

# Einfluss verschiedener Fütterungsintensitäten auf Leistungsparameter und Tränkeaufnahmeverhalten sowie auf ausgewählte Stoffwechselfparameter von Kälbern der Rasse Deutsche Holstein

---

Miriam Korst geb. Hill



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Aus dem Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Klaus Eder  
und  
dem Institut für Tierwissenschaften  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Betreuerin: Frau Prof. Dr. Dr. Helga Sauerwein

**Einfluss verschiedener Fütterungsintensitäten  
auf Leistungsparameter und Tränkeaufnahmeverhalten  
sowie auf ausgewählte Stoffwechselfparameter  
von Kälbern der Rasse Deutsche Holstein**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

**Dr. med. vet.**

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Miriam Korst**

**geb. Hill**

Tierärztin aus Kaiserslautern

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Klaus Eder  
Prof. Dr. Dr. Helga Sauerwein

Tag der Disputation: 26.09.2017

*Meinen Eltern*

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

**Kesser, J., Korst, M., Koch, C., Romberg, F.-J., Rehage, J., Müller, U., Schmicke, M., Eder, K., Hammon, H.M., Sadri, H., Sauerwein, H. (2017):** Different milk feeding intensities during the first 4 weeks of rearing dairy calves. Part 2: Effects on the metabolic and endocrine status during calthood and around the first lactation. *Journal of dairy science* **100**, 3109-3125.

**Korst, M., Koch, C., Kesser, J., Müller, U., Romberg, F.-J., Rehage, J., Eder, K., Sauerwein, H. (2017):** Different milk feeding intensities during the first 4 weeks of rearing in dairy calves. Part 1: Effects on performance and production from birth over the first lactation. *Journal of dairy science* **100**, 3096-3108.

**Korst, M., Koch, C., Kesser, J., Romberg, F.-J., Rehage, J., Eder, K., Sauerwein, H. (2016):** Different feeding intensities during the first four weeks of rearing in dairy calves: Part 1: Effects on performance and production from birth over the first lactation. In: Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (Hrsg.), *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*, Göttingen. DLG-Verlag, Band 25, 141.

**Korst, M., Kesser, J., Romberg, F.-J., Koch, C. (2017):** Ad-libitum-Fütterung bei Kälbern? Einfluss innerhalb der ersten 4 Lebenswochen auf Leistungsparameter und die Milchleistung in der ersten Laktation. *Milchpraxis* **51/1**, 18-21.

**Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Verzeichnis der Anhangstabellen	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1.1 Wachstum, postnatale Entwicklung und Aufzucht von Kälbern	3
2.1.1.1 Wachstum	3
2.1.1.2 Entwicklung des Pansens	4
2.1.1.3 Saugverhalten	5
2.1.1.4 Fütterung von Aufzuchtkälbern	5
2.2 Relevante Stoffwechselfparameter beim Rind	7
2.2.1 Insulin	7
2.2.1.1 Struktur des Moleküls	7
2.2.1.2 Biosynthese und Freisetzung	7
2.2.1.3 Induktion der Freisetzung	8
2.2.1.4 Wirkung	9
2.2.1.5 Insulinresistenz	10
2.2.2 Weitere Parameter	14
2.2.2.1 Gesamteiweiß	14
2.2.2.2 Glucose	15
2.2.2.3 $\beta$ -Hydroxybutyrat	16
2.2.2.4 Nichtveresterte Fettsäuren	16
2.2.2.5 Leptin	17
2.2.2.6 Enzyme der Gluconeogenese	18
	I

2.3	Der Begriff der Programmierung	20
2.3.1	Hintergrund	22
2.3.3	Intrauterine Programmierung	26
2.3.4	Postnatale Programmierung	29
2.3.5	Postnatale Programmierung beim Wiederkäuer	33
2.3.6	Laktokrine Hypothese	37
2.4	Methoden zur Abschätzung der Insulinsensitivität	38
2.4.1	Hyperinsulinämischer euglycämischer Clamp	39
2.4.2	Intravenöser Glucosetoleranztest	39
2.4.3	Intravenöser Insulintoleranztest	40
2.4.4	Berechnete Indizes	41
3	Eigene Untersuchungen	43
3.1	Versuchseinrichtung	43
3.2	Versuchsaufbau	43
3.2.1	Tiere	45
3.2.2	Aufstallung	45
3.2.3	Fütterung	47
3.2.3.1	Milchaustauscher	47
3.2.3.2	Vollmilch	48
3.2.3.3	Kraftfutter	48
3.2.3.4	Raufutter	49
3.2.3.5	Totale-Misch-Ration	49
3.3	Versuchsdurchführung	52
3.3.1	Gewichtserfassung	52
3.3.2	Erfassen von Körpertemperatur, Kotkonsistenz und Gesundheitsstatus	52
3.3.3	Blutproben	52
3.3.4	Toleranztests	53
3.3.4.1	Vorbereitung der Tests	53

---

3.3.4.2	Intravenöser Glucosetoleranztest	54
3.3.4.3	Intravenöser Insulintoleranztest	54
3.3.5	Leberbiopsien	55
3.4	Analysen	56
3.4.1	Gesamteiweiß	56
3.4.2	$\beta$ -Hydroxybutyrat	56
3.4.3	Nichtveresterte Fettsäuren	56
3.4.4	Glucose	57
3.4.5	Insulin	57
3.4.6	Leptin	57
3.4.7	Genexpression gluconeogenetischer Enzyme im Lebergewebe	58
3.4.7.1	mRNA-Menge der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	58
3.4.7.1	mRNA-Menge der Pyruvat-Carboxylase	59
3.5	Berechnungen	60
3.5.1	Energieaufnahme	60
3.5.1	Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index	61
3.5.2	Auswertung der intravenösen Glucose- und Insulintoleranztests	61
3.5.2.1	Basalwerte	61
3.5.2.2	Area under the curve	61
3.5.2.3	Differenz zwischen Basalwert und Peak	61
3.5.2.4	Insulin-stimulated blood glucose response	62
3.6	Statistische Auswertung	62
4	Ergebnisse	63
4.1	Leistungsparameter	63
4.1.1	Tränkeaufnahme	63
4.1.2	Kraftfutteraufnahme	63
4.1.3	Energieaufnahme	63
4.1.4	Körpergewicht und tägliche Zunahmen	65

4.2	Verhalten bei der Tränkeaufnahme	68
4.3	Blutparameter	70
4.3.1	Gesamteiweiß	70
4.3.2	$\beta$ -Hydroxybutyrat	71
4.3.3	Nichtveresterte Fettsäuren	72
4.3.4	Glucose	74
4.3.5	Insulin	75
4.3.6	Leptin	76
4.3.7	Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index	77
4.4	Toleranztests	78
4.4.1	Basalwerte	78
4.4.2	Intravenöser Glucosetoleranztest	78
4.4.3	Intravenöser Insulintoleranztest	81
4.5	Genexpression gluconeogenetischer Enzyme im Lebergewebe	83
4.5.1	mRNA-Menge der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	83
4.5.2	mRNA-Menge der Pyruvat-Carboxylase	84
5	Diskussion	85
5.1	Leistungsparameter	85
5.2	Verhalten bei der Tränkeaufnahme	88
5.3	Blutparameter	89
5.3.1	Metaboliten	89
5.3.2	Hormone	93
5.3.3	Insulinsensitivität	96
5.3.4	Genexpression gluconeogenetischer Enzyme im Lebergewebe	99
6	Schlussfolgerung	101
7	Zusammenfassung	103
8	Summary	105
9	Anhang	107

10	Literaturverzeichnis	110
11	Danksagung	143
12	Eidesstattliche Erklärung	145

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Formen der Insulinresistenz (modifiziert nach Kahn, 1978) .....	14
<b>Abbildung 2:</b> Konzept der funktionellen Teratogenese .....	24
<b>Abbildung 3:</b> Effekt der " <i>predictive adaptive responses</i> ". .....	25
<b>Abbildung 4:</b> Meta-Regression des Effekts der täglichen Zunahme <sup>1</sup> [kg/d] auf die Milchleistung [kg] in der 1. Laktation .....	37
<b>Abbildung 5:</b> Übersicht Probenentnahme über den gesamten Versuchsverlauf.....	44
<b>Abbildung 6:</b> Grundriss Kälberstall, Bereich Tränkekälber (Maßstab ca. 1:100) .....	46
<b>Abbildung 7:</b> Tägliche Zunahme nach Versuchsphase und Entwicklung des Körpergewichtes von der Geburt bis zur 15. Lebenswoche (MW ± SE) .....	67
<b>Abbildung 8:</b> Tägliche Besuche im Tränkeautomaten während der Tränkephase .....	69
<b>Abbildung 9:</b> Verlauf des Serumproteinspiegels [g/dL] .....	70
<b>Abbildung 10:</b> Verlauf der Serum-BHB-Konzentration [mmol/L] .....	71
<b>Abbildung 11:</b> Verlauf der Serum-Konzentrationen von nichtveresterten Fettsäuren [µmol/L] .....	73
<b>Abbildung 12:</b> Verlauf der Plasma-Glucose-Konzentration [mmol/L] .....	74
<b>Abbildung 13:</b> Verlauf der Serum-Insulin-Konzentration [µU/mL] .....	75
<b>Abbildung 14:</b> Verlauf der Serum-Leptin-Konzentration [ng/mL] .....	76
<b>Abbildung 15:</b> Verlauf der RQUICKI-Werte über alle Versuchsphasen .....	77
<b>Abbildung 16:</b> mRNA-Menge (PEPCK) im Lebergewebe; .....	83
<b>Abbildung 17:</b> mRNA-Menge (PC) im Lebergewebe; .....	84

---

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Zusammenfassung der Effekte der metabolischen Programmierung.....	33
<b>Tabelle 2:</b> Tränkezuteilung der Versuchsgruppen in Versuchsphase 1 .....	44
<b>Tabelle 3:</b> Roh Nährstoffgehalte des verwendeten Milchaustauschers und Liste der jeweils angewendeten Analysemethoden .....	48
<b>Tabelle 4:</b> Zusammensetzung und Roh Nährstoffgehalte der verwendeten Kraftfuttersorten ..	50
<b>Tabelle 5:</b> Zusammensetzung der Totalen-Misch-Ration für die Kälber ab dem 70. Lebenstag .....	51
<b>Tabelle 6:</b> Primersequenzen der Ziel- und Referenzgene für die RT-qPCR .....	59
<b>Tabelle 7:</b> Futterwert von Milchprodukten und pflanzlichen Eiweißträgern für Tränkkälber	60
<b>Tabelle 8:</b> Aufnahme von Tränke, Kraftfutter und umsetzbarer Energie (ME) in den verschiedenen Versuchsphasen .....	65
<b>Tabelle 9:</b> Ergebnisse der intravenösen Glucosetoleranztests (ivGTT), Vergleich zwischen den Gruppen .....	80
<b>Tabelle 10:</b> Ergebnisse der intravenösen Glucosetoleranztests (ivGTT), Vergleich zwischen den Versuchsphasen .....	81
<b>Tabelle 11:</b> Ergebnisse der intravenösen Insulintoleranztests (ivITT).....	82

## **Verzeichnis der Anhangstabellen**

<b>Anhang I</b> : Körpergewicht und tägliche Zunahme nach Woche .....	107
<b>Anhang II</b> : Körpergewicht bei Geburt und zu Ende jeder Versuchsphase (Tag 27, 69 und 105) sowie tägliche Zunahme von Geburt bis Tag 105 innerhalb der Versuchsphasen, .....	108
<b>Anhang III</b> : Übersicht über die Blutparameter innerhalb der drei Versuchsgruppen .....	109

**Abkürzungsverzeichnis**

AE	arbiträre Einheit
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
BHB	β-Hydroxybutyrat
BP	Blutprobe
CNRQ	calibrated normalized relative quantity
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
G6P	Glucose-6-Phosphat
GDR	Insulin-stimulated glucose disposal rate
GIP	Glucoseabhängiges insulinotropes Peptid
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLP-1	Glucagon-like Peptide 1
GLUT	Glucose Transporter
HC	High-carbohydrate
HEC	hyperinsulinämischer euglycämischer Clamp
HOMA	Homeostasis Assessment Model
HPA-Achse	Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenrinden-Achse
IGF	Insulin-like growth factor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
ISBGR	Insulin-stimulated blood glucose response
ivGTT	intravenöser Glucosetoleranztest
ivITT	intravenöser Insulintoleranztest
k. A.	keine Angabe
KGW	Körpergewicht
LT	Lebenstag
LUFA	Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt
LVAV	Lehr- und Versuchsanstalt für Viehhaltung
MAT	Milchaustauscher
MATadl	Milchaustauschertränke <i>ad libitum</i> [13,8 %]
MATr	restriktive Milchaustauschertränke [11,5 %]
ME	umsetzbare Energie

## Abkürzungsverzeichnis

---

mRNA	messenger-RNA
n.d.	nicht durchgeführt
n.s.	nicht signifikant
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NEB	Negative Energiebilanz
NEFA	Nichtveresterte freie Fettsäure
NfE	Stickstofffreie Extraktstoffe
PAPAC	Hypophysen-Adenylatcyclase-aktivierendes Peptid
PC	Pyruvat-Carboxylase
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
p. n.	post natum
REF	Referenzgene
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ribonukleinsäure
RQUICKI	Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transkriptions Polymerase Kettenreaktion
TA	Tränkeaufnahme
TAG	Triacylglycerol
TM	Trockenmasse
TMR	Totale-Misch-Ration
VMadl	Vollmilchtränke <i>ad libitum</i>
VP	Versuchsphase
vs.	versus
XL	Rohfett
XP	Rohprotein

## 1 Einleitung

Die Veränderung einer somatischen Struktur oder die Einstellung physiologischer Funktionen als Folge eines Ereignisses innerhalb bestimmter kritischer oder sensitiver Entwicklungsphasen eines Organismus wird in der Literatur als *Programmierung* bezeichnet (Lucas, 1991). Die Einfluss nehmenden Faktoren können dabei ganz unterschiedlicher Natur sein und dazu führen, dass der Entwicklungsverlauf von der ursprünglich vorgesehenen Form abweicht (Bartol et al., 2008).

Bei Milchkühen kann durch die Ernährung in der fetalen oder neonatalen Phase die Gesundheit und auch die Leistungsfähigkeit im späteren Leben beeinflusst werden (Bach, 2012). Ein besonderer Fokus wurde in den letzten Jahren auf die Fütterung von Kälbern in der neonatalen Phase gerichtet. Die bis dato empfohlenen und angewandten Fütterungsstrategien konzentrierten sich auf eine frühe Entwöhnung, um die Aufnahme von festem Futter und die Entwicklung des Vormagensystems zu forcieren (Jasper und Weary, 2002; Baldwin et al., 2004; Khan et al., 2016). Es gibt jedoch Studien, die zeigen, dass die Aufnahme geringerer Tränkemengen einen negativen Einfluss auf die Wachstumsraten, das Verhalten und die Entwicklung des Verdauungssystems haben kann (Khan et al., 2011; Khan et al., 2016). Man stellte sogar fest, dass eine intensivere Fütterung als bislang üblich zu verbesserten Wachstumsraten führte (Moallem et al., 2010), die Entwicklung des Gastrointestinaltrakts förderte (Eckert et al., 2015) und dass langfristig verschiedene Leistungsparameter wie Erstkalbealter und Milchleistung positiv beeinflusst werden (Raeth-Knight et al., 2009; Margerison et al., 2013; Soberon und van Amburgh, 2013). Als dahinter stehende Mechanismen, die im Sinne einer Programmierung durch die veränderte Nährstoffzufuhr beeinflusst werden, wird unter anderem ein verbessertes Organwachstum diskutiert (Brown et al., 2005a; Geiger et al., 2016). Zudem konnten positive Effekte von bioaktiven Substanzen in Kolostrum und Milch nachgewiesen werden: zum einen auf die Entwicklung bestimmter Gewebe (Blum und Hammon, 2000b; Rauprich et al., 2000; Blättler et al., 2001) und auf die metabolischen und endokrinen Vorgänge und hier im speziellen den Glucose- und Insulinstoffwechsel der Kälber, sowie auf weitere Hormone, die unter anderem als Wachstumsfaktoren fungieren (Brown et al., 2005b; Hammon et al., 2005; Prokop et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob eine intensive Fütterung mit Milchaustauscher oder Vollmilch in den ersten 4 Lebenswochen die Leistungsfähigkeit und das Tränkeaufnahmeverhalten der Kälber kurz- und mittelfristig (bis zu einem Alter von 110 Tagen) positiv beeinflusst und ob die Vollmilchfütterung im Vergleich zur

Milchaustauscherfütterung Vorteile bzgl. Leistung und Verhalten bringt. Um die Wirkmechanismen näher zu beleuchten, sollte der endokrine und metabolische Status der Tiere innerhalb der ersten 4 Wochen und anschließend bis zum Alter von 16 Wochen erfasst werden und mögliche Unterschiede zwischen intensiver und restriktiver Fütterung sowie zwischen Vollmilch- und Milchaustauschertränke dargestellt werden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1.1 Wachstum, postnatale Entwicklung und Aufzucht von Kälbern

#### 2.1.1.1 Wachstum

Der Begriff „Wachstum“ beschreibt die intensive Zunahme von Körpergröße und –masse, durch die sich junge Organismen auszeichnen. Dieser Vorgang wird begleitet von einer Veränderung der Zusammensetzung, der Strukturen und Proportionen des Organismus sowie von zunehmender funktioneller Differenzierung und Komplexität (McMeekan, 1940; Snow, 1981; Stern, 1981; Fiebig, 1991). Nicht nur der Wachstumsverlauf, sondern auch die letztendlich erreichte Größe ist genetisch festgelegt. Es gibt jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Tierarten, Rassen und auch Individuen (Fiebig, 1991). Zudem beeinflussen auch Umweltfaktoren, besonders die Ernährung, das Wachstum.

Kälber der Rasse Deutsche Holstein werden mit einem durchschnittlichen Gewicht von 38 bis 45 kg (Bar-Peled et al., 1997; Quigley et al., 2006; Khan et al., 2007a; Wiedemann et al., 2015), einer Rumpflänge von rund 63 cm und einer Widerristhöhe von rund 65 cm geboren. Das Geburtsgewicht entspricht ca. 6-7 % der adulten Körpermasse und wird innerhalb der ersten 100 Lebenstage mehr als verdoppelt (Fiebig, 1991). Die Kälber realisieren in den ersten Lebensmonaten durchschnittliche tägliche Zunahmen von 450 bis 950 g, je nachdem, welche Fütterungsstrategie verfolgt wird. Generell führt eine intensivere Fütterung zu höheren täglichen Zunahmen (Raeth-Knight et al., 2009; Moallem et al., 2010; Davis-Rincker et al., 2011; Maccari et al., 2015). Damit erreichen die Kälber im Alter von ca. 8 Wochen Körpergewichte von 75 bis 86 kg (Raeth-Knight et al., 2009; Davis-Rincker et al., 2011) und eine Widerristhöhe von 85 bis 89 cm.

Das Organwachstum kann auf zellulärer Ebene in drei Phasen unterteilt werden. Zunächst wächst jedes Organ durch Vergrößerung der Zellzahl (Hyperplasie), anschließend durch gleichzeitige Zunahme von Zellzahl und –größe (Hyperplasie und Hypertrophie) und schließlich nur noch durch Umfangsvermehrung der Zellen (Hypertrophie). Unmittelbar nach der Geburt erfolgt ein intensives hyperplastisches Wachstum in den Organen von Kälbern. Es bestehen jedoch Unterschiede sowohl hinsichtlich der zur Geburt erreichten Organmassen und zellulären Ausstattung als auch in Bezug auf die weitere Wachstumsintensität (Fiebig, 1991).

Von besonderem Interesse bei der Nachzucht von Milchkühen ist das Wachstum der Milchdrüse. Es lässt sich in zwei Phasen unterteilen. In den ersten drei Monaten nach der

Geburt spricht man von der isometrischen Entwicklungsphase. In dieser Phase ist die Wachstumsrate der Milchdrüse vergleichbar mit der anderer Organe. Ab einem Alter von 3 Monaten bis zum Durchlaufen der ersten Östruszuklen ist die Wachstumsrate der Milchdrüse mehr als 3-fach höher als z.B. die des Körpergewichts. Man spricht von der allometrischen Phase (Sinha und Tucker, 1969; Swanson und Poffenbarger, 1979). Einige Untersuchungen zeigen, dass eine hohe Gesamtwachstumsrate in der allometrischen Phase nachteilige Effekte auf die Entwicklung der Milchdrüse und damit auf die spätere Milchleistung hat (Sejrsen et al., 1982; Capuco et al., 1995). Dies widerspricht jedoch den Beobachtungen, dass eine intensivere Fütterung und höhere Wachstumsraten im Kälberalter die Milchleistung in der ersten Laktation steigern können (Bar-Peled et al., 1997; Shamay et al., 2005; Soberon und van Amburgh, 2013). Sejrsen et al. (1998) folgerten, dass ein verstärktes Wachstum bis zum Alter von 4 Monaten, also hauptsächlich in der isometrischen Phase, die Entwicklung der Milchdrüse nicht negativ beeinflusst. Diese Vermutung wird durch Untersuchungen von Moallem et al. (2010) bestätigt.

### 2.1.1.2 Entwicklung des Pansens

Kälber sind junge Boviden, die sich vom Monogastrier zum Ruminantier entwickeln. Das neugeborene Kalb ist funktionell als reiner Monogastrier anzusehen (Jeroch et al., 2008). Das Vormagensystem von neugeborenen Wiederkäuern ist zunächst nur rudimentär ausgebildet und erfüllt im Wesentlichen noch keine Verdauungsfunktionen (Warner et al., 1956). Über den Schlundrinnenreflex gelangt flüssige Nahrung direkt in den Labmagen. Die Schlundrinne schließt sich während des Saugaktes und dient damit als Umgehung des Ruminoreticulum, um die Fermentation von Protein und anderen Nährstoffen im Pansen zu verhindern (Ørskov et al., 1970). Leat (1971) beschreibt verschiedene Phasen des Kohlenhydratstoffwechsels beim Wiederkäuer im Entwicklungsverlauf des Pansens. Beginnend mit der intrauterinen Phase, in der die Ernährung hauptsächlich über Glucosezufuhr via Plazenta stattfindet, verhält sich die Situation beim neugeborenen Wiederkäuer in der 2-3 Wochen dauernden, unmittelbar postnatalen Phase, wie bei einem nicht-ruminierenden Säugetier. Bis zur 8.-12. Woche entwickelt sich der Pansen zunehmend. Kohlenhydrate können dann im Pansen zu flüchtigen Fettsäuren abgebaut werden. Dass die Entwicklung des Pansenepithels schon früher startet, lässt die Beobachtung vermuten, dass isolierte Pansenepithelzellen bereits ab dem 4. Lebenstag ketogenetische Aktivität zeigen (Baldwin und Jesse, 1992). Dadurch können kurzkettige Fettsäuren im Pansenepithel zu Acetoacetat und  $\beta$ -Hydroxybuttersäure metabolisiert und dann in den Portalkreislauf überführt werden (Bergman, 1990).

Die langsam steigende Aufnahme von Kraftfutter und Raufutter fördert die Pansenentwicklung. Die Pansenmasse nimmt zu, das Papillenwachstum wird angeregt und die Entwicklung der Mikrobenpopulation findet statt (Warner et al., 1956). Die Entwicklung der Mikrobenpopulation ist für den Wiederkäuer essentiell, denn nur dadurch ist es möglich, einen Großteil des Energiebedarfs aus faserhaltigem Raufutter zu decken (Carroll und Hungate, 1954) und Protein aus Stickstoffverbindungen zu synthetisieren (Reid, 1953).

#### 2.1.1.3 Saugverhalten

Kälber, die bei ihrer Mutter saugen können, führen 4 bis 10 Saugakte pro Tag aus. Jeder dieser Saugakte umfasst 7-17 min, wobei die Dauer des Saugens davon abhängt, wie leicht es den Kälbern fällt, den Milchfluss der Kuh zu stimulieren, insbesondere dann, wenn man Fleischrassen mit Milchrassen vergleicht (Reinhardt und Reinhardt, 1981; de Passillé, 2001; Lidfors et al., 2010). So wurde bei Kälbern von Milchkühen beobachtet, dass sie während eines Saugaktes eher wenige Verhaltensformen zeigten, die den Milchfluss stimulierten. Dies lässt den Schluss zu, dass die Tiere ohne großen Aufwand ausreichend Milch bekamen (de Passillé und Rushen, 2006; Lidfors et al., 2010). Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass diese Kälber kürzere Saugzeiten hatten und nur eine oder zwei Zitzen nutzten anstatt 3 oder 4 im Vergleich zu Kälbern von Fleischrassen (Lidfors et al., 1994; Lidfors et al., 2010). Die aufgenommenen Mengen schwankten je nach Alter der Tiere von 6 kg/Tag in der ersten Lebenswoche bis zu 20 kg/Tag im Alter von 6 Wochen (Bar-Peled et al., 1997; de Passillé et al., 2008). Die Motivation eines Kalbes zu saugen ist hoch, da das Überleben eines jungen Säugetieres vom Erfolg des Saugens abhängt. Das Saugen wird durch die Aufnahme von Milch stimuliert und deshalb sollten dem Kalb, das isoliert von seiner Mutter aufwächst, geeignete Mittel angeboten werden um diese Motivation zu befriedigen (de Passillé, 2001). Entwöhnt werden die Tiere an der Mutter im Alter von 9 bis 11 Monaten, wobei männliche Kälber länger an der Mutter saugen als weibliche (Reinhardt und Reinhardt, 1981).

#### 2.1.1.4 Fütterung von Aufzuchtälbern

Kälber ernähren sich in den ersten Lebenswochen hauptsächlich mit Nahrung in flüssiger Form, da ihr Pansen bei der Geburt noch nicht funktionsfähig ist. Die Nahrung für mutterlos aufgezogene Kälber wird in der Regel in Form von Vollmilch oder Milchaustauscher (MAT) zur Verfügung gestellt (Baldwin et al., 2004; Khan et al., 2011). In den letzten Jahrzehnten konzentrierten sich die Fütterungsstrategien auf eine frühe Entwöhnung, um die Aufnahme von festem Futter und damit die Entwicklung eines funktionierenden Vormagensystems zu forcieren (Jasper und Weary, 2002; Baldwin et al., 2004; Khan et al., 2011; Khan et al., 2012;

Khan et al., 2016). Man ging davon aus, dass eine Restriktion der flüssigen Nahrung vor dem Entwöhnen die Aufnahme von Kraftfutter fördert und damit die Produktion von flüchtigen Fettsäuren, vor allem Butyrat, begünstigt, welches eine wichtige Rolle bei der Pansenentwicklung spielt (Quigley et al., 1991). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Verringerung der Menge an aufgenommener Milch bzw. MAT zu geringeren Wachstumsraten, abnormalem Verhalten und negativen Effekten bei der Pansenentwicklung führt (Khan et al., 2011; Khan et al., 2016). Hinzu kommt, dass die Tiere in den ersten drei Lebenswochen unabhängig vom Tränkeangebot sehr geringe Kraftfuttermengen realisieren (Eicher-Pruiett et al., 1992; Maccari et al., 2015) und deshalb im Prinzip auf die Nährstoffe aus Milch bzw. MAT angewiesen sind. Neuerdings werden die Effekte von gesteigerter Nährstoffzufuhr durch Vollmilch bzw. MAT auf die Futteraufnahme, Wachstumsraten und Milchleistung untersucht (Soberon et al., 2012; Eckert et al., 2015; Kiezebrink et al., 2015). Eine erhöhte Aufnahme von Milch oder MAT in den ersten Wochen setzte die aufgenommene Kraftfuttermenge herab (Khan et al., 2007a; Raeth-Knight et al., 2009), führte zu verzögerter Pansenentwicklung und geringerem Körpergewicht zum Zeitpunkt des Entwöhnens (Suarez-Mena et al., 2011) und lässt damit nachteilige Auswirkungen auf die Entwicklung des Kalbes vermuten. Maccari et al. (2015) zeigten aber, dass eine *ad libitum* Fütterung in den ersten 3 Lebenswochen keinen negativen Effekt auf die Kraftfuttermengeaufnahme und die Entwicklung des Vormagensystems hatte. Auch andere Studien zeigten, dass sich durchaus positive Effekte durch eine intensivere Fütterung erzielen lassen. So resultierten z.B. höhere Tageszunahmen in den ersten 2 Lebensmonaten in höheren Körpergewichten im Alter von 24 Monaten (Robelin und Chilliard, 1989; Moallem et al., 2010). Außerdem führten höhere Wachstumsraten im frühen Leben zu einer verbesserten Entwicklung des Gastrointestinaltrakts (GIT) beim Entwöhnen (Eckert et al., 2015), zu einem reduzierten Erstkalbealter (Raeth-Knight et al., 2009) und zu verbesserten Milchleistungen in der ersten Laktation, die sich jedoch nicht immer signifikant zeigten (Margerison et al., 2013; Soberon und van Amburgh, 2013). Auch konnte ein verbessertes Organwachstum bei intensiv gefütterten Kälbern nachgewiesen werden (Geiger et al., 2016).

Unter anderem weil Milch und MAT als teure, arbeitswirtschaftlich ungünstige und hygienisch problematische Futtermittel gelten (von Keyserlingk et al., 2006), belaufen sich die Empfehlungen in Deutschland auf eine Tränkephase von 8 bis 10 Wochen, innerhalb derer rund 30 kg MAT je Kalb verfüttert werden sollen. Dies entspricht einer Konzentration von 11% (125 g MAT je L Wasser) und ca. 6 L Tränke täglich. Bei Vollmilchtränke sollten ca.

250 L je Kalb über 10 Wochen mit ebenfalls einer Menge von 4 - 6 L täglich verfüttert werden. In beiden Fällen wird ein graduelles Abtränken zum Ende der Tränkephase empfohlen (Spiekers et al., 2009).

Ein entscheidendes Kriterium für die optimale Entwicklung und den Gesundheitsstatus der Kälber ist eine möglichst unmittelbar nach der Geburt erfolgende Aufnahme einer maximalen Menge an qualitativ hochwertigem Kolostrum (Blum und Hammon, 2000b; Weaver et al., 2000; Godden et al., 2009). Ein intrauteriner Transfer der Immunglobuline von der Kuh auf das Kalb findet aufgrund der Struktur der bovinen syndesmochorialen Plazenta im Grunde nicht statt. Die agammaglobulinämisch geborenen Kälber sind also zum Schutz vor Pathogenen auf die enterale Absorption kolostraler Antikörper angewiesen. Um einen ausreichend hohen Immunglobulinspiegel im Plasma zu erreichen, wird eine Aufnahme von 4 L Kolostrum innerhalb der ersten 12 Stunden empfohlen (Kaske et al., 2005).

## **2.2 Relevante Stoffwechselfparameter beim Rind**

### **2.2.1 Insulin**

#### 2.2.1.1 Struktur des Moleküls

Insulin gehört zu den Proteohormonen und besteht aus zwei Peptidketten. Die A-Kette besteht aus 21 Aminosäuren (AS), die B-Kette aus 30 AS (Wilcox, 2005). Hinsichtlich der AS-Zusammensetzung innerhalb der Ketten treten mehr oder weniger starke Unterschiede zwischen den Spezies auf. So unterscheiden sich z.B. bovines und humanes Insulin durch 3 AS in der A-Kette und lediglich eine AS in der B-Kette (Trenkle, 1972). Der grundsätzliche Bauplan aller Insuline ist identisch, obwohl bei manchen Tierarten bis zu 29 der insgesamt 51 Aminosäuren im Vergleich zum humanen Insulin variieren. In verschiedenen experimentellen Systemen zeigten sich dennoch keine bedeutenden Unterschiede in der biologischen Aktivität der unterschiedlichen Säugetierinsuline (Smith, 1966; Löffler und Petrides, 1998).

#### 2.2.1.2 Biosynthese und Freisetzung

Induziert durch Glucose wird in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas Präproinsulin synthetisiert. Nach der Abspaltung eines Signalpeptids wird das verbleibende Molekül als Proinsulin bezeichnet. In ihm sind A- und B-Kette über ein Verbindungsstück (C-Peptid) miteinander verbunden. Mit der Abspaltung dieses C-Peptids und der Bildung von 2 Disulfidbrücken ergibt sich die Struktur des zweikettigen Insulinmoleküls (Orci, 1985; Möstl, 2005). Innerhalb der Zelle wird Insulin nach der Biosynthese in Sekretgranula gespeichert (Palade, 1975; Orci, 1985). Diese

Sekretgranula können bei Bedarf mit der Plasmamembran der Zelle fusionieren, so dass der Inhalt der Granula via Exozytose in den extrazellulären Raum abgegeben wird (Palade, 1975).

### 2.2.1.3 Induktion der Freisetzung

Ausgelöst wird die Freisetzung von Insulin i.d.R. durch die Aufnahme von Nahrung. Zunächst wird der Anstieg des Insulinspiegels durch psychische und sensorische Reize über cholinerge Nervenbahnen (erhöhter Vagustonus) rasch initiiert, durch enteral induzierte nervale und humorale Reizantworten verstärkt und schließlich durch die direkte Wirkung des ansteigenden Blutzuckerspiegels gehalten (Stangassinger, 2005). Daraus ergibt sich als Antwort auf einen Stimulus wie z.B. Glucose, eine biphasische Sekretion, mit einem initial schnellen Anstieg gefolgt von einer weniger intensiven dafür aber anhaltenden Insulinfreisetzung (Bratanova-Tochkova et al., 2002).

Aufgrund der zentralen Rolle des Insulins im Glucosemetabolismus verwundert es nicht, dass Glucose weitreichend Einfluss nimmt auf die Insulinbiosynthese und -sekretion. Dennoch können auch andere Faktoren, wie z.B. Aminosäuren, Acetylcholin, Hypophysen-Adenylatcyclase-aktivierendes Peptid (PACAP), Glucoseabhängiges insulinotropes Peptid (GIP), Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) und diverse andere Agonisten im Zusammenspiel diese Prozesse beeinflussen (Bratanova-Tochkova et al., 2002).

Während beim Monogastrier die Blutglucosekonzentration der wichtigste Trigger für die Insulinsekretion ist (Löffler und Petrides, 1998), stellt sich die Situation bei ruminierenden Spezies etwas anders dar.

Beim Wiederkäuer wurde ein erster Insulinpeak innerhalb der ersten Stunde nach der Fütterung, gefolgt von einem zweiten Peak nach 4 bis 6 Stunden beobachtet (McAtee und Trenkle, 1971; Trenkle, 1978). Allerdings ging der erste postprandiale Peak nicht mit einer Erhöhung der Plasmaglucosekonzentration einher, was dafür spricht, dass die initialen Auslöser für die Insulinausschüttung unabhängig vom Blutzuckerspiegel sein müssen. Bloom und Edwards (1981) konnten zeigen, dass eine Reizung des Nervus Vagus bei Kälbern zu einem Anstieg von Glucagon und Insulin führte. Manns und Boda (1967) beobachteten, dass die kurzkettigen Fettsäuren Butyrat und Propionat, nach intravenöser Injektion, die Insulinsekretion beim Schaf anregten. Die stimulierenden Effekte dieser kurzkettigen Fettsäuren auf die Insulinsekretion sind spezifisch für Wiederkäuer und konnten bei nicht-ruminierenden Spezies wie z.B. Ratten, Kaninchen oder Schweinen den Insulinspiegel nicht beeinflussen (Horino et al., 1968). Acetat, Acetoacetat und  $\beta$ -Hydroxybutyrat hatten auch beim Wiederkäuer keinen Effekt auf das Plasmainsulin (Horino et al., 1968). Eine aktuelle

Studie zeigt, dass der Einfluss von  $\beta$ -Hydroxybutyrat auf die Plasmainsulinkonzentration, und damit die endokrine Adaptation an eine Hyperketonämie, vom physiologischen Status der Kuh abhängig ist. Die Infusion von  $\beta$ -Hydroxybutyrat erhöhte den Insulinspiegel zwar vor, nicht aber nach der Kalbung (Zarrin et al., 2017). Die intravenöse Gabe von Glucose erhöhte ebenfalls den Insulinspiegel bei Schafen und Rindern, allerdings in geringerem Ausmaß als nach Propionat- oder Butyratinfusion (Horino et al., 1968; McAtee und Trenkle, 1971). Die Glucosekonzentration im Portalblut steigt bei rohfaserreichen Rationen nach der Futteraufnahme nicht wesentlich an, weil nahezu alle mit der Nahrung aufgenommenen Kohlenhydrate im Pansen durch Mikroben zu kurzkettigen Fettsäuren abgebaut werden (Sallmann und Fuhrmann, 2005). Damit versteht sich die geringere funktionelle Bedeutung des Plasmaglucoosespiegels bei Wiederkäuern. Entsprechend dieser besonderen Ernährungssituation gelten Wiederkäuer auch als insulin-resistenter als monogastrische Spezies (Brockman, 1986; Hasegawa et al., 1992) (siehe 2.2.1.5).

Auch die gastrointestinalen Hormone wie Sekretin und Cholezystokinin stimulieren die Sekretion von Insulin beim Wiederkäuer (Baile et al., 1969; Trenkle, 1972), so dass man annehmen kann, dass sie beim initialen Anstieg des Insulins nach der Fütterung beteiligt sind (Trenkle, 1972). Bei Schafen wurden außerdem Korrelationen zwischen den Plasmakonzentrationen verschiedener Aminosäuren und Insulin festgestellt (Bassett et al., 1971). Außerdem unterliegt der Insulinspiegel beim Schaf einer von der Futteraufnahme unabhängigen circadianen Rhythmik (Holley und Evans, 1974).

Molekular wirken die metabolischen Hormone beim Wiederkäuer wie beim Monogastrier. Bei der Regulierung von Glykolyse und Gluconeogenese scheint jedoch vielmehr das Verhältnis von Insulin zu Glucagon von Bedeutung zu sein, als der alleinige Anstieg eines der beiden Hormone im Blut. Die Erhöhung des Insulin/Glucagon-Quotienten unmittelbar nach der Nahrungsaufnahme durch einen deutlichen Anstieg des Insulins ist ein typisches Merkmal für eine anabole Stoffwechselsituation. Die Einstellung des Quotienten erfolgt wahrscheinlich über eine parakrine Autoregulation im Pankreas. Damit kann einer übermäßig dominierenden Wirkung des Insulins entgegengewirkt werden (Sallmann und Fuhrmann, 2005; Stangassinger, 2005).

#### 2.2.1.4 Wirkung

Die primäre molekulare Insulinwirkung wird durch die Bindung an einen in der Plasmamembran gelegenen Tyrosinkinase-Rezeptor vermittelt. Durch die Bindung des Insulins am Rezeptor wird eine Tyrosinkinase aktiviert, die zu einer Autophosphorylierung und Anlagerung eines spezifischen Proteins (Insulinrezeptorsubstrat 1, IRS-1) führt. An dieses

IRS-1 kann wiederum eine Reihe von Proteinen andocken, die die intrazelluläre Signaltransduktion übernehmen (Löffler und Petrides, 1998). Es schließen sich verschiedene intrazelluläre Kaskaden an. Diese Signalwege koordinieren intrazellulär die Regulation von Vesikeltransport, Proteinsynthese, Enzymaktivierung/–inaktivierung und Genexpression. Gut aufeinander abgestimmt dienen sie der insulinvermittelten Regulation des Glucose-, Fett- und Proteinmetabolismus (Saltiel und Kahn, 2001). Dabei lassen sich dem Insulin die folgenden Wirkungen zuordnen:

- Erhöhung der Glucoseaufnahme hauptsächlich in Muskel- und Fettzellen durch vermehrte Insertion von Glucosetransportern (GLUT-4) in die Zellmembran (Czech und Corvera, 1999) und dadurch Senkung des Blutglucosespiegels,
- Steigerung der Glycogen-, Lipid- und Proteinsynthese,
- Hemmung der Lipolyse und Gluconeogenese (Wilcox, 2005),
- Mitogene Effekte (Zellproliferation/-differenzierung) (Boulton et al., 1991)
- Antiapoptotische Effekte (Tseng et al., 2002)

### 2.2.1.5 Insulinresistenz

Die Insulinresistenz ist definiert als Stoffwechselsituation, bei der eine physiologische Insulinkonzentration lediglich eine subnormale biologische Antwort induziert. Zurückzuführen ist eine Insulinresistenz auf (a) eine verminderte Insulinsensitivität oder auf (b) einen verringerten Insulin-Response, bei dem die maximale biologische Antwort vermindert ist oder (c) eine Kombination aus beiden (Kahn, 1978; Rizza et al., 1981b).

Die Veränderungen von Insulinsensitivität und –Response können am besten in einer Dosis-Wirkungs-Kurve nachvollzogen werden (siehe Abbildung 1).

Bei einer verminderten Insulinsensitivität sind höhere Hormonkonzentrationen notwendig um einen halbmaximalen biologischen Effekt zu erzielen. Es kommt zu einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve. Typischerweise tritt eine verringerte Insulinsensitivität auf bei Adipositas, nicht-insulin-abhängigem Diabetes mellitus oder nach Glucocorticoidgabe (Rizza et al., 1981b; Bergman et al., 1989; Block und Buse, 1989).

Ein eingeschränkter Insulin-Response kennzeichnet sich durch eine verringerte maximale biologische Wirkung des Hormons, bei dem jedoch die Konzentration zum Erreichen des halbmaximalen Effekts unverändert bleibt. Folgen davon können beispielsweise Hypertension, Dyslipidämie und atherosklerotische cardiovaskuläre Erkrankungen sein (DeFronzo und Ferrannini, 1991).

Auf zellulärer Ebene kommt eine Insulinresistenz auf drei verschiedenen Ebenen vor: (1) Schon auf Prärezeptor-Ebene können Defekte auftreten, wenn z.B. die Konzentration von freiem Insulin durch erhöhten Insulinabbau oder Bindung an andere Proteine als den Insulinrezeptor (bspw. Insulin-Antikörper) reduziert ist. In der Regel führt dies zu einer verringerten Insulinsensitivität. (2) Auf Rezeptor-Ebene kann eine verringerte Rezeptordichte oder eine verringerte Rezeptoraffinität zur Insulinresistenz führen. In letzterem Fall würde sich eine verringerte Insulinsensitivität einstellen, wohingegen eine verringerte Rezeptordichte zu einer Kombination aus verminderter Sensitivität und Response zu beobachten wäre. Da weniger als die Hälfte der Insulinrezeptoren besetzt sein müssten, um eine maximale biologische Antwort zu erhalten, ist der zuletzt genannte Fall unwahrscheinlich und wurde beim Menschen noch nicht beobachtet (Kahn, 1978; Rizza et al., 1981b). Allerdings könnten Insulin-Antagonisten durch Bindung an den Rezeptor einen solchen Effekt hervorrufen (Kahn et al., 1976; Rizza et al., 1981b). (3) Schlussendlich können Störungen auf der Postrezeptor-Ebene, bei denen die intrazelluläre Signalübertragung mittels Second-messenger-Systemen nicht funktioniert, zur Verringerung des Insulin-Response führen (Kahn, 1978).

Entsprechend der Ernährungssituation beim Wiederkäuer, die aufgrund des mikrobiellen Abbaus der Kohlenhydrate zu kurzkettigen Fettsäuren durch eine geringe Aufnahme von Glucose aus dem Vormagensystem und auch dem Darm gekennzeichnet ist, gelten Wiederkäuer als insulin-resistenter als monogastrische Spezies (Brockman, 1986; Hasegawa et al., 1992). Untersuchungen an Schafen, Ponies, Schweinen und Kamelen zeigten, dass Schafe und Kamele eine geringere Ansprechbarkeit auf Insulin zeigten als Schweine (Kaske et al., 2001). Nicht nur die Besonderheiten in Bezug auf die Vormagenverdauung von Wiederkäuern scheinen den Insulinstoffwechsel zu beeinflussen. Man nimmt an, dass auch Tierarten, die mit einem zeitweise sehr spärlichen Nahrungsangebot haushalten müssen, einen Vorteil daraus ziehen, wenn durch eine gesteigerte Insulinresistenz der Glucoseverbrauch minimiert werden kann. Damit erklärt man sich, dass Ponies, als Vertreter der Dickdarmfermentierer, und Kamele noch insulinresistenter waren als Schafe, insbesondere bedingt durch einen niedrigen peripheren Insulin-Response. Außerdem wurden bei ihnen im Vergleich zu anderen monogastrischen und ruminierenden Spezies höhere Basal-Glucosekonzentrationen beobachtet (Elmahdi et al., 1997; Kaske et al., 2001).

Es gibt wie beim Menschen auch bei Wiederkäuern Faktoren, die zu einer Insulinresistenz führen können. So hat z.B. der physiologische Status der Tiere (Trächtigkeit, Laktation) Einfluss auf die Insulinsensitivität der peripheren Gewebe. Dies ist auf die große Variation bei der Insulinsekretion und die wesentlichen Unterschiede bei der insulin-unabhängigen Glucoseverwertung zurückzuführen, die mit diesen Stadien einhergehen (de Koster et al., 2017). Die Insulinsensitivität nimmt zum Ende der Trächtigkeit hin ab (Prior und Christenson, 1978; Sano et al., 1991). Während der späten Trächtigkeit und dem Beginn der Laktation ist der Nährstofffluss zum Fetus und in die Milchdrüse von großer metabolischer Bedeutung (Baird, 1981). Diese Priorisierung geht einher mit verringerter Insulin-Ansprechbarkeit und -Sensitivität von extrahepatischen Geweben (Kronfeld, 1982; Sano et al., 1991), was vermutlich in der Entstehung der Fettleber und Ketose eine Schlüsselrolle spielt (Holtenius, 1993; Steen et al., 1997). Kühe mit Ketose haben eine verminderte Ansprechbarkeit auf Insulin (Sakai et al., 1993) und Ketoazidose ist eine der Ursachen für Insulinresistenz (Holtenius, 1993; Steen et al., 1997). Eine verminderte periphere Insulinsensitivität wurde auch bei Kühen mit Fettleber beobachtet (Kräft, 2004). Des Weiteren scheint eine Überkonditionierung zur verminderten peripheren Insulinsensitivität und zu einem herabgesetzten Insulin-Response zu führen (Holtenius und Holtenius, 2007; de Koster et al., 2015).

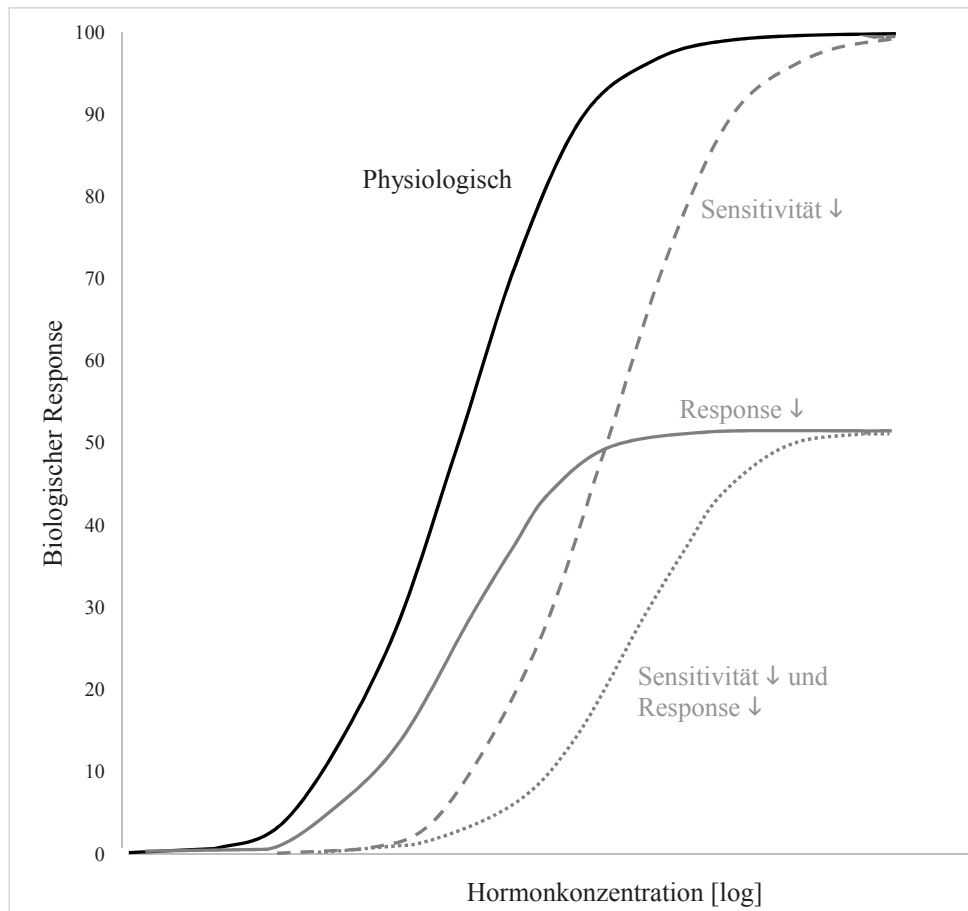
Daraus lässt sich schließen, dass die Fütterung ebenfalls Einfluss auf die Wirkmechanismen von Insulin hat. Holtenius et al. (2003) stellten fest, dass in Abhängigkeit vom Fütterungsregime in der Transitphase, die hochenergetisch gefütterten Tiere mit höheren Insulinwerten und höheren Glucose-Clearance-Raten im Glucosetoleranztest reagierten. Ähnliche Beobachtungen machten auch McCann und Reimers (1986) bei denen Adipositas bei Färsen mit Insulinresistenz, basaler Hyperinsulinämie und gesteigerter glucoseabhängiger Insulinausschüttung verknüpft war. Ebenso fand Goerigk (2011) bei intensiv aufgezogenen Färsen Hinweise auf eine peripartale Verringerung der Insulinsensitivität einhergehend mit erhöhter Lipomobilisation. Eine Reduktion der Energiezufuhr über die Fütterung wiederum führte bei Milchkühen zu einer verbesserten peripheren Insulinsensitivität (Bjerre-Harpøth et al., 2012).

Auch bei Kälbern scheint die Art der Fütterung die Entwicklung einer Insulinresistenz zu beeinflussen. In Untersuchungen an intensiv gefütterten Mastkälbern wurden Glucoseintoleranzen mit unphysiologisch hohen Glucosekonzentrationen und z.T. extrem hohe Insulinkonzentrationen sowie Insulinresistenz nachgewiesen (Palmquist et al., 1992; Hostettler-Allen et al., 1994). Ebenso führte eine energiereiche Fütterung bei Kälbern zu einer

Hyperinsulinämie und Hyperglycämie und damit einhergehender verminderter Insulinsensitivität (Röttger, 2007). Bei Zuchtkälbern mit strukturreicher Fütterung sanken dagegen die Glucose- und Insulinkonzentrationen mit zunehmendem Alter (Fahey und Berger, 1988). Ein höherer insulinabhängiger Glucoseumsatz und eine höhere Insulinsensitivität wurden bei Kälbern mit Eisenmangel im Vergleich zu Kälbern mit bedarfsgerechter Eisenversorgung nachgewiesen (Hostettler-Allen et al., 1993). Die Dichte der Insulinrezeptoren im Skelettmuskel war bei intensiv gefütterten Kälbern niedriger als bei konventionell getränkten Kälbern gleichen Alters (Hugi et al., 1998).

Jedoch nicht nur die Fütterung sondern auch das Alter der Tiere nimmt Einfluss auf den Insulin- und Glucosestoffwechsel. Bei Lämmern in der ersten Lebenswoche wurde die endogene Glucoseproduktion durch hohe Infusionsraten von Insulin um ein Drittel mehr unterdrückt als bei Tieren in der 4. bis 5. Lebenswoche. Demnach ist der Insulin-Response der Leber bei jüngeren Tieren größer. Ebenso ist der periphere Glucoseumsatz im Clamp bei Lämmern in der ersten Lebenswoche höher, so dass von einer höheren Insulinsensitivität bzw. -Response auszugehen ist (Gelardi et al., 1999). Auch neugeborene Kälber besitzen eine deutlich bessere periphere Insulinsensitivität, die mit dem Alter abnimmt (Stanley, 2005; Sternbauer, 2005).

Demnach sind Wiederkäuer nicht von Geburt an insulinresistent. In Abhängigkeit zur Fütterung verändert sich der Insulinstoffwechsel mit zunehmendem Alter (Sano et al., 1996).



**Abbildung 1:** Formen der Insulinresistenz (modifiziert nach Kahn, 1978)

Bei verminderter Insulinsensitivität sind höhere Insulinmengen erforderlich, um einen halbmaximalen Effekt zu erzielen. Die maximale biologische Antwort kann erreicht werden. Ein verminderter Insulin-Response führt zu einem verringerten maximalen Effekt. — physiologischer Verlauf, ---Verlauf bei herabgesetzter Sensitivität, — Verlauf bei herabgesetztem Response, ... Verlauf bei herabgesetzter Sensitivität und Response

## 2.2.2 Weitere Parameter

### 2.2.2.1 Gesamteiweiß

Die Menge des Gesamteiweißes im Blut wird oft als Schätzwert für die Menge an zirkulierendem IgG und als Indikator für die Anfälligkeit für Krankheiten im neonatalen Zeitraum verwendet (Naylor et al., 1977; Tyler et al., 1996; Weaver et al., 2000). Weaver et al. (2000) sehen die Messung des Gesamtproteins mittels Refraktometer für ein Herdenmonitoring als geeignet an, um eine vernünftige Einschätzung des Status der Immunglobulinversorgung beim Kalb zu erhalten. Als Grenzwert für einen adäquaten passiven Immunglobulintransfer schlagen die Autoren eine Gesamteiweißkonzentration von  $\geq 5,2$  g/dL vor.

Die Fähigkeit des Darmepithels nach der Geburt kolostrale Antikörper aufzunehmen ist zeitlich begrenzt. Es existieren jedoch unterschiedliche Angaben darüber, wann dieser sogenannte „*gut closure*“ (Darmschrankenschluss) eintritt. Die Angaben zum Ende der Absorptionsfähigkeit des Kälberdarms in der Literatur reichen von durchschnittlich 24 Lebensstunden (Bush und Staley, 1980) über 29 (Kim und Schmidt, 1983) bis hin zu 48 Stunden (Clover und Zarkower, 1980).

#### 2.2.2.2 Glucose

Unmittelbar nach der Geburt endet abrupt die Nährstoffzufuhr über die Plazenta, eine Versorgung, die reich ist an Kohlenhydraten und Aminosäuren, die aber wenig Fett enthält. Das Neugeborene muss sich nach einer kurzen Hungerperiode umstellen auf die orale Nährstoffzufuhr über Milch, deren Hauptenergieträger Fett und Laktose sind, wohingegen in der fetalen Entwicklung Glucose die wichtigste Energiequelle ist. Um den Glucosebedarf der Organe abzudecken, müssen Neugeborene schnellstmöglich auf die Stoffwechselwege der endogenen Glucoseproduktion umsteigen (Girard et al., 1992). Die Glucosekonzentration im Plasma ist bei Kälbern unmittelbar nach der Geburt niedrig, steigt aber innerhalb von 24 Stunden an und bleibt dann stabil im Bereich von 6-7 mmol/L (Egli und Blum, 1998). Hadorn et al. (1997) beobachteten bei Kälbern am ersten Lebenstag ebenfalls konstant niedrige Glucosekonzentrationen, selbst wenn diese ausschließlich mit Wasser getränkt wurden. Das deutet darauf hin, dass die Tiere trotz des Fehlens der oralen Aufnahme von Glucose in der Lage sind, ihre Glucosekonzentration im Blut stabil zu halten. Dass die körpereigene Glucoseproduktion bereits ab der Geburt funktionsfähig ist, wurde durch Untersuchungen von Steinhoff-Wagner et al. (2011b) bestätigt. Die Glucosekonzentrationen von präruminierenden Wiederkäuern sind höher als die von Wiederkäuern mit ausgereiftem Vormagensystem, sie fallen aber im Laufe der ersten Lebensmonate auf die Werte von adulten Tieren ab (Klotz und Heitmann, 2006). Die Glucosekonzentration im Plasma wird zusätzlich vom Zeitpunkt und der Art der Nahrungsaufnahme beeinflusst. Saugkälber hatten 2 Stunden nach der Fütterung höhere Glucosespiegel als vor der Fütterung. Bereits 14 Tage nach dem Entwöhnen wiesen die Tiere 2 Stunden nach der Futteraufnahme niedrigere Glucosekonzentrationen als vor der Fütterung auf (Quigley und Bernard, 1992).

Reguliert wird die Produktionsrate von Glucose über die Glucosekonzentration selbst, zusätzlich aber auch durch die Verfügbarkeit von Substraten und durch Hormone. Zu diesen Hormonen zählen Insulin, Glucagon, Glucocorticoide, Katecholamine und das Wachstumshormon. Während Insulin die Aufnahme von Glucose in die Zellen bewirkt, wirken die anderen genannten Hormone den Effekten von Insulin entgegen und fördern die

körper eigene Glucoseproduktion auf verschiedenen Wegen (Steinhoff-Wagner und Hammon, 2012).

### 2.2.2.3 $\beta$ -Hydroxybutyrat

Als reduzierte Form von Acetoacetat ist  $\beta$ -Hydroxybutyrat (BHB) der primäre zirkulierende Ketonkörper beim Wiederkäuer (Bergman, 1971). Auch wenn BHB aufgrund der fehlenden Ketongruppe (C=O) streng genommen nicht zu den Ketonen zu zählen ist, wird es dennoch wegen der strukturellen Verwandtschaft zum Aceton als Ketonkörper bezeichnet (Löffler und Petrides, 1998). Bei adulten Rindern entsteht BHB bei der unvollendeten Fettsäureoxidation in der Leber, wenn nur wenig Energie zur Verfügung steht und körpereigenes Fett mobilisiert wird. Beim Kalb sind die Änderungen des BHB-Spiegels im Blut mit der Entwicklung des Pansens assoziiert (Bergman, 1971; Ghorbani et al., 2012). Im Pansenepithel werden kurzkettige Fettsäuren, allen voran Butyrat, zu Acetoacetat und BHB metabolisiert und dann in den Portalkreislauf überführt (Bergman, 1990). Die Fähigkeit des Pansenepithels zur Ketogenese entwickelt sich bereits ab der 4. Lebenswoche und tritt unabhängig vom Einsetzen der ruminalen Fermentation auf (Giesecke et al., 1979; Lane et al., 2000). Baldwin und Jesse (1992) wiesen an isolierten Pansenepithelzellen sogar bereits ab dem 4. Lebenstag eine ketogenetische Kapazität nach.

Die Funktionen der Ketonkörper, die allgegenwärtig im Blut sind und deren Konzentration in Hungerphasen ansteigt, sind vielfältig. So konnte gezeigt werden, dass wenn Ketonkörper als Substrat zur Verfügung stehen, weniger Proteine abgebaut werden müssen, um Glucosevorläufer zur Verfügung zu stellen. Sie können die Lipolyse hemmen und als ein regulatorisches Sicherheitssystem funktionieren, indem sie Insulin ersetzen, wenn die Aktivität dieses Hormons gering ist, wie z.B. bei einer Ketose. Ketonkörper haben in vielen Geweben eine wichtige Rolle als Glucose-ersetzende Energielieferanten, insbesondere wenn Glucose gerade nicht verfügbar ist. Auch sind sie als Signalsubstanzen an der Regulation des Energiemetabolismus beteiligt (Holtenius und Holtenius, 1996; Laffel, 1999).

### 2.2.2.4 Nichtveresterte Fettsäuren

Als Nichtveresterte Fettsäuren (NEFA) verstehen sich die Produkte des Fettgewebeabbaus, die aus der Hydrolyse von Triacylglycerolen (TAG), unter Bildung von Glycerin und Fettsäuren, entstehen und ins Blut abgegeben werden. Im Serum werden sie in Bindung an Albumin transportiert, wohingegen die TAG im Blut als Chylomikronen oder in Lipoproteinen gebunden sind (Löffler und Petrides, 1998; Rukkwamsuk et al., 1999). NEFA können von vielen Geweben direkt als Energiequelle genutzt werden, insbesondere von

peripheren Geweben wie z.B. der Muskulatur (Adewuyi et al., 2005). Überschüssige NEFA werden von der Leber aufgenommen und über unterschiedliche Wege metabolisiert. Sie können vollständig zu Kohlenstoffdioxid oder unvollständig zu Ketonkörpern oxidiert werden. Außerdem können sie zu TAG verestert werden, um im Lebergewebe gespeichert oder als Teil von Lipoproteinen ins Blut abgegeben zu werden. Sammeln sich mehr NEFA im Lebergewebe an als verbraucht werden, steigt die Veresterungsrate zu Gunsten der TAG-Speicherung an. Als Folge kann eine Fettleber entstehen (Rezaeisaber et al., 2013).

Ähnlich wie bei Glucose fällt auch die Konzentration der NEFA mit dem Alter ab. Die Konzentration von zirkulierenden NEFA ist negativ korreliert mit der Aufnahme von festem Futter durch das präruminierende Kalb (Quigley, 1996; Klotz und Heitmann, 2006). Das ist möglicherweise zurückzuführen auf die Umstellung der Nährstoffzusammensetzung im Futter, den Wechsel von einer fettreichen und kohlenhydratarmen auf eine fettarme und kohlenhydratreiche Diät (Klotz und Heitmann, 2006).

Beim adulten Rind sind erhöhte Serumspiegel der NEFA Indikatoren für die negative Energiebilanz (NEB) im postpartalen Zeitraum. Hohe NEFA-Konzentrationen können im Zustand der NEB gemeinsam mit erhöhten Plasmakonzentrationen von BHB und erniedrigten Werten von Plasmaglucoese, Insulin und Insulin-like growth factor-I (IGF-I) sowie Leptin auftreten (Adewuyi et al., 2005).

#### 2.2.2.5 Leptin

Leptin ist ein Peptidhormon, das als Produkt des *ob*-Gens (*obese gene*) Mitte der 90er Jahre vom Molekulargenetiker Jeffrey Friedman entdeckt wurde (Zhang et al., 1994; Halaas et al., 1995). Der Hauptsyntheseort ist das Fettgewebe (Friedman und Halaas, 1998), aber auch in zahlreichen anderen Geweben, wie z.B. der Milchdrüse, wird Leptin gebildet (Chilliard et al., 2001; Smith und Sheffield, 2002). Reguliert wird es durch verschiedene Hormone, unter anderem Somatotropin, Insulin, Corticosteroide und IGF-I (de Vos et al., 1995; Houseknecht et al., 2000; Smith und Sheffield, 2002; Sauerwein et al., 2004).

Eine große Rolle spielt Leptin in der Steuerung der Nahrungsaufnahme und des Energiestoffwechsels. In seiner Funktion als „Adipostat“ erfasst es den Umfang der Körperfettreserven und kommuniziert diese Information an das Regelzentrum, den Hypothalamus. Das Hormon ist umfangreich in die Koordination der metabolischen, endokrinen und verhaltenssteuernden Systeme involviert, die Nahrungsaufnahme und Energiestoffwechsel regulieren (Houseknecht und Portocarrero, 1998). Es vermittelt Sättigungssignale ans Gehirn, hemmt jedoch die Futteraufnahme nicht spontan, sondern reduziert die Aufnahme der Gesamtfuttermenge bei Mäusen (Halaas et al., 1995). Neben den

zentralen Effekten im Gehirn wirkt Leptin auch an zahlreichen peripheren Geweben wie z.B. quergestreifter Muskulatur (Bates et al., 2002), Ovarien (Spicer, 2001),  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Emilsson et al., 1997) und auch direkt auf Fettgewebszellen (Newby et al., 2001). Die Leptinkonzentration im Plasma korreliert positiv mit dem Grad der Verfettung bei Nagetieren, Schweinen und Mensch (Friedman und Halaas, 1998; Houseknecht und Portocarrero, 1998), beim Schaf (Delavaud et al., 2000; Altmann et al., 2005) und beim Rind (Delavaud et al., 2002). Mit zunehmendem Alter und Körpergewicht konnte ein Anstieg der Leptinspiegel bei Schafen beobachtet werden (Recabarren et al., 2002; Narro et al., 2003; Altmann et al., 2005). Bisher ist wenig über die Funktion von Leptin in der frühen postnatalen Phase bekannt. Allerdings scheint es eine Rolle in wichtigen Prozessen, wie z.B. der Entwicklung des Euterparenchyms bei Kühen (Silva et al., 2002) oder der Entwicklung des Dünndarms bei Schweinen zu spielen. Block et al. (2003) konnten zeigen, dass der Plasmaleptinspiegel bei männlichen Milchkälbern in den ersten Lebenswochen durch die Fütterung beeinflusst wird. Kälber, die eine protein- und energiereichere Diät erhielten hatten höhere Leptinspiegel als Kälber mit einem protein- und energieärmeren Futterangebot (Brown et al., 2005b).

### 2.2.2.6 Enzyme der Gluconeogenese

Beim adulten Säugetier sind nur zwei Organe in der Lage Gluconeogenese zu betreiben, die Leber und die Niere (Löffler und Petrides, 1998). Die Gluconeogenese beim gesäugten Wiederkäuer ist vergleichbar mit der monogastrischer Spezies (Leat, 1970). Dennoch finden sich auch hier schon einige Besonderheiten, die die Tiere auf das Leben als Wiederkäuer vorbereiten, wie z.B. eine hohe Gluconeogenesekapazität aus Propionat und eine relativ geringe suppressive Wirkung von Insulin auf die Gluconeogenese (Hostettler-Allen et al., 1994; Donkin und Armentano, 1995). Während beim Monogastrier die *de-novo*-Synthese von Glucose aus Vorläufern wie z.B. Lactat, Glycerin oder Aminosäuren stattfindet (Woerle et al., 2003), dienen beim Wiederkäuer die kurzkettigen Fettsäuren aus der ruminalen Fermentation, allen voran Propionat, als Substrat für die Gluconeogenese (Reynolds et al., 2003; Overton und Waldron, 2004; Larsen und Kristensen, 2009). Da die Produktion und Absorption von Propionat nach der Futteraufnahme am höchsten ist, ist die Gluconeogeneserate beim Wiederkäuer nach der Futteraufnahme bzw. in Phasen mit hoher Energieaufnahme am höchsten. Dies steht im Gegensatz zur Situation bei nicht-ruminierenden Spezies, bei denen Gluconeogenese hauptsächlich im gefasteten Zustand oder in Phasen mit niedriger Energieaufnahme stattfindet (Young, 1977).

Am Vorgang der Gluconeogenese sind spezifische Enzyme beteiligt. Hierzu zählen unter anderem die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und die Pyruvat-Carboxylase (PC)

(Hanson und Garber, 1972). Da aufgrund thermodynamischer Barrieren die Gluconeogenese nicht einfach eine Umkehr der Glycolyse ist (Krebs, 1954), müssen einzelne Reaktionsschritte der Glycolyse bei der Glucoseneubildung umgangen werden. Hierzu gehört der durch die Pyruvatkinase katalysierte Abbau von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat. Die Umkehr dieser Reaktion erfolgt mittels eines zweistufigen Mechanismus, bei dem zunächst durch das Enzym PC Pyruvat zu Oxalacetat carboxyliert wird und anschließend durch PEPCK das vorher gebildete Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat decarboxyliert und gleichzeitig phosphoryliert wird (Hanson und Garber, 1972; Löffler und Petrides, 1998).

Während die PC in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist (Girard et al., 1992; Aschenbach et al., 2010), findet sich die PEPCK sowohl als cytosolische als auch mitochondriale Form (Hanson und Garber, 1972; Girard et al., 1992; Aschenbach et al., 2010). Die quantitative Verteilung der PEPCK auf die Zellkompartimente variiert stark zwischen den Tierarten, beim Rind findet sich eine Verteilung von 50:50 auf Cytosol und Mitochondrien (Hanson und Garber, 1972).

Die PEPCK ist ein Enzym, dessen Aktivität direkt mit der hepatischen Gluconeogenesekapazität korreliert ist (Hanson und Garber, 1972) und beim Wiederkäuer eine hohe Aussagekraft bzgl. der Glucoseproduktion aus Propionat hat (Aschenbach et al., 2010). Beim Rind ist der PEPCK-Genpromotor über Propionat direkt positiv reguliert (Koser et al., 2008). Generell führt eine gesteigerte Propionatverfügbarkeit zum Anstieg der PEPCK, was wiederum im Gegensatz zur Aktivierung beim Monogastrier steht. Bei diesem führt die Futterrestriktion zur transkriptionellen Induktion der PEPCK-Aktivität wohingegen beim Wiederkäuer bei Futterrestriktion keine Veränderungen in der Menge der PEPCK-mRNA zu beobachten sind (Aschenbach et al., 2010).

Bei der adulten Ratte stimulieren Glucagon und Glucocorticoide die Gentranskription der PEPCK (Cimbala et al., 1982; Granner und Pilkis, 1990), während Insulin hemmend wirkt (Granner et al., 1983). Auch beim Wiederkäuer stimulieren Glucagon und Glucocorticoide die hepatische PC- und PEPCK-Aktivität (Kraus-Friedmann, 1984; Pilkis und Granner, 1992; Aschenbach et al., 2010).

Die Aktivität der PC scheint ebenso bei Futterrestriktion anzusteigen. Deshalb ist davon auszugehen, dass die PC eine entscheidende Rolle in der Bereitstellung von Gluconeogenesevorläufern spielt, insbesondere dann, wenn die Futtermittelaufnahme eingeschränkt ist. Die PEPCK-Genexpression wiederum (besonders die der cytosolischen Form) steht in Verbindung mit der Steuerung der Gluconeogenese, wenn die Nahrungszufuhr unbeschränkt ist (Aschenbach et al., 2010). In Untersuchungen von Hammon et al. (2005) an Kälbern

konnte eine altersabhängige Antwort der PEPCK- und PC-Aktivität auf die Gabe von Glucocorticoiden festgestellt werden. Mit zunehmendem Alter nahm die PC-Aktivität ab, während die PEPCK-Aktivität unverändert blieb. Die Gabe von Dexamethason führte im Gegensatz zu anderen Untersuchungen entweder zu keiner Veränderung oder zur Verringerung der Aktivität der limitierenden Gluconeogeneseenzyme. Zu gleichem Ergebnis kam eine ähnliche Studie, bei der die Behandlung mit Dexamethason bis zum Alter von 5 Tagen keine Veränderung in der mRNA-Konzentration von PEPCK, aber eine Erniedrigung der mRNA-Konzentration von PC und eine Verringerung der Aktivität beider Enzyme zur Folge hatte (Hammon et al., 2003). Der fehlende Zusammenhang zwischen mRNA-Konzentration und Aktivität der Enzyme lässt die Autoren vermuten, dass Enzym-Expression und -Aktivität beim sich entwickelnden Kalb unterschiedlich reguliert werden (Hammon et al., 2005).

Auch ein Einfluss der Diät konnte nachgewiesen werden. So hatten gefastete Kälber die Kolostrum anstatt MAT bekommen hatten leicht höhere Messwerte für die hepatische PEPCK, während Aktivität und mRNA-Menge der PC bei den MAT-Kälbern höher waren (Hammon et al., 2003). Lohakare et al. (2012) konnten keinen Zusammenhang zwischen der Fütterung und gluconeogenetischen Enzymen der Leber feststellen, wenn ein Teil der Tiere nur die Hälfte der in der anderen Gruppe gefütterten Kraftfuttermenge bekam. Auch bei Scheuer et al. (2006) hatte die Fütterung keinen Einfluss auf die mRNA-Menge von PC und PEPCK.

### **2.3 Der Begriff der Programmierung**

Die Annahme, dass ein Stimulus im frühen Leben andauernde oder sogar lebenslange Folgen haben kann, ist in der Entwicklungsbiologie bereits etabliert (Lucas et al., 1999). Als *Programmierung* im Allgemeinen bezeichnet Lucas (1991) die Veränderung einer somatischen Struktur oder die (Neu-)Einstellung physiologischer Funktionen als Folge eines generellen Ereignisses innerhalb bestimmter kritischer oder sensitiver Phasen in der frühen Entwicklung des Organismus. Diese kritischen Phasen können sowohl vor der Geburt, also im Mutterleib, auftreten als auch im frühen postnatalen Zeitraum (siehe auch 2.3.2 und 2.3.4). Bereits 1976 beschrieb McCance in Bezug auf das Wachstum eines Lebewesens diese Phasen, in denen sich Gewebe ausdifferenzieren und reifen, als Vorbereitung auf das Überleben nach der Geburt. Die auslösenden bzw. Einfluss nehmenden Faktoren können unterschiedlicher Art sein.

Handelt es sich um einen nutritiven Stimulus so spricht man von *nutritiver Programmierung* (Lucas, 1991, 1998; Patel et al., 2000; Patel und Srinivasan, 2002). Es gibt allerdings auch

umfangreiche Beweise dafür, dass anders geartete Stimuli, außer den ernährungsbedingten, die oben beschriebenen Effekte auslösen können. Als Beispiele können hier hormonelle Einflüsse der fetalen endokrinen Drüsen auf die Entwicklung der Geschlechtsorgane, sensorische Stimuli (z.B. bei der Ausbildung der optischen Leitbahnen) oder Antigene als Trigger für die immunologische Entwicklung genannt werden (Lucas, 1991).

In der Entstehung eines jeden Gewebes definiert eine bestimmte und mitunter komplexe Sequenz von Ereignissen ein Entwicklungsprogramm (*developmental program*), das wiederum einen Entwicklungsverlauf (*developmental trajectory*) für Zellen und Gewebe vorgibt und damit die Ausprägung des Phänotypen bestimmt (Burggren, 1999). Das genetische Potential wird bei der Konzeption festgelegt. Folgt die Entwicklung dem vorgesehenen Verlauf während des embryonalen, fetalen und perinatalen Lebens, so bildet sich ein entsprechender Phänotyp aus. Wird das Entwicklungsprogramm durch bestimmte endogene oder exogene Stimuli beeinflusst, kann als Folge der Entwicklungsverlauf und schlussendlich die phänotypische Ausprägung von der ursprünglich vorgesehenen Form abweichen. In der Literatur wird deshalb dieser Vorgang auch als *epigenetische Programmierung* bezeichnet (Bartol et al., 2008).

Der Begriff *Epigenetik* wurde bereits 1940 durch Waddington definiert. Er beschreibt die Interaktion der Gene mit ihrer Umwelt, was wiederum die Entstehung eines bestimmten Phänotyps zur Folge hat. Dementsprechend werden Faktoren, die wichtige Ereignisse der Genexpression beeinflussen, und zwar mit anhaltenden und potenziell vererbaren Folgen, auch als epigenetische Elemente des Entwicklungsprogramms bezeichnet (Jirtle und Skinner, 2007).

Handelt es sich bei den auslösenden Faktoren um solche mütterlichen Ursprungs, so spricht man von *maternaler Programmierung* (Bartol et al., 2008; Bagnell et al., 2009). Der maternale Einfluss auf die Entwicklung beginnt im Uterus, endet jedoch nicht mit der Geburt, denn die Aufnahme von Muttermilch dehnt den maternalen Einflussbereich bis in die postnatale Phase aus (Bartol et al., 2008; Bagnell et al., 2009). Diese spezielle Form der postnatalen Programmierung wird in Abschnitt 2.3.6 unter dem Begriff „laktokrine Hypothese“ eingehend behandelt.

Übergreifend für die oben beschriebenen Prozesse wird in der Literatur der Begriff der *metabolischen Programmierung* verwendet, der verschiedenste Einflüsse auf den Stoffwechsel eines sich entwickelnden Organismus bezeichnet (Patel et al., 2000; Zhan et al., 2007; Patel et al., 2009; Zambrano et al., 2010). Häufig findet sich aber auch die Bezeichnung *developmental programming* (Armitage et al., 2005; Taylor und Poston, 2007; Zambrano et

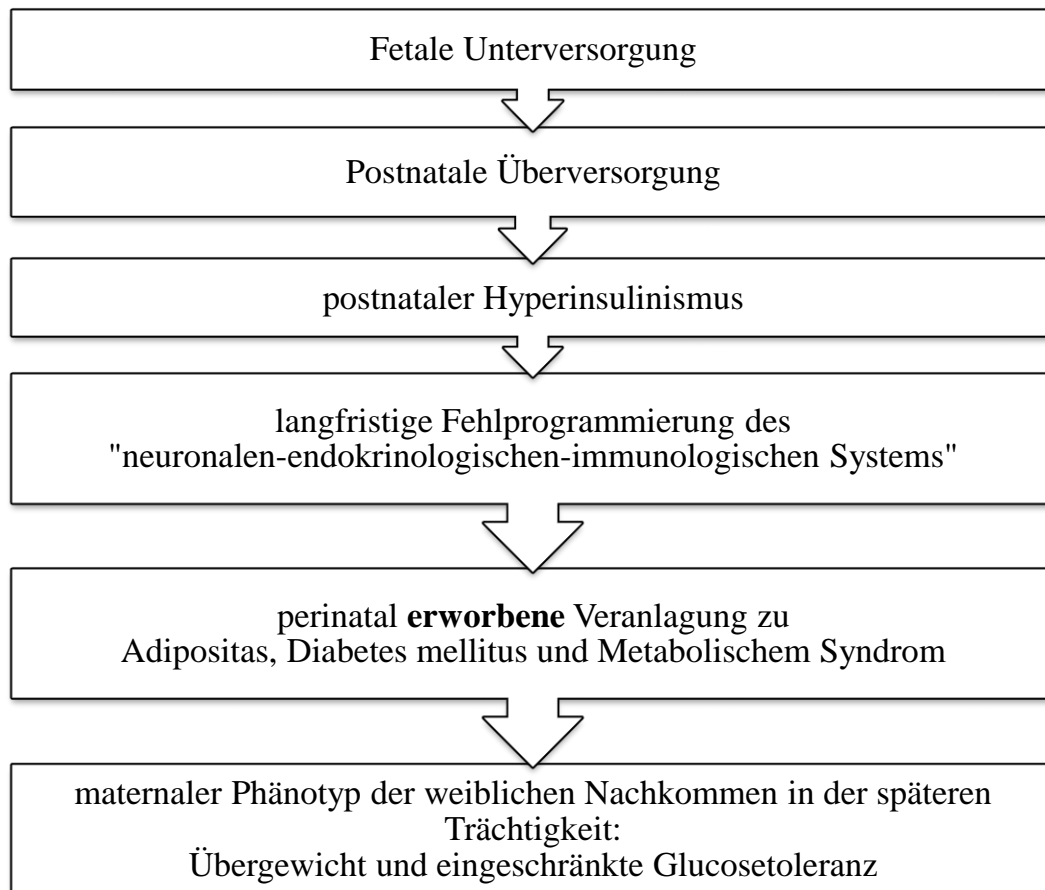
al., 2010; Bartol et al., 2013), die alleine aufgrund der Begrifflichkeit, bezüglich der Auswirkungen auf den Organismus, etwas weiter gefasst ist. Waterland und Garza (1999) wiederum bezeichnen die Vorgänge als *metabolische Prägung (metabolic imprinting)*, was allerdings von Lucas (2000) abgelehnt wird. Er ist der Ansicht, dass *Imprinting* als biologischer Begriff bereits erschöpft und vor allem in der Bedeutung anderweitig belegt ist. Als Beispiele hierfür nennt er das als Prägung bezeichnete Verhalten von neugeborenen Küken, die dem ersten sich bewegenden Objekt folgen wie ihrer Mutter, sowie den feststehenden Begriff der „imprinted genes“, die beide nichts mit der beabsichtigten Bedeutung in unserem Fall zu tun haben. Der Einfachheit halber sollen in dieser Arbeit die verschiedenen Begriffe nicht differenziert, sondern eher übergreifend im Sinne der Programmierung als solches eingesetzt werden.

### **2.3.1 Hintergrund**

Die Erkenntnis, dass die Entwicklung eines neuen Organismus Störungen bzw. Veränderungen durch äußere Einflüsse unterliegt, ist keine neue. Bereits 1979 stellten Freinkel und Metzger fest, dass die Ernährung der Mutter und die daran gekoppelten Stoffwechselfade, den metabolischen Status des Fetus beeinflussen. Sie verglichen die Schwangerschaft mit einer Zellkultur, in der sich der Embryo aus einer befruchteten Eizelle zu einer multizellulären Struktur mit komplexen Funktionen entwickelt. In dieser abstrakten Form der Zellkultur wird die Zusammensetzung des Nährmediums durch die Nahrung der Mutter bestimmt. Die in Entwicklung befindlichen Gewebe wiederum können stark durch dieses Nährmedium beeinflusst werden (Freinkel und Metzger, 1979).

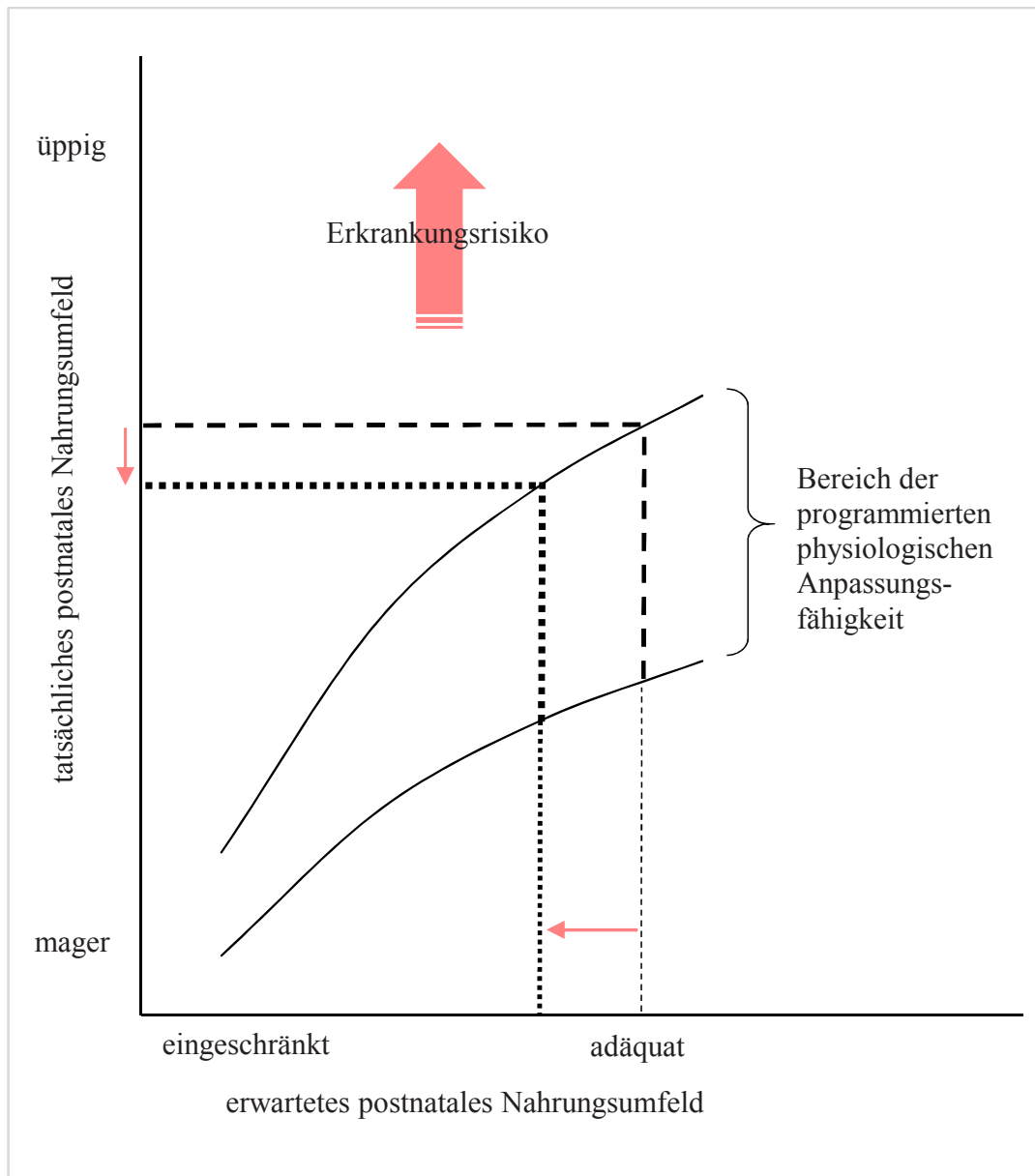
Im Jahr 1988 wurde erstmals über den Zusammenhang zwischen Geburtsgewicht und langfristigem Erkrankungsrisiko berichtet (Barker und Osmond, 1988; Barker et al., 1989). In den 90er Jahren entstanden weitere wichtige epidemiologische Studien auf diesem Gebiet in der Arbeitsgruppe um David Barker. Sie zeigten, dass ein geringes Geburtsgewicht die Neigung zu Krankheiten wie Fettleibigkeit, Typ-2-Diabetes, Bluthochdruck oder koronarer Herzleiden im Erwachsenenalter erhöhen kann (Barker et al., 1993). Diese wichtigen grundlegenden Erkenntnisse führten zur „*fetal origins hypothesis*“, deren initiales Modell später verfeinert und als „*thrifty phenotype hypothesis*“ bezeichnet wurde. Sie besagt, dass eine mangelhafte Ernährung in der fetalen und auch in der frühkindlichen Phase eine Veränderung in der Struktur und Funktion bestimmter Organe nach sich zieht. Dies wiederum hat eine Prädisposition für bestimmte Krankheiten zur Folge. Etabliert wurde diese Hypothese am Beispiel des Diabetes Typ 2 (nicht-insulinabhängig). Die prä- und postnatale

Unterernährung beeinflusst langfristig die Entwicklung und Funktion der pankreatischen  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln negativ und schafft damit die Grundlage für die Ausbildung eines Diabetes Typ 2 im Erwachsenenalter (Hales und Barker, 1992). So gesehen ist diese bleibende Veränderung in Organstruktur und -funktion eine Adaptation an die mangelhafte intrauterine Versorgung, die dafür sorgt, dass die ohnehin begrenzte Nährstoffzufuhr optimal genutzt werden kann und damit das Überleben gesichert wird (Holness et al., 2000). Besonders kritisch ist es, wenn dem pränatal auf ein karges Nährstoffangebot programmierten Organismus nach der Geburt über die Maßen Nahrung zugeführt wird. Diese Diskrepanz zwischen der intrauterinen und neonatalen Nährstoffzufuhr könnte wesentlich zum Erkrankungsrisiko beitragen. Plagemann (2004) benannte dieses Konzept als *funktionale Teratogenese* (siehe Abbildung 2) und rückte damit auch begrifflich den schadhaften Aspekt der Programmierung in den Vordergrund.



**Abbildung 2:** Konzept der funktionellen Teratogenese und der maternal-fetalen Übertragung der Neigung zu Adipositas, Diabetes und metabolischem Syndrom. Letzter Schritt ist die epigenetische Übertragung an nachfolgende Generationen (modifiziert nach Plagemann (2004)).

Ähnlich erklären auch Gluckman und Hanson (2004) das Prinzip der Programmierung und beleuchten dabei die entwicklungsgeschichtliche Seite. Die Programmierung ist eine Antwort auf Umwelteinflüsse, die nicht auf den unmittelbaren Vorteil für den Organismus zielt, sondern in Erwartung eines zukünftigen Umfeldes gemacht wird. Die Vorhersage, die vom Organismus für die Zukunft getroffen wird, kann zutreffend sein, dann bedeutet das einen langfristigen Vorteil für das Lebewesen. Trifft sie allerdings nicht zu und liegen die Umweltbedingungen außerhalb eines bestimmten Anpassungsbereichs, so erhöht sich das Erkrankungsrisiko (siehe Abbildung 3). Damit erweitern die Autoren die „*thrifty phenotype hypothesis*“, die sich explizit auf die Erwartung eines ärmlichen Umfelds aufgrund der nutritiven und hormonellen Reize der Mutter bezieht. Denn die Hypothese der „*predictive adaptive responses*“ schließt die gesamte Spanne der möglichen Umweltsituationen ein. Die vorausschauend adaptiven Antworten des Organismus ermöglichen der Spezies unter suboptimalen Umweltbedingungen zu überleben und zu reproduzieren.



**Abbildung 3:** Effekt der "*predictive adaptive responses*".

Die x-Achse stellt das Umfeld dar, das der Fetus nach der Geburt erwartet, bestimmt durch Signale, die er von der Mutter über die Plazenta erhält (z.B. nutritiv). Die y-Achse steht für das postnatal tatsächlich vorgefundene Umfeld. Die Spanne zwischen den beiden Kurven repräsentiert den Bereich, auf den der Organismus des Fetus im Uterus angepasst wurde. Die gestrichelte Linie zeigt einen optimal wachsenden Fetus, der ein höheres Ernährungsniveau nach der Geburt erhält. Er bleibt gesund. Die gepunktete Linie zeigt denselben Fetus, allerdings wächst dieser unter restriktiven Verhältnissen im Mutterleib heran. Dieser erwartet ein schlechteres Nahrungsangebot *post-natum*. Daraus resultiert eine herabgesetzte Obergrenze für das Nahrungsangebot, an das der Organismus sich ohne gesundheitliche Probleme anpassen kann. Das Erkrankungsrisiko ist dementsprechend bei üppigem Angebot erhöht (modifiziert nach Gluckman und Hanson (2004))

### 2.3.3 Intrauterine Programmierung

Die anfänglich durchgeführten retrospektiven Studien an Menschen zeigten, dass eine Verbindung besteht zwischen einem geringen Geburtsgewicht und dem Auftreten diverser Krankheiten im Erwachsenenalter, wie z.B. Diabetes Typ 2, koronare Herzerkrankungen und Bluthochdruck (Hales und Barker, 1992; Barker et al., 1993; Ozanne et al., 2005). In einer dänischen Studie mit Zwillingspaaren konnte gezeigt werden, dass Zwillinge mit gestörter Glucosetoleranz ein signifikant geringeres Geburtsgewicht hatten als ihre Zwillingspartner mit normaler Glucosetoleranz. Da diese Beobachtung bei eineiigen Zwillingspaaren unabhängig vom Genotyp sein muss, folgerte man, dass eine intrauterine Malnutrition die Ursache sein könnte (Poulsen et al., 1998). Weiterhin zeigte eine Studie über den holländischen Hungerwinter im Jahr 1944/45, dass die maternale Unterernährung, insbesondere im letzten Trimester der Schwangerschaft, in einer Wachstumsverzögerung des Fetus resultiert und mit einer verringerten Glucosetoleranz und mit Insulinresistenz im späteren Leben verknüpft ist (Ravelli et al., 1998). Um die zugrundeliegenden Mechanismen der fetalen Wachstumsrestriktion zu verstehen, wurden verschiedene Tiermodelle entwickelt. Eine Übersicht hierzu liefert ein Artikel von Ozanne (2001), in dem zum einen nutritive Modelle aber auch solche mit hormonellen oder operativen Eingriffen dargestellt werden. Eines der am besten untersuchten Tiermodelle ist das der maternalen Proteinrestriktion. Während der gesamten Trächtigkeit wurden Ratten mit einer „*low protein*“ Diät gefüttert (80 g Protein/kg). Die Nachkommen dieser Tiere hatten ein um ca. 35 % geringeres Geburtsgewicht im Vergleich zu Nachkommen von adäquat gefütterten Muttertieren (200 g Protein/kg) (Desai et al., 1996). Damit wurde gezeigt, dass die Nahrungszufuhr des maternalen Organismus das Wachstum des Fetus und seiner Organe beeinflusst. Als Erklärung hierfür könnte der nachteilige Einfluss der Proteinrestriktion auf die Funktion der Plazenta stehen. Rosso (1975) sowie Young und Widdowson (1975) stellten fest, dass bei proteinreduziert gefütterten Ratten bzw. Meerschweinchen ein veränderter plazentarer Transfer von Nährstoffen zum Fetus stattfindet, der Ursache für die Wachstumsretardierung sein kann. Ähnliche Beobachtungen machten auch Wunderlich et al. (1979). Tragende Ratten, die eine proteinarme Diät bekamen, wiesen eine Reduktion der plazentaren Proteinsynthese inklusive einer verringerten Ausschüttung von chorionalem Mammothropin (rat chorionic mammothropin, rCM) infolge reduzierter Ribosomenzahl auf. Die verminderte Aktivität dieses Hormons könnte eine inadäquate maternale Nährstoffzufuhr zum Fetus zur Folge haben, was zur Wachstumsretardierung beitragen kann. Um zu klären, was die mangelnde Nährstoffzufuhr kurz-, mittel- und langfristig im Fetus bewirkt, wurden weitere Studien

durchgeführt. Desai et al. (1996) dokumentierten in ihren Untersuchungen nicht nur das Geburtsgewicht der Jungtiere sondern auch Veränderungen im Organwachstum. Hierbei stellte man fest, dass Ratten, deren Mütter vor der Geburt proteinreduziert gefüttert wurden, im Alter von 21 Tagen niedrigere Organgewichte von Muskulatur und Leber hatten als eine adäquat gefütterte Kontrollgruppe. Auch im Alter von 11 Monaten hatten diese Tiere noch eine geringere Muskelmasse, obwohl sie nach der Geburt von normal gefütterten Muttertieren gesäugt wurden und auch nach dem Entwöhnen entsprechend ihres Bedarfs gefüttert wurden. Auch in neueren Untersuchungen an Schweinen konnte gezeigt werden, dass eine inadäquate Proteinversorgung der Muttertiere während der Trächtigkeit, sowohl durch Proteinunterversorgung als auch starke Proteinübersversorgung, zu geringeren Geburtsgewichten bei den Ferkeln führte. Zusätzlich hatte die Proteinrestriktion während der Trächtigkeit einen negativen Einfluss auf die fetale Myogenese der Nachkommen, die persistierende Defizite im Muskelwachstumspotential aufwiesen. Außerdem neigten die Ferkel der proteinarm gefütterten Muttertiere zur Verfettung (Rehfeldt et al., 2012a). Langfristig konnten die Tiere zwar das anfänglich rückständige Gewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe (adäquate Proteinversorgung der Sau während der Trächtigkeit) aufholen, die geringere Anzahl an Muskelfasern resultierte jedoch im schlachtfähigen Alter in einer geringeren Muskelmasse und in reduzierter Herzmuskelmasse (Rehfeldt et al., 2012b).

Nicht nur eine Proteinrestriktion sondern auch die generelle Veränderung der Nährstoffzufuhr beeinflusst den Fetus. Im Tiermodell kann diese Situation durch einen medikamentell induzierten Diabetes in der Trächtigkeit, durch eine verringertes Nahrungsangebot oder operativ durch die Ligatur der *Ateria uterina* erfolgen (Ozanne, 2001; Holemans et al., 2003). Intrauterin wachstumsretardierte Rattenwelpen zeigten während der Säugeperiode ein sogenanntes „*Catch-up*“-Wachstum. Sie holten im Vergleich zu den Kontrolltieren das Gewicht auf und wurden mit sechs Monaten sogar um 29% schwerer (Simmons et al., 2001). Allerdings zeigten sie als Adulte im Vergleich zu Kontrolltieren den größten Fettansatz und neigten zu Adipositas (Simmons et al., 2001; Vickers et al., 2003; Desai et al., 2005).

Es entstanden also nachweislich langfristige Effekte durch die intrauterine Programmierung, wie man sie auch schon in den epidemiologischen Studien am Menschen beobachtet hatte.

Betroffen sind von diesen langfristigen Veränderungen nicht nur Organe wie Muskulatur, Fettgewebe, Leber und Pankreas (Hales und Barker, 1992; Desai et al., 1996; Holness et al., 2000). Neueste Untersuchungen zeigen, dass Nachkommen unterernährter Muttertiere ein verändertes Reproduktionspotential aufweisen, das sich durch eine Veränderung im hormonellen Regelkreis der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse erklären lässt. So

wiesen Rattenwelpen von mangelernährten Muttertieren (LBW) erhöhte Testosteron- und Gonadotropinspiegel sowie erniedrigte Estradiolspiegel im Blut auf. Ab einem Alter von 8 Monaten zeigte die Mehrzahl der LBW-Tiere eine Störung des Östruszyklus, die sich bei den meisten der Tiere als persistierender Östrus manifestierte (Khorram et al., 2015).

Auch beim Wiederkäuer konnten Einflüsse der Nährstoffversorgung im fetalen Zeitraum beobachtet werden. Wurden Schafe während des ersten oder letzten Trächtigkeitdrittels mit der Hälfte der metabolisierbaren Energie (ME) im Vergleich zu Tieren, die bedarfsgerecht gefüttert wurden, versorgt, so zeigte ein intravenöser Glucosetoleranztest im Alter von elf Monaten eine verringerte Glucosetoleranz sowie eine Insulinresistenz bei den Lämmern, die in der späten Trächtigkeit unterernährt waren. Auch die verminderte GLUT-4-Expression bei diesen Lämmern und eine erhöhte Expression der p110 $\beta$ -Einheit des Insulinrezeptors im perirenal Fettgewebe wiesen auf eine geringere Glucosetoleranz hin. Im Unterschied zu den oben genannten Studien konnten hier jedoch keine Differenzen bei Geburtsgewicht und Wachstumsraten zwischen den Gruppen festgestellt werden (Gardner et al., 2005). In einem ähnlichen Versuchsansatz von Husted et al. (2007) kamen die pränatal unterernährten Lämmer (LOW) mit geringerem Geburtsgewicht als eine Kontrollgruppe zur Welt. Diese Beobachtung wurde in der oben genannten Studie von Gardner et al. (2005) nicht gemacht, obwohl in beiden Fällen die Futterrestriktion im letzten Trächtigkeitdrittels stattfand. Allerdings wurden in einem Fall ausschließlich Zwillingsgeburten (Husted et al., 2007), im anderen nur einzeln geborene Lämmer (Gardner et al., 2005) untersucht. Im Verhältnis erhielten die Mütter der Einzel geborenen auch mehr Energie/Tag als die Zwillingsmütter, so dass der Effekt bei den Zwillingslämmern möglicherweise gravierender ausfiel, da sie insgesamt schlechter versorgt waren. Husted et al. (2007) konnten kein Einfluss der Energierestriktion in den letzten 6 Wochen der Trächtigkeit auf die Glucosetoleranz von 10 bzw. 19 Wochen alten Jungtieren nachweisen. Die LOW-Lämmer sezernierten jedoch mit 19 Wochen weniger Insulin als die Lämmer von ausgefütterten Muttertieren (NORM) wenn sie durch intravenöse Glucosegabe stimuliert wurden. Die Autoren folgerten, dass sich die Programmierungseffekte der intrauterinen Mangelernährung erst im höheren Alter manifestiert hatten. Die fehlende Kapazität der Insulinsekretion auf einen Glucosestimulus hin (pankreatische Insulinresistenz) schienen die LOW-Lämmer durch eine erhöhte Insulinsensitivität des peripheren Gewebes, die laut den Autoren durch erhöhte Expression des Insulinrezeptors und veränderte Expression sowie Funktion des GLUT-4-Transporters bedingt ist, zu kompensieren. Diese Beobachtungen stehen zum Teil im Gegensatz zu denen von Gardner et al. (2005), allerdings unterschieden sich die Studien auch in der Art und Dauer

der Fütterung und dem Alter der Nachkommen zum Zeitpunkt der Testdurchführung. Da sowohl das Alter der Tiere, als auch die Abstammung bei den Ergebnissen des Glucosetoleranztests eine Rolle zu spielen scheint (Husted et al., 2007) und auch der physiologische Status der Tiere die Ergebnisse beeinflussen kann (de Koster et al., 2017), ist ein direkter Vergleich dieser Studien nicht möglich. Dennoch konnte in beiden Fällen gezeigt werden, dass die Fütterung der Muttertiere durchaus einen Effekt auf den Stoffwechsel der Nachkommen hatte.

#### **2.3.4 Postnatale Programmierung**

Die Grenzen zwischen prä- und postnataler Programmierung verschmelzen in Abhängigkeit der verschiedenen Säugetierspezies miteinander. Die Nachkommen unterschiedlicher Arten werden mit unterschiedlichen Reifegraden geboren (vgl. Nestflüchter und Nesthocker). Dadurch verschieben sich die kritischen Phasen der Entwicklung möglicherweise zeitlich vor bzw. nach die Geburt. So hat ein reifes neugeborenes Kind einen deutlich weiter fortgeschrittenen Entwicklungsstatus als ein Ferkel, während ein Fohlen oder Meerschweinchenjunges noch deutlich weiter entwickelt sind. Dahingegen ist selbst ein frühgeborenes Kind weiter entwickelt als ein Rattenwelp, der nach einer normalen Trächtigkeitsdauer geboren wird. Gerade deshalb aber ist die Ratte ein kostbares Modell für entwicklungsphysiologische Fragestellungen. Denn Versuche, die z.B. am Menschen nur vor der Geburt durchgeführt werden könnten, was aufwändig und durchaus unethisch wäre, können bei reif geborenen Rattenwelpen auch nach der Geburt durchgeführt werden (Widdowson und McCance, 1975). Und dennoch sind auch die nestflüchtigen Spezies und auch Menschen anfällig für Programmierungsreize während der Säugeperiode (Armitage et al., 2005).

Die kritischen Zeitfenster dehnen sich also bis in die unmittelbare postnatale Phase aus, wenn einzelne regulatorische Mechanismen ihren Reifungsprozess nach der Geburt fortsetzen. Nachgewiesen wurde dies bei Nagern z.B. für die Entwicklung der Langerhans'schen Inseln und des hypothalamischen Neuropeptid Y-Systems, einem wichtigen regulatorischen Bestandteil der Steuerung von Hunger und Magen-Darm-Motilität (Kaung, 1994; Grove et al., 2003). Finden wichtige Entwicklungsphasen auch nach der Geburt statt, ist davon auszugehen, dass ein veränderter nutritiver Stimulus in der unmittelbaren postnatalen Phase eine Programmierung während dieser kritischen Entwicklungsstufe induzieren kann (Patel et al., 2009). Eine Übersicht über die Effekte der metabolischen Programmierung bei Rattenwelpen durch veränderte postnatale Nahrungssituationen liefert Tabelle 1.

Eine geeignete Maßnahme um die Nahrungssituation bei neugeborenen Ratten zu verändern war, die Wurfgröße zu verringern und damit eine erhöhte Milchaufnahme pro Welpen zu ermöglichen (*small-sized litter rat model*). Diese Tiere wiesen lebenslang einen überdurchschnittlichen Wachstumsverlauf auf (McCance, 1962). Weiterhin resultierte die Überernährung während der Säugeperiode bei Rattenwelpen in Hyperinsulinämie, Hyperleptinämie, Hyperphagie und Obesitas (Plagemann, 2006a; Plagemann, 2006b). Boullou-Ciocca et al. (2005) zeigten zudem, dass die postnatale Überernährung die Ausreifung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) forcierte und zu einer permanenten Hochregulierung der HPA-Achse sowie einer erhöhten Glukokortikoid-Sensitivität des Fettgewebes führte. Die untersuchten Tiere hatten außerdem moderates Übergewicht und metabolische Störungen, die den beim metabolischen Syndrom auftretenden vergleichbar sind.

Interessant ist, dass schon vor 40 Jahren Oscai und McGarr (1978) erkannten, dass ein stufenweises Vergrößern der Wurfgröße von 4 auf 13, 17 bzw. 22 Jungtiere zu einer entsprechenden Reduktion der Futteraufnahme, auch nach dem Entwöhnen, bis zum Alter von 11 Wochen führte. Der Vergleich von Tieren, die in Würfen mit 4 bzw. 22 Jungtieren gesäugt wurden zeigte zudem, dass nach 62 Wochen die Tiere aus den 4er-Würfen um 140 g leichter waren, als die Tiere aus den 22er-Würfen, obwohl alle Tiere nach dem Entwöhnen freien Zugang zum Futter hatten. Ein Grund für die niedrigeren Gewichte war die geringere freiwillige Futteraufnahme. So schien also die Menge der in der Säugeperiode aufgenommenen Nahrung auch die Futteraufnahmegewohnheiten zu beeinflussen, sowohl in die eine, als auch in die andere Richtung (Oscai und McGarr, 1978).

Nicht nur die Überfütterung, sondern auch eine Unterernährung in der postnatalen Phase kann folglich in kritischen Zeitfenstern der Entwicklung Einfluss nehmen. Unterernährung wird, wie oben beschrieben, experimentell durch Vergrößern der Wurfgröße erreicht. Auch eine indirekte Futterrestriktion ist möglich. So zeigten Ratten, die prä- und postnatal einem Mangelangebot aufgrund einer proteinreduzierten Diät der tragenden und säugenden Muttertiere ausgesetzt waren, lebenslanges Untergewicht begleitet von eher erniedrigten Insulin- und Leptinspiegeln sowie niedrigerem stimuliertem Glucosespiegel und verringertem Blutdruck (Plagemann, 2006a). Auch eine fettangereicherte Diät der säugenden Ratten schien langfristige Effekte hervorzurufen. Adulte Nachkommen von Ratten, die während der Säugeperiode mit höherem Fettgehalt gefüttert wurden, litten an erhöhtem Blutdruck, beeinträchtigter Endothelfunktion und abnormaler Glucosehomöostase (Khan et al., 2005).

Ein weiteres Modell, um Zusammenhänge zwischen der Futteraufnahme im unmittelbar postnatalen Zeitraum und deren Effekte auf die Entwicklung zu untersuchen ist das *High-carbohydrate* (HC)-Ratten-Modell das auch als „*Pup in a cup*“ Modell bezeichnet wird. Vier Tage alte Rattenwelpen wurden mittels Magensonde bis zum 24. Lebenstag künstlich ernährt. Eine Gruppe (C-Ratten) erhielt einen der Rattenmilch vergleichbar zusammengesetzten Milchersatz (8 % Kohlenhydrate, 24% Protein und 68% Fett). Sie diente neben einer von den eigenen Müttern gesäugten Gruppe als Kontrollgruppe. Die HC-Ratten erhielten eine isoenergetische kohlenhydratreiche Formuladiät (56% Kohlenhydrate, 24% Protein und 20% Fett) (Hiremagalur et al., 1993; Patel und Srinivasan, 2002) Bereits innerhalb der ersten 24 Stunden konnte bei den HC-Ratten ein Anstieg des Insulinspiegels auf bis zu 6-fach höhere Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden (Haney et al., 1986). Diese unmittelbar auftretende Hyperinsulinämie blieb bis ins Erwachsenenalter bestehen, obwohl alle Tiere mit 24 Tagen auf die reguläre Labordiät entwöhnt wurden (Hiremagalur et al., 1993). Obwohl die Plasmainsulinspiegel bei 12 Tage alten HC-Ratten deutlich erhöht waren, waren ihre Plasmaglucoosespiegel im physiologischen Bereich (Srinivasan et al., 2008b). Diese Beobachtungen haben wichtige Konsequenzen für die spätere Entstehung der Obesitas, die bei den HC-Ratten mit einem zunehmenden Körpergewicht ab dem 55. Lebenstag beginnt und am 100. Tag voll entwickelt ist (Hiremagalur et al., 1993). Abweichungen in Insulin- und Leptinspiegel während früher Lebensphasen wurden als Ursache für permanente Veränderungen in den appetitregulierenden Zentren des Hypothalamus vermutet (Bouret und Simerly, 2004; Plagemann, 2005). Untersuchungen an heranwachsenden, frühgeborenen Kindern im Alter von 13 bis 16 Jahren haben gezeigt, dass das Verhältnis zwischen Leptin und Fettmasse bei den Probanden signifikant höher ist, die nach der Geburt einen angereicherten Muttermilchersatz für Frühgeborene erhalten hatten, als bei den mit Standardmilchersatz bzw. Muttermilch gefütterten. Hohe Leptinkonzentrationen im Verhältnis zur Fettmasse sind wiederum mit Fettleibigkeit verknüpft. Zu bemerken ist die Feststellung, dass die Menge der aufgenommenen Muttermilch negativ mit dem Leptin-Fettmasse-Verhältnis korrelierte. Je mehr Muttermilch die Kinder aufnahmen, desto geringer war das Verhältnis von Leptin zu Fettmasse (Singhal et al., 2002).

HC- und C-Ratten wurden im Alter von 12 Tagen Pankreas-Inselzellen entnommen und für weitere Versuche isoliert. Es wurden Unterschiede zwischen den Gruppen sowohl auf zellulärer als auch auf biochemischer und molekularer Ebene festgestellt. Auf zellulärer Ebene konnte bei den HC-Ratten eine Verringerung der mittleren Inselgröße einhergehend mit einer erhöhten Anzahl der Inseln festgestellt werden. Der Bereich, in dem  $\beta$ -Zellen

vorkamen, war ebenfalls vergrößert. Die Veränderungen auf biochemischer Ebene umfassten eine erhöhte Insulinsekretion nach Glucose-Stimulation sowie eine gesteigerte Aktivität der Hexokinase und weiterer Schlüsselenzyme des Glucosemetabolismus. Die vermehrte Insulinsekretion ließ sich zum einen auf eine erhöhte Sensitivität der  $\beta$ -Zellen auf einen Glucosestimulus, zum anderen auf eine erhöhte Insulinsynthese und gesteigerte Expression von Präproinsulin-Genen zurückführen. Damit wäre auch die molekulare Ebene beschrieben (Srinivasan et al., 2003; Patel et al., 2009).

Zusätzlich zu den Effekten im Pankreas konnten Abweichungen der appetitregulierenden Mechanismen des Hypothalamus nachgewiesen werden. So wurde im Hypothalamus von 12 Tage alten HC-Ratten eine Erhöhung der mRNA von orexigenen Neuropeptiden und zeitgleich eine Verringerung der mRNA von anorexigenen Neuropeptiden gemessen. Die Veränderungen blieben bis zu einem Alter von 100 Tagen bestehen (Srinivasan et al., 2008b). Weiterhin konnten in Untersuchungen auch Einflüsse auf den Leberstoffwechsel dargelegt werden. Bei HC-Ratten war bis ins Erwachsenenalter die Kapazität der hepatischen Lipogenese signifikant erhöht, was sich durch eine gesteigerte Aktivität lipogenetischer Enzyme äußerte (Hiremagalur et al., 1992; 1993).

Das HC-Ratten-Modell zeigt, dass auch Abweichungen in der Qualität der Nahrungszufuhr, ohne die totale Energiezufuhr zu verändern, als Umweltreiz für Programmierungseffekte dienen können. Diese können nachteilige Langzeitfolgen haben, wie z.B. chronische Hyperinsulinämie und Adipositas (Srinivasan und Patel, 2008; Patel et al., 2009).

Besonders zu erwähnen ist, dass beim HC-Rattenmodell ein Generationeneffekt zu beobachten war. Die Nachzucht von HC-Ratten bildete spontan den HC-Phänotyp aus, der durch chronische Hyperinsulinämie und Adipositas gekennzeichnet ist, ohne dass diese Tiere jemals eine diätetische Modifikation erfahren hätten (Vadlamudi et al., 1995). Dieser generationenübergreifende Effekt ist zurückzuführen auf die fetale Entwicklung in einem eher ungünstigen intrauterinen Umfeld, wie es bei den adipösen tragenden HC-Ratten zu finden ist (Srinivasan et al., 2008a).

**Tabelle 1:** Zusammenfassung der Effekte der metabolischen Programmierung induziert durch ein verändertes nutritives Umfeld im unmittelbaren postnatalen Zeitraum bei Ratten, <sup>1</sup>HC = high-carbohydrate, (modifiziert nach Patel et al., 2009)

**A. Unterernährung**

- lebenslang reduzierte Gewichtszunahmen
- verringerte Nüchtern-Insulinspiegel
- reduzierter sekretorischer Insulin-Response auf Glucosestimulus

**B. Überernährung** (*small-sized litter rat model*)

- Erhöhte Gewichtszunahme beginnend mit der Säugeperiode, begleitet von Hyperphagie. Lebenslang erhöhte Insulin- und Leptin-Plasmaspiegel
- Gesteigerter sekretorischer Insulin-Response von isolierten Inselzellen auf einen Glucosestimulus
- Veränderte Reaktionen von Hirnschnitten auf verschiedene Stimuli, z.B. Insulin, Leptin und diverse Neuropeptide

**C. Das HC<sup>1</sup>-Ratten-Modell**

- unmittelbare Effekte („*pre-weaning*“ Phase)
  - Veränderungen in den pankreatischen Inselzellen
  - Veränderungen im Hypothalamus
  - Veränderungen an anderen Organen, z.B. Leber
- Persistierende Effekte („*post-weaning*“ Phase)
  - Veränderungen in den pankreatischen Inselzellen
  - Veränderungen im Hypothalamus
  - Veränderungen an anderen Organen, z.B. Leber, Adipozyten
- Generationeneffekte
  - Spontane Transmission des HC-Phänotyps auf die Nachkommen
  - Effekte der metabolischen Programmierung während der Fetalentwicklung initiiert

### 2.3.5 Postnatale Programmierung beim Wiederkäuer

Das Vorhandensein von Programmierungseffekten, insbesondere durch nutritive Stimuli, wurde beim Wiederkäuer in den letzten Jahrzehnten intensiv diskutiert. Spätestens seit Studien an Milchkühen zeigten, dass die Fütterung größerer Mengen an Milchaustauscher (MAT) oder Vollmilch in den ersten Aufzuchtwochen zu höheren Milchleistungen in der

ersten Laktation führte, verglichen mit der bis dahin üblichen restriktiven Kälberfütterung, ist das Interesse an dieser Thematik geweckt (Shamay et al., 2005; Moallem et al., 2010; Soberon und van Amburgh, 2013).

Dass der metabolische Status von Rindern durch die Fütterung zu beeinflussen ist, konnte bereits bei Kälbern nachgewiesen werden. Intensiv gefütterte Mastkälber entwickelten Hyperinsulinämie, Hyperglycämie und Insulinresistenz (Hostettler-Allen et al., 1994; Hugi et al., 1998). Allerdings ließen diese Studien keinen Rückschluss auf eine eventuelle Programmierung in einer dafür sensiblen postnatalen Phase zu, da die intensive Fütterung erst im Alter von 4 bis 6 Wochen startete.

Kälber, die in den ersten 8 Lebenswochen eine erhöhte Protein- und Energiezufuhr (H) erhielten, hatten danach die 3-fache Masse an Milchdrüsenparenchym im Vergleich zu protein- und energieärmer (M) gefütterten Kälbern. Auch nach 14 Wochen konnte bei den H-Tieren um 50% mehr Parenchym nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob die Tiere ab einem Alter von 8 Wochen eine protein- und energiereiche oder –arme Fütterung erhielten. Zu diesem Zeitpunkt konnte bei den H-Kälbern auch eine größere Menge an parenchymaler DNA und RNA nachgewiesen werden (Brown et al., 2005a).

Aktuelle Untersuchungen von Geiger et al. (2016) unterstützen die oben dargestellten Resultate zur Entwicklung der Milchdrüse. Kälber, die in den ersten 8 Lebenswochen mit größeren Mengen eines protein- und fettreichen MAT getränkt wurden, erreichten höhere Tageszunahmen und wiesen höhere Organmassen von Leber, Milz, Thymus und Milchdrüse auf, als Kälber die mit einer geringeren Menge eines protein- und fettärmeren MAT getränkt wurden. Bisher ging man davon aus, dass hohe Wachstumsraten bei Jungtieren die Entwicklung der Milchdrüse nachteilig beeinflussten (Sejrsen et al., 1982; Foldager und Sejrsen, 1991; Capuco et al., 1995). Durch eine hohe Wachstumsintensität verursachte negative Effekte auf die Organentwicklung und auf die spätere Milchleistung machen sich allerdings erst ab einem Alter von ca. 3 Monaten bemerkbar, nämlich dann, wenn die Phase des allometrischen Milchdrüsenwachstums beginnt. Hohe Wachstumsraten während der Phase des isometrischen Wachstums in den ersten 3 Monaten nach der Geburt scheinen die Entwicklung der Milchdrüse nicht negativ zu beeinflussen (Sejrsen et al., 1998; Moallem et al., 2010), sondern ganz im Gegenteil einen positiven Einfluss zu haben (Brown et al., 2005a; Geiger et al., 2016). Vor diesem Hintergrund ist davon auszugehen, dass die kritischen Zeitfenster für Programmierungseffekte zwischen den Organen variieren können, da sich die Organe auch in ihrem Wachstumsverlauf, sowohl vor, als auch nach der Geburt, unterscheiden (Fiebig, 1991).

Neben dem Einfluss auf die Milchdrüse und andere Organe, kann die neonatale Ernährung auch die endokrine Regulation des Stoffwechsels beeinflussen. Wie bereits in Versuchen mit Ratten gezeigt wurde, können nutritive Einflüsse in der unmittelbar postnatalen Phase den Insulinstoffwechsel nachhaltig beeinflussen (Srinivasan et al., 2003; siehe auch 2.3.4).

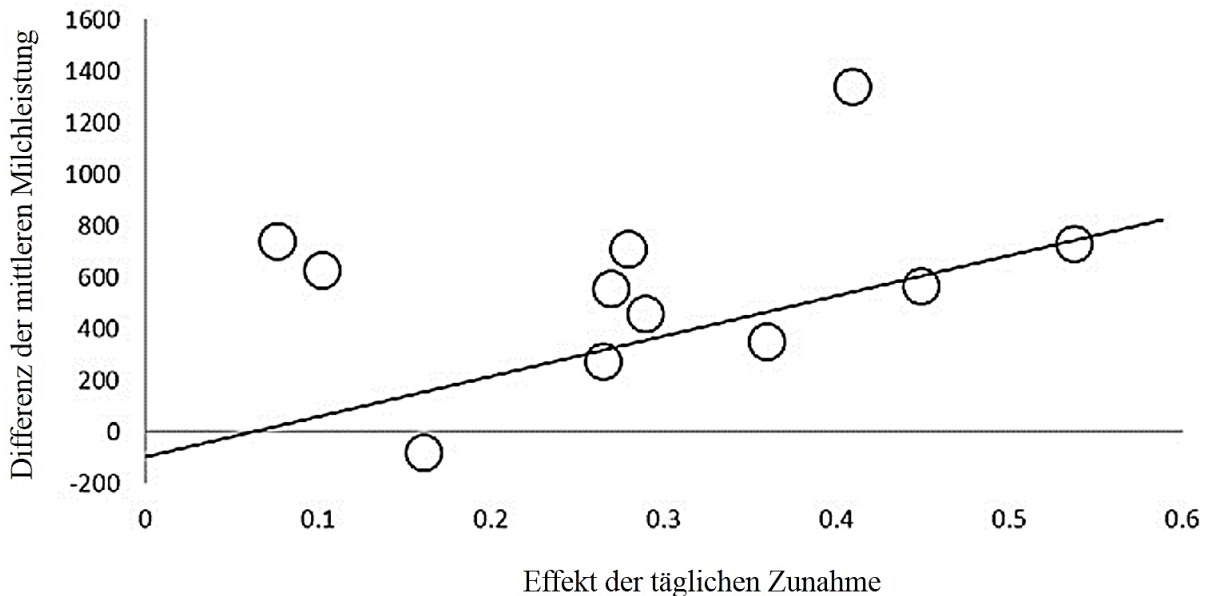
Im oben beschriebenen Kälbersversuch von Brown et al. konnte bei den Tieren aus Gruppe H ein höherer IGF-I- und Leptin-Gehalt im Plasma nachgewiesen werden als bei Tieren der Gruppe M. Die hohe Plasmakonzentration der Hormone in Gruppe H sank jedoch nach dem Abtränken in LW 8 auf das gleiche Niveau wie in Gruppe M, was die Autoren auf eine Depression der Wachstumsrate nach dem Entwöhnen zurückführten. Wurden die Tiere aus H und M nach der 8. Woche nun einer protein- und energiereicheren Fütterungsgruppe (HH bzw. MH) zugeordnet, so stieg der IGF-I-Spiegel wieder an, unabhängig von der Art der Fütterung in den ersten Wochen. Die Leptingehalte waren durch die Veränderung der Fütterung ab LW 8 nicht beeinflusst. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die Unterschiede im Körperfettanteil zwischen den Gruppen nicht ausreichend groß waren, um Differenzen im Leptingehalt auszulösen (Brown et al., 2005b).

Ähnliche Beobachtungen wurden auch an Bullenkälbern der Rasse Deutsche Holstein gemacht, die in den ersten 3 Lebenswochen entweder mit Vollmilch *ad libitum* (INT) oder restriktiv mit MAT (CON) getränkt wurden. Die Gruppe INT realisierte in den ersten 3 Wochen bis zu 9-fach höhere Tageszunahmen als die Gruppe CON. Dies führte jedoch nicht zu unterschiedlichen Körpergewichten zwischen den Gruppen im Alter von 8 Monaten. Die intensive Fütterung führte außerdem innerhalb der ersten 3 Lebenswochen zu erhöhten Plasmagluco-, Insulin- und IGF-I-Konzentrationen wohingegen die Konzentration von GH (Growth-Hormone) während der zweiten Lebenswoche bei den INT-Kälbern erniedrigt war. Zum Zeitpunkt der Schlachtung im Alter von 8 Monaten war die mittlere Anzahl an Langerhans'schen Inseln bei den INT-Kälbern höher als in der Kontrollgruppe. Auch die fotografisch mittels Immunohistochemie nachgewiesenen Insulin-positiven Bereiche im Pankreas waren bei INT-Kälbern größer als bei CON-Kälbern. Diese Resultate lassen den Schluss zu, dass Kälber durch eine modifizierte Aufzuchtintensität metabolisch programmiert werden können (Prokop et al., 2015).

Von Interesse sind diese Ergebnisse auch aus ökonomischer Sicht, insbesondere deshalb, weil die Mehrzahl der Studien an Kälbern positive Auswirkungen einer verbesserten Nährstoffzufuhr im postnatalen Zeitraum auf langfristige Leistungsdaten der Tiere zeigte. In Untersuchungen, die sich mit den Effekten von begrenzter Aufnahme oder *ad libitum* Fütterung von Kälbern in den ersten Lebenswochen auseinandersetzten, resultierte eine

erhöhte Nährstoffzufuhr aus Vollmilch oder MAT und dadurch bedingte höhere Wachstumsraten in einer erhöhten Milchleistung während der ersten Laktation (Shamay et al., 2005; Moallem et al., 2010; Soberon et al., 2012). Die Leistungsunterschiede reichten von 450 bis 1300 kg mehr Milch (305-Tage-Leistung) in der Gruppe der nährstoffreicher versorgten Kälber im Vergleich zu den restriktiv gefütterten (Soberon und van Amburgh, 2013). Da viele der Studien um diese Thematik zwar positive, nicht aber signifikante Effekte der intensiven Fütterung auf die spätere Milchleistung zeigten (Raeth-Knight et al., 2009; Davis-Rincker et al., 2011), erstellten Soberon und van Amburgh (2013) eine Meta-Analyse aus den zu diesem Zeitpunkt publizierten Daten. Mit dieser konnten sie zeigen, dass hohe Wachstumsraten im Zeitraum vor der Entwöhnung, die in der Regel aus einer gesteigerten Nährstoffversorgung resultierten, zu höheren Milchleistungen in der ersten Laktation führten. Soberon und van Amburgh (2013) errechneten eine um 1551 kg höhere Laktationsleistung je kg Differenz in der Tageszunahme zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe, die während der Tränkephase realisiert wurde (siehe Abbildung 4). Die fehlenden Signifikanzen in den Einzelstudien führten die Autoren auf die fehlende Teststärke zurück, die auf zu geringen Tierzahlen pro Versuchsgruppe beruhte.

Dem gegenüber stehen Studien, bei denen eine intensive Fütterung in der Tränkephase zwar zu höheren Wachstumsraten führte, jedoch keine langfristigen Vorteile in Bezug auf Parameter der Milchleistung mit sich brachte. So verglichen Kiezebrink et al. (2015) zwei mit Vollmilch getränkte Gruppen miteinander. Eine Gruppe erhielt 4 L, die andere Gruppe 8 L Vollmilch pro Tag bis zum Alter von 56 Tagen. Die 8 L-Gruppe konnte bis zum Alter von 4 Wochen höhere Tageszunahmen realisieren, was zu einem durchschnittlich höheren Körpergewicht führte. Dieser Unterschied im Körpergewicht zwischen den beiden Gruppen blieb bis zum Alter von 52 Wochen bestehen, danach konnte kein Einfluss der Tränkegruppe mehr nachgewiesen werden. Auch ein Einfluss auf das Erstkalbealter oder die Milchleistung konnte trotz der verhältnismäßig hohen Tierzahl im Versuch ( $n = 152$ ) nicht festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse liefert eine Studie, bei der Kälbern entweder 5 oder 10 L MAT pro Tag vertränkt wurde. Auch hier konnten keine langfristigen Effekte auf Reproduktions- oder Milchleistungsdaten nachgewiesen werden, obwohl die Tiere, die 10 L MAT bekamen, in der Tränkephase höhere Tageszunahmen hatten als die, die nur 5 L bekamen. Allerdings wurden die Tiere den Gruppen erst am 5. Lebenstag zugeteilt. Bis zu diesem Zeitpunkt erhielten alle Tiere 4 L Kolostrum pro Tag (Morrison et al., 2009).



**Abbildung 4:** Meta-Regression des Effekts der täglichen Zunahme<sup>1</sup> [kg/d] auf die Milchleistung [kg] in der 1. Laktation

Um den Effekt der täglichen Zunahme vor dem Entwöhnen auf die Milchleistung der 1. Laktation zu evaluieren, wurde die tägliche Zunahme als prädiktive Variable mit einbezogen. Regressions-Gleichung: Milchleistung = -106 kg + 1551,4<sup>2</sup> kg x TZ<sup>1</sup> kg/d

<sup>1</sup>Differenz der täglichen Zunahme vor dem Entwöhnen und <sup>2</sup>Differenz der mittleren Milchleistung in der 1. Laktation zwischen nährstoffreich und restriktiv gefütterten Kälbern (modifiziert nach Soberon und van Amburgh, 2013)

### 2.3.6 Laktokrine Hypothese

Der Begriff „laktokrin“ beschreibt die Übertragung bioaktiver Substanzen mütterlichen Ursprungs in den Kreislauf des Neugeborenen als Folge des Säugens (Yan et al., 2006; Bartol et al., 2008). Die „laktokrine Hypothese“ wurde erstmals 2008 als solche benannt. Mit ihr beschreiben Bartol et al. (2008) den Einfluss bioaktiver Stoffe aus der Muttermilch auf die epigenetische Entwicklung neonataler Gewebe.

Voraussetzung dafür ist zum einen das Vorhandensein der biologisch aktiven Substanz in der Milch, die Übertragungsmöglichkeit in den Blutkreislauf der Nachkommen, die Ansprechbarkeit des neonatalen Gewebes auf den maternalen Faktor sowie eine biologische Antwort des Zielgewebes (Bagnell et al., 2009). Diese kann beispielsweise durch Bindung an einen im neonatalen Gewebe exprimierten Rezeptor erfolgen (Yan et al., 2006; Bartol et al., 2013).

Bereits in den 1970er bis 1990er Jahren wurde gezeigt, dass die Fütterung von Milch bzw. Kolostrum Einfluss auf das Wachstum des Gastrointestinaltrakts (GIT; Widdowson et al., 1976) sowie auf den RNA-Gehalt (Simmen et al., 1990) bzw. die Proteinsynthese (Burrin et

al., 1992) im Gewebe des GIT hat. Kolostrum-gefütterte Ferkel wiesen außerdem eine erhöhte Proteinsynthese-Rate auch in anderen Organen (Leber, Niere, Milz und quergestreifte Muskulatur) auf, verglichen mit Ferkeln, die Milch oder Wasser bekommen hatten (Burrin et al., 1992). Auch ein Einfluss auf die Reifung und Entwicklung der weiblichen Reproduktionsorgane konnte nachgewiesen werden (Yan et al., 2006; Bartol et al., 2008).

Zurückgeführt wird diese Wirkung auf verschiedene Hormone und Wachstumsfaktoren, die in der Milch, nicht aber in Milchaustauschern enthalten sind. Besonders hohe Konzentrationen dieser bioaktiven Substanzen finden sich im Kolostrum (Grosvenor et al., 1993; Donovan und Odle, 1994; Blum und Hammon, 2000b). Diese können zum Teil, nachdem sie oral mit der Milch aufgenommen wurden, im Darm absorbiert werden und hier sowohl kurzfristige metabolische Effekte als auch langfristige Effekte auf die Entwicklung haben (Grosvenor et al., 1993; Bagnell et al., 2009). In welchem Umfang eine Absorption stattfinden kann, ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Die neonatalen Enterozyten sind in der Lage Makromoleküle mittels Pinozytose aufzunehmen (Broughton und Lecce, 1970), durch die Zelle zu transportieren und via Exozytose ins lymphatische System abzugeben (Staley et al., 1972). Der Zeitrahmen, in dem die Absorption der Moleküle und damit deren Aufnahme in den Blutkreislauf des Jungtieres möglich ist, wird in der Literatur unterschiedlich weit gefasst. Er reicht von innerhalb der ersten 24 h (Widdowson et al., 1976) über 36 h bei Ferkeln (Broughton und Lecce, 1970) bis hin zu 3 d bei Kälbern (Bartol et al., 2008).

Aber auch lokale Effekte bioaktiver Substanzen im Darm werden diskutiert (Donovan und Odle, 1994). Als Beispiel sei hier der Nachweis von Rezeptoren für Insulin und IGF-I und IGF-II in Epithelzellen der Darmmukosa genannt, der auf eine direkte Interaktion der Hormone mit ebendiesen Zellen schließen lässt (Fernandez-Moreno et al., 1987; Georgiev et al., 2003). Während sich anfängliche Studien vermehrt auf die Untersuchung der oben aufgeführten laktokrinen Effekte bei Ferkeln konzentrierten (Widdowson et al., 1976; Donovan und Odle, 1994; Burrin et al., 1997) wurden diese inzwischen auch bei Kälbern beschrieben (Blum und Hammon, 2000b; Rauprich et al., 2000; Blättler et al., 2001).

### **2.4 Methoden zur Abschätzung der Insulinsensitivität**

Unter dem Begriff der Insulinsensitivität versteht man die Fähigkeit von Insulin eine Antwort in bestimmten Zielgeweben hervorzurufen. Hierzu gehören z.B. Leber-, Muskel- und Fettgewebe (Holness et al., 2000).

Um die Insulinsensitivität eines Organismus zu bestimmen, gibt es verschiedene Möglichkeiten: die direkte Messung mittels sogenannter Clamp-Techniken sowie die indirekte Bestimmung mittels Glucosetoleranztests, die jeweils frequente Blutentnahmen voraussetzen,

oder eine Berechnung von Surrogatindizes aus in einzelnen Blutproben ermittelten Konzentrationen von Glucose und Insulin sowie fallweise weiteren Parametern (QUICKI, RQUICKI). Im Folgenden sollen die verschiedenen Möglichkeiten näher beschrieben werden.

#### **2.4.1 Hyperinsulinämischer euglycämischer Clamp**

Der hyperinsulinämische euglycämische Clamp (HEC) gilt als Goldstandard zur Quantifizierung des peripheren Insulin-Response, weil er direkt die Insulinantwort auf die Glucoseumsetzung unter „*steady-state*“ Bedingungen misst. Zunächst wurde die Technik für den Menschen beschrieben (DeFronzo et al., 1979). Später fand die Technik auch Anwendung am Wiederkäuer (Bergman et al., 1989; Sano et al., 1990; Hostettler-Allen et al., 1994; Hugi et al., 1998).

Vor Beginn des Tests werden die basalen Konzentrationen von Glucose und Insulin bestimmt. Die Glucosekonzentration im Blut soll während des Clamps auf einem vorher festgelegten Level gehalten, „geclamt“, werden. Dies geschieht mittels variabler Glucoseinfusionen entgegen einer festgelegten Insulin-Infusionsrate. Die Anpassung der infundierten Glucosemenge erfolgt über Messungen des Blutglucosespiegels im Abstand von 3 bis 5 Minuten. Etwa in der zweiten Hälfte einer mehrstündigen Insulin-Infusionsperiode wird ein sog. *steady-state* erreicht, bei dem die Blutglucose-Konzentration gleich bleibt und auch die *steady-state* Glucose-Infusionsrate (SSGIR) nicht mehr verändert werden muss. Der Grad der Insulinresistenz ist negativ korreliert mit der SSGIR (Wallace und Matthews, 2002; Klosinsky, 2008).

Die Durchführung dieser Technik erlaubt die Darstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve und ermöglicht so die Unterscheidung zwischen gestörter Insulinsensitivität bzw. -Response (Rizza et al., 1981a).

Die Clamps sind zeitaufwendig, kostenintensiv und arbeitsintensiv. Probleme der Clamp-Techniken finden sich in ihrem artifiziellen Aufbau, der superphysiologischen Insulinspiegel, die erreicht werden, der begrenzten Clamp-Stabilität, der Schwierigkeit wiederholte Studien durchzuführen und dem relativ hohen Variationskoeffizienten der Messergebnisse (Wallace und Matthews, 2002).

#### **2.4.2 Intravenöser Glucosetoleranztest**

Seit 1917 ist der Glucosetoleranztest in der Humanmedizin Mittel der Wahl um einen Diabetes mellitus zu diagnostizieren. Eingeführt wurde er als orale Variante. Jörgensen und Plum (1923) versuchten einen intravenösen Test zu etablieren, jedoch ohne Erfolg. So wurde standardmäßig weiterhin der orale Test als Diagnostikum durchgeführt. Erst 1962 beschrieb

Lundbaek die Vorteile des intravenösen Tests ausführlich. Bis heute wird jedoch der orale Glucosetoleranztest zur Diagnose von Diabetes mellitus angewandt. Zur Verwendung der oralen Variante für eine Abschätzung des Ausmaßes der Insulinresistenz wurden zwar Untersuchungen angestellt, allerdings sind entsprechende Modelle weder weit verbreitet noch unabhängig validiert (Wallace und Matthews, 2002). Hier findet der intravenöse Glucosetoleranztest (ivGTT) Anwendung.

Ein Problem des ivGTT war jedoch die fehlende Standardisierung und die daraus resultierende Variation der Methodik, so dass es schwierig war Ergebnisse von Studien miteinander zu vergleichen (Bingley et al., 1992). Deshalb schlugen Bingley et al. ein Standardprotokoll vor, in dem 2 Blutproben zur Bestimmung der Basalkonzentrationen von Insulin und Glucose einer dreiminütigen Glucoseinfusion (25%, 0,5 g/kg KGW) vorausgehen. Dieser schließen sich weitere Blutproben 1, 3, 5 und 10 Minuten nach Beendigung der Glucosegabe an.

Bei adulten Rindern wurden ivGTTs zur Bestimmung der Glucose-induzierten Insulinresponse und peripheren Insulinsensitivität durchgeführt (Holtenius et al., 2003; Pires et al., 2007; Bossaert et al., 2008). Neuere Studien haben aber gezeigt, dass ivGTTs nicht gut geeignet sind, um trockenstehende und laktierende Kühe zu vergleichen (de Koster et al., 2017). Bei Kälbern fanden ivGTTs bereits Anwendung (Bossaert et al., 2009; Pantophlet et al., 2016). Hier wird von Bossaert et al. (2009) ein Protokoll vorgeschlagen, bei dem zum Zeitpunkt -15 und -5 Minuten in Relation zur Glucosegabe die Basalkonzentrationen bestimmt werden. Nach Infusion der Glucoselösung (30%, 150 mg/kg KGW) werden weitere Blutproben zu den Zeitpunkten 4, 8, 12, 18, 25, 36, 45 und 60 Minuten entnommen, um den Verlauf der Glucose- und Insulinkonzentrationen zu bestimmen. Zur Auswertung der Tests werden verschiedene Parameter berechnet, wie z.B. die *Area under the curve* (AUC), die Peak- und Tiefpunktkonzentrationen sowie die Eliminationsraten für jeweils Insulin und Glucose.

### **2.4.3 Intravenöser Insulintoleranztest**

Der intravenöse Insulintoleranztest (ivITT) ist ein einfacher Test, bei dem die Abschätzung des Ausmaßes der Insulinresistenz anhand der Rate des Blutglucoseabfalls nach Injektion eines Insulinbolus erfolgt (Wallace und Matthews, 2002).

Der ebenfalls aus der Humanmedizin übernommene Test wurde bereits an adulten Milchkühen (Ohtsuka et al., 2001; Oikawa und Oetzel, 2006; Pires et al., 2007) und auch bei

Kälbern durchgeführt (Bossaert et al., 2009). Für Kälber wendet Bossaert et al. (2009) ein Protokoll mit 3 Blutentnahmen in Abständen von jeweils 15 Minuten nach Insulingabe an.

Als Maß für den Abfall der Glucosekonzentration dient der insulinstimulierte Blutglucose-Response (ISBGR) (Oikawa und Oetzel, 2006) der von Ohtsuka et al. (2001) als insulinstimulierte Glucoseverwertungs-Rate bezeichnet wird (Insulin-stimulated glucose disposal rate, GDR). Je geringer das Level von ISBGR bzw. GDR, desto geringer ist die Ansprechbarkeit des Gewebes auf Insulin (Ohtsuka et al., 2001) und desto stärker ausgeprägt die Insulinresistenz. Der ISBGR spiegelt sowohl die Hemmung der Glucoseproduktion als auch die gesteigerte Aufnahme von Glucose im peripheren Gewebe wider (Pires et al., 2007).

#### 2.4.4 Berechnete Indizes

Zur quantitativen Abschätzung der Insulinresistenz werden in der Humanmedizin auch weniger invasive Methoden, die keine Infusionen und frequente Blutentnahmen erfordern, herangezogen. Verschiedene Indizes können anhand unterschiedlicher Formeln und Modelle berechnet werden.

Hierzu gehört unter anderem das *Homeostasis Assessment Model* (HOMA), das es erlaubt, anhand eines mathematischen Modells, Werte für die Insulinsensitivität und  $\beta$ -Zell-Funktion zu generieren, sofern Nüchternwerte von Plasmaglucose- und -insulinkonzentrationen zu gleichen Zeitpunkten vorhanden sind (Matthews et al., 1985).

Der von Katz et al. (2000) definierte *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index* (QUICKI) sollte als einfache aber dennoch akkurate Möglichkeit dazu dienen, innerhalb klinischer Studien einen Messwert für die Insulinsensitivität *in vivo* zu erhalten. Da nach Meinung der Autoren die Basalwerte von Glucose und Insulin im nüchternen Zustand der Probanden kritische Informationen zur Insulinsensitivität enthalten, errechneten sie aus diesen Werten einen Index, der in den Untersuchungen eine deutliche Korrelation mit den Ergebnissen aus ebenfalls durchgeführten Clamps zeigte (Katz et al., 2000; Bastard et al., 2001). Da die Korrelationen mit den Clampergebnissen jedoch in Abhängigkeit von der Konstitution der Probanden schwankten, integrierten Perseghin et al. (2001) die Konzentration der freien Fettsäuren im Plasma in den QUICKI und erhielten damit eine bessere Korrelation zu den Clamp-basierten Werten auch in Fällen von milder Insulinresistenz. Damit gehört der *revised QUICKI* (RQUICKI) als weiterer geeigneter Index zu den Möglichkeiten der quantitativen Insulinsensitivitätsbestimmung (Rabasa-Lhoret et al., 2003).

Der RQUICKI wird mittlerweile auch in der Buiatrik als Insulinsensitivitäts-Index angewendet und scheint auch bei Kühen (Holtenius und Holtenius, 2007) als Indikator einer

gestörten Insulinfunktion zu dienen. Bei Kälbern wurde gezeigt, dass RQUICKI-Werte mit der Reaktion im ivGTT korrelierten (Bossaert et al., 2009). Es ist jedoch nicht bekannt, wie gut der RQUICKI eine reduzierte Insulinsensitivität bei Kühen widerspiegelt. Kerestes et al. (2009) konnten z.B. keinen Zusammenhang zwischen RQUICKI-Werten und Insulinresistenz bei Kühen mit Ketose und Anzeichen von Metritis feststellen. So bedarf die Verwendung des RQUICKI bei kranken Kühen oder solchen mit reduzierter Futteraufnahme weiterer Untersuchungen. Erste Vergleiche zwischen RQUICKI-Werten und den Ergebnissen aus HEC-Tests an trockenstehenden Milchkühen unterschiedlicher Körperkondition erbrachten zudem keinerlei Zusammenhang zu den über den „Goldstandard“ ermittelten Werten (de Koster et al., 2016)

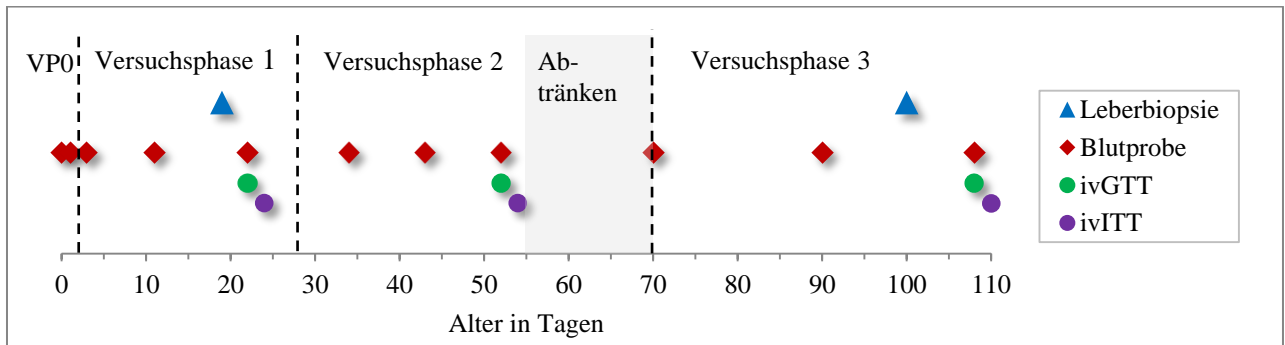
### **3 Eigene Untersuchungen**

#### **3.1 Versuchseinrichtung**

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten entstammen einem Versuch, der auf der Lehr- und Versuchsanstalt für Viehhaltung (LVAV) Hofgut Neumühle durchgeführt wurde. Die Untersuchungen erstreckten sich über einen Zeitraum von ca. 10 Monaten, beginnend im März 2012. Zu diesem Zeitpunkt hielt die Einrichtung 127 Milchkühe der Rasse Deutsche Holstein, Farbrichtung schwarzbunt, sowie deren weibliche Nachzucht. Die Kühe wurden in einem modernen Boxenlaufstall gehalten, der mit verschiedenen Liegeboxensystemen ausgestattet ist. Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit standen sowohl die weiblichen als auch die männlichen Kälber, die im Versuchszeitraum geboren wurden, zur Verfügung. Als Kälberstall diente der ehemalige Schafstall, der im Hinblick auf das Versuchsvorhaben für die Gruppenhaltung von Kälbern auf Tiefstreu umgebaut und entsprechend ausgestattet wurde.

#### **3.2 Versuchsaufbau**

Die im Versuchszeitraum geborenen Kälber wurden direkt nach der Geburt einer der drei Versuchsgruppen zugeordnet. Dies geschah unter Beachtung des Geschlechts und der Laktationsnummer der Mutter, so dass sich die Anzahl der Kälber von Kühen mit höchstens zwei Laktationen und von denen ab der dritten Laktation aufwärts gleichmäßig auf die Gruppen verteilte. Die Tiere nahmen bis zu einem Alter von 110 Tagen am Versuch teil. Dieser Zeitraum gliederte sich in 4 Versuchsphasen (VP). Die erste Versuchsphase (VP0) umfasste den Tag der Geburt und den ersten Lebenstag (LT). VP1 begann an LT 2 und endete mit LT 27. Von LT 28 bis LT 69 erstreckte sich die VP2. Hier schloss sich ab LT 70 die VP3 an, welche mit einem Alter von 110 Tagen und dem Ausscheiden des Kalbes aus dem Versuch endete. Innerhalb dieser Zeiträume wurden den Kälbern regelmäßig Blutproben (BP) entnommen: direkt nach der Geburt (LT 0, noch vor der Kolostrumgabe), vor der 2. Mahlzeit (LT 1) und an LT 3, 11, 22, 34, 43, 52, 70, 90 und 108. Es wurden intravenöse Glucosetoleranztests (ivGTT) an LT 22, 52 und 108 durchgeführt und bei den männlichen Tieren zusätzlich intravenöse Insulintoleranztests (ivITT) an LT 24, 54 und 110. Des Weiteren wurden in VP1 (LT 19) und VP3 (LT 100) Leberbiopsien entnommen (Übersicht in Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Übersicht Probenentnahme über den gesamten Versuchsverlauf

VP = Versuchsphase, ivGTT = intravenöser Glucosetoleranztest, ivITT = intravenöser Insulintoleranztest

Die drei Versuchsgruppen unterschieden sich durch das entsprechende Tränkeverfahren in VP1. Eine der Gruppen (MATr) erhielt Milchaustauschertränke in einer Konzentration von 11,5 % (130g Pulver auf 1 L Wasser) mit einer Gesamtmenge von 6 L Wasser pro Tag. Dies entsprach einer Tränkemenge von 6,78 kg je Tier und Tag (Wasser zuzüglich MAT). Eine weitere Gruppe (MATadl) erhielt ebenfalls MAT, allerdings mit einer Konzentration von 13,8 % (160 g Pulver auf 1 L Wasser). Diese Gruppe konnte bis zu 25 L Wasser (technisch bedingte Maximalmenge am Automat) zuzüglich der Menge an Milchpulver aufnehmen (das entsprach einer maximalen Tränkemenge von 29 kg pro Tier und Tag). Die letzte Gruppe (VMadl) erhielt Vollmilch und konnte ebenfalls bis zu 25 L Tränke abrufen (siehe Tabelle 2). Da die Tiere in keinem der Fälle die maximale Tagesration von 25 L tatsächlich abgerufen haben, ist davon auszugehen, dass die hoch angesetzte Tränkemenge einer *ad libitum*-Tränke gleichkam.

**Tabelle 2:** Tränkezuteilung der Versuchsgruppen in Versuchsphase 1

Versuchsgruppe	Tränkeart	Tränkekonzentration		tägliche Tränkemenge
		[g/L Wasser]	[%]	[kg]
MATr	Milchaustauscher	130	11,5	6,78
MATadl	Milchaustauscher	160	13,8	max. 29
VMadl	Vollmilch			max. 25

MATr = restriktive Milchaustauschertränke, MATadl = Milchaustauschertränke *ad libitum*, VMadl = Vollmilchfütterung *ad libitum*

### 3.2.1 Tiere

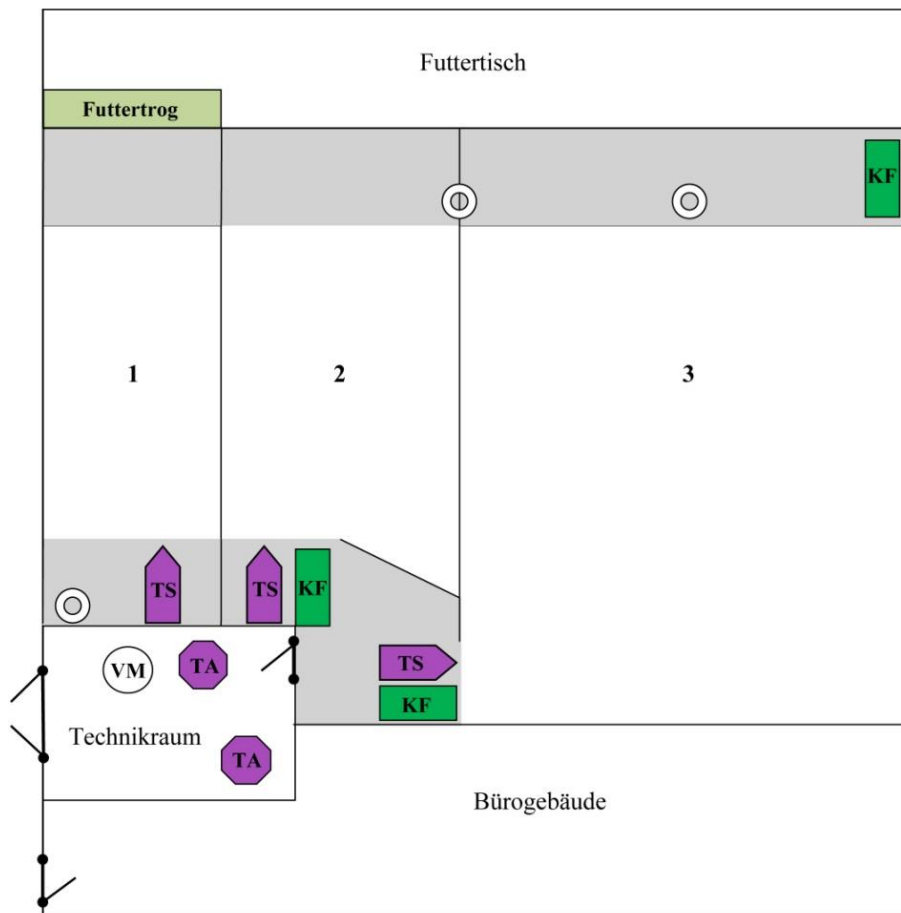
In den Versuch wurden 60 Kälber der Rasse Deutsche Holstein aufgenommen, davon waren 30 männlich und 30 weiblich. Zwillingssäuger wurden nicht eingesetzt. Eine Ausnahme bildeten ein weibliches Zwillingssäugerpaar (239 und 240) und ein Bullensäuger (635), dessen Zwilling tot geboren wurde. Diese Tiere nahmen am Versuch teil, wurden allerdings nicht den Toleranztests unterzogen. Ein Tier (233) wurde versehentlich am Säuger in einer falschen Gruppe angemeldet, erhielt über 17 Tage eine falsche Tränkeverteilung und wurde deshalb nachträglich ab diesem Zeitpunkt aus den Auswertungen ausgeschlossen.

Die Kälber wurden den Versuchsgruppen (n = 20) so zugeteilt, dass jede Gruppe 10 männliche und 10 weibliche Tiere umfasste. Letztendlich kamen in der Gruppe MATr 20 Kälber ganz oder teilweise zur Auswertung, davon 10 weibliche und 10 männliche Tiere, in Gruppe MATadl konnten die Daten von insgesamt 17 Tieren ausgewertet werden, davon 9 weibliche und 8 männliche und in Gruppe VMadl von insgesamt 20 Tieren, davon 10 weibliche und 10 männliche.

### 3.2.2 Aufstallung

Die Kälber wurden in Abkalbebuchten geboren, je nach Belegung in Einzel- oder Gruppenhaltung, die mit sauberem, trockenem Stroh eingestreut waren. Sie wurden nach der ersten Kolostrumaufnahme in Einzelglus vom Typ FLIXBOX (Fa. Mayer Maschinenbaugesellschaft mbH, Tittmoning) verbracht, die großzügig mit Stroh eingestreut waren. Nach durchschnittlich acht Tagen wurden die Tiere in den Kälberstall umgestallt und dort in drei altersangepassten Gruppen auf Tiefstreu gehalten (siehe Abbildung 6). Es standen zur automatischen Fütterung zwei Kälbertränkeautomaten (Typ Vario Kombi und Typ SA 2+, Förster-Technik GmbH, Engen) sowie drei an die Tränkeautomaten gekoppelte Kraftfutterstationen zur Verfügung. Die neu hinzukommenden Kälber wurden einer Babygruppe zugeteilt, um eine ruhige Gewöhnungsphase an den Tränkeautomaten, ohne Störung durch deutlich ältere Tiere, zu gewährleisten. Im Alter von durchschnittlich 3 Wochen wechselten sie in die nächsthöhere Altersgruppe. Diese beiden Gruppen hatten Zugang zu einem Tränkeautomaten, der sowohl Vollmilch als auch MAT ausgeben konnte. Mit einem durchschnittlichen Alter von 5 Wochen, wurden die Kälber in die nächste Gruppe eingegliedert, wo sie bis zum Ende der Abtränkphase blieben. Die Buchten waren teilweise mit Selbstfangfressgittern ausgestattet, durch die die Tiere Zugang zu einem Futtertrog oder zum mit Epoxydharz beschichteten Futtertisch hatten. Eine betonierte Standfläche bot einen sauberen und festen Untergrund. Auch die Tränkestationen sowie die Kraftfutterautomaten

waren auf betonierten Standflächen angebracht. Jede Gruppe hatte Zugang zu einer Tränkestation. Es gab einen Kraftfutterautomaten in der mittleren Altersgruppe und zwei in der Gruppe mit den älteren Kälbern. Alle Tiere hatten Zugang zu einer Wassertränke (siehe Abbildung 6). In VP3 wurden die Tiere zur Erfassung der TMR-Aufnahme gruppenweise mit anderen Kälbern der gleichen Versuchsgruppe aufgestellt. Hier standen drei abgetrennte, geräumige Tiefstreuabteile zur Verfügung. Der befestigte Laufgang am Futtertisch war durch einen Betonsockel vom Strohbereich abgetrennt. Auch dieser Bereich war mit Selbstfangfressgittern ausgestattet.



**Abbildung 6:** Grundriss Kälberstall, Bereich Tränkekälber (Maßstab ca. 1:100)

1 = Babygruppe, 2 = alle Tiere bis 5. Lebenswoche, 3 = alle Tiere ab 5. bis 10. Lebenswoche, KF = Kraftfutterstation, TS = Tränkestation, TA = Tränkeautomat, VM = Vollmilchbehälter mit Rührwerk, ⊙ = Wassertränke, ■ = betonierte Standfläche

### 3.2.3 Fütterung

#### 3.2.3.1 Milchaustauscher

Um eine ausreichende Versorgung der Neonaten mit Immunglobulinen zu gewährleisten, wurde in den ersten 6 Mahlzeiten Biestmilch der Mutter vertränkt. Bei der ersten Mahlzeit sollten alle Tiere mindestens 2,5 kg Kolostrum aufnehmen, besser mehr. Die beiden *ad libitum*-Gruppen bekamen danach weiterhin Tränke zur freien Verfügung, die restriktive Gruppe wurde ab der zweiten Mahlzeit auf 6 kg täglich begrenzt. Mit der siebten Mahlzeit erfolgte abrupt die Umstellung auf die entsprechende Tränkeart (MAT oder Vollmilch vom Tank, siehe Tabelle 2). Wurden die Kälber schließlich in den Kälberstall verbracht, so hatten die Tiere zusätzlich freien Zugang zu Heu, Kraftfutter und frischem Wasser. Während der Igluphase erhielten die Kälber ihre Tränke über Nuckeleimer und die Erfassung der aufgenommenen Tränkemengen erfolgte durch Einwiegen der zugeteilten Portion und Zurückwiegen der Restmenge. In der Gruppenhaltung wurde die Tränke mittels Tränkeautomat ausgegeben und die aufgenommene Menge automatisch erfasst und gespeichert (Software KalbManagerWin, Version 2.1.0.14, dsp-Agrosoft GmbH, Paretz). Als Milchaustauscher kam eine speziell für den Versuch angefertigte Mischung (MAT Neumühle sauer, Trouw Nutrition Deutschland GmbH, Burgheim) zum Einsatz. Die Mischung mit 50% Magermilchpulveranteil wurde bereits vom Hersteller leicht angesäuert, so dass beim Mischen mit Wasser ein pH-Wert von etwa 5,6 messbar war. Die Inhaltsstoffe laut Hersteller sind in Tabelle 3 nachzulesen. Zusätzlich wurde eine Futtermittelanalyse durch die Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt (LUFÄ, Speyer) durchgeführt. Hier wurden die Rohnährstoffe nach den Methoden des VDLUFÄ (2012) bestimmt. Die Ergebnisse sind Tabelle 3 zu entnehmen.

**Tabelle 3:** Rohnährstoffgehalte des verwendeten Milchaustauschers und Liste der jeweils angewendeten Analysemethoden

<b>Inhaltsstoff</b>	<b>Herstellerangaben</b>	<b>Analyse LUFA</b>	<b>Methode VDLUFA</b>
	<b>[%]</b>	<b>[%]</b>	<b>(2012)</b>
Wasser	k.A.	3,4	3.1/ 2/ 5
Rohprotein (N*6,25)	24	23	4.1.2
Rohfett	18	17	5.1.1/ 3
Rohfaser	0,1	0,1	6.1.1
Rohasche	7	7,4	8.1/ 4
N-Freie Extraktstoffe (NfE)	k.A.	49,1	
Lysin	2	1,82	4.11.1/ 6
Methionin	0,6	0,48	4.11.1/ 5/ 6
Calcium	1,0	n.d.	
Phosphor	0,7	n.d.	
Natrium	0,4	n.d.	

k.A. = keine Angabe, n.d. = nicht durchgeführt

### 3.2.3.2 Vollmilch

Wie in Abschnitt 3.2.3.1 bereits beschrieben, wurden die Kälber in den ersten sechs Mahlzeiten mit der Biestmilch der Mutter versorgt. Diese wurde ab der zweiten Mahlzeit mit 2 mL eines Gemischs aus Milchsäure, Essig- und Zitronensäure je L Milch auf einen pH-Wert von ca. 4,6 angesäuert (Schaumacid® Drink C flüssig, H. Wilhelm Schaumann GmbH, Pinneberg). Ebenso wurde mit der Vollmilch verfahren, die für die Befüllung des Milchbehälters am Tränkeautomat aus dem Milchtank entnommen wurde. Zur Ergänzung von Spurenelementen und Vitaminen, wurde der Vollmilch außerdem ein flüssiger Zwei-Komponenten-Aufwerter zugesetzt (Milkivit Quick-Mix® Spurenelemente und Milkivit Quick-Mix® Vitamine, Trouw Nutrition Deutschland GmbH, Burgheim) in einer Dosierung von 1 mL/L Milch von jeder der beiden Komponenten. Die Milch für den Automaten wurde einmal täglich aufgefüllt und vorab der Behälter gründlich gereinigt. Um zu vermeiden, dass die Milch aufrahmte, wurde ein Rührwerk im Behälter angebracht, das regelmäßig für eine Durchmischung der Vollmilchtränke sorgte.

### 3.2.3.3 Kraftfutter

Ab der zweiten Lebenswoche wurde den Kälbern Kraftfutter in Form von Pellets angeboten. Der Kraftfuttermverzehr wurde über 3 Kraftfutterautomaten geregelt und die Menge registriert. In der Babygruppe stand kein Automat zur Verfügung, das Kraftfutter wurde hier in einem

Futtertrog angeboten. Folglich fand in diesem Bereich keine Erfassung der Kraftfutteraufnahme statt.

Die Babygruppe erhielt ein Starterfutter (RWZ Kälberkraft Elite Start, Raiffeisen Waren-Zentrale Rhein-Main eG, Köln), während über die Kraftfutterautomaten in den beiden anderen Gruppen das Kälberfutter RWZ Kälberkraft Extra (Raiffeisen Waren-Zentrale Rhein-Main eG, Köln) ausdosiert wurde. Die Kraftfuttermenge war auf 2,5 kg/Tier und Tag beschränkt, keines der Tiere rief jedoch diese Menge ab, so dass man sagen kann, Kraftfutter stand zur freien Verfügung.

Die Zusammensetzung und Gehalte laut Hersteller sind Tabelle 4 zu entnehmen. Außerdem wurden Proben zur Untersuchung auf Inhaltsstoffe ins Labor der LUFA geschickt. Hier wurden die Proben nach den Methoden des VDLUFA (2012) analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

#### 3.2.3.4 Raufutter

Heu wurde den Tieren ab der 2. Lebenswoche zur freien Aufnahme zur Verfügung gestellt, die aufgenommene Menge konnte jedoch aus technischen Gründen nicht erfasst werden. Ebenso bestand für die Tiere die Möglichkeit, Stroh aus der Einstreu aufzunehmen und zu fressen.

#### 3.2.3.5 Totale-Misch-Ration

Nach dem Abtränken wurden die Kälber im Alter von ca. 70 Tagen in Gruppenbuchten umgestallt und bekamen ausschließlich eine Totale-Misch-Ration (TMR) auf Basis von Gras-, Mais- und Pressschnitzsilage vorgelegt. Die Einzelkomponenten der TMR sind in Tabelle 5 dargestellt. Die Zusammensetzung der Ration wurde während der Versuchsdauer grundsätzlich beibehalten, Umstellungen waren nur erforderlich wenn z.B. ein Wechsel der Silage stattfinden musste.

**Tabelle 4:** Zusammensetzung und Rohnährstoffgehalte der verwendeten Kraftfuttersorten

	<b>RWZ-Kälberkraft Elite Start</b>		<b>RWZ-Kälberkraft Extra</b>	
<b>Zusammensetzung</b>	Mais, Sojaextraktionsschrot, Trockenschnitzel, Weizen, Gerste, Zuckerrübenmelasse, Leinsaat extrudiert/ Weizenkleie, Calciumcarbonat, Dextrose, Dicalciumphosphat (mineralisch), Natriumchlorid, Monocalciumphosphat, Weizenkleie		Mais, Sojaextraktionsschrot, Weizenkleie, Weizenkleberfutter, Gerste, Weizen, Leinsaat/ Weizenkleie, Rapsextraktionsschrot, Trockenschnitzel, Zuckerrübenmelasse, Calciumcarbonat, Natriumchlorid, Pflanzenöl (Palm, Soja, Raps, Kokos)	
<b>Inhaltsstoff</b>	<b>Herstellerangaben [%]</b>	<b>Analyse LUFA [%]</b>	<b>Herstellerangaben [%]</b>	<b>Analyse LUFA [%]</b>
Trockenmasse	k.A.	87,9	k.A.	88,4
Rohprotein (N*6,25)	18	20,3	19	20,4
Rohfett	3,3	4,3	4,1	4,3
Rohfaser	6	5,5	6	5,5
Rohasche	7,5	6,2	7,4	6,3
Calcium	1	0,98	1	0,97
Phosphor	0,6	0,54	0,6	0,55
Natrium	0,25	0,31	0,25	0,30
<b>Energiegehalt [MJ ME<sup>1</sup>/kg TM]</b>	11,5	11,7	11,2	11,6

k.A. = keine Angabe, <sup>1</sup>ME = umsetzbare Energie

**Tabelle 5:** Zusammensetzung der Totalen-Misch-Ration für die Kälber ab dem 70. Lebenstag

Komponenten	[% der TM <sup>2</sup> ]	Nährstoffgehalte <sup>1</sup>	[% der TM <sup>2</sup> ]
Pressschnitzel	19,4	Rohprotein	15,4
Grassilage	20,1	Rohfaser	16,4
Maissilage	20,3	Calcium	0,7
Heu	2,30	Phosphor	0,4
Stroh	1,32	Magnesium	0,3
Gerste	9,11	Natrium	0,2
Körnermais	10,2		
Sojaextraktionsschrot	3,36	Trockenmassegehalt [%]	49
Rapsextraktionsschrot	12,1	ME <sup>3</sup> [MJ/kg TM <sup>2</sup> ]	11,2
Salz	0,29		
Harnstoff	0,29		
Kalk	0,38		
Mineralfutter	0,47		
Futterfett	0,33		

<sup>1</sup>errechnet aus den Nährstoffgehaltangaben der Einzelfuttermittel (nach DLG- Futterwerttabellen - Wiederkäuer, 1997) entsprechend der Rationszusammensetzung, <sup>2</sup>TM = Trockenmasse, <sup>3</sup>ME = umsetzbare Energie

### **3.3 Versuchsdurchführung**

#### **3.3.1 Gewichtserfassung**

Die Kälber wurden zum ersten Mal beim Verbringen aus der Abkalbebucht ins Einzelgülu gewogen. Da die Tiere hier in der Regel schon die erste Mahlzeit aufgenommen hatten, wurde die Menge der aufgenommenen Tränke vom gewogenen Gewicht abgezogen, so dass man das reine Geburtsgewicht erhielt. Im weiteren Versuchsverlauf wurden die Tiere im Kälberstall regelmäßig einmal pro Woche gewogen. Verwendet wurde eine transportable Durchtriebswaage, bestehend aus 2 Wägebalken (MP600, Tru-Test® Ltd., Auckland, Neuseeland) und einer Plattform (Aluminium 2,2m Cattle Platform, Tru-Test® Ltd., Auckland, Neuseeland) sowie dem dazugehörigen Anzeigegerät EziWeigh1 (Version 1.0, Tru-Test®, Auckland, Neuseeland).

#### **3.3.2 Erfassen von Körpertemperatur, Kotkonsistenz und Gesundheitsstatus**

Die Messung der rektalen Körperinnentemperatur wurde täglich bei allen Tränkekälbern durchgeführt. Des Weiteren wurde die Temperatur bei Tieren mit Hinweis auf eine Erkrankung nach Bedarf gemessen. Außerdem wurde eine Kotbonitur vorgenommen. Es wurde sowohl die Kotkonsistenz (pastös, dünnbreiig, suppig, wässrig) als auch die Kotfarbe (braun, gelb, grau) bestimmt. Beimengungen von Blut wurden ebenfalls erfasst. Als „Bemerkung“ wurden sonstige Veränderungen am klinischen Erscheinungsbild der Tiere erfasst, mit besonderem Augenmerk auf respiratorische Erkrankungen und Erkrankungen des Nabels.

#### **3.3.3 Blutproben**

Die Entnahme der Blutproben (BP) erfolgte nach Hautdesinfektion mit 70%-igem Isopropyl-Alkohol durch Punktion der *Vena jugularis* mit praxisüblichen Einmalkanülen (HS-Einmal Injektionskanülen, 1,2 x 40 mm, Henry Schein Inc., Melville, NY, USA). Es wurden jeweils ein Serumröhrchen mit Gerinnungsaktivator (10 mL, Probenröhre mit Eindrückstopfen, Präparierungsträger/Gerinnungsaktivator, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) und ein mit Natrium-Fluorid (NaF) beschichtetes Röhrchen zur Blutzuckerbestimmung (4 mL für 2 mL Blut, Probenröhre mit Eindrückstopfen, 16 I.E. Heparin und 1,0 mg Fluorid je mL Blut, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) befüllt und innerhalb 1 h nach Entnahme zentrifugiert (3500 x g, 20 min., Umgebungstemperatur). Konnten die Proben nicht direkt abzentrifugiert werden, so wurden sie bei max. 8 °C gelagert und möglichst innerhalb der nächsten Stunden weiterverarbeitet. Das gewonnene Serum oder Plasma wurde schließlich in Eppendorfgefäße

(1,5 mL, Reagiergefäß aus Polypropylen mit anhängendem Polypropylen-Stopfen, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) pipettiert und bei -20 °C bis zur Analyse aufbewahrt. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme hatten die Kälber seit mindestens 2 h keine Tränke mehr aufgenommen und auch keinen Zugang zu Kraftfutter und Heu. Die Beprobungstermine orientierten sich an den einzelnen Versuchsphasen und waren so aufgeteilt, dass jeweils zu Beginn, Mitte und Ende jeder Versuchsphase eine Probe entnommen wurde (dargestellt in Abbildung 5). In den ersten Lebenstagen war die Probendichte etwas höher, um eventuelle Einflüsse der Erstkolostrumgabe auf die Blutparameter darstellen zu können. Die erste Blutentnahme fand direkt nach der Geburt (LT 0) und noch vor der ersten Kolostrumgabe statt, sofern die Geburt beobachtet wurde (bei 12 Tieren konnte eine selbstständige Biestmilchaufnahme am Euter der Mutter nicht sicher ausgeschlossen werden). Die zweite Blutprobe wurde nach der ersten und vor der zweiten Mahlzeit entnommen (LT 1), die dritte Probe nach der letzten Biestmilchmahlzeit und vor der nächsten Mahlzeit mit Umstellung auf Vollmilch bzw. MAT (LT 3). Weitere Blutentnahmen fanden an LT 11, 22, 34, 43, 52, 70, 90 und 108 statt (siehe Abbildung 5).

### **3.3.4 Toleranztests**

#### **3.3.4.1 Vorbereitung der Tests**

Jeweils gegen Ende der drei Versuchsphasen wurden bei allen Versuchskälbern Glucosetoleranztests, bei den männlichen zusätzlich Insulintoleranztests durchgeführt, sofern keine gesundheitliche Beeinträchtigung (Durchfall, Fieber, etc.) der Tiere vorlag. War dies zum angesetzten Termin der Fall, wurde nicht getestet oder der Test auf einen späteren Termin verschoben. Die Durchführung der Tests orientierte sich an dem Protokoll, das Bossaert et al. (2009) bei Kälbern unterschiedlicher Rassen zur Schätzung der peripheren Insulinsensitivität beschrieben. Zur Vorbereitung wurden die Tiere morgens nüchtern gestellt, d.h. sie wurden innerhalb ihrer Stallgruppe separiert und hatten ausschließlich Zugang zu frischem Wasser. Die rechte oder linke Halsseite wurde im oberen Drittel im Bereich der Drosselrinne rasiert und mit alkoholischer Jodlösung desinfiziert (Braunoderm®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen). Die Jugularvene wurde gestaut und ein Venenverweilkatheter herzwärts eingeführt (Vygonüle T, 1,8 x 45 mm, Vygon SA, Ecouen, Frankreich). Dieser wurde schließlich mit einem Hautheft fixiert. Frühestens 4 h nach dem Nüchternstellen wurde mit der Durchführung des eigentlichen Tests begonnen. Die zu testenden Tiere verblieben im abgesperrten Bereich. Zum Test in VP3 mussten die Tiere zusätzlich angebunden werden, was sie in der Regel gut tolerierten. Es wurde ein 10 cm langer, mit physiologischer

Kochsalzlösung (Isotonische Natriumchlorid-Lösung ad us. vet. B. Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen) befüllter Verlängerungsschlauch mit Dreiwegehahn (Discofix®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) am Venenkatheter angebracht, nachdem dieser auf Durchlässigkeit überprüft worden war. Die Verlängerung wurde mit Klebestreifen am Kalb fixiert. Etwa 30 min nach dieser Maßnahme wurde die erste Blutprobe entnommen. Mit einer 10 mL-Spritze wurde Blut über die Verlängerung aspiriert und in jeweils ein (bei der ersten Probe zwei) Serum- und ein NaF-Röhrchen gefüllt. Nach jeder Blutentnahme wurden Schlauch und Katheter mit 0,9 %-iger Kochsalzlösung gespült. Die NaF-Röhrchen wurden direkt nach der Entnahme in Eiswasser gekühlt.

### 3.3.4.2 Intravenöser Glucosetoleranztest

Die Probenintervalle betragen beim intravenösen Glucosetoleranztest (ivGTT) in Relation zur Glucosegabe -15, -5, 4, 8, 12, 18, 25, 36, 45, 60, 90 und 120 min und waren damit um die beiden Proben in der 90. und 120. min erweitert, verglichen mit dem Testdesign von Bossaert et al. (2009). Zum Zeitpunkt „0“ wurde 40%-ige Glucoselösung (Glucosel-40%, Selectavet Dr. Otto Fischer GmbH, Weyarn/ Holzolling) in einer Dosierung von 150 mg Glucose je kg Körpergewicht (KGW) intravenös verabreicht. Mit Beendigung der Glucoseinjektion, die sich gewöhnlich über 30 bis 60 s erstreckte, wurde die Zeitmessung zur nächsten Blutprobe gestartet. Innerhalb einer Stunde wurden die Blutproben abzentrifugiert (3500 x g, 20 min, Umgebungstemperatur) und das gewonnene Serum und Plasma in Eppendorfgefäße pipettiert. Diese wurden bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

### 3.3.4.3 Intravenöser Insulintoleranztest

Der intravenöse Insulintoleranztest (ivITT) wurde ausschließlich bei den männlichen Versuchstieren, zwei Tage nach dem ivGTT durchgeführt. Die Beprobungsintervalle lagen in Relation zur Insulingabe bei -15, -5, 15, 30 und 45 min. Zum Zeitpunkt „0“ wurde den Kälbern eine mit isotonischer Natriumchloridlösung verdünnte Lösung von humanem rekombinantem Insulin (Actrapid® Penfill®, 100 I.E./mL, Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Dänemark) intravenös verabreicht. Die Dosierung betrug 0,05 I.E. Insulin je kg KGW. Die Blutproben wurden innerhalb 1 h abzentrifugiert (3500 x g, 20 min, Umgebungstemperatur) und in Eppendorfgefäße pipettiert. Bis zum Verbringen in die Zentrifuge wurden die NaF-Röhrchen in Eiswasser gekühlt.

### 3.3.5 Leberbiopsien

Die Entnahme der Leberbiopsien wurde nur bei klinisch unauffälligen Kälbern durchgeführt. In VP1 wurde der Termin auf LT 19, in VP3 auf LT 100 festgelegt. Für den Eingriff sollten die Kälber sediert werden um am liegenden Tier die Leber punktieren zu können. Bei den ersten Tieren im Versuch wurde die Probenentnahme in VP1 mit der Enthornung kombiniert, da hierzu ohnehin eine Gabe von Xylazin (0,3 mg/ kg KGW, Xylarium®, Ecuphar N.V., Oostkamp, Belgien) notwendig war. Im Verlauf des Versuchs stellte sich jedoch heraus, dass die Anwendung des Medikaments Einfluss auf die Analyseergebnisse der Biopsien haben könnte. Davon musste ausgegangen werden, da es durch den agonistischen Effekt von Xylazin auf die  $\alpha_2$ -Rezeptoren der  $\beta$ -Zellen des Pankreas zu einem Abfall des Plasmainsulinspiegels kommen und in Verbindung mit einer gesteigerten hepatischen Gluconeogenese (die durch schwache  $\alpha_1$ -agonistische Wirkung des Wirkstoffs hervorgerufen wird) eine Hyperglykämie resultieren kann (Hsu und Hummel, 1981). Die Aktivität von Enzymen der Gluconeogenese, deren Messung Gegenstand der Untersuchung war, könnte durch diese Prozesse beeinflusst werden. Deshalb wurde bei den folgenden Probenahmen auf eine Sedierung verzichtet.

Orientiert an der Methode von Swanson et al. (2000) wurde als Entnahmestelle der Bereich zwischen der 11. und 12. Rippe, ca. 15 cm unterhalb der Rückenlinie gewählt. Die Stelle wurde rasiert, gereinigt und anschließend mit alkoholischer Jodlösung entfettet und desinfiziert (Braunoderm®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen). Es wurde eine Lokalanästhesie (8-10 mL Minocain 2 %, Albrecht GmbH, Aulendorf) zur Desensibilisierung der Haut und der darunterliegenden Bauchwand durchgeführt. Etwa 10 min später wurde eine kleine Inzision in der Haut gesetzt, die mit 1 cm Länge ausreichte, um die Biopsienadel („Berliner Modell“, Eickemeyer Medizintechnik für Tierärzte, Tuttlingen) durchzulassen. Trokar und Hohlnadel wurden durch die Bauchwand gestochen. Direkt an der Bauchwand anliegend erreichte man die viszerale Oberfläche der Leber, die in Richtung des gegenüberliegenden Ellenbogengelenks perforiert wurde. Der Trokar wurde entnommen und die Hohlnadel mit schnellen Bewegungen mehrfach in das Lebergewebe vorgeschoben. Beim Zurückziehen der Nadel musste, um ein Vakuum zu erzeugen, der Finger auf die hintere Öffnung der Nadel gelegt werden. Das entnommene Lebermaterial wurde direkt in eine Petrischale mit eisgekühlter 0,9 %-iger Kochsalzlösung (500 mL Aqua dest. und 4,5 g Natriumchlorid, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) gegeben und dort maximal 15 min aufbewahrt. Den Kälbern wurden nach der Entnahme der Probe Ceftiofur (1 mg/kg KGW, Readycef® 50 mg/mL, Virbac Tierarzneimittel GmbH, Bad Oldesloe) und Meloxicam

(0,5 mg/kg KGW, Metacam® 20 mg/mL, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein) verabreicht und die Inzisionsstelle mit Blauspray (Nixal® Spray, Rebopharm GmbH, Bocholt) versorgt. Die Leberproben wurden in frischer Kochsalzlösung ausgewaschen, so dass möglichst keine Rückstände von Blut mehr enthalten waren, und auf einem Sieb in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die vereisten Leberstückchen wurden in 2 mL-Probengefäße gefüllt (Mikro-Schraubröhre mit anhängendem Schraubverschluss Typ I, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) und in einem Flüssigstickstoffbehälter (XT21-AI, Taylor-Wharton Germany GmbH, Husum) so aufbewahrt, dass die Probenröhrchen nicht in die Flüssigphase eintauchten. Die Lagertemperatur betrug damit ca. -155 °C.

### **3.4 Analysen**

#### **3.4.1 Gesamteiweiß**

Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts erfolgte nach der Zentrifugation der Blutproben aus dem Serum. Es wurde ein Handrefraktometer (Klinisches Hand-Refraktometer RF.5612, Euromex Microscopen B.V., Arnhem, Niederlande) verwendet. Zur Messung wird ein Tropfen Serum auf die Prismenfläche gegeben und die Abdeckung geschlossen. Beim Blick durch das Okular kann der Messwert direkt an der Skala „*Serum Protein*“ in g/dL abgelesen werden.

#### **3.4.2 $\beta$ -Hydroxybutyrat**

Die Analyse der Konzentration von  $\beta$ -Hydroxybutyrat im Blutserum der Probanden wurde im klinischen Labor der Klinik für Rinder, Tierärztliche Hochschule Hannover, am Analyseautomaten (ABX Pentra 400, Horiba ABX SAS, Montpellier, Frankreich) durchgeführt. Der verwendete enzymatische UV-Test (Ranbut D-3-Hydroxybutyrate, Art. RB 1007, Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK) basiert auf folgendem Reaktionsprinzip: Das in der Probe enthaltene BHB wird mit Hilfe des Enzyms BHB-Dehydrogenase zu Acetoacetat oxidiert. Als Cofaktor dient  $\text{NAD}^+$ , das bei Ablauf der Reaktion zu NADH reduziert wird. Die damit verbundene Änderung des gemessenen Absorptionsgrades ist abhängig von der BHB-Konzentration im Serum.

#### **3.4.3 Nichtveresterte Fettsäuren**

Für die Bestimmung der freien Fettsäuren im Serum wurde ein enzymatischer Farbttest (NEFA C ACS-ACOD-Methode, Wako Chemicals GmbH, Neuss) verwendet, der im klinischen Labor der Klinik für Rinder, Tierärztliche Hochschule Hannover, mit Hilfe eines Analyseautomaten (ABX Pentra 400, Horiba ABX SAS, Montpellier, Frankreich)

durchgeführt wurde. Bei der angewendeten Analyseverfahren werden in der Probe enthaltene NEFA in Anwesenheit von Coenzym A (CoA) und ATP durch Acyl-CoA-Synthetase zu Acyl-CoA, Adenosinmonophosphat (AMP) und Phosphorsäure (PPi) umgesetzt. Katalysiert durch Acyl-CoA-Oxidase reagiert das entstandene Acyl-CoA weiter zu 2,3-trans-Enoyl-CoA und Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Im letzten Reaktionsschritt, der die Anwesenheit von Peroxidase (POD) voraussetzt, wird unter Einwirkung von 3-Methyl-N-Ethyl-N-(β-Hydroxyethyl)-Anilin (MEHA) und 4-Aminophenazon ein roter Farbstoff gebildet, dessen Intensität proportional zur Konzentration freier Fettsäuren ist.

#### **3.4.4 Glucose**

Der Blutglucosewert wurde aus Natriumfluoridplasma bestimmt. Die Analyse wurde vom klinischen Labor der Klinik für Rinder, Tierärztliche Hochschule Hannover, durchgeführt, wo die Messung an einem Analyseautomaten für klinische Chemie (ABX Pentra 400, Horiba ABX SAS, Montpellier, Frankreich) erfolgte. Für die Bestimmung der Blutglucosekonzentration wurde die Hexokinase-Methode (Glucose Hexokinase Fluid 5+1, mti diagnostics GmbH, Idstein) angewendet. Hierbei wird die in der Probe enthaltene Glucose in Anwesenheit von Adenosintriphosphat (ATP) zu Glucose-6-Phosphat (G6P) phosphoryliert. Als Katalysator dient das Enzym Hexokinase. G6P wird durch ein weiteres Enzym (G6P-Dehydrogenase) zu Gluconat-6-Phosphat umgesetzt. Das bei der Reaktion beteiligte Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP) wird dabei zu NADPH<sub>2</sub> reduziert. Die gebildete Menge an NADPH<sub>2</sub> ist proportional zur Glucosekonzentration und dient schließlich als Messsignal.

#### **3.4.5 Insulin**

Die Messung des Plasmainsulingehalts aus den entnommenen Proben wurde im endokrinologischen Labor der Tierärztlichen Hochschule Hannover vorgenommen. Es wurde ein Radioimmunoassay (IM3210, Immunotech, Beckmann Coulter, Brea, Kalifornien, USA) verwendet. Der Intra-Assay-Variationskoeffizient (CV) lag bei 7,6 % der Inter-Assay-CV lag bei 10,7 %.

#### **3.4.6 Leptin**

Für die Bestimmung der Leptingehalte in den Blutproben der Kälber wurde ein kompetitiver Enzym-Immunoassay (EIA, Sauerwein et al., 2004) im Labor des Instituts für Tierwissenschaften der Universität Bonn durchgeführt. Die verwendeten Mikrotiterplatten (EIA plate 9018, Corning Costar, Cambridge, MA, USA) wurden mit Anti-Kaninchen-

Antikörpern beschichtet und freie Bindungsstellen mit Casein blockiert. Für die Analyse wurden die vorverdünnten Serumproben jeweils im doppelten Ansatz in die Vertiefungen der Platten pipettiert (50 µL) und Antiserum zugegeben. Nach 16 – 18 Stunden Inkubationszeit kam im nächsten Schritt biotinyliertes Leptin als Tracer zum Einsatz und es folgten weitere 2 Stunden Inkubation. Als Substrat zur Quantifizierung der gebundenen Komplexe wurde Streptavidin-Peroxidase eingesetzt (beschrieben von Hennies et al., 2001). Nach dem Abstoppen der Reaktion mit Oxalsäure erfolgte die Auswertung der Mikrotiterplatte mittels Synergy™ H1 Microplate Reader (BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall). Der Intra- bzw. Inter-Assay CV betrug 3,6 bzw. 7,8 %, die minimale Nachweisgrenze lag bei 0,3 ng/mL.

### **3.4.7 Genexpression gluconeogenetischer Enzyme im Lebergewebe**

#### 3.4.7.1 mRNA-Menge der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase

Der Nachweis der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK)-mRNA aus den Leberbiopsaten erfolgte mittels RT-qPCR (Quantitative Reverse Transkriptions Polymerase Kettenreaktion) im molekularbiologischen Labor des Instituts für Tierwissenschaften, Abteilung Physiologie und Hygiene, der Universität Bonn. Hierfür wurde die RNA aus den homogenisierten Proben mittels Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) extrahiert und anschließend gereinigt. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde durch Extinktionsmessung bei 260 und 280 nm mit dem Nanodrop 1000 (peQLab Biotechnology, Erlangen) bestimmt. Mittels Ethidiumbromid-Denaturierungs-RNA-Gelelektrophorese und bei ausgewählten Proben zusätzlich durch Mikrokapillarelektrophorese im Bioanalyser 2100 mit RNA 6000 Nano Kit System (Agilent, Waldbronn) erfolgte die Überprüfung der Intaktheit der RNA. Aus diesen Messungen wurden die RIN (*RNA Integrity Number*)-Werte bestimmt. Anschließend wurde eine Reverse Transkription durchgeführt, um cDNA für die darauf folgende PCR zu erhalten. Hierfür wurden 250 ng RNA pro 20 µL Reaktionsvolumen eingesetzt und mit 1 µL (200 U) Revert Aid™ Reverser Transkriptase, 1µL dNTP Mix (je 10mM dNTP) und 0,5 µL (20 U) RiboLock Ribonuklease-Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot) sowie 200 pmol Random Hexamer Primer (Sigma-Aldrich, Nümbrecht) für 10 min bei 27 °C, 60 min bei 42 °C und 1 min bei 99 °C inkubiert. Die reverse Transkription wurde jeweils im doppelten Ansatz durchgeführt und anschließend für die PCR kombiniert, um die Variation der cDNA-Synthese zu verringern.

Zur Durchführung der qPCR wurden jeweils als dreifacher Ansatz 2 µL cDNA (Verdünnung 1:4) als Template, 1 µL assay-spezifischer Primer Mix sowie 5 µL SYBR Green JumpStart Taq Readymix (Sigma-Aldrich, Steinheim) und 2 µL Wasser zu einem Gesamtvolumen von

10 µL zusammengefügt. Die Reaktion wurde in einem Mx3000P cycler (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt.

Die drei verwendeten Referenzgene (REF) waren bereits in einer vorangegangenen Arbeit im durchführenden Labor validiert worden (Saremi et al., 2012). Es handelte sich um EIF3K (Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit K), HPCAL1 (Hippocalcin-like 1) und LRP10 (Low density lipoprotein receptor-related protein 10) (Primersequenzen siehe Tabelle 6). Mit dem Programm qBASE Version 2.0 (Biogazelle, Ghent, Belgien) wurden alle folgenden Berechnungen und Qualitätskontrollen der vorhandenen Daten durchgeführt (Hellemans et al., 2007), nachdem die C<sub>q</sub> (quantification cycles)-Werte eingegeben worden waren. Man erhält dadurch genormte und kalibrierte Werte, die sogenannten CNRQ-Werte (*Calibrated Normalized Relative Quantity*).

#### 3.4.7.1 mRNA-Menge der Pyruvat-Carboxylase

Für die Analyse der Pyruvat-Carboxylase (PC)-mRNA aus den entnommenen Leberbiopaten wurde ebenfalls die Methode der RT-qPCR eingesetzt, die bereits im Abschnitt 3.4.7 für PEPCK beschrieben wurde.

**Tabelle 6:** Primersequenzen der Ziel- und Referenzgene für die RT-qPCR

	Forward Primer Sequenz (5'-3')	Reverse Primer Sequenz (5'-3')	Zugangsnummer
<i>Gene</i>			
<b>PC</b>	ATCTCCTACACGGGTGACGT	TGTCGTGGGTGTGGATGTGCA	NM_177946
<b>PEPCK-C</b>	AACTCACGGTTCTGCACTCCA	GGTCGTGCATGATGACTTTGC	NM_174737
<b>EIF3K</b>	CCAGGCCCAACAAGAAGAA	TTATACCTTCCAGGAGGTCCATGT	NM_001034489
<b>HPCAL</b>	CCATCGACTTCAGGGAGTTC	CGTCGAGGTCATACATGCTG	NM001098964
<b>LRP10</b>	CCAGAGGATGAGGACGATGT	ATAGGGTTGCTGTCCCTGTG	BC149232

PC: Pyruvat-Carboxylase; PEPCK-C: Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase; EIF3K: Eukaryotic translation initiation factor 3; HPCAL: Hippocalcin-like 1; LRP10: Lipoprotein receptor-related protein 10;

### 3.5 Berechnungen

#### 3.5.1 Energieaufnahme

Um die Aufnahme von umsetzbarer Energie (ME) aus den Futtermitteln zu ermitteln wurden im ersten Schritt die Energieaufnahme aus der Tränke und die aus dem Kraftfutter einzeln berechnet. Für die Gesamtmenge an aufgenommener Energie wurden beide Werte addiert.

Zur Berechnung des Energiegehalts im MAT wurde die Schätzformel für MAT nach Jentsch et al. (2000) angewendet:

$$MJ\ ME/kg_{MAT} = \frac{vXP \cdot 18,1 + vXL \cdot 32,4 + vNfE \cdot 15,2}{1000}$$

wobei

vXP = verdauliches Rohprotein [g/kg TM]

vXL = verdauliches Rohfett [g/kg TM]

vNfE = verdauliche stickstofffreie Extraktstoffe [g/kg TM].

Als Verdaulichkeiten wurden folgende Werte angenommen: XP 97 %, XL 90 % und NfE 98 %. Es ergibt sich damit für den im Versuch verfütterten Milchaustauscher „MAT Neumühle sauer“ (Trouw Nutrition Deutschland GmbH, Burgheim) ein Energiegehalt von 16,31 MJ ME/kg TM errechnet aus den Werten der Futtermittelanalysen (siehe Tabelle 3).

Sowohl für Vollmilch als auch für Biestmilch wurden die Energie- und Trockenmassegehalte der DLG-Futterwerttabelle für Wiederkäuer (1997) entnommen (siehe Tabelle 7) und anhand dieser die aufgenommene Energie berechnet (LT 0 bis 2: alle Gruppen Kolostrum, ab LT 3: MATr und MATadl Energie aus MAT und VMadl Energie aus Vollmilch).

**Tabelle 7:** Futterwert von Milchprodukten und pflanzlichen Eiweißträgern für Tränkkälber (DLG-Futterwerttabellen, 1997), je kg Trockenmasse

<b>Futtermittel</b>	<b>TM</b>	<b>Rohasche</b>	<b>XP</b>	<b>Kasein</b>	<b>XL</b>	<b>Lactose (Zucker)</b>	<b>Umsetzbare Energie</b>
	g/kg	g	g	g	g	g	MJ ME
<b><i>Kolostralmilch</i></b>	170	57	420	160	260	215	18,3
<b><i>Vollmilch</i></b>	140	54	264	185	321	362	19,3

TM = Trockenmasse, XP = Rohprotein, XL = Rohfett

Zur Berechnung der Energieaufnahme aus dem Kraftfutter wurde der im Labor der LUFA gemessene Trockenmasse- und Energiegehalt des Kälberfutters RWZ-Kälberkraft Extra (Raiffeisen Waren-Zentrale Rhein-Main eG, Köln, siehe Tabelle 4) zu Grunde gelegt. Um die

gesamte Energieaufnahme aus dem Futter zu ermitteln wurde die Summe aus der Energieaufnahme aus Tränke und der Energieaufnahme aus Kraftfutter gebildet. Die Tiere fraßen zwar auch Heu, aus technischen Gründen war jedoch die Messung der aufgenommenen Heumenge pro Tier nicht möglich. Da die Kälber während der Tränkephase (insbesondere in VP1) generell nur geringe Mengen an Heu aufnahmen, wurde die Energiezufuhr aus Heu in der Gesamtsumme der umsetzbaren Energie nicht berücksichtigt.

### 3.5.1 Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index

Der *Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index* (RQUICKI) wurde nach der Formel berechnet, die für die Humanmedizin bei Perseghin et al. (2001) beschrieben ist. Sie fand bereits Anwendung bei laktierenden Milchkühen (Holtenius und Holtenius, 2007) und bei Kälbern (Bossaert et al., 2009). Dieser Wert zur Schätzung der Insulinsensitivität leitet sich aus den Konzentrationen von Glucose (Gluc, mg/dL), Insulin (Ins,  $\mu\text{U/mL}$ ) und NEFA (NEFA, mmol/L) zu einem bestimmten Zeitpunkt wie folgt ab:

$$RQUICKI = \frac{1}{\log(\text{Gluc}) + \log(\text{Ins}) + \log(\text{NEFA})}$$

Die Konzentrationen von Glucose und NEFA wurden vorab in die oben angegebenen Einheiten umgerechnet.

### 3.5.2 Auswertung der intravenösen Glucose- und Insulintoleranztests

#### 3.5.2.1 Basalwerte

Als Basalwerte der Insulin ( $I_b$ )- und Glucosespiegel ( $G_b$ ) wurde der Mittelwert der beiden Blutproben vor der Glucose- bzw. Insulingabe (zum Zeitpunkt -15 und -5 min) angenommen.

#### 3.5.2.2 Area under the curve

Die *Area under the curve* (AUC) der Verlaufskurven des Glucosespiegels ( $AUC_{\text{Gluc}}$ ) und des Insulinspiegels ( $AUC_{\text{Ins}}$ ) wurden mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornien, USA) berechnet. Als Grundlinie wurde jeweils der Basalwert (wie oben berechnet) angenommen. Die Berechnung der AUC stellt den totalen Anstieg der Glucose-bzw. Insulinkonzentration über den Basalwert bis 120 min nach Glucosegabe dar (Bossaert et al., 2009).

#### 3.5.2.3 Differenz zwischen Basalwert und Peak

Als  $\Delta_{\text{Peak}}$  definiert sich die Differenz zwischen dem Basalwert (Mittelwert aus den Proben zum Zeitpunkt -15 und -5 min) und dem ersten Peak der Plasmakonzentrationskurve.

#### 3.5.2.4 Insulin-stimulated blood glucose response

Wie bei Oikawa und Oetzel (2006) beschrieben, wurde zur Auswertung der ivITTs der *Insulin-stimulated blood glucose response* (ISBGR) berechnet. Hierzu wurde folgende Formel angewendet:

$$ISBGR = \left( \frac{G_b - G_{30}}{G_b} \right) \cdot 100$$

wobei  $G_b$  die basale Glucosekonzentration als Mittelwert der Konzentration zum Zeitpunkt -15 und -5 min des Tests darstellt und  $G_{30}$  der gemessene Wert bei 30 min.

### 3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der im vorliegenden Versuch erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe des Programm SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 20.0, International Business Machines Corp., Armonk, NY, USA).

Mittels Kolmogorov-Smirnov-Test wurden die Daten auf Normalverteilung getestet, der Levene's Test wurde zur Überprüfung auf Varianzhomogenität angewendet.

Gruppenunterschiede zu bestimmten Zeitpunkten (Geburtsgewichte, Körpergewichte zu Ende der VP, erste Biestmilchaufnahme) wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, Normalverteilung und Varianzhomogenität) ermittelt.

Für alle anderen Analysen wurde ein lineares gemischtes Modell angewendet. Gruppe, Geschlecht, VP und die Interaktion zwischen Gruppe und VP wurden hier als fixe Effekte, das Kalb innerhalb der Gruppe als zufälliger Effekt berücksichtigt. Für Mehrfachvergleiche wurde der Bonferroni Post-hoc-Test eingesetzt.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (MW)  $\pm$  1 Standardfehler (SE) dargestellt. Unterschiede wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ( $p < 0,05$ ) als signifikant, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen 5 und 10 % ( $0,1 > p \geq 0,05$ ) als tendenziell angenommen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Leistungsparameter

#### 4.1.1 Tränkeaufnahme

Die erste Biestmilchaufnahme lag im Mittelwert bei allen drei Gruppen bei  $2309 \pm 124$  g und unterschied sich zwischen den Gruppen nicht. Bei Betrachtung der einzelnen Versuchsphasen zeigte sich, dass die Gruppen in Abhängigkeit zur Versuchsphase unterschiedliche Tränkeaufnahmen realisierten ( $p < 0,001$ ). In VP1 riefen die beiden *ad libitum*-Gruppen nahezu 50% mehr Tränke ab als die Gruppe MATr (siehe Tabelle 8). Nach dem Heruntersetzen der Tränkemenge in den Gruppen MATadl und VMadl auf das Tränkeprotokoll der Gruppe MATr ab VP2, nahmen die Kälber aller Gruppen im Schnitt  $5757 \pm 29$  g Tränke auf. Es gab keinen Gruppenunterschied mehr. Auch ein Unterschied zwischen den Geschlechtern war nicht festzustellen.

#### 4.1.2 Kraftfutteraufnahme

Die Aufnahme von Kraftfutter war in VP1 insgesamt sehr moderat, im Schnitt nahmen die Tiere in dieser Phase nur  $0,15 \pm 0,01$  kg Kraftfutter auf. Zwischen den Gruppen gab es hier keinen Unterschied. Die Kälber der Gruppe VMadl zeigten den deutlichsten Anstieg der Kraftfutteraufnahme im zeitlichen Verlauf von VP1 nach VP2 (im Mittel der VP um das 18-fache). Dies führte dazu, dass die Gruppe VMadl in VP2 0,21 kg mehr Kraftfutter aufnahm als die Gruppe MATadl ( $p < 0,10$ , siehe Tabelle 8). Die Tiere der Gruppe MATr unterschieden sich in VP2 nicht von den beiden anderen Gruppen.

#### 4.1.3 Energieaufnahme

Die Energieaufnahme wird als umsetzbare Energie (ME) in MJ/Tag angegeben und wurde wie in Punkt 3.5.1 beschrieben berechnet.

##### 4.1.3.1 Energieaufnahme aus Tränke

Die Versuchsgruppen hatten über die gesamte Tränkeperiode unterschiedlich hohe Energieaufnahmen aus der Tränke. Die Gruppe VMadl nahm täglich mindestens 10% mehr Energie über die Tränke auf als die Gruppe MATadl. Die Kälber der Gruppe MATadl wiederum konnten ca. 25% mehr Energie aus der Tränke aufnehmen als Kälber der Gruppe MATr (VMadl  $16,4 \pm 0,2 >$  MATadl  $14,8 \pm 0,2 >$  MATr  $11,4 \pm 0,1$  MJ ME/Tag,  $p < 0,001$ ). Betrachtet man die Gruppenunterschiede in Abhängigkeit von der VP stellt man fest, dass die Gruppenunterschiede hauptsächlich aus VP1 herrührten (siehe Tabelle 8). Hier übertrafen die

Tiere der Gruppe VMadl in der Energieaufnahme aus Tränke die Gruppen MATadl und MATr um einen Faktor von 1,2 bzw. 2,1 ( $p < 0,001$ ). Auch der Vergleich der Versuchsphasen zeigte, dass die höchste Energieaufnahme der Tiere in VP1 realisiert wird ( $19,7 \pm 0,2$  MJ ME/Tag), die zweithöchste in VP0 mit  $13,9 \pm 0,6$  und schließlich die niedrigste in VP2 mit  $10,8 \pm 0,1$  MJ ME/Tag ( $p < 0,001$ ). Die Geschlechter unterschieden sich nicht.

### 4.1.3.2 Energieaufnahme aus Kraftfutter

In VP0 wurde kein Kraftfutter angeboten. Von VP1 zu VP2 stieg die Kraftfutteraufnahme um das 5-bis 10-fache an und damit auch die Energie, die aus Kraftfutter aufgenommen wurde (VP1  $0,53 \pm 0,04$  vs. VP2  $12,1 \pm 0,2$  MJ/Tag,  $p < 0,001$ ). Die aus Kraftfutter aufgenommene Energie unterschied sich über die gesamte Tränkephase nicht zwischen den Gruppen. Betrachtet man jedoch die Gruppenunterschiede in Abhängigkeit von der Versuchsphase, so nahm in VP2 die Gruppe VMadl  $2,0$  MJ/Tag ( $p < 0,05$ ) und MATr  $1,8$  MJ/Tag ( $p < 0,1$ ) mehr Energie aus Kraftfutter auf als MATadl (siehe Tabelle 8). Ein Geschlechterunterschied war nicht zu verzeichnen.

### 4.1.3.3 Energieaufnahme gesamt

Aus den oben dargestellten Ergebnissen für die ME-Aufnahme aus Tränke und Kraftfutter ergab sich in Summe der aufgenommenen Energie, dass die Tiere der Gruppe MATr insgesamt gesehen bis LT 70 signifikant weniger Energie aufgenommen hatten als die beiden anderen Gruppen. Allerdings lagen auch die Kälber aus MATadl in der gesamten Energieaufnahme  $2,8$  MJ/Tag unter den Werten der Vollmilch-Gruppe (MATr  $19,9 \pm 0,2 < MATadl 21,6 \pm 0,2 < VMadl 24,4 \pm 0,2$  MJ/Tag,  $p < 0,001$ ). Mit zunehmendem Alter stieg die Energieaufnahme an (VP1  $20,3 \pm 0,3$  vs. VP2  $22,9 \pm 0,1$  MJ/Tag,  $p < 0,001$ ). Wirft man einen Blick auf die einzelnen Versuchsphasen stellt man fest, dass die Gruppenunterschiede signifikant nur in VP1 vorhanden waren. Auch wenn in VP2 die Gruppe MATadl numerisch um ca.  $1,6$  MJ/Tag tiefer lag als die beiden anderen Gruppen, so konnte dieser Unterschied statistisch nicht abgesichert werden (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Aufnahme von Tränke, Kraftfutter und umsetzbarer Energie (ME) in den verschiedenen Versuchsphasen

	VP0 (LT 0 und 1)			VP1 (LT 2 bis 27)			VP2 (LT 28 bis 69)		
	MATr (n = 20)	MATadl (n = 17)	VMadl (n = 20)	MATr (n = 19)	MATadl (n = 17)	VMadl (n = 20)	MATr (n = 19)	MATadl (n = 17)	VMadl (n = 20)
<b>Tränkeaufnahme</b> [g/Tag]	4015 ±243	4827 ±348	4736 ±410	6385 <sup>b</sup> ±39	9249 <sup>a</sup> ±150	9470 <sup>a</sup> ±137	5724 ±50	5833 ±53	5723 ±50
<b>Kraftfutter-</b> <b>aufnahme</b> [kg/Tag]	-	-	-	0,25 ±0,02	0,10 ±0,01	0,07 ±0,01	1,23 <sup>AB</sup> ±0,02	1,05 <sup>B</sup> ±0,03	1,26 <sup>A</sup> ±0,02
<b>ME aus Tränke</b> [MJ/Tag]	12,5 ±0,76	15,0 ±1,08	14,4 ±1,29	12,3 <sup>c</sup> ±0,09	21,1 <sup>b</sup> ±0,34	25,7 <sup>a</sup> ±0,37	10,7 ±0,09	10,9 ±0,10	10,7 ±0,09
<b>ME aus</b> <b>Kraftfutter</b> [MJ/Tag]	-	-	-	1,04 ±0,11	0,32 ±0,05	0,23 ±0,04	12,6 <sup>A</sup> ±0,25	10,8 <sup>Bb</sup> ±0,25	12,8 <sup>a</sup> ±0,25
<b>ME gesamt</b> [MJ/Tag]	-	-	-	13,0 <sup>c</sup> ±0,14	21,5 <sup>b</sup> ±0,39	26,2 <sup>a</sup> ±0,43	23,3 ±0,21	21,7 ±0,20	23,5 ±0,21

Daten angegeben als MW ± SE

unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p < 0,05$ ),

unterschiedliche Großbuchstaben kennzeichnen Trends ( $p < 0,10$ ),

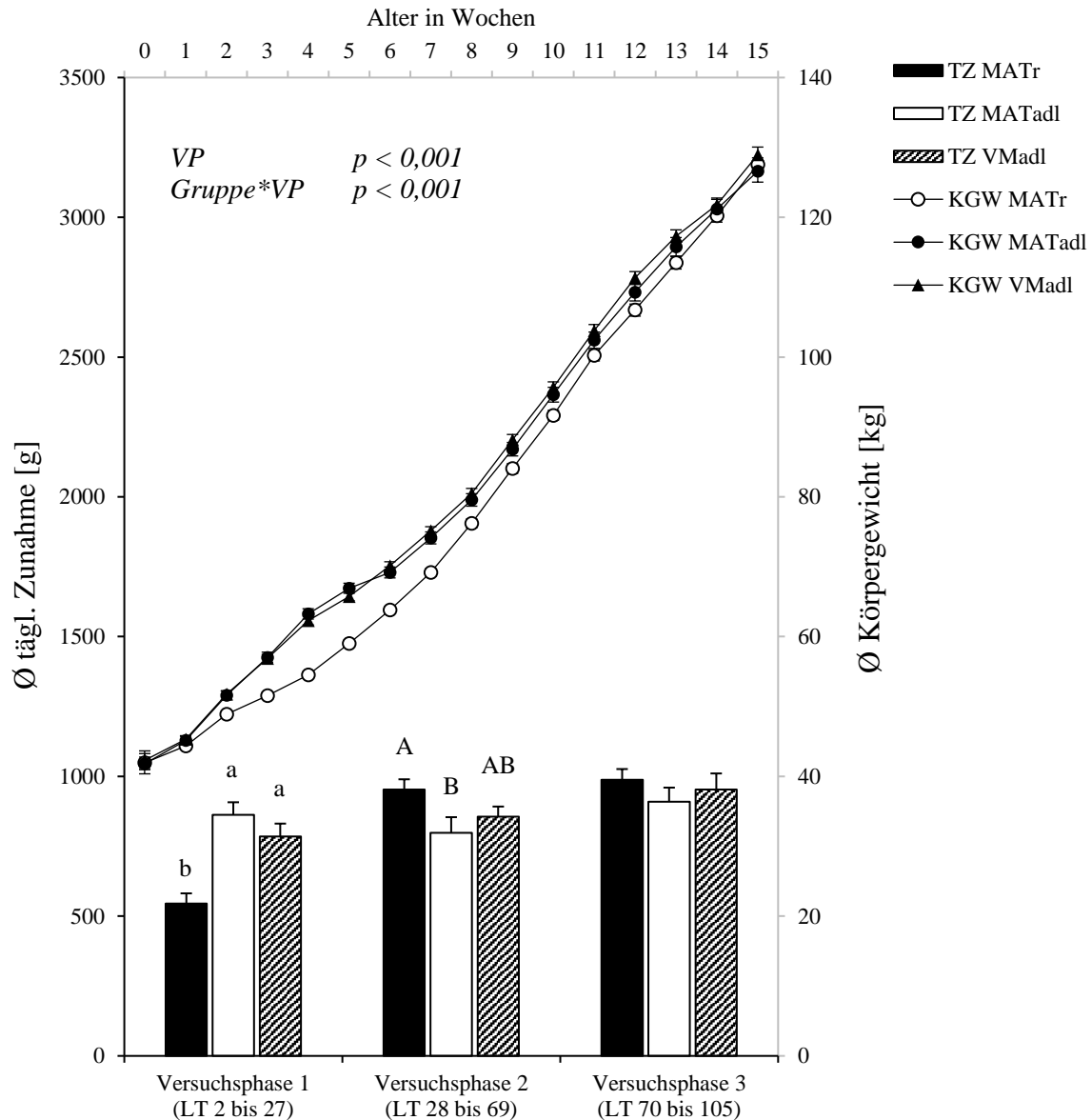
VP = Versuchsperiode, LT = Lebenstag, MATr = restriktive Milchaustauschertränke,

MATadl = Milchaustauschertränke *ad libitum*, VMadl = Vollmilchtränke *ad libitum*, ME = umsetzbare Energie

#### 4.1.4 Körpergewicht und tägliche Zunahmen

Die Geburtsgewichte der Kälber unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht. Im Schnitt wogen die Kälber aller Gruppen  $42,0 \pm 0,7$  kg zum Zeitpunkt der Geburt. Die Versuchsgruppe in Abhängigkeit von der VP hatte Einfluss auf die tägliche Zunahme und folglich auf das Gewicht der Kälber ( $p < 0,001$ ). Die Tiere der Gruppe MATr hatten in VP1 um 30% geringere Tageszunahmen ( $545 \pm 36$  g) als die Kälber der beiden anderen Gruppen (MATadl  $862 \pm 45$  und VMadl  $785 \pm 46$  g). Dies zeigte sich auch in den Gewichten zu Ende der ersten Versuchsphase. Die Kälber aus Gruppe MATr lagen mit  $56,4 \text{ kg} \pm 1,0$  fast 10 kg unter den Gewichten der beiden anderen Gruppen (MATadl  $65,4 \pm 1,9$  und VMadl  $63,9 \pm 1,8$  kg,  $p < 0,001$ ). In VP2 hatte die Gruppe MATr dafür tendenziell höhere tägliche Zunahmen als die Gruppe MATadl (MATr  $953 \pm 36$  vs. MATadl  $798 \pm 56$  g,  $p < 0,1$ ). Die Tiere aus VMadl lagen mit  $855 \pm 37$  g Zunahme numerisch zwischen den beiden anderen Gruppen, unterschieden sich von diesen jedoch statistisch nicht. Die Gewichte am Ende der

VP2 zeigten schließlich auch keine Unterschiede mehr (MATr  $95,8 \pm 1,9$ , MATadl  $98,4 \pm 2,9$ , VMadl  $99,0 \pm 2,1$  kg). In VP3 nahmen alle Tiere durchschnittlich  $952 \pm 29$  g pro Tag zu. Dies führte zu gleichen Gewichten in allen Gruppen am Ende des Versuchs (MATr  $132 \pm 2,6$ , MATadl  $131 \pm 4,2$ , VMadl  $134 \pm 3,1$  kg, siehe Abbildung 7). Des Weiteren hatte das Geschlecht Einfluss auf die täglichen Zunahmen. Die weiblichen Kälber realisierten im Schnitt geringere tägliche Zunahmen von  $824 \pm 21$  g während die männlichen durchschnittlich  $894 \pm 22$  g pro Tag zunahmen ( $p < 0,05$ ). In Abhängigkeit von der Versuchsphase unterschieden sich die beiden Geschlechter auch im absoluten Gewicht. Betrug die Gewichts Differenz in VP0 zwischen den Geschlechtern noch 2,9 kg, stieg dieser Unterschied bis zu VP3 auf 7,5 kg zu Gunsten der männlichen Tiere an ( $p < 0,001$ ).



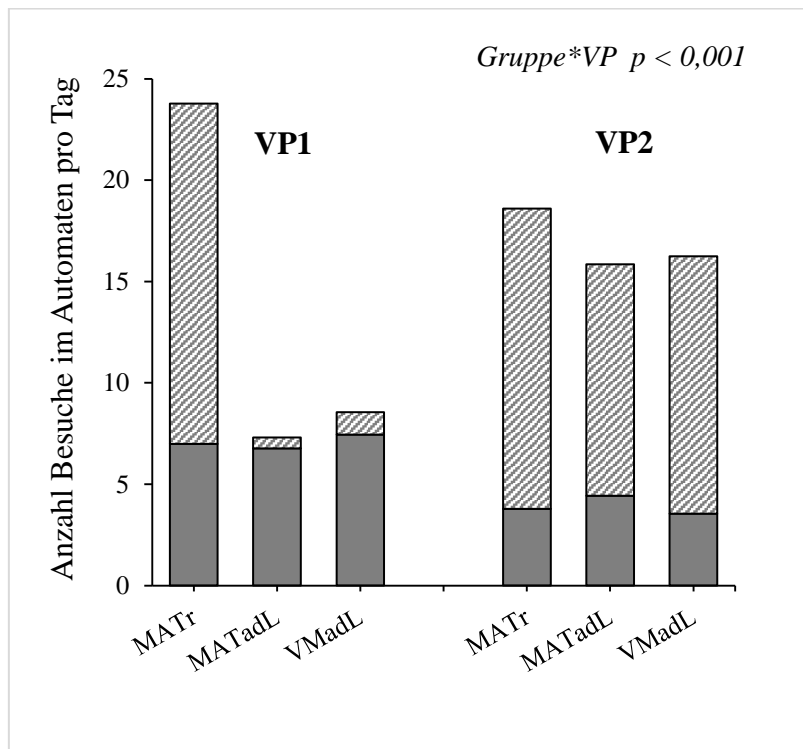
**Abbildung 7:** Tägliche Zunahme nach Versuchsphase und Entwicklung des Körpergewichtes von der Geburt bis zur 15. Lebenswoche (MW  $\pm$  SE)

n = 56, unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p < 0,05$ ), unterschiedliche Großbuchstaben kennzeichnen Trends ( $p < 0,1$ ), MATr = restriktive Milchaustauschertränke, MATadl = Milchaustauschertränke *ad libitum*, VMadl = Vollmilchtränke *ad libitum*, VP = zeitlicher Einfluss der Versuchsphase, Gruppe\*VP = Einfluss der Versuchsgruppe in Abhängigkeit zur Versuchsphase, TZ = Tägliche Zunahme, KGW = Körpergewicht, LT = Lebenstag

#### 4.2 Verhalten bei der Tränkeaufnahme

Um Unterschiede im Verhalten bei der Tränkeaufnahme (TA) festzustellen, wurde die tägliche Anzahl der Besuche in der Tränkestation erfasst. Dabei wurde differenziert ob es sich um einen erfolgreichen Besuch, also einen mit TA handelte, oder ob es sich um einen Besuch handelte, bei dem keine Tränke aufgenommen wurde. Dies kam zustande, wenn das Tier bei betreten der Station bereits die bis zu diesem Zeitpunkt erlaubte Menge abgerufen hatte oder wenn das Tier nachdem der Sender erfasst wurde die Station wieder verließ ohne Tränke abgerufen zu haben (Herausdrängen durch andere Kälber, Neugierde, etc.).

Während VP1 war die Gesamtanzahl der Besuche in der Station in der Gruppe MATr höher als in den beiden anderen Gruppen (MATr  $23,8 \pm 0,7$  vs. MATadl  $7,3 \pm 0,2$  und VMadl  $8,6 \pm 0,3$  Besuche/Tag,  $p < 0,001$ ). Der Anteil der erfolglosen Stationsbesuche bei den Kälbern der Gruppe MATr machte 70 % aller Besuche aus ( $\cong 17$  Besuchen), während bei den Kälbern der beiden anderen Gruppen im Schnitt täglich 10 % der Besuche ( $\cong 1$  Besuch) ohne TA zu verzeichnen waren ( $p < 0,001$ ). Die Anzahl der Besuche mit TA in VP1 in allen Gruppen lag durchschnittlich bei  $7,1 \pm 0,1$  je Tag, wobei die Tiere der Gruppe VMadl tendenziell mehr Besuche mit TA hatten als die Tiere der Gruppe MATadl ( $7,5 \pm 0,2$  vs.  $6,8 \pm 0,2$  Besuche/Tag,  $p < 0,1$ ). Mit dem Einführen des restriktiven Tränkeprogramms in den Gruppen MATadl und VMadl in VP2 änderte sich das Verhalten der ehemals *ad libitum* gefütterten Gruppen. Die Gesamtanzahl der Besuche/Tag verdoppelte sich im Vergleich zu VP1 (MATadl  $15,9 \pm 0,2$  und VMadl  $16,3 \pm 0,2$  Besuche/Tag;  $p < 0,001$ ). Der Anteil der erfolglosen Besuche erhöhte sich auf mehr als 70 % aller Besuche, vergleichbar mit den Werten für Gruppe MATr in VP1 und VP2 (siehe Abbildung 8). Die Kälber der Gruppe MATadl besuchten in VP2 den Automaten  $4,4 \pm 0,1$  Mal um Tränke aufzunehmen und damit häufiger als die beiden anderen Gruppen (MATr  $3,8 \pm 0,1$  und VMadl  $3,6 \pm 0,1$  Besuche/Tag,  $p < 0,05$ ). Umgekehrt hatten die Tiere der Gruppe MATr tendenziell mehr Besuche ohne TA als die Tiere der Gruppe MATadl ( $14,8 \pm 0,3$  vs.  $11,4 \pm 0,2$  Besuche/Tag,  $p < 0,1$ ) während sich die Gruppe VMadl mit  $12,7 \pm 0,2$  erfolglosen Besuchen/Tag von keiner der beiden anderen unterschied.

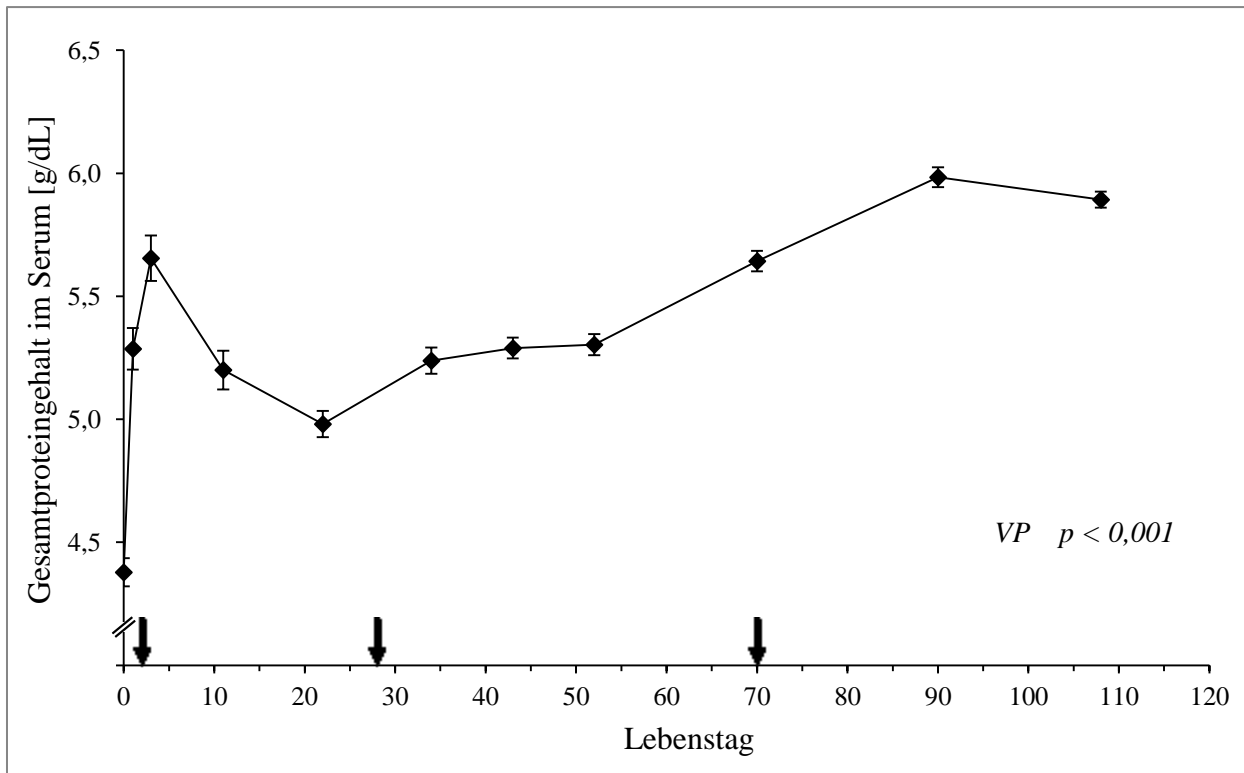


**Abbildung 8:** Tägliche Besuche im Tränkeautomaten während der Tränkephase  
 Vergleich zwischen den Gruppen MATr (restriktive Milchaustauschertränke mit einer Konzentration von 11,5 %, n = 19), MATadL (Milchaustauschertränke *ad libitum* mit einer Konzentration von 13,8 %, n = 17) und VMadL (Vollmilchtränke *ad libitum*, n = 20)  
 VP1 = Versuchsphase 1 (bis zum Alter von 27 Tagen) in der die Kälber entsprechend ihrer Gruppenzuteilung getränkt wurden, VP2 = Versuchsphase 2 in der die Tiere restriktiv getränkt wurden; einfarbige Balken: Mittlere Anzahl Besuche mit Tränkeaufnahme, schraffierte Balken: Mittlere Anzahl Besuche ohne Tränkeaufnahme weil die zugeteilte Menge bereits aufgenommen wurde; Gruppe\*VP = Einfluss der Versuchsgruppe in Abhängigkeit zur Versuchsphase

### 4.3 Blutparameter

#### 4.3.1 Gesamteiweiß

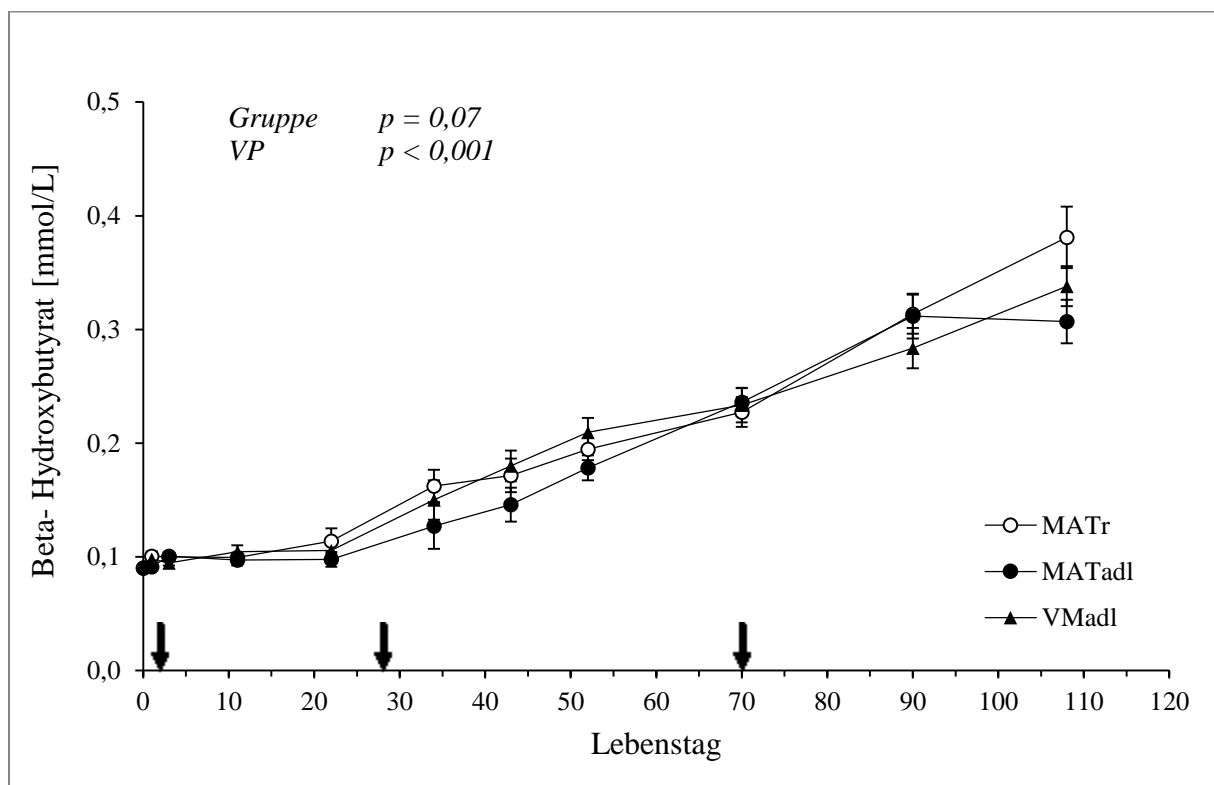
Der Serumproteinspiegel verhielt sich in allen drei Versuchsgruppen gleich. Nach der Kolostrumaufnahme stieg die Konzentration bis LT 3 um Faktor 1,3 an ( $4,4 \pm 0,1$  auf  $5,7 \pm 0,1$  g/dL). Dann sank der Proteinspiegel bis LT 22 wieder ab auf  $5,0 \pm 0,1$  g/dL, um schließlich stetig auf Werte um 6,0 g/dL anzusteigen ( $p < 0,001$ , siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Verlauf des Serumproteinspiegels [g/dL] über alle Versuchsphasen (MW  $\pm$  SE, n = 56),  $\blacktriangledown$  markiert den Wechsel der Versuchsphasen, VP = zeitlicher Einfluss der Versuchsphase

### 4.3.2 $\beta$ -Hydroxybutyrat

Das Niveau des Blut-BHB-Spiegels bewegte sich in VP0 und VP1 im sehr niedrigen Bereich um 0,10 mmol/L. Erst ab Ende der VP1 stiegen die BHB-Werte stetig bis VP3 auf  $0,29 \pm 0,01$  mmol/L an ( $p < 0,001$ ). Die Werte der Gruppe MATr lagen tendenziell über denen der Gruppe MATadl ( $0,18 \pm 0,01$  vs.  $0,16 \pm 0,01$  mmol/L,  $p = 0,07$ ). In VP2 zeigte sich dieser Trend auch zwischen VMadl und MATadl. Hier war die BHB-Plasmakonzentration in den Gruppen MATr und VMadl 1,2-fach höher als bei MATadl (MATr und VMadl  $0,18 \pm 0,01$  vs. MATadl  $0,15 \pm 0,01$  mmol/L,  $p < 0,1$ , siehe Abbildung 10).

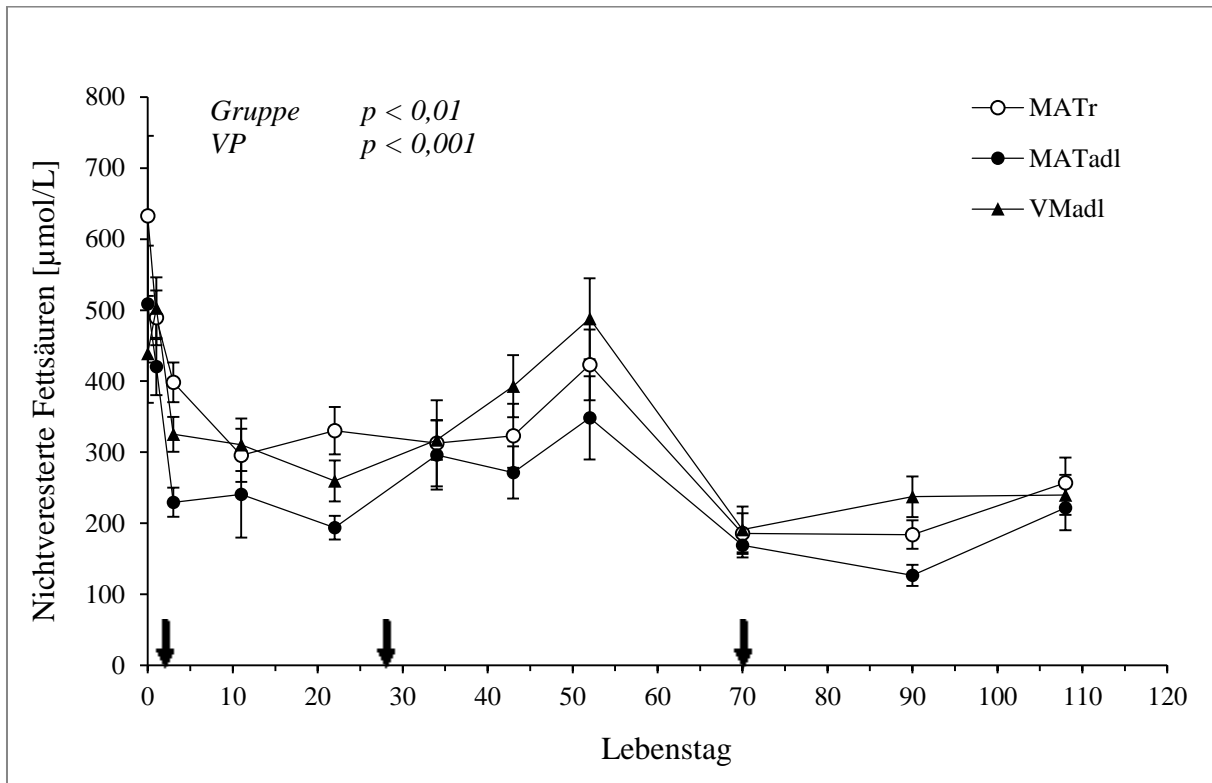


**Abbildung 10:** Verlauf der Serum-BHB-Konzentration [mmol/L]

über den gesamten Versuchszeitraum (MW  $\pm$  SE); verglichen wurden die Gruppen MATr (restriktive Milchaustauschertränke mit einer Konzentration von 11,5 %,  $n = 19$ ), MATadl (Milchaustauschertränke *ad libitum* mit einer Konzentration von 13,8 %,  $n = 17$ ) und VMadl (Vollmilchtränke *ad libitum*,  $n = 20$ ),  $\blacktriangledown$  markiert den Wechsel der Versuchsphasen, Gruppe = Einfluss der Versuchsgruppe, VP = zeitlicher Einfluss der Versuchsphase

### 4.3.3 Nichtveresterte Fettsäuren

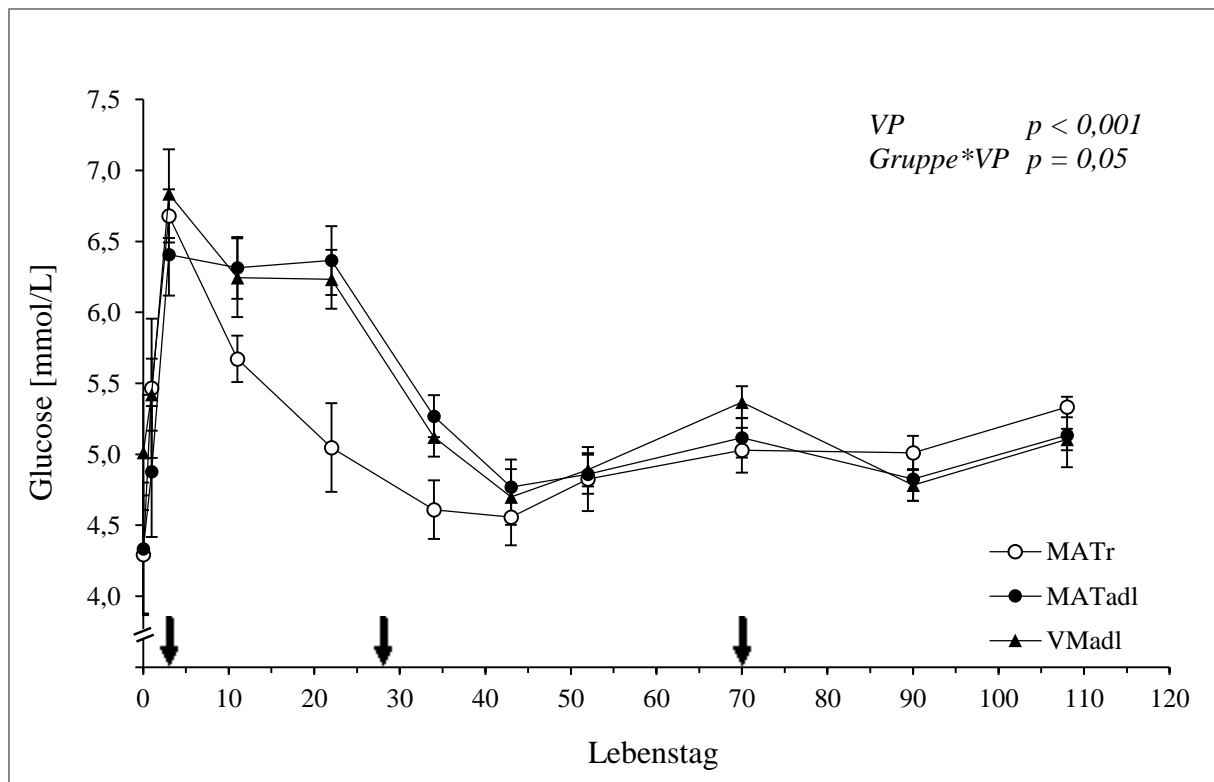
Direkt nach der Geburt wiesen die Kälber im Blut sehr hohe Konzentrationen an NEFA auf ( $526 \pm 52 \mu\text{mol/L}$ ), die aber bei allen Gruppen in VP1 auf ein Level von  $290 \pm 12 \mu\text{mol/L}$  abfielen. In VP2 stieg der NEFA-Serumspiegel wieder an ( $356 \pm 17 \mu\text{mol/L}$ ) um nach einem Spitzenwert an Tag 50 auf den bis dahin niedrigsten Wert im Versuchsverlauf von  $203 \pm 10 \mu\text{mol/L}$  in VP3 abzufallen ( $p < 0,001$ ). Obwohl der Verlauf der NEFA-Spiegel über den Versuchszeitraum in allen Gruppen gleich war, unterschieden sich die Gruppen untereinander im Niveau der Konzentrationen. Insgesamt hatte die Gruppe MATadl die niedrigsten Werte (MATadl  $275 \pm 15$  vs. MATr  $350 \pm 17 \mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0,01$  und vs. VMadl  $337 \pm 14 \mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0,05$ ). Bei Betrachtung der einzelnen Versuchsphasen lag in VP1 die NEFA-Konzentration bei MATadl ( $221 \pm 22 \mu\text{mol/L}$ ) deutlich unter der von MATr ( $342 \pm 20 \mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0,05$ ), während sich die Gruppe VMadl hier von keiner der beiden anderen unterschied. In VP2 lag die Gruppe VMadl tendenziell höher als MATadl ( $399 \pm 27$  vs.  $305 \pm 28 \mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0,1$ , siehe Abbildung 11). Die männlichen und weiblichen Tiere unterschieden sich lediglich in VP0. Hier hatten die weiblichen Kälber durchschnittlich um Faktor 1,39 höhere NEFA-Werte als die männlichen Tiere ( $578 \pm 44$  vs.  $417 \pm 32 \mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0,01$ ).



**Abbildung 11:** Verlauf der Serum-Konzentrationen von nichtveresterten Fettsäuren [ $\mu\text{mol/L}$ ] über den gesamten Versuchszeitraum ( $\text{MW} \pm \text{SE}$ ); verglichen wurden die Gruppen MATr (restriktive Milchaustauschertränke mit einer Konzentration von 11,5 %,  $n = 19$ ), MATadl (Milchaustauschertränke *ad libitum* mit einer Konzentration von 13,8 %,  $n = 17$ ) und VMadl (Vollmilchtränke *ad libitum*,  $n = 20$ ),  $\blacktriangledown$  markiert den Wechsel der Versuchsphasen, Gruppe = Einfluss der Versuchsgruppe, VP = zeitlicher Einfluss der Versuchsphase

#### 4.3.4 Glucose

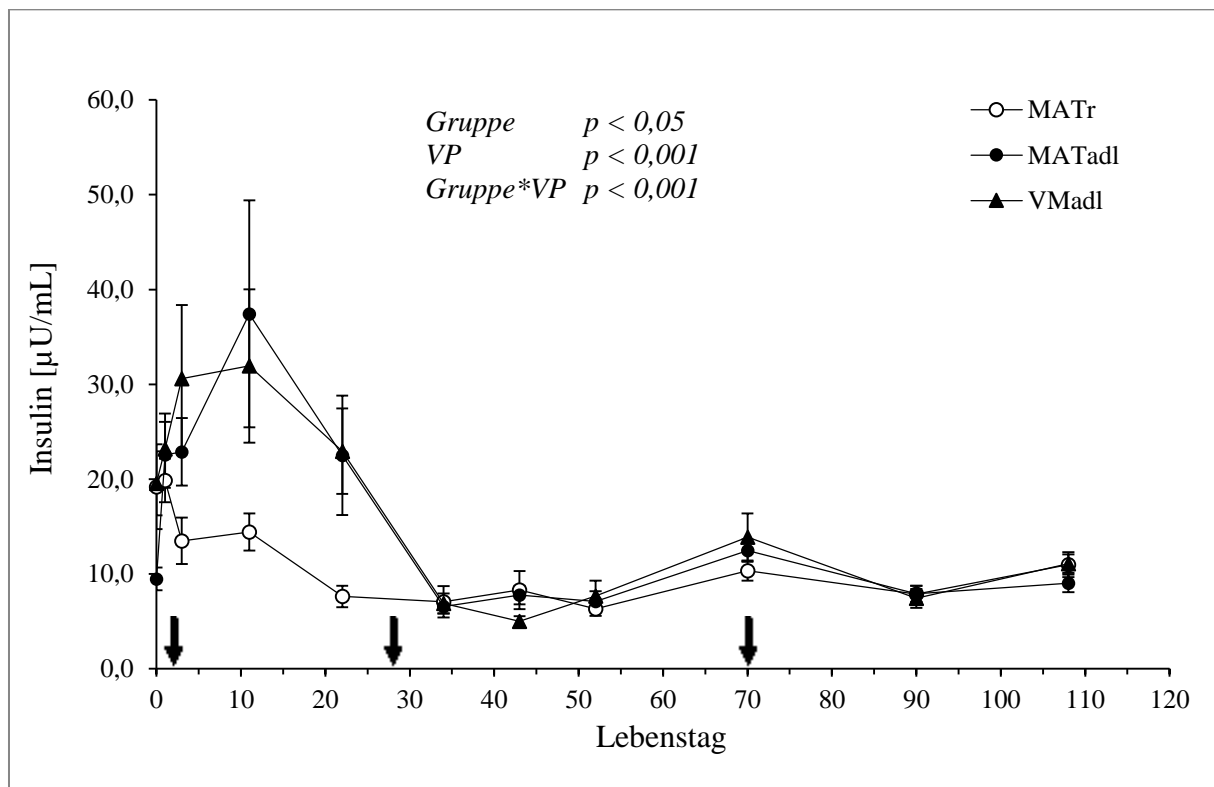
Über den Versuchszeitraum gesehen zeigte der Verlauf der Blutglucosespiegel von VP0 nach VP1 einen steilen Anstieg um Faktor 1,26 in allen Gruppen (von  $4,92 \pm 0,17$  auf  $6,21 \pm 0,09$  mmol/L) dem ein Abfall von VP1 nach VP2 und VP3 bis auf Höhe der Ausgangswerte folgte ( $p < 0,001$ ). Während sich bei den *ad libitum*-Gruppen in VP1 der Blutzuckerspiegel auf dem Niveau der Probe an Tag 3 hielt, stellte sich in der restriktiven Gruppe direkt nach dem Spitzenwert an Tag 3 ein stetiger Abfall dar. In diesem Versuchsabschnitt lag der Blutzuckerspiegel der Gruppe MATr um ca. 10 % niedriger als bei VMadl und MATadl ( $5,83 \pm 0,16$  vs.  $6,43 \pm 0,16$  ( $p < 0,05$ ) und  $6,36 \pm 0,14$  mmol/L ( $p < 0,1$ )). In VP2 und VP3 unterschieden sich die Gruppen untereinander nicht mehr (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Verlauf der Plasma-Glucose-Konzentration [mmol/L] über den gesamten Versuchszeitraum (MW  $\pm$  SE); verglichen wurden die Gruppen MATr (restriktive Milchaustauschertränke mit einer Konzentration von 11,5 %, n = 19), MATadl (Milchaustauschertränke *ad libitum* mit einer Konzentration von 13,8 %, n = 17) und VMadl (Vollmilchtränke *ad libitum*, n = 20),  $\blacktriangledown$  markiert den Wechsel der Versuchsphasen, VP = zeitlicher Einfluss der Versuchsphase, Gruppe\*VP = Einfluss der Versuchsgruppe in Abhängigkeit zur Versuchsphase

### 4.3.5 Insulin

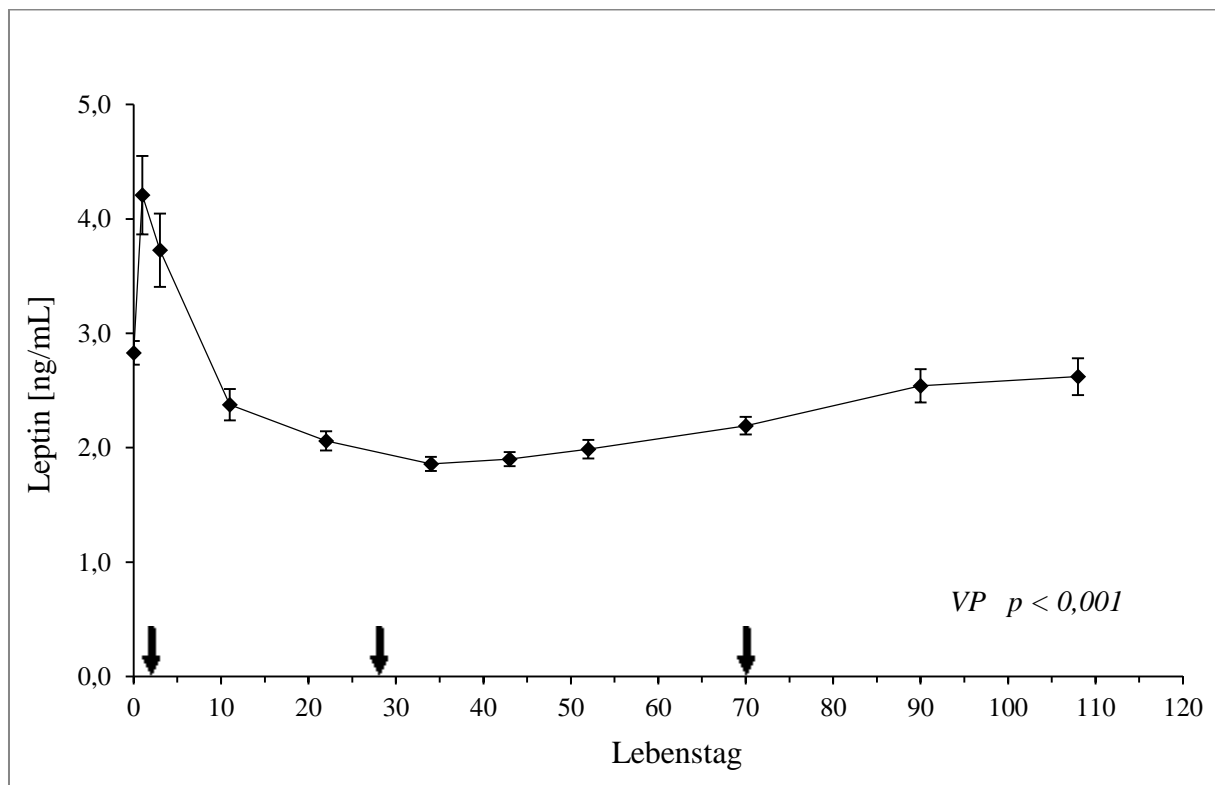
Insgesamt lagen die Insulinwerte der Gruppe MATr um 30% unter denen der Gruppe VMadl ( $11,6 \pm 0,70$  vs.  $16,4 \pm 1,36 \mu\text{U/mL}$ ,  $p < 0,05$ ). Die Gruppe MATadl unterschied sich von keiner der beiden Gruppen. In VP0 und VP1 bewegten sich die Plasmainsulinspiegel insgesamt auf einem höheren Level als in VP2 und VP3 ( $19,1 \pm 1,38$  und  $22,6 \pm 2,12$  vs.  $6,9 \pm 0,42$  und  $10,1 \pm 0,46 \mu\text{U/mL}$ ,  $p < 0,001$ ). Lediglich in Gruppe MATadl war von VP0 nach VP1 ein signifikanter Anstieg um Faktor 1,7 zu beobachten (von  $16,0 \pm 2,14$  auf  $27,6 \pm 4,67 \mu\text{U/mL}$ ). Der Abfall auf die niedrigeren Insulinkonzentrationen in VP2 und VP3 begann in der restriktiven Gruppe bereits Mitte der ersten VP, was sich auch in den signifikant niedrigeren Insulinwerten dieser Gruppe in VP1 zeigte (MATr  $12,1 \pm 1,19$  vs. MATadl  $27,6 \pm 4,67$  und VMadl  $28,5 \pm 4,00 \mu\text{U/mL}$ ,  $p < 0,05$ ). Innerhalb der Gruppen war generell eine große tierindividuelle Variabilität der Plasmainsulinspiegel festzustellen (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Verlauf der Serum-Insulin-Konzentration [ $\mu\text{U/mL}$ ] über den gesamten Versuchszeitraum (MW  $\pm$  SE); verglichen wurden die Gruppen MATr (restriktive Milchaustauschertränke mit einer Konzentration von 11,5 %,  $n = 19$ ), MATadl (Milchaustauschertränke *ad libitum* mit einer Konzentration von 13,8 %,  $n = 17$ ) und VMadl (Vollmilchtränke *ad libitum*,  $n = 20$ ),  $\blacktriangledown$  markiert den Wechsel der Versuchsphasen, Gruppe = Einfluss der Versuchsgruppe, VP = zeitlicher Einfluss der Versuchsphase, Gruppe\*VP = Einfluss der Versuchsgruppe in Abhängigkeit von der Versuchsphase

### 4.3.6 Leptin

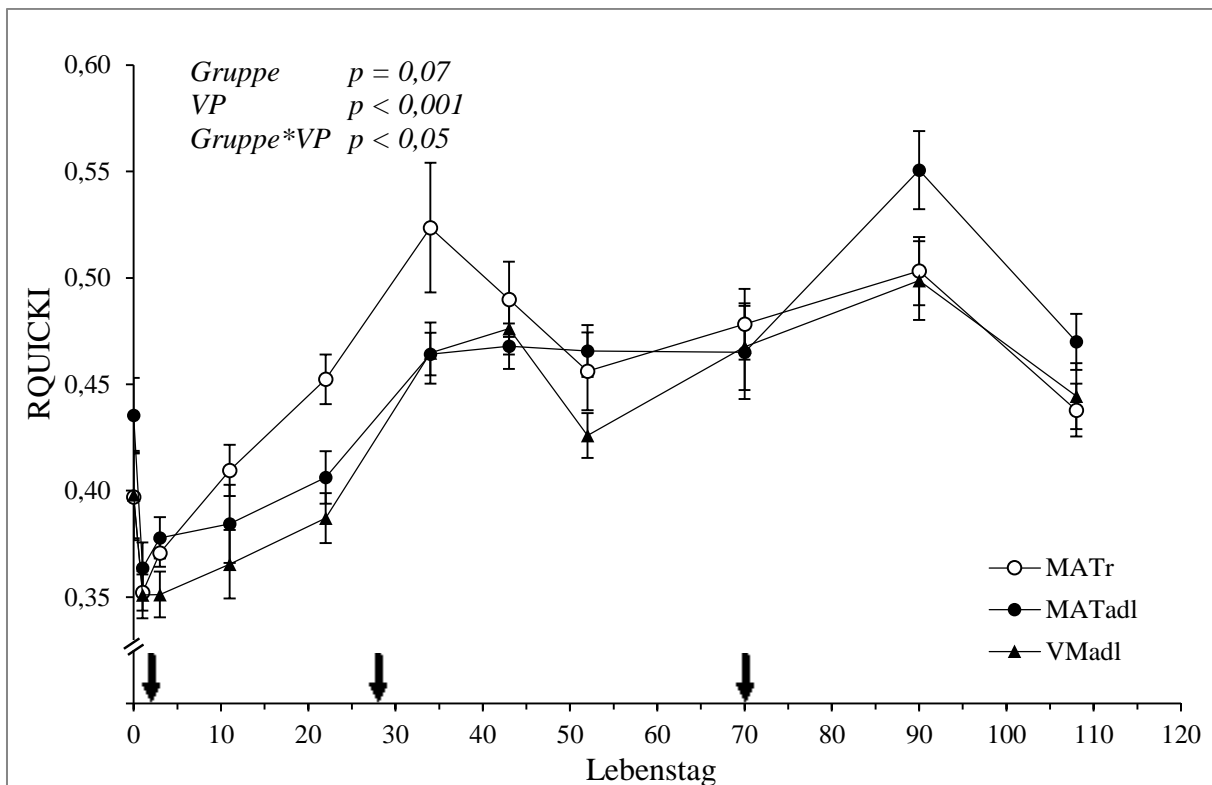
Bei den Blutwerten von Leptin gab es weder einen Effekt der Gruppe noch des Geschlechts. Im gesamten Verlauf der Serumleptinspiegel lässt sich jedoch feststellen, dass innerhalb der VP0 ein Anstieg nach der erten Kolostrumaufnahme um den Faktor 1,5 stattfand (von  $2,83 \pm 0,10$  auf  $4,21 \pm 0,34$  ng/mL,  $p < 0,001$ ). Von VP0 nach VP1 fiel der mittlere Wert der Leptinkonzentration von  $3,52 \pm 0,19$  ng/mL auf ein Level von  $2,73 \pm 0,13$  ng/mL und in VP2 noch weiter auf  $1,92 \pm 0,04$  ng/mL. In VP3 stieg er wieder leicht an, auf einen durchschnittlichen Wert von  $2,45 \pm 0,08$  ng/mL ( $p < 0,001$ ) (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Verlauf der Serum-Leptin-Konzentration [ng/mL] über alle Versuchsphasen (MW ± SE, n = 56), ▼ markiert den Wechsel der Versuchsphasen, VP = zeitlicher Einfluss der Versuchsphase

#### 4.3.7 Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index

Die Ergebnisse des *Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index* (RQUICKI) sind in Abbildung 15 dargestellt. In Gruppe VMadl war der RQUICKI tendenziell tiefer als bei den beiden MAT-Gruppen (MATr und MATadl  $0,44 \pm 0,01$  vs. VMadl  $0,42 \pm 0,01$ ,  $p = 0,07$ ). Besonders deutlich war dieser Unterschied in VP1. Hier lagen die Werte der Gruppe VMadl um rund 10 % tiefer als in Gruppe MATr ( $0,37 \pm 0,01$  vs.  $0,41 \pm 0,01$ ,  $p < 0,05$ ). Außerdem konnte im zeitlichen Verlauf ein Anstieg des RQUICKI verzeichnet werden. Während in den beiden ersten Phasen der RQUICKI in allen Gruppen im Mittel bei  $0,38$  bzw.  $0,39 \pm 0,01$  lag, so konnte bereits innerhalb der VP1 ein Anstieg beobachtet werden, der Werte von  $0,47$  bis  $0,48 \pm 0,01$  in VP2 und VP3 erreichte ( $p < 0,001$ ).



**Abbildung 15:** Verlauf der RQUICKI-Werte über alle Versuchsphasen

berechnet zu den jeweiligen Probenahmeterminen ( $MW \pm SE$ ); verglichen wurden die Gruppen MATr (restriktive Milchaustauschertränke mit einer Konzentration von 11,5%,  $n = 19$ ), MATadl (Milchaustauschertränke *ad libitum* mit einer Konzentration von 13,8%,  $n = 17$ ) und VMadl (Vollmilchtränke *ad libitum*,  $n = 20$ ),  $\blacktriangledown$  markiert den Wechsel der Versuchsphasen, Gruppe = Einfluss der Versuchsgruppe, VP = zeitlicher Einfluss der Versuchsphase, Gruppe\*VP = Einfluss der Versuchsgruppe in Abhängigkeit von der Versuchsphase

## 4.4 Toleranztests

### 4.4.1 Basalwerte

Bei den Basalwerten von Insulin lag die Gruppe MATr tendenziell unter den Werten der Gruppe MATr ( $8,9 \pm 0,7$  vs.  $13,2 \pm 2,5$   $\mu\text{U/mL}$ ,  $p < 0,1$ ). Die Gruppe VMadl unterschied sich von keiner der beiden anderen Gruppen ( $12,2 \pm 1,4$   $\mu\text{U/mL}$ ). Vergleicht man die Gruppen in Abhängigkeit zur VP, liegen die beiden *ad libitum*-Gruppen in VP1 deutlich über der Gruppe MATr, während in VP2 und VP3 keine Gruppenunterschiede zu verzeichnen sind (siehe Tabelle 9). Im zeitlichen Verlauf wurden beim Test in VP1 die höchsten Insulinbasalwerte gemessen, während in VP2 die niedrigsten Werte auftraten ( $16,2 \pm 2,6$  vs.  $6,9 \pm 0,5$   $\mu\text{U/mL}$ ,  $p < 0,001$ ). Die Konzentrationen in VP3 lagen tendenziell zwischen denen von VP1 und VP2 ( $11,5 \pm 0,9$   $\mu\text{U/mL}$ ,  $p = 0,09$ ). Auch waren die Basalwerte von Insulin bei den männlichen Tieren um Faktor 1,3 höher als bei den weiblichen Tieren ( $12,9 \pm 1,7$  vs.  $9,9 \pm 0,8$   $\mu\text{U/mL}$ ,  $p < 0,05$ ).

Ähnlich stellt sich die Situation bei den Basalwerten von Glucose dar. Hier lagen die Werte der Gruppe MATr durchschnittlich unter denen der Gruppen MATadl und VMadl ( $5,05 \pm 0,12$  vs.  $5,39 \pm 0,13$  und  $5,43 \pm 0,12$   $\text{mmol/L}$ ,  $p < 0,05$ ). Beim Vergleich der Gruppen unter Berücksichtigung der VP zeigt sich, dass dieser Unterschied hauptsächlich aus VP1 herrührt. Hier liegen die Glucosebasalkonzentrationen der Gruppe MATr um ca. 20 % unter denen der beiden *ad libitum*-Gruppen (siehe Tabelle 9). Im zeitlichen Verlauf wurden, wie auch bei Insulin, die höchsten Werte in VP1 gemessen und die niedrigsten in VP2 ( $5,82 \pm 0,16$  vs.  $4,89 \pm 0,10$   $\text{mmol/L}$ ,  $p < 0,001$ ). Die Werte in VP3 ( $5,19 \pm 0,07$   $\text{mmol/L}$ ) waren nur tendenziell höher als in VP2 ( $p < 0,1$ ). Ein Geschlechterunterschied konnte nicht beobachtet werden.

### 4.4.2 Intravenöser Glucosetoleranztest

Beim Vergleich der  $\text{AUC}_{\text{Ins}}$  (*Area under the curve*) zwischen den Gruppen erreichte die Gruppe VMadl tendenziell höhere Werte als MATr ( $p = 0,08$ ). Betrachtet man den Einfluss der Gruppe in Abhängigkeit von der VP, dann finden sich hauptsächlich in VP1 Unterschiede zwischen den Gruppen. Die  $\text{AUC}_{\text{Ins}}$  war bei Gruppe VMadl um Faktor 2,36 höher als bei Kälbern der Gruppe MATr ( $p < 0,05$ ). Gleiches gilt für die Peakkonzentration ( $P_{\text{Ins}}$ ), bei der in VP1 die Gruppe VMadl doppelt so hohe Insulinspiegel hatte als die Gruppe MATr ( $p < 0,05$ ). Auch bei  $\text{Ins}\Delta_{\text{Peak}}$  waren die Werte der VMadl Kälber doppelt so hoch wie die der Tiere von

MATr ( $p < 0,05$ ). Die Gruppe MATadl unterschied sich in diesen Parametern nicht von den beiden anderen Gruppen (siehe Tabelle 9).

In allen berechneten Parametern für Insulin hatte die Versuchsphase einen hochsignifikanten Einfluss. In VP3 lagen alle Werte am höchsten im Vergleich zu den anderen beiden Phasen, wobei in VP2 bei  $AUC_{Ins}$  und  $P_{Ins}$  die niedrigsten Werte gemessen wurden ( $p < 0,001$ , siehe Tabelle 10).

Bei den berechneten Werten aus dem Testverlauf des Blutglucosespiegels unterschieden sich die Gruppen in VP 1 lediglich in  $Gluc\Delta_{Peak}$ . Hier lag MATr tendenziell tiefer als MATadl ( $p < 0,1$ ). VMadl unterschied sich von keiner der anderen Gruppen (siehe Tabelle 9).

Weiterhin wurde auch hier der Einfluss der Versuchsphasen berücksichtigt.  $P_{Gluc}$  war in VP2 signifikant niedriger als in VP3, wohingegen  $Gluc\Delta_{Peak}$  in VP1 niedriger war als in VP3 ( $p < 0,05$ , siehe Tabelle 10). Die  $AUC_{Gluc}$  war bei den männlichen Kälbern 1,1-fach höher als bei den weiblichen Tieren ( $127 \pm 3,7$  vs.  $113 \pm 3,7$  mmol/L \* min,  $p < 0,05$ ).

**Tabelle 9:** Ergebnisse der intravenösen Glucosetoleranztests (ivGTT), Vergleich zwischen den Gruppen MATr (restriktive Milchaustauschertränke mit einer Konzentration von 11,5 %, n = 17), MATadl (Milchaustauschertränke *ad libitum* mit einer Konzentration von 13,8 %, n = 16) und VMadl (Vollmilchtränke *ad libitum*, n = 18)

	Basalwert		Peakkonzentration (P <sub>Gluc</sub> bzw. P <sub>Ins</sub> )		Differenz Peak- Basalwert (Gluc $\Delta$ <sub>Peak</sub> bzw. Ins $\Delta$ <sub>Peak</sub> )		Area under the curve (AUC <sub>Gluc</sub> bzw. AUC <sub>Ins</sub> ) [Konzentration*min]			
	MATr	MATadl	VMadl	MATadl	MATr	MATadl	VMadl	MATr	MATadl	VMadl
<b>VP1</b>										
<b>Glucose</b> [mmol/L]	4,87 <sup>b</sup> ±0,23	6,27 <sup>a</sup> ±0,20	6,24 <sup>a</sup> ±0,23	9,39 ±0,24	9,31 ±0,69	4,49 <sup>A</sup> ±0,61	10,26 ±0,74	125 ±11,1	112 ±5,8	113 ±8,7
<b>Insulin</b> [μU/mL]	8,0 <sup>b</sup> ±1,3	21,4 <sup>a</sup> ±6,8	18,8 <sup>a</sup> ±3,3	87,1 <sup>ab</sup> ±20,1	58,5 <sup>b</sup> ±14,2	50,6 <sup>b</sup> ±13,4	120 <sup>a</sup> ±17,2	1087 <sup>b</sup> ±256	2169 <sup>ab</sup> ±650	2562 <sup>a</sup> ±461
<b>VP2</b>										
<b>Glucose</b> [mmol/L]	4,90 ±0,25	4,84 ±0,15	4,92 ±0,11	9,06 ±0,19	8,96 ±0,27	4,06 ±0,22	9,08 ±0,22	122 ±11,0	115 ±7,5	112 ±7,0
<b>Insulin</b> [μU/mL]	7,1 ±0,8	7,3 ±1,1	6,2 ±0,6	68,1 ±13,4	48,3 ±7,3	41,2 ±7,2	61,9 ±7,4	875 ±122	1161 ±240	1089 ±119
<b>VP3</b>										
<b>Glucose</b> [mmol/L]	5,34 ±0,08	5,11 ±0,18	5,11 ±0,08	9,69 ±0,13	9,95 ±0,11	4,61 ±0,12	9,68 ±0,08	123 ±5,2	139 ±9,0	123 ±5,0
<b>Insulin</b> [μU/mL]	11,6 ±1,4	11,3 ±2,2	11,5 ±1,0	108 ±11,9	137 ±14,7	125 ±14,3	132 ±13,5	2651 ±274	2465 ±222	2679 ±256

n = 51, Daten angegeben als MW ± SE, unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p < 0,05$ ), unterschiedliche Großbuchstaben kennzeichnen Trends ( $p < 0,10$ ), VP = Versuchsphase (VP1:Lebenstag (LT) 2 bis 27, VP2: LT 28 bis 69 und VP3: LT 70 bis 110)

**Tabelle 10:** Ergebnisse der intravenösen Glucosetoleranztests (ivGTT), Vergleich zwischen den Versuchsphasen

	VP1	VP2	VP3	p
$AUC_{Ins}$ [mL*min]	1978 <sup>b</sup> ± 287	1040 <sup>c</sup> ± 95	2605 <sup>a</sup> ± 145	< 0,001
$P_{Ins}$ [μU/mL]	90,6 <sup>b</sup> ± 10,5	59,3 <sup>c</sup> ± 5,5	127 <sup>a</sup> ± 7,9	< 0,001
$Ins\Delta_{Peak}$ [μU/mL]	74,3 <sup>b</sup> ± 8,8	52,4 <sup>b</sup> ± 5,4	115 <sup>a</sup> ± 7,8	< 0,001
$AUC_{Gluc}$ [mmol/L*min]	116 ± 5,0	116 ± 4,9	127 ± 3,8	n.s.
$P_{Gluc}$ [mmol/L]	9,70 <sup>ab</sup> ± 0,36	9,03 <sup>b</sup> ± 0,13	9,77 <sup>a</sup> ± 0,06	< 0,05
$Gluc\Delta_{Peak}$ [mmol/L]	3,87 <sup>b</sup> ± 0,33	4,15 <sup>ab</sup> ± 0,12	4,59 <sup>a</sup> ± 0,07	< 0,05

n = 51, Daten angegeben als MW ± SE,

unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen Unterschiede zwischen den Versuchsphasen ( $p < 0,05$ ),

n.s. = nicht signifikant,

VP = Versuchsphase (VP1: Tag 2 bis 27, VP2: Tag 28 bis 69, VP3: Tag 70 bis 110), AUC = Area under the curve,  $P_{Ins}/P_{Gluc}$  = Peakkonzentration für Insulin/Glucose,  $Ins\Delta_{Peak}/Gluc\Delta_{Peak}$  = Differenz zwischen Basalwert und Peakwert für Insulin/Glucose

#### 4.4.3 Intravenöser Insulintoleranztest

Zur Auswertung der ivITTs wurde der ISBGR (*Insulin-stimulated blood glucose response*) berechnet (siehe 3.5.2.4) und einer statistischen Analyse unterzogen. Ein signifikanter Unterschied fand sich lediglich zwischen den Versuchsphasen. Im Mittel aller Tiere lagen die Werte in VP1 um Faktor 1,2 bzw. 1,3 höher als in VP2 bzw. VP3 ( $p < 0,01$ , siehe Tabelle 11). Bei Betrachtung der einzelnen Versuchsgruppen stellte sich dieser Unterschied am deutlichsten bei MATr dar. Hier lag der ISBGR in VP1 ebenfalls 1,3-fach höher als in VP2 und in VP3 ( $p < 0,05$ , siehe Tabelle 11). Bei den anderen beiden Gruppen gab es zwar numerische Unterschiede zwischen den Phasen, diese ließen sich jedoch statistisch nicht absichern.

**Tabelle 11:** Ergebnisse der intravenösen Insulintoleranztests (ivITT)

Berechnet wurde der *Insulin stimulated blood glucose response* (ISBGR), Vergleich zwischen den Gruppen MATr (restriktive Milchaustauschertränke mit einer Konzentration von 11,5 %), MATadl (Milchaustauschertränke *ad libitum* mit einer Konzentration von 13,8 %) und VMadl (Vollmilchtränke *ad libitum*) und den Versuchsphasen (VP1: Lebenstag (LT) 2 bis 27, VP2: LT 28 bis 69 und VP3: LT 70 bis 110)

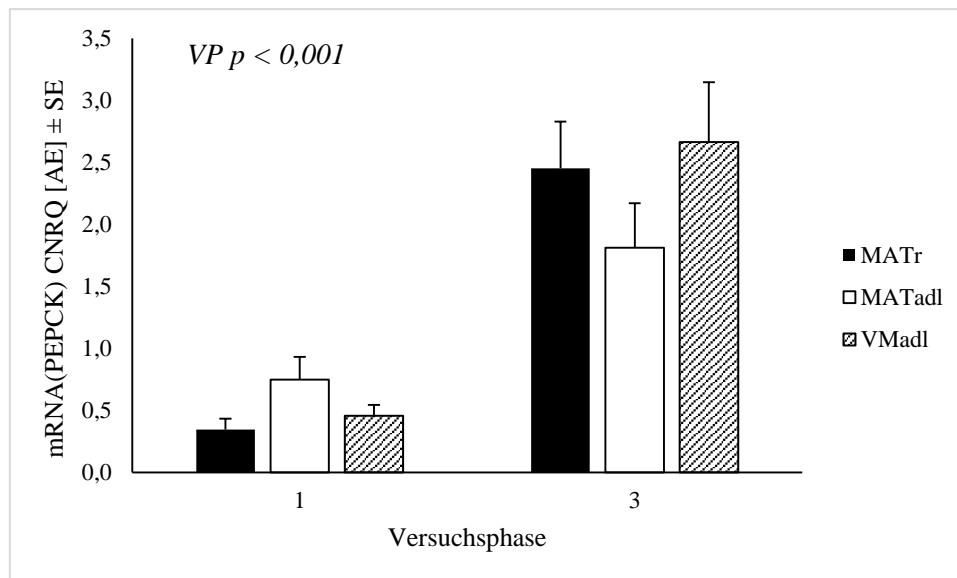
	ISBGR [%]			
	MATr (n = 9)	MATadl (n = 7)	VMadl (n = 7)	Gesamt (n = 23)
<b>VP1</b>	56,8 <sup>a</sup> ±4,8	52,0 ±3,2	52,8 ±5,5	54,1 <sup>a</sup> ±2,6
<b>VP2</b>	43,4 <sup>b</sup> ±3,3	48,8 ±3,3	45,0 ±2,3	45,4 <sup>b</sup> ±1,8
<b>VP3</b>	42,7 <sup>b</sup> ±2,9	43,4 ±3,6	43,2 ±3,3	43,1 <sup>b</sup> ±1,8

Daten angegeben als MW ± SE,  
unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen Unterschiede zwischen  
den Versuchsphasen ( $p < 0,05$ ).  
VP = Versuchsphase

## 4.5 Genexpression gluconeogenetischer Enzyme im Lebergewebe

### 4.5.1 mRNA-Menge der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase

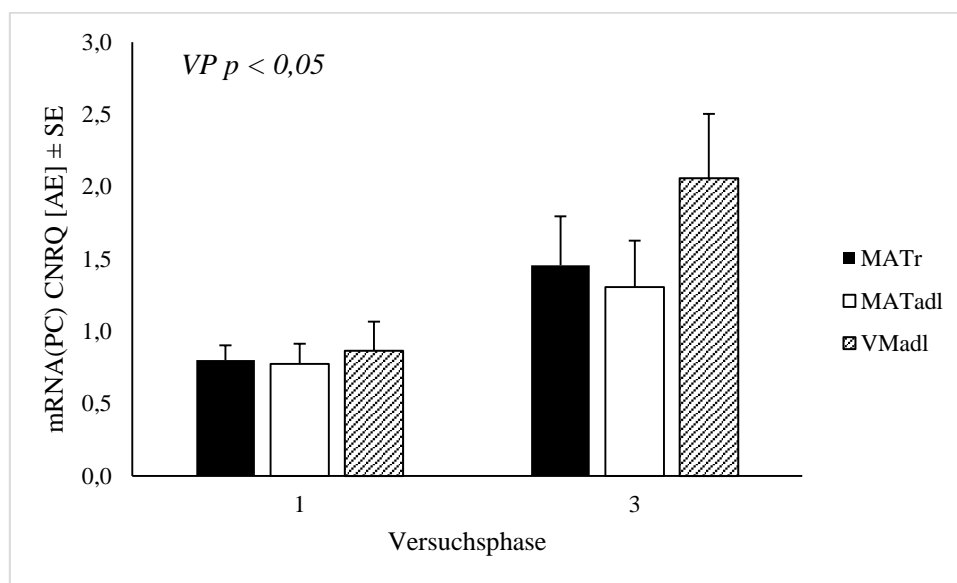
Die relative Häufigkeit der PEPCK-mRNA im Lebergewebe unterschied sich nicht zwischen den einzelnen Fütterungsgruppen. Zu beobachten war ein 4,5-facher Anstieg der mRNA-Konzentration von der Probe in VP1 (Tag 19) zur Probe in VP3 (Tag 100, von  $0,52 \pm 0,08$  auf  $2,33 \pm 0,25$  arbiträre Einheit (AE),  $p < 0,001$ , siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16:** mRNA-Menge (PEPCK) im Lebergewebe; verglichen wurden an Tag 19 (Versuchsphase 1) und an Tag 100 (Versuchsphase 3) die Gruppen MATr (restriktive Milchaustauschertränke mit einer Konzentration von 11,5 %, n = 13), MATadl (Milchaustauschertränke *ad libitum* mit einer Konzentration von 13,8 %, n = 14) und VMadl (Vollmilchtränke *ad libitum*, n = 16), PEPCK= Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, VP = zeitlicher Einfluss der Versuchsphase

#### 4.5.2 mRNA-Menge der Pyruvat-Carboxylase

Der Nachweis der mRNA der PC im Lebergewebe zeigte keinen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Es war ein Anstieg der mRNA-Konzentration von VP1 (Tag 19) zu VP3 (Tag 100) zu registrieren. Lag der durchschnittliche Wert bei der ersten Probe noch bei  $0,82 \pm 0,09$  AE so wurde bei der zweiten Probe ein Wert von  $1,64 \pm 0,23$  AE gemessen (siehe Abbildung 17). Damit lag die Differenz der Mittelwerte von den Proben in VP1 zu VP3 mit 0,82 bei PC im Vergleich zu 1,81 bei PEPCCK deutlich niedriger. Insbesondere bei den Proben zu Ende des Versuchs traten starke tierindividuelle Unterschiede in der Genexpression der untersuchten Enzyme auf.



**Abbildung 17:** mRNA-Menge (PC) im Lebergewebe; verglichen wurden an Tag 19 (Versuchsphase 1) und an Tag 100 (Versuchsphase 3) die Gruppen MATr (restriktive Milchaustauschertränke mit einer Konzentration von 11,5%, n = 13), MATadl (Milchaustauschertränke *ad libitum* mit einer Konzentration von 13,8%, n = 14) und VMadl (Vollmilchtränke *ad libitum*, n = 16), PC = Pyruvat-Carboxylase, VP = zeitlicher Einfluss der Versuchsphase

## 5 Diskussion

### 5.1 Leistungsparameter

Es liegen bereits Studien vor, in denen nachgewiesen wurde, dass Kälber, die größere Mengen als üblich an Vollmilch oder Milchaustauschertränke angeboten bekamen (4 - 6 L/Tag, Spiekers et al., 2009), täglich mehr Nährstoffe aufnahmen und damit auch höhere Wachstumsraten während der Tränkephase realisierten (Shamay et al., 2005; Moallem et al., 2010; Davis-Rincker et al., 2011; Kiezebrink et al., 2015). In der vorliegenden Studie wurde zwei Gruppen MAT bzw. Vollmilch *ad libitum* angeboten. Diese beiden Gruppen nahmen im Schnitt fast 50% mehr Tränke auf als die restriktiv getränkte Gruppe (Konzentration 11,5 %, 6,78 kg Tränke/Tag) und erreichten so höhere Tageszunahmen und Körpergewichte als die restriktiv getränkten Tiere. Allerdings traten diese Unterschiede lediglich in den ersten vier Lebenswochen auf, also genau in dem Zeitraum, in dem die Tiere das unterschiedliche Tränkeangebot erhalten hatten. Am Ende des Versuchs, im Alter von 15 Wochen, konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen mehr festgestellt werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Morrison et al. (2009; 2012) und Kiezebrink et al. (2015), bei denen die Kälber ebenfalls während der Tränkeperiode in Abhängigkeit von der Menge der aufgenommenen Tränke höhere Zunahmen bzw. Gewichte hatten. Diese Unterschiede egalisierten sich jedoch nach dem Entwöhnen, so dass später keine Gruppenunterschiede mehr messbar waren.

In unserem Versuch wurden alle Kälber nach den ersten 4 Lebenswochen mit einer restriktiven Milchaustauschertränke gefüttert. Die höheren Wachstumsraten aus der vorangegangenen *ad libitum*-Phase können nur dann aufrechterhalten werden, wenn die Energieaufnahme adäquat durch erhöhte Kraftfutteraufnahme nach dem Heruntersetzen der Milchtränkemenge ersetzt wird und die Entwicklung des GIT bereits so weit fortgeschritten ist, dass eine optimale Verdauung der Kraftfutterbestandteile möglich ist. Dass Kraftfutteraufnahme und Stärkefermentation im Pansen für die Entwicklung des Pansens mitverantwortlich sind, wurde bereits ausreichend dokumentiert (National Research Council (NRC), 2001). Die tägliche Zunahme von Kälbern im Alter von bis zu 2 Monaten korrelierte positiv mit der Kraftfutteraufnahme (Heinrichs und Heinrichs, 2011; Bateman et al., 2012) während eine erhöhte Tränkeaufnahme die Kraftfutteraufnahme herabsetzte (Khan et al., 2007b; Khan et al., 2007a; Chapman et al., 2016).

Da eine restriktive Tränkezufuhr die Tiere zwingen könnte früher Kraftfutter aufzunehmen und ihren GIT früher an festes Futter zu adaptieren als bei *ad libitum* getränkten Kälbern, erwarteten wir, dass die MATr-Gruppe früher größere Mengen Kraftfutter aufnehmen würde

als die beiden *ad libitum*-Gruppen. Allerdings konnten wir in VP1 keinen Unterschied zwischen den Gruppen feststellen, was möglicherweise auf die ohnehin sehr geringen Mengen an aufgenommenem Kraftfutter und die hohe Variabilität der Messung zurückzuführen ist. Hinzu kommt, dass Kälber überhaupt erst ab einem Alter von ca. 14 Tagen messbare Mengen an Kraftfutter fressen (Khan et al., 2008) und in den ersten 3 Lebenswochen unabhängig von der Tränkemenge insgesamt nur sehr geringe Mengen an Kraftfutter aufnehmen (Eicher-Pruett et al., 1992; Maccari et al., 2015). Die Phase mit unterschiedlichen Tränkeangeboten (VP1) endete bereits im Alter von 4 Wochen, so dass Unterschiede möglicherweise erst zu einem späteren Zeitpunkt aufgetreten wären.

Nach der Futterumstellung in VP2 nahmen die Kälber der Gruppe VMadl tendenziell mehr Kraftfutter auf als die Tiere aus Gruppe MATadl. Die Gruppe MATr unterschied sich hier nicht von den beiden anderen Gruppen. Auch die Energieaufnahme (ME) aus dem Kraftfutter war bei der Gruppe VMadl höher als bei MATadl und tendenziell höher bei MATr als bei MATadl. Die gesamte Energieaufnahme aus Tränke und Kraftfutter jedoch unterschied sich zwischen den Gruppen nicht. Die MATadl-Kälber schienen also das Absetzen der *ad libitum*-Tränke nicht so schnell über die Kraftfutteraufnahme kompensieren zu können wie die VMadl-Kälber. Die Tiere unserer Studie wurden innerhalb von 2 Tagen von einer *ad libitum*-Tränke auf ein restriktives Verfahren umgestellt. Der Übergang vom funktionellen Monogastrier zum Wiederkäuer, mit einem entsprechend ausgestatteten Verdauungssystem, und der Wechsel von flüssiger zu fester Nahrung ist mit die drastischste Veränderung, die der Magen-Darm-Trakt des Wiederkäuers durchläuft (Steele et al., 2016). Diese Umstellung erfordert die strukturelle und metabolische Entwicklung des Pansens und gleichzeitig die Entwicklung der speichelbildenden Organe, des Wiederkauverhaltens sowie weitere physiologische Anpassungen in Darm, Leber und anderen Geweben (Baldwin et al., 2004; Khan et al., 2011). Insofern wäre eine sanfte Umstellung von flüssiger auf feste Nahrung erforderlich, um dem Kalb die Möglichkeit zu geben, Kraft- und Raufutter zu verwerten und hinreichend verdauen zu können (Khan et al., 2016). Die Umstellung war aufgrund des Versuchsdesigns in der vorliegende Studie sehr abrupt, wenn auch die Kälber weiterhin flüssige Nahrung aufnehmen konnten, allerdings in geringeren Mengen. Möglicherweise war der GIT der Tiere, die Vollmilch erhalten hatten, bereits ausgereifter. Hierfür könnten bioaktive Substanzen in der Vollmilch verantwortlich sein, die im Sinne der laktokrinen Hypothese die Entwicklung des GIT positiv beeinflussen (Widdowson et al., 1976; Simmen et al., 1990; Burrin et al., 1992). Dies kann unter anderem durch lokale Effekte der Substanzen, z.B. durch direkte Interaktion mit spezifischen Rezeptoren in der Darmmukosa vermittelt

werden (Fernandez-Moreno et al., 1987; Donovan und Odle, 1994; Georgiev et al., 2003). Auf diese Weise wirksame Hormone und Wachstumsfaktoren finden sich in der Vollmilch, jedoch nicht im Milchaustauscher.

Auch im Vergleich der täglichen Zunahme zeichnete sich der Trend ab, dass die Gruppe MATadl geringere Zunahmen in VP2 realisierte als die Gruppe MATr. Es ist davon auszugehen, dass bei den Tieren der Gruppe MATadl nach der abrupten Umstellung ein Einbruch in der Wachstumskurve auftrat, während die Tiere der Gruppe MATr bei gleichem Nahrungsangebot ihre Wachstumsraten weiter steigern konnten.

Nach dem Abtränken, d.h. wenn alle Kälber freien Zugang zur TMR hatten, unterschieden sich die Wachstumsraten zwischen den Gruppen nicht mehr, auch wenn dies durchaus denkbar gewesen wäre: Khan et al. (2007b) dokumentierten eine höhere Trockenmasseaufnahme auch nach dem Entwöhnen bei Tieren, die in der Tränkephase bis zum Alter von 25 Tagen die doppelte Menge Milch bekommen hatten. Chapman et al. (2016) wiederum zeigten, dass höhere tägliche Zunahmen und Gewichte bei Kälbern, die größere Mengen MAT bekommen hatten, nach dem Abtränken zu einem Rückgang der Trockenmasseaufnahme und der Menge der verdauten Nährstoffe im Verhältnis zum Körpergewicht führten. Die Autoren führten diese Beobachtungen auf verschiedene Einschränkungen in der Verdauungsfähigkeit dieser Kälber zurück. Khan et al. (2016) schlussfolgerten in einer kürzlich veröffentlichten Übersicht, dass das Angebot von stärkereichem und faserarmen Kraftfutter die Pansenentwicklung nachteilig beeinflusste und dass die zusätzliche Gabe von Grundfutter (Heu, Silage, Stroh, Weidegang) die Darmentwicklung und das Wiederkauverhalten junger Kälber förderte. Da wir die Menge des aufgenommenen Heus nicht erfassen konnten, können wir auf diesen Aspekt nicht näher eingehen. Sicherlich ist es für die Aufrechterhaltung hoher Wachstumsraten nach dem Entwöhnen wichtig, dass die angebotenen Futtermittel dies in Bezug auf Menge, Nährstoffkonzentration und Verdaulichkeit auch ermöglichen.

Unsere Beobachtung, dass die Kälber, abgesehen vom Geschlechterunterschied, nach dem Entwöhnen gleiche Wachstumsraten hatten, entspricht nicht der Annahme, dass durch das Fütterungsregime in den ersten Wochen ein anhaltender Programmierungseffekt bzgl. des Wachstums stattfand. Dennoch ist es denkbar, dass beispielsweise auf der Ebene einzelner Organe Veränderungen stattgefunden haben, die sich erst im späteren Leben bemerkbar machen oder insgesamt zu differenziert sind, um sich in der Wachstumsrate niederzuschlagen. So konnten Geiger et al. (2016) in einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung zeigen, dass

höhere Wachstumsraten in den ersten 8 Lebenswochen die Organmasse von z.B. Leber und Milchdrüse je kg KGW erhöhten.

## **5.2 Verhalten bei der Tränkeaufnahme**

Die häufigen Besuche der restriktiven Gruppe in VP1 und der hohe Anteil an erfolgreichen Besuchen in der Tränkestation lassen vermuten, dass die restriktive Variante der Fütterung für die Kälber nicht zufriedenstellend war. Wahrscheinlich sind die häufigen erfolgreichen Besuche frustrierend für die Jungtiere, was wiederum Stress bei den Tieren auslösen kann. Kälber, die an der Mutter saugen können, führen zwischen 4 und 10 Saugakte pro Tag aus (Reinhardt und Reinhardt, 1981; de Passillé, 2001; Lidfors et al., 2010). Das entspricht in etwa der durchschnittlichen Anzahl an Besuchen mit Tränkeaufnahme (TA) im vorliegenden Versuch. Dennoch schienen die restriktiv gefütterten Tiere eine hohe Motivation zu haben, den Automaten öfter aufzusuchen als die *ad libitum*-Gruppen. Dieses Verhalten setzte sich in VP2 in ähnlicher Weise fort und trat dort auch bei den *ad libitum*-Kälbern nach dem Herabsetzen auf die restriktive Menge auf. Tatsächlich nahmen in VP1 die restriktiv getränkten Tiere bei gleicher Anzahl an Besuchen mit TA deutlich weniger Tränke auf als die beiden anderen Gruppen. Hierbei kam die Menge der aufgenommenen Tränke in den *ad libitum*-Gruppen dem näher, was vorangegangene Studien bereits bei Kälbern beobachtet hatten, die bei ihren Müttern saugen durften (bis zu 20 kg/Tag) (Bar-Peled et al., 1997), selbst wenn die Kälber nur zweimal am Tag mit der Mutter zusammen kamen (de Passillé et al., 2008). Es ist also davon auszugehen, dass nicht zwingend die Anzahl der erfolgreichen Besuche ausschlaggebend ist, sondern die aufgenommene Tränkemenge während dieser Besuche. Die Kälber aus der restriktiven Gruppe zeigten also möglicherweise eine höhere Motivation die Station aufzusuchen, weil sie von der aufgenommenen Tränkemenge nicht satt geworden waren. Die Aufnahme von Milch, die das Überleben des Kalbes sicherstellt, bestimmt die Motivation eines Kalbes zum Saugen (de Passillé, 2001).

Der Trend, dass die VMadl-Kälber häufiger den Tränkeautomaten aufsuchten, um Tränke aufzunehmen, als die Gruppe MATadl, lässt sich eventuell dadurch erklären, dass die Tiere aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Tränke unterschiedliche Sättigungsmechanismen durchlaufen. Im Proteingehalt entsprachen sich die beiden Futtermittel mit bei der Vollmilch ca. 26 % XP/kg TM im Vergleich zum MAT mit 24 % XP/kg TM. Da in dem von uns verwendeten MAT ein sehr hoher Anteil an Magermilchpulver (50%) und keine pflanzlichen Proteinträgerstoffe eingesetzt wurden, sollte auch die Proteinzusammensetzung ähnlich der von Vollmilch sein. Wichtig für Kälber ist in den ersten Lebenswochen eine kaseinreiche Tränke, da sie noch nicht über ein voll entwickeltes

Enzymsystem verfügen (Spiekers et al., 2009). Kasein gilt als langsam verdauliches Protein, weil es den Labmagen langsam passiert und dadurch zu einem verlangsamten, aber länger anhaltenden Anstieg der Aminosäurespiegel im Plasma führt. Generell sind Proteine Nährstoffe mit einem besonders guten Sättigungseffekt (Luhovyy et al., 2007). Der Fettgehalt der Vollmilch übersteigt jedoch den des MAT deutlich (32,1 % XL/kg TM vs. 18 % XL/kg TM). Da Fette keine gute Sättigung hervorrufen (Blundell und MacDiarmid, 1997) könnte es sein, dass die Vollmilchkälber früher wieder Hunger bekommen hatten als die MAT-Kälber, deren Energiequelle aus der Tränke durch die Anreicherung von Milchzucker in Magermilch- und Molkepulver zu einem höheren Anteil aus Kohlenhydraten bestand. Außerdem sollte die Wirkung von bioaktiven Substanzen in der Vollmilch bedacht werden. Theoretisch könnte Leptin, das als Sättigungsfaktor fungiert und in Vollmilch, nicht aber in MAT enthalten ist (Bartok und Ventura, 2009), schon während der Tränkeaufnahme zu einem Sättigungsgefühl geführt haben, weshalb die Vollmilchkälber weniger Tränke je Mahlzeit aufgenommen hatten. Allerdings müsste das Leptin hierfür nach der oralen Aufnahme in den Blutkreislauf der Kälber gelangen, was nach dem Schluss der Darmschranke (24 bis 72 Stunden nach der Geburt; Broughton und Lecce, 1970; Widdowson et al., 1976; Bartol et al., 2008) für ein Molekül dieser Größe eigentlich ausgeschlossen ist. Diese Parameter wurden nicht detailliert ausgewertet, so dass hierzu keine eindeutige Aussage getroffen werden kann.

Es bleibt ebenfalls unklar, ob der vermeintlich entstandene Stress für die Tiere über die Nahrungsaufnahme hinaus einen Einfluss auf die Stoffwechsellistung hatte. Aber auch wenn anhaltende Effekte in Bezug auf tägliche Zunahme und Körpergewicht aufgrund der Ergebnisse unserer Studie unwahrscheinlich sind, bedeutet ein restriktives Tränkeverfahren für die Kälber eine Einschränkung der Artgerechtigkeit (Khan et al., 2016) und sollte aus diesem Grund Anlass geben, diese in Deutschland weit verbreitete Form der Aufzucht zu überdenken.

## **5.3 Blutparameter**

### **5.3.1 Metaboliten**

Grundsätzlich stimmen die Plasmakonzentrationen von NEFA, Glucose, BHB und Gesamtprotein mit den Ergebnissen aus anderen Studien überein (Hadorn et al., 1997; Hugi und Blum, 1997; Hammon et al., 2002).

Insbesondere bei NEFA und BHB treten jedoch große Schwankungen im Vergleich zu anderen Studien auf (Klotz und Heitmann, 2006; Ghorbani et al., 2012). Dies lässt sich durch

die Abhängigkeit dieser Parameter von der Art der Futtermittel, die aufgenommen wurden, erklären.

So korreliert die NEFA-Konzentration negativ mit der Aufnahme von festem Futter präruminierender Kälber und folglich mit der Umstellung von fettarmem, kohlenhydratreichem Futter auf solches mit wenig Fett und vielen Kohlenhydraten (Quigley, 1996). Dem widerspricht jedoch das Ergebnis unserer Untersuchung, in der die Gruppe MATadl über den gesamten Versuchszeitraum die niedrigsten NEFA-Werte erreichte, obwohl diese Gruppe auch geringere Mengen an Kraftfutter aufnahm. Rauprich et al. (2000) folgern, dass gleiche NEFA-Konzentrationen auf eine vergleichbare Energieaufnahme aus der Nahrung hinweisen. Diese Schlussfolgerung lässt sich auch auf unsere Ergebnisse übertragen, denn die Tiere der Gruppe MATr wiesen höhere NEFA-Konzentrationen auf, als die Tiere der Gruppe MATadl. Die Gruppe MATr nahm in VP1 deutlich weniger Energie auf als MATadl und VMadl. Dies kann dazu geführt haben, dass die Tiere der Gruppe MATr mehr körpereigene Fettreserven mobilisieren mussten, was zu höheren NEFA-Konzentrationen im Blut geführt haben kann (Adewuyi et al., 2005).

Hammon et al. (2002) konnten nachweisen, dass Kälber, die begrenzte Mengen an Kolostrum und Milch aufnahmen, in den ersten 4 Lebenswochen höhere NEFA-Spiegel im Blut hatten, im Vergleich zu Kälbern, die *ad libitum* gefüttert wurden. Dies deckt sich mit der Beobachtung unserer Studie, dass die Tiere der Gruppe MATr in VP1 höhere NEFA-Konzentrationen aufwiesen als die Tiere der Gruppe MATadl.

In allen Gruppen fiel der NEFA-Serumspiegel nach verhältnismäßig hohen Werten um die Geburt mit großen tierindividuellen Schwankungen ab dem ersten Lebenstag deutlich ab. Das entspricht den Ergebnissen, die bereits in anderen Studien beschrieben wurden (Hadorn et al., 1997; Hugi und Blum, 1997; Rauprich et al., 2000; Hammon et al., 2002; Steinhoff-Wagner et al., 2011a). Die hohen NEFA-Werte um die Geburt könnten aus einer erhöhten Lipolyseaktivität, insbesondere im braunen Fettgewebe, resultieren. Nestflüchter müssen ihre Thermoregulation über den Stoffwechsel bewerkstelligen, um eine effektive Adaptation an die vergleichsweise kalte extrauterine Umwelt zu erreichen. Bei der Aktivierung der Thermogenese im braunen Fettgewebe, beispielsweise durch eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation über Noradrenalin, kommt es zur Lipolyse in den Adipozyten und folglich zum Anstieg der NEFA-Konzentrationen in der Zelle (Symonds et al., 2003; Cannon und Nedergaard, 2004). Der Abfall der NEFA nach der ersten Tränkeaufnahme lässt auf eine angepasste Stoffwechselantwort auf die Aufnahme von Nahrung schließen. Bei Kälbern, die kein Kolostrum in den ersten 24 Stunden erhalten hatten stiegen die NEFA-Werte an, während bei

gefütterten Kälbern die NEFA-Spiegel abfielen. Der Plasma-Lipid-Status der neugeborenen Kälber hängt also vom Zeitpunkt und der Menge der Kolostrumgabe ab (Blum und Hammon, 2000a). Die Energiezufuhr über die Nahrungsaufnahme führte dazu, dass weniger körpereigene Fette mobilisiert wurden, was unter anderem durch die Ausschüttung von Insulin und dessen hemmender Wirkung auf die Lipolyse vermittelt werden kann (Hadorn et al., 1997). Zusätzlich wird angenommen, dass durch die Aufnahme von Kolostrum die Induktion und Produktion von Transportproteinen gefördert wird und damit eine verbesserte post-absorptive Verteilung der Fettsäuren im Organismus gewährleistet wird (Blum und Hammon, 2000a).

Die BHB-Spiegel im Blut sind beim Kalb mit der Entwicklung des Pansens assoziiert (Bergman, 1971; Ghorbani et al., 2012). Erst kürzlich wurde die Eignung des Serum-BHB als Indikator für Kraftfutteraufnahme und Pansenentwicklung bei Kälbern bestätigt (Deelen et al., 2016). Ab der 4. Lebenswoche entwickelt sich die Fähigkeit des Pansenepithels zur Ketogenese (Giesecke et al., 1979; Lane et al., 2000). Ab diesem Zeitpunkt stiegen auch im vorliegenden Versuch die BHB-Konzentrationen in allen Gruppen stetig an. Hohe BHB-Spiegel im Blut können eine gesteigerte hepatische Ketogenese anzeigen, die aus einem erhöhten Angebot bzw. einer verminderten Oxidation von NEFA aus der Mobilisation von körpereigenem Fett resultiert. Auch präruminierende Tiere sind grundsätzlich zur hepatischen Ketogenese befähigt, wenn sie keinen Zugang zu Nahrung haben. Der Anstieg von BHB im Blut ist jedoch wahrscheinlicher auf die beginnende ruminale Produktion von Ketonkörpern zurückzuführen (Baldwin et al., 2004). Bis zur 8. bis 12. Lebenswoche sollte sich der Pansen zunehmend entwickelt haben, damit Kohlenhydrate zu Fettsäuren abgebaut und im heranreifenden Pansenepithel zu Acetoacetat und BHB metabolisiert und dem Portalkreislauf zugeführt werden können (Leat, 1971; Bergman, 1990). Kraftfutteraufnahme und BHB-Serumkonzentration zeigten in unserer Studie ab dem Zeitpunkt, ab dem alle Kälber nur noch restriktiv Tränke erhielten, vergleichbare Muster. Die höchsten Werte in beiden Variablen wurden in der Gruppe VMadl und MATr beobachtet, wohingegen die Gruppe MATadl ca. 200 g/Tag weniger Kraftfutter aufnahm und geringere BHB-Konzentrationen aufwies. Eigentlich hatten wir erwartet, dass die restriktive Gruppe den schnellsten BHB-Anstieg haben und sich von den beiden *ad libitum*-Gruppen unterscheiden würde, weil die Restriktion von flüssiger Nahrung die Kraftfutteraufnahme stimulieren würde. Die o.g. Beobachtung weist auf einen die Pansenentwicklung begünstigenden Effekt durch stimulierende Faktoren in der Milch hin. Insbesondere die Entwicklung des ruminalen Mikrobioms könnte dadurch

positiv beeinflusst werden und ggf. Auswirkungen auf den gesamten Intestinaltrakt haben (Steele et al., 2016).

Die Glucoseblutkonzentration war in allen Gruppen um die Geburt niedrig, stieg jedoch nach der ersten Kolostrumaufnahme deutlich an, wie bereits in anderen Studien beschrieben (Rauprich et al., 2000; Hammon et al., 2003; Steinhoff-Wagner et al., 2011a). Nach einem Höchstwert an Tag 3 fiel der Serumspiegel wieder auf den Ausgangswert ab. Die Glucosekonzentrationen von präruminierenden Widerkäuern sind höher als die von Tieren mit ausgereiftem Vormagensystem. In den ersten Lebensmonaten fallen sie jedoch auf das Level von adulten Tieren ab (Klotz und Heitmann, 2006). Bei der Gruppe MATr war dies schneller der Fall als bei den *ad libitum*-Gruppen. Die Gruppe MATr hatte demnach in VP1 niedrigere Blutglucosespiegel als die beiden anderen Gruppen. Dies könnte auf die gesteigerte Aufnahme von Lactose in den *ad libitum*-Gruppen zurückzuführen sein, wie bereits bei Mastkälbern beschrieben wurde (Hugi et al., 1997). Demgegenüber steht eine Untersuchung, bei der höhere Plasmaglukosekonzentrationen bei Kälbern gemessen wurden, die in den ersten 3 Tagen Kolostrum erhalten hatten, im Vergleich zu solchen, die MAT bekommen hatten, obwohl die Aufnahme von Lactose in beiden Gruppen vergleichbar war (Steinhoff-Wagner et al., 2011a). Einen Effekt der Vollmilchfütterung konnten wir in unserer Studie nicht erkennen, allerdings wäre ein alleiniger Einfluss der Kolostrumfütterung ohnehin nicht messbar, da alle Gruppen bis zur 6. Mahlzeit Kolostrum erhalten hatten und die MAT-Gruppen erst danach auf MAT-Fütterung umgestellt wurden.

Die Konzentration des Gesamtproteins stieg innerhalb der ersten 3 Tage massiv an, am deutlichsten jedoch war der Anstieg nach der ersten Kolostrumgabe. Da ein intrauteriner Transfer von Immunglobulinen auf das Kalb aufgrund der Struktur der Plazenta nicht stattfindet, sind Kälber nach der Geburt auf die orale Aufnahme und die enterale Absorption kolostraler Antikörper angewiesen (Kaske et al., 2005). Der Anstieg des Gesamtproteins auf Werte um 5,6 g/dL deutet auf eine erfolgreiche orale Aufnahme maternaler Antikörper hin, denn der Anstieg des Gesamtproteins im Serum verhält sich ähnlich wie der Anstieg der Immunglobuline (Kaske et al., 2005). In der Literatur wird ein Gesamteiweißspiegel von  $\geq 5,2$  g/dL als Grenzwert für einen ausreichenden passiven Immunglobulintransfer angesehen (Weaver et al., 2000). Eine Aussage über die tatsächlich aufgenommene Antikörpermenge ist dennoch nur eingeschränkt möglich. Während in Untersuchungen von Werner (2003) die Konzentration des Gesamtproteins mit der Konzentration der Immunglobuline im Blut der

Kälber 24 Stunden *post natum* eng korrelierte, war dies bei Schäfer et al. (1998) nur 2 bis 4 Stunden nach der ersten Kolostrumfütterung der Fall. Nach dem in unserem Versuch beobachteten Höchstwert an Tag 3 erfolgte ein Abfall des Gesamtproteinspiegels, dem ein stetiger Anstieg ab der 3. bis 4. Lebenswoche folgte. Ähnliche Verläufe wurden auch für den Gehalt an IgG beobachtet (Burton et al., 1989; Erhard et al., 1999). Es wird vermutet, dass der durch Elimination entstehende Verlust maternaler Antikörper durch das Einsetzen der endogenen Immunglobulinproduktion zwischen dem 11. und 28. Lebenstag überdeckt wird (Erhard et al., 1999).

Gruppenunterschiede traten für die oben beschriebenen Parameter hauptsächlich in VP1 auf und konnten nach dem Angleichen aller Gruppen auf das restriktive Fütterungsregime nicht mehr nachgewiesen werden. Vergleichbare Verläufe werden auch in der Literatur beschrieben (Hadorn et al., 1997; Rauprich et al., 2000; Prokop et al., 2015). Dennoch unterstützen die Ergebnisse hinsichtlich der Metaboliten im Blut die Hypothese, dass die *ad libitum*-Fütterung von Vollmilch mehr Vorteile bringt als die *ad libitum*-Fütterung von MAT. Dass generell eine verbesserte Nährstoffzufuhr durch eine intensivierete Fütterung in den ersten Lebenswochen langfristig positive Effekte auf Wachstum und Produktivität hat, ist bereits allgemein anerkannt (Khan et al., 2011).

### 5.3.2 Hormone

Im Gegensatz zu anderen Studien, in denen die Fütterung einen Einfluss auf die Leptinkonzentration im Blut der untersuchten Kälber hatte (Block et al., 2003; Brown et al., 2005b), konnten wir keine Gruppenunterschiede bei den Leptinwerten feststellen. Es war zu vermuten, dass insbesondere die Fütterung von Vollmilch im Vergleich zu Milchaustauscher zu höheren Leptinspiegeln im Blut führen würde, da das Vorhandensein von Leptin in Kolostrum und Milch von Menschen, Mäusen, Ratten, Schweinen und Rindern bereits nachgewiesen wurde (Casabiell et al., 1997; Houseknecht et al., 1997; Aoki et al., 1999; Estienne et al., 2000; Ucar et al., 2000; Kesser et al., 2017). Die Konzentration von Leptin in Milch liegt weit über der in MAT nachgewiesenen Menge (Houseknecht et al., 1997). Kälber, die nur MAT getränkt bekamen, hatten im Vergleich zu Kälbern, die Kolostrum bekommen hatten, geringere Leptinspiegel im Blut (Schäff et al., 2014). Da in der vorliegenden Studie alle Tiere in den ersten 3 Tagen mit Kolostrum gefüttert worden waren, hatten diesbezüglich alle Kälber gleiche Voraussetzungen. Nach dem Schluss der Darmschranke beschränkt sich die vermutete positive Wirkung von Leptin als bioaktive Substanz aus der Milch

möglicherweise auf lokale Prozesse im Darm, ähnlich wie bei Insulin und anderen Wachstumsfaktoren, für die eine direkte Interaktion mit Epithelzellen im Darm diskutiert wurde (Fernandez-Moreno et al., 1987; Donovan und Odle, 1994; Georgiev et al., 2003). Auch der Rezeptor für Leptin wurde bereits in Darmzellen nachgewiesen (Morton et al., 1998; Barrenetxe et al., 2002), was auf eine lokale Wirkung von Leptin im Darm hinweist (Wolinski et al., 2003). Eine Aufnahme in den Blutkreislauf müsste dann nicht zwingend stattfinden muss. Dass dies in den ersten Tagen jedoch der Fall ist, konnten Casabiell et al. (1997) beweisen, die zeigten, dass Leptin vom mütterlichen Kreislauf in die Milchdrüse transferiert und von dort, ohne Verlust der biologischen Aktivität, in den Magen des Säuglings und in dessen Blutkreislauf transportiert wurde. Dafür sprechen auch die Ergebnisse unserer Studie, die bei Leptin einen ähnlichen Verlauf zeigten wie beim Gesamteiweiß. Nach der Aufnahme von Kolostrum stieg die Leptinkonzentration im Serum um den Faktor 1,5 an, fiel dann bis zur VP2 wieder ab um danach leicht anzusteigen. Auch bei Ferkeln konnte ein Anstieg auf die 3-fache Konzentration nach der Fütterung von Kolostrum beobachtet werden (Wolinski et al., 2014). Allerdings konnte in anderen Studien an Kälbern der Anstieg von Leptin im Blutserum nach der Aufnahme von Kolostrum nicht nachgewiesen werden (Blum et al., 2005; Schäff et al., 2014). Dass die Vollmilchfütterung im Vergleich zur Fütterung von MAT keinen Unterschied brachte, kann auch an der verhältnismäßig geringen Menge an Leptin liegen, die in der Milch enthalten ist. Die Leptinkonzentration die in unserem Versuch in Milch gemessen wurde, lag im Kolostrum um das 4fache höher als in der Vollmilch. Selbst die hohe Leptinkonzentration im Kolostrum konnte bei den Kälbern lediglich einen geringen Anstieg im Serum bewirken (Kesser et al., 2017).

In den Gruppen MATadl und VMadl hielt sich der zu Beginn hohe Insulinspiegel über VP1 hinweg, während die Kälber der Gruppe MATr bereits in VP1 niedrigere Insulinkonzentrationen im Blut aufwiesen. Dass bei intensiv gefütterten Kälbere höhere Insulinkonzentrationen gemessen werden können, zeigten bereits andere Untersuchungen (Hadorn et al., 1997; Egli und Blum, 1998; Hammon und Blum, 1998; Kühne et al., 2000). Ob hier von Hyperinsulinämie die Rede sein sollte, bleibt zu diskutieren, denn bis dato sind uns keine validierten Referenzwerte für Kälber bzgl. der Seruminsulinspiegel bekannt. Es ist davon auszugehen, dass sich die Insulinkonzentrationen auch bei den *ad libitum* gefütterten Gruppen noch im physiologischen Bereich bewegen, da die im Versuch aufgenommenen Mengen an Milch bzw. MAT die natürlicherweise beim Saugen an der Kuh aufgenommenen

Mengen nicht überschritten, sondern diesen eher entsprachen (Bar-Peled et al., 1997; de Passillé et al., 2008). Die höheren Insulinwerte in den *ad libitum*-Gruppen im Vergleich zur Gruppe MATr sind vermutlich auf die größere Menge an aufgenommener Energie zurückzuführen, wie bereits in Untersuchungen an Mastkälbern gezeigt wurde (Hugi et al., 1997; Maccari et al., 2015). Diese Beobachtung stimmt auch mit den gemessenen Glucosewerten überein, die während VP1 in der Gruppe MATr ebenfalls niedriger waren als in den beiden anderen Gruppen. Auch wenn Glucose beim Wiederkäuer nicht der wichtigste Trigger für die Insulinsekretion ist (siehe 2.2.1.3), so ist doch davon auszugehen, dass in diesem frühen Zeitraum, in dem der Stoffwechsel des Kalbes noch dem eines Monogastriers gleicht, auch die höheren Glucosespiegel eine gesteigerte Ausschüttung von Insulin verursachen. Der spätere Abfall der basalen Insulinkonzentration trat dann im gleichen Zeitraum wie die Futterumstellung und die Anpassung des Verdauungssystems auf die zunehmende Pansenreifung auf. Mit dem Beginn der ruminalen Verdauung verliert der Blutglucosespiegel zunehmend an Bedeutung für die Stoffwechselregulation des Rindes. Kurzkettige Fettsäuren wie Butyrat und Propionat hingegen haben beim adulten Wiederkäuer eine stimulierende Wirkung auf die Insulinausschüttung (Manns und Boda, 1967; Harmon, 1992), was als einzigartig im Vergleich zu anderen monogastrischen Spezies gilt (Horino et al., 1968). Ein weiterer Effekt der Entwicklung zum ruminierenden Rind ist der Verlust der Sensitivität von Leberzellen gegenüber Insulin (Donkin und Armentano, 1995).

Insgesamt wiesen die Insulinkonzentrationen insbesondere in VP1 bei den *ad libitum*-Gruppen große tierindividuelle Unterschiede und große Schwankungen auf, was bereits Klotz und Heitmann (2006) bei Messungen an Jersey-Kälbern festgestellt haben.

In der von uns durchgeführten Studie gab es keinen Hinweis auf eine längerfristige Beeinflussung der Regelsysteme des Insulinstoffwechsels, denn die Unterschiede bestanden nur bis zu dem Zeitpunkt, an dem alle Kälber auf das gleiche Fütterungsregime umgestellt wurden. Die Ergebnisse unseres Versuchs decken sich mit den Resultaten aus anderen Untersuchungen, in denen die hohen Insulinkonzentrationen mit der Umstellung auf eine weniger intensive Fütterung verschwanden (Hadorn et al., 1997; Hammon und Blum, 1998; Kühne et al., 2000). Im Gegensatz dazu stehen Versuche an Ratten, bei denen eine intensive Fütterung in den ersten Lebenswochen die Entwicklung der pankreatischen Inselzellen stimulierte und zu höheren Insulinkonzentrationen im späteren Leben führte (Srinivasan et al., 2003). Auch bei während der ersten 3 Lebenswochen intensiv gefütterten Holsteinkälbern konnte ein Anstieg der Anzahl an Langerhans'schen Inseln nach 8 Monaten beobachtet werden (Prokop et al., 2015). Eine Aussage zu den Veränderungen auf zellulärer Ebene lässt

sich aufgrund der fehlenden notwendigen Analysen in unserer Studie leider nicht treffen, es besteht jedoch anhand der serologischen Untersuchungen kein Hinweis auf solche Effekte.

### 5.3.3 Insulinsensitivität

Auch wenn der HEC als Goldstandard zur Messung der Insulinsensitivität gilt (DeFronzo et al., 1979) wurde im vorliegenden Versuch der ivGTT als die praktikablere Methode gewählt. Ein Nachteil dieser Methode zeigt sich hauptsächlich bei laktierenden Kühen. Die Aufnahme von Glucose in die Zelle erfolgt über Glucosetransporter (GLUT)-Moleküle. Gestreifte Muskulatur und Fettgewebe enthalten insulin-unabhängige GLUT1 und insulin-abhängige GLUT4 (Dühlmeier et al., 2005), wohingegen in der bovinen Milchdrüse überwiegend GLUT1 aufgefunden wird (Zhao und Keating, 2007). In der Laktation wäre die Glucoseclearance eine ungeeignete Messgröße für die Insulinsensitivität, da bis zu 80% der verfügbaren Glucose insulin-unabhängig von der Milchdrüse verbraucht werden (Bauman und Currie, 1980). Auch eine aktuelle Studie zeigt, dass ivGTTs ungeeignet sind um z.B. laktierende mit trockenstehenden Kühen zu vergleichen (de Koster et al., 2017). Bei Kälbern dagegen ist die Milchdrüse noch inaktiv und die Aufnahme von Glucose in die Zelle findet hauptsächlich in der quergestreiften Muskulatur statt (Dühlmeier et al., 2007). Folglich ist die Steigerung der Glucoseaufnahme unter erhöhten Insulinspiegeln bei Kälbern hauptsächlich Insulin-abhängig (Dühlmeier et al., 2005) und damit eignet sich der ivGTT zumindest bei Kälbern zur Abschätzung der Insulinsensitivität (Bossaert et al., 2009). Weiterhin muss allerdings kritisiert werden, dass, wie auch in der Humanmedizin (Bingley et al., 1992), für die Durchführung des ivGTT an Rindern bzw. Kälbern ebenso wie für die Berechnung der entsprechenden Parameter aus den Tests jegliche Standardisierung fehlt. Dies mag an den geringen Anwendungsfällen liegen, macht jedoch den direkten Vergleich zwischen einzelnen Studien schwer.

Die basalen Konzentrationen von Glucose jeweils zu Beginn der Tests sind in der vorliegenden Studie vergleichbar mit den präprandialen Glucosewerten, die bereits Hostettler-Allen et al. (1994) bei Kälbern gemessen hatten. So ist auch für unsere Untersuchungen anzunehmen, dass die von Bossaert et al. (2009) empfohlenen 4 Stunden Wartezeit nach der letzten Nahrungsaufnahme ausreichend sind, um mögliche Interferenzen der Fütterung mit dem metabolischen Status zu vermeiden.

Unterschiede im ivGTT zwischen den Gruppen wurden ausschließlich in VP1 gemacht. Abgesehen von höheren Basalkonzentrationen von Insulin und Glucose in beiden *ad libitum*-Gruppen, die bereits auf Unterschiede in der Insulinsensitivität hinweisen, wurden bei den

Tieren der Gruppe MATr niedrigere Werte im Vergleich zur Gruppe VMadl bei  $P_{Ins}$ ,  $Ins\Delta_{Peak}$  und  $AUC_{Ins}$  nach der Glucoseinfusion gemessen. Diese Ergebnisse lassen auf eine erhöhte pankreatische Insulinsekretion als Folge der Glucosegabe in der Gruppe VMadl schließen (Bossaert et al., 2009). Obwohl die Werte für  $Gluc\Delta_{Peak}$  in Gruppe MATr tendenziell höher lagen als bei MATadl, unterschieden sich die Gruppen in der  $AUC_{Gluc}$  nicht, was bedeutet, dass trotz der höheren Glucoseanflutung die periphere Glucoseaufnahme in der Gruppe MATr schneller bzw. verstärkt stattfand. Damit lässt sich anhand der Testergebnisse eine höhere Insulinsensitivität und ein verbesserter Insulin-Response in der Gruppe MATr verglichen mit den beiden *ad libitum*-Gruppen unterstellen. Diese Annahme wurde durch die höheren RQUICKI-Werte der Gruppe MATr im Vergleich zu VMadl bestätigt. Die Verwendung des RQUICKI als Schätzwert für die Insulinsensitivität fand in vorangegangenen Studien bereits Zustimmung (Holtenius und Holtenius, 2007; Bossaert et al., 2009). Der RQUICKI zeichnet sich dabei im Vergleich zum QUICKI dadurch aus, dass er durch die Hinzunahme von Markern der Lipolyse (in diesem Fall die NEFA-Konzentration) neben dem Glucose- und Insulinspiegel wichtige Informationen beiträgt, um die Insulinsensitivität abzuschätzen (Perseghin et al., 2001). Auch wenn andere Autoren die Eignung des RQUICKI zur Diagnose von herabgesetzter Insulinsensitivität, insbesondere bei Kühen mit Stoffwechselstörungen, in Frage stellten (Kerestes et al., 2009; Schulz et al., 2014), so zeigten sich in unserer Untersuchung übereinstimmende Ergebnisse mit den Resultaten des ivGTT. Da die Tiere zum Zeitpunkt der Untersuchungen keine klinischen Krankheitsanzeichen aufwiesen und auch keiner der sonst analysierten Parameter Anzeichen für metabolische Entgleisungen zeigte, ist aber auch davon auszugehen, dass man es mit gesunden Tieren zu tun hatte. Hinzu kommt, dass metabolische Erkrankungen nicht in erster Linie ein Problem von Kälbern sind, sondern hauptsächlich im peripartalen Zeitraum bei hochleistenden Kühen auftreten (Drackley et al., 2016). Der RQUICKI lässt sich in unserem Fall also durchaus als Parameter zur Schätzung der Insulinsensitivität heranziehen.

Der ISBGR als Maß für den Abfall der Blutglucosekonzentration infolge einer intravenösen Insulingabe aus den ivITT unterschied sich zwischen den Gruppen nicht. Insgesamt war ein Abfall des ISBGR von VP1 nach VP2 und VP3 zu verzeichnen, was auf eine mit zunehmendem Alter verringerte Ansprechbarkeit des Gewebes auf Insulin hindeutet. Diese Beobachtung deckt sich mit den Aussagen anderer Autoren, die eine Abnahme von Insulinsensitivität und -Response mit zunehmendem Alter bei Lämmern und Kälbern beschreiben (Gelardi et al., 1999). Die fehlenden Unterschiede zwischen den Gruppen, mit denen man im Zusammenhang mit den anderen Ergebnissen bzgl. der Insulinsensitivität

zumindest in VP1 gerechnet hätte, lassen sich möglicherweise durch eine zu geringe Tierzahl erklären. Da die ivITTs nur an den männlichen Tieren durchgeführt wurden, halbierte sich die Stichprobengröße je Versuchsgruppe. Numerisch lag die Gruppe MATr in VP1 über den beiden *ad libitum*-Gruppen. Dies ließ sich jedoch statistisch nicht absichern. Auch ist nicht klar, ob die Einbeziehung der weiblichen Tiere zu einem anderen Ergebnis geführt hätte. Eine höhere  $AUC_{\text{Gluc}}$  und höhere Basalwerte von Insulin im ivGTT bei den männlichen Tieren weisen auf einen Geschlechterunterschied im Insulin- und Glucosestoffwechsel hin, der möglicherweise auch bei den Ergebnissen des ivITT zum Tragen gekommen wäre. Allerdings wurden die weiblichen Tiere diesem Test nicht unterzogen, da wir das zwar sehr unwahrscheinliche, aber zumindest theoretisch bestehende „Restrisiko“ einer Antigenizität des speziefremden Insulins nicht eingehen wollten. Humanes und bovines Insulin unterscheiden sich in drei Aminosäuren (Mohan, 2002), weshalb theoretisch eine Antikörperbildung gegen Insulin induziert werden könnte, die im Sinne einer Autoimmunerkrankung die Wirkungen des körpereigenen Insulins beeinträchtigt und damit einen späteren Einsatz der Tiere im Milchviehbestand gefährdet hätte. Da zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns kein bovines Insulin auf dem Markt verfügbar war, musste auf humanes Insulin zurückgegriffen werden. Dies war jedoch bereits in anderen Studien an Kühen (Oikawa und Oetzel, 2006) und Kälbern (Bossaert et al., 2009) dementsprechend erprobt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es einige Untersuchungen gibt, die bestätigen, dass eine intensive Fütterung zu einer verringerten Insulinsensitivität führt (Bach et al., 2013; Yunta et al., 2015), wohingegen andere Studien dies nicht bestätigen konnten (MacPherson et al., 2016). Eine Erklärung für die abweichenden Ergebnisse dieser Studien könnten die unterschiedlichen Zeitpunkte sein, zu denen die Fütterungsregimes gestartet wurden und das unterschiedliche Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Testdurchführung (ivGTT und ivITT). Auch erfolgte die Durchführung der Tests nicht, wie bereits angesprochen, nach einem standardisierten Protokoll, was ebenfalls zu unterschiedlichen Resultaten geführt haben kann. Zusätzliche Faktoren könnten die unterschiedliche Zusammensetzung der Tränken sowie die Menge des MATs und die Fütterungsfrequenz sein.

Auch wenn in einigen Studien, inklusive der vorliegenden, gezeigt wurde, dass eine hohe Nährstoffzufuhr in der frühen Aufzuchtphase die Insulinsensitivität und den Glucosestoffwechsel beeinflussen kann, so zeigte sich im Verlauf des Versuchs, dass diese Veränderungen nur vorübergehend waren. Es gab keine Hinweise auf anhaltende Effekte.

### 5.3.4 Genexpression gluconeogenetischer Enzyme im Lebergewebe

Die Leber, als einer der Hauptorte der Gluconeogenese, war weiterer Bestandteil der Untersuchungen. Schon beim Neonaten spielt die Gluconeogenese zur Erhaltung der Glucosehomöostase eine wichtige Rolle (Steinhoff-Wagner et al., 2011a). Der Anstieg der mRNA-Menge der gluconeogenetischen Enzyme aus dem Lebergewebe der hier untersuchten Tiere von der ersten Biopsie an LT 19 zur zweiten Biopsie an LT 100 zeigte eine Steigerung der gluconeogenetischen Kapazität in Abhängigkeit vom Alter der Tiere an. Es ist denkbar, dass mit der Umstellung vom nicht-wiederkauenden Neugeborenen zum wiederkauenden Jungrind auch eine Anpassung der Gluconeogenesevorgänge stattfand. Während beim Monogastrier die Neusynthese von Glucose aus Lactat, Glycerin und Aminosäuren stattfindet (Woerle et al., 2003), dienen beim Wiederkäuer vor allem die kurzkettigen Fettsäuren aus der ruminalen Fermentation als Substrat (Reynolds et al., 2003; Overton und Waldron, 2004; Larsen und Kristensen, 2009). Auch der Wechsel von Lactose als verfügbares Substrat aus der flüssigen Nahrung, zu kurzkettigen Fettsäuren aus der Verdauung von Festfutter im Pansen gilt als wichtiger Trigger für die Entwicklung zum Wiederkäuer (Aschenbach et al., 2010; Steinhoff-Wagner et al., 2011a). Auch wenn bereits beim nicht-ruminierenden Wiederkäuer Besonderheiten im Vergleich zum Monogastrier auftreten, wie z.B. eine hohe Gluconeogenesekapazität aus Propionat und eine vergleichsweise geringe suppressive Wirkung von Insulin auf die Gluconeogenese (Hostettler-Allen et al., 1994; Donkin und Armentano, 1995), so ist dennoch eine Anpassung auf den neuen Verdauungsstatus notwendig.

Ein Einfluss der Fütterung auf die Menge an exprimierter mRNA konnte in unserer Studie nicht nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit Beobachtungen anderer Untersuchungen, bei denen die Fütterung ebenfalls keinen Einfluss auf die Messwerte der Enzyme hatte (Scheuer et al., 2006; Steinhoff-Wagner et al., 2011a; Lohakare et al., 2012). Steinhoff-Wagner et al. (2011a) folgerten, dass Kälber, die Kolostrum erhielten, zwar einen verbesserten Glucosestatus aufwiesen als Tiere, die MAT bekamen, führten dies aber eher auf eine erhöhte orale Glucoseabsorption als auf kolostrale Effekte auf die endogene Glucoseproduktion und Gluconeogenese zurück. Die Studie zeigte ebenfalls, dass die in der Milch enthaltenen bioaktiven Substanzen keinen stimulierenden Einfluss auf die Gluconeogenese hatten, was auch dem Ergebnis unserer Untersuchung entspricht. Obwohl die *ad libitum*-Kälber in der Phase der unterschiedlichen Fütterung Unterschiede zu den restriktiv getränkten Tieren in anderen Parametern (Insulin, Glucose, ivGTT) aufwiesen, schien dies keinen Einfluss auf die Enzymausstattung in der Leber zu haben. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass die

endogene Regulation der gluconeogenetischen Enzyme in neugeborenen Kälbern eher schwach ausgeprägt ist (Hammon et al., 2003; Scheuer et al., 2006). Dennoch gibt es Untersuchungen in denen die Fütterung auch die Expression und Aktivität der Enzyme PC und PEPCK in der Leber beeinflusst hatte (Hammon et al., 2003). Allerdings hatten in unserer Studie alle Tiere in den ersten 3 Lebenstagen Kolostrum bekommen, während in der o.g. Untersuchung eine Gruppe direkt mit MAT gefüttert wurde, so dass eine mögliche Beeinflussung durch die Kolostrumaufnahme in unserer Untersuchung nicht dargestellt werden kann. Des Weiteren scheint der aktuelle Hungerzustand der Tiere eine Rolle zu spielen. In der Untersuchung von Hammon et al. (2003) wurden die Werte bei gefasteten Tieren gemessen, während wir ohne Rücksicht auf eine vorherige Nahrungsaufnahme Proben entnommen hatten. Da die Aktivität der PC insbesondere bei Nahrungskarenz eine Rolle zur Bereitstellung von Gluconeogenesevorläufern spielt, steht die PEPCK-Aktivität eher im Vordergrund wenn die Nahrungszufuhr unbeschränkt ist (Aschenbach et al., 2010). Dies sollte bei weiteren Studien unbedingt berücksichtigt werden. Auch wurde im hier durchgeführten Versuch ausschließlich die mRNA-Menge, nicht jedoch die Aktivität der Enzyme ermittelt, so dass auch darüber keine Aussage getroffen werden kann. Hammon et al. (2005) vermuteten eine unterschiedliche Regulation der Enzym-Expression und –Aktivität beim sich entwickelnden Kalb, da die Autoren keinen Zusammenhang zwischen mRNA-Konzentration und Aktivität der Enzyme feststellen konnten. Weiterhin wäre auch denkbar, dass das kritische Zeitfenster, in dem die Entwicklung des hepatischen Glucosemetabolismus sensibel auf Einfluss nehmende Faktoren reagiert, nicht in den ersten Lebenswochen, sondern schon in der fetalen Phase liegt. Hierfür sprechen Untersuchungen an Rattenwelpen, bei denen langfristig anhaltende Unterschiede in der Glucokinase- und PEPCK-Aktivität nur durch pränatale Fütterungseinflüsse auf die Muttertiere ausgelöst wurden, nicht aber durch Unterschiede in der postnatalen Fütterung der Jungtiere selbst (Desai et al., 1995).

Abschließend ist zu sagen, dass es aufgrund der vorliegenden Ergebnisse keinen Hinweis auf einen Einfluss der unterschiedlichen Fütterungsregimes auf die mRNA-Menge von PC und PEPCK aus dem Lebergewebe gab und damit keinen Anhaltspunkt, dass die unterschiedliche Fütterung die endogene Glucoseproduktion beeinflusst hat. Lediglich eine altersabhängige Entwicklung der Gluconeogenesevorgänge zeichnete sich ab.

## 6 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse des hier vorgestellten Versuchs zeigen, dass eine intensive Fütterung über die ersten 4 Lebenswochen zu höheren täglichen Zunahmen und Gewichten in diesem Zeitraum führte. Die Kälber, denen Tränke zur freien Verfügung stand, nahmen ca. 50 % mehr Tränke auf als die restriktiv ernährte Gruppe. Damit erreichten die *ad libitum*-Gruppen Werte, die einer natürlichen Tränkeaufnahmemenge eher entsprachen als es den Tieren in einem restriktiven Tränkeverfahren möglich wäre. Das Tränkeaufnahmeverhalten der restriktiv gefütterten Tiere lässt darauf schließen, dass die Kälber von der rationierten Tränkemenge nicht satt geworden waren und deshalb eine hohe Motivation hatten immer wieder die Tränkestation aufzusuchen. Dies kann für die Tiere Stress bedeuten, auch wenn es in unseren Untersuchungen keine Hinweise auf eine dadurch entstandene Beeinflussung der Stoffwechsellistung gab. Die restriktive Fütterung stimulierte die Kraftfutteraufnahme in gleichem Maß wie die *ad libitum*-Fütterung von Vollmilch, so dass mit dieser Studie, wie bereits in diversen vorangegangenen Untersuchungen, die durchaus lange Zeit verbreitete Annahme entkräftet wird, dass eine intensive Fütterung mit negativen Effekten auf die Kraftfutteraufnahme und die Vormagenentwicklung einhergeht. Auch ein positiver Effekt von bioaktiven Milchinhaltsstoffen auf die Entwicklung und Ausreifung des Vormagensystems sowie des gesamten Gastrointestinaltrakts ist nicht auszuschließen. Dennoch bedarf es weiterer Studien im Hinblick auf einen gesunden Pansen und Darm, um den optimalen Zeitraum und das passende Management für den Übergang von flüssiger auf feste Nahrung zu bestimmen.

Anhand der Ergebnisse der Blutanalysen, der mRNA-Messungen von Enzymen aus dem Lebergewebe und der durchgeführten ivGTTs konnte gezeigt werden, dass eine intensive Fütterung die Insulinsensitivität herabsetzen und den Glucosestoffwechsel beeinflussen kann, wobei ein Einfluss auf die endogene Glucoseproduktion nicht nachgewiesen werden konnte. Allerdings wäre auch eine Interpretation aus einer anderen Perspektive denkbar, denn die hier als „intensive Fütterung“ bezeichneten Nahrungsangebote kommen den natürlichen Verhältnissen näher, so dass man vielleicht sagen müsste, die restriktive Fütterung führte zu einer gesteigerten und unphysiologischen Insulinsensitivität, während die bei den *ad libitum*-Gruppen beobachteten Werte durchaus physiologisch sind. Auch hierzu besteht weiterer Forschungsbedarf, vor allem weil es für Kälber keine validierten Referenzwerte für die meisten Metaboliten und Hormone gibt.

Im Gegensatz zu unserer ursprünglich aufgestellten Hypothese waren alle oben genannten Effekte jedoch nur von kurzfristiger Dauer und verschwanden überwiegend ab dem Zeitpunkt

der Umstellung auf das gleiche Tränkeverfahren, das dem der restriktiven Gruppe entsprach. Demnach konnten wir keine Programmierungseffekte auf Stoffwechsel oder endokrine Regulatoren nachweisen, die mittel- und langfristig zu verbesserten Wachstumsraten sowie mit Eintritt in die Laktation zu einer verbesserten Milchleistung geführt hätten.

Ob es auf Ebene der Organentwicklung, insbesondere der Entwicklung des gesamten Gastrointestinaltrakts bzw. des Milchdrüsenparenchyms, infolge der differenzierten Fütterung zu Programmierungseffekten gekommen ist, konnten wir mit dieser Studie nicht erfassen.

### Anmerkung:

Die Fortführung der hier vorgestellten Studie, mit der weiteren Verfolgung der im Bestand gebliebenen weiblichen Tiere bis in die erste Laktation, war ein weiteres Forschungsprojekt der beteiligten Institutionen. Die Ergebnisse wurden bereits gemeinsam mit den hier vorgestellten im Journal of Dairy Science veröffentlicht (Kesser et al., 2017; Korst et al., 2017). Sie bestätigen die oben gemachte Annahme, dass die Effekte nur vorübergehend waren, denn weder bei den leistungsbezogenen Daten wie Milchleistung, Milchinhaltstoffe, Futteraufnahme, Körpergewicht und -kondition noch bei den endokrinen und metabolischen Messwerten konnten Unterschiede zwischen den ursprünglichen Tränkegruppen ausgemacht werden. Wenn auch eine numerisch höhere Milchleistung bei beiden *ad libitum*-Gruppen zu verzeichnen war, so konnte diese, möglicherweise aufgrund der fehlenden Stichprobengröße, statistisch nicht abgesichert werden.

## 7 Zusammenfassung

Untersuchungen zeigen, dass eine intensive Fütterung von Kälbern zu höheren Wachstumsraten im Kälberalter und zu einem verbesserten Leistungspotential im späteren Leben führt. In der hier vorgestellten Studie wurden 57 Kälber der Rasse Deutsche Holstein (28 männliche, 29 weibliche) innerhalb der ersten 4 Lebenswochen auf 3 verschiedene Arten gefüttert. Es sollte der Einfluss einer *ad libitum* Vollmilchtränke (VMadl, n = 20), einer *ad libitum* Milchaustauscher (MAT)-Tränke (MATadl, Konzentration 13,8 %, n = 17) und einer restriktiven MAT-Tränke (MATr, Konzentration 11,5 %, 6,78 kg/Tag, n = 20) sowohl auf Leistungsdaten wie Futteraufnahme und Wachstumsrate, als auch auf das Tränkeaufnahmeverhalten der Tiere im kurz- und mittelfristigen Zeitraum bis zum Alter von 110 Tagen untersucht werden. Des Weiteren wurden metabolische und endokrinologische Blutparameter erfasst und Glucose- und Insulintoleranztests sowie mRNA-Analysen aus Lebergewebe durchgeführt, um Informationen zum Stoffwechselstatus der Kälber zu erhalten. Nachdem alle Tiere bis zum 3. Lebenstag mit Kolostrum von der Mutter versorgt worden waren, erhielten sie bis Tag 27 (Versuchsphase 1, VP1) entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit unterschiedliche Tränkeangebote, wobei die restriktiv gefütterten Tiere bereits ab der 2. Mahlzeit auf 6 kg Kolostrum/Tag beschränkt wurden. Von Tag 28 bis 55 erhielten alle Kälber MAT, entsprechend dem Tränkeprotokoll der restriktiv gefütterten Gruppe, und wurden dann bis Tag 69 schrittweise abgesetzt (VP2). Heu, Kraftfutter und Wasser stand den Tieren ab Beginn der 2. Lebenswoche zur freien Verfügung. Ab Tag 70 bis 110 (VP3) erhielten die Kälber eine Totale-Misch-Ration auf Basis von Gras-, Mais- und Pressschnitzsilage.

Blutproben wurden unmittelbar nach der Geburt entnommen (Tag 0), sowie an den Tagen 1, 3, 11, 22, 34, 43, 52, 70, 90, 108 post natum (p.n.). Intravenöse Glucosetoleranztests (ivGTT) wurden an den Tagen 22, 52 und 108 p.n. durchgeführt und an den Tagen 19 und 100 p.n. wurden Gewebeproben aus der Leber entnommen. Die männlichen Tiere (n = 28) wurden zusätzlich an den Tagen 24, 54 und 110 p.n. einem intravenösen Insulintoleranztest unterzogen.

In VP1 übertraf die Tränkeaufnahme der beiden *ad libitum*-Gruppen die der restriktiven Gruppe um nahezu 50 % und die aufgenommene Menge an metabolisierbarer Energie lag bei VMadl und MATadl deutlich über den Werten von MATr, mit den höchsten Werten in Gruppe VMadl. Die Kraftfutteraufnahme unterschied sich in dieser Phase nicht zwischen den Gruppen, während in VP2 die Gruppe VMadl tendenziell mehr Kraftfutter aufnahm als

MATadl. MATr unterschied sich in VP2 von keiner der beiden anderen Gruppen. Die täglichen Zunahmen und Körpergewichte waren in den ersten 4 Wochen in Gruppe MATr niedriger als bei MATadl und VMadl. In VP3 konnte jedoch kein Unterschied der täglichen Zunahmen und Körpergewichte zwischen den Gruppen mehr festgestellt werden.

In der Phase der unterschiedlichen Fütterung besuchten die restriktiv gefütterten Kälber den Tränkeautomaten viel häufiger als die beiden *ad libitum*-Gruppen, wobei 70 % der von ihnen ausgeführten Besuche ohne Anspruch auf Tränke stattfanden. Ab dem Zeitpunkt der Fütterungsumstellung mit Tag 28 verdoppelte sich die Anzahl der Besuche auch in den ehemals *ad libitum* gefütterten Gruppen, mit einem Anteil von erfolglosen Besuchen von über 70 %.

Die Leptinspiegel im Blut stiegen, vergleichbar mit denen des Gesamtproteingehalts, nach der Kolostrumaufnahme in allen Gruppen an. Gruppenunterschiede bei den serologischen Parametern (Nichtveresterte Fettsäuren (NEFA), Glucose, Insulin), dem *Revised quantitative insulin sensitivity check index* (RQUICKI) und den Kennwerten aus den ivGTTs (Basal- und Peakkonzentration, Differenz zwischen Basalwert und Peak, *Area under the curve*) beschränkten sich hauptsächlich auf VP1. Die Gruppe MATr hatte in VP1 niedrigere Insulin- und Glucosewerte, sowie höhere RQUICKI- und NEFA-Werte als mindestens eine der beiden *ad libitum*-Gruppen. Auch bei den insulinbezogenen Kenngrößen aus dem ivGTT lag die Gruppe MATr in VP1 unter den Werten von VMadl.

Die mRNA-Menge der hepatischen Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und Pyruvat-Carboxylase stieg von Tag 19 bis Tag 100 in allen Gruppen an.

Diese Ergebnisse weisen auf eine zumindest vorübergehend höhere Insulinsensitivität bei den restriktiv getränkten Kälbern im Vergleich zu den intensiv gefütterten hin. Es gab jedoch keinen Hinweis darauf, dass eine längerfristige Beeinflussung im Sinne einer Programmierung von Stoffwechselregulatoren durch die unterschiedliche Fütterung stattgefunden hat. Offen bleibt auch ob ein Einfluss auf zellulärer Ebene (z.B. auf die Organentwicklung der Milchdrüse) erfolgt ist, der sich erst im späteren Leben zeigt.

Dass ein *ad libitum*-Tränkeangebot in den ersten Lebenswochen die Tränkeaufnahme und Wachstumsrate fördert, auch ohne die Kraffutteraufnahme negativ zu beeinflussen, wurde in diesem Versuch bestätigt. Auch im Hinblick auf das Wohlbefinden der Kälber zeigte sich das intensivere Tränkeverfahren als das den Bedürfnissen der Tiere besser angepasste.

## 8 Summary

### **Effect of different milk feeding intensities on performance, feed intake behaviour and on selected metabolic parameters of German Holstein calves**

High intensity feeding of dairy calves has been shown to increase growth rate in early life and to improve performance in adulthood. We tested the effect of 3 different feeding regimens during the first 4 weeks of life on performance (e.g. feed intake, growth rate etc.) and on the feed intake behaviour. In addition we obtained metabolic and endocrine data by collecting blood samples, performed glucose- and insulin tolerance tests and took liver biopsies for mRNA-analysis to assess the calves' metabolic status. 57 German Holstein calves (28 males, 29 females) were studied from birth until d 110 of life. The calves were allocated to 1 of 3 groups: VMadl (whole milk *ad libitum*, n = 20), MATadl (milk replacer *ad libitum*, 13.8 % solids, n = 17), MATr (milk replacer restricted, 11.5 % solids, 6.78 kg/calf per d, n = 20). After being fed colostrum for three days, calves were fed according to their group regimen until d 27 (Phase 1, VP1). By the 2<sup>nd</sup> meal, calves from MATr were restricted to 6 kg colostrum/d. From d 28 to d 55 all calves received the MATr feeding, followed by a gradual weaning until d 69 (VP2). Starting from week two, all calves had *ad libitum* access to hay, concentrate and water. From d 70 to d 110 (VP3) the calves were fed a total-mixed-ration based on grass-, corn- and pressed pulp-silage.

Blood samples were collected immediately after birth (d 0) and on d 1, 3, 11, 22, 34, 43, 52, 70, 90, 108 post natum (p.n.). Intravenous glucose tolerance tests (ivGTT) were performed on d 22, 52 and 108 p.n. and liver biopsies were taken on d 19 and 100 p.n.. Additionally, intravenous insulin tolerance tests (ivITT) were performed on male calves only on d 24, 54 and 110 p.n.

In VP1, liquid feed intake and energy intake (estimated as metabolizable energy) were about 50 % higher in the *ad libitum*-fed groups compared to MATr-calves. The highest energy intake was observed in group VMadl. Whereas there was no difference in concentrate intake between groups during VP1, VMadl-calves tended to have a higher concentrate intake than MATadl-calves during VP2. Concentrate intake of MATr-calves did not differ from any of the other groups. Average daily gain and body weight were lower in MATr-calves than in the *ad libitum*-fed calves (VMadl and MATadl) during the first 4 weeks of life, but these differences had disappeared in VP3.

During VP1 MATr-calves visited the automatic feeder more often than *ad libitum*-fed calves, and 70 % of these visits were unrewarded. In group MATadl and VMadl the same behaviour pattern of more than 70 % of unrewarded visits was observed after *ad libitum*-access was restricted on day 28.

In all groups leptin- and protein-concentration in serum increased with colostrum intake. Differences between groups in the metabolic and endocrine parameters (fatty acids, glucose, insulin), the revised quantitative insulin sensitivity check index (RQUICKI) and the variables of the ivGTT (basal- and peak-concentration, difference between baseline and peak, area under the curve) were mainly limited to VP1. MATr-calves had lower insulin- and glucose concentrations in VP1 and higher RQUICKI and fatty acids values than at least one of the *ad libitum*-fed groups. In addition, insulin-related measures that were assessed in the ivGTT during VP1 were lower in group MATr than in group VMadl. The mRNA-abundance of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase increased from d 19 to d 100 in all groups.

Our results suggest that insulin sensitivity was higher in restricted fed calves compared to *ad libitum* fed calves, at least temporarily. However, our results provide no evidence suggesting that rearing calves at different feeding intensities had sustained effects on metabolic regulation. It remains to be investigated whether the different feeding regimes affect the cellular development of organs (e.g. the mammary gland) which might have consequences later in life (e.g. increased/decreased milk yield).

Our study confirms that offering liquid feed *ad libitum* in the first weeks of life improved feed intake and growth rate without a negative effect on concentrate intake. In terms of the calves' welfare a more intensive feeding system seems to be better adapted to fit the needs of the calves.

## 9 Anhang

### Anhang I : Körpergewicht und tägliche Zunahme nach Woche

Vergleich zwischen den Gruppen MATr (restriktive Milchaustauschertränke mit einer Konzentration von 11,5 %), MATadl (Milchaustauschertränke *ad libitum* mit einer Konzentration von 13,8 %) und VMadl (Vollmilchtränke *ad libitum*)

Woche	Körpergewicht [kg]				Tägliche Zunahme [g]			
	MATr (n=19)	MATadl (n=17)	VMadl (n=20)	Gesamt (n=56)	MATr (n=19)	MATadl (n=17)	VMadl (n=20)	Gesamt (n=56)
1	44,4 ±0,3	45,1 ±0,6	45,3 ±0,5	44,9 ±0,3	764 <sup>b</sup> ±88	1083 <sup>a</sup> ±100	996 <sup>ab</sup> ±86	941 ±55
2	48,9 <sup>b</sup> ±0,3	51,6 <sup>a</sup> ±0,7	51,8 <sup>a</sup> ±0,4	50,7 ±0,3	499 <sup>Bb</sup> ±51	709 <sup>A</sup> ±60	778 <sup>a</sup> ±73	659 ±39
3	51,6 <sup>b</sup> ±0,3	57,0 <sup>a</sup> ±0,8	56,9 <sup>a</sup> ±0,6	55,1 ±0,3	325 <sup>b</sup> ±49	914 <sup>a</sup> ±78	805 <sup>a</sup> ±112	675 ±59
4	54,5 <sup>b</sup> ±0,3	63,3 <sup>a</sup> ±0,7	62,3 <sup>a</sup> ±0,6	60,0 ±0,4	583 ±60	742 ±94	563 ±67	624 ±43
5	59,0 <sup>b</sup> ±0,4	66,9 <sup>a</sup> ±0,7	65,7 <sup>a</sup> ±0,6	63,8 ±0,4	684 <sup>a</sup> ±90	271 <sup>b</sup> ±59	534 <sup>a</sup> ±67	505 ±48
6	63,8 <sup>b</sup> ±0,5	69,2 <sup>a</sup> ±0,8	70,2 <sup>a</sup> ±0,6	67,7 ±0,4	707 ±50	554 ±86	729 ±66	668 ±40
7	69,2 <sup>b</sup> ±0,5	74,1 <sup>a</sup> ±0,9	75,2 <sup>a</sup> ±0,6	72,8 ±0,4	891 ±71	741 ±172	655 ±76	761 ±64
8	76,2 <sup>Bb</sup> ±0,6	79,6 <sup>A</sup> ±0,9	80,5 <sup>a</sup> ±0,7	78,8 ±0,4	1126 ±75	967 ±159	1018 ±66	1039 ±59
9	84,0 <sup>Bb</sup> ±0,7	86,8 <sup>A</sup> ±1,0	88,2 <sup>a</sup> ±0,8	86,4 ±0,5	1029 ±74	1037 ±93	1091 ±82	1054 ±47
10	91,7 <sup>b</sup> ±0,7	94,6 ±1,1	95,7 <sup>a</sup> ±0,8	94,0 ±0,5	1283 ±83	1217 ±86	1106 ±91	1200 ±50
11	100,3 <sup>b</sup> ±0,8	102,4 <sup>ab</sup> ±1,2	103,8 <sup>a</sup> ±0,9	102,2 ±0,5	1001 ±113	981 ±127	1147 ±117	1047 ±68
12	106,7 <sup>b</sup> ±0,9	109,3 <sup>ab</sup> ±1,2	111,3 <sup>a</sup> ±0,9	109,1 ±0,6	908 ±78	972 ±80	1003 ±64	961 ±42
13	113,5 <sup>b</sup> ±0,9	115,8 <sup>ab</sup> ±1,3	117,3 <sup>a</sup> ±0,9	115,5 ±0,6	1017 <sup>a</sup> ±71	841 <sup>ab</sup> ±97	598 <sup>b</sup> ±110	814 ±59
14	120,2 ±0,9	121,2 ±1,4	121,8 ±1,0	121,1 ±0,6	973 ±89	692 ±130	834 ±179	838 ±81
15	127,5 ±1,0	126,6 ±1,5	129,0 ±1,1	127,8 ±0,7	1041 ±78	1060 ±114	1196 ±104	1100 ±57

Daten angegeben als MW ± SE;

unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p < 0,05$ ),

unterschiedliche Großbuchstaben kennzeichnen Trends ( $p < 0,10$ )

**Anhang II:** Körpergewicht bei Geburt und zu Ende jeder Versuchsphase (Tag 27, 69 und 105) sowie tägliche Zunahme von Geburt bis Tag 105 innerhalb der Versuchsphasen, Vergleich zwischen den Gruppen MATr (restriktive Milchaustauschertränke mit einer Konzentration von 11,5 %), MATadl (Milchaustauschertränke *ad libitum* mit einer Konzentration von 13,8 %) und VMadl (Vollmilchtränke *ad libitum*)

	KGW <sup>o</sup> [kg]			Tägliche Zunahme [g]		
	MATr (n = 19)	MATadl (n = 17)	VMadl (n = 20)	MATr (n = 19)	MATadl (n = 17)	VMadl (n = 20)
Geburt	41,9 ±0,8	41,8 ±1,4	42,3 ±1,3	-	-	-
VP*1	56,4 <sup>b</sup> ±1,0	65,4 <sup>a</sup> ±1,9	63,9 <sup>a</sup> ±1,8	545 <sup>b</sup> ±36	862 <sup>a</sup> ±45	785 <sup>a</sup> ±46
VP2	95,8 ±1,9	98,4 ±2,9	99,0 ±2,1	953 <sup>A</sup> ±36	798 <sup>B</sup> ±56	855 <sup>AB</sup> ±37
VP3	132 ±2,6	131 ±4,2	134 ±3,1	988 ±38	909 ±51	953 ±57

Daten angegeben als MW ± SE

unterschiedliche Kleinbuchstaben kennzeichnen Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p < 0,05$ ).

unterschiedliche Großbuchstaben kennzeichnen Trends ( $p < 0,10$ ).

<sup>o</sup>KGW = Körpergewicht

\*VP = Versuchsphase (VP1: Lebenstag(LT) 2 bis 27, VP2: LT 28 bis 69, VP3: LT 70 bis 105)

**Anhang III:** Übersicht über die Blutparameter innerhalb der drei Versuchsgruppen MATr (restriktive Milchaustauschertränke mit einer Konzentration von 11,5 %, n= 19), MATadl (Milchaustauschertränke *ad libitum* mit einer Konzentration von 13,8 %, n= 17) und VMadl (Vollmilchtränke *ad libitum*, n= 20) zu den einzelnen Probenahmeterminen

LT	Gesamteiweiß [g/dL]			BHB [mmol/L]			NEFA [ $\mu$ mol/L]			Glucose [mmol/L]			Insulin [ $\mu$ U/L]			Leptin [nmol/L]		
	MATr	MATadl	VMadl	MATr	MATadl	VMadl	MATr	MATadl	VMadl	MATr	MATadl	VMadl	MATr	MATadl	VMadl	MATr	MATadl	VMadl
<b>0*</b>	4,32 ±0,07	4,34 ±0,06	4,46 ±0,13	0,09 ±0,00	0,09 ±0,00	0,09 ±0,00	633 ±113	509 ±82	439 ±70	4,29 ±0,42	4,33 ±0,47	5,01 ±0,41	19,2 ±4,5	9,5 ±1,2	19,6 ±3,4	3,09 ±0,21	2,65 ±0,13	2,73 ±0,17
<b>1</b>	5,29 ±0,15	5,21 ±0,13	5,36 ±0,16	0,10 ±0,00	0,09 ±0,00	0,10 ±0,00	489 ±38	421 ±40	503 ±43	5,47 ±0,49	4,88 ±0,46	5,42 ±0,25	19,9 ±2,3	22,6 ±3,5	23,2 ±3,7	4,33 ±0,49	3,92 ±0,46	4,33 ±0,77
<b>3</b>	5,68 ±0,19	5,68 ±0,18	5,62 ±0,13	0,10 ±0,00	0,10 ±0,00	0,09 ±0,00	398 ±28	230 ±20	325 ±25	6,68 ±0,19	6,41 ±0,29	6,84 ±0,31	13,5 ±2,4	22,9 ±3,6	30,6 ±7,8	3,76 ±0,39	3,54 ±0,50	3,85 ±0,73
<b>11</b>	4,99 ±0,13	5,29 ±0,16	5,32 ±0,12	0,10 ±0,00	0,10 ±0,00	0,10 ±0,01	296 ±37	241 ±61	311 ±37	5,67 ±0,16	6,31 ±0,22	6,24 ±0,28	14,4 ±2,0	37,4 ±12,0	31,9 ±8,1	2,24 ±0,16	2,39 ±0,24	2,50 ±0,29
<b>22</b>	4,97 ±0,12	4,95 ±0,08	5,02 ±0,08	0,11 ±0,01	0,10 ±0,01	0,11 ±0,00	330 ±33	194 ±17	260 ±29	5,05 ±0,31	6,37 ±0,24	6,23 ±0,21	7,6 ±1,1	22,5 ±6,3	22,9 ±4,5	1,94 ±0,15	2,12 ±0,19	2,11 ±0,11
<b>34</b>	5,19 ±0,12	5,33 ±0,08	5,20 ±0,07	0,16 ±0,01	0,13 ±0,02	0,15 ±0,02	313 ±61	296 ±49	317 ±28	4,61 ±0,21	5,27 ±0,15	5,12 ±0,14	7,1 ±1,7	6,6 ±0,7	6,9 ±1,0	1,90 ±0,10	1,90 ±0,14	1,79 ±0,08
<b>43</b>	5,23 ±0,08	5,29 ±0,06	5,35 ±0,08	0,17 ±0,01	0,15 ±0,01	0,18 ±0,01	323 ±45	271 ±37	393 ±44	4,56 ±0,20	4,77 ±0,19	4,70 ±0,20	8,3 ±2,0	7,8 ±1,0	5,0 ±0,5	1,85 ±0,09	1,91 ±0,13	1,93 ±0,11
<b>52</b>	5,24 ±0,07	5,30 ±0,07	5,37 ±0,08	0,19 ±0,01	0,18 ±0,01	0,21 ±0,01	423 ±50	348 ±59	488 ±57	4,83 ±0,23	4,86 ±0,14	4,89 ±0,12	6,3 ±0,8	7,1 ±1,1	7,6 ±1,6	1,84 ±0,07	1,95 ±0,10	2,16 ±0,20
<b>70</b>	5,56 ±0,07	5,68 ±0,08	5,69 ±0,07	0,23 ±0,01	0,24 ±0,01	0,23 ±0,02	185 ±29	169 ±17	191 ±32	5,03 ±0,16	5,12 ±0,14	5,37 ±0,11	10,3 ±1,1	12,5 ±1,2	13,9 ±2,5	2,12 ±0,13	2,08 ±0,08	2,35 ±0,16
<b>90</b>	5,98 ±0,08	5,95 ±0,07	6,02 ±0,06	0,31 ±0,02	0,31 ±0,02	0,28 ±0,02	184 ±20	127 ±15	237 ±29	5,01 ±0,12	4,83 ±0,15	4,78 ±0,11	7,9 ±0,9	7,9 ±0,8	7,4 ±1,0	2,39 ±0,09	2,68 ±0,37	2,56 ±0,25
<b>108</b>	5,89 ±0,05	5,90 ±0,05	5,89 ±0,06	0,38 ±0,03	0,31 ±0,02	0,34 ±0,02	257 ±36	222 ±32	240 ±28	5,33 ±0,07	5,14 ±0,23	5,10 ±0,08	11,0 ±1,3	9,0 ±0,9	11,1 ±1,0	2,53 ±0,17	2,95 ±0,45	2,43 ±0,17

n = 57, Daten angegeben als MW  $\pm$  SE,

LT = Lebenstag, \*LT0 = Tag der Geburt

## 10 Literaturverzeichnis

- Adewuyi, A.A., Gruys, E., van Eerdenburg, F J C M (2005):** Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *The Veterinary Quarterly* **27**, 117–126.
- Altmann, M., Sauerwein, H., von Borell, E. (2005):** Relationship between plasma leptin concentrations and carcass composition in fattening mutton: a comparison with ultrasound results. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **89**, 326–330.
- Aoki, N., Kawamura, M., Matsuda, T. (1999):** Lactation-dependent down regulation of leptin production in mouse mammary gland. *Biochimica et Biophysica Acta* **1427**, 298–306.
- Armitage, J.A., Taylor, P.D., Poston, L. (2005):** Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *The Journal of Physiology* **565**, 3–8.
- Aschenbach, J.R., Kristensen, N.B., Donkin, S.S., Hammon, H.M., Penner, G.B. (2010):** Gluconeogenesis in dairy cows: the secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB Life* **62**, 869–877.
- Bach, A. (2012):** Ruminant Nutrition Symposium: Optimizing Performance of the Offspring: nourishing and managing the dam and postnatal calf for optimal lactation, reproduction, and immunity. *Journal of Animal Science* **90**, 1835–1845.
- Bach, A., Domingo, L., Montoro, C., Terre, M. (2013):** Short communication: insulin responsiveness is affected by the level of milk replacer offered to young calves. *Journal of Dairy Science* **96**, 4634–4637.
- Bagnell, C.A., Steinetz, B.G., Bartol, F.F. (2009):** Milk-Borne Relaxin and the Lactocrine Hypothesis for Maternal Programming of Neonatal Tissues. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1160**, 152–157.
- Baile, C.A., Glick, Z., Mayer, J. (1969):** Effects of secretin and cholecystokinin-pancreozymin on pancreatic juice and insulin secretion of goats. *Journal of Dairy Science* **52**, 513–517.
- Baird, G.D. (1981):** Lactation, pregnancy and metabolic disorder in the ruminant. *The Proceedings of the Nutrition Society* **40**, 115–120.
- Baldwin, R.L., VI., Jesse, B.W. (1992):** Developmental changes in glucose and butyrate metabolism by isolated sheep ruminal cells. *The Journal of Nutrition* **122**, 1149–1153.

- Baldwin, R.L., VI., McLeod, K.R., Klotz, J.L., Heitmann, R.N. (2004):** Rumen Development, Intestinal Growth and Hepatic Metabolism In The Pre- and Postweaning Ruminant. *Journal of Dairy Science* **87**, E55-E65.
- Barker, D.J., Hales, C.N., Fall, C.H., Osmond, C., Phipps, K., Clark, P.M. (1993):** Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* **36**, 62–67.
- Barker, D.J., Osmond, C. (1988):** Low birth weight and hypertension. *BMJ (Clinical research ed.)* **297**, 134–135.
- Barker, D.J., Winter, P.D., Osmond, C., Margetts, B., Simmonds, S.J. (1989):** Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *The Lancet* **2**, 577–580.
- Bar-Peled, U., Robinzon, B., Maltz, E., Tagari, H., Folman, Y., Bruckental, I., Voet, H., Gacitua, H., Lehrer, A.R. (1997):** Increased weight gain and effects on production parameters of Holstein heifer calves that were allowed to suckle from birth to six weeks of age. *Journal of Dairy Science* **80**, 2523–2528.
- Barrenetxe, J., Villaro, A.C., Guembe, L., Pascual, I., Munoz-Navas, M., Barber, A., Lostao, M.P. (2002):** Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes. *Gut* **50**, 797–802.
- Bartok, C.J., Ventura, A.K. (2009):** Mechanisms underlying the association between breastfeeding and obesity. *International Journal of Pediatric Obesity* **4**, 196–204.
- Bartol, F.F., Wiley, A.A., Bagnell, C.A. (2008):** Epigenetic programming of porcine endometrial function and the lactocrine hypothesis. *Reproduction in Domestic Animals* **43 Suppl 2**, 273–279.
- Bartol, F.F., Wiley, A.A., Miller, D.J., Silva, A.J., Roberts, K.E., Davolt, M L P, Chen, J.C., Frankshun, A.-L., Camp, M.E., Rahman, K.M., Vallet, J.L., Bagnell, C.A. (2013):** Lactation Biology Symposium: lactocrine signaling and developmental programming. *Journal of Animal Science* **91**, 696–705.
- Bassett, J.M., Weston, R.H., Hogan, J.P. (1971):** Dietary regulation of plasma insulin and growth hormone concentrations in sheep. *Australian Journal of Biological Sciences* **24**, 321–330.

- Bastard, J.P., Robert, J.J., Jardel, C., Bruckert, E., Grimaldi, A., Hainque, B. (2001):** Is quantitative insulin sensitivity check index, a fair insulin sensitivity index in humans? *Diabetes & Metabolism* **27**, 69–70.
- Bateman, H.G., II., Hill, T.M., Aldrich, J.M., Schlotterbeck, R.L., Firkins, J.L. (2012):** Meta-analysis of the effect of initial serum protein concentration and empirical prediction model for growth of neonatal Holstein calves through 8 weeks of age. *Journal of Dairy Science* **95**, 363–369.
- Bates, S.H., Gardiner, J.V., Jones, R.B., Bloom, S.R., Bailey, C.J. (2002):** Acute stimulation of glucose uptake by leptin in 16 muscle cells. *Hormone and Metabolic Research* **34**, 111–115.
- Bauman, D.E., Currie, W.B. (1980):** Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science* **63**, 1514–1529.
- Bergman, E.N. (1971):** Hyperketonemia-ketogenesis and ketone body metabolism. *Journal of Dairy Science* **54**, 936–948.
- Bergman, E.N. (1990):** Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews* **70**, 567–590.
- Bergman, E.N., Reulein, S.S., Corlett, R.E. (1989):** Effects of obesity on insulin sensitivity and responsiveness in sheep. *The American Journal of Physiology* **257**, E772-781.
- Bingley, P.J., Colman, P., Eisenbarth, G.S., Jackson, R.A., McCulloch, D.K., Riley, W.J., Gale, E.A. (1992):** Standardization of IVGTT to predict IDDM. *Diabetes Care* **15**, 1313–1316.
- Bjerre-Harpøth, V., Friggens, N.C., Thorup, V.M., Larsen, T., Damgaard, B.M., Ingvarsten, K.L., Moyes, K.M. (2012):** Metabolic and production profiles of dairy cows in response to decreased nutrient density to increase physiological imbalance at different stages of lactation. *Journal of Dairy Science* **95**, 2362–2380.
- Blättler, U., Hammon, H.M., Morel, C., Philipona, C., Rauprich, A., Romé, V., Le Huërou-Luron, I., Guilloteau, P., Blum, J.W. (2001):** Feeding colostrum, its composition and feeding duration variably modify proliferation and morphology of the intestine and digestive enzyme activities of neonatal calves. *The Journal of Nutrition* **131**, 1256–1263.

- Block, N.E., Buse, M.G. (1989):** Effects of hypercortisolemia and diabetes on skeletal muscle insulin receptor function in vitro and in vivo. *The American Journal of Physiology* **256**, E39-48.
- Block, S.S., Smith, J.M., Ehrhardt, R.A., Diaz, M.C., Rhoads, R.P., van Amburgh, M.E., Boisclair, Y.R. (2003):** Nutritional and developmental regulation of plasma leptin in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **86**, 3206–3214.
- Bloom, S.R., Edwards, A.V. (1981):** Pancreatic endocrine responses to stimulation of the peripheral ends of the vagus nerves in conscious calves. *The Journal of Physiology* **315**, 31–41.
- Blum, J.W., Hammon, H. (2000a):** Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. *Livestock Production Science* **66**, 151–159.
- Blum, J.W., Hammon, H.M. (2000b):** Bovines Kolostrum: Mehr als nur ein Immunglobulinlieferant. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* **142**, 221–228.
- Blum, J.W., Zbinden, Y., Hammon, H.M., Chilliard, Y. (2005):** Plasma leptin status in young calves: effects of pre-term birth, age, glucocorticoid status, suckling, and feeding with an automatic feeder or by bucket. *Domestic Animal Endocrinology* **28**, 119–133.
- Blundell, J.E., MacDiarmid, J.I. (1997):** Fat as a risk factor for overconsumption: satiation, satiety, and patterns of eating. *Journal of the American Dietetic Association* **97**, S63-69.
- Bossaert, P., Leroy, J.L., de Vlieghe, S., Opsomer, G. (2008):** Interrelations between glucose-induced insulin response, metabolic indicators, and time of first ovulation in high-yielding dairy cows. *Journal of Dairy Science* **91**, 3363–3371.
- Bossaert, P., Leroy, J L M R, de Campeneere, S., de Vlieghe, S., Opsomer, G. (2009):** Differences in the glucose-induced insulin response and the peripheral insulin responsiveness between neonatal calves of the Belgian Blue, Holstein-Friesian, and East Flemish breeds. *Journal of Dairy Science* **92**, 4404–4411.
- Boullu-Ciocca, S., Dutour, A., Guillaume, V., Achard, V., Oliver, C., Grino, M. (2005):** Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome. *Diabetes* **54**, 197–203.

- Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., DePinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H., Yancopoulos, G.D. (1991):** ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**, 663–675.
- Bouret, S.G., Simerly, R.B. (2004):** Minireview: Leptin and development of hypothalamic feeding circuits. *Endocrinology* **145**, 2621–2626.
- Bratanova-Tochkova, T.K., Cheng, H., Daniel, S., Gunawardana, S., Liu, Y.-J., Mulvaney-Musa, J., Schermerhorn, T., Straub, S.G., Yajima, H., Sharp, G.W.G. (2002):** Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes* **51 Suppl 1**, S83-90.
- Brockman, R.P. (1986):** Pancreatic and adrenal hormonal regulation of metabolism. In: Milligan LP, Grovum WL, Dobson A (Hrsg.), *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants*. Prentice Hall Inc, Englewood Cliffs, N.J., 405–419.
- Broughton, C.W., Lecce, J.G. (1970):** Electron-microscopic studies of the jejunal epithelium from neonatal pigs fed different diets. *The Journal of Nutrition* **100**, 445–449.
- Brown, E.G., Vandehaar, M.J., Daniels, K.M., Liesman, J.S., Chapin, L.T., Forrest, J.W., Akers, R.M., Pearson, R.E., Weber Nielsen, M.S. (2005a):** Effect of increasing energy and protein intake on mammary development in heifer calves. *Journal of Dairy Science* **88**, 595–603.
- Brown, E.G., Vandehaar, M.J., Daniels, K.M., Liesman, J.S., Chapin, L.T., Keisler, D.H., Weber Nielsen, M.S. (2005b):** Effect of increasing energy and protein intake on body growth and carcass composition of heifer calves. *Journal of Dairy Science* **88**, 585–594.
- Burggren, W. (1999):** Genetic, environmental and maternal influences on embryonic cardiac rhythms. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* **124**, 423–427.
- Burrin, D.G., Davis, T.A., Ebner, S., Schoknecht, P.A., Fiorotto, M.L., Reeds, P.J. (1997):** Colostrum enhances the nutritional stimulation of vital organ protein synthesis in neonatal pigs. *The Journal of Nutrition* **127**, 1284–1289.

- Burrin, D.G., Shulman, R.J., Reeds, P.J., Davis, T.A., Gravitt, K.R. (1992):** Porcine colostrum and milk stimulate visceral organ and skeletal muscle protein synthesis in neonatal piglets. *The Journal of Nutrition* **122**, 1205–1213.
- Burton, J.L., Kennedy, B.W., Burnside, E.B., Wilkie, B.N., Burton, J.H. (1989):** Variation in serum concentrations of immunoglobulins G, A, and M in Canadian Holstein-Friesian calves. *Journal of Dairy Science* **72**, 135–149.
- Bush, L.J., Staley, T.E. (1980):** Absorption of colostral immunoglobulins in newborn calves. *Journal of Dairy Science* **63**, 672–680.
- Cannon, B., Nedergaard, J. (2004):** Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews* **84**, 277–359.
- Capuco, A.V., Smith, J.J., Waldo, D.R., Rexroad, C.E. (1995):** Influence of Prepubertal Dietary Regimen on Mammary Growth of Holstein Heifers. *Journal of Dairy Science* **78**, 2709–2725.
- Carroll, E.J., Hungate, R.E. (1954):** The magnitude of the microbial fermentation in the bovine rumen. *Applied Microbiology* **2**, 205–214.
- Casabiell, X., Pineiro, V., Tome, M.A., Peino, R., Dieguez, C., Casanueva, F.F. (1997):** Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **82**, 4270–4273.
- Chapman, C.E., Erickson, P.S., Quigley, J.D., III., Hill, T.M., Bateman, H.G., II., Suarez-Mena, F.X., Schlotterbeck, R.L. (2016):** Effect of milk replacer program on calf performance and digestion of nutrients with age of the dairy calf. *Journal of Dairy Science* **99**, 2740–2747.
- Chilliard, Y., Bonnet, M., Delavaud, C., Faulconnier, Y., Leroux, C., Djiane, J., Bocquier, F. (2001):** Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domestic Animal Endocrinology* **21**, 271–295.
- Cimbala, M.A., Lamers, W.H., Nelson, K., Monahan, J.E., Yoo-Warren, H., Hanson, R.W. (1982):** Rapid changes in the concentration of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in rat liver and kidney. Effects of insulin and cyclic AMP. *The Journal of Biological Chemistry* **257**, 7629–7636.

- Clover, C.K., Zarkower, A. (1980):** Immunologic responses in colostrum-fed and colostrum-deprived calves. *American Journal of Veterinary Research* **41**, 1002–1007.
- Czech, M.P., Corvera, S. (1999):** Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 1865–1868.
- Davis-Rincker, L.E., Vandehaar, M.J., Wolf, C.A., Liesman, J.S., Chapin, L.T., Weber Nielsen, M.S. (2011):** Effect of intensified feeding of heifer calves on growth, pubertal age, calving age, milk yield, and economics. *Journal of Dairy Science* **94**, 3554–3567.
- de Koster, J., Hostens, M., Hermans, K., van den Broeck, W., Opsomer, G. (2016):** Validation of different measures of insulin sensitivity of glucose metabolism in dairy cows using the hyperinsulinemic euglycemic clamp test as the gold standard. *Domestic Animal Endocrinology* **57**, 117–126.
- de Koster, J., Hostens, M., van Eetvelde, M., Hermans, K., Moerman, S., Bogaert, H., Depreester, E., van den Broeck, W., Opsomer, G. (2015):** Insulin response of the glucose and fatty acid metabolism in dry dairy cows across a range of body condition scores. *Journal of Dairy Science* **98**, 4580–4592.
- de Koster, J., van Eetvelde, M., Hermans, K., van den Broeck, W., Hostens, M., Opsomer, G. (2017):** Short communication: Limitations of glucose tolerance tests in the assessment of peripheral tissue insulin sensitivity during pregnancy and lactation in dairy heifers. *Journal of Dairy Science* **100**, 2381–2387.
- de Passillé, A.M. (2001):** Sucking motivation and related problems in calves. *Applied Animal Behaviour Science* **72**, 175–187.
- de Passillé, A.M., Marnet, P.-G., Lapierre, H., Rushen, J. (2008):** Effects of twice-daily nursing on milk ejection and milk yield during nursing and milking in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **91**, 1416–1422.
- de Passillé, A.M.B., Rushen, J. (2006):** Calves' behaviour during nursing is affected by feeding motivation and milk availability. *Applied Animal Behaviour Science* **101**, 264–275.
- de Vos, P., Saladin, R., Auwerx, J., Staels, B. (1995):** Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 15958–15961.

- Deelen, S.M., Leslie, K.E., Steele, M.A., Eckert, E., Brown, H.E., DeVries, T.J. (2016):** Validation of a calf-side beta-hydroxybutyrate test and its utility for estimation of starter intake in dairy calves around weaning. *Journal of Dairy Science* **99**, 7624–7633.
- DeFronzo, R.A., Ferrannini, E. (1991):** Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* **14**, 173–194.
- DeFronzo, R.A., Tobin, J.D., Andres, R. (1979):** Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *The American Journal of Physiology* **237**, E214-223.
- Delavaud, C., Bocquier, F., Chilliard, Y., Keisler, D.H., Gertler, A., Kann, G. (2000):** Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *The Journal of Endocrinology* **165**, 519–526.
- Delavaud, C., Ferlay, A., Faulconnier, Y., Bocquier, F., Kann, G., Chilliard, Y. (2002):** Plasma leptin concentration in adult cattle: effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. *Journal of Animal Science* **80**, 1317–1328.
- Desai, M., Crowther, N.J., Lucas, A., Hales, C.N. (1996):** Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *The British Journal of Nutrition* **76**, 591–603.
- Desai, M., Crowther, N.J., Ozanne, S.E., Lucas, A., Hales, C.N. (1995):** Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. *Biochemical Society Transactions* **23**, 331–335.
- Desai, M., Gayle, D., Babu, J., Ross, M.G. (2005):** Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **288**, R91-96.
- DLG- Futterwerttabellen - Wiederkäuer (1997):** DLG-Futterwerttabellen - Wiederkäuer. DLG-Verl., 7., erw. und überarb. Aufl., Frankfurt am Main.
- Donkin, S.S., Armentano, L.E. (1995):** Insulin and glucagon regulation of gluconeogenesis in preruminating and ruminating bovine. *Journal of Animal Science* **73**, 546–551.
- Donovan, S.M., Odle, J. (1994):** Growth factors in milk as mediators of infant development. *Annual Review of Nutrition* **14**, 147–167.

- Drackley, J.K., Dann, H.M., Douglas, N., Guretzky, N.A.J., Litherland, N.B., Underwood, J.P., Loor, J.J. (2016):** Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Italian Journal of Animal Science* **4**, 323–344.
- Dühlmeier, R., Hacker, A., Widdel, A., von Engelhardt, W., Sallmann, H.-P. (2005):** Mechanisms of insulin-dependent glucose transport into porcine and bovine skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **289**, R187-197.
- Dühlmeier, R., Sammet, K., Widdel, A., von Engelhardt, W., Wernery, U., Kinne, J., Sallmann, H.-P. (2007):** Distribution patterns of the glucose transporters GLUT4 and GLUT1 in skeletal muscles of rats (*Rattus norvegicus*), pigs (*Sus scrofa*), cows (*Bos taurus*), adult goats, goat kids (*Capra hircus*), and camels (*Camelus dromedarius*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* **146**, 274–282.
- Eckert, E., Brown, H.E., Leslie, K.E., DeVries, T.J., Steele, M.A. (2015):** Weaning age affects growth, feed intake, gastrointestinal development, and behavior in Holstein calves fed an elevated plane of nutrition during the preweaning stage. *Journal of Dairy Science* **98**, 6315–6326.
- Egli, C.P., Blum, J.W. (1998):** Clinical, haematological, metabolic and endocrine traits during the first three months of life of suckling simmentaler calves held in a cow-calf operation. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A* **45**, 99–118.
- Eicher-Pruiett, S.D., Morrill, J.L., Nagaraja, T.G., Higgins, J.J., Anderson, N.V., Reddy, P.G. (1992):** Response of young dairy calves with lasalocid delivery varied in feed sources. *Journal of Dairy Science* **75**, 857–862.
- Elmahdi, B., Sallmann, H.P., Fuhrmann, H., von Engelhardt, W., Kaske, M. (1997):** Comparative aspects of glucose tolerance in camels, sheep, and ponies. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Physiology* **118**, 147–151.
- Emilsson, V., Liu, Y.L., Cawthorne, M.A., Morton, N.M., Davenport, M. (1997):** Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes* **46**, 313–316.
- Erhard, M.H., Amon, P., Nuske, S., Stangassinger, M. (1999):** Studies on the systemic availability of maternal and endogeneously produced immunoglobulin G1 and G2 in

- newborn calves by using newly developed ELISA systems. systemsUntersuchungen zur systemischen Verfügbarkeit von maternalen und endogen produzierten Immunglobulin G1 und G2 bei neugeborenen Kälbern unter Verwendung von neu entwickelten ELISA-Systemen. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **81**, 239–248.
- Estienne, M.J., Harper, A.F., Barb, C.R., Azain, M.J. (2000):** Concentrations of leptin in serum and milk collected from lactating sows differing in body condition. *Domestic Animal Endocrinology* **19**, 275–280.
- Fahey, G.C., Berger, L.L. (1988):** Carbohydrate nutrition of ruminants. In: Church DC (Hrsg.), *The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs NJ, 269–297.
- Fernandez-Moreno, M.D., Serrano-Rios, M., Prieto, J.C. (1987):** Identification of insulin receptors in epithelial cells from duodenum, jejunum, ileum, caecum, colon and rectum in the rat. *Diabète & Métabolisme* **13**, 135–139.
- Fiebig, U. (1991):** Wachstums- und Entwicklungsprozesse beim Kalb. In: Schmoldt P, Bünger U (Hrsg.), *Kälber- und Jungrinderaufzucht. Veterinärmedizinische Aufgaben und Erfahrungen*. Fischer 1. Aufl., Jena, 27–47.
- Foldager, J., Sejrsen, K. (1991):** Opdrætningsintensitetens indflydelse på den senere mælkeproduktion hos RDM og SDM kvier. Rearing intensity in dairy heifers and the effect on subsequent milk production. National Institute of Animal Science, Foulum, Denmark. *Report No. 693*.
- Freinkel, N., Metzger, B.E. (1979):** Pregnancy as a tissue culture experience: the critical implications of maternal metabolism for fetal development. *Ciba Foundation Symposium. Pregnancy Metabolism, Diabetes and the Fetus*, 3–28.
- Friedman, J.M., Halaas, J.L. (1998):** Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**, 763–770.
- Gardner, D.S., Tingey, K., Van Bon, B W M, Ozanne, S.E., Wilson, V., Dandrea, J., Keisler, D.H., Stephenson, T., Symonds, M.E. (2005):** Programming of glucose-insulin metabolism in adult sheep after maternal undernutrition. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **289**, R947-954.

- Geiger, A.J., Parsons, C.L.M., James, R.E., Akers, R.M. (2016):** Growth, intake, and health of Holstein heifer calves fed an enhanced preweaning diet with or without postweaning exogenous estrogen. *Journal of Dairy Science* **99**, 3995–4004.
- Gelardi, N.L., Rapoza, R.E., Renzulli, J.F., Cowett, R.M. (1999):** Insulin resistance and glucose transporter expression during the euglycemic hyperinsulinemic clamp in the lamb. *The American Journal of Physiology* **277**, E1142-1149.
- Georgiev, I.P., Georgieva, T.M., Pfaffl, M., Hammon, H.M., Blum, J.W. (2003):** Insulin-like growth factor and insulin receptors in intestinal mucosa of neonatal calves. *The Journal of Endocrinology* **176**, 121–132.
- Ghorbani, A., Sadri, H., Alizadeh, A.R., Bruckmaier, R.M. (2012):** Performance and metabolic responses of Holstein calves to supplemental chromium in colostrum and milk. *Journal of Dairy Science* **95**, 5760–5769.
- Giesecke, D., Beck, U., Wiesmayr, S., Stangassinger, M. (1979):** The effect of rumen epithelial development on metabolic activities and ketogenesis by the tissue in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology* **62B**, 459–463.
- Girard, J., Ferre, P., Pegorier, J.P., Duee, P.H. (1992):** Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. *Physiological Reviews* **72**, 507–562.
- Gluckman, P.D., Hanson, M.A. (2004):** Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatric Research* **56**, 311–317.
- Godden, S.M., Haines, D.M., Konkol, K., Peterson, J. (2009):** Improving passive transfer of immunoglobulins in calves. II: interaction between feeding method and volume of colostrum fed. *Journal of Dairy Science* **92**, 1758–1764.
- Goerigk, D.I. (2011):** Peripartaler Energie- und Fettstoffwechsel sowie Insulinsensitivität von Färsen bei unterschiedlicher Aufzuchtintensität. Leipzig, Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät, Dissertation.
- Granner, D., Andreone, T., Sasaki, K., Beale, E. (1983):** Inhibition of transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene by insulin. *Nature* **305**, 549–551.
- Granner, D., Pilkis, S. (1990):** The genes of hepatic glucose metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 10173–10176.

- Grosvenor, C.E., Picciano, M.F., Baumrucker, C.R. (1993):** Hormones and growth factors in milk. *Endocrine Reviews* **14**, 710–728.
- Grove, K.L., Allen, S., Grayson, B.E., Smith, M.S. (2003):** Postnatal development of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Neuroscience* **116**, 393–406.
- Hadorn, U., Hammon, H., Bruckmaier, R.M., Blum, J.W. (1997):** Delaying colostrum intake by one day has important effects on metabolic traits and on gastrointestinal and metabolic hormones in neonatal calves. *The Journal of Nutrition* **127**, 2011–2023.
- Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., Friedman, J.M. (1995):** Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* **269**, 543–546.
- Hales, C.N., Barker, D.J. (1992):** Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* **35**, 595–601.
- Hammon, H., Blum, J.W. (1998):** Endocrine and metabolic changes in neonatal calves in response to growth hormone and long-R3-insulin-like growth factor-I administration. *Biology of the Neonate* **73**, 121–128.
- Hammon, H.M., Philipona, C., Zbinden, Y., Blum, J.W., Donkin, S.S. (2005):** Effects of dexamethasone and growth hormone treatment on hepatic gluconeogenic enzymes in calves. *Journal of Dairy Science* **88**, 2107–2116.
- Hammon, H.M., Sauter, S.N., Reist, M., Zbinden, Y., Philipona, C., Morel, C., Blum, J.W. (2003):** Dexamethasone and colostrum feeding affect hepatic gluconeogenic enzymes differently in neonatal calves. *Journal of Animal Science* **81**, 3095–3106.
- Hammon, H.M., Schiessler, G., Nussbaum, A., Blum, J.W. (2002):** Feed intake patterns, growth performance, and metabolic and endocrine traits in calves fed unlimited amounts of colostrum and milk by automate, starting in the neonatal period. *Journal of Dairy Science* **85**, 3352–3362.
- Haney, P.M., Estrin, C.R., Caliendo, A., Patel, M.S. (1986):** Precocious induction of hepatic glucokinase and malic enzyme in artificially reared rat pups fed a high-carbohydrate diet. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **244**, 787–794.
- Hanson, R.W., Garber, A.J. (1972):** Phosphoenolpyruvate carboxykinase. I. Its role in gluconeogenesis. *The American Journal of Clinical Nutrition* **25**, 1010–1021.

- Harmon, D.L. (1992):** Impact of nutrition on pancreatic exocrine and endocrine secretion in ruminants: a review. *Journal of Animal Science* **70**, 1290–1301.
- Hasegawa, S., Sako, T., Koyama, H., Motoyoshi, S. (1992):** Glucose utilization in cats, dogs and cows measured by euglycemic insulin clamp technique. *The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science* **54**, 583–584.
- Heinrichs, A.J., Heinrichs, B.S. (2011):** A prospective study of calf factors affecting first-lactation and lifetime milk production and age of cows when removed from the herd. *Journal of Dairy Science* **94**, 336–341.
- Hellemans, J., Mortier, G., de Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J. (2007):** qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology* **8**, R19.1-19.14.
- Hennies, M., Voglmayr, J.K., Dietrich, E., Stollmann, M., Moeller, R., Holtz, W. (2001):** Hormonal response of female goats to active immunization against a recombinant human inhibin alpha-subunit, and establishment of an enzyme-linked immunosorbent assay for caprine follicle-stimulating hormone. *Reproduction in Domestic Animals* **36**, 65–71.
- Hiremagalur, B., Johanning, G.L., Kalhan, S.C., Patel, M.S. (1992):** Alterations in hepatic lipogenic capacity in rat pups artificially reared on a milk-substitute formula high in carbohydrate or medium-chain triacylglycerides. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **3**, 474–480.
- Hiremagalur, B.K., Vadlamudi, S., Johanning, G.L., Patel, M.S. (1993):** Long-term effects of feeding high carbohydrate diet in pre-weaning period by gastrostomy: a new rat model for obesity. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity* **17**, 495–502.
- Holemans, K., Aerts, L., van Assche, F.A. (2003):** Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. *The Journal of Physiology* **547**, 11–20.
- Holley, D.C., Evans, J.W. (1974):** Effect of confinement on ovine glucose and immunoreactive insulin circadian rhythms. *The American Journal of Physiology* **226**, 1457–1461.
- Holness, M.J., Langdown, M.L., Sugden, M.C. (2000):** Early-life programming of susceptibility to dysregulation of glucose metabolism and the development of Type 2 diabetes mellitus. *Biochemical Journal* **349**, 657–665.

- Holtenius, K., Agenas, S., Delavaud, C., Chilliard, Y. (2003):** Effects of feeding intensity during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses. *Journal of Dairy Science* **86**, 883–891.
- Holtenius, P. (1993):** Hormonal regulation related to the development of fatty liver and ketosis. *Acta Veterinaria Scandinavica Suppl* **89**, 55–60.
- Holtenius, P., Holtenius, K. (1996):** New aspects of ketone bodies in energy metabolism of dairy cows: a review. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A* **43**, 579–587.
- Holtenius, P., Holtenius, K. (2007):** A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows. *Acta Veterinaria Scandinavica* **49**, 29.
- Horino, M., Machlin, L.J., Hertelendy, F., Kipnis, D.M. (1968):** Effect of short-chain fatty acids on plasma insulin in ruminant and nonruminant species. *Endocrinology* **83**, 118–128.
- Hostettler-Allen, R., Tappy, L., Blum, J.W. (1993):** Enhanced insulin-dependent glucose utilization in iron-deficient veal calves. *The Journal of Nutrition* **123**, 1656–1667.
- Hostettler-Allen, R.L., Tappy, L., Blum, J.W. (1994):** Insulin resistance, hyperglycemia, and glucosuria in intensively milk-fed calves. *Journal of Animal Science* **72**, 160–173.
- Houseknecht, K.L., McGuire, M.K., Portocarrero, C.P., McGuire, M.A., Berman, K. (1997):** Leptin is present in human milk and is related to maternal plasma leptin concentration and adiposity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **240**, 742–747.
- Houseknecht, K.L., Portocarrero, C.P. (1998):** Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Domestic Animal Endocrinology* **15**, 457–475.
- Houseknecht, K.L., Portocarrero, C.P., Ji, S., Lemenager, R., Spurlock, M.E. (2000):** Growth hormone regulates leptin gene expression in bovine adipose tissue: correlation with adipose IGF-1 expression. *The Journal of Endocrinology* **164**, 51–57.
- Hsu, W.H., Hummel, S.K. (1981):** Xylazine-induced hyperglycemia in cattle: a possible involvement of alpha 2-adrenergic receptors regulating insulin release. *Endocrinology* **109**, 825–829.
- Hugi, D., Blum, J.W. (1997):** Changes of blood metabolites and hormones in breeding calves associated with weaning. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A* **44**, 99–108.

- Hugi, D., Gut, S.H., Blum, J.W. (1997):** Blood metabolites and hormones--especially glucose and insulin--in veal calves: effects of age and nutrition. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A* **44**, 407–416.
- Hugi, D., Tappy, L., Sauerwein, H., Bruckmaier, R.M., Blum, J.W. (1998):** Insulin-dependent glucose utilization in intensively milk-fed veal calves is modulated by supplemental lactose in an age-dependent manner. *The Journal of Nutrition* **128**, 1023–1030.
- Husted, S.M., Nielsen, M.O., Tygesen, M.P., Kiani, A., Blache, D., Ingvarstsen, K.L. (2007):** Programming of intermediate metabolism in young lambs affected by late gestational maternal undernourishment. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **293**, E548-557.
- Jasper, J., Weary, D.M. (2002):** Effects of ad libitum milk intake on dairy calves. *Journal of Dairy Science* **85**, 3054–3058.
- Jentsch, W., Derno, M., Klein, M., Junghans, P., Lohrke, B. (2000):** Research note: is starch utilization for fat deposition in man different from that in animals? *Archiv für Tierernährung* **53**, 395–398.
- Jeroch, H., Drochner, W., Simon, O. (2008):** Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere. Ernährungsphysiologie, Futtermittelkunde, Fütterung; 198 Tabellen. Ulmer, 2., überarb. Aufl., Stuttgart.
- Jirtle, R.L., Skinner, M.K. (2007):** Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews. Genetics* **8**, 253–262.
- Jørgensen, S., Plum, T. (1923):** On the differential diagnosis between benign and malignant glycosuria by means of intravenous injections of small quantities of grape-sugar. *Acta Medica Scandinavica* **58**, 161–200.
- Kahn, C.R. (1978):** Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metabolism: Clinical and Experimental* **27**, 1893–1902.
- Kahn, C.R., Flier, J.S., Bar, R.S., Archer, J.A., Gorden, P., Martin, M.M., Roth, J. (1976):** The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans. Insulin-receptor disorders in man. *The New England Journal of Medicine* **294**, 739–745.

- Kaske, M., Elmahdi, B., von Engelhardt, W., Sallmann, H.P. (2001):** Insulin responsiveness of sheep, ponies, miniature pigs and camels: results of hyperinsulinemic clamps using porcine insulin. *Journal of Comparative Physiology B* **171**, 549–556.
- Kaske, M., Werner, A., Schuberth, H.-J., Rehage, J., Kehler, W. (2005):** Colostrum management in calves: effects of drenching vs. bottle feeding. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **89**, 151–157.
- Katz, A., Nambi, S.S., Mather, K., Baron, A.D., Follmann, D.A., Sullivan, G., Quon, M.J. (2000):** Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **85**, 2402–2410.
- Kaung, H.L. (1994):** Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists* **200**, 163–175.
- Kerestes, M., Faigl, V., Kulcsar, M., Balogh, O., Foldi, J., Febel, H., Chilliard, Y., Huszenicza, G. (2009):** Periparturient insulin secretion and whole-body insulin responsiveness in dairy cows showing various forms of ketone pattern with or without puerperal metritis. *Domestic Animal Endocrinology* **37**, 250–261.
- Kesser, J., Korst, M., Koch, C., Romberg, F.-J., Rehage, J., Müller, U., Schmicke, M., Eder, K., Hammon, H.M., Sadri, H., Sauerwein, H. (2017):** Different milk feeding intensities during the first 4 weeks of rearing dairy calves. Part 2: Effects on the metabolic and endocrine status during calthood and around the first lactation. *Journal of Dairy Science* **100**, 3109–3125.
- Khan, I.Y., Dekou, V., Douglas, G., Jensen, R., Hanson, M.A., Poston, L., Taylor, P.D. (2005):** A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **288**, R127-133.
- Khan, M.A., Bach, A., Weary, D.M., von Keyserlingk, M.A.G. (2016):** Invited review: Transitioning from milk to solid feed in dairy heifers. *Journal of Dairy Science* **99**, 885–902.
- Khan, M.A., Lee, H.J., Lee, W.S., Kim, H.S., Ki, K.S., Hur, T.Y., Suh, G.H., Kang, S.J., Choi, Y.J. (2007a):** Structural growth, rumen development, and metabolic and immune

- responses of Holstein male calves fed milk through step-down and conventional methods. *Journal of Dairy Science* **90**, 3376–3387.
- Khan, M.A., Lee, H.J., Lee, W.S., Kim, H.S., Kim, S.B., Ki, K.S., Ha, J.K., Lee, H.G., Choi, Y.J. (2007b):** Pre- and postweaning performance of holstein female calves fed milk through step-down and conventional methods. *Journal of Dairy Science* **90**, 876–885.
- Khan, M.A., Lee, H.J., Lee, W.S., Kim, H.S., Kim, S.B., Park, S.B., Baek, K.S., Ha, J.K., Choi, Y.J. (2008):** Starch source evaluation in calf starter: II. Ruminant parameters, rumen development, nutrient digestibilities, and nitrogen utilization in Holstein calves. *Journal of Dairy Science* **91**, 1140–1149.
- Khan, M.A., Weary, D.M., Veira, D.M., von Keyserlingk, M.A.G. (2012):** Postweaning performance of heifers fed starter with and without hay during the milk-feeding period. *Journal of Dairy Science* **95**, 3970–3976.
- Khan, M.A., Weary, D.M., von Keyserlingk, M.A.G. (2011):** Invited review: effects of milk ration on solid feed intake, weaning, and performance in dairy heifers. *Journal of Dairy Science* **94**, 1071–1081.
- Khorram, O., Keen-Rinehart, E., Chuang, T.-D., Ross, M.G., Desai, M. (2015):** Maternal undernutrition induces premature reproductive senescence in adult female rat offspring. *Fertility and Sterility* **103**, 291-298.e2.
- Kiezebrink, D.J., Edwards, A.M., Wright, T.C., Cant, J.P., Osborne, V.R. (2015):** Effect of enhanced whole-milk feeding in calves on subsequent first-lactation performance. *Journal of Dairy Science* **98**, 349–356.
- Kim, J.W., Schmidt, F.W. (1983):** Zur Frage der Absorption von kolostralen Immunglobulinen durch das Kalb. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **90**, 283–286.
- Klosinsky, I. (2008):** Auswirkungen der postnatalen Fütterung auf den peripheren Insulin-Response von Kälbern. Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover, Klinik für Rinder, Dissertation.
- Klotz, J.L., Heitmann, R.N. (2006):** Effects of weaning and ionophore supplementation on selected blood metabolites and growth in dairy calves. *Journal of Dairy Science* **89**, 3587–3598.
- Korst, M., Koch, C., Kesser, J., Müller, U., Romberg, F.-J., Rehage, J., Eder, K., Sauerwein, H. (2017):** Different milk feeding intensities during the first 4 weeks of rearing

- in dairy calves. Part 1: Effects on performance and production from birth over the first lactation. *Journal of Dairy Science* **100**, 3096–3108.
- Koser, S.L., Thomas, M., Donkin, S.S. (2008):** Cloning the promoter region for bovine phosphoenolpyruvate carboxykinase gene and identification of propionate responsive region. *Journal of Dairy Science* **91 Suppl 1**, 424.
- Kräfte, S. (2004):** Charakterisierung der peripheren Insulin-Response und Insulin-Sensitivität bei trockenstehenden, laktierenden und leberverfetteten Milchkühen ohne und mit Ketose mittels hyperinsulinämischer, euglycämischer Clamps. Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover, Klinik für Rinder, Dissertation.
- Kraus-Friedmann, N. (1984):** Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Physiological Reviews* **64**, 170–259.
- Krebs, H.A. (1954):** Considerations concerning the pathways of syntheses in living matter; synthesis of glycogen from non-carbohydrate precursors. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* **95**, 19–33.
- Kronfeld, D.S. (1982):** Major metabolic determinants of milk volume, mammary efficiency, and spontaneous ketosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **65**, 2204–2212.
- Kühne, S., Hammon, H.M., Bruckmaier, R.M., Morel, C., Zbinden, Y., Blum, J.W. (2000):** Growth performance, metabolic and endocrine traits, and absorptive capacity in neonatal calves fed either colostrum or milk replacer at two levels. *Journal of Animal Science* **78**, 609–620.
- Laffel, L. (1999):** Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* **15**, 412–426.
- Lane, M.A., Baldwin, R.L., VI., Jesse, B.W. (2000):** Sheep rumen metabolic development in response to age and dietary treatments. *Journal of Animal Science* **78**, 1990–1996.
- Larsen, M., Kristensen, N.B. (2009):** Effect of abomasal glucose infusion on splanchnic amino acid metabolism in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* **92**, 3306–3318.
- Leat, W.M. (1970):** Carbohydrate and lipid metabolism in the ruminant during post-natal development. In: Phillipson AT (Hrsg.), *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*. Proceedings of the Third International Symposium, Cambridge, England, August 1969;. Oriel P, Newcastle upon Tyne, 211–222.

- Leat, W.M. (1971):** Digestion and metabolism of carbohydrates in the foetal and neonatal ruminant. *The Proceedings of the Nutrition Society* **30**, 236–243.
- Lidfors, L.M., Jensen, P., Algers, B. (1994):** Suckling in Free-ranging Beef Cattle - Temporal Patterning of Suckling Bouts and Effects of Age and Sex. *Ethology* **98**, 321–332.
- Lidfors, L.M., Jung, J., de Passillé, A.M. (2010):** Changes in suckling behaviour of dairy calves nursed by their dam during the first month post partum. *Applied Animal Behaviour Science* **128**, 23–29.
- Löffler, G., Petrides, P.E. (1998):** Biochemie und Pathobiochemie. Mit 233 Tabellen. Springer, 6., korrigierte Aufl., Berlin [u.a.].
- Lohakare, J.D., van de Sand, H., Gerlach, K., Hosseini, A., Mielenz, M., Sauerwein, H., Pries, M., Sudekum, K.-H. (2012):** Effects of limited concentrate feeding on growth and blood and serum variables, and on nutrient digestibility and gene expression of hepatic gluconeogenic enzymes in dairy calves. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **96**, 25–36.
- Lucas, A. (1991):** Programming by early nutrition in man. *Ciba Foundation Symposium* **156**, 38-50; discussion 50-55.
- Lucas, A. (1998):** Programming by early nutrition: an experimental approach. *The Journal of Nutrition* **128**, 401S-406S.
- Lucas, A. (2000):** Programming not metabolic imprinting. *The American Journal of Clinical Nutrition* **71**, 602.
- Lucas, A., Fewtrell, M.S., Cole, T.J. (1999):** Fetal origins of adult disease-the hypothesis revisited. *BMJ (Clinical research ed.)* **319**, 245–249.
- Luhovyy, B.L., Akhavan, T., Anderson, G.H. (2007):** Whey proteins in the regulation of food intake and satiety. *Journal of the American College of Nutrition* **26**, 704S–712S.
- Lundbaek, K. (1962):** Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. *British Medical Journal* **1**, 1507–1513.
- Maccari, P., Wiedemann, S., Kunz, H.-J., Piechotta, M., Sanftleben, P., Kaske, M. (2015):** Effects of two different rearing protocols for Holstein bull calves in the first 3 weeks of life on health status, metabolism and subsequent performance. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **99**, 737–746.

- MacPherson, J.A.R., Berends, H., Leal, L.N., Cant, J.P., Martin-Tereso, J., Steele, M.A. (2016):** Effect of plane of milk replacer intake and age on glucose and insulin kinetics and abomasal emptying in female Holstein Friesian dairy calves fed twice daily. *Journal of Dairy Science* **99**, 8007–8017.
- Manns, J.G., Boda, J.M. (1967):** Insulin release by acetate, propionate, butyrate, and glucose in lambs and adult sheep. *The American Journal of Physiology* **212**, 747–755.
- Margerison, J.K., Robarts, A.D.J., Reynolds, G.W. (2013):** The effect of increasing the nutrient and amino acid concentration of milk diets on dairy heifer individual feed intake, growth, development, and lactation performance. *Journal of Dairy Science* **96**, 6539–6549.
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., Turner, R.C. (1985):** Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412–419.
- McAtee, J.W., Trenkle, A. (1971):** Metabolic regulation of plasma insulin levels in cattle. *Journal of Animal Science* **33**, 438–442.
- McCance, R.A. (1962):** Food, growth, and time. *The Lancet* **2**, 671–676.
- McCance, R.A. (1976):** Critical periods of growth. *Proceedings of the Nutrition Society* **35**.
- McCann, J.P., Reimers, T.J. (1986):** Effects of obesity on insulin and glucose metabolism in cyclic heifers. *Journal of Animal Science* **62**, 772–782.
- McMeekan, C.P. (1940):** Growth and development in the pig, with special reference to carcass quality characters. Part I. *The Journal of Agricultural Science* **30**, 276–343.
- Moallem, U., Werner, D., Lehrer, H., Zachut, M., Livshitz, L., Yakoby, S., Shamay, A. (2010):** Long-term effects of ad libitum whole milk prior to weaning and prepubertal protein supplementation on skeletal growth rate and first-lactation milk production. *Journal of Dairy Science* **93**, 2639–2650.
- Mohan, V. (2002):** Which insulin to use? Human or animal? *Current Science* **83**, 1544–1547.
- Morrison, S.J., Wicks, H.C.F., Carson, A.F., Fallon, R.J., Twigge, J., Kilpatrick, D.J., Watson, S. (2012):** The effect of calf nutrition on the performance of dairy herd replacements. *Animal : An International Journal of Animal Bioscience* **6**, 909–919.
- Morrison, S.J., Wicks, H.C.F., Fallon, R.J., Twigge, J., Dawson, L.E.R., Wylie, A.R.G., Carson, A.F. (2009):** Effects of feeding level and protein content of milk replacer on the

- performance of dairy herd replacements. *Animal : An International Journal of Animal Bioscience* **3**, 1570–1579.
- Morton, N.M., Emilsson, V., Liu, Y.L., Cawthorne, M.A. (1998):** Leptin action in intestinal cells. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 26194–26201.
- Möstl, E. (2005):** Endokrinologie. Spezielle Endokrinologie. In: von Engelhardt W, Breves G (Hrsg.), *Physiologie der Haustiere*. Enke 2., völlig neu bearb. Aufl., Stuttgart, 477–494.
- Narro, L.A., Thomas, M.G., Silver, G.A., Rozeboom, K.J., Keisler, D.H. (2003):** Body composition, leptin, and the leptin receptor and their relationship to the growth hormone (GH) axis in growing wethers treated with zeranol. *Domestic Animal Endocrinology* **24**, 243–255.
- National Research Council (NRC) (2001):** Nutrient requirements of dairy cattle. National Academy Press, 7th rev. edition, Washington.
- Naylor, J.M., Kronfeld, D.S., Bech-Nielsen, S., Bartholomew, R.C. (1977):** Plasma total protein measurement for prediction of disease and mortality in calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **171**, 635–638.
- Newby, D., Gertler, A., Vernon, R.G. (2001):** Effects of recombinant ovine leptin on in vitro lipolysis and lipogenesis in subcutaneous adipose tissue from lactating and nonlactating sheep. *Journal of Animal Science* **79**, 445–452.
- Ohtsuka, H., Koiwa, M., Hatsugaya, A., Kudo, K., Hoshi, F., Itoh, N., Yokota, H., Okada, H., Kawamura, S.-i. (2001):** Relationship between Serum TNF Activity and Insulin Resistance in Dairy Cows Affected with Naturally Occurring Fatty Liver. *Journal of Veterinary Medical Science* **63**, 1021–1025.
- Oikawa, S., Oetzel, G.R. (2006):** Decreased insulin response in dairy cows following a four-day fast to induce hepatic lipodosis. *Journal of Dairy Science* **89**, 2999–3005.
- Orci, L. (1985):** The insulin factory: a tour of the plant surroundings and a visit to the assembly line. The Minkowski lecture 1973 revisited. *Diabetologia* **28**, 528–546.
- Ørskov, E.R., Benzie, D., Kay, R.N.B. (1970):** The effects of feeding procedure on closure of the oesophageal groove in young sheep. *British Journal of Nutrition* **24**, 785–795.
- Oscai, L.B., McGarr, J.A. (1978):** Evidence that the amount of food consumed in early life fixes appetite in the rat. *The American Journal of Physiology* **235**, R141-144.

- Overton, T.R., Waldron, M.R. (2004):** Nutritional Management of Transition Dairy Cows: Strategies to Optimize Metabolic Health. *Journal of Dairy Science* **87 E Suppl**, E105-119.
- Ozanne, S.E. (2001):** Metabolic programming in animals. *British Medical Bulletin* **60**, 143–152.
- Ozanne, S.E., Jensen, C.B., Tingey, K.J., Storgaard, H., Madsbad, S., Vaag, A.A. (2005):** Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. *Diabetologia* **48**, 547–552.
- Palade, G. (1975):** Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**, 347–358.
- Palmquist, D.L., Doppenberg, J., Roehrig, K.L., Kinsey, D.J. (1992):** Glucose and insulin metabolism in ruminating and veal calves fed high and low fat diets. *Domestic Animal Endocrinology* **9**, 233–241.
- Pantophlet, A.J., Gilbert, M.S., van den Borne, J J G C, Gerrits, W.J.J., Priebe, M.G., Vonk, R.J. (2016):** Insulin sensitivity in calves decreases substantially during the first 3 months of life and is unaffected by weaning or fructo-oligosaccharide supplementation. *Journal of Dairy Science* **99**, 7602–7611.
- Patel, M.S., Srinivasan, M. (2002):** Metabolic programming: causes and consequences. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 1629–1632.
- Patel, M.S., Srinivasan, M., Aalinkeel, R. (2000):** Metabolic programming by nutrition during early development. *Indian Journal of Experimental Biology* **38**, 849–855.
- Patel, M.S., Srinivasan, M., Laychock, S.G. (2009):** Metabolic programming: Role of nutrition in the immediate postnatal life. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **32**, 218–228.
- Perseghin, G., Caumo, A., Caloni, M., Testolin, G., Luzi, L. (2001):** Incorporation of the fasting plasma FFA concentration into QUICKI improves its association with insulin sensitivity in nonobese individuals. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86**, 4776–4781.
- Pilkis, S.J., Granner, D.K. (1992):** Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annual Review of Physiology* **54**, 885–909.

- Pires, J.A.A., Souza, A.H., Grummer, R.R. (2007):** Induction of hyperlipidemia by intravenous infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* **90**, 2735–2744.
- Plagemann, A. (2004):** 'Fetal programming' and 'functional teratogenesis': on epigenetic mechanisms and prevention of perinatally acquired lasting health risks. *Journal of Perinatal Medicine* **32**, 297–305.
- Plagemann, A. (2005):** Perinatal programming and functional teratogenesis: impact on body weight regulation and obesity. *Physiology & Behavior* **86**, 661–668.
- Plagemann, A. (2006a):** Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. *Hormone Research* **65 Suppl 3**, 83–89.
- Plagemann, A. (2006b):** Perinatal Programming. *Journal of Perinatal Medicine* **34**, 256–257.
- Poulsen, P., Vaag, A.A., Kyvik, K.O., Jensen, D.M., Beck-Nielsen, H. (1998):** Low birth weight is associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus in discordant monozygotic and dizygotic twins. *Ugeskrift for laeger* **160**, 2382–2387.
- Prior, R.L., Christenson, R.K. (1978):** Insulin and glucose effects on glucose metabolism in pregnant and nonpregnant ewes. *Journal of Animal Science* **46**, 201–210.
- Prokop, L., Kaske, M., Maccari, P., Lucius, R., Kunz, H.-J., Wiedemann, S. (2015):** Intensive rearing of male calves during the first three weeks of life has long-term effects on number of islets of Langerhans and insulin stained area in the pancreas. *Journal of Animal Science* **93**, 988–998.
- Quigley, J.D., III. (1996):** Influence of weaning method on growth, intake, and selected blood metabolites in Jersey calves. *Journal of Dairy Science* **79**, 2255–2260.
- Quigley, J.D., III., Bernard, J.K. (1992):** Effects of nutrient source and time of feeding on changes in blood metabolites in young calves. *Journal of Animal Science* **70**, 1543–1549.
- Quigley, J.D., III., Caldwell, L.A., Sinks, G.D., Heitmann, R.N. (1991):** Changes in blood glucose, nonesterified fatty acids, and ketones in response to weaning and feed intake in young calves. *Journal of Dairy Science* **74**, 250–257.
- Quigley, J.D., III., Wolfe, T.A., Elsasser, T.H. (2006):** Effects of additional milk replacer feeding on calf health, growth, and selected blood metabolites in calves. *Journal of Dairy Science* **89**, 207–216.

- Rabasa-Lhoret, R., Bastard, J.-P., Jan, V., Ducluzeau, P.-H., Andreelli, F., Guebre, F., Bruzeau, J., Louche-Pellissier, C., MaItrepierre, C., Peyrat, J., Chagné, J., Vidal, H., Laville, M. (2003):** Modified quantitative insulin sensitivity check index is better correlated to hyperinsulinemic glucose clamp than other fasting-based index of insulin sensitivity in different insulin-resistant states. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **88**, 4917–4923.
- Raeth-Knight, M., Chester-Jones, H., Hayes, S., Linn, J., Larson, R., Ziegler, D., Ziegler, B., Broadwater, N. (2009):** Impact of conventional or intensive milk replacer programs on Holstein heifer performance through six months of age and during first lactation. *Journal of Dairy Science* **92**, 799–809.
- Rauprich, A.B., Hammon, H.M., Blum, J.W. (2000):** Effects of feeding colostrum and a formula with nutrient contents as colostrum on metabolic and endocrine traits in neonatal calves. *Biology of the Neonate* **78**, 53–64.
- Ravelli, A.C., van der Meulen, J.H., Michels, R.P., Osmond, C., Barker, D.J., Hales, C.N., Bleker, O.P. (1998):** Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *The Lancet* **351**, 173–177.
- Recabarren, S.E., Lobos, A., Vilches, C., Munoz, P., Sir-Petermann, T. (2002):** Pulsatile leptin secretion is independent of luteinizing hormone secretion in prepubertal sheep. *Endocrine* **17**, 175–184.
- Rehfeldt, C., Lefaucheur, L., Block, J., Stabenow, B., Pfuhl, R., Otten, W., Metges, C.C., Kalbe, C. (2012a):** Limited and excess protein intake of pregnant gilts differently affects body composition and cellularity of skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue of newborn and weanling piglets. *European Journal of Nutrition* **51**, 151–165.
- Rehfeldt, C., Stabenow, B., Pfuhl, R., Block, J., Nurnberg, G., Otten, W., Metges, C.C., Kalbe, C. (2012b):** Effects of limited and excess protein intakes of pregnant gilts on carcass quality and cellular properties of skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue in fattening pigs. *Journal of Animal Science* **90**, 184–196.
- Reid, J.T. (1953):** Urea as a Protein Replacement for Ruminants: A Review. *Journal of Dairy Science* **36**, 955–996.
- Reinhardt, V., Reinhardt, A. (1981):** Natural sucking performance and age of weaning in zebu cattle (*Bos indicus*). *The Journal of Agricultural Science* **96**, 309.

- Reynolds, C.K., Aikman, P.C., Lupoli, B., Humphries, D.J., Beever, D.E. (2003):** Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *Journal of Dairy Science* **86**, 1201–1217.
- Rezaeisaber, A., Abdili, D., Noii, F., Khanzadeh, J., Dehghan, H., Akhondi, F. (2013):** BHBA, NEFA and LDH have changed in fatty liver syndrome: An Abattoir-based study. *European Journal of Experimental Biology* **3**, 572–575.
- Rizza, R.A., Mandarino, L.J., Gerich, J.E. (1981a):** Dose-response characteristics for effects of insulin on production and utilization of glucose in man. *The American Journal of Physiology* **240**, E630-639.
- Rizza, R.A., Mandarino, L.J., Gerich, J.E. (1981b):** Mechanisms of insulin resistance in man. *The American Journal of Medicine* **70**, 169–176.
- Robelin, J., Chilliard, Y. (1989):** Short-term and long-term effects of early nutritional deprivation on adipose tissue growth and metabolism in calves. *Journal of Dairy Science* **72**, 505–513.
- Rosso, P. (1975):** Maternal malnutrition and placental transfer of alpha-aminoisobutyric acid in the rat. *Science* **187**, 648–650.
- Röttger, K. (2007):** Auswirkungen der postnatalen Fütterung auf den pankreatischen Insulin-Response von Kälbern. Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover, Klinik für Rinder, Dissertation.
- Rukkwamsuk, T., Kruip, T.A., Wensing, T. (1999):** Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *The Veterinary Quarterly* **21**, 71–77.
- Sakai, T., Hayakawa, T., Hamakawa, M., Ogura, K., Kubo, S. (1993):** Therapeutic effects of simultaneous use of glucose and insulin in ketotic dairy cows. *Journal of Dairy Science* **76**, 109–114.
- Sallmann, H.-P., Fuhrmann, H. (2005):** Physiologische Aspekte der Leberfunktion. In: von Engelhardt W, Breves G (Hrsg.), *Physiologie der Haustiere*. Enke 2., völlig neu bearb. Aufl., Stuttgart, 423–434.
- Saltiel, A.R., Kahn, C.R. (2001):** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799–806.

- Sano, H., Asanos, K., Noguchi, Y., Yoshimura, K., Senshu, T., Terashima, Y. (1996):** Insulin responsiveness, action and sensitivity in growing lambs and mature rams. *Canadian Journal of Animal Science*, 203–208.
- Sano, H., Matsunobu, S., Nakagawa, M., Terashima, Y. (1990):** Insulin responsiveness to glucose and tissue responsiveness to insulin over the feeding cycle in sheep. *Journal of Animal Science* **68**, 3736–3741.
- Sano, H., Nakai, M., Kondo, T., Terashima, Y. (1991):** Insulin responsiveness to glucose and tissue responsiveness to insulin in lactating, pregnant, and nonpregnant, nonlactating beef cows. *Journal of Animal Science* **69**, 1122–1127.
- Saremi, B., Al-Dawood, A., Winand, S., Müller, U., Pappritz, J., von Soosten, D., Rehage, J., Dänicke, S., Häussler, S., Mielenz, M., Sauerwein, H. (2012):** Bovine haptoglobin as an adipokine: serum concentrations and tissue expression in dairy cows receiving a conjugated linoleic acids supplement throughout lactation. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **146**, 201–211.
- Sauerwein, H., Heintges, U., Hennies, M., Selhorst, T., Daxenberger, A. (2004):** Growth hormone induced alterations of leptin serum concentrations in dairy cows as measured by a novel enzyme immunoassay. *Livestock Production Science* **87**, 189–195.
- Schäfer, S., Wesenauer, G., Arbeiter, K. (1998):** Der Immuntransfer beim vitalen neugeborenen Kalb. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **105**, 153–157.
- Schäff, C.T., Rohrbeck, D., Steinhoff-Wagner, J., Kanitz, E., Sauerwein, H., Bruckmaier, R.M., Hammon, H.M. (2014):** Effects of colostrum versus formula feeding on hepatic glucocorticoid and alpha(1)- and beta(2)-adrenergic receptors in neonatal calves and their effect on glucose and lipid metabolism. *Journal of Dairy Science* **97**, 6344–6357.
- Scheuer, B.H., Zbinden, Y., Schneiter, P., Tappy, L., Blum, J.W., Hammon, H.M. (2006):** Effects of colostrum feeding and glucocorticoid administration on insulin-dependent glucose metabolism in neonatal calves. *Domestic Animal Endocrinology* **31**, 227–245.
- Schulz, K., Frahm, J., Meyer, U., Kersten, S., Reiche, D., Rehage, J., Dänicke, S. (2014):** Effects of prepartal body condition score and peripartal energy supply of dairy cows on postpartal lipolysis, energy balance and ketogenesis: an animal model to investigate subclinical ketosis. *The Journal of Dairy Research* **81**, 257–266.

- Sejrsen, K., Huber, J.T., Tucker, H.A., Akers, R.M. (1982):** Influence of nutrition of mammary development in pre- and postpubertal heifers. *Journal of Dairy Science* **65**, 793–800.
- Sejrsen, K., Purup, S., Martinussen, S.H., Vestergaard, M. (1998):** Effect of feeding level in calves and prepubertal heifers. *Journal of Dairy Science* **81 Suppl 1**, 377 (Abstr.).
- Shamay, A., Werner, D., Moallem, U., Barash, H., Bruckental, I. (2005):** Effect of nursing management and skeletal size at weaning on puberty, skeletal growth rate, and milk production during first lactation of dairy heifers. *Journal of Dairy Science* **88**, 1460–1469.
- Silva, L., Vandehaar, M.J., Weber Nielsen, M.S., Smith, G.W. (2002):** Evidence for a Local Effect of Leptin in Bovine Mammary Gland. *Journal of Dairy Science* **85**, 3277–3286.
- Simmen, F.A., Cera, K.R., Mahan, D.C. (1990):** Stimulation by colostrum or mature milk of gastrointestinal tissue development in newborn pigs. *Journal of Animal Science* **68**, 3596–3603.
- Simmons, R.A., Templeton, L.J., Gertz, S.J. (2001):** Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes* **50**, 2279–2286.
- Singhal, A., Farooqi, I.S., O'Rahilly, S., Cole, T.J., Fewtrell, M., Lucas, A. (2002):** Early nutrition and leptin concentrations in later life. *The American Journal of Clinical Nutrition* **75**, 993–999.
- Sinha, Y.N., Tucker, H.A. (1969):** Mammary development and pituitary prolactin level of heifers from birth through puberty and during the estrous cycle. *Journal of Dairy Science* **52**, 507–512.
- Smith, J.L., Sheffield, L.G. (2002):** Production and regulation of leptin in bovine mammary epithelial cells. *Domestic Animal Endocrinology* **22**, 145–154.
- Smith, L.F. (1966):** Species variation in the amino acid sequence of insulin. *The American Journal of Medicine* **40**, 662–666.
- Snow, M.H. (1981):** Growth and its control in early mammalian development. *British Medical Bulletin* **37**, 221–226.
- Soberon, F., Raffrenato, E., Everett, R.W., van Amburgh, M.E. (2012):** Prewaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves. *Journal of Dairy Science* **95**, 783–793.

- Soberon, F., van Amburgh, M.E. (2013):** Lactation Biology Symposium: The effect of nutrient intake from milk or milk replacer of preweaned dairy calves on lactation milk yield as adults: a meta-analysis of current data. *Journal of Animal Science* **91**, 706–712.
- Spicer, L.J. (2001):** Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domestic Animal Endocrinology* **21**, 251–270.
- Spiekers, H., Nussbaum, H., Potthast, V. (2009):** Erfolgreiche Milchviehfütterung. DLG-Verlag, 5., erw. und aktualisierte Aufl., Frankfurt am Main.
- Srinivasan, M., Dodds, C., Ghanim, H., Gao, T., Ross, P.J., Browne, R.W., Dandona, P., Patel, M.S. (2008a):** Maternal obesity and fetal programming: effects of a high-carbohydrate nutritional modification in the immediate postnatal life of female rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **295**, E895-903.
- Srinivasan, M., Laychock, S.G., Hill, D.J., Patel, M.S. (2003):** Neonatal nutrition: metabolic programming of pancreatic islets and obesity. *Experimental Biology and Medicine* **228**, 15–23.
- Srinivasan, M., Mitrani, P., Sadhanandan, G., Dodds, C., Shbeir-ElDika, S., Thamotharan, S., Ghanim, H., Dandona, P., Devaskar, S.U., Patel, M.S. (2008b):** A high-carbohydrate diet in the immediate postnatal life of rats induces adaptations predisposing to adult-onset obesity. *The Journal of Endocrinology* **197**, 565–574.
- Srinivasan, M., Patel, M.S. (2008):** Metabolic programming in the immediate postnatal period. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **19**, 146–152.
- Staley, T.E., Corley, L.D., Bush, L.J., Jones, E.W. (1972):** The ultrastructure of neonatal calf intestine and absorption of heterologous proteins. *The Anatomical Record* **172**, 559–579.
- Stangassinger, M. (2005):** Stoffwechselregulation. In: von Engelhardt W, Breves G (Hrsg.), *Physiologie der Haustiere*. Enke 2., völlig neu bearb. Aufl., Stuttgart, 588–600.
- Stanley, C.C. (2005):** Regulation of glucose metabolism in dairy cattle. Baton Rouge, Louisiana State University, Dissertation.
- Steele, M.A., Penner, G.B., Chaucheyras-Durand, F., Le Guan, L. (2016):** Development and physiology of the rumen and the lower gut: Targets for improving gut health. *Journal of Dairy Science* **99**, 4955–4966.

- Steen, A., Gronstol, H., Torjesen, P.A. (1997):** Glucose and insulin responses to glucagon injection in dairy cows with ketosis and fatty liver. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A* **44**, 521–530.
- Steinhoff-Wagner, J., Görs, S., Junghans, P., Bruckmaier, R.M., Kanitz, E., Metges, C.C., Hammon, H.M. (2011a):** Intestinal glucose absorption but not endogenous glucose production differs between colostrum- and formula-fed neonatal calves. *The Journal of Nutrition* **141**, 48–55.
- Steinhoff-Wagner, J., Görs, S., Junghans, P., Bruckmaier, R.M., Kanitz, E., Metges, C.C., Hammon, H.M. (2011b):** Maturation of endogenous glucose production in preterm and term calves. *Journal of Dairy Science* **94**, 5111–5123.
- Steinhoff-Wagner, J., Hammon, H.M. (2012):** Anpassung des Glucosestoffwechsels bei Kälbern nach der Geburt. *Züchtungskunde* **84**, 226–241.
- Stern, L. (1981):** Growth, gestational age, and maturational development. In: Lebenthal E (Hrsg.), *Textbook of Gastroenterology and Nutrition in Infancy*. Raven Press, New York.
- Sternbauer, K. (2005):** Metabolic studies in cattle using the hyperinsulinemic euglycemic clamp technique. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Clinical Sciences, Dissertation.
- Suarez-Mena, F.X., Hill, T.M., Heinrichs, A.J., Bateman, H.G., II., Aldrich, J.M., Schlotterbeck, R.L. (2011):** Effects of including corn distillers dried grains with solubles in dairy calf feeds. *Journal of Dairy Science* **94**, 3037–3044.
- Swanson, E.W., Poffenbarger, J.I. (1979):** Mammary gland development of dairy heifers during their first gestation. *Journal of Dairy Science* **62**, 702–714.
- Swanson, K.S., Merchen, N.R., Erdman, J.W., Drackley, J.K., Orias, F., Douglas, G.N., Huhn, J.C. (2000):** Technical note: a technique for multiple liver biopsies in neonatal calves. *Journal of Animal Science* **78**, 2459–2463.
- Symonds, M.E., Mostyn, A., Pearce, S., Budge, H., Stephenson, T. (2003):** Endocrine and nutritional regulation of fetal adipose tissue development. *The Journal of Endocrinology* **179**, 293–299.
- Taylor, P.D., Poston, L. (2007):** Developmental programming of obesity in mammals. *Experimental Physiology* **92**, 287–298.

- Trenkle, A. (1972):** Radioimmunoassay of plasma hormones: review of plasma insulin in ruminants. *Journal of Dairy Science* **55**, 1200–1211.
- Trenkle, A. (1978):** Relation of hormonal variations to nutritional studies and metabolism of ruminants. *Journal of Dairy Science* **61**, 281–293.
- Tseng, Y.-H., Ueki, K., Kriauciunas, K.M., Kahn, C.R. (2002):** Differential roles of insulin receptor substrates in the anti-apoptotic function of insulin-like growth factor-1 and insulin. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 31601–31611.
- Tyler, J.W., Hancock, D.D., Parish, S.M., Rea, D.E., Besser, T.E., Sanders, S.G., Wilson, L.K. (1996):** Evaluation of 3 Assays for Failure of Passive Transfer in Calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **10**, 304–307.
- Ucar, B., Kirel, B., Bor, O., Kilic, F.S., Dogruel, N., Aydogdu, S.D., Tekin, N. (2000):** Breast milk leptin concentrations in initial and terminal milk samples: relationships to maternal and infant plasma leptin concentrations, adiposity, serum glucose, insulin, lipid and lipoprotein levels. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism* **13**, 149–156.
- Vadlamudi, S., Kalhan, S.C., Patel, M.S. (1995):** Persistence of metabolic consequences in the progeny of rats fed a HC formula in their early postnatal life. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **269**, E731-738.
- VDLUFA (2012):** Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (VDLUFA- Methodenbuch). VDLUFA-Verlag, 3. Aufl., Darmstadt.
- Vickers, M.H., Breier, B.H., McCarthy, D., Gluckman, P.D. (2003):** Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **285**, R271-273.
- von Keyserlingk, M.A.G., Wolf, F., Hotzel, M., Weary, D.M. (2006):** Effects of continuous versus periodic milk availability on behavior and performance of dairy calves. *Journal of Dairy Science* **89**, 2126–2131.
- Waddington, C.H. (1940):** Organisers & genes. University Press, Cambridge.
- Wallace, T.M., Matthews, D.R. (2002):** The assessment of insulin resistance in man. *Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association* **19**, 527–534.

- Warner, R.G., Flatt, W.P., Loosli, J.K. (1956):** Ruminant Nutrition, Dietary Factors Influencing Development of Ruminant Stomach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **4**, 788–792.
- Waterland, R.A., Garza, C. (1999):** Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* **69**, 179–197.
- Weaver, D.M., Tyler, J.W., VanMetre, D.C., Hostetler, D.E., Barrington, G.M. (2000):** Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **14**, 569–577.
- Werner, A. (2003):** Experimentelle Untersuchungen zur Eignung der [gamma]-Glutamyltransferase-Aktivität im Blut von Kälbern zur Überprüfung der Kolostrumversorgung. Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover, Klinik für Rinder, Dissertation.
- Widdowson, E.M., Colombo, V.E., Artavanis, C.A. (1976):** Changes in the Organs of Pigs in Response to Feeding for the First 24 h after Birth. *Neonatology* **28**, 272–281.
- Widdowson, E.M., McCance, R.A. (1975):** A review: new thoughts on growth. *Pediatric Research* **9**, 154–156.
- Wiedemann, S., Holz, P., Kunz, H.-J., Stamer, E., Kaske, M. (2015):** Einfluss einer ad libitum Tränke von Holstein-Friesian Kälbern während der ersten vier Lebenswochen auf die Gewichtsentwicklung sowie auf Milchleistung und Futteraufnahme in der ersten Laktation. *Züchtungskunde* **87**, 413–422.
- Wilcox, G. (2005):** Insulin and insulin resistance. *The Clinical Biochemist Reviews* **26**, 19–39.
- Woerle, H.J., Meyer, C., Dostou, J.M., Gosmanov, N.R., Islam, N., Popa, E., Wittlin, S.D., Welle, S.L., Gerich, J.E. (2003):** Pathways for glucose disposal after meal ingestion in humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **284**, E716–725.
- Wolinski, J., Biernat, M., Guilloteau, P., Westrom, B.R., Zabielski, R. (2003):** Exogenous leptin controls the development of the small intestine in neonatal piglets. *The Journal of Endocrinology* **177**, 215–222.

- Wolinski, J., Slupecka, M., Romanowicz, K. (2014):** Leptin and ghrelin levels in colostrum, milk and blood plasma of sows and pig neonates during the first week of lactation. *Animal Science Journal* **85**, 143–149.
- Wunderlich, S.M., Baliga, B.S., Munro, H.N. (1979):** Rat placental protein synthesis and peptide hormone secretion in relation to malnutrition from protein deficiency or alcohol administration. *The Journal of Nutrition* **109**, 1534–1541.
- Yan, W., Wiley, A.A., Bathgate, Ross A D, Frankshun, A.-L., Lasano, S., Crean, B.D., Steinetz, B.G., Bagnell, C.A., Bartol, F.F. (2006):** Expression of LGR7 and LGR8 by neonatal porcine uterine tissues and transmission of milk-borne relaxin into the neonatal circulation by suckling. *Endocrinology* **147**, 4303–4310.
- Young, J.W. (1977):** Gluconeogenesis in cattle: significance and methodology. *Journal of Dairy Science* **60**, 1–15.
- Young, M., Widdowson, E.M. (1975):** The influence of diets deficient in energy, or in protein, on conceptus weight, and the placental transfer of a non-metabolisable amino acid in the guinea pig. *Biology of the Neonate* **27**, 184–191.
- Yunta, C., Terré, M., Bach, A. (2015):** Short- and medium-term changes in performance and metabolism of dairy calves offered different amounts of milk replacers. *Livestock Science* **181**, 249–255.
- Zambrano, E., Martínez-Samayoa, P.M., Rodríguez-González, G.L., Nathanielsz, P.W. (2010):** Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *The Journal of Physiology* **588**, 1791–1799.
- Zarrin, M., Grossen-Rosti, L., Bruckmaier, R.M., Gross, J.J. (2017):** Elevation of blood beta-hydroxybutyrate concentration affects glucose metabolism in dairy cows before and after parturition. *Journal of Dairy Science* **100**, 2323–2333.
- Zhan, X.A., Wang, M., Ren, H., Zhao, R.Q., Li, J.X., Tan, Z.L. (2007):** Effect of early feed restriction on metabolic programming and compensatory growth in broiler chickens. *Poultry Science* **86**, 654–660.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. (1994):** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425–432.

**Zhao, F.-Q., Keating, A.F. (2007):** Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science* **90 Suppl 1**, E76-86.

## 11 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Klaus Eder möchte ich mich herzlich bedanken, für die unkomplizierte Betreuung meiner Arbeit, für die gute Zusammenarbeit mit der Uni Bonn, für die schnellen Rückmeldungen und auch für die sonstige Unterstützung in jeglichen Angelegenheiten, die dieses Vorhaben betrafen.

Ein weiterer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. Helga Sauerwein, die zu jeder Zeit an mich geglaubt hat und selbst wenn meine Hoffnung schon lange verfliegen war immer noch ein aufbauendes Wort für mich übrig hatte. Auch die schnellen und konstruktiven Korrekturen und die immerwährende Erreichbarkeit (sogar bei Meeresrauschen unterm italienischen Sternenhimmel) waren nicht selbstverständlich und dennoch so unglaublich hilfreich für mein Vorankommen.

Dem Bezirksverband Pfalz und Herrn Dr. Landfried verdanke ich nicht nur die Finanzierung des Versuchs sondern auch einen tollen Job auf der Lehr- und Versuchsanstalt für Viehhaltung Hofgut Neumühle. Aber auch den Kolleginnen und Kollegen auf dem Hofgut verdanke ich einiges. Alle Mitarbeiter im Kuhstall und im Kälberbereich haben mich zu jeder Zeit tatkräftig unterstützt, mich früh oder spät aus dem Bett geschmissen, mir Kälber gehalten, Kälber getränkt und und und.... Hier seien auch die Praktikanten und Azubis nicht vergessen die stundenlang mit mir Tests durchgeführt und Blutproben aufbereitet haben. Auch Herrn Dr. Romberg vom DLR Westpfalz möchte ich danken, der mir stets bei statistischen Anliegen Rede und Antwort stand und meine Daten in eine auswertbare Form gebracht hat.

Dir lieber Christian herzlichen Dank für alles rund um diese Arbeit. Für die Hilfe bei der Planung, Durchführung, Ausarbeitung und dafür, dass du immer dafür gesorgt hast, dass es für mich weiter geht und dass ich genug Freiraum hatte um dieses Projekt durchzuführen. Ja du hattest recht, alles wird gut.

Dir liebe Julia Trautwein danke dafür, dass du die Sache überhaupt erst ins Rollen gebracht hast, an jenem Abend an dem alles so aussichtslos schien.

Auch den Mitarbeitern des ITW der Uni Bonn gilt mein Dank: Besonders Dr. Manfred Mielenz und Birgit Mielenz für die Hilfe bei Fragen zu labortechnischen Angelegenheiten sowie für die Aufarbeitung der Leberbiopsien, Dr. Hassan Sadri für die Fortführung der Leberanalysen, Dr. Ute Müller für die Hilfe bei statistischen Fragen, Peter Müller für die behutsame Heranführung an Microsoft Access und die Verschaffung von Zugriff auf die benötigten Programme, Dr. Julia Steinhoff-Wagner für die Infos zu den Toleranztests und deren Auswertung und allen anderen Personen die in die Untersuchungen der Proben involviert waren.

Den Mitarbeitern der TiHo Hannover möchte ich ebenfalls danken. Herrn Prof. Dr. Rehage für die hilfreichen praktischen Tipps zur Durchführung des Versuchs, den Mitarbeitern vom klinischen und endokrinologischen Labor herzlichen Dank für die aufwendige Analyse der Proben.

Meiner treuen Doktorandenkollegin und Freundin Julia Kesser, die mir vom ersten Moment an eine Seelenverwandte war und mit der ich in dieser Zeit durch dick und dünn gegangen bin: Ich möchte dir nicht nur für die Laborarbeiten zur Bestimmung der Leptingehalte danken sondern auch für eine tolle Freundschaft, für viele durchaus wichtige Telefonate, Treffen und Diskussionen. Schön dass es dich gibt.

Meinen Freundinnen Verena Schummer und Antonia Patt danke ich für aufbauende Worte, Motivations-Post, Emails sowie fürs Korrekturlesen und den fremdsprachlichen Support.

Liebe Mama, danke für die unzähligen Stunden, Tage und Nächte die du geopfert hast um mir den Rücken freizuhalten. Du hast dich am Wochenende mit mir in den Stall gestellt und assistiert, du hast mich angetrieben weiter zu machen und ohne deine niemals endende Unterstützung hätte ich so manches in den letzten Jahren nicht geschafft. Du bist die Beste! Lieber Papa, auch dir vielen Dank dafür, dass du mir Mama so oft überlassen hast und natürlich auch für jegliche emotionale und finanzielle Unterstützung auf dem Weg hierhin. Schön, dass ich die Drucklegung meiner Arbeit in deine Hände geben kann.

Liebe Steffi, du hast immer an deine kleine Schwester geglaubt und mir Kraft gegeben durchzuhalten. Und auch wenn es mal chaotisch zuging, bei dir wusste ich Klara immer in guten Händen.

Danke auch an Oma Käthe und Opa Klaus, die sich immerzu über Besuch ihrer Enkeltochter gefreut und mir so Freiraum zum Schreiben verschafft haben.

Und zuletzt möchte ich auch dir lieber „Herr Dogder“ Klaus danken. Nicht nur deine Unterstützung auf der Neumühle während der praktischen Versuchsdurchführung sondern auch deine Toleranz gegenüber meinem geistigen Schaffen und Wirken in den letzten Jahren und dein Wille dieses Projekt zu einem Ende zu bringen haben mich dazu gebracht durchzuhalten auf diesem mühsamen Weg.

Und meinen beiden Mäusen Klara und Mathilda danke ich ohnehin jeden Tag dafür, dass sie mich so lieben wie ich bin, ob mit oder ohne Titel. Ich bin so froh dass ihr da seid!

## **12 Eidesstattliche Erklärung**

Erklärung nach § 10, Absatz 6 der Promotionsordnung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.“

---

(Unterschrift, Datum)

