

**Untersuchung zur Anpassung des Calciumstoffwechsels
adulter Hunde an längerfristige marginale
Calciumversorgung**

Von Stephanie Constanze Schmitt

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

Untersuchung zur Anpassung des Calciumstoffwechsels
adulter Hunde an längerfristige marginale
Calciumversorgung

von

Stephanie Constanze Schmitt

aus Wasserburg am Inn

München 2018

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr. Ellen Kienzle

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Ellen Kienzle

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Stefan Unterer

Tag der Promotion: 27.07.2018

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	III
Einleitung	1
Literaturübersicht	2
1. Physiologie des Calciums	2
1.1 Verteilung und Funktionen des Calciums im Körper	2
1.2 Regulation des Calciumstoffwechsels	2
1.3 Calciumresorption aus dem Gastrointestinaltrakt	6
1.4 Calciumausscheidung über die Nieren	7
2. Vergleichender Calciumstoffwechsel von Hund und Mensch	8
2.1 Calciumbedarf von Hund und Mensch	8
2.2 Vergleich Calciummangelerkrankungen	8
3. Metaanalyse zur Calciumverdaulichkeit bei Hund und Katze	12
Publikation	16
Diskussion	43
1. Kritik der Methodik	43
1.1 Versuchsplan	43
1.2 Auswahl der Tiere	44
1.3 Futter	45
1.4 Blutabnahmen	47
2. Diskussion der Ergebnisse	48
2.1. Scheinbare Calciumverdaulichkeit und faecale Calciumausscheidung	48
2.2. Erhalt der Calciumhomöostase über den Knochenumbau	49
2.4 Evolutionsbiologische Hypothese zu den Ergebnissen	51
Zusammenfassung	53
Summary	55
Literaturverzeichnis	57
Danksagung	64

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ALP	alkalische Phosphatase
bALP	knochenspezifische alkalische Phosphatase (bone alkaline phosphatase)
bs	blood sampling
BW	Body Weight
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
cALP	corticosteroidinduzierte alkalische Phosphatase
DM	Dry Matter
dt	digestion trial
ELISA	enzym-linked immunosorbent assay
et al.	et alii, -ae, -a; und andere
FBI	Foxhound-Boxer-Ingelheimlabrador
FGF 23	fibroblast growth factor 23
fig	figure
g	Gramm
i.e.	it est; das heißt
ILMA	Immunoluminometric Sandwich Assay
IU	International Units
K	Kalium
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
lALP	leberspezifische alkalische Phosphatase

III

LMM	linear mixed effect models
met	metabolisch
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
ME	Metabolisable Energy
MJ	Megajoule
Na	Natrium
Ng	Nanogramm
nmol	Nanomol
P	Phosphor
pg	Pikogramm
PTH	Parathormon
RDA	recommended daily allowance
Rfe	Rohfett
RIA	radio immuno assay
SD	Standard Deviation
sV	scheinbare Verdaulichkeit
TS	Trockensubstanz
U	Units
wV	wahre Verdaulichkeit
1,25(OH) ₂ Vit D3	1,25-dihydroxy Vitamin D3
25(OH) Vit D3	25-hydroxy Vitamin D3

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb 1: Schematische Darstellung eines Plots der Calciumaufnahme gegen die faecale Calciumausscheidung: Broken Line Modell mit Breakpoint im Bereich des Bedarfs und Ausreißer bei besonders schwer bzw. leicht verdaulichem Calcium	13
Abb 2: Abhängigkeit der faecalen Calciumausscheidung zur Calciumaufnahme beim adulten Hund (nach Mack et al., 2015)	14
Abb 3: Abhängigkeit des ileocaecalen Calciumflusses zur Calciumaufnahme (nach Lass, 1988)	15
Abb 4: Abhängigkeit des ileocaecalen Calciumflusses zur Calciumausscheidung (nach Lass, 1988)	15
Abb 5: Fettgehalt in der Trockensubstanz des Futters (%) und faecale Calciumausscheidung (mg/kg KGW ^{0,75} /Tag)	45
Abb 6: Die Beziehung zwischen der Calciumaufnahme und der faecalen Calciumausscheidung beim adulten Hund (□ Daten nach MACK et al., 2015; ● eigene Daten)	49

Abbildungen in der Publikation

Figure 1: Experimental design.....	40
Figure 2: Mean serum crosslaps concentration (ng/ml), mean serum parathormone concentration (PTH) (pg/ml), and mean bone alkaline phosphatase (bALP) concentration (U/l) in pre- trial period, during low calcium intake and post-trial period with standard deviation; means not sharing a superscript letter are significantly different.....	41
Figure 3: Mean 25-hydroxy vitamin D concentration (nmol/l) and mean 1,25-dihydroxy vitamin D concentration (pg/ml) in pre-trial period, during low calcium intake and post-trial period with standard deviation; means not sharing a superscript letter are significantly different.....	42

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle I: Ausscheidung und Bilanz während Prä-Adaptation und Adaptation adulter Männer bei einer Calciumaufnahme von 450mg/Tag (MALM, 1958)	10
Tabelle II: Saisonale Beeinflussung der Calciumabsorption beim Menschen (McCance und Widdowson, 1942)	12

Tabellen in der Publikation

Table 1: Composition and analysis of diets.....	36
Table 2: Daily intake of ME, protein, fat, and vitamin D per kg BW ^{0.75}	37
Table 3: Intake, faecal excretion and apparent digestibility of calcium and phosphorus.....	38
Table 4: Serum total calcium, ionized calcium and total phosphorus.....	39

EINLEITUNG

Der Calciumbedarf von Hunden liegt deutlich höher als der vieler anderer Säugetierspezies, z.B. des Menschen (NRC 2006; NRC 1980; GfE, 1989; DGE, 2013). Dies gilt nicht nur für den wachsenden Hund, sondern auch für den Hund im Erhaltungsstoffwechsel. Zahlreiche Fallberichte haben aufgezeigt, dass nicht nur wachsende, sondern auch adulte Hunde sehr empfindlich auf Calciumunterversorgung reagieren (BECKER et al., 2012; DIQUELOU, 2005; DE FORNEL-THIBAUD et al., 2007).

MACK et al. (2015) führten eine Meta-Analyse zur Calciumaufnahme und faecalen Calciumausscheidung bei adulten Hunden durch. Die Ergebnisse legen nahe, dass Hunde und Katzen die Calciumhomöostase nur in eingeschränktem Maß über die Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt regulieren. Alle Studien, die in dieser Metaanalyse erfasst worden sind, hatten jedoch nur eine Dauer von maximal vier Wochen. Daher konnte nicht ausgeschlossen werden, dass Hunde eine längere Zeit benötigen, um ihre faecale Calciumausscheidung an eine niedrige Calciumversorgung anzupassen.

Ziel der vorliegenden Studie war daher zu prüfen, ob sich die faecale Calciumausscheidung bei adulten Hunden nach längerer Zeit (6 Monate) geringer Calciumversorgung verringert.

LITERATURÜBERSICHT

1. Physiologie des Calciums

1.1 Verteilung und Funktionen des Calciums im Körper

99 % des gesamten Körperbestandes an Calcium befindet sich in den Knochen, welche damit auch das einzige Speicherorgan für Calcium darstellen (ERBEN, 2013).

Der größte Teil des übrigen Calciums (0,9 %) befindet sich in der Plasmamembran, sowie im endoplasmatischen Retikulum der Zellen. Die extrazelluläre Flüssigkeit beinhaltet die restlichen 0,1 % Calcium, mit einer Gesamtkonzentration von etwa 2,5 mmol/l. Das extrazelluläre Calcium teilt sich in drei Gruppen: 1. Ungebundenes ionisiertes Calcium, welches die biologisch aktive Form des Calciums ist und etwa 50 % des Gesamtcalciums ausmacht. 2. An Anionen wie Citrat, Bikarbonat, Phosphat oder Laktat gebundenes Calcium (5 % des Gesamtcalciums). 3. Proteingebundenes Calcium, welches etwa 45 % des Gesamtcalciums ausmacht. Letzteres ist an die negativ geladene Seite des Proteins, meist Albumin, seltener Globuline, gebunden. Die proteingebundene Form des Calciums ist pH abhängig, da im Falle eines pH-Wert Abfalls im Serum H^+ Ionen die Bindung des Calciums an die Proteine kompetitiv hemmen. Nur das ionisierte und an Anionen gebundene Calcium wird in der Niere filtriert (ROSOL et al., 1995).

Neben der Stützfunktion des Skeletts fungiert Calcium im Körper als Signalion (ROSOL & CAPEN, 1996), ist an der Aktivität aller Muskeln beteiligt (HUBER, 2013) und dient als Bindeglied der Gerinnungskaskade (KASPERS & GÖBEL, 2013).

1.2 Regulation des Calciumstoffwechsels

Die Calciumhomöostase bestrebt die Aufrechterhaltung einer konstanten Konzentration von ionisiertem Calcium im Extrazellulärraum (ERBEN, 2013). Die Regulation des Calciumstoffwechsels erfolgt bei allen landlebenden Säugetieren prinzipiell gleichartig und steht unter einer strengen Stoffwechselkontrolle (ROSOL et al., 1995). Beteiligt an der Erhaltung des

3 LITERATURÜBERSICHT

Gleichgewichts sind 3 Organe (Darm, Niere, Knochen) und 3 Hormone (Parathormon, Vitamin D, Calcitonin). Zwischen der extrazellulären Flüssigkeit und dem Darm, der Niere und dem Knochen kommt es, abhängig vom Calciumgehalt und der Flussgeschwindigkeit des Plasmas zu Transportmechanismen. Diese Transporte sind abhängig von Parathormon (PTH), Calcitonin und 1,25-dihydroxy Vitamin D₃ (CLINE, 2012). Im Falle ungenügender Calciumaufnahme aus dem Intestinaltrakt bzw. ungenügender renaler Rückresorption steht das Calcium des Extrazellulärkompartments des Knochens als schnelle Quelle für Calcium und Phosphor zur Verfügung, wobei dieser Vorrat schnell aufgebraucht ist. Für die längerfristige Aufrechterhaltung der Calciumfreisetzung aus dem Knochen muss der Knochenumbau gesteigert werden. Osteoklasten bauen hierbei Knochen ab und setzen so Calcium und Phosphat frei, während Osteoblasten zunächst neues kollagenes Grundgerüst sezernieren, welches nach und nach kalzifiziert wird und so neue Knochenmatrix bildet (DE BRITO GALVAO, 2013; ROSOL et al., 1995). Im Falle erhöhten Calciumbedarfs und damit erhöhtem Knochenumbau, überwiegt der Knochenabbau dem Neuaufbau von Knochen. Die Folge ist, dass der Anteil jungen Knochengewebes, d.h. nicht ausreichend kalzifiziertes kollagenes Grundgerüst, größer ist als der des vollständig auskalzifizierten alten Knochens. Bindegewebe ersetzt folglich die Struktur der Knochen (MILLER et al., 1989).

1.2.1 PTH

PTH ist ein Polypeptid mit 84 Aminosäuren. Ionisiertes Calcium bindet an einen calciumsensitiven Rezeptor in den Hauptzellen der Nebenschilddrüse (ROSOL & CAPEN, 1996). Fällt der Plasmaspiegel an ionisiertem Calcium, steigt die PTH Ausschüttung aus der Nebenschilddrüse an (SAVILLE & KROOK, 1969; CLOUTIER et al., 1993; CLOUTIER et al., 1994; ESTEPA et al., 2003). Die Hauptfunktion des PTHs ist der Erhalt des physiologischen Gehalts an ionisiertem Calcium im Blut. Hierfür wird zum einen die renale Reabsorption von Calcium gefördert, zum anderen wirkt es am Knochen, wo die Osteoklastenaktivität und somit die Knochenresorption erhöht wird (ROSOL & CAPEN, 1996). Zuletzt steigert PTH die Bildung von 1,25-dihydroxy Vitamin D, welches wiederum die Resorption von Calcium aus dem Darm steigert (CLINE, 2012).

1.2.2 Vitamin D

Vitamin D ist ein Prohormon, das eine zweistufige Aktivierung zu Calcitriol durchläuft, seinem wichtigsten biologisch aktiven Metaboliten. Im Körper befindet sich nur wenig natives Vitamin D, da es unter physiologischen Umständen schnell zu Calcidiol umgewandelt wird (DE BRITO GALVAO, 2013).

Im Gegensatz zu Herbivoren und Omnivoren können Hunde Vitamin D nicht durch UV-Strahlung in der Haut synthetisieren. Dementsprechend ist Vitamin D für den Hund ein essentielles Vitamin, das über die Nahrung aufgenommen werden muss (HOW et al., 1994).

Das aus tierischen Produkten stammende Vitamin D₃ (Cholecalciferol), sowie das aus pflanzlichen Quellen stammende Vitamin D₂ (Ergocalciferol) werden im Dünndarm quantitativ resorbiert. Als Voraussetzung für die intestinale Resorption gilt eine intakte Fettverdauung (ERBEN, 2013).

Aus dem Darm aufgenommenes Vitamin D wird zur Leber transportiert, wo es mithilfe der 25-Hydroxylase zu Calcidiol hydroxyliert wird. Anschließend wird Calcidiol in der Niere entweder mit der 1- α -Hydroxylase, welche Calcidiol zu 1,25-dihydroxy Vitamin D (Calcitriol) hydroxyliert oder mit der 24-Hydroxylase, wodurch der größtenteils inaktive Metabolit 24,25-dihydroxy Vitamin D gebildet wird (DE BRITO GALVAO, 2013).

Die 24-Hydroxylase und die 1- α -Hydroxylase stehen in Wechselwirkung zueinander. Um die Effekte des Calcitriols zu verringern und um vor dem Entstehen einer Hypercalcämie zu schützen, induziert Calcitriol selbst die 24-Hydroxylase (DE BRITO GALVAO, 2013).

Die renale 1- α -Hydroxylase gilt als Hauptkontrollpunkt im Vitamin D Metabolismus. Die entscheidenden Einflussgrößen sind PTH, 1,25-dihydroxy Vitamin D, Phosphat und Fibroblast Growth Factor-23 (FGF 23). PTH aktiviert die renale 1- α -Hydroxylase, während Phosphat und 1,25-dihydroxy Vitamin D sie hemmen. Dahingegen wird die 24-Hydroxylierung durch 1,25-dihydroxy Vitamin D und Phosphat aktiviert und durch PTH gehemmt. FGF-23 unterdrückt die Expression der renalen 1- α -Hydroxylase und verhindert die renal-tubuläre Phosphat-Reabsorption. FGF-23 wird von Osteozyten in Abhängigkeit von Phosphat und 1,25-dihydroxy Vitamin D sezerniert. Folglich ist dieser endokrine

5 LITERATURÜBERSICHT

Faktor ein weiteres negatives Feedback zwischen Knochen und Niere (ERBEN, 2013).

Die biologisch wichtigste Wirkung des 1,25-dihydroxy Vitamin D ist die Stimulation der intestinalen Calcium- und Phosphorresorption. Zusätzlich fördert es die renal-tubuläre Reabsorption von Calcium (ERBEN, 2013).

1.2.3 Calcitonin

Calcitonin ist ein Polypeptid, gebildet in den parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse. Der Hauptregulator der Calcitoninsekretion ist die Konzentration des ionisierten Calciums im Blut. Sobald die Konzentration an ionisiertem Calcium im Blut steigt, steigt auch die Calcitoninsekretion. Des Weiteren wird die Sekretion von Calcitonin durch Gastrin und Cholezystokinin gefördert. Calcitonin reagiert an spezifischen Calcitonin-Rezeptoren auf den Osteoklasten und inhibiert so die Knochenresorption. Zusätzlich bewirkt Calcitonin eine Hypocalcämie durch Hemmung des Calciumausstroms. An der Niere inhibiert Calcitonin die Calcium- und Phosphatrückresorption (ROSOL et al., 1995).

1.2.4 FGF-23

FGF-23 ist ein Protein, welches hauptsächlich von Osteoklasten, aber auch von Osteoblasten, gebildet und sezerniert wird. Bei einem erhöhten Knochen turnover kommt es somit zu einem Anstieg an FGF-23. Der wichtigste Effekt des FGF-23 ist die Verringerung des Serumspiegels anorganischen Phosphors. Dies wird erreicht durch eine Verminderung der intestinalen Absorption sowie einer Steigerung der renalen Phosphor Ausscheidung (DE BRITO GALVAO, 2013).

FGF-23 agiert vornehmlich im proximalen Tubulus, wo es die Phosphat Exkretion über den Urin steigert und die 1- α -Hydroxylase inhibiert, während es die 25-Hydroxylase Aktivität steigert. Demzufolge sind die wichtigsten FGF-23 Sekretion stimulierenden Faktoren ein Anstieg des Calcitriol Levels sowie ein Anstieg des über die Nahrung zugeführten Phosphors. Durch Bindung an die Promotor Region des FGF-23 Gens in den Osteozyten stimuliert 1,25-dihydroxy Vitamin D die FGF-23 Expression (GUTIERREZ, 2010).

Zusätzlich inhibiert FGF-23 die Sekretion von PTH. Der Haupteffekt des FGF-23 ist die Erhaltung der Phosphor Homöostase (DE BRITO GALVAO, 2013).

1.2.5 Marker des Knochenstoffwechsels

Der Knochenstoffwechsel ist abhängig von der Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten. Diese bilden je nach Aktivität Enzyme oder Proteine, die sich im Falle von Aufbaumarkern nur im Serum, im Falle von Abbaumarkern im Serum und Urin messen lassen (ALLEN, 2003).

Der in der Diagnostik bedeutendste Knochenaufbaumarker ist die alkalische Phosphatase (ALP). Wird nur die gesamtalkalische Phosphatase bestimmt, ist es schwierig zu beurteilen, woher die Erhöhung kommt, da zwischen verschiedenen Isoenzymen unterschieden werden kann. Bei den Haussäugetieren sind folgende Isoenzyme bekannt: Die knochenspezifische alkalische Phosphatase (bALP, *bone specific alkaline phosphatase*), die intestinale alkalische Phosphatase, die leberspezifische alkalische Phosphatase (lALP) und beim Hund die Corticosteroid induzierte alkalische Phosphatase (cALP). Die bALP lässt sich durch Hitzedenaturierung, Gelelektrophorese oder chemische Ausfällung mit Weizenkeim Lektin isolieren. Neuere Methoden sind ein Radioimmunoassay (RIA) oder ein Enzymlinked Immunosorbent Assay (ELISA) (ALLEN, 2003).

Typ I Kollagen macht über 90 % der organischen Matrix des Knochens aus. Im Falle von Osteoklastenaktivität im Rahmen von Knochenresorption kommt es zur Freisetzung von Spaltprodukten der C-terminalen Telopeptide des Typ I Kollagens. Die sogenannten β -Crosslaps stellen somit ein spezifisches Abbauprodukt des Knochenkollagens dar (ALLEN, 2003).

1.3 Calciumresorption aus dem Gastrointestinaltrakt

Allen Säugetieren ist gemeinsam, dass Calcium nur aus dem Darm resorbiert werden kann, wenn es in gelöster Form vorliegt (BRONNER & PANSU, 1998). Die Lösung und damit Verdaulichkeit des Calciums ist abhängig von einem Wechselspiel der Calciumquelle, der Magensäure und der Enzyme im Darm. In der scheinbaren Calciumverdaulichkeit zeigen sich hingegen große tierartige Unterschiede (STANIK, 2006).

Bei Ratten konnte gezeigt werden, dass Calcium durch den niedrigen pH-Wert im Magen in Lösung geht und sich somit in ionischer Form befindet. Folglich kann es resorbiert werden. Je weiter caudal der Chymus transportiert wird, desto basischer wird der pH-Wert und das Calcium fällt wieder aus. Folglich sinkt die Absorptionsrate des Calciums in den hinteren Abschnitten des Dünndarms.

Sobald hier die übrigen Calciumionen absorbiert worden sind, geht allerdings weiteres Calcium in Lösung. Folglich steigt die Absorptionsrate des Calciums auch mit der Dauer, die der Chymus in einem Darmsegment verweilt (BRONNER, 1997).

Die Effizienz des aktiven Transports hängt von der Calcium- und Phosphorzufuhr über das Futter ab. Im Falle erhöhten Calciumbedarfs (Laktation, Wachstum) ist die Bildung von 1,25-dihydroxy Vitamin D in der Niere gesteigert, welches die Ausbildung von Ca^{2+} -Kanälen, sowie Einbau von Ca^{2+} -Pumpen fördert. Hierdurch kommt es auch zu einer erhöhten Bildung von Calbindin, welches bei mehreren Säugetierarten, so auch beim Hund, von 1,25-dihydroxy Vitamin D reguliert wird, und die Resorption von Calcium beeinflussen kann (BRONNER & PANSU, 1998; ROCHE et al., 1984; AL-ATAWI et al, 2009). Auch Phosphor, sowie der pH-Wert haben einen Effekt auf die Absorption. Phosphor hat insofern einen Einfluss, indem die Calciumabsorption signifikant verringert wird, wenn kein Phosphor im Darmlumen vorhanden ist. Das Verhältnis von Phosphor zu Calcium hingegen ändert die Calciumabsorption nicht signifikant (CRAMER, 1968). Die Quelle des Phosphors spielt auch eine entscheidende Rolle in der Absorption des Calciums. Phytat-Phosphor aus Getreide bildet mit Calcium unlösliche Calciumphytate und verhindert so die Absorption des Calciums aus dem Darmlumen (CHERYAN, 1980).

1.4 Calciumausscheidung über die Nieren

Die Calciumausscheidung über die Nieren zeigt enorme tierartliche Unterschiede. Kaninchen (CHEEKE und AMBERG, 1973) scheiden größere Mengen Calcium über den Harn aus, Pferde regulieren bei einer hohen Calciumversorgung ihre Calciumhomöostase ebenfalls über die Nieren (KIENZLE und BURGER, 2011), Menschen regulieren ihren Calciumstoffwechsel unter anderem über die Nieren (SILBERNAGEL und DESPOPOULOS, 2012). Beim Hund hingegen sind die Calciumausscheidungen über die Nieren konstant niedrig (CHEN, 1955), was dafür spricht, dass Hunde ihren Calciumstoffwechsel nicht über die Nieren regulieren können.

2. Vergleichender Calciumstoffwechsel von Hund und Mensch

2.1 Calciumbedarf von Hund und Mensch

Aktuell liegt der empfohlene Bedarf für einen ausgewachsenen Hund im Erhaltungsstoffwechsel bei 130 mg / kg met KGW (NRC, 2006). Hunde einer großen Rasse mit etwa 70 kg Körpergewicht haben folglich einen Calciumbedarf von 3146 mg, während ein 70 kg schwerer Mann hingegen nur 1000 mg / Tag benötigt (NRC, 1980; GfE, 1989; DGE, 2013).

2.2 Vergleich Calciummangelkrankungen

2.2.1 Calciummangel beim Hund

Obwohl Mensch und Hund grundsätzlich über dieselben Mechanismen verfügen, die Calciumhomöostase zu steuern, hat der Hund nicht nur einen höheren Bedarf an Calcium, sondern ist gegenüber Calciummangel in der Nahrung wesentlich empfindlicher. Klinische Fälle von Calciummangel können bei Hunden häufig beobachtet werden und sind meist Folge hausgemachter Rationen ohne adäquate Calciumquelle (SCHLESINGER u. JOFFE, 2011; BECKER et al., 2012; DIQUELOU et al., 2005).

Beim Hund führen Calciummangel und eine proportionale Überversorgung mit Phosphor zu einer inadäquaten Versorgung mit Calcium. Um den Blutcalciumspiegel aufrecht zu erhalten, wird Calcium aus den Knochen mobilisiert, wodurch es zur Knochenentmineralisierung kommt. Die Folge ist eine Zunahme des Knorpelgewebes und Osteoids. Bei lang andauerndem Mangel entwickelt sich ein sekundärer Hyperparathyreoidismus, was eine erhöhte Ausschüttung von PTH zur Folge hat, wodurch die weitere Mobilisierung des Calciums aus den Knochen gefördert wird. Daraus resultiert eine Einlagerung von fibrösem Bindegewebe in den Knochen und es entwickelt sich das Krankheitsbild der Osteodystrophia fibrosa generalisata. Obwohl alle Knochen im Körper betroffen sind, tritt die Krankheit zuerst im Unterkiefer auf, wodurch beim Hund das typische Krankheitsbild des Gummikiefers (*rubber jaw*) in Erscheinung tritt (LIU, 2002; HOLMES, 1967). Später erfolgt ein Substanzverlust in den Wirbeln und erst zuletzt in den langen Knochen (CLINE, 2012; KROOK et al., 1970; HENRIKSON et al., 1970).

2.2.2 Calciummangel beim Menschen

Beim Menschen verhält es sich anders. Die übliche Ernährung des Menschen (Western Diet) besteht aus größtenteils calciumarmen Produkten, mit denen die empfohlene Calciumversorgung oft nicht erreicht wird. Beim Menschen sind Knochenerkrankungen, die auf eine unzureichende Mineralisierung zurückzuführen sind, insbesondere bei Kindern und Heranwachsenden weltweit bekannt. Ursache der Erkrankung liegt jedoch hier in der Regel in einer nutritiven Fehlversorgung mit Vitamin D bzw. einer unzureichenden Exposition gegenüber UV-Strahlung (NOH et al., 2013; KARRAR, 1998; AL-ATAWI et al., 2009; WEISBERG et al., 2004; ROBINSON et al., 2006). Auch die postmenopausale Osteoporose scheint ihren Ursprung nicht vor allem in einer mangelhaften Calciumversorgung zu haben (GARN et al., 1992).

Anfang bis Mitte des 20. Jahrhunderts wurden mehrere Studien zur Calciumverdaulichkeit beim Menschen durchgeführt. Im Gegensatz zum Hund kann der Mensch sich an geringe Mengen Calcium in der Nahrung adaptieren durch eine Verbesserung der intestinalen Resorption (MALM, 1958; LEITCH et al., 1937; MITCHEL u. CURZON, 1939; SHERMAN u. HAWLEY, 1922; MCKAY et al., 1942; POTGIETER, 1940).

Um äußere zwischen den Probanden variierende Einflussfaktoren zu minimieren, haben MALM (1958) 26 Freiwillige aus einem Gefängnis in Norwegen ausgewählt für Bilanzstudien. In der Phase der niedrigen Calciumaufnahme erhielten die Männer im Durchschnitt 450 mg Calcium und 1400 mg Phosphor täglich. Die Dauer der Studie wurde so lang wie möglich (2 – 2,5 Jahre) durchgeführt und nur durch Freilassung, Verlegung in ein anderes Gefängnis oder freiwilliges Ausscheiden aus der Studie abgebrochen. In Tabelle 1 sind Dauer bis zur Adaptation, Calciumverluste vor und nach der Adaptation, sowie die Bilanzen bei einer Calciumaufnahme von 450 mg / Tag (~ 50 % RDA) bei den adulten Männern angegeben. Die Autoren haben Bilanzen von mehr als - 20 mg / Tag als signifikant erklärt, demzufolge waren 5 von 26 Männern in einer deutlich negativen Bilanz, 9 Männer waren in einer leicht negativen Bilanz, einer in ausgeglichener Bilanz und 11 Männer in positiver Bilanz.

Entsprechend der Dauer von 14 bis 240 Tagen bis zur Adaptation zeigten sich verschiedene Typen des Adaptierens (Tabelle I): Typ A kann sich sofort an die niedrige Calciumversorgung anpassen und zeigt eine positive oder nicht

signifikante negative Bilanz.

Tabelle I: Ausscheidung und Bilanz während Prä-Adaptation und Adaptation adulter Männer bei einer Calciumaufnahme von 450mg/Tag (MALM, 1958)

Alter	Zeit bis Adaptation [Tage]	Ca Verlust bis Adaptation [g]	Pre-Adaptation		Adaptation		Bilanz		Zugewinn Bilanz	Adaptations Typ
			Ca Fäzes [mg]	Ca Urin [mg]	Ca Fäzes [mg]	Ca Urin [mg]	nicht adaptiert	Adaptiert		
20	98	1,6	411	201	357	157	-16	60	76	B ₃
25	84	4,9	362	146	280	183	-58	6	64	B ₂
28	56	3,3	207	271	208	223	-58	-8	50	B ₂
29	42	1,2	349	204	222	179	-54	51	105	B ₁
30	98	3,8	444	163	403	158	-39	24	63	B ₁
30	56	7,8	320	215	221	172	-139	17	156	B ₂
32	140	15,7	343	190	308	212	-112	-69	43	B ₃
32	>84	>4,8	260	195	nicht adaptiert		-57			C
36	56	1	279	166	234	137	-17	31	48	B ₁
36	70	2,2	198	272	160	245	-32	32	64	B ₁
37	98	17,5	418	137	315	149	-149	-11	138	B ₂
41	210	18,5	323	200	252	209	-88	-7	81	B ₂
42	112	13,1	292	256	207	260	-117	-37	80	B ₂
42	56	3,2	365	169	264	195	-57	-11	46	B ₂
44	0	0			132	254		70		A
47	252	19,7	467	192	398	209	-78	0	76	B ₂
	266	32,2	292	170	206	167	-47	-18	29	
50	>280	>34,5	289	358	nicht adaptiert		-101			C
54	0	0			292	176		-20		A
54	>266	>20,8	355	213	nicht adaptiert		-78			C
55	56	4,1	381	152	229	140	-74	65	139	B ₁
56	98	8,8	259	433	195	395	-90	-2	88	B ₂
57	28	1,5	374	79	335	75	-53	-12	41	B ₂
58	56	0,8	327	232	254	210	-14	43	57	
59	28	5,4	391	219	277	184	-192	-18	174	B ₂
64	56	1,5	246	135	203	142	-26	-8	18	B ₂
69	0	0			200	199		44		A

Typ B hat zunächst eine negative Bilanz, gefolgt von einer besseren Einsparung oder Adaptation. Dieser Typ wird von den Autoren in weitere Untergruppen

unterteilt: B₁ zeigt eine kompensatorische Adaptation mit Erholung vom initialen Calciumverlust, B₂ erreicht ein neues Gleichgewicht mit einer gering negativen Bilanz bzw. einer ausgeglichenen Bilanz ohne Wiederherstellung des anfänglichen Calciumverlustes, während B₃ anfangs eine deutlich negative Bilanz zeigt, gefolgt von einer weniger starken, aber immer noch signifikant negativen Calciumbilanz. Bei Typ C handelt es sich um jene Probanden, bei denen eine deutlich negative Calciumbilanz vorliegt, die keine Anzeichen einer Einsparung oder Adaptation erahnen lässt (MALM, 1958).

Es konnte auch eine saisonale Adaptation beobachtet werden. Vergleicht man die 13 Männer, die mit der niedrigen Calciumaufnahme im Februar bis Juli begonnen haben mit denen, die im September bis November begonnen haben, kommt man zu folgenden Ergebnissen: die 6 Männer, die das Experiment im Februar und März begonnen haben, konnten innerhalb von durchschnittlich 88 Tagen adaptieren, während die 7 Männer, die im April und Juli begonnen haben durchschnittlich nur 39 Tage brauchten, um in positive Bilanz zu kommen. Dahingegen benötigten die 11 Männer, die September bis November das Experiment starteten, durchschnittlich 106 Tage, um in positive Bilanz zu kommen (MALM, 1958).

Einer der Männer wurde in zwei Versuchen, beginnend im Oktober und im November des darauffolgenden Jahres, untersucht. Jeweils benötigte er die längste Zeit für eine Adaptation, 252 bzw. 266 Tage und erreichte damit das Equilibrium im Juni bzw. August. Einer der zunächst nicht adaptierenden Männer zeigte im Juni nach 112 Tagen eine intestinale Adaption. Aufgrund weiterhin bestehender hoher Calciumausscheidungen über den Urin konnte er jedoch in der Gesamtheit keine positive Calciumbilanz erreichen. Ein weiterer der nicht adaptierenden Männer hatte von Juli bis Mitte November eine durchschnittliche faecale Ausscheidung von 320 mg / Tag, die von Dezember bis März auf 395 mg / Tag anstieg. Die Vermutung einer saisonalen Beeinflussung der Calcium Absorption wird noch dadurch verstärkt, dass 2 der 3 Männer, die sofort adaptierten, und 5 der 7 der kompensierenden Adaptierer das Experiment im Februar bis April starteten, während nur 4 der 12 Typ B₂ Adaptierer in diesen Monaten begann (MALM, 1958).

McCANCE und WIDDOWSON (1942) untersuchten in mehreren kurzen Durchgängen (1, 2 und 3 Wochen) 6 gesunde Menschen bei Calcium Aufnahmen

von 450 bis 620 mg / Tag zu verschiedenen Jahreszeiten. Das wenigste Calcium wurde Februar und März absorbiert, das meiste im Juli und August (Tabelle II). Um festzustellen, ob die bessere Bilanz in den Sommermonaten auf die verstärkte Sonneneinstrahlung und damit bessere Vitamin D Synthese zurückzuführen ist, wurden im März 1941 über sieben Tage in einer Vorversuchsphase den Probanden 2000 IU Vitamin D täglich verabreicht. Trotzdem zeigten die Individuen eine nicht signifikante Verbesserung der Calciumabsorption ohne Veränderung in der Calciumausscheidung im Urin. Daraus schlossen die Autoren eine Verbesserung der Calciumabsorption in den Sommermonaten durch verstärkte Vitamin D Synthese aus.

Tabelle II: Saisonale Beeinflussung der Calciumabsorption beim Menschen (McCance und Widdowson, 1942)

	Calciumaufnahme [mg / Tag]	Calciumabsorption [% der Calcium- aufnahme]	Calciumausscheidung im Urin [% der Calciumaufnahme]
Juli 1940	450	26	27
Dezember 1940	515	6	17
Januar 1941	515	6	17
Juli 1941	600	17	25
Februar 1942	535	7	15
Juli 1942	590	29	30

3. Metaanalyse zur Calciumverdaulichkeit bei Hund und Katze

MACK et al. (2015) führten eine Metaanalyse zur Calciumaufnahme und faecalen -ausscheidung bei Hunden und Katzen durch. Dabei sollten Faktoren identifiziert werden, die die Absorption von Calcium und Phosphor beeinflussen wie z.B. die Quelle und die Rationszusammensetzung. Hierzu wurden die Aufnahme gegen die faecale Exkretion geplottet. Besonders schwerverdauliche Calciumquellen oder Inhaltsstoffe in der Ration, welche die Calciumverdaulichkeit verschlechtern, müssten dann Ausreißer nach oben zur Folge haben, während besonders hochverdauliches Calcium nach unten abweichen würde. Ein Einfluss der quantitativen Calciumaufnahme auf die Absorption müsste ebenfalls sichtbar werden. Wenn die Aufnahme unterhalb des Bedarfs liegt, müsste ein großer Teil absorbiert werden, während beim Überschreiten des Bedarfs fast alles Calcium wieder ausgeschieden werden müsste (Abb. 1). Die Steigung der Regressionslinie repräsentiert den reziproken Wert der wahren Verdaulichkeit

(i.e. 1-Steigung)*100 = wV).

Diese Vorstellungen bestätigten sich nicht. Die Autoren fanden eine hoch signifikante lineare Beziehung zwischen der Calciumaufnahme und der Calciumausscheidung ohne Breakpoint (Abb. 2). Dies spricht gegen eine Adaptation der Calciumausscheidung bzw. der Calciumabsorption an die aufgenommene Menge. Bei geringer Calciumaufnahme würde demnach die wahre Verdaulichkeit nicht wesentlich erhöht und bei hoher nicht systematisch reduziert werden.

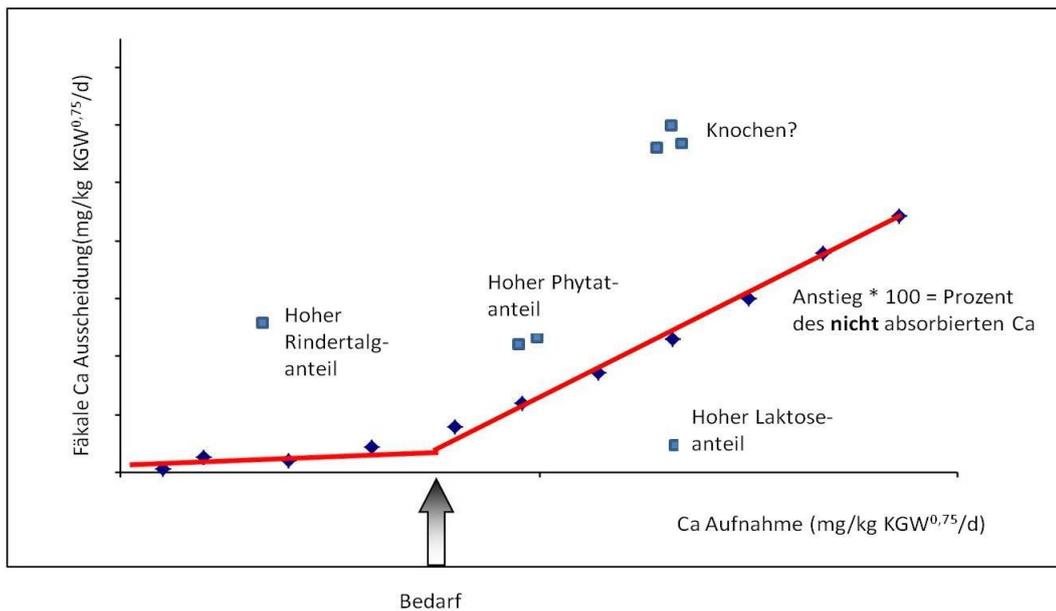


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Plots der Calciumaufnahme gegen die fäkale Calciumausscheidung: Broken Line Modell mit Breakpoint im Bereich des Bedarfs und Ausreißer bei besonders schwer bzw. leicht verdaulichem Calcium

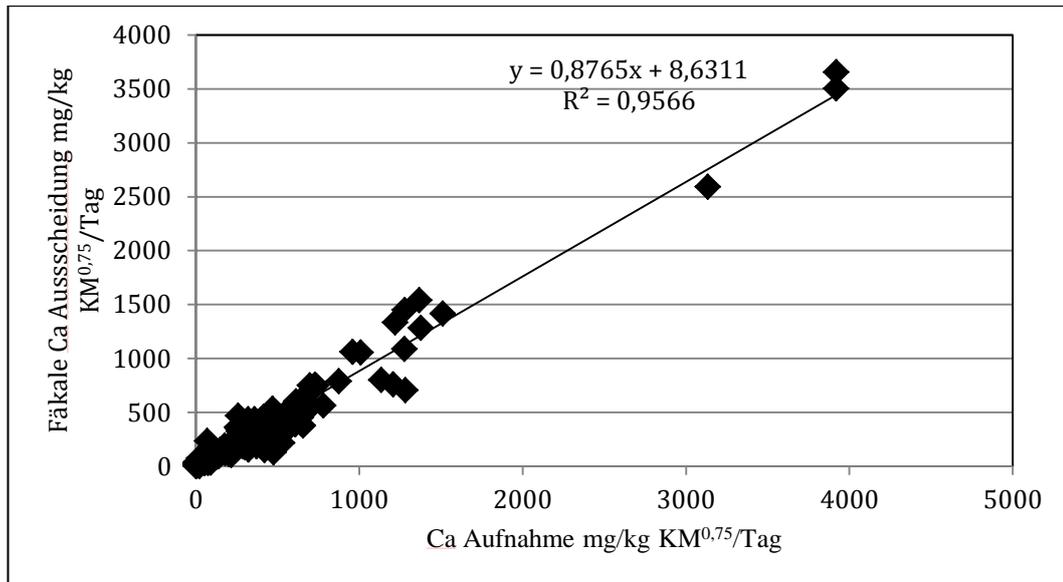


Abb. 2: Abhängigkeit der faecalen Calciumausscheidung zur Calciumaufnahme beim adulten Hund (nach Mack et al., 2015)

Ähnliche Beobachtungen machten auch andere Autoren. So fanden CRAMER und DUECK (1962) heraus, dass bei Hunden die intestinale Resorption von Calcium bereits gesättigt ist, während Ratten wesentlich höhere Calciummengen resorbieren können.

SCHÜNEMANN et al. (1989) fütterten Hunde mit Rationen unterschiedlichen Calciumgehalts und fanden heraus, dass selbst bei Rationen mit sehr niedrigen Calciumgehalten größtenteils praecaecal eine Nettosekretion stattfand, während im Colon eine Nettoabsorption stattfand. Dagegen gilt bei anderen Spezies wie z.B. Ratten oder Menschen der Dünndarm als Hauptort der Absorption (BRONNER et al., 2003). Auffällig war, dass bei den Hunden von SCHÜNEMANN et al. (1989) die Calciumaufnahme und der ileocaecale Calciumfluss in ähnlicher Weise korrelierten (Abb. 3) wie Calciumaufnahme und faecale Calciumausscheidung in der Studie von MACK et al. (2015). Auch zwischen dem ileocaecalen Calciumfluss und der faecalen Calciumausscheidung bestand eine positive Korrelation (Abb. 4).

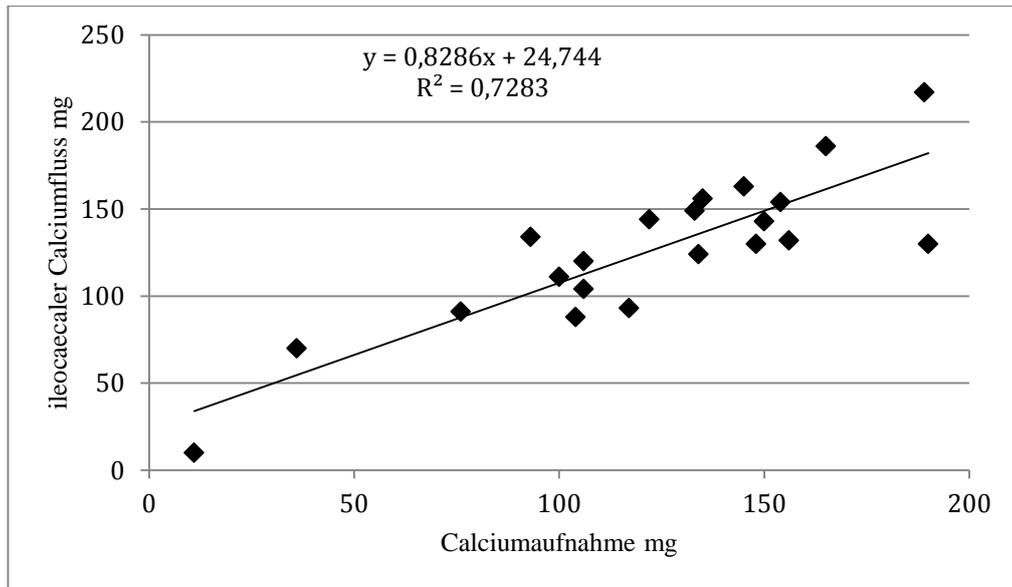


Abb. 3: Abhängigkeit des ileocaecalen Calciumflusses zur Calciumaufnahme (nach Lass, 1988)

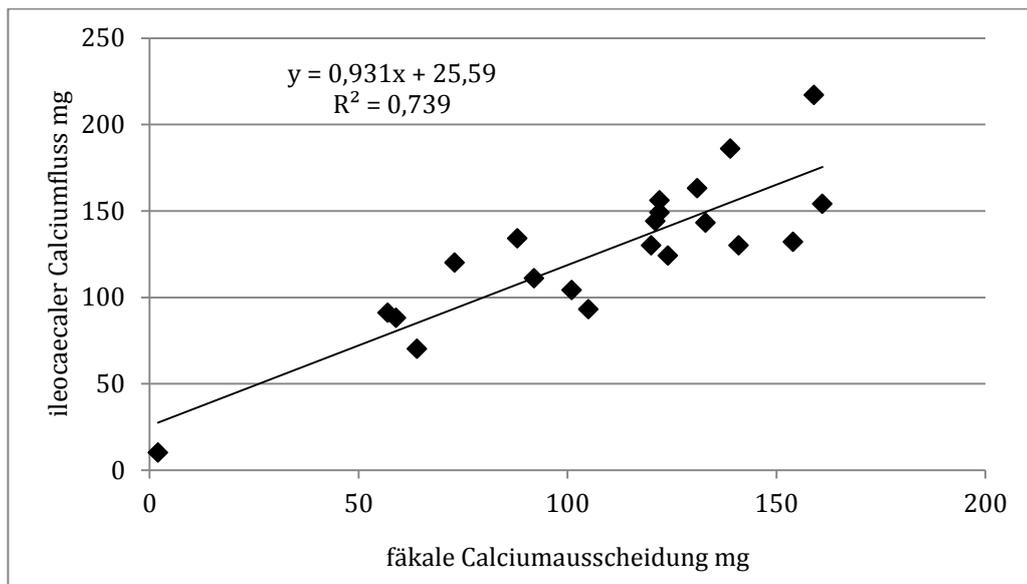


Abb. 4: Abhängigkeit des ileocaecalen Calciumflusses zur Calciumausscheidung (nach Lass, 1988)

Bei der Studie von MACK et al. (2015) wurden hauptsächlich Kurzeitstudien einbezogen. Deshalb kann anhand der Literatur nicht eindeutig beantwortet werden, ob Hunde längerfristig – ähnlich wie MALM (1958) es bei Menschen zeigte – die Calciumabsorption im Darm bei einem Calciummangel adaptieren könnte

PUBLIKATION

Das folgende Manuskript ‘Faecal calcium excretion does not decrease during long-term feeding of a low calcium diet in adult dogs’ wurde am 04. Oktober 2017 vom Journal of Physiology and Animal Nutrition (JAPAN) zur Veröffentlichung angenommen.

The following manuscript entitled ‘Faecal calcium excretion does not decrease during long-term feeding of a low calcium diet in adult dogs’ has been accepted for publication in the Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (JAPAN) on October 4th, 2017.

Submitted April 18th; Revised June 25th, 2017 Accepted October 4th, 2017

Article first published November 2017; Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berlin)

Copyright © 2017, Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, Wiley-Blackwell.

Faecal calcium excretion does not decrease during long-term feeding of a low calcium diet in adult dogs

S. Schmitt¹, J. Mack¹, E. Kienzle¹, L.G. Alexander², P.J. Morris², A. Colyer², B. Dobenecker¹

¹ Chair of Animal Nutrition and Dietetics, Ludwig-Maximilians-University Munich, Oberschleissheim, Germany

² WALTHAM[®] Centre for Pet Nutrition, Freeby Lane, Waltham-on-the-Wolds, Melton Mowbray, Leicestershire, UK

Key words: dog, calcium, calcium absorption, calcium requirements

Introduction

Dogs are more sensitive to chronic low calcium intake than men. Within several months up to some years of calcium deficient feeding even adult dogs at maintenance develop skeletal problems such as rubber jaw, osteoporosis, osteodystrophia fibrosa (Holmes, 1967; Becker et al., 2012; Diquélou et al., 2005). In puppies, skeletal problems due to calcium deficiency are commonly seen (Dobenecker et al., 1998; Hutchinson et al., 2012; Becker et al., 2012). By contrast, in humans, insufficient calcium supply alone is not seen to be a major cause of osteoporosis in elderly people (Garn et al., 1992).

Calcium requirements, even for maintenance, are much lower for adult humans than for adult dogs (NRC, 2006; NRC, 1980; GfE, 1989; DGE, 2013). The current recommended daily allowance (RDA) is 1000mg/d for an adult human, and the estimated average requirement is 800 mg/d (Institute of Medicine, 2011). By contrast a Great Dane of the same body weight (BW) requires 3146 mg calcium per day (130 mg/kg BW^{0.75} recommended allowance; NRC, 2006). Humans are able to increase intestinal calcium absorption when calcium intake is low, and are therefore able to tolerate suboptimal intakes for sustained periods of time (Malm, 1958; Leitch et al., 1937; Mitchell & Curzon, 1939; McKay et al., 1942; Potgieter, 1940). By contrast adult dogs eating diets comparable in calcium content with western human diets exhibit clinical symptoms of deficiency in a relatively short time (Diquélou et al., 2005).

A previous meta-analysis of digestion trials in dogs suggested that true digestibility of calcium does not notably increase when calcium intake is below

requirements (Mack et al., 2015). Given the differences in calcium requirements of dogs and humans, the relatively common occurrence of clinical calcium deficiency in dogs but not in man, and the outcome of the meta-analysis of Mack et al. (2015), we hypothesize that dogs will not effectively increase calcium absorption from the gastrointestinal tract when challenged with a low dietary calcium intake. The NRC (2006) defines the minimal requirements of a nutrient as requirement of bioavailable nutrient. Provided the calcium source is available, a dog eating the minimal requirement and efficiently increasing its capability for calcium absorption should achieve a balance between calcium intake and excretion. In a digestion trial therefore the apparent calcium digestibility should be close to zero. By contrast, a highly negative calcium digestibility, i.e. faecal losses considerably exceeding the ingested amount, would suggest that calcium absorption has not sufficiently increased to maintain calcium homeostasis. In the present study therefore we fed calcium according to minimal requirements of NRC (2006) to adult dogs at maintenance and measured faecal calcium excretion in digestion trials.

As the studies included in the meta-analysis of Mack et al. (2015) were mostly short term experiments lasting only a few weeks, it is possible that dogs may be slow to adapt to changes in calcium availability, and only increase their quantitative calcium absorption during longer periods of low calcium intake. Therefore, in order to determine this we maintained calcium supply according to minimal requirements of NRC (2006) for a period of 28 weeks, with repeated assessment of calcium digestibility and balance during this period. We hypothesized that potential long term adaptations of intestinal calcium metabolism to low calcium intake should be demonstrable after more than six months.

Animals, Materials and Methods

To determine the ability of adult dogs to modify faecal calcium losses in response to a low calcium diet, 12 dogs from two different breeds were fed a diet with a calcium amount corresponding to the minimal requirements (NRC, 2006) for 28 weeks. Six intact female Beagles with a body weight of (mean \pm SD) 14.6 ± 1.5 kg and 6 intact female Foxhound Boxer Ingelheim Labrador crossbred dogs (FBI) with a body weight of 25.7 ± 0.9 kg were used in this feeding trial. The FBI-breed was established as an experimental dog breed around 40 years ago from the three above mentioned breeds, with a major Foxhound percentage. The standard number for digestion trials of six dogs (in this case per breed) was used (Nott et al. 1994). Protection against parasites, parvovirus, distemper, canine infectious hepatitis, kennel cough and leptospirosis was provided. All dogs were housed individually in ≥ 6 m² (Beagles) and ≥ 8 m² (FBIs) indoor kennels with concrete floors. During daytime they had access to large outdoor kennels for 4 to 8 hours depending on weather conditions in groups of up to 7 dogs; and they were also walked individually. During the digestion trials, the dogs were kept in their usual indoor kennels. All institutional and national guidelines for the care and use of animals were followed. The Government of Upper Bavaria, the proper authority according to German law on animal welfare (*Tierschutzgesetz*) and the WALTHAM ethics committee, approved the study.

The experiment consisted of three phases: 18 weeks pre-trial, 28 weeks trial and 14 weeks post-trial (Fig. 1). To ensure that the dogs were neither over- nor under-nourished before the beginning of the study, which might have compromised their reaction to low calcium intake, in the pre-trial period all dogs were fed a commercial complete and balanced dry extruded diet in an amount to maintain

ideal body weight (table 1). Calcium intake during this phase amounted to 200 ± 40 mg/kg BW^{0.75} (balanced diet, Table 1). The same balanced diet was also fed throughout the 14 week post-trial feeding. During the 28 week low calcium feeding period, the dogs were fed a customised dry extruded diet (Table 1) which supplied almost the minimal requirements of calcium, mainly from calcium carbonate (feed grade powder). A single batch was fed throughout the low calcium feeding period and small amounts of calcium carbonate (feed grade powder, mixed into the food) were added to meet the minimal requirements (60 mg Ca/kg BW^{0.75}; NRC, 2006). Approximately two third of the total calcium came from calcium carbonate, the rest from feed ingredients. Protein sources were maize and wheat gluten (low calcium diet, Table 1). Dogs were fed the low calcium diet in amounts of 19.7 g dry matter/kg BW^{0.75} an amount which met the recommended allowance for phosphorus intake of 100 mg/kg BW^{0.75} (NRC, 2006). The resulting calcium to phosphorus ratio was 0.6/1. This amount of food did not completely meet the energy requirements for maintenance of each dog so to adapt for individual maintenance energy requirements dogs received added lard to maintain body weight. Consequently the dietary fat content in the low calcium diets fed to individual dogs varied between 33 % and 57 % dry matter. Table 2 shows the total energy and vitamin D, table 3 the calcium and phosphorus intake of the dogs.

Four digestion assessment trials were completed during the 28 weeks of low calcium feeding. The first trial was carried out in the 7th week on the low calcium diet, the following trials every 7 weeks thereafter. This resulted in trials carried out at week 7, 14, 21 and 28 of the low calcium feeding period. On each occasion, feed intake was measured and the faeces of every dog were collected for 5 days

quantitatively and were weighed, frozen, lyophilized and ground. The faeces for each dog, on each balance trial, were pooled and homogenised and one sample was analysed. Calcium levels in the faeces were determined by flame-emission photometry (Eppendorf Flammenphotometer EFOX 5053, HJG Spezialmesssysteme, Faßberg/Münden, Germany), phosphorus levels by spectrophotometry (GENESYS 10 UV, Thermo Spectronic, Rochester NY, USA), both after wet digestion in a microwave (Janßen et al., 2006). Blood samples were taken during each digestion trial in the low calcium diet feeding phase. In addition blood was collected in the week before the start of the low calcium diet (i.e. after at least 17 weeks on the pre-trial diet). After the low calcium feeding period, blood was collected when the dogs were fed the post-trial balanced diet for 7 and 14 weeks. Blood samples were taken from every dog fasted for about 24 hours between 8 and 10 a.m. from the cephalic vein and allowed to stand for 20 to 30 minutes before centrifugation at 3000 rpm for 10 minutes. For ionised calcium 0.7 ml of the serum was pipetted into transport tubes of the laboratory ALOMED avoiding oxygen contact, and 0.5 ml into PTH transport tubes with a PTH stabiliser composed of a mixture of several proprietary protease inhibitors (ALOMED, Radolfzell, Germany). The remaining serum was aliquoted into Eppendorf safe-lock tubes and frozen at -20°C for determination of vitamin D content, and at -80°C for serum crosslaps and bone alkaline phosphatase (bALP). The serum samples for determination of PTH, calcium, phosphorus and ionised calcium were shipped to a diagnostic laboratory specialised in veterinary medicine (ALOMED, Radolfzell/Bodensee, Germany). Calcium was analysed by colorimetry via endpoint determination by the kresolphtalein method; phosphorus was determined using the phosphor-molybdat method (ILab 650 analytic system, IL GmbH, Kirchheim, Germany). The reference range for dogs of the laboratory

is 2.3 to 2.8 mmol/l for total calcium and 1.0 to 1.7 mmol/l for phosphorus in adult dogs, respectively. Ionised calcium was measured using a calcium ion-selective electrode (CRT 8 Nova biomedical, Rödermark, Germany), with simultaneous assessment of serum pH as ionised calcium is strongly pH dependent. Afterwards the measured ionised calcium value was adjusted to pH 7.4, and declared as standardised ionised calcium. The reference range of the laboratory for ionised calcium in adult dogs is 1.29 to 1.55 mmol/l. For the PTH determination a direct Immunoluminometric sandwich immunoassay (ILMA) was used, that uses two polyclonal antibodies against different epitopes of the intact human PTH. The first antibody is focused against the N-terminale epitope and acts through its marking with acridinium-ester as tracer. The second antibody is focused against the C-terminale epitope and is solid bound. The reference range of the laboratory for PTH in adult dogs is 8 to 45 pg/l. The serum samples for the measurement of 1,25-dihydroxy vitamin D₃ (1,25(OH)₂-Vit D₃) and 25-hydroxy vitamin D₃ (25(OH)-Vit D₃) were sent to a validated laboratory (IDEXX Ludwigsburg, Germany). 1,25(OH)₂-Vit D₃ was detected by a radioimmunoassay (1,25(OH)₂-Vit D-RIA-CT Testkit, DIAsource Immuno Assays S.A.; Code KIP1929, IBL, Hamburg, Germany). The serum samples for the 25(OH)-Vit D₃ measurement were processed via a solid phase extraction by a standardised method of ChromSystems (Gräfelfing, Germany) and measured with an ultra-high performance liquid chromatography (RSLC3000 Dionex/ThermoFisher, Dreieich, Germany). The reference range for adult dogs of the laboratory for 25(OH)-Vit D₃ is 73 to 461 nmol/l and for 1,25(OH)₂-Vit D₃ is 22.1 to 105 pg/ml. Serum crosslaps, a marker of osteoclastic activity were measured with a human ELISA (immunodiagnostic systems Serum CrossLaps[®] ELISA; Immunodiagnostic Systems GmbH, Frankfurt/Main, Germany) validated for dogs. Reference ranges

for dogs found in literature using ELISAs are 0.11 to 1.83 ng/ml in intact female dogs (Belić et al., 2012). bALP, a marker of osteoblastic activity was measured with the human ELISA kit from MicroVue™ Quidel® BAP Enzym-Immunoassay (TECOmedical AG, Sissach, Switzerland) validated for dogs. The reference range for this ELISA kit in adult dogs between 3 to 7 years is 6.7 ± 3.6 U/l (Allen et al., 2000).

Statistics: Data is expressed as mean \pm standard deviation. Each measure was analysed by linear mixed effects models (LMM), including dog as a random effect to account for repeated measures over time, time as fixed categorical effect and variance weighting by time. Pairwise comparisons between all time points were performed using Tukey HSD tests. A p-value below 0.05 was considered as significant. LMM assumptions were found to be appropriate after visual inspection of the residuals, for normality and constant variance. Analyses were performed in R v3.3.2 statistical software, using libraries *nlme*, *multcomp* and *ggplot2*. Data from the LMM are reported as means with 95% family-wise confidence intervals and summary data are reported as means \pm standard deviation (SD).

Results

All dogs remained clinically healthy, as assessed by weekly health checks, throughout the experiment. Faecal excretion of calcium was almost double that of calcium intake throughout all digestion trials. There was a small but non-significant decrease in faecal calcium excretion which led to a small but non-significant increase in apparent calcium digestibility at week 14 (Table 3). Apparent calcium digestibility was negative at all time points. By contrast, faecal phosphorus excretion decreased after 14 weeks and remained in the same range for the remainder of the experiment (Table 3). Apparent phosphorus digestibility was positive throughout the experiment, and it increased from week 7 to week 14 of low calcium feeding.

On the low calcium diet total serum calcium content increased significantly compared to the pre-trial period on a balanced diet (Table 4). It did not decrease again in the post-trial period when the dogs were fed a balanced diet again. All data on total serum calcium remained within the reference range. Ionised serum calcium content remained within the laboratory reference range. The percentage of ionised calcium of total serum calcium decreased when total serum calcium increased ($r^2=0.68$; $p<0.01$). Total serum phosphorus was unaffected by diet (Table 4). There was no systematic effect of breed on either parameter. PTH decreased in week 14 of the low calcium feeding in some dogs even below the reference range (20.3 ± 6.8 to 8.9 ± 3.3 pg/ml; Fig. 2) and increased again in the post-trial period. There was no systematic effect of breed. There was no strong correlation between PTH and either serum calcium, ionised serum calcium or serum phosphorus ($r^2 <0.1$). The osteoclastic bone markers crosslaps in serum increased throughout the low calcium feeding period (Fig. 2). In the post-trial period on the balanced diet the crosslaps decreased. The osteoblastic bone marker

alkaline phosphatase (bALP) was unaffected during the low calcium feeding period (Fig. 2). After the dogs were fed a balanced diet again bALP increased significantly, from 10.1 ± 3.3 U/l to 15.6 ± 5.4 U/l at week 28, even above the reference range. 25(OH)-Vit D3 decreased significantly after feeding the low calcium diet (from 163.5 ± 47.9 nmol/l to 119.1 ± 21.8 nmol/l). When the balanced diet was fed again after the low calcium period it decreased even further (92.2 ± 17.2 nmol/l; Fig. 3). All data were within reference range throughout all feeding periods. 1,25(OH)₂-Vit D3 was not affected by the change from a balanced diet to the low calcium diet (from 59 ± 20.55 pg/ml to 65.18 ± 17.2 pg/ml; Fig. 3). When the balanced diet was re-fed after the low calcium period 1,25(OH)₂-Vit D3 decreased but non-significantly (44.1 ± 13.17 pg/ml). All data remained within reference range.

Discussion

The present study aimed to determine whether dogs would increase dietary calcium absorption when fed their requirements of available calcium at the NRC (2006) minimal requirement over a period of 28 weeks. The calcium source was calcium carbonate. It has been shown by Dobenecker (2002) that calcium carbonate is available in growing dogs. Apparent digestibility amounted to around 50 % even if the puppies were fed three times requirements. If dogs are able to adapt calcium absorption in response to low dietary calcium concentrations, then faecal excretion of dietary calcium in the present study should have been considerably decreased, resulting in a total faecal calcium excretion close to the calcium intake and an apparent calcium digestibility close to zero. Given an intake of 60 mg/kg BW^{0.75} in the present study, and endogenous losses of 20 mg/kg BW (GfE 1989) which corresponds to 23 to 55 mg Ca/kg BW^{0.75} in the dog population of this study the true digestibility would range between about 40 and 90 %. Throughout the study, however, faecal calcium excretion amounted consistently to more than 100 mg/kg BW^{0.75}. This value is similar to the sum of endogenous losses and dietary calcium a finding that suggests a continuously low true digestibility of calcium during the 28 week period on the low calcium diet. Even if only faecal calcium excretion is considered the calcium balance was clearly negative, with faecal excretion exceeding intake by about 40-60 mg Ca/kg BW^{0.75}. It is unlikely that this is an artefact caused by experimental errors. If food is not eaten completely and lost somewhere or if faeces are not completely collected, then the balance would appear to be more positive than it really is. By contrast there are no comparable pitfalls in the experimental work that would make the balance appear more negative than it really is. The diet contained considerable amounts of fat. This might be a problem for calcium digestibility in rats

(GOEDEGEBUURE et al. 2014) but not in dogs (Hallebeek & Hazewinkel, 1997).

With daily calcium losses in the range of 40 to 60 mg/kg BW^{0.75} a serious depletion of body calcium and associated adverse consequences could be predicted, if the low calcium intake would go on for a longer period. This is in agreement with clinical case reports where clinical symptoms occurred after years (Becker et al., 2012; Diquélou et al., 2005). It was also the rationale behind limiting the experiment to 28 weeks.

In the present study serum calcium and phosphorus levels were not affected by low calcium intake. This is in agreement with experiments and case reports where a decrease of serum calcium only occurs in advanced stages of calcium deficiency in dogs (Diquélou et al., 2005; Jowsey, 1971; Saville & Krook, 1969). If intestinal calcium absorption is not increased during periods of low calcium intake as the current data suggest, mobilisation of calcium from the bones is the only option open to the animals to maintain serum calcium levels. In the present study serum cross-laps increased during low calcium feeding suggesting increased calcium mobilisation from the skeleton. Since bALP an osteoblastic marker did not also increase, an increase in bone turn-over is unlikely to be the reason for increased crosslaps. The relatively high level of bALP might be due to the high activity levels of the experimental dogs which is known to lead to increased levels of bone formation markers (Menkes et al., 1993). It is worth mentioning that after repletion of calcium the bALP levels did increase suggesting rebuilding of bone calcium stores. It appears as if dogs rely rather on bone resorption than on increased intestinal calcium absorption for calcium homeostasis. This is not a

feature unique to this species. A similar pattern of calcium homeostasis has been described for sheep (Wilkins et al., 2012) compared to goats which increase intestinal absorption of calcium when challenged with a low calcium diet.

In animals on a low calcium diet serum PTH and 1,25-(OH)₂-Vit D₃ would be expected to increase. This did not happen in the present study. 25-(OH)-Vit D₃ levels suggest vitamin D intake was adequate. There was no strong correlation between any of the three parameters. A similar effect was observed by Wilkins et al. (2012) in sheep compared to goats. When goats were challenged with a low calcium diet 1,25-(OH)₂-Vit D₃ increased but this did not occur in sheep. Dogs with a combined deficiency of calcium and vitamin D had increased PTH levels under laboratory conditions as well as in a clinical case (Cloutier et al., 1992; de Fornel-Thibau et al., 2007). A rather simple explanation for the lack of a PTH reaction might be the time of blood sampling, i.e. 24 hours after the last offering of food. In another study by Dobenecker & Siedler (2016) with high phosphorus diets there was a significant increase of PTH after feeding but not pre-prandial.

From an evolutionary point of view an increase of intestinal calcium absorption, presumably by increasing active transport systems, is only economical in species that are eating low calcium diets for prolonged periods. This is neither the case in grazers like sheep nor in carnivores eating whole prey. By contrast, browsers and intermediates like goats as well as omnivores and especially granivores need such mechanisms for calcium homeostasis. It might be interesting to have a closer look into species differences of calcium homeostasis in the future.

Summary

According to a previous meta-analysis adult dogs do not notably increase calcium absorption from the gastrointestinal tract when calcium intake is decreased. This results in a negative calcium balance even with a moderate calcium reduction. In the present study we wanted to verify i) whether a negative calcium balance occurs at a calcium intake equivalent to NRC (2006) minimal requirements, and if so ii) whether the negative calcium balance will persist for up to 6 months on a low calcium diet. After a pre-feeding period of at least 18 weeks with calcium intake slightly exceeding maintenance requirements (200 mg/kg body weight^{0.75}), 12 dogs (6 Beagles, 6 Foxhound crossbreds) were fed a low calcium diet for 28 weeks. One dog was removed from the trial for reasons unrelated to the study at week 23. Calcium intake amounted to 60 mg/kg body weight^{0.75} corresponding to the minimal requirement for maintenance in dogs (NRC, 2006). Digestion trials were carried out at week 7, 14, 21 and 28 of the low calcium feeding period. At these time points, and at week 18 of the pre-trial, blood samples were taken and analysed for calcium, ionised calcium, phosphorus, parathyroid hormone, vitamin D, serum crosslaps and bone alkaline phosphatase. Apparent calcium digestibility was negative throughout the study, suggesting a negative calcium balance. There was no systematic decrease of faecal calcium excretion. Serum calcium, ionised calcium and phosphorus remained within the reference range. Serum crosslaps increased continuously from baseline to week 28 of trial, with averages increasing from 0.102 ng/ml to 0.279 ng/ml, suggesting osteoclastic activity, indicative of calcium mobilisation from the skeleton. The study supports the theory of a lack of adaptation of intestinal calcium absorption from diets with relatively low calcium content in dogs. This agrees with clinical findings in dogs eating low calcium diets.

References

Allen, M.J., 2000: Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. *Veterinary clinical pathology* **32**, 101-113.

Becker, N., Kienzle, E., Dobenecker, B., 2012: Calcium deficiency: a problem in growing and adult dogs: two case reports. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere* **40**, 135-139.

Belić, M., Kušec, V., Svetina, A., Grizelj, J., Robić, M., Vrbanac, Z., Benić, M., Turk, R. 2012: The influence of sex on biochemical markers of bone turnover in dogs. *Research in veterinary science* **93**, 918-920.

Cloutier, M., Gascon-Barre, M., D'amour, P. 1992: Chronic adaptation of dog parathyroid function to a low-calcium-high-sodium-vitamin D-deficient diet. *Journal of Bone and Mineral Research* **7**, 1021-1028.

DGE, 2013: Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, Calcium **1**, Deutschland.

de Fornel-Thibaud, P., Blanchard, G., Escoffier-Chateau, L., Segond, S., Guetta, F., Begon, D., Delisle F., Rosenberg, D. 2007: Unusual case of osteopenia associated with nutritional calcium and vitamin D deficiency in an adult dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* **43**, 52-60.

Diquélou, A., Chaput, C., Benoit, E., Priymenko, N., 2005: Hypocalcaemia due to nutritional calcium deficiency and hypoparathyroidism in an adult dog. *The veterinary record* **156**, 45-48.

Dobenecker, B., Kienzle, E., Köstlin, R. und Matis, U., 1998: Mal- and overnutrition in puppies with or without disorders of skeletal development. *Journal of animal physiology and animal nutrition* **80**, 76-81.

Dobenecker, B., 2002: Influence of calcium and phosphorus intake on the apparent digestibility of these minerals in growing dogs. *The Journal of nutrition* **132**, 1665-1667.

Dobenecker, B., Siedler, S. 2016: The source of phosphorus influences serum PTH, apparent digestibility and blood levels of calcium and phosphorus in dogs fed high phosphorus diets with balanced Ca/P ratio. *Proceedings of Waltham International Nutritional Sciences Symposium, P21*

Frommelt, L., Bielohuby, M., Stoehr, B. J., Menhofer, D., Bidlingmaier, M., Kienzle, E. 2014: Effects of low-carbohydrate, high-fat diets on apparent digestibility of minerals and trace elements in rats. *Nutrition* **30**, 869-875.

Garn, S.M., Sullivan, T.V., Decker, S.A., Larkin, F.A., Hawthorne, V.M., 1992: Continuing bone expansion and increasing bone loss over a two-decade period in men and women from a total community sample. *American journal of human biology* **4**, 57-67.

GfE, 1989: Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, Energie- und Nährstoffbedarf (*energy and nutrient requirements*) Nr.5 Hunde (*dogs*), Germany

Hallebeek, J. M., & Hazewinkel, H. A. W. 1997: Effect of isoenergetic substitution of dietary fat (beef tallow) for carbohydrates (wheat starch) on the calcium absorption in the dog. *Journal of animal physiology and animal nutrition* **78**, 60-66.

Holmes, J.R., 1967: Some skeletal disorders in domestic animals. *Canadian veterinary journal* **8**, 112-123.

Hutchinson, D., Freeman, L.M., McCarthy, R., Anastasio, J., Shaw, S.P., Sutherland-Smith, J. 2012: Seizures and severe nutrient deficiencies in a puppy fed a homemade diet. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **241**, 477-483.

Institute of Medicine, 2011: Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. *Washington, DC: The National Academies Press*

Janßen E., Matter Y., Rieß P., Seifert D. 2006: Nassaufschluss unter Druck. *VDLufa Methodenbuch III*, 6.Erg., 10.8.1, 1-4.

Jowsey, J., 1971: Calcium release from the skeleton of rachitic puppies. *The journal of clinical investigation* **51**, 9-15.

Leitch, I., 1937: The determination of the calcium requirements of man. *Nutrition abstracts and reviews* **6**, 553-578.

Mack, J., Alexander, L.G., Morris, P.J., Dobenecker, B., Kienzle, E., 2015: Demonstration of uniformity of calcium absorption in adult dogs and cats. *Journal of animal physiology and animal nutrition* **99**, 801-809.

Malm, O.J., 1958: Calcium requirement and adaptation in adult men. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* **10** Supplement 36, 1-290.

McKay, H., Patton, M.B., Ohlson, M.A., Pittman, M.S., Leverton, R.M., Marsh, A.G., Stearns, G., Cox, G., 1942: Calcium, phosphorus and nitrogen metabolism of young college women. *The journal of nutrition* **24**, 367-384.

Menkes, A., Mazel, S., Redmond, R.A., Koffler, K., Libanati, C.R., Gundberg, C.M., Zizic, T.M., Hagberg, J.M., Pratley, R.E., Hurley, B.F., 1993: Strength training increases regional bone mineral density and bone remodelling in middle-aged and older men. *Journal of applied physiology* **74**, 2478-2484.

Mitchell, H.H. and Curzon, E.G., 1939: The dietary requirement of calcium and its significance. *Actualités scientifiques et industrielles* **771**, Hermann & Cie, Paris

National Research Council (NRC), 1980: National Research Council. Recommended dietary allowances. The national academy of sciences, USA, 9th edition, 125-133.

National Research Council (NRC), 2006: *Nutrient requirements of dogs and cats*, The National Academies Press, Washington, DC, USA.

Nott, H. M. R., Rigby, S. I., Johnson, J. V., Bailey, S. J., & Burger, I. H. 1994: Design of digestibility trials for dogs and cats. *The Journal of Nutrition*, 124(12), 2582S.

Potgieter, M., 1940: The utilization of the calcium and phosphorus of taro by young women. *Journal of American dietetic association* **16**, 698-904.

Saville, P.D., Krook, L., 1969: Gravimetric and isotopic studies in nutritional hyperparathyroidism in beagles. *Clinical orthopaedics and related research* **62**, 15-24

Wilkens, M. R., Richter, J., Fraser, D. R., Liesegang, A., Breves, G., Schröder, B., 2012: In contrast to sheep, goats adapt to dietary calcium restriction by increasing intestinal absorption of calcium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **163**, 396-406.

Table 1: Composition and analysis of diets

Balanced diet for pre-/post-trial period ¹⁾			Low calcium diet ¹⁾		
Ingredients	Chemical analysis	g/kg	Ingredients	Chemical analysis	g/kg
Maize, wheat, chicken, turkey meal, animal fats, protein, hydrolysate, soy bean meal, maize gluten meal, pea bran meal, flaxseed vegetable oil, minerals, L-carnitin, Rice, Taurin, L-tryptophan, vitamins and trace elements, cartilage hydrolysate, shellfish hydrolysate, beta-carotene	Dry matter	922	Wheat gluten, pork fat, chicken fat, wheat, corn gluten, Corn, dehusked oats, beet pulp, fish oil, vitamin/mineral premix, soya oil, lysine, monopotassium phosphate, salt, sodium zeolite, trace vitamins and minerals, methionine, potassium chloride, choline, potassium sorbate, calcium carbonate, magnesium oxide, vitamin C	Dry matter	918
		g/kg DM			g/kg DM
	Crude protein	197		Crude protein	221
	Crude fat	159		Crude fat	307
	Crude fibre	37		Crude fibre	17
	Crude ash	48		Crude ash	45
	Ca	6.3		Ca	2
	P	6.2		P	5
	Na	2.5		Na	3.2
	K	7.6		K	6.9
	Mg	1.1		Mg	1
				phytate	0.08
		IU			IU
	Analysed vitamin D content	803		Analysed vitamin D content ²⁾	746

1) ME calculated according to NRC (2006) 17.3 MJ/kg DM in pre-trial diet and 20.9 MJ/kg DM in low calcium diet

2) Adequate intake, according to NRC (2006)

Table 2: Daily intake of ME, protein, fat, and vitamin D per kg BW^{0.75}

Trial week	n	ME	Protein	Fat	Vitamin D
		MJ	g	g	IU
Pre-trial	12	0.5±0.1	5.7±1.1	4.6±0.9	24.4±4.9
Week 7	12	0.5±0.1	4.4±0.3	9.9±2.1	14.5±0.9
Week 14	12	0.6±0.1	4.5±0.2	11.7±2.8	14.9±0.5
Week 21	12	0.6±0.1	4.4±0.1	12.6±3.2	15.6±0.3
Week 28	11	0.5±0.1	4.2±0.1	10.3±2.8	14.3±0.3
Post-trial 7	11	0.4±0.1	4.8±1.2	3.8±0.9	20.3±4.9
Post-trial 14	11	0.4±0.1	4.8±1.2	3.8±0.9	20.3±4.9

Table 3: Intake, faecal excretion and apparent digestibility of calcium and phosphorus

Trial week	n	Intake (mg/kg BW ^{0.75})		Faecal excretion (mg/kg BW ^{0.75})		Apparent digestibility (%)	
		Ca	P	Ca	P	Ca	P
Week 7	12	60±3 ^{ab}	100±4 ^{ab}	131±48 ^a	84±27 ^a	-117±74 ^a	17±26 ^a
Week 14	12	61±3 ^a	101±4 ^a	103±25 ^a	60±14 ^b	-69±36 ^a	41±13 ^b
Week 21	12	59±2 ^b	99±3 ^b	116±31 ^a	61±12 ^b	-95±51 ^a	39±12 ^b
Week 28	11	57±1 ^c	96±2 ^c	108±33 ^a	54±11 ^b	-88±60 ^a	44±12 ^b

Means not sharing a superscript letter are significantly different, $p < 0.0$

Table 4: Serum total calcium, ionized calcium and total phosphorus

Trial week	N	Total Ca	Ionized Ca	Total P
		mmol/l		
Pre-trial week 18	12	2.38±0.10 ^a	1.43±0.03 ^a	1.33±0.17 ^a
Week 7	12	2.60±0.04 ^b	1.40±0.03 ^b	1.46±0.19 ^a
Week 14	12	2.53±0.08 ^{cd}	1.40±0.03 ^b	1.28±0.23 ^a
Week 21	12	2.53±0.06 ^{cd}	1.41±0.02 ^{ab}	1.33±0.20 ^a
Week 28	11	2.50±0.09 ^c	1.42±0.05 ^{ab}	1.34±0.24 ^a
Post-trial week 7	11	2.51±0.08 ^{cd}	1.41±0.05 ^{ab}	1.28±0.20 ^a
Post-trial week 14	11	2.59±0.08 ^{bd}	1.40±0.03 ^{ab}	1.51±0.37 ^a

Means in one column not sharing a superscript letter are significantly different, $p < 0.05$

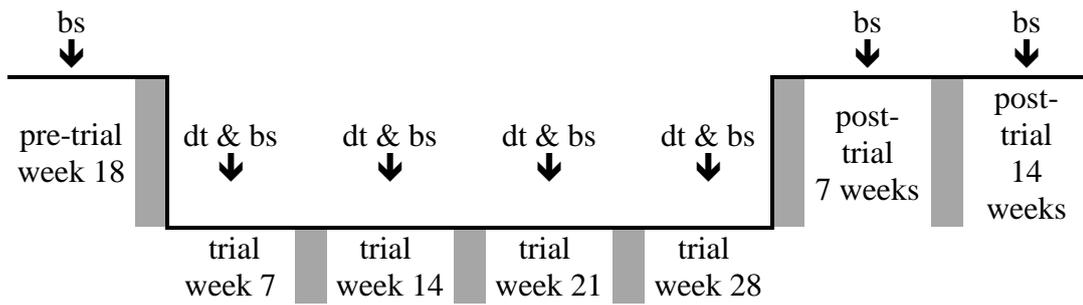


Figure 1: Experimental design

The arrow indicates the time point of a digestion trial (dt) and blood sampling (bs)

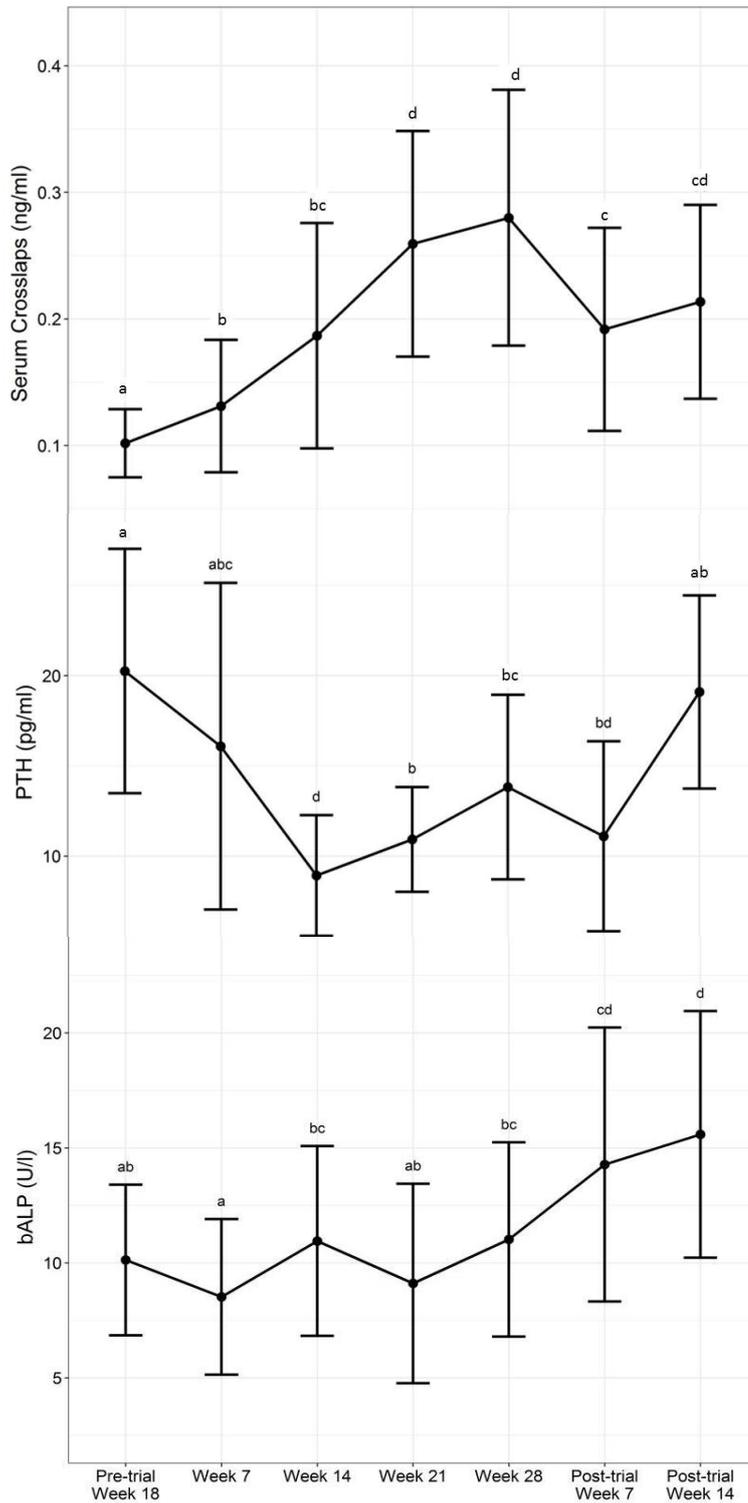


Figure 2: Mean serum crosslaps concentration (ng/ml), mean serum parathormone concentration (PTH) (pg/ml), and mean bone alkaline phosphatase (bALP) concentration (U/l) in pre- trial period, during low calcium intake and post-trial period with standard deviation; means not sharing a superscript letter are significantly different

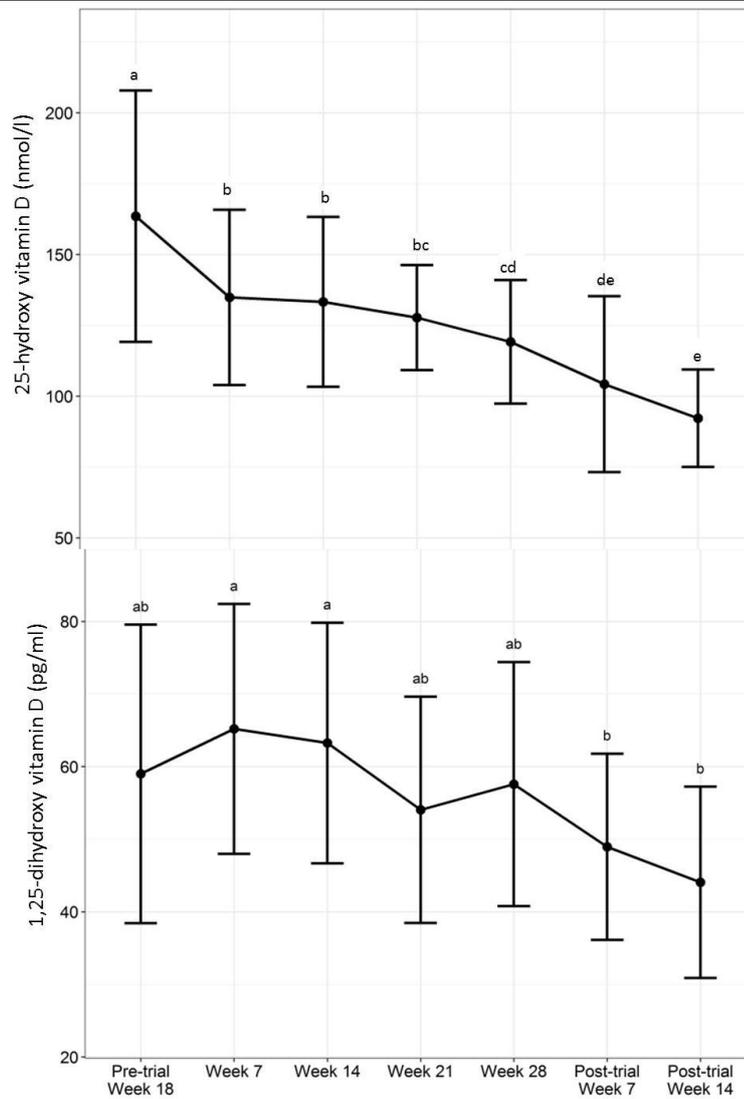


Figure 3: Mean 25-hydroxy vitamin D concentration (nmol/l) and mean 1,25-dihydroxy vitamin D concentration (pg/ml) in pre-trial period, during low calcium intake and post-trial period with standard deviation; means not sharing a superscript letter are significantly different

DISKUSSION

1. Kritik der Methodik

1.1 Versuchsplan

MACK et al. (2015) zeigten in ihrer Metaanalyse zur Calciumverdaulichkeit bei adulten Hunden, dass diese ihre faecale Calciumausscheidung nicht adäquat an unterschiedliche Calciumversorgungen anpassen können. Bei allen angeführten Studien handelte es sich um Versuche mit einer Dauer von weniger als 4 Wochen. Folglich bestand die Hypothese, dass eine mögliche Adaptation an eine niedrige Calciumversorgung längere Zeit benötigt.

In der vorliegenden Studie wurde als Versuchsdauer 28 Wochen gewählt, was in etwa 3 – 5 % der durchschnittlichen Lebenserwartung eines Hundes entspricht. Es ist unwahrscheinlich, dass eine längere Versuchsdauer eine Verbesserung der Adaptation mit sich bringen würde. Menschen zeigen spätestens nach 9 Monaten knapper Calciumversorgung ein Equilibrium zwischen Calciumaufnahme und –ausscheidung (MALM, 1958). Diese Zeitspanne entspricht etwa 1 % der durchschnittlichen Lebenserwartung eines Menschen. Die Zeitdauer von 28 Wochen war auch im Sinne des Tierschutzes gewählt worden. Aus klinischen Fallberichten ist bekannt, dass sich Calciummangelerscheinungen erst nach frühestens einem Jahr klinisch manifestieren (DIQUELOU et al., 2005; BECKER et al., 2012). In der vorliegenden Studie sollte jedoch kein klinisch erkennbarer Calciummangel provoziert werden, daher wurde die Versuchsdauer kürzer gewählt. Es besteht zwar die Möglichkeit, dass die faecale Calciumausscheidung an eine niedrige Calciumaufnahme kurz vor Manifestation klinischer Mangelsymptome adaptiert werden kann, jedoch ist davon auszugehen, dass diese späte Adaptation keine klinische Relevanz mehr hätte, da die Entkalkung der Knochen bereits weit fortgeschritten sein dürfte.

Ziel der Studie war, generell zu erkunden, ob Hunde über Möglichkeiten verfügen, ihre faecale Calciumexkretion an eine niedrige Calciumversorgung anzupassen. Hierfür ist eine quantitative Kotsammlung über die in vergangenen Studien bewährten fünf Tage (NOTT et al., 1997) und die Bestimmung der scheinbaren Verdaulichkeit ausreichend. Eine Verwendung von fistulierten Tieren

zur Bestimmung der exakten Abschnitte der Calciumabsorption ist nicht notwendig, um die grundsätzliche Machbarkeit einer Anpassung der Calciumausscheidung zu beweisen bzw. zu widerlegen. Da Hunde Calcium hauptsächlich über die Fäzes ausscheiden (FROMM & GÄBEL, 2013), war auch eine Haltung in Bilanzkäfigen, welche erforderlich gewesen wäre, um Urin zu sammeln, nicht notwendig für das Erreichen des Versuchsziels.

1.2 Auswahl der Tiere

Für den Versuch standen 6 intakte Beaglehündinnen und 6 intakte Foxhound-Boxer-Ingelheimlabrador (FBI) Hündinnen zur Verfügung. Eine FBI Hündin wurde aus der Studie genommen aus Gründen, die nicht mit der Studie in Zusammenhang stehen. Die Beaglehündinnen wurden als Vertreter für kleine Hunderassen gewählt, die FBI Hündinnen als Vertreter für große Hunderassen. In Aufzuchtversuchen an Beagles und FBIs zu unterschiedlichen Nährstoffversorgungen hat sich gezeigt, dass diese beiden Rassen während des Wachstums unterschiedlich auf inadäquate Calciumversorgung reagieren (DOBENECKER, 2002). Sollte es einen deutlichen Rasseunterschied in der Anpassungsfähigkeit der Calciumverdaulichkeit bei adulten Hunden geben, wäre zu erwarten, dass er bei den verwendeten Rassen sichtbar wäre. Für einen ausführlichen Rassevergleich war die Tierzahl mit insgesamt 11 Tieren eventuell zu gering, aber dieser war nicht primäres Ziel der Studie. Es sollte lediglich ein eklatanter Rasseunterschied ausgeschlossen werden.

Eine geschlechtsspezifische Beeinflussung der Calciumverdaulichkeit beim Hund ist nicht bekannt. Der Knochenstoffwechsel hingegen und damit auch die Calciumhomöostase wird bei mehreren Spezies durch Geschlechtshormone beeinflusst (TURNER et al., 1994, GIRO et al., 2008, WRONSKI et al., 1988; SCHOT & SCHUURS, 1990). Um den Einflussfaktor der fehlenden Hormone bei kastrierten Tieren auszuschließen wurden intakte Tiere verwendet. Da sich die Gruppenhaltung von intakten Rüden wesentlich schwieriger gestaltet und häufig mit Blessuren der Tiere einhergeht, war schon aus Tierschutzgründen die ausschließliche Verwendung von Hündinnen zu bevorzugen. Ein Unterschied im Knochenstoffwechsel zwischen intakten männlichen und weiblichen Tieren ist nicht bekannt.

1.3 Futter

Beim Versuchsfutter handelte es sich um ein Trockenfutter, hergestellt aus Geflügelfett, Schweinefett, Fischöl, Sojaöl, Weizen, Mais, Hafer, Reisbruch und Mineralstoffen. Als Calciumquelle diente Calciumcarbonat. Der Minimalbedarf von $60 \text{ mg Ca} / \text{kg BW}^{0,75}$ (NRC, 2006) geht von verfügbarem Calcium aus. Calciumcarbonat gilt als verfügbare Calciumquelle bei Hunden (DOBENECKER, 2002).

1.3.1 Fettgehalt des Futters

Der Rohfettgehalt des Futters lag bei 30,7 % der Trockensubstanz. Zusätzlich wurde den Hunden, die größere Energiemengen benötigten um ihren individuellen Energiebedarf zu decken, Schweineschmalz gefüttert. Schlechtere Calciumverdaulichkeiten bei hohem Fettgehalt in der Ration kommen bei Ratten (FROMMELT et al., 2014), nicht jedoch beim Hund vor (HALLEBEEK & HAZEWINKEL, 1997). An der Calciumexkretion konnten keine Veränderungen abhängig vom Fettgehalt der Gesamtration einzelner Tiere festgestellt werden (Abb. 5).

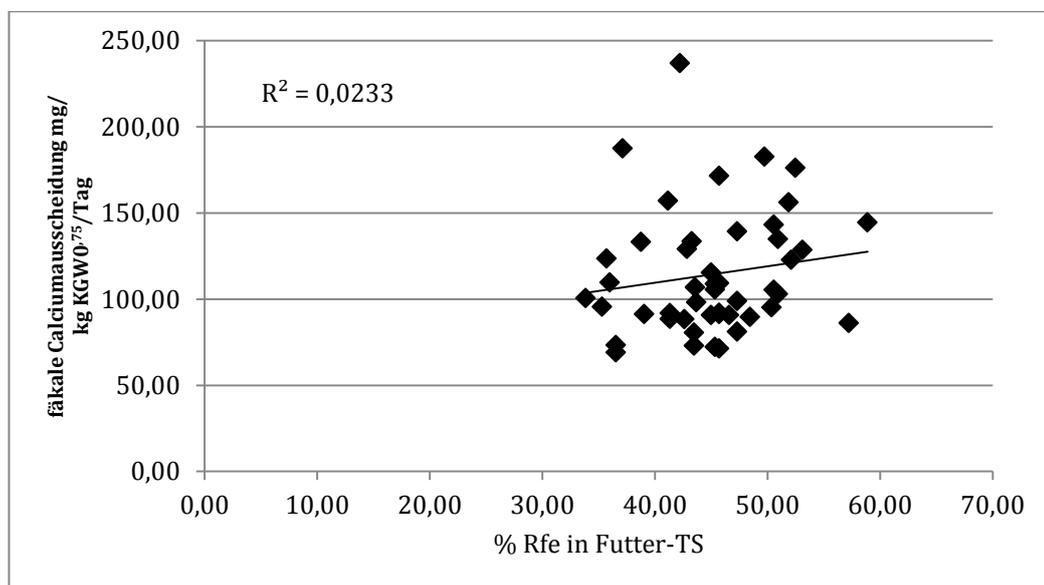


Abb 5: Fettgehalt in der Trockensubstanz des Futters (%) und faecale Calciumausscheidung ($\text{mg} / \text{kg KGW}^{0,75} / \text{Tag}$)

1.3.2 Vitamin D Gehalt im Futter

Bei dem für das Futter verwendeten Vitamin D handelte es sich um Vitamin D3. Für die Dosierung der zugesetzten Menge wurden die FEDIAF Richtlinien (2012) hinzugezogen, welche im Gegensatz zu den NRC (2006) keine Sicherheitsspanne

von 20 % aufschlagen. Allerdings wurde für die NRC und die FEDIAF Richtlinien der Vitamin D Bedarf von Welpen zu adulten Hunden extrapoliert. Es ist daher davon auszugehen, dass der Bedarf adulter Hunde eher überschätzt wird. Des Weiteren blieben in der vorliegenden Studie die 25-hydroxy Vitamin D Werte im Blut stets innerhalb des Referenzbereichs (Fig. 3 Publikation). Hinzu kommt, dass in der Repletionsphase, in der höhere Mengen Vitamin D gefüttert wurden, die 25-hydroxy Vitamin D Konzentration im Blut nicht wieder anstieg. 25-hydroxy Vitamin D ist als verlässlicher Marker für die adäquat aufgenommene Vitamin D Menge anzusehen, da jegliches aufgenommenes Vitamin D in der Leber zu 25-hydroxy Vitamin D hydroxyliert wird (DE BRITO GALVAO, 2013). Die Konzentration des wirksamsten Metaboliten 1,25-dihydroxy Vitamin D verhielt sich ebenso und sank über den Versuchszeitraum, auch in der Repletionsphase bei höherer Vitamin D Versorgung ab (Fig. 3 Publikation). Die Ursache dieser Beobachtung konnte nicht geklärt werden, möglicherweise handelt es sich um einen saisonalen Effekt.

Der Osteoklastenmarker Serum Crosslaps zeigte deutlich, dass es zu einer Freisetzung von Calcium aus dem Knochen kam, da er über den gesamten Versuchszeitraum kontinuierlich anstieg und in der Repletionsphase wieder abfiel (Fig. 2 Publikation). Dieser Effekt hätte kaum bei einer Unterversorgung mit Vitamin D auftreten können. Ebenfalls wäre es sehr ungewöhnlich gewesen, dass der Serum-Calciumspiegel während des gesamten Versuchszeitraums innerhalb des Referenzbereichs geblieben wäre. In vergangenen Studien hat sich gezeigt, dass es bei einer niedrigen Calciumaufnahme, kombiniert mit einer niedrigen Vitamin D Aufnahme zu einem starken PTH Anstieg kam (CLOUTIER et al., 1992), welcher in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden konnte (Fig. 2 Publikation). In einem klinischen Fall mit kombinierter Calcium und Vitamin D Unterversorgung trat eine hohe PTH, niedrige 25-hydroxy Vitamin D und normale 1,25-dihydroxy Konzentration im Blut auf (DE-FORNEL THIBAU, 2007). Genannte Studie (CLOUTIER et al., 1992) und Fallbericht (DE-FORNEL THIBAU et al., 2007) zeigen folglich andere Ergebnisse, als die eigene Studie. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass bei den Hunden in der eigenen Studie keine Vitamin D Unterversorgung vorlag, die die fehlende Reaktion des PTHs auf die niedrige Calciumaufnahme erklären würde.

1.4 Blutabnahmen

Die Blutabnahmen fanden zeitgleich mit den Verdauungsversuchen statt. Durch die Blutentnahmen wurde der Gehalt an Calcium, ionisiertem Calcium, Phosphor, 25-hydroxy Vitamin D, 1,25-dihydroxy Vitamin D, PTH, Serum Crosslaps als Marker für die Osteoklastenaktivität und bALP als Marker für die Osteoblastenaktivität im Serum bestimmt. Diese Blutwerte stellen die wichtigsten Marker des Knochenstoffwechsels dar. Beim Hund werden neben intaktem PTH auch PTH-Fragmente von der Nebenschilddrüse ins Blut freigesetzt. Beide Arten von PTH sind wirksam, ihr Verhältnis unterscheidet sich allerdings bei Hyper- und Hypocalcämie (ESTEPA et al., 2003). Der in der vorliegenden Studie verwendete Test zur Bestimmung des PTHs erfasste sowohl intaktes PTH als auch dessen Fragmente. Ein Verhältnis wurde nicht bestimmt. In der vorliegenden Studie konnte weder eine Hypo-, noch eine Hypercalcämie aufgezeigt werden. Es bleibt allerdings fraglich, ob das Verhältnis der Fragmente zusätzliche Information gebracht hätte.

PTH wirkt schnell bei einem Abfall des Blutcalciumspiegels. Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit lässt es sich allerdings nicht lange im Blut nachweisen. Demzufolge kann es sein, dass durch eine einmalige Messung alle sechs Wochen, ein tatsächlicher Anstieg oder Abfall des PTHs gar nicht erfasst werden konnte. Mehrere Messungen während der 28 Wochen der niedrigen Calciumversorgung wären daher sinnvoll gewesen, waren jedoch aus Tierschutzgründen nicht möglich. Hinzu kommt, dass sich in einer Studie über den Phosphatstoffwechsel bei Hunden inzwischen zeigte, dass ein fütterungsbedingter Anstieg des PTHs nur postprandial nachgewiesen werden konnte (DOBENECKER & SIEDLER, 2016). Möglicherweise hätte ein Anstieg des PTHs bei einer postprandialen Bestimmung des PTHs dargestellt werden können.

Diurnale Unterschiede sind zumindest bei den Knochenaufbau und -abbaumarkern nachgewiesen (ALLEN, 2003). Um diesen Effekt so gering wie möglich zu halten, wurden alle Blutentnahmen zwischen 8 Uhr und 10 Uhr durchgeführt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass nicht nur häufigere Blutuntersuchungen während der Versuchsphase, sondern auch mehrere Blutuntersuchungen innerhalb eines Versuchsdurchgangs aussagekräftigere Ergebnisse geliefert hätten. Insbesondere prä- und postprandiale Schwankungen hätten genauere Ergebnisse liefern können. Hierzu wäre es jedoch notwendig

gewesen, den Tieren mehrfach an einem Tag Blut abzunehmen, was aus Tierschutzgründen abzulehnen war, da es für die grundlegende Beweisführung des zu untersuchenden Prinzips der Calciumverdaulichkeit nicht essentiell notwendig gewesen ist.

2. Diskussion der Ergebnisse

2.1. Scheinbare Calciumverdaulichkeit und faecale Calciumausscheidung

Nachdem die Ergebnisse zur Calciumverdaulichkeit bei adulten Hunden und Katzen in der Metaanalyse von MACK et al. (2015) gezeigt haben, dass Hunde im Erhaltungsstoffwechsel zumindest über einen kurzen Zeitraum von bis zu vier Wochen keine erhebliche Adaptation der Calciumverdaulichkeit auf verschiedene Calciumversorgungen zeigten, wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob eine Adaptation bei einer längeren Depletionsphase stattfindet.

In der vorliegenden Studie wurden Hunde über einen Zeitraum von 28 Wochen mit einem Futter gefüttert, das einen Calciumgehalt von 60 mg / kg KGW^{0,75} enthält, welches dem Minimalbedarf¹ an Calcium der NRC (2006) entspricht. Im gesamten Zeitraum war die faecale Ausscheidung des Calciums beinahe doppelt so hoch wie die Calciumaufnahme. Daraus resultierte über den gesamten Zeitraum der Studie eine negative scheinbare Verdaulichkeit (Table 3 Publikation). Die Hypothese, Hunde könnten nach einem längeren Zeitraum die faecale Calciumausscheidung an die niedrige Calciumaufnahme anpassen, konnte daher widerlegt werden. Die Beziehung von aufgenommenem zu faecal ausgeschiedenem Calcium ist dieselbe wie bei kürzeren Versuchen (Abb. 6).

¹ Der Minimalbedarf ist definiert als die kleinste notwendige Zufuhr an bioverfügbarem Nährstoff, um einen bestimmten physiologischen Lebensumstand zu erhalten. Die Zufuhr des Minimalbedarfs reicht nur dann zur Erhaltung des Nährstoffequilibriums, wenn die scheinbare Verdaulichkeit maximal ist.

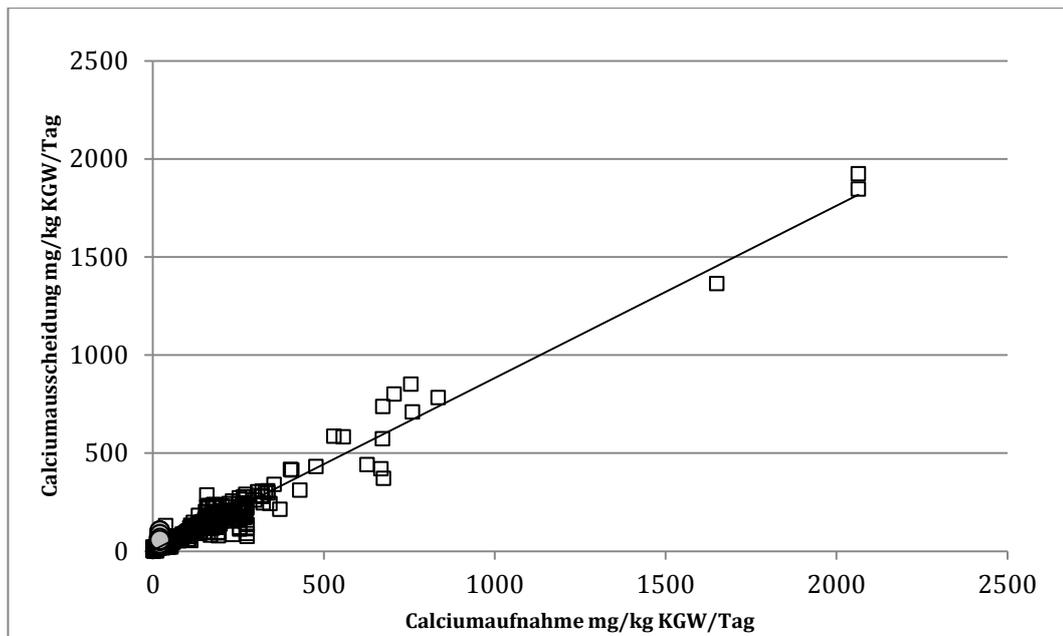


Abb 6: Die Beziehung zwischen der Calciumaufnahme und der faecalen Calciumausscheidung beim adulten Hund (□ Daten nach MACK et al., 2015; ● eigene Daten)

2.2. Erhalt der Calciumhomöostase über den Knochenumbau

Da die scheinbare Calciumverdaulichkeit während der gesamten Studie negativ war, ist davon auszugehen, dass die Hunde nicht genügend Calcium aus dem Darm absorbieren konnten, um ihre Calciumhomöostase aufrecht zu erhalten.

Da Calcium viele Funktionen im Körper übernimmt, als Signalantwort in der Zellkommunikation, als Faktor in der Blutgerinnung, als wichtige Komponente in der Erregbarkeit von Muskelzellen, insbesondere dem Herzen, ist eine Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase unabdingbar.

Im Gegensatz zu der faecalen Calciumausscheidung wurde der Knochenmetabolismus stark von der niedrigen Calciumaufnahme beeinflusst. In der Zeit der niedrigen Calciumversorgung stieg der Knochenabbau marker Serum Crosslaps signifikant an (Fig. 2 Publikation). Dies ist ein Zeichen für eine erhöhte Osteoklastenaktivität, die wiederum als Hinweis gewertet werden kann, dass die Calciumhomöostase während der Phase der niedrigen Calciumversorgung vorrangig über Bereitstellung von Calcium aus den Knochen aufrechterhalten wurde.

In der Repletionsphase zeigte sich ein Anstieg des Knochenaufbaumarkers

knochenspezifische alkalische Phosphatase (*bone alcalic phosphatase*, bALP) über den Referenzbereich, während die Serum Crosslaps in ihrer Konzentration wieder sanken (Fig. 2 Publikation).

Beide Beobachtungen sprechen dafür, dass die Hunde zum Erhalt des Serumcalciumspiegels Calcium aus dem Knochen lösten und diese Speicher im Moment der adäquaten Calciumversorgung wieder auffüllten. Etwas Ähnliches fanden auch SAVILLE & KROOK (1969) bei Beagles heraus, die nur minimal mit Calcium versorgt worden waren. Hier zeigte sich in der postmortalen Knochenuntersuchung eine verringerte Calciummenge im Vergleich zu den adäquat mit Calcium gefütterten Kontrolltieren. Auch andere Autoren konnten einen auffallend hohen Knochen turnover beim Hund bei höherem Calciumbedarf beobachten (MILLER et al., 1989).

Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei anderen Tierarten gemacht werden. WILKENS et al. (2012) zeigten, dass Schafe bei niedriger Calciumversorgung ebenfalls einen erhöhten Knochen turnover haben, um ihre Calciumhomöostase aufrecht zu erhalten, während Ziegen unter denselben Bedingungen keine Steigerung der Knochenresorption für eine Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase zeigten.

Die Freisetzung von Parathormon (PTH) aus der Nebenschilddrüse steigt an, wenn der Blutspiegel von ionisiertem Calcium abfällt (SAVILLE und KROOK, 1969). PTH wirkt am Knochen, indem es die Freisetzung von Calcium steigert. Demzufolge wäre bei einer niedrigen Calciumversorgung und dem beobachteten erhöhten Knochen turnover eine Steigerung der Konzentration des PTHs zu erwarten gewesen. Entgegen dieser Erwartung zeigte sich in der Phase der niedrigen Calciumversorgung ein Abfall des PTHs (Fig. 2 Publikation). Diese Beobachtung lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass das PTH zum Zeitpunkt der präprandialen Blutentnahmen nicht mehr hoch war. SIEDLER (2018) zeigte, dass bei hoher Phosphorversorgung postprandial ein Anstieg des PTHs vorlag. Vor der nächsten Messung ging auch die präprandial gemessene PTH Konzentration im Serum bei hoher Phosphorversorgung im Vergleich zur Kontrolle zurück. Wäre in dieser Studie nur die präprandiale PTH Konzentration im Serum gemessen worden, so wäre ebenfalls der Eindruck eines Rücklaufs der PTH Konzentration bei hoher Phosphorversorgung entstanden.

2.4 Evolutionsbiologische Hypothese zu den Ergebnissen

Die Ergebnisse können dahingehend interpretiert werden, dass Hunde auch über einen längeren Zeitraum eine marginale Calciumversorgung nicht über eine Verringerung der faecalen Calciumausscheidung ausgleichen können. Um die Calciumhomöostase aufrecht zu erhalten, verwenden sie Calcium aus den Knochen durch einen gesteigerten Knochenumbau.

Auch bei anderen Tierarten lässt sich ähnliches beobachten. WILKENS et al. (2012) verglichen die Calciumverdaulichkeit von Schafen und Ziegen. Im Gegensatz zu Schafen können sich Ziegen an eine niedrigere Calciumversorgung durch Verringerung der faecalen Calciumausscheidung anpassen. Schafe als Grasfresser haben in ihrer natürlichen Ernährung nie einen Mangel an Calcium, während Ziegen als Intermediärtyp eher mit einer Mangelsituation konfrontiert werden können.

Sogar innerhalb einer Spezies kann eine unterschiedlich effektive Adaptation an verschiedene Calciumgehalte in der Nahrung gefunden werden. Menschen, die in tropischen oder subtropischen Gebieten leben, ernähren sich hauptsächlich von sehr calciumarmen Lebensmitteln wie z.B. Reis. Diese Menschen können sich wesentlich besser an niedrige Calciumgehalte in der Nahrung anpassen als jene, deren Ernährung auch calciumreiche Lebensmittel wie z.B. Milch enthält (POTGIETER, 1940; KNUDSON, 1955; WALKER, 1951).

Betrachtet man den Hund als Beutetierfresser in seiner evolutionären Entwicklung, ist die Hypothese einer Anpassung der Calciumhomöostase über den Knochen turnover überaus plausibel. Wenn der Hund ausreichend Beute fand, stand ihm auch mehr als genug Calcium in Form von Knochen zur Verfügung. In diesem Fall bedurfte es keiner aktiven energieverbrauchenden Transportmechanismen, um eine ausreichende Calciumabsorption aus dem Darm zu gewährleisten. Fand der Hund keine Beute, stand ihm auch kein Calcium zur Verfügung. In diesem Fall war die einzige Möglichkeit die Calciumhomöostase aufrecht zu erhalten, in der Erhöhung des Knochen turnover. Während der Domestikation änderte sich die Situation für den Hund nicht. Als Begleiter und Jagdgefährte des Menschen wurde er größtenteils mit Essensresten ernährt, wozu auch immer ein großer Teil Knochen gezählt haben dürfte.

Andere Fleischfresser, wie Katzen oder Nerze, zeigen ebenfalls eine lineare

Beziehung zwischen aufgenommenem und ausgeschiedenem Calcium (MACK et al., 2015; BÖSWALD et al., 2017).

Energieverbrauchende Prozesse, wozu auch der aktive Calciumtransport aus dem Darm zählt, können sich in der Evolution nur durchsetzen, wenn ein Mangel an einem Nährstoff in der natürlichen Ernährung zu erwarten ist.

ZUSAMMENFASSUNG

MACK et al. (2015) konnten in einer Metaanalyse zur Calciumverdaulichkeit bei adulten Hunden zeigen, dass der Hund im Erhaltungsstoffwechsel seine faecale Calciumausscheidung nicht an unterschiedliche Calciumversorgungen anpassen kann. Bei allen erfassten Studien handelte es sich um Kurzzeitstudien von maximal vier Wochen Versuchsdauer.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob die scheinbare Calciumverdaulichkeit bei Fütterung niedriger Calciummengen längerfristig negativ ist. Hierfür wurde der Minimalbedarf an Calcium (NRC, 2006) ausgewählt, da dieser nur dann eine ausgeglichene Calciumbilanz gewährleistet, wenn die Calciumabsorption nahezu vollständig ist. Nur dann kann die scheinbare Calciumverdaulichkeit positiv sein (Calciumaufnahme – faecale Calciumausscheidung > 0).

Für die Studie standen 12 intakte weibliche Hunde zweier verschiedener Rassen (6 Beagle und 6 Foxhound Boxer Labrador Mischlinge) im Erhaltungsstoffwechsel zur Verfügung. Einer der Hunde konnte nicht bis zum Ende an der Studie teilnehmen, aus Gründen, die nicht mit der Studie im Zusammenhang stehen.

Die Studie gliederte sich in drei Phasen: in der Vorversuchsphase (18 Wochen) erhielten die Hunde ein Futter, dessen Calciumgehalt die empfohlene tägliche Aufnahme von 130 mg / kg KGW^{0,75}. (NRC, 2006) etwas überstieg (200 mg / kg KGW^{0,75}). Im Anschluss fand die Hauptversuchsphase (28 Wochen) statt, in der die Hunde mit Calcium am Minimalbedarf (60 mg / kg KGW^{0,75}, NRC 2006) gefüttert wurden. Bei der dritten Phase handelte es sich um eine Repletionsphase

(14 Wochen), in der die Hunde dasselbe Futter wie in der Vorversuchsphase erhalten haben.

In den 28 Wochen Versuchsphase wurde alle sieben Wochen eine 5-tägige Bilanz mit quantitativer Kotsammlung durchgeführt. Zu denselben Zeitpunkten wurde Blut genommen und der Gehalt von Calcium, ionisiertem Calcium, Phosphor, Parathormon (PTH), 25-hydroxy Vitamin D, 1,25-dihydroxy Vitamin D, knochenspezifische alkalische Phosphatase (*bone alkaline phosphatase*, bALP)

und Serum Crosslaps bestimmt. Blutuntersuchungen wurden ebenfalls am Ende der Vorversuchsphase, nach 7 Wochen und am Ende der Repletionsphase durchgeführt.

Ergebnisse:

Die scheinbare Calciumverdaulichkeit war während des gesamten Versuchszeitraums negativ. Des Weiteren konnte keine Verringerung der faecalen Calciumausscheidung beobachtet werden. In allen drei Versuchsphasen lagen die Serumwerte für Calcium, ionisiertes Calcium und Phosphor innerhalb des Referenzbereichs. Der Knochenabbaumarker Serum Crosslaps stieg vom Ende der Vorversuchsphase über den gesamten Zeitraum des Hauptversuchs an, um bis zum Ende der Repletionsphase wieder abzufallen. Dies spricht für eine verstärkte Osteoklastenaktivität und damit vermehrte Calciumfreisetzung aus dem Knochen. Bei dem Knochenaufbaumarker bALP verhielt es sich genau anders herum. Während der niedrigen Calciumversorgung in Hauptversuchsphase lag der Wert stets im Referenzbereich und stieg in der Repletionsphase stark an, sogar über den Referenzwert.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass Hunde ihre intestinale Calcium Absorption nur ungenügend an eine niedrige Calciumversorgung anpassen können. Des Weiteren scheinen Hunde ihre Calciumhomöostase vorrangig über einen gesteigerten Knochen turnover zu regulieren.

SUMMARY

Mack et al. (2015) demonstrated in a meta-analysis about calcium digestibility in adult dogs that dogs at maintenance do not adapt their faecal calcium excretion efficiently to different amounts of calcium in their diet. All included studies were short term studies with a maximum of four weeks duration.

The aim of the present study was to investigate, if a negative apparent calcium digestibility also occurs when low calcium is fed long-term. For this purpose the minimum calcium requirement (NRC, 2006) was chosen as this only ensures a positive calcium balance when calcium absorption is nearly complete. Only in this case the apparent calcium digestibility can be positive (calcium intake – faecal calcium excretion > 0).

12 intact female dogs of two different breeds (6 Beagles and 6 Foxhound Boxer Labrador crossbreds) were included in the study. One dog was removed from the study due to reasons unrelated to the study.

The study was composed of three phases: during a pre-trial (18 weeks) the dogs received a food with calcium amounts slightly exceeding the daily recommended requirements of 130 mg / kg BW^{0.75} (NRC, 2006) (200 mg / kg BW^{0.75}). The pre-trial was followed by the main-trial (28 weeks) when the dogs were fed calcium at the minimal requirements (60 mg / kg BW^{0.75}, NRC, 2006). The third phase (post-trial, 14 weeks) was a repletion phase. The dogs received the same food as during the pre-trial.

During the 28 weeks of the main-trial every seventh week a five day lasting balancing trial with quantitative faecal collection was conducted. At the same time blood samples were taken and were analysed for calcium, ionised calcium, phosphorus, parathyroid hormone (PTH), 25-hydroxy vitamin D, 1,25-dihydroxy vitamin D, bone alkaline phosphatase (bALP) and serum crosslaps. Additional blood samples were taken and analysed at the end of the pre-trial, at week 7 and 14 of the post-trial.

Results:

The apparent calcium digestibility was negative throughout the study. Furthermore, there was no decrease of the faecal calcium excretion. In all three

trial phases serum concentrations for calcium, ionised calcium and phosphorus remained within the reference range. The osteoclastic marker serum crosslaps increased from the end of the pre-trial until the end of the main-trial and decreased in the post-trial again, suggesting an increased osteoclastic activity to release calcium from the bones. Whereas the osteoblastic marker bALP was within the reference range during the main-trial and increased during the post-trial even above the reference range.

The results indicate that dogs do not adapt their intestinal calcium absorption efficiently to a low calcium intake. Instead, they seem to regulate their calcium homoeostasis paramount with an increased bone turnover.

LITERATURVERZEICHNIS

AL-ATAWI, M., AL-ALWAN, I., AL-MUTAIR, A., TAMIM, H., & AL-JURAYYAN, N. (2009): Epidemiology of nutritional rickets in children. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 20 (2), 260-265.

ALLEN, M. J. (2003): Biochemical Markers of Bone Metabolism in Animals: Uses and Limitations. *Veterinary Clinical Pathology*, 32 (3), 101-113.

BECKER, N., KIENZLE, E., DOBENECKER, B. (2012): Calcium deficiency: a problem in growing and adult dogs: two case reports. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere*, 40 (2), 135-139.

BRONNER F. (1997): Calcium. In: O'Dell B.L. & Sunde R. A. (Ed.) *Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements*. Marcel Dekker Inc., New York, 13-62

BRONNER, F., & PANSU, D. (1998): Nutritional Aspects of Calcium Absorption. *The Journal of Nutrition*, 129 (1), 9-12.

BRONNER, F. (2003): Mechanisms and functional aspects of intestinal calcium absorption. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 300 (1), 47-52.

BÖSWALD, L. F., DOBENECKER, B., CLAUSS, M., & KIENZLE, E. (2017): A comparative meta-analysis on the relationship of faecal calcium and phosphorus excretion in mammals. *Journal of animal physiology and animal nutrition*.

CHEEKE, P. R., & AMBERG, J. W. (1973): Comparative Calcium Excretion by Rats and Rabbits 1. *Journal of animal science*, 37 (2), 450-454.

CHEN, P. S., & NEUMAN, W. F. (1955): Renal excretion of calcium by the dog. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 180 (3), 623-631.

CHERYAN, M., (1980): Phytic acid interactions in food systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 13 (4), 297–335.

CLINE, J. (2012): Calcium and Vitamin D Metabolism, Deficiency, and Excess. *Topics in Companion Animal Medicine*, 27 (4), 159-164.

CLOUTIER, M., GASCON-BARRE, M., D'AMOUR, P. (1992): Chronic adaptation of dog parathyroid function to a low-calcium-high-sodium-vitamin D-deficient diet. *Journal of Bone and Mineral Research*, 7 (9), 1021-1028.

CLOUTIER, M., ROUSSEAU, L., GASCON-BARRE, M., & D'AMOUR, P. (1993): Immunological evidences for post-translational control of the parathyroid function by ionized calcium in dogs. *Bone and Mineral*, 22 (3), 197-207.

CLOUTIER, M., BROSSARD, J. H., GASCON-BARRE, M., & D'AMOUR, P. (1994): Lack of Involution of Hyperplastic Parathyroid Glands in Dogs: Adaptation via a Decrease in the Calcium stimulation Set Point and a Change in Secretion Profile. *Journal of Bone and Mineral Research*, 9 (5), 621-629.

CRAMER, C. F., & DUECK, J. (1962): In vivo transport of calcium from healed Thiry-Vella fistulas in dogs. *American Journal of Physiology--Legacy Content*, 202 (1), 161-164.

CRAMER, C. F. (1968): Effect of Ca/P ratio and pH on calcium and phosphorus absorption from dog gut loops in vivo. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 46 (2), 171-173.

DE BRITO GALVAO J.F., N. L. (2013): Calcitriol, calcidiol, parathyroid hormone, and fibroblast growth factor-23 interactions in chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 23 (2), 134-162.

DE FORNEL-THIBAUD, P., BLANCHARD, G., ESCOFFIER-CHATEAU, L., SEGOND, S., GUETTA, F., BEGON, D., DELISLE F. & ROSENBERG, D. (2007): Unusual case of osteopenia associated with nutritional calcium and vitamin D deficiency in an adult dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 43 (1), 52-60.

DGE (2013): Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, Calcium 1, Deutschland.

DIQUELOU, A., CHAPUT, C., BENOIT, E., PRIYMENKO, N., (2005): Hypocalcaemia due to nutritional calcium deficiency and hypoparathyroidism in an adult dog. *The veterinary record*, 156 (2), 45-48.

DOBENECKER, B. (2002): Influence of calcium and phosphorus intake on the

apparent digestibility of these minerals in growing dogs. *The Journal of nutrition*, 132 (6), 1665-1667.

DOBENECKER, B., SIEDLER, S. (2016): The source of phosphorus influences serum PTH, apparent digestibility and blood levels of calcium and phosphorus in dogs fed high phosphorus diets with balanced Ca/P ratio. *Proceedings of Waltham International Nutritional Sciences Symposium*, 21

ERBEN, R. G. (2013): Knochen und Calciumhomöostase. In: W. von Engelhardt, & G. Breves (Hrsg.), *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag, Stuttgart, 653-660

ESTEPA, J. C., LOPEZ, I., FELSENFELD, A. J., GAO, P., CANTOR, T., RODRIGUEZ, M., et al. (2003): Dynamics of secretion and metabolism of PTH during hypo- and hypercalcaemia in the dog as determined by the 'intact' and 'whole' PTH assays. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 18 (6), 1101-1107.

FROMM, M., & GÄBEL, G. (2013): Niere. In: W. von Engelhardt, & G. Breves (Hrsg.), *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag, Stuttgart, 292-320.

FROMMELT, L., BIELOHUBY, M., STOEHR, B. J., MENHOFER, D., BIDLINGMAIER, M., KIENZLE, E. (2014): Effects of low-carbohydrate, high-fat diets on apparent digestibility of minerals and trace elements in rats. *Nutrition*, 30 (7), 869-875.

GARN, S. M., SULLIVAN, T. V., DECKER, S. A., LARKIN, F. A., & HAWTHORNE, V. M. (1992): Continuing bone expansion and increasing bone loss over a two-decade period in men and women from a total community sample. *American Journal of Human Biology*, 4 (1), 57-67.

GfE (1989): Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, Energie- und Nährstoffbedarf (energy and nutrient requirements) Nr. 5 Hunde (dogs), Germany

GIRO, G., GONCALVES, D., SAKAKURA, C. E., PEREIRA, R. M. R., JUNIOR, E. M., & ORRICO, S. R. P. (2008): Influence of estrogen deficiency and its treatment with alendronate and estrogen on bone density around osseointegrated implants: radiographic study in female rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 105 (2), 162-167.

GUTIERREZ, O. M. (2010): Fibroblast growth factor 23 and disordered vitamin D metabolism in chronic kidney disease: updating the “trade-off” hypothesis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5 (9), 1710-1716.

HALLEBEEK, J. M., & HAZEWINKEL, H. A. W. (1997): Effect of isoenergetic substitution of dietary fat (beef tallow) for carbohydrates (wheat starch) on the calcium absorption in the dog. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 78 (1-5), 60-66.

HENRIKSON, P.-A., LUTWAK, L., KROOK, L., SKOGERBOE, R., KALLFELZ, F., BELANGER, L. F., MARIER, J. R., SHEFFY, B. E., ROMANUS B., HIRSCH C. (1970): Fluoride and Nutritional Osteoporosis: Physicochemical Data on Bones from an Experimental Study in Dogs. *Journal of Nutrition*, 100 (6), 631-642.

HOLMES, J. (1967): Some skeletal disorders in domestic animals. *Canadian veterinary journal*, 8 (5), 112-123.

HOW, K. L., HAZEWINKEL, H. A., & MOL, J. A. (1994): Dietary Vitamin D Dependence of Cat and Dog Due to Inadequate Cutaneous Synthesis of Vitamin D. *General and comparative endocrinology*, 96 (1), 12-18.

HUBER, K. (2013): Muskulatur. In: W. von Engelhardt, & G. Breves (Hrsg.), *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag, Stuttgart, 118-140.

KARRAR, Z. (1998): Vitamin D deficiency rickets in developing countries. *Annals of Tropical Paediatrics*, 18 (Sup 1), 89-92.

KASPERS, B., & GÖBEL, T. (2013): Blutstillung und Blutgerinnung. In: W. von Engelhardt, & G. Breves (Hrsg.), *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag, Stuttgart 212-219.

KIENZLE, E., BURGER A. (2011): Der Erhaltungsbedarf des Pferdes an Mengenelementen. *Übersichten zur Tierernährung* 39, 67-104.

KNUDSON, A. (1955): Letter to the editor. *Nutrition Reviews*, 13, 191–192.

KROOK, L., LUTWAK, L., HENRIKSON, P.-A., KALLFELZ, F., HIRSCH, C., ROMANUS, B., BELANGER L. F., MARIER J. R., SHEFFY B. E. (1970): Reversibility of Nutritional Osteoporosis: Physicochemical Data on Bones from an Experimental Study in Dogs. *Journal of Nutrition*, 101 (2), 233-246.

LASS, N. (1988): Verdauungs-und Perfusionsversuche beim Hund zur Bestimmung der Netto-Absorption von Calcium und Magnesium insbesondere im Dickdarm. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

Leitch, I. (1937): The determination of the calcium requirements of man. Nutrition abstracts and reviews, 6, 553-578.

LIU, S. K. (2002): Metabolic Disease in Animals. Seminars in Musculoskeletal Radiology, 6 (4), 341-346.

MACK, J., ALEXANDER, L. G., MORRIS, P. J., DOBENECKER, B., KIENZLE, E. (2015): Demonstration of uniformity of calcium absorption in adult dogs and cats. Journal of animal physiology and animal nutrition, 99 (5), 801-809.

MALM, O. J. (1958): Calcium requirement and adaptation in adult men. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation, 10 (Suppl.).

McCANCE, R. A., WIDDOWSON, E. M., & LEHMANN, H. (1942): The effect of protein intake on the absorption of calcium and magnesium. Biochemical journal, 36 (7-9), 686-691.

MILLER, M. A., OMURA, T. H., & MILLER, S. C. (1989): Increased cancellous bone remodeling during lactation in beagles. Bone, 10 (4), 279-285.

NOH, C.-K., LEE, M.-J., KIM, B., & CHANG, Y.-S. (2013): A case in osteomalacia in young adult male. Journal of bone metabolism, 20 (1), 51-55.

NOTT, H. M. R., RIGBY, S. I., JOHNSON, J. V., BAILEY, S. J., & BURGER, I. H. (1994): Design of digestibility trials for dogs and cats. The Journal of nutrition, 124 (12), 2582.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC) (2006): Nutrient requirements of dogs and cats, The National Academies Press, Washington, DC, USA.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC) (1980): National Research Council. Recommended dietary allowances. The national academy of sciences, 125-133.

POTGIETER, M. (1940): The utilization of the Calcium and Phosphorus of Taro by Young Women. Journal of the American Dietetic Association, 16 (9), 898-904.

ROBINSON, P., HÖGLER, W., CRAIG, M., VERGE, C. F., WALKER, J.L., PIPER, A.C., WOODHEAD, C.T., AMBLER, G.R. (2006): The reemerging burden of rickets: A decade of experience from Sydney. *Archives of Disease in Childhood*, 91 (7), 564-568.

ROCHE, C., BELLATON, C., PANSU, D., & BRONNER, F. (1984): Simultaneous induction of CaBP and active calcium transport in rat duodenum by 1,25 Dihydroxyvitamin D₃. In: F. Bronner, & M. Peterlik (Ed.) *Epithelial Calcium and Phosphate Transport*. Alan R. Liss, New York, 267-271.

ROSOL, T. J., CHEW, D. J., NAGODE, L. A., & CAPEN, C. C. (1995): Pathophysiology of Calcium Metabolism. *Veterinary Clinical Pathology*, 24 (2), 49-63.

ROSOL, T. J., & CAPEN, C. C. (1996): Pathophysiology of Calcium, Phosphorus, and Magnesium metabolism in animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 26 (5), 1155-1183.

SAVILLE, P. D., & KROOK, L. (1969): Gravimetric and isotopic studies in nutritional hyperparathyroidism in beagles. *Clinical orthopaedics and related research*, 15-24.

SCHLESINGER, D. P., & JOFFE, D. J. (2011): Raw food diets in companion animals: a critical review. *The Canadian Veterinary Journal*, 52 (1), 50-54.

SCHOT, L. P. C., & SCHUURS, A. H. W. M. (1990): Pathophysiology of bone loss in castrated animals. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 37 (3), 461-465.

SCHÜNEMANN, C., LASS, N., & MEYER, H. (1989): Intestinaler Stoffwechsel von Calcium, Magnesium und Phosphor beim Hund. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 61 (1-5), 193-205.

SHERMAN, H. C., & HAWLEY, E. (1922): Calcium and phosphorus metabolism in childhood. *Journal of Biological Chemistry*, 53 (2), 375-399.

SILBERNAGEL und DESPOPOULUS (2012): *Taschenatlas Physiologie*. 8.Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart

SIEDLER (2018): Der Einfluss verschiedener Phosphorquellen bei alimentärer Phosphorübersversorgung auf die Phosphorverdaulichkeit und auf ausgewählte

Blutparameter beim Hund. Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

STANIK, K. (2006): Tierartlich vergleichende Literatur und experimentelle Arbeiten zu Effekten unterschiedlicher Calcium-Aufnahmen auf die Calcium-Homöostase beim arbeitenden Pferd. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.

TURNER, R. T., RIGGS, B. L., & SPELSBERG, T. C. (1994): Skeletal effects of estrogen. *Endocrine reviews*, 15 (3), 275-300.

Walker, A. R. P. (1951): Calcification in the South African Bantu. *Journal of the American Medical Association*, 145 (1), 49-49.

WEISBERG, P., Scanlon, K., LI, R., & COGSWELL, M. (2004): Nutritional rickets among children in the United States: Review of cases reported between 1986 and 2003. *American journal of clinical nutrition* (80(Suppl)), 1697-1705.

WILKENS, M. R., RICHTER, J., FRASER, D. R., LIESEGANG, A., BREVES, G., SCHRÖDER, B. (2012): In contrast to sheep, goats adapt to dietary calcium restriction by increasing intestinal absorption of calcium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 163 (3-4), 396-406.

WRONSKI T.J., CINTRON M., DANN L.M. (1988): Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcified Tissue International*, 43 (3), 179-183.

DANKSAGUNG

Zunächst bedanke ich mich herzlichst bei Frau Prof. Dr. Ellen Kienzle für die intensive Betreuung und der hilfsbereiten Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Dr. Britta Dobenecker und Frau Dr. Julia Mack für die intensive Betreuung während der Versuchsphase und die tatkräftige Unterstützung bei der Auswertung der Daten.

Ein besonderer Dank gilt dem Team des OWFs, insbesondere Gabi Reder, für die Lagerung meiner Proben und die Hilfe bei der Vorbereitung der Proben zur Analytik. Ebenso bedanke ich mich bei dem Laborteam in Oberschleißheim, vor allem bei Christian Overdiek für die tatkräftige Unterstützung bei der Analytik meiner Proben.

Mein Dank gilt ebenfalls Waltham[®], die meine Arbeit finanziell unterstützten.

Ich möchte mich auch bei allen meinen Kollegen bedanken, die mich während der Anfertigung der Arbeit unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich auch meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und mich jederzeit unterstützen. Danke für das Hundesitten während des praktischen Teils der Arbeit, Danke für die motivierende Unterstützung zwischendurch und Danke für das fleißige Korrekturlesen.