerte Kalziumresorption aus dem Nahrungsbrei erreicht.

### 2.2.3 Wirkung auf den Knochenstoffwechsel

Das Knochengewebe besteht aus drei Komponenten: dem zellulären Anteil, den Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten, den Knochenmineralien, deren Großteil Kalzium und Phosphor darstellt, sowie der organischen Matrix, dem so genannten Osteoid, welches sich zu 90 % aus Kollagen Typ I und zu 10 % aus anderen Proteinen zusammensetzt.

Osteoblasten stellen das Grundgerüst beim Knochenaufbau dar, während Osteoklasten nur Resorption betreiben. Der Knochen unterliegt damit ein Leben lang andauernden Auf- und Abbauprozessen, die dementsprechend, um eine konstante Knochenmasse gewährleisten zu können, aufeinander abgestimmt sein müssen. Osteozyten stellen Abkömmlinge der Osteoblasten dar, die in Lakunen des mineralisierten Knochens liegen und am Informationsaustausch zu Umbauprozessen beteiligt sind (MARTIN, 1993).

Osteoblasten selbst sind mesenchymalen Ursprungs und produzieren das Osteoid, die Grundsubstanz des Knochens. Daneben bilden sie aber auch das Osteocalcin (s. 2.1.1.), welches für den Transport der Kalziumionen aus dem Blutplasma in den Verkalkungsbereich des Knochens zuständig ist. Untersuchungen konnten zeigen, dass Osteoblasten über  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptoren verfügen (NIJWEIDE et al., 1986) und damit dem direkten Einfluss von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bzgl. ihrer Proliferation, Differenzierung und Proteinsynthese unterliegen (KANIS et al., 1988). In-Vivo konnte sowohl bei Tieren als auch beim Menschen eine durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induzierte gesteigerte Osteocalcinproduktion beobachtet werden (ERBEN et al., 1997; PRICE und BAUKOL, 1981; MARKOWITZ et al., 1987).

Zu der Rolle von  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  im Knochenstoffwechsel gab es verschiedene Untersuchungen, deren Aussagen aber stets in die gleiche Richtung abzielten. So wird von ORNOY et al. (1978) dem  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  eine wichtige Bedeutung für die ausreichende Mineralisierung des Skeletts zugesprochen. In weiteren Untersuchungen konnte es in hohen Dosen das Knochenvolumen erhöhen, ohne dabei die Knochengröße zu beeinflussen (NAKAMURA et al., 1987).

An verschiedenen Tiermodellen konnten RAMBECK et al. (1988) eine synergistische Wirkung von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf die Knochenmineralisation nachweisen. Der additive Effekt beider Metabolite konnte des Weiteren auch am Verkalkungsgrad der Epiphysenfuge der Tibia und an den



Eischalendicken bei japanischen Wachteln beobachtet werden. RAMBECK und ZUCKER (1985a) schwächten diese Aussage bezüglich der Eischalendicke ab, indem sie eine vorherige Umwandlung von  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zu  $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$  als notwendig annahmen. YAMAMOTO et al. (1998) konnten in Versuchen nachweisen, dass  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die vermehrte Freisetzung eines second-messenger-Botenstoffes bewirkt und im Zusammenspiel mit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Osteocalcinsynthese steigert.

Auch der Knochenabbau unterliegt dem Einfluss von Vitamin  $\text{D}_3$ - Metaboliten. Bei der Bildung der Osteoklasten ist  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  unbedingt notwendig, wie SUDA et al. (1992) zeigen konnten: die mehrkernigen Präosteoklasten, eine Zwischenstufe in der Bildung aus Stammzellen des hämatopoetischen Systems, fusionieren nur in Anwesenheit von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und direktem Kontakt zu Osteoblasten. Die Osteoklastenformation kann auf mehreren Wegen angeregt werden, wobei  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  dies durch Rezeptorpräsentation induziert. Parathormon, Prostaglandin  $\text{E}_2$  und Vertreter der Interleukinfamilie stellen weitere, die Knochenresorption fördernde Faktoren dar (SUDA et al., 1992). Über diese unterschiedlichen Wege wird in Osteoblasten die Bildung eines Osteoklasten-Aktivierungsfaktors (ODF) angeregt, der auf der Plasmamembran der Osteoblasten präsentiert wird (SUDA et al., 1992). Versuche zeigten, dass aus den genannten Gründen nur dann eine Differenzierung zu reifen Osteoklasten möglich ist, wenn Osteoklastenvorstufen in Zellkontakt mit den ODF- tragenden Osteoblasten stehen. Für die den Knochenabbau anregenden Substanzen stellen also nicht die Osteoklastenvorstufen die Zielzellen dar, sondern nach diesen Erkenntnissen die Osteoblasten. Neben der in vivo vorliegenden Funktion als Knochenmobilisierendes Hormon zeigt  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in vitro auch die Eigenschaften eines Knochenformenden Hormons. Dabei spielt seine Konzentration eine wichtige Rolle. Es wird angenommen, dass in vivo eine Knochenresorption nur bei pharmakologischer Überdosierung oder Fehlregulierten Mechanismen möglich ist (SUDA et al., 2003).

In vivo verhindert  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in physiologischer Konzentration die Knochenresorption durch Unterdrückung der durch Parathormon induzierten messenger- RNA- Synthese und folgender Osteoklastenaktivierung (ENDO et al., 2000).

MERKE et al. vermuteten bereits 1986 ein Fehlen von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ - Rezeptoren bei Osteoklasten. Sie nahmen an, dass  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nicht die Aktivität der Osteoklasten, sondern vielmehr ihre Anzahl beeinflusste.

Auch Hormone nehmen auf den Knochen Einfluss. So wirkt Parathormon zum einen stimulierend auf die Osteoklasten, aber auch auf die Differenzierung der Osteoblasten bzw. deren Vorläuferzellen (SCUTT et al., 1992). Während Östrogen beide Prozesse behindert, unterdrückt  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nur die Knochenresorption, die Knochenformation hält es aufrecht (SHIBATA et al., 2002). In genaueren Untersuchungen beider Substanzen fand man heraus, dass die Menge der Osteoklastenprogenitorzellen im Knochenmark stark reduziert war, so dass sich  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  gut für die Behandlung östrogenabhängiger Osteoporose eignet. Weiter wirkt  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in Osteoblasten stimulierend auf die Synthese verschiedener Proteine, die auf die Zelladhäsion und die Matrixverkalkung Einfluss nehmen (AVIOLI, 1999). Zum Teil können diese Proteine sogar in der klinischen Diagnostik als biochemische Marker des Knochenumbaus verwendet werden.

Als Marker für Resorption am Knochen können auch z.B. kollagene Abbauprodukte (Hydroxyprolin, pyridinium cross links) oder TRAP (tartrate resistant acid phosphatase) dienen. Marker für Knochenformationen sind z.B. Beiprodukte der Knochenmatrixsysteme (Osteocalcin u.a.) oder das Enzym Alkalische Phosphatase (ALP). Im alkalischen Milieu katalysiert sie die Synthese und die hydrolytische Spaltung von Phosphorsäureestern.

Der ALP wird eine Rolle bei der Mineralisation neu formierten Knochens zugesprochen, indem sie durch die Freisetzung von anorganischem Phosphat in die Matrix als direkt die Mineralisation katalysiert und indirekt die Hydroxyapatit-Kristallbildung stimuliert (RINGE et al., 1994). Die positive Korrelation zwischen ALP und aktiven Osteoblasten lässt den Schluss zu, dass ALP als ein Marker für die Matrixformation und die beginnende Mineralisation fungiert, und nicht auf eine fortschreitende Mineralisation hinweist (van de VELDE et al., 1985).

## 2.3 Weitere Wirkungsbereiche von Vitamin D<sub>3</sub>

War man bis dato der Annahme, die Funktion von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> würde sich rein auf den Kalzium- und Phosphorhaushalt beschränken, so konnten STUMPF et al. im Jahre 1979 diese Meinung widerlegen: durch Versuche mit radioaktiv markiertem 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> konnte gezeigt werden, dass sich nicht nur in den schon bekannten Organen wie Darm, Niere und Knochen 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> fand, sondern auch in bis dahin noch unvermuteten Organen wie Pankreas, Haut, Brustdrüsen- und Ovargewebe, Nebenhoden, Nervengewebe, Promyelozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten.

### 2.3.1 Immunsystem

Nachdem STUMPF et al. bereits wichtige Vorarbeit geleistet hatten, gelang es MANOLAGAS et al. (1985), wie auch auf Monozyten die Anwesenheit von VDR auf B- und T- Lymphozyten nachzuweisen. Untersuchungen konnten die beeinflussende Wirkung von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auf das Immunsystem in Form einer massiv erhöhten Immuntoleranz zeigen, hauptsächlich im Bereich der Dendritischen Zellen und der T- Lymphozyten (MATHIEU et al., 2004).

Die dendritischen Zellen übernehmen eine wichtige Rolle bei der T-Zell-medierten Immunantwort, indem sie nicht nur die CD4<sup>+</sup>-, sondern auch die CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten stimulieren (STEINMANN 1991; HART 1997). Sie unterliegen einer zweifachen Reifung, wobei die erste in der Phase nach dem Kontakt mit dem Antigen abläuft, in der sie unter dem Einfluss von proinflammatorischen Stimuli in die lymphatischen Organe wandern. Hier übernehmen sie mehr die Funktion der Antigenpräsentation (BANCHEREAU et al., 2000) und reagieren mit den Lymphozyten. Dann folgt die zweite Reifungsphase, in der sie T-, B-Lymphozyten und die natürlichen Killerzellen aktivieren und Cytokine (TNF, IL-12) produzieren (HACKSTEIN und THOMSON, 2004). In vivo und in vitro Untersuchungen konnte 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> über die Bindung an den VDR auf den Dendritischen Zellen diese in einer Art Unreifezustand verharren lassen (GRIFFIN und KUMAR, 2003) und blockt dadurch die Aktivierung der T-Lymphozyten. Auch kommt es durch die Anregung der Th2 T- Helferzellen zur

Bildung von Cytokinen (TGF- $\beta$ 1, IL- 4) an, was wiederum zu einer Unterdrückung der Th1- Zellen und deren Cytokin- Produktion führt.

In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass 1,25(OH) $_2$ D $_3$  und auch dessen Analoga eine gesteigerte Immuntoleranz bedingen, ohne dabei die Reaktionsfähigkeit des Immunsystems auf Infektionen zu beeinträchtigen (CANTORNA et al., 1998). Diese Tatsache macht die aktive Vitamin D- Hormon zu einer sinnvollen Alternative gegenüber den angewandten Immunsuppressiva bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen. Als Beispiel sind z.B. die autoimmune Encephalomyelitis (LEMIRE und ARCHER, 1991) zu nennen, rheumatoide Arthritis durch *Borrelia burgdorferi*, systemischer Lupus erythematodes, Diabetes mellitus oder auch die kollagen induzierte Arthritis (CANTORNA et al., 1998).

### 2.3.2 Tumorzellen

Mit der Entdeckung der Expression von VDRs auf humanen Brustkrebszellen (EISMAN et al., 1979) und der Beobachtung eine höheren Inzidenz von Prostatakrebs bei Menschen, die in nördlichen Breitengraden leben und damit einer geringeren UV-Strahlung ausgesetzt sind (HANCHETTE und SCHWARTZ, 1992), lag die Vermutung nahe, dass 1,25(OH) $_2$ D $_3$  lokal in verschiedenen Organen einen regulierenden Einfluss auf das Zellwachstum habe und damit auch das Risiko der Entartung herabsetze (HOLICK, 2002).

In Untersuchungen an Prostatazelllinien konnte weiter gezeigt werden, dass diese in der Lage sind, 1,25(OH) $_2$ D $_3$  mittels der 1 $\alpha$ -Hydroxylase aus 25(OH)D $_3$  zu bilden und dadurch die Invasivität der Krebszellen herabgesetzt wird (SCHWARTZ et al., 1998). Ein Einsatz von 1,25(OH) $_2$ D $_3$  in der Chemoprävention wäre also denkbar.

Den genauen Mechanismus der anti-Tumor-proliferativen Eigenschaft konnten JOHNSON et al. 2003 beschreiben: 1,25(OH) $_2$ D $_3$  ist in der Lage, den Zellzyklus in der G $_0$  bzw. G $_1$ - Phase anzuhalten und damit die unkontrollierte Vermehrung von Tumorzellen zu verhindern. Weiter fand man heraus, dass 1,25(OH) $_2$ D $_3$  im Zusammenspiel mit einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration den apoptotischen Zelltod einleitet. Diese Eigenschaft könnte zum Einsatz in der Behandlung von Mammakarzinomen hilfreich sein (SERGEEV, 2004).

Ein alleiniger Einsatz von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ist im Moment noch nicht denkbar, da der Eingriff in den Kalzium- und Phosphorhaushalt dadurch zu groß wäre. Jedoch sowohl bei in vitro (KOSHIZUKA et al., 1998; WANG Q. et al., 2000; HERSHBERGER et al., 2001; RASSNICK et al., 2006) als auch in vivo (RASSNICK et al., 2006) durchgeführten humanmedizinischen Untersuchungen konnte  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  den Anti-Tumor-Effekt von den Chemotherapeutika Cisplatin, Adriamycin und Paclitaxel verstärken. Auch für andere Substanzen konnte ein synergistischer Effekt nachgewiesen werden, was Anlass zu weiteren Forschung auf diesem Gebiet gibt.

### **2.3.3 Haut und ihre Anhangsorgane**

STUMPF et al. konnten bereits 1979 die Anwesenheit von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in Keratinozyten nachweisen. Später wurde auch die Anwesenheit von VDRs an Keratinozyten entdeckt. Es zeigte sich, dass  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  über die VDRs an Keratinozyten auch in der Lage ist, deren Wachstum einzuschränken und die Alterung zu beschleunigen (SMITH et al., 1986). Dabei ist die Konzentration ausschlaggebend: eine hohe Konzentration hemmt die Proliferation der Keratinozyten, durch niedrige wird sie stimuliert (GNIADCKI, 1996). Durch die oben beschriebenen Erkenntnisse stellt  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  einen möglichen Therapieansatz für die Behandlung von hyperproliferativen Hauterkrankungen, wie der Psoriasis, dar.

Hervorgehend aus Versuchen mit Mäusen (YOSHIZAWA et al., 1997; LI et al. 1997; KATO et al. 1999) und anhand Untersuchungen der erblichen Calcitriolresistenz und Alopezie des Menschen (MARX et al., 1986), ließ die Entdeckung der VDRs an der Haarwurzel auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Alopezie und  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  schliessen. REICHRATH et al. (1994) konnten die Expression des VDR an der Dermalpapille und der äußeren epithelialen Haarwurzelscheide nachweisen. Der genaue Zusammenhang zwischen Alopezie und aktivem Vitamin  $\text{D}_3$  konnte noch nicht geklärt werden. Dass er aber besteht, wird durch obige Untersuchungen zweifelsfrei bewiesen.

### **2.3.4 Zentrales Nervensystem (ZNS)**

Auch im Bereich des Nervensystems finden sich Zusammenhänge zwischen der Funktionsfähigkeit von Nerven und Gehirn und der Anwesenheit von Vitamin D. Untersuchungen an Ratten konnten zeigen, dass ein Mangel an Vitamin D in der vorgeburtlichen Phase eine Beeinträchtigung der Funktionalität der Zellbestandteilen bei heranwachsenden Tieren nach sich zieht (EYLES et al., 2006). Wie oben bereits genannt, konnten STUMPF et al. (1979) in ihren Untersuchungen zeigen, dass auch im Nervengewebe VDRs nachweisbar waren. Ebenso konnten verschiedene Arbeitsgruppen die Anwesenheit sowohl der  $1\alpha$ -Hydroxylase als auch der  $24$ -Hydroxylase im Gehirn aufzeigen (ST-ARNAUD 1999; ZEHNDER et al., 2001; EYLES et al., 2005). Somit waren alle notwendigen Reaktionspartner für die Ermöglichung einer Wirksamkeit des Vitamin D auf zellulärer Ebene gegeben. In vielerlei Untersuchungen, die den Rahmen dieser Arbeit überschreiten würden, wurde die neurotrophischen und neuroprotektiven Fähigkeiten des Vitamin D genauer untersucht. Weiter wird der Effekt von Vitamin D bei neurologischen Erkrankungen wie Parkinson, Schizophrenie und bei Zirkulationsstörungen (Schlaganfall) diskutiert. Hierzu wurde in verschiedenen Tierversuchen versucht, einen protektiven oder auch heilenden Effekt des Vitamin D bei genannten Erkrankungen nachzuweisen. Diese Untersuchungen konnten noch keine klaren Ergebnisse liefern und werden deshalb in der vorliegenden Arbeit noch nicht weiter diskutiert.

### **2.3.5 Herz-Kreislauf-System**

Das Renin- Angiotensin- Aldosteronsystem stellt ein wichtiges Element zur Regulation des Blutdrucks und auch des Elektrolyt- und Volumenhaushalts dar. Renin ist selbst kein Hormon, sondern ein proteolytisches Enzym, welches, induziert durch verschiedene Faktoren, aus den juxtamedullären Zellen sezerniert wird. Solcherlei Faktoren sind z.B. der Abfall des systemischen Blutdrucks, der Abfall der  $\text{Na}^+$ -Konzentration an der Macula densa, Einfluss des Sympathikus über  $\alpha_1$ -Rezeptoren, bestimmte Prostaglandine oder auch medikamentelle Beeinflussung durch Diuretika oder ACE-Hemmer. Das freigesetzte Renin wandelt in der Leber Angiotensinogen zu Angiotensin I um. Dieses wird nun in der Lunge durch das Angiotensin-converting-enzyme (ACE) zum biologisch

aktiven Oktapeptid Angiotensin II. Angiotensin II bewirkt neben einer Vasokonstriktion, und damit einer Anhebung des systemischen Blutdrucks, die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde, welches die Rückresorption von  $\text{Na}^+$  fördert und die ADH- Freisetzung (Vasopressin) aus dem Hypophysenhinterlappen stimuliert. Sekundär löst Angiotensin II ein Durstgefühl aus.

LI et al. beobachteten 2002, dass  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  negativ regulierend auf die endokrine Genexpression von Renin einwirkt. Somit stehen die Vitamin D-Konzentration und der Blutdruck in einem indirekt proportionalen Verhältnis.

### **2.3.6 Nebenschilddrüse**

Der positive Behandlungserfolg durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bei Patienten mit sekundärem Hyperparathyreoidismus aufgrund einer chronischen Niereninsuffizienz (SLATOPOLSKY et al., 1984) bedingte die Annahme, dass auch hier ein VDR im Gewebe der Nebenschilddrüse einen direkten Effekt durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ermöglichte. Eine Analyse der das Parathormon kodierenden mRNA zeigte, dass  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Transkription durchaus unterdrücken kann (RUSSELL et al., 1986).

Durch die Entdeckung des "Vitamin D Responsive Element" (VDRE) in der Promotorregion des Parathyreoidgens konnte bewiesen werden, dass  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Expression des Promotors zu unterdrücken in der Lage ist (DEMAY et al., 1992; SILVER und NAVEH-MANY, 1997). Nach weiteren Untersuchungen kam man dann zu der Annahme, dass  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , wie es auch in den Versuchen die Pomyelozyten in ihrem Wachstum unterdrückt und ihre Differenzierung stimuliert, ebenso eine hemmenden Effekt auf die Proliferation der Zellen der Nebenschilddrüse habe (ABE et al., 1981).

### **2.3.7 Autoimmuner Diabetes Typ I**

Im Mäuseversuch konnten ROTHE et al. (1999) feststellen, dass die Erkrankungswahrscheinlichkeit dieser Mäuse an Diabetes Typ I durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  deutlich herabgesetzt wurde. Als Folge einer T- Zell- vermittelten Autoimmunreaktion gegen die Insulin- bildenden  $\beta$ - Zellen der Langerhans' schen

Zellen der Bauchspeicheldrüse kommt es zu dieser Diabetes- Form. Wie schon beschrieben (s. 2.3.1) werden die Dendritischen Zellen in ihrer Reifung und der Produktion von Cytokinen durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  gestört (GRIFFIN und KUMAR, 2003).

### **2.3.8 Vitamin D- Mangel und dessen Auswirkungen**

Wie bereits ausführlich beschrieben, kann der Vitamin D- Bedarf über zwei Wege gedeckt werden: über die Nahrung und durch endogene Bildung in der Haut. Mangelsymptome treten eben dann auf, wenn einer der beiden Quellen nicht zugänglich ist, sei es durch mangelnden Gehalt der Nahrung oder durch fehlende UV- Exposition der Haut. Zwei verschiedene Krankheiten, in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Auftretens, werden beschrieben.

Die Rachitis tritt in der Wachstumsphase auf. Dabei kommt es aufgrund zu geringer Kalzium- Resorption im Darm und verstärkter Phosphatrückresorption in der Niere auch zu einer gestörten Versorgung des Knochens mit Mineralstoffen. Als Folge kommt es zum Krankheitsbild des sekundären Hyperparathyreoidismus, bei dem der Organismus versucht, den niedrigen Kalziumspiegel im Blut oder Kalzium/Phosphat- Imbalancen durch verstärkte Freisetzung von Parathormon aus der Nebenschilddrüse auszugleichen. Dadurch kommt es zur vermehrten Phosphatexkretion über die Niere und einer gesteigerten Mobilisation von Kalzium aus dem Knochen. Der Knochen wird dadurch entkalkt, es kommt zu Formveränderungen (v.a. Im Bereich der Wachstumszonen) sowie zur Knochenerweichung (v.a. Schädelknochen). Häufig sind diese Symptome aber erst nach mehreren Monaten sichtbar und stellen das klinische Bild der Rachitis (GREER, 2003). Auch die Muskulatur zeigt einen verringerten Tonus ("Froschbauch") und es kann zu Obstipationen kommen.

Beim Adulten ist die Pathogenese identisch mit der der Rachitis, wird aber als Osteomalazie bezeichnet. Durch den bereits erfolgten Schluss der Wachstumsfugen kommt es hier neben der Knochenerweichung auch zu einer sekundären Ossifikationsstörung, die als Folge zu einer Verbiegung der Knochenachsen führt. Es treten häufiger Ermüdungsfrakturen auf.

Die Überversorgung mit Vitamin D und deren Folgen werden im Abschnitt über Kalzinogene Pflanzen genauer dargestellt.



## 2.4 Kalzinogene Pflanzen

### 2.4.1 Geographisches Vorkommen

In den verschiedensten Regionen der ganzen Welt konnte bei Nutztieren das Krankheitsbild der Kalzinose beobachtet werden, ausgelöst durch auf den Weiden wachsende kalzinogene Pflanzen. Zur genaueren Beschreibung der Symptomatik s. 2.4.2

#### 2.4.1.1 Südamerika

Bereits im 19. Jahrhundert konnte das erste Mal eine derartige Symptomatik bei Rindern in Argentinien beschrieben werden (LIGNIÈRES, 1898). Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Erkrankung und dem Aufenthalt auf Weiden, auf denen ein Vertreter der Nachtschattengewächse, *Solanum glaucophyllum* (sein brasilianischer Vertreter *Duraznillo blanco*) wuchs. Die Krankheit selbst wurde als "Enteque secco" bezeichnet. Vor einiger Zeit wurden auch die ersten Fälle von Kalzinose bei Schweinen beobachtet, auch hier ausgelöst durch *Solanum glaucophyllum* (CAMPERO und ODRIZOLA, 1990).

Einige Jahre später fiel auch in Brasilien das Augenmerk auf die Symptome bei Rindern wie Verkalkung der Lungen und Gefäßintima (PARDI und SANTOS, 1947). Hierzulande bezeichnete man diese Erkrankung als "Espichamento" oder "Espichacao", was als "dünner werden" verstanden werden kann. Die Symptome glichen denen der Kalzinose im Nachbarland (DÖBEREINER und DÄMMRICH, 1974; DONE et al., 1976) und auch hier war *Solanum glaucophyllum* das auslösende Agens (DÖBEREINER et al., 1971).

Auch in Uruguay wurde von einer Kalzinose durch *Solanum glaucophyllum* berichtet (CORREA et al., 1975).

#### **2.4.1.2 Nordamerika**

Im unter subtropischem Klimaeinfluss liegenden Florida konnte an Pferden (KROOK et al., 1975b) und Rindern (KROOK et al., 1975a) eine chronische Erkrankung einhergehend mit Lahmheit und Gewichtsverlust beobachtet werden sowie den typischen pathologischen Befund, d.h. Verkalkung des elastischen Gewebes und eine generalisierte Osteosklerose. In Fütterungsversuchen zur Ursachenfindung konnte *Cestrum diurnum* identifiziert werden.

#### **2.4.1.3 Indien**

Bei Schafen im nördlichen Bundesstaat Punjab konnten Verkalkungen im Herz-Kreislauf- System und der Nieren sowie ulzerative Veränderungen der Gelenkknorpel festgestellt werden. Das Kalzium- Phosphor- Verhältnis war bei diesen Tieren deutlich erniedrigt. Eine pflanzliche Ursache ist neben einem unausgeglichene Mineralhaushalt denkbar (GILL et al., 1976), aber noch nicht bewiesen.

#### **2.4.1.4 Afrika**

Bei Schafen konnten in Südafrika neben Steifheit der Glieder und Tod durch Herzversagen die klassischen pathologischen Befunde der Kalzinose beobachtet werden. Nachdem TUSTIN et al. 1973 bereits eine Pflanze als Ursache vermuteten, konnten RAMBECK und ZUCKER diesen Verdacht 1982 mit dem Nachweis eines kalzinogenen Stoffs in *Solanum verbiscafolium* bestätigen. In Nigeria fand sich bei Büffeln eine "Calcinosis circumscripta", die bis heute noch nicht genau erarbeitet ist (IDEKE, 1979).

#### **2.4.1.5 Ozeanien**

Auf der Insel Hawaii (HENDERSHOT, 1942; LYND et al., 1965), auf Papua-Neuguinea (COPLAND, 1975) und in Australien (O'SULLIVAN, 1976) wurden bei Rindern, Ziegen und Schafen die Symptome einer Kalzinose entdeckt. Auf Hawaii wurde sie als "Naalehu disease" bezeichnet und als ursächliches Agens, wie

auch in Papua-Neuguinea (MORRIS et al., 1979), die Pflanze *Solanum torvum* (Türkenbeere) und *Cestrum diurnum* (Wilder Jasmin) identifiziert.

#### **2.4.1.6 Karibik**

Auf Jamaika findet man eine Kalzinose bei Rindern und Ziegen unter dem Namen "Manchester Wasting Disease". Die klinische Symptomatik entspricht mit Steifheit, Herz- Kreislauf- Insuffizienz und den Verkalkungen der Gefäße und Sehnen derer der südamerikanischen Kalzinosen (ARNOLD und BRAS, 1956). ARNOLD und FINCHAM konnten 1997 *Stenotaphrum secundatum*, einen Vertreter der Familie der Süßgräser, als Ursache für die "Manchester Wasting Disease" identifizieren. Auf Cuba wurde ein bei Rindern vorkommender Krankheitskomplex als "Cestrum diurnum intoxication" bezeichnet (DURAND et al., 1999).

#### **2.4.1.7 Mitteleuropa**

Auch im Voralpengebiet kam eine Erkrankung vor, deren Symptome denen der oben beschriebenen sehr ähnlich waren. Die bekannt dafür ursächlichen Pflanzen kommen allerdings in diesen Gebieten nicht vor. Somit war die tatsächliche Ursache vorerst nicht genau bekannt.

Als "Weidekrankheit" vor allem im westlichen Österreich (Tirol, Steiermark) bekannt (LIBISELLER und GUNHOLD, 1969), nahm man aufgrund der Häufigkeit in Bertrieben mit Mähweidewirtschaft an, dass eine besonders starke Düngung ursächlich sei (KÖHLER und LIBISELLER, 1970). Wurde auf die Düngung verzichtet, trat die Krankheit scheinbar nicht auf. Andere vermuteten einen Zusammenhang der Kalzinose mit einer als "Chronischer Magnesiummangel bei Kühen" bezeichneten Krankheit (ONDERSCHEKA et al., 1967). Ihre Symptome waren deutlich an die Weidehaltung gekoppelt. Wurden die Tiere aufgestallt und mit Heu versorgt oder in eine andere Herde verbracht, verbesserten sich die Symptome.

Eine dem klinischen und pathologisch-anatomischen Bild entsprechende Erkrankung kannte man auch im bayerischen Voralpenland als "Enzootische Rinderkalzinose" (DIRKSEN, 1969). Um die vorhergehenden Spekulationen über

die Ursache der Kalzinose zu revidieren, führten DIRKSEN et al. (1971b) einen Versuch durch, in dem sie Schafen Klee, Gräser und Kräuter von besonders schwer von Kalzinose betroffenen Betrieben verfütterten. Nach 10 Wochen waren bei der Schlachtung nur bei solchen Tieren die typischen Verkalkungen sichtbar, die mit den Gräsern gefütterte worden waren. Die Analyse der Gräser auf diesen Wiesen und Weiden ergab einen erhöhten Anteil von Goldhafer (*Trisetum flavescens*) und Knautgras (*Dactylis glomerata*).

#### **2.4.2 Vertreter der kalzinogenen Pflanzen**

Zur Gruppe der kalzinogenen Pflanzen zählen solche aus der Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) und der Süßgräser (*Gramineae*). Auch Angehörige anderer Familien konnten in den letzten Jahren als kalzinogene Pflanzen identifiziert werden, so konnten BOLAND et al. 2003 Secosteriode in Kürbisgewächsen (*Curcubitaceae*) und Schmetterlingsblütlern (*Fabaceae*) nachweisen, die in ihrer Struktur dem Vitamin D<sub>3</sub> ähneln.

Was Vitamin D<sub>3</sub> an der Pflanze selbst bewirkt, ist noch nicht genau erarbeitet. Lediglich eine Beeinflussung des Wurzelwachstums konnte herausgestellt werden (BUCHALA und SCHMID, 1979).

Wichtig zu erwähnen sind *Solanum glaucophyllum*, *S. torvum*, *S. esuriale*, *S. verbascifolium*, *Cestrum diurnum* und *Nierembergia veichtii* als Vertreter der Nachtschattengewächse, *Trisetum flavescens* und *Stenotaphrum secundatum* aus der Familie der Süßgräser. Bei weiteren Nachtschattengewächsen konnten in den Blättern Substanzen mit Vitamin D- ähnlichen Aktivitäten nachgewiesen werden, so in Blättern der Tomatenpflanze (PREMA und RHAGAMULU,, 1996), den Kartoffel-, Auberginen- und Zucchiniblätter (ABURJAI et al., 1998) sowie in *Nicotiana glauca*, einem blaugrünen Tabak (SKLIAR et al., 2000).

Da in dieser Arbeit nur Versuche mit Extrakten von *Solanum glaucophyllum* und *Trisetum flavescens* durchgeführt wurden, werden nur diese beiden Vertreter der kalzinogenen Pflanzen genauer besprochen.

### 2.4.2.1 *Solanum glaucophyllum*

*Solanum glaucophyllum* ist ein Vertreter der Nachtschattengewächse und wurde früher mit dem Namen *Solanum malocoxylon* Sendtner bezeichnet. Strauchartig, mit einer Zweighöhe von 1,5 bis 3 Meter, wächst es vor allem auf tonhaltigen Böden tiefer gelegener Landschaften, welche häufig überflutet sind, und trägt lilafarbene Blüten. Die Pflanze zeichnet sich zum einen durch ein langsames extensives Wachstum aus, zum anderen durch sein tiefgreifendes Wurzelsystem, welches ihm eine erhöhte Widerstandskraft gegenüber Unkrautvernichtungsmitteln und Bodenkultivierung verleiht (TOKARNIA et al., 2002). *S. glaucophyllum* ist vor allem in Brasilien beheimatet und wird dort in endemischen Gebieten auch als limitierender Faktor der Freilandhaltung bei Rindern betrachtet.

Nachdem der Pflanze bereits im Rahmen des Auftretens von Enteque secco in Argentinien kalzinogene Eigenschaften zugesprochen worden waren (WORKER und CARILLO, 1967), konnte in weiteren Untersuchungen gezeigt werden, dass sich der kalzinogene Wirkstoff vor allem in den Blättern der Pflanze befindet (CAMBEROS et al., 1970). Auf den Boden gefallen, werden sie dann schließlich mit dem normalen Futter auf der Weide aufgenommen. Dabei ist der kalzinogene Stoff in diesen abgefallenen Blättern über einen sehr langen Zeitraum aktiv. Es konnte an der Krankheit Enteque secco auch gezeigt werden, dass bereits ein Anteil von 0,1% im Futter über 10 Wochen die Symptome auslösen kann (OKADA et al., 1977).

Zur genauen Identifizierung seiner biologischen Wirkeigenschaften konnte bei einem Fütterungsversuch mit Hühnern, deren  $1\alpha$ -Hydroxylase mittels Strontium inhibiert wurde, gezeigt werden, dass nach Verfütterung von *S. glaucophyllum* eine gesteigerte Kalziumabsorption aus dem Darm stattfand. Diese war auf eine Neusynthese von Calbindin, durch Vitamin D induziert, zurückzuführen (WASSERMAN, 1974). In weiteren Untersuchungen, wie z.B. Chromatographie, Fragmentographie konnte die Ähnlichkeit der *S. glaucophyllum*-Substanz mit Vitamin D<sub>3</sub> bestätigt werden. Im Gegensatz zu Vitamin D<sub>3</sub>, welches ätherlöslich ist, ist der Extrakt wasserlöslich. Untersuchungen ergaben, dass dies durch eine glykosidische Bindung hervorgerufen wird (WASSERMAN et al., 1976) und durch deren Spaltung  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  freigesetzt wird (HAUSSLER et al., 1976). Neben

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> konnten ESPARZA et al. (1982) in den Blättern von *S. glaucophyllum* auch Cholecalciferol und 25(OH)D<sub>3</sub> nachweisen. Alle Metaboliten liegen in der Pflanze glykosidisch gebunden vor, was die Frage aufwirft, ob zur biologischen Wirksamkeit im Organismus einer Spaltung der glykosidischen Bindung mittels Enzyme notwendig ist. Dazu zeigten PETERLIK et al. (1976) mittels radioaktiv markiertem 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, dass dieses gegenüber dem glykosidisch gebundenen Extrakt aus *S. glaucophyllum* wesentlich schneller an die Rezeptoren zu binden vermag. Wird es jedoch vorher mit Glucosidasen versetzt, wird extrakorporal der Zuckerrest abgespalten und es kann in direkte Konkurrenz zu 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> am Rezeptor treten. Um also eine biologische Effektivität zu erreichen, muss im Darm von Mensch und Tier eine körpereigene Glucosidase anwesend sein. Diese Annahme konnte durch Untersuchungen an Schafen, Ratten und Kaninchen gefestigt werden, welche zeigten, dass eine orale Gabe von Extrakten verglichen mit der parenteralen eine stärkere Hypercalciämie und Hyperphosphatämie hervorrief (LADIZESKY et al., 1974). Bei der Gabe von in Pansensaft vor-inkubierten Pflanzenextrakten an Ratten konnte ein deutlicher, stimulierender Effekt an der Regulation des Kalzium- und Phosphorstoffwechsels verzeichnet werden (BOLAND et al., 1979).

Mit verschiedenen Versuchsdurchführungen wurde das Ziel verfolgt, die biologische Aktivität der Pflanze *Solanum glaucophyllum* bezüglich der Vitamin D<sub>3</sub>- Metaboliten zu bestimmen. In folgender Tabelle sind die Ergebnisse einiger dieser Untersuchungen zusammengefasst:

**Tab. 2.2:** Zusammenstellung einiger bisher durchgeführter Untersuchungen zur biologischen Aktivität von *Solanum glaucophyllum* in verschiedenen Bioassays

Referenz	Tierart und Versuchsdurchführung	Untersuchte Parameter	Untersuchte Substanz	Dosis
BRUNS-DROSTE (1980)	Ratten; a) i.p.- Injektion eines Wasserextrakts b) p.o. Pulver	Kalzium, Phosphat im Serum	$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	a) 0,25 $\mu\text{g}/$ 0,1g b) 0,25 $\mu\text{g}/$ g
SANTOS et al. (1976)	Kaninchen Via Magensonde	Kalzium, Phosphat, ALP im Serum	$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	10 $\mu\text{g}/\text{g}$
TRÖGER (1984)	Hühnerküken "strontiuminduzierte Rachitis"	CaBP Bildung	$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	1 mg/ kg
MELLO und HABERMEHL (1998)	Hühnerküken "strontiuminduzierte Rachitis"	Kalzium, Phosphat, ALP im Serum	Vitamin D	82800 IE/ g
CORRADINO UND WASSERMAN (1974)	Isoliertes Hühnerduodenum Inkubation mit Extrakten	CaBP Bildung	$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	0,1 $\mu\text{g}/\text{g}$
RAMBECK UND ZUCKER (1982)	Wachteleischalentest	Eischale	Vitamin D	170 000 IE/kg
REICHENBÄCHER (1979)	Wachteleischalentest	Eischale	Vitamin D	4 000 IE/ kg
WASSERMAN (1975)	Wachteleischalentest	Eischale	Vitamin D	300 000 IE/ kg
PUCHE ET AL. (1980)	Hühnerküken	Kalziumgehalt der Femora	Vitamin D	24- 120 $\mu\text{g}/\text{g}$

Wohl ist *S. glaucophyllum* jedoch nicht in der Lage, alle Funktionen von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zu imitieren: fehlerhafte Phosphorregulation und verminderte Förderung des Wachstum konnte bei rachitischen Hühnern beobachtet werden (CANAs et al., 1977).

Für die hier vorliegenden Ergebnisse und Untersuchungen muss beachtet werden, dass der Gehalt einer eigens für die Extraktgewinnung gezüchteten

*Solanum glaucophyllum*- Pflanze mit bis zu 80 mg  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  pro kg Pflanzentrockensubstanz wesentlich höher ist, als solches der wild wachsenden Pflanzen. Bei ihnen findet sich eine Variation des Gehalts zwischen 0 und 30 mg pro kg Trockensubstanz in Abhängigkeit von Standort und Bodenverhältnissen (BACHMANN, 2005).

Zum Einsatz von *Solanum glaucophyllum* aufgrund seiner Eigenschaft als Träger von Vitamin  $\text{D}_3$ - Metaboliten s. 2.6

#### **2.4.2.2 *Trisetum flavescens***

Wegen seiner goldgelben Ähren trägt dieser Vertreter der Süßgräser den Namen Goldhafer. Mit einer Wuchshöhe von 40 bis 80 cm wächst er in Höhenlagen ab circa 700 m auf mäßig feuchten, kalk- und nährstoffreichen Böden.

In den Bergregionen Deutschlands, Österreich und der Schweiz stellt es neben Knaulgras ein wertvolles Futtermittel für weidende Tiere dar. Aufgrund seiner Eigenschaft als Auslöser von Kalzinose bei Weidetieren haben Untersuchungen über Gehalt an Vitamin D- wirksamer Substanzen neben einem wissenschaftlichen auch ein wirtschaftliches Interesse.

Im Anschluss an seine oben beschriebenen Fütterungsversuche an Schafen verfütterten DIRKSEN et al. (1972) über 18 Wochen sowohl Knaulgras als auch Goldhafer an Kaninchen. Dabei ergab sich eindeutig eine verkalkende Wirkung des Goldhafers. Bei einer weiteren Untersuchung an Schafen wurde dies erneut bestätigt (DIRKSEN et al., 1973, 1974; SIMON et al., 1978; WASER et al., 1983). PLANK et al. (1976) konnten dabei zeigen, dass die Wirkung des Goldhafers nicht durch Einflüsse wie besondere Bodenformation, bestimmtes Klima oder übermäßige Düngung verändert wird. Auch die Sonneneinstrahlung hat daran keinen Anteil (DIRKSEN et al., 1975).

Genauere Untersuchungen am Goldhafer selbst ergaben, dass sich die Vitamin D- Metaboliten vor allem in den Blättern befinden, weniger im Stängeln, Samen, Blüten oder Wurzeln (RAMBECK et al., 1981). Aufgrund seiner gleichwertigen Aktivität im Versuch mit Vögeln schlossen ZUCKER und RAMBECK (1981) daraus, dass es sich bei der wirksamen Substanz um Vitamin  $\text{D}_3$  handeln muss (s. 2.1.5). In kombinierter Gas- Chromatographie mit Massenspektrometrie konnte Vitamin



D<sub>3</sub> im Ätherextrakt des Goldhafers nachgewiesen werden (RAMBECK et al., 1979) und schließlich 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> identifiziert werden (RAMBECK 1984).

Bei Rindern konnte eine Verfütterung von *Trisetum flavescens*, der 10 % der Gesamtration ausmachte, über einen Zeitraum von fünf Monaten bereits erst Anzeichen einer Kalzinose auslösen, entspricht sie 50% der Gesamtration bereits nach ungefähr einem Monat (SIMON, 1980). Bei Schafen wurde eine höhere Toleranz gegenüber der kalzinogenen Wirkung beobachtet sowie auch eine große individuelle Variation der Symptome. Ein Anteil von 30 bis 40 % der Gesamtration löst bei ihnen etwa nach fünf Monaten die klinischen Symptome einer Verkalkung aus (DIRKSEN et al., 2003). Dabei wird aber bereits ab einem Weidebesatz des Goldhafers von 5 % auf die differentialdiagnostische Möglichkeit der Kalzinose hingewiesen, wenn Symptome wie Lahmheiten, steifer Gang oder Entwicklungsstörungen bei Schafen auftreten (DIRKSEN et al., 2003). Um die biologische Aktivität des Goldhafers zu beurteilen, wurden unterschiedliche Tiermodelle verwendet. Durch die Unterschiede in den untersuchten Parametern und den Versuchsbedingungen entstanden dabei auch unterschiedliche Aktivitäten der eingesetzten Präparate. Auch Herkunft und Verarbeitung des verwendeten Materials unterschied sich in den verschiedenen Untersuchungen, womit auch ein Abweichen der Ergebnisse erklärt werden kann. Einige sind in folgender Tabelle dargestellt, dabei ist ersichtlich dass zwischen den Tierarten große Unterschiede bestehen.

**Tab. 2.3:** Zusammenstellung einiger bisher durchgeführten Untersuchungen zur biologischen Aktivität von *Trisetum flavescens* in verschiedenen Bioassays, stark modifiziert nach MELLO (2003)

Referenz	Tierart Versuchsdurchführung	und Untersuchte Parameter	Untersuchte Substanz	Dosis
TRÖGER (1984)	Rachitische Hühnerküken	CaBP Bildung	Vitamin D <sub>3</sub>	80 - 100 µg/kg
BITTNER (1979)	Rachitische Hühnerküken	CaBP Bildung	Vitamin D <sub>3</sub>	3000 IE/ kg
KREISL (1981)	Hühnerküken "strontiuminduzierte Rachitis"	CaBP Bildung	1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	5-6 µg/ kg
MELLO und HABERMEHL (1998)	Hühnerküken "strontiuminduzierte Rachitis"	Kalzium, Phosphat, ALP im Serum	1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	12 000 IE/ kg
KÖHLER et al. (1978)	Wachteleischalentest	Eischalen	Vitamin D <sub>3</sub>	22 000 IE/ kg
RAMBECK et al. (1981)	Wachteleischalentest	Eischalen	Vitamin D <sub>3</sub>	4 000 IE/ kg
RAMBECK und ZUCKER (1982)	Wachteleischalentest	Eischalen	Vitamin D <sub>3</sub>	3 600 IE/kg
BRUNS- DROSTE (1980)	Ratten mit Hypophosphatämie	Kalzium, Phosphat Serum	im 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	0,25µg/30g
WASER et al. (1983)	Schafe Cobfütterung	Phosphat Serum	im Vitamin D <sub>3</sub>	150 000 IE/g
STARK (1979)	Ratten	Phosphat Serum	im Vitamin D <sub>3</sub>	3 IE/ g

In Untersuchungen zur Abhängigkeit der kalzinogenen Wirkung vom Zustand der Goldhaferpflanze wurde festgestellt, dass diese auch im Heu erhalten bleibt, wobei Heu mit geringerem Rohfaseranteil eine höhere Wirksamkeit aufweist als solches mit höherem Rohfaseranteil (WOLF und DIRKSEN, 1976). Auch in Cobs (DIRKSEN et al., 1981) und siliertem Zustand (HEINRITZI et al., 1977) bleibt die kalzinogene Wirkung erhalten.

Zum Einsatz von *Trisetum flavescens* aufgrund seiner Eigenschaft als Träger von Vitamin D<sub>3</sub>- Metaboliten s. 2.6

## 2.5 Kalzinose

Wie bereits oben beschrieben, wurde das Krankheitsbild der Kalzinose in den verschiedensten Ländern unseres Kontinents beobachtet und konnte somit auch durch Laboruntersuchungen und Versuche in seinen verschiedenen Formen, ausgelöst durch verschiedene Futterpflanzen bei verschiedenen Tierarten, genau untersucht werden.

### 2.5.1 Mechanismus

Kennzeichnend für eine kalzinogene Pflanze ist der Gehalt von einem oder mehreren hormonell aktiven Vitamin D- Metaboliten. Am häufigsten findet sich 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, das, wie bereits oben beschrieben, glykosidisch gebunden ist und daher, anders als das im Organismus vorkommende 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nicht liposondern hydrophil ist.

Nach Abspaltung des Zuckerrestes durch im Verdauungstrakt lokalisierte Enzyme kann es nun die gleichen Reaktionen auslösen wie sein im Organismus gebildetes Pendant.

Durch diese exogene Zufuhr des aktiven Vitamin D werden die normalerweise regulierenden Kontrollmechanismen umgangen, der Organismus mit Vitamin D überschwemmt. In nun viel zu hoher Konzentration regt 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> die verstärkte Bildung von Transportproteinen (CaBP) an, woraus eine vermehrte Resorption von Kalzium und Phosphor aus dem Darm resultiert und damit eine Hypercalciämie und/oder eine Hyperphosphatämie.

Durch die erhöhte Kalziumkonzentration im Blut wird die Freisetzung von Parathormon aus der Nebenschilddrüse gehemmt, die von Calcitonin aus den C-Zellen der Schilddrüse jedoch stimuliert. Diese Stoffwechsellage, als Hypoparathyreoidismus bezeichnet, hemmt die endogene 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Produktion und führt zu einer vermehrten Einlagerung von Kalzium und Phosphor in die Knochen, was eine Osteosklerose nach sich zieht.

Die weiter über den Darm unkontrolliert aufgenommen Mineralstoffe können im Organismus nicht ausreichend verstoffwechselt werden und lagern sich nun in den Weichteilen ab, was zur Kalzinose, einer Verkalkung führt (DIRKSEN et al., 2003, 1971a). Betroffen sind die Weichgewebe einschließlich Aorta, Herz, Nieren, Sehnen, Bänder, Uterus, Darm und Magenschleimhaut.

### **2.5.2 Klinik**

Zu Beginn der chronischen Erkrankung zeigen die betroffenen Tiere progressive Gewichtreduktion mit Verschlechterung des Allgemeinbefindens. Schon weiter fortgeschritten werden die Tiere kachektisch und schweratmig (DIRKSEN et al., 1971a, 1974). Typisch ist bei diesen Tieren eine Körperhaltung mit kyphotischer Rückenlinie, so dass der Rücken bogenförmig aufgekrümmt ist. An der Hinterhand sind die Hüfthöcker aufgrund der starken Muskelatrophie sehr prominent. Der hochgradige Verlust des Körperfetts zeigt sich durch eine deutliche Abzeichnung der Scapula an der Haut sowie eine Steilstellung derer, was durch den starken Abbau des subscapularen Fettes entstanden ist.

Die Atmung erfolgt nur noch über die Bewegung des Zwerchfells, aufgrund der Dyspnoe haben die Tiere einen nach oben gestreckten Kopf und weit gestellte Nasenlöcher. Die Tiere verharren beim Aufstehen lange auf ihren gebeugten Karpalgelenken, bewegen sich nur noch ungern und mit unsicherem, steifem Gang. Bei schnellen Bewegungen, z.B. Flucht, stürzen die Tiere zu Boden (DIRKSEN et al., 1971a, 1974; DÖBEREINER et al., 1971; LYND et al., 1965; CORREA et al., 1993; TOKARNIA et al., 2002). Bei Palpation der Metatarsal- und Metakarpalgelenke ist eine Differenzierung der einzelnen Beugesehnen und des M. interosseus medius nicht mehr möglich (KLEE, 2006). Bei der klinischen Untersuchung zeigen die Tiere weiter Herzarrhythmien und Polypnoe (DIRKSEN et al., 1970).

Wie bereits angedeutet, verhält sich die Erkrankung bei Schafen anders als bei Rindern. Sie sind in der Lage, die verminderte Futteraufnahme und daher fehlende Gewichtszunahme besser zu kompensieren und somit ihr Körpergewicht zu halten (DIRKSEN et al., 2003), so dass bei Weidetieren die Krankheit oftmals zu spät entdeckt wird. Hauptorgansystem ist bei den Schafen das Herz- Kreislauf-System, so dass in schweren Fällen ein akutes Herzversagen auftreten kann. Bei

Rindern wurde dies nur äußerst selten beobachtet. In einem Versuch dazu mit Hobbyschafen von DIRKSEN et al., (2003) starben 4 der 12 Tiere an akutem Herzversagen, 5 mussten aufgrund der chronischen Kreislaufinsuffizienz euthanasiert werden.

Bezüglich der Reproduktionsleistung wurde in einigen Studien beschrieben, dass an Kalzinose erkrankte Tiere in der Gravidität ohne Schwierigkeiten gebären und ihren Nachwuchs säugen könnten (BARROS et al., 1970). Im Gegensatz dazu wurden in anderen Studien, in denen eine experimentelle Intoxikation von Ratten und Kaninchen stattfand, zahlreiche Veränderungen am Nachwuchs beschrieben, so z.B. eine unvollständige Ossifikation der Schädelknochen (MELLO et al., 1999; GORNIK et al., 1999).

### **2.5.3 Pathologisch-anatomische Befunde**

Aufgrund der oben beschriebenen Pathogenese (s. 2.5.1) kommt es zu Verkalkungen. Die Knochen erscheinen kompakter und schwerer, an den Gelenkknorpeln sind körnige Bereiche sichtbar. Bänder und Sehnen sind deutlich verkalkt (CAMBEROS et al., 1970). Auch am Endokard, den Herzklappen und der Intima grosser Gefäße sind diese Veränderungen sichtbar, vor allem die Aorta ist hier stark betroffen (BARROS und GIMENO, 2000). Die Lunge weist in einigen Bereichen ein Bimssteinartiges Aussehen auf. Neben dem Herz-Kreislauf-System ist auch die Niere mit Verkalkungszonen in Mark und Rinde sowie in seltenen Fällen auch die Uteruswand und die Magen- und Darmschleimhaut mit Verdickungen und Verlust der Elastizität betroffen (GILL et al., 1976).

### **2.5.4 Histologie**

Bei der mikroskopischen Betrachtung zeigt sich eine starke Degeneration der elastischen Fasern von Intima und Media der Aorta sowie anderer Arterien. An diesen Stellen finden sich die Mineralablagerungen (VASCONCELOS et al., 1998). Auch die Kollagenfasern der Grundsubstanz sind davon betroffen und sind dadurch für Rupturen prädisponiert (MELLO, 2003). Die Herzmuskelzellen sind deutlich degeneriert, Nekrosen und Verkalkungsherde zum Teil durch Fibrosen ersetzt. Ebenso sind die Alveolarsepten der Lunge degeneriert, es finden sich wie

auch an den Broncheal- und Trachealknorpeln dystrophische Verkalkungen (DIRKSEN et al., 2003).

### **2.5.5 Prophylaxe und Behandlung**

Um gegen die Kalzinose vorzugehen, bieten sich zwei Angriffspunkte: das Weidetier und die Weide selbst.

Man hat bereits mit den verschiedensten Verfahren versucht, das Wachstum der kalzinogenen Pflanzen auf den Weiden einzuschränken. Jedoch konnte weder die Kultivierung der Erde noch das Eintragen konkurrierender Pflanzenarten etwas ausrichten. Auch der Einsatz von Herbiziden zeigte nicht den gewünschten Effekt. So versuchte man mittels Picrolan (4- Amino- 3,5,6- Trichloropicrolsäure) und Glyphosphate nur mit mäßigem Erfolg das Wachstum von *Solanum glaucophyllum* einzudämmen (PUCHE und BINGLEY, 1995). Durch sein tiefgreifendes und ausgedehntes Wurzelsystem scheinen die Nachtschattengewächse hier einen biologischen Vorteil gegenüber anderen Pflanzen zu haben.

Die einzig sinnvolle und wirksame Methode, prophylaktisch gegen die Kalzinose vorzugehen, bleibt also der eingeschränkte Auftrieb auf betroffene Weiden bzw. die Tiere gar nicht mehr auf diese aufzutreiben. In diesem Zusammenhang hat sich auch ein regelmäßiger Umtrieb der Tiere auf andere Weiden bewährt. Dabei wird die dauerhafte Aufnahme der kalzinogenen Pflanzen verhindert und der Grad der Kalzinose vermindert.

Therapeutisch wurden schon mehrere Behandlungsformen versucht, da die Kalzinose unumgänglich wirtschaftliche Verluste mit sich bringt. So wurden beispielsweise schon Komplexbildner wie Kaliumoxalat, Aluminiumhydroxid (NOWOTZIN, 1983) und auch andere Vertreter in ihrer Anwendung versucht. Keine Verbindung erwies sich als wirkungsvoll (DIRKSEN et al., 1983; PUCHE und BINGLEY, 1995). Andere Gruppen versuchten mittels dem Anticoccidiostatikum Monensin die ruminalen Bakterien, die mittels Enzyme die glykosidische Bindung des  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  spalten, in ihrem Wachstum zu behindern (RUKSAN et al., 2000).

Die Tiere sollten bei einer beginnenden Kalzinose umgehend von der Weide verbracht werden mit „Kalzinogene Pflanzen“- freiem Heu gefüttert werden. In

Einzelfällen ist eine Genesung möglich, aber selten und dauert über einen langen Zeitraum, was wiederum den wirtschaftlichen Aspekt dieser Erkrankung betont (LANGELOH und MELLO, 1998). HANICHEN und HERMANN (1990) haben versucht, die Reversibilität der Erkrankung genauer zu betrachten. Neben an Kalzinose erkrankten Weiderindern wurden auch Kaninchen untersucht, bei denen die Kalzinose experimentell durch eine Vitamin D- Überversorgung ausgelöst wurde.

Bei den Rindern konnte nach Gabe einer „kalzinogenen Pflanzen“- freien Fütterung nur eine eingeschränkte Reabsorption der Verkalkungen im Weichteilgewebe festgestellt werden. An der Wand der Aorta waren fibröse Narben zu erkennen. Im Gegensatz dazu fand man bei den Kaninchen eine Reabsorption der Verkalkungen, die offensichtlich von der Dosierung, dem Zeitraum der Vitamin D- Gabe sowie dem involvierten Gewebe abhängig war. An Aortenwand und Sehnen war eine Tendenz zur Demineralisierung erkennbar, ebenso stellenweise knorpelige Metaplasien.

Als Fazit muss verstanden werden, dass aufgrund mangelnder Therapiemöglichkeiten der Kalzinose die prophylaktischen Maßnahmen von höchster Bedeutung sind, um die wirtschaftlichen Schäden, die durch diese Erkrankung bei Weidetieren verursacht wird, so gering wie möglich zu halten bzw. sie zu umgehen.

## **2.6 Therapeutische Ansätze in der Tiermedizin**

Mit der Entdeckung von Vitamin D- Metaboliten in diesen bestimmten Pflanzen und der symptomatischen und ätiologischen Aufklärung des Krankheitsbilds Kalzinose entstand ebenso die Überlegung, ob man durch den gezielten Einsatz dieser Pflanzen Kalziummangelzustände bei Mensch und Tier beheben könnte. Ihr Vorteil gegenüber den synthetischen Vitamin D- Präparaten läge darin, dass sie kostengünstiger und schneller verfügbar wären. Weiter enthalten sie auch den bereits aktiven Metaboliten  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und somit ist im Körper keine Metabolisierung mehr nötig. Ein Problem stellt dabei jedoch die genaue Dosierung dar, denn die Menge der kalzinogenen Metabolite kann, unter Einfluss vom Wuchsalter sowie Klima- und Nährstoffbedingungen während des Wachstums, schwanken (MELLO, 2003).

In der Tiermedizin bieten sich verschiedene Anwendungsgebiete zum Einsatz von kalzinogenen Pflanzen. Die Gebärparese (Milchfieber) beschreibt bei Rindern einen Zustand der Mineralhaushaltentgleisung. Mit Einsetzen der Laktation wird Kalzium über die Milch in hoher Rate ausgeschieden. Der Organismus der Kuh ist nicht in der Lage, diesen Verlust durch Mobilisierung körpereigener Reserven schnell genug wieder aufzufüllen. Es zeigen sich die klinischen Symptome wie Festliegen durch fortschreitende Lähmung der Muskulatur mit deutlicher Hypocalciämie und Hypophosphatämie, Rückgang der Milchleistung und häufig geringgradiger Untertemperatur. In 50 bis 60 % der Fälle endet diese Erkrankung unbehandelt tödlich, was wiederum die wirtschaftliche Bedeutung von Therapie und Prophylaxe hervorhebt. Eine mögliche Therapiemethode stellt die präventive Gabe von Vitamin D<sub>3</sub> und 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vor der Geburt. HOVE und KRISTIANSEN (1982) konnten dadurch das Auftreten der Gebärparese signifikant reduzieren. Auch in einer anderen Untersuchung konnte durch intramuskuläre Gabe von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> fünf Tage vor dem Abkalbetermin eine Gebärparese verhindert werden (GAST et al., 1979). BARLET et al. (1979) stellten in einer Vergleichsstudie dar, dass die Infusion von Kalzium bei tragenden Kühen keine Veränderung des fetalen Kalzium-Plasmaspiegels verursachte, wohl aber die orale Verabreichung von *Solanum glaucophyllum* (25-50 g getrocknete Blätter pro Kuh über 6 Tage) bei trächtigen Kühen einen Anstieg sowohl des Kalziumspiegels des Muttertiers als auch des Fetus bedingt und damit eine Hypocalciämie verhindert. ROUX et al. (1979) bestätigten diese Beobachtung: durch eine Fütterung von 20 bis 30 g getrockneter *Solanum glaucophyllum*-Blätter 8 bis 2 Tage vor dem errechneten Geburtstermin konnte beim Muttertier ein Absinken des Kalzium- und Phosphorspiegels verhindert werden. KUNZ und HÄNICHEN (1981; 1983) beschäftigten mit der systemischen Toleranz der Tiere indem sie 10 bis 20 g von *Solanum glaucophyllum* über 5 Tage oral verabreichten. Nach 19 bis 31 Tagen kam es in unterschiedlichem Ausmaß zu Verkalkungen der Aorta abdominalis. Sie schlossen daraus, dass die bisher zur Gebärpareseprophylaxe beim Rind verwendeten Dosierungen mit einem hohen Risiko an Weichgewebsverkalkungen verbunden waren. Diesen Aspekt griff FRICKE (1985) auf und untersuchte die Wirkung von nicht-calcämischen Dosen auf die Milchfieberprophylaxe. Er stellte fest, dass bei einer ante partum Verfütterung kein positiver Effekt ersichtlich war, hingegen eine Verabreichung von 15 g *Solanum*



glaucophyllum zwei Tage vor und einen Tag nach der Geburt eine prophylaktische Wirkung hatte.

In einer weiteren Studie wurde ein Vergleich zur Prophylaxe der Gebärpause zwischen einem Kalziumpräparat und einem Extrakt aus *Solanum glaucophyllum* angestellt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden noch nicht veröffentlicht. (SCHLÖTTERER- WIESER, 2008). Auch über den in Europa beheimateten Vertreter der kalzinogenen Pflanzen, *Trisetum flavescens*, wurden Untersuchungen zur prophylaktischen Wirkung bei Milchfieber angestellt. DIRKSEN et al. (1981) konnten die Konstanz der kalzinogenen Aktivität nach Grüntrocknung und Cobherstellung beweisen. BUCHELT (1986) nutzte dies für seinen Versuch, in dem er Rinder mit so hergestellten Trisetum- Cobs fütterte. Das Problem dabei lag in der ausreichenden Futteraufnahme der Cobs, denn für eine ausreichend vorbeugende Wirkung mussten 5 bis 6 kg Cobs pro Tag von den Rindern aufgenommen werden.

Ein weiterer kritischer Punkt liegt im Beginn der prophylaktischen Fütterung. Sie muss rechtzeitig vor dem Geburtstermin begonnen werden. Dieser kann aber aufgrund der heutigen Reproduktionstechnik mit Durchführung der künstlichen Besamung nicht immer genau bestimmt werden. Ist der Zeitpunkt nicht richtig gewählt, wird der therapeutische Einsatz erschwert oder gar verhindert (BACHMANN, 2005; DIRKSEN, 2005).

Neben dem Rind findet sich auch beim Eierlegenden Geflügel ein mögliches Anwendungsgebiet. Am Ende der jährlichen Legeperiode kommt es bei den Legehennen zum vermehrten Auftreten von Windeiern (Schale weich, da ungenügend kalzifiziert) oder Brucheiern. Grund hierfür ist eine verminderte 1-Hydroxylase- Aktivität in den Nieren älterer Hennen. RAMBECK et al. (1991) konnten dies mit einem Fütterungsversuch zeigen, im Rahmen dessen die Tiere bei einer zusätzlichen Gabe von 1, 2 und 4  $\mu\text{g}$   $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zu 2800 IE Vitamin  $\text{D}_3$  / kg Futter eine verbesserte Legeleistung zeigten, sowie eine erhöhte Kalziumexkretion über die Eischale. Folglich war also die schlechtere Eischalenqualität mit einer erniedrigten  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  - Syntheseleistung verbunden. Dies war Ausgangspunkt für die Überlegung, ob es möglich ist, mittels kalzinogener Pflanzen das Auftreten von qualitativ minderwertigen Eiern zu verhindern. Die Dosierung von 3,5 % *Solanum glaucophyllum*- Blätter im Futter von Legehennen erzeugte bereits ab dem zweiten Tag der Fütterung eine

deutliche Zunahme der Eischalendicke (MORRIS, 1977). Kurze Zeit später konnten GALLEGO et al. (1979) beobachten, dass bei einer täglichen Gabe von 200 mg getrockneter *Solanum glaucophyllum*- Blätter pro Henne zwar die Eischalendicke zunahm, die Legeleistung aber in Abhängigkeit von der zu hohen Vitamin D-Versorgung abnahm. Da durch das Wissen über die enzootische Kalzinose bei Rindern bekannt war, welche Auswirkungen eine übermäßige Aufnahme von kalzinogenen Pflanzen hatten, war nun das Ziel, niedrigere Dosierungen mit ausreichend kalzinogener Wirkung für *Solanum glaucophyllum*- Präparate zu finden. REICHENBÄCHER (1979) untersuchte hierzu nun den Einfluss von 0,3 % *Solanum glaucophyllum* sowie von 15 % *Trisetum flavescens* im Futter von Legehennen. Während bei *Solanum* in dieser niedrigen Dosierung kein positiver Effekt an der Eischale zu verzeichnen war, bedingte *Trisetum* eine deutliche Zunahme der Eischalendicke. Beide Präparate konnten jedoch auch in niedrigen Dosierungen die Legeleistung verbessern. Auch in der Geflügelmast wurde die Wirkung von kalzinogenen Pflanzen untersucht. CHENG et al. konnten 2004 zeigen, dass 7,5 g *Solanum glaucophyllum* in Kombination mit 1200 IE/ kg Phytase bei Broilern eine Gewichtszunahme, einen Anstieg des Kalzium- und Phosphatspiegels sowie des Mineralstoffgehalts im Knochen bedingte. Phytinsäure, eine möglich enthaltene Komponente im Futter, ist in der Lage Phosphor zu binden und es damit für den Organismus nicht verfügbar zu machen. Das Enzym Phytase spaltet die Phytinsäure und hebt damit ihre Wirkung auf. Auch in der Humanmedizin können Präparate aus kalzinogenen Pflanzen Einsatz finden. Versuchsweise wurden sie bei chronischer Niereninsuffizienz eingesetzt, um  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zu substituieren und damit die intestinale Kalziumresorption zu steigern (HERRATH et al., 1974; MAUTALEN et al., 1977). Versuche an Ratten von VON ROSENBERG (2006) konnten die knochenprotektive Wirkung von *Solanum glaucophyllum* und *Trisetum flavescens* im Osteoporose- Modell belegen. Daraus geht ein möglicher Einsatz der kalzinogenen Pflanzen als Alternative zu den bisher in der Humanmedizin verwendeten Medikamenten hervor.

### **3 Material und Methoden**

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen von zwei Versuchen die biologische Aktivität bestimmter Pflanzenextrakte im Vergleich zu verschiedenen Vitamin D<sub>3</sub>-Präparaten im Wachteleischalentest beurteilt. Dabei wurde neben einfachem Vitamin D<sub>3</sub> in verschiedenen Konzentrationen auch die biologisch aktive Form, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> verwendet, ebenfalls verschieden konzentriert. Des weitern wurden in beiden Durchgängen verschiedene Präparate von *Solanum glaucophyllum* und *Trisetum flavescens* eingesetzt.

#### **3.1 Versuchstiere**

In beiden Versuchsdurchläufen wurden Wachtelhennen der Art *Coturnix coturnix japonica* eingesetzt. Um eine möglichst hohe Einheitlichkeit des Genmaterials der Versuchspopulation zu gewährleisten, wurden deshalb ausschließlich Tiere aus der institutseigenen Zucht verwendet. Das Alter der Tiere betrug in beiden Versuchsdurchläufen bei Einstallung 3 Monate.

#### **3.2 Versuchstierhaltung, Pflege der Tiere**

Die Unterbringung der Tiere erfolgte in einem fensterlosen Stall auf dem Institutsgelände Oberwiesenfeld. Die Drahtkäfige waren in sechs Reihen angeordnet, dabei standen jeweils vier Käfige nebeneinander und vier übereinander.

Der Futtertrog war an der Vorderseite des Käfigs eingehängt und somit auch einfach herauszunehmen. Er war mit einer verstellbaren Drahtschiebetür abgedeckt, so dass übermäßiges Futterverstreuen weitgehend vermieden wurde. Ebenso befanden sich an der Vorderfront des Käfigs zwei Nippeltränken. Futter und Wasser waren den Tieren ad libitum zugänglich.

Unter jedem Käfig befand sich ein Kotblech, auf dem sich der Kot der Tiere sammelte.

Mittels Leuchtstoffröhren wurden die Käfige 24 Stunden pro Tag beleuchtet. Die Beheizung und Belüftung des Stalles wurde durch eine mit einer Belüftungsanlage kombinierten Warmwasserheizung (Centratherm CK-R, Fa. Centra-Buerkle, Schönaich) bewerkstelligt. Die Temperatur, Luftfeuchte und der Luftwechsel entsprachen dabei den vorgeschriebenen Haltungsbedingungen.

Einmal täglich wurde der Gesundheits- und Pflegezustand der Tiere kontrolliert. Dies schloss neben den Tränk- und Futtereinrichtungen auch den Käfig selbst ein, um möglichen Verletzungen der Tiere vorzubeugen. Einmal wöchentlich wurde der Kot vom Blech entfernt und dieses gereinigt.

### **3.3 Versuchsaufbau**

In beiden Durchgängen gegliederte sich der Versuchsablauf in drei Phasen.

In der ersten Phase, der Kontrollphase, welche eine Woche andauerte, wurden jeden Tag zur selben Tageszeit die Eier aus jedem einzelnen Käfig entnommen und gezählt. Am Ende dieser Woche wurde auf Basis der ermittelten Daten die Legeleistung für jeden Käfig bestimmt. Als Mindestanforderung, um in die zweite Versuchsphase übernommen zu werden, musste die Käfiggruppe eine konstante Legeleistung von mind. 80 % erreichen.

In den darauf folgenden zwei bis drei Wochen wurden die Wachtelhennen mit Vitamin D - armen Futter gefüttert, um deren Kalziumreserven in den Knochen zu erschöpfen (Depletionsphase). Die Tiere legten am Ende dieser Phase entweder gar keine Eier mehr oder nur so genannte Windeier, welche über keine Schale mehr verfügen, sondern der Eiinhalt nur durch die Eihaut zusammengehalten wird.

In der sich anschließenden eigentlichen Versuchsphase, welche sich im ersten Durchgang über 15 Tage, im zweiten über einen Zeitraum von 21 Tagen erstreckte, wurde den Tieren gruppenweise Präfraktionen mit unterschiedlichen Vitamin D<sub>3</sub>-Konzentrationen angeboten. Wie auch in der Kontrollphase wurden jeden Tag zur selben Tageszeit die Wachteleier entnommen und deren Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag für jeden Käfig einzeln bestimmt.

Nach Ablauf der Testphase wurden im ersten Versuch 150 Tiere, im zweiten Versuch alle verbliebenen Tiere durch Dekapitation getötet und Blut-, Knochen- sowie

Leberproben entnommen. Im ersten Versuch wurden die Tiere zusätzlich vor der Tötung gewogen.

### 3.4 Versuchsgruppen

Die Versuchsgruppen wurden nach der in der Vorphase ermittelten Legeleistung randomisiert den einzelnen Versuchsgruppen zugeteilt. Im ersten Versuch wurden insgesamt nach Ermittlung der Legeleistung 225 Tiere eingestallt. Es wurden 15 Gruppen gebildet, die aus je drei Käfigen mit einem Besatz von jeweils fünf Tieren bestanden.

Im zweiten Versuch wurden 17 Gruppen gebildet. Die Besetzung der Käfige wurde auf sechs Tiere aufgestockt. Auch hier bildeten drei Käfige eine Gruppe. Somit nahmen am zweiten Durchgang 306 Wachtelhennen teil.

Die Käfige einer Gruppe wurden so im Stall verteilt, dass geringfügige Unterschiede in der Beleuchtung und Temperatur ausgeglichen werden konnten.

### 3.5 Fütterung, eingesetzte Präparate und deren Dosierungen

In der Kontrollphase sollte die Legeleistung der Tiere unter normalen Bedingungen beurteilt werden. Zu diesem Zweck erhielten sie ein bilanziertes Wachtelalleinfuttermittel auf der Basis von Sojaschrot, welches eigens vom Institut für Tierernährung der LMU München gemischt wurde. (Tab.3.1)

**Tabelle 3.1:** Bilanziertes Wachtelalleinfutter

	% der Trockenmasse
Rohprotein	26,4
Rohfett	7,1
Rohasche	13,7
Rohfaser	3,9
N-freier Extrakt	48,9

Kennzeichnend für die Depletionsphase war die Fütterung mit einem Futter, welches auch als Vitamin D<sub>3</sub>- frei bezeichnet wird. Dies ist allerdings so nicht ganz richtig, da die Herstellung eines vollständig Vitamin D<sub>3</sub>- freien Futters nicht ohne Weiteres möglich ist. Die hier verwendeten Präparate sind somit als Vitamin D<sub>3</sub>- arm zu bezeichnen.

Bei dem eingesetzten Vitamin D<sub>3</sub> handelte es sich um ein Präparat der Firma Roche (Rovimix® D<sub>3</sub>-500, Firma Hoffmann- La Roche AG, Grenzach- Wyhlen, Deutschland), welches einen Mindestgehalt von 500.000 IE pro Gramm an Vitamin D<sub>3</sub> enthielt. Im ersten Versuch wurden als Standardrationen die Dosierungen 100 IE/kg Futter, 200 IE/kg Futter und 400 IE/kg Futter eingesetzt, im zweiten Durchgang zusätzlich noch die Dosierung 50 IE/kg Futter.

Weiter wurden im ersten Durchgang des Versuchs drei verschiedene Dosierungen von 1,25- Dihydroxy- Vitamin D<sub>3</sub> verwendet. Dieses Präparat stammt von der Firma FLUKA, Buchs, Schweiz. Im zweiten Durchgang wurde stattdessen PAN-HVD eingesetzt, was für Panbonis Herbal Vitamin D<sub>3</sub> steht und einen Solanum glaucophyllum- Extrakt darstellt. Auch diese Substanz wurde in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Die Vitamin D<sub>3</sub>- Substanzen dienten als Bezugsration für die biologische Effektivität der eingesetzten Extrakte kalzinogener Pflanzen.

In beiden Versuchen wurden weiter Extrakte von *Trisetum flavescens* sowie von *Solanum glaucophyllum* in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Das Solanum- Präparat des ersten Versuchs wird als Solbone P und Solbone PP bezeichnet (purified extract of *Solanum glaucophyllum*), das im zweiten Versuch verwendete als Solbone-A-CWS. Die Extrakte der kalzinogenen Pflanzen zur Durchführung dieses Wachteleischalentests wurden uns freundlicherweise von der Herbonis AG, Basle, Switzerland, zur Verfügung gestellt.

Die genaue Verteilung und Bezeichnung der Substanzen finden sich in Tab. 3.2 und 3.3 .

**Tabelle 3.2:** Eingesetzte Präparate und Dosierungen im ersten Versuch

<b>Gruppe</b>	<b>Tierzahl</b>	<b>Präparat</b>	<b>Dosierung/kg Futter</b>
1	15	Vitamin D <sub>3</sub>	100 IE
2	15	Vitamin D <sub>3</sub>	200 IE
3	15	Vitamin D <sub>3</sub>	400 IE
4	15	1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	0,5 µg
5	15	1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1 µg
6	15	1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	2 µg
7	15	Solbone P	5 mg
8	15	Solbone P	20 mg
9	15	Solbone P	80 mg
10	15	Solbone P	320 mg
11	15	Solbone PP	8 mg
12	15	Solbone PP	32 mg
13	15	Trisbone	2 g
14	15	Trisbone	8 g
15	15	Trisbone	32 g

**Tabelle 3.3:** Eingesetzte Präparate und Dosierungen im zweiten Versuch

<b>Gruppe</b>	<b>Tierzahl</b>	<b>Präparat</b>	<b>Dosierung/kg Futter</b>
1	18	Vitamin D <sub>3</sub>	50 IE
2	18	Vitamin D <sub>3</sub>	100 IE
3	18	Vitamin D <sub>3</sub>	200 IE
4	18	Vitamin D <sub>3</sub>	400 IE
5	18	PAN-HVD	0,25 g
6	18	PAN-HVD	0,5 g
7	18	PAN-HVD	1,0 g
8	18	PAN-HVD	2,0 g
9	18	PAN-HVD	4,0 g
10	18	Solbone A-CWS	0,05 g
11	18	Solbone A-CWS	0,1 g
12	18	Solbone A-CWS	0,2 g
13	18	Solbone A-CWS	0,4 g
14	18	Solbone A-CWS	0,8 g
15	18	Trisbone F	2 g
16	18	Trisbone F	4 g
17	18	Trisbone F	8 g

### 3.6 Untersuchte Parameter

#### 3.6.1 Mortalitätsrate

Über die gesamte Versuchsdauer hinweg wurde täglich der Gesundheitsstatus der Tiere adspektorisch kontrolliert. Tote Tiere wurden ersatzlos entfernt, die erniedrigte Tierzahl vermerkt und das aktuelle Bruttogewicht des Futtertrogs gemessen und ebenfalls dokumentiert.



### **3.6.2 Futtermittelverzehr**

Im Anschluss an die Depletionsphase wurden die Futtertröge gereinigt, bevor sie mit dem eigentlichen Versuchsfutter bestückt wurden. Hierbei wurde für jeden einzelnen Käfig einer Gruppe die Menge des eingefüllten Futters auf einer Waage der Firma Mettler PS 15 mit angeschlossenen Rechner der Firma Hewlett-Packard (Modell 46) gewogen, wie auch alle drei bis vier Tage, wenn das Futter nach Bedarf aufgefüllt wurde. Am Schlachttag wurde das übrig gebliebene Futter durch Bestimmung des Bruttogewichts der Tröge ausgewogen. Aus den so erhobenen Daten konnte nun der Futtermittelverzehr pro Wachtel und Tag errechnet werden.

Um eine mögliche Verfälschung der Werte durch Futtermittelverluste weitgehend auszuschließen, wurden die Futtertröge so gesichert, dass die Tiere zwar ständig uneingeschränkter Zugang zu den Trögen hatten, jedoch ein übermäßiges Verstreuen des Futters durch „Baden“ im Futtertrog verhindert wurde.

### **3.6.3 Tiergewichte**

Die Tiergewichte wurden nur für den ersten Versuch ermittelt. Dazu wurden die Tiere zum einen bei der Einstellung käfigweise gewogen und somit das Durchschnittsgewicht pro Gruppe errechnet. Am Schlachttag wurden die Tiere das zweite Mal gewogen, hier allerdings einzeln, so dass für jedes Tier sein individuelles Gewicht bestimmt werden konnte. Im zweiten Durchgang wurde auf die Erhebung der Gewichtsdaten verzichtet.

### **3.6.4 Legeleistung**

In der Testphase beider Versuchsdurchläufe wurden jeden Tag zur selben Tageszeit (9 Uhr +/- 2 Stunden) die Eier aus den Käfigen gesammelt, gezählt und in mit der Käfignummer beschrifteten Plastikschälchen bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Die Zahl der gelegten Eier wurde notiert, Windeier oder zerbrochene Eier, bei denen bereits der Eihalt ausgeflossen war oder Teile der Schale fehlten, wurden für die Auswertung nicht berücksichtigt, jedoch notiert.

### 3.6.5 Eischalentrockengewicht

Nach der oben beschriebenen Bestimmung der Legeleistung wurden die Eier im Labor mit einer Schere vorsichtig eröffnet, so dass keine Schalenanteile verloren gingen. Der Eidotter und das Eiklar wurden verworfen und die Schalenhälften mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) gründlich ausgespült, um jegliche Reste zu entfernen. Die Schalen wurden dann auf mit der Käfignummer beschrifteten Petrischalen gelegt und für 24 Stunden bei 103°C in den Trockenofen (Fa. Memmert, V60) gestellt.

Vor Messung des Trockengewichts durchliefen die Petrischalen nach Ablauf der 24 Stunden eine einstündige Abkühlung im Exsikkator (Glaswerk Wertheim). Danach wurde auf einer Analysewaage (Fa. Mettler AE 160, Wagebereich 0-160 g, Messgenauigkeit  $10^{-4}$ ) das Gewicht der Eischalen bestimmt.

Unter Berücksichtigung der Tierverluste wurde nun aus der Summe der Eischalentrockengewichte der jeweiligen Käfigeinheit das Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag bestimmt. Um diesen Wert auf eine Gruppe und somit auf eine bestimmte Futterration beziehen zu können, wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der Eischalentrockengewichte der einzelnen Käfigeinheiten errechnet.

### 3.6.6 Knochenaschegehalt

Am Versuchsende wurden die Tiere durch Dekapitation getötet und bei jedem Tier beide Hinterextremitäten im Bereich des Hüftgelenks und des Intertarsalgelenks abgesetzt. Sie wurden in nach Tiernummern beschrifteten Plastiktüten einzeln verpackt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

Zur Verarbeitung wurden die Proben aufgetaut, jeweils das rechte Bein entnommen und mit einer Flügelmarke (Fa. Hauptner) gekennzeichnet. Das linke Bein wurde als Rückstellprobe wieder eingefroren. Nach dem Auftauen wurden Muskeln, Sehnen und Knorpel vom Knochen abgelöst. Nach gründlichem Entfernen aller Weichteile wurde der freipräparierte Femurknochen auf einer mit der Tiernummer beschrifteten Petrischale für 24 Stunden in den Trockenschrank (Fa. Memmert) gestellt. Nach Ablauf dieser Frist und einer einstündigen Abkühlphase im Exsikkator wurde das Trockengewicht des Knochens mit einer Analysewaage (Fa. Mettler AE 160) auf  $10^{-4}$ g genau bestimmt.

Zur Bestimmung des Aschegehaltes wurde der getrocknete Knochen in einem beschrifteten Tiegel für 24 Stunden bei 550°C im Muffelofen der Fa. Heraeus verascht

und nach entsprechender Abkühlungszeit im Exsikkator die Asche auf oben genannter Analysewaage gewogen.

Diese Größe wurde für jedes Tier einzeln und in beiden Versuchsdurchgängen bestimmt.

### **3.6.7 Kalziumgehalt der Knochenasche**

Für weitere Analysevorgänge wurde die Knochenasche eines jeden Tieres in nummerierte Reagenzgläser aus Plastik überführt. Um die Asche aufzulösen, wurde sie mit 1 ml 37% Salzsäure versetzt und dann mit Aqua dest, auf 10 ml aufgefüllt. Um die für die Messung erforderliche Konzentration von 1:1000 zu erreichen, wurden aus der genannten Lösung 100 µl in ein weiteres Reagenzglas überführt und wiederum mit Aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt.

Die Messung des Kalziumgehalts der Knochenasche wurde nun mittels eines Flammenphotometers (EFOX 5053, Eppendorf AG, Hamburg) bestimmt.

Nachdem 1 ml Probe in Eppendorfcups (Eppendorf AG, Hamburg) pipettiert wurden, erfolgte die Messung im Flammenphotometer. Die Funktionsweise eines solchen Gerätes besteht darin, die Lösung anzusaugen und mittels Druckluft durch einen Zerstäuber fein zu verteilen. Das dabei entstehende Aerosol wird mit Brenngas (Acetylen) gemischt und in die Flamme injiziert. Die ausgestrahlte Lichtmenge verhält sich proportional zur Menge der im Aerosol enthaltenen Atome. Durch die Messung der Lichtintensität kann somit auf die Konzentration eines Elements in der Probe geschlossen werden. Jedes Element erzeugt eine für es charakteristische Flammenfarbe bestimmter Wellenlänge. Durch einen Spektralfilter können diese selektiert und photoelektrisch gemessen werden.

### **3.6.8 Kalziumgehalt im Serum**

Für die Bestimmung des Serumkalziumwertes wird das oben genannte Flammenphotometer EFOX 5053 der Fa. Eppendorf, Hamburg verwendet.

Das tiefgefrorene Serum wurde dazu langsam bei Raumtemperatur aufgetaut und eine 1:5 Verdünnung angelegt. Hierzu werden 100 µl Probe und 400 µl Aqua dest. miteinander in ein Eppendorf Röhrchen pipettiert. Danach wurde vorgegangen wie bei der Bestimmung des Kalziumgehalts im Knochen.

### **3.6.9 Aschegehalt der Leber**

Am Tag der Schlachtung wurden im ersten Versuch von allen getöteten Tieren die Lebern entnommen, gewogen, einzeln in beschrifteten Bechern verpackt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren.

Am Tag der Bearbeitung wurden die Lebern aufgetaut und für mind. 24 Stunden in den Trockenschrank (Fa. Memmert) gestellt. Nach einer zweistündigen Abkühlphase im Exsikkator wurden die Lebern auf einer Analysewaage (Fa. Mettler, AE 160) auf  $10^{-4}$ g genau gewogen. Im Anschluss wurden die Lebern in beschriftete Tiegel überführt und bei 550°C für mind. 24 Stunden in den Muffelofen (Fa. Heraeus) verbracht und verascht. Nach Ablauf dieser Frist und einer zweistündigen Abkühlung im Exsikkator wurde auf der oben genannten Analysewaage das Gewicht der Asche der Lebern bestimmt.

### **3.6.10 Kalziumgehalt der Leber**

Nach Bestimmung des Aschegehaltes wurde die Leberasche zur weiteren Bearbeitung im Labor in 1 ml Salzsäure gelöst und in beschriftete Reagenzgläser aus Plastik überführt. Dann wurde bis auf 10 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und somit eine 1:10 Verdünnung hergestellt, aus der heraus dann der Kalziumgehalt bestimmt wurde. Auch hier erfolgte die Messung nach bekanntem Vorgehen mit einem Flammenphotometer der Fa. Eppendorf, Modell EFOX 5053.

### 3.6.11 ALP- Aktivität im Serum

Dieser Wert wird spektralphotometrisch mittels eines Photometers Genesys 10 UV, Fa. Thermo Spectronic bestimmt. Eine konstante Temperatur der Serumproben von 37 °C ist für diese Messung unerlässlich, da es sich um eine temperaturabhängige, enzymatische Reaktion handelt. Dies wird durch eine beheizte Küvettenhalterung im Photometer ermöglicht.

Das Serum wurde aus der Tiefkühltruhe entnommen und im Heizblock (Fa. Liebisch) bei 37°C aufgetaut und konstant hierauf gehalten. Ebenso wurde das in Küvetten (Plastibrand, 1,5ml halbmikro, Cat.No. 759015) pipettierte Puffer-Reaktionslösungsgemisch in den Heizblock verbracht.

Mit einem Plastikrührspatel (Fa. Sarstedt, Best.Nr.81970) wurden 1000 µl Puffer-Reagenzlösung und 20 µl Plasma in der Küvette vermischt und in das Photometer verbracht. Bei einer Wellenlänge von 405 nm wurde die Extinktion nach einer halben Minute (Vorlaufzeit), nach einer, zwei, drei sowie vier Minuten gemessen. Chemische Grundlage dieser Messung stellt die Abspaltung eines Phosphatrestes von der Reagenz Nitrophenylphosphat durch die Anwesenheit der Alkalischen Phosphatase im Serum dar. Als Endprodukte dieser Reaktion entstehen Nitrophenolat- Anionen, welche im alkalischen Milieu eine Gelbfärbung bedingen. Diese kann photometrisch optimalerweise bei 405 nm gemessen werden.

Da es sich um eine enzymatische Reaktion handelt, die im zeitlichen Verlauf auch weiter voranschreitet, wurde die Extinktion zu drei Zeitpunkten im Abstand von jeweils einer Minute gemessen.

#### Reagenzien:

- Zur Herstellung der 100 ml Pufferlösung (pH 10,4):
  - 23,3 ml Alkalische Pufferlösung 221  
2-Amino-2-methyl-1-propanol buffer 1,5 mol/l, pH 10,3 at 25°C  
Lot 051 K 605, Best.Nr. 221  
Fa. Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis, USA
  - 74,44 mg Ethylendiamintetraessigsäure-dinatriumsalz (EDTA-2Na)  
Lot.Nr. 6858C, Cat.Nr. 152522  
Fa. ICN Biomedicals GmbH, D-Eschwege
  - 42,89 mg Magnesium- Tetrahydrat  $[(CH_3COO)_2Mg \cdot 4H_2O]$  p.a.

Charge A 322119 217, Best. Nr. 105819

Fa. Merck, D-Darmstadt

- 28,75 mg Zinksulfat- Heptahydrat ( $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) p.a.

Charge TA 1021 783 221, Best.Nr.108883

Fa. Merck, D-Darmstadt

- Millipur zum Auffüllen
- Reaktionssubstrat:  
p- Nitrophenylphosphat Disodiumsalt Hexahydrate ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_6\text{PNa}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )  
Lot.No. 2732E Cat.No. 100878  
Fa. ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA
- Zur Herstellung des Puffer- Reaktionslösungsgemisches:  
148,4 mg Reaktionssubstrat in 100 ml Puffer

### 3.7 Weender- Analyse

Mittels dieses Verfahrens ist es möglich, den Nährstoffgehalt eines Futters zu bestimmen. Hierzu wurden in beiden Versuchsdurchgängen alle Rationen untersucht.

#### 3.8.1 Trockensubstanz- Bestimmung

Für die Bestimmung der Trockensubstanz des Futters wurden etwa 100 bis 150 g der Ursprungssubstanz zerkleinert, im Mörser weiter verfeinert und im Anschluss bis zur Gewichtskonstanz bei  $103^\circ\text{C}$  im Trockenschrank getrocknet. Die Trockensubstanz in % der ursprünglichen Substanz ergab sich aus dem nichtflüchtigen Anteil des Futters.

#### 3.8.2 Rohfaser- Bestimmung

Verwendete Materialien und Geräte:

- Foss Fibertec hot extractor 2010, Foss, Hamburg
- Fibertec cold extractor 1021, Foss, Hamburg
- Glasfiltertiegel mit eingeschmolzenem gesintertem Glasfilter, Foss, Hamburg
- Filtrationshilfsmittel: Celite 545, Art. Nr. 102693, Merck, Darmstadt

- Antischaummittel Octanol, Art. Nr. 100991, Merck, Darmstadt
- Schwefelsäure 1,25 %ig, Art. Nr. 109912, Merck, Darmstadt
- Kalilauge 1,25 %ig, Art. Nr. 109918, Merck, Darmstadt
- Bidestilliertes Wasser, Reinstwasseranlage der Serie Ultra Clear, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel
- Trockenschrank Heraeus Funktion Kine, Kendro, Langenselbold
- Muffelofen Controller P320 30- 3000°C, Nabertherm, Lilienthal
- Exsikkator aus Glas, bezogen von VWR International GmbH, Wien, Österreich

Durchführung:

Für die Bestimmung der Rohfaser wurden die getrockneten Proben aus der TS-Bestimmung verwendet. Nach Wiegen der leeren Fritten erfolgte die Futtereinwaage von etwa 1 g (auf 0,1 mg genau), unter Zusatz von etwa 0,2 g Celite als Filtrationshilfsmittel zu jeder Probe (auf 0,1 mg genau).

Die Proben wurden nun im Fibertec hot extractor mit Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,25 %ig) und Kalilauge (KOH, 1,25 %ig) gekocht. Beim Beginn der Schaumentstehung mussten 1 bis 2 Tropfen Octanol hinzugegeben werden. Nach jedem der beiden Säurekochgänge erfolgte eine dreimalige Spülung mit Reinstwasser. Die Glasfiltertiegel wurden dann für etwa 1 h bei 103°C im Trockenschrank getrocknet und nach einer etwa 30minütigen Abkühlphase im Exsikkator mit der Analysewaage gewogen. Danach erfolgte bei 520°C die Veraschung im Muffelofen. Die Rohfasermenge ergab sich nun aus der Differenz der Glasfiltertiegel mit der Futtereinwaage als Trockensubstanz und dem Gewicht des Glasfiltertiegels nach der Veraschung abzüglich der Celiteeinwaage.

### **3.8.3 Rohasche- Bestimmung**

In seiner ursprünglichen Substanz wurde das Futter für diesen Analyseschritt in Porzellantiegel eingewogen und für etwa 36 h bei einer Temperatur von 550°C im Muffelofen verascht. Durch anschließendes Wiegen konnte die Rohasche ermittelt und in Prozent der ursprünglichen Substanz angegeben werden.

### 3.8.4 Rohprotein- Bestimmung

Zur Bestimmung des Rohproteins findet das Kjeldahlverfahren Anwendung. Hierbei wird der im gesamten Futter enthaltene Stickstoff ermittelt, wodurch dann der Proteingehalt in Prozent mit Hilfe des Umrechnungsfaktors ( $N \times 6,25$ ) berechnet werden kann.

Materialien und Geräte:

- Foss Kjeltac 2400, Dispenser 0-25 ml, Foss, Hamburg
- Schwefelsäure 98 %ig, Art. Nr. 100748, Merck, Darmstadt
- Natronlauge 21 %ig, Art. Nr. 105593, Merck, Darmstadt
- Natronlauge 32 %ig, Art. Nr. 105590, Merck, Darmstadt
- Salzsäure 0,2 n, Art. Nr. 113134, Merck, Darmstadt
- Borsäurelösung 1 %ig, Art. Nr. 100160, Merck, Darmstadt
- Kjeltabs Cu/3,5 (3,5 g  $K_2SO_4$ + 0,4 g  $CuSO_4 \times 5H_2O$ ), VWR International GmbH, Wien, Österreich

Durchführung:

0,5 g bis 1 g Futter Ursprungssubstanz werden in eine 250 ml Tube eingewogen und ein bis zwei Kjeltabs und 10 ml konzentrierte  $H_2SO_4$  mit dem Dispenser hinzu gegeben. Die Probe wird bei  $380^\circ C$  im Aufschlussblock gekocht, wobei der Stickstoff in Ammoniumsulfat übergeht. Im anschließenden Destillierprozess wurde der Stickstoff unter Zugabe von Natronlauge als  $NH_3$  in eine Vorlage aus Borsäure überführt. Mittels Titration mit Salzsäure konnte der  $NH_4OH$ - Gehalt in der Vorlage ermittelt und somit die Stickstoffmenge erfasst werden. Die Umrechnung von Stickstoff auf % Rohprotein erfolgte automatisch.

### 3.8.5 Rohfett- Bestimmung

Geräte:

- Soxtec Avanti 2050, Foss, Hamburg
- Soxlet- Hülsen, Foss, Hamburg
- Siedesteinchen (Glasperlen), bezogen von VWR International GmbH, Wien, Österreich
- Petrolether ( $40- 60^\circ C$ ), Art. Nr. T173.3, Roth, Karlsruhe



- Trockenschrank
- Glasmörser (AH00 Staatl. Berlin)

Durchführung:

Für die Fettextraktion wurden die Futterproben in einem Mörser zerkleinert und per Analysewaage 1 bis 2 g mittels eines Hülsenträgers direkt in die Filterhülsen eingewogen. Das Gewicht des unteren Topfes mit drei Siedesteinchen wurde notiert. Der Fettextractor wurde anschließend mit den Probegefäßen bestückt, die Extraktionshülsen mit 80 ml Petroläther gefüllt und mit Programm 1 bis 135°C extrahiert. Nach der Trocknung der Töpfe mit den Glasperlen und dem Fett während 60 min bei 103°C im Trockenschrank und anschließender Abkühlung im Exsikkator konnte das Rohfett in Prozent durch die Gewichts Differenz bestimmt werden.

### 3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gesammelten Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SigmaStat, Version 3.00, Systat Software Inc., Richmond, CA, USA.

Die Ergebnisse der Analysen in dieser Arbeit wurden als arithmetischer Gruppenmittelwert (MW) mit der dazugehörigen Standardabweichung (SD) angegeben.

In dieser Arbeit wurden mittels Sigma Stat 3.0 nur Vergleichsuntersuchungen ohne Verlaufsuntersuchungen angestellt. Die Untersuchung auf Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (One Way ANOVA), wobei die Gruppen versus der drei bzw. vier Kontrollgruppen verglichen wurden. Im ersten Versuch wurden drei Kontrollgruppen verschiedener Vitamin D<sub>3</sub> - Konzentrationen verwendet, im zweiten Versuch vier verschiedene Vitamin D<sub>3</sub> - Konzentrationen. Es wurde hierbei die Dunn's Methode angewandt. Wurden signifikante Unterschiede gegenüber einer Kontrollgruppe gefunden, wurde für jedes Gruppenpaar  $p$  angegeben. Dabei steht  $p$  für die Irrtumswahrscheinlichkeit, d.h. wenn  $p < 0,05$ , liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % und zwischen den beiden verglichenen Gruppen besteht ein signifikanter Unterschied. Ist  $p > 0,05$ , besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden verglichenen Gruppen.

Lag die Irrtumswahrscheinlichkeit zweier Gruppen deutlich unter 5 %, wurde der Holm-Sidak- Test angewandt. Er ist der derzeit empfohlene Test für paarweise Vergleichsstudien. Das Vergleichsprinzip stellt hier eine multifaktorielle Varianzanalyse dar. Wurde eine noch geringere Irrtumswahrscheinlichkeit als mit der Dunn's Methode gefunden, so wurde der Unterschied als hochsignifikant eingestuft und entsprechend mit  $\rho < 0,01$  und  $\rho < 0,001$  angegeben.

Signifikanzen gegenüber den Kontrollgruppen wurden mit folgenden Symbolen gekennzeichnet:

* ( $\rho < 0,05$ )	** ( $\rho < 0,01$ )	*** ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 1
◇ ( $\rho < 0,05$ )	◇◇ ( $\rho < 0,01$ )	◇◇◇ ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 2
◆ ( $\rho < 0,05$ )	◆◆ ( $\rho < 0,01$ )	◆◆◆ ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 3
▽ ( $\rho < 0,05$ )	▽▽ ( $\rho < 0,01$ )	▽▽▽ ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 4 (nur zweiter Versuch)

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Versuch 1

#### 4.1.1 Mortalität

Die Wachteln zeigten in allen Phasen des ersten Versuchsdurchlaufes ein unauffälliges Allgemeinbefinden.

Während der über 15 Tage laufenden Testphase starben von den 225 eingestellten Wachtelhennen insgesamt 5 Tiere. Zwei Tiere mussten aufgrund von starkem Kümern ohne weitere konkrete Symptome getötet werden, drei Tiere verstarben an Erkrankungen der Legeorgane. Dies entspricht einer Gesamtmortalitätsrate von 2,22 %.

In der Gruppe, die 2 g Trisetum flavescens/ kg Futter als Zusatz bekamen, verstarben zwei Tiere und eines musste aufgrund hochgradigen Kümerns getötet werden. Die Mortalitätsrate für die Gruppe mit dem Zusatz 2 g Trisetum flavescens/kg Futter beträgt damit 20,0 % und stellt den höchsten Verlustwert einer einzelnen Gruppe dar.

#### 4.1.2 Futterverzehr

Der durchschnittliche Futterverzehr pro Tier und Tag beträgt im ersten Versuch 26,70 g. Den höchsten Verbrauch mit 28,08 g zeigt die Gruppe mit 32 g Trisetum flavescens als Futterzusatz. Der niedrigste Wert findet sich bei der Gruppe mit dem Futterzusatz 100 IE Vitamin D<sub>3</sub>.

Der durchschnittliche Futterverbrauch pro gelegtes Ei beträgt hier 81,19 g. Bei diesem Parameter zeigen sich hochgradige Schwankungen zwischen den einzelnen Gruppen, somit zeigt die Gruppe mit 5 mg Solbone P den höchsten Wert an (608,19 g), hingegen die Gruppe mit 320 mg Solbone P mit 37,35 g den niedrigsten Wert. Genaue Werte sind folgender Tabelle zu entnehmen.

Der durchschnittliche Verbrauch pro Gramm Eischalen- TS beträgt 112,49 g. Es kann keine deutliche Tendenz innerhalb der Gruppen in Abhängigkeit der Dosierungssteigerung erkannt werden. Sowohl höchster als auch niedrigster Wert finden sich in der Solbone P Gruppe: 5 mg Solbone P mit einem Verbrauch von 841,36 g sowie bei 80 mg Solbone P ein Verbrauch von 43,32 g pro Gramm Eischalen- TS.

**Tabelle 4.1:** Durchschnittlicher Futterverbrauch pro Tier und Tag [g], pro Ei [g] und pro Gramm Eischale [g], Versuch I

Diätzusätze/ kg Futter	Futterverbrauch pro Tier und Tag [g] $\bar{x}$	Futterverbrauch pro Ei [g] $\bar{x}$	Futterverbrauch pro Gramm Eischale [g] $\bar{x}$
100 IE Vitamin D <sub>3</sub>	20,17	81,60*	120,20*
200 IE Vitamin D <sub>3</sub>	27,23	46,53	54,65
400 IE Vitamin D <sub>3</sub>	26,63	46,98	56,28
0,5 µg 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	26,42	57,14	76,75
1 µg 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	25,64	40,63	49,11
2 µg 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	27,76	40,58	46,53
5 mg Solbone P	22,47	608,19*	841,36*
20 mg Solbone P	24,40	67,99*	101,29*
80 mg Solbone P	24,67	38,73	43,32
320 mg Solbone P	27,53	37,35	44,18
8 mg Solbone PP	23,98	47,63	62,48
32 mg Solbone PP	25,42	49,04	55,60
2 g Trisetum flavescens	23,98	72,63*	109,87*
8 g Trisetum flavescens	25,88	86,87*	118,85*
32 g Trisetum flavescens	28,08	41,30	51,77

\* diese Werte haben bei zu geringer Legeleistung keine Aussagekraft

### 4.1.3 Tiergewichte

Nur in diesem Durchgang wurde auch das Körpergewicht der Wachteln ermittelt, und zwar am Tage der Einstellung gruppenweise, sowie am Schlachttag eines jeden Tieres einzeln.

Dazu muss bemerkt werden, dass der gemessene Wert für die einzelnen Gruppen am Schlachttag einen Mittelwert darstellt, und es innerhalb der Gruppen zwischen den beiden Käfigen z. T. deutliche Schwankungen bestanden. Es können sowohl Zunahmen, als auch Gewichtsabnahmen verzeichnet werden.

Den deutlichsten Verlust zeigt die Gruppe, welche den Zusatz 100 IE Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter erhalten hat, der höchste Zunahmewert ist bei 5 mg Solbone P zu erkennen. Die Gewichte der Gruppe 1 µg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und 5 mg Solbone P/kg Futter weisen einen signifikanten Unterschied gegenüber der Gruppe mit 100 IE Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter auf, die Gruppe mit 8 mg Solbone PP gegenüber der mit 200 IE Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter.

Die genauen Werte sind folgender Tabelle zu entnehmen.

**Tabelle 4.2:** Durchschnittliche Tiergewichte [g] (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), Versuch I

Diätzusätze/ kg Futter	Tiergewicht [g] Am Tag der Einstallung n= 10 Tiere $\bar{x}$	Tiergewicht [g] Schlachttag	
		$\bar{x}$	$\pm s$
100 IE Vitamin D <sub>3</sub>	150,7	132,9	21,6
200 IE Vitamin D <sub>3</sub>	155,1	166,3	10,1
400 IE Vitamin D <sub>3</sub>	153,8	143,6	14,0
0,5 $\mu\text{g}$ 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	150,9	150,9	11,1
1 $\mu\text{g}$ 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	149,4	163,9*	9,4
2 $\mu\text{g}$ 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	144,8	157,5	13,8
5 mg Solbone P	144,4	163,9*	11,8
20 mg Solbone P	154,1	154,8	15,1
80 mg Solbone P	156,0	161,4	13,1
320 mg Solbone P	151,5	153,5	18,0
8 mg Solbone PP	147,2	138,9◇	20,5
32 mg Solbone PP	154,8	154,4	14,7
2 g Trisetum flavescens	151,4	164,5	20,4
8 g Trisetum flavescens	150,7	147,0	19,5
32 g Trisetum flavescens	150,7	143,9	18,4

\* ( $\rho < 0,05$ )      \*\* ( $\rho < 0,01$ )      \*\*\* ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 1 (100 IE/kg Futter)

◇ ( $\rho < 0,05$ )      ◇◇ ( $\rho < 0,01$ )      ◇◇◇ ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 2 (200 IE/kg Futter)

◆ ( $\rho < 0,05$ )      ◆◆ ( $\rho < 0,01$ )      ◆◆◆ ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 3 (400 IE/kg Futter)

#### 4.1.4 Legeleistung

Die Legeleistung steigt innerhalb der einzelnen Dosierungsgruppen von Vitamin D<sub>3</sub> durchwegs an (Vergleiche Tabelle 4.3). Der Maximalwert der Vitamin D<sub>3</sub>-Standardgruppen beträgt 73,7 % bei der Dosierung 400 IE Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter. Er wird mehrmals durch die höchste Dosierung anderer Präparate überstiegen, so durch 2 µg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>/kg Futter, 320 mg Solbone P/ kg Futter und 32 g Trisetum flavescens/ kg Futter. Alle Präparatdosierungen weisen gegenüber den Vitamin D<sub>3</sub> Kontrollgruppen signifikante Unterschiede auf.

Bei vergleichender Betrachtung der Entwicklung der Legeleistung der Gruppen im Verlauf des Versuchs ist aus der Tabelle 4.4 und der Abbildung 4.1 heraus zu erkennen, dass eine initial höhere Legeleistung im Vergleich zu den Standardgruppen bei den Tieren der Gruppe mit dem Zusatz 2µg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> /kg Futter (65,0 %) zu verzeichnen ist, sowie bei den Gruppen mit Zusatz 320 mg Solbone P/kg Futter (66,7 %) und 32 g Trisbone/kg Futter (68,3 %). Für alle drei Gruppen gilt eine konstante Steigerung der Legeleistung über den weiteren Versuchszeitraum.

Im zweiten Teil des Untersuchungszeitraums kann bei der Gruppe mit 320 mg Solbone P/kg Futter mit 84,0 % die höchste Legeleistung verzeichnet werden.

Im letzten Abschnitt des Untersuchungszeitraumes wird der Höchstwert von 90,7 % ebenfalls von dieser Gruppe erreicht. Eine steigende Tendenz der Legeleistung über den gesamten Zeitraum zeigen die Gruppen mit 400 IE Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter, alle Dosierungen des 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 80 mg, 320 mg Solbone P/kg Futter sowie die Gruppe mit dem Zusatz 32 g Trisbone/kg Futter. Die niedrigsten Legeleistungen über den gesamten Zeitraum zeigen die Dosierungen 100 IE Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter sowie 5 mg Solbone P/kg Futter, des weiteren weisen sie ein deutliches Absinken der Legeleistung auf. Auch bei den Dosierungen 20 mg Solbone P, 8 mg, 32 mg Solbone PP und 8 g Trisbone/kg Futter kommt es nach einer bis zum zehnten Tag tendenziell steigenden Legeleistung zum erneuten Abfall der Legeleistung im letzten Abschnitt der Untersuchung.

**Tabelle 4.3:** Durchschnittliche Legeleistung pro Gruppe [%] , Tag 4- 15, Versuch I

Diätzusätze/ kg Futter	Durchschnittliche Legeleistung [%] Tag 4 bis 15	
	$\bar{x}$	$\pm s$
100 IE Vitamin D <sub>3</sub>	30,30	20,37
200 IE Vitamin D <sub>3</sub>	66,67	22,38
400 IE Vitamin D <sub>3</sub>	72,73	28,21
0,5 µg 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	58,79*	15,52
1 µg 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	78,18*	18,00
2 µg 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	82,42*	16,88
5 mg Solbone P	10,30◇◆	14,87
20 mg Solbone P	38,79◇◆	19,66
80 mg Solbone P	76,36*	20,57
320 mg Solbone P	86,06*◇	15,94
8 mg Solbone PP	60,00*	25,11
32 mg Solbone PP	71,21*	22,36
2 g Trisetum flavescens	41,82◇◆	25,60
8 g Trisetum flavescens	35,76◇◆	18,91
32 g Trisetum flavescens	79,39*	19,37

\* ( $\rho < 0,05$ )    \*\* ( $\rho < 0,01$ )    \*\*\* ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 1 (100 IE/kg Futter)

◇ ( $\rho < 0,05$ )    ◇◇ ( $\rho < 0,01$ )    ◇◇◇ ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 2 (200 IE/kg Futter)

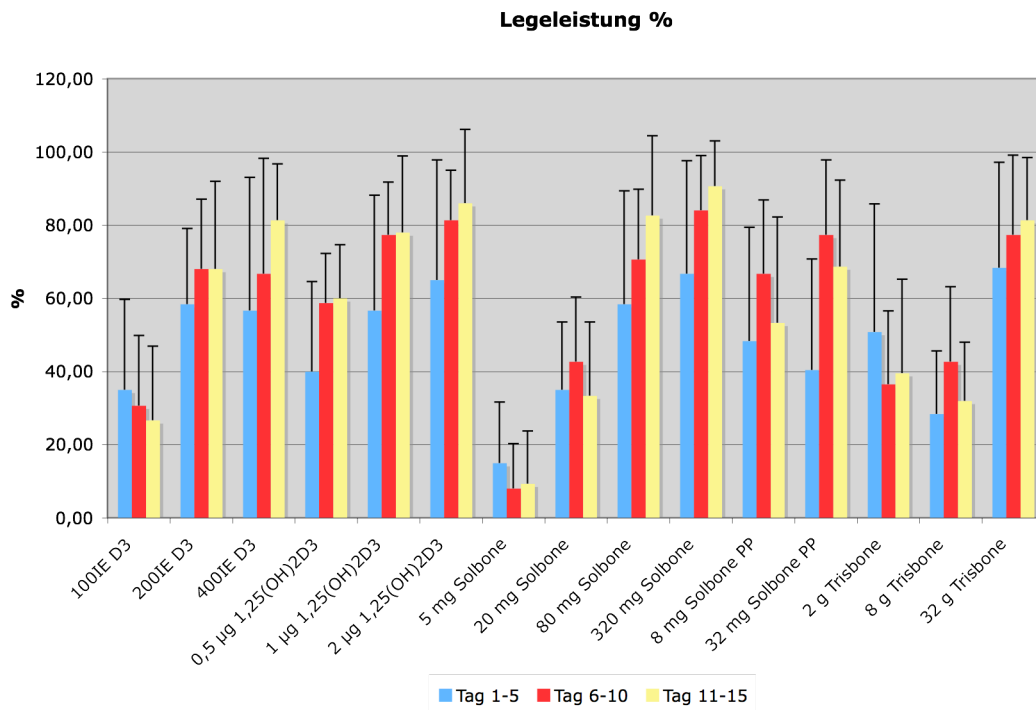
◆ ( $\rho < 0,05$ )    ◆◆ ( $\rho < 0,01$ )    ◆◆◆ ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 3 (400 IE/kg Futter)



**Tabelle 4.4:** Durchschnittliche Legeleistung pro Gruppe [%] (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), Tag 1-15, Versuch I

Zusatz/kg Futter	Durchschnittliche Legeleistung [%] Tag 1-5		Durchschnittliche Legeleistung [%] Tag 6-10		Durchschnittliche Legeleistung [%] Tag 11-15	
	$\bar{x}$	$\pm s$	$\bar{x}$	$\pm s$	$\bar{x}$	$\pm s$
100IE Vitamin D3	35,00	24,66	30,67	19,14	26,67	20,22
200IE Vitamin D3	58,33	20,75	68,00	19,04	68,00	24,00
400IE Vitamin D3	56,67	36,36	66,67	31,55	81,33	15,43
0,5 $\mu$ g 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	40,00	24,49	58,67	13,60	60,00	14,61
1 $\mu$ g 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	56,67	31,45	77,33	14,36	78,00	20,88
2 $\mu$ g 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	65,00	32,79	81,33	13,60	86,00	20,10
5 mg Solbone P	15,00	16,58	8,00	12,22	9,33	14,36
20 mg Solbone P	35,00	18,48	42,67	17,69	33,33	20,22
80 mg Solbone P	58,33	31,05	70,67	19,14	82,67	21,75
320 mg Solbone P	66,67	30,91	84,00	14,97	90,67	12,36
8 mg Solbone PP	48,33	31,05	66,67	20,22	53,33	28,91
32mg Solbone PP	40,42	30,31	77,33	20,48	68,67	23,56
2 g Trisbone	50,83	34,99	36,44	20,12	39,56	25,65
8 g Trisbone	28,33	17,24	42,67	20,48	32,00	16,00
32 g Trisbone	68,33	28,82	77,33	21,75	81,33	17,07

**Abb. 4.1:** vergleichende Darstellung der durchschnittlichen Legeleistung [%] der Gruppen in Tagen 1-15, Versuch I



#### 4.1.5 Eischalentrockengewicht

Auch beim Parameter des Eischalentrockengewichts zeigt sich innerhalb der Vitamin D<sub>3</sub>- Standardgruppen eine deutlich steigende Tendenz. Diese Beobachtung gilt für alle anderen Präparatdosierungen mit Ausnahme von 8 g Trisetum flavescens/kg Futter, bei welchem sich ein Absinken des Eischalentrockengewichts gegenüber der Dosierung 2 g Trisetum flavescens/kg Futter zeigt, jedoch die Gruppe mit der Dosierung 32 g Trisetum flavescens wieder eine deutliche Steigerung des Eischalentrockengewichts pro Tier und Tag aufzeigt (s. Tab. 4.5). Die Dosierung 5 mg Solbone P weist einen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe 3 (400 IE Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter) auf ( $p < 0,05$ ).

Beim Vergleich der mittleren Eischalentrockensubstanz pro Tier und Tag über den gesamten Versuchszeitraum (s. Tab. 4.6 und Abb. 4.2) zeigen sich ähnliche Ergebnisse wie bei der Legeleistung. Es zeigt sich, dass eine Steigerung der Vitamin D<sub>3</sub>- Dosierung auch eine Steigerung des Eischalentrockengewichts in dieser Gruppe bewirkt.

Initial hat die Vitamin D<sub>3</sub>- Standardgruppe 200 IE/kg Futter den höchsten Wert (448,54 mg), einen fast ebenso hohen Wert erreicht die Gruppe mit der Dosierung 320 mg Solbone P/kg Futter (442,32 mg). Während sich die Standarddosierung im weiteren Verlauf nicht mehr stark steigern kann (570, 90 mg, 597, 78 mg) zeigt die Gruppe mit 320 mg Solbone P/kg Futter in der zweiten Phase mit 712,79 mg den zweithöchsten Wert hinter der Gruppe mit 2 µg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (720,18 mg), im letzten Abschnitt des Untersuchungszeitraumes aber wieder den Maximalwert mit 804,88 mg Eischalentrockengewicht.

Mit wenigen Ausnahmen zeigen die verschiedenen Präparate über den gesamten Versuchszeitraum mit steigender Dosierung ebenso ein steigendes Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag.

Tendenziell absteigend verhält sich das Eischalentrockengewicht bei den Gruppen mit dem Zusatz 100 IE Vitamin D<sub>3</sub>/kg, 5 mg und 20 mg Solbone P/kg Futter sowie 2g Trisetum flavescens/kg Futter. Bei den Dosierungen 8 mg und 32 mg Solbone PP sowie 8 g Trisetum flavescens/kg Futter kommt es nach einer in den ersten zehn Tagen massiven Steigerung des Eischalentrockengewichts (zwei- bzw. dreifache Steigerung des initialen Wertes) in der letzten Phase des Versuchs zum erneuten Abfall.

Genaue Werte sind der Tabelle 4.5 zu entnehmen.

**Tabelle 4.5:** Durchschnittliches Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag [mg], Tag 4- 15, Versuch I

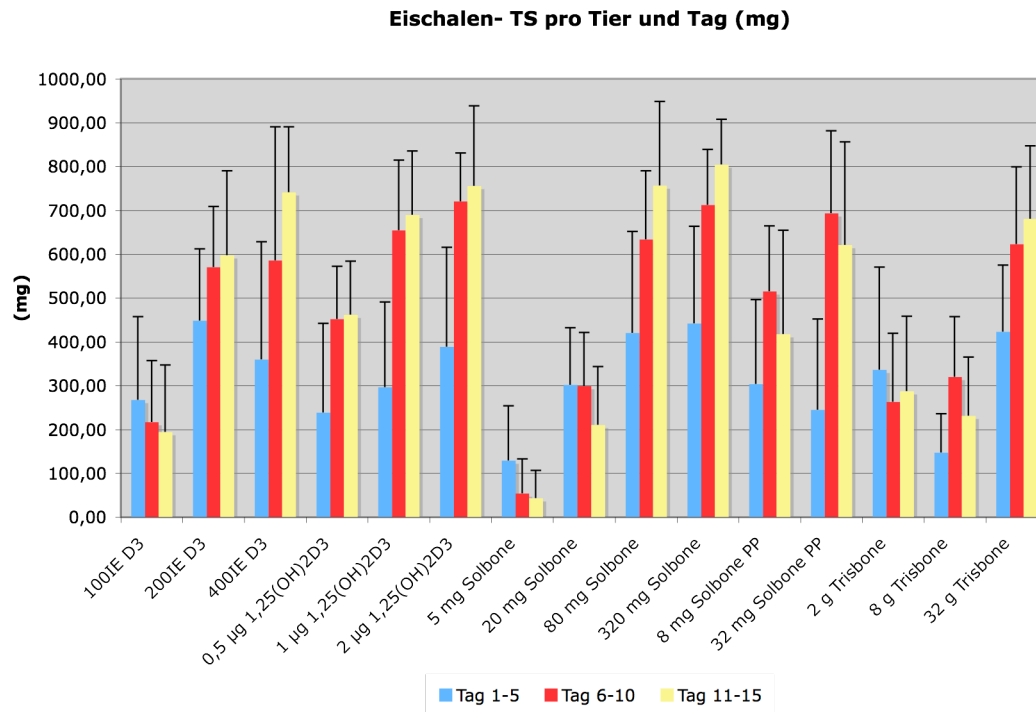
Diätzusätze/ kg Futter	Eischalen- TS pro Tier und Tag [mg] Tag 4 bis 15	
	$\bar{x}$	$\pm S$
100 IE Vitamin D <sub>3</sub>	243,7	128,3
200 IE Vitamin D <sub>3</sub>	623,8	79,4
400 IE Vitamin D <sub>3</sub>	685,0	206,4
0,5 µg 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	474,9	84,4
1 µg 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	697,0	74,0
2 µg 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	770,0	64,9
5 mg Solbone P	66,4♦	59,4
20 mg Solbone P	287,4	54,7
80 mg Solbone P	735,9	70,0
320 mg Solbone P	795,7	35,4
8 mg Solbone PP	509,0	93,3
32 mg Solbone PP	662,0	121,5
2 g Trisetum flavescens	326,8	109,4
8 g Trisetum flavescens	280,4	45,7
32 g Trisetum flavescens	685,5	81,7

\* ( $\rho < 0,05$ )      \*\* ( $\rho < 0,01$ )      \*\*\* ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 1 (100 IE/kg Futter)  
 ◇ ( $\rho < 0,05$ )      ◇◇ ( $\rho < 0,01$ )      ◇◇◇ ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 2 (200 IE/kg Futter)  
 ♦ ( $\rho < 0,05$ )      ♦♦ ( $\rho < 0,01$ )      ♦♦♦ ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 3 (400 IE/kg Futter)

**Tabelle 4.6:** Durchschnittliches Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag [mg], (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), Tag 1 bis 15, Versuch I

Zusatz/kg Futter	Eischalen-TS pro Tier und Tag [mg] Tag 1-5		Eischalen-TS pro Tier und Tag [mg] Tag 6-10		Eischalen-TS pro Tier und Tag [mg] Tag 11-15	
	$\bar{X}$	$\pm S$	$\bar{X}$	$\pm S$	$\bar{X}$	$\pm S$
100IE Vitamin D3	267,99	189,32	217,09	139,87	194,45	152,40
200IE Vitamin D3	448,54	163,33	570,90	137,68	597,78	192,22
400IE Vitamin D3	359,72	268,46	586,24	303,99	741,41	149,40
0,5 $\mu\text{g}$ 1,25(OH) $_2$ D $_3$	238,30	203,71	452,16	120,49	461,59	122,71
1 $\mu\text{g}$ 1,25(OH) $_2$ D $_3$	296,28	194,38	654,84	159,80	689,97	145,17
2 $\mu\text{g}$ 1,25(OH) $_2$ D $_3$	388,92	227,08	720,18	110,91	755,70	182,91
5 mg Solbone P	129,30	124,45	54,05	79,26	43,07	63,25
20 mg Solbone P	301,73	130,40	298,88	122,58	210,82	132,94
80 mg Solbone P	420,83	231,36	633,61	156,98	756,43	192,24
320 mg Solbone P	442,32	220,95	712,79	125,96	804,88	102,81
8 mg Solbone PP	303,40	193,10	515,54	148,60	417,81	237,24
32 mg Solbone PP	244,86	207,26	693,37	188,62	620,86	235,45
2 g Trisbone	336,58	233,62	262,88	156,91	287,72	170,50
8 g Trisbone	147,81	88,55	320,35	137,40	231,03	134,08
32 g Trisbone	422,96	152,29	623,21	176,28	680,52	166,44

**Abb. 4.2:** vergleichende Darstellung der mittleren Eischalen-TS pro Tier [mg], Tag 1-15, Versuch I



#### 4.1.6 Knochenaschegehalt

In Tabelle 4.7 sind die Werte der mittleren relativen Knochenaschegehalte vom Femur für die einzelnen Gruppen dargestellt. Bei den eingesetzten Vitamin D<sub>3</sub>-Dosierungen kann eine in direkt proportionalem Verhältnis zur Dosierungserhöhung stehende Zunahme des Knochenaschegehalts im Femur verzeichnet werden.

Den höchsten prozentualen Knochenaschegehalt im Femur weist die Gruppe mit dem Zusatz von 2 µg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> /kg Futter auf (65,39 %). Zusammen mit der Gruppe, welche 320 mg Solbone P/kg Futter als zugefügtes Präparat (63,58 %) erhielt, übersteigt es als einziges den höchsten Wert der Vitamin D<sub>3</sub>- Dosierungen, welcher in der Gruppe mit dem Zusatz 400 IE Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter zu finden ist (63,05 %).

Signifikante Unterschiede sind in der Tabelle vermerkt.

**Tabelle 4.7:** Durchschnittlicher relativer Knochenaschegehalt vom Femur [%] (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), Versuch I

Diätzusätze/ kg Futter	Knochenasche in % Femur	
	$\bar{x}$	$\pm s$
100 IE Vitamin D <sub>3</sub>	60,16	3,45
200 IE Vitamin D <sub>3</sub>	61,10	4,27
400 IE Vitamin D <sub>3</sub>	63,05	2,80
0,5 $\mu\text{g}$ 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	59,49	2,92
1 $\mu\text{g}$ 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	60,09	2,30
2 $\mu\text{g}$ 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	65,39*	1,59
5 mg Solbone P	60,36	3,36
20 mg Solbone P	58,42◆	2,34
80 mg Solbone P	60,74	5,96
320 mg Solbone P	63,58	2,95
8 mg Solbone PP	60,09	3,72
32 mg Solbone PP	61,61	4,08
2 g Trisetum flavescens	59,13	2,94
8 g Trisetum flavescens	59,47	2,76
32 g Trisetum flavescens	60,19	2,73

\* ( $\rho < 0,05$ )      \*\* ( $\rho < 0,01$ )      \*\*\* ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 1 (100 IE/kg Futter)

◇ ( $\rho < 0,05$ )      ◇◇ ( $\rho < 0,01$ )      ◇◇◇ ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 2 (200 IE/kg Futter)

◆ ( $\rho < 0,05$ )      ◆◆ ( $\rho < 0,01$ )      ◆◆◆ ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 3 (400 IE/kg Futter)

#### 4.1.7 Kalzium in der Knochenasche

Der Mittelwert des Kalziumgehalts im Femur aller Gruppen beträgt 234,20 g/kg. Den höchsten Kalziumgehalt in der Knochenasche zeigt die Gruppe, welche 2 µg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> /kg Futter als Zusatz erhalten hat (305,26 g/kg). Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Parametern kann hier kein Zusammenhang zwischen der Steigerung der Präparatdosis und einer Zunahme des Kalziumgehaltes im Femur erkannt werden. Die Einzelwerte der Gruppen sind Tab. 4.8 zu entnehmen.

Bei der statistischen Auswertung finden sich signifikante Unterschiede zwischen der mittleren Vitamin D<sub>3</sub>- Konzentration (200 IE/kg Futter) und den Versuchsgruppen mit Zusatz von Solbone PP und Solbone P (s. Tab. X).



**Tabelle 4.8:** Durchschnittlicher Kalziumgehalt in der Knochenasche von Femur [g/kg] (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), Versuch I

Diätzusätze/ kg Futter	Kalziumgehalt in der Knochenasche [g/kg] Femur	
	$\bar{x}$	$\pm s$
100 IE Vitamin D <sub>3</sub>	225,68	32,21
200 IE Vitamin D <sub>3</sub>	183,60	67,09
400 IE Vitamin D <sub>3</sub>	206,85	69,96
0,5 $\mu$ g 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	165,40	23,44
1 $\mu$ g 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	194,31	87,23
2 $\mu$ g 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	305,26 $\diamond$	61,66
5 mg Solbone P	222,25	26,69
20 mg Solbone P	269,74	86,78
80 mg Solbone P	285,69 $\diamond$	33,20
320 mg Solbone P	273,53 $\diamond$	23,53
8 mg Solbone PP	298,67 $\diamond$	37,78
32 mg Solbone PP	287,22 $\diamond$	37,76
2 g Trisetum flavescens	249,84	69,25
8 g Trisetum flavescens	187,77	68,46
32 g Trisetum flavescens	157,11	23,87

\* ( $\rho < 0,05$ )      \*\* ( $\rho < 0,01$ )      \*\*\* ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 1 (100 IE/kg Futter)  
 $\diamond$  ( $\rho < 0,05$ )       $\diamond\diamond$  ( $\rho < 0,01$ )       $\diamond\diamond\diamond$  ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 2 (200 IE/kg Futter)  
 $\blacklozenge$  ( $\rho < 0,05$ )       $\blacklozenge\blacklozenge$  ( $\rho < 0,01$ )       $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$  ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 3 (400 IE/kg Futter)

#### 4.1.8 Kalziumgehalt im Serum

Aus Tabelle 4.9 ist ersichtlich, dass auch bei diesem Parameter kein Zusammenhang zwischen einer Steigerung der Dosierung eines verwendeten Präparates und einer Zunahme des Kalziumgehalts im Serum besteht, da die Werte sehr stark streuen. Der höchste Gehalt des Serums an Kalzium ist bei der Versuchsgruppe mit dem Zusatz 80 mg Solbone P/kg Futter zu sehen (305,82 mg/l). Einige Gruppen unterschreiten den Wert der niedrigsten Vitamin D<sub>3</sub>- Dosierung, so die Gruppe mit dem Zusatz 0,5 µg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 20 mg Solbone P, 8 mg Solbone PP und 32 g *Trisetum flavescens*/kg Futter.

Bei der statistischen Auswertung ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe mit 20 mg Solbone P/kg Futter und der mittleren Vitamin D<sub>3</sub>- Dosierung (200 IE/kg Futter).

**Tabelle 4.9:** Durchschnittlicher Kalziumgehalt im Serum [mg/l] (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), Versuch I

Diätzusätze/ kg Futter	Kalzium im Serum [mg/l]	
	$\bar{x}$	$\pm s$
100 IE Vitamin D <sub>3</sub>	238,28	95,67
200 IE Vitamin D <sub>3</sub>	301,8	77,52
400 IE Vitamin D <sub>3</sub>	272,94	54,23
0,5 $\mu\text{g}$ 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	233,87	64,51
1 $\mu\text{g}$ 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	258,32	56,88
2 $\mu\text{g}$ 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	298,60	66,74
5 mg Solbone P	238,88	73,49
20 mg Solbone P	202,20 $\diamond$	38,88
80 mg Solbone P	309,82	45,37
320 mg Solbone P	296,99	53,51
8 mg Solbone PP	233,67	61,34
32 mg Solbone PP	305,81	76,37
2 g Trisetum flavescens	254,11	51,95
8 g Trisetum flavescens	247,49	81,83
32 g Trisetum flavescens	212,62	49,19

\* ( $p < 0,05$ )    \*\* ( $p < 0,01$ )    \*\*\* ( $p < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 1 (100 IE/kg Futter)

$\diamond$  ( $p < 0,05$ )     $\diamond\diamond$  ( $p < 0,01$ )     $\diamond\diamond\diamond$  ( $p < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 2 (200 IE/kg Futter)

$\blacklozenge$  ( $p < 0,05$ )     $\blacklozenge\blacklozenge$  ( $p < 0,01$ )     $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$  ( $p < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 3 (400 IE/kg Futter)

#### 4.1.9 Aschegehalt der Leber

Der durchschnittliche Aschegehalt der Leber in diesem Versuchsdurchgang beträgt 4,80 g. Wie aus Tabelle 4.10 ersichtlich, besteht kein direkter Zusammenhang zwischen einer Erhöhung der Präparatdosierung und dem Aschegehalt der Leber. Den höchsten Gehalt innerhalb der Standardgruppen zeigt jene mit dem Zusatz 100 IE Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter (4,99 g), den höchsten Gehalt insgesamt verzeichnet die Gruppe mit dem Zusatz 0,5 µg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> /kg Futter (5,37 g).

Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

**Tabelle 4.10:** Durchschnittlicher Aschegehalt der Leber [%] (Mittelwert ± Standardabweichung), Versuch I

Diätzusätze/ kg Futter	Aschegehalt der Leber [g]	
	$\bar{x}$	±s
100 IE Vitamin D <sub>3</sub>	4,99	0,21
200 IE Vitamin D <sub>3</sub>	4,63	0,37
400 IE Vitamin D <sub>3</sub>	4,94	0,62
0,5 µg 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	5,37	1,55
1 µg 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	4,47	0,84
2 µg 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	4,83	0,59
5 mg Solbone P	4,24	0,59
20 mg Solbone P	4,23	0,72
80 mg Solbone P	5,21	0,33
320 mg Solbone P	5,25	1,18
8 mg Solbone PP	4,89	0,31
32 mg Solbone PP	5,02	0,48
2 g Trisetum flavescens	4,49	0,58
8 g Trisetum flavescens	4,89	0,43
32 g Trisetum flavescens	4,98	0,35

#### **4.1.10 Kalziumgehalt der Leber**

Der durchschnittliche Kalziumgehalt in der Leber beträgt in diesem Versuchsdurchgang 8,03 g. Auch hier verhält es sich wie beim Aschegehalt der Leber, die Werte sind breit gestreut und es kann keine Abhängigkeit des Kalziumgehalts der Leber von einer Steigerung der Präparatdosis beobachtet werden. Den höchsten Gehalt der Standardgruppen verzeichnet die mittlere Vitamin D<sub>3</sub>- Dosierung (200 IE/kg Futter) mit einem Gehalt von 9,33 g, den höchsten Wert aller Gruppen zeigt diejenige, welche den Zusatz 8 g Trisetum flavescens/kg Futter erhalten hat (18,58 g). Die genauen Werte der einzelnen Gruppen sind Tabelle 4.11 zu entnehmen.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede der Versuchsgruppen ermittelt werden.

**Tabelle 4.11:** Durchschnittlicher Kalziumgehalt der Leber [g/kg] (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), Versuch I

Diätzusätze/ kg Futter	Kalziumgehalt der Leber [g/kg]	
	$\bar{x}$	$\pm s$
100 IE Vitamin D <sub>3</sub>	6,54	5,85
200 IE Vitamin D <sub>3</sub>	9,33	8,36
400 IE Vitamin D <sub>3</sub>	5,38	1,25
0,5 $\mu$ g 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	7,45	9,72
1 $\mu$ g 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	9,16	11,60
2 $\mu$ g 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	7,94	7,40
5 mg Solbone P	8,02	7,58
20 mg Solbone P	6,47	5,23
80 mg Solbone P	5,28	1,05
320 mg Solbone P	6,93	6,43
8 mg Solbone PP	7,44	4,97
32 mg Solbone PP	6,00	5,53
2 g Trisetum flavescens	5,42	3,00
8 g Trisetum flavescens	18,58	23,66
32 g Trisetum flavescens	7,79	9,34

#### 4.1.11 ALP im Serum

Bei der Auswertung der ALP- Aktivität findet sich ein Zusammenhang zwischen einer zunehmenden Präparatdosierung und einer verminderten Enzymaktivität. Unter den Vitamin D<sub>3</sub>- Standardgruppen kann bei der Ration 100 IE/kg Futter der höchste Wert verzeichnet werden, hingegen bei 400 IE/kg Futter die niedrigste. Der Wert der Ration 100 IE/kg Futter wird von folgenden Rationen weiter überschritten: 0,5 µg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 5 und 20 mg Solbone, 8 mg Solbone PP sowie 2 g Trisbone/ kg Futter. Den Gesamthöchstwert verzeichnen gleichwertig die Gruppen mit dem Zusatz 0,5 µg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und 2 g Trisbone/kg Futter. Den niedrigsten Standardgruppenwert unterschreitet neben der Ration 2 µg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auch die Gruppen mit dem Zusatz 80 und 320 mg Solbone P, die geringste Enzymaktivität findet sich in letztgenannter Gruppe.

Es finden sich signifikanten Unterscheide gegenüber den Kontrollgruppen, bei diesem Parameter finden sich sogar hoch signifikante Unterschiede. Die genauen Verteilungen sind untenstehender Tabelle 4.12 zu entnehmen.

**Tabelle 4.12:** Durchschnittliche Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) im Serum [U/l] (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), Versuch I

Diätzusätze/ kg Futter	ALP im Serum [U/l]	
	$\bar{x}$	$\pm s$
100 IE Vitamin D <sub>3</sub>	0,46	0,20
200 IE Vitamin D <sub>3</sub>	0,37	0,18
400 IE Vitamin D <sub>3</sub>	0,28	0,18
0,5 $\mu$ g 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	0,56 $\diamond\diamond\diamond$	0,13
1 $\mu$ g 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	0,38	0,24
2 $\mu$ g 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	0,19*** $\diamond$	0,11
5 mg Solbone P	0,51 $\diamond\diamond$	0,17
20 mg Solbone P	0,52 $\diamond\diamond$	0,17
80 mg Solbone P	0,22** $\diamond$	0,13
320 mg Solbone P	0,15***	0,16
8 mg Solbone PP	0,53 $\diamond\diamond$	0,15
32 mg Solbone PP	0,32	0,21
2 g Trisetum flavescens	0,56 $\diamond\diamond\diamond$	0,13
8 g Trisetum flavescens	0,42	0,21
32 g Trisetum flavescens	0,40	0,22

\* ( $\rho < 0,05$ )    \*\* ( $\rho < 0,01$ )    \*\*\* ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 1 (100 IE/kg Futter)

$\diamond$  ( $\rho < 0,05$ )     $\diamond\diamond$  ( $\rho < 0,01$ )     $\diamond\diamond\diamond$  ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 2 (200 IE/kg Futter)

$\diamond$  ( $\rho < 0,05$ )     $\diamond\diamond$  ( $\rho < 0,01$ )     $\diamond\diamond\diamond$  ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 3 (400 IE/kg Futter)



## 4.2 Versuch 2

### 4.2.1 Mortalität

Die Wachteln zeigten in allen Phasen des zweiten Versuchsdurchlaufes ein unauffälliges Allgemeinbefinden.

Während des 21 Tage andauernden Versuchsdurchgangs starben insgesamt von den 306 eingestellten Wachtelhennen 20 Tiere. Von diesen Tieren mussten drei aufgrund von starkem Kümern ohne weitere konkrete Symptome getötet werden, die restlichen Tiere verstarben an Erkrankungen der Legeorgane oder an körperlicher Schwäche ohne äußerliche Symptomatik der Legeorgane. Dies entspricht einer Gesamtmortalitätsrate im zweiten Versuchsdurchgang von 6,54 %.

Die Tiergruppen dreier Rationen verzeichneten die höchsten Tierverluste mit einer Mortalitätsrate von 16,67 %: die der Zusätze 50 IE Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter, 0,2 g Solbone/kg Futter und 2 g Trisbone/kg Futter. Die der Gruppen 0,8 g Solbone, 4 g Trisbone und 8 g Trisbone/kg Futter betragen jeweils 11,11 %, die Mortalität der Gruppen 200 IE Vitamin D<sub>3</sub>, 0,25 g und 1 g PAN-HVD und 0,05 g und 1g Solbone/kg Futter betrug jeweils 5,56 %.

### 4.2.2 Futterverzehr

Der durchschnittliche Futterverzehr pro Tier und Tag beträgt 26,01 g. Der höchste Wert der Standardgruppen wird bei der höchsten Vitamin D<sub>3</sub>-Dosierung (400 IE/kg Futter) mit 30,54 g erreicht. Den höchsten Verbrauch mit 32,71 g zeigt die Gruppe mit 4 g PAN-HVD als Futterzusatz, neben ihr übersteigt auch der Futterverzehr der Gruppe mit dem Zusatz 0,4 g Solbone/kg Futter den höchsten Wert der Vitamin D<sub>3</sub>-Rationen. Der niedrigste Wert findet sich bei der Gruppe mit dem Futterzusatz 4 g Trisbone/kg Futter (20,97 g). Alle Futterverbrauchswerte der Trisbone- Dosierungen unterschreiten neben zwei weiteren die der niedrigsten Vitamin D<sub>3</sub>- Dosierungen (50 IE/kg Futter) mit einem Wert von 25,23 g. Die exakten Werte sind Tabelle 4.13 zu entnehmen.

Der durchschnittliche Futterverbrauch pro gelegtes Ei beträgt 95,43 g. Es zeigen sich hochgradige Schwankungen zwischen den einzelnen Gruppen, mit zunehmender

Dosissteigerung der Präparate ist im Allgemeinen ein abnehmender Futtermittelverbrauch zu erkennen. Bei Betrachtung der Standardgruppen weist die niedrigste Vitamin D<sub>3</sub>-Dosierung (50 IE/kg Futter) den höchsten Verbrauch auf (69,45 g). Die Gruppe mit 0,25 g PAN-HVD zeigt insgesamt den höchsten Wert (366,35g), hingegen die Gruppe mit 0,8 g Solbone mit 38,19 g den niedrigsten Wert. Neben dieser Gruppe unterschreiten noch drei weitere den geringsten Futtermittelverzehr der Vitamin D<sub>3</sub>-Gruppen, welcher bei 400 IE/kg Futter zu erkennen ist (44,61 g). Die genauen Werte sind Tabelle X zu entnehmen.

Der durchschnittliche Verbrauch pro Gramm Eischalen- TS beträgt 181,91 g. Auch hier zeigt sich, außer in der Gruppe mit Zusatz Trisbone, eher eine absinkende Tendenz des Futtermittelverbrauchs innerhalb der eingesetzten Präparate in Abhängigkeit von der Dosierungssteigerung. Den höchsten und niedrigsten Verbrauch innerhalb der Standardgruppen zeigen, wie auch beim Futtermittelverbrauch pro Ei, die niedrigste und die höchste Vitamin D<sub>3</sub>- Dosierung. Den höchsten Verbrauch insgesamt zeigt erneut die Gruppe mit dem Zusatz 0,25 g PAN-HVD (888,16 g), den niedrigsten 0,8 g Solbone (43,43 g). Auch hier sind die genauen Verbrauchszahlen der Tabelle 4.13 zu entnehmen.

**Tabelle 4.13:** Durchschnittlicher Futtermittelverbrauch pro Tier und Tag [g], pro Ei [g] und pro Gramm Eischale [g], Tag 1 bis 21, Versuch II

Diätzusätze/ kg Futter	Futtermittelverbrauch pro Tier und Tag [g] $\bar{x}$	Futtermittelverbrauch pro Ei [g] $\bar{x}$	Futtermittelverbrauch pro Gramm Eischale [g] $\bar{x}$
50 IE Vitamin D <sub>3</sub>	25,23	69,45	114,21
100 IE Vitamin D <sub>3</sub>	27,75	58,89	79,06
200 IE Vitamin D <sub>3</sub>	29,12	50,14	62,54
400 IE Vitamin D <sub>3</sub>	30,54	44,61	51,81
0,25 g PAN-HVD	21,62	366,35*	888,16*
0,5 g PAN-HVD	26,74	128,0*	237,57*
1 g PAN-HVD	28,43	47,48	56,59
2 g PAN-HVD	29,37	44,03	51,00
4 g PAN-HVD	32,71	42,57	46,88
0,05 g Solbone-A-CWS	25,71	126,63*	233,16*
0,1 g Solbone-A-CWS	24,01	106,08*	169,59*
0,2 g Solbone-A-CWS	26,02	56,34	76,31
0,4 g Solbone-A-CWS	31,43	43,39	50,19
0,8 g Solbone-A-CWS	24,68	38,19	43,43
2 g Trisbone	24,07	355,30*	868,48*
4 g Trisbone	20,97	209,46*	450,76*
8 g Trisbone	22,34	334,09*	686,83*

\*diese Werte haben bei zu geringer Legeleistung keine Aussagekraft

### 4.2.3 Legeleistung

Die durchschnittliche Legeleistung steigt bei Betrachtung der Gruppen mit dem Futterzusatz Vitamin D<sub>3</sub> mit steigender Dosierung deutlich an (Vergleiche Tabelle 4.14). Der Maximalwert der Vitamin D<sub>3</sub>- Standardgruppen beträgt 78,4 % bei der Dosierung 400 IE Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter. Eine höhere Legeleistung wird in den Gruppen mit Zusatz 0,4 g und 0,8 g Solbone/kg Futter erreicht, ebenso in der Gruppe mit 4 g PAN-HVD, welche auch die maximale Legeleistung in diesem Versuch zeigt (85,0 %). In der Gruppe mit Trisbone als Futterzusatz zeigt sich, dass eine Dosissteigerung keine Verbesserung der Legeleistung erzielen kann. Die niedrigste Legeleistung der Vitamin D<sub>3</sub>- Gruppen mit 48,2 % (50 IE/kg Futter) wird durch die niedrigen Dosierungen von Solbone sowie allen Trisbone- Dosierungen unterschritten. Ebenso von der Gruppe mit 0,5 g und 0,25 g PAN-HVD/kg Futter, welche damit auch die insgesamt niedrigste Legeleistung aufweist (7,9 %). Alle Präparatdosierungen weisen gegenüber den Vitamin D<sub>3</sub> Kontrollgruppen signifikante Unterschiede auf, welche der Tabelle 4.14 zu entnehmen sind.

Bei vergleichender Betrachtung der Entwicklung der Legeleistung der Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum ist aus Tabelle 4.15 und Abbildung 4.3 heraus zu erkennen, dass eine initial höhere Legeleistung im Vergleich zu den Standardgruppen bei den Tieren der Gruppe mit dem Zusatz 2 g (43,3 %) und 4 g PAN-HVD/kg Futter (50,0 %) zu verzeichnen ist, sowie bei den Gruppen mit Zusatz 0,4 g Solbone/kg Futter (41,1 %) und 0,8 g Solbone/kg Futter (48,2 %). Die Standardgruppen weisen initial mit steigendem Vitamin D<sub>3</sub>- Gehalt des Futters auch eine höhere Legeleistung auf. Im zweiten Teil des Untersuchungszeitraums kann bei der Gruppe mit 0,4 g Solbone/kg Futter mit 83,3 % die höchste Legeleistung verzeichnet werden. Im letzten Abschnitt des Untersuchungszeitraumes wird der Höchstwert von 89,2 % von der Gruppe mit der nächsthöheren Dosierung, 0,8 g Solbone/kg Futter erreicht.

Eine steigende Tendenz der Legeleistung über den gesamten Zeitraum kann bei den Vitamin D<sub>3</sub>- Gruppen, mit Ausnahme der Dosierung 100 IE/kg Futter, beobachtet werden, ebenso bei jenen, welche 1 g und 4 g PAN-HVD und 0,2 g, 0,4 g und 0,8 g Solbone/kg Futter als Zusatz erhalten. Die niedrigeren Legeleistungen über den gesamten Zeitraum im Vergleich zur niedrigsten Vitamin D<sub>3</sub>- Dosierung (50 IE/kg)

zeigen die Gruppen mit dem Zusatz 0,25 g und 0,5 g PAN-HVD, 0,05 g und 0,1 g Solbone/kg Futter sowie alle Trisbone- Gruppen. Diese weisen ein zum Teil deutliches Absinken der Legeleistung nach den ersten 13 Tagen auf. Lediglich die Gruppe mit 8 g Trisbone/kg Futter zeigt über den gesamten Versuchszeitraum eine steigende Tendenz, bei 2 g Trisbone/kg Futter steigt die Leistung nach leichtem Abfall gegenüber der initialen Legeleistung in der letzten Versuchsphase wieder an. Die genauen Werte jeder einzelnen Gruppe sind in Tabelle 4.15 zusammengefasst.

**Tabelle 4.14:** Durchschnittliche Legeleistung pro Gruppe [%] , Tag 4 bis 20, Versuch II

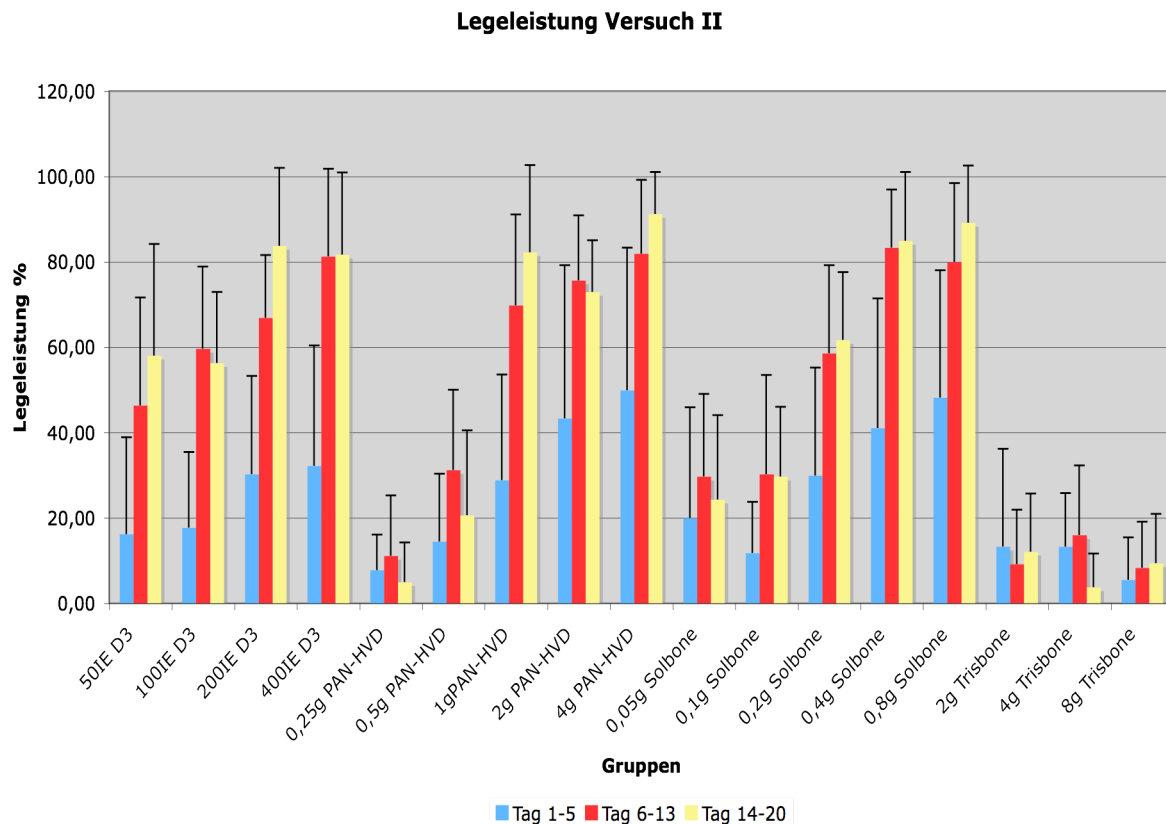
Diätzusätze/ kg Futter	durchschnittliche Legeleistung [%] Tag 4 bis 20	
	$\bar{x}$	$\pm s$
50 IE Vitamin D <sub>3</sub>	48,20	29,79
100 IE Vitamin D <sub>3</sub>	54,90	25,12
200 IE Vitamin D <sub>3</sub>	72,22	27,63
400 IE Vitamin D <sub>3</sub>	78,43	30,88
0,25 g PAN-HVD	7,91*◇◆▽	11,63
0,5 g PAN-HVD	25,82*◇◆▽	19,77
1 g PAN-HVD	72,29*	30,33
2 g PAN-HVD	74,18*	25,48
4 g PAN-HVD	84,97*◇	26,37
0,05 g Solbone-A-CWS	26,60◇▽◆	21,70
0,1 g Solbone-A-CWS	28,50◇▽◆	20,22
0,2 g Solbone-A-CWS	58,56▽	24,27
0,4 g Solbone-A-CWS	82,68*◇	27,28
0,8 g Solbone-A-CWS	83,53*◇	26,14
2 g Trisbone	10,95*◇◆▽	16,26
4 g Trisbone	10,72*◇◆▽	14,02
8 g Trisbone	8,43*◇◆▽	10,97

\* ( $\rho < 0,05$ )      \*\* ( $\rho < 0,01$ )      \*\*\* ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 1 (50 IE/kg Futter)  
 ◇ ( $\rho < 0,05$ )      ◇◇ ( $\rho < 0,01$ )      ◇◇◇ ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 2 (100 IE/kg Futter)  
 ◆ ( $\rho < 0,05$ )      ◆◆ ( $\rho < 0,01$ )      ◆◆◆ ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 3 (200 IE/kg Futter)  
 ▽ ( $\rho < 0,05$ )      ▽▽ ( $\rho < 0,01$ )      ▽▽▽ ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 4 (400 IE/kg Futter)

**Tabelle 4.15:** Durchschnittliche Legeleistung pro Gruppe [%] (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), Tag 1-20, Versuch II

Zusatz/kg Futter	Durchschnittliche Legeleistung [%] Tag 1-5		Durchschnittliche Legeleistung [%] Tag 6-13		Durchschnittliche Legeleistung [%] Tag 14-20	
	$\bar{x}$	$\pm s$	$\bar{x}$	$\pm s$	$\bar{x}$	$\pm s$
50IE D3	16,22	22,67	46,39	25,24	58,02	26,23
100IE D3	17,78	17,71	59,72	19,19	56,35	16,65
200IE D3	30,22	23,11	66,94	14,72	83,81	18,21
400IE D3	32,22	28,20	81,25	20,59	81,75	19,18
0,25g PAN-HVD	7,78	8,31	11,11	14,16	4,92	9,35
0,5g PAN-HVD	14,44	15,95	31,25	18,83	20,63	19,86
1g PAN-HVD	28,89	24,70	69,86	21,25	82,22	20,53
2g PAN-HVD	43,33	35,90	75,69	15,20	73,02	12,04
4g PAN-HVD	50	33,33	81,94	17,29	91,27	9,78
0,05g Solbone-A-CWS	20	25,96	29,72	19,34	24,29	19,82
0,1g Solbone-A-CWS	11,78	12,04	30,28	23,25	29,68	16,36
0,2g Solbone-A-CWS	30	25,24	58,61	20,59	61,75	15,86
0,4g Solbone-A-CWS	41,11	30,35	83,33	13,61	84,92	16,19
0,8g Solbone-A-CWS	48,22	29,81	80,00	18,51	89,21	13,41
2g Trisbone	13,33	22,93	9,17	12,81	12,14	13,54
4g Trisbone	13,33	12,47	15,97	16,33	3,81	7,85
8g Trisbone	5,56	9,94	8,33	10,80	9,37	11,58

**Abb. 4.3:** vergleichende Betrachtung der Legeleistung über den gesamten Versuchszeitraum, Tag 1- 20, Versuch II



#### 4.2.4 Eischalentrockengewicht

Für den Parameter des Eischalentrockengewichts können alle vergleichenden Aussagen, welche auch über die Legeleistung getroffen wurden, gänzlich übernommen werden. Auch hier zeigt sich innerhalb der Vitamin D<sub>3</sub>-Standardgruppen eine deutlich steigende Tendenz. Diese Beobachtung gilt ebenso für alle anderen Präparatdosierungen, eine Ausnahme bilden die Gruppen mit dem Zusatz Trisbone, bei welchem eine Dosiserhöhung auf 8 g Trisbone/kg Futter gegenüber 4 g/kg Futter keine Verbesserung des Parameters bewirkt (s. Tab. 4.16). Den höchsten Wert des Eischalentrockengewichts zeigt die Gruppe mit dem Zusatz 4 g PAN-HVD/kg Futter, den niedrigsten jene mit 0,25 g PAN-HVD/kg Futter. Diese Gruppe weist einen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe 4 (400 IE Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter) auf ( $p < 0,05$ ).



Bei vergleichender Betrachtung der Entwicklung des Eischalentrockengewichts der Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum ist aus Tabelle 4.17 und Abbildung 4.4 heraus zu erkennen, dass eine initial höheres Eischalentrockengewicht im Vergleich zu den Standardgruppen bei den Tieren der Gruppe mit dem Zusatz 2 g (335,11 mg) und 4 g PAN-HVD/kg Futter (404,22 mg) zu verzeichnen ist, sowie bei den Gruppen mit Zusatz 0,4 g Solbone/kg Futter (326,72 mg) und 0,8 g Solbone/kg Futter (332,01 mg). Initial zeigt sich beim Vergleich der Standardgruppen untereinander mit steigendem Vitamin D<sub>3</sub>- Gehalt des Futters auch ein höheres Eischalentrockengewicht. Im zweiten Teil des Untersuchungszeitraums kann bei der Gruppe mit 4 g PAN-HVD/kg Futter mit 748,82 mg die höchste Eischalentrockensubstanz verzeichnet werden, ebenso im letzten Abschnitt des Untersuchungszeitraumes mit 859,88 mg.

Eine steigende Tendenz der Eischalentrockensubstanz über den gesamten Zeitraum kann bei den Vitamin D<sub>3</sub>- Gruppen, mit Ausnahme der Dosierung 100 IE/kg Futter, beobachtet werden, ebenso bei jenen, welche 1 g und 4 g PAN-HVD und 0,1 g, 0,2 g, 0,4 g und 0,8 g Solbone/kg Futter als Zusatz erhalten. Die Gruppe mit Zusatz 4 g Trisbone/kg Futter weist im Gegensatz zu den Gruppen mit anderen Trisbone-Dosierungen ein deutliches Absinken der Legeleistung nach den ersten 13 Tagen auf, ebenso jene mit dem Futterzusatz 0,25 g, 0,5 g und 2 g PAN-HVD, 0,05 g Solbone/kg Futter. Bei der Gruppe mit dem Zusatz 2 g Trisbone/kg Futter steigt die Leistung nach leichtem Abfall gegenüber der initialen Legeleistung in der letzten Versuchsphase wieder an. Allgemein kann allerdings gesagt werden, dass die Steigerung des Eischalentrockengewichts von der ersten Phase auf die zweite des Versuchs z.T. zwei- bis vierfach erhöht ist im Vergleich zum Ansteige von der zweiten auf die dritte Phase.

**Tabelle 4.16:** Durchschnittliches Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag [mg], Tag 4 bis 20, Versuch II

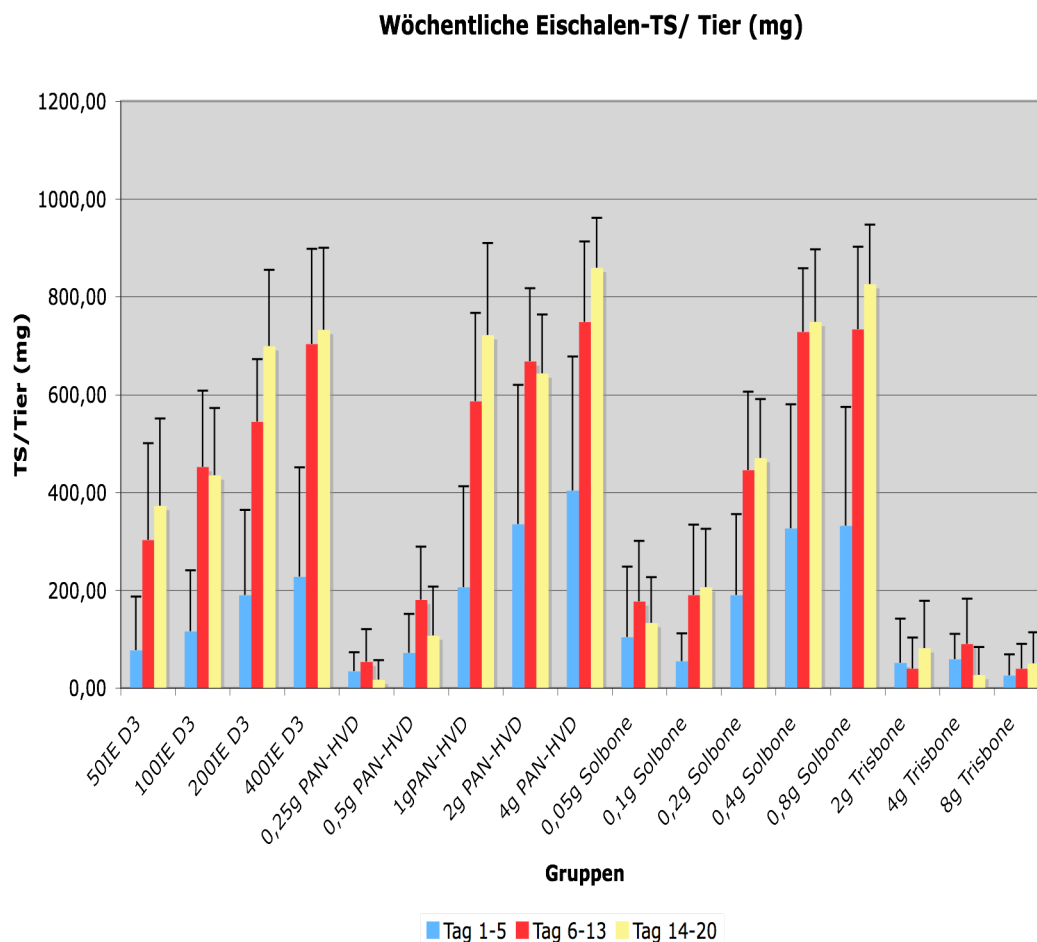
Diätzusätze/ kg Futter	Eischalen- TS pro Tier und Tag [mg] Tag 4 bis 20	
	$\bar{x}$	$\pm S$
50 IE Vitamin D <sub>3</sub>	309,4	100,1
100 IE Vitamin D <sub>3</sub>	416,6	65,1
200 IE Vitamin D <sub>3</sub>	588,8	66,8
400 IE Vitamin D <sub>3</sub>	683,4	27,4
0,25 g PAN-HVD	35,5∇	18,3
0,5 g PAN-HVD	143,6	44,1
1 g PAN-HVD	617,5	88,8
2 g PAN-HVD	648,7	67,1
4 g PAN-HVD	780,2	45,9
0,05 g Solbone-A-CWS	154,4	65,7
0,1 g Solbone-A-CWS	184,3	50,0
0,2 g Solbone-A-CWS	441,8	57,8
0,4 g Solbone-A-CWS	720,7	64,1
0,8 g Solbone-A-CWS	756,5	66,6
2 g Trisbone	58,9	37,9
4 g Trisbone	60,7	31,2
8 g Trisbone	42,9	15,3

\* ( $p < 0,05$ )      \*\* ( $p < 0,01$ )      \*\*\* ( $p < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 1 (50 IE/kg Futter)  
 ◇ ( $p < 0,05$ )      ◇◇ ( $p < 0,01$ )      ◇◇◇ ( $p < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 2 (100 IE/kg Futter)  
 ◆ ( $p < 0,05$ )      ◆◆ ( $p < 0,01$ )      ◆◆◆ ( $p < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 3 (200 IE/kg Futter)  
 ∇ ( $p < 0,05$ )      ∇∇ ( $p < 0,01$ )      ∇∇∇ ( $p < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 4 (400 IE/kg Futter)

**Tabelle 4.17:** Durchschnittliches Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag [mg], (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), Tag 1 bis 20, Versuch II

Zusatz/kg Futter	Eischalen-TS pro Tier und Tag [mg] Tag 1-5		Eischalen-TS pro Tier und Tag [mg] Tag 6-13		Eischalen-TS pro Tier und Tag [mg] Tag 14-20	
	$\bar{x}$	$\pm s$	$\bar{x}$	$\pm s$	$\bar{x}$	$\pm s$
50IE Vitamin D3	76,82	110,41	302,67	197,53	372,77	178,70
100IE Vitamin D3	116,17	124,77	452,61	155,84	434,71	138,05
200IE Vitamin D3	189,97	174,59	544,27	127,72	699,10	156,13
400IE Vitamin D3	227,76	223,21	703,47	194,33	732,87	167,13
0,25g PAN-HVD	34,85	38,54	53,32	67,18	17,30	39,79
0,5g PAN-HVD	71,84	80,05	180,59	108,56	107,83	99,87
1g PAN-HVD	206,66	206,12	587,04	179,56	721,52	187,89
2g PAN-HVD	335,11	284,86	668,48	148,61	643,90	120,02
4g PAN-HVD	404,22	273,16	748,82	163,91	859,88	101,44
0,05g Solbone-A-CWS	104,30	143,42	176,74	124,40	133,08	93,81
0,1g Solbone-A-CWS	54,72	57,31	190,24	143,48	206,00	119,47
0,2g Solbone-A-CWS	190,12	165,21	445,88	160,22	470,82	119,54
0,4g Solbone-A-CWS	326,72	253,67	728,46	129,48	748,61	148,06
0,8g Solbone-A-CWS	332,01	242,49	733,87	168,45	826,40	121,46
2g Trisbone	51,81	89,46	40,22	62,76	82,10	96,24
4g Trisbone	59,25	51,10	89,92	92,89	26,94	56,79
8g Trisbone	25,72	43,39	40,23	50,53	50,02	64,02

**Abb. 4.4:** vergleichende Betrachtung der Entwicklung der Eischalen- TS [mg] über den gesamten Versuchszeitraum, Tag 1- 20, Versuch II



#### 4.2.5 Knochenaschegehalt

Die Werte der mittleren relativen Knochenaschegehalte des Femurs der verschiedenen Gruppen sind in Tabelle 4.18 dargestellt. Bei Betrachtung der Werte der Vitamin D<sub>3</sub>- Gruppen zeigt sich, dass bei steigender Dosierung auch der Knochenaschegehalt ansteigt. Diese Beobachtung kann nicht durchgehend auf alle Präparate übertragen werden.

Den höchsten prozentualen Knochenaschegehalt im Femur weist die Gruppe mit dem Zusatz von 4 g PAN-HVD/kg Futter auf (64,46 %), neben ihr übertreffen auch die Gruppen mit Zusatz 2 g PAN-HVD (63,10 %) und 0,8 g Solbone/kg Futter (62,31 %) den Wert der höchsten Vitamin D<sub>3</sub>- Dosierung, 400 IE kg/ Futter (62,08 %). Alle Trisbone- Gruppen unterschreiten neben drei anderen Gruppen den

Knochenaschegehalt der niedrigsten Vitamin D<sub>3</sub>- Dosierung 50 IE/ kg Futter (57,30 %).

Signifikante Unterschiede sind in der Tabelle vermerkt.

**Tabelle 4.18:** Durchschnittlicher relativer Knochenaschegehalt vom Femur [%] (Mittelwert ± Standardabweichung), Versuch II

Diätzusätze/ kg Futter	Knochenasche in % Femur	
	$\bar{x}$	±s
50 IE Vitamin D <sub>3</sub>	57,30	2,17
100 IE Vitamin D <sub>3</sub>	58,41	3,16
200 IE Vitamin D <sub>3</sub>	60,02	3,09
400 IE Vitamin D <sub>3</sub>	62,08	2,82
0,25 g PAN-HVD	56,60∇	4,88
0,5 g PAN-HVD	55,51♦∇	2,26
1 g PAN-HVD	60,09	3,87
2 g PAN-HVD	63,10*◇	2,88
4 g PAN-HVD	64,46*◇♦	2,10
0,05 g Solbone-A-CWS	57,77∇	3,14
0,1 g Solbone-A-CWS	56,56∇	4,18
0,2 g Solbone-A-CWS	57,89	14,43
0,4 g Solbone-A-CWS	60,46	2,88
0,8 g Solbone-A-CWS	62,31*◇	2,22
2 g Trisbone	51,39♦∇	13,04
4 g Trisbone	56,02∇	3,86
8 g Trisbone	57,05∇	4,70

* ( $p < 0,05$ )	** ( $p < 0,01$ )	*** ( $p < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 1 (50 IE/kg Futter)
◇ ( $p < 0,05$ )	◇◇ ( $p < 0,01$ )	◇◇◇ ( $p < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 2 (100 IE/kg Futter)
◆ ( $p < 0,05$ )	◆◆ ( $p < 0,01$ )	◆◆◆ ( $p < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 3 (200 IE/kg Futter)
▽ ( $p < 0,05$ )	▽▽ ( $p < 0,01$ )	▽▽▽ ( $p < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 4 (400 IE/kg Futter)

#### 4.2.6 Kalzium in der Knochenasche

Der Mittelwert des Kalziumgehalts im Femur aller Gruppen beträgt 322,02 g/kg. Bei Betrachtung der Vitamin D<sub>3</sub>- Gruppen zeigt sich, dass die Dosiserhöhung von 200 IE auf 400 IE keine weitere Erhöhung des Kalziumgehalts der Knochenasche bewirkt, ebenso verhält es sich bei den letzten Dosierungserhöhungen bei PAN-HVD und Trisbone. Den höchsten Kalziumgehalt in der Knochenasche zeigt die Gruppe mit 4 g Trisbone/kg Futter als Zusatz (330,04 g/kg). Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Parametern schwanken die Werte deutlich und es kann kein Zusammenhang zwischen der Steigerung der Präparatdosis und einer Zunahme des Kalziumgehaltes im Femur erkannt werden. Die exakten Einzelwerte sind Tab. 4.19 zu entnehmen.

Bei der statistischen Auswertung findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen der höchsten Vitamin D<sub>3</sub>- Konzentration (400 IE/kg Futter) und der Versuchsgruppe mit Zusatz von 4 g Trisbone/kg Futter (s. Tab. 4.19).

**Tabelle 4.19:** Durchschnittlicher Kalziumgehalt in der Knochenasche von Femur [g/kg] (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), Versuch II

Diätzusätze/ kg Futter	Kalziumgehalt in der Knochenasche [g/kg] Femur	
	$\bar{x}$	$\pm s$
50 IE Vitamin D <sub>3</sub>	312,19	35,14
100 IE Vitamin D <sub>3</sub>	321,77	52,31
200 IE Vitamin D <sub>3</sub>	326,75	85,81
400 IE Vitamin D <sub>3</sub>	293,52	27,75
0,25 g PAN-HVD	277,59	68,44
0,5 g PAN-HVD	294,34	40,78
1 g PAN-HVD	280,26	60,00
2 g PAN-HVD	324,03	14,87
4 g PAN-HVD	321,78	17,15
0,05 g Solbone-A-CWS	311,32	29,80
0,1 g Solbone-A-CWS	314,83	36,45
0,2 g Solbone-A-CWS	282,46	67,32
0,4 g Solbone-A-CWS	295,86	38,63
0,8 g Solbone-A-CWS	299,16	30,90
2 g Trisbone	285,35	71,16
4 g Trisbone	330,04 $\nabla$	24,29
8 g Trisbone	281,10	61,93

\* ( $\rho < 0,05$ )      \*\* ( $\rho < 0,01$ )      \*\*\* ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 1 (50 IE/kg Futter)  
 $\diamond$  ( $\rho < 0,05$ )       $\diamond\diamond$  ( $\rho < 0,01$ )       $\diamond\diamond\diamond$  ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 2 (100 IE/kg Futter)  
 $\blacklozenge$  ( $\rho < 0,05$ )       $\blacklozenge\blacklozenge$  ( $\rho < 0,01$ )       $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$  ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 3 (200 IE/kg Futter)  
 $\nabla$  ( $\rho < 0,05$ )       $\nabla\nabla$  ( $\rho < 0,01$ )       $\nabla\nabla\nabla$  ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 4 (400 IE/kg Futter)

#### 4.2.7 Kalzium im Serum

Wie aus Tabelle 4.20 erkenntlich ist, kann zwischen der Steigerung der Dosierung eines verwendeten Präparates und einer Zunahme des Kalziumgehalts im Serum kein Zusammenhang erschlossen werden. Der höchste Gehalt des Serums an Kalzium ist bei der Versuchsgruppe mit dem Zusatz 2 g PAN-HVD/kg Futter zu sehen (312,62 mg/l). Den niedrigsten Gehalt zeigt die Gruppe mit dem Zusatz von 0,05 g Solbone/kg Futter (211,42 mg/l) und unterschreitet damit neben den Gruppen mit 0,25 g PAN-HVD (229,58 mg/l) und 0,1 g Solbone/kg Futter (232,46 mg/l) auch den niedrigsten Wert der Vitamin D<sub>3</sub>- Standardgruppen (200 IE/kg, 237,72 mg/l).

Bei der statistischen Auswertung ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe mit 20 mg Solbone P/kg Futter und der mittleren Vitamin D<sub>3</sub>- Dosierung (200 IE/kg Futter).



**Tabelle 4.20:** Durchschnittlicher Kalziumgehalt im Serum [mg/l] (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), Versuch II

Diätzusätze/ kg Futter	Kalzium im Serum [mg/l]	
	$\bar{x}$	$\pm s$
50 IE Vitamin D <sub>3</sub>	243,74	98,04
100 IE Vitamin D <sub>3</sub>	243,61	72,08
200 IE Vitamin D <sub>3</sub>	237,72	68,52
400 IE Vitamin D <sub>3</sub>	267,41	39,50
0,25 g PAN-HVD	229,58	149,25
0,5 g PAN-HVD	264,03	73,63
1 g PAN-HVD	256,76	58,15
2 g PAN-HVD	312,62	105,32
4 g PAN-HVD	270,29	84,55
0,05 g Solbone-A-CWS	211,42	67,72
0,1 g Solbone-A-CWS	232,46	68,43
0,2 g Solbone-A-CWS	303,25	179,25
0,4 g Solbone-A-CWS	286,82	98,25
0,8 g Solbone-A-CWS	303,98	71,70
2 g Trisbone	260,87	87,67
4 g Trisbone	249,87	93,28
8 g Trisbone	266,03	117,32

\* ( $p < 0,05$ )      \*\* ( $p < 0,01$ )      \*\*\* ( $p < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 1 (50 IE/kg Futter)  
 ◇ ( $p < 0,05$ )      ◇◇ ( $p < 0,01$ )      ◇◇◇ ( $p < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 2 (100 IE/kg Futter)  
 ◆ ( $p < 0,05$ )      ◆◆ ( $p < 0,01$ )      ◆◆◆ ( $p < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 3 (200 IE/kg Futter)  
 ▽ ( $p < 0,05$ )      ▽▽ ( $p < 0,01$ )      ▽▽▽ ( $p < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 4 (400 IE/kg Futter)

#### 4.2.8 ALP im Serum

Wie aus Tabelle 4.21 ersichtlich ist, besteht ähnlich wie im ersten Versuchsdurchgang ein Zusammenhang der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase mit der Präparatdosierung. Mit steigender Dosierung kommt es bei allen verwendeten Präparaten zu einer Abnahme der Aktivität. Unter den Vitamin D<sub>3</sub>- Standardgruppen zeigen die Gruppen mit dem Zusatz 50 und 100 IE/kg Futter die höchste Enzymtätigkeit. Übertroffen werden diese von den Gruppen mit dem Zusatz 0,25 und 0,5 g PAN-HVD, 0,05 Solbone sowie den Gruppen mit 2 und 8 g Trisbone pro kg Futter. Die letztgenannte Gruppe stellt eine Ausnahme der vorher getroffenen Aussage bezüglich des Verhaltens der ALP auf eine Steigerung der Dosis, da es hier gegenüber der Gruppe mit 4 g Trisbone/kg Futter zu einem erneuten Anstieg der Enzymaktivität kommt. Die niedrigste Enzymaktivität findet sich bei der Ration 4 g PAN-HVD/ kg Futter, welche damit den Wert der niedrigsten Vitamin D<sub>3</sub>- Dosis noch weiter unterschreitet. Die stärkste ALP- Aktivität zeigt die Gruppe mit dem Zusatz 0,05 g Solbone pro kg Futter.

Bei der statistischen Auswertung finden sich verschiedene Signifikanzen gegenüber den Kontrollgruppen. Diese sind aus untenstehender Tabelle X zu entnehmen.

**Tabelle 4.21:** Durchschnittlicher Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) im Serum [U/l] (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), Versuch II

Diätzusätze/ kg Futter	ALP im Serum [U/l]	
	$\bar{x}$	$\pm s$
50 IE Vitamin D <sub>3</sub>	0,51	0,13
100 IE Vitamin D <sub>3</sub>	0,51	0,20
200 IE Vitamin D <sub>3</sub>	0,44	0,17
400 IE Vitamin D <sub>3</sub>	0,21*◇	0,09
0,25 g PAN-HVD	0,56▽	0,21
0,5 g PAN-HVD	0,56▽	0,16
1 g PAN-HVD	0,42	0,18
2 g PAN-HVD	0,24*◇	0,20
4 g PAN-HVD	0,14*◇◆	0,06
0,05 g Solbone-A-CWS	0,59▽	0,14
0,1 g Solbone-A-CWS	0,50▽	0,17
0,2 g Solbone-A-CWS	0,33	0,17
0,4 g Solbone-A-CWS	0,39	0,20
0,8 g Solbone-A-CWS	0,23*◇	0,13
2 g Trisbone	0,52▽	0,14
4 g Trisbone	0,48▽	0,16
8 g Trisbone	0,55▽	0,14

\* ( $\rho < 0,05$ )      \*\* ( $\rho < 0,01$ )      \*\*\* ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 1 (50 IE/kg Futter)  
 ◇ ( $\rho < 0,05$ )      ◇◇ ( $\rho < 0,01$ )      ◇◇◇ ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 2 (100 IE/kg Futter)  
 ◆ ( $\rho < 0,05$ )      ◆◆ ( $\rho < 0,01$ )      ◆◆◆ ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 3 (200 IE/kg Futter)  
 ▽ ( $\rho < 0,05$ )      ▽▽ ( $\rho < 0,01$ )      ▽▽▽ ( $\rho < 0,001$ ) vs. Kontrollgruppe 4 (400 IE/kg Futter)

### 4.3 Weender- Analyse

Bei der durchgeführten Weender- Analyse ergaben sich für die Futterproben der beiden Versuche die in Tabelle 4.22 und 4.23 dargestellten Ergebnisse.

**Tabelle 4.22:** Nährstoffgehalt der Proben im ersten Versuch

Futterart	TS [%]	Rfa [%]	Rp [%]	Rfe [%]	Ra [%]
100 IE Vitamin D <sub>3</sub>	90,56	4,43	23,22	5,03	8,46
200 IE Vitamin D <sub>3</sub>	91,05	3,91	22,57	3,72	9,47
400 IE Vitamin D <sub>3</sub>	91,29	4,16	21,06	2,64	11,76
0,5 µg 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	90,74	4,21	21,83	3,08	9,57
1 µg 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	91,33	4,40	22,28	3,37	9,06
2 µg 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	90,78	4,06	21,97	2,56	8,57
5 mg Solbone-A-CWS P	91,62	4,29	22,32	2,28	8,40
20 mg Solbone P	91,04	4,16	21,88	2,72	8,80
80 mg Solbone P	91,31	4,13	22,89	2,34	8,14
320 mg Solbone P	90,98	3,91	21,65	2,65	8,00
8 mg Solbone PP	90,71	4,01	21,39	2,03	8,96
32 mg Solbone PP	91,21	3,94	21,84	2,12	8,53
2 g Trisbone	90,76	4,17	21,47	1,86	7,94
8 g Trisbone	91,38	4,20	21,73	2,08	8,71
32 g Trisbone	90,91	4,25	21,60	3,07	8,77

**Tabelle 4.23:** Nährstoffgehalt der Proben im zweiten Versuch

Futterart	TS [%]	Rfa [%]	Rp [%]	Rfe [%]	Ra [%]
50 IE Vitamin D <sub>3</sub>	90,52	4,80	20,25	*	9,26
100 IE Vitamin D <sub>3</sub>	90,15	4,92	19,92	2,04	10,41
200 IE Vitamin D <sub>3</sub>	90,40	4,75	20,18	2,19	8,76
400 IE Vitamin D <sub>3</sub>	90,31	5,23	20,00	3,08	9,98
0,25 g PAN-HVD	90,02	3,54	22,36	3,46	9,60
0,5 g PAN-HVD	90,31	4,47	22,01	1,79	9,34
1,0 g PAN-HVD	89,99	4,90	21,29	3,95	9,07
2,0 g PAN-HVD	90,33	5,38	21,18	3,41	9,51
4,0 g PAN-HVD	90,07	5,26	21,37	2,59	10,27
0,05 g Solbone-A-CWS	90,04	5,60	21,61	2,82	9,12
0,1 g Solbone-A-CWS	89,99	5,58	21,55	1,74	8,19
0,2 g Solbone-A-CWS	89,96	5,63	21,05	3,09	10,97
0,4 g Solbone-A-CWS	90,10	4,85	21,32	3,47	12,16
0,8 g Solbone-A-CWS	90,46	5,37	20,49	3,51	10,67
2 g Trisbone	90,54	5,01	21,60	3,77	9,75
4 g Trisbone	90,32	4,93	21,02	*	9,27
8 g Trisbone	90,35	4,94	21,35	4,10	8,95

\* aus technischen Gründen sind diese Werte nicht bestimmbar.

#### **4.4 Beurteilung der biologischen Aktivität der verwendeten Extrakte**

Anhand der erhobenen Daten des Wachteleischalentests erfolgte für jeden Versuchsdurchgang und die darin verwendeten Präparate eine Schätzung der biologischen Aktivität der Extrakte anhand des Hauptparameters Eischalentrockengewicht mittels dem Parallel- Line Bioassay PLA 2.0 erstellt. Die Ergebnisse sind der statistischen Auswertung sind den Tabellen 4.24 und 4.25 zu entnehmen. Bei dieser Art der Auswertung wird von einer bekannten Wirkung des

„Standard“, in diesem Fall Vitamin D<sub>3</sub> ausgegangen. Mithilfe des Standards kann nun für die verwendeten Extrakte eine Dosis- Wirkungs- Kurve erstellt werden, die einen parallelen Verlauf zu der des Standards aufweist. Dadurch kann mittels Logarithmik die biologische Aktivität des Extraktes anhand des Standards errechnet werden. Die Vorteile dieses Bioassays liegen zum einen darin, dass die lineare Korrelation zwischen Dosis und Wirkung damit bewiesen werden kann, und zum anderen die biologische Aktivität eines Extraktes unabhängig von seiner eingesetzten Dosierung errechnet werden kann.

**Tab. 4.24:** geschätzte biologische Aktivität der Extrakte des ersten Versuchs

Extrakt	Geschätzte Aktivität [IE/g]	95 % Confidence Intervall [IE/g]
Solbone P	4 071	2 065- 8 001
Solbone PP	17 167	6 162- 90 092
Trisbone	15	4- 38

Wie aus Tab. 4.24 ersichtlich, zeigt der Extrakt Solbone PP mit einer biologischen Aktivität von 17 167 IE/g Extrakt die höchste geschätzte biologische Aktivität der verwendeten Präparate, aber auch die höchste Streuung innerhalb der Werte. Die biologische Aktivität von Solbone P beträgt mit 4 071 IE/g nur etwa ein Viertel derer von Solbone PP. Die biologische Aktivität des verwendeten *Trisetum flavescens* liegt mit 15 IE/g weit unterhalb der anderen Präparate.

**Tab. 4.25:** geschätzte biologische Aktivität der Extrakte des zweiten Versuchs

Extrakt	Geschätzte Aktivität [IE/g]	95 % Confidence Intervall [IE/g]
PAN-HVD	114	88- 146
Solbone-A-CWS	574	428- 761
Trisbone	1	0,2- 3

Im zweiten Versuchsdurchgang zeigt der Extrakt Solbone-A-CWS mit 574 IE/g die höchste biologische Aktivität. Damit beträgt sie gut das Fünffache der biologischen Aktivität des zweiten eingesetzten Solanum- Extraktes PAN-HVD, welche 114 IE/g beträgt. Desweiteren zeigt Solbone-A-CWS im Vergleich zu PAN-HVD eine deutlich stärkere Streuung der Werte. Die biologische Aktivität von *Trisetum flavescens* ist in

diesem Versuchsdurchgang verglichen mit dem ersten Durchgang noch weiter erniedrigt und liegt hier bei nur 1 IE/ g Extrakt.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Kritik der Methoden**

#### **5.1.1 Haltung und Unterbringung der Tiere**

Die Wachtelhennen wurden in beiden Versuchsdurchgängen in Gruppen von 15 bzw. 18 Tieren in Drahtkäfigen gehalten, die durch eine Schiebetür verschlossen waren und über einen an der Frontseite angehängten Futtertrog verfügten. Das Klima im Stall wurde vollautomatisch überwacht und geregelt. Um dennoch mögliche Unterschiede des Klimas und auch des Lichtes auszugleichen, wurden die Käfige gleichmäßig im Raum verteilt. Die Lichtzufuhr erfolgte nach einem vom Zentralverband der deutschen Geflügelwirtschaft e.V. festgelegten, 24- stündigen Lichtprogramm. Die Funktionstüchtigkeit der Klimaanlage wurde täglich kontrolliert. Ebenso wurde täglich kontrolliert, ob eine ad libitum Aufnahme von Futter sowie ein uneingeschränkter Zugang zum Trinkwasser möglich war, auch wurde die Funktionalität der Toppeltränken überprüft.

Trotz dieser standardisierten Versuchsanordnung konnte keine hundertprozentige Überwachung der Tiere selbst und ihrer Haltungsbedingungen erfolgen. Aus diesem Grund können der erste und der zweite Versuchsdurchgang nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden.

#### **5.1.2 Der Wachteleischalentest**

Der Wachteleischalentest stellt ein biologisches Testverfahren zur Bestimmung der biologischen Aktivität von Vitamin D- Metaboliten in verschiedenen, kalzinogenen Pflanzen dar, wie z.B. auch *Solanum glaucophyllum* und *Trisetum flavescens*. Dadurch kann ein direkter Vergleich mit Vitamin D- haltigen Kontrollrationen hergestellt werden. Erstmals wurde er 1968 von ZUCKER und GROPP verwendet und wird auch noch heute im damals verwendeten Versuchsaufbau angewandt. Wie bereits unter Punkt 3 (Material und Methoden) beschrieben, setzt sich der Wachteleischalentest aus mehreren Phasen zusammen: einer Kontrollphase, in der die Tiere noch mit handelsüblichem Futter versorgt werden und ihre Gesundheit und



ihre Legeleistung im Vordergrund der Beobachtung stehen, so dass kranke Tiere und solche mit niedrigerer Legeleistung zum Schutz vor Ergebnisverfälschung von vornherein aus dem Versuch genommen werden können. In der sich anschließenden Phase, der so genannten Depletionsphase, wird den Tieren ein Vitamin D- armes Futter zugeführt. Fehlerhafterweise wird dieses Futter auch oft als Vitamin D- freies Futter bezeichnet, was aber rein von der Mischtechnik her betrachtet nicht möglich ist. Vitamin D ist in diesem Futter jedoch nur noch in so geringen Mengen vorhanden, dass es keinen biologischen Effekt im Organismus mehr erzielen kann. Diese Phase erstreckt sich über einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen (BAUMEISTER 1972), an deren Ende die Tiere entweder gar keine Legeleistung mehr zeigen oder nur noch dünnchalige bis schalenlose Eier, so genannte Windeier, legen. Da die Speicherkapazität für Vitamin D nur sehr gering ist (HOFMAN, 1971), wird das erwünschte Ergebnis der Depletion relativ schnell erreicht. In der folgenden Testphase können nun sowohl Vitamin D<sub>3</sub>- Präparate als auch Präparate von kalzinogenen Pflanzen untersucht werden, wie *Solanum glaucophyllum* und *Trisetum flavescens* (RAMBECK und ZUCKER, 1982). Bei einer suboptimalen Vitamin D- Versorgung (20- 70%  $\approx$  80 bis 320 IE im Futter) ist es möglich, die biologische Aktivität natürlicher und synthetischer Metaboliten vergleichend zu bestimmen (KOPP 1985) und somit eine lineare Beziehung zwischen der Aufnahme von Vitamin D<sub>3</sub> über das Futter und der Kalziumausscheidung über die Eischale herzustellen (ZUCKER und GROPP, 1968). Da es sich zeigte, dass sich der Kalziumanteil auch bei unterschiedlichem Eischalengewicht nicht veränderte (GROPP und ZUCKER, 1971), wurde der Messparameter der Kalziumausscheidung über die Eischale durch den Parameter Eischalentrockengewicht ersetzt.

Somit ist das Eischalentrockengewicht der wichtigste zu bestimmende Parameter um die biologische Verfügbarkeit von Vitamin D und seinen Metaboliten darzustellen. Während das Kalzium im Serum sehr straffen Regulationsmechanismen unterliegt und kaum Schwankungen zeigt, reagieren Legeleistung und Eischalentrockengewicht sehr stark auf das Zuführen von Vitamin D. Mittels weiterer Blut- und Knochenparameter können die Ergebnisse weiter gefestigt werden. THIERER (1989) konnte in seinen Untersuchungen die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der aus dem Wachteleischalentest ergebenden Daten durch ihre Reproduzierbarkeit nachweisen.

Die japanische Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) eignet sich sehr gut als Versuchstier. Infektionskrankheiten stellen bei dieser Art unter normalen Haltungsbedingungen kein Problem da, weiter zeichnen sie sich durch Körpergröße, Platzbedarf und Futtermittelverbrauch als praktisches Versuchstier aus, stehen sie doch bei diesen Größen zwischen denen von Maus und Ratte. GERKEN und MILLS (1993) konnten zeigen, dass sich die Legeleistung der Wachteln durch richtiges Handling und passende Haltungsbedingungen auf einem hohen Niveau mit ausgesprochener Regelmäßigkeit konstant halten lassen. Das Eigewicht entspricht bei der Wachtel 7 % des Körpergewichts (ca. 10 g), im Gegensatz dazu bei Huhn 3 % (ca. 60 g). Dies drückt einen vergleichbar intensiveren Stoffwechsel der Wachtel gegenüber dem Huhn aus (ZUCKER et al, 1967). Die Kalziumausscheidung über die Eischale beträgt fast das Doppelte als die beim Huhn. Daraus ergibt sich, dass die Wachtel wesentlich schneller auf den Mangel von Vitamin D reagieren kann und damit das bessere Versuchstier für Untersuchungen eine Depletion von Vitamin D betreffend darstellt. Den wirtschaftlichen Vorteil der Wachtel als Versuchstier stellt der niedrigere Futtermittelverbrauch dar (24 g/ Ei gegenüber 170 g/Ei beim Huhn), wodurch nicht nur geringere Futterkosten, sondern auch weniger Kosten durch die verwendeten Präparate entstehen. Des Weiteren können bei teureren Präparaten größere Tierzahlen verwendet werden als bei der Durchführung mit Hühnern.

### **5.1.3 Versuchsdurchführung**

Beide Versuche liefen nach dem in 5.1.2 beschriebenen Schema mit Kontroll-, Depletions- und Testphase ab. In der Kontrollphase wurde die Legeleistung der Tiere bestimmt, nur ein Mindestwert von 80 % führte zu einer weiteren Verwendung in den folgenden Testphasen. Um in der Depletionsphase eine ausreichende Entleerung der Vitamin D- Speicher zu erhalten, musste die Legeleistung mindestens um 50 % vermindert sein. Nach BAUMEISTER (1972) ist eine 18- bis 21- tägige Depletionsphase ausreichend, um neben dem Absinken der Legeleistung keine Vitamin D- Mangelsymptome der Tiere zu provozieren. Die Tiere stammten allesamt aus der Institutseigenen Wachtelzucht, was einen einheitlichen Genpool der Tiere garantierte. Der gesundheitliche Zustand der Tiere wurde täglich kontrolliert. Nach einer 15- bzw. 21- tägigen Testphase, in welcher täglich die

Parameter Legeleistung und Eischalentrockengewicht bestimmt wurden, wurden Blut- und Knochenwerte am Ende des Versuchs bestimmt.

## 5.2 Versuchspräparate

Vor jedem Versuchsdurchlauf wurde die Futterrationen im Institutseigenen Mischaum aus den einzelnen Komponenten hergestellt. Die prozentuale Zusammensetzung ist aus Tabelle 3.1 ersichtlich. Um die Verteilung kleiner Mengen im Futter zu ermöglichen, wurde im 500 g Mischer jeweils eine Vormischung hergestellt, die dann im 8 kg Mischer mit den restlichen Futterkomponenten zu einer homogenen Ration vermischt wurden.

In der Testphase beider Versuche wurden Vitamin D<sub>3</sub>- Rationen verwendet, im ersten Durchgang zusätzlich verschiedene Konzentrationen des Vitamin D-Metaboliten 1,25(OH)<sub>2</sub>- Vitamin D<sub>3</sub>, um als Vergleichspräparate für die verwendeten Pflanzenextrakte von *Solanum glaucophyllum* und *Trisetum flavescens* zu dienen. Die verschiedenen Konzentrationen der Extrakte sind den Tabellen 3.2 und 3.3 zu entnehmen.

## 5.3 Vergleichende Betrachtung der einzelnen Parameter

Der Wachteleischalentest stützt sich in erster Linie auf die Bestimmung der Legeleistung und des Eischalentrockengewichtes. Der Vorteil dieses Probenmaterials stellt die einfache Art der Gewinnung dar, denn die Vögel müssen dabei kein stressprovozierendes Handling durchlaufen. Wichtig ist dabei jedoch zu bemerken, dass sich die aus dieser Auswertung ergebenden Daten nicht exakt auf einzelne Tiere beziehen, da sich in einem Käfig in beiden Durchgängen eine Gruppe befand und keine Einzeltiere. Die errechneten Werte stellen demnach Mittelwerte der jeweiligen Gruppe dar.

Um mögliche Fehlerquellen in der weiteren Verarbeitung der Eier auszuschließen, erfolgte das Aufschneiden, Auswaschen, Trocknen und Wiegen der Schalen mit größter Sorgfalt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass zum einen beim Aufschneiden keine Schalenanteile verloren gingen, und zum anderen kein Eiinhalt in der Schale verblieb. Dies hätte das Eischalentrockengewicht verfälscht. Ebenso

war auch an der getrockneten Eischale auf mögliche Verluste zu achten.

Die anderen Parameter, die aus Knochen und Serum bestimmt wurden, stellen eine Möglichkeit dar, die im Eischalentest gewonnenen Ergebnisse zu unterstreichen.

### **5.3.1 Mortalität**

Die Gesamtmortalität im ersten Durchgang betrug 2,22 %. Zwei der Tiere mussten aufgrund starken Kümmerns ohne weitere Symptome getötet werden, drei verstarben aufgrund Erkrankungen der Legeorgane.

In der Testphase des zweiten Durchgangs starben insgesamt von den 306 eingestellten Wachtelhennen 20 Tiere, was einer Gesamtmortalität von 6,54 % entspricht. Von diesen Tieren mussten drei aufgrund von starkem Kümmern ohne weitere konkrete Symptome getötet werden, die restlichen Tiere verstarben an Erkrankungen der Legeorgane oder an körperlicher Schwäche ohne äußerliche Symptomatik der Legeorgane. Hier zeigte die Gruppe, die die Ration mit 50 IE Vitamin D<sub>3</sub>/ kg Futter erhielten, neben anderen Gruppen (0,2 g Solbone-A-CWS/kg Futter und 2 g Trisbone/kg Futter) die höchste Mortalität innerhalb einer Ration mit 16,67 %. Somit besteht hier ein möglicher Zusammenhang zwischen der niedrigen Vitamin D<sub>3</sub>- Dosierung im Futter und dem geschwächten körperlichen Zustand der Tiere, der schließlich zu deren Tod führte.

In den Aufzeichnungen des ersten Durchgangs können derartige Zusammenhänge nicht beobachtet werden.

### **5.3.2 Tiergewichte**

Die Tiergewichte wurden nur im ersten Versuchsdurchlauf bestimmt. Um bei den Tieren keinen zusätzlichen Stress zu provozieren, wurde darauf verzichtet, die Tiere in regelmäßigen Abständen zu wiegen, sondern lediglich am Tag der Einstallung und am Schlachttag. Zu ersterem Zeitpunkt wurden die Tiere käfigweise gewogen, am Versuchsende wurde von jedem Tier das Einzelgewicht ermittelt.

Es finden sich sowohl Gewichtszu- als auch Abnahmen. Die stärksten Gewichtsverluste finden sich allerdings in der Gruppe, welche 100 IE Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter als Zusatz erhalten haben. Somit könnte ein Zusammenhang zwischen der

Vitamin D<sub>3</sub>- Mangelversorgung und den Gewichtsverlusten innerhalb dieser Gruppe bestehen.

### 5.3.3 Futtermittelverzehr

Um eine verfälschende Beeinflussung dieses Parameters durch hohe Futtermittelverluste zu verhindern, wurde den Tieren zwar ein uneingeschränkter Zugang zum in den Futtertrögen befindlichen Futter gewährt, jedoch gab die Schiebetür an der Käfigfront nur so weiten Spielraum, dass die Tiere mit dem Kopf an das Futter gelangten, jedoch nicht in die Raufe zwecks „Baden“ klettern konnten. Im zweiten Durchgang kam es trotz dieser Vorsichtsmaßnahme zum Verstreuen von Futter. Dieses wurde gesammelt, gewogen und bei der Berechnung des Futtermittelverzehrs bei Auswertung des Versuchs berücksichtigt.

In beiden Versuchen ergeben sich ähnliche Werte für den Futtermittelverbrauch pro Tier und Tag, pro Ei und pro Gramm Eischale. Beim Verbrauch pro Ei und pro Gramm Eischale zeigt sich in beiden Versuchsdurchgängen mit steigender Dosierung eine deutliche Abnahme des Verbrauchs. Ebenso muss dazu bemerkt werden, dass sich die zum Teil sehr hohen Verbrauchszahlen sowohl im ersten als auch im zweiten Versuchsdurchgang aus einer verminderten Legeleistung bei konstantem Futtermittelverzehr ergeben und daher rein rechnerische Werte darstellen. Sie eignen sich daher nicht, um Vergleiche zwischen den Gruppen anzustellen. Diese wäre nur bei einer annähernd gleichen Legeleistung gegeben.

Der Futtermittelverzehr selbst trifft zwar keine Aussage über die biologische Aktivität der im Futter enthaltenen Vitamin D- Metaboliten, wohl aber über Akzeptanz des Futters bei den Wachtelhennen. Dabei soll festgehalten werden, dass die Akzeptanz des Futters durch den Zusatz der Extrakte nicht negativ beeinflusst wurde, was eine absolute Voraussetzung für den Einsatz von Pflanzenextrakten als mögliche Futterzusatzstoffe darstellt.

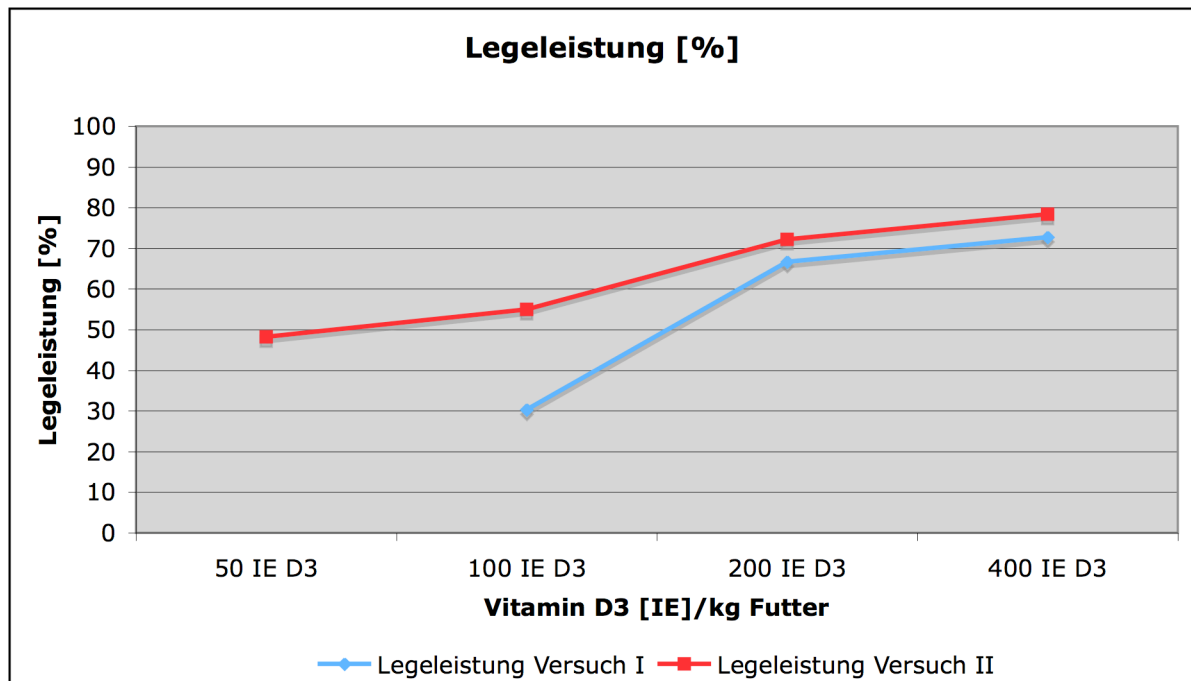
### 5.3.4 Legeleistung

Neben dem Eischalentrockengewicht und der Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Serum stellt die Legeleistung den ausschlaggebendsten Parameter des Wachteleischalentestes dar.

Hierzu wurde täglich zur selben Tageszeit, und zwar vormittags, für jede Gruppe die Zahl der gelegten Eier bestimmt. Dadurch konnte zum einen die Legeleistung der einzelnen Gruppen von Tag 4 bis 15 bzw. Tag 4 bis 20 bestimmt werden, zum anderen die durchschnittliche Legeleistung zu bestimmten Zeitabschnitten. Zur Berechnung der durchschnittlichen Legeleistung wurden erst Werte ab dem fünften Tag herangezogen, da die Präparate im Anschluss an die Depletion nur einen langsam einsetzenden Effekt auf die Legeleistung zeigten. Um konstante Werte zu erhalten, wurden diese ersten Tage mit niedriger Legeleistung nicht berücksichtigt. Die Betrachtung der Legeleistung in einzelnen Zeitabschnitten lässt einen detaillierten Blick auf die Entwicklung der Legeleistung im Versuchsverlauf zu.

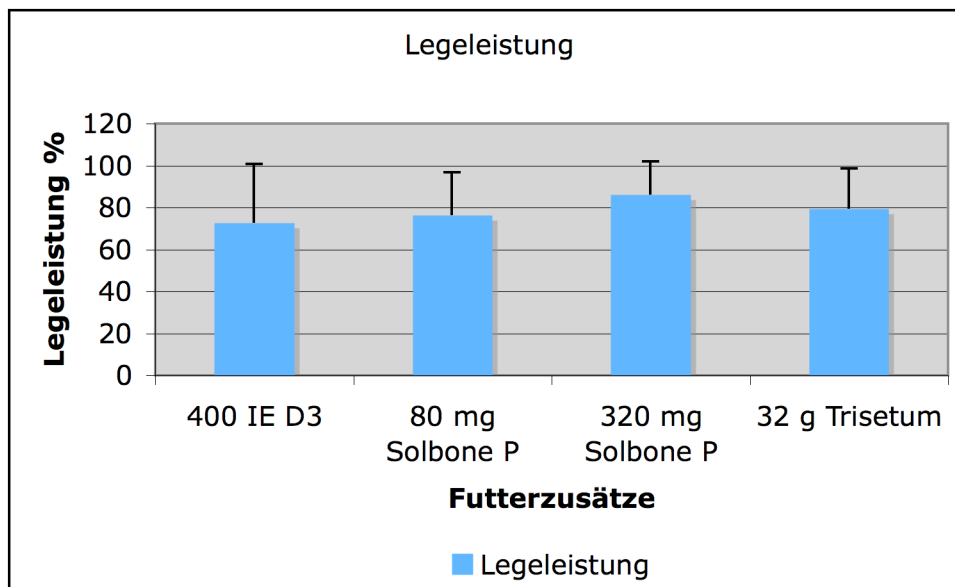
Bei Betrachtung des gesamten Versuchszeitraums zeigt sich in beiden Durchgängen eine direkt proportionale Abhängigkeit zwischen der steigenden Vitamin D<sub>3</sub>- Dosierung und der Erhöhung der Legeleistung (s. Abb. 5.1). Dadurch ergibt sich die Annahme, dass bei der Dosierung von 400 IE Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter als optimale D<sub>3</sub>- Dosierung ausgegangen werden kann, da hier ein Maximum innerhalb der Vitamin D<sub>3</sub>- Gruppen verzeichnet werden kann. Dass die Legeleistung der optimalen Vitamin D<sub>3</sub>- Dosierung im ersten Versuch durch die Gruppe mit der höchsten 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> - Dosierung übertroffen wird, kann dadurch erklärt werden, dass es sich dabei um den bereits aktivierten Vitamin D<sub>3</sub>- Metaboliten handelt, der dadurch eine höhere biologische Aktivität hat als das noch nicht in Leber und Niere metabolisierte Vitamin D<sub>3</sub> (RAMBECK, 1997; PONCHON et al., 1969; BRUNETTE et al., 1978).

**Abb. 5.1:** Durchschnittliche Legeleistung [%] in Abhängigkeit vom Vitamin D<sub>3</sub>-Gehalt im Futter



Bei der Betrachtung der durchschnittlichen Legeleistung über den gesamten Zeitraum des erste Versuchs ist erkennbar, dass die beiden höchsten Solbone P-Dosierungen, nämlich 80 und 320 mg/kg Futter und die höchste Trisbone-Dosierung (32 g/kg Futter) einen steigernden Effekt auf die Legeleistung ausüben (s Abb. 5.2). Die hier verwendeten Dosierungen von Solbone PP, welches eine hochgereinigte und konzentrierte Form des Solbone P (Solanum) mit einem um den Faktor 2,5 erhöhten Inhalt von Solanum glaucophyllum darstellt, erzielen keine das Vitamin D<sub>3</sub>- Optimum übersteigenden Effekte. Hier müsste überprüft werden, ob die Dosierungen in einem zu niedrigen Bereich lagen oder ob die Aktivität der Extrakte noch weiter verbessert werden könnte.

**Abb. 5.2:** Vergleichende Betrachtung einzelner Legeleistungen über den Gesamtversuchszeitraum, Versuch I



Auch bei Betrachtung der Entwicklung der Legeleistung sind es oben genannte Extrakte, die gegenüber der optimalen Vitamin D<sub>3</sub>- Ration eine zunehmende Steigerung der Legeleistung erreichen. Bei keiner der Gruppen findet sich im Verlauf ein Absinken. Die zunehmende Legeleistung der Tiere kann mit einer verstärkten Reaktion auf das Vitamin D<sub>3</sub>- Angebot nach der Depletionsphase erklärt werden, in der die Speicher nahezu geleert wurden (GROPP und ZUCKER, 1971; KOPP, 1985; ZUCKER und GROPP, 1968). Diese Extrakte optimieren damit den biologischen Effekt des reinen Vitamin D<sub>3</sub>.

Bei den Gruppen, welche eine im Verlauf absinkende oder eine nach anfänglicher Steigerung auftretende Verminderung der Legeleistung verzeichnen, ist die biologische Aktivität des Extraktes evtl. nicht ausreichend, um eine konstante Legeleistung zu gewährleisten bzw. es wurde mit diesen Dosierungen das Optimum der Dosis- Wirkungs- Beziehung übertroffen. Dies trifft besonders auf die Gruppen mit 5 und 20 mg Solbone P, 8 und 32 mg Solbone PP und 8 g Trisetum flavescens pro kg Futter zu.

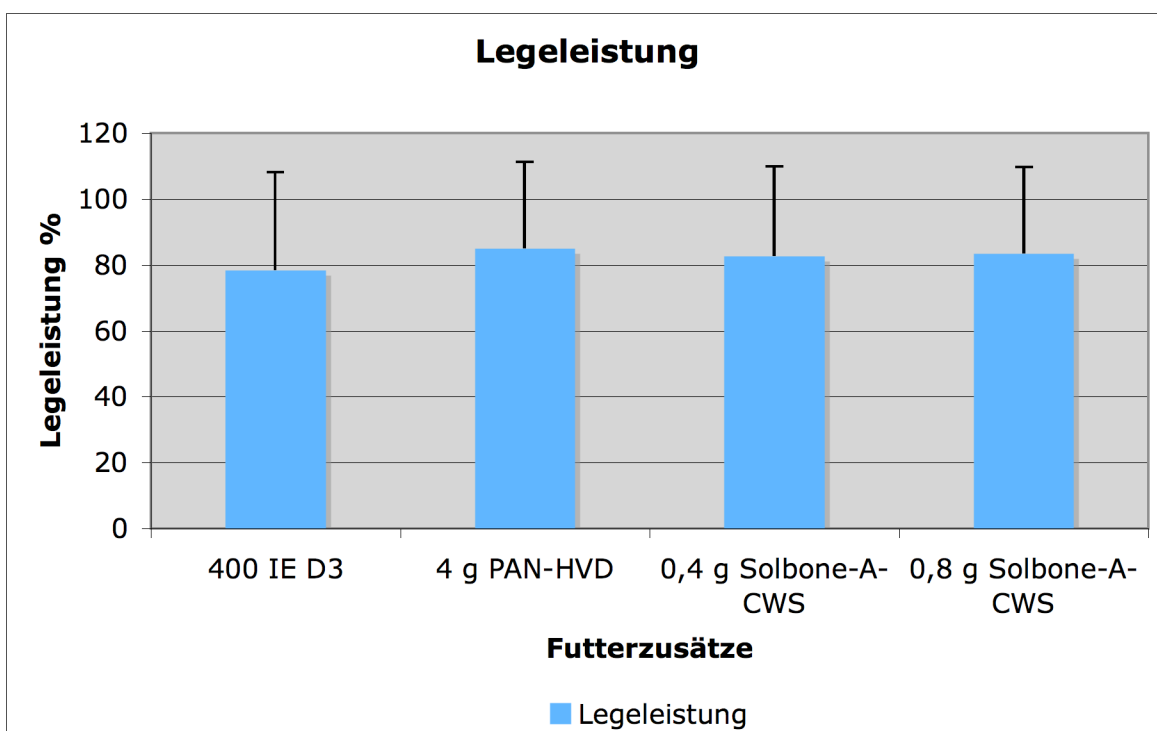
Im zweiten Durchgang zeigt sich bezüglich der Gesamtlegeleistung gegenüber der optimalen Vitamin D<sub>3</sub>- Dosierung eine Steigerung bei den Rationen 4 g PAN-HVD



und 0,4 und 0,8 g Solbone -A-CWS/kg Futter. Die verwendeten Trisetum-Dosierungen haben hier keinen das Optimum verbessernden biologischen Effekt. Bei den verschiedenen Dosierungen des PAN-HVD ist die oben genannte die einzige, die das Optimum übersteigt, niedrigere Dosierungen erzielen keine Verbesserung der Legeleistung gegenüber 400 IE Vitamin D<sub>3</sub>. Zum Optimum muss gesagt werden, dass im zweiten Durchgang im letzten Abschnitt des Versuches nicht bei 400 IE die höchste Legeleistung auftritt, sondern bei der Gruppe mit 200 IE Vitamin D<sub>3</sub> /kg Futter. Auch wenn, wie in diesen Versuchen gezeigt, die Parameter wie Legeleistung und Eischalentrockengewicht eine höhere Leistung bei 400 IE als bei 200 IE zeigen, stellt die Dosierung von 200 IE/kg Futter aufgrund von Sicherheitsaspekten bezüglich einer möglichen Überdosierung den empfohlenen Futtergehalt zur Vitamin D<sub>3</sub>- Abdeckung dar. Weiter wird dies durch die Tatsache bekräftigt, dass die Steigerung der Parameterwerte von 200 auf 400 IE/kg Futter nicht so bedeutend sind.

Ebenso ist erkennbar, dass eine Dosiserhöhung von 0,4 g auf 0,8 g Solbone-A-CWS /kg Futter keine weitere Steigerung der Legeleistung bewirkt. Es zeigt sich hier somit keine verstärkte biologische Aktivität in Abhängigkeit von der Dosierung.

**Abb. 5.3:** Vergleichende Betrachtung einzelner Legeleistungen über den Gesamtversuchszeitraum, Versuch II



Auch bei Betrachtung der Entwicklung der Legeleistung können bei oben genannten Extrakten konstante Zunahmen der Legeleistung beobachtet werden. Im Verlauf der Testphase zeigt sich keine absinkende Legeleistung, wohl aber bei der Dosierung 0,4 g Solbone von der zweiten auf die dritte Phase verglichen mit der Gruppe mit 0,8 g Solbone als Zusatz nur eine minimale Zunahme. Es kommt hier wohlmöglich zu einer Art Erschöpfungszustands des Organismus oder erneut ein Überschreiten des Optimums der Dosis- Wirkungs- Beziehung.

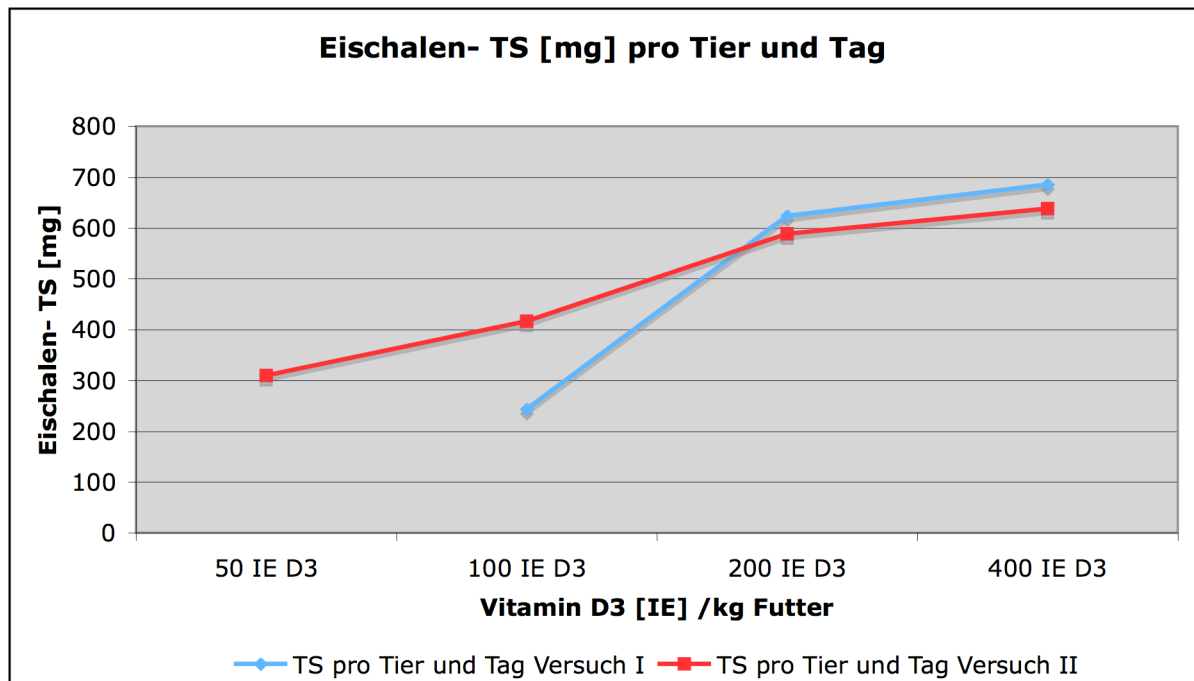
Die Zunahmen erklären sich wohl auch hier mit einer stärkeren Reaktion nach der Depletionsphase auf das Vitamin D<sub>3</sub>- Angebot in den Extrakten. Die genannten Extrakte optimieren also den biologischen Effekt des reinen Vitamin D<sub>3</sub>.

Der verwendete Extrakt von *Trisetum flavescens* wurde in beiden Versuchen in den Dosierungen 2 g und 8 g /kg Futter verwendet wurde. Hier zeigen sich sehr starke Schwankungen der Legeleistung. Gründe für diese Imbalancen können z.B. im unterschiedlichen Gehalt in der Pflanze selbst liegen, beeinflusst durch Standort und Bodenverhältnisse, sowie auch durch das angewandte Extraktionsverfahren. Weitere mögliche Gründe für derartige Schwankungen können auch in der Herstellungsmethode liegen, so z.B. im Mischvorgang und in der Verteilung des Extrakts. Um diesen *Trisetum flavescens*- Extrakt kommerziell als Futterzusatzstoff einsetzen zu können, müssten dazu die Schwankungen zwischen den einzelnen Chargen noch minimiert werden .

### **5.3.5 Eischalentrockengewicht**

Wie auch schon beim Parameter der Legeleistung beobachtet findet sich ein direkter Zusammenhang zwischen einer Vitamin D<sub>3</sub>- Dosissteigerung und der Zunahme des Eischalentrockengewichts (Eischalen-TS). Dies ist in Abb. 5.4 dargestellt.

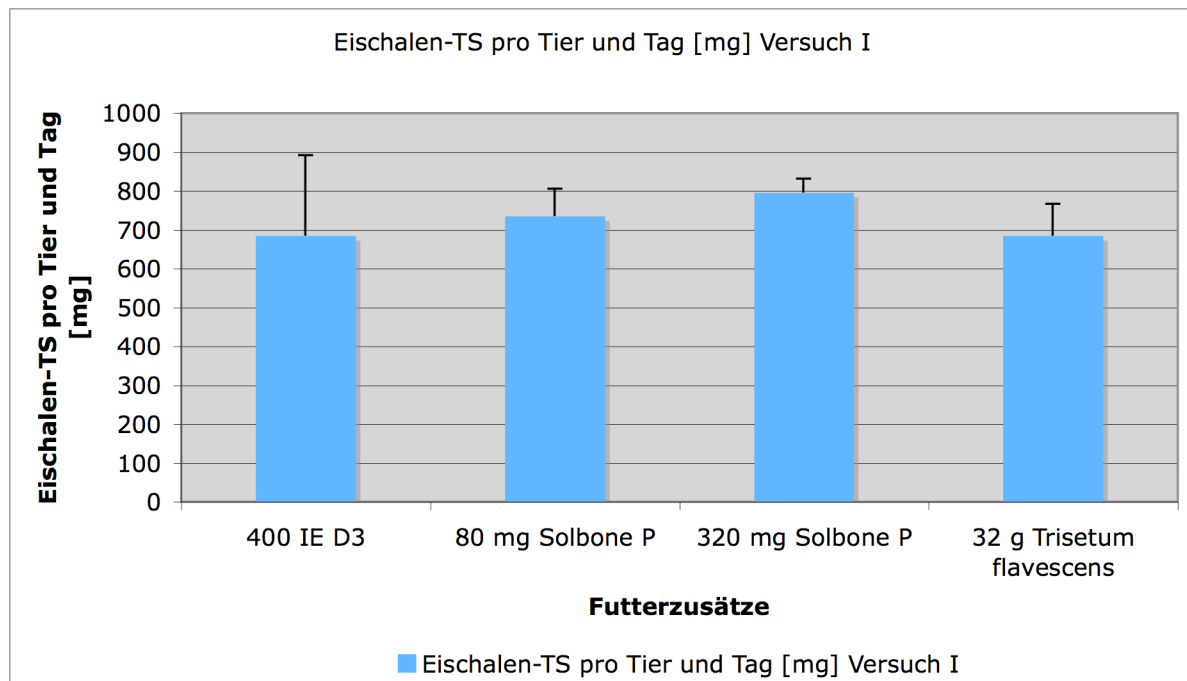
**Abb. 5.4:** Durchschnittliches Eischalentrockengewicht [mg] in Abhängigkeit vom Vitamin D<sub>3</sub>- Gehalt im Futter



Auch bei diesem Parameter kann also die Vitamin D<sub>3</sub>- Dosierung 400 IE/kg Futter als Optimum angesehen werden.

Im ersten Durchgang wird gegenüber dem Optimum beim Zusatz 400 IE/kg Futter ab der Dosis 1 µg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> /kg Futter ein positiver Effekt beobachtet, sowie ab einer Solbone P- Dosis von 80 mg/kg Futter. Entgegen der Legeleistung entspricht die Eischalen-TS der Gruppe mit 32 g Trisetum flavescens/kg Futter nahezu exakt derer von 400 IE/ kg.

**Abb. 5.5:** Vergleichende Betrachtung einzelner Eischalentrockengewichte über den Gesamtversuchszeitraum, Versuch I

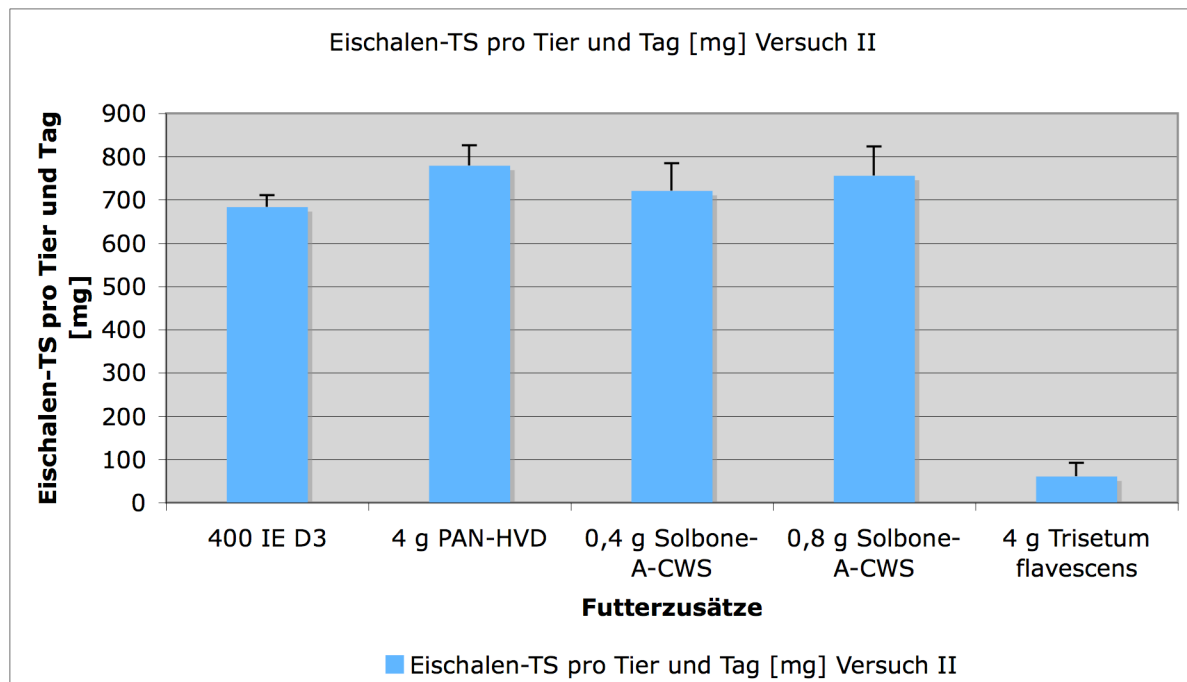


Bei der Verlaufbetrachtung bietet sich ein der Legeleistung vergleichbares Bild, wobei bei 32 g Trisetum zwar ein Anstieg erkennbar ist, dieser jedoch in der letzten Phase des Versuches nicht mehr an den Wert des Vitamin D<sub>3</sub>- Optimums heranreicht und damit im Durchschnitt keine Verbesserung gegenüber dem Optimum erreicht. Die beiden Solbone P- Zusätze von 80 und 320 mg/ kg Futter zeigen hingegen eine kontinuierliche Steigerung, die auch das Vitamin D<sub>3</sub>- Optimum übertreffen. Die niedrigeren Dosierungen des Solbone P reichen nicht aus, um eine konstante Zunahme des Eischalentrockengewichts zu gewährleisten. Die biologische Aktivität von 5 mg Solbone P unterschreitet deutlich jene von 100 IE D<sub>3</sub> und ist somit nicht in der Lage, die entleerten Vitamin D- Speicher wieder aufzufüllen. Bei Solbone PP kann nach 10 Tagen eine Erschöpfung der Speicher erkannt werden, dem man durch den Futterzusatz nicht gerecht werden kann.

Im zweiten Durchgang kann gegenüber dem Optimum bei 400 IE D<sub>3</sub> bei den Gruppen mit dem Zusatz PAN-HVD ab der Dosierung von 4 g/ kg Futter eine deutliche Steigerung beobachtet werden. Ebenso wie auch schon beim Parameter der Legeleistung, stellen die Dosierungen 0,4 g und 0,8 g Solbone-A-CWS /kg Futter und 4 g PAN-HVD die Rationen dar, die in der Lage sind, das

Eischalentrockengewicht gegenüber dem Optimum zu steigern. Bei Betrachtung der Verlaufswerte werden diese Aussagen weiter unterstrichen.

**Abb. 5.6:** Vergleichende Betrachtung einzelner Eischalentrockengewichte über den Gesamtversuchszeitraum, Versuch II



Die verwendeten Trisetum- Präparate sind auch hier nicht in der Lage, den Parameter zu verbessern und liegen sogar noch unter den niedrigeren Vitamin D<sub>3</sub>- Dosierungen (s. Abb. 5.6). Wie auch bei der Legeleistung kann hier eine noch nicht voll optimierte Herstellung des Präparates ursächlich sein, aber auch Schwankungen des Gehaltes der biologisch aktiven Komponente in der Pflanze vorliegen. Wie bereits erwähnt, kann dies durch die Bodenbeschaffenheit, den Standort der Pflanze oder auch durch die Bearbeitung der Pflanze (Labormethoden zur Bestimmung, Extraktionsverfahren) beeinflusst werden (MELLO, 1991; MELLO und HABERMEHL, 1998; STARK 1979; ZUCKER et al., 1980).

Zur Schätzung der biologischen Aktivität der verwendeten Extrakte Solbone P, Solbone PP, Solbone-A-CWS, PAN-HVD und Trisetum flavescens siehe Punkt 5.4.

### 5.3.6 Knochenasche und Kalzium in der Knochenasche

In dieser Arbeit wurde der Femurknochen der Versuchstiere sorgfältig präpariert, getrocknet und verascht. Bei der Auslösung der Femurknochen am Schlachttag musste besonders darauf geachtet werden, dass das Caput humeri zusammenhängend mit dem restlichen Knochen gewonnen werden konnte, um eine Verfälschung der Werte zu verhindern.

Mit Ausnahme der Gruppen, welche Solbone (P) als Futterzusatz erhielten, kann bei beiden Versuchsdurchgängen ein Anstieg des Knochenaschegehaltes mit steigender Präparatdosierung beobachtet werden. In keiner Gruppe findet sich mit steigender Dosierung ein Abfall des Knochenaschegehaltes.

Im ersten Versuch kann der höchste Wert, der bei der Gruppe mit 400 IE Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter erreicht wird, von der Gruppe mit dem Zusatz 2 µg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und 320 mg Solbone P/kg Futter übertroffen werden. Im zweiten Versuch zeigt sich diese Beobachtung bei den Gruppen, welche 2 g und 4 g PAN-HVD, sowie 0,8 g Solbone bzw. Solanum glaucophyllum als Futterzusatz erhielten. Bei den Gruppen, welche Trisbone bzw. Trisetum flavescens erhielten, ist eine derartige Verteilung nicht zu finden. Der Knochenaschegehalt der höchsten Trisetum- Dosierung liegt im ersten Durchgang zwischen dem der Gruppen mit dem Zusatz 100 und 200 IE Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter, im zweiten Durchgang sogar noch unterhalb dessen der Gruppe mit 50 IE Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter. Bezüglich dieses Parameters besitzt Trisetum flavescens also keine höhere biologische Aktivität als Vitamin D<sub>3</sub>.

Anders verhält es sich bei den Solbone- Präparaten und PAN-HVD, denn sowohl im ersten als auch zweiten Durchgang kann ab einer Dosierung von 320 mg Solbone P bzw. 0,8 g und 2 g Solbone A-CWS pro kg Futter ein höherer Knochenaschegehalt beobachtet werden. Diese Beobachtung stimmt mit jenen, die bezüglich des Parameters Eischalentrockengewicht gemacht wurden, weitgehend überein.

Die Ergebnisse des Kalziumgehaltes in der Knochenasche sind in beiden Versuchen derart schwankend, dass kein deutlicher Zusammenhang zwischen einer Dosissteigerung und einem erhöhten Kalziumgehalt der Knochenasche erkannt werden kann. Im zweiten Versuch sind allerdings Ansätze eines derartigen Zusammenhanges zu erkennen, da der Wert der Gruppe mit 200 IE Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter mit einer Dosissteigerung auf 400 IE/kg Futter nicht mehr weiter gesteigert werden kann. Ebenso verhält es sich in der Gruppe mit PAN-HVD (Maximum bei 2

g/ kg Futter) sowie der mit Trisbone (höchster Wert in der Gruppe bei 4g/kg Futter). Begründet werden können die starken Schwankungen dieser beiden Parameter durch eine anatomische Besonderheit des Legegeflügels: aufgrund der notwendigen schnellen Verfügbarkeit des Kalziums kommt es bei weiblichen Tier kurz vor der Legeperiode zur Anbildung des medullären Knochens in Rippen und Röhrenknochen (SIMKISS, 1961). Dieser stellt ca. 40 % des Kalziums für die Eischalenbildung bereit, der Rest entstammt direkt der Nahrung (JOWSEY et al., 1956). Aus diesem Grund kann zwischen dem Rohaschegehalt des Knochens und deren Kalziumgehalt kein direkter Zusammenhang mit der Versorgung mit Vitamin D<sub>3</sub> aus der Nahrung geschlossen werden.

### **5.3.7 Kalzium in der Leberasche**

Der Kalziumgehalt in der Leberasche steht in keinerlei Abhängigkeit von den verwendeten Präparaten und deren Dosierungen und stellt damit keinen aussagekräftigen Parameter in dieser Studie dar. Ziel der Betrachtung dieses Parameters war es, mögliche Verkalkungen des Weichteilgewebes zu erkennen. Pathologische Untersuchungen konnten beim Einsatz kalzinogener Pflanzen Mineraleinlagerungen in den verschiedensten Organen beobachten (BARROS und GIMENO, 2000; GILL et al., 1976; VASCONCELOS et al., 1998; MELLO, 2003). Auch in diesem Versuch wäre eigentlich in Abhängigkeit einer höheren Dosierung ebenso ein erhöhter Gehalt der Organe an Kalzium zu erwarten. Mögliche Gründe für ein Ausbleiben dieses Zusammenhangs könnten in einer zu geringen Dosis des Extraktes liegen, so dass der Zustand einer Überdosierung nicht eingetreten ist. Ebenso denkbar ist ein Verfahrensfehler bei der Leberentnahme, so dass die Leber nicht vollständig für diese Untersuchung zur Verfügung stand.

### **5.3.8 Kalzium im Serum**

Bei der Betrachtung dieses Parameters lässt sich weder im ersten noch im zweiten Versuchsdurchgang ein Zusammenhang des Serumkalziumgehaltes und einer steigenden Vitamin D<sub>3</sub>- Dosierung feststellen. Wie schon im Abschnitt 5.6 beschrieben, kann aufgrund des Vorkommens des medullären Knochens beim

Legegeflügel (SIMKISS, 1961; JOWSEY et al., 1956) kein Zusammenhang zwischen dem Vitamin D<sub>3</sub>- Gehalt der Nahrung und dem Kalziumgehalt im Serum gezogen werden.

### 5.3.9 ALP im Serum

Von der Alkalischen Phosphatase (ALP) existieren verschiedene Isoenzyme, die, je nach ihrem Wirkungsort, unterschiedlich bezeichnet werden. So gibt es neben einer Knochen- ALP ebenso eine ALP der Leber, des Dünndarms und auch der Plazenta. GIEREN (2004) konnte aufzeigen, dass zwischen der knochenspezifischen ALP und der Gesamt- ALP eine lineare Beziehung besteht. Daher wird in diesem Versuch nur die Gesamt- ALP zur Darstellung von Knochenumbauprozessen verwendet. Im Rahmen dieser Umbauprozesse bilden die Osteoblasten vermehrt ALP, so dass die Aktivität derer dann im Serum gemessen werden kann. Demnach deutet ein hoher ALP- Wert im Serum unter anderem auch auf Umbauprozesse am Knochen und eine erhöhte Mineralisation des Knochens hin (MOSS, 1992).

Die Messungen zeigten auch, dass sich die Standardabweichungen der einzelnen Gruppen deutlich unterschieden, dies war vor allem im zweiten Versuchsdurchgang der Fall. Plausibelste Erklärung dafür wäre ein Messfehler im Labor, was aber durch wiederholte Messungen nicht belegt werden konnte. Auch die Qualität des Serums (hämolytisch, lipämisch) konnte als beeinflussender Faktor auf die Messwerte ausgeschlossen werden. Daneben könnte es auch sein, dass der aktuelle Zyklusstand der Tiere einen Einfluss auf die ALP- Werte nimmt. Wie VAN DER VELDE et al. (1985) mit histologischen und radiologischen Untersuchungen zeigen konnten, kommt es in Abhängigkeit vom Eibildungszyklusstand zu Auf- und Umbauvorgängen am medullären Knochen. Daneben kommt es auch zu Resorptionsprozessen, die für eine ausreichende Kalziumbereitstellung für die Eischalenbildung sorgen. Beides kann dadurch also schwankende ALP- Werte verursachen.

Im ersten Versuch findet sich mit Ausnahme der Solbone P- Dosierung 20 mg /kg Futter mit steigender Dosierung ein steter Abfall der ALP- Aktivität. Der Anstieg bei dieser Dosierung ist allerdings mit 0,01 U/l nur sehr gering. Im zweiten Durchgang



zeigt sich bei den *Trisetum flavescens*- Gruppen hingegen nach einem minimalen Abfall ein erneuter Anstieg bei 8 g *Trisetum flavescens*/kg Futter.

Der Abfall der ALP- Aktivität kann wie folgt erklärt werden: durch die Depletion entsteht der Zustand eines Vitamin D- Mangels und einer Hypocalciämie. Um trotzdem den benötigten Kalziumsspiegel für die Schalenbildung zu gewährleisten, wird durch die Pathogenese des sekundären Hyperparathyreoidismus vermehrt Kalzium aus dem Knochen freigesetzt (SLATOPOLSKY et al., 1984 am Modell der humanen Niereninsuffizienz). Es finden somit Knochenumbauprozesse statt, folglich kommt es zu einer erhöhten Aktivität der Alkalischen Phosphatase (MOSS, 1992). Durch die Zufuhr von Vitamin D<sub>3</sub>, in diesem Versuch neben 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auch durch Extrakte von kalzinogenen Pflanzen bewerkstelligt, wird die Vitamin D- Mangelsituation behoben und die Knochenumbauvorgänge je nach Dosierung der zugeführten Substanz stärker gemindert. Folglich sinkt die ALP- Aktivität.

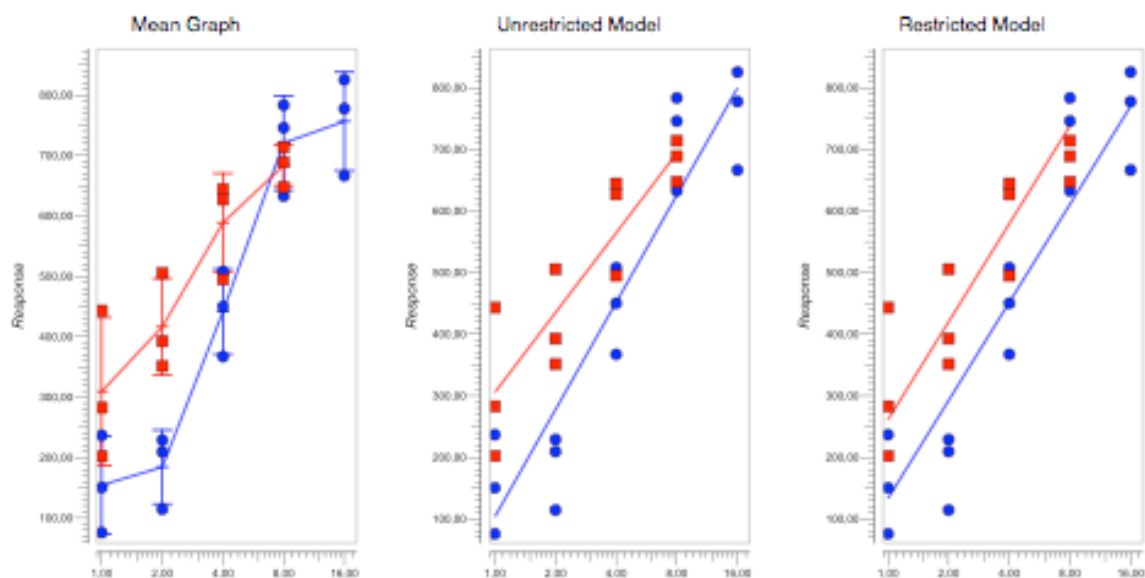
Im ersten Versuch ist gegenüber den Vitamin D<sub>3</sub>- Standardrationen bei den Dosierungen von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ein stärkerer Abfall zu beobachten. Erklärt kann dies werden, dass es sich bei dieser Substanz um das aktivierte Vitamin D<sub>3</sub> handelt und daher das Absinken der ALP- Aktivität stärker ist (RAMBECK 1997). Ebenso zeigt sich dieser Effekt bei Solbone P, auch hier wird die ALP- Aktivität gegenüber Vitamin D<sub>3</sub> ab einer Dosierung von 80 mg/kg Futter stärker gemindert, was auf eine höhere biologische Wirksamkeit gegenüber den Standardrationen schließen lässt. Im zweiten Versuch trifft dies auf eine PAN-HVD- Dosis von 4 g/ kg Futter zu, bei Solbone-A-CWS erreicht die höchste Dosierung nicht den Wert des Vitamin D<sub>3</sub>- Optimums. *Trisetum flavescens* zeigt im ersten Versuch nur eine sehr geringe, im zweiten hingegen sogar eine Steigerung der ALP Aktivität.

## 5.4 Schätzung der biologischen Aktivität der verwendeten Extrakte

Die Bewertung der biologischen Aktivität erfolgte mit Hilfe des Parallel-Line Bioassays PLA 2.0 der Fa. Stegmann Systems, Rodgau, Deutschland. In Abb. 5.7 ist beispielhaft die graphische Darstellung für den Extrakt Solbone-A-CWS abgebildet. Auf der horizontalen Achse wird die Dosis aufgetragen, die vertikale Achse spiegelt die Wirkung wider.

**Abb. 5.7:** Graphische Darstellung des Parallel-Line Bioassays PLA 2.0 für den Extrakt Solbone-A-CWS

### Graphics



Wie bereits beschrieben, stellt das Eischalentrockengewicht den Hauptparameter des Wachteleischalentests dar und wird daher für die Schätzung der biologischen Aktivität herangezogen. Andere Parameter, wie Legeleistung, ALP- Aktivität und Knochenasche haben nur eine unterstreichende Funktion für die aus dem Eischalentrockengewicht erhobenen Daten. Allein haben sie keine Aussagekraft.

Als Ergebnis der Schätzung der biologischen Aktivität zeigt sich die höchste biologische Aktivität bei geringsten Nebenwirkungen bei fast allen der verwendeten

Solanum glaucophyllum- Extrakte. Beim Extrakt Solbone-A-CWS kann eine biologische Aktivität von 574 IE/g Extrakt gemessen werden, ohne dass diese Tiere Symptome einer Vitamin D<sub>3</sub>- Überdosierung aufweisen, wie z.B. Verkalkung der Weichteilgewebe (in dieser Arbeit am Kalziumgehalt der Leber gemessen). Ebenso zeigt sich beim Extrakt PAN-HVD eine biologische Aktivität von 114 IE/g Extrakt, die somit nur ca. ein Fünftel des erstgenannten Solanum- Extraktes beträgt. Den Parameter Eischalentrockengewicht betrachtend zeigt sich jedoch bei PAN-HVD eine stärkere Auswirkung der Dosissteigerung gegenüber der Dosissteigerung von Solbone-A-CWS. Von allen Solanum glaucophyllum Extrakten zeigt Solbone P mit einer Aktivität von 4 071 IE/g Extrakt die höchste biologische Aktivität bei nur geringen Nebenwirkungen. Allerdings zeigen die beiden anderen genannten Solanum- Extrakte PAN-HVD und Solbone-A-CWS eine deutlicher steigende Tendenz bei Betrachtung der Entwicklung des Eischalentrockengewichts über den gesamten Versuchszeitraum. Weiter ist bei Solbone P eine stärkere Streuung der Werte der biologischen Aktivität zu verzeichnen. Somit kann Solbone P im Vergleich zu Solbone-A-CWS und PAN-HVD mit einer weniger konstanten Effektivität bewertet werden.

Solbone PP zeigt zwar eine wesentlich höhere biologische Aktivität, aber ebenso ein sehr hohe Streuung. Ebenso bewirkt Solbone PP bei den bewerteten Parametern keine Verbesserung gegenüber dem Vitamin D<sub>3</sub>- Optimum. Gründe für diese Schwankungen liegen möglicherweise darin, dass ein biologisches System bei hoher Dosierung auch größeren Schwankungen unterworfen ist.

Das Trisetum flavescens- Präparat wurde in beiden Versuchen in unterschiedlichen Dosierungen verwendet, der Extrakt selbst war im Gegensatz zu Solanum glaucophyllum gleichbleibend. Bei der Schätzung der biologischen Aktivität finden sich grosse Schwankungen zwischen den Werten des ersten (15 IE/g) und des zweiten Versuchs (1 IE/g). Zusammenfassend für alle Parameter können die Aussagen von über den positiven Effekt von Trisetum flavescens in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (REICHENBÄCHER 1979; VON ROSENBERG, 2006). Mögliche Gründe für diese abweichenden Ergebnisse könnten in der Herstellung der Futtermischung und eine daraus resultierende ungleiche Verteilung des Extraktes im Futter zu finden sein. Ebenso könnte die Ursache aus der Bearbeitung der Pflanze resultieren (MELLO, 1991; MELLO und HABERMEHL, 1998; STARK 1979; ZUCKER et al., 1980).

## 6 Zusammenfassung

Ziel vorliegender Arbeit war es, die biologische Vitamin D- Aktivität zweier kalzinogener Vitamin D- Metabolit- haltiger Pflanzen, nämlich *Solanum glaucophyllum* und *Trisetum flavescens*, mittels des Wachteleischalentests zu bestimmen. Dazu wurde das Eischalentrockengewicht als Maß für die Kalziumausscheidung über die Eischale bestimmt. Am Ende des jeweiligen Versuches wurden die Tiere geschlachtet und die Knochenasche und ihr Kalziumgehalt sowie die Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Serum bestimmt.

In zwei Versuchsdurchgängen wurde während der Testphase, die im ersten Versuch 15 und im zweiten Durchgang 21 Tage andauerte, der Effekt der verwendeten Präparate auf die Legeleistung und das Eischalentrockengewicht depletierter japanischer Wachteln (*Coturnix coturnix japonica*) beobachtet. Dazu wurden in beiden Versuchen verschiedene Vitamin D<sub>3</sub>- Standardrationen (50 IE, 100 IE, 200 IE und 400 IE/kg Futter) sowie der Vitamin D<sub>3</sub>- Metabolit 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Bei den zu untersuchenden Präparaten handelte es sich um verschieden angereicherte, als Solbone P, Solbone PP (aufgereinigter *Solanum glaucophyllum*-Extrakt) und Solbone-A-CWS (wasserlöslich) bezeichnete Extrakte von *Solanum glaucophyllum*. Ebenso wurde der *Solanum*- Extrakt PAN-HVD (Panbonis Herbal Vitamin D<sub>3</sub>) in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Als zweiter Vertreter der kalzinogenen Pflanzen wurden als Trisbone bezeichnete Extrakte von *Trisetum flavescens*, ebenfalls verschieden konzentriert, über das Futter zugeführt.

Ausgangslage zur Beurteilung der biologischen Aktivität ist die direkte Korrelation des Vitamin D<sub>3</sub>- Gehaltes im Futter und dem Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag. Mit steigender Dosierung steigt auch die Eischalentrockensubstanz. Nach Auswertung der Parameter ergibt sich für den Extrakt Solbone P eine geschätzte biologische Aktivität von 4 071 IE/g Extrakt, während die anderen *Solanum*- Extrakte PAN-HVD (114 IE/g) und Solbone-A-CWS (574 IE/g) eine niedrigere biologische Aktivität aufweisen. Solbone PP zeigt zwar eine Aktivität von 17 167 IE/g und damit die höchste der verwendeten

Extrakte, weist jedoch auch massive Schwankungen der Werte auf und hat anhand der Eiparameter keinen positiven Effekt. Bei Solbone P, Solbone-A-CWS und PAN-HVD konnte kein vermehrtes Auftreten negativer Nebeneffekte beobachtet werden. Das in beiden Versuchen eingesetzte Trisbone zeigt in den beiden Versuchen sehr unterschiedliche Werte der biologischen Aktivität (15 IE/g und 1 IE/g Extrakt) in Kombination mit ebenso schwankenden Ergebnissen beim Parameter Legeleistung, Eischalentrockengewicht sowie ALP- Aktivität. Dies führt zu der Einschätzung, dass *Trisetum flavescens* in dieser Form noch nicht für den Einsatz zur Behandlung von Vitamin D<sub>3</sub>- Mangelzuständen geeignet ist. Ein solcher stellt beispielweise die Gebärpause des Rindes dar. Weitere Untersuchungen könnten dazu genutzt werden, die Herstellungsverfahren von Trisetum- Extrakten zu optimieren, um damit die Aussagefähigkeit des Wachteleischalentests für diesen Extrakt zu verbessern und die Schwankungen zwischen den Chargen zu minimieren. Ein therapeutischer und prophylaktischer Einsatz von angereicherten Extrakten der beiden hier untersuchten kalzinogenen Pflanzen *Solanum glaucophyllum* und *Trisetum flavescens* zur Beeinflussung der Kalziumhomöostase beim Geflügel erscheint somit möglich.

## 7 Summary

### **The japanese quail eggshell test as method for determination of the biological activity of vitamin D- metabolites in extracts of *Trisetum flavescens* and *Solanum glaucophyllum***

The aim of this thesis was to compare the biological activity of extracts of two kalzinogenic, Vitamin D- metabolites containing plants, termed *Solanum glaucophyllum* and *Trisetum flavescens*, utilising the japanese quail eggshell test. Therefore, the dry weight of eggshells was determined as a measurement for Kalzium secretion by the eggshell. At the end of each experiment, the animals were killed and the additional parameters bone ash, Kalzium content and the alkaline phosphatase activity were determined.

In two sets of experiments, lasting 15 and 21 days, respectively, we analysed the effect of the two supplemented substances on egg laying capacity and eggshell dry weight in vitamin D<sub>3</sub>-depleted Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). In both sets of experiments, we used different vitamin D<sub>3</sub> standard rates (50 IE, 100 IE, 200 IE and 400 IE/kg food) as well as the vitamin D<sub>3</sub> metabolite 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in various concentrations. The substances to be analysed were various concentrated extracts from *Solanum glaucophyllum*, termed Solbone P, Solbone PP (purified extracts of *Solanum glaucophyllum*) and Solbone-A-CWS (water soluble). Similarly, the solanum extract PAN-HVD (Panbonis Herbal Vitamin D<sub>3</sub>) was supplemented in various concentrations. As a second member of kalzinogenic plants, extracts from *Trisetum flavescens*, termed Trisbone, were supplemented by feeding.

Basis for the determination of the biological activity is the direct correlation between the vitamin D<sub>3</sub> content in the food and the eggshell dry weight per animal and day. With increasing dosage the eggshell dry weight also shows an increase.

Analyses of the data showed an estimated biological activity of 4 071 IE/g extract for Solbone P and 29 IE/g extract, while the other *Solanum* extracts PAN-HVD (114 IE/g) and Solbone-A-CWS (574 IE/g) show a smaller biological activity. Solbone PP showed an activity of 137 IE/g, hence, with massive variation and according to the egg

parameters does not show a positive effect. With Solbone P, Solbone-A-CWS and PAN-HVD no increase in negative side effects was observed. Trisbone, supplemented in both sets of experiments, showed very variable values of biological activity (15 IE/g and 1 IE/g extract) in combination with equally variable results of the parameters egg laying capacity, eggshell dry weight and ALP-activity. This led to the assumption that *Trisetum flavescens* is not suitable for therapy of diseases caused by deficiency of Vitamin D<sub>3</sub> in its current form, such as the bovine parturient paresis. Additional analyses could be utilised to optimize the production of *Trisetum* extracts in order to improve the interpretation of experimental data obtained by the Japanese quail eggshell test. The therapeutical and preventive use of enriched extracts from the kalzinogenic plants *Solanum glaucophyllum* and *Trisetum flavescens* for influencing the Kalzium homeostasis in birds seems to be possible.

## 8 Literaturverzeichnis

- ABE, E., MIURA, C., SAKAGAMI, H., TAKEDA, M., KONNO, K., YAMAZAKI, T., YOSHIKI, S. und SUDA, T. (1981)  
Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>.  
Proc Nat Acad Sci, USA **78**: 4990- 4994.
- ABURJAI, T., S. AL-KHALIL and M. ABUIRJEIE (1998)  
Vitamin D<sub>3</sub> and its metabolites in tamato, potato, egg-plant and zucchini leaves  
Phytochemistry **49**: 2497-2499.
- ARNOLD, R.M. and BRAS, G. (1956)  
Observations on the morbid anatomy and histology of Manchester wasting disease of cattle in Jamaica, and related conditions in other countries of the Americas.  
Am J Vet Res **17** (65): 630-639.
- ARNOLD, R.M. and FINCHAM, I.H. (1997)  
Manchester wastind disease: a calcosinosis caused by a pasture grass (*Stenotaphrum secundatum*) in Jamaica.  
Trop Anim Health Prod **29** (3): 174- 176.
- ASKEW F.A., BOURDILLON R.B., BRUCE H.M., JENKINS R.G.C. und WEBSTER T.A. (1931)  
The destillation of vitamin D.  
Proc R Soc Lond **8107**: 76- 90.
- APPELBOOM T., BODY J.J. (1993)  
The antiquity of osteoporosis: More questions than answers.  
Calcif Tissue Int **53**: 367-369.
- AVIOLI L.V. (1999)  
Vitamin D and the D- hormones, alfacalcidol and calcitriol, as therapeutic agents for osteoporotic populations.  
Calcif Tissue Int **65** (4): 292- 294.
- BACHMANN, H. (2005)  
Persönliche Mitteilung.  
Herbonis AG, Basel, Schweiz.



BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C., DAVOUST, J., LEBECQUE, S., et al. (2000)

Immunobiology of dendritic cells.  
Annu Rev Immunol. **18**: 767- 811.

BARLET, J.P., M.J. DAVICCO, J. LEFAIRRE and B.J. CARILLO (1979)

Fetal blood Kalzium response to maternal hypercalcemia induced in the cows by Kalzium infusion or by solanum glaucophyllum ingestion.  
Horm. Med. Res. **11** (1): 57-60.

BARROS, S.S. and E.J. GIMENO (2000)

Cell differentiation and bone protein synthesis in the lungs of sheep with spontaneous calcinosis.  
Journ. of comp. Pathol. **123** (4): 270-277.

BARROS, S.S.; J. POHLENZ und C. SANTIAGO (1970)

Zur Kalzinose beim Schaf.  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **77**: 346-349.

BAUMEISTER, M. (1972)

Ein neuartiges biologisches Verfahren zur Vitamin D3 Bestimmung .  
Diss. med. vet., Tierärztl. Fak. der LMU, München.

BAXTER, L.A. und DELUCA, H.F. (1976)

Stimulation of 25- hydroxyvitamin D3- 1 alpha- hydroxylase by hopsphat depletion.  
J Biol Chem **251**: 3158- 3161.

BITTNER, P. (1979)

Vergleichende Untersuchungen von Trisetum flavescens, Cholecalciferol und 1,25- Dihydroxycholecalciferol an Hühnerküken.  
Diss. med. vet., Tierärztl. Fak. der LMU München.

BOLAND, A.R.D., ESPARZA, M., GALLEGGO, S., SKLIAR, M.I. und BOLAND, R.L. (1979)

Modification by rumen of vitamin D- like activity of Solanum malacoxylyon in rats.  
Acta Physiol Lat Am **29** (6): 285- 290.

BOLAND, R.L., M. SKLIAR, A. CURINO and L. MILANESI (2003)

Vitamin D compounds in plants  
Plant Sci. **00**: 1-13.

- BRUNETTE, M.G., M. CHAN, C. FERRIERE and K.D. ROBERTS (1978)  
Site of 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> synthesis in the kidney  
Nature **276**: 287-289.
- BRUNS- DROSTE, C. (1980)  
Untersuchungen über den Einfluss von UV- Strahlung auf die antirachitische  
Aktivität in *Trisetum flavescens* und *Solanum malacoxylon*.  
Diss. Med. vet., Tierärztl. Fak. der LMU, München
- BUCHALA, A.J. and A. SCHMID (1979)  
Vitamin D and its analogs as a new class of plant growth substance affecting  
rhizogenesis  
Nature **280**: 230-231.
- BUCHELT, K.D. (1986)  
Versuche zur Prophylaxe der hypokalzämischen Gebärhlähmung mittels  
Verfütterung von *Trisetum flavescens*- Cobs.  
Diss. med. vet., Tierärztl. Fak. der LMU, München
- CAMBEROS, H.R., G.K. DAVIS, M.I. DJAFAR and C.F. SIMPSON (1970)  
Soft tissue calcification in guinea pigs fed with poisonous plant *Solanum  
malacoxylon*  
Am. J. Vet. Res. **31**: 685-696.
- CAMPERO, C.M. und ODRIZOLA, E. (1990)  
A case of *Solanum malacoxylon* toxicity in pigs.  
Vet Hum Toxicol **32**: 238-239.
- CANAS, F.M., O.E. ORTIZ, C.A. ASTEGGIANO and R.D. PEREIRA (1977)  
Effects of *solanum malacoxylon* extract on rachitic chicks  
Calcif. Tiss. Res. **23**: 297-301.
- CANTORNA, M.T., HULLETT, D.A., REDAELLI, C., BRANDT, C.R., HUMPAL-  
WINTER, J., et al. (1998)  
1,25- Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> prolongs graft survival without compromising host  
resistance to infection or bone mineral density.  
Transplantation **66** (7): 828- 831.

- CANTORNA, M.T., HAYES, C.E., DELUCA, H.F. (1998)  
1,25- Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis.  
J Nutr. **128**: 68- 72.
- CHEN, P.S. Jr. and H.B. BOSMAN (1964)  
Effects of vitamin D2 and D3 on serum Kalzium and phosphorus in rachitic chicks  
J. Nutr. **83**: 133-139.
- CHENG Y.H., GOFF, J.P., SELL, J.L., DALLORSO, M.E., GIL, S., PAWLAK, S.E. und HORST, R.L. (2004)  
Utilizing Solanum glaucophyllum alone or with phytase to improve phosphorus utilization in broilers.  
Poult Sci **83** (3): 406- 413.
- CHICK H., DOLYELL E.J. und HUME E.M. (1923)  
Studies of rickets in Vienna 1919- 1922  
Med Res Counc. (GB) Spec Rep Ser **77**.
- CHRISTAKOS, S., F. BARLETTA, M. HUENING, P. DHAWAN, Y. LIU, A. PORTA and X. PENG (2003)  
Vitamin D target proteins: function and regulation  
J. Cell. Biochem. **88** (2): 238-244.
- CHRISTAKOS, S., R. GILL, S. LEE and H. LI (1992)  
Molecular aspects of the calbindins  
J. Nutr. **122** (3 Suppl.): 678-682.
- CLEMENS, T.L., S.L. HENDERSON, J.S. ADAMS and M.F. HOLICK (1982)  
Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3  
Lancet North Am. Ed. **6**: 74-76.
- COPLAND, J.W. (1975)  
Enzootic calcinosis of cattle in Papua, New Guinea.  
Aust Vet J **51** (6): 326.  
Letter.
- CORRADINO, R.A. und WASSERMAN, R.H. (1974)  
1, 25- dihydroxycholecalciferol- like activity of Solanum malacoxylon extract in Kalzium transport.  
Nature **252**: 716- 718.

- CORREA, F.R., CORREA, I.R. und BELLAGAMBA, C. (1975)  
Calcificación metastática enzoótica (enteque seco) em bovinos del Uruguay:  
Vet Montevideo **12**: 15- 23.
- CORREA, F.R., MENDEZ, M.C., SCHILD, A.L. und PETIZ, C.A. (1993)  
Enzootic calcinosis in sheep. Experimental reproduction with *Nierembergia veitchii*  
(Solanaceae).  
Pesq Vet Bras **13**: 21- 24.
- DÖBEREINER, J. und DÄMMRICH, K. (1974)  
Skelettveränderungen bei Rindern nach Vergiftungen mit *Solanum malacoxylon*  
Sendtner.  
Verh Dtsch Ges Path **58**: 323- 326.
- DÖBEREINER, J., HUBINGER- TOKARNIA, C., DACOSTA, J.B.D., CAMPOS, J.L.E.  
und DAYRELL, M.D.S. (1971)  
Espichamento intoxicacao de bovinos por *Solanum malacoxylon* no pantanal de  
Mato Grosso.  
Pesq Agropec Bras Sec Vet **6**: 91- 117.
- DELUCA, H.F. (1978)  
Vitamin D metabolism and function  
Arch. Intern. Med. **138**: 836-847.
- DELUCA H.F., KRISINGER J. und DARWISH H. (1990)  
The vitamin D system  
Kidney Int. **38**: 2- 8.
- DELUCA H.F. und GHAZARIAN J.G. (1980)  
The role of vitamin D and its metabolites in Kalzium and phosphate metabolism.  
Handbuch der inneren Medizin vi/ 1a. Knochen, Gelenke, Muskeln edition,  
Springer- Verlag Berlin.
- DEMAY, M.B., KIERNAN, M.S., DELUCA, H.F. und KRONENBERG H.M. (1992)  
Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind to the 1, 25-  
dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor and mediate transcriptional repression in response  
to 1,25- dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>.  
Proc Natl Acad Sci USA **89**: 8097- 8101.
- DIRKSEN, G. (1969)  
Tagungsbericht der Schaumann- Stiftung zur Förderung der  
Agrarwissenschaften.  
55- 60.

- DIRKSEN, G. (2005)  
Persönliche Mitteilung.
- DIRKSEN, G., P. PLANK, A. SPIESS, T. HÄNICHEN und K. DÄMMRICH (1970)  
Über eine enzootische Kalzinose beim Rind. 1. Klinische Beobachtungen und Untersuchungen.  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **77**: 321-338.
- DIRKSEN, G., PLANK, P., DÄMMRICH, K. und HÄNICHEN, T. (1971a)  
Das klinische Bild und pathologisch- anatomische Bild einer enzootischen Kalzinose beim Rind.  
Vet Med Nachr (Bayer): 199- 214.
- DIRKSEN, G., PLANK, P., HÄNICHEN, T., DÄMMRICH, K. und SPIESS, A. (1971b)  
An enzootic calcinosis in cattle. 4. Studies on sheep with selective feeding of clover, gramineae or herbs.  
Dtsch Tierärztl Wochenschr **78** (1): 9- 12.
- DIRKSEN, G., P. PLANK, T. HÄNICHEN, K. DÄMMRICH und A. SPIESS (1972)  
Über eine enzootische Kalzinose beim Rind.  
V. Experimentelle Untersuchung an Kaninchen mit selektiver Verfütterung von Knautgras (*Dactylis glomerata*), Goldhafer (*Trisetum flavescens*) und einem Grasmisch  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **79**: 77-79.
- DIRKSEN, G., PLANK, P., SIMON, U., HÄNICHEN, T. und SPIESS, A. (1973)  
Über eine enzootische Kalzinose bei Rind. VI. Experimentelle Kalzinose bei Kaninchen durch selektive Verfütterung von Goldhafer (*Trisetum flavescens*).  
Dtsch tierärztl Wschr **80** (7): 148- 151.
- DIRKSEN, G., P. PLANK, U. SIMON, T. HÄNICHEN, P. DANIEL und A. SPIESS (1974)  
Über eine enzootische Kalzinose beim Rind. VII.: Nachweiss der kalzinogenen Wirkung von Goldhafer (*Trisetum flavescens*) beim Wiederkäuer  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **81**: 1-5.
- DIRKSEN, G., SIMON, U., PLANK, P., HÄNICHEN, T., DANIEL, P. und SPIESS, A. (1975)  
Enzootic calcinosis in cattle. VIII. Studies on th epossible significance of sunlight (UV-rays) for the etiology of calcinosis as well as of the kalzinogenic activity of dried yellow oat grass (*Trisetum flavescens* L.P.B.)  
Dtsch Tierärztl Wochenschr **82** (10): 387- 390.

- DIRKSEN, G., KRAGENINGS, G., HÄNICHEN, T. und ELMER- ENGELHARD, D. (1981)  
Trisetum flavescens (L.P.B.)  
Kalzinogene Aktivität der Pflanze nach künstlicher (Grün-)Trocknung und Herstellung von Cobs.  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **88**: 263-265.
- DIRKSEN, G., SACHS, M., HELD, T., NOWOTZIN, C., HÄNICHEN, T., MEYER, J., RAMBECK, W.A. und ZUCKER, H. (1983)  
Effect of aluminium hydroxide and 1- hydroxyethane- 1,1- diphosphonate (EDHP) on the kalzinogenic effect of Trisetum flavescens (L., P. B.) in sheep.  
Zentralbl Veterinärmed **30** (9): 645- 655.
- DIRKSEN, G., K. STERR und W. HERRMANN (2003)  
Enzootische Kalzinose beim Schaf nach Verzehr von Goldhafer  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **110** (12): 475-483.
- DONE, S.H., DÖBEREINER, J. und TOKARINA, C.H. (1976)  
Systemic connective tissue calcification in cattle poisoned by Solanum malacoxylon.  
Brit Vet J **132**: 28- 38.
- DURAND, R., FIGUEREDO, J.M. and MENDOZA, E. (1999)  
Intoxication in cattle from Cestrum diurnum.  
Vet Hum Toxicol **41** (1): 26- 27.
- EDELSTEIN, S., D.E.M. LAWSON and E. KODICEK (1973)  
The transporting proteins of cholecalciferol and 25- hydroxycholecalciferol in serum of chicks and other species  
Biochem. J. **135**: 417-426.
- EDWARDS, M.M. (2000)  
Nutrition and skeletal Problems in Poultry  
Poult. Sci. **79**: 1081-1023.
- EISMAN, J.A., MARTIN, T.J., MacINTYRE, I., MOSELEY, J.M. (1979)  
1,25- dihydroxyvitamin-D- receptor in breast cancer cells.  
Lancet **2**: 1335- 1336.

ENDO, K., K. KATSUMATA, T. MASAKI, N. KUBODERA, T. NAKAMURA, K. IKEDA and E. OGATA (2000)

1,25D<sub>3</sub> as well as its analogue OCT lower blood Calcium through inhibition of bone resorption in hypercalcaemic rats with continuous parathyroid hormone related peptide infusion  
J. Bone Miner. Res. **15**: 175-181.

ERBEN R.G., SCUTT A.M., MIAO D., KOLLENKIRCHEN U. und HABEREY M. (1997)

Short-term Treatment of Rats with High Dose 1,25- Dihydroxivitamin D<sub>3</sub> Stimulates Bone Formation and Increases the Number of Osteoblast Precursor Cells in Bone Marrow.  
Endocrinology **138** (11): 4629- 4635.

ESPARZA, M.S., M. VEGA and R.L. BOLAND (1982)

Synthesis and composition of vitamin D<sub>3</sub> metabolites in *Solanum malacoxylon*  
Biochem. Biophys. Acta **719**: 633-640.

EYLES, D.W., SMITH, S., KINOBE, R., HEWISON, M., McGRATH, J.J. (2005)

Distribution of the vitamin D receptor and 1 $\alpha$ - hydroxylase in human brain.  
J Chem Neuroanat. **29**: 21-30.

EYLES, D.W., ALMERAS, L., BENCH, P., LAFFITE, D., VILLARD, C., et al. (2006)

Developmental vitamin D deficiency is associated with the altered mitochondrial, cytoskeletal and synaptic function in the adult rat brain.  
Proceedings of the 13th vitamin D workshop, Victoria, BC, Canada.

FESTENSTEIN, G.N. AND R.A. MORTON (1955)

Provitamin D in animal tissues  
Biochem. J. **60**: 22- 25.

FRASER, D.R. (1995)

Vitamin D  
Lancet North Am. Ed. 345

FRICKE, R. (1985)

Untersuchung über die Prophylaxe der hypokalzämischen Gebärlähmung beim Rind mit *Solanum malacoxylon*  
Diss. med. vet., Tierärztl. Fak. der LMU, München

FUNK C. (1912)

The etiology of the deficiency diseases: Beriberi, Polyneuritis in birds, Scurvy, Pellagra.  
J State Med **20**: 341- 368.

- GALLEGO, S.E., BOLAND, R., BONINO, M., AZCONA, J. und VILLAR, J. (1979)  
Efecto de la administracion de Solanum malacoxylon en la calcificacion de los  
huevos de gallina.  
Ver Inv Agropec Inta **62**: 67- 76.
- GAST, D.R., HORST, R.L., JORGENSEN, N.A. und DELUCA, H.F. (1979)  
Potential use of 1,25- dihydroxycholecalciferol for prevention of parturient  
paresis.  
J Dairy Sci **62**: 1009- 1013.
- GAYLOR, J.L. and F.M. SAULT (1964)  
Localization and biosynthesis of 7- Dehydrocholesterol in rat skin  
J. Lipid. Res. **5**(3): 422- 431.
- GERKEN, M. and A.D. MILLS (1993)  
Welfare of domestic quail  
Abstract, Symp. of poultr. Wellfare.
- GIEREN, C. K. (2004)  
Der Wachteischalentest als biologisches Bestimmungsverfahren für  
pflanzliche und tierische Vitamin D Metaboliten  
Diss. med. vet., Tierärztl. Fak. der LMU, München
- GILL, B.S., M. SINGH and A.K. CHOPRA (1976)  
Enzootic calcinosis in sheep: clinical signs and pathology  
Am. J. Vet. Res. **37**: 545-552.
- GNIADDECKI, R. (1996)  
Stimulation versus inhibition of keratinocyte growth by 1,25- dihydroxyvitamin D3:  
dependence on cell culture conditions.  
J Invest Dermatol. **106** (3): 510- 516.
- GOLDBLATT H. und SOAMES K.M (1923)  
Studies on the fat soluble growth- promoting factor.  
Biochem J **17**: 446-453.
- GORNIK, S.L., M.L. DAGLI, P.C. MAIORKA, D.C. RASPANTINI and M.M. JERICO  
(1999)  
Evaluation in rabbits of the fetal effects of maternal ingestion of solanum  
malacoxylon.  
Vet. Res. Com. **23**: 307-316.



- GREER, F.R. (2003)  
Vitamin D deficiency. It's more than rickets.  
J Pediatr. **143**: 422- 423.
- GRIFFIN, M.D. und KUMAR, R. (2003)  
Effects of 1,25(OH)2D3 and its analogs on dendritic cell function.  
J Cell Biochem **88** (2): 323- 326.
- GRIFFIN, M.D., XING, N., KUMAR, R. (2003)  
Vitamin D and its analogs as regulators of immune activation and antigen presentation.  
Annu Rev Nutr.
- GROPP, J. und H. ZUCKER (1971)  
Vitamin D3 Bestimmung im biologischen Verfahren an der japanischen Wachtel  
Arch. Geflkd. **35**: 41-45.
- GUO, Q., S. CHRISTAKOS, N. ROBINSON and M.P. MATTSON (1998)  
Calbindin D28K blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin1: reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **95** (6): 3227-3232.
- HACKSTEIN, H., THOMSON, A.W. (2004)  
Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs.  
Nat Rev Immunol. **4**: 24-34.
- HÄNICHEN, T. and HERRMANN, W. (1990)  
The question of reversibility of tissue calcification in enzootic calcinosis of cattle and in experimental hypervitaminosis D.  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **97** (11): 479-482.
- HANCHETTE, C.L. and G.G. SCHWARTZ (1992)  
Geographic patterns of prostate cancer mortality  
Cancer **70**: 2861-2869.
- HART, D.N. (1997)  
Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response.  
Blood **90**: 3245.

- HAUSSLER, M.R., R.H. WASSERMANN, T.A. McCAIN, M. PETERLIK, K.M. BURSAC and M.R. HUGHES (1976)  
1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-glycoside: identification of a kalzinogenic principle of solanum malacoxylon  
Life Sci. **18**: 1049-1056.
- HAVINGA, E., R.J. De KOCK and M.P. RAPPOLD (1960)  
The photochemical interconversion of provitamin D, lumisterol, previtamin D and tachysterol  
Tetrahedron **11**: 276.
- HAY, A.W.M. and G. WATSON (1975)  
Binding of 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> to plasma protein to New World Monkeys  
Nature **256**: 150.
- HEINRITZI, K., KRAGENINGS, G. und HÄNICHEN, T. (1977)  
Untersuchungen über die kalzinogene Aktivität von siliertem Goldhafer (Trisetum flavescens L.P.B.)  
Z. Tierphysiol. **39**: 139-145.
- HENDERSHOT, J.M. (1942)  
Naalehu disease.  
Rep. Vet. Off. Hawai  
Zit. Von Lynd et al. (1965)
- HENRY, H.L. and A.W. NORMAN (1984)  
Vitamin D: metabolism and biological actions  
Ann. Rev. Nutr. **4**: 493-520.
- HERRATH, D., D. KRAFT, G. OFFERMANN und K. SCHÄFER (1974)  
Solanum malacoxylon: Eine therapeutische Alternative für 1,25D<sub>3</sub> bei urämischen Calciumstoffwechselstörungen.  
Dtsch. Med. Wschr. **99**: 2407-2409.
- HERSHBERGER, P.A., YU, W.-D., MODZELEWSKI, R.A., RUEGER, R.M., JOHNSON, C.S., TRUMP, D.L. (2001)  
Calcitriol (1,25- dihydroxycholecalciferol) enhances paclitaxel antitumor in vitro and in vivo and accelerates paclitaxel- induces apoptosis.  
Clin Cancer Res. **7**: 1043- 1051.
- HOFMAN, J.H. (1971)  
Untersuchungen über den Vitamin D<sub>3</sub>-Bedarf der japanischen Wachtel  
Diss. med. vet., Tierärztl. Fak. der LMU, München

- HOLICK M.F., SCHNOES H.K., DELUCA H.F., STUDA T. und COUSINS R.J. (1971)  
Isolation and identification of 1,25- dihydrocholecalciferol, a metabolite of vitamin D active in intestine  
Biochem **10**: 2799- 2804.
- HOLICK, M.F, M. RICHTAND (1975)  
Isolation and Identification of previtamin D3 from the skin of rats exposed to UV-irradiation  
Biochem. **18**: 1003-1008.
- HOLICK, M.F. (2002)  
Vitamin D: The underappreciated D- hormone that is important for skeltal and cellular health  
Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes **9**: 87-98.
- HOVE, K. und KRISTIANSEN, T. (1983)  
Prevention of parturient hypocalcaemia: effect of a single oral dose 1,25- dihydroxyvitamin D3.  
J Dairy Sci **65**: 1934- 1940.
- HOW, K.L., H.A. HAZEWINKEL and J.A. MOL (1994)  
Dietary vitamin D dependence of cat and dog due to inadequate cutaneous synthesis of vitamin D  
Gen. Comp. Endocrinol. **96** (1): 12-8.
- HULDSHINSKY K. (1919)  
Heilund von Rachitis durch künstliche Höhensonne  
Dtsch. Med. Wochenschr **45**: 712- 713.
- HURWITZ, S. (1978)  
Kalzium metabolism in birds  
Chemical Zoology (Brush, A.H., ed.)  
Academic Press, New York **10**: 273-306.
- IDEKE, P.O. (1979)  
Calcinosis circumscripta in the buffalo (Bos bubalis).  
Vet Pathol, Washington, Baltimore **16**: 260- 262.
- JONES, G, H.K. SCHNOES and H.F. DeLUCA (1976)  
An in vitro study of vitamin D3 hydroxylases in the chick  
J. Biol. Chem. **251**: 24-28.

- JONES, G., S.A. STRUGNELL and H.F. De LUCA (1998)  
Current understanding of the molecular actions of vitamin D  
Physiol. Rev. **78** (4): 1193-1231.
- JOWSEY, J.R., M.R. BERLIE, J.W.T. SPINKS and J.B. O NEILL (1956)  
Uptake of Kalzium by the laying hen and subsequent transfer from egg to chick  
Poult. Sci. **35**: 1234-1238.
- JOHNSON, C.S., HERSHBERGER, P.A. und TRUMP, D.L. (2003)  
Vitamin D- related therapies in prostate cancer.  
Cancer Metastasis Rev **21** (2): 147- 158.
- KAMPHUES, J., COENEN, M., KIENZLE, E., PALLAUS, J., SIMON, O., ZENTEK, J.  
(2004)  
Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung  
10. überarbeitete Auflage, Verlag M. und H. Schaper, Alfeld- Hannover
- KANDUTSCH, A.A., E.D. MURPHY and M.E. DREISBACH (1956)  
Provitamin D in certain sebaceous tissues of the mouse and the guinea pig  
Arch. Biochem. Biophys. **61**(2): 450- 455.
- KANIS J.A., DREZNER M.K., EVANS D.B., HORST R.L., MALLUCHE H.H., NORMAN  
A.W., THAVARAJAH M. und USKOKOVIC M.R. (1988)  
Vitamin D. Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology, chapter Prospects for  
the modelling of vitamin D activity in man, 739- 748  
Walter de Gruyter, Berlin- New York
- KATO, S., TAKEYAMA, K., KITANAKA, S., MURAYAMA, A., SEKINE, K.,  
YOSHIZAWA, T. (1999)  
In vivo function of VDR in gene expression- VDR knock- out mice.  
J Steroid Biochem Mol Biol. **69**: 247- 251.
- KLEE, W. (2006)  
Vorlesungsskript „Ausgewählte Kapitel aus dem Gebiet der Inneren  
Medizin und Chirurgie der Rinder, Ausgabe 2006/2007“ der II. Medizinischen  
Tierklinik, Ludwig- Maximilians- Universität München  
aufgerufen am 06.November 2006  
<http://www.vetmed.uni-muenchen.de/med2/skripten/skriptv.html>

- KÖHLER, H. und LIBISELLER, R. (1970)  
Occurrence of the so- called Weidekrankheit (Pasture disease) in cows in Austria  
in relation to fertilizing and feeding.  
Zbl Vet Med A **17** (4): 289- 337.
- KÖHLER, H., REGAL, D.S. und PETERLIK, M. (1978)  
Zur Kalzinose der Rinder in Österreich. VI. Nachweis einer 1,25-  
Dihydroxycholecalciferol- artigen Substanz als Ursache der antirachitischen  
Wirkung von Goldhafer (*Trisetum flavescens*) bei Küken und Wachteln.  
Zentralbl Vet Med **A 25**: 253- 270.
- KOBAYASHI, T. and M. YASUMURA (1973)  
Studies in the isomerization of vitamin D and related compounds with acid  
reagents  
J. Nutr. Sci. Vitaminol. **19**: 123.
- KOCH, E.M. and F.C. KOCH (1941)  
The provitamin D of the covering tissues of chickens  
Poult. Sci. **20**: 33-35.
- KOPP, M. (1985)  
Natürliche und synthetische Vitamin D-Metaboliten im Wachteleischalentest  
Diss. med. vet., Tierärztl. Fak der LMU, München
- KOSHIZUKA, K., KOIKE, M., KUBOTA, T., SAID, J., BINDERUP, L., KOEFFLER, H.P.  
(1998)  
Novel vitamin D3 analog (CB1093) when combined with paclitaxel and cisplatin  
inhibits growth of MCF- 7 human breast cancer cells in vivo.  
Int J Oncol. **13**: 421- 428.
- KREISL, M.M. (1981)  
Einfluss von Goldhaferfraktionen auf Vitamin D- abhängige Parameter beim  
rachitischen Hühnerküken  
Diss. med. vet., Tierärztl. Fak. der LMU, München
- KREMER R. und GOLTZMANN D. (1982)  
Parathyroid hormone stimulates mammalian renal 25- hydroxyvitamin- D3-  
1alpha- hydroxylase in vitro  
Endocrinology **110**: 294-296.

KROOK, L., WASSERMAN, R.H., McENTEE, K., BROKKEN, T.D. und TEIGLAND, M.B. (1975a)

Cestrum diurnum poisoning in Florida cattle.  
Cornell Vet **65** (4): 557- 575.

KROOK, L., WASSERMAN, R.H., N. SHIVELY, J., TASHJIAN, A.H.J., BROKKEN, T.D. und MORTON, J.F. (1975b)

Hypercalcemia and calcinosis in florida horses: implication of the shrub, Cestrum diurnum, as the caisative agent.  
Cornell Vet **65** (1): 26- 56.

KUBOTA, M., E. ABE, T. SHINKI and T. SUDA (1981)

Vitamin D metabolism and its possible role in the developing chick embryo  
Biochem. J. **194**: 103-109.

KUNZ, W. und HÄNICHEN, T. (1981)

Solanum malacoxylon: Untersuchungen zur Verträglichkeit der zur Prophylaxe der Hypocalcämischen Gebährlähmung empfohlenen Mengen.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **94**: 421-424.

KUNZ, W. und HÄNICHEN, T. (1983)

Solanum malacoxylon: investigation on the systemic tolerance of doses recommended for prophylaxis of parturient paresis.  
Anim Res Dev **17**: 88- 93.

LADIZESKY, M., CABREJAS, C., LABARRERE, C. und MAUTALEN, C. (1974)

Solanum malacoxylon and vitamin D: comparison of ist antirachitic acivity and its effect on the intestinal absorption of Kalzium in the rat.  
Endocrin Acta Panam **5**: 71- 79.

LANGELOH, A. und MELLO, J.R.B. (1998)

Plantas toxicas: revisao e atualizacao dos efeitos farmacologicos, substancias ativas e tratamento da intoxicacao por ateleia (Ateleia glazioviana), timbauva (Dimorphandra mollis), tamboril (Enterolobium contortisiliquum), nierembergia (Nierembergia veitchii), espichadeira (Solanum malacoxylon), trevo subterraneo variedade Yarlopp (Trifolium subterraneum) e rio- grandense.

Magalhaes, I.M. (Ed.), Farmacologia Veterinaria- Temas Escolhidos, Agropecuaria, Guaiba.

IN: FORMES DE PENSÉE DANS LA COLLECTION HIPPOCRATIQUE (EDS.: LASSERRRE F. M.P., ed. (1983) La vieillesse dans le Corpus Hippocratique., volume Actes d IVeme colloque intrnational hippocratique. Lausanne.

- LAWSON, D.E.M. and M. DAVIE (1979)  
 Aspects of the metabolism and function of vitamin D  
 Vitamins and hormones **37**: 1-67.
- LEMIRE, J.M. und ARCHER D.C. (1991)  
 1,25- dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental  
 autoimmune encephalomyelitis.  
 J Clin Invest. **87** (3): 1103- 1107.
- LI, Y.C., PIRRO, A.E., AMLING, M., DELLING, G., BARON,R. et al. (1997)  
 Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D  
 dependent rickets type II with alopecia.  
 Proc Natl Acad Sci. USA **94**: 9831- 9835.
- LI, Y.C., KONG, J., WEI, M., CHEN, Z.F., LIU, S.Q. und CAO, L.P. (2002)  
 1,25- dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-  
 angiotensin system.  
 J Clin Invest **110** (2): 155- 156.
- LIBISELLER, R. und GUNHOLD, P. (1969)  
 Calcinosen bei Kühen.  
 Naturwiss **56**: 39.
- LIGNIERES, J. (1898)  
 Contribution a l'étude de la pasteurellose bovine  
 Bull. Soc. Cent. Med. Vet. **52**: 761-769.
- LUCAS, N.S. (1933)  
 BIOCHEM. J. **27**: 133.
- LYND, F.T., WILLERS, E.H., WEIGHT, L.A. und GEBAUER, P.W. (1965)  
 Bovine Arteriosclerosis in Hawaii.  
 Am J Vet Res **26**: 1344- 1349.
- Mac LAUGHLIN, J. and M.F. HOLICK (1985)  
 Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3  
 J. Clin. Invest. **76**: 1536-1538.
- MANOLAGAS, S.C. and L.J. DEFTOS (1981)  
 Comparison of 1,25-, 25-, 24,25-D3 binding in fetal rat calvaria and osteogenic  
 sarcoma cells  
 Calcif. Tissue Int. **33**: 655-661.

- MANOLAGAS, S.C., D.M. PROVVEDINI and C.D. TSOUKOS (1985)  
Interactions of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and the immune system  
Mol. Cell. Endocrinol. **43**(2-3): 113-122.
- MARKOWITZ M.E., GUNDBERG C.M. und F. ROSEN J. (1987)  
The circadian rhythm of serum osteocalcin concentrations: Effects of 1,25-  
hydroxyvitamin- D administration.  
Calcif Tissue Int **40**: 179- 183.
- MARTIN, T.J. (1993)  
Hormones in the coupling of bone resorption and formation  
Osteoporosis Int. **1**: 121-125.
- MARX, S.J., BLIZIOTES, M.M., NANES, M. (1986)  
Analysis of the relation between alopecia and resistance to 1,25-  
dihydroxyvitamin D.  
Clin Endocrinol. (Oxf) **25**: 373- 381.
- MATHIEU C., VAN ETTEN, E., DECALLONNE, B., GUILIETTI, A., GYSEMANS, C. et  
al., (2004)  
Vitamin D and 1,25- dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> as modulators in the immune system.  
J Steroid Biochem Mol Biol. **89- 90**: 449-452.
- MATSUOKA, L.Y., L. IDE, J. WORTSMAN, J. MacLAUGHLIN, M.F. HOLICK (1987)  
Sunscreens suppress cutaneous vitamin D<sub>3</sub>- synthesis  
J. Clin. Endocrinol. Metab. **64**: 1165-1168.
- MAUTALEN, C.A., C. FERRARO, M. CABREJAS, E. LANDI and L. GOTTLIEB  
(1977)  
Effects of Solanum malacoxylon on Kalzium metabolism in patients with  
chronical renal failure.  
Calc. Tiss. Res. **22**: 534-537.
- MCCOLLUM E.V., SIMMONDS N., BECKER J.E. UND SHIPLEY P.G. (1922)  
An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes  
Kalzium deposition.  
J Biol Chem **53**: 293- 298.



- MELLANBY E. (1919)  
An experimental investigation on rickets.  
Lancet **1**: 407- 412.
- MELLO, J.R.B. (1991)  
Untersuchungen der Auswirkungen von kalzinogenen Pflanzen auf die Elemente Ca, P und Alkalische Phosphatase bei Hühnerküken.  
Diss. med. vet., TiHo Hannover
- MELLO, J.R.B. (2003)  
Calcinosis- kalzinogenic plants  
Toxicon **41**: 1-12.
- MELLO, J.R.B. und G.G. HABERMEHL (1998)  
Untersuchungen der Auswirkungen von kalzinogenen Pflanzen- Qualitative und quantitative Bewertung  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **105**: 25-29.
- MELLO, J.R.B, A. LANGELOH, G. HABERMEHL, H.C. KREBS and F.C. BASTOS (1999)  
Influência de extratos de duas plantas calcinogênicas sobre la fertilidade de Ratos.  
Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. **51**: 453-462.
- MERKE J., KLAUS G., WALDHERR R. und RITZ E. (1986)  
No 1,25- dihydroxyvitamin D3 receptors on osteoclasts of Kalzium- deficient chicken despite demonstrable receptors on circulating monocytes.  
J Clin Invest **77** (1): 312- 314.
- MINGHETTI, P.P. and A.W. NORMAN (1988)  
1,25(OH)<sub>2</sub>- vitamin D3 receptors: Gene regulation and genetic circuitry  
FASEB J **2** (15): 3043-3053.
- MINGHETTI, P.P., L. CANCELA, Y. FUJISAWA, G. THEOFAN and A.W. NORMAN (1988)  
Molecular structure of the chicken vitamin D- induced calbindin D28k gene reveals eleven exons, six Ca<sup>2+</sup>-binding domains, and numerous promotor regulatory elements.  
Mol. Endocrinol. **2** (4): 355-367.
- MORRIS, K.M.L. (1977)  
The effect on egg shell thickness of the inclusion of the kalzinogenic plant "Solanum malacoxylon" in the diet of laying hens.  
Vet. Rec. **101**: 502-504.

- MORRIS, J.G. (1997)  
Ineffective synthesis of vitamin D in kittens exposed to sun or UV-light is reversed by an inhibitor of 7-dehydrocholesterol-reductase  
Vitamin D: chemistry, biology and clinical application of the steroid hormone 721-722.
- MORRIS, K.M., SIMONITE, J.P., PULLEN, L. and SIMPSON, J.A. (1979)  
Solanum torvum as a causative agent of enzootic calcinosis in Papua, New Guinea.  
Res Vet Sci **27** (2): 264- 266.
- MUSSER, M., W.L. BACON and K.E. NESTOR (1977)  
Kalzium binding protein in the turkey and in the japanese quail  
Poult. Sci.
- MOSS, D.W (1992)  
Perspectives in alkaline phosphatase research.  
Clin Chem. **38** (12): 2486- 2492.
- NAKAMURA T., KUROKAWA T. und ORIMO H. (1987)  
Action of 24,25- dihydroxyvitamin D3 (24,25(OH)2D3) on bone in vivo.  
In Vivo **1** (5): 313- 317.
- NEMERE, I. and A.W. NORMAN (1988)  
1,25D3 mediated vesicular transport of Ca in intestine: time course studies  
Endocrinology **122**: 2962-2969.
- NORMAN A.W. und DELUCA H.F. (1963)  
The preparation of H3- Vitamin D2 and D3 and their localisation in the rat.  
Biochem **2**: 1160- 1181.
- NORMAN, A.W., V.L. LEATHERS and J.E. BISHOP (1983)  
Normal egg hatchability requires the simultaneous administration to the hen of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and 24R,25-dihydroxyvitamin D3  
J. Nutr. **113**: 2505-2515.
- NORMAN, A.W., I. NEMERE, L.X. ZHOU, J.E. BISHOP, K.E. LOWE, A.C. MAIYAR, E.D. COLLINS, T. TAOKA, I. SERGEV and M.C. FARACH- CARSON (1992)  
1,25(OH)2 Vitamin D3, a steroid hormone that produces biologic effects via both genomic and nongenomic pathways  
J. Steroid. Biochem. Molec. Biol. **41** (3-8): 231-240.

- NORMAN, A.W., X.D. SONG, L. ZANELLO, C. BULA and W.H. OKAMURA (1999)  
Rapid and genomic biological responses are mediated by different shapes of the agonist steroid hormone,  $1\alpha,25(\text{OH})_2$  Vitamin D3  
Steroids **64**: 120-128.
- NOWOTZIN, C. (1983)  
Untersuchungen über die Wirkungsäquivalenz von *Trisetum flavescens* und  $1\alpha,25$ - dihydroxycholecalciferol sowie über den Einfluss von Aluminiumhydroxid auf die Goldhafer- Kalzinose beim Schaf.  
Diss. Med. vet., Tierärztl. Fak. der LMU, München.
- NIJWEIDE P.J., BURGER E.H. und FEYEN H.M. (1986)  
Biologically active forms of vitamin D3 in kidney and intestine.  
Arch. Biochem. Biophys **108**: 12-14.
- OKADA, K.A., CARILLO, B.J. und TLLEY, J.M.A. (1977)  
*Solanum malacoxylon* Sendtner: A toxic plant in Argentina  
Econ Bot **31**: 225- 236.
- ONDERSCHEKA, K., LABER, B., SZEKELY, H. und BINDER, K. (1967)  
Chronischer Magnesiummangel bei Kühen.  
Wiener Tierärztl Mschr **54** (4): 219- 236.
- ORNOY A., GOODWIN D., NOFF D. und EDELSTEIN S. (1978)  
 $24,25$ - dihydroxyvitamin D is a metabolite of vitamin D essential for bone formation.  
Nature **276** (5687): 370- 376.
- OSBORNE T.B. und MENDEL L.B. (1913)  
The relation of growth to the chemical constituents of the diets.  
J Biol Chem **15**: 311- 326.
- O' SULLIVAN, B.M. (1976)  
Humpy back of sheep. Clinical and pathological observations.  
Aust Vet J **52** (9): 414- 418.
- PARDI, M.C. und SANTOS, J.A.D. (1947)  
Ossificacao pulmonar e calcificacao vascular en bovinos pantanal Mato Grossense.  
Veterinaria (Brasil) **1**: 3- 7.

- PETERLIK, M., K. BURSAC, M.R. HAUSSLER, M.R. HUGHES and R.H. WASSERMANN (1976)  
 Further evidence for the 1,25-dihydroxyvitamin D-like activity of Solanum malacoxylon  
 Biochem. Biophys. Res. Comm, **70**: 797-804.
- PIKE, J.W. (1984)  
 Monoclonal antibodies to chick intestinal receptors for 1,25- dihydroxyvitamin D3. Interaction and effects of binding on receptor function  
 J. Biol.Chem. **259**: 1167-1173.
- PIKE, J.W. (1985)  
 Intracellular receptors mediate the biologic action of 1,25 dihydroxyvitamin D3  
 Nutr. Rev. **43** (6): 161-168.
- PLANK, P., HÄNICHEN, T. und DIRKSEN, G. (1976)  
 Enzootic calcosinosis in cattle. IX. Effect of fertilizer on the pathogenic effect of calcosinosis pastures.  
 Dtsch Tierärztl Wochenschr **83** (4): 159- 161.
- PONCHON G., KENNAN A.L. und DELUCA H.F. (1969)  
 ‚Activation‘ of vitamin D by the liver.  
 J Clin Invest **48**: 2032- 2037.
- POSER, J.W. and P.A. PRICE (1979)  
 A method for decarboxylation of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid in proteins  
 J. Biol. Chem. **254**: 431-436.
- PREMA, T.P. and N. RHAGAMULU (1996)  
 Vitamin D3 and its metabolites in the tomato plant  
 Phytochem. **42** (3): 617-620.
- PRICE P.A. und BAUKOL S.A. (1981)  
 1,25- dihydroxyvitamin D3 increases serum levels of the vitamin K- dependent bone protein.  
 Biochem Biophys Res Comm **99**: 928- 935.
- PUCHE, R.C and J.B. BINGLEY (1995)  
 Calcosinosis of Cattle in Argentina  
 Second Ed., UNR Editora, Rosario, 152 pp.
- PUCHE, R.C., A.M. MASONI, D.A. ALLOATTI and E. ROVERI (1980)  
 The antirachitic activity of Solanum malacoxylon leaves  
 Planta Med. **40**: 378-381.

- RAMBECK, W.A. (1984)  
Vitamin D- artige Verbindungen in der kalzinogenen Pflanze *Trisetum flavescens* (Goldhafer).  
Habilitationsschrift zur Erlangung der Lehrbefähigung an der tierärztl. Fak. der LMU München , Institut für Physiologie, Physiolog. Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München.
- RAMBECK, W.A. (1997) Vitamin D  
BIESALSKI H.K., SCHREZENMEIR J., WEBER P. und WEISS H., eds. Vitamine: Physiologie, Pathophysiologie, Therapie, 34- 40.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- RAMBECK, W.A., W. OESTERHELT, M. VECCHI and H. ZUCKER (1979)  
Occurrence of cholecalciferol in the kalzinogenic plant *Trisetum flavescens*  
*Biochem. Biophys. Res. Conn.* **87**: 743-749.
- RAMBECK, W.A., H. WEISER, R. HASELBAUER and H. ZUCKER (1981a)  
Vitamin D activity of different Vitamin D-esters in chicken, japanese quails and in rats.  
*Internat. J. Vit. Nutr. Res.* **51**: 353-358.
- RAMBECK W.A., WEISER H., MEIER W. und ZUCKER H. (1988)  
Synergistic effects of vitamin D metabolites.  
*Ann Nutr Metab* **32**: 108- 111.
- RAMBECK, W.A., H. WEISER and H. ZUCKER (1984a)  
Biological activity of glycosides of vitamin D<sub>3</sub> and 1 -hydroxyvitamin D<sub>3</sub>  
*Internat. J. Vit. Nutr. Res.* **54**: 25-34.
- RAMBECK, W.A. und H. ZUCKER (1982)  
Vitamin D-artige Aktivität in kalzinogenen Pflanzen  
*Zentralbl. Veterinärmed.* **A29** (4-5): 289-296.
- RAMBECK, W.A. und ZUCKER, H. (1985a)  
Synergistic effects of 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 24, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on duodenal CaBP in rachitic chicks and on eggshell weight in Japanese Quails.  
*Biochem Biophys Res Comm* **126**: 799- 804.
- RAMBECK, W.A., A. EGGERT, M. LEHNER, K.J. THIERER and H. WEISER (1991)  
Effect of 1,25 dihydroxycholecalciferol on egg production and egg shell quality in laying hens.  
Abstract, eighth Workshop on vitamin D, Paris, France.

RASSNICK, K.M., BALKMAN, C.E., JOHNSON, C.S., MUINDI, J.R., YU, W.D., et al. (2006)

In Vitro and in vivo studies to evaluate the combined effects of calcitriol and cisplatin in dogs with spontaneously- occurring tumors.  
Proceedings of the 13th vitamin D workshop, Victoria, BC, Canada

REICHEL, H. und A.W. NORMAN (1989)

Systemic effects of vitamin D  
Annu. Rev. Med. **40**: 71-78.

REICHENBÄCHER, H. (1979)

Der Einfluss von Goldhafer (*Trisetum flavescens*) und *Solanum malacoxylon* auf die Eischalenqualität  
Diss. med. vet., Tierärztl. Fak. der LMU, München

REICHRATH, J., SCHILLI, M., KERBER, A., BAHMER, F.A., CZARNETZKI, B.M., PAUS, R. (1994)

Hair follicle expression of 1,25- dihydroxyvitamin D3 receptors during the murine hair cycle.  
Br J Dermatol. **131**: 477- 482.

REINERTSON, R.P. and V.R. WHEATLEY (1959)

Studies on the chemical composition of human epidermal lipids  
J. Invest. Dermatol. **32**: 49- 59.

RINGE, J.D., M. FISCHER und A.W. WAHNER (1994)

Diagnostik des Osteoporoserisikos  
Dtsch. Med. Wschr. **119**: 1289-1295.

ROTHE, M., HAUSMANN, A., CASTEELS, K., OKAMURA, H., KURIMOTO, M., BURKART, V., MATHIEU, C. und KOLB, H. (1999)

IL- 28 inhibits diabetes development in nonobese diabetic mice by counterregulation of Th 1- dependent destructive insulinitis.  
J Immunol **163** (3): 1230- 1236.

ROUX, R., N.J. DAVICCO, B.J. CARILLO and J.P. BARLET (1979)

*Solanum glaucophyllum* in pregnant cows. Effect on colostrum mineral composition and plasma Kalzium and phosphorus levels in dams and in newborn calves.  
Ann. Biol. Anim.Biochem. Biophys. **19**: 91-101.

- RUKSAN, B.E., L.B. LOEWE, L. MARANGUNICH and G. BALL (2000)  
XXI. World buiatrics congress, Uruguay , Abstr. 326
- RUSSELL, J., LETTIERI, D. und SHERWOOD, L.M. (1986)  
Suppression by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> of transcription of the pre-proparathyroid hormone gene.  
Endocrinology **119**: 2864- 2867.
- SANTOS, M.N., NUNES, V.A., NUNES, I.J., BARROS, S.S., WASSERMAN, R.H., und KROOK, L. (1976)  
Solanum malacoxylon toxicity: inhibition of bone resorption.  
Cornell Vet **66**: 565- 589.
- SCHLÖTTERER- WIESER, S. (2008)  
Untersuchungen zum Einsatz eines Vitamin D- haltigen Pflanzenprodukts von Solanum glaucophyllum zur Prävention der hypocalcämische Gebärparese des Rindes  
Diss.med.vet., Tierärztl. Fak. der LMU, München.
- SCHWARTZ, G.G., L.W. WHITLATCH, T.C. CHEN, B.L. LOKESHWAR and M.F. HOLICK (1998)  
Human prostate cells synthesize 1,25- dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> from 25- hydroxyvitamin D<sub>3</sub>  
Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **7**: 391-395.
- SCUTT A., MAYER H. und WINGENDER E. (1992)  
New perspectives in the differenciation of bone forming cells.  
Biofactors **4** (1): 1- 13.
- SERGEEV, I.N. (2004)  
Kalzium as a mediator of 1,25- dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>- induced apoptosis.  
J Steroid Biochem Mol Biol **89- 90** (1-5): 419- 425.
- SHIBATA T., SHIRA- ISHI A., SATO T., MASAKI T., MASUDA A., HISHIYA A., ISHIKURA N., HIGASHI S., UCHIDA Y., SAITO M.O., ITO M., OGATA E., WATANABE K. und IKEDA K. (2002)  
Vitamin D hormone inhibits osteoclastogenesis in vivo by decreasing the pool of osteoclast precursors in bone marrow.  
J Bone Miner Res **17** (4): 622- 629.

- SILVER, J. and NAVEH-MANY, T. (1997)  
Vitamin D and the parathyroid glands.  
Academic.
- SIMKISS, K. (1961)  
Kalzium metabolism an avian reproduction  
Biol. Rev. **36**: 321-367.
- SIMON, U. (1980)  
Golden oat grass and enzootic calcinosis of cattle in the alpine region  
Europ. Grass Fed. 7113-7124.
- SIMON, U., DANIEL, P., HÄNICHEN, T. und DIRKSEN, G. (1978)  
An enzootic cattle calcinosis. XI. The effect of variously high oats content in the  
feed on sheep tissue calcinosis.  
Dtsch Tierärztl Wochenschr **85** (9): 363- 366.
- SKLIAR, M., A. CURINO, L. MILANESI, S. BENASSATI and R. BOLAND (2000)  
Nicotiana glauca: another plant species containing vitamin D3 metabolites  
Plant Science **156**: 193-199.
- SLATOPOLSKY, E., WEERTS, C., THIELAND, J., HORST, R., HARTER, H. und  
MARTIN, K. (1984)  
Marked suppression of secondary hyperparathyroidism by i.v. administration of  
1,25- dihydroxycholecalciferol in uremic patients.  
J Clin Invest **74**: 2136- 2141.
- SMITH, E., J.A. MacLAUGHLIN, W. GRANGE, D. TAYLOR, M.F. HOLICK (1986)  
Cultured psoriatic fibroblasts have partial resistance to the proliferation-  
inhibition activity of 1,25- dihydroxy vitamin D3  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82** (16): 5409-5412.
- SOARES, J.R., J.M. KERR and R.W. GRAY (1995)  
25- Hydroxycholecalciferol in poultry nutrition  
Poultr. Sci. **74**: 1919-1934.
- SOOY, K., T. SCHERMERHORN, M. NODA, M. SURANA, W.B. ROTHEN, M.  
MEYER, N. FLEISCHER, G.W.G. SHARP and S. CHRISTAKOS (1999)  
Calbindin D28k controls Ca<sup>2+</sup> and insulin release  
J. Biol. Chem. **274**: 34343-34349.



- STAMP, T.C.B. (1975)  
Factors in human vitamin D nutrition and in the production and cure of classical rickets  
Proc. Nutr. Soc. **34**: 119-130.
- STARK, H. (1979)  
Untersuchungen zur lichtabhängigen Bildung und Verteilung von Cholecalciferol im Goldhafer (*Trisetum flavescens*)  
Diss. med. vet., Tierärztl. Fak. der LMU, München
- ST-ARNAUD, R. (1999)  
Targeted inactivation of vitamin D hydroxylases in mice.  
Bone **25**: 127- 129.
- STEENBOCK H. und BLACK A. (1924)  
Fat soluble vitamins. XVII. The induction of growth- promoting and calcifying properties in a ration by exposure to ultraviolet light.  
J Biol Chem **61**: 405- 422.
- STEINMAN, R.M. (1991)  
The dendritic cell system and its role in immunogenicity.  
Annu Rev Immunol. **9**: 271.
- STUMPF, W.E., M. SAR, F.A. REID, Y. TANAKA and H.F. DeLUCA (1979)  
Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary and parathyroid  
Science **206** (4423): 1188-1190.
- SUDA, T., N. TAKAHASHI and T.J. MARTIN (1992)  
Modulation of osteoclast differentiation  
Endocr. Rev. **13**: 66-80.
- SUDA, T., Y. UENO, K. FUJII and T. SHINKI (2003)  
Vitamin D and bone  
J. Cell. Biochem. **88**: 259-266.
- TAKEUSHI, A., T. OKANO, M. AYAME, H. YOSHIKAWA, S. TEAOKA, MURAKAR and T. KOBAYASHI (1984)  
High- performance liquid chromatographic determination of vitamin D<sub>3</sub> in fish liver oils and eel body oils  
J. Nutr. Sci. Vitaminol. **30**(5): 421- 430.

- TANAKA, Y., L. CASTILLO, M.J. WINELAND and H.F. DeLUCA (1978)  
Synergistic effect of progesterone, testosterone and estradiol in the stimulation in the chick renal 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1-hydroxylase  
Endocrinol. **103**: 2035-2039.
- TERRY, M., M. LANENGA, J. McNAUGHTON and L.E. STARK (1999)  
Safety of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> as a source of vitamin D<sub>3</sub> in layer poultry feed  
Vet. Human Toxicol. **41**: 312-316.
- THIERER, K.J. (1989)  
Bestimmung der biologischen Aktivität von Vitamin D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>3</sub>-Metaboliten, ohne bzw. mit Zusatz von Ascorbinsäure, sowie von Handelsüblichen Vitamin D<sub>3</sub>-Trockenpulvern im Wachteleischalentest  
Diss. med. vet., Tierärztl. Fak. der LMU, München.
- TOKARNIA, C.H., J. DÖBEREINER and P.V. PEIXOTO (2002)  
Poisonous plants affecting livestock in Brazil  
Toxicon **40** (12): 1635-1660.
- TRÖGER, C. (1984)  
Wirkungsvergleich von Solanum malacoxylon, Trisetum flavescens, 1,5-Dihydroxycholecalciferol und 24, 25-Dihydroxycholecalciferol am rachitischen Hühnerküken.  
Diss. Med. vet., Tierärztl. Fak. der LMU, München.
- TUSTIN, R.C., C.H. PIENAAR, J.M. SCHMIDT, A. FAUL, K. VAN DER WALT, P.A. BOYAZUGLU and H.P.A. BOOM (1973)  
Enzootic calcinosis of sheep in South Africa  
J. S. Afr. Vet. Assoc. **44** (4): 383-395.
- VASCONCELOS, R.O., DE BARROS, S.S., RUSSOWSKI, D., GRANDO, S.M. und IRIGOYEN, L.F. (1998)  
Arterial diffuse intimal thickening associated with enzootic calcinosis of sheep.  
Pesq Vet Bras **18** (1): 9- 15.
- VAN DE VELDE, J.P., VERMEIDEN, J.P.W and. BLOOT, A.M (1985)  
Medullary bone matrix formation, mineralization, and remodeling related to the daily egg-laying cycle of japanese quail: A histological and radiological study  
Bone **6**: 321-327.

- VON ROSENBERG, S. (2006)  
Untersuchungen zur knochenprotektiven Wirkung von *Trisetum flavescens* und *Solanum glaucophyllum* im Osteoporosemodell der ovariektomierten Ratte  
Diss. med. vet., Tierärztl. Fak. der LMU, München
- WANG, Q., YANG, W., UYTINGCO, M.S., CHRISTAKOS, S., WEIDER, R. (2000)  
1,25- dihydroxyvitamin D3 and all- trans- retinoic acid sensitizes breast cancer cells to chemotherapy- induced cell death.  
Cancer Res. **60**: 2040- 2048.
- WASER, J., MEYER, J., HÄNICHEN, T. und DIRKSEN, G. (1983)  
*Trisetum flavescens* und Vitamin D3: Vergleich der kalzinogenen Wirkung beim Schaf.  
Tierärztl Wschr **96**: 163- 166.
- WASSERMAN, R.H. (1974)  
Kalzium absorption and and Kalzium- binding protein synthesis: *Solanum malacoxylon* reverses Strontium inhibition  
Science **183**: 1092-1094.
- WASSERMAN, R.H. (1975)  
Active vitamin D- like substances in *Solanum malacoxylon* and other kalzinogenic plants.  
Nutr Vet **33**: 1- 5.
- WASSERMAN, R.H., J.D., HENION, M.R. HAUSSLER and T.A. McCHAIN (1976)  
Kalzinogenic factors in *Solanum malacoxylon*: Evidence that is is 1,25- dihydroxyvitamin D3-glycoside  
Science **194**: 853-855.
- WINDAUS A., SCHENCK F. und VON WERDER F. (1936)  
Über das antirachitische Bestrahlungsprodukt aus 7- Dehydrocholesterin  
Hoppe- Seyler's Z Physiol Chem **241**: 100- 103.
- WINDAUS, A., DEPPE M. and WUNDERLICH, W. (1938)  
Justus Liebig Ann. Chem. **533**: 118.
- WOLF, M. und DIRKSEN, G. (1976)  
Über eine enzootische Kalzinose beim Rind  
10. Mitteilung; Untersuchungen über den Einfluss von *Trisetum flavescens* (L.P.B.) auf den Kalzium- und Phosphorspiegel im Blutserum des Kaninchens  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. **83**: 398-401.

- WORKER, N.A. und CARILLO, B.J. (1967)  
 ‚Enteque secco‘, calcification and wasting in grazing animals in Argentina.  
 Nature **215**: 72- 74.
- YAMAMOTO T., OZONO K., SHIMA M., YAMAOKA K. und OKADA S. (1998)  
 24R,25- dihydroxyvitamin D3 increases cyclic GMP contents, leading to an  
 enhancement of osteocalcin synthesis by 1,25- dihydroxyvitamin D3 in cultured  
 human osteoblastic cells.  
 Exp Cell Res **244** (1): 71- 76.
- YOON P.S. und DELUCA H.F. (1980)  
 Resolution and reconstitution of soluble components of rat liver microsomal  
 vitamin-D3 - 25- hydroxylase.  
 Arch. Biochem. Biophys **203**: 529- 541.
- YOSHIZAWA, T., HANDA, Y., UEMATSU, Y., TAKEDA, S., SEKINE, K., et al. (1997)  
 Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine  
 hypoplasia and growth retardation after weaning.  
 Nat Genet. **16**: 391-396.
- ZEHNDER, D., BLAND, R., WILLIAMS, M.C., McNINCH, R.W., HOWIE, A.J., et al.  
 (2001)  
 Extrarenal expression of 25- hydroxyvitamin D3- 1alpha- hydroxylase.  
 J Clin Endocrinol Metab. **86**: 888- 894.
- ZUCKER, H., J. GROPP, J. PEH und C. ZENTZ (1967)  
 Erfahrungen mit der japanischen Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) als  
 Labortier sowie einige Ergebnisse von Nährstoffbedarfsuntersuchungen  
 Tierärztl. Umsch. **8**: 416-421.
- ZUCKER, H. und GROPP, J. (1968)  
 Vitamin D3 -Bestimmung über die Eischalenbildung bei der japanischen  
 Wachtel  
 Naturwiss. **55**: 447-455.
- ZUCKER, H und W.A. RAMBECK (1981)  
 Vitamin D3 und Vitamin D3-metabolitartige Aktivität in *Trisetum flavescens*  
 Zbl. Vet. Med. A **28**: 436-441.
- ZUCKER, H., STARK, H. und RAMBECK, W.A. (1980)  
 Light- dependent synthesis of cholecalciferol in a green plant.  
 Nature **283**: 68- 69.

## Tabellenverzeichnis

2.1	Empfehlung zur optimalen Versorgung mit Vitamin D	9
2.2	Zusammenstellung einiger bisher durchgeführten Untersuchungen zur biologischen Aktivität von <i>Solanum glaucophyllum</i> in verschiedenen Bioassays	29
2.3	Zusammenstellung einiger bisher durchgeführten Untersuchungen zur biologischen Aktivität von <i>Trisetum flavescens</i> in verschiedenen Bioassays	32
3.1	Bilanzieretes Wachtelalleinfutter	43
3.2	Eingesetzte Präparate und Dosierungen im ersten Versuch	45
3.3	Eingesetzte Präparate und Dosierungen im zweiten Versuch	46
4.1	Durchschnittlicher Futtermittelverbrauch, Versuch I	58
4.2	Durchschnittliche Tiergewichte, Versuch I	60
4.3	Durchschnittliche Legeleistung pro Gruppe, Tag 4- 15, Versuch I	62
4.4	Durchschnittliche Legeleistung pro Gruppe, Tag 1-15, Versuch I	63
4.5	Durchschnittliches Eischalentrockengewicht, Tag 4- 15, Versuch I	66
4.6	Durchschnittliches Eischalentrockengewicht, Tag 1- 15, Versuch I	67
4.7	Durchschnittlicher relativer Knochenaschegehalt vom Femur, Versuch I	69
4.8	Durchschnittlicher Kalziumgehalt in der Knochenasche von Femur, Versuch I	71
4.9	Durchschnittlicher Kalziumgehalt im Serum, Versuch I	73
4.10	Durchschnittlicher Aschegehalt der Leber, Versuch I	74
4.11	Durchschnittlicher Kalziumgehalt der Leber, Versuch I	76
4.12	Durchschnittliche Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Serum, Versuch I	78
4.13	Durchschnittlicher Futtermittelverbrauch, Tag 1- 21, Versuch II	81
4.14	Durchschnittliche Legeleistung pro Gruppe, Tag 4- 20, Versuch II	84
4.15	Durchschnittliche Legeleistung pro Gruppe, Tag 1-20, Versuch II	85
4.16	Durchschnittliches Eischalentrockengewicht, Tag 4- 20, Versuch II	88
4.17	Durchschnittliches Eischalentrockengewicht, Tag 1- 20, Versuch II	89
4.18	Durchschnittlicher relativer Knochenaschegehalt vom Femur, Versuch II	91
4.19	Durchschnittlicher Kalziumgehalt in der Knochenasche von Femur, Versuch II	93
4.20	Durchschnittlicher Kalziumgehalt im Serum, Versuch II	95
4.21	Durchschnittlicher Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Serum, Versuch II	97
4.22	Nährstoffgehalt der Proben im ersten Versuch	98
4.23	Nährstoffgehalt der Proben im zweiten Versuch	99
4.24	Geschätzte biologische Aktivität der Extrakte im ersten Versuch	100
4.25	Geschätzte biologische Aktivität der Extrakte im zweiten Versuch	100

## Abbildungsverzeichnis

4.1	Durchschnittliche Legeleistungen des ersten Versuches, Tag 1- 15	64
4.2	Mittlere Eischalentrockengewichte des ersten Versuches, Tag 1-15	68
4.3	Legeleistungen im Gesamtverlauf des zweiten Versuches	86
4.4	Entwicklung des Eischalentrockengewichts im Gesamtverlauf des zweiten Versuches	90
5.1	Durchschnittliche Legeleistung in Abhängigkeit vom Vitamin D <sub>3</sub> - Gehalt im Futter	109
5.2	Einzelner Legeleistungen über den Gesamtversuchszeitraum des ersten Versuches	110
5.3	Einzelner Legeleistungen über den Gesamtversuchszeitraum des zweiten Versuches	111
5.4	Durchschnittliches Eischalentrockengewicht in Abhängigkeit vom Vitamin D <sub>3</sub> - Gehalt im Futter	113
5.5	Einzelne Eischalentrockengewichte über den Gesamtversuchszeitraum des ersten Versuches	114
5.6	Einzelne Eischalentrockengewichte über den Gesamtversuchszeitraum, des zweiten Versuches	115
5.7	Graphische Darstellung des Parallel-Line Bioassays PLA 2.0 für den Extrakt Solbone-A-CWS	120

## Danksagung

Zu allererst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. W.A. Rambeck bedanken, der mir nicht nur dieses Thema zur Verfügung gestellt hat, sondern trotz seiner vielen Pflichten immer ein offenes Ohr für Fragen hatte und zur Unterstützung bereitstand.

Ein weiteres riesengroßes Dankeschön gilt Herrn Dr. Ulrich Wehr, der nicht nur bei der Planung und der Durchführung der Versuche ständig beratend beistand, sondern auch immer erreichbar war, auf jede Frage eine hilfreiche Antwort wusste und mich mit seinem Engagement weiter vorantrieb.

Weiter möchte ich mich bei Frau Dr. Sylvia von Rosenberg bedanken, ohne die eine Anfertigung meiner Arbeit genauso wenig möglich gewesen wäre. Mit Tipps und Tricks zum Statistikprogramm unterstützte sie mich und schonte vieler meiner Nerven. Auch die Email- Standleitung Hannover- München half mir ungemein. Danke vielmals dafür!

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. Matthias Schmitt, der so freundlich war, bei der Auswertung der Daten eine hilfreiche Hand zu reichen. Ohne ihn wäre eine derart schnelle Fertigstellung der Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein weiterer Dank geht an das Personal der Außenstellen des Instituts für Tierernährung Oberwiesefeld, die mich bei der Betreuung der Versuchstiere und auch bei der Probennahme tatkräftig unterstützten. Hier möchte ich besonders Frau E. Stadler nennen, die neben der morgendlichen Kaffeeversorgung immer beratend im Labor zur Seite stand und mich in jeder erdenklichen Weise unterstützte.

Weiter gilt dem Laborpersonal in Oberschleißheim ein großes Dankeschön, hier vor allem Marina Kohn, Stefan Lochbrunner, Amon Horngacher, Christian Overdiek, Benjamin Schnautz, Sonja Sedlaczek und Mark Petersen. Besonderer Dank geht auch an Herrn Werner Hesselbach, Frau Elke Kleiner und Frau Antje Wetzel, die immer für

Fragen jeglicher Art offen waren und mit ihrer Unterstützung bei der Laborarbeit einen maßgeblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit trugen.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung und den Glauben an mich: meinem Bruder Benedikt für Unterstützung aus der Ferne, meiner Schwester Julia für aufmunternde Anrufe in der neuen Heimat, meiner Schwester Susi für die kleinen motivierenden Fusstritte zum Ende der Arbeit und für den Transformatordienst. Besonders meiner Mutter danke ich, die immer für mich da war und mir ein großer Fels in der Brandung war und immer ist. Ebenso meinem Vater, der einen großen Anteil an dem hat, was ich heute bin.

Besonders danke ich Hendrik, der mich nie allein ließ, mich tröstete und aufbaute, wenn es nicht ganz so rund lief. Und dessen große Liebe mir alles einfacher machte.