Kapitel 1

Einleitung

Die Milchleistung in Deutschland erhöhte sich in den letzten drei Jahrzehnten jährlich im Mittel um 2,4 % (*REHAGE & KASKE*, 2004). Mit der erhöhten Milchleistung sind häufig Gesundheitsprobleme der Milchkühe verbunden, die vor allem in der Frühlaktation auftreten. Entzündungen der Milchdrüse, sogenannte Mastitiden, sind häufige Erkrankungen der Milchkuh. Sie verursachen durch eine verringerte Milchleistung und erhöhte Behandlungskosten sowohl ökonomische, als auch durch das Verwerfen der für den menschlichen Verzehr nicht mehr geeigneten Milch ökologische Probleme (*HOSPIDO & SONESSON*, 2005). Aus den genannten Gründen ist die Erforschung der für eine Mastitis prädisponierenden Faktoren unabdingbar.

Die Funktion und damit der Stoffwechsel der Milchdrüse verändert sich in Abhängigkeit vom physiologischen Status (*BLUM*, 2004). In der frühen Phase der Laktation benötigt die Milchdrüse Energie sowohl für ihren basalen Stoffwechsel als auch für die Synthese erheblicher Mengen an Protein, Fett und Laktose. Dies führt zu einer Veränderung der Stoffwechselpriorität zu Gunsten der Milchdrüse. Während in der Milchdrüse stark anabole Stoffwechselprozesse ablaufen, sind die Stoffwechselprozesse in anderen Organen katabol (*BLUM*, 2004). Den enormen Energiebedarf in der Anfangsphase der Laktation deckt die Kuh über das aufgenommene Futter und aus körpereigenen Reserven (*GOFF & HORST*, 1997). Dabei steigt der Energiebedarf zu Laktationsbeginn stärker als die Futteraufnahme. Die unmittelbare Folge ist eine negative Energiebilanz (NEB) zu Beginn der Laktation. Die Mobilisation von Depotfett ist eine physiologische Strategie der Säugetiere die Stoffwechselleistung zu steigern, wobei

die Fähigkeit von Milchkühen, die NEB durch adaptive hormonell-metabolische Reaktionen zu bewältigen, individuell sehr unterschiedlich ist (*REHAGE* & *KASKE*, 2004). Hohe Milchleistungen, die bei einigen Tieren zu lang anhaltenden katabolen Stoffwechselveränderungen führen, können Stoffwechselerkrankungen, gefolgt von reduzierter Milchproduktion und Reproduktionsproblemen, verursachen. Von verschiedenen Autoren wurden den, zum Zeitpunkt der Kalbung ansteigenden Konzentrationen metabolischer Parametern, ein suppressiver Effekt auf die systemische Abwehr der Milchkuh zugeschrieben, der wiederum prädisponierend für eine Mastitis sein soll.

Gegenstand dieser Arbeit war, zunächst die physiologischen Veränderungen in der Peripartalphase und Frühlaktation der systemischen und lokalen Abwehr der Milchdrüse anhand verschiedener, ausgewählter Parameter darzustellen und die Ergebnisse bezüglich der Parameter der lokalen Abwehr miteinander zu vergleichen. Darüber hinaus sollte der Effekt erhöhter Konzentrationen metabolischer Parameter auf die systemische und lokale Abwehr der Milchdrüse bei Tieren, die energetisch unterschiedlich versorgt wurden, aus einer organisch und einer konventionell bewirtschafteten Stalleinheit, untersucht werden.

Kapitel 2

Physiologische Grundlagen

Die Laktation stellt eine der wichtigsten biologischen Funktionen der Evolution dar (*MARTINET* et al., 1999) und bezeichnet die Milchbildung der Säugetiere. Sie dient in erster Linie der Aufzucht der Nachkommen und somit dem Überleben der eigenen Art. Die Laktation ermöglicht dem Muttertier, den Nachwuchs mit einer hochwertigen, relativ einheitlichen und vom jeweiligen Nahrungsspektrum unabhängigen Nahrung, der Milch, zu versorgen (*GÜRTLER & SCHWEIGERT*, 2000). Die Synthese der Milch geht einher mit einem erhöhten Bedarf an Nährstoffen für das laktierende Tier. Der Bedarf an Nährstoffen ist abhängig von der Milchmenge und der Milchzusammensetzung. Die Zusammensetzung der Milch unterscheidet sich bei den verschiedenen Spezies in Abhängigkeit von ihrer Wachstumsbiologie (*OFTEDAL*, 1993).

2.1 Physiologie der Laktation

Die Funktion und damit der Stoffwechsel der Milchdrüse verändert sich in Abhängigkeit vom physiologischen Status (*BLUM*, 2004). Unterschieden wird dabei zwischen Mammogenese, Laktogenese und Galaktopoese. Im Zeitraum der Mammogenese erfolgt die morphologische Entwicklung der Milchdrüse, während die Laktogenese das Einsetzen der Drüsenfunktion (Milchsynthese und Milchsekretion) und die Galaktopoese die Aufrechterhaltung der bestehenden Laktation beschreibt. Diesen drei Phasen schließt sich die Involution der Milchdrüse an, verursacht durch Unterlassen des Milchentzuges bei fehlendem Säugen oder Melken (*GÜRTLER & SCHWEIGERT*, 2000). Im Weiteren wird auf die Mammogenese und die Involution der Milchdrüse

nicht näher eingegangen.

Laktogenese

Die Laktogenese beginnt in der zweiten Hälfte der Trächtigkeit und wird unterteilt in zwei Phasen. In Phase I kommt es zur enzymatischen und zytologischen Differenzierung der Alveolarzellen (*TUCKER*, 1981) und zur Ansammlung von Präkolostrum im Euter. Hormonelle Veränderungen bereiten die Austreibung des Fötus und der Plazenta sowie die Stimulation der Laktogenese vor. Vor der Kalbung sinkt die Konzentration an Progesteron, wobei die Konzentration an Glukokortikoiden, Östrogenen, Prolaktin, plazentärem Laktogen und Somatotropin merklich ansteigt (*BURVENICH* et al., 1996). Die zweite Phase der Laktogenese beginnt mit der Geburt und der Sekretion des Kolostrums und wird ausgelöst durch die fehlende hemmende Wirkung von Progesteron auf die Milchbildung bei gleichzeitig erhöhten Prolaktin-Konzentrationen im Blutplasma (*GÜRTLER & SCHWEIGERT*, 2000). Sie beginnt vier bis null Tage ante partum (a.p.) bis wenige Tage post partum (p.p.) (*TUCKER*, 1981).

Als Kolostralmilch wird die in den ersten sechs Tagen nach dem Kalben (Kolostralmilchperiode) ermelkbare Milch bezeichnet. Sie unterscheidet sich hinsichtlich ihrer Zusammensetzung von reifer Milch. Die Kolostralmilchperiode ist der Anfang der bis zum 21. Tag p.p. andauernden Milchreifungsphase, in der das Sekret langsam die Zusammensetzung der reifen Milch annimmt (*MIELKE*, 1986). Der größte Unterschied zwischen Kolostrum und reifer Milch liegt in der hohen Konzentration an kolostralen Immunglobulinen (*BARRINGTON* et al., 2001), die dem Neugeborenen nach der Aufnahme einen spezifischen Schutz gegen Pathogene im Sinne einer passiven Immunisierung verleihen.

Für die Synthese von Kolostrum und die nachfolgende Synthese spezifischer Milchkomponenten ist die Aufnahme verschiedener Substrate notwendig (Glukose, Acetat, Aminosäuren u.a.). Dies ist verbunden mit einer vermehrten Durchblutung der Milchdrüse als Ausdruck einer erhöhten metabolischen Aktivität. Synthetisierte Milchkomponenten wie Zitrat, Triglyzeride, Laktose, Kasein, α-Laktalbumin und β-Laktoglobulin werden dann in das Alveolarlumen sezerniert (*BLUM*, 2004). Zudem werden Immunglobuline und verschiedene Peptide und Proteine wie Laktoferrin, Transferrin, Insulin, Glukagon, Prolaktin, Wachstumshormon, Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren

und deren Bindungsproteine, Leptin, Parathormon-ähnliches Peptid, Zytokine (z.B. Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α), Interleukine (IL), Transforming Growth Faktor-β) und Enzyme vom Blut transzellulär oder parazellulär in den Alveolarraum der Milchdrüse transportiert (*BLUM & BAUMRUCKER*, 2002).

Galaktopoese

Für die Aufrechterhaltung der bestehenden Laktation ist der Stoffwechsel der Milchdrüse eng mit dem Stoffwechsel des Gesamtorganismus gekoppelt. Bis zum Erreichen der maximalen Milchleistung („Startphase“, s. Abb. 2.2 S. 20) nimmt die Synthese von Fettsäuren, Fetten (v.a. Triglyzeride), Aminosäuren, Peptiden, Proteinen und Laktose zu. Dieser Phase folgt eine allmähliche Reduktion während der „Produktionsphase“ (s. Abb. 2.2) und einer abrupten Abnahme während des Trockenstellens (*BLUM*, 2004). Für die Aufrechterhaltung der Milchsekretion sind generell Prolaktin, Insulin, Glukokortikosteroide, Trijodthyronin und Wachstumshormon notwendig (*GÜRTLER & SCHWEIGERT*, 2000).

Die Laktationskurve der Milchkuh zeigt in den ersten zwei bis drei Wochen einen steilen Anstieg der Tagesmilchmenge, die bei einer Laktationsleistung von 10.000 kg pro Kuh und Jahr auf die tägliche Milchleistung von 40 kg und mehr ansteigt. Das Maximum wird im Mittel in der sechsten bis achten Laktationswoche erreicht. Anschließend erfolgt der Übergang in den langfristigen Teil des allmählichen Leistungsabschwunges mit einer gegen Null gerichteten Tendenz des Laktationsverlaufes (*HUTH*, 1995). Die Milchleistung und der Verlauf der Laktationskurve werden durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst. Neben der Anzahl der vorangegangenen Laktationen, dem Alter des Tieres, der Dauer des Trockenstehens, dem Klima, der Umgebungstemperatur sowie dem Gesundheitszustand des Tieres (*GÜRTLER & SCHWEIGERT*, 2000) ist die energetische Versorgung für die entsprechende Milchleistung des betreffenden Laktationsstadiums an erster Stelle zu nennen (*HUTH*, 1995). Für eine Milchleistung von > 40 kg/Tag sind tägliche Futteraufnahmen von 25-26 kg Trockenmasse (T) erforderlich, welche ein optimales Management voraussetzen (*BREVES & RODEHUTSCORD*, 2000).

2.2 Risikofaktoren für die Inzidenz einer Mastitis

Mastitis ist definiert als Entzündungsreaktion des Eutergewebes auf bakteriologische, chemische, thermische oder mechanische Verletzungen (*HOSPIDO & SONESSON*, 2005). Mastitiden sind multifaktorielle Infektionskrankheiten, an deren Entstehung Faktoren der Pathogene, des Managements oder der Umwelt und der Kuh beteiligt sind (*BURVENICH* et al., 2003).

Die Pathogene verfügen über verschiedene Virulenzmechanismen wie Adhäsine, Invasionsfaktoren (z.B. Ausbreitungsenzyme: Streptokinase, Hyaluronidase), Toxine (Endotoxine: Lipopolysaccharide (LPS) und andere Zellwandpolymere wie Teichonsäuren, Peptidglycane; Exotoxine: Zytotoxine, Neurotoxine, Enterotoxine, Superantigen-Toxine etc.) und Evasionsstrategien (Antiphagozytose-Faktoren, Antikörper-Zerstörungsfaktoren) (*MARRE*, 2001). Die Entfaltung der genannten Virulenzmechanismen ist abhängig von dem Lebensraum sowohl außerhalb als auch innerhalb des Wirtsorganismus. Verschiedene Managementfaktoren wie z.B. Haltungsbedingungen und Fütterung beeinflussen diese. Umweltbedingte Mastitiden, verursacht u.a durch koliforme Keime wie Koagulase negative Staphylokokken und *Streptokokkus uberis*, können durch eine erhöhte Anzahl an Keimen in der Umgebung der Kühe entstehen. Bei der Entstehung von Mastitiden, deren Erreger hoch kontagiös sind wie z.B. *Staphylokokkus aureus und Streptokokkus agalaktiae*, spielt die Melkhygiene eine entscheidende Rolle. Die Exposition der Milchdrüse in den genannten Umgebungen sowie die Diversität der pathogenen Bakterien (Staphylokokken, Streptokokken, koliforme Keime, Mykoplasmen etc.) erschweren die Gesunderhaltung der Milchdrüse (*KEHRLI & SHUSTER*, 1994).

Zu den Faktoren des Managements oder der Umwelt, die wiederum die Pathogene und die „Kuhfaktoren“ beeinflussen, zählen u.a. das Futter und die Fütterung. Das Futter der Tiere wirkt zum einen direkt (unabhängig von oraler Aufnahme) und zum anderen indirekt (nach Verdauung des Futters) auf die Qualität der direkten Umgebung der Tiere. *KAMPHUES* (1991) nennt als direkte Effekte u.a. Futterreste (z.B. Abraum von Silage), Insekten, Sporen und andere Keime und als indirekte Effekt u.a. die Kotkonsistenz und -zusammensetzung sowie die Einstreuqualität, welche wiederum einen wichtigen Faktor bei der Sauberkeit der Liegeflächen und damit für den Lebensraum der verschiedenen Erreger darstellt. Fütterungseinflüsse können ebenfalls direkt z.B.

durch Schlundverstopfung oder indirekt - durch immunsuppressive Wirkungen vermittelt - zu Gesundheitsstörungen führen (*KAMPHUES*, 1991). Die Fütterungseinflüsse, welche in der späten Trächtigkeit die Kondition der Milchkuh beeinflussen, führen dazu, dass die Kuh der Belastung der Kalbung und dem Übergang zwischen Trächtigkeit und Laktation weniger stressresistent begegnen kann (*BURVENICH* et al., 2003). *BURVENICH* et al. (2003) beschreiben eine geringere Anfälligkeit gegenüber umweltassoziierten Erregern nach dem Laktationspeak.
Die „Kuhfaktoren“ beinhalten die Fähigkeit, die Invasion der Pathogene durch mechanische Barrieren (s. 2.3.2.1) und die Infektion der Milchdrüse durch zelluläre und humorale Abwehrmechanismen (s. 2.3.1.1 und 2.3.1.2) zu verhindern.

2.3 Immunbiologie der Milchdrüse

Die Milchdrüse ist durch die Blut- und Lymphgefäße in die systemische Abwehr des Gesamtorganismus integriert und verfügt über lokale Abwehrmechanismen, welche das Eindringen von Pathogenen, deren Verbreitung sowie eine intramammäre Infektion (s. 2.3.2.1) verhindern sollen.

2.3.1 Systemische Abwehr

Das Abwehrsystem ist unterteilt in die unspezifische oder angeborene und die spezifische oder erworbene Immunantwort. Zu beiden Systemen zählen jeweils zelluläre und humorale Abwehrfaktoren. Das unspezifische System reagiert zuerst in der frühen Phase einer Infektion. Mit einer zeitlichen Verzögerung reagiert das spezifische System auf Infektionserreger, welche die Barriere der unspezifischen Immunabwehr überwunden haben.

2.3.1.1 Zelluläre Abwehr

Die zelluläre Abwehr beinhaltet die weißen Blutzellen, die Leukozyten. Zu ihnen gehören Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten. Eine Untersuchung der im Blut vorhandenen Leukozyten liefert Informationen über die Reaktionslage des Abwehrsystems. Die Gesamtleukozytenzahl variiert tierartlich stark. Für das Rind liegt der Referenzbereich bei 4000-10000 Zellen/μL Blut (*LÖSCH* et al., 2000).

Unspezifische zelluläre Abwehr

Die Population der Granulozyten stellt einen erheblichen Anteil der zirkulierenden Leukozyten dar und wird unterteilt in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Bei der unspezifischen zellulären Abwehr zählen neutrophile Granulozyten zu der wichtigsten Zellpopulation. Der Anteil der neutrophilen Granulozyten liegt mit 20-50 % an der Gesamtleukozytenzahl weit höher als der Anteil der eosinophilen (2-6 %) und der basophilen (0-2 %) Granulozyten (*LÖSCH* et al., 2000). Wegen ihres unregelmäßig geformten Zellkerns werden die Granulozyten auch als polymorphkernig bezeichnet. Nach der terminalen Differenzierung zirkulieren polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNLs) für sechs bis 12 Stunden im Blut, danach folgt die vorprogrammierte Apoptose (*BURTON* et al., 2004). Neutrophile Granulozyten sind stark phagozytierende Zellen, die als Reaktion auf Entzündungsmediatoren wie Zytokine, Komplement und Prostaglandine an den Ort der Entzündung wandern (*PERSSON* et al., 1993). Dort phagozytieren die PMNLs Erreger und Zelldetritus abgestorbener Gewebezellen. Inaktiviert werden Pathogene mit Hilfe reaktiver Sauerstoffmetabolite, deren massenhafte Produktion als „respiratorischer Burst“ bezeichnet wird, sowie durch bakterizid wirkende lysosomale Enzyme und Proteine/Peptide (*SORDILLO* et al., 1997; *SELSTED* et al., 1993). PMNLs umschließen die Fremdpartikel mit Pseudopodien und nehmen diese in Form von Phagosomen in die Zelle auf. Nach der Fusion mit einem Lysosom zu dem so genannten Phagolysosom wird durch die lysosomalen Enzyme der phagosomale Inhalt abgebaut. Die Lysosome werden in primäre und sekundäre Granula unterteilt. Die primären Granula enthalten u.a. mikrobizide Enzyme wie Lysozym, Myeloperoxidase und Proteinasen, wohingegen Laktoferrin, Kollagenasen und andere bakterizide Agenzien in den sekundären Vesikeln zu finden sind (*LONNERDALE & IYER*, 1995; *RESCH & GEMSA*, 1983). Ein wesentlicher Teil der von PMNLs gebildeten Metaboliten und Enzyme gelangt durch Exozytose in das umliegende Gewebe und führt zur Schädigung der dort gelegenen Zellen.

PMNLs sind darüber hinaus in der Lage, nach der Stimulation mit verschiedenen Mediatoren z.B LPS, Tumor-Nekorose-Faktor (TNF) oder IL (IL-1, IL-2) Zytokine (IL-1, IL-6, TNF-α) zu synthetisieren und freizusetzen und infolge dessen die T- und B-Zellen-Aktivität zu modulieren (*LLOYD & OPPENHEIM*, 1992).

Makrophagen entstehen im Gewebe aus differenzierten Monozyten, welche, nachdem

sie das Knochenmark verlassen haben, im Blut für mehrere Tage zirkulieren (*STABEL* et al., 1997). Der Anteil der Monozyten an der Gesamtleukozytenzahl liegt beim Rind bei 2-6 %. Makrophagen bilden ebenfalls reaktive Sauerstoffverbindungen, zusätzlich reaktive Stickstoffverbindungen (Stickstoffmonoxid) und verfügen wie die Granulozyten über lysosomale Enzyme. Im Gegensatz zu den neutrophilen Granulozyten sind Makrophagen allerdings wiederholt und über lange Zeiträume in der Lage zu phagozytieren (*LÖSCH* et al., 2000). Durch die Sezernierung von Zytokinen werden T-Lymphozyten stimuliert und weitere Makrophagen aktiviert. Ferner sind die Makrophagen an der Aktivierung des spezifischen Abwehrsystems durch Spaltung von phagozytierten Antigenen und deren Präsentation an der Zelloberfläche beteiligt (*SORDILLO* et al., 1997).

Spezifische zelluläre Abwehr

Die spezifische zelluläre Immunität wird vermittelt von antigenpräsentierenden Zellen und Lymphozyten als den einzigen Zellen, die mittels spezifischer Membranrezeptoren Antigene erkennen können (*SORDILLO* et al., 1997). Die Lebensdauer der Lymphozyten beträgt Tage bis Jahre (*RICK*, 1990). Die Population langlebiger Zellen umfasst vorwiegend T-Lymphozyten. Bei jedem Antigenkontakt (ausgenommen bei der direkten Stimulierung von B-Zellen durch so genannte Mitogene, z.B. LPS oder gramnegative Bakterien) kommt es neben der Aktivierung der T- und B-Lymphozyten und Ausführung ihrer spezifischen Aufgaben auch zur Bildung so genannter Gedächtniszellen. Lymphozyten werden unterteilt in T- und B-Lymphozyten und Null-Lymphozyten. Ihr Anteil an der Gesamtleukozytenzahl liegt beim Rind bei 45-65 % (*LÖSCH* et al., 2000). Dem T-Zell-System werden die zellvermittelten und dem B-Zell-System die humoralen Immunreaktionen zugeordnet.

Bei den reifen T-Lymphozyten lassen sich auf Grund ihrer Oberflächenmerkmale immunologisch zwei Hauptgruppen unterscheiden: T4- und T8-Lymphozyten. Die T4-Zellen werden weiter differenziert in CD4+- oder Helferzellen und CD8+- oder Supressorzellen. T-Helferzellen erkennen die von Makrophagen und B-Lymphozyten präsentierten Antigene und produzieren und sezernieren Zytokine, die ihrerseits B- und T-Zellen sowie Makrophagen und verschiedene andere Zellen, die an der Immunantwort beteiligt sind, aktivieren (*SORDILLO* et al., 1997). Die B-Zellen bilden Zytokine, die die Teilung und die Differenzierung der B-Zelle zur antikörperbildenden Plasma-

zelle ermöglichen (*LIEBICH*, 1993).
Die T-Supressorzellen werden durch die T-Helferzellen aktiviert. Sie sind danach in der Lage, die Aktivität oder Aktivierung anderer immunkompetenter Zellen zu beeinflussen, so dass humorale und zelluläre Immunantworten in ihrem Ausmaß vermindert oder völlig unterdrückt werden können (Immuntoleranz) (*RICK*, 1990).
Lymphozyten, deren Ausstattung mit Oberflächenmarkern sich qualitativ und quantitativ von denjenigen der T- und B-Lymphozyten unterscheidet, werden als Nullzellen bzw. Null-Lymphozyten bezeichnet. Deren größte Subpopulation bilden die aggressiven natürlichen-Killerzellen (NK). Sowohl virusinfizierte Zellen als auch Tumorzellen können von NK-Zellen erkannt und vernichtet werden. Nach Kontakt mit der Zielzelle setzen NK-Zellen zytotoxische Faktoren frei und leiten dadurch deren Apoptose ein (*LÖSCH* et al., 2000).

2.3.1.2 Humorale Abwehr

Unspezifische humorale Abwehr
Zu der unspezifischen humoralen Abwehr gehören das Komplement-System, das Interferon-System, verschiedene Enzyme sowie die Synthese der Akute-Phase-Proteine (APP). In diesem Kapitel wird nur auf die APP näher eingegangen.

Durch die Freisetzung der Zytokine IL-1, IL-6, IL-12 und TNF-α, vorwiegend von Gewebemakrophagen (*GODDEERIS*, 2005), wird die Synthese einer Reihe von humoralen Faktoren stimuliert. Diese unspezifische Reaktion des Körpers auf bakterielle Infektionen und Gewebeverletzungen wird als Akute-Phase-Reaktion (APR) bezeichnet. Zu dieser Reaktion gehören ein Anstieg der Biosynthese von Plasmaproteinen, den so genannten APP (*PETRIDES*, 1990), deren Hauptsyntheseort für den überwiegenden Teil der APP die Leber ist. Die Freisetzung der Zytokine verursacht weiterhin systemische Reaktionen wie Fieber, Leukozytose, Komplementaktivierung sowie eine erhöhte Sekretion an Glukokortikoiden. Die Zytokine IL-1, IL-6 und TNF-α wirken auf die Hypophyse, die dann ihrerseits Adrenokortikotropin ausschüttet, welches die Nebennierenrinde dazu veranlasst, Glukokortikoide freizusetzen. Glukokortikoide wie Kortison und Kortisol wirken regulierend auf den Protein-, Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel. Erhöhte Spiegel von Glukokortikoiden führen zu einem Abbau von Protein in der Muskulatur und zum Anstieg der Glukoneogenese aus Aminosäuren sowie

zur Lipolyse im peripheren Fettgewebe, d.h. der Stoffwechsel wird katabol. In der Folge steigt die Glukosekonzentration im Blut.
HEINRICH et al. (1990) beschrieben, dass Glukokortikoide einerseits steigernd auf die APP-Synthese der Hepatozyten wirken, andererseits eine Reduktion der Zytokinsynthese der Makrophagen hervorrufen. *KATOH* & *ITOH* (1995) berichteten ebenfalls über einen suppressiven Effekt der Glukokortikoide auf die Synthese der Zytokine IL-1 und IL-6.

Die von den Hepatozyten produzierten APP präsentieren sich in verschiedenen Konzentrationen im Blut. Sie werden unterteilt in positive APP wie Haptoglobin (Hp), Serum Amyloid A (SAA) und C-reaktives Protein (CRP), deren Konzentrationen im Blut bei der APR ansteigen und negativen APP wie Albumin, deren Konzentrationen im Blut während der APR sinken (*PETERSEN* et al., 2004). Bezüglich der Proteinmuster bestehen tierartliche Unterschiede in der APR. Beim Schwein zählen CRP, pig major acute phase protein (pig-map) und Hp zu den wesentlichen APP (*ECKERSALL* et al., 1996). Bei Kühen sind Hp und SAA die sensitivsten APP, deren Konzentrationen um etwa das 100fache bei einer Infektion ansteigen (*NIELSEN* et al., 2004; *ECKERSALL* et al., 2001). Die Funktion der APR ist die Isolation der Pathogene und deren Zerstörung sowie die Wiederherstellung der normalen Funktion des Gewebes (*ECKERSALL*, 1991).

Haptoglobin

Hp ist ein α2-Glykoprotein, das in den meisten Körperflüssigkeiten von Säugetieren vorkommt (*DOBRYSZYCKA*, 1997). Der Hauptsyntheseort für Hp ist die Leber. *FRIEDRICHS* et al. (1995) konnten jedoch bei Mäusen nach Injektion von LPS größere Mengen an Hp-mRNA in Fettgewebe und Lunge nachweisen. Positive Signale an Hp-mRNA fanden *THIELEN* et al. (2005) in bovinen Blutleukozyten und somatischen Zellen in der Milch.

Hp bindet Hämoglobin, welches beim Erythrozytenzerfall frei wird. Zusammen mit Hemopexin und Transferrin verringert es die schädliche Wirkung von freiem Eisen, welches die Bildung von freien Sauerstoffradikalen begünstigt, und begrenzt somit die Verfügbarkeit von freiem Eisen für eindringende Bakterien (*PUTNAM*, 1975). Dieser

Komplex wird vom retikuloendothelialen System in der Leber abgebaut (*DOBRYSZYCKA*, 1997). Damit steht das frei gewordene Eisen der Hämoglobinresynthese zur Verfügung. Durch die Komplexbildung wird außerdem die Entstehung von Hydroxylradikalen und die Peroxidation von Lipiden durch freies Hämoglobin verhindert (*GUTTERIDGE*, 1987). Eine Reihe von Proteinen wie z.B. Transferrin, Coeruloplasmin und Hp werden von *GUTTERIDGE* (1987) als „präventive Antioxidantien“ bezeichnet, darauf zurückzuführen, dass sie die oxidative Wirkung von Eisen und Kupfer verhindern. Eine weitere Funktion des Hps liegt in der Modellierung der „respiratorischen Burst-Aktivität“ der neutrophilen Granulozyten, also in dem Schutz des Organismus vor den Gefahren der Immunantwort auf Infektion und Entzündung (*DOBRYSZYCKA*, 1997). Immunmodulatorische Effekte auf Lymphozyten wurden auch von *MURATA* & *MIYAMOTO* (1993) beschrieben.

Erhöhte Hp-Konzentrationen im Serum von Kühen konnten nach entzündlichen Erkrankungen wie toxischer puerperaler Metritis (*SMITH* et al., 1998) und Mastitis ermittelt werden (*ECKERSALL* et al., 2001; *HIRVONEN* et al., 1999; *HIRVONEN* et al., 1996), sowie bei klinischen Erkrankungen des Respirationstraktes (*WITTUM* et al., 1996). *NAKAGAWA* et al. (1997) berichteten von erhöhten Hp-Konzentrationen bei dem Krankheitsbild Fettleber.
Der Einsatz von APP als Enzündungsparameter hat gegenüber der Leukozytenbestimmung den Vorteil, dass diese Proteine stabiler als zelluläre Komponenten und weniger anfällig gegenüber kurzzeitigen Stimuli wie z.B. Aufregung sind (*SOLTER* et al., 1991). *RICHTER* (1974) gibt die Halbwertszeit von Hp beim Rind mit ein bis zwei Tagen und beim Schwein mit vier bis sechs Tagen an.

Spezifische humorale Abwehr

Spezifische Antikörper werden entsprechend der genetischen Information eines jeden B-Lymphozyten synthetisiert, d.h. B-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche spezifische Rezeptoren (Immunglobuline) für Antigene (*LIEBICH*, 1993). Nur wenn das passende Antigen auf den entsprechenden B-Lymphozyten trifft, wird dieser aktiviert und nur dieser Antikörper wird nach der Differenzierung zur Plasmazelle sezerniert. Die verschiedenen Immunglobuline werden in Isotypen eingeteilt und unterscheiden sich strukturell und funktionell. Antikörper binden Antigene verbunden mit einer direkten

Neutralisation von Toxinen oder Pathogenen. Ferner können Immunglobuline (vorwiegend IgG) Fremdsubstanzen markieren, wonach diese von phagozytierenden Zellen beseitigt werden. Des Weiteren werden NK oder Komplement von ihnen aktiviert (*LÖSCH* et al., 2000).

2.3.2 Lokale Abwehr

2.3.2.1 Physiologische Prozesse bei intramammärer Invasion und Infektion

Mastitis entsteht vor allem durch das Eindringen von Pathogenen in den Strichkanal. Dieser stellt die erste mechanische Barriere gegen das Eindringen von Krankheitserregern dar. Der Zitzenkanal ist mit einem schuppenartigen Epithel ausgekleidet, das kontinuierlich keratinisiert wird und dabei ein sebum-ähnliches Material erzeugt (*JAIN*, 1979). Dieses Material enthält Fettsäuren und kationische Proteine. Die veresterten und nicht veresterten Fettsäuren wie Myristinsäure, Palmitoleinsäure und Linolsäuren wirken bakteriostatisch (*TREECE*, 1966). Durch die kationischen Proteine werden die Mastitiserreger elektrostatisch gebunden. Die daraus resultierenden Veränderungen in den Zellwänden der Bakterien bewirken eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber osmotischem Druck; Lysis und Tod der Erregerzelle sind die Folge (*TREECE*, 1966).
Nach dem Überwinden der Zitzenbarriere und intramammärer Invasion von Pathogenen versuchen Leukozyten, die beginnende Infektion durch Phagozytose aufzulösen (s. Abb. 2.1 A).

Falls die beginnende Infektion nicht aufgelöst werden kann, setzen Epithelzellen und Leukozyten Entzündungsmediatoren wie Zytokine, Komplement und Prostaglandine (*BAUMANN & GAULDIE*, 1994; *PERSSON* et al., 1993) frei (s. Abb. 2.1 B), welche die Migration von weiteren PMNLs aus dem Blut in die Milchdrüse veranlassen (s. Abb. 2.1 C) (*SURIYASATHAPORN* et al., 2000). Gleichzeitig werden unspezifische humorale Komponenten wie Hp, Laktoferrin, Lysozym etc. freigesetzt. Neben den von Epithelzellen und Leukozyten freigesetzten Entzündungsmediatoren wirken die von den Bakterien freigesetzten Stoffwechselprodukte wie Enterotoxine oder Zellwandkomponenten wie LPS ebenfalls als Chemoattraktantien auf die Komponenten der unspezifischen Abwehr. Erfolgt dennoch eine weitere Vermehrung der Pathogene, werden, bedingt durch eine Reihe löslicher Faktoren wie z.B. Zytokine, klinische An-

zeichen einer Mastitis sichtbar. Eine verlängerte Diapedese verursacht Gewebeschäden im Parenchym der Milchdrüse (*SORDILLO* et al., 1997).

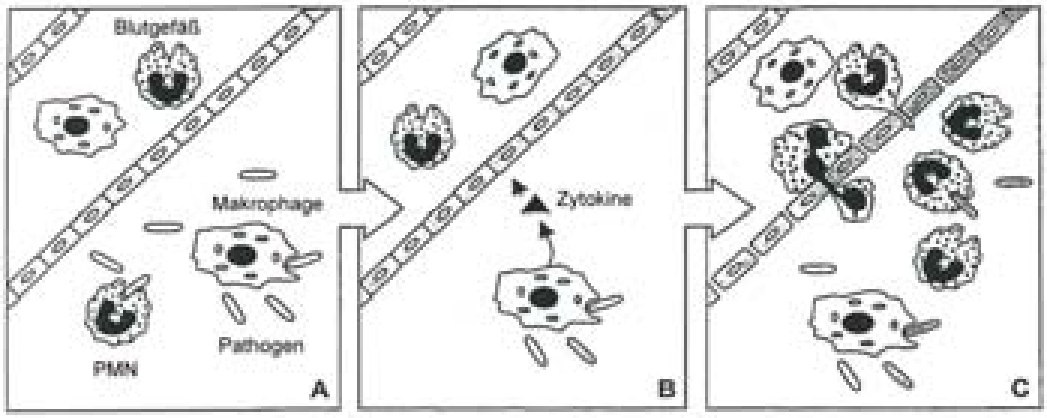

Abbildung 2.1: Abwehrmechanismen nach intramammärer Invasion und Infektion; Drei Komponenten: (A) Eliminierung von Pathogenen durch Phagozyten, (B) Freisetzung von inflammatorischen Substanzen, (C) Migration von neutrophilen Granulozyten (PMN) in das infizierte Euter (*SURIYASATHAPORN* et al., 2000)

2.3.2.2 Parameter zur Beschreibung der Eutergesundheit

Somatische Zellen

Die somatischen Zellen in der Milch, die dem Blut und Eutergewebe entstammen, sind hauptsächlich Gewebeformen der weißen Blutzellen. Die Gesamtzahl der somatischen Zellen in Milch infektionsfreier Euterviertel wird von der *DVG* (2002) mit < 100.000 Zellen/mL Milch angegeben. In der Milch einer gesunden Milchdrüse sind in erster Linie mononukleäre Phagozyten (Makrophagen) und Lymphozyten zu finden und zu einem kleinen Prozentsatz PMNLs und abgestoßene Epithelzellen (*KEHRLI & SHUSTER*, 1994). In der Kolostralphase ist der Anteil der PMLNs mit 50-80 % wesentlich höher als in der Hochlaktation mit 0-11 % (*LEE* et al., 1980). Insgesamt steigt die Zellzahl (ZZ) in der Kolostralphase auch in bakteriologisch negativen Eutervierteln an. *BARKEMA* et al. (1999) berichteten von 306.000 Zellen/mL in bakteriologisch negativen Eutervierteln. Die PMNLs der Milch weisen im Vergleich zu den PMNLs aus dem Blut eine geringere Phagozytoseaktivität auf, dadurch bedingt, dass die Zellen in der Milch Kasein und Fettkügelchen phagozytieren und dabei Energiereserven

(Glykogen) verbrauchen (*MIELKE & MICHEL*, 1986).
Der Anteil der PMNLs kann bei Euterinfektionen im akuten Stadium auf 90-96 % ansteigen. Ab dem Überschreiten des Schwellenwertes von 100.000 Zellen/mL Milch und dem Nachweis von Mastitiserregern in zwei von drei Untersuchungen (Probenahmeintervall eine Woche) ist das Tier, ohne äußerlich erkennbare Symptome, an einer subklinischen Mastitis erkrankt (*DVG*, 2002).
Erhöhte Zellzahlen weisen auf eine erhöhte immunologische Aktivität hin, bedingt durch das Eindringen von Mikroorganismen, was in einer subklinischen oder klinischen Mastitis enden kann. Als weitere Einflussfaktoren werden das Laktationsstadium und die Laktationsnummer gesehen (*SCHUKKEN* et al., 1990; *WARD & HORTON*, 1965). *LEAVENS* et al. (1997) konnten bis zur dritten Laktation keinen Einfluss der Laktationsnummer sowie des Laktationsstadiums in einem Zeitraum von 300 Tagen in bakteriologisch negativen Milchproben auf die Zellzahl feststellen. Verschiedene Autoren führen den Einfluss der Laktationsnummer auf die Anzahl der vorangegangenen Infektionen zurück (*HILLERTON*, 1999; *HARMON*, 1994).

Haptoglobin in Milch

Hp in der Milch kann durch Serum-Hp direkt aus dem Blut nach dem Überwinden der Blut-Milch-Barriere im Zuge der APR in die Milch gelangen oder durch Blutleukozyten (*THIELEN* et al., 2005) in die Milch transportiert werden. Darüber hinaus konnten *HISS* et al. (2004a) durch den Nachweis von Hp-mRNA im Homogenat verschiedener Bereiche der Milchdrüse eine lokale Synthese nachweisen. Nach der intrazisternalen Applikation von LPS in die Milchdrüse fanden die genannten Autoren bereits nach drei Stunden einen Anstieg der Hp-Milch-Konzentration und erst nach neun Stunden einen Anstieg der Hp-Serum-Konzentration. Die Autoren sehen die lokale Synthese von Hp darin bestätigt. In einer immunhistochemischen Untersuchung von Eutergewebe mit erhöhter Zellzahl (> 7 Mio. Zellen/mL) konnten *HISS* et al. (2004b) eine Hp-Immunfärbung für Granulozyten, Makrophagen und Plasmazellen, jedoch nur für einige Epithelzellen nachweisen.
Die Hp-Konzentrationen steigen im Blut und in der Milch sowohl bei natürlich vorkommenden klinischen Mastitiden (*NIELSEN* et al., 2004; *ECKERSALL* et al., 2001), als auch bei experimentell induzierten klinischen Mastitiden an (*GRÖNLUND* et al., 2003). *GRÖNLUND* et al. (2005) konnten ebenfalls einen Anstieg der Hp-Konzentrati-

on in der Milch bei Tieren mit einer chronisch subklinischen Mastitis nachweisen. *HISS* et al. (2005) ermittelten einen Grenzwert (GW) für die Unterscheidung zwischen gesunden und subklinisch erkrankten Eutervierteln von 2,2 μg Hp/mL Milch. Dieser GW wurde auf der Basis der *DVG*-Definition (2002) für subklinische Mastitiden ermittelt. Unter Anwendung des genannten GW erfolgte die Klassifizierung in subklinisch krank oder gesund mit einer Sensitivität von 85 % und einer Spezifität von 92 %.

Laktoferrin

Das zur Familie der Transferrine gehörende Laktoferrin (Lf) ist ein Fe^{3+}-Ionen-bindendes Glykoprotein und in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie z.B. Milch, Tränenflüssigkeit, Speichel und Nasensekret nachweisbar (*MASSON* et al., 1969). Lf in Milch wird von Epithelialzellen als Hauptquelle (*HARMON* & *NEWBOULD*, 1980) und PMNLs (*BAGGLIONI* et al., 1970) sezerniert. Bovines Lf (bLf) ist aus 689 Aminosäuren aufgebaut, die jeweils zwei Funktionsabschnitte, die so genannten Domänen bilden (*PIERCE* et al., 1991). Jeweils in einer Schleife der N- und D-Domäne liegt die Fe^{3+}-Bindungsstelle (*VORLAND*, 1999). Lf liegt in einer eisengesättigten Form, der Holo-Form und einer ungesättigten, der Apo-Form, vor. In den meisten exokrinen Flüssigkeiten, so auch in der Milch, liegt Lf in der Apo-Form vor (*VORLAND*, 1999).
Durch die Bindung des freien Eisens wirkt Lf bakteriostatisch. Koliforme Keime und Staphylokokken benötigen für ihr Wachstum Eisen. Eisenmangel könnte bei diesen Bakterien die Bildung des Enzyms Dismutase, welches Superoxidradikale deaktiviert, verhindern und somit die Phagozytierung der Keime erleichtern (*SORDILLO* et al., 1997). Lf wird sezerniert durch Stimulation von Zytokinen und gram-negativen Bakterien wie *Escherichia coli*. *NONNECKE* & *SMITH* (1984) konnten eine bakteriostatische Wirkung des Apo-Lfs auf das Wachstum ausgewählter gram-positiver und gram-negativer Bakterien beobachten. *E. coli* und zwei Stämme *Klebsiella pneumonia* wiesen ein stark eingeschränktes Wachstum in einem Medium mit Lf-Supplementierung auf. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden erreichte das durchschnittliche Populationswachstum der koliformen Keime im Kulturmedium mit 10 mg Apo-Lf/mL nur 0,44 % im Vergleich zu den Populationen im Lf-freien Kontrollmedium. *YAMAUCHI* et al. (1993) und *ELLISON* et al. (1988) beschrieben eine bakterizide Wirkung des Lfs auf gram-negative Bakterien *in vitro*, bedingt durch eine Destabilisierung der Bakterienmembran.

Immunologisch aktiv ist Lf durch die Wachstumsförderung der Lymphozyten. *HASHIZUME* et al. (1983) beobachteten, dass *in vitro* sowohl humanes Lf als auch bLf einen stimulierenden Einfluss auf das Wachstum der Zelllinien der B- und T-Lymphozyten zeigten. *CHEW* et al. (1991) untersuchten PMNLs aus der Milchdrüse gesunder laktierender Kühe und beobachteten eine von der bLf-Konzentration abhängige Stimulation der Phagozytose von *S. aureus*.
Darüber hinaus werden dem Lf antimykotische, antivirale und antiprotozoale Effekte zugeschrieben (*VORLAND*, 1999).
In der gesunden Milchdrüse ist die Lf-Konzentration gering und steigt während der Involution und einer Entzündung der Milchdrüse stark an. *MIELKE* & *MICHEL* (1986a) gaben die Lf-Konzentration in reifer Milch mit 100-1000 μg/mL Milch und in der Kolostralmilch mit 2000-5000 μg/mL Milch an. Während der Involution steigt die Lf-Konzentration im Trockenstehersekret in den ersten vier bis sechs Wochen auf 30 mg/mL und darüber hinaus an (*SMITH* & *OLIVER*, 1981). *HAGIWARA* et al. (2003) untersuchten die Lf-Konzentration in Milch von Kühen mit subklinischer Mastitis und gesunden Tieren. Die Lf-Konzentration in der Milch der gesunden Tiere lag im Mittel bei 170 μg/mL Milch und die der kranken Tiere bei 500 μg/mL Milch. *HARMON* et al. (1976) berichteten über einen 30fachen Anstieg der Lf-Konzentration im Maximum auf 8 mg/mL Milch, 90 Stunden nach einer experimentell induzierten *E. coli*-Mastitis. *RAINARD* et al. (1982) untersuchten den Einfluss der physiologischen Faktoren Laktationsnummer, Lokalisation der Viertel und Laktationsstadium auf die Lf-Konzentration in der Milch. Die Laktationsnummer sowie die Lokalisation der Viertel zeigten keinen Einfluss auf die Lf-Konzentration. Bezüglich des Laktationsstadiums wiesen die drei untersuchten Abschnitte (30 Tage p.p.; 150 Tage p.p.; 270 Tage p.p.) ansteigende Lf-Konzentrationen in der Milch mit fortschreitender Laktation auf. *HAGIWARA* et al. (2003) fanden bei gesunden Tieren in der fünften Laktation signifikant niedrigere Lf-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Tieren in der zweiten Laktation. Das Laktationsstadium (50-109 Tage p.p.; 110-219 Tage p.p.; 220-Laktationsende) hatte in dieser Studie keinen Einfluss auf die Lf-Konzentration.

Laktatdehydrogenase

Das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein tetrameres Protein (*JUNGMANN* et al., 1998), das in jeder glycolysierenden Zelle vorkommt und die reversible Redukti-

on des Pyruvats zu Laktat katalysiert. Enzyme werden im Rahmen der Immunantwort und bei Veränderungen der Zellmembran freigesetzt (*CHAGUNDA* et al., 2005). Eine Erhöhung der LDH-Aktivität in der Milch euterkranker Tiere wird von verschiedenen Autoren beschrieben (*ZANK* & *SCHLATTERER*, 1998; *KATO* et al., 1989; *BOGIN* et al., 1977). Nach Schädigung der Blut-Milch-Barriere durch eine massive Irritation von Mastitiserregern kann ein Übertritt von LDH aus dem Blut in die Milch erfolgen. *BOGIN* et al. (1977) nennen die Leukozyten und die Parenchymzellen als Ursprungsort für erhöhte LDH-Aktivitäten in der Milch.
ANDERSSON (1991) untersuchte die diagnostischen Möglichkeiten der LDH bezüglich der subklinischen Mastitis entsprechend der Definition nach *TOLLE* (1982). In 1374 Viertelgemelksproben konnte er bei einem GW von 85 U/L 87,7% der Viertel mit wiederholtem Nachweis von Mastitiserregern und einer erhöhten ZZ (> 250.000 Zellen/mL Milch) über drei Wochen richtig einordnen. Die von *ANDERSSONs* (1991) beschriebene Sensitivität der LDH-Aktivität bezüglich der Euterpathogenität von Erregern konnte von *NEU-ZAHREN* et al. (2004) bestätigt werden. Beide Untersuchungen fanden höhere LDH-Aktivitäten bei hoch pathogenen Erregern wie *E. coli* und *S. aureus* im Vergleich zu weniger pathogenen Erregern wie *Corynebakterium bovis* und Koagulase negativen Staphylokokken. Mit einem Grenzwert von 100 U/L Milch für subklinische Mastitiden (*DVG*, 2002) konnten *NEU-ZAHREN* et al. (2004) eine Sensitivität von 88 % und eine Spezifität von 86 % in 408 in Rohmilch gemessenen Viertelgemelksproben erreichen.

2.4 Stoffwechselveränderungen in der Frühlaktation

Säugetiere verwenden die aufgenommene Nahrung zur Erhaltung, für das Wachstum von Geweben und für Körperreserven in Form von Depotfett sowie für Glukosespeicher (Glykogen) und Aminosäurenreserven in Form von labilen Proteinen. Am Ende der Trächtigkeit ist der Bedarf an Nährstoffen um 75 % höher als bei einem nicht tragenden Tier mit gleichem Gewicht (*BAUMAN* & *CURRIE*, 1980). *DRACKLEY* (1999) nennt den Bedarf an Glukose und umsetzbarer Energie 21 Tage a.p. bis 21 Tage p.p. als um das Zwei- bis Dreifache erhöht. Die für die Trächtigkeit verwendete umsetzbare Energie aus der Nahrung liegt bei Schafen (*RATTRAY* et al., 1974) und Kühen (*MOE* & *TYRRELL*, 1972) bei 10 bis 25 %.

Während der Trächtigkeit und Laktation erfolgt die Adaption des Metabolismus durch Homöostase und Homöorhese. Die Homöostase ist charakterisiert durch die Aufrechterhaltung des physiologischen Gleichgewichtes bei sich fortwährend verändernden Umweltbedingungen (*BAUMAN & CURRIE*, 1980), z.B. die Regulation einer konstanten Blutglukosekonzentration durch die Peptidhormone Insulin und Glukagon. Die Homöorhese ist hingegen eine überwiegend langfristig ausgelegte Koordinierung des Stoffwechsels zur Gewährleistung eines spezifischen, durch den jeweiligen körperlichen Zustand vorgegebenen, metabolischen Bedürfnisses (*STANGASSINGER*, 2000). Die homöorhetische Stoffwechselkontrolle ist wichtig zur Aufrechterhaltung einer bestimmten metabolischen Hierachie z.B. in den ersten Laktationsmonaten zur Aufrechterhaltung der hohen metabolischen Priorität der Milchdrüse gegenüber anderen Organen (*BLUM* et al., 1983; *HART*, 1983; *BAUMAN & CURRIE*, 1980).

Die Stoffwechselpriorität ändert sich in der frühen Phase der Laktation zu Gunsten der Milchdrüse im Vergleich zu anderen Organen. Für ihren basalen Stoffwechsel, für synthetische Prozesse und für den Austausch bzw. Transport von Substanzen benötigt die Milchdrüse Energie. Der Energiebedarf für die Synthese von Protein ist besonders hoch. Für die Bildung von Adenosintriphosphat dienen Glukose, Acetat, Ketonkörper, Fettsäuren und Aminosäuren (*BLUM*, 2004).
Erhebliche Mengen an Gesamtprotein [Kolostrum (Tag 1 p.p.): 14,2 %; reife Milch (Tag 21 p.p.): 3,4 %], Fett [Kolostrum: 3,3 %; reife Milch: 4,0 %] und Laktose [Kolostrum: 2,9 %; reife Milch: 4,9 %] werden pro Tag von der Milchkuh erzeugt (*MIELKE*, 1986). Vor allem für die Synthese an Laktose im Euter steigt der Bedarf an Glukose aus dem Blut. Bei einer täglichen Milchmenge von 55 kg liegt der Glukosebedarf bei 4,0 kg/Tag (*BREVES & RODEHUTSCORD*, 2000). Die von der Milchdrüse benötigte Glukose entspricht nahezu der gesamten, im Organismus zirkulierenden Menge (*BICKERSTAFFE* et al., 1974). Für die Aufrechterhaltung einer normalen Blutglukosekonzentration ist v.a. die Glukoneogenese in der Leber wichtig (*DANFÆR* et al., 1995). Diese Umkehrung der Glykolyse erfolgt unter erheblichem energetischen Aufwand. Als Substrate für die Glukoneogenese dienen Propionat, glukoplastische Aminosäuren, Laktat und während der Lipidmobilisation Glyzerol (*DRACKLEY* et al., 2001), wobei der Glukoneogenese aus Laktat in der späten Trächtigkeit eine größere Bedeutung zukommt, als zu Beginn der Laktation (*BELL*, 1995). Endokrin regu-