Bestimmung der Vitamin D- Aktivität von calcinogenen Pflanzen im Wachteleischalentest

Christina Stephanie Greissinger

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

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

Bestimmung der Vitamin D- Aktivität von calcinogenen Pflanzen

im Wachteleischalentest

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

von
Christina Stephanie Greissinger
aus Wiesbaden

München 2004

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

Dekan:	Univ.- Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Prof. Dr. W. Rambeck
Korreferent:	Univ.- Prof. Dr. B. Aigner

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung **1**

2. Literaturübersicht **3**

2.1 Historischer Überblick über Vitamin D 3
2.2 Bildungs- und Metabolisierungsprozesse von Vitamin D 6
2.3 Limitierende Faktoren 8
2.4 Wirkungen von Vitamin D und seiner Metaboliten im Organismus 11
2.4.1 Wirkung auf molekulare Basis: D- Rezeptor 11
2.4.2 Wirkung auf physiologischer Basis: „rapide responses“ 12
2.5 Calcium- und Phosphor- Homöostase 13
2.5.1 Calcium- Absorption aus dem Darm 14
2.5.2 Einfluss auf die Knochen 15
2.5.3 Calcium- Resorption in der Niere 17
2.6 Weitere Wirkungen von Vitamin D_3 18
2.6.1 Antiproliferative Wirkung 18
2.6.2 Immunregulatorische Wirkung 19
2.6.3 Autoimmune Diabetes Typ 1 19
2.6.4 Wirkung auf das Renin- Angiotensin- System 20
2.6.5 Wirkung auf Keratinozyten 20
2.7 Besonderheiten der Vitamin D- Versorgung beim Vogel 20
2.8. Calcinogene Pflanzen 23
2.9. Kalzinose 26
2.9.1 Klinische Symptome 27
2.9.2 Pathologisch- anatomische Befunde 28
2.9.3 Histologische Befunde 29
2.9.4 Prophylaxe und Therapie der Kalzinose 29
2.10 Solanum glaucophyllum 30
2.11 Trisetum flavescens 32
2.12 Therapeutischer Einsatz calcinogener Pflanzen 35

3. Material und Methoden **38**

3.1 Versuchstiere 38

3.2 Versuchsgruppen 38

3.3 Versuchstierhaltung 39

3.4 Probennahme 39

3.5 Versuchsaufbau 40

3.6 Futterzusammensetzung und –herstellung 41

3.6.1 Verwendete Versuchspräparate 44

3.6.2 Einmischen der Versuchspräparate in die Gesamtration 46

3.7 Untersuchte Parameter 47

3.7.1 Gesundheitszustand und Mortalitätsrate 47

3.7.2 Futterverzehr 47

3.7.3 Legeleistung 48

3.7.4 Eigewicht 48

3.7.5 Eischalentrockengewicht 49

3.7.6 Schalenanteil 49

3.7.7 Körpergewicht 49

3.7.8 Serumcalcium 50

3.7.9 Alkalische Phosphatase im Serum 50

3.7.10 Knochenaschegehalt 52

3.7.11 Calcium in der Knochenasche 53

3.7.12 Phosphor in der Knochenasche 54

3.8 Statistische Auswertung 55

4. Ergebnisse **56**

4.1 Versuch 1 56

4.1.1 Gesundheitszustand der Versuchstiere und Mortalität 56

4.1.2 Tiergewicht und Gewichtsentwicklung 56

4.1.3 Futterverbrauch 58

4.1.4 Legeleistung 60

4.1.5 Eischalentrockengewicht 61

4.1.6 Eigewichte 64

4.1.7 Schalenanteil 64

4.1.8 Serumwerte 67

4.1.8.1 Calciumgehalt im Serum 67
4.1.8.2 ALP im Serum 67
4.1.9 Knochenaschegehalte 69
4.1.9.1 Relativer Knochenaschegehalt 69
4.1.9.2 Calcium in der Knochenasche 69
4.1.9.3 Phosphor in der Knochenasche 69
4.2 Versuch 2 73
4.2.1 Gesundheitszustand der Versuchstiere und Mortalität 73
4.2.2 Tiergewicht und Gewichtsentwicklung 73
4.2.3 Futterverbrauch 75
4.2.4 Legeleistung 77
4.2.5 Eischalentrockengewicht 78
4.2.6 Eigewichte 81
4.2.7 Schalenanteil 81
4.2.8 Serumwerte 84
4.2.8.1 Calciumgehalt im Serum 84
4.2.8.2 ALP im Serum 84

5. Diskussion 87
5.1 Kritik der Methoden 87
5.1.1 Stall und Haltung der Tiere 87
5.1.2 Der Wachteleischalentest 88
5.1.3 Versuchsdurchführung 90
5.1.4 Futterinhaltsstoffe und Versuchspräparate 90
5.1.5 Messparameter 91
5.2 Mortalität 92
5.3 Gewichtsentwicklung 93
5.4 Futterverbrauch 93
5.5 Legeleistung 94
5.6 Eiparameter 98
5.6.1 Eischalentrockengewicht 98
5.6.2 Schalenanteil 102
5.6.3 Frischeigewicht 103

5.7 Knochenparameter 104
5.7.1 Knochenaschegehalt Versuch 1 104
5.7.2 Calcium- und Phosphorgehalt in der Knochenasche 105
5.8 Serumparameter 105
5.8.1 Calciumgehalt im Serum 105
5.8.2 ALP- Gehalt im Serum 106

6. Zusammenfassung 109

7. Summary 110

8. Literaturverzeichnis 111

9. Anhang 132

10. Danksagung 141

11. Lebenslauf 143

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Empfehlungen zur optimalen Versorgung verschiedener Tierarten Mit Vitamin D; modifiziert nach KAMPHUES et al., 1999 9

Tabelle 2: Regionale Bezeichnungen der Kalzinose 24

Tabelle 3: Konzentration von 1,25$(OH)_2D_3$ in verschiedenen calcinogenen Pflanzen; nach MELLO und HABERMEHL (1998) 26

Tabelle 4: Zeitlicher Ablauf der Versuche 1 und 2 40

Tabelle 5: Zusammensetzung des Zuchtwachtelalleinfutters (Angaben in %) 42

Tabelle 6: Rohnährstoffgehalt des Zuchtwachtelalleinfutters (Angaben in % der Trockensubstanz (TS)) 42

Tabelle 7: Mischanweisung für Vitaminvormischung (Angaben in g/kg) 43

Tabelle 8: Mischanweisung für Spurenelementvormischung (Angaben in g/kg) 43

Tabelle 9: Eingesetzte Präparate und Dosierungen im ersten Versuch 45

Tabelle 10: Eingesetzte Präparate und Dosierungen im zweiten Versuch 45

Tabelle 11: Komponenten der Futterration (Angaben in %) 46

Tabelle 12: Durchschnittliche Tiergewichte [g] (Mittelwert ± Standardabweichung), Versuch 1 57

Tabelle 13: Durchschnittlicher Futterverbrauch pro Tier und Tag [g], pro Ei [g] und pro Gramm Eischale [g], Tag 1 bis 21, Versuch 1 59

Tabelle 14: Durchschnittliche Legeleistung pro Gruppe [%] und durchschnittliches Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag [mg], Tag 5 bis 21, Versuch 1 62

Tabelle 15: Durchschnittliches Frischeigewicht [g] und Schalenanteil [%] pro Tag (Mittelwert ± Standardabweichung), Tag 5 bis 21, Versuch 1 65

Tabelle 16: Durchschnittlicher Calciumgehalt im Serum [g/l] (Mittelwert ± Standardabweichung); Durchschnittlicher Alkalische Phosphatase-Gehalt im Serum [U/L] (Mittelwert ± Standardabweichung), Versuch 1 68

Tabelle 17: Durchschnittlicher relativer Knochenaschegehalt von Femur und Tibiotarsus [%] (Mittelwert ± Standardabweichung), Versuch 1 70

Tabelle 18: Durchschnittlicher Calciumgehalt in der Knochenasche von Femur und Tibiotarsus [g/kg] (Mittelwert ± Standardabweichung), Versuch 1 71

Tabelle 19: Durchschnittlicher Phosphorgehalt in der Knochenasche von Femur und Tibiotarsus [g/kg] (Mittelwert ± Standardabweichung), Versuch 1 72

Tabelle 20: Durchschnittliche Tiergewichte [g] (Mittelwert ± Standardabweichung), Versuch 2 74

Tabelle 21: Durchschnittlicher Futterverbrauch pro Tier und Tag [g], pro Ei [g] und pro Gramm Eischale [g], Tag 1 bis 21, Versuch 2 76

Tabelle 22: Durchschnittliche Legeleistung pro Gruppe [%] und durchschnittliches Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag [mg], Tag 5 bis 21, Versuch 2 79

Tabelle 23: Durchschnittliches Frischeigewicht [g] und Schalenanteil [%] pro Tag (Mittelwert ± Standardabweichung), Tag 5 bis 21, Versuch 2 83

Tabelle 24: Durchschnittlicher Calciumgehalt im Serum [g/l] (Mittelwert ± Standardabweichung); durchschnittlicher Alkalische Phosphatase-Gehalt im Serum [U/L] (Mittelwert ± Standardabweichung), Versuch 2 85

Im Anhang:

Tabelle 25: Durchschnittliche wöchentliche Legeleistung pro Gruppe [%] (Mittelwert ± Standardabweichung), Woche 1 bis Woche 3, Versuch 1 132

Tabelle 26: Durchschnittliches wöchentliches Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag [mg] (Mittelwert ± Standardabweichung), Woche 1 bis Woche 3, Versuch 1 133

Tabelle 27: Durchschnittliches wöchentliches Frischeigewicht [g] pro Gruppe (Mittelwert ± Standardabweichung), Woche 1 bis Woche 3, Versuch 1 134

Tabelle 28: Durchschnittlicher wöchentlicher Schalenanteil [%] pro Ei (Mittelwert ± Standardabweichung), Woche 1 bis Woche 3, Versuch 1 135

Tabelle 29: Durchschnittliche wöchentliche Legeleistung pro Gruppe [%] (Mittelwert ± Standardabweichung), Woche 1 bis Woche 3, Versuch 2 136

Tabelle 30: Durchschnittliches wöchentliches Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag [mg] (Mittelwert ± Standardabweichung), Woche 1 bis Woche 3, Versuch 2 137

Tabelle 31: Durchschnittliches wöchentliches Frischeigewicht [g] pro Gruppe (Mittelwert ± Standardabweichung), Woche 1 bis Woche 3, Versuch 2 138

Tabelle 32: Durchschnittlicher wöchentlicher Schalenanteil [%] pro Ei (Mittelwert ± Standardabweichung), Woche 1 bis Woche 3, Versuch 2 140

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Trans- und cis- Isomere des Prävitamin D_3 6
(verändert nach HOLICK, 2003)
Abb. 2: Photochemische und metabolische Umwandlung von 7
7- Dehydrocholesterol zu 1,25- Dihydroxycholecalciferol
(verändert nach FRASER, 1995)
Abb. 3: Struktureller Unterschied zwischen Ergocalciferol und Cholecalciferol 10
(verändert nach SOARES et al., 1995)
Abb. 4: Bild von Solanum glaucophyllum 30
Abb. 5: Bild von Trisetum flavescens 32
Abb. 6: Vergleich der durchschnittlichen wöchentlichen Legeleistung [%] 63
der Gruppen in Woche 1 bis Woche 3, Versuch 1
Abb. 7: Vergleich der durchschnittlichen wöchentlichen Eischalen- TS [mg] 63
pro Tier in Woche 1 bis Woche 3 pro Gruppe, Versuch 1
Abb. 8: Vergleich des durchschnittlichen wöchentlichen Eigewichts [g] in 66
Woche 1 bis Woche 3 pro Gruppe, Versuch 1
Abb. 9: Vergleich des durchschnittlichen wöchentlichen Schalenanteils [%] 66
in Woche 1 bis Woche 3 pro Gruppe, Versuch 1
Abb. 10: Vergleich der durchschnittlichen wöchentlichen Legeleistung [%] 80
der Gruppen in Woche 1 bis Woche 3, Versuch 2
Abb. 11: Vergleich der durchschnittlichen wöchentlichen Eischalen- TS [mg] 80
pro Tier in Woche 1 bis Woche 3 pro Gruppe, Versuch 2
Abb. 12: Vergleich des durchschnittlichen wöchentlichen Eigewichts pro Tag [g] 82
in Woche 1 bis Woche 3 pro Gruppe, Versuch 2
Abb. 13: Vergleich des durchschnittlichen wöchentlichen Schalenanteils [%] 82
In Woche 1 bis Woche 3 pro Gruppe, Versuch 2
Abb. 14: Durchschnittliche Legeleistung pro Tier [%] in Abhängigkeit vom 94
Vitamin D_3- Gehalt pro kg Futter, Versuch 1
Abb. 15: Vergleich der Legeleistung von 0,3 g und 1g Solanum- Rohextrakt 96
in Woche 1, Woche 2 und Woche 3, Versuch 1
Abb. 16: Durchschnittliche Legeleistung pro Tier [%] in Abhängigkeit vom 97
Vitamin D_3- Gehalt pro kg Futter, Versuch 2

Abb. 17: Vergleich durchschnittlicher Legeleistungen [%] in Woche 1, Versuch 2 98

Abb. 18: Durchschnittliche Eischalentrockengewichte pro Tier und Tag [mg] in Abhängigkeit vom Vitamin D_3- Gehalt pro kg Futter, Versuch 1 99

Abb. 19: Vergleich durchschnitttlicher Eischalen- TS/Tier und Tag [mg] in Woche 1, Versuch 1 100

Abb. 20: Durchschnittliche Eischalentrockengewichte pro Tier und Tag [mg] in Abhängigkeit vom Vitamin D_3- Gehalt pro kg Futter, Versuch 2 100

Abb. 21: Vergleich der durchschnittlichen Eischalen- TS/Tier und Tag [mg] in Woche 1, Versuch 2 102

Abb. 22: Durchschnittliche ALP- Gehalte im Serum, Versuch 2 107

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
ALP	Alkalische Phosphatase
Art. Nr.	Artikelnummer
ATP	Adenosintriphosphat
β	Beta
Best.Nr.	Bestellnummer
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Kohlenstoff
ca.	ungefähr, circa
Ca	Calcium
CaBP	Calciumbindendes Protein
Cat. No	Katalognummer
Ch.-B.	Chargennummer
D	Deutschland
dest.	destilliert
d.h.	das hei t
DNA	Desoxyribonucleinsäure
durch.	durchschnittlich
ECaC	Epithelialer Calciumkanal
et al.	und Mitarbeiter
Fa.	Firma
G	Gap
g	Gramm
ges.	gesamt
Gluc	Glucosidase
gp	g Protein
h	Stunde
HNO_3	Salpetersäure
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
IE	Internationale Einheit
IL	Interleukin

Inc.	Incorporated
K	Kalium
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
KO	Knockout
L	Liter
Lot.No	Chargennummer
µ	Mikro
m²	Quadratmeter
ME	Metabolisierbare Energie
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
Mio.	Millionen
MJ	Megajoule
ml	Milliliter
mmol	Millimol
m RNA	messenger RNA
n	Anzahl
Na	Natrium
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
Nr.	Nummer
ODF	Osteoklastendifferenzierender Faktor
OH	Hydroxy
$(OH)_2$	Dihydroxy
$(OH)_3$	Trihydroxy
p	Signifikanzwert, Irrtumswahrscheinlichkeit
P	Phosphor
p.a.	pro analysi
PGE	Prostaglandin E
%	Prozent
PMCA	Plasmamembranständiger Calciumkanal
PTH	Parathormon

RE	Rohextrakt
ReE	Reinextrakt
RNA	Ribonucleinsäure
± s	Standardabweichung
S.	Solanum
sec	Sekunde
S.g.	Solanum glaucophyllum
Std.	Stunde
TCA	Trichloressigsäure
T.f.	Trisetum flavescens
TM	Trockenmasse
TS	Trockensubstanz
U/L	Einheiten pro Liter
U/min.	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VDR	Vitamin D- Rezeptor
vgl.	vergleiche
$\bar{x}$	Mittelwert
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Calcinogene Pflanzen enthalten anstatt des pflanzlichen Vitamin D_2 das „tierische“ Vitamin D_3 und seine Metaboliten, was bei übermäßigem Verzehr durch weidende Tiere zu dem Krankheitsbild der Kalzinose führt. Als calcinogenes Wirkprinzip enthalten diese Pflanzen neben dem Vitamin D_3 unterschiedliche Mengen des hormonell wirksamen Metaboliten 1,25- Dihydroxyvitamin D_3. Dieser Metabolit bedarf nicht wie Vitamin D_3 selbst der Metabolisierung in Niere und Leber des Organismus, da er bereits in aktiver Form vorliegt. Damit unterliegt seine Synthese im Tierkörper nicht mehr der Produkthemmung.
Während in den Bergregionen Deutschlands, Österreichs und der Schweiz Trisetum flavescens (Goldhafer) heimisch ist, kommt Solanum glaucophyllum hauptsächlich in Gebieten Südamerikas vor.
Vitamin D ist sowohl im tierischen als auch im menschlichen Körper im Zusammenspiel mit anderen Regulatoren für die Steuerung der komplexen Vorgänge der Calcium- und Phosphor- Homöostase verantwortlich. Diese Mineralien haben vielfältige Aufgaben in mehreren biologischen Prozessen wie z.B. der Regulation von Muskel- und Nervenfunktionen und der Entwicklung und Erhaltung von Knochenstrukturen. Der größte Calcium- Bedarf im Tierreich entsteht, neben der Milchproduktion bei Kühen, bei der Bildung von Ei und Eischale beim Vogel. Weiterhin ist bei Vögeln die Aufnahme von Vitamin D_3 von besonderer Bedeutung, da sie zusammen mit Neuweltaffen im Tierreich eine Ausnahme darstellen und Vitamin D_2 bei ihnen nur etwa 1/10 der biologischen Wirksamkeit des Vitamin D_3 besitzt. Der Calcium- Stoffwechsel der Wachtel ist im Vergleich zum Huhn deutlich intensiver, was sich in einer fast doppelt so hohen Calcium- Ausscheidung über die Eischale bemerkbar macht.
Krankheiten, die bei der Störung des Vitamin D- Stoffwechsels auftreten, sind sowohl in der Tier- als auch in der Humanmedizin bekannt. Zu ihnen zählen unter anderem die Gebärparese der Rinder, das vermehrte Auftreten von Brucheiern bei alten Legehennen und die humane Hypocalcämie ausgehend von verschiedenen Grundkrankheiten. Aus diesen Gründen wird versucht, Vitamin D- Metaboliten in unterschiedlichen Formulierungen einzusetzen und zur Erweiterung der therapeutischen Breite unerwünschte Nebenwirkungen (wie z.B. hohe Calcium-Resorption aus dem Knochen) weitest möglich auszuschließen.

Der Wachteleischalentest wird als biologisches Testverfahren zur Bestimmung der Wirksamkeit verschiedener Vitamin D- Präparate und seiner Metaboliten herangezogen. Der Gehalt von Vitamin D- Metaboliten in calcinogenen Pflanzen, wie Solanum glaucophyllum und Trisetum flavescens, und ihre Bioverfügbarkeit kann durch diese Testmethode verfolgt werden.
Mittels des Wachteleischalentests lässt sich eine direkt proportional zum Vitamin D_3- Gehalt des Futters ansteigende Calcium- Ausscheidung über die Eischale nachweisen. Dies setzt die Gabe eines Futters mit suboptimalem Vitamin D_3- Gehalt nach einer Phase der Vitamin D- Depletierung der Wachteln voraus. Der Parameter Calcium- Ausscheidung über die Eischale wurde durch das leichter zu bestimmende Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag ermittelt und dient als Maßstab für die biologische Vitamin D- Aktivität der eingesetzten Präparate.

In der vorliegenden Arbeit sollte in zwei Versuchsdurchgängen mit Hilfe des Wachteleischalentests die Vitamin D artige- Aktivität von Solanum glaucophyllum und Trisetum flavescens im Vergleich zu Vitamin D_3 und dem Metaboliten $1,25(OH)_2D_3$ bestimmt werden. Neben getrockneten und gemahlenen Blättern und Stängeln des Solanums kamen zwei Formulierungen - ein wasserextrahierter Rohextrakt und ein angereicherter Reinextrakt - zum Einsatz.
Zusätzlich sollte untersucht werden, ob zu den Roh- und Reinextrakten des Solanum zugesetzte Glucosidase einen Einfluss auf die zu testenden Parameter zeigen würde.
Weiterhin sollten die Solanum- Präparate in Hinblick auf die nach Depletion eventuell schneller wieder einsetzende Legeleistung beurteilt werden.

2. Literaturübersicht

2.1 Historischer Überblick über Vitamin D

Vitamin D steht schon seit einigen Jahrzehnten im Mittelpunkt von Untersuchungen in vielen Labors rund um die Welt. Im Laufe der Zeit gab es viele interessante Entdeckungen, die Vitamin D als zentral in mehreren sehr komplexen Systemen aufzeigten.
Rückblickend kann heute gesagt werden, dass schon im 17ten Jahrhundert der Anstoß zur Vitamin D Forschung gegeben wurde als Glisson 1650 in seinem lateinischen Werk „de Rachitide“ eine genaue klinische und anatomische Beschreibung der damals in England bei Kindern weit verbreiteten Krankheit Rachitis gab (heute immer noch unter dem Namen Glissonsche Krankheit bekannt) (KUMARAVEL, 2003).
PARRY kam 1872 mit seiner Aussage „it looks as if the blood lacks something that would allow the salt to deposite themselves in the cartilage of the growing bone”, einer heute in vielen Details bekannten Funktion des Vitamin D sehr nahe. Und als 1895 SNOW das fehlende Sonnenlicht als möglichen Auslöser für das häufige Vorkommen von Rachitis in großen Städten zur Diskussion stellte, gelang es HULDSCHINSKY 1919 die kurative Wirkung von Sonnenlicht und künstlichem UV-Licht nachzuweisen.
Auch andere Wissenschaftler beschäftigten sich mit der Behandlung der Krankheit Rachitis und es kam zu der erstaunlichen Entdeckung, dass einerseits UV- Licht, aber andererseits auch Fisch- Lebertran in der Prävention die selbe Wirkung haben (CHICK et al., 1922).
In der gleichen Zeit schritt auch die Identifizierung des sogenannten rachitischen Faktors voran. 1912 bezeichnete HOPKINS Bestandteile der Nahrung, die in synthetischen Diäten fehlten, als „acessory food factors“. Im gleichen Jahr bekamen sie ihre Bezeichnung als „Vitamine“, bestehend aus den Wortteilen „vital for life“ und „amine“ (FUNK, 1912).
Dass die Untersuchungen nicht immer ganz einfach waren, zeigt die Annahme OSBORNES und MENDELS, die 1913 einen fettlöslichen Stoff im Lebertran fanden, dem sie als Vitamin A die heilende Wirkung gegen Xerophthalmie und Rachitis zusprachen.

Erst 1922 konnten McCOLLUM et al. zeigen, dass zwei separate Faktoren im Lebertran vorhanden sein mussten, von denen einer nach Erhitzen nicht mehr gegen Xerophthalmie wirksam ist. Im gleichen Jahr gelang es ihm, bei Hunden Rachitis durch eine spezielle Diät auszulösen und zu zeigen, dass es einen Faktor gibt, der die spezifische Eigenschaft hat, in den Metabolismus der Knochen einzugreifen.
Erst 1936 wurde dann von WINDAUS et al. aus Fischlebertran Vitamin D_3 isoliert und identifiziert. Damit wurde die biochemische Ära in der Ergründung des Vitamin D eingeläutet.
Nach der gelungenen Herstellung von radioaktiv markiertem Vitamin D (NORMAN und DeLUCA, 1963) kamen dieselben Wissenschaftler 1966 zu der Erkenntnis, dass Vitamin D im Körper erst umgesetzt werden muss, damit das eigentlich biologisch wirksame Substrat entsteht. In kurzer Zeit wurden das durch Hydroxylierung entstandene $25(OH)D_3$ (PONCHON et al., 1969) und der biologisch aktive Metabolit $1,25(OH)_2D_3$ (HOLICK et al., 1971) entdeckt.
Mit der Wirkung auf den Knochenmetabolismus und dem Nachweis von Vitamin D in den Nieren und im Darm waren dies nun die klassischen Zielorgane der Untersuchungen.
Erst im Laufe der Zeit stellte sich heraus, dass noch andere Organsysteme unter dem Einfluss von Vitamin D stehen. So ist heute neben der Calcium- und Phosphor-Homöostase, dem Knochenumbau und dem Einfluss von Vitamin D auf die Muskelgesundheit, auch die Immunmodulation zum Schutz vor autoimmunen Krankheiten und der Schutz von Zellen vor Entartung (Krebs) bekannt.
Der schon früh entdeckte Einfluss von Sonnenlicht auf die Behandlung der Rachitis (LUCAS, 1933) kam erneut in den Mittelpunkt des Interesses: WINDAUS et al. stellten 1938 den fördernden Einfluss von UV- Licht auf die Spaltung der 9C-10C-Bindung von Provitamin D (7- Dehydrocholesterol) dar. 7- Dehydrocholesterol wurde in der Haut von verschiedenen Lebewesen (Schwein FESTENSTEIN und MORTON, 1955; Maus und Meerschwein KANDUTSCH et al., 1956; Mensch REINERTSON und WHEATLEY, 1959; Ratte GAYLOR und SAULT, 1964) gefunden und als Provitamin D essentiell für die weitere Umsetzung zu D_3 dargestellt.
Heute ist bekannt, dass bei diesem Vorgang im Stratum spinosum und Stratum germinativum der Haut (STAMP, 1975) der B-Ring des 7- Dehydrocholesterols durch Energieabsorption aufgebrochen wird (HOLICK et al., 1995).

Die speziellen Eigenschaften des Lichts wurden ebenfalls untersucht, wobei die Wellenlänge der Strahlung zwischen 290 und 315 nm (HAVINGA et al., 1960) und der Energiegehalt (KOBAYASHI und YASUMURA, 1973) für die Vitamin D_3-Synthese positiven, hoher Ozongehalt der Luft, Wolken vor der Sonne, starke Pigmentierung der Haut (CLEMENS et al., 1982) und Sonnencreme auf der Haut (MATSUOKA et al., 1987) negativen Einfluss ausüben.

Es wurde immer deutlicher, dass die Vitamin D- Versorgung von Menschen und Tieren von zwei Seiten her beeinflusst werden konnte: Zum einen konnte der Köper mit UV- Licht dazu angeregt werden, Vitamin D selbst herzustellen, zum anderen war es möglich, von außen Vitamin D mit der Nahrung zuzuführen. In klassischer Weise wurde Lebertran als Vitamin D- Quelle eingesetzt, aber es fanden ebenfalls Versuche statt, Vitamin D- Aktivität in Pflanzen zu finden. WINDAUS identifizierte 1931 eine aktive Substanz aus Futterpflanzen, die die gleiche Wirkung wie Vitamin D_3 hat. Da diese Substanz allerdings eine etwas andere Struktur aufwies, bezeichnete er sie als Vitamin D_2 (Ergocalciferol). JONES et al. gelang erst einige Zeit später (1976b) der Nachweis, dass mit der Nahrung aufgenommenes D_2 einer dem D_3 analogen metabolischen Umwandlung unterliegt.

Im Rahmen der Suche nach dem genauen Metabolisierungprozess wurden über 30 Verbindungen gefunden (HENRY und NORMAN, 1984), deren Funktion als Metaboliten oft bis heute noch unklar ist. Auch die Orte, die als Bildungsstätte in der Herstellung und Metabolisierung von Vitamin D eine Rolle spielen, mussten mühsam identifiziert werden: Bis Mitte der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts galt die Niere als das einzige Organ, das mittels der 1α- Hydroxylase 1,25$(OH)_2D_3$ bilden konnte. Innerhalb kurzer Zeit wurde diese Umsetzung auch in Keratinozyten (BIKLE et al., 1986), in der Prostata (SCHWARTZ, 1998) und in aktivierten Makrophagen, besonders denen des Knochenmarks (REICHEL und NORMAN, 1989), nachgewiesen.

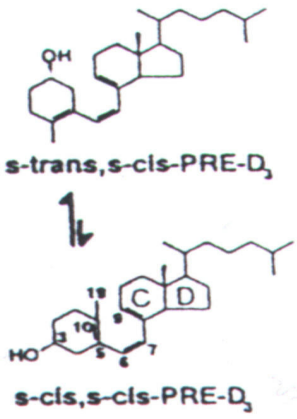
Zur bislang bekannten Darstellung des Bildungs- und Metabolisierungsprozesses von Vitamin D siehe Abschnitt 2.2.

2.2 Bildungs- und Metabolisierungsprozesse von Vitamin D

Die Hauptquelle für die Versorgung des menschlichen und tierischen Organismus mit Vitamin D ist seine Produktion in der Haut durch die Wirkung von UV- Licht (HOLICK, 2002). Aus diesem Grund ist seine Bezeichnung als Vitamin unter der Benennung eines Stoffes, der in Mikromengen als Nahrungsbestandteil benötigt wird, um Stoffwechselfunktionen aufrecht zu erhalten, nur begrenzt zutreffend. Obwohl es sich auch von den klassischen Steroidhormonen in seiner konformationellen Flexibilität hinsichtlich der Bindung an seinen Rezeptor unterscheidet (NORMAN et al., 1999), ist der Vitamin D- Metabolit jedoch eher als Hormon zu bezeichnen.

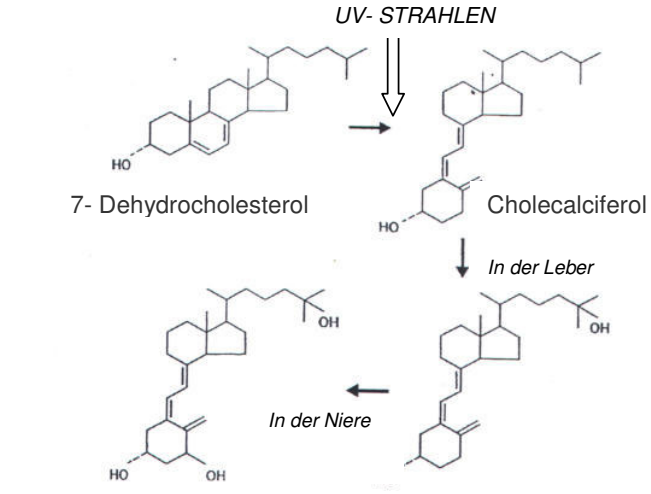
7- Dehydrocholesterolmoleküle in der Haut absorbieren die Energie der auftreffenden UV- Strahlen und benutzen diese zum Aufbrechen des B- Ringes. Dieser Prozess führt zur Bildung von Prävitamin D_3 (HOLICK et al., 1995). Prävitamin D_3 liegt in seiner Molekularstruktur in zwei Stereoisomeren vor, die als cis- und trans- Isomere bezeichnet werden (Abb. 1). Allein die cis- Form kann in das eigentliche Vitamin D_3 (Cholecalciferol) umgewandelt werden und wird wegen ihrer thermodynamischen Labilität zwischen den Phospholipiddoppelschichten der Haut stabilisiert. Nach ihrer Umsetzung zu Cholecalciferol (Vitamin D_3) ist es in seiner Formation für die Membran ungünstig und wird in den extrazellulären Raum abgestoßen (TIAN et al., 1994).

Abb. 1: Trans- und cis- Isomere des Prävitamin D_3 (verändert nach HOLICK, 2003)



Dieses freigesetzte Vitamin D_3 gelangt über den Blutstrom, wo es an Plasmatransportproteine gebunden ist, in die Leber. Dort findet im ersten Metabolisierungsschritt durch das in Mikrosomen befindliche Enzym 25- Hydroxylase die Bildung von 25- Hydroxyvitamin D_3 ($25(OH)D_3$) statt (JONES et al., 1998). Der Transport von der Leber zur Niere findet ebenfalls auf dem Blutweg statt, wobei $25(OH)D_3$ wiederum an ein spezifisches Transportprotein gebunden ist.
Der zweite Metabolisierungschritt führt zur Bildung des biologisch wirksamen Metaboliten 1,25- Dihydroxyvitamin D_3 (Calcitriol) (Abb. 2). Dieser Schritt findet größten Teils in den proximalen Tubuli der Nierenrinde mittels 1α- Hydroxylase statt (BRUNETTE et al., 1978).
Sowohl für den Metabolisierungsprozess der Leber, als auch für den der Niere konnten andere Organe gefunden werden, in denen ebenfalls C-25- Hydroxylierungskapazität (Lunge, Darm, Niere: TUCKER et al. ,1973) oder extrarenale 1α- Hydroxylaseaktivität (Colon: CROSS et al., 2001; Osteoblasten und Haut: HOLICK, 2002) nachgewiesen werden konnten.

Abb. 2: Photochemische und metabolische Umwandlung von 7- Dehydrocholesterol zu 1,25- Dihydroxycholecalciferol (verändert nach FRASER, 1995)



2.3 Limitierende Faktoren

Das Ergebnis frühester Studien (HULDSCHINSKY, 1919) konnte in der Zwischenzeit differenzierter dargestellt werden. Die Menge an in der Haut synthetisiertem Vitamin D_3 ist entscheidend abhängig von der Intensität der Strahlung und der Dauer der Exposition. So zeigten >40% junger Erwachsener in Zentral- Europa in den Wintermonaten einen latenten Vitamin D_3- Mangel, der auf unzureichende Strahlenintensität zurückgeführt werden konnte (SCHARLA, 1998). Beim Menschen führt weiterhin eine gesteigerte Pigmentierung der Haut zur Reduktion der Umsetzung von 7- Dehydrocholecaciferol (CLEMENS et al., 1982). Ein zusätzlich limitierender Faktor ist das Alter der Haut. Mit steigendem Alter des Menschen nimmt die Fähigkeit seiner Haut, Vitamin D_3 zu synthetisieren, ab (MacLAUGHLIN und HOLICK, 1985).
Bei Tieren ist die Vitamin D_3- Bildungskapazität durch andere Faktoren begrenzt. HOLICK et al. beschrieben 1975 die Vitamin D- Synthese bei der Bestrahlung einer Ratte, deren Fell rasiert war. Später stellte sich heraus, dass bei normalen Verhältnissen die Ratte nur an Beinen und Bauch, den Regionen mit wenig Haaren, in ihrer Haut Vitamin D produziert. Von KOCH und KOCH wurde 1941 Ähnliches für Hühner beschrieben, die ihre Vitamin D- Synthese an den Stellen ihres Körpers betreiben, die nicht mit Federn bedeckt sind wie z.B. an den Beinen. Der Körper der Hausschweine ist wiederum kaum mit Haaren bedeckt, so dass diese Tiere eine sehr hohe potentielle Vitamin D_3- Bildungskapazität haben. Im Gegensatz zu anderen Tierarten hat Cholecalciferol für Hunde und Katzen deutlichen Vitamincharakter, denn diese beiden Tierspezies sind nicht in der Lage, körpereigenes Vitamin D_3 in ihrer Haut zu synthetisieren (HOW et al., 1994). Als Ursache hierfür gilt eine Überaktivität des Enzyms 7- Dehydrocholesterol- Reduktase (MORRIS, 1997).
Im Lauf der Evolution scheinen diese Tiere, eventuell aufgrund ihrer calciumreichen Nahrung aus Knochen und Fleisch, einige physiologische Mechanismen in ihrer Calcium- Homöostase verloren zu haben (EDWARDS, 2000). Sie sind nun, im Gegensatz zu den herbivoren und omnivoren Tieren, auf ausreichend Vitamin D in ihrer Nahrung angewiesen.

Während für Wildtiere und Tiere mit genügend Aufenthalt im Freien ausreichend Vitamin D_3 über die Haut produziert oder mit der Nahrung aufgenommen wird, ist die Stallhaltung für intensiv genutzte Landwirtschaftstiere ein weiterer limitierender Faktor. Zur Gesunderhaltung und Leistungsbereitschaft- besonders bei Rindern und Geflügel- muss Vitamin D_3 über das Futter zugeführt werden. Dazu wurden Bedarfstabellen mit Richtwerten für jede einzelne Tierart entwickelt (KAMPHUES et al., 1999) (siehe Tabelle 1). Darüber hinausgehende Gaben von Vitamin D sind bei erhöhtem Bedarf während des Wachstums, der Gravidität und der Laktation notwendig.

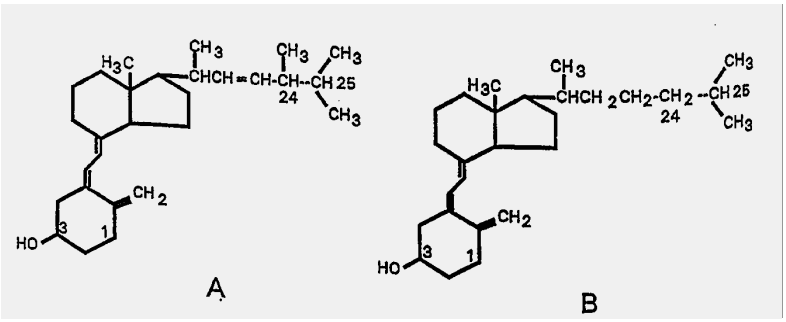
Beim Vogel ist eine weitere Besonderheit von Bedeutung: Im Gegensatz zu Säugetieren können Vögel durch mit der Nahrung zugeführtes Vitamin D_2 (Ergocalciferol) ihren Bedarf an Vitamin D nicht ausreichend decken. Vögel und Neuweltaffen diskriminieren Vitamin D_2 gegenüber Vitamin D_3 in der biologischen Wirksamkeit (HAY und WATSON, 1975). Schon 1964 wurde bei Vögeln die biologische Aktivität von D_2 gegenüber D_3 mit dem Quotienten 1/10 beschrieben (CHEN und BOSMAN, 1964). RAMBECK et al. (1984a) vermuteten eine zweifache Diskriminierung von D_2 im Vogelorganismus, nachdem Versuche an rachitischen Hühnerküken eine um eine Zehnerpotenz weniger wirksame Aktivität von $1,25(OH)_2D_2$ gegenüber $1,25(OH)_2D_3$ und gleichzeitig eine um zwei Zehnerpotenzen weniger wirksame Aktivität von D_2 gegenüber D_3 zeigten. Offenbar kommt es einmal vor und einmal nach der Metabolisierung zu $1,25(OH)_2D_2$ zur Behinderung im Organismus.

Tabelle 1: Empfehlung zur optimalen Versorgung verschiedener Tierarten mit Vitamin D; modifiziert nach KAMPHUES et al., 1999

Tierart	Täglicher Vitamin D- Bedarf in IE/kg KM/Tag (IE = 0,025 µg Vitamin D_2 bzw. D_3)
Hund	10 – 20
Katze	15 – 35
Pferd	10 – 20
Rind	5 – 10
Schaf	5
Schwein	5 - 20

Bei der Zufütterung von Vitamin D beim Geflügel ist vor diesem Hintergrund darauf zu achten, dass D_3 zugesetzt wird. Mit Ausnahme der calcinogenen Pflanzen (siehe Abschnitt 2.8) sind Vitamin D_3 und seine Metaboliten ausschließlich in Nahrungsmitteln tierischer Herkunft enthalten.
In Pflanzenzellen hingegen entsteht durch Bestrahlung aus dem Provitamin Ergosterol das Vitamin D_2 (Ergocalciferol) (Abb. 3). Bei absterbenden Pflanzen (z.B. sonnengetrocknetem Heu), deren UV- Schutz aus Carotinoiden langsam zerfällt, bildet sich vermehrt D_2. Auch aus ergosterolreichen Hefen kann mittels UV-Bestrahlung Vitamin D_2 gewonnen werden (FRASER, 1995).
Unbehandelte Nahrungsmittel enthalten wenig Vitamin D_3. Nur in Milch und Eiern sind stark schwankende messbare Mengen enthalten. Eine große Ausnahme bilden die Lebern einiger Meeresfische (Thunfisch, Dorsch, Seelachs), deren Lebertran schon in der frühen Medizin als reichhaltige Vitamin D- Quelle eingesetzt wurde.

Abb. 3: Struktureller Unterschied zwischen Ergocalciferol und Cholecalciferol, verändert nach SOARES et al., 1995



Ergocalciferol (Vitamin D_2) Cholecalciferol (Vitamin D_3)

2.4 Wirkungen von Vitamin D und seiner Metaboliten im Organismus

2.4.1 Wirkung auf molekulare Basis: Vitamin D- Rezeptor

Den größten Einfluss auf den Organismus übt der biologisch aktive Metabolit $1,25(OH)_2D_3$ mittels des Vitamin D- Rezeptors aus. Dieser Rezeptor mit einem Molekulargewicht zwischen 60 und 70 Kilodalton bindet $1,25(OH)_2D_3$ mit einer höheren Spezifität als die anderen Metaboliten, wie z.B. $25(OH)D_3$ oder Vitamin D_3 selbst (PIKE, 1984). Diese Spezifität ist umgekehrt zu der des Serum-Transportproteins, das $25(OH)D_3$ und $24,25(OH)_2D_3$ fester bindet als $1,25(OH)_2D_3$. Das erlaubt den intrazellulären Rezeptoren $1,25(OH)_2D_3$ in den Vitamin D- Zielzellen zurückzuhalten und zu konzentrieren (MANOLAGAS und DEFTOS, 1981).
Die Rezeptoren befinden sich sowohl im Zytoplasma sowie im Zellkern fast aller kerntragenden Zellen des Körpers, die dadurch als potentielle Zielzellen zu bezeichnen sind.
Gebunden an dieses Rezeptorprotein gelangt $1,25(OH)_2D_3$ in den jeweiligen Zellkern, wo es durch die DNA- bindende Domäne des Vitamin D- Rezeptors an die Promotorregion des chromosomalen DNA- Stranges anknüpft (NORMAN et al., 1992).
Der Mechanismus, mit dem $1,25(OH)_2D_3$ die Calcium- Homöostase regelt, scheint demjenigen sehr ähnlich zu sein, dessen sich die klassischen Glucocorticoide oder Steroidhormone bedienen (FRASER, 1995). Wie bei den Steroidhormonen wird durch den Komplex mit dem Rezeptor die Transkription spezifischer messenger- RNA ausgelöst, die wiederum den Code für spezielle Proteine tragen. Diese Regulation der genetischen Transkription ist für über 60 Gene beschrieben (MINGHETTI und NORMAN, 1988), die damit direkt oder indirekt in die Calcium- und Phosphor- Homöostase eingreifen.
Gut untersuchte Genregulationen sind z.B. die Expression von Calbindin, einem Vitamin D induzierten Protein zur Calciumbindung (MINGHETTI et al., 1988b) und Osteocalcin, einem extrazellulären Knochenmatrix Protein (POSER und PRICE, 1979).

Da Calbindin an der Aufrechterhaltung der Calcium- Homöostase beteiligt ist, wird es hauptsächlich in zwei Organen exprimiert: dem Darm und den Nieren (CHRISTAKOS et al., 2003). Aber auch in anderen Organen wie Schilddrüse, Leber, Uterus, Pankreas, Gehirn und Plasma wird Calbindin angetroffen (GOODWIN et al., 1978). Mittlerweile sind zwei Arten von CaBP bekannt: Calbindin- $D28_k$ im Vogeldarm, Säuger- und Vogelniere, Pankreas, Gehirn und Calbindin- $D9_k$ im Darm von Säugern und Mauselebern (CHRISTAKOS et al., 1992).
Seine Wirkung entfaltet Calbindin hauptsächlich im Calcium- Transport im Darm und in den Nieren. Hier dient es Calcium als Transportmittel durch die Zellen hindurch zur Basolateralmembran, wo es mittels einer Calciumpumpe aktiv aus der Zelle ausgeschleust wird (CHRISTAKOS et al., 2003). In einem zweiten Mechanismus steuert Calbindin über die intrazelluläre Calcium- Menge die Insulinfreisetzung aus den Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas (SOOY et al.,1999). Als Drittes spielt Calbindin durch seine Pufferung des Calciums eine Rolle im Schutz der Zellen vor apoptotischem Zelltod (GUO et al., 1998).
Die Funktionen des Calbindins können also zusammenfassend als Schutz gegen zelluläre Beschädigungen betrachtet werden (CHRISTAKOS et al., 2003).

2.4.2 Wirkung auf physiologischer Basis : „rapide responses"

Neben dem bereits beschriebenen genomischen Weg kann $1,25(OH)_2D_3$ auch Wirkungen auf nicht- genomischem (physiologischem) Weg auslösen: Durch sogenannte „rapid responses" werden Zellantworten ausgelöst, die schneller einsetzen als die des genomischen Wegs. Während die Zellantwort nach Transkription bestimmter Proteine frühestens nach 60 Minuten auftritt (NORMAN et al., 1992), sind die „rapid responses" schon nach wenigen Sekunden bis Minuten messbar. Eine gut untersuchte schnelle Zellantwort ist die Stimulation der Calcium-Absorption aus dem Darm (Transcaltachia) (NEMERE und NORMAN, 1988). Durch die Bindung von $1,25(OH)_2D_3$ an membranständige Rezeptoren werden second messenger- Botenstoffe aktiviert, die die Regulation von Zellfunktionen vermitteln (NORMAN et al., 1999).
Auch die Aktivierung der Calcium- Kanäle der Darmwand zur gesteigerten Calcium-Absorption aus dem Nahrungsbrei gehört zu der Kategorie der „rapid responses".

2.5 Calcium- und Phosphor- Homöostase

Die Hauptzielorgane in Bezug auf die Calcium- und Phosphor- Homöostase stellen Darm, Knochen und Nieren dar. In Darm und Nieren werden diese Mineralien verstärkt aufgenommen bzw. rückresorbiert, aus den Knochen werden diese vermehrt freigesetzt.
Als Regulatoren spielen zusätzlich neben Calcitriol ($1,25(OH)_2D_3$) die Hormone Calcitonin und Parathormon wichtige Rollen:

- Funktion von Parathormon: Ein Absinken des Serumcalciumspiegels löst in der Nebenschilddrüse die Bildung und Sekretion von Parathormon aus. Parathormon induziert die Bildung des Enzyms 1α- Hydroxylase der Niere, während es gleichzeitig die 24- Hydroxylase hemmt. Demzufolge wird vermehrt $1,25(OH)_2D_3$ und weniger $24,25(OH)_2D_3$ gebildet. Mit diesem Mechanismus zeigt das Parathormon eine gegensätzliche Wirkung zu $1,25(OH)_2D_3$, das mit Induzierung der 24- Hydroxylase und Hemmung der 1α- Hydroxylase seine eigene Inaktivierung auslöst (ZIEROLD et al., 2003).

- Funktion von Calcitriol: Sinkende Calcium- und Phosphat- Spiegel sowie Wachstums- und Sexualhormone im Blut stimulieren die Bildung von $1,25(OH)_2D_3$. Um unphysiologisch hohe Mengen an Calcium im Blut zu vermeiden, hemmt Calcitriol sowohl die Bildung von Parathormon als auch die 1α- Hydroxylase (ZIEROLD et al., 2003). In einem Feed- back- Mechanismus reguliert es sich selbst, indem es seine eigene Inaktivierung über das Enzym 24- Hydroxylase in Gang setzt (JONES et al., 1998).

- Funktion von Calcitonin: Durch eine Hypercalcämie wird vermehrt Calcitonin aus den parafollikulären Zellen der Schilddrüse ausgeschüttet. Am Knochen bewirkt es einen vermehrten Einbau von Calcium und Phosphat, während es an der Niere für eine vermehrte Exkretion dieser Mineralien verantwortlich ist. Zusätzlich hemmt es am Knochen die Osteoklastenaktiviät.

Zum besseren Verständnis der Regulationszusammenhänge folgen nun in kurzer Beschreibung die Möglichkeiten zur Anhebung des Calciumgehaltes im Serum. Viele dieser Mechanismen sind mittlerweile in detaillierteren Ausführungen bekannt (Vgl. mit aktueller Literatur). Im Rahmen dieser Arbeit soll eine anschauliche Darstellung der Prinzipien genügen.

2.5.1 Calcium- Absorption aus dem Darm

Calcium kann im Darm über zwei verschiedene Mechanismen resorbiert werden: Ein aktiver, transzellulärer Transportprozess hauptsächlich im Duodenum und Jejunum und ein passiver, parazellulärer Prozess auf der ganzen Länge des Darms (BRONNER et al., 1986)

Der aktive Calciumtransport vom Darmlumen durch die Zellen der Darmwand hindurch ist durch einen 3-phasigen Prozess gekennzeichnet. In der ersten Phase kommt es zum passiven Calcium- Eintritt in die Zellen des Bürstensaums. Die zweite Phase beinhaltet den Calcium- Transport innerhalb der Zellen und endet mit dem Calcium- Ausstoß der dritten Phase auf der serosalen Seite des Darms in den Blutstrom (BOUILLON et al., 2003). Die Einflussmöglichkeiten von Vitamin D_3 auf diesen Transportprozess sind an folgenden Punkten gegeben (WASSERMAN,1997):

- Epitheliale Calcium Kanäle (ECaC1 / ECaC2) sind membranständige Kanäle an der luminalen Darmseite, die für einen unbeschränkten Calcium- Einstrom in das Zellinnere sorgen. Ihre Bildung wird durch $1,25(OH)_2D_3$ gesteigert (HOENDEROP et al., 1999).

- Intrazellulärer Calcium-Transport gebunden an Calbindin, wobei Calbindin-$D9_k$ bei Säugern 2 Calciumionen und Calbindin- $D28_k$ bei Vögeln 4 Calciumionen zu binden vermag (BOUILLON et al., 2003). Zusätzlich wirkt Calbindin in der Zelle als Puffer für die Calciumionen und beschleunigt den Calcium- Ausstoß aus der Zelle, indem es mittels Bindung die Calcium- ATPase (PMCA) stimuliert. Der Einfluss von Vitamin D_3 auf Calbindin ist in Abschnitt 2.4.1 beschrieben (CHRISTAKOS et al., 1992).

- Calcium- Ausstoß aus der Zelle mittels Plasmamembran- Calcium- ATPase (PMCA) oder Na-/Ca- Ionentauscher (NCX), wobei NCX nicht durch D_3 zu beeinflussen ist.

Dieser Transportweg ist an einigen Stellen sättigbar, wobei der Ausschleusung des Calciums keine limitierende Rolle zuzukommen scheint (SLEPCHENCO und BRONNER, 2001). Vielmehr stellt sich Calbindin als limitierender Faktor in den Vordergrund, da der transzellulare Transport direkt proportional zum Gehalt an Calbindin ansteigt (BRONNER, 2003). Vieles deutet darauf hin, dass es zwei nebeneinander existierende Regulationsmechanismen des Calcium- Einstroms durch die Calcium- Kanäle gibt.

Es ist sowohl ein Transportermechanismus vorhanden, der Calcium direkt bindet, als auch ein passiver, durch intrazelluläres Calcium regulierter Calcium- Fluss, durch Kanäle hindurch (BOUILLON et al., 2003).
Der passive Transport funktioniert nach dem Prinzip des Konzentrationsgefälles und ist direkt abhängig vom Calcium- Gehalt der Nahrung und der Verweildauer des Chymus in dem jeweiligen Darmabschnitt. BRONNER und PANSU (1999) untersuchten die Passage des Nahrungsbreis im Darm von Ratten und beschrieben das Ileum als Ort der längsten Verweildauer, wobei dort die größte Calcium-Resorption stattfand. Limitierender Faktor bei diesem Mechanismus ist alleine das Calciumangebot im Nahrungsbrei. Nur bei normalem bis hohem Calcium- Gehalt ist das Konzentrationsgefälle für eine Aufnahme ausreichend.
Ist der Calciumgehalt des Chymus niedrig, wird Calcium hauptsächlich über den energieabhängigen transzellularen Mechanismus absorbiert (PANSU et al., 1993).

2.5.2 Einfluss auf die Knochen

Knochengewebe besteht aus drei Komponenten: Organischer Matrix (Osteoid = 90% Kollagen Typ1, 10% andere Proteine), Knochenmineralien (hauptsächlich Calcium und Phosphor) und Knochenzellen (Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten) (WATTS, 1999).
Osteoblasten sind verantwortlich für die Formation der Grundsubstanz beim Knochenaufbau, während Osteoklasten für dessen Resorption zuständig sind. Diese Auf- und Abbauprozesse laufen ein Leben lang nebeneinander her und müssen gut aufeinander abgestimmt sein, damit die Knochenmasse konstant bleibt (MARTIN, 1993). Osteozyten sind Abkömmlinge von Osteoblasten, die in Lakunen im mineralisierten Knochengewebe liegen und durch Verbindungen zu anderen Zellen Informationen zum Umbau des Knochens weitergeben (MARTIN, 1993).
An Vitamin D- Rezeptor Knock- out Mäusen konnten AMLING et al. 1999 zeigen, dass Vitamin D in erster Linie die intestinale Calcium- Absorption stimuliert und dadurch auf indirektem Weg die Mineralisation der Knochen fördert. Die fehlende Mineralisierung des Skeletts bei Vitamin D- Mangel lässt sich auf unzureichende Plasmaspiegel von Calcium und Phosphor zurückführen. Nur in Anwesenheit von Parathormon kommt es bei externer Vitamin D- Gabe zu einem Anstieg des Serum-Calciums durch Calcium- Mobilisation aus den Knochen.

Knochenresorption ist die Aufgabe von Osteoklasten, die aus der hämopoetischen Zelllinie der Monozyten- und Makrophagen abstammen (UDAGAWA et al., 1990). Osteoklasten entstehen aus dieser Zelllinie nur in Anwesenheit von $1,25(OH)_2D_3$ und direktem Kontakt zu Osteoblasten (SUDA et al., 1992). Auf mehreren Wegen kann die Osteoklastenformation angeregt werden, wobei $1,25(OH)_2D_3$ durch Rezeptor-Präsentation dieses induziert. Andere, die Knochenresorption fördernde Faktoren, sind Parathormon, PGE und Vertreter der Interleukinfamilie (SUDA et al., 1992). Über diese verschiedenen Wege wird in Osteoblasten die Bildung eines Osteoklasten- Aktivierungsfaktors (ODF) angeregt, der auf ihrer Plasmamembran präsentiert wird. (SUDA et al., 1992). Versuche ergaben, dass aus diesen angeführten Gründen nur bei Zellkontakt von Osteoklastenvorstufen mit ODF-tragenden Osteoblasten eine Differenzierung zu reifen Osteoklasten erfolgen kann. Die Zielzellen des Parathormon, $1,25(OH)_2D_3$, Interleukine und weiterer Faktoren stellen also nicht die Osteoklastenvorstufen dar, sondern sind nach diesen Erkenntnissen die Osteoblasten.

In vivo hat $1,25(OH)_2D_3$ die Funktion eines „bone-mobilizing hormone“, während dessen es in vitro auch ein „bone-forming hormone“ sein kann (SUDA et al., 2003), wobei seine Konzentration eine entscheidende Rolle spielt. Es kann nur aufgrund von pharmakologischen Überdosierungen oder fehlregulierten Mechanismen zu einer Knochenresorption in vivo kommen (SUDA et al., 2003).

$1,25(OH)_2D_3$ verhindert in physiologischer Konzentration die Knochenresorption in vivo durch Unterdrückung der Parathormon induzierten messenger- RNA- Synthese und folgender Osteoklastenaktivierung (ENDO et al., 2000).

Schon 1986 beschrieben MERKE et al., dass Osteoklasten keine Rezeptoren für $1,25(OH)_2D_3$ besitzen. Ihre Vermutung war, dass $1,25(OH)_2D_3$ nicht direkt die Aktivität der Osteoklasten steigern kann, sondern für ihre Anzahl verantwortlich sei. Parathormon stimuliert einerseits die knochenabbauenden Zellen, andererseits stimuliert es das Wachstum und die Differenzierung von Osteoblasten bzw. deren Vorläuferzellen (MAYER 1992)

Im Gegensatz zu Östrogen, das beide Prozesse behindert, unterdrückt $1,25(OH)_2D_3$ nur die Knochenresorption, während es die Knochenformation aufrechterhält (SHIBATA et al., 2002). In Untersuchungen beider Substanzen war der Pool der Osteoklastenprogenitorzellen im Knochenmark stark reduziert, sodass $1,25(OH)_2D_3$ gut bei der Behandlung von östrogenabhängiger Osteoporose eingesetzt werden

kann. Zudem stimuliert 1,25$(OH)_2D_3$ in Osteoblasten die Synthese verschiedener Proteine, deren Funktionen in der Zelladhäsion und Matrixverkalkung zu suchen sind (AVIOLI, 1999).
Einige dieser Proteine können im klinischen Gebrauch als biochemische Marker des Knochenumbaus herangezogen werden.
Marker für die Knochenresorption sind z.B. kollagene Abbauprodukte (Hydroxyprolin, pyridinium cross links) oder TRAP (tartrate resistant acid phospathase).
Marker für Knochenformation sind z.B. Beiprodukte der Knochenmatrixsynthese (Osteocalcin u.a.) oder das Enzym Alkalische Phosphatase (ALP). ALP ist in der Plasmamembran von Zellen der Leber, des Darm, der Plazenta und in Osteoblasten zu finden (MOSS, 1987). ALP katalysiert im alkalischen Milieu die Synthese und die hydrolytische Spaltung von Phosphorsäureestern.
Es wird vermutet, dass die Alkalische Phosphatase eine Rolle bei der Mineralisation neu formierter Knochen spielt, indem sie als direkter Promotor der Mineralisation durch Freisetzung von anorganischem Phosphat in die Matrix und indirekter Stimulator der Hydroxyapatit- Kristallbildung fungiert (RINGE et al., 1994).
Die positive Beziehung zwischen ALP und aktiven Osteoblasten deutet weiterhin darauf, dass ALP ein Marker für Matrixformation und beginnender Mineralisation ist und nicht auf fortschreitende Mineralisation hindeutet (van de VELDE et al., 1985).

2.5.3 Calcium- Resorption in der Niere

Dem Parathormon kommt neben den Knochen auch in den Nieren eine entscheidende Funktion in der Homöostase des Calcium- und Phosphat- Haushalts zu. In der Niere verursacht es eine Phosphat- Diurese, während 1,25$(OH)_2D_3$ die Reabsorption von Phosphat aus dem Primärfiltrat steigert, so dass die Serumkonzentration von Phosphat relativ unverändert bleibt (DeLUCA, 1974). Im Zusammenspiel kommt es zu einer verstärkten Reabsorption von Calcium aus dem glomerulären Filtrat. CRAVISO et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen (1987), dass in den distalen Nierentubuli und den Sammelrohren entsprechende Transportmechanismen vorhanden sind. Weiterhin stimuliert Parathormon durch die Bildung von 1α- Hydroxylase die Produktion von 1,25$(OH)_2D_3$ (LAWSON und DAVIE, 1979) und vermindert die Stabilität der 24- Hydroxylase- mRNA, so dass weniger

inaktivierte Metaboliten von 1,25$(OH)_2D_3$ gebildet werden (ZIEROLD et al, 2003). Gegensätzlich dazu erniedrigt 1,25$(OH)_2D_3$ seine eigene Produktion durch den Einfluss auf die renalen Enzyme 1- Hydroxylase und 24- Hydroxylase (TANAKA et al., 1979) und erhöht die Anzahl der 24- hydroxylierten Metaboliten (HAUSSLER, 1986).
Die Kombinationen dieser Wirkungen auf Darm, Knochen und Nieren führen letztendlich zu einem Nettoanstieg des Serumcalcium- Gehalts.

2.6 Weitere Wirkungen von Vitamin D_3

Bis Ende der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde angenommen, dass 1,25$(OH)_2D_3$ seine Wirkungen ausschließlich im Calcium- und Phosphat-Metabolismus entfaltet (HOLICK, 2003). Erst die Entdeckung von STUMPF 1979, dass sich radioaktiv markiertes 1,25$(OH)_2D_3$ in vielen Geweben des Körpers ansammelt, brachte den Anstoß zu neuen Überlegungen der Wirkungsweise von Vitamin D_3 auf die lokale Zellgesundheit .
Nur stichpunktmäßig sollen hier einige Wirkungen dargestellt werden, um einen Überblick über den Stand der Forschung zu ermöglichen.

2.6.1 Antiproliferative Wirkung

Durch Beobachtungen, dass Menschen, die in nördlicheren Breitengraden leben, ein höheres Risiko haben an Prostatakrebs zu erkranken (HANCHETTE und SCHWARTZ, 1992), kam HOLICK (2002) zu der Annahme, dass die lokale Produktion von 1,25$(OH)_2D_3$ das Zellwachstum reguliert und somit das Risiko einer Entartung herabsetzt. SCHWARTZ et al. (1998) beschrieben die 1α- Hydroxylase-Aktivität in Prostatazelllinien und zeigten, dass die Aktivität in der Krebszellline deutlich abnimmt, bis sie gar nicht mehr vorhanden ist. 25$(OH)D_3$ scheint bis zu 30fach weniger aktiv bei der Inhibition der Zellproliferation zu sein, als 1,25$(OH)_2D_3$ (CHEN et al., 2000).Da 1,25$(OH)_2D_3$ wie ein das Wachstum hemmendes Hormon fungiert, muss das Enzym 1α- Hydroxylase aktiviert sein, um aus 25$(OH)D_3$ die aktive Form 1,25$(OH)_2D_3$ herzustellen.

$1,25(OH)_2D_3$ hält den Zellvermehrungszyklus in der G0 bzw. G1 Phase an, sodass unkontrollierte Teilungen der Tumorzellen verhindert werden (TRUMP und JOHNSON, 2003). Weiterhin leitet es den apoptotischen Zelltod durch Erhöhung der intrazellulären Calcium- Konzentration ein (SERGEEV, 2003).

2.6.2 Immunregulatorische Wirkung

Auch B- und T- Lymphozyten haben, genau wie Monozyten, Vitamin D- Rezeptoren, was die Rolle von $1,25(OH)_2D_3$ an der Immunmodulation erklärt (MANOLAGAS et al., 1985). $1,25(OH)_2D_3$ blockiert die Aktivierung der T- Lymphozyten (LEMIRE et al., 1995). T- Zellen (CD_4= Helferzellen, CD_8= Zytolytische Zellen) werden durch Antigen- präsentierende Zellen (z.B. Dendritische Zellen) aktiviert. In vivo und in vitro Versuchen lässt $1,25(OH)_2D_3$ in Anwesenheit von Vitamin D- Rezeptoren die Dendritischen Zellen in einer Art Unreifezustand verharren (GRIFFIN und KUMAR, 2003). So ließen sich autoimmune Erkrankungen bei Tieren, wie z.B. die autoimmune Enzephalomyelitis (LEMIRE und ARCHER, 1991), durch Kollagen induzierte Arthritis (CANTORNA et al., 1998), Multiple Sklerose und rheumatoide Arthritis verhindern.

2.6.3 Autoimmune Diabetes Typ1

MATHIEU et al. konnten 1999 zeigen, dass $1,25(OH)_2D_3$ die Wahrscheinlichkeit einer Diabetes Typ1 Erkrankung bei Mäusen deutlich herabsetzt. Dieser Diabetestyp entsteht als Resultat einer T- Zell vermittelten autoimmunen Reaktion gegen die Insulin- produzierenden β-Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas. Durch $1,25(OH)_2D_3$ wird diese autoimmune Reaktion verhindert. Zusätzlich unterdrückt $1,25(OH)_2D_3$ die Produktion von Zytokinen und die Reifung von Dendritischen Zellen (ZELLA und DeLUCA, 2003).

2.6.4 Wirkung auf das Renin- Angiotensin- System

Das Renin- Angiotensin- System von Niere und Gehirn spielt unter anderem eine zentrale Rolle bei der Regulation des Blutdrucks und der Elektrolyt- und Volumen-Homöostase des Blutes. $1,25(OH)_2D_3$ wirkt in diesem System als negativer Regulator auf die endokrine Genexpression von Renin (Li, 2003). Renin, das im Juxtaglomerulären Apparat der Niere produziert wird, spaltet von Angiotensinogen Angiotensin 1 ab. Seine biologisch aktive Form erhält es nach Umformung zu Angiotensin 2. Somit besteht ein inverser Zusammenhang zwischen der Vitamin D Konzentration im Blut und dem Blutdruck .

2.6.5 Wirkung auf Keratinozyten

SMITH et al. (1986) zeigten, dass Keratinozyten ebenfalls Vitamin D- Rezeptoren tragen und dadurch in der Lage sind, unter dem Einfluss von $1,25(OH)_2D_3$, ihr Wachstum einzuschränken und ihre Alterung zu beschleunigen. $1,25(OH)_2D_3$ kann daher bei der Behandlung von Psoriasis (einer hyperproliferativen Hauterkrankung) eingesetzt werden (MacLAUGHLIN et al., 1985).

2.7 Besonderheiten der Vitamin D- Versorgung beim Vogel

Die Bildung von Ei und Eischale beim Vogel repräsentiert neben der Milchproduktion bei Kühen, den größten Calciummetabolismus im Tierreich. Pro Ei scheidet dabei eine Legehenne circa 2,3 g und eine Wachtel circa 350 mg Calcium aus. Bezogen auf die Körpermasse ist die Calcium- Ausscheidung der Wachtel mehr als doppelt so groß, wie die des Huhns (ZUCKER et al., 1967). Dieses Calcium muss schnellst möglich zur Verfügung gestellt und der Blutspiegel aufrecht erhalten werden. Quellen für eine Calciummobilisation sind einerseits die medullären Knochen, andererseits die Resorption aus dem Darm. Als medulläre Knochen werden spezielle Knochengewebe bezeichnet, die von weiblichen Vögeln unter dem Einfluss von Geschlechtshormonen 10 bis 14 Tage vor Beginn der Legeperiode (SIMKISS, 1961) in den Markräumen der Röhrenknochen und der Rippen aufgebaut werden.

Diese Konstruktionen bestehen aus vielen kleinen Knochenbälkchen, die einem ständigen Auf- und Abbau unterworfen sind. Röntgenologisch ähnelt der medulläre Knochen gewöhnlichem Ersatzknochen, wobei ihm jedoch keine mechanisch stützende Funktion zukommt. Um das Volumen dieser Knochenkonstruktion unabhängig von seinem Mineralisationsgrad konstant zu halten, ist eine synchronisierte Aktivität der Osteoklasten und Osteoblasten mit dem Legezyklus notwendig (Van de VELDE et al., 1985). Das Calcium der Eischale wird zu 40% aus den medullären Knochen gewonnen, während 60% direkt aus dem Futter stammen. Insgesamt enthält die Schale eines Eies etwa 10% des gesamten Calcium- Gehalts des Körpers der Wachtel (JOWSEY et al., 1956).
Um eine verstärkte Calcium- Aufnahme aus der Nahrung zu ermöglichen, ist beim Vogel, genauso wie bei anderen Lebewesen, eine gesteigerte duodenale Calbindin-Expression und Aktivität notwendig.
Neben dem duodenalen Calbindin wird beim Vogel Calbindin- Aktivität auch im Uterus gemessen, wo sie eine Woche vor Legen des ersten Eies eines Legezyklus deutlich ansteigt (MUSSER et al., 1977). Dieser als „egg shell gland“ bezeichnete Abschnitt des Legetrakts besitzt neben dem Darm die Fähigkeit, große Mengen an Calcium innerhalb kurzer Zeit zu transportieren (HURWITZ, 1978).
Die Wichtigkeit der jeweiligen Organe an der Regulation des Mineralhaushalts spiegelt sich in dem Vorhandensein von 1,25$(OH)_2D_3$- Rezeptoren wider. Zusätzlich zu den bekannten Orten bei anderen Lebewesen (Haut, Parathyreoidea, Darm, Hypophyse, u.a.) zeigen diese Rezeptoren bei Vögeln durch ihre Expression im Uterus und der Chorioallantoismembran ihren Einfluss auf den Calcium- Haushalt (PIKE, 1985).
Zudem ist eine hohe 1- Hydroxylase Konzentration bei legenden Vögel messbar (TANAKA et al., 1978). Um den Einfluss der Geschlechtshormone zu bestimmen, wurden im Versuch weibliche gegen männliche Tiere getestet. Es zeigte sich deutlich eine stimulierende Wirkung von Östrogen auf die 1- Hydroxylase. Bei immaturen Vögeln stellte sich jedoch eine unterstützende Wirkung von Testosteron heraus, denn diese Tiere sprachen nicht auf Östrogen an, was TANAKA et al. (1978) darauf zurückführten, dass in ihrem Organismus zu wenig Testosteron vorhanden ist.

Die additive Wirkung der Geschlechtshormone (TANAKA et al., 1978) ist für den Calcium- Haushalt notwendig, um einerseits bei hohem Bedarf die Calcium-Resorption in den Nieren über das endokrine Vitamin D- System zu forcieren , andererseits Vitamin D in seine aktiven Metaboliten zu überführen (DeLUCA, 1978). Ein weiterer Hinweis auf die Verbindung zwischen Östrogen und renaler 1- Hydroxylase ist in der ciracardianen Rhythmik der $1,25(OH)_2D_3$- Produktion während des Ovulationszykluses gegeben, die demselben Wellenfluss unterliegt wie Östrogen (GULATI et al., 1981).

Die komplexe Wirkungsweise vieler Vitamin D- Metaboliten scheint beim Vogel für die optimale Ausnutzung aller Mechanismen notwendig zu sein. Während einige Metaboliten beim Menschen als Abbauprodukte des $1,25(OH)_2D_3$ angesehen werden und ihnen keine Wirkung zugesprochen wird, schließt man beim Vogel einen synergistischen Effekt nicht aus (NORMAN et al., 1983).

So verstärkt z. B. $24,25(OH)_2D_3$ den Einfluss von $1,25(OH)_2D_3$ auf das duodenale Calbindin und führt damit zu einer höheren Calcium- Exkretion über die Eischale (RAMBECK und ZUCKER, 1984a).

Ein weiterer synergistischer Effekt macht sich bei der Schlupfrate bemerkbar. Bei alleiniger Fütterung von $1,25(OH)_2D_3$ bleibt bei normaler Befruchtungsrate die Schlupfrate gering und steigt erst durch Zusatz von $24,25(OH)D_3$ an (NORMAN et al., 1983). In weiteren Studien zeigte sich, dass $25(OH)D_3$ diejenige Form ist, die mittels eines Transportproteins in das Ei hinein gelangen kann. Dort findet sich ab dem achten Bebrütungstag Aktivität der 1- Hydroxylase (KUBOTA et al., 1981), die nun das zugeführte $25(OH)D_3$ in $1,25(OH)_2D_3$ umwandeln kann. Dieses wiederum ermöglicht den Transport von Calcium aus der Schale in das Skelettsystem der Kükenembryonen (SOARES et al., 1995).

Als Transportproteine für Vitamin D und seine Metaboliten im Blut stehen bei Vögeln im Gegensatz zum Menschen und anderen Tierarten zwei Globuline (α- und β-Globulin) zur Verfügung (EDELSTEIN et al., 1973). Während das eine eine hohe Affinität zu $1,25(OH)_2D_3$ aufweist, zeigt das andere eine starke Bindung zu $25(OH)D_3$. Es scheint, dass dieser Komplex aus Transportprotein und $25(OH)D_3$ in der Lage ist, in das Ei einzudringen und somit dem Embryo zur Verfügung steht (LAWSON und DAVIES, 1979). Die Aufnahme und Produktion verschiedener Vitamin D_3-Metaboliten durch das Muttertier scheint also für die Entwicklung des Kükens sehr wichtig zu sein (EDWARDS, 2000).

TERRY et al. (1999) zeigten, dass 25(OH)D_3 als alleinige Quelle für Vitamin D_3 beim Vogel eingesetzt werden kann. Als aktivster Metabolit und Vorläufer von 1,25$(OH)_2D_3$ erfüllt 25(OH)D_3 alle Funktionen von Vitamin D.
Eine weitere Besonderheit ist die zweifache Diskriminierung von Vitamin D_2 durch den Vogel einmal vor und einmal nach der Metabolisierung (RAMBECK et al., 1984b) Auch die Bindungsfähigkeit des Transportproteins mit D_2 ist geringer als die mit D_3. Es bindet in abnehmender Reihenfolge 25(OH)D_3 > 1,25$(OH)_2D_3$ > D_3 > D_2 (SOARES, 1995). Bei Überdosierung (> 10fach des täglichen Bedarfs) (TERRY et al., 1999) von extern zugeführtem Vitamin D_3 oder seiner Metaboliten kommt es bei Vögeln zu folgenden Toxizitätserscheinungen: Geringere Legeleistung mit vermehrtem Anteil von Bruch- und Knickeiern, Gewichtsverlust durch Anorexie, Entzündungen mit zellulärer Degeneration in Weichteilen mit anschließender Verkalkung, besonders der Nierentubuli und der Aorta. Wie bei anderen Spezies auch, spielt Calcium neben der Eischalenbildung auch bei Vögeln eine wichtige Rolle bei Regulationen von Muskel und Nervenfunktionen sowie in der Blutgerinnungskaskade, der Entwicklung und dem Erhalt von Knochenstrukturen (BOUILLON et al., 2003).

2.8 Calcinogene Pflanzen

Die Bezeichnung calcinogene Pflanzen wird als Oberbegriff für einige Pflanzen aus unterschiedlichen Familien genutzt, die nach oraler Aufnahme durch das Tier zu Intoxikationen mit sehr ähnlichem klinischen Bild führen. Nach unterschiedlich langfristiger Aufnahme kommt es zu systemischen Kalzifikationen durch Imbalancen im Mineralhaushalt.
Zu diesen Pflanzen zählen hauptsächlich Arten aus der Familie der Solanaceae (Nachtschattengewächse) (Solanum glaucophylllum [= S. malacoxylon = S. glaucum], S. torvum, S. esuriale, S. verbascifolium, Cestrum diurnum und Nierembergia veichtii) und aus der Familie der Gramineae (Süßgräser) die Art Trisetum flavescens. Durch intensive Untersuchungen mit anderen Pflanzenfamilien sind in den letzten Jahren Vitamin D- ähnliche Aktivitäten in Blättern der Tomatenpflanze (Lycopersicon esculentum aus der Familie der Solanaceae) mittels Chromatographie als D_3, 25(OH)D_3 und 1,25$(OH)_2D_3$ – Glycoside identifiziert worden

(PREMA und RHAGAMULU, 1996). Auch in Kartoffel- (Solanum tuberosum), Auberginen- (Solanum melongena) und Zucchiniblättern (ABURJAI et al., 1998) sowie in Nicotiana glauca (blaugrüner Tabak aus der Familie der Solanaceae) (SKLIAR et al. 2000) wurde Vitamin D gefunden. In weiteren Pflanzenfamilien wie den Curcubitaceae (Kürbisgewächsen) und den Fabaceae (Schmetterlingsblütler) wurden Secosteroide ähnlich dem Vitamin D_3 nachgewiesen (BOLAND et al., 2003). Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf dem Einsatz von Präparaten aus den Familien der Solanaceae und Gramineae liegt, werden im Folgenden hauptsächlich diese näher dargestellt. Da die Pflanzen individuell unterschiedliche Ansprüche in ihrem Wachstum an Klima- und Nährstoffbedingungen stellen, findet man sie nur in circa 15 Ländern der Erde (MELLO, 2003). Dort auftretende Krankheiten bekamen regional unterschiedliche Namen bis sie nach Auffinden der gemeinsamen Ätiologie unter dem Namen Kalzinose zusammengefasst wurden.
Die Länder und die dortige Bezeichnung für die Kalzinose der entsprechenden Tierart sind in Tabelle 2 kurz zusammengefasst.

Tabelle 2: Regionale Bezeichnungen der Kalzinose

Regionale Bezeichnung	Land	Tierart	Auslösende Pflanze
Enteque seco	Argentinien	Rind, Schaf	Solanum glaucophyllum
Spontaneous S.g.- poisoning	Argentinien	Schwein	Solanum glaucophyllum
Espichamento	Brasilien	Rind	Solanum glaucophyllum
Calcinosis	Brasilien	Schaf	Nierembergia veichtii
Calcinosis	Süd Afrika	Schaf	Solanum verbascifolium
Naalehu disease	Hawaii	Rind, Ziege	Cestrum diurnum +
Manchester wasting disease	Jamaika	Rind, Ziege	Solanum torvum
C.d.- poisoning	Florida (USA)	Rind, Pferd	Cestrum diurnum
Humpy back	Australien	Schaf	Solanum esuriale
Weidekrankheit	Österreich,	Rind, Pferd	Trisetum flavescens
Enzootische Kalzinose	Schweiz,	Rind, Ziege	Trisetum flavescens
Enzootische Kalzinose	Deutschland	Rind, Schaf	Trisetum flavescens

Die calcinogenen Pflanzen zählen bei weidenden Tieren wie Rindern, Pferden, Schafen und Ziegen zu den schädlichsten Pflanzen und lösen sowohl unter Feldbedingungen als auch unter Laborbedingungen und bei den dabei eingesetzten verschiedenen Tieren (Ratten, Hasen, Meerschweinchen, Wachteln, u.a.) Kalzinosen aus. Neben der speziesspezifischen Sensibilität entsteht ein unterschiedlicher Grad der Erkrankung auch durch die Menge der aufgenommenen Substanz.
Einige Tierarten wie z.B. Wiederkäuer, Hasen und Meerschweinchen reagieren empfindlicher als andere auf geringe Mengen der calcinogenen Substanz (CARILLO et al., 1971). Zudem bemerkt MELLO (2003), dass jüngere Tiere resistenter gegenüber dem Auftreten von Krankheitssymptomen sind.
Wenn bei betroffenen Tieren beim ersten Auftreten der Symptome jede weitere Aufnahme von Futtermitteln mit calcinogenen Komponenten unterbunden wird, können sich diese Tiere zum Teil wieder erholen. Allerdings regenerieren sie nicht vollständig und damit ist ihre weitere Nutzung unter wirtschaftlichen Aspekten meist nicht mehr lukrativ. Bei experimentell erzeugter Kalzinose bei Kaninchen konnten HÄNICHEN und HERRMANNS (1990) Anzeichen für einen Rückgang der Kalzifikationen in Lunge, Nieren und Aortenwand aufzeigen. Die geringste Demineralisierungstendenz zeigten die Aortenwand und die Bänder.
Großen Einfluss auf den Rückgang hatten neben der aufgenommenen Dosis auch die Dauer der Aufnahme und das von der Kalzifizierung betroffene Gewebe.
Die wirtschaftlichen Verluste gehen zumeist nicht auf den Tod der Tiere, sondern auf ihre verminderte Leistungsfähigkeit (Futterverwertung, Milchproduktion, Trächtigkeitsrate, Muskelansatz, etc.) und ihre Anfälligkeit für andere Erkrankungen zurück.

Lange Zeit wurde angenommen, dass in Pflanzen ausschließlich Vitamin D_2 vorhanden ist und Vitamin D_3 nur durch Nahrungsmittel tierischer Herkunft aufgenommen werden kann. Dass Vitamin D_3 nicht nur ein sogenanntes „tierisches Vitamin“ ist, wurde durch den Nachweis von D- Metaboliten in sogenannten calcinogenen Pflanzen widerlegt. Noch einen Schritt weiter gingen NAPOLI et al. (1977), als sie versuchten, neben D_3 auch D_2 – Metaboliten in Solanum glaucophyllum nachzuweisen, aber keine messbaren Werte fanden.

Die Funktionen von Vitamin D_3 in der Pflanze selbst sind noch nicht vollständig geklärt. Allein ihr Einfluss auf das Wurzelwachstum ist bestätigt (BUCHALA und SCHMID, 1979).
Bei der Untersuchung des calcinogenen Prinzips und der Menge die aufgenommen werden musste, um eine Erkrankung auszulösen, fanden MELLO und HABERMEHL (1998) unterschiedliche Konzentrationen in verschiedenen Pflanzenarten (siehe Tabelle 3)

Tabelle 3: Konzentration von $1,25(OH)_2D_3$ in verschiedenen calcinogenen Pflanzen; nach MELLO und HABERMEHL (1998)

Pflanzenart	**Konzentration von $1,25(OH)_2D_3$ [IE/kg]**
Solanum glaucophyllum	82.800
Cestrum diurnum	63.200
Nierembergia veichtii	16.400
Trisetum flavescens	12.000

2.9 Kalzinose

Kalzinose ist eine Sammelbezeichnung für die Symptome einer systemischen Kalzifizierung mit chronischem Verlauf. Sie unterliegt nach Aufnahme von bestimmten Pflanzen einer enzootischen Verbreitung in verschiedenen Ländern der Welt. Dass die Ursache dieser Erkrankungen nicht auf bakteriologischer oder viraler Basis zu suchen ist, sondern aufgrund oraler Aufnahme calcinogener Pflanzen mit dem täglichen Futter zusammenhängt, gab der Ursachenforschung eine neue Richtung. CARILLO et al. (1971) bewiesen, dass in Argentinien die sogenannte Enteque seco durch Ingestation von Solanum glaucophyllum- Blättern ausgelöst wird. Diese Pflanze ist durch die Umgehung der 1α- Hydroxylation in der Niere in der Lage, im Organismus eine Hypervitaminose auszulösen. Sie entziehen sich jeder Regulationsstufe des Körpers.
Die klinischen Symptome und pathologisch-anatomischen Befunde sind so ähnlich, dass bei fortgeschrittener Erkrankung allein das klinische Bild zur Befunderhebung ausreicht.

2.9.1 Klinische Symptome

Bei Rindern ist eine chronische von Wochen über Monate fortschreitende Gewichtsreduktion besonders auffällig, die bei starker Ausprägung bis hin zur Kachexie führt. Wirtschaftliche Einbußen machen sich durch einen Rückgang in der Milchleistung und über Fertilitätsstörungen bemerkbar (PUCHE et al., 1980). Weiterhin fallen die Tiere durch vermehrtes Liegen und längeres Verharren auf den Karpalgelenken beim Aufstehen auf. Ihre Körperhaltung mit kyphotischer Rückenlinie und vorbiegigen Karpalgelenken ist charakteristisch. Es scheint, dass sie ihr Körpergewicht hauptsächlich auf den Fußspitzen tragen. Die eigentümliche Körperhaltung wird durch die Atrophie der Hinterhandmuskulatur und die scharf hervorstechenden Hüftknochen weiter betont. Im weitern verlieren sie ihr subscapulares Fett, so dass ihre Schulterbewegungen ebenfalls auffälliger werden. Wenn sie zu Bewegung angetrieben werden, bewegen sie sich langsam und zeigen lokomotorische Schwierigkeiten. Erweiterte Nüstern und das Vorstrecken des Kopfes und Halses sind deutliche Zeichen einer Dyspnoe.

Bei klinischer Untersuchung kann eine Herzarrhythmie und eine gesteigerte Respirationsrate festzustellen sein (DIRKSEN et al., 1970). Die Phosphor- Blutwerte sind deutlich erhöht, wobei zu Beginn einer Erkrankung die Calcium- Werte noch im Referenzbereich liegen können. Des weiteren kann das Blutbild niedrige Hämatokritwerte mit Tendenz zur Anämie aufweisen.
Bei Schafen ist die Ausprägung der unterschiedlichen Symptome etwas anders. Bei zurückgehendem Futterverzehr und stagnierender Gewichtsentwicklung halten Schafe über längere Zeit ihren guten Ernährungszustand bei (DIRKSEN et al., 2003), so dass unter Feldbedingungen oftmals der Beginn der Erkrankung unentdeckt bleibt. Im Unterschied zu den Rindern setzt die Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems wesentlich früher ein und beherrscht den Krankheitsverlauf. In schweren Fällen können aufgetriebene Schafe mit Symptomen von Herz- und Kreislaufinsuffizienz zusammenbrechen, während akutes Herzversagen bei Rindern fast nie beobachtet wird. Bei einer Studie von DIRKSEN et al. (2003) mit Hobbyschafen starben 4 von 12 Tieren an akutem Herzversagen, während 5 weitere aufgrund von chronischer Kreislaufinsuffizienz eingeschläfert werden mussten.

Der Test über die Verfütterung von Trisetum flavescens über einen Zeitraum von 2½ Jahren zeigte bei den Schafen die gleichen kalzinosetypischen Bewegungsstörungen wie beim Rind, jedoch mit stärkerer Beeinträchtigung von Kreislauf und Atmung im Verlauf der Krankheitsdauer (DIRKSEN et al., 2003). Bei Untersuchungen in der klinisch noch inapparenten Phase fällt deutlich die ungewöhnlich hohe Herz- und Atemfrequenz auf, während das Allgemeinbefinden unbeeinträchtigt ist (subklinische Kalzinose). Im Verlauf dieser subklinischen Kalzinose beginnen jedoch die histologisch nachweisbaren Verkalkungen in den Weichgeweben.
Es wird in einigen Studien beschrieben, dass gravide Tiere ohne Probleme gebären und ihre Jungen säugen können (BARROS et al., 1970; ECKEL, 1960). Allerdings kam es bei experimentell intoxikierten Ratten und Hasen zu zahlreichen Veränderungen des Nachwuchses (z.B. unvollständige Ossifikationen der Schädelknochen) (MELLO et al., 1999; GORNIAK et al., 1999).
Obwohl es große individuelle Variationen bei den Tieren hinsichtlich des Verlaufs und des Sektionsbildes gibt, kann jedoch aufgrund der klinischen Befunde eine sichere Diagnose gestellt werden (DIRKSEN et al., 2003).
Von Interesse ist diese tierartenunterschiedliche Ausprägung der Symptome, da die Rinderkalzinose in ihrer Häufigkeit rückläufig ist, während die spontane Kalzinose bei Schafen (DIRKSEN, 2002) und Ziegen (BRAUN et al., 2000) zunimmt.

2.9.2 Pathologisch- anatomische Befunde

Die pathologisch- anatomischen Befunde spiegeln durch ihre funktionelle Beeinträchtigung gut das klinische Bild einer Hypervitaminose D wider. Exzessiv absorbiertes Calcium kann physiologisch nicht mehr kompensiert werden und wird in Weichgeweben und den Knochen abgelagert.
Die Knochen der betroffenen Tiere erweisen sich als kompakter und schwerer gegenüber denjenigen nicht betroffener Artgenossen. In den Gelenkknorpeln sind körnige Bereiche sichtbar. Die Bänder und Sehnen zeigen deutliche Verkalkungen (CAMBEROS et al., 1970). Kalzifikationen sind auch im Endokard, Herzklappen und der Intima der großen Gefäße, besonders der Aorta, zu finden (BARROS und GIMENO, 2000). Bimssteinartigen Charakter weisen einige Bereiche der Lunge auf. In der Nierenrinde sind herdförmige und im Nierenmark streifenförmige Verkalkungszonen zu bemerken (DONE et al., 1976).

Seltener finden sich Verdickungen und Elastizitätsverluste der Uteruswand und der Magen- und Darmschleimhaut (GILL et al., 1976). Neben diesen Weichteilverkalkungen ist eine Vergrößerung der Thyreoidea anzutreffen.

2.9.3 Histologische Befunde

Bei der Untersuchung der pathologischen Befunde sind degenerierte elastische Fasern sichtbar, die den Ort der verstärkten Mineralisation darstellen. Aber auch die Kollagenfasern und die Grundsubstanz der Gewebe sind von den Veränderungen betroffen (MELLO, 2003). Deutlich erkennbar sind degenerierte Herzmuskelzellen, deren Nekrosen und Kalzifizierungen zum Teil durch Fibrosen ersetzt werden. Die Septen der Lungenalveolen degenerieren und zeigen ebenso wie die Broncheal- und Trachealknorpel dystrophische Verkalkungen (DIRKSEN et al., 2003). Weiterhin finden sich in den Arterien und den Intestitien der Nieren Verkalkungen.

2.9.4 Prophylaxe und Therapie der Kalzinose

Da es bislang keine zufriedenstellende Therapie der Kalzinose gibt, liegt der Schwerpunkt der Bekämpfung bei der Prophylaxe. Mit einer Kombination von Verminderung der Aufnahme und Einschränkung der Verbreitung der calcinogenen Pflanzen können Verluste ganzer Tierherden vermieden werden. Die Tiere sollten auf hoch belasteten Weiden nur noch beschränkten Aufenthalt bekommen und zusätzlich mit Futtermitteln versorgt werden, die wenig bis keine calcinogene Aktivitäten aufweisen (PÖTSCH, 2001). Bei Untersuchungen zu verschiedenen Therapiemethoden beobachteten RUKSAN et al. (2000), dass Tiere mit einem Selenmangel anfälliger für die Ausprägung einer Kalzinose sind. Daher sollte in Selenmangelgebieten auf einen Ausgleich dieses Minerals geachtet werden. In der gleichen Studie testeten die Autoren den Einsatz von Monensin. Dieses Anticocccidium behindert das Wachstum der ruminalen Bakterien, die mittels ihrer Glucosidase das in den Pflanzen in glucosidisch gebundene $1,25(OH)_2D_3$ (Calcitriol) freisetzen. In gebundener Form ist das Calcitriol offensichtlich weit weniger wirksam und entfaltet seine Wirkungen im tierischen Organismus wesentlich langsamer.

2.10 Solanum glaucophyllum

Abb. 4: Solanum glaucophyllum

Solanum glaucophyllum wächst als Strauch mit hohen Zweigen (1,5 bis 3 m) auf tonhaltigen Böden tiefer gelegener Landschaften, die zeitweilig überflutet sind (siehe Abb. 4). Er zeigt ein langsames, extensives Wachstum und ist durch sein tiefreichendes Wurzelsystem sehr widerstandsfähig gegenüber Unkrautvernichtungsmitteln und Bodenkultivierung (TOKARNIA et al., 2002). In Gebieten endemischen Wachstums wird er als limitierender Faktor in der Freilandhaltung von Rindern angesehen.

In den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts hat sich durch verschiedene biologische Effekte nach Verfütterung von Blättern Solanum glaucophyllums die Anwesenheit von 1,25$(OH)_2D_3$ angedeutet (CORRADINO und WASSERMAN, 1971). So konnte an Hühnern, deren 1α- Hydroxylase mittels Strontium inhibiert wurde, nach Verfütterung von Solanum glaucophyllum eine erhöhte Calcium- Absorption aus dem Darm festgestellt werden. Diese Aufnahme war auf die Vitamin D- induzierte Neusynthese von Calbindin zurückzuführen (WASSERMAN, 1974). In unterschiedlichen Techniken wie Bindung an Rezeptoren, Chromatographie oder Fragmentographie zeigte sich eine deutliche Ähnlichkeit der Substanz aus Solanum glaucophyllum zu Vitamin D_3.
Ein großer Unterschied besteht allerdings in der Wasserlöslichkeit des wirksamen Extraktes, während Vitamin D_3 an sich ätherlöslich ist. Für dieses Phänomen wurde eine glycosidische Bindung des Metaboliten verantwortlich gemacht (WASSERMAN et al., 1976) nach deren Spaltung mit einer β- Glucosidase aus Mandeln und einem Glucosidasegemisch des Seewurms Charonia lampas eine lipophile Substanz frei wurde und diese als 1,25$(OH)_2D_3$ identifiziert werden konnte (HAUSSLER et al.,

1976). Auch DIRKSEN et al. fanden 1981 neben der in Diäthyläther löslichen antirachitischen Substanz Hinweise auf eine wasserlösliche Wirksubstanz. Allerdings zeigte sich auch, dass Solanum glaucophyllum nicht alle Wirkungen von Vitamin D_3 imitiert. CANAS et al. (1977) beschrieben Defizite in der Phosphorregulation und geringere Wachstumsförderung der Extrakte gegenüber Vitamin D- Präparaten bei rachitischen Hühnerküken.
ESPARZA et al. gelang es 1982, in Blättern von Solanum glaucophyllum nicht nur Konzentration von $1,25(OH)_2D_3$, sondern auch Vitamin D_3 und $25(OH)D_3$ nachzuweisen. Alle diese Metaboliten liegen glucosidisch gebunden in der Pflanze vor. Da bislang ausschließlich Wirkungsmechanismen mit freien Vitamin D_3-Metaboliten beschrieben wurden, entstand die Frage, inwieweit das Glucosid die Bindung an den Vitamin D- Rezeptor beeinflusst.
Es zeigte sich bei Versuchen von PETERLIK et al. (1976), dass sich radioaktiv markiertes $1,25(OH)_2D_3$ schneller an diesen Rezeptor bindet als das Glucosid. Wird allerdings das Solanum glaucophyllum- Präparat mit Glucosidase versetzt, kommt es schon extrakorporal zu einer Abspaltung des Zuckerrests und das freie $1,25(OH)_2D_3$ kann ebenso schnell an den Rezeptor binden wie der reine Metabolit. Körpereigene Glucosidasen im Darm scheinen bei Tieren und Menschen notwendig, um eine Bindung und nachfolgende Wirkungen möglich zu machen.
Nachdem Solanum glaucophyllum als potenter Träger von Vitamin D_3- Metaboliten erkannt war, beschäftigten sich nun viele Studien mit seinem Einsatz bei der Heilung von Krankheiten oder der Steigerung von Leistungsparametern wie z.B. der Eierschalenqualität (REICHENBÄCHER, 1979; KOPP, 1985) oder des Milchfiebers (FRICKE, 1985; GÜTHLE, 1991)

2.11 Trisetum flavescens

Abb. 5: Trisetum flavescens

Trisetum flavescens trägt wegen seiner goldgelben Ähren den deutschen Namen Goldhafer. Er ist ein wertvolles Futtergras, das in lockeren Horsten mit einer Wuchshöhe von 40 bis 80 cm in Höhenlagen ab circa 700 m wächst. Da es Trockenheit besser als Nässe verträgt, gedeiht es gut auf mäßig feuchten, kalk- und nährstoffreichen Böden. Neben Knaulgras stellt es in den Bergregionen Deutschlands, Österreichs und der Schweiz ein sehr wertvolles Futtermittel für weidende Tiere dar (siehe Abb. 5).

So sind Untersuchungen über seinen Gehalt an Vitamin D- wirksamer Substanz und seine Verbreitung wirtschaftlich von großem Interesse.
Die Vegetationsstadien weisen unterschiedliche Konzentrationen an Vitamin D-Metaboliten auf, so dass die Wirksamkeit mit zunehmendem Alter der Pflanze nachlässt. Sind in den „Schossen“ noch durchschnittlich 15.000 bis 27.000 IE/kg TM Vitamin D- ähnliche Aktivität messbar, beträgt der Gehalt im Vegetationsstadium „Rispenschieber“ nur noch 5.300 IE/kg TM und verringert sich bis zum „Blütestadium“ auf durchschnittlich 2.900 IE/kg TM (PÖTSCH, 2001). Durch Züchtungen sind mittlerweile Sorten zu finden, deren Gehalte weit unter diesen Angaben liegen.
Der Anteil von Trisetum flavescens am Weidegras ist stark durch die Nutzungshäufigkeit des Bestandes beeinflusst (SCHECHTER, 1976). Ab einer vierfachen Nutzung pro Jahr verringert sich sein Anteil von ursprünglich 25% auf etwa 15% (BUCHGRABER und PÖTSCH, 1998).

Des weiteren ist der Düngezustand der Weiden von Bedeutung, da Trisetum flavescens düngerliebend ist. Nur nach gründlicher Bodenkontrolle sollte eine Aufkalkung oder eine Phosphatdüngung erfolgen (SCHECHTER, 1976).
Trisetum flavescens kann bei Rindern bereits ab einem Gehalt von etwa 10% in der Gesamtration bei längerer Verfütterung (5 Monate) zu ersten Anzeichen von Kalzinose führen. Bei einem Anteil von 50% zeigen sich die Symptome schon nach ungefähr einem Monat (SIMON, 1980). Schafe tolerieren einen etwas höheren Besatz und zeigen bei 30 bis 40% Goldhaferanteil nach etwa 5 Monaten klinische Symptome (DIRKSEN et al., 2003). Jedoch sollte differentialdiagnostisch bei Lahmheiten, steifem Gang oder Entwicklungsstörungen schon ein Goldhaferbesatz der Weide von 5% zu weiteren Untersuchungen in Hinsicht auf Kalzinose führen. Dementsprechend ist neben der Zufuhr über die tägliche Ration auch die gesamte Dauer der Aufnahme entscheidend für die Ausprägung der Kalzinose.

Zu Beginn der sechziger Jahre des letzten Jahrhunderts traten in Österreich vermehrt Symptome einer bis dahin unbekannten Krankheit auf, die sich im Sektionsbefund durch Verkalkungen unterschiedlicher Organe auszeichnete (DIRKSEN, 1970). 1972 fanden DIRKSEN et al. in Fütterungsversuchen mit verschiedenen Futtergräsern als verursachendes Prinzip Trisetum flavescens und beschrieben 1974 die unterschiedlich calcinogene Wirkung junger und alter Pflanzen. RAMBECK et al. zeigten 1981 auf, dass die Vitamin D- Metaboliten vorwiegend in den Blättern vorkommen und sich kaum Aktivität in Stängeln, Samen, Blüten und Wurzeln nachweisen lässt. In vielen Studien wurde seine antirachitische Aktivität nachgewiesen, und da es bei Vögeln die gleiche Effektivität besitzt wie bei Säugetieren, schlossen ZUCKER und RAMBECK (1981b) darauf, dass es Vitamin D_3- Metaboliten enthalten muss, weil Vögel Metaboliten des Vitamin D_2 diskriminieren. Eine kombinierte Gas- Chromatographie und Massen- Spectrometrie erbrachte den Nachweis von Vitamin D_3 im Ätherextrakt des Goldhafers (RAMBECK et al., 1979). Allerdings erwies sich der Anteil als zu gering (100 µg/kg TM), um bei normalem Verzehr Kalzinose auslösen zu können. Vielmehr lösen Metaboliten des Vitamin D_3 die Erkrankung aus.
Durch Versuche von KREISL (1981) an rachitischen Hühnerküken, deren renale 1α-Hydroxylase durch Strontium inhibiert war, stellte man fest, dass, wie in Solanum glaucophyllum, auch in Trisetum flavescens $1,25(OH)_2D_3$ der aktive Metabolit ist.

Nach Versuchen möglicher synthetischer Glycoside des 1,25$(OH)_2D_3$ erwies sich das C25- Glycosid im Wachteleischalentest in den Parametern Serum- Calcium, Knochenaschegehalt, Calbindin und Calciumaussscheidung über die Eischale als wesentlich wirksamer als die Glycoside -C1 und -C3 (RAMBECK et al. 1985). Im Vergleich mit gemahlenen Trisetum flavescens- Blättern zeigte dieses synthetische Glycosid die gleiche Aktivität, sodass daraus geschlossen wurde, dass im Goldhafer das Calcitriol als C25- Glycosid vorliegt.

Es wurden viele Versuche unternommen, um den Gehalt an Vitamin D- Metaboliten in den Pflanzen zu beeinflussen. So zeigten Bestrahlungsversuche mit UV- Licht, dass Vitamin D in der Pflanze auf ähnlichem Weg entsteht, wie bei Tieren (ZUCKER et al.,1980, CURINO et al., 2001). In Versuchen von ZUCKER et al. (1980) reichte eine Exposition unter der UV- Lampe für drei Minuten aus, um eine messbare Vitamin D- Aktivität zu erzeugen. Andere Autoren postulieren eine lichtunabhängige Reaktion in Solanum glaucophyllum, die ebenfalls in der Lage ist, den B- Ring des 7-Dehydrocholesterols aufzubrechen und 1,25$(OH)_2D_3$ zu bilden (CURINO et al. 1998, BOLAND, 2003). Verschiedene Faktoren wie z.B. Calcium und Wachstumsfaktoren (Auxin und Kinetin), fördern diesen Syntheseschritt (CURINO et al., 2001). Werden Solanum glaucophyllum Pflanzen im calciumarmen Medium gezüchtet, kommt es zu einer Anhäufung von Cholecalciferol und 25- Hydroxycholecaciferol (ABURJAI et al., 1997), jedoch nicht zur Bildung von 1,25$(OH)_2D_3$.

Es wurden unterschiedliche Tiermodelle verwendet, um die biologische Aktivität des Goldhafers festzustellen. Hierbei waren unterschiedliche Parameter und Versuchsbedingungen dafür verantwortlich, dass unterschiedliche Vitamin D- artige Aktivitäten der eingesetzten Präparate festgestellt werden konnten.
Auch die Herkunft und Verarbeitung des verwendeten Pflanzenmaterials unterschied sich innerhalb der verschiedenen Versuchsreihen, so dass auch hier Gründe für unterschiedliche Ergebnisse zu suchen sind.
Die calcinogene Wirkung des Goldhafers bleibt auch im Heu erhalten, wobei Heu mit geringem Rohfaseranteil eine größere Vitamin D-ähnliche Wirksamkeit aufweist als Heu mit höherem Rohfaseranteil (WOLF und DIRKSEN, 1976).

Die Vitamin D- Metaboliten des Trisetums sind auch in Futter- Cobs (DIRKSEN et al., 1981) und siliertem Pflanzenmaterial enthalten (HEINRITZI et al., 1977). Einige Autoren beschäftigten sich mit der Stabilität der Vitamin D- Metaboliten in getrockneten S.g.- Blättern. CARILLO et al. (1971) konnten mit 2 Jahre zuvor gezüchteten und getrockneten S.g.- Blättern erfolgreich eine Intoxikation bei Rindern auslösen. Bei Versuchen von PUCHE et al. (1980) konnte sogar nach 4 Jahren noch die gleiche calcinogene Wirkung der S.g.- Präparate gemessen werden.

2.12 Therapeutischer Einsatz calcinogener Pflanzen

Nachdem die Wirkprinzipien einiger calcinogener Pflanzen ausreichend ergründet waren, wurde versucht Präparate aus diesen Pflanzen zur Prophylaxe und Therapie verschiedenster Erkrankungen bei Tieren und auch bei Menschen einzusetzen. Diese Pflanzen können als billige und schnell verfügbare Quellen als Ersatz für Präparate von Vitamin D- Metaboliten dienen. Allerdings ist eine genaue Dosierung der wirksamen Komponenten noch schwierig, da die Menge der calcinogenen Metaboliten in den Pflanzenpräparaten aus mehreren Gründen schwankt (MELLO, 2003). Vermutlich ist für den Gehalt an Vitamin D_3- Metaboliten das Wuchsalter der Pflanze, sowie ihre Klima- und Nährstoffbedingungen während des Wachstums verantwortlich.
Die Verwendung von calcinogenen Pflanzen hat gegenüber dem Einsatz von Vitamin D_3 den weitern Vorteil, dass sie direkt den aktiven Metaboliten 1,25D_3 enthalten und keine Metabolisierung im Köper mehr benötigen.
RAMBECK et al. (1991) zeigten, dass bei alten Hennen die 1-Hydroxylase- Aktivität reduziert ist. Sie erhielten bei Zusatz von 1, 2 und 4 µg 1,25$(OH)_2D_3$ zu 2.800 IE Vitamin D_3/kg Futter einen Anstieg sowohl in der Legeleistung als auch in der Calcium- Exkretion über die Eischale. Sie zogen daraus den Schluss, dass bei alten Hennen die geringere 1,25$(OH)_2D_3$ -Synthesekapazität zu einer minderwertigen Eischalenqualität führt.

Bei Tieren zählen vor allem Geflügel und Rinder zu den Spezies, bei denen Präparate aus calcinogenen Pflanzen zur Prophylaxe unterschiedlicher Erkrankungen eingesetzt werden können.
Am Ende einer jeden Legeperiode kommt es bei eierlegendem Geflügel zu vermehrtem Auftreten von Wind- und Brucheiern. Eine prophylaktische Gabe von Präparaten, die verhindern, dass die Eischale an Dicke verliert, kann große wirtschaftliche Verluste vermeiden.
MORRIS (1977) untersuchte nach Verfütterung von S.g.- Blättern in einer Dosierung im Futter von 3,5% den Effekt auf die Eischale. Er stellte ab dem zweiten Tag der Fütterung eine merkliche Zunahme der Eischalendicke fest.
Da durch die Enzootische Kalzinose bei Rindern bekannt war, dass eine übermäßige Aufnahme von calzinogenen Pflanzen zu einer Hypervitaminose mit Verkalkungen der Weichgewebe führt, wurden niedrigere Dosierungen mit ausreichend calcinogener Aktivität für S.g.- Präparate gesucht.
REICHENBÄCHER (1979) untersuchte bei Hennen, die am Ende ihrer Legeperiode standen, den Einfluss von 0,3% Solanum glaucophyllum und 15% Trisetum flavescens im Futter. Er stellte fest, dass Solanum in dieser niedrigen Dosierung keinen verbessernden Effekt auf die Eischale ausübt, wohingegen Trisetum deutlich zu einer Zunahme der Schalendicke führte. Beide Präparate zeigen in den Gruppen eine Verbesserung der Legeleistung.
Bei Rindern ist das sogenannte Milchfieber (Gebärparese) eine Entgleisung des Mineralstoffhaushalts bei kalbenden (Milch-) Kühen, die durch die plötzlich einsetzende hohe Calcium- Ausscheidung mit der Milch ausgelöst wird. Der Körper ist durch die Verluste gezwungen, seinen Calcium- Blutspiegel aus seinen Reserven wieder aufzufüllen. Da die Regulation einige Zeit in Anspruch nimmt, kommt es zu den klinischen Symptomen des Festliegens durch fortschreitende Lähmung der Muskulatur mit deutlicher Hypocalcämie und Hypophosphatämie. Da die Mortalitätsrate ohne Behandlung sehr hoch ist, ist sowohl eine erfolgreiche Therapieform als auch eine Prophylaxe von wirtschaftlichem Interesse. Eine anerkannte Therapiemethode ist die präventive Verabreichung von Vitamin D_3 und $1,25(OH)_2D_3$, was die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung deutlich sinken lässt.
BARLET et al. (1979) fanden heraus, dass Calcium- Infusionen der tragenden Kühe keine Veränderungen im fetalen Calcium- Plasmaspiegel nach sich zogen, wohingegen orale Gaben von Solanum glaucophyllum (25-50 g pro Tier) über 6 Tage

das Plasma- Calcium und Phosphor der Mutter und des Fetus ansteigen lässt und eine Hypocalcämie bei der Geburt verhindert.
ROUX et al. (1979) verabreichten Kühen 8 bis 2 Tage vor errechnetem Geburtstermin getrocknete Blätter von Solanum glaucophyllum in Dosierungen zwischen 20 und 30 g. Es konnte ein Absinken des Calcium- und Phosphatspiegels im Blut nach der Geburt verhindert werden.
KUNZ und HÄNICHEN (1981) führten Untersuchungen zum Einsatz von Solanum mit besonderem Blick auf die systemische Toleranz der Tiere durch. Nach Verfütterung von Solanum glaucophyllum in Dosierungen von 10 g und 20 g über fünf Tage kam es nach 19 bis 31 Tagen zu Verkalkungen unterschiedlichen Grades in der Aorta abdominalis. Sie schlussfolgerten daraus, dass alle bisher eingesetzten Dosierungen von Solanum mit einem hohen Risiko von Weichgewebeverkalkungen verbunden sind,
Daher untersuchte FRICKE 1985 den Einfluss von nicht- calcämischen Dosen von Solanum auf die Milchfieberprophylaxe. Er kam zu dem Ergebnis, dass bei ante partum Fütterung keine sichere Vorbeugung möglich ist, während bei Verabreichung von 15 g Solanum glaucophyllum zwei Tage vor und einen Tag nach der Geburt eine Prophylaxe erfolgt.
Neben Solanum wurde auch das in Europa heimische Gras Trisetum flavescens auf seinen Einfluss zur Verhinderung der Gebärparese hin untersucht. Nach DIRKSEN (1981) setzte auch BUCHELT (1986) Cobs aus Trisetum ein, musste allerdings feststellen, dass die größte Schwierigkeit darin bestand, eine ausreichende Aufnahme durch die Rinder zu erreichen. Es mussten mindestens 5 bis 6 kg dieser Cobs pro Tag über den Zeitraum vom sechsten bis dritten Tag vor der Geburt aufgenommen werden, um eine ausreichende Prophylaxe zu gewährleisten
Neben den Tieren gibt es auch beim Menschen Einsatzmöglichkeiten für Präparate aus calcinogenen Pflanzen. Prophylaktisch können sie bei erhöhter Inzidenz von Rachitis oder Osteomalazie eingesetzt werden. Im experimentellen Stadium haben sie auch in der Prävention von Zellentartung Erfolg. Zur Therapie werden sie bei chronischer Niereninsuffizienz eingesetzt (HERRATH et al., 1974; MAUTALEN et al., 1977), um die intestinale Calcium- Absorption zu steigern.

3. Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde in zwei Versuchsdurchgängen mit Hilfe des Wachteleischalentests, die Bioverfügbarkeit verschiedener Solanum glaucophyllum- und Trisetum flavescens Präparate im Vergleich mit Vitamin D_3 und dem Metaboliten $1,25(OH)_2D_3$ geprüft.

3.1 Versuchstiere

Insgesamt 326 Wachtelhennen der Art Coturnix coturnix japonica wurden in den Versuchen eingesetzt. Um eine möglichst hohe genetische Einheitlichkeit zu erreichen, wurden ausschließlich Hennen aus institutseigener Wachtelzucht verwendet. Im ersten Versuch betrug das Alter der 150 Tiere einheitlich 3 Monate, das Alter der 176 Tiere im zweiten Versuch 6 Monate.

3.2 Versuchsgruppen

Die Gruppenzusammensetzung der Wachteln erfolgte nach dem Wiegen der Tiere am ersten Versuchstag durch Ermittelung eines annähernd gleichen Durchschnittsgewichts pro Gruppe (= Käfigeinheit).
Der erste Versuch umfasste 150 Wachtelhennen, die zunächst in 10 Gruppen à 15 Tiere aufgeteilt waren; diese wurden jeweils als Gruppe (= 10 Gruppen) zusammengewogen. Am fünften Tage wurden neue Käfigeinheiten mit 10 Tieren pro Gruppe (= 15 Gruppen) gebildet.
Der zweite Versuch umfasste 176 Wachtelhennen, die in 16 Gruppen à 10 Tiere plus einer Reservegruppe mit 16 Tieren aufgeteilt waren.
Das Wiegen der Tiere erfolgte je einzeln.
Jede Gruppe bekam einen eigenen Käfig zugeteilt und diese Käfige wurden so im Raum so positioniert, dass Licht- und Temperaturbedingungen bestmöglich ausgeglichen waren.

3.3 Versuchstierhaltung

Die Wachtelhennen wurden während der Versuche in Drahtkäfigen der Größe 113 x 71 x 35 cm mit Drahtschiebetür gehalten. Der jeweilige Futtertrog befand sich an der Vorderseite des entsprechenden Käfigs, so dass er mit der verstellbaren Drahtschiebetür soweit abgedeckt war, dass übermäßiges Futterverstreuen ausgeschlossen werden konnte. Zur Wasseraufnahme standen pro Käfig zwei Nippeltränken zur Verfügung. Futter und Wasser konnte ad libitum aufgenommen werden. Unter jedem Käfig befand sich ein Kotblech, auf dem sich der Kot der Tiere sammelte.
96 dieser gleichartigen Käfige waren in 6 Reihen 4 stöckig in einem 17,5 m² großen Stall angeordnet. Der Stall war fensterlos und mit Leuchtstoffröhren 24 Stunden pro Tag gleichmäßig beleuchtet.
Die Belüftung und Heizung des Stalls erfolgte über eine Warmwasserheizung, die mit einer Belüftungsanlage kombiniert war (Centratherm CK-R, Fa. Centra- Buerkle, Schönaich). Die Temperatur im Stall wurde bei 20 ± 2 ºC konstant gehalten.

3.4 Probennahme

Die Wachteleier wurden täglich zum Feststellen der Legeleistung, des Eigewichts, des Eischalentrockengewichts und des Schalenanteils gesammelt.
Die Blutentnahme erfolgte jeweils am letzten Tag des Versuchs, nachdem die Tiere per Dekapitation getötet wurden.
Das in Serumröhrchen mit Granulat (Fa. Sarstedt, Art. Nr. 26323) aufgefangene Blut kam nach circa 2 Stunden Ruhezeit bei 3000 U/min für 12 Minuten in die Zentrifuge (Roto Silenta II, Fa. Hettich). Das in Cups hineinpipettierte Plasma wurde anschlie end bei -20 ºC tiefgefroren.
Im ersten Versuch wurden zusätzlich Knochenproben, durch Abtrennen der beiden Hinterextremitäten der Wachteln mit einer Schere, genommen. Die im Bereich des Hüftgelenks abgesetzten Knochen wurden in Gefrierbeuteln (Fa. Alfons Haaf, 50my) verpackt, die Beutel mit der jeweiligen Gruppennummer und der fortlaufenden Tiernummer beschriftet und ebenfalls bei -20 ºC tiefgefroren

3.5 Versuchsaufbau

Ein Versuchsdurchgang gliederte sich in 3 Phasen:
In der ersten Phase (Kontrollphase) wurde die tägliche Legeleistung der Wachtelgruppen festgestellt. Außerdem wurde die Gruppenzusammensetzung (Legeverhalten, Rangordnungskämpfe u.a.) und der Gesundheitszustand jeder Wachtel in der Gruppe beurteilt.
Die Gruppen mussten eine konstante Legeleistung von mindestens 80% aufweisen, um in die nächste Phase des Versuchs übergehen zu können. Im ersten Versuch waren für diese Phase 8, im zweiten Versuch 10 Tage angesetzt.
In der zweiten Phase (Depletionsphase) wurde bei den Vögeln durch Fütterung einer Vitamin D- freien Ration die Entleerung der Vitamin D- Speicher angestrebt. Parameter für die fortschreitende Depletion war die Abnahme der Legeleistung. Eine ausreichende Depletion lag vor, wenn die Gruppenlegeleistung über mindestens 3 Tage unter 50% sank. Bei den Tieren des ersten Versuchs dauerte diese Phase 18 Tage, bei den Tieren des zweiten Versuchs 19 Tage.
In der 21 Tage andauernden dritten Phase (Testphase) wurden die zu testenden Vitamin D- Präparate verfüttert. Festgehaltene Parameter in dieser Phase waren die tägliche Legeleistung, das Frischeigewicht, das Eischalentrockengewicht und der Schalenanteil.
Am Versuchsende wurden die Wachteln einzeln gewogen, per Dekapitation getötet und Blut- sowie Knochenproben entnommen.
Tabellarisch stellt sich der Versuchsaufbau wie folgt dar:

Tabelle 4: Zeitlicher Verlauf der Versuche 1 und 2

Versuch 1:

Phase 1 "Kontrollphase"	8 Tage
Phase 2 "Depletionsphase"	18 Tage
Phase 3 " Testphase"	21 Tage

Versuch 2:

Phase 1 "Kontrollphase"	10 Tage
Phase 2 "Depletionsphase"	19 Tage
Phase 3 " Testphase"	21 Tage

3.6 Futterzusammensetzung und -herstellung

Da in der Kontrollphase die ursprüngliche Legeleistung der Wachtelhennen bei standardisierter Fütterung überprüft werden sollte, kam ein übliches Zuchtwachtelalleinfutter zum Einsatz. Der Vitamin D_3 Gehalt in diesem Futter betrug 1320 IE/kg. Die Zusammensetzung und der Rohnährstoffgehalt ist in Tabelle 5 aufgeführt.
Während der Depletionsphase musste ein Vitamin D- freies Futter verwendet werden, das durch Einmischen einer Vitamin D- freien Vitaminvormischung in die Basalration hergestellt wurde. Vitaminvormischung siehe Tabelle 7
In der Testphase bekam jede Gruppe ein eigens für sie hergestelltes Futter zu fressen.
Die zu testenden Präparate wurden in die gleiche Vitamin D- freie Basale (Grundfutter) eingemischt, die auch in der Depletionsphase Verwendung fand.
Die Herstellung aller Futterrationen erfolgte unmittelbar vor Versuchsbeginn im institutseigenen Mischraum mit Pflugscharmischern.
Zur Berechnung der benötigten Futtermengen wurde von einem Futterverbrauch von 25 g pro Tier und Tag ausgegangen. Außerdem wurden Futterverluste und eine Futtermenge zur Füllung des Troges (= Bodenfüllung) mit berücksichtigt. Daher ergab die Rechnung für den ersten Versuch pro Gruppe (à 10 Tiere) 8 kg Futter, für den zweiten Versuch pro Gruppe mit 10 Tieren ebenfalls 8 kg und für die Gruppe mit 7 Tieren 6 kg Futter.
Um eine gleichmäßige Verteilung der Vitamine und Spurenelemente (Tabelle 8) zu ereichen, wurde jeweils eine Vormischung im 500 g Mischer angefertigt, bevor sie zur Basale hinzugefügt wurden.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Zuchtwachtelalleinfutters (Angaben in %)*

Komponenten	Anteil in %
Maisschrot	37
Sojaschrot	44
Molkenpulver	1
Calciumcarbonat	6,2
Cefkaphos	1,35
Ca-proprionat	0,5
Natriumchlorid	0,3
DL-Methionin	0,25
Zn-Sulfat Heptahydrat	0,05
Bierhefe	1,75
Grünmehl	3
Carophyll rot	0,02
Mais	0,18
Sojaöl	4
Spurenelementvormischung	0,1
Vitaminvormischung	0,3
Gesamt	*100,00*

* Mischtabelle des Instituts für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung, LMU München

Tabelle 6: Rohnährstoffgehalt des Zuchtwachtelalleinfutters (Angaben in % der Trockensubstanz (TS))

Rohnährstoffe	Anteil in % der TS
Rohprotein	26,4
Rohfett	7,1
Rohfaser	3,9
Rohasche	13,7
Nfe	48,9
Gesamt	*100,0*

Tabelle 7: Mischanweisung für Vitaminvormischung (Angaben in g/kg)

Komponenten	Anteil in g/kg Vormischung
Vitamin A (500.000 IE/g)	10,00
Vitamin D_3 *(500.000 IE/g)	0,88
Vitamin E	24,00
Vitamin C	30,00
Vitamin K_3 51%	0,78
Vitamin B_1 98%	2,22
Vitamin B_2 96%	3,12
Vitamin B_6 96%	1,22
Vitamin B_{12} 0,1%	10,00
Nikotinsäure	18,00
Ca- Pantothenat	6,52
Folsäure	0,06
Biotin 2%	1,50
Cholinchlorid 50%	345,66
Sojafeinmehl	546,04
Gesamt	*1000,00*

* Vitaminvormischung für Depletionsfutter enthält kein Vitamin D_3. Vitamin D_3- Anteil wurde hier durch Sojafeinmehl ersetzt.

Tabelle 8: Mischanweisung für Spurenelementvormischung (Angaben in g/kg)

Komponenten	Anteil in g/kg Vormischung
MgO	116,67
Cu- Acetat	37,74
Co- Sulfat	4,76
Na- Fluorid	11,04
Fe- Fumarat	307,77
Mn- Sulfat	246,15
K- Iodid	3,27
Na- Selenit	1,67
Zn- Acetat	268,46
Maisstärke	2,47
Gesamt	*1000,00*

3.6.1 Verwendete Versuchspräparate

Bei dem eingesetzten Vitamin D_3 handelte es sich um ein Präparat der Firma Roche (Rovimix® D_3-500, Code 044014 0004, Lot No UE 00112109), das, wie in Tabelle 7 dargestellt, mindestens 500.000 IE Vit D_3 (E671) pro Gramm enthält.
Es wurde in beiden Versuchen in den Dosierungen 100 IE/kg Futter, 200 IE/kg Futter und 400 IE/kg Futter als Standardrationen eingesetzt.
Das ebenfalls in beiden Versuchen mitgeführte $1,25(OH)_2D_3$ wurde in Konzentrationen von 0,125 µg/kg Futter, 0,25 µg/kg Futter, 0,5 µg/kg Futter und 1 µg/kg Futter eingemischt. Diese beiden Präparate dienten in ihrer unterschiedlichen Dosierung als Bezugsration für die zu testenden Präparate.
Im ersten Versuch wurden in unterschiedlicher Dosierung die gemahlenen Stängel von Solanum glaucophyllum, Extrakte derselbigen mit und ohne den Zusatz von Glucosidase, gewonnen aus Aspergillus niger, sowie Trisetum flavescens getestet (Tabelle 9).
Im zweiten Versuch kamen ebenfalls in unterschiedlicher Dosierung Reinextrakte und Hydrolysate sowie gemahlenen Blättern von Solanum glaucophyllum mit und ohne den Zusatz von Glucosidase, zum Einsatz (Tabelle 10). Die Präparate stellte die Firma Herbonis zur Verfügung.

Versuch 1

Tabelle 9: Eingesetzte Präparate und Dosierungen im ersten Versuch

Gruppe	Tierzahl	Präparat	Dosierung/kg Futter
1	10	Vitamin D_3	100 IE/kg
2	10	Vitamin D_3	200 IE/kg
3	10	Vitamin D_3	400 IE/kg
4	10	$1,25(OH)_2D_3$	0,125 µg/kg
5	10	$1,25(OH)_2D_3$	0,25 µg/kg
6	10	$1,25(OH)_2D_3$	0,5 µg/kg
7	10	Stängel Solanum glaucophyllum	3 g/kg
8	10	Trisetum flavescens	8 g/kg
9	10	Trisetum flavescens	24 g/kg
10	10	S.g.- Extrakt	0,1 g/kg
11	10	S.g.- Extrakt	0,3 g/kg
12	10	S.g.- Extrakt	1,0 g/kg
13	10	S.g.- Extrakt	3,0 g/kg
14	10	S.g.- Extrakt + Glucosidase	0,3 g/kg + 20 mg/kg Glucosidase
15	10	S.g.- Extrakt + Glucosidase	1,0 g/kg + 20 mg/kg Glucosidase

Versuch 2

Tabelle 10: Eingesetzte Präparate und Dosierungen im zweiten Versuch

Gruppe	Tierzahl	Präparat	Dosierung/kg Futter
1	10	Vitamin D_3	100 IE/kg
2	10	Vitamin D_3	200 IE/kg
3	10	Vitamin D_3	400 IE/kg
4	10	$1,25(OH)_2D_3$	0,25 µg/kg
5	10	$1,25(OH)_2D_3$	0,5 µg/kg
6	10	$1,25(OH)_2D_3$	1,0 µg/kg
7	10	S.g.- Reinextrakt	2 mg/kg
8	10	S.g.- Reinextrakt	8 mg/kg
9	10	S.g.- Reinextrakt	32 mg/kg
10	10	S.g.- Reinextrakt	128 mg/kg
11	7	S.g.- Reinextrakt	512 mg/kg
12	10	S.g.- Reinextrakt + Glucosidase	3 mg/kg + 40 mg/kg Glucosidase
13	10	S.g.- Hydrolysat	7,5 mg/kg
14	10	S.g.- Hydrolysat	15,0 mg/kg
15	10	S.g.- Hydrolysat	30,0 mg/kg
16	10	Gemahlene Blätter von S.g.	1000,0 mg/kg

3.6.2 Einmischen der Versuchspräparate in die Gesamtrationen

Ausgehend von einem täglichen Futterverzehr von 25 g pro Tier und Tag und einer Sicherheitsspanne mussten die pro kg angegebenen Präparatdosierungen auf eine Futtermenge von 8 kg pro Gruppe, mit Ausnahme der Gruppe 11 im zweiten Versuch (6 kg Futter) hochgerechnet werden.
Da diese kleinen Präparatmengen gleichmäßig im Futter verteilt werden sollten, mussten sie im 500 g- Mischer mit 240 g Sojafeinmehl (entspr. 3% von 8 kg) vorgemischt werden. Anschlie end wurde diese Vormischung mit 7440 g Basale (entspr. 93% von 8 kg) und 320 g Sojaöl (entspr. 4% von 8 kg) im 8 kg- Mischer zu einer homogenen Ration vermischt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Komponenten der Futterration (Angaben in %)

Komponenten	**Anteil in %**
Basale	93
Sojafeinmehl	3
Sojaöl	4
Gesamt	100

Vor Beginn musste von dem verwendeten Vitamin D_3- Präparat (500.000 IE/g) eine Vormischung mit 100 IE/g hergestellt werden, da sonst ein genaues Einwiegen nicht möglich gewesen wäre. Als Trägersubstanz diente Sojafeinmehl.
Das in ethanolischer Lösung vorliegende $1,25(OH)_2D_3$ wurde zunächst von ursprünglich 205 µg/ml mit Ethanol auf 20,5 µg/ml verdünnt. Die entsprechende Menge wurde jeweils mit der Pipette entnommen und auf das mit Petrolether 40-60º (Fa. Carl Roth, Rotipuran®, Art-Nr. T173.3) durchtränkte Sojafeinmehl gegeben. Nach guter Durchmischung erfolgte eine schonende Trocknung unter dem Abzug. Diese Vormischungen wurden dann ebenfalls im Pflugscharmischer mit den anderen Komponenten gründlich vermischt.
Die zu testenden Präparate von Solanum glaucophyllum und Trisetum flavescens wurden in gleicher Weise über einen ersten Mischvorgang mit Sojafeinmehl in die Gesamtration eingemischt.

3.7 Untersuchte Parameter:

3.7.1 Gesundheitszustand und Mortalitätsrate

Die adspectorische Untersuchung des Gesundheitszustands der Tiere erfolgte einmal täglich beim Kontrollgang.
Gleichzeitig wurden die Käfige überprüft und die Nippeltränken kontrolliert. Futter wurde täglich oder alle zwei Tage nachgefüllt, die Kotbleche einmal wöchentlich gereinigt.
Tote Tiere wurden sofort aus den Käfigen entfernt, gewogen, adspectorisch auf ihre Todesursache hin untersucht und die Daten zur Auswertung notiert.

3.7.2 Futterverzehr

Die Feststellung des Futterverzehr erfolgte ausschließlich in der jeweils dreiwöchigen Testphase der beiden Versuche.
Dazu wurden nach der Depletionsphase die Futtertröge sorgfältig gereinigt und mit einer abgewogenen Menge des entsprechenden Futters gefüllt. Die täglich zugefütterte Menge Futter, ausgehend von einem durchschnittlichen Futterverzehr von 25 g pro Tier und Tag, wurde ebenfalls notiert. Am Ende des Versuchs wurde das übriggebliebene Futter rückgewogen.
Aus diesen Daten lie sich die Menge des gefressenen Futters pro Gruppe und nach Einbeziehung der " Wachteltage" (= Summe der Lebenstage aller Wachteln einer Käfigeinheit während des Versuchszeitraums) auch der Futterverzehr pro Wachtel und Tag errechnen.

$$\text{Futterverbrauch/Tier/Tag [g]} = \frac{\text{Gesamtfutterverbrauch [g]/Tierzahl}}{\text{Wachteltage}}$$

Um eine Verfälschung der Werte durch Futterverluste weitmöglich zu verhindern, wurden die Futtertröge so gesichert, dass zwar ein freier Zugang und eine ad libitum Aufnahme von Futter durch die Vögel möglich war, Futterverstreuen durch Baden darin jedoch verhindert wurde.

Zusätzlich zum Futterverbrauch pro Tier und Tag ließ sich aus den gesammelten Daten mit Hilfe nachfolgender Formeln auch der Futterverbrauch pro gelegtem Ei und pro Gramm Eischale darstellen.

$$\text{Futterverbrauch/ Ei [g]} = \frac{\text{Gesamtfutterverbrauch [g]}}{\text{Eizahl gesamt}}$$

$$\text{Futterverbrauch/ Gramm Eischale [g]} = \frac{\text{Gesamtfutterverbrauch [g]}}{\text{Schalengewicht ges.}}$$

3.7.3 Legeleistung

Während aller Phasen der Versuche wurden täglich vormittags (11Uhr ± 3 Stunden) die Eier aus den Käfigen herausgesammelt und ihre Anzahl je Käfigeinheit notiert. Aus dem Verhältnis der Zahl der Eier zur Zahl der Tiere ließ sich die prozentuale Legeleistung pro Gruppe berechnen. Zur Auswertung wurden die Legeleistungen der einzelnen Gruppen während verschiedener Abschnitte der Hauptphase des Versuchs berechnet. Diese Abschnitte beziehen sich auf Tag 5 bis 21, Tag 1 bis 7, Tag 8 bis 14, Tag 15 bis 21 und wurden nach anschließender Formel berechnet.

$$\text{Legeleistung Tag x bis y [\%]} = \frac{\text{Summe Legeleistung [\%] Tag x bis y}}{\text{Summe Tage Tag x bis Tag y}}$$

3.7.4 Eigewicht

Während der gesamten Testphase wurden täglich vormittags die Eier nach Gruppen getrennt gezählt und aus den Käfigen entfernt. Die Bestimmung des Frischeigewichts aller Eier einer Gruppe erfolgte auf einer Waage (Fa. Mettler, PS 15). Zur Auswertung wurde folgende Formel herangezogen:

$$\text{Eigewicht [g]} = \frac{\text{Summe Eigewichte Tag x bis y}}{\text{Summe der Tage Tag x bis Tag y}}$$

3.7.5 Eischalentrockengewicht

Nach der Bestimmung des Frischeigewichts, wurden die Eier nach Gruppen getrennt mit einer Schere so aufgeschnitten, dass keine Schale oder Schalenteile verloren gingen. Der Inhalt wurde entnommen, die Eierschalen mit Aqua dest. gründlich ausgespült, um Reste von Eiklar und -dotter zu entfernen. In einer beschrifteten Petrischale kamen die Schalen gruppenweise 24 Stunden zum Trocknen bei 105 ºC in den Trockenschrank (Fa. Memmert, V60). Nach vollständigem Erkalten im Exsikator (Glaswerk Wertheim) erfolgte das Wiegen der getrockneten Eierschalen auf der Analysenwaage (Fa. Mettler, AE 160 - Meßgenauigkeit 10^{-4} g-). Für den Parameter Eischalentrockengewicht pro Tier kam folgende Formel zum Einsatz:

$$\text{Eischalentrockengewicht Tag x bis y} = \frac{\text{Summe Eischalen-TS Tag x bis y}}{\text{Summe der Tage Tag x bis Tag y}}$$

3.7.6 Schalenanteil (prozentuales Schalentrockengewicht)

Dieser Parameter beschreibt den prozentualen Anteil der Schale am Gesamteigewicht und lässt sich rechnerisch wie folgt darstellen:

$$\text{Schalentrockengewicht [\%]} = \frac{\text{Eischalentrockengewicht [g] x 100 \%}}{\text{Eigewicht [g]}}$$

3.7.7 Körpergewicht

Am Tag vor Beginn des ersten Versuchs wurden jeweils 15 Tiere als Gruppe (= Käfigeinheit) gewogen und ihr Gesamtgewicht bestimmt. Am fünften Tag wurde die Tierzahl pro Gruppe verringert und die Gruppenanzahl vergrö ert, so dass diesmal 10 Tiere pro Gruppe zusammen gewogen wurden (= neue Käfigeinheit). Am Tag vor dem Beginn des zweiten Versuchs wurden ebenfalls jeweils 10 Tiere als Gruppe gewogen und ihr Gesamtgewicht bestimmt. Am jeweils letzten Tag der Versuche (Schlachttag) kam jede einzelne Wachtel alleine auf die Waage (Fa. Mettler, PS 15), um ihr genaues Gewicht zu bestimmen.
Aus den Einzelgewichten errechnete sich das Gesamtgewicht der jeweiligen Gruppe.

3.7.8 Serumcalcium

Die Serumcalciumbestimmung erfolgte am Flammenphotometer (Eppendorf, ELEX 6361 mit Acetylengas). Das tiefgefrorene Serum wurde langsam bis auf 20ºC erwärmt. Für eine 1:2 Verdünnung wurden 40 µl Serum mit 2 ml 5%iger Lithiumchloridlösung (Verdünnung von Eppendorf Li-Stammlösung) im Diluter (Eppendorf, Diluter 5213) vermischt. Die Messung erfolgte immer im Doppelansatz. Der Calcium- Gehalt der Probe errechnet sich nach folgender Formel anhand seiner Extinktion:

$$\text{Ca [g/l]} = \frac{\text{Messwert [mmol/l] x Molgewicht von Ca 40,08 [g/mol] x Verdünnungsstufe}}{1000}$$

Der Calciumgehalt im Serum innerhalb einer Versuchsgruppe ergibt sich als Mittelwert aus den Einzelwerten innerhalb der Gruppe.

Reagenzien:

- **Li-Stammlösung**
  Best.Nr. 0030 306 007, Ch.B. 40136001, 500 mmol/l
  Eppendorf AG

3.7.9 Alkalische Phosphatase (ALP) im Serum

Die Serumaktivität der ALP wurde spectralphotometrisch am Photometer Genesys 10 UV (Fa. Thermo Spectronic) bestimmt. Da es sich bei diesem Parameter um eine temperaturabhängige Reaktion handelt, mussten die Serumproben auch während des Messvorgangs auf 37ºC gehalten werden. Dies war durch eine wasserbeheizte Küvettenhalterung im Photometer möglich.
Das tiefgefrorene Serum wurde im Heizblock (Fa. Liebisch) bei 37 ºC aufgetaut und auf dieser Temperatur konstant gehalten.
Auch das zuzusetzende Puffer- Reaktionslösungsgemisch wurde, in Küvetten (Plastibrand®, 1,5ml halbmikro, Cat.No. 759015) pipettiert, im Heizblock auf 37ºC gebracht.

Direkt vor der Messung wurden 1000 µl Puffer- Reagenzlösung und 20 µl Plasma in der Küvette mit einem Plastikrührspatel (Fa. Sarstedt, Best.Nr. 81970) miteinander vermischt und in das Photometer gestellt. Gemessen wurde die Extinktion der Lösung bei einer Wellenlänge von 405 nm nach 30 Sekunden (Vorlaufzeit), nach einer, zwei, drei und vier Minuten.
Dieser Wert wurde mehrmals ermittelt, da der ALP- Messung eine fortschreitende enzymaytische Reaktion zugrunde liegt. Hierbei wird durch Anwesenheit von Alkalischer Phosphatase im Serum, vom Reagenz Nitrophenylphosphat, der Phosphatrest abgespalten. Zurück bleiben Nitrophenolat- Anione, die in alkalischem Milieu zu einer messbaren gelben Verfärbung führen. Photometrisch lässt sich diese Gelbfärbung optimal bei 405 nm messen.
Aus den Werten der Zunahme der Absorption ergibt sich der Messwert, der mit 3306 multipliziert, den Gehalt an ALP im Serum wiedergibt. Auch diese Messung wurde im Doppelansatz durchgeführt.

ALP [U/L]= Mittelwert der Extinktionsdifferenzen x 3306

Reagenzien:

- zur Herstellung von 100 ml Pufferlösung mit pH 10,4:
  - **23,3ml Alkalische Pufferlösung 221**
    2-Amino-2-methyl-1-propanol buffer 1,5 mol/l, pH 10,3 at 25ºC
    Lot 051 K 605, Best.Nr. 221
    Fa. Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis, USA,
  - **74,44 mg Ethylendiamintetraessigsäure-dinatriumsalz**(EDTA-2Na)
    Lot.No. 6858C, Cat.Nr. 152522
    Fa. ICN Biomedicals GmbH, D-Eschwege
  - **42,89 mg Magnesium- Tetrahydrat** [$(CH_3COO)_2Mgx4H_2O$)]p.a.
    Charge A 322119 217, Best.Nr. 105819
    Fa. Merck, D-Darmstadt
  - **28,75 mg Zinksulfat- Heptahydrat** [$ZnSO_4x7H_2O$] p.a.
    Charge TA 1012 783 221, Best.Nr. 108883
    Fa. Merck, D-Darmstadt
  - Millipor zum Auffüllen

- Reaktionssubstrat:
  p- Nitrophenylphosphat Disodiumsalt Hexahydrate [$C_6H_4NO_6PNa_2x6\ H_2O$]
  Lot.No. 2732E Cat.No. 100878
  Fa. ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA

- zur Herstellung des Puffer- Reaktionslösungsgemisches:
  148,4 mg Reaktionssubstrat in 100 ml Puffer lösen

3.7.10 Knochenaschegehalt

Von den bei der Probennahme tiefgefrorenen Hinterextremitäten der Wachteln des ersten Versuchs wurde jeweils das rechte Bein zur Bestimmung herangezogen, während das andere als Rückstellprobe weiterhin bei -20ºC im Tiefkühlschrank verblieb.
Direkt bei der Entnahme aus den beschrifteten Gefrierbeuteln erfolgte die Markierung mit nummerierten Flügelmarken (Fa. Hauptner).
Nach 15 minütigem Antauen bei Zimmertemperatur wurden die Proben in einem Topf mit Aqua dest. 30 Minuten gekocht. Dieser Vorgang erleichterte das manuelle Entfernen der Muskeln, Sehnen und anderen Weichteilen vom Knochen.
Die gesäuberten Knochen kamen zusammen mit der entsprechenden Flügelmarke in Petrischalen 24 Stunden bei 105ºC in den Trockenschrank (Fa. Memmert). Das getrennte Wiegen von Femur und Tibia erfolgte, nachdem die Proben vollständig im Exsikator ausgekühlt waren, mit der Waage (Fa. Mettler, AE 160) -Meßgenauigkeit 10^{-4} g -.
Nach dem ermittelten Knochentrockengewicht, wurden Femur und Tibia jeder Wachtel getrennt in nummerierten Aschetiegeln im Muffelofen (Fa. Heraeus) bei 550ºC 24 Stunden verascht. Nach Auskühlen im Exsikator wurde das Knochenaschegewicht durch erneutes Wiegen auf der gleichen Waage bestimmt.
Aus diesen beiden Parametern lä t sich der relative Knochenaschegehalt nach folgender Formel errechnen:

$$\text{Knochenaschegehalt [\%]} = \frac{\text{Knochenaschegewicht [g] x 100\%}}{\text{Knochentrockengewicht [g]}}$$

Benötigt wird diese Prozentzahl, um den Grad der Knochenmineralisation der einzelnen Gruppen miteinander vergleichen zu können.
Im zweiten Versuch fand die Bestimmung dieses Parameters und im folgenden Calcium und Phosphor in der Knochenasche nicht mehr statt.

3.7.11 Calcium in der Knochenasche

Um den Calciumgehalt in der Knochenasche bestimmen zu können, wurden die veraschten Knochen in konzentrierter Salzsäure (Fa. neolab Migge, 37%) aufgelöst und mit Aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt.
Da für die Messung eine 1:1000 Verdünnung notwendig war, wurden 0,1 ml der oben genannten Knochenlösung in ein 10 ml Reagenzglas pipetttiert und erneut mit Aqua dest. aufgefüllt.
Umgefüllt in spezielle Reaktionsgefä e (Eppendorf 3810), erfolgte nach Aufrufen des entsprechenden Progammes und kalibrieren mit speziellem Urin- Standard (Eppendorf) die vollautomatische Messung am Flammenphotometer EFOX 5053 (Eppendorf).
Da das Gerät aus der Humanmedizin stammt und noch keine Serum- Standards für Tiere verfügbar sind, musste mit Human- Standards gemessen werden. Der Serum-Standard ist jedoch nicht geeignet, da im Wachtelserum höhere Calcium- Werte erwartet werden, als im Human- Serum. Daher lässt sich gut der verwendete Urin-Standard einsetzten.
Das Prinzip dieser Messung beruht darauf, dass die Probenlösung mit Acetylengas in der Flamme des Flammenphotometers verbrennt und dabei eine entsprechende Lichtmenge ausgestrahlt. Je höher die Konzentration des Calciums in der Probe, desto stärker ist die zu messende Lichtintensität.
Wie bei allen anderen Messungen erfolgte auch hier eine Doppelbestimmung jeder Probe. Der Calciumgehalt in g/kg errechnet sich aus folgende Formel, die das molare Gewicht des Calciums berücksichtigt:

$$\text{Ca [g/kg]} = \frac{\text{40,08 [g/mol] x Messwert [mmol/l] x Verdünnung (10ml ausVeraschung)}}{\text{1000 x Einwaage [g]}}$$

Reagenzien:

- **Salzsäure 37% zur Analyse**
  Art. Nr. 5025. 2500, 2,5l, Charge 0601 M 6461
  neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, D- Heidelberg
- **Urin- Standard**
  Cat No 0030 358.007 , Ch.-B. 40235102
  Eppendorf AG

3.7.12 Phosphor in der Knochenasche

Der Phosphorgehalt in der Knochenasche wurde am Spectralphotometer (Genesys 10 UV, Fa. Thermo Spectronic) bestimmt. Hierzu war eine 1:100 Verdünnung der in 37%iger Salzsäure aufgelösten Wachtelknochen (vgl. Abschnitt Knochenaschegehalt 3.7.10) notwendig. Diese Verdünnung wurde hergestellt, indem 1 ml der ursprünglichen 1:10 Verdünnung mit Aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt wurde.
Da mit dem Photometer Extinktionen von Lösungen unterschiedlicher Farbintensität gemessen werden, wurden Trichloressigsäure (TCA), Ammoniummolybdat und Ammoniumvanadat als Reagenzien zugesetzt. In Einmalküvetten (Plastibrand®, 2,5 ml makro, Cat. No 759005) wurde zu 0,5 ml verdünnter Knochenasche (1:100) 1 ml TCA, 1 ml Ammoniummolybdat und 1 ml Ammoniumvanadat hinzupipettiert und gemischt. Während 10 Minuten Wartezeit konnte die Reaktion vollständig ablaufen und es bildete sich Phosphomolybdänsäure, deren gelbe Farbe bei ihrem Absorptionsmaximum von 366 nm zu messen war.
Um einen Nullwert zu bestimmen, wurde die Mischung aus TCA, Ammoniummolybdat und Ammoniumvanadat ohne Zusatz von Knochenasche gemessen.
Die Umrechnung des Messwerts in den tatsächlichen Gehalt an Phosphor in g/kg Knochenasche erfolgte nach folgender Formel:

$$P\ [g/kg] = \frac{\text{Messwert} \times 10{,}5 \times \text{Verdünnung}}{\text{Standard} \times 100 \times \text{Ascheeinwaage}}$$

Standard = 0,34

Reagenzien:

- **Trichloressigsäure (TCA)**
  Art.Nr. 810, 0,6n (98 g TCA in 1 l Aqua dest. mischen), 163,9 mol/g
  Fa. Merk, D-Darmstadt
- **Ammoniummolybdat- Lösung**
  Art.Nr. 1182 (40 mmol Ammoniummolybdat in 2,5n H_2SO_4) 49,4 g Molybdat
  Molgewicht 1235,86, 130 ml H_2SO_4 (98%ig) in 1 l Aqua dest. lösen
  Fa. Merk, D- Darmstadt
- **Ammoniumvanadat- Lösung**
  Art.Nr. 1226 (21 mmol Ammoniumvanadat in 2,8n HNO_3) 2,46 g Vanadat
  Molgewicht 116,9, 280 ml 1n HNO_3 in 1 l Aqua dest. lösen
  Fa. Merk, D- Darmstadt

3.8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gesammelten Daten erfolgte mit dem computergestützten Statistikprogramm SAS (statistical analysis system) der Firma SAS- Institute GmbH. Aus den jeweiligen Einzelwerten wurden die Mittelwerte (MW) und die Standardabweichungen (STABW) berechnet. Zur Beurteilung der Vergleichbarkeit der Einzelwerte einer Gruppe eines Versuchsdurchgangs wurde der least square means test (LS- MEANS) angewendet. Zur Beurteilung der Unterschiede zwischen den Gruppen eines Versuchsdurchgangs wurde der t- Test herangezogen. Signifikante Unterschiede wurden jeweils in den Tabellen mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1 Versuch 1

4.1.1 Gesundheitszustand der Versuchstiere und Mortalität

In allen 3 Phasen des ersten Versuchs war das Allgemeinbefinden der Wachteln unauffällig.
Während der 21 Tage dauernden Testphase des ersten Versuchs starben insgesamt 7 von 146 Tieren. 2 Wachteln verendeten an Genickbruch nach Einklemmen des Kopfes zwischen den Gitterstäben der Käfige, 4 mussten aufgrund von Legedarmvorfällen und ein Tier wegen Kümmern ohne weitere konkrete Symptome getötet werden. Das entspricht einer Gesamtmortalität von 4,8%.
In der Gruppe, deren Tiere 8 g Trisetum flavescens/kg Futter als Diätzusatz bekamen, mussten 3 von 10 Tieren wegen Legedarmvorfällen getötet werden; das entspricht einer Mortalitätsrate in dieser Gruppe von 30,0%.

4.1.2 Tiergewicht und Gewichtsentwicklung

Die Wachteln wurden an Tag 1 und Tag 5 der Kontrollphase in Gruppen und am Schlachttag der Versuchsphase einzeln gewogen. Es zeigt sich, dass das Durchschnittskörpergewicht der Tiere in fast allen Gruppen geringfügig abnimmt. Diese Gewichtsabnahme ist in den Gruppen mit Vitamin D_3 als Diätzusatz im Futter am geringsten und lässt sich hier auch nicht als signifikant darstellen.
Am deutlichsten ausgeprägt ist die Gewichtsreduktion in der Gruppe, die 0,1 g S.g.-Roh-Extrakt/kg Futter bekam. Eine geringe Tendenz zur Gewichtszunahme ist in den Gruppen mit folgenden Diätzusätzen zu verzeichnen: 0,25 µg $1,25(OH)_2D_3$, 0,3 g Roh-Extrakt aus Solanum glaucophyllum.
Die durchschnittlichen Körpergewichte der Wachteln sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Durchschnittliche Tiergewichte [g] (Mittelwert ± Standardabweichung), Versuch 1

Diätzusätze/ kg Futter	Tiergewicht [g] Tag 1 Kontrollphase n= 15 Tiere $\bar{x}$	Tiergewicht [g] Tag 5 Kontrollphase n= 10 Tiere $\bar{x}$	Tiergewicht [g] Schlachttag $\bar{x}$	±s
100 IE Vitamin D_3	154,1	152,7	146,4	8,4
200 IE Vitamin D_3	152,5	156,3	154,2	13,5
400 IE Vitamin D_3	151,5	153,3	150,3	12,8
0,125 µg 1,25$(OH)_2D_3$	155,0	151,6	142,8	11,9
0,25 µg 1,25$(OH)_2D_3$	153,4	142,7	152,6	11,2
0,5 µg 1,25$(OH)_2D_3$	152,1	151,3	144,4	9,4
3 g Stängel Solanum glaucophyllum	153,0	153,1	144,7	11,2
8 g Trisetum flavescens	152,1	156,8	156,6	13,9
24 g Trisetum flavescens	151,6	153,3	146,5	10,7
0,1 g S.g.- Roh-Extrakt	152,1	156,1	136,3[a]	14,9
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt		150,4	153,0[a]	10,2
1 g S.g.- Roh-Extrakt		157,1	144,4	12,4
3 g S.g.- Roh-Extrakt		153,0	142,8	14,8
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase		154,5	142,6	11,4
1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase		153,4	141,7	9,6

Buchstabe kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:

a = $p \leq 0,01$ zwischen Gruppen 0,1 g S.g.- Rohextrakt und 0,3 g S.g.- Rohextrakt

4.1.3 Futterverbrauch

Der durchschnittliche Futterverbrauch pro Tier und Tag beträgt im ersten Versuch 30,79 g. Den höchsten Verbrauch mit 33,86 g zeigt die Gruppe mit der Zufütterung von 1 g S.g.- Roh-Extrakt/kg Futter + Glucosidase.
Den niedrigsten Wert hingegen weist die Gruppe mit dem Futterzusatz von 0,1 g S.g.- Roh-Extrakt auf.
Bei den restlichen Gruppen variiert der Durchschnittswert nur geringfügig, so dass keine signifikanten Unterschiede festzustellen sind.

Der durchschnittliche Futterverbrauch pro gelegtem Ei beträgt 54,00 g. Bei diesem Parameter sind zwischen den Gruppen deutliche Schwankungen festzustellen. Zu den einzelnen Werten siehe Tabelle 13. Mit jeweils über 80 g weisen die Gruppen mit der niedrigsten Dosierung $1,25(OH)_2D_3$ und der niedrigsten Dosierung Trisetum flavescens die höchsten Werte auf. Die Gruppe, die den S.g.- Rohextrakt in größten Menge erhalten hat, liegt mit ihrem Futterverbrauch von 37,85 g pro Ei noch unter den Werten der Vitamin D_3 -Standardgruppen.

Der durchschnittliche Futterverbrauch pro Gramm Eischalen- TS beträgt 60,87 g.
In den Gruppen mit steigender Dosierung Vitamin D_3 und $1,25(OH)_2D_3$ ist eine abnehmende Tendenz im Futterverbrauch merklich zu erkennen. Diese Tendenz ist auch bei den Gruppen, die Trisetum flavescens erhielten, noch deutlich zu sehen. Bei den Gruppen mit Zufütterung von S.g.- Rohextrakt ist eine solche Eindeutigkeit nicht zu erkennen.

Tabelle 13: Durchschnittlicher Futterverbrauch pro Tier und Tag [g], pro Ei [g] und pro Gramm Eischale [g], Tag 1 bis 21, Versuch 1

Diätzusatz/ kg Futter	Futterverbrauch pro Tier und Tag [g] $\underline{x}$	Futterverbrauch pro Ei [g] $\bar{x}$	Futterverbrauch pro Gramm Eischale [g] $\bar{x}$
100 IE Vitamin D_3	30,24	53,79	63,61
200 IE Vitamin D_3	29,62	45,40	51,19
400 IE Vitamin D_3	30,52	40,82	41,93
0,125 µg 1,25$(OH)_2D_3$	29,57	80,65	92,63
0,25 µg 1,25$(OH)_2D_3$	30,72	57,29	65,37
0,5 µg 1,25$(OH)_2D_3$	30,21	50,75	58,45
3 g Stängel Solanum glaucophyllum	30,06	69,29	83,74
8 g Trisetum flavescens	30,02	83,95	97,88
24 g Trisetum flavescens	31,65	52,34	57,71
0,1 g S.g.- Roh-Extrakt	28,98	47,91	54,81
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt	32,98	46,78	51,34
1 g S.g.- Roh-Extrakt	31,33	55,70	58,27
3 g S.g.- Roh-Extrakt	30,46	37,85	41,60
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	31,77	44,81	48,94
1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	33,86	42,67	45,63

4.1.4 Legeleistung

Die durchschnittliche Legeleistung pro Gruppe steigt mit zunehmender Dosierung von Vitamin D_3, 1,25$(OH)_2D_3$ und Trisetum flavescens an (Tabelle 14).
Mit 86,93% weist die mit 1 g S.g.- Rohextrakt/kg + Glucosidase gefütterte Gruppe eine geringgradig höhere Legeleistung auf als die Vitamin D_3 -Standardgruppen. Die Gruppe, die dieselbe Menge Rohextrakt ohne Glucosidase bekommen hat, zeigt im Vergleich dazu mit 67,97% eine deutlich niedrigere Legeleistung.

Beim Vergleich der mittleren wöchentlichen Legeleistung der Gruppen zeigt sich, dass die Gruppen mit 3 g S.g.- Rohextrakt/kg, 0,3 g S.g.- Rohextrakt/kg + Glucosidase und 1 g S.g.- Rohextrakt/kg + Glucosidase Zufütterung, mit den Werten 68,57%, 55,56% und 60,32% eine initial höhere Legeleistung aufweisen als die Vitamin D_3 -Standardgruppen mit maximal 45,71%. Vergleiche hierzu Abbildung 6
Mit einem Durchschnittswert aller Gruppen von 73,26% ist in der zweiten Woche, gegenüber 42,83% der ersten und 69,05% der dritten Woche, die Legeleistung am grö ten.
Allerdings steigt in den Gruppen mit der Zufütterung von 100 IE Vitamin D_3/kg, 0,5 µg 1,25$(OH)_2D_3$/kg und 0,3 g S.g.- Rohextrakt/kg + Glucosidase die Legeleistung im Vergleich zur zweiten Woche, in der dritten Woche nochmals um 24,69%, 21,28% bzw. 25,00% an.
In den Gruppen, die mit 0,125 µg 1,25$(OH)_2D_3$ bzw. 3 g Stängel Solanum glaucophyllum gefüttert wurden, sinkt die mittlere Legeleistung in der dritten Woche noch unter die Werte der ersten Woche ab.
In allen drei durchschnittlichen Wochenlegeleistungen weist die Gruppe, die zu 1 g S.g.- Rohextrakt, dieselbe Menge wie ihre Parallelgruppe, noch Glucosidase erhielt, eine vergleichsweise höhere Legeleistung als diese auf. Diese Steigerung ist bei 0,3 g S.g.- Rohextrakt/kg + Glucosidase nicht gegeben.
Die einzelnen Werte sind im Anhang in Tabelle 25 aufgelistet.

4.1.5 Eischalentrockengewicht

Ähnlich wie bei dem Parameter Legeleistung steigt auch die Eischalentrockengewichtsmenge pro Tier und Tag in den Gruppen mit zunehmender Konzentration von Vitamin D_3 und 1,25$(OH)_2D_3$ an. Bei Trisetum flavescens ist ein signifikanter Anstieg von 339,4 mg auf 644,8 mg zu verzeichnen. Den niedrigsten Wert weist die Gruppe mit 0,125 µg 1,25$(OH)_2D_3$/kg Futter auf. Auch die Gruppe, die als Zusatz 3 g gemahlene Stängel Solanum glaucophyllum/kg Futter erhielt, zeigt mit 349,0 mg eine sehr geringes Eischalentrockengewicht pro Tag.
Die genauen Angaben sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Beim Vergleich der mittleren wöchentlichen Eischalentrockengewichtsmenge pro Tier und Tag der Gruppen zeigen sich ähnliche Verhältnisse wie beim Vergleich der wöchentlichen Legeleistung. Die Gruppen mit der Zufütterung von 3 g S.g.- Rohextrakt/kg, 0,3 g S.g.- Rohextrakt/kg + Glucosidase und 1 g S.g.- Rohextrakt/kg + Glucosidase, weisen mit 602,4 mg, 501,0 mg bzw. 580,8 mg Eischalen- TS/Tier in der ersten Woche höhere Werte auf, als die Vitamin D_3 -Standardgruppen mit 405,5 mg. Vergleiche hierzu Abbildung 7.
In der zweiten Woche wird bei allen Gruppen, mit Ausnahme derjenigen mit der Präparatedosierung 100 IE Vitamin D_3, 1 µg 1,25$(OH)_2D_3$ und 0,3 g S.g.- Rohextrakt/kg + Glucosidase, der jeweils höchste Wert gemessen. Daraus ergibt sich ein täglicher Durchschnittswert aller Gruppen von 678,0 mg/Tier.
Die absolut größte Eischalen- TS- produktion zeigen mit 903,2 mg/Tier und Tag in der zweiten Woche die Tiere der Gruppe mit 400 IE Vitamin D_3. Diese Gruppe produziert auch in der dritten Woche mit 874,8 mg/Tier und Tag den größten Wert.
In den Gruppen, die mit 0,125 µg 1,25$(OH)_2D_3$, 0,25 µg 1,25$(OH)_2D_3$ bzw. 3 g Stängel Solanum glaucophyllum gefüttert wurden, sinkt die mittlere Eischalentrockengewichtsmenge in der dritten Woche noch unter die Werte der ersten Woche ab.
In der ersten und dritten Woche zeigen sich im Vergleich der Gruppen mit und ohne Glucosidase- Zufütterung deutliche Steigerungen in der Eischalen- TS- Produktion beim Einsatz der Glucosidase. In der zweiten Woche ist diese Steigerung nur in der Gruppe mit 1 g S.g.- Rohextrakt/kg + Glucosidase zu verzeichnen.
Die einzelnen Werte sind im Anhang in Tabelle 26 aufgelistet.

Tabelle 14: Durchschnittliche Legeleistung pro Gruppe [%] und durchschnittliches Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag [g], Tag 5 bis 21, Versuch 1

Diätzusatz/ kg Futter	durchschnittliche Legeleistung [%] Tag 5 bis 21		Eischalen- TS pro Tier und Tag [mg] Tag 5 bis 21	
	$\bar{x}$	± s	$\bar{x}$	± s
100 IE Vitamin D_3	63,59	26,48	538,9	231,6
200 IE Vitamin D_3	72,94	14,90	652,2	134,5
400 IE Vitamin D_3	84,71^{ac}	15,05	841,4^{efg}	157,1
0,125 µg 1,25$(OH)_2D_3$	37,65	25,62	327,4	222,1
0,25 µg 1,25$(OH)_2D_3$	59,15	19,45	519,6	207,6
0,5 µg 1,25$(OH)_2D_3$	71,18	15,76	622,4	148,6
3 g Stängel Solanum glaucophyllum	41,83^{c}	24,07	349,0^{g}	208,5
8 g Trisetum flavescens	39,75^{cd}	12,33	339,4^{g}	110,7
24 g Trisetum flavescens	70,00^{d}	26,22	644,8^{g}	199,4
0,1 g S.g.- Roh-Extrakt	71,18	22,33	627,2^{ef}	218,6
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt	80,96	20,65	741,9	186,6
1 g S.g.- Roh-Extrakt	67,97^{b}	20,37	653,1^{ef}	207,8
3 g S.g.- Roh-Extrakt	85,29	15,86	780,8^{e}	146,0
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	75,82	18,94	703,1^{e}	185,5
1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	86,93^{ab}	15,83	817,2^{e}	161,3

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:

a = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase

b = $p \leq 0,01$ zwischen Gruppen 1 g S.g.- Roh-Extrakt und 1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase

c = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 3 g S.g. -Stängel, 8 g T. flavescens

d = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 8 g Trisetum flavescens und 24 g Trisetum flavescens

e = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Gluc.; 0,1 g S.g.- Roh-Extrakt und 3 g S.g.- Roh-Extrakt; 1 g S.g. -Roh-Extrakt und 1 g S.g.- Roh-Extrakt + Gluc.

f = $p \leq 0,01$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 0,1 g S.g.- Roh-Extrakt, 1 g S.g. -Roh-Extrakt

g = $p \leq 0{,}001$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 3 g S.g.- Stängel ; 8g Trisetum flavescens und 24g Trisetum flavescens

Abb. 6: Vergleich der durchschnittlichen wöchentlichen Legeleistung [%] der Gruppen in Woche 1 bis Woche 3, Versuch 1

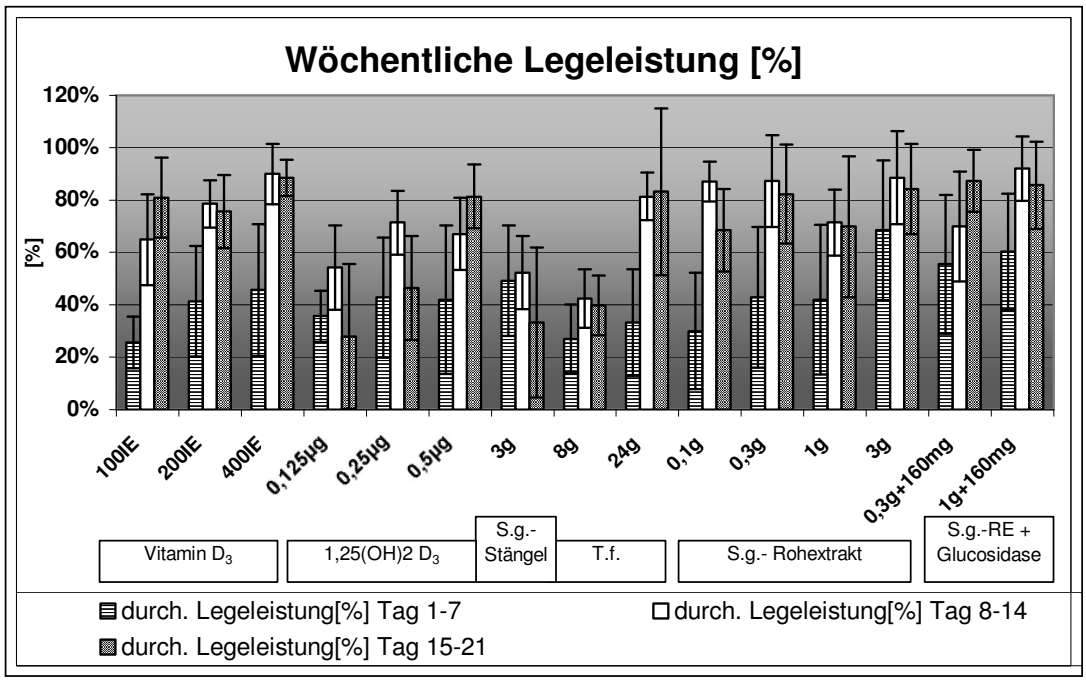
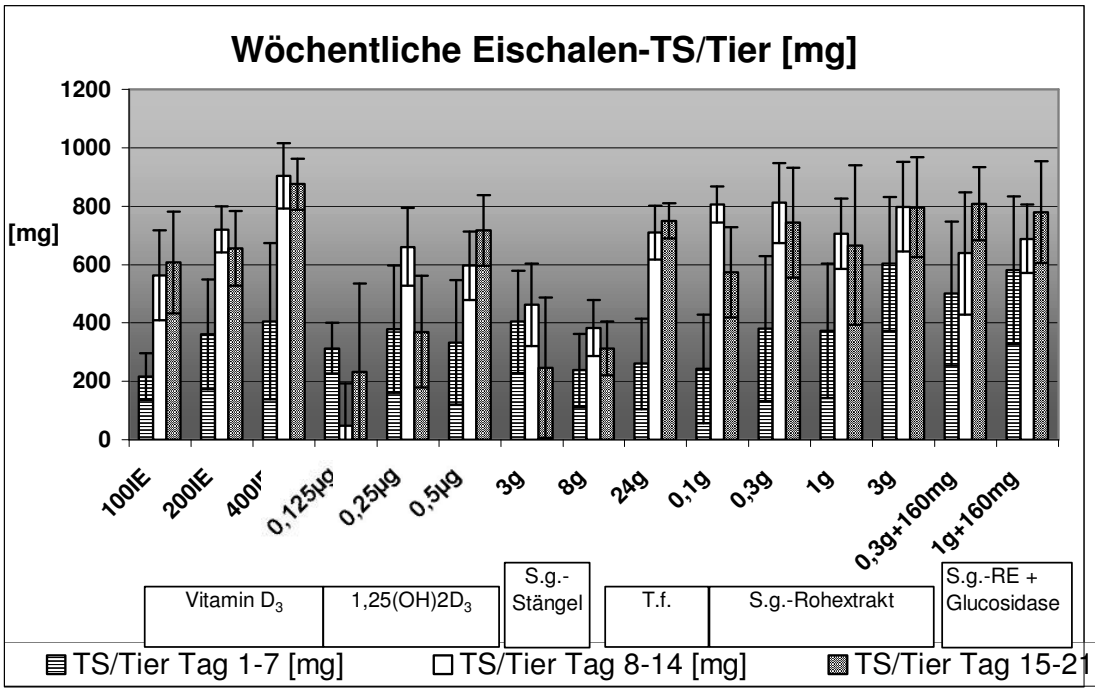


Abb. 7: Vergleich der durchschnittlichen wöchentlichen Eischalen- TS pro Tier [mg] in Woche 1 bis Woche 3 pro Gruppe, Versuch 1



4.1.6 Eigewichte

Die durchschnittlich schwersten Eier weist, wie in Tabelle 15 zu sehen, die Gruppe mit der Standardration Vitamin D_3 (400 IE) auf, wohingegen die Gruppe mit der Zufütterung von S.g.- Stängeln mit durchschnittlich 10,13 g die leichtesten Eier legen. Innerhalb der Vitamin D_3 -, 1,25$(OH)_2D_3$ - und Trisetum flavescens- Gruppen ist mit steigender Präparatedosierung auch eine Zunahme der Eigewichte belegt. Innerhalb der Gruppen, die mit S.g.- Rohextrakt gefüttert wurden, ist ein Anstieg nur bis zu einer Dosierung von 0,3 g feststellbar. Mit höherer Dosierung oder dem Einsatz von Glucosidase sinkt das durchschnittliche Eigewicht wieder ab.

Beim wöchentlichen Vergleich der Eigewichte weist die Gruppe mit Zufütterung von 24 g Trisetum flavescens in etwa gleich schwere Eier auf wie die Vitamin D_3 - Standardgruppe mit 400 IE (Vergleiche Tabelle 27 im Anhang).
Innerhalb der Gruppen, die mit S.g.- Rohextrakt gefüttert wurden, produzieren die Wachteln, die 0,3 g des Rohextrakts zu fressen bekamen, in allen drei Wochen die schwersten Eier. Wie in Abbildung 8 ersichtlich lässt eine höhere Dosierung das Eigewicht bis auf unter 9 g absinken.

4.1.7 Schalenanteil

Der Schalenanteil der Gruppen mit 1 g S.g.- Rohextrakt/kg Futter mit und ohne Glucosidase liegt mit 8,81% bzw. 8,92% deutlich über den Werten der Vitamin D_3 - und 1,25$(OH)_2D_3$- Gruppen. Den niedrigsten Anteil weist, wie aus Tabelle 15 zu entnehmen, die Gruppe auf, die 8 g Trisetum flavescens/kg Futter bekommen hat.

Beim wöchentlichen Vergleich der Schalenanteile der Gruppen (Abb. 9) lässt sich eine tendenzielle Erhöhung der Werte der Gruppen mit dem Futterzusatz von 1 g S.g.- Rohextrakt/kg mit und ohne Glucosidase feststellen. Beim Einsatz von Glucosidase ist in der erste Woche mit 9,50% der absolut größte Anteil erreicht, der in der zweiten und dritten Woche auf 8,79% absinkt und den Wert der Vitamin D_3 - Standardgruppen in allen Phasen deutlich übersteigt (Vergleiche Tabelle 28 im Anhang). Die Steigerung der Dosierung auf 3 g S.g.- Rohextrakt/kg lässt den Schalenanteil deutlich unter den der 1 g- Gruppe sinken.

Tabelle 15: Durchschnittliches Frischeigewicht [g] und Schalenanteil [%] pro Tag (Mittelwert ± Standardabweichung), Tag 5 bis 21, Versuch 1

Diätzusatz/ kg Futter	Frischeigewicht pro Tag [g] Tag 5 bis 21 x	± s	Schalenanteil [%] pro Tag Tag 5 bis 21 X	± s
100 IE Vitamin D_3	10,43	0,35	8,12	0,46
200 IE Vitamin D_3	10,97	0,43	8,16	0,37
400 IE Vitamin D_3	11,46^{ab}	0,37	8,65^{cd}	0,29
0,125 µg 1,25$(OH)_2D_3$	10,79	0,67	7,60	1,06
0,25 µg 1,25$(OH)_2D_3$	10,84	0,40	7,90	0,88
0,5 µg 1,25$(OH)_2D_3$	10,56	0,41	8,25	0,29
3 g Stängel Solanum glaucophyllum	10,13^{b}	0,60	7,47^{d}	0,73
8 g Trisetum flavescens	11,24	0,48	7,61	0,70
24 g Trisetum flavescens	11,33	0,74	8,03	0,24
0,1 g S.g.- Roh-Extrakt	10,76^{b}	0,41	8,09^{d}	0,44
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt	11,08	0,38	8,28	0,23
1 g S.g.- Roh-Extrakt	10,71^{b}	0,44	8,81^{d}	0,75
3 g S.g.- Roh-Extrakt	10,78^{b}	0,32	8,51^{d}	0,50
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	11,03^{a}	0,30	8,38^{c}	0,26
1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	10,53^{ab}	0,42	8,92^{cd}	0,54

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:

a = $p \leq 0,01$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase ; 0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase und 1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase

b = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 3 g S.g.- Stängel, 0,1 g S.g.- Roh-Extrakt, 1 g S.g.- Roh-Extrakt, 3 g S.g.- Roh-Extrakt, 1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase

c = $p \leq 0,01$ zwischen Gruppen 0,3 g S.g.- Roh-Extrakt +Glucosidase und 1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase; 400 IE Vitamin D_3 und 0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase

d = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 3 g S.g.- Stängel, 0,1 g S.g.- Roh-Extrakt, 1 g S.g.- Roh-Extrakt, 3 g S.g.- Roh-Extrakt, 1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase

Abb. 8: Vergleich des durchschnittlichen wöchentlichen Eigewichts [g] in Woche 1 bis Woche 3 pro Gruppe, Versuch 1

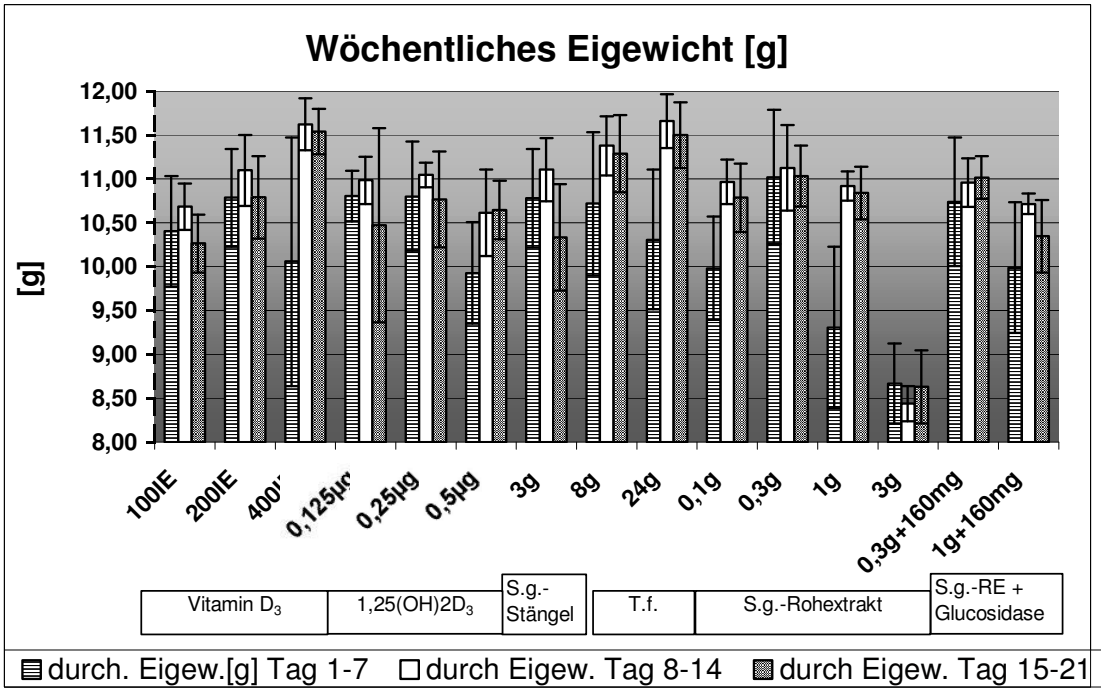
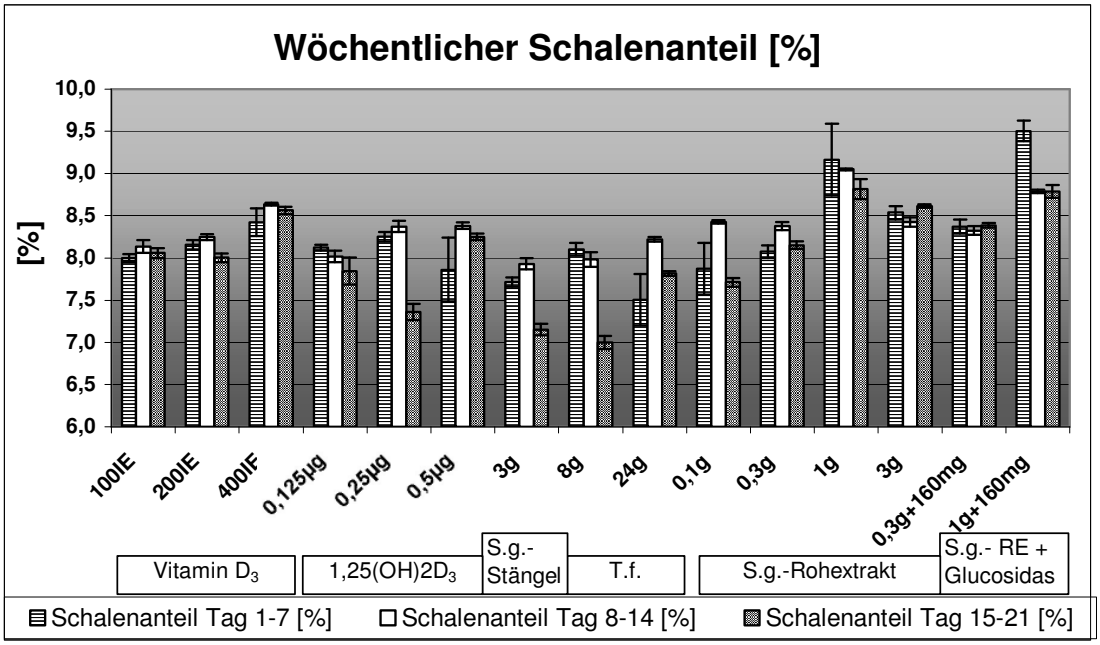


Abb. 9: Vergleich des durchschnittlichen wöchentlichen Schalenanteils [%] in Woche 1 bis Woche 3 pro Gruppe, Versuch 1



4.1.8 Serumwerte:

4.1.8.1 Calciumgehalt im Serum

Aus den Daten der Tabelle 16 ist ersichtlich, dass durch die Streuung der Calciumgehalt im Serum der Vitamin D_3 - und 1,25$(OH)_2D_3$ -Gruppen kein direkter Zusammenhang zwischen Dosierung des Präparates und dem Calciumserumgehalt festgestellt werden kann. Allein in den S.g.- Rohextrakt-Gruppen sind Unterschiede sichtbar. Die Sera der Gruppen, die 0,1 g , 0,3 g S.g.- Roh-Extrakt sowie 1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase erhalten haben, zeigen niedrigere Werte als alle anderen Gruppen. Eine Steigerung des Solanumgehaltes im Futter auf 1 g zieht mit 209,9 mg/l den höchsten Calciumserumgehalt nach sich. Statistisch lassen sich keine Signifikanzen darstellen.

4.1.8.2 ALP im Serum

Die durchschnittlichen ALP- Werte im Serum der Wachteln sind ebenfalls in Tabelle 16 dargestellt. Es zeigt sich, dass eine Dosiserhöhung innerhalb aller Präparategruppen, mit Ausnahme der Trisetum- Gruppen, einen deutlichen Abfall der ALP im Serum nach sich zieht. Ebenso wie bei den Werten des Calciumgehalts im Serum weist die Gruppe, deren Diätzusatz aus 24 g Trisetum flavescens/kg Futter bestand, gegensätzlich zu den anderen Gruppen, einen geringgradig höheren ALP-Wert auf. Der Einsatz der gemahlenen S.g.- Blätter führt im Serum der Tiere zu einem ähnlich hohen Wert, den die Gruppe mit 0,125 µg 1,25$(OH)_2D_3$/kg Futter vorweist. Signifikante Unterschiede sind nach statistischer Auswertung in der Tabelle kenntlich gemacht. Der größte Wert (4174 U/L) findet sich als mittlerer Gehalt des Serums der Tiere der Gruppe mit der geringsten Dosis des S.g.- Rohextrakts. Bis zu einer Konzentration von 1 g S.g.- Rohextrakt/kg Futter nimmt der Gehalt kontinuierlich auf einen Wert von 641 U/L ab. Die Dosis von 3 g S.g.- Rohextrakt/kg Futter lässt den Wert wieder auf 768 U/L ansteigen. Bei diesem Parameter lässt sich die Wirkung des Einsatzes von Glucosidase in der Futterration deutlich darstellen. Bei gleicher Konzentration des S.g.- Roh-Extrakts werden signifikante Abfälle des ALP- Gehalts erreicht, so dass dabei mit 567 U/L der absolut niedrigste Wert gemessen wird.

Tabelle 16: Durchschnittlicher Calciumgehalt im Serum [g/l] (Mittelwert ± Standardabweichung); durchschnittlicher Alkalische Phosphatase- Gehalt im Serum [U/L] (Mittelwert ± Standardabweichung), Versuch 1

Diätzusatz/ kg Futter	Calcium im Serum [g/l]		ALP im Serum [U/L]	
	$\bar{x}$	±s	x	±s
100 IE Vitamin D_3	193,0	52,8	3177[a]	1535
200 IE Vitamin D_3	202,0	74,2	1418[a]	1112
400 IE Vitamin D_3	189,6	46,5	1859[b]	1492
0,125 µg $1,25(OH)_2D_3$	204,6	81,0	4141	2583
0,25 µg $1,25(OH)_2D_3$	175,2	72,0	2983[ac]	2116
0,5 µg $1,25(OH)_2D_3$	198,9	47,8	1402[ac]	983
3 g Stängel Solanum glaucophyllum	212,9	67,2	3872[b]	941
8 g Trisetum flavescens	209,7	119,6	2613	1559
24 g Trisetum flavescens	202,1	94,2	2925	2013
0,1 g S.g.- Roh-Extrakt	160,2	46,4	4174[bcd]	2950
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt	180,2	57,5	1389[d]	997
1 g S.g.- Roh-Extrakt	209,9	108,1	641[d]	339
3 g S.g.- Roh-Extrakt	195,5	38,7	768[d]	841
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	199,6	32,9	793[d]	994
1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	178,3	52,2	567[d]	270

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:

a = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 100 IE Vitamin D_3 und 200 IE Vitamin D_3, 0,25 µg $1,25(OH)_2D_3$ und 0,5 µg $1,25(OH)_2D_3$

b = $p \leq 0,01$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 3 g S.g. -Stängel bzw. 0,1 g S.g.- RE

c = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 0,5 µg $1,25(OH)_2D_3$ und 0,25 µg$1,25(OH)_2D_3$ bzw. 0,1 g S.g.- RE

d = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppe 0,1 g S.g. -Roh-Extrakt und allen übrigen S.g.- Roh-Extraktgruppen

4.1.9 Knochenaschegehalte:

4.1.9.1 Relativer Knochenaschegehalt

Die mittleren relativen Knochenaschegehalte von Femur und Tibiotarsus der Gruppen sind in Tabelle 17 zusammengestellt. Gruppenintern ist nur ein geringfügiger Unterschied zwischen Femur und Tibiotarsus nachweisbar. Innerhalb der Vitamin D_3 - Standardgruppen und den Gruppen mit $1,25(OH)_2D_3$, in Dosierungen bis zu 0,5 µg ist tendenziell ein Ansteigen des Knochenaschegehalts zu erkennen. Signifikante Unterschiede sind in der Tabelle vermerkt. In den Gruppen, die S.g.- Rohextrakt in steigender Konzentration erhielten, zeigt der Femur der Gruppe mit 0,3 g/kg Futter mit 62,25% durchschnittlich den höchsten Knochenaschegehalt, der selbst durch Fütterung von 1 g bzw. 3 g S.g.- Rohextrakt nicht gesteigert werden kann. Der Einsatz von Glucosidase zu 0,3 g S.g.- Rohextrakt erreicht mit 65,60% den absolut grö ten Wert.

4.1.9.2 Calcium in der Knochenasche

In Tabelle 18 sind die mittleren Calciumgehalte der Knochenasche von Femur und Tibiotarsus der Wachtelgruppen dargestellt. Gruppenintern gibt es zwischen Femur und Tibiotarsus keinen bemerkenswerten Unterschied in den Ergebnissen.
Der Mittelwert aller Gruppen beträgt bei Femur 377,97 g/kg, beim Tibiotarsus 377,48 g/kg Knochenasche. Innerhalb der einzelnen Gruppen kann keine ursächliche Beziehung zwischen Dosierung des Präparates und dem Knochenaschegehalt festgestellt werden. Auch die statistische Auswertung lässt nur in den Versuchsgruppen mit $1,25(OH)_2D_3$ signifikante Unterschiede erkennen.

4.1.9.3 Phosphor in der Knochenasche

Aus den Daten in Tabelle 19 ist zu ersehen, dass die Phosphorgehalte in der Knochenasche von Femur und Tibiotarsus in allen Gruppen sehr ähnlich sind und geringfügig um einen Wert von 166,52 g/kg liegen.

Tabelle 17: Durchschnittlicher relativer Knochenaschegehalt von Femur und Tibiotarsus [%] (Mittelwert ± Standardabweichung), Versuch 1

Diätzusatz/ kg Futter	Knochenasche in % Femur		Knochenasche in % Tibiotarsus	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
100 IE Vitamin D_3	56,49	1,77	56,21	2,99
200 IE Vitamin D_3	56,81	2,73	57,19	2,41
400 IE Vitamin D_3	59,13[a]	3,79	58,50[c]	3,11
0,125 µg 1,25$(OH)_2D_3$	57,45[a]	3,83	57,69[a]	4,24
0,25 µg 1,25$(OH)_2D_3$	58,21	2,27	59,30[a]	2,57
0,5 µg 1,25$(OH)_2D_3$	61,01[a]	6,21	60,93	4,89
3 g Stängel Solanum glaucophyllum	55,72	3,34	55,79	3,53
8 g Trisetum flavescens	57,66	3,23	57,85	2,84
24 g Trisetum flavescens	57,31	4,11	58,15	4,56
0,1 g S.g.- Roh-Extrakt	55,66[ab]	2,85	56,72[abc]	2,69
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt	62,25[b]	4,48	60,49[a]	4,12
1 g S.g.- Roh-Extrakt	61,44[b]	4,26	61,60[b]	3,40
3g S.g.- Roh-Extrakt	61,39[b]	2,34	60,88[b]	3,40
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	65,61[b]	3,54	64,91[ac]	2,98
1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	63,02[b]	3,77	62,63[ac]	3,36

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:

a= $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 0,125 µg 1,25$(OH)_2D_3$ und 0,5µg 1,25$(OH)_2D_3$, 0,1 g S.g.- Roh-Extrakt und 400 IE Vitamin D_3, 1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase und 400 IE Vitamin D_3, 0,1 g S.g.- Roh-Extrakt und 0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase und 0,3 g S.g.- RE

b= $p \leq 0,01$ zwischen Gruppe 0,1 g S.g.- Roh-Extrakt zu allen anderen S.g.- Roh-Extraktgruppen und zwischen Gruppen 0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase und 0,1 g S.g.- Roh-Extrakt, 1 g S.g.- Roh-Extrakt, 3 g S.g.- Roh-Extrakt

c= $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 0,1 g S.g.- Roh-Extrakt und 0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase und 1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase, 0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase und 400 IE Vitamin D_3

Tabelle 18: Durchschnittlicher Calciumgehalt in der Knochenasche von Femur und Tibiotarsus [g/kg] (Mittelwert ± Standardabweichung), Versuch 1

Diätzusatz/ kg Futter	Calciumgehalt in der Knochenasche [g/kg] Femur		Calciumgehalt in der Knochenasche [g/kg] Tibiotarsus	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
100 IE Vitamin D_3	382,70	13,22	376,29	10,85
200 IE Vitamin D_3	379,00	21,59	382,71	24,55
400 IE Vitamin D_3	375,23	23,52	375,32	13,09
0,125 µg $1,25(OH)_2D_3$	352,19[a]	51,83	385,29	30,04
0,25 µg $1,25(OH)_2D_3$	376,67[a]	40,81	370,79	13,55
0,5 µg $1,25(OH)_2D_3$	378,15[a]	9,17	377,42	5,44
3 g Stängel Solanum glaucophyllum	365,27	29,94	366,38	33,81
8 g Trisetum flavescens	385,89	14,24	381,08	10,58
24 g Trisetum flavescens	398,67	23,69	378,16	22,69
0,1 g S.g.- Roh-Extrakt	385,63	8,63	386,72	10,74
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt	374,96	17,85	369,26	17,78
1 g S.g.- Roh-Extrakt	381,71	12,39	376,86	16,30
3 g S.g.- Roh-Extrakt	377,64	31,61	381,53	33,23
0,3 g S.g. -Roh-Extrakt + Glucosidase	368,30	16,56	372,47	13,41
1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	382,52	16,25	381,96	20,72

Buchstabe kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:

a= $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 0,125 µg $1,25(OH)_2D_3$ und 0,25 µg $1,25(OH)_2D_3$ bzw. 0,5 µg $1,25(OH)_2D_3$

Tabelle 19: Durchschnittlicher Phosphorgehalt in der Knochenasche von Femur und Tibiotarsus [g/kg] (Mittelwert ± Standardabweichung), Versuch 1

Diätzusatz/ kg Futter	Phosphorgehalt in der Knochenasche [g/kg] Femur		Phosphorgehalt in der Knochenasche [g/kg] Tibiotarsus	
	$\bar{x}$	±s	x	±s
100 IE Vitamin D_3	161,57	14,58	164,96	10,55
200 IE Vitamin D_3	168,15	7,01	165,47	5,65
400 IE Vitamin D_3	163,32[a]	11,15	164,21[a]	10,95
0,125 µg 1,25$(OH)_2D_3$	164,04	9,32	157,76	26,61
0,25 µg 1,25$(OH)_2D_3$	162,86	11,12	159,71	11,40
0,5 µg 1,25$(OH)_2D_3$	164,41	8,25	164,86	5,11
3 g Stängel Solanum glaucophyllum	167,96	3,70	171,71	3,67
8 g Trisetum flavescens	169,46	17,64	173,80	7,87
24 g Trisetum flavescens	164,21	16,80	162,94	18,38
0,1 g S.g.- Roh-Extrakt	173,12[a]	7,60	176,03[a]	4,68
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt	162,86[a]	9,34	164,61[a]	6,61
1 g S.g.- Roh-Extrakt	161,12[a]	9,68	164,83[a]	8,88
3 g S.g.- Roh-Extrakt	166,95	8,34	170,97	8,85
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	168,93	8,58	168,91	8,73
1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	164,49	5,91	166,72	7,91

Buchstabe kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:

a= $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 0,1 g S.g.- Roh-Extrakt und 400 IE Vitamin D_3 , 0,3 g S.g.- Roh-Extrakt bzw. 1 g S.g.- Roh-Extrakt

4.2 Versuch 2

4.2.1 Gesundheitszustand der Versuchstiere und Mortalität

In allen 3 Phasen des zweiten Versuchs war das Allgemeinbefinden der Wachteln ebenfalls unauffällig.
Während der 21 Tage dauernden Testphase des zweiten Versuchs starben insgesamt 14 von 157 Tieren. Das entspricht einer gesamten Mortalitätsrate von 8,92%.
In der Gruppe, die 0,25 µg $1,25(OH)_2D_3$/kg Futter bekam, mussten 3 Wachteln aufgrund von immer schwerwiegenderer Beinschwäche getötet werden. Das entspricht in dieser Gruppe einer Mortalität von 30,00%. Auch in den Gruppen mit niedrig dosiertem Solanum glaucophyllum- Hydrolysat (7,5 mg bzw. 15 mg/kg Futter) ist die Mortalitätsrate mit jeweils 20,00% höher als in den restlichen Gruppen. Die Tiere verendeten an unterschiedlichen Erkrankungen der Legeorgane.
Die Todesursachen der restlichen Tiere können nicht mit ihrer jeweiligen Fütterung in Zusammenhang gebracht werden.
Am Versuchsende wurde jeweils eine Wachtel pro Gruppe zur pathologischen Untersuchung in die Klinik für Geflügelkrankheiten in Oberschleißheim gebracht. Sektion, pathologische Untersuchung, bakteriologische-, mykologische und virologische Tests waren jeweils ohne besonderen Befund. Spezielle Untersuchungen auf Verkalkungen der inneren Organe erbrachten keine Hinweise darauf.

4.2.2 Tiergewicht und Gewichtsentwicklung

Die Wachteln wurden am ersten Tag der Kontrollphase, am ersten Tag der Testphase in Gruppen und am letzten Tag der Testphase (Schlachttag) einzeln gewogen. Im Verlauf des Versuchszeitraums verloren die Tiere an Körpergewicht, so dass ihr Schlachtgewicht unter ihrem Gewicht zu Beginn liegt. Am deutlichsten ist diese Abnahme bei den Tieren der Gruppen mit den Diätzusätzen 0,25 µg $1,25(OH)_2D_3$/kg Futter und 128 mg S.g.- Reinextrakt/kg Futter zu erkennen.
Die genauen Zahlen sind der Tabelle 20 zu entnehmen.

Tabelle 20: Durchschnittliche Tiergewichte [g] (Mittelwert ± Standardabweichung), Versuch 2

Diätzusätze/ kg Futter	Tiergewicht [g] Tag 1 Kontrollphase n= 10 Tiere n Grp 11=7 Tiere $\bar{x}$	Tiergewicht [g] Tag 1 Testphase n= 10 Tiere n Grp 11=7 Tiere x	Tiergewicht [g] Schlachttag $\bar{x}$	±s
100 IE Vitamin D_3	160,8	156,3	153,3	16,7
200 IE Vitamin D_3	160,6	164,6	157,1	10,8
400 IE Vitamin D_3	160,8	166,7	155,4[a]	18,7
0,25 µg 1,25$(OH)_2D_3$	160,9	154,2	129,4[b]	18,9
0,5 µg 1,25$(OH)_2D_3$	160,8	155,8	155,1[b]	17,5
1 µg 1,25$(OH)_2D_3$	161,5	152,7	141,6	16,6
2 mg S.g.- Reinextrakt	161,7	158,1	145,2	15,9
8 mg S.g.- Reinextrakt	161,6	156,3	147,7	12,9
32 mg S.g.- Reinextrakt	162,1	158,0	152,5	10,6
128 mg S.g.- Reinextrakt	160,7	162,8	139,2[a]	24,9
512 mg S.g.- Reinextrakt	161,8	161,3	159,3[a]	14,4
3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase	160,7	157,5	148,1	17,6
7,5 mg S.g.- Hydrolysat	161,1	159,4	161,0	10,8
15 mg S.g.- Hydrolysat	160,6	155,1	150,3	4,6
30 mg S.g.- Hydrolysat	161,1	157,4	149,9	29,6
Gemahlene S.g.- Blätter	160,7	192,5	157,2	14,2
Kontrolle	161,0			

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen

a = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 128 mg S.g.- Reinextrakt, 128 mg S.g.- Reinextrakt und 512 mg S.g.- Reinextrakt

b = $p \leq 0,01$ zwischen Gruppen 0,25 µg 1,25$(OH)_2D_3$ und 0,5 µg 1,25$(OH)_2D_3$

4.2.3 Futterverbrauch

Der durchschnittliche tägliche Futterverzehr pro Wachtel liegt in diesem Versuchsdurchgang bei 25,41 g. Die Gruppe, der 512 mg S.g.- Reinextrakt/kg gefüttert wurden, frisst mit 29,35 g durchschnittlich am meisten.
Mit 22,36 g und 22,88 g haben die Gruppen mit 0,25 µg 1,25$(OH)_2D_3$/kg und 3 mg S.g. –Reinextrakt + Glucosidase den geringsten Verbrauch. Alle Werte des Futterverbrauchs sind in Tabelle 21 zusammengestellt.

Der durchschnittliche Futterverbrauch pro gelegtem Ei beträgt 662,59 g.
Bei diesem Parameter sind zwischen den Gruppen noch deutlichere Schwankungen festzustellen als im ersten Versuch. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 21 festgehalten. Mit 4293,00 g weist die Gruppe mit der Dosierung 15 mg S.g.-Hydrolysat den höchsten Werte auf.

Der durchschnittliche Futterverbrauch pro Gramm Eischalen- TS beträgt 1152,66 g. In den Gruppen mit steigender Präparatedosierung ist eine abnehmende Tendenz im Futterverbrauch zu sehen. Die Gruppe mit hochdosiertem S.g.- Reinextrakt zeigt mit 41,89 g in etwa den selben Futterverbrauch wie die Vitamin D_3 - Standardgruppe.

Tabelle 21: Durchschnittlicher Futterverbrauch pro Tier und Tag [g], pro Ei [g] und pro Gramm Eischale [g], Tag 1 bis 21, Versuch 2

Diätzusatz/ kg Futter	Futterverbrauch pro Tier und Tag [g] $\bar{x}$	Futterverbrauch pro Ei [g] $\bar{x}$	Futterverbrauch pro Gramm Eischale [g] $\bar{x}$
100 IE Vitamin D_3	24,41	87,18	121,91
200 IE Vitamin D_3	24,80	54,51	69,43
400 IE Vitamin D_3	26,09	35,50	40,22
0,25 µg 1,25$(OH)_2D_3$	22,36	678,33*	1350,99*
0,5 µg 1,25$(OH)_2D_3$	24,65	931,60*	1441,88*
1 µg 1,25$(OH)_2D_3$	26,06	50,20	59,25
2 mg S.g.- Reinextrakt	23,11	455,20	616,79
8 mg S.g.- Reinextrakt	24,31	155,57	151,21
32 mg S.g.- Reinextrakt	28,49	42,51	46,02
128 mg S.g.- Reinextrakt	27,91	34,88	36,71
512 mg S.g.- Reinextrakt	29,35	39,66	41,89
3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase	22,88	2287,50*	3121,80*
7,5 mg S.g.- Hydrolysat	24,27	1116,50*	2183,33*
15 mg S.g.- Hydrolysat	23,33	4293,00*	8681,50*
30 mg S.g.- Hydrolysat	25,66	268,06	392,89
Gemahlene S.g.- Blätter	28,85	71,24	86,75

* diese Werte haben bei zu geringer Legeleistung keine Aussagekraft

4.2.4 Legeleistung

Die Legeleistung steigt innerhalb der Vitamin D_3 -Standardgruppen deutlich auf den höchsten Wert von 82,94% an. In den Gruppen mit unterschiedlicher Dosierung S.g.-Reinextrakt ist ebenfalls ein Anstieg erkennbar (Vergleiche Tabelle 22). Dieser erreicht aber mit 81,95% bei der Konzentration von 128 mg S.g.- Reinextrakt/kg Futter seinen maximalen Wert und erlangt auch durch die vierfache Dosierung des Extrakts (512 mg/kg Futter) nicht den Wert der Standardgruppe. Der Zusatz von Glucosidase zum Reinextrakt zeigt ebenfalls keine Steigerung der Legeleistung. Auch innerhalb der S.g.- Hydrolysat- Gruppen sind keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellbar.

Beim Vergleich der wöchentlichen mittleren Legeleistung der Gruppen ist aus Abbildung 10 zu erkennen, dass die Tiere der Gruppe mit der Zufütterung von 128 mg S.g.- Reinextrakt/kg Futter eine initial höhere Legeleistung aufweisen (62,86%), als die Tiere der Standardgruppen. Dieser Wert steigt in der zweiten Woche auf 82,86%, auf dem er auch in der dritten Woche verbleibt. Auch die als Diätzusatz eingemischten Blätter von Solanum glaucophyllum verhelfen der Gruppe zu einem mit 42,86% initial hohen Wert, der dann in den beiden nächsten Wochen konstant auf 28,57% abnimmt.
Die Dosierung des Reinextraktes von 512 mg/kg Futter führt bei der entsprechenden Gruppe in der zweiten Woche zu der insgesamt höchsten Legeleistung von 92,86%. Allerdings kann dieser Wert nicht gehalten werden, sondern sinkt in der dritten Woche signifikant auf 73,81% ab.
Eine konstant über die drei Wochen hinweg steigende Legeleistung weist die Gruppe mit der S.g.- Reinextraktdosierung von 32 mg/kg Futter auf. Sie erreicht in der dritten Woche mit 82,86% den gleichen Wert wie die Gruppe, die mit 128 mg/kg gefüttert wurde.
Bei Einsatz von Glucosidase wird keine Verbesserung der Legeleistung erreicht.
Die Fütterung von S.g.- Hydrolysaten in steigender Konzentration zeigt zwar initial höhere Werte, die jedoch untereinander keine signifikanten Unterschiede aufweisen und zudem im Verlauf der drei Wochen deutlich auf sehr niedriges Niveau absinken.
Die Werte jeder einzelnen Gruppe sind im Anhang in Tabelle 29 zusammengefasst.

4.2.5 Eischalentrockengewicht

In Tabelle 22 wird gezeigt, dass die Steigerung der Präparatedosierungen von Vitamin D_3 auch eine Steigerung der täglichen Eischalentrockengewichtsmenge bewirkt. Diese Beobachtung gilt ebenfalls für die Dosierung des S.g- Reinextraktes von 2 mg bis 128 mg/kg Futter. Die Konzentration 512 mg/kg hat ein Absinken des Eischalentrockengewichts zur Folge.
In den S.g.- Hydrolysat- Gruppen sind nach statistischer Auswertung keine signifikanten Abweichungen festzustellen.

Beim Vergleich der mittleren wöchentlichen Eischalentrockengewichtsmenge pro Tier und Tag der Gruppen zeigen sich auch im zweiten Versuch ähnliche Verhältnisse wie beim Vergleich der wöchentlichen Legeleistung. Aus Tabelle 30 im Anhang wird ersichtlich, dass die Steigerung der Präparatedosierungen von Vitamin D_3 auch im wöchentlichen Vergleich innerhalb der Fütterungsgrupppen eine Steigerung der täglichen Eischalentrockengewichtsmenge bewirkt.
Allerdings weist die Gruppe mit der Zufütterung von 512 mg S.g- Reinextrakt/kg Futter in der ersten und dritten Woche niedrigere Werte auf als die Gruppe mit 128 mg S.g- Reinextrakt, produziert aber in der zweiten Woche mit 903,8 mg Eischalentrockengewicht/Tier und Tag die größte Menge. Die Glucosidase-Zufütterung zeigt bei diesem Parameter keine Verbesserung. Die entsprechende Gruppe weist sogar niedrigere Werte auf als die Gruppe mit 2 mg S.g- Reinextrakt ohne Glucosidase. Vergleiche hierzu Abbildung 11.
Die Gruppen, die S.g- Hydrolysat als Futterzusatz bekamen, zeigen allesamt sehr niedrige Werte.

Tabelle 22: Durchschnittliche Legeleistung pro Gruppe [%] und durchschnittliches Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag [g], Tag 5 bis 21, Versuch2

Diätzusatz/ kg Futter	durchschnittliche Legeleistung [%] Tag 5 bis 21		Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag [mg] Tag 5 bis 21	
	x	± s	$\bar{x}$	± s
100 IE Vitamin D_3	32,35	18,21	231,4	122,5
200 IE Vitamin D_3	55,23	21,66	433,7	183,2
400 IE Vitamin D_3	82,94[a]	18,63	737,7[b]	168,7
0,25 µg 1,25$(OH)_2D_3$	3,15	6,18	14,6	30,9
0,5 µg 1,25$(OH)_2D_3$	1,32	3,76	10,3	13,0
1 µg 1,25$(OH)_2D_3$	58,83	21,07	502,3	169,5
2 mg S.g.- Reinextrakt	2,94[ac]	4,70	17,1[b]	22,5
8 mg S.g.- Reinextrakt	18,17[ac]	7,34	186,7[b]	47,2
32 mg S.g.- Reinextrakt	73,53[c]	14,12	686,9	152,3
128 mg S.g.- Reinextrakt	81,95 [c]	6,86	802,0	71,3
512 mg S.g.- Reinextrakt	81,23	18,03	781,5	176,1
3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase	0,59[a]	2,43	4,2[b]	2,3
7,5 mg S.g.- Hydrolysat	2,65[a]	6,09	13,4[b]	36,9
15 mg S.g.- Hydrolysat	0,65[a]	2,69	3,2[b]	1,4
30 mg S.g.- Hydrolysat	9,02[a]	12,72	62,5[b]	74,6
Gemahlene S.g.- Blätter	43,53[a]	19,02	361,1[b]	155,6

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:

a = $p \leq 0{,}001$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 2 mg S.g.- Reinextrakt

8 mg S.g.- Reinextrakt, 3 mg S.g. -Reinextrakt + Glucosidase, 7,5 mg S.g.- Hydrolysat,

15 mg S.g.- Hydrolysat, 30 mg S.g.- Hydrolysat, Gemahlene Blätter

b = $p \leq 0{,}001$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 2 mg S.g.- Reinextrakt

8 mg S.g.- Reinextrakt, 3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase, 7,5 mg S.g.- Hydrolysat,

15 mg S.g.- Hydrolysat, 30 mg S.g.- Hydrolysat, Gemahlene Blätter

c = $p \leq 0{,}001$ zwischen allen markierten Reinextrakt- Gruppen

Abb. 10: Vergleich der durchschnittlichen wöchentlichen Legeleistung [%] der Gruppen in Woche 1 bis Woche 3, Versuch 2

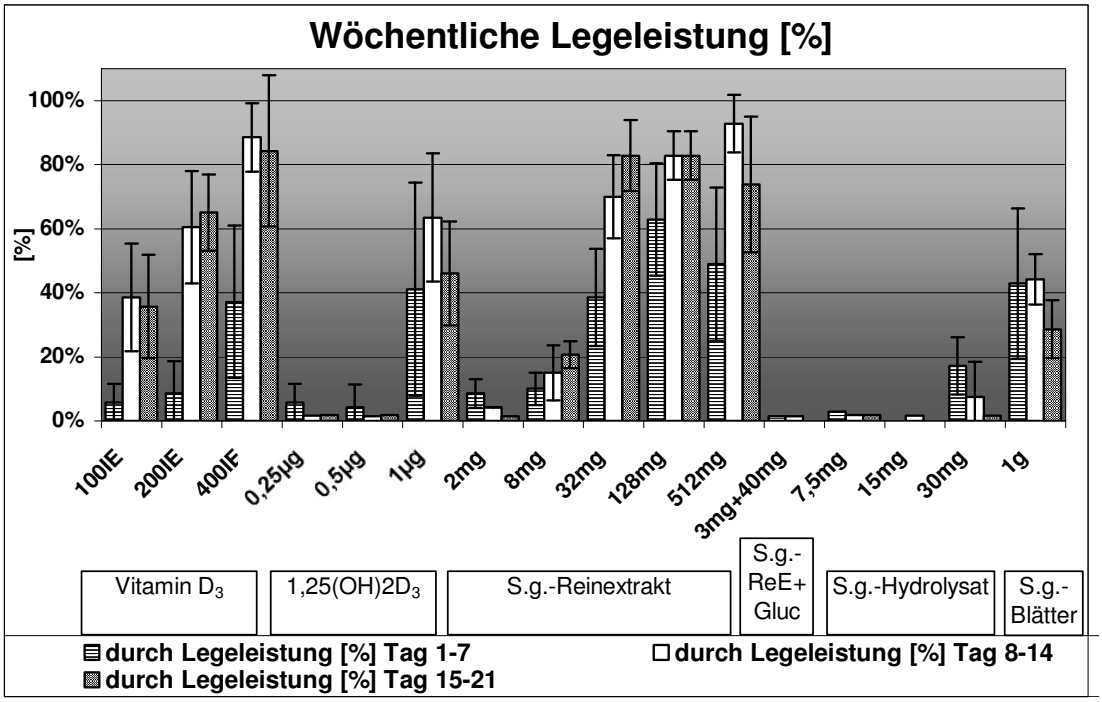
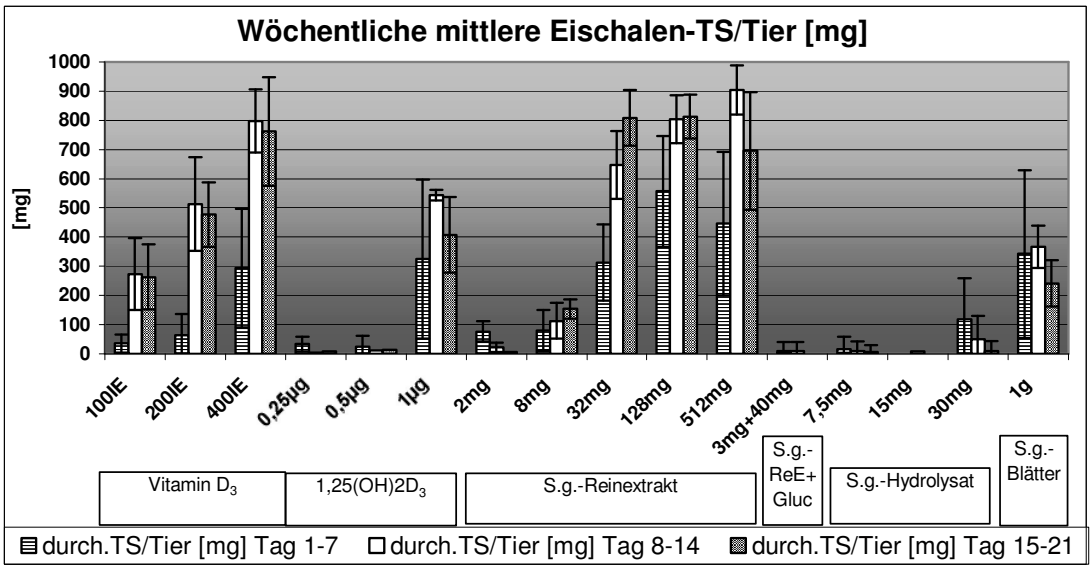


Abb. 11: Vergleich der durchschnittlichen wöchentlichen Eischalen- TS pro Tier [kg] in Woche 1 bis Woche 3 pro Gruppe, Versuch 2



4.2.6 Eigewichte

Die Betrachtung des mittleren Frischeigewichts pro Tier und Tag in Tabelle 23 lässt eine deutliche Abhängigkeit von der jeweiligen Präparatekonzentration erkennen. Je höher das Präparat im Futter dosiert ist, desto grö er ist das ermittelte Eigewicht. Mit 11,69 g legt die Gruppe mit der höchsten Dosierung des Reinextraktes (512 mg/kg) durchschnittlich das signifikant schwerste Ei.
Beim Einsatz des S.g.- Hydrolysates in steigender Dosierung kann keine Veränderung des Eigewichts festgestellt werden. Der Einsatz von Glucosidase zu dem Reinextrakt kann auch bei diesem Parameter keine Steigerung herbeiführen.

Beim wöchentlichen Vergleich der Eigewichte weisen die Gruppen mit Zufütterung ab 32 mg S.g.- Reinextrakt in allen drei Wochen schwerere Eier auf als die Vitamin D_3 - Standardgruppen (Vergleiche Tabelle 31 im Anhang). Die Dosiserhöhung von 128 mg auf 512 mg S.g.- Reinextrakt/kg Futter zeigt keine wesentliche Steigerung des Eigewichts. Wie in Abbildung 12 ersichtlich, zeigt auch der Einsatz von Glucosidase keine Verbesserung dieses Parameters.

4.2.7 Schalenanteil

Bei der Betrachtung des Schalenanteils pro Tag (Tabelle 23) fällt im Vergleich der Gruppen auf, dass die parallel zum Frischeigewicht ansteigenden Werte des Schalenanteils der Vitamin D_3- Standard- und 1,25$(OH)_2D_3$- Gruppen sich bei den Gruppen mit der Zufütterung von Reinextrakt positiv widerspiegeln. Signifikante Unterschiede sind in der Tabelle gekennzeichnet. Abweichend hiervon zeigt die Gruppe mit dem Diätzusatz von 3 mg Reinextrakt + Glucosidase mit 7,89 % einen deutlich höheren Wert als die Vergleichsgruppe (2 mg Reinextrakt/kg Futter) mit 6,09%. Ebenso weist innerhalb der Hydrolysatgruppe, bei der im Frischeigewicht keine signifikanten Unterschiede bestehen, diejenige Tiergruppe mit der Dosierung von 30 mg/kg Futter einen deutlich größeren Schalenanteil (7,51%) auf.
Wie aus Tabelle 32 im Anhang und Abbildung 13 ersichtlich, zeigt sich im wöchentlichen Vergleich der Gruppen ähnliches wie bei den Werten für die Tage 5 bis 21.

Abb. 12: Vergleich des durchschnittlichen wöchentlichen Eigewichts pro Tag [g] in Woche 1 bis Woche 3 pro Gruppe, Versuch 2

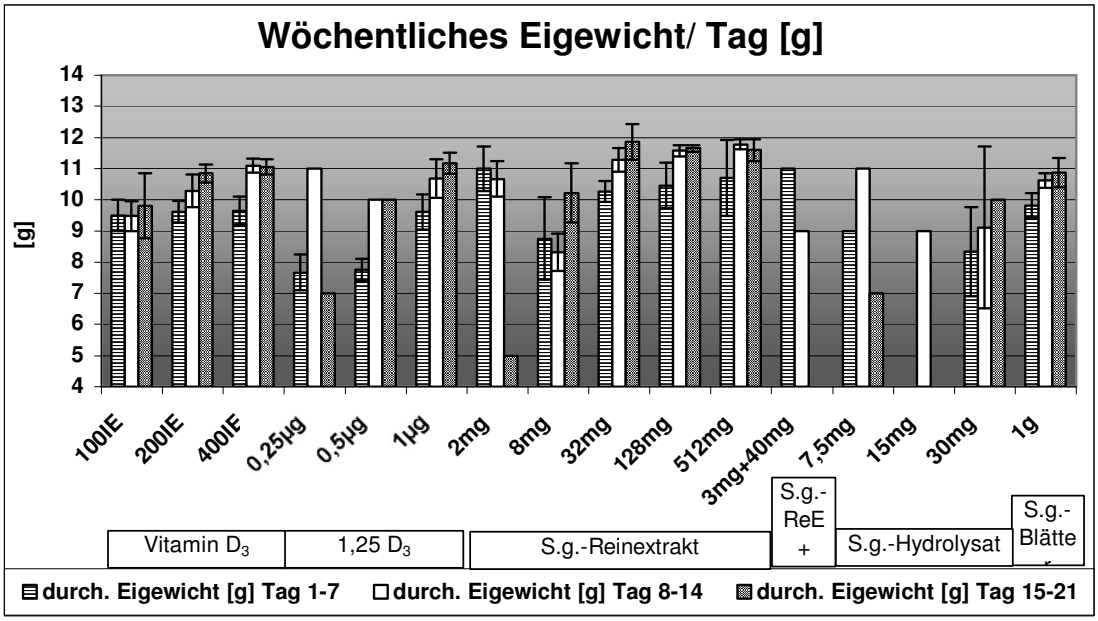


Abb. 13: Vergleich des durchschnittlichen wöchentlichen Schalenanteils [%] in Woche 1 bis Woche 3 pro Gruppe, Versuch 2

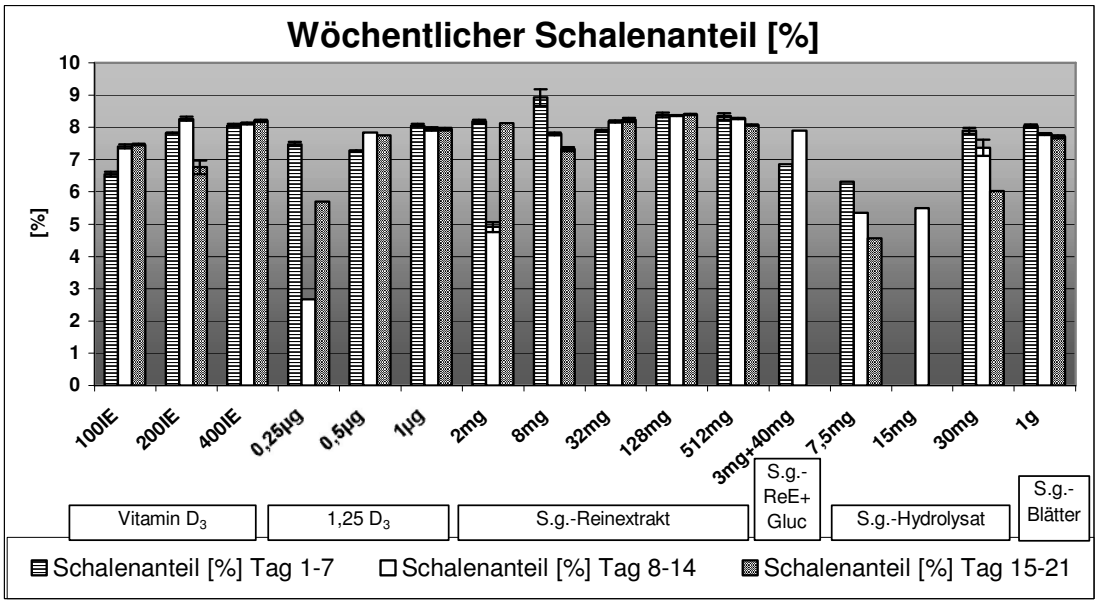


Tabelle 23: Durchschnittliches Frischeigewicht [g] und Schalenanteil [%] pro Tag (Mittelwert ± Standardabweichung), Tag 5 bis 21, Versuch 2

Diätzusatz/ kg Futter	Frischeigewicht pro Tier und Tag [g] Tag 5 bis 21		Schalenanteil [%] pro Tag Tag 5 bis 21	
	x	± s	x	± s
100 IE Vitamin D_3	9,59	0,76	7,42	0,83
200 IE Vitamin D_3	10,40	0,60	7,64	1,36
400 IE Vitamin D_3	10,87^{abc}	0,51	8,18^{f}	0,26
0,25 µg 1,25$(OH)_2D_3$	8,50	1,73	5,64	2,13
0,5 µg 1,25$(OH)_2D_3$	10,00	,-	7,79	0,07
1 µg 1,25$(OH)_2D_3$	10,76	0,61	7,99	0,28
2 mg S.g.- Reinextrakt	9,80^{a}	2,77	6,09^{efg}	1,88
8 mg S.g.- Reinextrakt	9,85^{bd}	0,83	7,85^{g}	1,07
32 mg S.g.- Reinextrakt	11,38^{d}	0,65	8,17^{g}	0,41
128 mg S.g.- Reinextrakt	11,52^{d}	0,25	8,39^{g}	0,12
512 mg S.g.- Reinextrakt	11,69^{d}	0,27	8,23^{g}	0,16
3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase	9,00^{a}	,-	7,89^{e}	,-
7,5 mg S.g.- Hydrolysat	9,00^{b}	2,00	5,41^{f}	0,88
15 mg S.g.- Hydrolysat	9,00^{a}	,-	5,49^{e}	,-
30 mg S.g.- Hydrolysat	9,29^{c}	2,34	7,51^{e}	0,87
Gemahlene S.g.- Blätter	10,63	0,43	7,82	0,24

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:

a = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 2 mg S.g.- Reinextrakt, 3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase, 15 mg S.g.- Hydrolysat

b = $p \leq 0,01$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 8 mg S.g.- Reinextrakt, 7,5 mg S.g.- Hydrolysat

c = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 30 mg S.g.- Hydrolysat

d = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 8 mg S.g.- Reinextrakt und 32 mg S.g.- Reinextrakt, 128 mg S.g.- Reinextrakt, 512 mg S.g.- Reinextrakt

e = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 2 mg S.g.- Reinextrakt und 3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase; 15 mg S.g.- Hydrolysat und 30 mg S.g.- Hydrolysat
f = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 2 mg S.g.- Reinextrakt, 7,5 mg S.g.- Hydrolysat
g = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 2 mg S.g.- Reinextrakt und 8 mg S.g.- Reinextrakt, 32 mg S.g.- Reinextrakt, 128 mg S.g.- Reinextrakt, 512 mg S.g.- Reinextrakt

4.2.8 Serumwerte

4.2.8.1 Calciumgehalt im Serum

Im Vergleich der Gruppen bewirken steigende Vitamin D_3- Gehalte im Futter eine Erniedrigung des Calciumgehaltes im Serum. Das gleiche Phänomen ist in den S.g-Reinextrakt-Gruppen bis zur Konzentration von 128 mg/kg Futter zu beobachten. In der Dosierung von 512 mg S.g- Reinextrakt/kg Futter steigt der Calciumgehalt wieder auf 203,2 mg/l an. Wie aus Tabelle 24 ersichtlich, zeigen auch die S.g.- Hydrolysat-Gruppen diesen Abfall des Calciumgehalts im Serum.

4.2.8.2 ALP im Serum

In der gleichen Tabelle (Tabelle 24) sind die Gehalte der Alkalischen Phosphatase im Serum der Tiere aufgelistet. In allen Gruppen sind bei steigender Dosierung des jeweiligen Futterzusatzes deutlich fallende Werte der ALP sichtbar. Signifikante Unterschiede sind in der Tabelle kenntlich gemacht. Den grö ten ALP- Gehalt (5043 U/L) weist die Gruppe mit der niedrigsten Konzentration S.g.- Reinextrakt auf. Bis zu einer Konzentration von 128 mg S.g.- Reinextrakt/kg Futter nimmt der Gehalt kontinuierlich auf einen Wert von 638 U/L ab. Die vierfache Dosierung dieser Menge (512 mg) lässt den Wert wieder auf 677 U/L ansteigen.

Tabelle 24: Durchschnittlicher Calciumgehalt im Serum [g/l] (Mittelwert ± Standardabweichung); Durchschnittlicher Alkalische Phosphatase- Gehalt im Serum [U/L] (Mittelwert ± Standardabweichung), Versuch 2

Diätzusatz/ kg Futter	Calcium im Serum [mg/l]		ALP im Serum [U/L]	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
100 IE Vitamin D_3	214,8	70,4	1989	784
200 IE Vitamin D_3	195,0	68,7	2365^{d}	1983
400 IE Vitamin D_3	186,5^{a}	27,8	925^{def}	294
0,25 µg 1,25$(OH)_2D_3$	192,2	96,1	4063^{df}	2634
0,5 µg 1,25$(OH)_2D_3$	259,3^{a}	85,9	3511^{f}	1497
1 µg 1,25$(OH)_2D_3$	199,5	83,9	2428^{d}	1407
2 mg S.g.- Reinextrakt	261,6^{ab}	74,3	5043^{fghi}	1162
8 mg S.g.- Reinextrakt	233,4	92,3	3596^{fhi}	2408
32 mg S.g.- Reinextrakt	184,3^{bc}	41,0	1524^{gk}	1283
128 mg S.g.- Reinextrakt	178,8^{b}	33,9	638^{hk}	315
512 mg S.g.- Reinextrakt	282,4^{ac}	108,5	677^{ik}	342
3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase	203,2^{c}	71,1	4695^{fk}	2135
7,5 mg S.g.- Hydrolysat	201,5	31,6	4259^{df}	1825
15 mg S.g.- Hydrolysat	188,7	50,0	3267^{e}	1478
30 mg S.g.- Hydrolysat	171,9	54,6	2776^{d}	1528
Gemahlene S.g.- Blätter	210,7	52,9	2983^{e}	1299

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen

a = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 0,5 µg 1,25$(OH)_2D_3$, 2 mg S.g.- Reinextrakt bzw. 512 mg S.g.- Reinextrakt

b = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 2 mg S.g.- Reinextrakt und 32 mg S.g.- Reinextrakt bzw. 128 mg S.g.- Reinextrakt

c = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 512 mg S.g.- Reinextrakt und 32 mg S.g.- Reinextrakt bzw. 3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase

d = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 200 IE Vitamin D_3 bzw. 30 mg S.g.- Hydrolysat; 1 µg $1,25(OH)_2D_3$ und 0,25 µg $1,25(OH)_2D_3$ bzw. 7,5 mg S.g.- Hydrolysat

e = $p \leq 0,01$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 15 mg S.g.- Hydrolysat bzw. Gemahlene Blätter

f = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 0,25 µg $1,25(OH)_2D_3$, 0,5 µg $1,25(OH)_2D_3$, 2 mg S.g.- Reinextrakt, 8 mg S.g.- Reinextrakt, 3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase bzw. 7,5 mg S.g.- Hydrolysat

g = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 2 mg S.g.- Reinextrakt und 32 mg S.g.- Reinextrakt

h = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 128 mg S.g.- Reinextrakt und 2 mg S.g.- Reinextrakt bzw. 8 mg S.g.- Reinextrakt

i = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 512 mg S.g.- Reinextrakt und 2 mg S.g.- Reinextrakt bzw. 8 mg S.g.- Reinextrakt

k = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase und 32 mg S.g.- Reinextrakt, 128 mg S.g.- Reinextrakt bzw. 512 mg S.g.- Reinextrakt

5. Diskussion

5.1 Kritik der Methoden

5.1.1 Stall und Haltung der Tiere

In den beiden aufeinander folgenden Versuchen wurden die Wachtelhennen in Drahtkäfigen mit Schiebetür und vorgehängtem Futtertrog gehalten. Licht- und Klimabedingungen wurden automatisch geregelt. Die Tiere wurden mit Leuchtstoffröhren nach einem vom Zentralverband der deutschen Geflügelwirtschaft e.V. festgesetzten Lichtprogramm 24 Stunden pro Tag über mit Licht versorgt. Luftzufuhr und Temperatur wurden über eine vollautomatische Belüftungsanlage gesteuert und mehrmals täglich kontrolliert. Durch die gleichmäßige Verteilung der Käfige im Raum wurden Licht- und Temperaturunterschiede weitgehend ausgeglichen.
Einmal täglich wurde kontrolliert, ob trotz abgedeckter Futtertröge, die ein Futterverstreuen weitmöglich verhindern sollten, eine ad libitum Aufnahme von Futter und Wasser erfolgen konnte. Trotz dieser standardisierten Versuchsbedingungen ließ sich keine 100 prozentige Überwachung der Tiere und ihrer Haltungsbedingungen durchführen. Deshalb und aufgrund wechselnder Bedingungen, wie Alter der Tiere oder Depletionsdauer ist eine Vergleichbarkeit zwischen den beiden Versuchen nicht ohne weiteres möglich. Das Schwanken der Reaktionslage der Wachtelhennen ist an den Standardregressionsgraden der jeweiligen Vitamin D_3- Gruppen sichtbar.

5.1.2 Der Wachteleischalentest

Der Wachteleischalentest wird mit dem Messparameter Eischalentrockengewicht als biologisches Verfahren herangezogen, um den Gehalt von D- Metaboliten in calcinogenen Pflanzen, wie Solanum glaucophyllum und Trisetum flavescens zu verfolgen, und sie in ihrer Wirksamkeit mit Vitamin D_3- und $1,25(OH)_2D_3$-Standardgruppen zu vergleichen.
Seit seinen Anfängen (GROPP und ZUCKER, 1971) umfasst der Test eine Kontroll-, eine Depletions- und eine eigentliche Testphase. Zunächst werden die in Gruppen eingestallten Wachteln bei Fütterung mit Legewachtelfutter auf ihre Gesundheit und Legeleistung hin überprüft, so dass latent kranke Tiere oder Tiere mit niedriger Legeleistung frühzeitig erkannt und aus dem Versuch herausgenommen werden können. Dann wird durch Verfütterung einer Vitamin D- freien Ration eine rasche und gleichmäßige Entleerung der Vitamin D- Speicher der Wachteln angestrebt. Sichtbar wird diese Entleerung durch den Rückgang der Legeleistung und das Legen von dünnschaligen bis schalenlosen Eiern. Wegen der geringen Speicherkapazität von Vitamin D (HOFMAN, 1971) tritt dieses Phänomen schnell auf und die Tiere sind nach 2 bis 3 Wochen fast vollständig depletiert (BAUMEISTER, 1972). In der eigentlichen Testphase können nun Präparate von Vitamin D_3 und calcinogenen Pflanzen getestet werden. Dieser Test eignet sich sowohl zur quantitativen Vitamin D_3 Bestimmung zum Wirkungsvergleich verschiedener Vitamin D_3- Ester (RAMBECK et al. 1981) als auch zur Messung der Vitamin D_3- analogen Aktivität in Trisetum flavescens und Solanum glaucophyllum (RAMBECK und ZUCKER, 1982). Es ist dabei möglich bei suboptimaler Vitamin D- Versorgung (20- 70%) die Aktivität natürlicher und synthetischer Metaboliten nebeneinander zu bestimmen (KOPP, 1985) und eine direkte lineare Beziehung zwischen der Vitamin D- Aufnahme mit dem Futter und der Calciumausscheidung über die Eischale zu erstellen (ZUCKER und GROPP, 1968). Der Parameter Calciumausscheidung über die Eischale wurde durch das leichter zu bestimmende Eischalentrockengewicht ersetzt, nachdem festgestellt wurde, dass der Calciumanteil in der Eischale auch bei unterschiedlichem Schalengewicht gleich bleibt (GROPP und ZUCKER, 1971). Das Eischalentrockengewicht dient als Maßstab für die biologische Aktivität der eingesetzten Präparate. Der Wachteleischalentest gilt als bisher geeignetste Methode, um die Bioverfügbarkeit von Vitamin D_3 und seiner Metaboliten in

natürlichen oder künstlichen Präparaten zu testen, da andere Methoden, wie z.B. die Messung des Calciumgehalts- oder 25(OH)- Gehalts im Plasma zu ungenau oder wesentlich aufwendiger sind. Zudem ist der Plasmacalciumgehalt in engen Grenzen reguliert und zeigt kaum Veränderungen, während die Legeleistung und das Eischalengewicht schnell auf Veränderungen bei der Zufuhr von Vitamin D reagieren und deutliche Reaktionen zeigen. Mit den weiteren Knochen- und Blutparametern lassen sich die gewonnenen Ergebnisse weiter festigen. Des weiteren ist seine Zuverlässigkeit und Genauigkeit durch reproduzierbare Daten nachgewiesen (THIERER, 1989).

Die japanische Wachtel (Coturnix coturnix japonica) hat gegenüber anderen Vögeln in diesem Test einige Vorteile zu bieten, weshalb sie als Versuchstier eingesetzt wird. Bezüglich Körpergröße, Futterbedarf und Platzanspruch liegt sie etwa zwischen Maus und Ratte, womit sie auch für Untersuchungen auf anderen Gebieten von Interesse ist. Infektionskrankheiten sind unter den üblichen Haltungsbedingungen kein Problem. ZUCKER et al. (1967) geben an, dass eine Käfighöhe von 30 cm nicht wesentlich überschritten werden sollte, da sich die Tiere sonst durch Hochfliegen schwere Verletzungen zufügen. Durch gleichmäßige Bedingungen, ruhiges Hantieren, wenig Störungen und vollautomatische Überwachung der Klimabedingungen lassen sich die Tiere in ihrer außergewöhnlich hohen und regelmäßigen Legeleistung konstant halten (GERKEN and MILLS, 1993). Sie beginnen ihre Legetätigkeit im Alter von 5 bis 6 Wochen und legen im Jahr etwa gleich viele Eier wie Hühner (durchschnittlich 250 Stück). Auch der prozentuale Gehalt des Ei-Inhalts der beiden Arten ist sehr ähnlich, bis auf den geringfügig niedrigeren Schalenanteil der Wachteleier. Der intensivere Stoffwechsel der Wachteln drückt sich auch im Eigewicht aus, das beim Huhn nur 3% (=60 g), bei der Wachtel hingegen 7% (=10 g) des Körpergewichts beträgt (ZUCKER et al., 1967). Die Calciumausscheidung über das Ei ist bei vergleichbarer Legeleistung fast doppelt so groß wie beim Huhn. Daraus ist zu folgern, dass die Wachtel schneller auf Vitamin D- Mangel reagiert und es zu einer rascheren Depletierung des Körpers kommt. Ein weiterer Vorteil der Wachtel ist der geringere Futterverbrauch pro Ei (24 g/Ei zu 170 g/Ei bei Hühnern), der sich in den Futterkosten, vor allem aber in der geringeren benötigen Substanzmenge niederschlägt. Bei kostspieligen oder in geringen Mengen vorhandenen Präparaten können im Vergleich zu Hühnern mit Wachteln größere Tierzahlen eingesetzt werden.

5.1.3 Versuchsdurchführung

Beide Versuche folgten dem gleichen Versuchsablauf, der sich jeweils in 3 Phasen gliederte: Die Kontrollphase, die Depletionsphase und die Testphase. In der Kontrollphase wurde die tägliche Legeleistung der zusammengesetzten Wachtelgruppen festgehalten und überprüft, ob sie das geforderte Maß von 80% erreicht. In der nachfolgenden Depletionsphase musste die Legeleistung unter 50% sinken, damit von einer ausreichenden Entleerung der Vitamin D- Speicher der Tiere ausgegangen werden konnte. Um das Auftreten von Vitamin D- Mangelsymptomen zu verhindern, sollte die Depletionsphase, nach Erfahrungen von BAUMEISTER (1972), nicht länger als 18 bis 21 Tage andauern.
In der 21tägigen Testphase bekamen die Tiere den entsprechenden Diätzusatz über das Futter verabreicht und es wurden täglich die Parameter Legeleistung, Frischeigewicht, Eischalentrockengewicht und Schalenanteil bestimmt. Blut- und Knochenwerte wurden bei Versuchsende bestimmt.

5.1.4 Futterinhaltsstoffe und Versuchspräparate

Das gesamte verwendete Futter wurde vor jedem Versuchsabschnitt im institutseigenen Mischraum aus den jeweiligen Komponenten hergestellt. Die Zusammensetzung und der Rohnährstoffgehalt ist in Tabelle 5 und 6 aufgeführt. Um kleine Mengen gleichmäßig im Futter verteilen zu können, wurde jeweils eine Vormischung im 500 g Mischer angefertigt, bevor diese im 8 kg- Mischer mit den anderen Komponenten zu einer homogenen Ration vermischt wurden.
In der Testphase wurde in beiden Versuchen als Standardrationen Vitamin D_3 und der im Körper natürlicher Weise vorkommende Vitamin D- Metabolit $1,25(OH)_2D_3$ in unterschiedlicher Dosierung zugesetzt. Daneben kamen im ersten Versuch Rohextrakte von Solanum glaucophyllum mit und ohne Zusatz von Glucosidase, Stängel von Solanum glaucophyllum und Trisetum flavescens- Präparate zum Einsatz. Im zweiten Versuch waren von Solanum glaucophyllum angereicherte Extrakte, wiederum mit und ohne Glucosidasezusatz, und Hydrolysate von den Extrakten, sowie gemahlene Blätter zu testen.

5.1.5 Messparameter

Der Wachteleischalentest wurde ausgewählt, da er sich in verschiedenen vorangegangenen Versuchen (REICHENBÄCHER, 1979; RAMBECK und ZUCKER, 1985; THIERER, 1989) als bisher geeignetste Methode herausgestellt hat, um die biologische Aktivität natürlicher und synthetischer Vitamin D- Metaboliten zu bestimmen. Im Bereich von 20 bis 70% (das entspricht 80 bis 320 IE) der optimalen Vitamin D- Versorgung ergibt sich eine direkte lineare Beziehung zwischen der Calciumausscheidung über die Eischale und der Vitamin D- Konzentration im Futter. Da der prozentuale Calciumanteil in der Eischale auch bei suboptimaler Vitamin D-Versorgung konstant bleibt (GROPP und ZUCKER, 1971), wurde alternativ dazu das einfacher zu bestimmende Eischalentrockengewicht als Parameter herangezogen. Die Bioverfügbarkeit von Vitamin D- Metaboliten kann durch einige Faktoren beeinflusst werden, wozu insbesondere die Versorgung mit anderen Nährstoffen (besonders Calcium), die Formulierung des zu testenden Präparates und die Akzeptanz durch die Wachteln zählt.
Die Eier zeichnen sich als Probenmaterial dadurch aus, dass sie leicht und ohne invasiven Eingriff in den Vogel gewonnen werden können. Allerdings konnte bei diesem Versuchsaufbau nur der Mittelwert einer Gruppe bestimmt werden, da die Tiere in Gruppen in den Käfigen saßen und nicht jedem Tier direkt das entsprechende Ei zugeordnet werden konnte. Durch einen sorgfältigen Umgang mit den Eiern beim Wiegen, Aufschneiden, Auswaschen, Trocknen und erneutem Wiegen, wurden Fehlerquellen bei der Bestimmung ausgeschlossen.
Als Hauptkriterium zur Bestimmung der biologischen Aktivität der eingesetzten Präparate wird der Parameter Eischalentrockengewicht herangezogen.
Die weiteren Parameter aus Knochen- und Serumproben bieten eine zusätzliche Möglichkeit, die im Eischalentest erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren. Bei alleiniger Verwendung führen diese jedoch zu weit weniger aussagekräftigen Resultaten, da z.B. bei der Bestimmung der ALP im Serum die Streuungsbreite innerhalb der Gruppen zu hoch ist, um eindeutige Ergebnisse zu erzielen. Ob die Genauigkeit der Werte verbessert werden kann, wenn die technischen Schwierigkeiten bei der Blutgewinnung, wie z.B. Kontamination durch Kropfinhalt oder Federn im Serum-röhrchen beseitigt werden können und in wie weit lipämisches und hämolytisches Serum die Messmethodik stört, müsste in weiteren Versuchen geklärt werden.

Die Gewinnung der Knochenproben birgt weit weniger Probleme als die Gewinnung des Serums. Allerdings kann gesagt werden, dass in diesen Versuchen alleine der Parameter Knochenasche genügend Aussagekraft hat. Die Werte von Calcium und Phosphor lassen keinen Schluss auf die Aktivität des verabreichten Präparates zu. Auch die Futterparameter eignen sich nur bedingt zur Beurteilung. Durch Futterverstreuen und durch die einmalige Futterrückwaage am Ende der Testphase kann es zu ungenauen Ergebnissen kommen. Mit diesen Parametern lassen sich grob die Akzeptanz und Verwertbarkeit der Futterzusätze durch die Wachteln beurteilen. Der Futterverbrauch eines Vogels pro Ei und pro Gramm Eischale ist zwischen den Gruppen nur bei annähernd gleicher Legeleistung vergleichbar.

5.2 Mortalität

Die Mortalität während der Testphase des ersten Versuchs lag bei knapp 5%.
2 Wachteln verendeten an Genickbruch nach Einklemmen des Kopfes zwischen den Gitterstäben der Käfige, 4 mussten aufgrund von Legedarmvorfällen und ein Tier wegen Kümmerns ohne weitere konkrete Symptome getötet werden.
Während der Testphase des zweiten Versuchs starben insgesamt 14 von 157 Tieren. Das entspricht einer Mortalitätsrate von knapp 9%. Die Todesursachen waren auch hier größtenteils auf Technopathien zurückzuführen. Die pathologische Untersuchung (Klinik für Geflügelkrankheiten in Oberschleißheim) am Versuchsende von jeweils einer Wachtel pro Gruppe ergab keinen Befund, der auf einen ursächlichen Zusammenhang für die Todesfälle mit der Fütterung hinweist. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die von REICHENBÄCHER (1979) angemerkte Verkalkungen der Aorta, der Lungenknorpel und der Nieren durch Solanum glaucophyllum bei jungen Wachtel, gelegt. Es konnten jedoch keinerlei ähnliche Symptome gefunden werden.

5.3 Gewichtsentwicklung

Um den Wachteln übermäßigen Stress und einen damit verbundenen Rückgang der Legeleistung zu ersparen, wurden sie im ersten, wie auch im zweiten Versuch in der Testphase lediglich zu Beginn und am Ende gewogen. Aus diesen Daten ist ersichtlich, dass die Tiere in beiden Versuchen geringfügig an Gewicht verloren hatten. Allerdings lässt sich kein Zusammenhang zu den eingesetzten Präparatdosierungen herstellen, da sich diese Gewichtsreduktion durch alle Gruppen des ersten und zweiten Versuchs zieht. Obwohl die Tiere in beiden Versuchen unterschiedlich alt waren, lässt sich der Altersaspekt ebenfalls ausschließen. Erkrankungen können aufgrund des Obduktionsbefundes der in der Klinik für Geflügelkrankheiten pathologisch untersuchten Tiere ebenfalls ausgeschlossen werden.

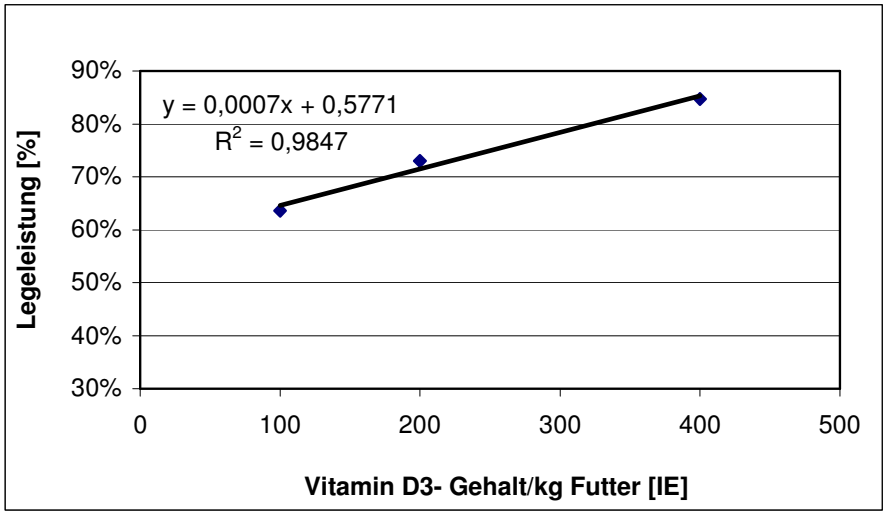
5.4 Futterverbrauch

Obwohl der Futterverbrauch nicht zu den ausschlaggebenden Parametern des Eischalentests zählt, wurde er jedoch zusätzlich bestimmt, um eine mögliche Inakzeptanz des Futters durch die Wachteln festzustellen. Zwischen den Gruppen des jeweiligen Versuchs waren nur geringfügige Unterschiede im Futterverbrauch erkennbar, so dass keine verringerte Futteraufnahme aufgrund eines Präparatzusatzes beobachtet werden konnte. Um eine Verfälschung der Werte durch Futterverluste weitmöglich zu verhindern, wurden die Futtertröge so gesichert, dass zwar ein freier Zugang und eine ad libitum Aufnahme von Futter durch die Vögel möglich war, Futterverstreuen durch Baden darin jedoch verhindert wurde.
Der durchschnittliche Futterverbrauch pro Ei und pro Gramm Eischale zeigt bei steigender Dosierung des Präparates signifikante Abnahmen im Verzehr. Der wesentlich höhere Futterverbrauch pro Ei und pro Gramm Eischale im zweiten Versuch erklärt sich aus der deutlich niedrigeren Legeleistung einiger Gruppen bei gleichbleibendem Futterverzehr. Diese Werte sind deshalb als rein rechnerische Ergebnisse anzusehen und haben als Vergleichsbasis zu anderen Gruppen keine Aussagekraft. Erst bei annähernd gleicher Legeleistung ist dieser Parameter zum Vergleich der Gruppen geeignet.

5.5 Legeleistung

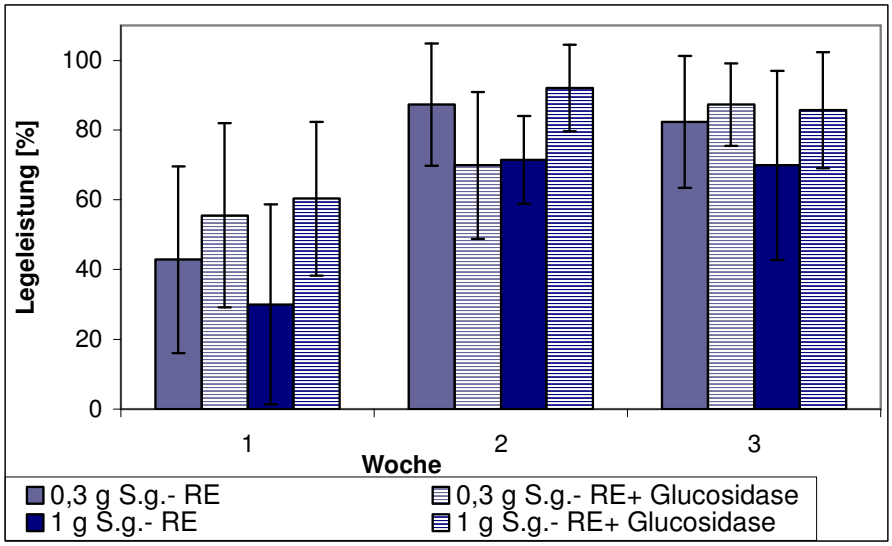
Die Anzahl der gelegten Eier pro Gruppe wurde täglich vormittags bestimmt und daraus die Legeleistung für die Abschnitte Tag 1 bis 7, Tag 8 bis 14, Tag 15 bis 21 und Tag 5 bis 21 der Testphase berechnet. Üblicherweise wurde bisher die durchschnittliche Legeleistung von Tag 5 ab ausgewertet, um eine in den ersten Tagen langsam einsetzende Wirkung der Präparate auszuschließen und konstante Werte zu erhalten. Mit der detaillierten Betrachtung der Legeleistung in wöchentlichen Abschnitten ist dieses eventuell schnellere Einsetzen der Legeleistung genauer zu erkennen. Die durchschnittliche Legeleistung im Untersuchungszeitraum Tag 5 bis 21 steigt mit zunehmender Dosierung von Vitamin D_3 und 1,25$(OH)_2D_3$ an, so dass für diese Gruppen im ersten Versuch Standardregressionsgeraden (r= 0,9847 bzw. r= 0,9235) erstellt werden konnten (siehe Abb. 14). Der positive Einfluss von Trisetum flavescens auf die Legeleistung in diesem Versuch findet sich auch in der Arbeit von REICHENBÄCHER (1979) . Es ergibt sich eine Vitamin D-Äquivalenz des Trisetums von etwa 8 IE/g, was über den ermittelten Werten von REICHENBÄCHER (1979) mit 4 IE/g liegt. Abweichungen können in unterschiedlichen Standorten der Pflanze, dem Wachstumsstand und der Art der Verarbeitung des Pflanzenmaterials begründet sein. Der Einsatz von Glucosidase zu 1 g S.g.-Rohextrakt führt zu einem signifikanten Anstieg gegenüber der Gruppe ohne Glucosidase.

Abb. 14: Durchschnittliche Legeleistung pro Tier [%] in Abhängigkeit vom Vitamin D_3- Gehalt pro kg Futter, Versuch 1



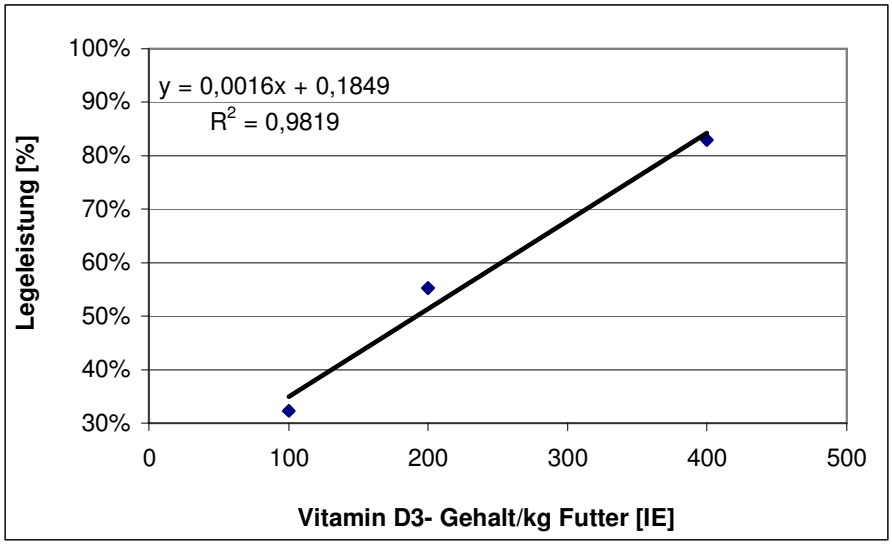
Betrachtet man den wöchentlichen Verlauf, so zeigt sich, dass in der ersten Woche bei den S.g.- Rohextrakt- Gruppen mit 3 g und 1 g + Glucosidase die Legeleistung tendenziell schneller wieder einsetzt und damit höhere Werte erreicht als die Vitamin D_3- Standardgruppen.
Die Glucosidase verhilft vermutlich durch die Abspaltung des Zuckerrestes von $1,25(OH)_2D_3$ zu einer schnelleren Bindung des Metaboliten an den zuständigen Rezeptor und sorgt dafür, dass Calcium schneller für die Eischalenbildung zur Verfügung steht. Die Legeleistung derjenigen Gruppen, die Extrakte erhielten, steigt gegenüber den Vitamin D_3 - Gruppen schneller an, da bereits $1,25(OH)_2D_3$ vorliegt und nicht wie bei Vitamin D_3 erst im Körper eine Metabolisierung zu $1,25(OH)_2D_3$ stattfinden muss.
In der zweiten Woche erreichen alle Gruppen größere Legeleistungen als in der dritten Woche, so dass von einer Art überschießender Reaktion aufgrund von Vitamin D- Angebot nach vollständiger Entleerung der Speicher ausgegangen werden kann. In der dritten Woche sinken die hohen Werte der zweiten Woche ab. Ob die erreichten Werte auf diesem Niveau weiterhin gehalten werden können, müsste in weiteren Versuchen mit längerem Untersuchungszeitraum überprüft werden.
In den Gruppen, die in ihrem Futterzusatz wenig biologische Aktivität der Vitamin D-Metaboliten erwarten ließen (0,125 µg $1,25(OH)_2D_3$ und S.g.- Stängel), sinkt in der dritten Woche die Legeleistung drastisch ab und erreicht Werte, die unter denen der ersten Woche liegen. Dies könnte auf eine Art Erschöpfungsphänomen der Vitamin D- Speicher hinweisen.
In allen drei Wochen weist die Gruppe, die zu 1 g S.g.- Rohextrakt noch Glucosidase erhielt, eine vergleichsweise höhere Legeleistung als die Gruppe ohne Glucosidase auf. Es ergibt sich eine biologische Wirksamkeit der Rohextrakte in den Dosierungen 0,1 bis 3 g, die zwischen den Werten der Vitamin D_3- Standardgruppen mit 200 und 400 IE/kg Futter liegt. Vermutlich bindet das glucosidisch gebundene $1,25(OH)_2D_3$ schlecht am Vitamin D-Rezeptor.
Mittels Glucosidase (körpereigen oder von außen zugesetzt) erfolgt die Abspaltung des Zuckerrests, wodurch nun eine bessere Bindung an den Rezeptor möglich wird und eine Reaktion ausgelöst werden kann (Vgl. Abb. 15).

Abb. 15: Vergleich der Legeleistungen von 0,3 g und 1 g Solanum- Rohextrakt in Woche 1, Woche 2 und Woche 3, Versuch 1



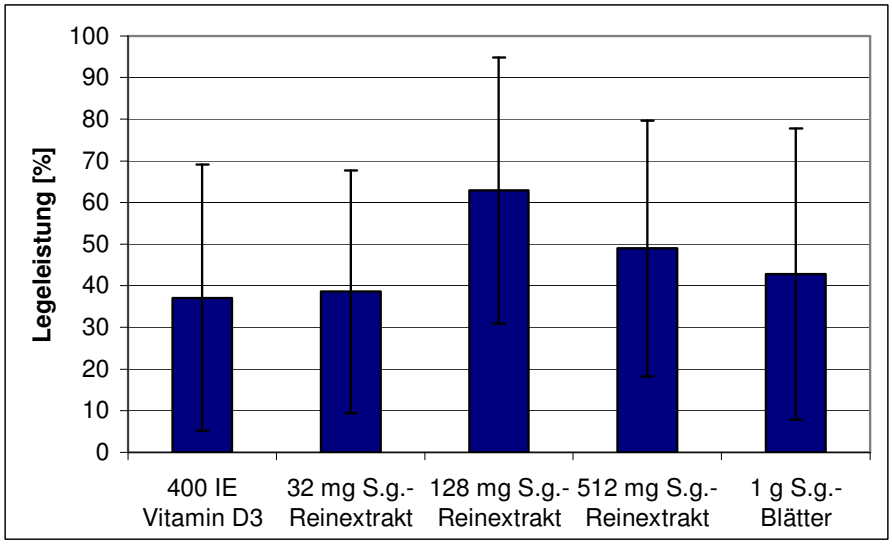
Auch im zweiten Versuch steigt bei den Gruppen mit der Zufütterung von Vitamin D_3 und 1,25$(OH)_2D_3$ die durchschnittliche Legeleistung im Untersuchungszeitraum Tag 5 bis 21 mit zunehmender Dosierung an, so dass für diese Gruppen ebenfalls Standardregressionsgeraden (r= 0,9882 bzw. r= 0,8987) erstellt werden konnten (siehe Abb. 16). An der Legeleistung zeigt sich deutlich die abweichende Reaktionslage der Tiere im ersten und zweiten Versuch. Sie lässt sich durch die unterschiedliche Steigung der Geraden bei gleichem Präparat erkennen.
Nach Verfütterung des Reinextraktes ist bis zu der Dosierung 128 mg/kg ein hoch signifikanter Unterschied zwischen jeder Dosierung sichtbar. Da selbst durch die vierfache Dosiserhöhung (auf 512 mg/kg) keine Verbesserung der Legeleistung mehr erzielt werden kann, ist davon auszugehen, dass die maximale Ausschöpfung der Vitamin D- metabolitartigen Wirksamkeit mit 128 mg erreicht ist.
Demnach erreicht die eingesetzte Menge des Solanum Reinextrakt einen äquivalenten Vitamin D_3- Gehalt von etwa 3125 IE/g. Der Zusatz von Glucosidase zum Reinextrakt zeigt keinen positiven Effekt bei diesem Parameter.

Abb. 16: Durchschnittliche Legeleistung pro Tier [%] in Abhängigkeit vom Vitamin D_3- Gehalt pro kg Futter, Versuch 2



Betrachtet man den wöchentlichen Verlauf**,** zeigt sich auch hier, dass die Legeleistung in der ersten Woche beim Einsatz von S.g.- Reinextrakt in der Dosierung 128 mg/kg schneller wieder ein signifikant höheres Niveau erreicht, als die Vitamin D_3- Standardgruppen. In der Dosierung 32 mg/kg und der höchsten Dosis (512 mg/kg) liegt die Legeleistung ebenso wie die der gemahlenen Blätter in der ersten Woche nach Depletion geringgradig über dem Wert der Standardgruppe mit 400 IE/kg (Abb.17). Die Blätter können allerdings in der zweiten und dritten Woche das Niveau nicht halten und fallen auf niedrigere Werte zurück, so dass sie in der Berechnung der Legeleistung von Tag 5 bis 21 einen deutlich niedrigeren Wert aufzeigen, als die Kontrollgruppe. Bei langfristigem Einsatz (min. 3 Wochen) haben sie demnach eine biologische Wirksamkeit zwischen 100 und 200 IE Vitamin D_3. Wie im ersten Versuch ist auch hier das Phänomen der überschießenden Reaktion (ganz deutlich bei 512 mg) in der zweiten Woche zu beobachten.

Abb. 17: Vergleich durchschnittlicher Legeleistungen [%] in Woche 1, Versuch 2

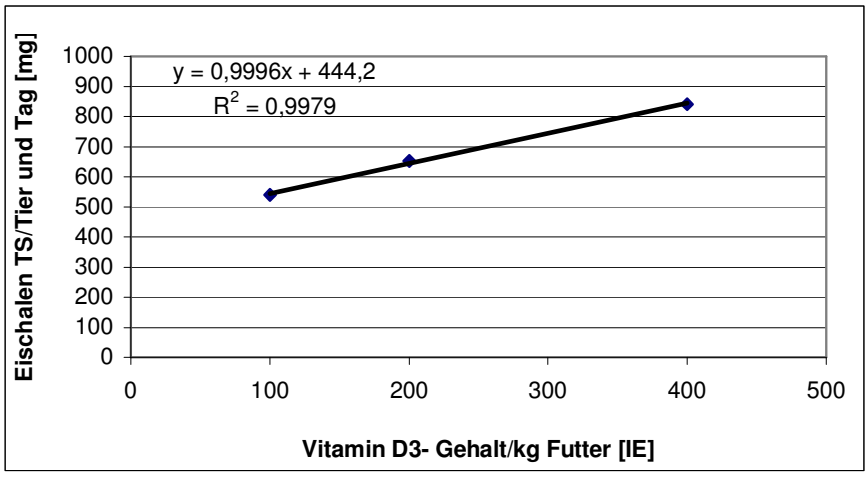


5.6 Eiparameter

5.6.1 Eischalentrockengewicht

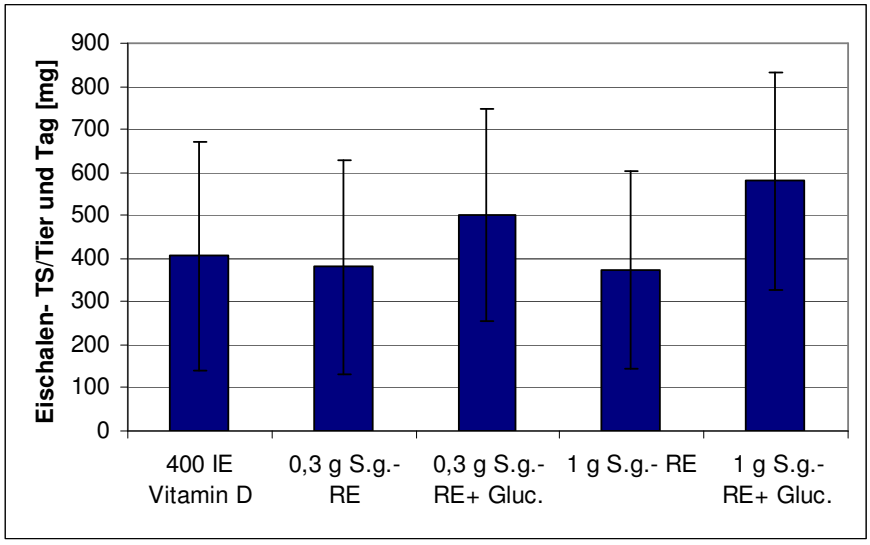
Vergleichbar mit dem Parameter Legeleistung lassen sich auch hier für die Gruppen Vitamin D_3 und $1,25(OH)_2D_3$ Standardregressionsgleichungen erstellen, die mit r= 0,9979 und r= 0,9156 sehr ähnliche Steigungswinkel aufweisen wie die der Legeleistungen (Abb. 18). Eine direkt lineare Beziehung zwischen steigenden Präparatedosierungen und erhöhter Eischalen- TS- Produktion ist entsprechend der Arbeit von THIERER (1989) zu erwarten. Auch die Stängel von Solanum glaucophyllum zeigen diese Abhängigkeit und liegen aber mit ihrer erreichten Eischalen- TS deutlich unter den Vitamin D- Gruppen. Da der calcinogene Metabolit nicht in den Stängeln der Pflanze, sondern in ihren Blättern zu finden ist (RAMBECK und ZUCKER, 1981b), entspricht die ermittelte Vitamin D- ähnliche Aktivität der Stängel von etwa 33 IE/g den Erwartungen. Der S.g.- Rohextrakt hingegen zeigt tendenziell das gleiche Bild wie bei der Legeleistung und bewirkt bei zunehmender Dosierung eine Steigerung des Eischalen- TS.
In allen Gruppen ist eine starke Korrelation zwischen Legeleistung und Eischalen- TS gegeben.

Abb. 18: Durchschnittliches Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag [mg] in Abhängigkeit vom Vitamin D_3- Gehalt pro kg Futter, Versuch 1



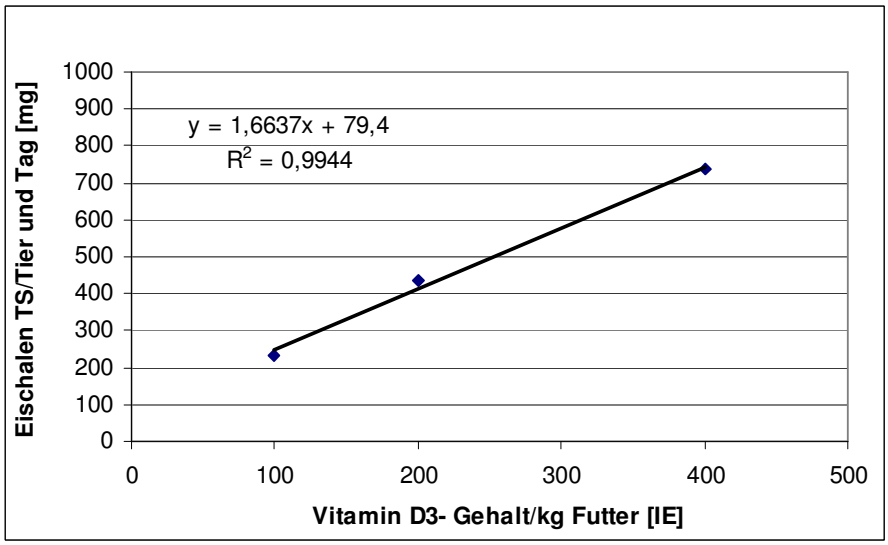
Genauso wie in der Gesamtbetrachtung fällt auch die Betrachtung der drei separat gemessenen Wochen aus:
Die Gruppen mit der Zufütterung von 0,3 g S.g.- Rohextrakt + Glucosidase und 1 g S.g.- Rohextrakt + Glucosidase, weisen in der ersten Woche signifikant höhere Werte auf als die Vitamin D_3- Standardgruppen (Abb. 19). In der zweiten Woche ist auch hier wieder die überschießende Reaktion zu messen.
Dass in den Gruppen mit sehr wenig Vitamin D- Metaboliten (0,125 µg $1,25(OH)_2D_3$ und 3 g Stängel Solanum glaucophyllum) die mittlere Eischalentrockengewichte in der dritten Woche noch unter die Werte der ersten Woche absinken, könnte durch eine fortschreitende Erschöpfung der Vitamin D-Speicher durch zu geringen Nachschub bei ebenfalls fallender Legeleistung erklärt werden.
Die Glucosidase- Zufütterung zeigt in der ersten und dritten Woche ihre Wirkung durch deutliche Steigerungen der Eischalen- TS- Produktion gegenüber ihren Vergleichsgruppen. Durch ihre externe Zusetzung führt sie schneller zu vermehrter Absorption von Calcium aus dem Darm, das somit für die Schalenproduktion zur Verfügung steht.

Abb. 19: Vergleich durchschnittlicher Eischalen- TS/Tier und Tag [mg] in Woche1, Versuch 1



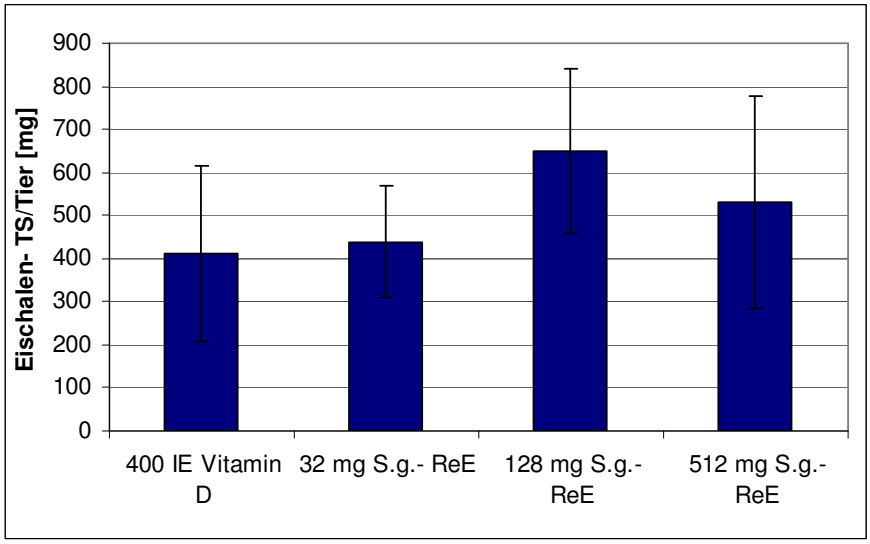
Auch im zweiten Versuch steigt bei den Gruppen mit der Zufütterung von Vitamin D_3 und $1,25(OH)_2D_3$ die Eischalen- TS- Produktion mit zunehmender Dosierung an, so dass für diese Gruppen wiederum Standardregressionsgeraden (r= 0,997 bzw. r= 0,9226) erstellt werden konnten (Abb. 20).

Abb. 20: Durchschnittliches Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag [mg] in Abhängigkeit vom Vitamin D_3- Gehalt pro kg Futter, Versuch 2



Vergleichbar mit dem Parameter Legeleistung ist bei den Reinextrakten mit einer Dosissteigerung bis 128 mg ein hoch signifikantes Ansteigen der Eischalen- TS-Produktion auslösbar.
Im Vergleich der Reinextrakte mit den Rohextrakten reichen bei den Reinextrakten wesentlich geringere Dosen (max. 512 mg) aus, um ähnliche Ergebnisse zu erzielen. Es ergeben sich Vitamin D- ähnliche Aktivitäten für die Rohextrakte zwischen 666 und 1333 IE/g und für die Reinextrakte von circa 6.250 bis 12.500 IE/g. Diese Werte übersteigen die von GIEREN (2004) ermittelten Gehalte von 400 bis 800 IE/g getrocknete Blattsubstanz des Solanums. Das lässt die Vermutung zu, dass in der technischen Herstellung eine Konzentration der Vitamin D- Metaboliten im Präparat gelungen ist.
Auch in diesem Versuch ist die enge Korrelation zwischen Legeleistung und Eischalen- TS gegeben. Bei 512 mg/kg scheint das Maximum überschritten, die Reaktion gesättigt und es kommt zu keiner Steigerung der Eischalen- TS mehr.
Beim Vergleich der mittleren wöchentlichen Eischalentrockengewichte pro Tier und Tag der Gruppen zeigen sich auch im zweiten Versuch ähnliche Verhältnisse wie beim Vergleich der wöchentlichen Legeleistung.
Aus Tabelle 30 im Anhang wird ersichtlich, dass die Steigerung der Präparatedosierungen von Vitamin D_3 auch im wöchentlichen Vergleich innerhalb der Fütterungsgruppen eine Steigerung der täglichen Eischalen- TS bewirkt.
Die Glucosidase- Zufütterung zeigt bei diesem Parameter keine Verbesserung. Die entsprechende Gruppe weist sogar niedrigere Werte auf als die Gruppe mit 2 mg S.g- Reinextrakt ohne Glucosidase.

Abb. 21: Vergleich der durchschnittlichen Eischalen- TS/Tier und Tag [mg] in Woche 1, Versuch 2



5.6.2 Schalenanteil

Der Schalenanteil ist ein rechnerischer Wert, der aus Eischalentrockengewicht und Frischeigewicht berechnet wird. Durch diese Darstellung des Schalengewichts am Gesamteigewicht lässt sich der Einfluss auf die Eischalenbildung der Präparate gut miteinander vergleichen.

Wie bei allen anderen Eiparametern, ist auch hier bei Vitamin D_3, 1,25$(OH)_2D_3$, Trisetum flavescens und dem S.g.- Rohextrakt ein Anstieg mit steigender Dosierung zu erkennen. Der Wert der Stängel liegt unter dem der Standardgruppen und bestätigt die Annahme einer Vitamin D-ähnlichen Aktivität von unter 100 IE/ 3g (<33 IE/g). Wegen hoher Standardabweichungen ist keine Signifikanz zwischen den S.g.- Rohextrakt- Gruppen mit und ohne Glucosidase nachzuweisen, obwohl tendenziell ein positiver Effekt der Glucosidase auch auf den Schalenanteil sichtbar ist.

Signifikant unterscheiden sich in der ersten Woche die hohen Schalenanteile der Gruppe mit Zufütterung von 1 g S.g.- Rohextrakt mit und ohne Glucosidase von der Vitamin D_3- Standardgruppe und belegen damit ihren positiven Einfluss auf die Eischalenbildung, wobei sich auch hier wiederum der verbessernde Effekt der Glucosidase bemerkbar macht.

Bezüglich der Gruppen des zweiten Versuchs kann genauso, wie im ersten Versuch, die Parallele zu Eischalen- TS- Produktion hergestellt werden. Dementsprechend gelten alle Befunde bezüglich des Anstiegs innerhalb der Dosierungen auch beim Schalenanteil.
Beim wöchentlichen Vergleich lässt sich in der ersten Woche beim Reinextrakt, im Gegensatz zum Rohextrakt, kein verbesserter Schalenanteil gegenüber der Vitamin D_3– Standardgruppe nachweisen. Auch in der zweiten und dritten Woche sind keine deutlichen Verbesserungen gegenüber Vitamin D_3 oder 1,25$(OH)_2D_3$ zu erkennen. Das lässt auf einen geringeren Einfluss des Reinextraktes auf die Schalenbildung schließen, als das bei dem Rohextrakt der Fall ist.
Das im ersten Versuch aufgetretene Phänomen der überschießenden Reaktion in der zweiten Woche bleibt in diesem Versuch fast vollständig aus. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die unterschiedliche Reaktionslage der Tiere in Versuch 1 und 2.

5.6.3 Frischeigewicht

Das Frischeigewicht korreliert weniger eng mit dem Schalenanteil, als das Eischalentrockengewicht mit dem Schalenanteil. Bei den Vitamin D_3-Standardgruppen ist schon zwischen 100 IE und 200 IE ein deutliches Ansteigen der Eigewichte feststellbar, während der Schalenanteil erst zwischen 200 IE und 400 IE deutlich ansteigt. Bei S.g.- Rohextrakt steigt der Schalenanteil bis zur Dosierung 1 g/kg Futter an, während das Eigewicht nur bis zu der Gruppe mit dem Futterzusatz 0,3 g ansteigt. Die Glucosidase zeigt keinen Einfluss auf das Frischeigewicht. Der geringe Anteil von Vitamin D- Metaboliten in den Stängeln von Solanum glaucophyllum spiegelt sich im Eigewicht wider. Das Eigewicht eignet sich nicht ideal als Messparameter, da es nicht so deutlich reagiert und dem entsprechend auch nicht die Ergebnisse der anderen Parameter widerspiegelt. Es reagiert deutlich langsamer, da erst in der zweiten Woche sind die jeweiligen Tendenzen klar zu erkennen. Beim Reinextrakt führt erst die Dosierung 32 mg zu einer Steigerung im Eigewicht. Bei der Konzentration 512 mg/kg Futter gibt es gegenüber 128 mg eine weitere Steigerung im Eigewicht, während in den vorangegangenen Parametern die Dosierung 128 mg/kg als Maximum angesehen werden konnte.

5.7 Knochenparameter

5.7.1 Knochenaschegehalt

Der Knochenaschegehalt von Femur und Tibiotarsus eines Tieres weist keinen bedeutenden Unterschied auf. Innerhalb der Vitamin D_3 -Standardgruppen und den Gruppen mit $1,25(OH)_2D_3$ ist tendenziell ein Ansteigen des Knochenaschegehalts zu erkennen, wobei eine Signifikanz zwischen den Dosierungen 0,125 µg und 0,5 µg gegeben ist. Dies bestätigt die Annahme (HAUSSLER, 1976), dass $1,25(OH)_2D_3$ eine ca. 10fach höhere Wirksamkeit auf die Knochenasche hat als Vitamin D_3.
Insgesamt fällt auf, dass die Aschegehalte der Gruppen, die S.g.- Rohextrakt erhalten hatten, ab der Dosierung 0,3 g/kg allesamt höhere Werte aufweisen als die der Vitamin D_3- Standardgruppen. Ihre Vitamin D- ähnliche Aktivität liegt oberhalb des Werts der Standardgruppe, die 400 IE Vitamin D_3 erhalten haben. Somit kann vermutet werden, dass Solanum glaucophyllum bezüglich der Wirkung auf den Knochen eine höhere biologische Wirksamkeit aufweist als bezüglich der Eischalenbildung. Die Dosierung 0,1 g ist hoch signifikant niedriger gegenüber allen anderen S.g.- Gruppen, woraus zu schließen ist, dass diese Dosierung zu geringe biologische Aktivität besitzt.
Der Zusatz von Glucosidase zu 0,3 g S.g.- Rohextrakt verursacht eine signifikante Erhöhung gegenüber der gleichen Dosierung ohne Glucosidase.
Die Werte der S.g.- Stängel sind hoch signifikant niedriger als die der Gruppe mit 0,5 µg $1,25(OH)_2D_3$. Die biologische Wirksamkeit der Inhaltsstoffe der gemahlenen Stängel liegt noch unterhalb der Wirksamkeit von 100IE Vitamin D_3. Daraus ist zu folgern, dass die Vitamin D- Metaboliten nicht in gleicher Menge in den Stängeln der Pflanze vorhanden ist, wie in den Blättern, aus denen der wässrige Extrakt hergestellt wurde. Der Einsatz von Trisetum flavescens in steigender Dosierung zeigt keine Veränderung im Aschegehalt und liegt mit ihrer biologischen Aktivität im Bereich zwischen 200 und 400 IE Vitamin D_3.

Beim Vergleich der Knochenaschegehalte von Femur mit der Eischalen- TS/Tier für jede Gruppe des ersten Versuchs ist erkennbar, dass sowohl für Vitamin D_3 als auch für $1,25(OH)_2D_3$ eine positive Korrelation besteht. Es zeigt sich auch der verstärkte Einfluss von $1,25(OH)_2D_3$ auf den Knochenstoffwechsel und damit auf den Knochenaschegehalt. Bei Trisetum flavescens ist in der Dosierung 24 g/kg Futter ein deutliches Ansteigen im Eischalen- TS- Gehalt/Tier im Vergleich zur Dosierung 8 g bemerkbar, der sich nicht im Knochenaschegehalt widerspiegelt. Daraus lässt sich folgern, dass Trisetum flavescens einen stärkeren Einfluss auf die Eischalenbildung als auf den Knochenstoffwechsel hat.

5.7.2 Calcium- und Phosphorgehalt in der Knochenasche

Bei Betrachtung der mittleren Calcium- und Phosphorgehalte der Knochenasche von Femur und Tibiotarsus kann keine ursächliche Beziehung zwischen der Dosierung des jeweiligen Präparates und den ermittelten Werten festgestellt werden.

5.8. Serumparameter

5.8.1 Calciumgehalt im Serum

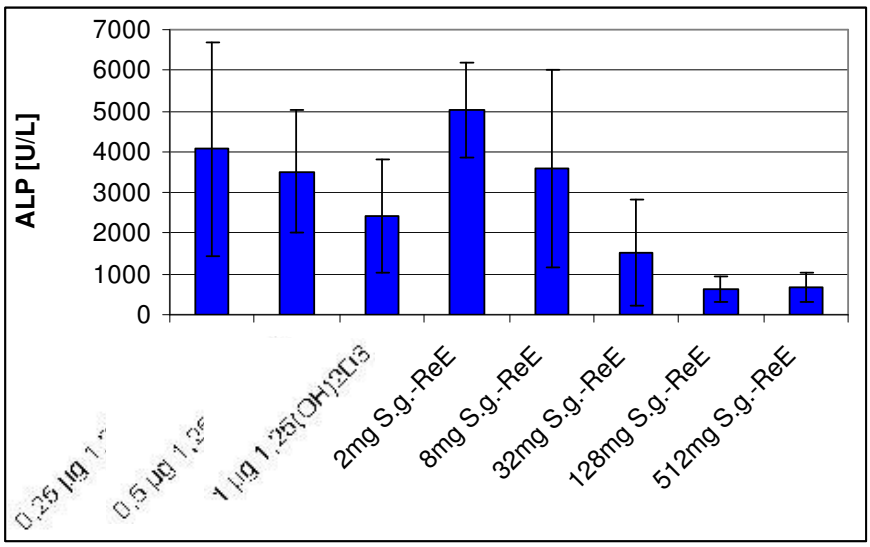
Für den gemessenen Calciumgehalt im Serum der Vitamin D_3 -, $1,25(OH)_2D_3$- und S.g.- Rohextrakt- Gruppen lässt sich keine Beziehung zur Dosierung des Präparates feststellen.
Auch im zweiten Versuch bestehen keine deutlichen Unterschiede zwischen den Serumcalciumwerten der Vitamin D_3- Gruppen

5.8.2 ALP- Gehalt im Serum

Im peripheren Blut gesunder Individuen können verschiedene Isoenzyme der Alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden, die jeweils nach ihrem Wirkungsort benannt sind (Knochen- ALP, Leber- ALP, Dünndarm- ALP und Plazenta- ALP).
Die in diesem Versuch gemessene gesamtalkalische Phosphatase (ALP) dient als Marker für Knochenumbauprozesse, während derer sie von Osteoblasten im Knochen vermehrt produziert wird und dann auch im Blut vermehrt nachgewiesen werden kann. Hohe ALP- Werte weisen dementsprechend auf eine Inanspruchnahme des Knochen- Calciums hin. Die Arbeit von GIEREN (2004) hat eine direkte lineare Beziehung zwischen ALP und Knochen- ALP nachgewiesen, so dass im vorliegenden Versuch ausschließlich die ALP bestimmt wurde. Aus Tabellen 16 und 24 ist ersichtlich, dass es große Standardabweichungen der ALP- Werte zwischen den Tieren einer Gruppe gibt. Diese hohen Standardabweichungen wären am naheliegendsten durch einen Fehler, der während der Bestimmung im Labor aufgetreten sein könnte, zu erklären. Die hohe Streuungsrate bleibt jedoch trotz mehrfach wiederholter Messungen und Prüfung der verwendeten Geräte und Reagenzien bestehen.
Ein Zusammenhang zwischen der Qualität des Serums (hämolytisch, lipämisch) und Abweichungen in der Messung konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Außerhalb der Probennahme und -bestimmung könnte auch das von VAN DE VELDE et al. (1985) beschriebene Phänomen des unterschiedlichen Zyklusstandes der Wachtelhennen verbunden mit schwankenden ALP- Werten bedeutsam sein.
Im Rahmen jener Studie wurden histologische und radiologische Untersuchungen an Wachtelhennen durchgeführt, die Auf- und Umbauvorgänge innerhalb des medullären Knochens im Verlauf des 24- stündigen Eibildungszyklus darstellen.
Es zeigte sich, dass parallel zum Eibildungszyklus Resorptionsvorgänge im medullären Knochen stattfinden, damit ausreichend Calcium für die Kalzifizierung der Eischale zur Verfügung steht.
Da der Gehalt an ALP im Serum die Osteoblastenaktivität im Knochen widerspiegelt, liegt die Vermutung nahe, dass während der Auf- und Umbauvorgänge im medullären Knochen auch unterschiedliche Werte der ALP im Serum gemessen werden können.

Bedingt durch diese nicht steuerbare Rhythmik ist dieser Parameter nur als zusätzliche Festigung der Werte des Eischalengewichts einsetzbar.
Eine Dosiserhöhung innerhalb aller Präparategruppen, mit Ausnahme der Trisetum-Gruppen, zieht einen deutlichen Abfall der ALP im Serum nach sich.
Das lässt sich daraus erklären, dass die ALP als Marker für Knochenumbau dient und als Hinweis auf eine Inanspruchnahme des Knochen- Calciums gedeutet werden kann.
Da durch die Eiparameter belegt wurde, dass Trisetum flavescens einen größeren Einfluss auf die Eischale als auf den Knochen hat, ist es nachvollziehbar, dass bei diesen Gruppen der ALP- Wert auf hohem Niveau bleibt. Beim Rohextrakt scheint auch hier die Schwelle des Absinkens bei 1 g erreicht zu sein, da bei der Dosierung 3 g die ALP- Konzentration im Serum wieder ansteigt. Die Ergebnisse des ersten Versuchs spiegeln sich im zweiten Versuch wider. Auch hier sind bei steigender Dosierung in allen Gruppen des jeweiligen Futterzusatzes deutlich fallende Werte der ALP sichtbar, sowohl bei Vitamin D_3, als auch bei $1,25(OH)_2D_3$ oder den Reinextrakten und Hydrolysaten von Solanum glaucophyllum. Da bei den S.g.-Reinextrakten diese Beziehung besonders deutlich hervortritt, sollen hier exemplarisch die abnehmenden ALP- Gehalte mit den ebenfalls deutlich sinkenden Gehalten der $1,25(OH)_2D_3$- Gruppen dargestellt werden (Abb. 22).

Abb. 22: Durchschnittliche ALP- Gehalte im Serum, Versuch 2



Die Gruppe mit der niedrigsten Konzentration des S.g.- Reinextraktes weist den größten ALP- Gehalt im Serum auf. Dies kann als Beweis gelten, dass es bei der Herstellung des Präparates nicht zu einem Aktivitätsverlust gekommen ist.
Auch die Annahme, dass mit 512 mg eine Überdosierung erreicht ist, wurde bestätigt, da die ALP wieder einen höheren Wert annimmt. Rechnerisch ergibt sich ein äquivalenter Vitamin D_3- Gehalt für die Rohextrakte zwischen 666 IE/g und 1.333 IE/g und für die Reinextrakte von 6.250 IE/g und 12.500 IE/g Substanz.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die biologische Aktivität verschiedener Präparate der calcinogenen Pflanzen Solanum glaucophyllum und Trisetum flavescens anhand des Wachteleischalentests untersucht. Als Hauptparameter zur Beurteilung der biologischen Wirksamkeit wurde einerseits die pro Tier und Tag ausgeschiedene Menge an Eischalentrockensubstanz, als Maß für die Calciumausscheidung über die Eischale, andererseits die Alkalische Phosphatase im Serum und der Knochenaschegehalt herangezogen. Zusätzlich wurden weitere Ei-, Knochen- und Blutparameter bestimmt. In zwei Versuchsreihen, deren Testphase jeweils
21 Tage andauerte, wurden Vitamin D depletierte Wachteln (Coturnix coturnix japonica) als Versuchstiere eingesetzt. In beiden Versuchsreihen wurden drei Vitamin D_3-Standardrationen (100 IE, 200 IE und 400 IE/kg Futter) und der Metabolit $1,25(OH)_2D_3$ in unterschiedlichen Konzentrationen mitgeführt. Bei den zu testenden Präparaten handelte es sich um einen wasserextrahierten Rohextrakt, einen angereicherten Reinextrakt, ein Hydrolysat und gemahlene Stängel und Blätter von Solanum glaucophyllum und ein Trisetum flavescens- Präparat. Des weiteren wurde der Einfluss von Glucosidase auf die Testparameter geprüft.
Die bestehende lineare Beziehung zwischen der Vitamin D_3- Konzentration im Futter und dem Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag bildet die Grundlage für den Vergleich der biologischen Aktivität der Prüfrationen. Nach Auswertung der Parameter konnte für den Solanum glaucophyllum- Rohextrakt ein äquivalenter Vitamin D- Gehalt von 666 bis 1.333 IE/g bestimmt werden, während für den Reinextrakt Gehalte von 6.250 bis 12.500 IE/g ermittelt wurden. Konzentrationsabhängig nahm die Alkalische Phosphatase im Serum unter dem Einfluss von $1,25(OH)_2D_3$ bzw. von Solanum glaucophyllum Extrakten ab. Die Stängel enthalten nur geringe Vitamin D- Aktivität, für Trisetum flavescens ergab sich die geringste Wirksamkeit.
Der Zusatz von Glucosidase zum Solanum- Rohextrakt zeigt einen deutlich positiven Effekt auf die Legeleistung, die Eischalentrockensubstanz- Produktion und den Knochenaschegehalt. Weiterhin kommt es zu einem tendenziell früheres Einsetzten der Legeleistung.
Die pathologische Untersuchung zeigte auch bei höchster Konzentration des Solanum- Reinextraktes keinerlei Verkalkungen in den Weichgeweben und Organen der Tiere.

7. Summary

Determination of vitamin D- activity of calcinogenic plants in the Japanese quail eggshell test

In this studie the biological activity of various preparations of the calcinogenic plants Solanum glaucophyllum and Trisetum flavescens is analysed by means of the Japanese quail eggshell test. As main parameters for the evaluation of the biological activity served on the one hand the amount of eggshell dryweight excreted per animal per day as a indicator for the calcium excretion via the eggshell, on the other hand the serum alkaline phosphatase and the content of realitve boneash. Furthermore, additional egg-, bone- and blood parameters were determined.
In the two test series which lasted 21 days each vitamin D depleted quails (Coturnix coturnix japonica) were utilized as test animals. In both test series three vitamin D_3–standard ratios (100 IU, 200 IU und 400 IU/kg diet) and the metabolite $1,25(OH)_2D_3$ in different concentrations were used. The preparations of Solanum glaucophyllum to be tested was a watersoluble raw extract, an enriched pure extract, a hydrolyzed preparation and preparations of stems and leaves and a preparation of Trisetum flavescens. The influence of glucosidase on the test parameters was analyzed too.
The existing linear relationship between vitamin D_3-concentration in the diet of the ovendry mass of the eggshells per animal and day forms the basis of the biological activity of the preparations examined. After evaluation of the tested parameters an equivalent for the rwa extract content of vitamin D between 666 IU and 1.333 IU/g was estimated, while for the enriched pure extract a content in the range of 6.250 IU up to 12.500 IU/g was found. Depending on the concentration, the alkaline phosphatase in the serum was reduced under the influence of $1,25(OH)_2D_3$ and extracts of Solanum glaucophyllum respectively. The stems showed only a small amount of vitamin D-activity, while Trisetum flavescens showed the lowest effectiveness.
The addition of glucosidase to the raw extract of Solanum glaucophyllum resulted in a significant positive effect on the laying performance, as well as on the eggshell dryweight and the content of boneash.
The pathological examination did not show any calcification of the soft tissues or the internal organs, even at the highest concentration of pure extract of Solanum glaucophyllum.

8. Literaturverzeichnis

ABURJAI, T., S. BERNASCONI, L.A. MANZOCCHI and F. PELIZZONI (1997)
Effect of calcium and cell immobilization the production of cholecalziferol and its derivates by Solanum malacoxylon cell cultures
Phytochemistry 46 (6) 1015-1018

ABURJAI, T., S. AL-KHALIL and M. ABUIRJEIE (1998)
Vitamin D3 and its metabolites in tamato, potato, egg-plant and zucchini leaves
Phytochemistry 49, 2497-2499

AGARWAL, M.K. (1993)
Receptors for mammalien steroid-hormones in microbes and plants
FEBS Lett 322, 207-210

AMLING, M., M. PRIEMEL, T. HOLZMANN, K. CHAPIN, J.M. RUEGER, R. BARON and M.B. DEMAY (1999)
Rescue of the skeletal phenotype of Vitamin D receptor-ablated mice in setting of normal mineral ion homeostasis
Endocrinology 140, 4982-4987

ARNOLD, R.M and I.H. FINCHAM (1987)
Manchester wasting disease: a calcinosis caused by a pasture grass (stenotaphrum secundatum) in Jamaika
Trop. Anim. Hlth. Prod. 29, 174-176

AVIOLI, L.V. (1999)
Vitamin D and the D-hormones, Alfacalcidiol and Calcitriol, as therapeutic agents for Osteoporotic populations
Calcif. Tissue Int. 65, 292-294

BARLET, J.P., M.J. DAVICCO, J. LEFAIRRE and B.J. CARILLO (1979)
Fetal blood calcium response to maternal hypercalcemia induced in the cows by calcium infusion or by solanum glaucophyllum ingestion
Horm. Med. Res. 11 (1), 57-60

BARROS, S.S.; J. POHLENZ und C. SANTIAGO (1970)
Zur Kalzinose beim Schaf
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 77, 346-349

BARROS, S.S. and E.J. GIMENO (2000)
Cell differentation and bone protein synthesis in the lungs of sheep with spontaneous calcinosis
Journ. of comp. Pathol. 123 (4), 270-277

BASUDDE, C.D.K. and D.J. HUMPHREYS (1975)
The effect of the administration of solanum malacoxylon on the chick
Res. Vet. Sci. 18:3, 330-331

BASUDDE, C.D.K. (1982)
The effect of solanum malacoxylon on serum enzyme activities, blood glucose and cholesterol levels in chicks
Poult. Sci. 5, 1001-1002

BAUMEISTER, M. (1972)
Ein neuartiges biologisches Verfahren zur Vitamin D_3 Bestimmung
Vet. Med. Diss., München

BIKLE, D.D., E. GEE, B. HALLORAN, M.A. KOWALSKI, E. RYZEN and J.G. HADDAD (1986)
Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein
J. Clin. Endocrinol. Metab. 63, 954-959

BOLAND, L. (1986)
Plants as a source of vitamin D_3 metabolites
Nutr. Rev. 44 (1), 1-8

BOLAND, R.L., M. SKLIAR, A. CURINO and L. MILANESI (2003)
Vitamin D compounds in plants
Plant Sci. 00, 1-13

BOUILLON, S., S. van CROMPHOUT and G. CARMELIET (2003)
Intestinal calcium absorption : Molecular vitamin D mediated mechanisms
J. Cell. Biochem. 88, 332-339

BRAUN U., M. DIENER, M. HILBE, M. BUSCH, M. BISCHOFF (2000)
Enzootic calcinosis in 16 cows from 6 diary farms in Unterengadin
Schweiz. Arch. Tierheilkd. 142 (6), 333-338

BRONNER, F., D. PANSU and W.D. STEIN (1986)
An analysis of intestinal calcium transport across the rat intestine
Am. J. Physiol. 250 (Gastrointest. Liver Physiol. 12),

BRONNER, F. and D. PANSU (1999)
Nutritional aspects of calcium absorption
J. Nutr. 129, 9-12

BRONNER, F. (2003)
Mechanisms of intestinal calcium absorption
J. Cell. Biochem. 88, 387-393

BRUNETTE, M.G., M. CHAN, C. FERRIERE and K.D. ROBERTS (1978)
Site of 1,25(OH)2 vitamin D3 synthesis in the kidney
Nature 276, 287-289

BUCHALA, A.J. and A. SCHMID (1979)
Vitamin D and ist analogs as a new class of plant growth substance affecting rhizogenesis
Nature 280, 230-231

BUCHELT, K.D. (1986)
Versuche zur Prophylaxe der hypokalzämischen Gebährlähmung mittels Verfütterung von Trisetum flavescens- Cobs
Vet. Med. Diss., München

BUCHGRABER. K. und E.M. PÖTSCH (1998)
Pflanzenbauliche Massnahmen zur Bekämpfung der Kalzinose
Der fortschrittliche Landwirt 17, 4-7

CAMBEROS, H.R., G.K. DAVIS, M.I. DJAFAR and C.F. SIMPSON (1970)
Soft tissue calcification in giunea pigs fed with poisenous plant Solanum malacoxylon
Am. J. Vet. Res. 31, 685-696

CANAS, F.M., O.E. ORTIZ, C.A. ASTEGGIANO and R.D. PEREIRA (1977)
Effects of solanum malacoxylon extract on rachitic chicks
Calcif. Tiss. Res. 23, 297-301

CANTORNA, M.T., C.E. HAYES and H.F. DE LUCA (1996)
1,25- dihydroxyvitamin D_3 reversibly blocks the progressions of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (15), 7861-7864

CARILLO (1971)
Experimental intoxication of cattle with Solanum malacoxylon
Gac. Vet. 33, 468-484

CHEN, P.S. Jr. and H.B. BOSMAN (1964)
Effects of vitamin D_2 and D_3 on serum calcium and phosphorus in rachitic chicks
J. Nutr. 83, 133-139

CHEN, T.C., G.G. SCHWARTZ, K.L. BURNSTEIN, B.L. LOKESHWAR and M.F. HOLICK (2000)
The in vitro evaluation of 1,25-D3 and 19-nor-1α-dihydroxyvitamin D2 for prostate cancer therapy
Clin. Cancer. Res. 6, 901-908

CHEN, T.C., L. WANG, L.W. WHITLATCH, J.N. FLANAGAN and M.F. HOLLICK (2003)
Prostatic 25-hydryoxyvitamin D-1 -hydroxylase and its implication in prostate cancer
J. Cell. Biochem. 88, 315-322

CHICK, H., E.J. DALYELL, M. HUME, H.M.M. MACKAY and H. HENDERSON-SMITH (1922)
The etiology of rickets in infants: prophylactic and curative observation at the Vienna University Kinderklinik
Lancet North Am. Ed. 7-11

CHRISTAKOS, S., R. GILL, S. ELEE and H. LI (1992)
Molecular aspects of the calbindins
J. Nutr. 122, 678-682

CHRISTAKOS, S., F. BARLETTA, M. HUENING, P. DHAWAN, Y. LIU, A. PORTA and X. PENG (2003)
Vitamin D target proteins: function and regulation
J. Cell. Biochem. 88, 238-244

CLEMENS, T.L., S.L. HENDERSON, J.S. ADAMS and M.F. HOLICK (1982)
Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D_3
Lancet North Am. Ed. 6, 74-76

COLLIER, W.A. (1927)
Zur Kenntnis einer als Enteque bezeichneten Krankheit der Rinder in der Provinz Buenos Aires
Z. Infekt. Krankh. Haust. 31, 81-92

COPLAND, J.L. (1975)
Enzootic calcinosis of cattle in Papua New Guinea
Aust. Vet. J. 51, 326

CORRADINO, R.A. and R.H. WASSERMAN (1971)
Vitamin D_3: induction of calcium-binding protein in embryonic chick intestine in vitro
Science 172, 731-733

CRAVISO, L.G., K.P. GARRETT and T.L. CLEMENS (1987)
1,25-dihydroxyvitamin D_3 induces the synthesis of vitamin D-dependent calcium- binding protein in cultured chick kidney cells
Endocrinology 120, 894-902

CROSS, H.S., B. BAREIS and P. HOFER (2001)
25- Hydroxyvitamin D- 1α- hydroxylase and Vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis
Steroids 66, 287-292

CURINO, A., M. SKLIAR and R. BOLAND (1998)
Identification of 7-dehydrocholecalziferol, Vitamin D3, 25(OH)D3 and 1,25D3 in Solanum glaucophyllum cultures grown in absence of light
Biochem. Biophys. Acta. 27 (3), 485-492

CURINO, A., L. MILANESI, S. BENASSATI, M. SKLIAR and R. BOLAND (2001)
Effect of culture conditions on the synthesis of Vitamin D3-metabolites in Solanum glaucophyllum grown in vitro
Phytochem. 58 (1), 81-89

DeLUCA, H.F. (1974)
Vitamin D: the vitamin and the hormone
Fed. Proc. 33, 2211-2219

DeLUCA, H.F. (1978)
Vitamin D metabolism and function
Arch. Intern. Med. 138, 836-847

DIRKSEN, G., P. PLANK, A. SPIESS, T. HÄNICHEN und K. DÄMMRICH (1970)
Über eine enzootische Kalzinose beim Rind. 1. Klinische Beobachtungen und Untersuchungen
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 77, 321-338

DIRKSEN, G., P. PLANK, T. HÄNICHEN, K. DÄMMRICH und A. SPIESS (1972)
Über eine enzootische Kalzinose beim Rind.
V. Experimentelle Untersuchung an Kaninchen mit selektiver Verfütterung von Knaulgras (Dactylis glomerata), Goldhafer (Trisetum flavescens) und einem Grasgemisch
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 79, 77-79

DIRKSEN, G., P. PLANK, U. SIMON, T. HÄNICHEN, P. DANIEL und A. SPIESS (1974)
Über eine enzootische Kalzinose beim Rind. VII.: Nachweiss der kalzinogenen Wirkung von Goldhafer (Trisetum flavescens) beim Wiederkäuer
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 81, 1-5

DIRKSEN, G., G. KRAGENINGS, T. HÄNICHEN und D. ELMER- ENGELHARD (1981)
Trisetum flavescens (L.P.B.)
Kalzinogene Aktivität der Pflanze nach künstlicher (Grün-)Trocknung und Herstellung von Cobs
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 88, 263-265

DIRKSEN, G. and R. FRICKE (1986)
Prophylaxis of parturient paresis in diary cows by oral application of solanum malacoxylon

DIRKSEN, G., K. STERR und W. HERRMANNS (2003)
Enzootische Kalzinose beim Schaf nach Verzehr von Goldhafer
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 110 (12), 475-483

DÖBEREINER, J. (1971)
Espichamento: Intoxication of cattle by Solanum malaoxylon
Pesq. Agro. Bras. Ser. Vet. 6, 91-117

DONE, S.H., J. DÖBEREINER and C.H. TOKARNIA (1976)
Systemic connective tissue calcification in cattle poisoned by Solanum malacoxylon
Br. Vet. J. 132, 28-38

DURAND, R., J.M. FIGUEREDO and E. MENDOZA (1999)
Intoxication in cattle from Cestrum diurnum
Vet. Hum. Toxicol. 41, 26-27

EDELSTEIN, S., D.E.M. LAWSON and E. KODICEK (1973)
The transporting proteins of cholecalciferol and 25- hydroxycholecalciferol in serum of chicks and other species
Biochem. J. 135, 417-426

EDWARDS, M.M. (2000)
Nutrition and skeletal Problems in Poultry
Poult. Sci. 79, 1081-1023

ENDO, K., K. KATSUMATA, T. MASAKI, N. KUBODERA, T. NAKAMURA, K. IKEDA and E. OGATA (2000)
1,25D3 as well as its analogue OCT lower blood calcium through inhibitoin of bone resorption in hypercalcaemic rats with contious parathyroid hormone related peptide infusion
J. Bone Miner. Res. 15, 175-181

ESPARZA, M.S., M. VEGA and R.L. BOLAND (1982)
Synthesis and composition of vitamin D_3 metabolites in Solanum malacoxylon
Biochem. Biophys. Acta 719, 633-640

FESTENSTEIN, G.N. and R.A. MORTON (1955)
Provitamin D in animal tissues
Biochem. J. 60, 22-25

FRASER, D.R. (1995)
Vitamin D
Lancet North Am. Ed. 345

FRICKE, R. (1985)
Untersuchung über die Prophylaxe der hypokalzämischen Gebärlähmung beim Rind mit Solanum malacoxylon
Vet. Med. Diss., München

FUNK, C. (1912)
The etiology of the deficiency diseases: Beriberi, Polyneuritis in birds, Scury, Pellagra
J. State Med. 20, 341-368

GAYLOR, J.L. and F.M. SAULT (1964)
Localization and biosynthesis of 7- Dehydrocholesterol in rat skin
J. Lipid. Res. 5(3), 422-431

GERKEN, M. and A.D. MILLS (1993)
Welfare of domestic quail
Abstract, Symp. of poultr. wellfare

GIEREN, C.K. (2004)
Der Wachteleischalentest als biologisches Bestimmungsverfahren für pflanzliche und tierische Vitamin D Metaboliten
Vet. Med. Diss., München

GILL, B.S., M. SINGH and A.K. CHOPRA (1976)
Enzootic calcinosis in sheep: clinical signs and pathology
Am. J. Vet. Res. 37, 545-552

GOODWIN, D., D. NOFF and S. EDELSTEIN (1978)
The parotid gland: a new target organ for vitamin D actions
Biochem. Biophys. Acta. 539(2), 249-252

GORNIAK, S.L., M.L. DAGLI, P.C. MAIORKA, D.C. RASPANTINI and M.M. JERICO (1999)
Evaluation in rabbits of the fetal effects of maternal ingestion of solanum malacoxylon
Vet. Res. Com. 23, 307-316

GRIFFIN, M.D. and R. KUMAR (2003)
Effects of 1 ,25$(OH)_2D_3$ and its analogs on dendritic cell function
J. Cell. Biochem. 88, 323-326

GROPP, J. und H. ZUCKER (1971)
Vitamin D_3 Bestimmung im biologischen Verfahren an der japanischen Wachtel
Arch. Geflkd. 35, 41-45

GULATI, P.D., T. NAKAMURA and Y. TANABE (1981)
Diurnal variations in plasma LH, progesterone, testosterone, estradiol and estrone in the japanese quail
Poult. Sci. 60, 668-673

GÜTHLE, U. (1991)
Untersuchungen zur Prophylaxe der Hypokalzämischen Gebärlähmung mittels 1α- Hydroxycholecalciferol
Vet. Med. Diss., München

GUO, Q., S. CHRISTAKOS, N. ROBINSON and M.P. MATTSON (1998)
Calbindin D28K blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin1
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95, 3227-3232

HÄNICHEN, T. and W. HERRMANNS (1990)
The question of reversibility of tissue calcification in enzootic calcinosis of cattle and in experimentaly hypervitaminosis D
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 97 (11), 479-482

HANCHETTE, C.L. and G.G. SCHWARTZ (1992)
Geographic patterns of prostate cancer mortality
Cancer 70, 2861-2869

HAUSSLER, M.R., R.H. WASSERMANN, T.A. McCAIN, M. PETERLIK, K.M. BURSAC and M.R. HUGHES (1976)
1,25-dihyrdroxyvitamin D_3-glycoside: identification of a calcinogenic principle of solanum malacoxylon
Life Sci. 18, 1049-1056

HAUSSLER, M.R. (1986)
Vitamin D receptors: nature and function
Ann. Rev. Nutr. 6, 527-562

HAVINGA, E., R.J. De KOCK and M.P. RAPPOLD (1960)
The photochemical interconversion of provitamin D, lumisterol, previtamin D and tachysterol
Tetrahedron 11, 276

HAY, A.W.M. and G. WATSON (1975)
Binding of 25-hydroxyvitamin D2 to plasma protein to New World Monkeys
Nature 256, 150

HEINRITZI, K., G. KRAGENINGS und T. HÄNICHEN (1977)
Untersuchungen über die kalzinogene Aktivität von siliertem Goldhafer (Trisetum flavescens L.P.B.)
Z. Tierphysiol. 39, 139-145

HENRY, H.L. and A.W. NORMAN (1984)
Vitamin D: metabolism and biological actions
Ann. Rev. Nutr. 4, 493-520

HERRATH, D., D. KRAFT, G. OFFERMANN und K. SCHÄFER (1974)
Solanum malacoxylon: Eine therapeutische Alternative für 1,25D3 bei urämischen Calziumstoffwechselstörungen
Dtsch. Med. Wschr. 99, 2407-2409

HOENDEROP, J.G, A.W. van der KEMP, A. HARTOG, S.F. van de GRAAF, C.H. van OS, P.H. WILLEMS and R.J. BINDELS (1999)
Molecular identification of the apical Ca channel in 1,25-dihydroxyvitamin D_3 responsive epithelia
J. Biol. Chem. 274, 8375-8378

HOFMAN, J.H. (1971)
Untersuchungen über den Vitamin D_3-Bedarf der japanischen Wachtel
Vet. Med. Diss., München

HOLICK, M.F., H.K. SCHNOES, H.F.DeLUCA , T. STUDA and R.J. COUSINS (1971)
Isolation and identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D active in intestine
Biochem.10, 2799-2804

HOLICK, M.F, M. RICHTAND (1975)
Isolation and Identification of previtamin D3 from the skin of rats exposed to UV-irradiation
Biochem.18, 1003-1008

HOLICK, M.F., X.Q. TIAN and M. ALLEN (1995)
Evolutionary importance for the membrane enhancement of the production of vitamin D3 in the skin of poikilothermic animals
Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 3124-3126

HOLICK, M.F. (2002)
Vitamin D: The underappreciated D- hormone that is important for skeltal and cellular health
Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes 9, 87-98

HOLICK, M.F. (2003)
Vitamin D: A Millenium Perspective
J. Cell. Biochem. 88, 296-307

HOPKINS, F.G. (1912)
Feeding experiments illustrating the improtance of accessory factors in normal dieatry
J. Physiol. 44, 425-460

HOW, K.L., H.A. HAZEWINKEL and J.A. MOL (1994)
Dietary vitamin D dependence of cat and dog due to inadequate cutaneous synthesis of vitamin D
Gen. Comp. Endocrinol. 96 (1), 12-8

HULDSCHINSKY, K. (1919)
Heilung von Rachitis durch künstliche Höhensonne
Dtsch. med. Wschr. 45, 712-713

HURWITZ, S. (1978)
Calcium metabolism in birds
Chemical Zoology (Brush, A.H., ed.)
Academic Press, New York 10, 273-306

JONES, G, H.K. SCHNOES and H.F. DeLUCA (1976)
An in vitro study of vitamin D_3 hydroxylases in the chick
J. Biol. Chem. 251, 24-28

JONES, G., S.A. STRUGNELL and H.F. De LUCA (1998)
Current understanding of the molecular actions of vitamin D
Physiol. Rev. 78 (4), 1193-1231

JOWSEY, J.R., M.R. BERLIE, J.W.T. SPINKS and J.B. O'NEILL (1956)
Uptake of calcium by the laying hen and subsequent transfer from egg to chick
Poult. Sci. 35, 1234-1238

KAMPHUES, J., D. SCHNEIDER und J. LEIBETSEDER (1999)
Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung
9. Auflage, Verlag M. und H. Schaper, Alfeld- Hannover

KANDUTSCH, A.A., E.D. MURPHY and M.E. DREISBACH (1956)
Provitamin D in certain sebaceous tissues of the mouse and guinea pig
Arch. Biochem. Biophys. 61(2), 450-455

KOBAYASHI, T. and M. YASUMURA (1973)
Studies in the isomerization of vitamin D and related compounds with acid reagents
J. Nutr. Sci. Vitaminol. 19, 123

KOCH, E.M. and F.C. KOCH (1941)
The provitamin D of the covering tissues of chickens
Poult. Sci. 20, 33-35

KÖHLER, H. und R. LIBISELLER (1970)
Über das Auftreten der sogenannten Weidekrankheit bei Kühen in Österreich in Zusammenhang mit Düngung und Fütterung
Zentralbl. Vetmed. A. 17, 289-337

KÖHLER, H., D.S. REGAL und M. PETERLIK (1978)
Zur Kalzinose der Rinder in Österreich VI. Nachweis einer 1,25-Dihydroxycholecalciferol- artigen Substanz als Ursache der antirachitischen Wirkung von Goldhafer (Trisetum flavescens) bei Küken und Wachteln
Zentralbl. Vetmed. A 25, 253-270

KOPP, M. (1985)
Natürliche und synthetische Vitamin D-Metaboliten im Wachteleischalentest
Vet. Med. Diss., München

KREISL, M.M. (1981)
Einfluss von Goldhaferfraktionen auf Vitamin D- abhängige Parameter beim rachitischen Hühnerküken
Vet. med. Diss., München

KROOK, L., R.H. WASSERMAN, J.N. SHIVERLY, A.H. TASHJIAN, T.D. BROKKEN and J.F. MORTON (1975)
Hypercalcemia and calcinosis in Florida horses: implication of the shrub, Cestrum diurnum, as the causative agent
Cornell. Vet. 65, 26-56

KUBOTA, M., E. ABE, T. SHINKI and T. SUDA (1981)
Vitamin D metabolism and its possible role in the developing chick embryo
Biochem. J. 194, 103-109

KUMARAVEL RAJAKUMAR (2003)
Vitamin D, cod-liver oil, sunlight and rickets: A historical perspective
Pediatrics Vol 112, 132-135

KUNZ, W. und T. HÄNICHEN (1981)
Solanum malacoxylon: Untersuchungen zur Verträglichkeit der zur Prophylaxe der Hypocalcämischen Gebährlähmung empfohlenen Mengen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 94, 421-424

LAWSON, D.E.M. and M. DAVIE (1979)
Aspects of the metabolism and function of vitamin D
Vitamins and hormones 37, 1-67

LEMIRE, J.M. and D.C. ARCHER (1991)
1,25-dihydroxyvitamin D_3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis
C. Clin. Invest. 87(3), 1103-1107

LEMIRE, J.M., D.C. ARCHER, L. BECK, H.L. SPIEGELBERG (1995)
Immunsupressive actions of 1,25D_3: preferential inhibition of Th1 functions
J. Nutr. 125(6), 1704S-1708S

LI, Y.C. (2003)
Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system
J. Cell. Biochem. 88, 327-331

LIBISELLER, R., E. GLAWISCHNIG, H. KÖHLER und R. SWOBODA (1976)
Zur Kalzinose der Rinder in Österreich:
3. Experimentelle Auslösung einer Kalzinose bei Schafen und Kaninchen durch grünen Goldhafer (Trisetum flavescens) aus dem panonischen Klimagebiet
Zbl. Vet. Med. A 23, 1-30

LIGNIERES, J. (1898)
Contribution a lètude de la pasteurellose bovine
Bull. Soc. Cent. Med. Vet. 52, 761-769

LUCAS, N.S. (1933)
Biochem. J. 27, 133

LYND, F.T., E. WILLIERS, T. WEIGHT and P.W. GABANER (1965)
Bovine arteriosclerosis in Hawaii
Am. J. Vet. Res. 26, 1344-1348

Mac LAUGHLIN, J. and M.F. HOLICK (1985)
Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D_3
J. Clin. Invest. 76, 1536-1538

MANOLAGAS, S.C. and L.J. DEFTOS (1981)
Comparison of 1,25-, 25-, 24,25-D3 binding in fetal rat calvaria and osteogenic sarkoma cells
Calcif. Tissue Int. 33, 655-661

MANOLAGAS, S.C., D.M. PROVVEDINI and C.D. TSOUKOS (1985)
Interactions of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and the immune system
Mol. Cell. Endocrinol. 43(2-3), 113-122

MARTIN, T.J. (1993)
Hormones in the coupling of bone resorption and formation
Osteoporosis Int. 1, 121-125

MATHIEU, C., M. ROTHE, A. HAUSMANN , K. CASTEELS, H. OKAMURA, M. KURIMOTO, V. BURKART and H. KOLB (1999)
IL-18 inhibits diabetes development in nonobese diabetic mice by counterregulation of Th 1- dependent destructive insulitis
J. Immonol. 163(3), 1230-1236

MATSUOKA, L.Y., L. IDE, J. WORTSMAN, J. MacLAUGHLIN, M.F. HOLICK (1987)
Sunscrenns suppress cutaneous vitamin D_3- synthesis
J. Clin. Endocrinol. Metab. 64, 1165-1168

MAUTALEN, C.A., C. FERRARO, M. CABREJAS, E. LANDI and L. GOTTLIEB (1977)
Effects of Solanum malacoxylon on calcium matabolism in patients with chronical renal failure
Calc. Tiss. Res. 22, 534-537

MAYER, H., A. SCUTT and E. WINGENDER (1992)
New perspectives in the differentiation of bone forming cells
Biofactors 4(1), 1-13

McCOLLUM, E.V., N. SIMMONDS, J.E. BECKER and P.G. SHIPLEY (1922)
Studies on experimental rickets XXI, an experimental demonstration of the existance of a vitamin which promotes calcium deposition
J. Biol. Chem. 53, 293-312

MELLO, J.R.B. (1991)
Untersuchungen der Auswirkungen von kalzinogenen Pflanzen auf die Elemente Ca, P, ALP bei Hühnerküken
Vet. Med. Diss., Hannover

MELLO, J.R.B. und G.G. HABERMEHL (1991)
Einfluss von UV-Strahlen und klimatischen Bedingungen auf die kalzinogene Aktivität von Trisetum flavescens und N.v.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 98, 462-465

MELLO, J.R.B. und G.G. HABERMEHL (1998)
Untersuchungen der Auswirkungen von kalzinogenen Pflanzen- Qualitative und quantitative Bewertung
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 105, 25-29

MELLO, J.R.B, A. LANGELOH, G. HABERMEHL, H.C. KREBS and F.C. BASTOS (1999)
Influência de extratos de duas plantas calcinogênicas sobre la fertilidade de ratos
Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 51, 453-462

MELLO, J.R.B. (2003)
Calcinosis- calcinogenic plants
Toxicon 41, 1-12

MERKE, J., G. KLAUS, R. WALDHERR and E. RITZ (1986)
No 1,25D3 receptors in osteoclasts of Ca-deficient chicks despite demonstrable receptors in circulating monocytes
J. Bone Mineral. Res. 1, 151

MILANESI, L., P. MONJE and R. BOLAND (2001)
Presence of estrogenes and estrogen receptor-like protiens in Solanum glaucophyllum
Biochem. Biophys. Res. Comm. 289 (5), 1175-1179

MILANESI, L. and R. BOLAND (2004)
Presence of estrogenreceptors (ER) like proteins and endogenous ligands for ER in Solanaceae
Plant Science 166 (2), 397-404

MINGHETTI, P.P. and A.W. NORMAN (1988a)
1,25$(OH)_2$- vitamin D_3 receptors: Gene regulation and genetic circuitry
FASEB Jl 2, 3043-3053

MINGHETTI, P.P., L. CANCELA, Y. FUJISAMA, G. THEOFAN and A.W. NORMAN (1988b)
Molekularstructure of the chicken vitamin D- induced calbindin D28k gene reveals 11 exons, six Ca2+-binding domains and numerous pormotor regulatory elements
Molec. Endocrin. 2, 355-367

MORRIS, K.M.L. (1977)
The effect on egg shell thickness of the inclusion of the calcinogenic plant "Solanum malacoxylon" in the diet of laying hens
Vet. Rec. 101, 502-504

MORRIS, J.G. (1997)
Ineffective synthesis of vitamin D in kittens exposed to sun or UV-light is reversed by an inhibitor of 7-dehydrocholesterol-reductase
Vitamin D: chemistry, biology and clinical application of the steroid hormone 721-722

MOSS D.W. (1987)
Diagnostic aspects of ALP an dits isoenzymes
Clin. Biochem. 20, 225-230

MUSSER, M., W.L. BACON and K.E. NESTOR (1977)
Calcium binding protein in the turkey and in the japanese quail
Poult. Sci.

NAPOLI, J.L., L.E. REEVE, J.A. EISMAN, H.K. SCHNOES and H.F. DeLUCA (1977)
Solanum glaucophyllum as a source of 1,25- dihydroxyvitamin D_3
J. Biol. Chem. 252 (8), 2580-2583

NEMERE, I. and A.W. NORMAN (1988)
1,25D3 mediated vesicular transport of Ca in intestine: time course studies
Endocrinology 122, 2962-2969

NORMAN, A.W. and H.F. DeLUCA (1963)
The preparation of H3-Vitamin D2 and D3 and their localisation in the rat
Bichem. 2, 1160-1181

NORMAN, A.W., V.L. LEATHERS and J.E. BISHOP (1983)
Normal egg hatchability requiresthe simultaneous administration to the hen of 1 ,25-dihydroxyvitamin D_3 and 24R,25-dihydroxyvitamin D_3
J. Nutr. 113, 2505-2515

NORMAN, A.W., I. NEMERE, L.X. ZHOU, J.E. BISHOP, K.E. LOWE, A.C. MAIYAR, E.D. COLLINS, T. TAOKA, I. SERGEV and M.C. FARACH- CARSON (1992)
1,25(OH)2 Vitamin D3, a steroid hormone that produces biologic effects via both genomic and nongenomic pathways
J. Steroid. Biochem. Molec. Biol. 41 (3-8), 231-240

NORMAN, A.W., X.D. SONG, L. ZANELLO, C. BULA and W.H. OKAMURA (1999)
Rapid and genomic biological responses are mediated by different shapes of the agonist steroid hormone, $1\alpha,25(OH)_2$ Vitamin D_3
Steroids 64, 120-128

OSBORNE, T.B. and L.B. MENDEL (1913)
The relation of growth to the chemical constituents of the diets
J. Biol. Chem. 15, 311-326

O`SULLIVAN, B.M. (1976)
Humpy back of sheep. Clinical and pathological observations
Aust. Vet. J. 52, 414-418

PANSU, D., C. DUFLOS. C. BELLATON and F. BRONNER (1993)
Solubility and intestinal transit time limit calcium absorption in rats
J. Nutr. 123, 1396-1404

PARRY, J.S. (1872)
Remarks on the pathological anatomy, causes and treatment of rickets
Am. J. Med. Sci. 63, 305-329

PETERLIK, M. and R.H. WASSERMANN (1975)
1,25-dihydroxycholecalciferol-like activity in solanum malacoxylon: purification and particl characterization
Febs Letters 56 (1), 16-19

PETERLIK, M., K. BURSAC, M.R. HAUSSLER, M.R. HUGHES and R.H. WASSERMANN (1976)
Further evidence for the 1,25-dihydroxyvitamin D-like activity of Solanumm malacoxylon
Biochem. Biophys. Res. Comm, 70, 797-804

PIKE, J.W. (1984)
Monoclonal antibodies to chick intestinal receptors for 1,25- dihydroxyvitamin D_3. Interaction and effects of binding on receptor function
J. Biol.Chem. 259, 1167-1173

PIKE, J.W. (1985)
Intracellular receptors mediate the biologic action of 1,25 dihydroxyvitamin D_3
Nutr. Rev. 43 (6), 161-168

PÖTSCH, E.M. (1999)
Kalzinose-Eine gefürchtete Weidekrankheit
5.Alpenländ. Expertenforum „Zeitgemäße Weidewirtschaft“
Bericht der BAL Gumpenhausen, 73-80

PÖTSCH, E.M. (2001)
Massnahmen zur Bekämpfung der enzootischen Kalzinose

PONCHON, G., A.L. KENNAN and H.F. DeLUCA (1969)
"Activation" of vitamin D by the liver
J. Clin. Invest. 48, 2032-2037

POSER, J.W. and P.A. PRICE (1979)
A method for decarboxylation of γ-carboxyglutamic acid in proteins
J. Biol. Chem. 254, 431-436

PREMA, T.P. and N. RHAGAMULU (1996)
Vitamin D3 and its metabolites in the tomato plant
Phytochem. 42 (3), 617-620

PUCHE, R.C., A.M. MASONI, D.A. ALLOATTI and E. ROVERI (1980)
The antirachitic activity of Solanum malacoxylon leaves
Planta Med. 40, 378-381

PUCHE, R.C and J.B. BINGLEY (1995)
Calcinosis of Cattle in Argentina
Second Ed., UNR Editora, Rosario, 152 pp.

RAMBECK, W.A., W. OESTERHELT, M. VECCHI and H. ZUCKER (1979)
Occurence of cholecalciferol in the calcinogenic plant Trisetum flavescens
Biochem. Biophys. Res. Conn. 87, 743-749

RAMBECK, W.A., H. WEISER, R. HASELBAUER and H. ZUCKER (1981a)
Vitamin D activity of different Vitamin D-esters in chicken, japanese quail and in rats
Internat. J. Vit. Nutr. Res. 51, 353-358

RAMBECK, W.A. und H. ZUCKER (1981b)
Vitamin D_3 und Vitamin D_3-metabolitartige Aktivität in Trisetum flavescens
Zbl. Vet. Med. A. 28, 436-441

RAMBECK, W.A. und H. ZUCKER (1982)
Vitamin D-artige Aktivität in kalzinogenen Pflanzen
Zbl. Vet. Med. A29, 289-296

RAMBECK, W.A., H. WEISER and H. ZUCKER (1984a)
Biological activity of glycosides of vitamin D_3 and 1 -hydroxyvitamin D_3
Internat. J. Vit. Nutr. Res. 54, 25-34

RAMBECK, W.A., H. WEISER, U. HENNES, W. MEIER and H. ZUCKER (1984b)
Bioactivity of the C(1)-, C(3)- and C(25)- -D-Glucopyranoside of 1 ,25$(OH)_2D_3$
Calcif. Tissue Int. 36 (2), 51

RAMBECK, W.A. und H. ZUCKER (1985)
Vitamin D_3 und 1,25 dihydroxyvitamin D3 in der kalzinogenen Pflanze Trisetum flavescens (Goldhafer)
Tierärztl. Umschau 40(11), 921-924

RAMBECK, W.A., H. WEISER, W. MEIER, L. LABLER and H. ZUCKER (1985)
Biological Activity of the Three Mono-β-D-Glucanopyranosides of 1,25-Dihydroxycholecalciferol
Internat. J. Vit. Nut. Res. 55, 263-267

RAMBECK, W.A., A. EGGERT, M. LEHNER, K.J. THIERER and H. WEISER (1991)
Effect of 1,25 dihyrdoxycholecalciferol on egg production and egg shell quality in laying hens
Abstract, eighth Workshop on vitamin D, Paris, France

REICHEL, H. und A.W. NORMAN (1989)
Systemic effects of vitamin D
Annu. Rev. Med. 40, 71-78

REICHENBÄCHER, H. (1979)
Der Einfluss von Goldhafer (Trisetum flavescens) und Solanum malacoxylon auf die Eischalenqualität
Vet. med. Diss., München

REINERTSON, R.P. and V.R. WHEATLEY (1959)
Studies on the chemical composition of human epidermal lipids
J. Invest. Dermatol. 32, 49-59

RIET CORREA, F.,I. RIET CORREA and C. BELLAGAMBA (1975)
Calcificación metastática enzoótica (enteque seco) en bovinos del Uroguay
Vet. Montevideo 12, 15-23

RIET CORREA, F., M.C. MENDEZ, A.L. SCHILD, C.A. PETIZ and R. SCARSI (1980)
Reprodução experimental de calcinose enzoótica em ovinos mediante a administração de Nierembergia veitchii
XVII Congr. Bras. Med. Vet., Fortaleza, 105

RINGE, J.D., M. FISCHER und A.W. WAHNER (1994)
Diagnostik des Osteoporoserisikos
Dtsch. Med. Wschr. 119, 1289-1295

ROSATI, F., G. DANZA, A. GUARNA, N. CINI, M.L. RACCHI and M. SERIO (2003)
New evidence of similarity between human and plant steroids metabolism: 5alpha-reductase activity in solanum malacoxylon
Endocrinology, 144 (1):220-9

ROUX, R., N.J. DAVICCO, B.J. CARILLO and J.P. BARLET (1979)
Solanum glaucolphyllum in pregnant cows. Effect on colostrum mineral composition and plasma plasma calcium and phosphorus levels in dams and in newborn calves
Ann. Biol. Anim.Biochem. Biophys. 19, 91-101

RUKSAN, B.E., L.B. LOEWE, L. MARANGUNICH and G. BALL (2000)
XXI. World buiatrics congress, Uruguay , Abstr. 326

SCHARLA, S.H. (1998)
Prevalence of subclinical vitamin D_3 deficiency in different european countries
Osteoporos. Int. 8, S7-S12

SCHECHTER, G. (1976)
Der Goldhafer im Zwielicht
Der Förderungsdienst 11,

SCHWARTZ, G.G., L.W. WHITLATCH, T.C. CHEN, B.L. LOKESHWAR and M.F. HOLICK (1998)
Human prostate cells synthesize 1,25- dihydroxyvitamin D_3 from 25-hydroxyvitamin D_3
Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 7, 391-395

SERGEEV, I.N. (2003)
Calcium as a mediator of 1,25- dihydroxyvitamin D_3- induced apoptosis
12th workshop on Vitamin D, Maastricht

SHIBATA, T., A. SHIRA-ISHI, T. SATO, T. MAGAKI, A. MASUDA, A. HISHIYA, N. ISHIKURA, S. HIGASHI, Y. USHIDA, M.O. SAITO, M. HO, E. OGATA, K. WATANABE and K. IKEDA (2002)
Vitamin D hormone inhibits osteoclastogenesis in vivo by decreasing the pool of osteoclastprecursors in bone marrow
J. Bone Miner. Res. 17 (4), 622-629

SIMKISS, K. (1961)
Calcium metabolism an avian reproduction
Biol. Rev. 36, 321-367

SIMON, U. (1980)
Golden oat grass and enzootic calcinosis of cattle in the alpine region
Europ. Grass Fed. 7113-7124

SKLIAR, M., A. CURINO, L. MILANESI, S. BENASSATI and R. BOLAND (2000)
Nicotiana glauca: another plant species containing vitamin D3 metabolites
Plant Science 156, 193-199

SLEPCHENCO, B. and F. BRONNER (2001)
Modeling of transcellular calcium transport in rat duodenum points to the coexistence of two mechanisms of calcium entry
Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 281, C270-C281

SMITH, E., J.A. MacLAUGHLIN, W. GRANGE, D. TAYLOR, M.F. HOLICK (1985)
Cultured psoriatic fibroblasts have partial resistance to the proliferation-inhibition activity of 1,25- dihydroxy vitamin D_3
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 (16), 5409-5412

SNOW, I.M. (1895)
An explanation of the great frequency of rickets among neapolitan children in American cities
Arch. Pediatr. 12, 18-34

SOARES, J.R., J.M. KERR and R.W. GRAY (1995)
25- Hydroxycholecalciferol in poultry nutrition
Poultr. Sci. 74, 1919-1934

SOOY, K., T. SCHERMERHORN, M. NODA, M. SURANA, W.B. ROTHEN, M. MEYER, N. FLEISCHER, G.W.G. SHARP and S. CHRISTAKOS (1999)
Calbindin D28k controls Ca2+ and insulin release
J. Biol. Chem. 274, 34343-34349

STAMP, T.C.B. (1975)
Factors in human vitamin D nutrition and in the production and cure of classical rickets
Proc. Nutr. Soc. 34, 119-130

STARK, H. (1979)
Untersuchungen zur lichtabhängigen Bildung und Verteilung von Cholecalciferol im Goldhafer (Trisetum flavescens)
Vet. med. Diss., München

STUMPF, W.E., M. SAR, F.A. REID, Y. TANAKA and H.F. DeLUCA (1979)
Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D_3 in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary and parathyroid
Science 206(4423), 1188-1190

SUDA, T., N. TAKAHASHI and T.J. MARTIN (1992)
Modulation of osteoclast differentiation
Endocr. Rev. 13, 66-80

SUDA, T., Y. UENO, K. FUJII and T. SHINKI (2003)
Vitamin D and bone
J. Cell. Biochem. 88, 259-266

TANAKA, Y., L. CASTILLO, M.J. WINELAND and H.F. DeLUCA (1978)
Synergistic effect of progesterone, testosterone and estradiol in the stimulation in the chick renal 25-hydroxyvitamin D_3-1 -hydroxylase
Endocrinol. 103, 2035-2039

TANAKA, Y., H.F. DeLUCA, Y. KOBAYASHI, T. TAGUCHI, N. IKEKAWA and M. MORISAKI (1979)
Biological activity of 24,24-difluoro-25-hydroxy-vitamin D_3; effect of blocking of 24-hydroxylation on the function of vitamin D
J. Biol. Chem. 254, 7163-7167

TERRY, M., M. LANENGA, J. McNAUGHTON and L.E. STARK (1999)
Safety of 25-hydroxyvitamin D_3 as a source of vitamin D_3 in layer poultry feed
Vet. Human Toxicol. 41, 312-316

THIERER, K.J. (1989)
Bestimmung der biologischen Aktivität von Vitamin D_3 und Vitamin D_3-Metaboliten, ohne bzw. mit Zusatz von Ascorbinsäure, sowie von Handelsüblichen Vitamin D_3-Trockenpulvern im Wachteleischalentest
Vet. Med. Diss., München

TIAN, X.Q., T.C. CHEN, L.Y. MATSUOKA, J. WORTSMAN and M.F. HOLICK (1994)
Kinetic and thermodynamic studies of the conversion of previtamin D_3 in human skin
J. Biol. Chem. 268, 14888-14892

TOKARNIA, C.H., J. DÖBEREINER and P.V. PEIXOTO (2002)
Poisonous plants affecting livestock in Brazil
Toxicon 40 (12), 1635-1660

TRUMP, D.L. and C.S. JOHNSON (2003)
Anti- tumor activity of calcitriol: Pre- clinical and clinical studies
12th workshop on Vitamin D, Maastricht

TUCKER, G., R.E. GAYNON and M.R. HAUSSLER (1973)
Vitamin D-25-hydroxylase: tissue occurence and aaprent lack of regulation
Arch. Biochem. Biophys. 155, 47-57

TUSTIN, R.C., C.H. PIENAAR, J.M. SCHMIDT, A. FAUL, K. VAN DER WALT, P.A. BOYAZUGLU and H.P.A. BOOM (1973)
Enzootic calcinosis of sheep in South Africa
J. S. Afr. Vet. Assoc., 383-395

UDAGAWA, N., N. TAKAHASHI, T. AKATSU, H. TANAKA, T. SASAKI, T. NISHIHARA, T. KOGA, T.J. MARTIN and T. SUDA (1990)
Origin of osteoclasts: Mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow- derived stromal cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7260-7264

VAN DE VELDE, J.P., J.P.W. VERMEIDEN and A.M. BLOOT (1985)
Medullary bone matrix formation, mineralization, and remodeling related to the daily egg- laying cycle of japanese quail: A histological and radiological study
Bone 6, 321-327

WANNER, M.J., J. KESSLER, J. MARTIG und A. TONTIS (1986)
Enzootische Kalzinose bei Ziege und Rind in der Schweiz
Schweiz. Arch. Tierheilk. 128, 151-160

WASSERMAN, R.H. (1974)
Calcium absorption and and calcium- binding protein synthesis: Solanum malacoxylon reverses Strontium inhibition
Science 183, 1092-1094

WASSERMAN, R.H., J.D., HENION, M.R. HAUSSLER and T.A. McCHAIN (1976)
Calcinogenic factors in Solanum malacoxylon: Evidence that is is 1,25-dihydroxyvitamin D_3-glycoside
Science 194, 853-855

WASSERMAN, R.H. (1997)
Intestinal calcium-absorption
Academic Press 259-273

WATTS, N.B. (1999)
Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling
Clin.Chem. 44:8b, 1359-1368

WINDAUS, A., O. LINSERT, A. LÜTTRINGHAUS und A. WEIDLICH (1932)
Über das kristallisierte Vitamin D_3
Justus Liebigs Ann. Chem. 492, 226-241

WINDAUS, A., F. SCHRENK und F. von WERDER (1936)
Über das antirachitisch wirksame Bestrahlungsprodukt aus 7-dehydro-Cholesterin
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 241, 100-103

WINDAUS, A., M. DEPPE and W. WUNDERLICH (1938)
Justus Liebig Ann. Chem. 533, 118

WOLF, M. und G. DIRKSEN (1976)
Über eine enzootische Kalzinose beim Rind
10. Mitteilung; Untersuchungen über den Einfluss von Trisetum flavescens (L.P.B.) auf den Kalzium- und Phosphorspiegel im Blutserum des Kaninchens
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 83, 398-401

ZELLA, J.B. and H.F. De LUCA (2003)
Vitamin D and autoimmune diabetes
J. Cell. Biochem. 88, 216-222

ZIEROLD, C., J.A. MINGS and H.F. De LUCA (2003)
Regulation of 25- hydroxyvitamin D_3- 24- hydroxylase m RNA by 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and parathyroid hormone
J. Cell. Biochem. 88, 234-237

ZUCKER, H., J. GROPP, J. PEH und C. ZENTZ (1967)
Erfahrungen mit der japanischen Wachtel (Coturnix coturnix japonica) als Labortier sowie einige Ergebnisse von Nährstoffbedarfsuntersuchungen
Tierärztl. Umsch. 8, 416-421

ZUCKER, H. und J. GROPP (1968)
Vitamin D_3 -Bestimmung über die Eischalenbildung bei der japanischen Wachtel
Naturwiss. 55, 447-455

ZUCKER, H., H. STARK und W.A. RAMBECK (1980)
Light dependent synthesis of cholecalciferol in a green plant
Nature Vol 283, No 5742, 68-69

ZUCKER, H und W.A. RAMBECK (1981)
Vitamin D_3 und Vitamin D_3-metabolitartige Aktivität in Trisetum flavescens
Zbl. Vet. Med. A 28, 436-441

9. Anhang

Tabelle 25: Durchschnittliche wöchentliche Legeleistung pro Gruppe [%] (Mittelwert ± Standardabweichung), Woche 1 bis Woche 3, Versuch 1

Diätzusatz/ kg Futter	durchschnittliche Legeleistung [%] Tag 1 bis 7		durchschnittliche Legeleistung [%] Tag 8 bis 14		durchschnittliche Legeleistung [%] Tag 15 bis 21	
	x	±s	x	±s	x	±s
100 IE Vitamin D3	25,71	9,76	64,92	17,25	80,95	15,33
200 IE Vitamin D_3	41,43	21,16	78,57	9,00	75,71	13,97
400 IE Vitamin D_3	45,71	25,07	90,00	11,55	88,57	6,90
0,125 µg 1,25(OH_2) D_3	35,71	9,76	54,29	16,18	20,00	27,69
0,25 µg 1,25(OH_2) D_3	42,86	22,89	71,43	12,15	46,51	19,95
0,5 µg 1,25(OH_2) D_3	30,00	28,28	67,14	13,80	81,43	12,15
3 g S.g.- Stängel	49,21	21,14	52,38	13,93	28,57	28,59
8 g Trisetum flavescens	27,14	13,02	42,46[d]	11,17	39,80[e]	11,33
24 g Trisetum flavescens	28,57	20,35	81,43[d]	9,00	71,43[e]	31,85
0,1 g S.g.- Roh-Extrakt	25,71	22,25	87,14	7,56	68,57	15,74
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt	42,86	26,78	87,30[b]	17,48	82,34	18,97
1 g S.g.- Roh-Extrakt	30,00[a]	28,61	71,43[c]	12,60	69,84	27,00
3 g S.g.- Roh-Extrakt	68,57	26,73	88,57	17,73	84,29	17,18
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	55,56	26,45	69,84[b]	21,00	87,30	11,88
1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	60,32[a]	22,09	92,06[c]	12,36	85,72	16,62

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:

a = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 1 g S.g.- Roh-Extrakt und 1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase

b = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 0,3 g S.g. -Roh-Extrakt und 0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase

c = $p \leq 0,01$ zwischen Gruppen 1 g S.g.- Roh-Extrakt und 1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase

d = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 8 g Trisetum flavescens und 24 g Trisetum flavescens

e = $p \leq 0,01$ zwischen Gruppen 8 g Trisetum flavescens und 24 g Trisetum flavescens

Tabelle 26: Durchschnittliches wöchentliches Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag [mg] (Mittelwert ± Standardabweichung), Woche 1 bis Woche 3, Versuch 1

Diätzusatz/ kg Futter	Eischalen- TS pro Tier und Tag [mg] Tag 1 bis 7		Eischalen- TS pro Tier und Tag [mg] Tag 8 bis 14		Eischalen- TS pro Tier und Tag [mg] Tag 15 bis 21	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
100 IE Vitamin D3	215,9	80,5	562,7	153,9	670,2	173,9
200 IE Vitamin D_3	361,1	188,8	719,7	79,2	655,1	128,6
400 IE Vitamin D_3	405,5	266,9	903,2[d]	112,7	874,8	87,3
0,125 µg 1,25(OH_2) D_3	313,2	86,5	478,7	143,9	232,2	303,2
0,25 µg 1,25(OH_2) D_3	378,5	217,9	660,2	133,0	369,1	190,9
0,5 µg 1,25(OH_2) D_3	333,3	213,8	696,2	117,3	716,4	120,7
3 g S.g.- Stängel	404,0	175,6	461,9	140,5	246,3	241,1
8 g Trisetum flavescens	237,4	125,0	383,1[d]	95,9	312,7[e]	91,8
24 g Trisetum flavescens	260,1	155,2	780,8[d]	92,4	748,8[e]	59,6
0,1g S.g.- Roh-Extrakt	242,8	185,8	805,5	61,3	572,8	154,7
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt	380,5	247,9	811,1[b]	137,2	743,6	188,3
1 g S.g.- Roh-Extrakt	372,9[a]	230,2	705,1[c]	121,1	666,1	272,8
3 g S.g.- Roh-Extrakt	602,4	228,8	797,9	152,7	796,1	170,6
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	501,0	245,5	638,3[bd]	209,4	808,1	124,7
1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	580,8[a]	252,3	866,1[c]	117,1	779,6	174,7

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:

a = $p \leq 0,01$ zwischen Gruppen 1 g S.g.- Roh-Extrakt und 1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase

b = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 0,3 g S.g.- Roh-Extrakt und 0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase

c = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 1 g S.g.- Roh-Extrakt und 1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase

d = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase ; 8 g Trisetum flavescens und 24 g Trisetum flavescens

e = $p \leq 0,01$ zwischen Gruppen 8 g Trisetum flavescens und 24 g Trisetum flavescens

Tabelle 27: Durchschnittliches wöchentliches Frischeigewicht [g] pro Gruppe (Mittelwert ± Standardabweichung), Woche 1 bis Woche 3, Versuch 1

Diätzusatz/ kg Futter	Frischeigewicht pro Tag [g] Tag 1 bis 7		Frischeigewicht pro Tag [g] Tag 8 bis 14		Frischeigewicht pro Tag [g] Tag 15 bis 21	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
100 IE Vitamin D_3	10,49	0,59	10,69	0,27	10,26	0,33
200 IE Vitamin D_3	10,80	0,56	11,10	0,40	10,79	0,47
400 IE Vitamin D_3	10,07[a]	1,42	11,62[b]	0,30	11,54[d]	0,26
0,125 µg 1,25(OH_2) D_3	10,80	0,27	11,00	0,28	10,48	1,11
0,25 µg 1,25(OH_2) D_3	10,80	0,62	11,04	0,16	10,77	0,55
0,5 µg 1,25(OH_2) D_3	9,94	0,58	10,61	0,49	10,65	0,34
3 g S.g.- Stängel	10,80	0,56	11,10	0,40	10,33	0,61
8 g Trisetum flavescens	10,70	0,81	11,34	0,31	11,29	0,44
24 g Trisetum flavescens	10,33	0,79	11,66	0,31	11,50	0,38
0,1 g S.g.- Roh-Extrakt	10,00	0,60	10,97[b]	0,25	10,78	0,39
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt	11,04[a]	0,77	11,12	0,49	11,03	0,35
1 g S.g.- Roh-Extrakt	9,29	0,93	10,92[b]	0,17	10,84[c]	0,30
3 g S.g.- Roh-Extrakt	8,67	0,75	8,44[b]	0,41	8,63	0,14
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	10,75	0,74	10,96[b]	0,27	11,01	0,24
1g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	9,98	0,75	10,72[b]	0,12	10,35[cd]	0,41

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:

a = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 0,3 g S.g.- Roh-Extrakt

b = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 0,1 g S.g.- Roh-Extrakt, 1 g S.g.- Roh-Extrakt, 3 g S.g.- Roh-Extrakt, 0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase, 1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase

c = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 1 g S.g.- Roh-Extrakt und 1 g S.g. -Roh-Extrakt + Glucosidase

d = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase

Tabelle 28: Durchschnittlicher wöchentlicher Schalenanteil [%] pro Ei (Mittelwert ± Standardabweichung), Woche 1 bis Woche 3, Versuch 1

Diätzusatz/ kg Futter	Schalenanteil [%] pro Tag Tag 1 bis 7		Schalenanteil [%] pro Tag Tag 8 bis 14		Schalenanteil [%] pro Tag Tag 15 bis 21	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
100 IE Vitamin D3	8,00	0,41	8,11	0,51	8,00	0,46
200 IE Vitamin D_3	8,05	0,41	8,27	0,27	8,02	0,47
400 IE Vitamin D_3	8,42[abc]	1,30	8,64[d]	0,14	8,56	0,39
0,125 µg 1,25(OH_2) D_3	8,14	0,24	8,03	0,52	7,85	1,44
0,25 µg 1,25(OH_2) D_3	8,25	0,42	8,35	0,59	7,36	0,86
0,5 µg 1,25(OH_2) D_3	7,86	0,92	8,39	0,09	8,24	0,13
3 g S.g.- Stängel	7,63	0,49	7,92	0,46	7,15	0,51
8 g Trisetum flavescens	8,04	0,50	8,02	0,47	6,97[e]	0,50
24 g Trisetum flavescens	7,50[a]	0,77	8,22[d]	0,14	7,81[e]	0,15
0,1 g S.g.- Roh-Extrakt	7,78	0,08	8,44	0,23	7,68	0,30
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt	8,02	0,50	8,40	0,19	8,13	0,21
1 g S.g.- Roh-Extrakt	9,16[b]	0,45	9,05 [d]	0,16	8,82	1,10
3 g S.g.- Roh-Extrakt	8,57	0,75	8,44	0,41	8,63	0,14
0,3 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	8,36	0,33	8,29	0,35	8,39	0,14
1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase	9,50[c]	0,60	8,79	0,20	8,79	0,43

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:

a = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 24 g Trisetum flavescens

b = $p \leq 0,01$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 1 g S.g.- Roh-Extrakt

c = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 1 g S.g.- Roh-Extrakt + Glucosidase

d = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 24 g T. flavescens, 1 g S.g.- Roh-Extrakt

e = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 8 g Trisetum flavescens und 24 g Trisetum flavescens

Tabelle 29: Durchschnittliche wöchentliche Legeleistung pro Gruppe [%] (Mittelwert ± Standardabweichung), Woche 1 bis Woche 3, Versuch 2

Diätzusatz/ kg Futter	durchschnittliche Legeleistung [%] Tag 1 bis 7		durchschnittliche Legeleistung [%] Tag 8 bis 14		durchschnittliche Legeleistung [%] Tag 15 bis 21	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
100 IE Vitamin D_3	5,71	7,87	38,57	16,76	35,71	16,18
200 IE Vitamin D_3	8,57	12,15	60,48	17,62	65,08	11,88
400 IE Vitamin D_3	37,14[ab]	32,00	88,57[c]	10,69	84,29[d]	23,70
0,25 µg 1,25(OH_2) D_3	5,71	7,87	1,59	4,20	1,79	4,72
0,5 µg 1,25(OH_2) D_3	4,29	7,87	1,43	3,78	1,79	4,72
1 µg 1,25(OH_2) D_3	41,11	39,02	63,49	20,00	46,03	16,27
2 mg S.g.-Reinextrakt	8,57[a]	6,90	4,29[c]	5,35	1,43[d]	3,78
8 mg S.g.-Reinextrakt	10,00[a]	10,00	14,92[c]	10,24	20,63[d]	4,20
32 mg S.g.-Reinextrakt	38,57	29,11	70,00	12,91	82,86	11,13
128 mg S.g.-Reinextrakt	62,86[a]	32,00	82,86	7,56	82,86	7,56
512 mg S.g.-Reinextrakt	48,98	30,70	92,86	8,91	73,81	21,21
3 mg S.g.-Reinextrakt + Glucosidase	1,43[b]	3,78	1,43[c]	3,78	0,00[d]	,-
7,5 mg S.g.-Hydrolysat	2,86[b]	7,56	1,79[c]	4,72	1,79[d]	4,72
15 mg S.g.-Hydrolysat	0,00[b]	,-	1,59[c]	4,20	0,00[d]	,-
30 mg S.g.-Hydrolysat	17,14	13,80	7,46[c]	11,23	1,59[d]	4,20
Gemahlene S.g.-Blätter	42,86	34,98	44,29[c]	7,87	28,57	9,00

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:

a = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 2 mg S.g.- Reinextrakt, 8 mg S.g.- Reinextrakt, 128 mg S.g.- Reinextrakt

b = $p \leq 0,01$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase, 7,5 mg S.g.- Hydrolysat, 15 mg S.g.- Hydrolysat

c = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 2 mg S.g.- Reinextrakt, 8 mg S.g.- Reinextrakt, 3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase, 7,5 mg S.g.- Hydrolysat, 15 mg S.g.- Hydrolysat, 30 mg S.g.- Hydrolysat, Gemahlene Blätter

d = p ≤ 0,001 zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 2 mg S.g.- Reinextrakt, 8 mg S.g.- Reinextrakt, 3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase, 7,5 mg S.g.- Hydrolysat, 15 mg S.g.- Hydrolysat, 30 mg S.g.- Hydrolysat, Gemahlene Blätter

Tabelle 30: Durchschnittliches wöchentliches Eischalentrockengewicht pro Tier und Tag [mg] (Mittelwert ± Standardabweichung), Woche 1 bis Woche 3, Versuch 2

Diätzusatz/ kg Futter	Eischalen- TS pro Tier und Tag [mg] Tag 1-7 $\bar{x}$	±s	Eischalen- TS pro Tier und Tag [mg] Tag 8-14 x	±s	Eischalen- TS pro Tier und Tag [mg] Tag 15-21 $\bar{x}$	±s
100 IE Vitamin D_3	43,8	31,4	273,2	123,6	263,4	111,9
200 IE Vitamin D_3	61,7	73,1	513,0	159,8	476,5	109,9
400 IE Vitamin D_3	291,3[a]	203,8	797,9[b]	108,9	761,6[c]	186,8
0,25 µg 1,25(OH_2) D_3	33,7	24,1	4,7	,-	7,1	,-
0,5 µg 1,25(OH_2) D_3	23,6	38,2	18,4	,-	16,8	,-
1 µg 1,25(OH_2) D_3	325,5	272,2	543,7	180,0	407,5	128,6
2 mg S.g.- Reinextrakt	80,8	35,9	25,2[b]	15,5	7,5[c]	,-
8 mg S.g.- Reinextrakt	86,9	69,4	112,9[b]	61,6	153,5[c]	33,4
32 mg S.g.- Reinextrakt	318,8	130,2	647,1	115,6	808,1	95,2
128 mg S.g.- Reinextrakt	564,3[a]	189,3	803,4	81,6	812,0	75,0
512 mg S.g.- Reinextrakt	450,4	245,5	903,8	84,4	694,5	201,4
3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase	13,7[a]	29,7	11,0[b]	29,8	000,0	,-
7,5 mg S.g.- Hydrolysat	26,5[a]	42,6	13,7[b]	31,5	5,7[c]	24,1
15 mg S.g.- Hydrolysat	000,0	,-	7,9[b]	,-	000,0[c]	,-
30 mg S.g.- Hydrolysat	125,3	140,3	58,1[b]	79,4	9,6[c]	34,9
Gemahlene S.g.- Blätter	347,4[a]	287,4	366,7[b]	71,6	241,1[c]	79,5

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:

a = p ≤ 0,01 zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 128 mg S.g.- Reinextrakt, 3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase, 7,5 mg S.g.- Hydrolysat, Gemahlene Blätter

b = p ≤ 0,001 zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 2 mg S.g.- Reinextrakt, 8 mg S.g.- Reinextrakt, 3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase, 7,5 mg S.g.- Hydrolysat, 15 mg S.g.- Hydrolysat, 30 mg S.g.- Hydrolysat, Gemahlene Blätter

c = p ≤ 0,001 zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 2 mg S.g.- Reinextrakt, 8 mg S.g.- Reinextrakt, 3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase, 7,5 mg S.g.- Hydrolysat, 15 mg S.g.- Hydrolysat, 30 mg S.g.- Hydrolysat, Gemahlene Blätter

Tabelle 31: Durchschnittliches wöchentliches Frischeigewicht [g] pro Gruppe (Mittelwert ± Standardabweichung), Woche 1 bis Woche 3, Versuch 2

Diätzusatz/ kg Futter	Frischeigewicht pro Tag [g] Tag 1 bis 7		Frischeigewicht pro Tag [g] Tag 8 bis 14		Frischeigewicht pro Tag [g] Tag 15 bis 21	
	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s	$\bar{x}$	±s
100 IE Vitamin D_3	9,50	0,50	9,47	0,47	9,81	1,04
200 IE Vitamin D_3	9,61	0,35	10,29	0,53	10,48	0,29
400 IE Vitamin D_3	9,65[a]	0,45	11,09[bc]	0,22	11,06[d]	0,24
0,25 µg 1,25(OH_2) D_3	7,67	0,58	11,00	,-	7,00	,-
0,5 µg 1,25(OH_2) D_3	7,75	0,35	10,00	,-	10,00	,-
1 µg 1,25(OH_2) D_3	9,61	0,57	10,68	0,61	11,17	0,35
2 mg S.g.- Reinextrakt	11,00[a]	0,71	10,67	0,58	5,00[de]	,-
8 mg S.g.- Reinextrakt	8,75	1,32	9,70[c]	0,60	10,21[e]	0,95
32 mg S.g.- Reinextrakt	10,27	0,34	11,28	0,37	11,86[e]	0,57
128 mg S.g.- Reinextrakt	10,46	0,72	11,58	0,18	11,65[e]	0,10
512 mg S.g.- Reinextrakt	10,70[a]	1,21	11,78	0,16	11,59[e]	0,35
3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase	11,00	,-	9,00[b]	,-	,-	,-
7,5 mg S.g.- Hydrolysat	9,00	,-	11,00	,-	7,00[d]	,-
15 mg S.g.- Hydrolysat	,-	,-	9,00[b]	,-	,-	,-
30 mg S.g.- Hydrolysat	8,33[a]	1,43	9,11[c]	4,00	10,00	,-
Gemahlene S.g.- Blätter	9,82	0,40	10,62	0,23	10,87	0,47

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:

a = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 2 mg S.g.- Reinextrakt, 512 mg S.g.- Reinextrakt, 30 mg S.g.- Hydrolysat

b = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase, 15 mg S.g.- Hydrolysat

c = $p \leq 0,01$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 8 mg S.g.- Reinextrakt, 30 mg S.g.- Hydrolysat

d = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 2 mg S.g.- Reinextrakt, 7,5 mg S.g.- Hydrolysat

e = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 8 mg S.g.- Reinextrakt und 32 mg S.g.- Reinextrakt, 128 mg S.g.- Reinextrakt, 512 mg S.g.- Reinextrakt,

Tabelle 32: Durchschnittlicher wöchentlicher Schalenanteil [%] pro Ei (Mittelwert ± Standardabweichung), Woche 1 bis Woche 3, Versuch 2

Diätzusatz/ kg Futter	Schalenanteil [%] pro Tag Tag 1 bis 7		Schalenanteil [%] pro Tag Tag 8 bis 14		Schalenanteil [%] pro Tag Tag 15 bis 21	
	x	±s	x	±s	x	±s
100 IE Vitamin D_3	6,65	0,44	7,51	0,65	7,63	0,95
200 IE Vitamin D_3	7,76	0,23	8,24	0,39	6,99	1,95
400 IE Vitamin D_3	8,05	0,33	8,11	0,27	8,25[cde]	0,28
0,25 µg 1,25(OH_2) D_3	7,87	1,44	2,67	,-	5,70	,-
0,5 µg 1,25(OH_2) D_3	7,23	0,22	7,84	,-	7,74	,-
1 µg 1,25(OH_2) D_3	8,07	0,13	7,91	0,25	8,04	0,36
2 mg S.g.- Reinextrakt	8,27[a]	0,56	4,88[b]	1,24	8,13	,-
8 mg S.g.- Reinextrakt	8,67	1,71	7,93	0,77	7,31[c]	0,35
32 mg S.g.- Reinextrakt	7,89	0,28	8,21	0,35	8,26	0,47
128 mg S.g.- Reinextrakt	8,34	0,25	8,37	0,14	8,41	0,13
512 mg S.g.- Reinextrakt	8,32	0,40	8,27	0,11	8,12	0,16
3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase	6,87[a]	,-	7,89[b]	,-	,-	,-
7,5 mg S.g.- Hydrolysat	6,32[a]	,-	5,36	,-	4,56[e]	,-
15 mg S.g.- Hydrolysat	,-	,-	5,49[b]	,-	,-	,-
30 mg S.g.- Hydrolysat	8,03[a]	0,46	7,78[b]	0,97	6,02[d]	,-
Gemahlene S.g.- Blätter	7,98	0,22	7,80	0,22	7,72	0,22

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen:

a = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 2 mg S.g.- Reinextrakt und 3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase; 7,5 mg S.g.- Hydrolysat und 30 mg S.g.- Hydrolysat

b = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 2 mg S.g.- Reinextrakt und 3 mg S.g.- Reinextrakt + Glucosidase; 15 mg S.g.- Hydrolysat und 30 mg S.g.- Hydrolysat

c = $p \leq 0,05$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 8 mg S.g.- Reinextrakt

d = $p \leq 0,01$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 30 mg S.g.- Hydrolysat

e = $p \leq 0,001$ zwischen Gruppen 400 IE Vitamin D_3 und 7,5 mg S.g.- Hydrolysat

10. Danksagung

Bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. W.A. Rambeck, möchte ich mich herzlich für die Überlassung des Themas und die umfassende Betreuung während der Arbeit bedanken. Ohne seine ständige Erreichbarkeit und schnelle Hilfe wäre die rasche Fertigstellung der Promotion nicht möglich gewesen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Dr. Ulrich Wehr, der mich bei der Planung und Durchführung der Versuche beraten hat, herzlich bedanken.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern auf der Außenstelle Oberwiesenfeld (Lehrstuhl für Tierernährung). Besonderer Dank gebührt Frau E. Stadler, die mir mit ihrem großen Erfahrungsschatz und ihrem morgendlichen Kaffee geholfen hat, viele Probleme zu beseitigen.

Auch beim Laborpersonal des Instituts für Tierernährung möchte ich mich aufs herzlichste bedanken. Besonders erwähnen möchte ich Herrn W. Hesselbach, Frau E. Kleiner und Frau J. Lasic, die mich bei der Laborarbeit und in Computerfragen stets mit Rat und Tat unterstützt haben.

Für die große Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. K. Osterkorn und bei Herrn Stanglmeier.

by Karhu

Großer Dank gilt weiterhin Frau Nicole Seiler und Frau Dr. Cordula Gieren, die mir bei der Durchführung der Versuche jederzeit hilfreich zur Seite gestanden sind.

Für die Mühe des Korrekturlesens und des Auseinandersetzens mit meiner eigenwilligen Kommasetzung möchte ich vielen tausend Dank an meinen Vater und Herrn Paul übersenden.

Herr Achim Paul und Frau Sabine Leichmann, die für mein letztendlich doch freundschaftliches Verhältnis zu meinen Laptops verantwortlich sind, gebührt ein besonderer Dank. Zu dem „Computerteam“ zählt auch Herr Nico Langen, der mir mit Engelsgeduld die unterschiedlichsten Funktionen in Excel und Word erklärt hat.

Allen meinen Freunden, besonders Frau Nicole Seiler bin ich für ihre großartige Unterstützung und Hilfe bei Problemen jeder Art ganz besonders herzlichen Dank schuldig. Ganz lieben Dank auch an Frau Karin Lanz, die immer ein offenes Ohr für alle Probleme hatte und mich mit intensiven Springstunden auf andere Gedanken gebracht hat. Kurz noch ein Wort an Frau Dr. Isabell Herold: ich freue mich auf einen großen Eisbecher!

Last but not least möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, denn ohne eure Unterstützung, Geduld und Motivation hätte ich mein ganzes Studium und die Doktorarbeit nicht so schnell und erfolgreich bewältigt.

by Karhu

11. Lebenslauf

Name: Christina Stephanie Greissinger

Geburtsdatum: 04. Dezember 1975 in Marburg an der Lahn

Eltern: Dietrich Greissinger; Dipl. Volkswirt
Liesel Greissinger, geb. Hauß; Dipl. Volkswirtin

Geschwister: Michael Philipp Greissinger

Ausbildung:

1981-1986	Diesterweg- Grundschule in Wiesbaden
1986- 1988	Konrad- Duden- Schule in Wiesbaden
1988- 1995	Dilthey- Gymnasium in Wiesbaden mit Abschluss des Abiturs
1995- 1996	Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
1996- 2002	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität in München
2002	Beginn der vorliegenden Doktorarbeit

3. Staatsexamen: 16. August 2002

Approbation: 12. Dezember 2002

Promotion: Oktober 2002 bis April 2004
Anfertigung vorliegender Doktorarbeit am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig- Maximilians- Universität München