

## 6 Zusammenfassung

Es wurde die Frage untersucht, ob das in Milch in hoher Konzentration enthaltene PTHrP bei neugeborenen Ferkeln mit erblichem Calcitriolmangel einen Vitamin D-unabhängigen intestinalen Calciumtransport induziert. Bekannt ist, daß dieses Peptidhormon den Calciumtransport durch die Placenta in den Fetus und vom Blut in die Milch fördert.

- a) Zuerst wurde untersucht, ob bei Saugferkeln noch PTHrP-Fragmente im Magen-Darm-Inhalt vorkommen. Der Gehalt an nativem PTHrP, an N-terminalen Fragmenten und an PTHrP-Fragmenten aus der Molekülmitte wurde mit drei verschiedenen Radioimmunoassays in Sauenmilch und im Chymus aus Magen, Duodenum und Ileum von gesäugten und milchfrei ernährten Ferkeln gemessen.
- b) An isolierten Schleimhäuten wurde in Ussingkammern untersucht, ob PTHrP oder eines seiner Fragmente von der Darmschleimhaut absorbiert wird.
- c) Die Wirkung von Milchinhaltstoffen auf den aktiven, intestinalen Calciumtransport wurde sowohl *in vivo* mittels oraler Verabreichung von Radiocalcium an gesäugte und frühabgesetzte milchfrei ernährte Wurfgeschwister als auch
- d) *In vitro* an isolierten Darmschleimhäuten von Saugferkeln und milchfrei ernährten Ferkeln untersucht.
- e) Ein möglicher Kurzzeiteffekt von synthetischem PTHrP und von PTHrP in Milch auf den aktiven intestinalen Calciumtransport von gesäugten und milchfrei ernährten Ferkeln wurde *in vitro* durch Zugabe dieser Substanzen zur Inkubationslösung gemessen.

- f) Schließlich wurde geprüft, ob sich das Frühabsetzen schädigend auf die Schleimhaut ausgewirkt hat. Dazu wurden morphologische Merkmale der Darmschleimhaut wie Zottenlänge, und allgemeine funktionelle Eigenschaften des Darms, wie die Aktivität verschiedener Disaccharasen, und der glucoseabhängige Kurzschlußstromanstieg, vergleichend bei Saugferkeln und frühabgesetzten Ferkeln erfaßt und beurteilt.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- 1) Das native PTHrP der Milch wird im Magen-Darm-Trakt der Ferkel rasch abgebaut. Im Duodenalchymus war kein intaktes PTHrP mehr nachweisbar. Von den N-terminalen PTHrP-Fragmenten und denen aus der Molekülmitte waren im Duodenalchymus jedoch noch 15-20% vorhanden.
- 2) Isolierte Darmschleimhaut konnte PTHrP-Fragmente aus der Molekülmitte mit einer Rate von 8 ng/(cm<sup>2</sup>·h) absorbieren. Im Plasma gesäugter, aber auch milchfrei ernährter Ferkel, waren PTHrP-Fragmente aus der Molekülmitte in einer Konzentration von 1,2 nmol/l nachweisbar. Einige Saugferkel wiesen jedoch um 50% höhere Konzentrationen an diesem Fragment im Plasma auf.
- 3) Saugferkel absorbierten *in vivo* etwa doppelt soviel Calcium wie gleichaltrige, milchfrei ernährte Tiere.
- 4) Auch *in vitro* war der aktive Calciumtransport der Saugferkel signifikant ( $p < 0,01$ ) größer als der gleichaltriger milchfrei ernährter Tiere ( $59 \pm 17$  vs.  $18 \pm 3,6$  nmol/(cm<sup>2</sup>·h),  $\bar{x} \pm SD$ ).
- 5) Eine Zugabe von PTHrP zur mucosalen oder serosalen Seite isolierter Dünndarmschleimhäute förderte die Calciumabsorption nicht.

- 6) Das Frühabsetzen der Ferkel hatte keinen schädigenden Einfluß auf den Funktionszustand des Darmes.

Die Ergebnisse zeigen, daß der aktive, Vitamin D-unabhängige intestinale Calciumtransport bei Ferkeln durch Milchhaltsstoffe vermutlich induziert, in jedem Falle aber aufrecht erhalten wird. Eine Mitwirkung des in der Milch enthaltenen PTHrP an diesem Effekt ist wahrscheinlich, aber durch die hier vorgelegten Befunde nicht eindeutig belegbar. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß bestimmte in Milch enthaltene PTHrP-Fragmente vom Darm absorbiert werden und in Form eines (genomischen) Langzeiteffektes den aktiven, Vitamin D-unabhängigen Calciumtransport induzieren bzw. aufrecht erhalten.

## 7 Summary

Cornelia Klein:

### **Effect of PTHrP (Parathyroid Hormone-related Peptide) in milk on the intestinal calcium transport of suckled piglets**

The aim of the study was to investigate the effect of PTHrP on the intestinal calcitriol-independent calcium transport in suckled piglets. The concentration of PTHrP in milk is remarkably high and it is known, that PTHrP stimulates calcium transport across several epithelial barriers, e.g. the placenta.

- a) In a first series of experiments it was investigated, whether PTHrP or some of its fragments was present in sufficient quantities in chyme or in the gastro-intestinal tract to exert an effect on the absorption of calcium. For this, the concentrations of PTHrP in sow's milk and chyme of stomach, duodenum and ileum from suckled and weaned piglets were examined by use of three radioimmuno assays which were directed against native PTHrP and two PTHrP-fragments i.e. n-terminal and mid-molecular fragments.
- b) Subsequently, the absorption of PTHrP-fragments by stripped duodenal mucosae, mounted in Ussing chambers, was investigated
- c) A positive effect of milk-feeding on intestinal calcium transport was studied *in vivo* after oral administration of radiocalcium and
- d) *in vitro* employing  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  flux rate measurements in Ussing chambers. Under both conditions the intestinal calcium transport was compared between suckled piglets and early-weaned littermates. The latter were fed on a milk-free replacer diet.

- e) Finally the Ussing chamber technique was used to study the question, whether the addition of synthetic PTHrP or PTHrP in milk to the incubation buffer exerted an immediate effect on the intestinal absorption of calcium.
- f) For adequate interpretation of the results it was examined whether the process of weaning perhaps negatively affected the functionality of the intestinal mucosa. For this, morphological features, such as villous length, and functional properties of the mucosa, such as activities of various carbohydrases and the sodium dependent glucose transport, were compared between suckled and weaned piglets.

The following results were obtained:

- 1) Intact PTHrP from milk was digested rapidly in the gastro-intestinal tract. No intact PTHrP could be found in duodenal ingesta. The concentrations of n-terminal and mid-molecular PTHrP-fragments in duodenal chyme were 15-20% as compared to that present in milk.
- 2) Mid-molecular PTHrP-fragments were absorbed by intact duodenal mucosa at a rate of 8 ng/(cm<sup>2</sup>·h). The plasma concentrations of mid-molecular PTHrP-fragments in suckled and weaned piglets were about 1,2 nmol/l. But there were some suckled piglets with a 1.5fold higher plasma concentration of PTHrP, compared to the remaining animals.
- 3) The *in vivo* calcium absorption of suckled piglets was about twice as high as that of weaned piglets of the same age.
- 4) Under *in vitro* conditions the active calcium transport was also higher in suckled (59 ± 17 nmol/(cm<sup>2</sup>·h)) than in weaned piglets (18 ± 3,6 nmol/(cm<sup>2</sup>·h)).

- 5) Addition of PTHrP to the solution bathing either the mucosal or serosal side of stripped mucosa mounted in Ussing chambers had no immediate effect on calcium transport *in vitro*.
- 6) The functionality of the intestinal mucosa was not negatively affected by early weaning and feeding a milk-free diet.

The results show, that the active, vitamin D-independent intestinal calcium transport is probably induced and maintained by milk-ingredients. The involvement of PTHrP is likely, but could not be conclusively demonstrated. The results indicate, that specific PTHrP-fragments in milk are absorbed and probably responsible for inducing an active, vitamin D-independent calcium transport, probably by exerting a (genomic) long-lasting effect upon the intestinal mucosa.