

UNTERSUCHUNG ZUM ANTIOXIDATIVEN STATUS VON KÜHEN UND DEREN NEUGEBORENEN KÄLBERN

Stephanie Porzig

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

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. M. Stangassinger

**Untersuchung zum
antioxidativen Status von Kühen
und deren neugeborenen Kälbern**

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

von
Stephanie Porzig
aus Kassel

München 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig Maximilians Universität München

Dekan: Univ.- Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.- Prof. Dr. M. Stangassinger
Korreferent: Univ.- Prof. Dr. M. H. Erhard

Tag der Promotion: 23.Juli 2004

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1. Freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies	2
2.1.1. Entstehung von freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).....	2
2.1.2. Biologische Bedeutung von freien Radikalen und ROS	5
2.2. Antioxidatives Abwehrsystem und Oxidativer Stress	8
2.2.1. Antioxidantien	8
2.2.1.1. Enzymatische Antioxidantien	8
2.2.1.2. Nichtenzymatische Antioxidantien	9
2.2.2. Oxidativer Stress	12
2.2.3. Negative Folgen von oxidativem Stress	12
2.3. Antioxidativer Status	16
2.3.1. Antioxidativer Status von Kühen um die Geburt	16
2.3.2. Antioxidativer Status von Neugeborenen	16
2.4. Oxidativer Stress und Erkrankungen bei Neugeborenen	20
2.4.1. Retinopathie der Frühgeborenen	20
2.4.2. Bronchopulmonäre Dysplasie	21
2.4.3. Nekrotisierende Enterocolitis	22
2.4.4. Intraventrikuläre Hämorrhagien	22
2.4.5. ROS-assoziierte Erkrankungen bei neugeborenen Kälbern	23
2.5. Prophylaxe und Therapie von ROS-assoziierten Krankheiten	26
3. Material und Methoden	29
3.1. Versuchstiere	29
3.1.1. Kühe	29
3.1.2. Kälber	30

3.2. Versuchsanordnung	33
3.2.1. Probennahme	33
3.2.2. Lagerung.....	33
3.3. Analytische Methoden.....	35
3.3.1. Bestimmung der Trolox äquivalenten antioxidativen Kapazität (TEAC) im Plasma	35
3.3.2. Bestimmung der latenten Eisenbindungskapazität (LEBK) im Serum	37
3.3.3. Bestimmung von Vitamin E im Plasma	38
3.3.4. Bestimmung von Vitamin C im Plasma	39
3.3.5. Weitere Blutparameter im Serum: Alb, Eiw, Krea, Eisen, Glc, T-Bil, CK, ALT, AST und GLDH.....	41
3.4. Statistische Methoden	41
4. Ergebnisse	42
4.1. Peripartaler Konzentrationsverlauf spezifischer Messparameter im Blut der Muttertiere	42
4.2.1. Antioxidantien	42
4.2.2. Metabolite und Enzymaktivitäten	44
4.2. Neonataler Konzentrationsverlauf ausgewählter Messparameter im Blut der Kälber 	48
4.2.1. Beeinflussung durch den Geburtsverlaufs.....	48
4.2.2. Beeinflussung durch den Hämoglobin-Abbau	57
4.2.3. Beeinflussung durch den Gesundheitsstatus	59
5. Diskussion	60
5.1. Zum antioxidativen Status der Kühe in der Transitionsperiode	60
5.2. Zum antioxidativen Status der Kälber und dessen Beeinflussbarkeit	64
5.2.1. Einfluss des Geburtsverlaufs	64
5.2.2. Einfluss des fetalen Hämoglobin- Abbaus	68
5.3. Die TEAC als prognostischer Faktor bei neugeborenen Kälbern?	71

6. Zusammenfassung.....	74
7. Summary	77
8. Literaturverzeichnis.....	79
9. Anhang	97
9.1. Abkürzungsverzeichnis.....	97
9.2. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	99

1. Einleitung

Freie Radikale und aktivierte Sauerstoffmoleküle werden kontinuierlich als Nebenprodukte des physiologischen und pathologischen Stoffwechsels gebildet (Halliwell, 1994; Cheeseman und Slater, 1993). Vielfältige antioxidative Schutzmechanismen stehen zur Verfügung, um einer unkontrollierten Bildung und Anhäufung von freien Radikalen entgegenzuwirken (siehe Kapitel 2.2.3.).

Aus Untersuchungen am Menschen (Ochoa et al., 2003) und aus bereits abgeschlossenen Arbeiten an Jungtieren (Kälber, Fohlen, Hunde) ist bekannt, dass das antioxidative Abwehrsystem von Neugeborenen unterschiedlich stark belastet ist (Inamani et al., 1999; Stohrer et al., 2001) was gesundheitlich relevante Folgen haben kann.

Sauerstoffradikale sind an der Pathogenese einer Reihe von Neugeborenenenerkrankungen wie der neonatalen Retinopathie, der bronchopulmonären Dysplasie und der nekrotisierenden Enterocolitis beteiligt (Saugstad, 2001; Toti et al., 1996; Wagner und Wispé, 1992).

Fortführend zu bisherigen Untersuchungen (Stohrer et al., 2001) sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Hypothesen geprüft werden:

- I. Es tritt ein systematischer Abfall von Vitamin E und anderen Antioxidantien bei Milchkühen vor der Geburt auf.
- II. Der Geburtsverlauf beeinflusst den antioxidativen Status von neugeborenen Kälbern.
- III. Eine wesentliche Ursache für den verminderten antioxidativen Status von neugeborenen Kälbern ist vor allem die Freisetzung von Eisen beim Abbau des fötalen Hämoglobins.
- IV. Neugeborene Kälber mit niedrigem antioxidativen Status sind krankheitsanfälliger als Kälber mit gutem antioxidativen Status.

Dazu sollten bei Kühen und deren Kälbern im perinatalen bzw. postnatalen Zeitraum Blutproben genommen und der antioxidative Status sowie der Stoffwechsel- und Gesundheitsstatus anhand ausgewählter Blutparameter untersucht werden.

2. Literaturübersicht

2.1. Freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies

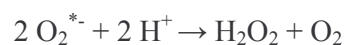
2.1.1. Entstehung von freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Als freie Radikale werden Moleküle bezeichnet, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen. Sie werden mit einem hochgestellten Sternchen gekennzeichnet (x^*).

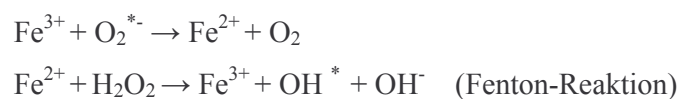
Unter dem Begriff „reaktive Sauerstoffspezies“ (reactive oxygen species, ROS) werden sowohl Sauerstoffradikale wie Superoxid-Radikal O_2^{*-} oder Hydrogenoxid-Radikal OH^* , als auch nicht-radikalische Sauerstoff-Derivate wie Wasserstoffperoxid H_2O_2 , Ozon O_3 und hypochlorige Säure $HOCl$ zusammengefasst (Halliwell, 1994).

Bei der mitochondrialen Zellatmung bilden ca. 1-3% der verbrauchten Sauerstoffmoleküle Sauerstoffradikale im Verlauf der Atmungsketten-Phosphorylierung (Fridovich, 1986; Halliwell, 1997). Durch Reduktion von molekularem Sauerstoff O_2 entsteht das **Superoxid-Radikal O_2^{*-}** .

Bei der Reaktion von zwei Superoxid-Radikalen entsteht katalysiert durch das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) **Wasserstoffperoxid H_2O_2** :

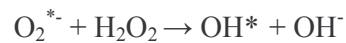


H_2O_2 ist kein freies Radikal, sondern ein starkes Oxidationsmittel. Es zerfällt in Gegenwart von Übergangsmetall-Ionen (z.B. Eisen, Kupfer) in das reaktivste freie Radikal, das **Hydroxyl-Radikal OH^*** . Diese sog. Fenton-Reaktion gilt auch als Bestandteil der eisenkatalysierten Haber-Weiss-Reaktionen (Elstner et al., 1994).



Die besondere Bedeutung des Superoxid-Radikals liegt nicht nur in seiner Vorläuferfunktion für das Hydroxyl-Radikal. Es vermag in geringer Menge auch Eisen aus seinen Speichern zu lösen (Halliwell, 1994).

Die nicht katalysierte Haber-Weiss-Reaktion, bei der das Superoxid-Radikal direkt mit Wasserstoffperoxid zum Hydroxyl-Radikal reagiert, ist in vivo aufgrund der geringen Konzentrationen der Reaktionspartner unwahrscheinlich (Cheeseman und Slater, 1993).



Als weiteres freies Radikal ist das **Nitritoxid-Radikal (NO^{*})** zu berücksichtigen. Es wird aus der Aminosäure L-Arginin von vaskulären endothelialen Zellen, Phagozyten, bestimmten Zellen im Gehirn und von vielen anderen Zelltypen gebildet. Es fungiert als Signalmolekül in der Vermittlung von Vasodilatation in kleinen Blutgefäßen. Ein Übermaß an NO^{*} ist jedoch toxisch. Es vermag dann direkt Biomoleküle schädigen oder zusammen mit Superoxid-Radikalen das Peroxynitrit (ONOO⁻) formen, welches Lipidperoxidationen initiieren kann (Beckman, 1996; Packer, 1996).

Darüber hinaus werden freie Radikale und ROS in vivo kontinuierlich auch als Nebenprodukte zahlreicher Stoffwechselprozesse freigesetzt. Als intrazelluläre Quellen dienen folgende Strukturen/Mechanismen (nach Freeman und Crapo, 1982):

- Autoxidation von kleinen Molekülen (Thiole, Hydroquinone, Katecholamine, Flavine, Tetrahydropterine)
- Lösliche Enzyme und Proteine (Xanthin-Oxidase, Tryptophan-Dioxygenase, Hämoglobin)
- Mitochondrialer Elektronentransport (s.o.)
- Endoplasmatisches Retikulum und Zellkernmembran-Elektronentransport (Cytochrom P450, Cytochrom b 5)
- Peroxisomen (Oxidasen, Flavoproteine)
- Plasmamembranen (Lipoxygenasen, Prostalandin-Synthetase, Lipidperoxidation)

Beispielhaft sei die Reaktionsfolge der **Xanthin-Oxidase** besprochen. Dieses Enzym produziert Superoxid-Radikale unter der Reduktion von Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid

(Abb. 1). Diese Reaktion ist in vivo abhängig vom pH-Wert, der Sauerstoffkonzentration und der Substratkonzentration.

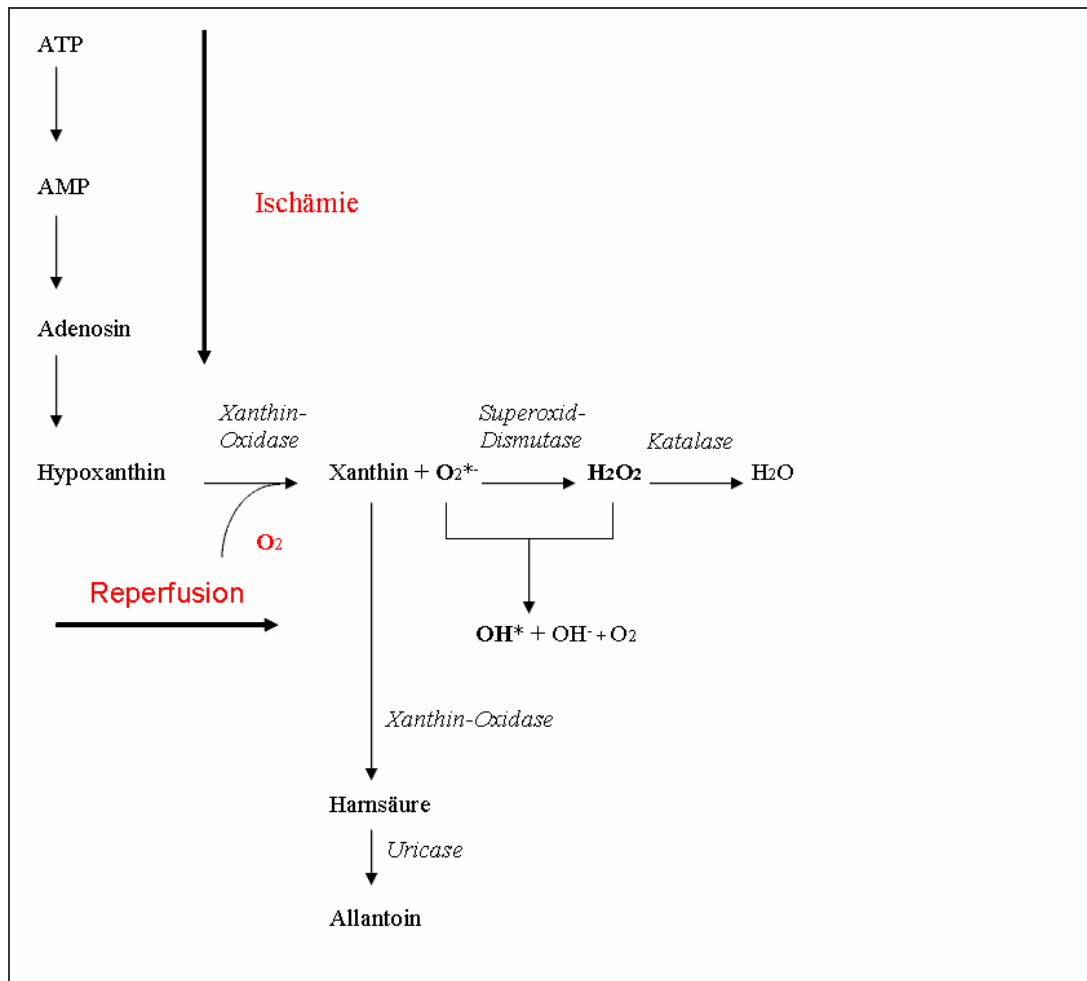


Abb. 1: Mechanismus der Radikal-Bildung durch die Xanthin-Oxidase bei Ischämie-Reperfusionsvorgängen

Unter physiologischen Bedingungen liegt das Enzym als Xanthin-Dehydrogenase vor, welches NAD als Elektronenakzeptor benutzt.

Bei Ischämie mit verstärktem ATP-Verbrauch und gesteigertem Hypoxanthin-Anfall in der Folge erfährt es eine Konformationsänderung zur Xanthin-Oxidase und überträgt bei Einsetzen der Reperfusion Elektronen auf molekularen Sauerstoff. Dabei werden massiv ROS produziert (Ray und McCord, 1982).

In lebenden Organismen werden durch die γ -Strahlungs-induzierte homolytische Spaltung von Wasser ständig Hydroxyl-Radikale gebildet (Harris, 1992):



Auch andere exogene Faktoren wie hyperoxische Atmosphäre oder Xenobiotika bewirken die Bildung von freien Radikalen/ROS. So zeigte Balentine (1982), dass Sauerstoffkonzentrationen über 21 % in der Atmosphäre oxidative Schädigungen bei aeroben Lebewesen bewirken. Aufgenommene Substanzen wie zum Beispiel einige Medikamente haben selber oxidative Eigenschaften, oder bei deren Metabolisierung werden freie Radikale/ROS produziert (Farombi, 2001).

Bei extremer physischer Anstrengung werden vermehrt freie Radikale und ROS freigesetzt. Dies wird auf einen Nebeneffekt beim erhöhten Verbrauch von Sauerstoffmolekülen in den Mitochondrien zurückgeführt (Hinchcliff et al., 2000; Stohrer et al., 2002).

Bei der Aktivierung phagozytierender Zellen (z.B. Makrophagen, Neutrophile) durch bakterielle Lipopolysaccharide, Lipoproteine, oder Cytokine werden immer freie Radikale produziert. Etwa 30 Sekunden nach der Aktivierung kommt es zu einem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs der Phagozyten auf das 10fache (Biesalski und Frank, 1995), daraus resultiert die Bildung von Superoxid-Radikalen und Wasserstoffperoxid aus Sauerstoff. Als Reduktionsäquivalent dient NADPH, als Katalysator die membranständige NADPH-Oxidase. Dieser Vorgang wird auch „respiratory burst“ (Babior, 1978) bzw. „oxidative burst“ genannt, da die Pathogene mit Sauerstoffradikalen attackiert werden, wobei den reichlich gebildeten ROS in einem Entzündungsareal dann eine antimikrobielle oder tumorizide Wirkung zugeschrieben werden muss („first line of defense against environmental pathogens“).

2.1.2. Biologische Bedeutung von freien Radikalen und ROS

Freie Radikale können biologische Moleküle wie Lipide, Nukleinsäuren und Proteine durch Oxidation schädigen. (Halliwell und Gutteridge, 1989; Sies 1991; Halliwell, 1996).

Den Übergangsmetallen wie Eisen und Kupfer wird aufgrund ihrer katalytischen Wirkung bei der Bildung von hochreaktiven Hydroxyl-Radikalen besondere Bedeutung beigemessen (Herbert et al., 1994).

Biologische Membranen enthalten viele mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA = poly unsaturated fatty acid), die der primäre Angriffsort für die Oxidation durch freie Radikale sind.

Bei der Lipidperoxidation von Membranen reagieren freie Radikale mit der Seitenkette einer ungesättigten Fettsäure in der Zellmembran und oxidieren diese. Ein Peroxylradikal entsteht und reagiert mit weiteren Fettsäuren, eine Kettenreaktion wird in Gang gesetzt (Esterbauer et al., 1992; Cheeseman und Slater, 1993, Reaven und Witztum, 1996).

Schematischer Ablauf der **Lipidperoxidation** (nach Porter, 1990):

- (1) $R^* + LH \rightarrow H_2O + L^*$
- (2) $L^* + O_2 \rightarrow LOO^*$
- (3) $LOO^* + L-H \rightarrow LOOH + L^*$
- (4) $LOOH \rightarrow LO^*, LOO^*, \text{Aldehyde}$

Bei der Reaktion eines Radikals (R^*) mit einer Fettsäure (LH) wird ein Lipidradikal (L^*) gebildet (1), dieses reagiert mit molekularem Sauerstoff zum Peroxylradikal LOO^* (2). Peroxylradikale sind in der Lage, benachbarte Fettsäuren zu Hydroperoxiden ($LOOH$) zu oxidieren (3), welche in Anwesenheit von Übergangsmetallen zu weiteren ROS und anderen Stoffen, vor allem Aldehyden, zerfallen können (4). Die Kettenreaktion kann durch Antioxidantien gestoppt werden (siehe Kapitel 2.2.1.)

Bei der Kumulation von entstehenden Peroxiden in der Membran wird deren Durchlässigkeit und Fluidität verändert. Dies hat unter anderem Auswirkungen auf immunkompetente Zellen. So haben Versuche mit Mäusen gezeigt, dass eine verminderte Membranfluidität zu einer verminderten lymphozytären Immunantwort führt (Bendich, 1992).

Die im Sauerstoffmetabolismus fortlaufend gebildeten ROS ($O_2^{\cdot-}$, OH^* , H_2O_2 etc.) können auch mit DNA-Basen reagieren und diese modifizieren. Oxidative DNA-Schäden sind in den Zellen nachweisbar. Auch Strangbrüche resultieren aus der Reaktion von Radikalen mit dem Zuckergerüst der DNA. Man geht davon aus, dass freie Radikale z.B. für über 80% der strahlungsinduzierten DNA-Schädigungen verantwortlich sind (Freeman und Crapo, 1982). Da alle diese Schäden auch mutagen sein können, wird vermutet, dass sie zum Krebsrisiko erheblich beitragen (Halliwell, 1997). Die Entstehungsgeschwindigkeit der DNA-Schäden

hängt dabei von der Menge an ROS (oxidativer Stress) und dem Vorrat an Antioxidantien ab, die jede Zelle zum Abfangen der ROS zur Verfügung hat.

Die Schädigung von Proteinen („Funktionsträgern“) durch freie Radikale und ROS hat weitreichende Folgen. So beeinflusst sie die Funktionsfähigkeit von Rezeptoren, Enzymen, Transportproteinen etc., und nimmt so indirekten Einfluss auf verschiedenste Funktionen dieser Proteine. Der Angriff von freien Radikalen erzeugt Protein-Peroxide, die auf komplexe Weise zerstörend auf die Zelle wirken (Fu et al., 1995).

Freie Radikale und ROS haben nicht nur negative, destruktive Eigenschaften, sondern können auf verschiedene Weise positiv in physiologische Funktionen eingreifen. So dient zum Beispiel die Bildung von Sauerstoffradikalen durch aktivierte Phagozyten dem Immunsystem als wichtiger Mechanismus bei der Abwehr pathogener Keime (Babior, 1978).

Nitritoxid fungiert als second messenger für wichtige biologische Prozesse wie Muskelrelaxation, Neurotransmission und Vasodilatation (Lowenstein und Snyder, 1992).

Auch Superoxid, Hydroperoxide und Hydroxyl-Radikale induzieren als Signalmoleküle (in subtoxischen Konzentrationen) verschiedenste biologische Vorgänge, wie zum Beispiel Zellwachstum, Apoptose und Zelladhäsion (Suzuki et al., 1997).

2.2. Antioxidatives Abwehrsystem und Oxidativer Stress

2.2.1. Antioxidantien

Im physiologischen und pathologischen Sauerstoffmetabolismus werden, wie schon erwähnt, freie Radikale gebildet. Lebende Organismen verfügen deshalb über zahlreiche antioxidative Strategien, um eine unkontrollierte Bildung und Anhäufung von freien Radikalen und ROS im Organismus zu verhindern.

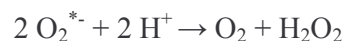
Als Antioxidantien werden Substanzen definiert, welche die Oxidation eines Substrats signifikant verzögern oder verhindern und dabei in geringerer Konzentration als das Substrat vorliegen (Halliwell, 1995).

Es kann unterschieden werden zwischen enzymatischen und nichtenzymatischen Antioxidantien.

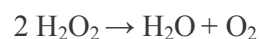
2.2.1.1. Enzymatische Antioxidantien

Zu den wichtigsten enzymatischen intrazellulären Antioxidantien zählen die Superoxid-Dismutase (SOD), die Katalase und die Glutathion-Peroxidase. Sie fangen direkt Radikale ab (SOD), bzw. reduzieren Wasserstoffperoxid und organische Hydroperoxide.

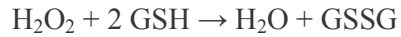
SOD enthält Mangan (Mn-SOD in den Mitochondrien) bzw. Kupfer und Zink (CuZn-SOD im Cytosol) und überführt Superoxid-Radikale zu Wasserstoffperoxid:



Die **Katalase** überführt H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff und arbeitet somit mit der SOD zusammen:



Das wichtigste Enzym zur Beseitigung von Wasserstoffperoxid ist die **Glutathion-Peroxidase**. Mit Hilfe dieses selenhaltigen Enzyms reagiert Glutathionsulfhydryl (GSH) mit H_2O_2 zu GSSG (Glutathiondisulfid = oxidierte Form zweier Moleküle GSH) und Wasser (Chance et al., 1979):



GSH kann auch direkt mit Hydroperoxiden reagieren, diese Reaktion wird ebenfalls durch die Glutathion-Peroxidase katalysiert. Die Lipidperoxide werden dabei zu Lipidalkoholen (LOH) reduziert:



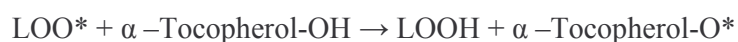
Die Regenerierung von GSH aus GSSG erfolgt durch Reaktion mit NADPH/H mit Hilfe der **Glutathion-Reduktase**, einem Flavoprotein-Enzym:



2.2.1.2. Nichtenzymatische Antioxidantien

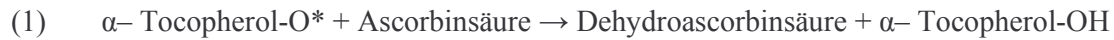
Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien zählen das Vitamin E, Vitamin C, Albumin, einige Carotinoide, Bilirubin, Harnsäure und Glutathion.

Der wichtigste Radikalfänger im fettlöslichen Medium ist das **Vitamin E** (α -Tocopherol). Vitamin E stoppt die Kettenreaktion bei der Peroxidation von Membranlipiden, indem es direkt mit Peroxyl-Radikalen reagiert und somit selber zum α -Tocopherol-Radikal wird (Halliwell, 1994):



Dieses Radikal ist sehr viel weniger reaktiv als das Peroxyl-Radikal, die Kettenreaktion wird verlangsamt. Das α -Tocopherol-Radikal wird durch die Reaktion mit Vitamin C (1)

(Esterbauer et al., 1989) und mit Ubichinon, dem reduzierten Coenzym Q (2) (Kagan et al., 1990) regeneriert:



Die Ascorbinsäure wiederum wird durch Reaktion der Dehydroascorbinsäure mit NADH/NADPH regeneriert, als Katalysator dient das Enzym Dehydroascorbinsäure-Reduktase (Weber et al., 1996). Die Regeneration von Coenzym Q geschieht beim Elektronentransfer in der Mitochondrienmembran vom oxidierten CoQH zum reduzierten CoQH₂ (Corbucci et al., 1986).

Vitamin C (Ascorbinsäure) ist in wässrigem Milieu in hoher Konzentration vorhanden und dient als potenter Radikalfänger für ROS, wie z.B. Superoxid- und Hydroxyl-Radikale, wasserlösliche Peroxyl-Radikale und hypochlorige Säure (Halliwell, 1990). Es gilt als eines der effektivsten Antioxidantien, und ist auch in hohen Konzentrationen nicht toxisch (Bendich et al., 1986). Vitamin C vermag Lipidperoxidationen durch wasserlösliche Peroxidradikale komplett zu verhindern, und fungiert an Stelle von hypochloriger Säure als Substrat für die Myeloperoxidase. Paradoxerweise zeigt Ascorbinsäure in Verbindung mit Übergangsmetallen ein pro-oxidatives Verhalten, es reduziert Fe³⁺ und Cu³⁺ zu Fe²⁺ und Cu²⁺ (Buettner und Jurkiewicz, 1996). Da diese Metallionen im gesunden Organismus nur in sehr geringer Anzahl frei vorhanden sind, überwiegt die antioxidative Eigenschaft von Vitamin C.

Albumin stellt mengenmäßig die größte Proteinfraction im Serum dar. Neben der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks hat es auch antioxidative Eigenschaften. Es bindet Übergangsmetallionen und seine Sulfhydrylgruppen neutralisieren schon gebildete Radikale (Halliwell et al., 1992; Nakazawa et al., 1996).

Beta-Karotin, ein Pflanzenfarbstoff und ein Provitamin des Retinols (Vitamin A), kann durch die Inaktivierung des radikalgenerierenden Singulett-Sauerstoffs auf einer sehr frühen Stufe die Bildung freier Radikale verhindern (Biesalski und Frank, 1995).

Auch **Bilirubin**, ein Produkt des Häm-Abbaus besitzt antioxidative Eigenschaften. Unkonjugiertes Bilirubin reagiert mit Superoxid- und Peroxyl-Radikalen und dient als Fänger von einatomigem Sauerstoff (Singulett-Sauerstoff).

Harnsäure ist ein Produkt des Purinstoffwechsels und gilt beim Menschen als eines der wichtigsten wasserlöslichen Antioxidantien durch Einfangen verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies und die Bindung von Eisenionen (Jacob und Burri, 1996). Es wird durch das Enzym Xanthin-Oxidase aus Xanthin und Wasser synthetisiert. Bei den meisten Tieren wird Harnsäure jedoch mit Hilfe der Uricase unter Ring-Öffnung in Allantoin umgewandelt und ausgeschieden. Harnsäure liegt bei ihnen deshalb nur in sehr geringer Konzentration vor.

Glutathion ist ein Tripeptid aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Glycin und Cystein und kann neben seiner Substrat-Eigenschaft für antioxidativ wirksame Enzyme auch direkt als Radikalfänger seine antioxidative Wirkung entfalten.

Als weitere antioxidative Strategie ist die Bindung von Eisen in Redox-inaktiver Form an **Ferritin** (Speicherform) und **Transferrin** (Transportform) und die Fe²⁺-Oxidation durch die Ferroxidase-Funktion von **Caeruloplasmin** zu nennen. Wird das Eisen in seiner oxidierten, dreiwertigen Form gehalten, steht es für die Reaktion mit Wasserstoffperoxid nicht zur Verfügung. Wie erwähnt, katalysiert zweiwertiges Eisen die Fenton-Reaktion, bei der das hochreaktive Hydroxylradikal entsteht. Wird Eisen an die Proteine gebunden, so steht es als Katalysator nicht mehr zur Verfügung. Die gleiche Wirkung haben Chelatbildner. Sie binden die Metallionen und entziehen sie somit der Reaktion.

Eine weitere antioxidative Strategie ist die Beseitigung bzw. Reparatur von oxidativ geschädigten Molekülen bevor sie im Gewebe akkumulieren. Nukleinsäuren werden mithilfe von speziellen Enzymen repariert, oxidierte Proteine werden von proteolytischen Enzymen beseitigt, beschädigte Membranlipide werden von Lipasen, Peroxidasen und Acyltransferasen wiederhergestellt.

2.2.2. Oxidativer Stress

Verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen freien Radikalen/ROS und der antioxidativen Kapazität des Organismus zugunsten der freien Radikale/ROS, so spricht man von „oxidativem Stress“ (Sies, 1991).

Oxidativer Stress kann mehrere Ursachen haben:

- *Mangel an Antioxidantien durch Mangelernährung*
(durch unzureichende Aufnahme von α - Tocopherol, Ascorbinsäure, Riboflavin und schwefelhaltigen Aminosäuren für die GSH-Bildung)

- *übermäßige Bildung von ROS*
(durch Exposition in hoch konzentriertem Sauerstoff, durch Aufnahme von Toxinen, bei deren Metabolisierung freie Radikale produziert werden, oder bei exzessiver Aktivierung von natürlichen radikal-produzierenden Systemen wie z.B. von phagozytierenden Zellen bei chronischen Entzündungsprozessen)

Oxidativer Stress kann bis zu einem gewissen Grad toleriert werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in Teilbereichen eine Synthese- bzw. Aktivitätssteigerung im antioxidativen Abwehrsystem erreicht werden kann, wodurch die Balance von Oxidantien und Antioxidantien wiederhergestellt werden kann. Wird dieser Toleranzbereich überschritten, so können schwere Zellstoffwechsel-Störungen inklusive DNA-Strangbrüchen, Schäden an transmembranösen Ionen-Transportersystemen und anderen Proteinen sowie Lipidperoxidationen entstehen. Daraus folgen Zellschäden bis hin zum Zelltod (Cochrane, 1991; Stadtman und Oliver, 1991).

2.2.3. Negative Folgen von oxidativem Stress

Ein Gewebeschaden, ausgelöst durch unterschiedliche Noxen (Krankheit, Trauma, Vergiftung etc.) führt zu einer vermehrten Bildung von ROS und freien Radikalen durch aktivierte

Phagozyten, Austritt von Übergangsmetallen aus deren Speichern und aus dem Hämoglobin, und Enzymaktivierung (Halliwell, 1994).

Wie bereits im Abschnitt 2.1.2. beschrieben, entziehen Oxidantien dem Reaktionspartner Elektronen, was in einer Kettenreaktion münden kann. Diese Reaktion kann unkontrolliert zu schweren Gewebeschäden führen, was wiederum Folgen für die Membranpermeabilität, Enzymfunktion und sogar auch auf den Muskeltonus haben kann. So beschreiben Miller et al. (1993 a) eine verminderte Uteruskontraktilität und demzufolge eine Verminderung des Spermientransports zur Eizelle bei Kühen mit relativem Antioxidantien-Mangel. Auch durch die oxidative Schädigung von Enzymen, die an der Synthese von Steroidhormonen beteiligt sind, ließen sich negative Auswirkungen auf die Fruchtbarkeit beobachten.

Mit der zunehmenden Erforschung der Genese und der biologischen Wirkung von freien Radikalen und ihrer Bedeutung für den Gesundheitsstatus von Mensch und Tier wird oxidativer Stress immer häufiger mit allen möglichen Arten von Krankheiten in Verbindung gebracht. Interessanterweise wird dabei die Bildung von freien Radikalen überwiegend als unvermeidliche Folge von vielen Krankheiten gesehen (Gutteridge und Halliwell, 2000), nicht aber als deren alleinige Ursache.

Freie Radikale stehen in direktem Zusammenhang mit der Ausbildung von rheumatoiden Erkrankungen. Rheumatische Arthritis ist eine systemische Auto-Immunkrankheit, charakterisiert durch chronische Gelenkentzündungen mit Infiltrationen von Makrophagen und aktivierten T-Zellen. Die Produktion von freien Radikalen an den Entzündungsstellen trägt wesentlich zur Krankheitsintensität bei (Mapp et al., 1995; Aasteh et al., 1998, Araujo et al., 1998).

Ähnlich wie bei der rheumatischen Arthritis führt bei chronischen Darmentzündungen, wie z.B. Morbus Crohn oder ulzerativer Colitis eine übermäßige Produktion von freien Radikalen zu einer verstärkten Gewebsschädigung und trägt damit zur Intensivierung der Symptome bei (van der Vliet und Bast, 1992).

Auch bei der Artherosklerose, einer multifaktoriellen Erkrankung der Arterienwand, spielen freie Radikale eine wichtige Rolle. Die Oxidation von Low-Density-Lipoproteinen (LDL)

durch freie Radikale begünstigt die Ausbildung der proatherogenen Eigenschaften von LDL (Berliner und Heinecke, 1996; Bhakdi, 2003).

Die oxidative Schädigung der DNA durch freie Radikale trägt zur Kanzerogenese und zum Alterungsprozess bei (Ames, 1989). Anhaltender oxidativer Stress führt zu Mutationen der DNA und zur Modifikation der Genexpression durch Aktivierung von Signalmolekülen (Klaunig und Kamendulis, 2004).

Bei Krankheiten mit Ischämie- und Reperfusionsvorgängen, wie Herz- und Hirninfarkten sowie intestinalen Ischämien spielen freie Radikale eine große Rolle. Durch die hypoxischen Bedingungen während der Ischämie konvertiert die Xanthin-Dehydrogenase zur Xanthin-Oxidase und stellt bei nachfolgender Reperfusion eine potente Quelle von Superoxid-Radikalen dar (McCord, 1985; van der Vliet und Bast, 1992; McCord, 1993).

Oxidativer Stress wird auch mit neurodegenerativen Erkrankungen wie zum Beispiel der Alzheimer-Erkrankung in Verbindung gebracht. Skoumalova et al. (2003) fanden erhöhte Konzentrationen an Radikalfolgeprodukten und erniedrigte Vitamin E-Gehalte im Gehirn von Hunden eines caninen Alzheimer-Modells. Auch die Erythrozyten der betroffenen Hunde wiesen höhere Konzentrationen an Lipidperoxidationsprodukten auf als die Kontrollgruppe.

Auch in der Tiermedizin wird die Bedeutung von freien Radikalen bei der Entstehung und Unterhaltung von Krankheiten immer klarer erkannt.

So wurden bei Untersuchungen an Katzen, bei denen eine lokale einstündige Ischämie des Darmepithels induziert wurde, eine signifikante Erhöhung der Membranpermeabilität festgestellt. Für die Permeabilitätserhöhung wurden vor allem Schädigungen an Membranlipiden durch Superoxidradikale verantwortlich gemacht (Granger et al., 1981).

Bei Hunden mit hereditärer spinaler Muskelatrophie wurden Indikatoren für oxidativen Stress, wie signifikant erhöhter Kupferspiegel und verminderter Gehalt an Vitamin E gefunden (Green et al., 2001).

Stickstoff-Monoxid (NO) spielt eine Rolle bei der „exercise-induced pulmonary haemorrhage (EIPH)“ des Pferdes. Normalerweise fungiert NO als Vasodilatator, produziert von

endothelialen Zellen. Kommt es nun zu einer oxidativen Schädigung der Endothelzellen (wie es bei extremer Anstrengung der Fall ist), wird die Bildung von NO unterdrückt, und ein erhöhter Lungenarteriendruck mit eventuellen Kapillarrupturen und Lungenbluten ist die Folge (Mills et al., 1996; Derksen, 1997).

Der Nachweis freier Radikale in vivo ist aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer von wenigen Mikrosekunden (Cheeseman und Slater, 1993) kaum möglich, deshalb bedient man sich der indirekten Bestimmung über die Messung entweder von Reaktionsprodukten (z.B. Malondialdehyd) bzw. Gewebeschädigungen oder des Verbrauches von Antioxidantien.

2.3. Antioxidativer Status

Unter dem Begriff „antioxidativer Status“ werden alle antioxidativ wirksamen Substanzen eines Organismus zusammengefasst.

2.3.1. Antioxidativer Status von Kühen um die Geburt

Der antioxidative Status von Kühen im Zeitraum um die Geburt ist Schwankungen unterworfen. Durch die großen Stoffwechseleränderungen in der Übergangsperiode, die von der späten Trächtigkeit bis zum Einsetzen der Laktation reicht, kommt es zu einer Abnahme von Antioxidantien im Blut. Dabei handelt es sich anscheinend um einen Effekt der insbesondere durch die Vitamine C und E zustande kommt (Goff und Stabel, 1990; Weiss et al., 1992; Brzezinska-Slebodzinska et al., 1994; Kolb und Seehawer, 2000; Lantzsch und Kaufmann, 2002).

Eine ausführlichere Besprechung dieser Veränderungen erfolgt im Diskussionsteil.

2.3.2. Antioxidativer Status von Neugeborenen

Der antioxidative Status von Neugeborenen ist unzureichend auf die sehr variablen, neuen Umwelt- und Lebensbedingungen eingestellt. Das antioxidative Abwehrsystem ist im geburtsnahen Zeitraum noch nicht so gut ausgebildet wie bei erwachsenen Individuen und gleichzeitig wird das Neugeborene perinatal mit mehreren neuen und sehr potenten Radikal-Bildungs-Quellen konfrontiert.

So haben menschliche Neugeborene eine geringere Eisenbindungskapazität und einen niedrigeren Caeruloplasmin- und Transferringehalt im Blut als Erwachsene (Lindeman et al., 1992). Dadurch sind sie nicht in ausreichendem Maße in der Lage, Eisenionen abzufangen, bzw. zu oxidieren, und somit der Bildung von Hydroxylradikalen entgegen zu wirken.

Menschliches neonatales Plasma enthält weniger Beta-Karotin, Riboflavin und Selen (Buoncore et al., 2001), Substanzen, die alle direkt oder indirekt eine antioxidative Wirkung haben. Auch die Aktivitäten der antioxidativ wirksamen Enzyme Glutathion-Peroxidase,

Superoxiddismutase und Katalase sind verringert (McElroy et al., 1992). Robles et al. (2001) fanden vermehrt Hydroxidperoxide in der Erythrozytenmembran von menschlichen Neugeborenen, parallel dazu jedoch verringerte Gehalte von Vitamin E.

Der Gehalt an fettlöslichen Vitaminen im Blut von Neugeborenen ist aufgrund des geringen Plazentatransfers dieser Substanzen vermindert (Ametaj et al., 2000). So ist zum Beispiel der Vitamin A-Gehalt bei Neugeborenen nur etwa halb so groß wie bei den Müttern (Böhles, 1997). Bei neugeborenen Kälbern wurden direkt nach der Geburt ebenfalls niedrige Vitamin A und -E-Gehalte im Blut gemessen, deshalb ist die schnelle postnatale Gabe von vitaminreicher Kolstralmilch für deren antioxidativen Status von großer Bedeutung (Zanker et al., 2000).

Untersuchungen von Inamani et al. (1999) an neugeborenen Kälbern zeigten hohe Lipidperoxid-Konzentrationen, gemessen als TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances), im Vergleich zu deren Müttern. Diese Erhöhung von Radikalfolge-Produkten lässt indirekt auf einen erniedrigten Gehalt an antioxidativen Substanzen im Blut schließen. Tatsächlich war die antioxidative Kapazität des Neugeborenen-Serums, gemessen als Superoxid-Radikalfänger-Aktivität, Ferroxidase-Aktivität und Bilirubin-assoziiertes Albumin, signifikant niedriger als die antioxidative Kapazität des Serums der Muttertiere.

Stohrer et al. (2001) bestimmten die TEAC (Trolox equivalent antioxidant activity, als Indikator für den antioxidativen Status) bei neugeborenen Kälbern und Pferden. Bei beiden Tierarten sank die TEAC unmittelbar nach der Geburt ab und stieg erst langsam im Verlauf der nächsten Tage und Wochen wieder an.

Bei menschlichen Frühgeburten konnten höhere Konzentrationen an Hydroperoxiden, niedrigere Gehalte an Vitamin E und geringere Aktivitäten von antioxidativen Enzymen im Blut gemessen werden (Ochoa et al., 2003), und auch die Plasmakonzentrationen von Caeruloplasmin und Apotransferrin waren niedriger als bei zeitig geborenen Säuglingen (Sullivan und Newton, 1988). Diese und weitere Untersuchungen unterstreichen die These, dass der antioxidative Status mit zunehmendem Gestationsalter und zunehmendem Gewicht ansteigt (Böhles, 1997; Silvers et al., 1994; Lindeman et al., 1992). Denn gerade im letzten Trimester reift das antioxidative Abwehrsystem des Fetus, und auch die beteiligten Enzymaktivitäten steigen an. So konnten Frank et al. (1984) zeigen, dass die

Superoxiddismutase-, Katalase- und Glutathionperoxidase-Aktivitäten in der fetalen Lunge kurz vor der Geburt deutlich zunehmen.

Weiterhin haben Untersuchungen gezeigt, dass der Vitamin C-Gehalt im Blut von Neugeborenen erhöht ist (Silvers et al., 1994; Powers et al., 1995). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Übergangsmetallen und geringem Cearuloplasmin-Gehalt entfaltet Vitamin C seine prooxidativen Eigenschaften und hemmt die Ferroxidase-Aktivität von Cearuloplasmin (Gutteridge, 1991). Freie Eisenionen können nicht in ihrer oxidierten, weniger reaktiven Form gehalten werden und katalysieren die Reaktion von Wasserstoffperoxid zum Hydroxylradikal. Dadurch wird das antioxidative Abwehrsystem geschwächt.

Beim Geburtsvorgang ist die Blutversorgung des Fetus durch die Mutter verringert (Ching et al., 2001), da während der Wehentätigkeit die Arterien der Mutter durch die Uterusmuskulatur komprimiert werden. Dadurch kommt es zu einer kurzzeitigen Unterversorgung des Fetus mit Sauerstoff. Aufgrund der entstehenden ischämischen Hypoxie konvertiert die Xanthin-Dehydrogenase zur Xanthin-Oxidase, welche sofort aktiviert wird und massenhaft verschiedene Sauerstoffradikale produziert. Während der Ischämie-Phase im Austreibungsstadium der Geburt wird ATP zu Hypoxanthin abgebaut, welches in der nachfolgenden Reperfusion-Phase als Substrat für die Xanthin-Oxidase dient (Saugstad, 1996). Weitere Sauerstoffradikale werden produziert und stellen eine große Belastung für das unreife antioxidative Abwehrsystem der Neugeborenen dar (siehe auch Abb. 1).

Der Geburtsvorgang bedeutet Stress für die Mutter und das Neugeborene. Untersuchungen von Nockles et al. (1996 a) haben gezeigt, dass es unter Stress zu einer Anhäufung von Sauerstoffradikalen kommt, bedingt durch die Adrenalin-induzierte Grundumsatz-Erhöhung und die vermehrte Eicosanoid und Kortikosteroid-Synthese.

Nach der Geburt wird das fetale Hämoglobin im neonatalen Blut abgebaut und durch adultes Hämoglobin ersetzt. Erythrozyten von Neonaten haben eine sehr kurze Lebensdauer, einen hohen Gehalt an fetalem Hämoglobin (fast 100%) und sind sehr empfindlich gegenüber oxidativem Stress. Im Alter von dreißig Tagen ist der Anteil an fetalem Hämoglobin bei Kälbern auf ca. 20% gesunken (Gustin et al., 1997).

Werden Erythrozyten mit fetalem Hämoglobin oxidativem Stress ausgesetzt, setzen sie intrazellulär Eisen in Desferrioxamin-Chelat-bildender Form frei (Ciccoli et al., 2003). Diese

freien Eisenionen sind in der Lage, aus den Erythrozyten ins Plasma zu diffundieren. Die Eisenfreisetzung bei Frühgeborenen und/oder hypoxischen Neugeborenen ist höher als bei zeitig geborenen und/oder normoxischen Neonaten. Außerdem korreliert die Eisenfreisetzungsrates in den Erythrozyten und der Gehalt an freiem Eisen im Plasma der Neugeborenen negativ mit dem pH-Wert des Blutes, welcher bei hypoxischen Zuständen erniedrigt ist.

Man vermutet eine Beteiligung von freien Eisenionen bei der Präsentation von SCA (senescence cell antigen) auf der Erythrozytenoberfläche, welches zur Beseitigung der fetalen Erythrozyten durch Makrophagen führt. Dies könnte auch die beobachtete Hyperbilirubinämie der Neugeborenen erklären (Comporti et al., 2002).

Wie schon erwähnt, katalysieren reduzierte Eisenionen die Bildung von Hydroxylradikalen, den reaktivsten Sauerstoffradikalen. Das heißt, die Freisetzung von Eisen in neonatalem Blut hat zwangsläufig die Produktion von freien Radikalen zur Folge.

Insgesamt gesehen ist das antioxidative Abwehrsystem von Neugeborenen durch den geringen Gehalt an antioxidativ wirksamen Substanzen im Blut deutlich eingeschränkt. Darüber hinaus kann es zu einer zusätzlichen Schwächung durch die auftretende Hypoxie während des Geburtsvorgangs kommen. Schon kurz nach der Geburt ist das neonatale antioxidative Abwehrsystem mit freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies aus der Eisenfreisetzung beim Umbau von fetalem in adultes Hämoglobin und mit freien Radikalen aus den Nachwirkungen der Geburt konfrontiert. Dadurch verschlechtert sich der bereits eingeschränkte antioxidative Status noch mehr.

Bei Frühgeburten ist der antioxidative Status noch schlechter ausgebildet, da das antioxidative Abwehrsystem zum größten Teil erst im letzten Trimester der Schwangerschaft bzw. Trächtigkeit ausreift. Dies kann weitreichende gesundheitliche Folgen haben, wie im nachfolgenden dargestellt.

2.4. Oxidativer Stress und Erkrankungen bei Neugeborenen

Neugeborene sind aufgrund ihres verminderten antioxidativen Status sehr anfällig für oxidativen Stress.

Daraus resultieren verschiedene Krankheitsbilder, die vor allem bei menschlichen Frühgeburten beschrieben werden, wie zum Beispiel Retinopathien der Frühgeborenen, bronchopulmonäre Dysplasien, neonatale nekrotisierende Enteritiden und intraventrikuläre Hämorrhagien (Saugstad, 2001).

Frühgeburten sind noch anfälliger für oxidativen Stress als termingerecht geborene, da das antioxidative Abwehrsystem des Fetus wie bereits dargestellt hauptsächlich erst im letzten Trimester der Schwangerschaft bzw. Trächtigkeit ausreift.

2.4.1. Retinopathie der Frühgeborenen

Die Retinopathie (retinopathy of prematurity = ROP) ist eine Entwicklungsstörung der Netzhaut, die nur bei Frühgeborenen auftritt (Wagner und Wispé, 1992). Bis zur 40. Schwangerschaftswoche wachsen die Blutgefäße der Retina von Spindelzellen ausgehend von der Papille in die Peripherie. Bei Frühgeburten existiert abhängig vom Alter des Fetus eine unterschiedlich breite periphere avaskuläre Zone (Ashton et al., 1970). Ursächlich dafür ist, dass die Spindelzellen plötzlich einem höheren Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt sind, die Einwanderung gestoppt wird und die Vaskularisation eingestellt wird. Die Spindelzellen sezernieren angiogenetische Faktoren, was ein unkontrolliertes Blutgefäßwachstum (bis in den Glaskörper) mit gleichzeitiger Formation von arterio-venösen Shunts zur Folge hat. Die entstehenden Shunts sind pathognomisch für die ROP (Kretzer und Hittner, 1988).

Postnatale Hyperoxie, aber auch der normale Sauerstoffgehalt in der Außenluft bewirken die Vasokonstriktion der unreifen retinalen Gefäße. Das wiederum führt zu einem Gefäßverschluss und zu degenerativen Veränderungen in der Gefäßwand (Ashton et al., 1954). Das unkontrollierte Gefäßwachstum in der späteren Phase kann bis zur Glaskörperblutung, Netzhautablösung und bindegewebiger Verschwartung des Glaskörpers führen (D'Amore, 1994).

Sauerstoffradikale und reaktive Sauerstoffspezies, welche bei der Geburt durch die Ischämie-Reperfusionsvorgänge gebildet werden, spielen eine Rolle bei der Vermittlung der

Spindelzellen-Schädigung und der arteriellen Vasokonstriktion. Die Netzhaut wird hauptsächlich über die Regenbogenhaut mit Sauerstoff versorgt, eine Autoregulation wie beim Erwachsenen fehlt dem Fötus, deshalb kommt es bei einer Frühgeburt zu einer Überversorgung der Retina mit Sauerstoff. Das wiederum führt aufgrund des unreifen antioxidativen Abwehrsystems der Frühgeborenen zu oxidativer Schädigung, wie oben beschrieben (Hardy et al., 2000).

2.4.2. Bronchopulmonäre Dysplasie

Die bronchopulmonäre Dysplasie, auch chronische Lungenkrankheit (CLD) oder respiratory distress syndrome (RDS) genannt, war lange Zeit die häufigste Todesursache von Frühgeburten (Toti et al., 1996). Als pathogenetische Faktoren dieser progressiven Lungenkrankheit sind zu nennen: Frühgeburt, unreife Lunge mit einem Mangel an Surfactant und erhöhter Kapillarpermeabilität, künstliche Beatmung mit Sauerstoff eventuell verbunden mit Barotrauma und das nicht ausgereifte antioxidative Abwehrsystem des Frühgeborenen (Northway, 1990).

Die meisten Frühgeburten sind auf künstliche Beatmung angewiesen. Diese kann jedoch zu einer oxidativen Schädigung der Lungenstrukturen führen, einerseits durch den mechanisch erhöhten Druck in der Lunge, andererseits durch vermehrte Gewebeschädigung durch Sauerstoffradikale. Bei der ersten Phase der oxidativen Schädigung der Lunge kommt es zu einer vermehrten Produktion von freien Radikalen und ROS sowie zu Veränderungen im Zellmetabolismus. Die anschließende Entzündungsphase wird begleitet von Schädigungen der Endothelzellen, einem interstitiellen Ödem und der Akkumulation von Entzündungszellen im Lungengewebe (Crapo, 1986). Durch die Anwesenheit von neutrophilen Zellen in der Lunge kommt es zu einer massiven Verstärkung der Lungengewebschädigung aufgrund der Bildung von Sauerstoffradikalen und Entzündungsmediatoren durch die Neutrophilen. Eine proliferative Phase mit dem Auftreten von hauptsächlich Fibroblasten und Monozyten schließt sich an.

Wird die Lunge über eine längere Zeit hyperoxischen Bedingungen ausgesetzt, so kommt es zu einer fibrotischen Veränderung des Lungengewebes, was eine schwere Gasaustausch-Störung zur Folge haben kann.

Das histologische Bild zeigt eine verminderte Ausbildung der Alveolen und eine geringere Anzahl an kleinen Lungen-Blutgefäßen, von welchen die Wände verdickt sind und einen höheren Gehalt an Elastin aufweisen (Bland et al., 2003).

2.4.3. Nekrotisierende Enterocolitis

Die nekrotisierende Enterocolitis (NEC) der Frühgeborenen ist eine komplexe, multifaktoriell bedingte Krankheit, die zu schweren Schädigungen des Darmgewebes führt. Die NEC tritt hauptsächlich bei Frühgeburten auf, wobei die Inzidenz mit zunehmendem Gestationsalter und zunehmendem Geburtsgewicht abnimmt (De Curtis et al., 1987).

Obwohl die genaue Krankheitsursache unklar ist, gibt es zahlreiche prädisponierende Faktoren, wie zum Beispiel Frühgeburt, Flaschenfütterung und Infektionen (Hansbrough et al., 1983). Alle Zustände, die eine Minderdurchblutung des Darmgewebes mit sich bringen, erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung an NEC.

Am Anfang der Pathogenese steht eine milde postnatale Infektion oder perinatale Hypoxie. Beide führen zu Schädigungen in der Darmwand. Bakterien können durch die unausgereifte Darmschleimhautbarriere in das Darmepithel eindringen, und dort die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie PAF (Plättchen aktivierender Faktor) und TNF (Tumornekrose Faktor) bewirken. Dadurch wird eine Entzündungskaskade ausgelöst, in deren Folge ROS von aktivierten Leukozyten und endothelialer Xanthin-Oxidase gebildet werden und zu extremen Gewebeschädigungen führen (Hsueh et al., 2002).

Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Vorbehandlung mit Allopurinol, einem Inhibitor der Xanthin-Oxidase, die PAF-induzierte Darmnekrose größtenteils verhindern kann (Qu et al., 1999). Die Bedeutung von ROS bei der Ausbildung von nekrotisierender Enteritis wird daraus deutlich.

2.4.4. Intraventrikuläre Hämorrhagien

Das Gehirn von Neugeborenen ist besonders anfällig für oxidative Schädigungen, da deren neuronale Membranen reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA= poly unsaturated fatty acid) und arm an antioxidativ wirksamen Enzymen wie SOD und Glutathion-Peroxidase sind (Buoncore et al., 2001).

Intraventrikuläre Hämorrhagien sind wie die nekrotisierende Enterocolitis multifaktoriell bedingt. Risikofaktoren sind Frühgeburt, Asphyxie, künstliche Beatmung und Blutdruckschwankungen. Die Autoregulation des Blutdrucks, wie sie bei Erwachsenen vorkommt, ist bei Frühgeburten nicht genügend ausgebildet. Durch die entstehenden Ischämie-Reperfusionvorgänge nach Blutdruckschwankungen werden große Mengen an

Sauerstoffradikalen gebildet. Wegen des verminderten Gehalts an Antioxidantien kommt es zu oxidativen Schädigungen des Gehirngewebes und aufgrund der dünnen Kapillarwände auch zu Rupturen und Einblutungen ins Gehirngewebe (Kelly, 1993).

2.4.5. ROS-assoziierte Erkrankungen bei neugeborenen Kälbern

Bisher wurden kaum Untersuchungen über den Zusammenhang von der Bildung freier Radikalen/ROS und von Erkrankungen bei neugeborenen Kälbern gemacht. Doch aufgrund ihres verminderten antioxidativen Status ist mit einer Beteiligung von ROS/freien Radikalen bei Neugeborenenenerkrankungen zu rechnen.

Die häufigsten Kälberkrankheiten sind Durchfallerkrankungen, Bronchopneumonien und Nabelentzündungen. Durchfallerkrankungen sind in der Schweiz und in Florida mit einem Drittel aller Krankheiten am meisten vertreten, gefolgt von Bronchopneumonien mit circa 25% und Nabelentzündungen mit rund 10%. (Busato et al., 1997; Donovan et al., 1998).

Zwei Drittel aller Kälberverluste treten im perinatalen Zeitraum (bis 48 Stunden post partum) auf (Busato et al., 1997, Walser, 1975), gefolgt von Verlusten im postnatalen Zeitraum bis zum Alter von 30 Tagen.

Die neonatale Asphyxie, auch Atemschwäche des neugeborenen Kalbes genannt (Dirksen et al., 2002 a) ist die häufigste Erkrankung neugeborener Kälber. Dabei ist zu unterscheiden zwischen der Frühhypoxie, bei der die Atmung unmittelbar nach der Geburt verzögert ist, und der Späthypoxie, eine innerhalb der ersten Lebensstunde auftretende Beeinträchtigung der Atmung.

Die Frühasphyxie kommt durch Verzögerung und Komplikationen beim Geburtsverlaufs (Schwergewurten), Plazentainsuffizienz oder Azidose des Muttertiers zustande. Als Folge entwickelt das Kalb schon im Mutterleib durch den gestörten utero-plazentären Gasaustausch eine respiratorische Azidose durch die gehinderte Kohlendioxid-Abgabe. Eine metabolische Azidose resultiert aus den hypoxischen Bedingungen während der Geburt und der darauf folgenden anaeroben Glykolyse. Als Folge der gemischten Azidose können persistierende fetale Kreislaufverhältnisse (Ductus Botalli, Foramen ovale) und Hirnläsionen auftreten. Durch die Minderdurchblutung von Lunge und Darm während der Hypoxie kommt es zu

Schädigungen des jeweiligen Organgewebes. Eventuell auftretender Mekoniumabgang und Fruchtwasserrespiration noch im Mutterleib können zu weiteren Komplikationen bei der Ausbildung pneumonischer Veränderungen führen.

Die Spätasphyxie kommt bei zu früh geborenen und somit unreifen Kälbern vor. Die unreife Lunge des Kalbes mit einem Mangel an Surfactant ist nicht in der Lage, einen ausreichenden Gasaustausch zu gewährleisten, Hypoxie und Azidose resultieren.

Wie schon ausführlich besprochen, ist das antioxidative Abwehrsystem bei Neugeborenen noch nicht vollständig ausgereift. Hinzu kommt, dass neugeborene Kälber bei der Geburt in hypoxische Zustände geraten können, was verbunden mit einer unzureichenden Atemtätigkeit, wie es bei der Asphyxie der Fall ist, zur Aktivierung der Xanthin-Oxidase führt. Das wiederum hat eine massive Produktion von verschiedenen Sauerstoffradikalen und ROS zur Folge.

Die neonatale Diarrhoe der Kälber ist eine multifaktoriell bedingte Krankheit. Sowohl Haltung, Fütterung, Stallhygiene und die Anwesenheit von spezifischen Viren, Bakterien und Parasiten spielen eine Rolle bei der Krankheitsentstehung, als auch der Immunstatus des Kalbes.

Meistens handelt es sich um eine Mischinfektion mit mehreren Erregern. Nach der oralen Infektion kommt es zu einer lokalen Vermehrung der Erreger im Darm. Durch die Bildung von Toxinen werden Darmzellen und Darmzotten zerstört, was zur Maldigestion, Malabsorption und Hypersekretion führt. Infolgedessen erleidet das betroffene Kalb massive Flüssigkeits- und Elektrolytverluste und entwickelt eine Azidose, verbunden mit Dehydratation.

Im Punkt 2.4.3. wurde die Beteiligung von Sauerstoffradikalen bei der Pathogenese der nekrotisierenden Enteritis dargelegt. Dies lässt sich auch auf die Pathogenese der neonatalen Diarrhoe der Kälber übertragen. Freie Radikale und ROS werden an verschiedenen Stellen während des Krankheitsverlaufs gebildet, so zum Beispiel bei der Erregervermehrung im Darm durch die Rekrutierung von phagozytierenden Zellen. Die gleichzeitig entstehende Azidose führt zu einer vermehrten Eisenfreisetzung in den Erythrozyten.

Durch den verminderten antioxidativen Status der Kälber kann die anti-/prooxidative Balance nicht aufrecht erhalten werden und es kommt zu oxidativem Stress. Dieser trägt zur Intensivierung der Krankheitssymptome bei.

Nabelentzündungen entstehen durch Eindringen von Eitererregern in den ungenügend oblitrierten Nabel bei unzureichender Geburtshygiene. Sauerstoffradikale spielen eine Rolle bei der unspezifischen Abwehr der Erreger durch aktivierte phagozytierende Zellen.

Eine weitere Erkrankung bei neugeborenen Kälbern, die unmittelbar mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht wird, ist die Weißmuskelkrankheit („white muscle disease“).

Die Weißmuskelkrankheit ist eine bei allen Tierarten (v.a. Lämmer, Fohlen und Kälber) auftretende Muskeldystrophie als Folge von Vitamin E und/oder Selenmangel und/oder Überversorgung mit Futtermitteln, die mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthalten. Sie tritt hauptsächlich bei Kälbern im Alter von einem bis vier Monaten auf, es sind jedoch auch neugeborene Kälber betroffen (Abutarbush und Radostitis, 2003). Eine weitere Bezeichnung dieser Krankheit ist „enzootische Myodystrophie des präruminanten Kalbes“ (Dirksen, 2002 b). Enzootisch deshalb, weil sie meist bestandsweise in Gebieten mit Selen-armen Böden auftritt.

Selen ist ein Bestandteil des Enzyms Glutathion-Peroxidase, welches als potentes Antioxidans fungiert (siehe 2.2.1.). Auf die Bedeutung von Vitamin E als wichtigstes Antioxidans in der fettlöslichen Phase wurde bereits hingewiesen.

Durch den Vitamin E- und/oder Selen-Mangel können die in physiologischen Reaktionen gebildeten Sauerstoffradikale nicht in genügendem Maße abgefangen werden und oxidativer Stress ist die Folge. Die Muskelzellen werden nicht ausreichend vor Lipidperoxidation geschützt und eine rasche Myodegeneration tritt auf. Auch der Herzmuskel kann betroffen sein, weshalb plötzliche, kardiomyopathisch bedingte Todesfälle nicht selten sind.

Die Therapie dieser Krankheit ist meist aufgrund der schlechten Prognose nicht möglich oder wird wegen Unwirtschaftlichkeit nicht durchgeführt.

2.5. Prophylaxe und Therapie von ROS-assoziierten Krankheiten

Der antioxidative Status kann durch dem Körper zugeführte Substanzen mit antioxidativer Wirkung positiv beeinflusst werden. Exogene Wirkstoffe können auch direkt die Schäden reduzieren, welche durch die Bildung von freien Radikalen/ROS entstanden sind.

Die wichtigsten Ansatzpunkte therapeutischer Stoffapplikationen sind eine Verhinderung der Bildung von ROS, ein enzymatisches und nichtenzymatisches Abfangen und Inaktivieren bereits gebildeter Sauerstoffradikale und eine Verminderung der zellschädigenden Wirkung der ROS.

Die Bildung von ROS bei Ischämie/Reperfusionsvorgängen kann durch die Hemmung des potenten Radikalbildners Xanthin-Oxidase durch Allopurinol reduziert werden. Allopurinol dient dem Enzym erst als Substrat und wird zum Oxypurinol oxidiert. Dieses bindet fest an das aktive Zentrum des Enzyms und wirkt sodann als Inhibitor. Die Wirksamkeit von Allopurinol wurde bei Studien zu oxidativen Schädigungen des Herz-, Lungen-, Darm- und Gehirngewebes dargelegt (Jenkinson et al., 1991; Van Bel et al., 1998; Qu et al., 1999; Shadid et al., 1999 a).

Eine therapeutische Wirkung von Superoxid-Dismutase (SOD) bei Frühgeburten wurde von Rosenfeld et al. (1984) beschrieben. In dieser Studie reduzierte subkutan verabreichte SOD sowohl radiologisch darstellbare als auch klinisch manifeste Fälle von bronchopulmonärer Dysplasie. Das Enzym ist wahrscheinlich an der Zelloberfläche der Alveolen und des Endothels wirksam, ohne in die Zellen aufgenommen zu werden. In anderen Studien wurde die Superoxid-Dismutase mittels Liposomen (Turrens et al., 1984) bzw. an Polyethylenglycol konjugiert (Niesman et al., 1997) verabreicht, um die Aufnahme in die Zellen zu gewährleisten und um die Verweilzeit zu erhöhen. Dabei konnte ein verbesserter Schutz der Lunge gegenüber hohen Sauerstoffkonzentrationen (Turrens et al., 1984) und ein positiver Effekt bei der Retinopathie der Frühgeburten (durch erhöhte Gefäßdichte und Verkleinerung der avaskulären Zone; Niesman et al., 1997) beobachtet werden.

Eisenchelatoren wie Ferrozin, Desferrioxamin, Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Quercetin binden freies Eisen und verhindern die Bildung von ROS. Die Gabe von Desferrioxamin an neugeborene Lämmer nach einer induzierten Hypoxie verringerte radikalinduzierte

Schädigungen des Herzmuskels und gewährleistete somit eine physiologische Herzmuskeltätigkeit (Shadid et al., 1999 b).

Auch Transferrin bindet freies Eisen und kann therapeutisch eingesetzt werden. Ein Studie an frühgeborenen Hasen zeigte, dass die Supplementierung mit eisenfreiem Transferrin Eisenkatalysierte Redox-Reaktionen vermindert und somit möglicherweise die oxidativen Schädigungen des Lungengewebes verringert (Shah und Hallman, 1997).

Glukokortikoide hemmen die Granulozytenaggregation und vermindern oxidative Schäden durch eingewanderte neutrophile Zellen. Zudem stimulieren sie die Reifung des Surfactant-Faktors und des antioxidativen Enzymsystems in der fötalen Lunge (Frank und Groseclose, 1984), und könnten demnach prophylaktisch bei einer erwarteten Frühgeburt eingesetzt werden.

Neuere Studien zeigen eine potente antioxidative Wirkung von Melatonin, die therapeutisch genutzt werden kann (Reiter und Xan, 2003). Melatonin fungiert als Fänger von vielen verschiedenen Stickstoff- und Sauerstoff-Radikalen (Tan et al., 2002). Lee et al. (2002) untersuchten die Melatonin-Schutzwirkung auf die Herzmuskulatur nach Koronararterienverschluss. Dabei konnten sie zeigen, dass die Sauerstoffradikalproduktion und die Myeloperoxidase-Aktivität signifikant reduziert waren.

Vitaminen wird ein präventiver und auch therapeutischer Effekt bei entzündlichen Prozessen und Infektionskrankheiten zugesprochen. Die präventiven Mechanismen verlaufen dabei teilweise über eine stimulierende Wirkung des Immunsystems. Brzezinska-Slebozinska et al. (1994) und Miller et al. (1993 a) zeigten, dass eine Supplementierung mit Vitamin E und Selen bei hochträchtigen Kühen die Inzidenz von Mastitis und Nachgeburtsverhalten post partum deutlich verringerte. Die Fruchtbarkeit der Rinder konnte verbessert werden durch den Schutz der Enzyme vor oxidativer Schädigung, die an der Steroidgenese beteiligt sind. Auch das Hirninfarktvolume bei Ratten konnte durch eine Zufütterung von Vitamin E verringert werden (Eichinger, 1998; Stohrer et al., 1998).

Die Weißmuskelkrankheit kann im Anfangsstadium erfolgreich durch parenterale Gaben von Vitamin E und Selen therapiert werden (Abutarbush und Radostitis, 2003). Zur Prophylaxe

empfiehlt sich die Zugabe von Vitamin E und Selen zum Futter der Mutterkuh, was besonders in Gegenden mit Selen-armen Böden angezeigt ist (Zust et al., 1996).

Bei einer Studie wurden Müttern vor der Geburt Multivitaminpräparate verabreicht, um die Wirkung auf den antioxidativen Status bei ihnen und ihren neugeborenen Kindern zu untersuchen. Dabei konnte in der Tat eine Reduzierung des oxidativen Stresses sowohl bei den Müttern wie auch bei den Kindern beobachtet werden (Bolisetty et al., 2002).

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere

Von 32 Kühen und 33 dazugehörigen Kälbern (eine Zwillingsgeburt) wurden Blutproben im geburtsnahen Zeitraum genommen.

Es handelte sich dabei um zwölf Fleckviehkühe, 14 Kreuzungen zwischen Fleckvieh und Deutsch-Holstein, ein Braunvieh, eine Jersey, ein Gelbvieh und drei Deutsch-Holstein Kühe. Arbeiten von Stohrer et al. (1998) zeigten, dass es bei den Rindern keine Rasseunterschiede bezüglich des antioxidativen Status gibt, deshalb wurden alle Tiere ungeachtet der verschiedenen Rassen zusammengefasst

Bei den Kälbern waren 18 Tiere weiblich und 15 Tiere männlich.

Die Tiere stammen allesamt vom Lehr- und Versuchsgut (LVG) der Universität München in Oberschleißheim. Das LVG wurde wegen seiner großen Anzahl an Tieren und der standardisierten Bedingungen ausgewählt. Alle Tiere hatten dieselbe Herkunft und wurden gleich gehalten und gefüttert.

3.1.1. Kühe

Haltung

Die Muttertiere wurden in einem Laufstall mit Liegeboxen gehalten. Die Liegeboxen waren mit Hartgummimatten ausgelegt, die Lauffläche des Stalls bestand in einem Teil aus Betonspalten, in dem anderen Teil war er mit Hartgummi-Spaltenboden ausgelegt. Die unterschiedliche Bodenbeschaffenheit war Teil eines Forschungsprojekts, das zu dieser Zeit ebenfalls am LVG durchgeführt wurde.

Die Kühe wurden mittels eines Melkroboters gemolken.

Ungefähr zehn Tage vor dem errechneten Geburtstermin wurden die Kühe in den Abkalbestall umgestallt, bei früher einsetzenden Anzeichen der Geburt auch schon früher.

Im Abkalbestall befanden sich die Kühe in Anbindehaltung, die Liegefläche war mit Stroh eingestreut. Gemolken wurden die Kühe dort mit Melkmaschinen.

Die Muttertiere wurden ca. eine Woche nach der Geburt wieder in den Laufstall umgestallt.

Fütterung

Im Laufstall und auch im Anbindestall wurden die Kühe mit Heu, Mais-Silage ad libitum und Kraftfutter als TMR (totale Mischration) gefüttert. Das Kraftfutter bekamen die Kühe im Laufstall im Melkroboterstand. Die TMR ist berechnet für eine Milchleistung von 25 l, bei einer höheren Milchleistung bekamen die Kühe zusätzliches Kraftfutter im Melkroboterstand zugeteilt.

3.1.2. Kälber

Haltung

Die Kälber wurden nach der Geburt von der Mutter getrennt und in Kälberboxen im Abkalbestall verbracht.

Je nach Witterung wurden sie noch am Tag der Geburt oder am nächsten Tag in Kälber-Iglus im Freien umgestallt. Die Kälberiglus waren mit Stroh eingestreut. In den Kälber-Iglus verblieben sie bis zum Alter von ca. zwei Wochen, danach wurden sie in den Kälberlaufstall umgestallt. Der Kälberlaufstall bestand aus einem Stallteil mit Stroh-Einstreu und aus einem Freigehege, das die Kälber jederzeit aufsuchen konnten. Die Kälber wurden in drei Altersgruppen aufgeteilt. Sie blieben bis zum Alter von neunzig Tagen im Kälberstall und wurden dann je nach Geschlecht in andere Ställe verteilt

Fütterung

Die neugeborenen Kälber bekamen nach Möglichkeit fünf Tage lang Kolostrum und die Milch der Mutter, verteilt auf zwei Mahlzeiten mit je drei Litern. War das nicht möglich, stand eingefrorenes Kolostrum zur Verfügung. Die weiteren Tage bekamen diese Kälber Milch von einer anderen Mutterkuh.

Bis zum Alter von zwei Wochen erhielten die Kälber 6 Liter Vollmilch pro Tag, aufgeteilt auf zwei Mahlzeiten morgens und abends. Im Iglu wurde ihnen auch Heu und Stroh angeboten. Nach dem Umstallen in den Kälberstall bekamen sie Heu, Mais-Silage, Stroh und Kraftfutter ad libitum und einen Milchaustauscher („Bullilac 50“, Fa. Inntaler Mischfutter GmbH) gefüttert (s. Tab. 1).

Tab. 1: Zusammensetzung und Inhaltsstoffe des Milchaustauschers „Bullilac 50“

Zusammensetzung			
Magermilchpulver, Molkenpulver, Pflanzenöl raff. (Palmöl, Kokosöl 4:1), Weizenquellmehl			
Vitamine und Zusatzstoffe je kg Mischfutter			
Vit A	40.000 IE	Pantothensäure	13 mg
Vit D	4.000 IE	Biotin	200 µg
Vit E	40 mg	Betain	200 µg
Vit C	100 mg	Eisen	80 mg
Vit K	2 mg	Mangan	40 mg
Vit B1	6 mg	Zink	40 mg
Vit B2	5 mg	Kupfer	5 mg
Vit B6	3 mg	Jod	1 mg
Vit B12	20 µg	Kobalt	1 mg
Nicotinsäure	25 mg	Selen	0,3 mg

Die Tränkephase mit Milchaustauscher dauerte drei Monate. Bis zum 50. Lebenstag wurde die Milchaustauscher-Menge für jedes Kalb bis zu neun Liter pro Tag gesteigert, ab dann bis zum 90. Lebenstag wieder auf 0,5 Liter pro Tag reduziert.

Die Kälber konnten pro Tränke-Mahlzeit maximal zwei Liter aufnehmen. Die Tränkefraktionen wie auch die Gesamtmenge an Milchaustauscher waren computergesteuert. Die Kälber trugen ein Sensor-Halsband, über welches sie mit dem Computer vernetzt waren.

Routine-Maßnahmen

Alle Kälber wurden mit ca. vier Wochen enthornt und dazu mit 1 ml Xylazin sediert. Desweiteren wurden sie im Alter von ca. 2,5 und 3 Monaten gegen Trichophytie geimpft (Impfstoff „Trichovac“ von IDT).

3.2. Versuchsanordnung

3.2.1. Probennahme

Die Blutproben wurden von Dezember 2002 bis Mai 2003 zu bestimmten Zeitpunkten von Mutter und Kalb genommen.

Bei den Muttertieren wurde zu sechs Zeitpunkten Blut aus der Schwanzvene (*V. coccygica*, s. *V. caudalis mediana*) genommen, und zwar sowohl drei Wochen und zehn Tage vor dem errechneten Geburtstermin, als auch am Tag der Geburt, sowie fünf, zehn und dreißig Tage später. Der errechnete Geburtstermin stimmte verständlicherweise nicht immer mit dem tatsächlichen überein, daraus erklärt sich der Gesamtzeitraum von ca. 30 Tagen präpartum bei der Probenauswertung. Die Werte der präpartalen Proben wurden dann in fünf-Tages-Gruppen zusammengefasst, deshalb die Standardabweichung auf der x-Achse bei den Werten vor der Geburt (siehe Ergebnisteil).

Bei den Kälbern wurde zu elf Zeitpunkten Blut aus der gestauten Drosselvene (*V. jugularis externa*) genommen, nämlich am Tag der Geburt, und an den Tagen 1, 2, 5, 8, 11, 14, 21, 28, 49 und 79 nach der Geburt.

Bei den Kälbern war vor allem der perinatale Zeitraum von Bedeutung, deshalb war die Blutentnahme-Frequenz bis zum 14. Lebenstag höher. Ab dann genügte eine wöchentliche Blutentnahme bis zum ersten Lebensmonat.

Bei jeder Blutentnahme wurden drei Monovetten Blut entnommen, eine Serum-Monovette (6 ml), eine Lithium-Heparin-Monovette (2 ml) und eine Flour-EDTA-Monovette (2 ml).

Diese wurden im Anschluss an die Entnahme zentrifugiert und die Überstände auf insgesamt sechs beschriftete Caps mit je 2 ml aufgeteilt.

3.2.2. Lagerung

Die Caps wurden in flüssigem Stickstoff noch im LVG eingefroren. In regelmäßigen Abständen wurden die Caps auf Trockeneis oder in flüssigem Stickstoff ins Labor des

Instituts für Physiologie in der Veterinärstrasse gebracht, wo sie in Kühltruhen weiter bis zur Analyse gelagert wurden.

Die Serum- und F/EDTA-Proben wurden bei -27 °C eingefroren, die Li-Heparin-Proben bei -80 °C gelagert.

Alle Proben wurden erst kurz vor der Analyse bei Raumtemperatur aufgetaut, und danach nochmals zentrifugiert.

Zur Bestimmung von TEAC, Vitamin E und Vitamin C wurde Li-Heparin-Plasma verwendet. Für die Untersuchung der latenten Eisenbindungskapazität, und von Albumin, Gesamteiweiß, Kreatinin, Gesmateisen, Glucose, Gesamtbilirubin, und von den Aktivitäten der Enzyme CK, ALT, AST und GLDH wurde Serum genommen.

3.3. Analytische Methoden

3.3.1. Bestimmung der Trolox äquivalenten antioxidativen Kapazität (TEAC) im Plasma

Der antioxidative Status wurde in Form der TEAC (Trolox equivalent antioxidative capacity) nach der von Miller et al. (1993 b) beschriebenen Methode bestimmt. Die TEAC ist definiert als die Konzentration von Trolox in mmol/l, die eine vergleichbare antioxidative Kapazität wie eine 1 mmolare Lösung der zu untersuchenden Substanz (hier Serum) hat.

Testprinzip

Grundlage dieser spektralphotometrischen Messung ist die Reaktion von Metmyoglobin und Wasserstoffperoxid zu dem daraus entstehenden Eisenmyoglobin-Radikal.

Dieses Radikal reagiert mit dem chromogenen Substrat ABTS [2,2'-Azino-bis(3-ethylthiazoline-6-sulphonic acid)diammonium salt] zu dem blau-grünen chromogenen ABTS-Radikal-Kation (ABTS^{•+}), welches bei 645 nm, 734 nm und 815 nm Wellenlänge die stärksten Absorptionsmaxima aufweist. Je mehr ABTS^{•+} in der Lösung enthalten sind, desto intensiver ist ihre Färbung.

In Anwesenheit von Antioxidantien aus den Proben wird diese Radikalbildung gehemmt, wobei der fortschreitende Verbrauch an Antioxidantien zu einer zunehmenden Farbentwicklung führt. Diese Reaktion ist also zeitabhängig.

Methode

Vor der Messung wurde der Nullwert am Photometer mit PBS-Puffer eingestellt, die ABTS-Stammlösung wurde mit PBS-Puffer bis zu einer Absorption von 0,700 ($\pm 0,002$) verdünnt. Mit den Trolox-Standards wurde eine Kalibrierungskurve erstellt. Dazu wurden je 10 μ l Trolox mit je 990 μ l ABTS-PBS-Gemisch versetzt und nach exakt einer Minute die Extinktion abgelesen

Diese Schritte wurden täglich durchgeführt, da die Methode temperaturabhängig ist. Es wurde bei Raumtemperatur gemessen.

Von den Serumproben wurden im Doppelansatz jeweils 10µl Serum in jede Küvette pipettiert, mit 990µl ABTS-PBS-Gemisch versetzt und nach genau 60 Sekunden die Extinktion abgelesen.

Berechnung

Zur Berechnung der Kalibrierkurve bildet man den Extinktionsmittelwert und errechnet die sogenannte TAA (Total antioxidant activity):

$$\text{TAA} = (\text{Ext}_{\text{Nullwert}} - \text{Ext}_{\text{Standard}}) / \text{Ext}_{\text{Nullwert}}$$

Auf der x-Achse wird die Trolox-Konzentration aufgetragen, auf der y-Achse die TAA. Man berechnet die Formel der Kurve (z.B. $y = 0,2x - 0,01$) und löst nach x auf. Dann kann man darauf basierend die TEAC der Probe ausrechnen:

$$x (\text{TEAC Probe in mmol/l}) = (y (\text{TAA Probe}) + 0,01) / 0,2$$

3.3.2. Bestimmung der latenten Eisenbindungskapazität (LEBK) im Serum

Die latente Eisenbindungskapazität macht Aussagen über die Sättigung von Transferrin mit freiem Eisen. Ist die LEBK hoch, so sind viele Eisen-Bindungsstellen der Transferrin-Moleküle unbesetzt.

Die Bestimmung der LEBK wurde mithilfe eines Testkits von Sigma Diagnostics® (Sigma Diagnostics®, Eisen und totale Eisenbindungskapazität, Methode Nr. 565) durchgeführt. Die Methode basiert auf der von Persijn et al. (1971) beschriebenen Bestimmung von Serumeisen mit Ferrozin. Die Testdurchführung wurde für die vorliegende Untersuchung modifiziert, um eventuell noch freies Eisen nachzuweisen.

Testprinzip

Ferrozin ist ein sulfuriertes Derivat von Diphenyltriazin und bildet mit freiem Eisen einen wasserlöslichen magentaroten Komplex, der bei 560 nm sein Absorptionsmaximum hat. Durch Zugabe von Ferrozin zum Serum lässt sich so freies Eisen photometrisch bestimmen.

Methode

Zur Bestimmung der LEBK werden der **Serumprobe** (100 µl) bei alkalischem pH-Wert (erreicht durch speziellen Puffer) eine bekannte Menge **freier Eisenionen** (in einer Hydroxylamin-Hydrochloridlösung, definiert als Eisenstandard) und ein **Eisenfarbreagenz** (enthält Ferrozin) nacheinander zupipettiert.

Die zugegebenen freien Eisenionen lagern sich spezifisch an freie Eisen-Bindungsstellen des Transferrins an. Die Differenz zwischen ungebundenem Eisen (nachgewiesen mit Ferrozin) und der zum Serum zugegebenen Menge an Eisenionen entspricht dem transferringebundenen Eisen und wird als latente Eisenbindungskapazität bezeichnet.

Als photometrischer Vergleich dient der Leerwert, welcher nur Pufferlösung und Aqua dest. enthält, und der Standard mit Pufferlösung und Eisenionen. Damit lässt sich auch die Konzentration eventuell vorhandener freier Eisenionen in der Serumprobe berechnen.

3.3.3. Bestimmung von Vitamin E im Plasma

Testprinzip

Die Vitamin E Konzentration im Plasma (hier: Lithium-Heparin-Plasma) wurde nach der Methode von Vuilleumier et al. (1983) mittels HPLC (high pressure liquid chromatography) mit Fluoreszenzdetektor durchgeführt. Dazu wurde das im Plasma enthaltene fettlösliche Vitamin E nach der Präzipitation der Plasmaproteine durch Ethanol mit Hexan extrahiert und danach unter Stickstoff zur Trockene eingengt. Das trockene Vitamin E wurde in ein Methanol-Ethanol-Gemisch für die HPLC-Analytik aufgenommen.

Methode

Die Extraktion des Vitamin E aus dem Plasma erfolgte wie oben beschrieben.

Für die Herstellung einer Vitamin E Standardlösung wurde ein Öltröpfchen reines α -Tocopherol (Fa. Sigma®, Deisenhofen) in 100 ml Ethanol gelöst und die Extinktion bei 295 nm photometrisch gemessen. Die Berechnung der Standardkonzentration erfolgte unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten $\epsilon=75,8$ und des Molekulargewichts (3430,69 mg/mmol).

Danach wurde der Standard auf die in den Kuh- und Kälber-Plasmaproben zu erwartende Konzentration verdünnt.

HPLC-Bedingungen:

- **Elutionsmittel:** Methanol mit 3% Millipore-Wasser
- **Pumpe:** Gynotec High precision Pump Model 300 C (Gynotec GmbH., Germering b. München), Flußrate: 1,3 ml/min
- **Probengeber:** Kontron HPLC Autosampler 460 (Fa. Kontron Instruments), Injektionsvolumen 20 μ l, Analysezeit: 10 min
- **Säule:** Lichrosorb RP 18, 5 μ m, 125x4mm (Fa. Grom)
- **Detektor:** Uvikon 735 LC (Fa. Kontron Instruments), Wellenlänge: 520 nm

Berechnung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des „Borwin™“- Computerprogramms (Fa. JMBS Developpements, Le Fontaneil, Frankreich), einer speziellen Chromatographie-Software. Die Peaks wurden integriert und deren Flächeninhalte berechnet. Danach wurden die Flächen der Plasmaproben mit denen der bekannten Standards verglichen und die Vitamin E-Konzentration der Proben ausgerechnet.

3.3.4. Bestimmung von Vitamin C im Plasma

Testprinzip

Es wurde die von Schüep et al. (1984) beschriebene Methode zur Bestimmung von Ascorbinsäure in Körperflüssigkeiten, Geweben und Nahrungsmitteln modifiziert angewandt. Ascorbinsäure wird mit Jodlösung versetzt, dabei entsteht Dehydro-Ascorbinsäure. Diese bildet in einer Kondensationsreaktion mit 2,4,-Dinitrophenylhydrazin das 2,4,-Phenylhydrazon. Dieses Derivat extrahiert man mit Ethylacetat-Diisopropylether. Die quantitative Bestimmung der Vitamin C Konzentration wurde wie auch beim Vitamin E mittels HPLC durchgeführt.

Methode

Zur Herstellung der Vitamin C- Standards wurden 100 mg Vitamin C in 1ml Metaphosphorsäure gelöst. Diese Stammlösung wurde mit Metaphosphorsäure auf die zu erwartenden Konzentrationen des Kuh- bzw. Kalb-Plasmas verdünnt. Der Standard wurde jeden Tag frisch hergestellt.

Zur Analyse der Proben wurden 100 µl Plasma mit 100µl Metaphosphorsäure, 30 µl Thioharnstoff, 30 µl Jodlösung und 50 µl Dinitrophenylhydrazin versetzt. Zwischen den einzelnen Zugaben wurden die Proben sorgfältig geschüttelt. Danach wurden sie 5 Minuten bei 13000 Umdrehungen zentrifugiert und für 3 Stunden bei 50°C im Trockenschrank inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 250 µl Ethylacetat mit Eisessig (im Verhältnis 98:2) hinzupipettiert und 2 Minuten vorgetext. Der gelbe organische Überstand wurde in HPLC-Vials pipettiert und sofort verschlossen.

Da die Probe nach dem Ethylacetatausschütteln nur ca. eine Stunde haltbar ist, wurden nur jeweils fünf Proben vorbereitet.

HPLC-Bedingungen:

- **Elutionsmittel:** Di-iso-propylether:Ethylacetat (im Verhältnis 40:60) + 2% Eisessig
- **Pumpe:** Gynotec High precision Pump Model 300 C (Fa. Gynotec GmbH., Germering b. München), Flußrate: 1,2 ml/min
- **Probengeber:** Kontron HPLC Autosampler 460 (Fa. Kontron Instruments), Injektionsvolumen 20 µl, Analysezeit: 13 min
- **Säule:** Lichrosorb Si 60, 5µ, 250x4,6 mm (Fa. Grom) + Vorsäule dazu
- **Detektor:** Uvikon 735 LC (Fa. Kontron Instruments), Wellenlänge: 520 nm

Berechnung

Die Proben wurden mit Hilfe der Chromatographie-Software Borwin™ (Fa. JMBS Developpements, Le Fontaneil, Frankreich) ausgewertet. Die Peaks wurden integriert und deren Flächeninhalte berechnet, Danach wurden die Flächen der Plasmaproben mit denen der bekannten Standards verglichen und die Vitamin C-Konzentration der Proben ausgerechnet.

3.3.5. Weitere Blutparameter im Serum: Alb, Eiw, Krea, Eisen, Glc, T-Bil, CK, ALT, AST und GLDH

Die Serumproben wurden im Labor der I. Medizinischen Tierklinik mittels eines Hitachi® 911 Automatic Analyzer auf folgende Parameter untersucht:

- **Albumin** (Testkit SYS1, BM/Hitachi 704/911, 1489143)
- **Gesamteiweiß** (Testkit SYS1, BM/Hitachi, 1553836)
- **Kreatinin** (Testkit SYS1, BM/Hitachi 911, 1775642)
- **Gesamteisen** (Testkit SYS1, BM/Hitachi 705/911, 5893421)
- **Glucose** (Testkit SYS1, BM/Hitachi 704/705/911, 8735241)
- **Gesamtbilirubin** (Testkit SYS1, BM/Hitachi 704/911, 1489149)
- **CK** (Testkit SYS1, BM/Hitachi 704/705/911, 763870)
- **ALT** (Testkit SYS1, BM/Hitachi 706/911, 13722463)
- **AST** (Testkit SYS1, BM/Hitachi 704/911, 816337)
- **GLDH** (Testkit SYS1, BM/Hitachi 911, 758441)

Die Parameter wurden in SI-Einheiten umgerechnet und tabellarisch bzw. grafisch erfasst.

3.4. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms GraphPad InStat™ (GraphPad Software, Version 1994).

Es wurden eine Varianzanalyse und der Normalitätstest gemacht, um zu sehen, ob die Werte der Normalverteilung folgen. Danach wurde zur Erfassung signifikanter Unterschiede der U-Test von Mann und Whitney (bei zwei Gruppen), und der H-Test nach Kruskal und Wallis (3 bis 36 Gruppen) durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde dabei als signifikant (*), von $p < 0,01$ als hoch signifikant (**) und von $p < 0,001$ als sehr hoch signifikant (***) angesehen.

In den Tabellen und Abbildungen wurden die Parameter als Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1. Peripartaler Konzentrationsverlauf spezifischer Messparameter im Blut der Muttertiere

4.2.1. Antioxidantien

Um den antioxidativen Status der Kühe zu erfassen, wurden die TEAC (Trolox equivalent antioxidative capacity) und auch der Vitamin C- und Vitamin E- Gehalt im Plasma bestimmt.

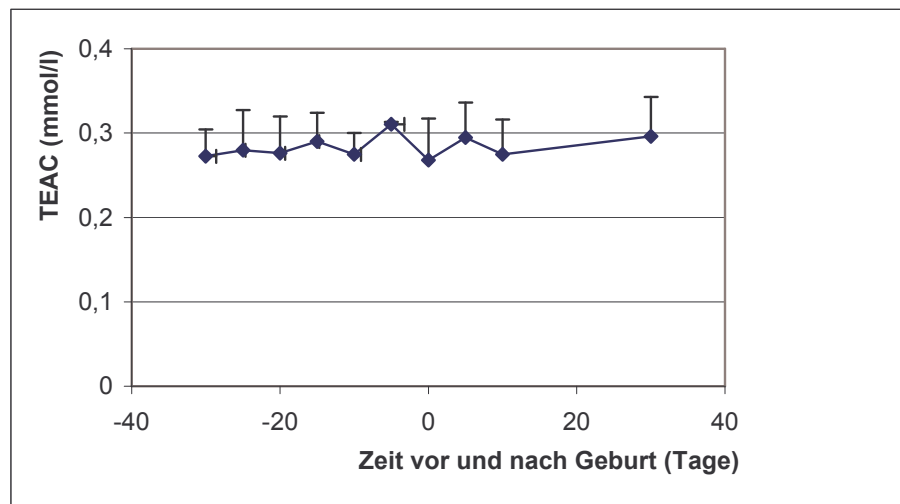


Abb. 2: TEAC-Werte im Plasma der Kühe vor und nach der Geburt (n=13)

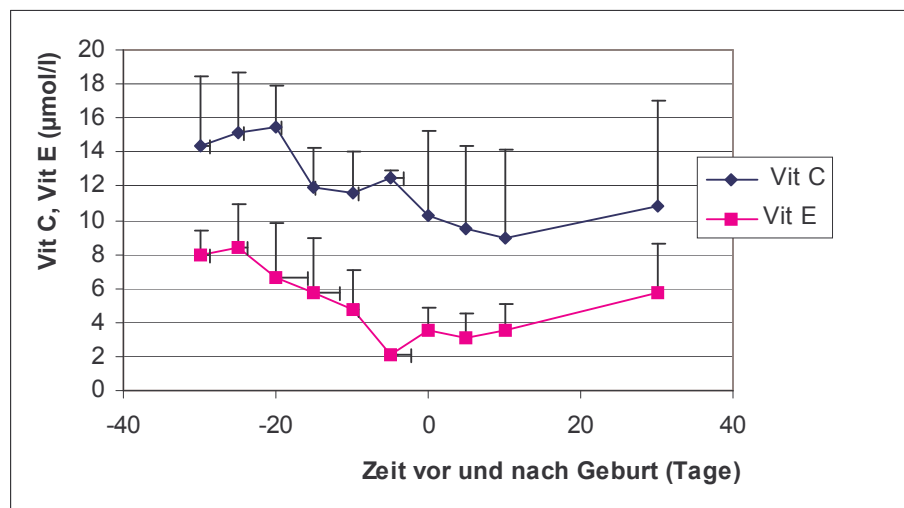


Abb. 3: Vitamin C- und Vitamin E – Konzentrationen im Plasma der Kühe vor und nach der Geburt (n=13)

Der TEAC-Wert wies keine signifikanten Veränderungen vor und nach der Geburt auf (siehe Abb. 2).

Dazu wurden die Werte vor und nach der Geburt mit denen am Tag der Geburt verglichen. Der über den gesamten Beobachtungszeitraum gemittelte TEAC-Werte lag bei $0,28 \pm 0,04$ mmol/l.

Anders verhielt es sich mit dem Gehalt der Vitamine C und E im Plasma (siehe Abb. 3). Beide zeigten einen deutlichen Abfall bereits präpartum.

Betrug die Konzentration am Tag 20 vor der Geburt noch $15,4 \pm 2,5$ $\mu\text{mol/l}$ (Vit C) bzw. $6,7 \pm 3,1$ $\mu\text{mol/l}$ (Vit E), so fiel sie bis zum Tag der Geburt auf Werte von $10,3 \pm 4,9$ $\mu\text{mol/l}$ (Vit C) bzw. $3,5 \pm 1,3$ $\mu\text{mol/l}$ (Vit E) ab. Dies entspricht einem prozentualen Abfall von 43% (Vit C) bzw. 48% (Vit E) und war jeweils signifikant.

Nach der Geburt sanken die Vitamin C-Werte bis zum Tag 10 auf $9 \pm 5,2$ $\mu\text{mol/l}$, dies war eine weitere relative Abnahme von 13% im Vergleich zum Tag der Geburt.

Die Vitamin E-Werte sanken bis zum Tag 5 bis auf $3,1 \pm 1,5$ $\mu\text{mol/l}$ ab, was einer relativen Abnahme (zum Tag 0) von 12% entsprach.

Im weiteren postpartalen Verlauf stiegen die Vitamin C- und Vitamin E-Gehalte im Plasma wieder auf $10,8$ $\mu\text{mol/l}$ (Vit C) bzw. auf $5,7$ $\mu\text{mol/l}$ (Vit E) an.

Beim Abfall der Antioxidantien im Blut der Muttertiere scheint es sich also um einen spezifischen Effekt bei den Vitaminen C und E zu handeln, da der TEAC-Wert unverändert blieb. Eine nähere Erläuterung folgt in der Diskussion.

4.2.2. Metabolite und Enzymaktivitäten

Um den allgemeinen gesundheitlichen Status der Tiere zu beurteilen, wurden weitere Blutparameter bestimmt. Die Standardabweichung bei den Tagen vor der Geburt ergibt sich aus der Zusammenfassung der Blutproben in fünf-Tages-Gruppen (siehe 3.2.1.)

Tab. 2: Gesamteiweiß-, Albumin- und Glucose-Konzentrationen im Serum der Kühe vor und nach der Geburt (n=30)

Zeit vor und nach Geburt (Tage)	Eiw (g/l)	ALB (g/l)	Gluc (mmol/l)
-30 ± 2	76 ± 2	33 ± 5	4,1 ± 0,9
-25 ± 2	71 ± 8	34 ± 2	4,3 ± 0,5
-20 ± 2	72 ± 8	34 ± 2	4,5 ± 0,5
-15 ± 2	68 ± 6	33 ± 1	4,2 ± 0,3
-10 ± 2	69 ± 6	34 ± 1	4,3 ± 0,2
-5 ± 2	72 ± 8	36 ± 2	4,2 ± 0,4
0	71 ± 6	34 ± 2	6,1 ± 1,8*
5	73 ± 5	32 ± 2	3,7 ± 0,6
10	73 ± 6	31 ± 3	3,8 ± 0,4
30	78 ± 4	33 ± 3	3,7 ± 0,5

Der **Gesamteiweißgehalt** der Muttertiere im Blut sank bis zur Geburt undeutlich von 76±2 g/l am Tag 30±2 vor der Geburt auf 71±6 g/l am Tag der Geburt ab. Dies entspricht einer Abnahme von 9%,. Bis zum Tag 30 nach dem Abkalben erhöhte er sich wieder etwas auf 78±4 g/l, was einer relativen Zunahme von 11% entspricht (Tab. 2). Sowohl Zu- als auch Abnahme waren nicht signifikant.

Der durchschnittliche **Albumin**-Gehalt im Serum der Kühe betrug 33,5±2,4 g/l, es waren keine deutlichen Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Blutentnahme-Zeitpunkten festzustellen (Tab. 2).

Die **Glucose**-Konzentration im Blut der Mütter zeigte ante partum bis kurz vor der Geburt keine wesentlichen Veränderungen. Sie betrug im Mittel $4,3 \pm 0,5$ mmol/l. Erst zum Geburtszeitpunkt stieg sie signifikant um 70% auf $6,1 \pm 1,8$ mmol/l an. Im weiteren Verlauf sank die Konzentration bis zum Tag 30 nach der Geburt wieder auf $3,7 \pm 0,5$ mmol/l ab (Tab. 2). Dieser zahlenmäßig Unterschied war nicht signifikant.

Tab. 3: Bilirubin -, Kreatinin- und Eisen -Konzentrationen und die LEBK im Serum der Kühe vor und nach der Geburt (n=30)

Zeit vor und nach Geburt (Tage)	T-Bil ($\mu\text{mol/l}$)	Krea ($\mu\text{mol/l}$)	Eisen ($\mu\text{mol/l}$)	LEBK ($\mu\text{mol/l}$)
-30 \pm 2	2,5 \pm 1,9	120 \pm 19	29,3 \pm 3,7	19 \pm 9
-25 \pm 2	2,6 \pm 1,4	118 \pm 17	32,7 \pm 8,8	19 \pm 5
-20 \pm 2	2,5 \pm 1,7	120 \pm 24	32,0 \pm 5,7	20 \pm 7
-15 \pm 2	1,6 \pm 0,9	113 \pm 16	30,4 \pm 9,3	17 \pm 6
-10 \pm 2	2,1 \pm 0,8	132 \pm 29	35,6 \pm 5,8	21 \pm 7
-5 \pm 2	2,1 \pm 0,3	119 \pm 13	29,0 \pm 4,9	15 \pm 8
0	5,1 \pm 3,0	131 \pm 28	18,9 \pm 8,4	19 \pm 6
5	4,6 \pm 3,2	107 \pm 15	23,1 \pm 7,3	20 \pm 8
10	4,2 \pm 3,6	99 \pm 15	22,9 \pm 6,2	20 \pm 6
30	3,0 \pm 2,5	91 \pm 17	24,1 \pm 6,9	20 \pm 6

Die **Gesamtbilirubin-** (T-Bil) Konzentration im Serum der Kühe nahm ante partum tendenziell von $2,5 \pm 1,9$ auf $2,1 \pm 0,3$ $\mu\text{mol/l}$ (= -16%), aber nicht signifikant ab. Am Tag der Geburt stieg die Konzentration auf $5,1 \pm 3$ $\mu\text{mol/l}$ an, was nahezu das doppelte des Ausgangsniveaus ausmachte. Bis zum Tag 30 nach der Geburt sank die Bilirubin-Konzentration wieder bis auf $3 \pm 2,5$ $\mu\text{mol/l}$ ab (Tab. 3).

Der **Kreatinin**-Gehalt im Blutserum der Kühe lag ante partum im Durchschnitt bei 120 ± 21 $\mu\text{mol/l}$. Nach einem geburtsbedingten, nicht signifikanten Anstieg auf 131 ± 28 $\mu\text{mol/l}$

(= + 9%) fiel die Konzentration im postpartalen Verlauf kontinuierlich auf $91 \pm 17 \mu\text{mol/l}$ ab (Tab. 3).

Der **Gesamteisen**-Gehalt im Blutserum war am Tag der Geburt mit $18,9 \pm 8,4 \mu\text{mol/l}$ um 60% geringer als an den Tagen vor der Geburt mit im Mittel $31,5 \pm 6,4 \mu\text{mol/l}$. Er stieg bis zum Tag 30 nach der Geburt wieder auf $24,1 \pm 6,9 \mu\text{mol/l}$ (= + 12%) an. (Tab. 3). Alle diese Veränderungen waren jedoch nicht signifikant.

Im Zuge der Methode zur Bestimmung der latenten Eisenbindungskapazität (siehe 3.3.2.) konnte zu keinem Zeitpunkt **freies Eisen** im Serum der Muttertiere nachgewiesen werden.

Die Bestimmung der **latenten Eisenbindungskapazität** im Serum ergab vor der Geburt einen Durchschnittswert von $19 \pm 7 \mu\text{mol/l}$. Auch nach der Geburt konnte keine Veränderung der LEBK gemessen werden (Tab. 3).

Tab. 4: ALT-, AST-, GLDH- und CK-Aktivitäten im Serum der Kühe vor und nach der Geburt (n=30)

Zeit vor und nach Geburt (Tage)	ALT (nkat/l)	AST (nkat/l)	GLDH (nkat/l)	CK (μ kat/l)
-30 \pm 2	153 \pm 22	472 \pm 84	73 \pm 21	2,1 \pm 2,4
-25 \pm 2	157 \pm 67	559 \pm 277	64 \pm 24	2,4 \pm 3,6
-20 \pm 2	153 \pm 54	532 \pm 203	94 \pm 68	2,2 \pm 3,2
-15 \pm 2	155 \pm 25	472 \pm 121	70 \pm 28	1,5 \pm 2,2
-10 \pm 2	139 \pm 28	615 \pm 317	60 \pm 23	2,6 \pm 3,2
-5 \pm 2	187 \pm 27	604 \pm 266	78 \pm 23	1,9 \pm 1,6
0	154 \pm 44	635 \pm 183	94 \pm 116	3,4 \pm 4,1
5	161 \pm 61	777 \pm 332	99 \pm 64	2,8 \pm 3,8
10	151 \pm 37	745 \pm 191	111 \pm 88	2,8 \pm 3,3
30	169 \pm 57	542 \pm 138	122 \pm 78	2,1 \pm 2,6

Bei den gemessenen Enzymen zeigte die **Alanin-Amino-Transferase (ALT)** keine Aktivitätsveränderungen vor und nach der Geburt. Die Werte lagen im Durchschnitt bei 158 ± 42 nkat/l (Tab. 4).

Die **Aspartat-Amino-Transferase (AST)** zeigte im näheren Geburtszeitraum (-10 d bis 10 d) tendenziell eine Aktivitätserhöhung mit den jeweils höchsten Werten in der ersten Woche post partum. Hier betrug die Zunahme gegenüber der früheren Werte ante partum (-30 d bis -15 d) im Mittel immerhin 60 %. Am Ende der Beobachtungsperiode lag die AST-Aktivität bei 542 ± 138 nkat/l.

Desweiteren wurde die **Glutamat-Dehydrogenase (GLDH)** bestimmt. Hier zeigte sich postpartal tendenziell ein kontinuierlicher Anstieg der Enzymaktivität.

Die **Kreatinkinase (CK)**, ante partum im Mittel bei $2,1 \pm 2,7$ μ kat/l, zeigte am Tag der Geburt eine leichte Erhöhung mit $3,4 \pm 4,1$ μ kat/l (= + 60 %). Bis zum Tag 30 war die Enzymaktivität jedoch wieder auf $2,1 \pm 2,6$ μ kat/l abgesunken (Tab. 4).

4.2. Neonataler Konzentrationsverlauf ausgewählter Messparameter im Blut der Kälber

4.2.1. Beeinflussung durch den Geburtsverlaufs

Um zu prüfen, inwieweit der Verlauf der Geburt einen Einfluss auf den antioxidativen Status der Kälber hat, wurden die Kälber in zwei Gruppen – einfache Geburt und Schweregeburt – aufgeteilt. Unter „einfacher Geburt“ wurden solche Geburtsverläufe verstanden, bei denen die Mutter problemlos ohne Hilfe von außen gekalbt hat, und das Kalb sich in einer normalanatomischen Lage befand. Unter dem Begriff „Schweregeburt“ wurden alle diejenigen Geburten verstanden, bei denen Zughilfe angewendet werden musste (mit Geburtsstricken oder mit Geburtshelfer) und bei denen das Kalb zusätzlich aus einer abnormen Lage (Rückenlage, ein Fall) zur Welt kam.

Zur Beurteilung des antioxidativen Status der Kälber wurden analog zu den Erhebungen bei den Kühen der TEAC-Wert und die Vitamine C und E bestimmt.

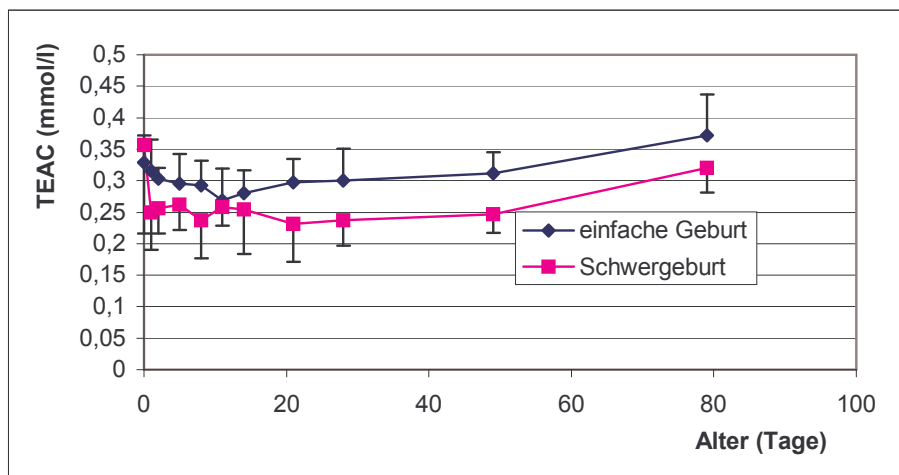


Abb. 4: TEAC-Werte im Plasma von Kälbern aus einfacher Geburt (n=12) und aus Schweregeburt (n=5)

Prinzipiell zeigt die TEAC einen bei allen Kälbern ähnlichen zeitlichen Verlauf. Sie fällt kurz nach der Geburt ab, und steigt bis zum Alter von 79 Tagen langsam wieder an. (Abb. 4). Es

zeigt sich aber ein deutlicher Niveau-Unterschied zwischen Kälbern aus einfacher Geburt und Kälbern aus Schweregeburt.

Die Kälber aus Schweregeburten hatten fast zu jedem Zeitpunkt einen niedrigeren (von 4% bis 22%) TEAC-Wert als die Kälber aus einfachen Geburten. Nur am Tag der Geburt war die TEAC bei den Schweregeburts-Kälbern mit $0,36 \pm 0,14$ mmol/l geringfügig höher als die bei den Kälbern aus einfacher Geburt mit $0,33 \pm 0,04$ mmol/l.

Doch fiel der TEAC-Wert bei den Schweregeburtskälbern sehr viel deutlicher bis zum Tag 1 ab ($0,25 \pm 0,06$ mmol/L) als bei den anderen Kälbern ($0,32 \pm 0,05$ mmol/l). Auch der letzte gemessene TEAC-Wert im Alter von 79 Tagen lag bei den Schweregeburtskälbern mit $0,32 \pm 0,04$ mmol/l geringer als der mit $0,37 \pm 0,07$ mmol/l von den Kälbern aus einfacher Geburt.

Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den beiden Geburtsgruppen ergab folgendes Ergebnis: Die Unterschiede am Tag 1, 2 und 28 waren signifikant ($p < 0,05$), die Unterschiede am Tag 49 und am Tag 79 waren hoch signifikant ($p < 0,01$).

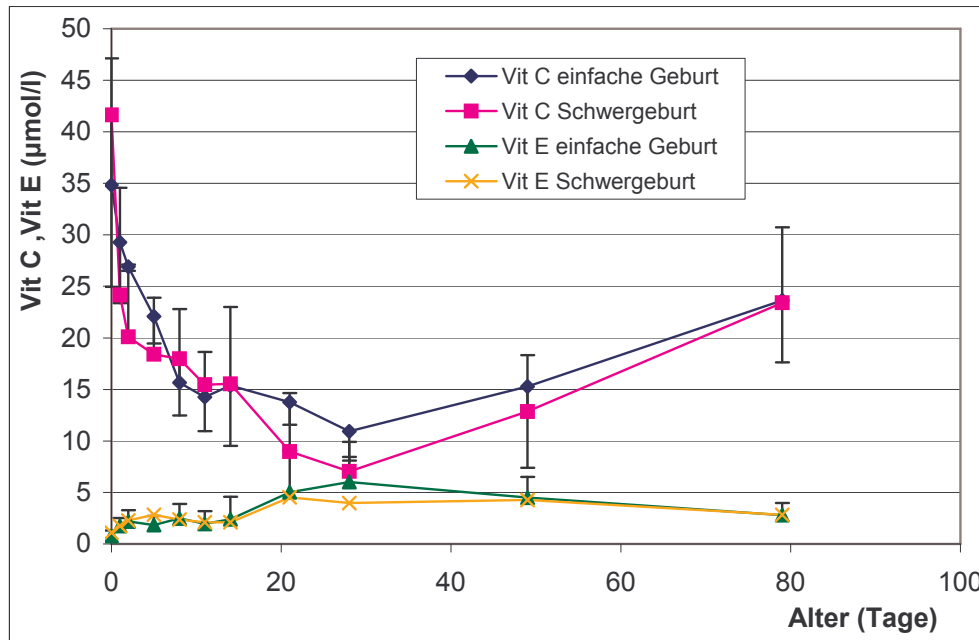


Abb. 5: Vitamin E- und Vitamin C-Konzentrationen im Plasma von Kälbern aus einfacher Geburt (n=13) und aus Schweregeburt (n=5)

Bei der Betrachtung der **Vitamin C- und E-** Konzentrationsverläufe im Kälberplasma lassen sich grundsätzlich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Geburts-Gruppen erkennen (Abb. 5).

Der Verlauf der Vitamin C- Konzentration ist jedoch ein völlig anderer als jener der Vitamin E- Konzentration.

Der **Vitamin C-** Gehalt im Blut der Kälber folgt annähernd dem Verlauf der TEAC. Ist die Konzentration am Tag der Geburt noch recht hoch ($37,1 \pm 15,2 \mu\text{mol/l}$), so fällt sie danach stark ab. Im Gegensatz zum TEAC-Wert dauert der Abfall jedoch länger, nämlich bis zum Tag 28 ($9,7 \pm 3,2 \mu\text{mol/l} = 26\%$ des Ausgangswertes). Erst danach steigt die Konzentration an Vitamin C wieder bis auf $23,5 \pm 6,5 \mu\text{mol/l}$ (= 68% des Ausgangswertes) im Alter von 79 Tagen an.

Beim **Vitamin E** zeigte sich ein anderes Bild. Die Vitamin E- Konzentration im Kälberplasma nahm kontinuierlich vom Tag der Geburt ($0,8 \pm 0,5 \mu\text{mol/l}$) bis zum Alter von 2 Tagen ($2,2 \pm 1,2 \mu\text{mol/l}$) zu. Ab dann blieb der Gehalt im Blut weitgehend stabil bis zum letzten gemessenen Wert im Alter von 79 Tagen ($2,8 \pm 1,2 \mu\text{mol/l}$).

Am Tag 21 ($5 \pm 4 \mu\text{mol/l}$), Tag 28 ($6 \pm 2,4 \mu\text{mol/l}$) und auch am Tag 49 ($4,5 \pm 2 \mu\text{mol/l}$) wurden vorübergehend höhere Vitamin E- Konzentrationen gemessen. Dies mag aus der Tatsache resultieren, dass die Kälber in diesem Zeitraum mit Milchaustauscher gefüttert wurden. Eine nähere Erklärung folgt in der Diskussion (siehe 5.2.1.).

Auch weitere Blutparameter, wie die Glucose, die Proteinfractionen, das Bilirubin und die Aktivitäten der Enzyme CK, ALT, AST und GLDH wurde auf Unterschiede zwischen den Geburtsgruppen untersucht. Auch wenn keine Differenzen festgestellt werden konnten wurden die Parameter der Vollständigkeit halber getrennt dargestellt.

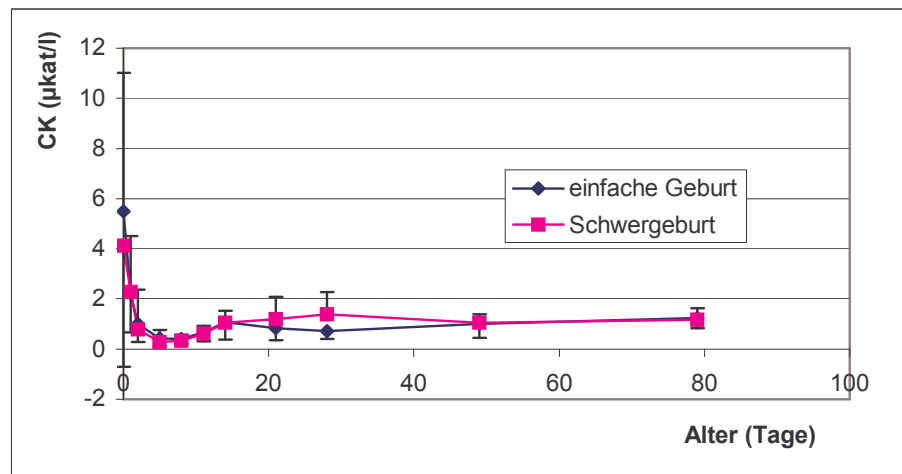


Abb. 6: CK-Aktivitäten im Serum von Kälbern aus einfacher Geburt (n=17) und Kälbern aus Schwerg Geburt (n=12)

Die Aktivität der **Kreatininkinase (CK)** im Serum gibt Auskunft über Schädigungen der Muskulatur, wie sie z.B. beim Geburtsvorgang auftreten können. Wie aus Abbildung 6 ersichtlich, verhalten sich die beiden Geburtsgruppen vom zeitlichen Verlauf der Aktivität her gesehen einheitlich.

So war die CK-Aktivität war am Tag der Geburt erwartungsgemäß bei beiden Gruppen mit $5,5 \pm 5,5 \mu\text{kat/l}$ (einf. Geburt) bzw. $4,1 \pm 4,8 \mu\text{kat/l}$ (Schwerg Geburt) vergleichsweise hoch, sank dann in den folgenden Tagen deutlich ab und blieb ab dem Alter von zwei Wochen auf einem weitgehend identischen Niveau von durchschnittlich $1,1 \pm 0,6 \mu\text{kat/l}$.

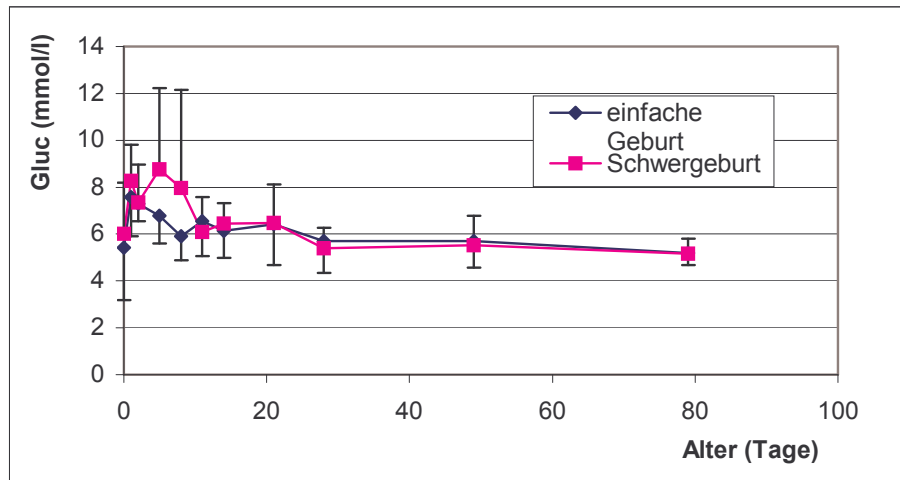


Abb. 7: Glucose-Konzentrationen im Serum von Kälbern aus einfacher Geburt (n=17) und Schwerg Geburt (n=12)

Bei der Betrachtung der **Glucose-Konzentration** im Serum der Kälber konnte bei beiden Gruppen am Tag 1 ein Anstieg bemerkt werden (Abb. 7).

So stieg der Glucose-Gehalt im Serum der Schwerg geburtskälber von $6 \pm 2,2$ mmol/l am Tag der Geburt bis auf $8,3 \pm 1,5$ mmol/l (Tag 1), dies entspricht einer relativen Zunahme von 38%. Der Glucose-Gehalt im Serum der Kälber aus einfacher Geburt stieg um 23% von $5,4 \pm 2,3$ mmol/l (Tag 0) auf $7 \pm 1,7$ mmol/l (Tag 1).

Ab dem zweiten Lebenstag sank die Glucose-Konzentration bei den Kälbern aus einfacher Geburt stetig bis zum Tag 28, und blieb dann mit im Mittel $5,5 \pm 0,8$ mmol/l gleich.

Anders verhielt es sich bei den Kälbern aus Schwerg geburten. Bei diesen Tieren fiel die Glucose-Konzentration erst ab dem achten Lebenstag (hier noch $8 \pm 4,2$ mmol/l) deutlich ab, dann verhielt es sich auch hier wie bei den Kälbern aus einfacher Geburt. Die durchschnittliche Glucose-Konzentration betrug ab dem 28. Tag $5,4 \pm 0,8$ mmol/l.

Die Unterschiede der Glucose-Konzentrationen bei den beiden Geburtsgruppen am Tag 5 und am Tag 8 waren signifikant.

Bei allen weiteren untersuchten Parametern (Gesamteiweiß, Albumin, Gesamtbilirubin, Kreatinin und den Aktivitäten von AST, ALT und GLDH) konnte kein Einfluss des Geburtsverlaufs erkennbar werden, wie aus den Tabellen 5 bis 8 ersichtlich. Der Vollständigkeit halber wurden trotzdem beide Geburtsgruppen aufgelistet.

Tab. 5: Gesamteiweiß- und Albumin-Gehalte im Blutplasma von Kälbern aus einfacher Geburt (n=17) und Kälbern aus Schweregeburt (n=12)

Alter (Tage)	Eiw (g/l)		ALB (g/l)	
	einfache Geburt	Schweregeburt	einfache Geburt	Schweregeburt
0	45 ± 4	44 ± 3	24 ± 1	25 ± 2
1	49 ± 6	51 ± 5	24 ± 2	24 ± 1
2	50 ± 7	51 ± 6	24 ± 1	24 ± 1
5	49 ± 6	50 ± 6	25 ± 2	24 ± 1
8	52 ± 4	49 ± 3	26 ± 1	26 ± 1
11	50 ± 5	50 ± 3	26 ± 2	27 ± 2
14	48 ± 6	50 ± 3	26 ± 3	28 ± 1
21	52 ± 4	52 ± 3	29 ± 1	29 ± 1
28	51 ± 3	53 ± 4	29 ± 1	28 ± 1
49	54 ± 5	55 ± 6	28 ± 2	28 ± 2
79	63 ± 6	62 ± 6	31 ± 2	30 ± 1

Sowohl die **Gesamteiweiß-** als auch die **Albumin-**Konzentration im Blutplasma von allen Kälbern stieg kontinuierlich im Laufe des Untersuchungszeitraumes an (Tab. 5). Im Alter von drei Monaten betrug die Eiweiß-Konzentration im Plasma aller Kälber 62±5 g/l, die Albumin-Konzentration 31±2 g/l. Dies ist eine relative Zunahme von 30% (Eiw) bzw. 20% (Alb) im Vergleich zum Ausgangswert am Tag der Geburt.

Tab. 6: Bilirubin- und Kreatinin- Gehalte im Blutplasma von Kälbern aus einfacher Geburt (n=17) und Kälbern aus Schweregeburt (n=12)

Alter (Tage)	T-Bil ($\mu\text{mol/l}$)	T-Bil (mmol/l)	Creat ($\mu\text{mol/l}$)	Creat ($\mu\text{mol/l}$)
	einfache Geburt	Schweregeburt	einfache Geburt	Schweregeburt
0	16,7 \pm 10,9	17,1 \pm 6,0	209 \pm 68	245 \pm 81
1	16 \pm 14,1	14,1 \pm 6,7	123 \pm 34	161 \pm 137
2	13,7 \pm 14,7	10,2 \pm 6,1	97 \pm 13	109 \pm 34
5	6,5 \pm 3,9	4,1 \pm 2,1	98 \pm 14	101 \pm 22
8	3,8 \pm 2,0	2,7 \pm 0,8	98 \pm 13	96 \pm 25
11	3,3 \pm 2,9	2,5 \pm 1,2	89 \pm 16	99 \pm 19
14	2,5 \pm 0,9	2,4 \pm 1,2	86 \pm 20	91 \pm 20
21	4,2 \pm 2,6	3,8 \pm 1,9	92 \pm 18	97 \pm 22
28	3 \pm 1,3	3,4 \pm 1,5	95 \pm 19	91 \pm 20
49	2,5 \pm 1,3	2 \pm 0,7	87 \pm 13	87 \pm 24
79	1,3 \pm 0,4	1,1 \pm 0,4	71 \pm 12	73 \pm 16

Die Konzentration an **Gesamtbilirubin** im Serum der Kälber war in den ersten Lebenstagen hoch (im Durchschnitt bei 13,5 \pm 11,3 $\mu\text{mol/l}$ bis zum 5. Lebenstag), und fiel ab dann stetig bis auf eine Konzentration von 1,3 \pm 0,4 $\mu\text{mol/l}$ (am Tag 79) ab (Tab. 6). Der relative Abfall der Gesamtbilirubin-Konzentration von den ersten zwei Lebenstagen im Vergleich zum Mittel der Konzentrationen im weiteren Beobachtungszeitraum betrug 76%.

Auch der **Kreatiningehalt** im Kälberserum war innerhalb der ersten Lebenstage (bis Tag 5) besonders hoch. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Geburtsgruppen waren in diesem Zeitraum nicht erkennbar. Insgesamt gesehen war vom Tag der Geburt an ein stetiger Abfall von im Mittel 223 \pm 79 $\mu\text{mol/l}$ bei Tag 0 auf 72 \pm 13 $\mu\text{mol/l}$ (= 68%) bei Tag 79 zu beobachten (Tab. 6)

Tab. 7: Enzymaktivitäten von ALT und AST im Blutserum von Kälbern aus einfacher Geburt (n=17) und Kälbern aus Schweregeburt (n=12)

Alter (Tage)	ALT (nkat/l)		AST (nkat/l)	
	einfache Geburt	Schwergeburt	einfache Geburt	Schwergeburt
0	83 ± 43	65 ± 46	432 ± 263	328 ± 234
1	115 ± 66	132 ± 59	505 ± 166	568 ± 202
2	120 ± 68	150 ± 98	379 ± 119	406 ± 165
5	83 ± 45	94 ± 57	249 ± 51	224 ± 30
8	60 ± 24	80 ± 30	210 ± 36	229 ± 42
11	51 ± 39	55 ± 14	219 ± 46	235 ± 44
14	44 ± 27	78 ± 54	249 ± 79	297 ± 123
21	66 ± 46	74 ± 25	254 ± 82	295 ± 66
28	59 ± 26	133 ± 99	300 ± 133	474 ± 235
49	75 ± 33	87 ± 19	403 ± 144	388 ± 116
79	147 ± 30	163 ± 33	487 ± 113	442 ± 108

Tab. 8: Enzymaktivitäten CK und GLDH im Blutserum von Kälbern aus einfacher Geburt (n=17) und Kälbern aus Schwergeburt (n=12)

Alter (Tage)	CK (µkat/l)		GLDH (nkat/l)	
	einfache Geburt	Schwergeburt	einfache Geburt	Schwergeburt
0	5,5 ± 5,5	4,1 ± 4,8	80 ± 49	59 ± 34
1	2,2 ± 2,3	2,3 ± 1,6	87 ± 38	119 ± 88
2	1 ± 1,4	0,8 ± 0,5	75 ± 38	88 ± 45
5	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,2	77 ± 37	69 ± 36
8	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	71 ± 26	101 ± 71
11	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,3	90 ± 55	146 ± 98
14	1,1 ± 0,5	1 ± 0,7	128 ± 149	176 ± 74
21	0,8 ± 0,5	1,2 ± 0,9	133 ± 78	146 ± 81
28	0,7 ± 0,3	1,4 ± 0,9	252 ± 163	311 ± 197
49	1 ± 0,6	1,1 ± 0,9	304 ± 219	257 ± 124
79	1,2 ± 0,4	1,2 ± ,3	278 ± 112	362 ± 182

Der Vergleich der Aktivitäten von ALT, AST und GLDH im Serum der Kälber mit unterschiedlichem Geburtsverlauf ergab ebenfalls keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Tab. 7+8).

Mit Ausnahme der GLDH liegen bei allen anderen Enzymen im geburtsnahen Zeitraum (Tag 0 bis 2) vergleichsweise hohe Ausgangs-Aktivitäten vor, die dann im Verlauf der 2. bis 4. Lebenswoche deutlich abnehmen. Erst gegen Ende der Beobachtungsperiode (>4 Wochen) ist bei diesen Enzymen (**ALT**, **AST**) eine Aktivitätszunahme zu verzeichnen.

Bei der **GLDH** ist ein kontinuierlicher Aktivitätsanstieg mit zunehmendem Alter zu beobachten. So liegen die Aktivitäten im Alter von 79 Tagen um den Faktor 4,4 höher als zum Zeitpunkt der Geburt.

4.2.2. Beeinflussung durch den Hämoglobin-Abbau

Um den Einfluss abschätzen zu können, den der Abbau des fetalen Hämoglobins auf den antioxidativen Status der Kälber hat, wurden **freies Eisen**, **Gesamteisen** und die **latente Eisenbindungskapazität** bestimmt.

Ein Unterschied zwischen den Geburtsgruppen konnte nicht beobachtet werden, deshalb wurde auf eine getrennte Darstellung verzichtet.

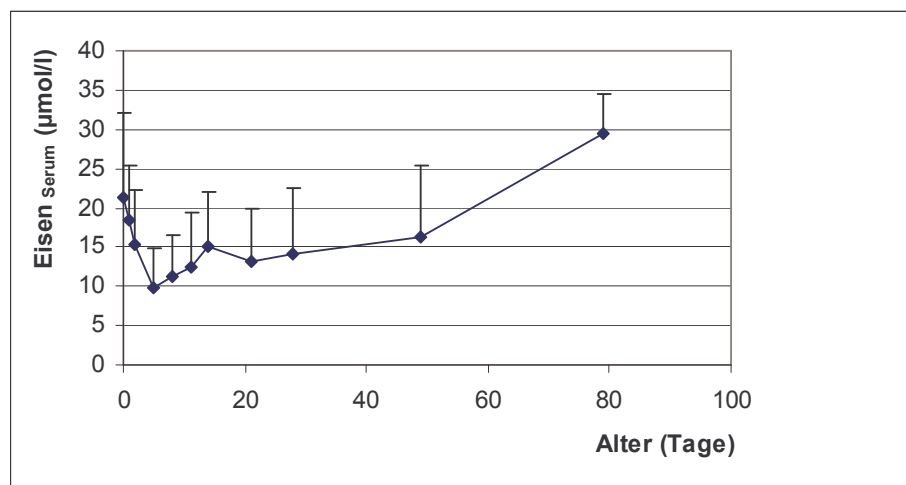


Abb. 8: Gesamteisenkonzentration im Serum von Kälbern (n=29)

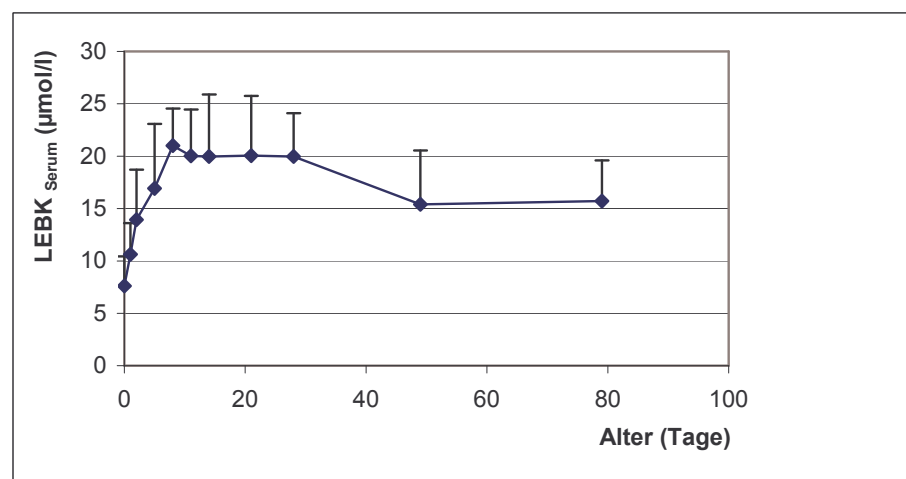


Abb. 9: Latente Eisenbindungskapazität im Blutserum von Kälbern (n=29)

Der Gesamteisengehalt im Serum betrug am Tag der Geburt $21,3 \pm 10,7 \mu\text{mol/l}$ und verringerte sich bis zum 5. Lebenstag auf $9,8 \pm 5,2 \mu\text{mol/l}$. Bis zum Ende des Versuchszeitraumes (Tag 79) stieg die Konzentration von Eisen wieder bis auf $29,6 \pm 4,8 \mu\text{mol/l}$ an. Der Anstieg des Eisengehaltes entspricht 66% und war mit $p < 0,05$ signifikant (Abb. 8).

Die latente Eisenbindungskapazität (LEBK) im Blutserum zeigte erwartungsgemäß einen gegensätzlichen Verlauf (Abb. 9).

Am Tag der Geburt wies die LEBK mit $8 \pm 3 \mu\text{mol/l}$ einen vergleichsweise geringen Wert auf, stieg aber bis zum 8. Lebenstag deutlich an (Tag 8: $21 \pm 4 \mu\text{mol/l}$). Dies entspricht einer relativen Zunahme von 62%.

Darüber hinaus blieben die Werte bis zum Tag 28 mit durchschnittlich $20 \pm 5 \mu\text{mol/l}$ auf einem weitgehend konstanten Niveau, sanken aber gegen Ende des untersuchten Zeitraums auf $16 \pm 4 \mu\text{mol/l}$ (Tag 79), und entsprachen damit den bei den Mutterkühen gemessenen Werten (siehe Tab. 3).

Es wurde zu keinem Zeitpunkt **freies Eisen** in den untersuchten Serumproben der Kälber im Zuge der Bestimmung der LEBK (siehe 3.3.2.) nachgewiesen.

4.2.3. Beeinflussung durch den Gesundheitsstatus

Während des Untersuchungszeitraumes erkrankten einzelne Kälber. Krankheiten wie Enteritis, Bronchitis und Omphalitis wurden bei ihnen diagnostiziert.

Vier Kälber starben im Alter von 11, 12 14 und 18 Tagen. Sie alle litten an starkem Durchfall. Die von ihnen bis dato gesammelten Daten wurden zur Auswertung nicht herangezogen.

Die restlichen Kälber wurden zur Datenauswertung in kranke und gesunde Kälber aufgeteilt. Dabei wurden diejenigen Tiere, die im Beobachtungszeitraum mehr als zwei Tage erkrankt waren als „krank“ bezeichnet, alle anderen als „gesund“.

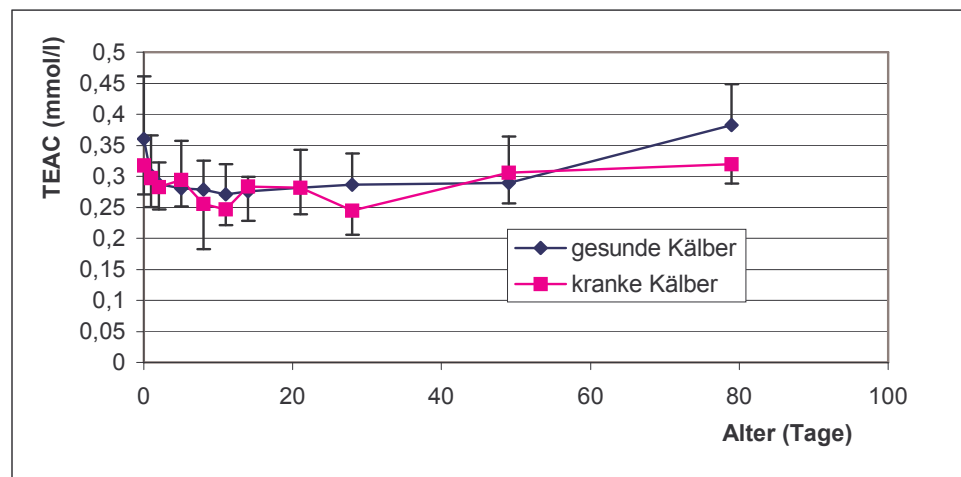


Abb. 10: TEAC-Verlauf bei gesunden (n=11) und kranken Kälbern (n=6)

Interessanterweise zeigt die TEAC-Verlaufskurve dieselbe Form bei „gesunden“ und bei „kranken“ Kälbern (Abb. 10).

5. Diskussion

5.1. Zum antioxidativen Status der Kühe in der Transitionsperiode

Die Transitionsperiode reicht von der späten Trächtigkeit bis zur frühen Laktation. Der Übergang (Transition) von der Trächtigkeit zur Laktation ist charakterisiert durch eine Vielzahl an physiologischen und umweltbedingten Veränderungen, die vom Organismus der Milchkuh bewältigt werden müssen (Lantzsch und Kaufmann, 2002). Dazu zählen unter anderem vielfältige hormonelle Umstellungen, die oft schon im vorgeburtlichen Zeitraum beginnen, die Belastung durch den Geburtsvorgang an sich, das Einsetzen der Laktation und die damit einhergehende große Steigerung insbesondere in den Bereichen mechanische Arbeit (Herz/Kreislauf), osmotische Arbeit (Stofftransport über Membranen) und chemische Arbeit (Nährstoffabbau und –synthese). Hinzu kommen oft auch noch Belastungen durch Rations- und Gruppenumstellungen.

Dass dabei auch der antioxidative Status der Kühe großen unkalkulierbaren Schwankungen unterworfen sein kann, ist naheliegend. So wurden in der vorliegenden Untersuchung bei Kühen im peripartalen Zeitraum versucht, über die Bestimmung der TEAC (Trolox equivalent antioxidative capacity) und der Konzentrationsverläufe der Vitamine C und E im Blut einen Einblick in die antioxidative Kapazität zu erhalten.

In der Tat konnte eine signifikante Abnahme der Vitamingehalte im Blut vor der Geburt beobachtet werden (siehe Abb. 3). Der Vitamin-Gehalt betrug vor der Geburt (Tag -20) $15,4 \pm 2,5 \mu\text{mol/l}$ (Vit C) bzw. $6,7 \pm 3,1 \mu\text{mol/l}$ (Vit E) und fiel bis zum Tag der Geburt signifikant auf Werte von $10,3 \pm 2,5 \mu\text{mol/l}$ (Vit C) bzw. $3,5 \pm 1,3 \mu\text{mol/l}$ ab. Nach der Geburt nahm der Gehalt noch etwas ab, stieg aber bis zum Tag 30 wieder auf $10,8 \pm 2,9 \mu\text{mol/l}$ (Vit C) bzw. $5,7 \pm 6,2 \mu\text{mol/l}$ (Vit E) an und erreichte damit fast sein Anfangsniveau.

Dieses Absinken der Vitamin E- Konzentration im zeitlichen Verlauf vor der Geburt wurde in anderen Studien auch schon beobachtet (Goff und Stabel, 1990; Weiss et al., 1992; Brzezinska-Slebodzinska et al., 1994; Kolb und Seehawer, 2000; Lantzsch und Kaufmann, 2002).

Das Auftreten dieses Phänomens wird in der Literatur wie folgt zu erklären versucht:

Lantsch und Kaufmann (2002) vermuten einen Abzug der Vitamine über die Kolostrumbildung und einen erhöhten Verbrauch in den Geweben. Auch Goff und Stabel (1990) sehen die Kolostrumbildung und –sekretion als Hauptursache für den Vitamin E-Abfall vor der Geburt. Tatsächlich ist der Gehalt an Vitamin E im Kolostrum sechs bis sieben mal höher als in normaler Milch (Hidiroglou, 1989). Am dritten Tag der Laktation sinken die Vitamin E- Konzentrationen jedoch in der Milch wieder ab.

Eine weitere Erklärung für das präpartale Absinken der Vitamin E- Konzentrationen im Plasma ist das Fehlen von Transportmolekülen. Vitamin E wird im Plasma hauptsächlich von Lipoproteinen transportiert, und zwar bevorzugt von Very Low Density Lipoproteinen = VLDL (Dutta-Roy et al., 1994). Während der Trächtigkeit nimmt die Lipodeposition in den Geweben deutlich zu und der Fettgehalt des Blutes verringert sich demzufolge (Weiss et al., 1992). Mit der rasch einsetzenden Laktation bei gleichzeitig ungenügendem Futterverzehr werden diese Fettdepots wieder mobilisiert, sodass reichlich freigesetzte und von der Leber aufgenommene Fettsäuren über VLDL hepatogen wieder ausgeschleust und zur Milchdrüse transportiert werden. In beiden Fällen – ante und post partum - stehen nicht mehr so viele Lipoproteine zum Transport des Vitamin E zur Verfügung.

Pinotti et al. (2003) fütterten trächtigen Kühen eine Cholin-reiche Diät in der Transitionsperiode. Cholin ist ebenso wie die Aminosäure Methionin ein wichtiger Methyl-Gruppen-Donator im Stoffwechsel der Milchkuh. Durch reichliche Cholinzufuhr wird Methionin geschont, das gleichzeitig wichtiger Bestandteil für die Synthese des Apoproteins im VLDL ist.

Tatsächlich war ein Ergebnis der zuletzt zitierten Studie eine signifikante Erhöhung der Vitamin E- Konzentration im Plasma der supplementierten Kühe. Der Gehalt in der Milch als auch die Milchleistung zeigten keine Veränderungen.

Kolb und Seehawer (2000) führen den Vitamin E-Abfall auf eine vermehrte Produktion von Sauerstoffradikalen durch den erhöhten Sauerstoffbedarf der Kuh während der Hochträchtigkeit zurück. Hinzu kommt, dass sich Sauerstoffbedarf beim Übergang von der Trächtigkeit zur Laktation verdoppelt. Ob eine Verdopplung des Sauerstoffverbrauchs tatsächlich ausreicht, um eine deutliche Radikalproduktion auszulösen ist zweifelhaft. In anderen Studien wurde erst ab einer 10- bis 15-fachen Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs

von einer merklichen Radikalproduktion mit oxidativem Stress als Folge gesprochen (Sen, 1995).

Desweiteren beeinflusst Stress ebenfalls den oxidativen Status. Kühe, die gestresst waren, oder denen ACTH und Adrenalin-Injektionen verabreicht wurden, hatten geringere α -Tocopherol-Konzentrationen im Plasma und in den weißen und roten Blutzellen (Sconberg et al., 1993). Kühe sind in der Transitionsperiode neben der Geburt vielfältigen zusätzlichen Stressoren, wie zum Beispiel Umstallung und Futterumstellung ausgesetzt. Nach Stresseinwirkung werden Adrenalin und Noradrenalin ausgeschüttet. Diese Hormone bewirken sowohl eine Erhöhung des aeroben Energiestoffwechsels als auch eine vermehrte Eicosanoid- und Kortikosteroid-Synthese, bei welchen Sauerstoffradikale gebildet werden. Der Gehalt an Antioxidantien kann deshalb im Stress abnehmen.

Die Böden in den meisten Gegenden von Deutschland sind Selen-arm. Dies kommt unter anderem von der extensiven Felderwirtschaft und der unzureichenden Düngung. Deshalb haben oftmals auch Futtermittel einen erniedrigten Selen-Gehalt. Aufgrund der synergistischen Wirkung von Selen und Vitamin E muss bei Selen-Mangel mit einem erhöhten Vit E- Bedarf unbedingt auf ein erhöhtes Vitamin E- Angebot geachtet werden.

Vitamin E und Selen unterstützen das Immunsystem durch Vermehrung und erhöhte Reaktionsfähigkeit der Leukozyten und Lymphozyten und durch eine effektivere Antikörperbildung (Politis et al., 1995). Desweiteren schützen sie die biologischen Membranlipide vor Oxidation.

Viele Studien in den letzten Jahren zeigten, dass Inzidenz und Schwere von Mastitiden und das Nachgeburtverhalten bei Milchkühen in Beziehung stehen mit der Vitamin E- und Selen-Versorgung der Kühe (Goff und Stabel, 1990; Hogan et al., 1993; Brzezinska-Slebodzinska et al., 1994, Nockles, 1996 b). Supplementierte Kühe erkrankten signifikant weniger häufig als nicht supplementierte. Schon eine zweimalige präpartale Gabe genügte, um die Gesundheit und somit auch die Leistung der Kühe zu gewährleisten bzw. zu erhalten.

Das heißt, weil Stress bei Milchkühen unvermeidlich ist, hohe Milchleistung aber einen gesunden Organismus erfordert, ist die Supplementation mit Vitamin E vor der Abkalbung oder besser noch während des gesamten Jahres deshalb durchaus sinnvoll.

Die Tatsache, dass in der vorliegenden Untersuchung die TEAC im Blut der Kühe während der Transitionsperiode unverändert war, ist nicht ungewöhnlich. Da die Vitamine E und C nur einen kleinen Teil des mit der TEAC summativ erfassten antioxidativen Abwehrsystems ausmachen, muss sich deren Konzentrationsabnahmen im TEAC-Verlauf nicht widerspiegeln.

Laut Miller et al. (1993 b) stellen Albumin, Harnsäure (Mensch und Primaten), Ascorbinsäure, α -Tocopherol und Bilirubin den Hauptanteil der antioxidativ wirksamen Substanzen im Plasma dar. Nicht unerheblich für das antioxidative Abwehrsystem im Plasma sind aber auch Eisenbindende Proteine wie Ceruloplasmin und Transferrin. Der TEAC-Wert des Menschen im Blut wird mit $1,41 \pm 0,07$ mmol/l angegeben (Miller et al., 1993 b). Der bei den Kühen gemessene Wert ist mit $0,27 \pm 0,05$ mmol/l (siehe Kapitel 4.2.1.) deutlich geringer. Kühe besitzen keine Harnsäure, sind jedoch im Gegensatz zum Menschen in der Lage, Vitamin C zu synthetisieren. Da die Harnsäure im Vergleich zur Ascorbinsäure eine größere antioxidative Kapazität besitzt, erklärt sich somit ein Teil der deutlich differierenden TEAC-Werte von Menschen und Kühen.

Es handelt sich also beim Abfall der Vitamine E und C anscheinend nur um einen auf diese Vitamine ausgerichteten Effekt, der nicht noch andere wichtige Teilbereiche des gesamten antioxidativen Abwehrsystems betrifft. Es gibt bis dato keine Studie über den antioxidativen Status von Kühen in der Transitionsperiode. Wie oben besprochen, sind Kühe zu dieser Zeit vielen Belastungen ausgesetzt. Die dabei entstehenden Sauerstoffradikale können im gesunden Organismus von einem effizienten und vielfach gegliederten antioxidativen Abwehrsystem ohne Probleme abgefangen werden. Die Vitamine E und C werden jedoch zusätzlich über die Kolostralmilch eliminiert. Gleichzeitig können auch noch die Transportlipoproteine aufgrund der Lipiddeposition in der späten Phase der Trächtigkeit vermindert sein. Deshalb kann der Vitamin E- und C- Gehalt im Blut auch ohne oxidativen Stress deutlich verringert sein. Diese Überlegung erfährt auch noch dadurch eine Bestätigung, dass der Vitamingehalt in der Milch schon bald nach der Kalbung wieder abnimmt, und der Gehalt im Blut gleichzeitig wieder zu.

5.2. Zum antioxidativen Status der Kälber und dessen Beeinflussbarkeit

Der antioxidative Status der Kälber wurde mit Hilfe der TEAC (Trolox equivalent antioxidative capacity) bestimmt.

Es konnte ein Abfall des TEAC-Wertes nach der Geburt beobachtet werden (siehe Abb. 3). Bis zum Alter von cirka zwei Wochen fiel die TEAC auf 79 % des Ausgangswertes ab, und stieg dann kontinuierlich bis zur letzten Messung im Alter von drei Monaten etwas über den Ausgangswert an.

Die Beobachtung der Beeinträchtigung des antioxidativen Status bei Neugeborenen nach der Geburt wurde im Literaturteil (siehe 2.3.2.) schon erläutert. Im Folgenden soll erörtert werden, dass der Verlauf der Geburt einen maßgeblichen Einfluss auf den antioxidativen Status bei neugeborenen Kälbern haben kann, und dass die weitere Abnahme der TEAC nach der Geburt sehr wahrscheinlich mit dem Freiwerden von Eisen beim Abbau des fetalen Hämoglobins zusammenhängen kann.

5.2.1. Einfluss des Geburtsverlaufs

Der Geburtsverlauf hat einen Einfluss auf den antioxidativen Status der Kälber.

Die in der vorliegenden Arbeit gemessene TEAC als Maß für den antioxidativen Status zeigte bei Kälbern aus Schweregeburten im Vergleich zu Kälbern aus einfachen Geburten bis auf den Tag der Geburt durchgehend geringere Werte (siehe Abb. 4). Außerdem war der Abfall des TEAC-Wertes um 30% bei Schweregeburtskälbern sehr viel deutlicher bzw. stärker ausgeprägt als bei Kälbern aus einfacher Geburt. Hier lag der Abfall vom Ausgangswert am Tag 0 bei 4%.

Im Unterschied zur einfachen Geburt dauerte eine Schweregeburt länger. Desweiteren wurde zur Entwicklung des Kalbes oftmals Zughilfe mit Geburtsstricken oder manchmal auch mit dem Geburtshelfer angewandt. Zughilfe wurde immer dann gegeben, wenn sich die Kuh schon lange Zeit im Geburtsprozess befand, die Wehentätigkeit schwächer wurde und die Kuh sich immer mehr erschöpft zeigte. D.h., Schweregeburten bedeuten sowohl für das Muttertier als auch für das Kalb eine deutlich größere stressartige Belastung.

Bereits an früherer Stelle (siehe Kapitel 2.3.2.) wurden die Veränderungen der fetalen Sauerstoffversorgung während der Geburt beschrieben. So kommt der Fetus schon bei einer einfachen Geburt in ein kurzfristiges Sauerstoffdefizit. Kälber aus Schweregeburten befinden sich länger in hypoxischen Zuständen, was weitreichendere Folgen hat. Die während des Geburtsvorgangs entstehende Ischämie mit nachfolgender Reperfusion scheint der wichtigste Faktor bei der zusätzlichen Beeinträchtigung des antioxidativen Status dieser Neugeborenen zu sein. Wie schon erläutert, konvertiert bei solchen Situationen die Xanthin-Dehydrogenase zur Xanthin-Oxidase und produziert massiv Sauerstoffradikale. Auch die Eisenfreisetzung aus den Erythrozyten ist umso größer, je ausgeprägter die Hypoxie ist.

Das heißt, das Ausmaß der Hypoxie steht in direktem Zusammenhang mit der Produktion von freien Radikalen. So prüften Buoncore et al. (2000) die Hypothese, dass Gewebhypoxie vermehrte Proteinoxidationen im Blut von Neugeborenen verursacht. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass je ausgeprägter die Hypoxie war, desto mehr oxidative Lipid- und Proteinschädigungen durch freie Radikale zu finden waren.

Die Blut-pH-Werte bei hypoxischen Neugeborenen sind geringer, da während des Sauerstoffdefizits die Glucose anaerob nur bis auf die Stufe von Milchsäure abgebaut wird. Bei Kälbern, bei denen Zughilfe angewandt wurde, sind deshalb niedrigere Plasma-pH-Werte zu finden. Die Konvertierung der Xanthin-Dehydrogenase korreliert positiv mit der Erniedrigung des pH-Wertes. D.h., eine vermehrte Sauerstoffradikalproduktion und damit eine Verschlechterung des antioxidativen Status der betreffenden Kälber ist die zwangsläufige Folge.

Die Hypoxie während des Geburtsvorgangs bewirkt einen vermehrten ATP-Abbau mit Anstieg der Hypoxanthin-Konzentration. Je ausgeprägter die Hypoxie, desto größer die Hypoxanthinkonzentration (Saugstad, 1988).

Dies erklärt möglicherweise den stärkeren Abfall der TEAC von Schweregeburtskälbern direkt nach der Geburt. Denn vor dem Hintergrund des reichlichen Hypoxanthinanfalls können bei der postpartal einsetzenden deutlich verbesserten Sauerstoffversorgung (= Reperfusion) über die Konvertierung der Xanthin-Oxidase vermehrt ROS gebildet werden, mit einem deutlichen Antioxidantienverbrauch in Folge (siehe Tag 1 der Kälber).

Die Kälber aus Schweregeburten wurden mehr gestresst als Kälber aus einfachen Geburten. Diese Beobachtung lässt sich mit Hilfe des Glucose-Gehalts im Blut belegen (siehe Abb. 7). Durch die Ausschüttung von Katecholaminen in Stress-Situationen (hier: die Geburt) kommt es u.a. zu einer erhöhten Freisetzung von Glucose aus dem Leberglykogen.

Bei beiden Geburtsgruppen war der Glucose-Gehalt im Blut am ersten Lebenstag mit $7 \pm 1,7$ mmol/l (einfache Geburt) bzw. $8,3 \pm 1,5$ mmol/l (Schweregeburt) erhöht im Vergleich zum Tag der Geburt (einfache Geburt: $5,4 \pm 2,3$ mmol/l, Schweregeburt: $6 \pm 2,2$ mmol/l).

Danach sank die Glucose-Konzentration bei Kälbern aus einfacher Geburt stetig bis zum 28. Lebenstag ab und blieb dann weitgehend unverändert (durchschnittlich bei $5,5 \pm 0,8$ mmol/l). Bei den Kälbern aus Schweregeburten fiel die Glucose-Konzentration erst ab dem achten Lebenstag wieder ab, was auf eine gewisse Nachhaltigkeit des schweren Geburtsverlaufs schließen lässt.

Die erhöhte CK-Aktivität zum Zeitpunkt der Geburt und auch an den folgenden fünf Tagen erklärt sich durch Muskelzellschädigungen während des Geburtsvorgangs. Beim Durchtritt des Kalbes durch den engen Geburtskanal wird die Muskulatur zwangsläufig gequetscht. Die Dauer der Kompression hat anscheinend keinen deutlichen Einfluss auf die Höhe der Enzymaktivität (siehe Abb. 6), spiegelt sich aber möglicherweise in der Höhe der Standardabweichung wieder.

Nockles et al. (1996 a) und Sconberg et al. (1993) beobachteten eine Erhöhung der CK-Aktivität bei gestressten Kälbern. Sie führten die Aktivitätserhöhung auf Muskelzellschädigungen zurück, die aus der erhöhten Anzahl an Sauerstoffradikalen resultierten, welche während der Stress-Situation gebildet wurden.

Dies ist eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die auch in der vorliegenden Untersuchung beobachtete CK-Aktivitätserhöhung bei den neugeborenen Kälbern.

Kein Einfluss des Geburtsverlaufs war im Konzentrationsverlauf der Vitamine E und C nachweisbar (siehe Abb. 5). Bei beiden Geburtsgruppen fanden sich in etwa dieselben Verhältnisse.

Der Vitamin C- Gehalt im Plasma der Kälber war am Tag der Geburt hoch ($37,1 \pm 15,2$ $\mu\text{mol/l}$) und fiel dann bis zur 4. Lebenswoche kontinuierlich bis auf einen Wert von $9,7 \pm 3,2$

$\mu\text{mol/l}$ ab. Danach stieg er wieder bis zum letzten Blutentnahme-Zeitpunkt im Alter von drei Monaten auf $23,5\pm 6,5 \mu\text{mol/l}$ an.

Auch in anderen Arbeiten wurde über einen hohen Vitamin C- Gehalt im neonatalen Blut berichtet (Silvers et al., 1994; Powers et al., 1995). In Verbindung mit einem ebenfalls hohen Gehalt an Caeruloplasmin könnte Vitamin C prooxidative Eigenschaften entwickeln und die Ferroxidase-Aktivität von Caeruloplasmin hemmen, was die Bildung von Hydroxylradikalen zur Folge hätte.

Der Vitamin E- Gehalt im Blutplasma zeigte einen gänzlich anderen Verlauf. Er war am Tag der Geburt mit $0,8\pm 0,5 \mu\text{mol/l}$ gering im Vergleich mit dem Gehalt von $2,8\pm 1,2 \mu\text{mol/l}$ im Alter von drei Monaten. Vitamin E als fettlösliches Molekül diffundiert nur unzureichend durch die Plazenta und muss nach der Geburt über das Kolostrum aufgenommen werden (Baydas et al., 2002). Im Alter von drei bis vier Wochen wies das Kälberplasma dagegen etwas höhere Vitamin E- Konzentrationen als bei der letzten Messung an drei Monate alten Kälbern auf. Das hängt mit der Fütterung der Tiere zusammen. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Kälber hauptsächlich mit Milchaustauscher ernährt (siehe 3.1.2.2.), welcher einen höheren Vitamin E- Gehalt als die normale Kuhmilch besaß.

5.2.2. Einfluss des fetalen Hämoglobin- Abbaus

Kälber-Erythrozyten besitzen wie die Erythrozyten von menschlichen Säuglingen fetales Hämoglobin. Dieses wird im Laufe der ersten Lebensmonate durch adultes Hämoglobin ersetzt. Über die Dauer diese Umbaus bei Kälbern gibt es Angaben, die sich nur geringfügig unterscheiden. So fanden McGillivray et al. (1985) bei über sechs Wochen alten Kälbern kein fetales Hämoglobin mehr. In einer neueren Studie von Gustin et al. (1997) ist von ca. acht Wochen bis zum Verschwinden des fetalen Hämoglobins die Rede. Fetales Hämoglobin besitzt aufgrund einer anderen Quartärstruktur eine größere Sauerstoffaffinität als adultes Hämoglobin, da es Sauerstoff aus dem mütterlichen Kreislauf übernehmen muss.

Kälber besitzen zusätzlich auch noch postnatal gebildetes, neonatales Hämoglobin, welches eine sehr geringe Sauerstoffaffinität besitzt und in den ersten acht bis zehn Lebenswochen im Blut zu finden ist (McGillivray et al. 1985; Hubbert und Miller, 1971).

Beim Abbau der Häm-Gruppe aus fetalem Hämoglobin durch die Häm-Oxygenase wird zweiwertiges Eisen (Fe^{2+}) frei und steht für eine Wiederverwendung zur Verfügung. Fe^{2+} besitzt starke oxidative Eigenschaften und bildet durch die Oxidation von Wasserstoffperoxid das äußerst reaktionsfreudige Hydroxyl-Radikal. Die Hydroxyl-Radikalbildung wird verhindert, indem der Anteil des nicht mehr am Häm gebundenem Eisens (auch als „freies Eisen“ bezeichnet) so gering wie möglich gehalten wird, zum Beispiel durch Eisen-bindende Proteine, die zum antioxidativen Abwehrsystem gehören (siehe 2.2.1.).

Die Konzentration der Eisen-bindenden Proteine Transferrin und Caeruloplasmin im Blut von Neugeborenen ist verringert (Lindeman et al., 1992.). Auch die latente Eisenbindungskapazität (LEBK) im neonatalen Blut ist geringer als bei Erwachsenen. Die LEBK gibt Auskunft über die Kapazität des Transferrins im Zusammenhang mit der Bindung freier Eisenionen. Transferrin hat zwei hoch-affine Bindungsstellen für Eisen. Je mehr Bindungsstellen frei sind, desto größer ist die LEBK. Umgekehrt gilt: je mehr Bindungsstellen mit Eisen besetzt sind, desto geringer ist sie.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zur latenten Eisenbindungskapazität im Kälberserum lassen eine Anwesenheit von freiem Eisen während der ersten Lebenswochen vermuten, denn die LEBK war am Tag der Geburt mit $8 \pm 3 \mu\text{mol/l}$ noch sehr gering und stieg bis zum achten Lebenstag kontinuierlich an (Tag 8: $21 \pm 4 \mu\text{mol/l}$).

Ein weiterer Grund für diesen neonatalen Verlauf der LEBK könnte auch ein Mangel an Transferrin sein. Möglicherweise braucht die Leber des Kalbes einige Tage, um über die Neusynthese von Transferrin die LEBK deutlich anzuheben.

Die oben genannten Sachverhalte – das Freiwerden von zweiwertigem Eisen beim Abbau des fetalen Hämoglobins und unzureichend vorhandene Eisen-bindenden Proteine – führen wahrscheinlich zu einer Belastung des Neugeborenen mit freien Eisenionen und den daraus resultierenden Hydroxylradikalen. Das zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht vollständig ausgereifte antioxidative Abwehrsystem des neugeborenen Kalbes (siehe 2.3.2) wird durch das freie Eisen zusätzlich belastet.

Erythrozyten mit fetalem Hämoglobin stellen nicht nur wegen des Freiwerdens von Fe^{2+} beim Abbau eine Belastung für das antioxidative Abwehrsystem dar. Ciccoli et al. (2003) untersuchten den Einfluss von Hypoxie auf die Eisenfreisetzungsraten in den Erythrozyten von Erwachsenen und Neugeborenen. Dabei konnten sie zeigen, dass Erythrozyten mit fetalem Hämoglobin *in vitro* empfindlicher auf hypoxische Zustände reagieren als Erythrozyten mit adultem Hämoglobin, und dabei Eisen in Form von Desferrioxamin-Chelat-bildender Form freisetzen. Das freigesetzte Eisen ist in der Lage, aus den Erythrozyten in das Inkubationsmedium zu diffundieren und in ihrer Umgebung Radikal-bildende Reaktionen zu katalysieren. Desweiteren war die Eisenfreisetzungsraten aus Erythrozyten hypoxischer Neugeborener größer als bei normoxischen.

Hinzu kommt, dass die hypoxischen Zustände, die während des Geburtsvorgangs herrschen, nicht nur die erythrozytäre Eisenabgabe beeinflussen, sondern auch ein Freiwerden des Eisens aus seinen Speicher- und Transportproteinen bewirken (Kanter, 1998).

Im einleitenden Literaturteil wurde die Toxizität von freiem Eisen erläutert. Danach kann bei der Fenton-Reaktion das hochreaktive Hydroxyl-Radikal gebildet werden, welches die Bildung von weiteren Sauerstoffradikalen bewirkt und auch direkt Biomoleküle schädigt. Das heißt, beim Neugeborenen trägt die Anwesenheit von freien Eisenionen in jedem Fall zu einer Beeinträchtigung des antioxidativen Status bei.

In dieser Arbeit wurde zu keinem Zeitpunkt freies Eisen im Kälberplasma gefunden. In anderen Studien, die über nicht-Protein-gebundenes Eisen im Blut von Neugeborenen berichteten (Evans et al., 1992; Lentjes et al., 1995; Ciccoli et al., 2003), wurden andere

Analyse-Methoden zur Auffindung des freien Eisens angewandt als in dieser Arbeit. Evans et al. (1992) berichten, dass die meisten Forscher freies Eisen nicht direkt bestimmten, sondern nur die LEBK. War keine LEBK vorhanden, so postulierten sie die Anwesenheit von freien Eisenionen.

Mit dem Bleomycin-Test, konnten von Evans et al. (1992) die Eisenionen direkt nachgewiesen werden. Sie fanden freie Eisenionen nicht nur wie erwartet bei Frühgeburten, sondern auch bei gesunden, zeitgerecht geborenen Säuglingen.

Das Nichtauffinden von freien Eisenionen in dieser Arbeit ist höchstwahrscheinlich analytisch begründet.

Der Gesamteisengehalt im Kälberserum zeigte erwartungsgemäß einen anderen Verlauf als die latente Eisenbindungskapazität (siehe Abb. 8). Die Eisenkonzentration sank vom Zeitpunkt der Geburt ($21,3 \pm 10,7 \mu\text{mol/l}$) bis zum fünften Lebenstag ($9,8 \pm 5,2 \mu\text{mol/l}$) ab und stieg ab dann stetig bis zum Alter von drei Monaten auf Werte von $29,4 \pm 6,8 \mu\text{mol/l}$. Das heißt, die Gesamteisenkonzentration verhielt sich reziprok zur latenten Eisenbindungskapazität. Je höher die LEBK war, desto geringer der Eisengehalt. Der Anstieg des Gesamteisens im Blutplasma ab dem 5. Lebenstag lässt sich mit der Aufnahme von Eisen durch die Nahrung erklären.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle Messwerte auf einen belastenden Einfluss des Abbaus des fetalen Hämoglobins auf den antioxidativen Status der neugeborenen Kälber hindeuten. Durch die beim Abbau freiwerdenden zweiwertigen Eisenionen und den vermutlich geringen Eisentransport- und -speicherproteingehalt werden die Neugeborenen mit einer vermehrten Anzahl von Sauerstoffradikalen konfrontiert. Dadurch kommt es zu einem erhöhten Antioxidantienverbrauch und zu einer Verschlechterung des antioxidativen Status.

5.3. Die TEAC als prognostischer Faktor bei neugeborenen Kälbern?

In der vorliegenden Arbeit wurden bei 30 Kälbern Blutproben vom Zeitpunkt der Geburt bis zum Alter von drei Monaten genommen. Fünf Kälber starben, vier davon in den ersten achtzehn Lebenstagen. Das fünfte Kalb starb im Alter von drei Wochen ohne vorherige Erkrankung und mit ungeklärter Todesursache. Die anderen vier litten alle an sehr starken Durchfallerkrankungen, an deren Folgen sie trotz Behandlungsversuchen starben.

Durchfallerkrankungen machen statistisch gesehen ungefähr ein Drittel aller Kälberkrankheiten aus (siehe 2.4.5.). Es ist zu vermuten, dass Sauerstoffradikale an der Pathogenese initial beteiligt sind, oder dass sie zumindest im Laufe der Krankheit durch das Entzündungsgeschehen gebildet werden. Halliwell und Gutteridge (2000) sehen die Produktion von freien Radikalen während des Krankheitsgeschehens als eine unvermeidliche Konsequenz derselben, aber nicht als deren alleinige Ursache.

Deshalb steht es wohl außer Frage, dass kranke Kälber zum Zeitpunkt der Krankheit einen schlechteren antioxidativen Status haben, da sie mit einer größeren Menge an freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies konfrontiert werden. Andererseits kann man davon ausgehen, dass der verschlechterte antioxidative Status der neugeborenen Kälber Einfluss auf die Krankheitsanfälligkeit und den Krankheitsverlauf nimmt. Hinzu kommt, dass die Neugeborenen nicht ausreichend in der Lage sind, freie Radikale und aktivierte Sauerstoffspezies abzufangen und so Schädigungen zu vermeiden.

Die TEAC kann durch bestimmte Medikamente, die entweder selber antioxidative Eigenschaften besitzen oder bei deren Metabolisierung freie Radikale gebildet werden, verfälscht sein (Farombi, 2001). Deshalb wurden die Blutproben der kranken Kälber, die medikamentell behandelt wurden, nicht in die Auswertung mit einbezogen. Um Angaben zum antioxidativen Status von Kälbern zum Zeitpunkt der Krankheit zu machen, dürften die kranken Kälber nicht medikamentell behandelt werden. Bekommt aber zum Beispiel ein an Durchfall erkranktes Kalb keine Therapie, so stirbt es innerhalb kurzer Zeit an Dehydratation und damit verbundenem Kreislaufversagen. Das ist ethisch nicht vertretbar.

Daraus wird die Schwierigkeit ersichtlich, unter praktischen Bedingungen den antioxidativen Status von Kälbern im akuten Verlauf einer Krankheit zu beurteilen.

Man kann jedoch vorläufige Schlussfolgerungen bezüglich der Eignung der TEAC als prognostischer Faktor aus den in dieser Arbeit gemachten Untersuchungen ziehen.

Der Vergleich der TEAC-Kurven von gesunden und kranken Kälbern zeigt keine markanten Unterschiede (siehe Abb. 10). Die Werte am Tag der Erkrankung wurden zwar nicht berücksichtigt, aber an dem weitgehend identischen Kurvenverlauf von kranken und gesunden Kälbern ist ersichtlich, dass die Krankheit anscheinend keinen deutlichen Einfluss auf den antioxidativen Status der Kälber hatte, da er nicht nachhaltig beeinträchtigt war. Dies kann daran liegen, dass die ausgewerteten Kälber nicht schwer betroffen waren und deshalb auch kein massiver weiterer Einfluss auf die TEAC zu finden war.

Die Zahl der kranken Kälber in dieser Studie ist jedoch zu gering, um eindeutige Aussagen bezüglich der TEAC als prognostischen Faktor machen zu können.

Anders verhält es sich bei Frühgeborenen. Pitkänen et al. (1990) fanden bei frühgeborenen menschlichen Säuglingen mit schlechter Prognose signifikant höhere Lipidperoxidationsprodukte als bei Frühgeborenen mit guter Kurzzeit-Prognose. Silvers et al. (1998) sehen in der geringen antioxidativen Kapazität des Neugeborenen-Blutes einen eigenständigen Risikofaktor für die Mortalität bei Frühgeburten. Dazu untersuchten sie mit Hilfe der Messung von TBARS (TBARS= Thiobarbitursäure reaktive Substanzen) die Fähigkeit des Plasmas, Lipidperoxidationen zu verhindern. Die TBARS-Werte bei Frühgeburten waren signifikant geringer als die der zeitig geborenen Säuglinge und waren mit einem gesteigerten Mortalitätsrisiko verbunden.

Rogers et al. (2000) untersuchten die Hypothese, dass die antioxidative Kapazität des Blutes (gemessen als TEAC) eine Vorhersage über die Ausbildung von ROS-assoziierten Krankheiten ermöglichen kann. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die TEAC zwar positiv mit dem Gestationsalter korreliert, aber nicht mit der Ausbildung ROS-assoziiierter Krankheiten. Dies kann daran liegen, dass die antioxidative Kapazität des Blutes nur einen Teil des vorhandenen oxidativen Abwehrsystems widerspiegelt, und lokale antioxidative Kapazitäten im Gewebe in dieser Studie nicht berücksichtigt wurde.

In einer Studie von Luukkainen et al. (1999) wurde die TRAP (=total radical trapping antioxidant parameter) im Blut von Frühgeborenen und termingerecht geborenen Säuglingen bestimmt. Bei dieser Methode werden die Peroxyl-Radikalfänger Harnsäure, Vitamin E und Vitamin C im Blutplasma erfasst. Die Werte bei Frühgeborenen waren höher als die der zeitig geborenen. Die Frühgeborenen hatten dennoch eine schlechtere Kurzzeit-Prognose als die

zeitig geborenen Kinder. Man muss anmerken, dass der Harnsäuregehalt im Blut bei der TRAP-Methode eine größere Bedeutung besitzt als zum Beispiel bei der TEAC-Methode. Frühgeborene haben aufgrund der unreifen Nieren häufig höhere Harnsäure-Konzentrationen im Blut und demzufolge höhere TRAP-Werte. Außerdem werden bei der TRAP-Methode nur diejenigen Antioxidantien erfasst, die direkt mit freien Radikalen reagieren, nicht aber die präventiv wirksamen Antioxidantien. Das heißt, die antioxidative Kapazität des Plasmas lässt sich mit dieser Methode nur unzureichend darstellen.

Wie im Literaturteil (2.3.2.) ausführlich erläutert, besitzen Frühgeborene ein noch unreiferes antioxidatives Abwehrsystem als zeitig Geborene. Desweiteren werden sie durch die intensive Betreuung nach der Geburt inklusive der meist unvermeidbaren Sauerstofftherapie mit einer großen Anzahl von freien Radikalen und ROS konfrontiert. Deshalb ist der antioxidative Status zum Zeitpunkt der Geburt bei menschlichen Frühgeburten durchaus als prognostischer Faktor zu bewerten. In der vorliegenden Arbeit gab es keine Frühgeburten unter den Kälbern. Es ist aber davon auszugehen, dass es sich bei frühgeborenen Kälbern nicht anders verhält als bei neugeborenen Menschen und der antioxidative Status zum Zeitpunkt der Geburt auch hier als prognostischer Faktor gesehen werden kann. Allerdings ist die praktische Bedeutung von frühgeborenen Kälbern sehr gering. Diese Kälber werden nicht wie menschliche Frühgeburten intensivmedizinisch betreut, da sie aufgrund ihrer schlechten Gesundheitsprognose nicht in der Lage sind, den produktiven Anforderungen (optimales Wachstum) zu entsprechen.

6. Zusammenfassung

Freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies, die in zahlreichen Teilprozessen des Sauerstoffmetabolismus gebildet werden, können biologische Moleküle wie Lipide, Proteine und Nukleinsäuren nachhaltig schädigen. Der Körper verfügt deshalb über eine große Vielfalt an antioxidativen Abwehrmechanismen, um eine Schädigung zu vermeiden bzw. möglichst gering zu halten.

In dieser Arbeit wurde der antioxidative Status im Blut von Kälbern und deren Müttern untersucht, wobei das Hauptaugenmerk bei den Kälbern lag. Dazu wurden bei dreißig Kühen bzw. deren Kälbern Blutproben zu bestimmten Zeitpunkten peripartal bzw. von der Geburt bis zum Alter von drei Monaten genommen und auf verschiedene für die antioxidative Kapazität im Blut relevante Parameter untersucht. Die TEAC (Trolox equivalent antioxidative capacity) wurde für Kühe und Kälber als Maß für den antioxidativen Status genommen. Darüber hinaus wurden neben den Vitaminen C und E bei den Kälbern auch das Gesamteisen und die latente Eisenbindungskapazität postnatal bis zum Alter von 79 Tagen bestimmt. Zur Charakterisierung des jeweiligen Stoffwechsel- und Gesundheitsstaus der Versuchstiere wurden auch typische Metabolite (Glucose, Bilirubin), Proteine (Gesamteiweiß, Albumin) und Enzyme (ALT, AST, GLDH, CK) im peripartalen (-30 d bis 30 d) und postnatalen (0 bis 79 d) Zeitraum erfasst.

Die Untersuchung der Kuh-Proben erbrachte vor der Geburt ein signifikantes Absinken der Vitamine C und E im Blutplasma. So betrug der Vitamin-Gehalt im Mittel vor der Geburt (Tag -20) $15,4 \pm 2,5 \mu\text{mol/l}$ (Vit C) bzw. $6,7 \pm 3,1 \mu\text{mol/l}$ (Vit E) und fiel bis zum Tag der Geburt signifikant auf Werte von $10,3 \pm 2,5 \mu\text{mol/l}$ (Vit C) bzw. $3,5 \pm 1,3 \mu\text{mol/l}$ (Vit E) ab. Da die TEAC-Kurve im gesamten peripartalen Zeitraum keine Schwankungen zeigte, ist beim präpartalen Absinken der Vitamin C- und Vitamin E- Konzentrationen von einem speziellen Effekt auf die Vitamine C und E auszugehen. Möglicherweise spiegelt sich hierbei der Vitamin- Abfluss über die Kolostralmilch wieder.

Bei der Betrachtung der Metabolite, Proteine und Enzymaktivitäten im Serum der Kühe konnte ein für die Transitionsperiode und das Geburtsergebnis typischer Verlauf dieser Parameter beobachtet werden. So herrschten z.B. hohe Glucose- bzw. Gesamtbilirubin-Spiegel am Tag der Geburt bzw. auch bis zum 5. Tag danach. Der Gesamteiweißgehalt im

Serum war kurz vor und nach der Geburt undeutlich niedriger und die Enzymaktivitäten von AST und GLDH erhöhten sich tendenziell in der ersten zehn Tagen nach der Geburt.

Bei der Analyse der Kälberblutproben konnte eine deutlich schlechtere Ausgangslage bezüglich des antioxidativen Status (gemessen als TEAC) nach der Geburt im Vergleich zu den Kühen festgestellt werden. Dies hatte verschiedene Gründe:

Es konnte ein Einfluss des Geburtsverlaufs gezeigt werden. Demnach hatten Kälber aus Schweregeburten im Beobachtungszeitraum durchgehend im Mittel um 15,5 % erniedrigte antioxidative Kapazität, gemessen über die TEAC-Konzentration im Plasma, als Kälber aus einfacher Geburt. Außerdem war der Abfall des TEAC-Wertes bei Schweregeburtskälbern ausgehend von einem TEAC-Wert von $0,36 \pm 0,14 \mu\text{mol/l}$ (Tag der Geburt) und $0,25 \pm 0,06 \text{ mmol/l}$ (Tag 1) sehr viel deutlicher bzw. stärker ausgeprägt als bei Kälbern aus einfacher Geburt (von $0,33 \pm 0,04 \text{ mmol/l}$ am Tag 0 auf $0,32 \pm 0,05 \text{ mmol/l}$ am Tag 1). Die Hypoxie, welche beim Geburtsvorgang unweigerlich auftritt, war vermutlich bei Kälbern aus Schweregeburten ausgeprägter.

Die Glucose-Konzentration im Blut der Schweregeburtskälber war in den ersten Lebenstagen zum Teil signifikant höher als bei Kälbern aus einfacher Geburt. Bei den weiteren gemessenen Parametern konnten keine Unterschiede in den Geburtsgruppen beobachtet werden. Sie zeigten einen für die neonatale Periode charakteristischen Verlauf, so war zum Beispiel die Gesamtbilirun-Konzentration nach der Geburt erhöht („Hyperbilirubinämie der Neugeborenen“) und auch die CK zeigte eine deutliche Aktivitätserhöhung zu diesem Zeitpunkt.

Um den Einfluss abzuschätzen, den der Abbau des fetalen Hämoglobins auf den antioxidativen Status der Kälber hat, wurden die latente Eisenbindungskapazität, freies Eisen und das Gesamteisen im Serum der Kälber bestimmt. Mit der verwendeten Analysemethode konnte kein freies Eisen nachgewiesen werden. Die latente Eisenbindungskapazität verdreifachte sich vom Tag der Geburt ($7,6 \pm 2,8 \mu\text{mol/l}$) bis zum elften Lebenstag ($20 \pm 4,4 \mu\text{mol/l}$) und sank dann wieder auf das Niveau von $15,4 \pm 5,2 \mu\text{mol/l}$ (Tag 49) ab. Die geringen LEBK-Werte kurz nach der Geburt sind vermutlich auf die freien Eisenionen, die beim Abbau des fetalen Hämoglobins freiwerden, zurückzuführen.

Die Konzentration des Gesamteisens im Serum zeigte erwartungsgemäß einen gegensätzlichen Verlauf, und sank nach der Geburt auf 60% des Ausgangswertes ($16,4 \pm 6,7$

$\mu\text{mol/l}$ am tag 0) ab, um dann ab dem fünften Lebenstag kontinuierlich bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes auf $26,5 \pm 3,2 \mu\text{mol/l}$ (Tag 79) anzusteigen.

Es wurden die TEAC-Werte von kranken und gesunden Kälbern gegenüber gestellt. Dabei konnten keine Unterschiede im Niveau und im Verlauf der TEAC-Kurven nachgewiesen werden. Bei der geringen Anzahl an kranken Tieren (nur sechs Kälber) in dieser Untersuchung stellte sich die TEAC nicht als deutlicher prognostischer Faktor hinsichtlich der Morbidität heraus. Um eine endgültige Aussage darüber zu treffen, muss eine größere Tierzahl untersucht werden.

7. Summary

Study on the antioxidant status of cows and their newborn calves

Free radicals and reactive oxygen species that are produced during numerous steps of oxygen-metabolism processes can damage biomolecules such as lipids, proteins and DNA. The body has several antioxidant defense mechanisms to avoid or reduce any damage.

In this dissertation the antioxidant status of newborn calves and their dams were investigated. The main focus was set on the calves. As a first step blood samples were taken at certain times from thirty dairy cows and their calves from the day of birth until the calves reached the age of three months. The samples were analysed according to various blood parameters whereby the TEAC (Trolox equivalent antioxidative capacity) was taken as measurement parameter for the antioxidative status. In addition to that, vitamin E and C, total serum iron and the latent iron binding capacity was analysed in samples taken postnatal until the age of 79 days. Furthermore typical metabolites (Glucose, Bilirubin) proteins and enzym activities (ALT, AST, CK, GLDH) were seized in the peripartal (-30 d to 30 d) and postnatal (0 to 79 d) period in order to characterise the individual metabolism and health of the animals in this study.

The analysis of mother cow blood samples prior to the expected day of parturition detected a significant reduction of vitamin C and E in the bloodplasma. The mean vitamin concentration before birth was (day -20) $15,4 \pm 2,5 \mu\text{mol/l}$ (Vit C) and $6,7 \pm 3,1 \mu\text{mol/l}$ (Vit E) and decreased significantly up to the day of birth to $10,3 \pm 2,5 \mu\text{mol/l}$ (Vit C) and $3,5 \pm 1,3 \mu\text{mol/l}$ (Vit E). The prepartal reduction of vitamin C and E must be a special effect of these vitamins since the TEAC curve remained without any variations during the peripartal period. It is possible that the reduction of the vitamins is due to an efflux to colostrum.

An analysis of the metabolites, proteins and enzymes in the blood serum of the mother cows detected a typical development in the transition period and at parturition, for example high glucose and bilirubin measurement existed at day of birth and until the fifth day after birth, respectively. The total serum protein concentration was just before and after parturition indistinctly lower and the activities of AST and GLDH tendentious increased in the first ten days after birth.

When analysing the blood samples taken from calves one could measure a deterioration of the antioxidant status (TEAC measured) in comparison to adult cattle. There are several reasons for that:

On the one hand there was a dependency on the delivery condition. Calves which had a tough delivery had a lower antioxidant status, measured as the TEAC, (on average 15,5 % throughout the whole study) than the calves who had an easy delivery. Calves with a tough delivery experienced a reduction of the TEAC with $0,36 \pm 0,14 \mu\text{mol/l}$ at the day of birth and $0,25 \pm 0,06 \text{ mmol/l}$ at the first day after birth much more stronger than calves with an easy birth experienced ($0,33 \pm 0,04 \text{ mmol/l}$ day 0 and $0,32 \pm 0,05 \text{ mmol/l}$ on day 1). The hypoxia which inevitable occurs during birth was presumably stronger in calves with a tough delivery. The glucose concentrations in the serum of calves with tough delivery was in parts significantly higher in the first day of life as of calves with an easy delivery. No unusual difference was observed in the measured parameters of the birth-groups, they showed a characteristic for the neonatal period, for example the concentration of bilirubin increased after birth (“hyperbilirubinemia of the newborn”) and the CK also showed a clear increase in the same period.

Latent iron-binding capacity, nono protein bound (also referred to as “free iron”) and total serum iron was measured, in order to assess the effect of the decomposition of fetal hemoglobin on the antioxidant status of calves. No free iron could be established with the adopted method of measurement. The latent iron-binding capacity increased threefold from the day of birth ($7,6 \pm 2,8 \mu\text{mol/l}$) to the 11th day of life ($20 \pm 4,4 \mu\text{mol/l}$) and then decreased on the level of $15,4 \pm 5,2 \mu\text{mol/l}$ (day 49). The low latent iron-binding capacity measurements just after birth are presumably caused by free iron-ions which appear because of the decomposition of fetal hemoglobin.

The concentration of total serum iron showed an opposite reaction to latent iron-binding capacity. It decreased after birth to a level of 60% in comparison to the day of birth ($16,4 \pm 6,7 \mu\text{mol/l}$) and increased continuously after the fifth day of life until the end of the measurement period to $26,5 \pm 3,2 \mu\text{mol/l}$ (day 79).

The TEAC curves of healthy and sick calves were compared with each other, however no difference between the curves was detected. In this sample of only six sick calves the TEAC did not materialise as a significant factor in morbidity rate, it is suggested that a greater sample of sick calves has to be assessed in order to draw a definite conclusion on this topic.

8. Literaturverzeichnis

AASTEH, J., HAUGEN, M., FØRRE, Ø. , **1998**:

Rheumatoid arthritis and metal compounds-perspectives on the role of oxygen radical detoxification. *Analyst*, 123:3-6

ABUTARBUSH, S.M., RADOSTITIS, O.M. , **2003**:

Congenital muscular dystrophy in a beef calf. *Can Vet J*, 44:738-739

AMES, B.N. , **1989**:

Endogenous oxidative DNA-damage, aging and cancer. *Free Radical Res Commun*, 7:121-128

AMETAJ, B.M., NONNECKE, B.J., FRANKLIN, S.T., HORST, R.L., BIDLACK, W.R., STUART, R.L., BEITZ, D.C. , **2000**:

Dietary vitamin A Modulates the concentrations of RRR- α -tocopherol in plasma lipoproteins from calves fed milk replacer. *American Society for Nutritional Sciences*, 130(3):629-636

ARAUJO, V., ARNAL, C., BORONAT, M., RUIZ, E., DOMINGUEZ C. , **1998**:

Oxidant-antioxidant imbalance in blood of children with juvenile rheumatoid arthritis. *Biofactors*, 8:155-159

ASHTON, N., WARD, B., SERPEL, G. , **1954**:

Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. *Br J Ophthalmol*, 38:397

ASHTON, N. , **1970**:

Retinal angiogenesis in the human embryo. *Br Med Bull*, 26:103-106

BABIOR, B.M., **1978**:

Oxygen-dependent microbial killing in phagocytes. *The New England Journal of Medicine*, 298(12):659-668

BALENTINE, J., **1982**:

Patology of oxygen toxicity. New York and London: *Academic Press*

BAYDAS, G., KARATAS, F., GURSU, M.F., BOZKURT, H.A., ILHAN, N., YASAR, A., CANATAN, H., **2002**:

Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Archives of Medical Research*, 33:276-280

BECKMAN, J.S., **1996**:

Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrit. *Chemical Research in Toxicology*, 9:836-844

BENDICH, A., MACHLIN, L.J., SCANDURRA, O., BURTON, G.W., WAGNER, D.D.M., **1986**:

The antioxidant role of vitamin C. *Free Radical Biology and Medicine*, 2:419-444

BENDICH, A. , **1992**:

Physiological role of antioxidants in the immune system. *Journal of Dairy Science*, 76:2789-2794

BERLINER, J.A. & HEINECKE, J.W. , **1996**:

The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical Biology and Medecine*, 29:707-727

BHAKDI, S. , **2003**:

An hypothesis for the immunopathogenesis of atherosclerosis. *Clin Nephrol.*, 60 Suppl. 1:49-52

BIESALSKI, H.K., FRANK,J. , **1995**:

Antioxidantien in der Ernährung und ihre Bedeutung für die anti-/prooxidative Balance im Immunsystem. *Immun.Infekt*, 23(5): 166-173

BLAND, R.D., LING, C.L., ALBERTINE, K.H., CARLTON, D.P., MACRITCHIE, A.J., DAY, R.W., DAHL., M.A, **2003.**:

Pulmonary vascular dysfunction in preterm lambs with chronic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285:L76-L85

BÖHLES, H., **1997:**

Antioxidative vitamins in prematurely and maturely born infants. *Internat.J.Vit.Res.*, 67:321-328

BOLISETTY, S., NAIDOO, D., LUI, K., KOH, T.H., WATSON, D., WHITEHALL, J., **2002:**
Antenatal supplementation of antioxidant vitamins to reduce the oxidative stress at delivery - a pilot study. *Early Human Development*, 253:H1372-H1380

BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E., MILLER, J.K., QUIGLEY, J.D., MOORE, J.R. , **1994:**

Antioxidant status of dairy cows supplemented prepartum with vitamin e and selenium. *J Dairy Sci*, 77:3087-3095

BUETTNER, G.R., JURKIEWICZ, B.A. , **1996:**

Catalytic metals, ascorbate and free radicals: Combinations to avoid. *Radiation Research*, 145:532-541

BUONCORE, G., PERRONE, S., LONGINI, M., TERZUOLI, L., BRACCI, R., **2000:**

Total hydroperoxid and advanced oxidation products in preterm hypoxic babies. *Pediatric Research*, 47(2):221-224

BUONCORE, G., PERRONE, S., BRACCI, R. , **2001:**

Free radicals and brain damage in the newborn. *Biol Neonate*, 79(3-4):180-186

BUSATO, A., STEINER, L., TOMTIS, A., GAILLARD, C. , **1997:**

Häufigkeiten und Ursachen von Kälberverlusten und Kälberkrankheiten in Mutterkuhbetrieben. *Dtsch.tierärztl.Wschr.*, 104:125-164

- CHANCE, B., SIES, H., BOVERIS, A., **1979**:
Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59:527-605
- CHEESEMAN, K.H., SLATER, T.F. , **1993**:
An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3): 481-493
- CHING, S., MAHAN, D., OTTOBRE, J.S., DABROWSKI, K. , **2001**:
Ascorbic acid synthesis in fetal and neonatal pigs and in pregnant and postpartum sows.
American Society for Nutritional Studies, S.1997-2001
- CICCOLI, L., ROSSI, V., LEONCINI, S., SIGNORINI, C., PAFFETTI, P., BRACCI, R.,
BUONCORE, G., COMPORTE, M. , **2003**:
Iron release in erythrocytes and plasma non protein-bound iron in hypoxic and non hypoxic
newborns. *Free Radical Research*, 37(1):51-58
- COCHRANE, C.G. , **1991**:
Mechanisms of oxidant injury of cells. *Mol Aspects Med*, 12:137-147
- COMPORTE, M., SIGNORINI, C., BUONCORE, G., CICCOLI, L. , **2002**:
Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. *Free Radical Biology & Medicine*,
32(7):568-576
- CORBUCCI, G.G., GASPARETTO, A., ANTONELLI, M., BUFI, M., DE BLASI, R.A.,
1986:
Changes in levels of coenzyme Q homologues, α -tocopherol and malondialdehyde in human
tissue during the course of circulatory shock. *Int J Tiss Reac*, 8(5):421-430
- CRAPO, J.D. , **1986**:
Morphologic changes in pulmonary oxygen toxicity. *Ann Rev Physiol*, 48:721
- D'AMORE, P.A. , **1994**:
Mechanisms of retinal and choroidal neovascularisation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35:3974-3979

DE CURTIS, M., PAONE, C., VETRANO, G., ROMANO, G., PALUDETTO, R., CICCIMARRA, F. , **1987**:

A case control study of necrotizing enterocolitis occurring over 8 years in a neonatal intensive care unit. *European Journal of Pediatrics*, 146:398-400

DERKSEN, F.J. , **1997**:

Oxidant injury and nitric oxide: a role in exercised-induced pulmonary haemorrhage? *The Veterinary Journal*, 153:119-122

DIPLOCK, A.T., CHARLEUX, J.-L., CROZIER-WILLI, G., KOK, F.J., RICE-EVANS, C., ROBERSFROID, M., STAHL, W., VIÑA-RIBES J. , **1998**:

Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, 80, Suppl.1:77-112

DIRKSEN, G., GRÜNDER, H-D., STÖBER, M. (HRSG.), **2002**:

Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. 4. Auflage, *Parey Buchverlag*, a:295-297, b:1000-1004

DONOVAN, G.A., DOHOO, I.R., MONTGOMERY, D.M., BENETT, F.L. , **1998**:

Calf and disease factors affecting growth in female holstein calves in florida. USA. *Preventive Veterinary Medicine*, 33:1-10

DUTTA-ROY, A.K., GORDON, M.J., CAMPBELL, F.M., DUTHIE, G.G., JAMES, W.P.T., **1994**:

Vitamin E requirements, transport, and metabolism: role of α -tocopherol-binding proteins. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 5:562-570

EICHINGER, A. , **1998**:

Untersuchungen zur neuroprotektiven Wirkung des Antioxidans Vitamin E am Modell der fokalen zerebralen Ischämie bei Vitamin E- depletierten und –repletierten Ratten. *Diss med vet*, München

ELSTNER, E.F., SCHEMPP,H., PREIBISCH, G., HIPPELI, S., OßWALD, W. , **1994**:
Biological sources of free radicals, In: Free radicals in the environment, medicine and toxicology. herausgegeben von Nohl, H.,Esterbauer, H., Rice-Evans, *Richelieu Press, London*

ESTERBAUER, H., STRIEGL, G., PUHL, H., ROTHENEDER, M., **1989**:
Continuos monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radical Research Communications*, 6:67-75

ESTERBAUER, H., GEBICKI, J., PUHL, H., JURGENS, G., **1992**:
The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 13:341-390

EVANS, P.J., EVANS, R., KOVAR, I.Z., HOLTON, A.F., HALLIWELL, B. , **1992**:
Bleomycin-detectable iron in the plasma of premature and full term neonates. *FEBS Letters*, 303(2,3):210-212

FAROMBI, E.O., **2001**:
Antioxidant status and hepatic lipidperoxidation in chloramphenicol-treated rats. *Tohoku J Exp Med*, 194 (2):91-98

FRANK, L., GROSECLOSE, E.E. , **1984**:
Preparation for birth into an O₂-rich environment: the antioxidant enzymes in the developing rabbit lung. *Pediatr Res*, 18(3):240-244

FREEMAN, B.A., CRAPO, J.D., **1982**:
Biology of disease – free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation* 47(5): 412-426

FRIDOVICH, I., **1986**:
Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology*, 58:61-97

FU, S., GEBICKI,S., JESSUP,W., GEBICKI, J., DEAN, R.T., **1995**:
Biological fate of amino acid, peptide and protein hydroperoxids. *Biochemical Journal*, 311: 821-827

GOFF, J.P., STABEL, J.R. , **1990**:

Decreased plasma retinol, α -tocopherol, and zinc concentration during the periparturient period: effect of milk fever. *J Dairy Sci*, 73:3195-3199

GRANGER, D.N., RUTILI, G., McCORD, J.M. , **1981**:

Superoxid radicals in feline intestinale ischemia. *Gastroenterology*, 81(1):22-29

GREEN, S.L., BUOLEY, D.M., PINTER, M.J., CORK, L.C., VATASSERY, G.T. , **2001**:

Canine motor neuron disease: clinicopathological features and selected indicators of oxidative stress. *J Vet Intern Med*, 15(2):112-119

GUSTIN, P., DETRY, B., ROBERT, A., CAO, M.L., LESSIRE, F., CAMBIER, C., KATZ, V., ANSAY, M., CLERBAUX, T. , **1997**:

Influence of age and breed on the binding of oxygen to red blood cells of bovine blood. *The American Physiological Society*, 784-790

GUTTERIDGE, J.M. , **1991**:

Plasma ascorbate levels and inhibition of the antioxidant activity of caeruloplasmin. *Cli Sci (Lond)*, 81(3):413-417

GUTTERIDGE, J.M.C., HALLIWELL, B. , **2000**:

Free radicals in the year 2000: A historical look to the future. *Annals New York Academy Of Science*: 136-147

HALLIWELL, B., **1990**:

How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad Res Commun*, 9:1-32

HALLIWELL, B. , **1994**:

Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr.Rev.*, 52(8): 253-265

HALLIWELL, B., **1995**:

How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem.Soc.Symp.*, 61:73-101

HALLIWELL, B., **1996**:

Oxidative stress, nutrition and health. *Free Radical Research*, 25:57-74

HALLIWELL, B. , **1997**:

Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Reviews*,55(1) : 44-52

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., **1989**: Free radicals in biology and medicine. 2nded. Oxford: *Clarendon Press*

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., CROSS, C.E. **1992**:

Free radicals, antioxidants and human diseases: Where are we now?. *J Lab Clin Med*, 199(6):598-620

HANSBROUGH, F., PRIEBE, C.J., FALTERMAN, K.W., BORNSIDE, G.H., WELSH, R.A. , **1983**:

Pathogenesis of early necrotizing enterocolitis in the hypoxic neonatal dog. *The American Journal of Surgery*, 145:169-175

HARDY, P., DUMONT, I., BHATTACHARYA, M., HUO, X., LAPACHEELLE, P., VARMA, D.R., CHEMTOB, S., **2000**:

Oxidants, nitric oxide and prostanoids in the developing ocular vasculature: a basis for ischemic retinopathy. *Cardiovascular Research*, 47:489-509

HARRIS, E.D., **1992**:

Copper as a cofactor and regulator of copper, zinc superoxid dismutase. *J Nutr*, 122:636-640

HERBERT, V., SHAW, S., JAYTILLEKE, E., STOPLER-KASDAN, T., **1994**:

Most free-radical injury is iron-related: it is promoted by iron, hemin, holoferritin and vitamin C, and inhibited by desferrioxamine and apoferritin. *Stem Cells*, 12 (3):289-303

HIDIROGLOU, M. , **1989**:

Mammary transfer of vitamin E in dairy cows. *J Dairy Science*, 72:1067

HINCHCLIFF, K.W., REINHART, G.A., DISIVESTRO, R., REYNOLDS, A., BLOSTEIN-FUJII, A., SWENSON, R.A. , **2000**:

Oxidant stress in sled dogs subjected to repetitive endurance exercise. *Am J Vet Res*, 5:512-517

HOGAN, J.S., WEISS, W.P., SMITH, K.L. , **1993**:

Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis. *J Dairy Science*, 76:2795-2803

HSUEH, W., CAPLAN, M.S., QU, X-W., TAN, X-D., DE PLEAN, I., GONZALES-CRUSSI, F. , **2002**:

Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts. *Pediatric and Development Pathology*, 6:6-23

HUBBERT, W.T., MILLER, W.J. , **1971**:

Developmental polymorphism in bovine hemoglobin. *Am J Vet Res*, 32:1723-1730

INAMANI, O., SHIGA, A., OKADA, K., SATO, R., MIYAKE, Y., KUWABARA, M. , **1999**:

Lipid peroxidations and antioxidants in serum of neonatal calves. *Am J Vet Res*, 60(4): 452-457

JACOB, R.A., BURRI, B.J., **1996**:

Oxidative damage and defence. *American Journal of Clinical Nutrition*, 63:985S-990S

JENKINSON, S.G., RIOBERTS, R.J., DELEMOS, R.A., LAWRENCE, R.A., COALSON, J.J., KING, R.J., NULL, D.M., GERSTMAN, D.R. , **1991**:

Allopurinol-induced effects in premature baboons with respiratory distress syndrome. *J Appl Physiol*, 70(3):1160-1167

KAGAN, V.E., SERBINOVA, E.A., PACKER, L., **1990**:

Antioxidant effects of ubiquinons in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. *Biochem Biophys Res Commun*, 169:851-857

KANTER, M. , **1998**:

Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Proceedings of the Nutrition Society*, 57:9-13

KELLY, F.J. , **1993**:

Free radical disorders of preterm infants. *British Medical Bulletin*, 49(3):668-678

KLAUNIG, J.E., KAMENDULIS, L.M, **2004**:

The role of oxidative stress in cancerogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44:239-267

KOLB, E, SEEHAWER, J. , **2000**:

Auswirkungen von Belastungen beim Rind auf die Cortisolkonzentration und den Vitaminstoffwechsel. *Der praktische Tierarzt*, 81:12,1037-1046

KRETZER, F.L., HITTNER, H.M. , **1988**:

Retinopathy of prematurity: clinical implications of retinal development. *Arch Dis Child*, 63:1151

LANTZSCH, G., KAUFMANN, O. , **2002**:

Die Transitionsperiode. *Milchpraxis*, 1:16-19

LEE, Y.M., CHEN, H.R., HSIAO, G. ET AL, **2002**:

Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Pineal Res*, 33: 72-80

LENTJES, E., LINDEMAN, J., VAN DEN BENT, W. , **1995**:

Measured versus calculated latent iron binding capacity in plasma of newborns. *Ann Clin Biochem*, 32:478-481

LINDEMAN, J.H.N., HOUDKAMP, E., LENTJES, B., BERGER, H. , **1992**:

Limited protection against iron-induced lipid peroxidation by cord blood plasma. *Free Radic Res Comm*, 16(5):285-294

LOWENSTEIN, C.J., SNYDER, S.H. , **1992**:

Nitric oxid, a novel biological messenger. *Cell*, 70:705-707

LUUKKAINEN, P., AEJMELEUS, R., ALHO, H., METSÄ-KETELÄ, T., IKONEN, S.R., SALO, M.K. , **1999**:

Plasma chain-breaking antioxidants in preterm infants with good and poor short-term outcome. *Free Radical Resaerch*, 30:189-197

MAPP, P.I., GROOTVELD, M.C., BLAKE, D.R. , **1995**:

Hypoxia, oxidative stress and rheumatoid arthritis. *Br Med Bull*, 51:419-436

McCORD, J.M. , **1985**:

Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*, 312(3):159.163

McCORD, J.M. , **1993**:

Free radicals and human disease, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem*, 26:351-357

McELROY, M.C., POSTLE, A.D., KELLY, F.J. , **1992**:

Catalase, superoxid dismutase and glutathione peroxidase activities of lung and liver during human development. *Biochim Biophys Acta.*, Sep 15, 1117(2):153-158

McGILLIVRAY, S.R., SAERCY, G.P., HIRSCH, V.M. , **1985**:

Serum iron, total iron binding capacity, plasma copper and hemoglobin types in anemic and poikileytic calves. *Can J Comp Med*, 49:286-290

MILLER, J.K., BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E. , **1993 a**:

Oxidative stress, antioxidants and animal function. *Journal of Dairy Science*, 76(9):2812-2823

MILLER, N.J., RICE-EVANS, C., DAVIES, M.J., GOPINATHAN, V., MILNER, A. , **1993 b**:

A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84:407-412

MILLS, P.C., MARLIN, D.J., SCOTT, C.M. , **1996**:

Pulmonary artery pressure in the horse during exercise after inhibition of nitric oxide synthetase. *Veterinary Journal*, 152:1-4

NAKAZAWA, H., GENKA, C., FULISHIMA, M., **1996**:

Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jap J Physiol*, 46:15-32

NIESMAN, M.R., JOHNSON, K.A., PENN, J.S. , **1997**:

Therapeutic effects of liposomal superoxide dismutase in an animal model of retinopathy of prematurity. *Neurochem Res*, 22(5):597-605

NOCKLES, C.F., ODDE, K.G., CRAIG, A.M. , **1996 a**:

Vitamin E supplementation and stress affect tissue content of beef heifers. *J Anim Sci*, 74:672-677

NOCKLES, C.F. , **1996 b**:

Antioxidants improve cattle immunity following stress. *Animal Feeding Science Technology*, 62:59-68

NORTHWAY, W.H. , **1990**:

Bronchopulmonary dysplasia: now and then. *Archives of Diseases in Childhood*, 65:1076-1081

OCHOA, J.J., RAMIREZ-TODOSA, M.C., QUILES, J.L., PALOMINO, N., ROBLES, R., MATAIX, J., HUERTAS, J.R. , **2003**:

Oxidative stress in erythrocytes from premature and full-term infants during their first 72 h of life. *Free Radic Res.*, 37(3):317-322

PACKER, L., **1996**:

Nitric oxide. Part A: Sources and detection of NO*; NO synthase. *Methods in Enzymology*, 286:331-340

- PERSIJN, J.P., VAN DER SLIK, W., RIETHORST, A. , **1971**:
Determination of serum iron and latent iron-binding capacity (LIBC). *Clin Chim Acta*, 35:91-98
- PINOTTI, L., REBUCCI, R., FUSI, E., ROSSI, L., BALDI, A. , **2003**:
Milk choline, α -tocopherol and neutrophil chemotaxis in the perparturient dairy cow. *Veterinary Research Communications*, 27 Suppl.(1):265-268
- PITKÄNEN, O.M., HALLMAN, M., ANDERSSON, S.M. , **1990**:
Correlation of free oxygen radical-induced lipid peroxidation with outcome in very low birth weight infants. *Journal of Pediatrics*, 116:760-764
- POLITIS, I., HIDIROGLOU, M., BATRA, T.R., GILMORE, J.A., GOREVIT, R.C., SCHERF, H. , **1995**:
Effects of vitamin E on immune function of dairy cows. *Am J Vet Res*, 56(2):179-184
- PORTER, N.A., **1990**:
Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: initiation propagation and product distribution (basic chemistry). In: *Vigo-Pelfrey C, ed. Membrane Lipid Oxidation*. Boca Raton: CRC:33-62
- POWERS, H.J., LOBAN, A., SILVERS, K., GIBSON, A.T., **1995**:
Vitamin C concentrations observed in premature babies inhibits the ferroxidase activity of caeruloplasmin. *Free Radical Research*, 22:57-65
- QU, X-W., ROZENFELD, R.A., HUANG, W., BULKEY, G.B., HSUEH, W. , **1999**:
The role of xanthine oxidase in platelet-activating factor induced intestinal injury in the rat. *Gut*, 44:203-211
- RAY, S., McCord, J.M. , **1982**:
Ischemia-induced conversion of xanthin dehydrogenase to xanthin oxidase. *Fed.Proc.*, 47:767-769

REAVEN, P.D., WITZTUM, J.L., **1996:**

Oxidized low density lipoproteins in atherogenesis: role of dietary modification. *Annual Reviews in Nutrition*, 16:51-71

REITER, R.J., XAN, D-T. , **2003:**

Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovascular Research*, 58:10-19

ROBLES, R., PALOMINO, N., ROBLES, A. , **2001:**

Oxidative stress in the neonate. *Early Human Development*, 65 Suppl:75-81

ROGERS, S., WITZ, G., ANWAR, M., HIATT, M., HEYGI, T. , **2000:**

Antioxidant capacity and oxygen radical diseases in the preterm newborn. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 154:544-548

ROSENFELD, W., EVANS, H., CONCEPCION, L., JHAVERI, R., SCHAEFFER, H., FRIEDMAN, A. , **1984:**

Prevention of bronchopulmonary dysplasia by administration of bovine superoxide dismutase in preterm infants with respiratory distress syndrome. *Journal of Pediatrics*, 105(5):781-785

SAUGSTAD, O.D., **1988:**

Hypoxanthin as an indicator of hypoxia: Its role in health and disease through free radical production. *Pediatric Research*, 23:143-150

SAUGSTAD, O.D., **1996:**

Role of xanthine oxidase and its inhibitor in hypoxia: reoxygenation injury. *Pediatrics*, 98(1):103-107

SAUGSTAD, O.D., **2001:**

Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr.Opin.Obstet.Gynecol.*, 13:147-153

- SCHÜEP, W., VUILLEUMIER, T., SPEER, C.P., GIRSCHICK, H., **1984**:
Determination of ascorbic acid in body fluids, tissues and feedstuffs. In: *Proceedings of workshop on ascorbic acid in domestic animals*. Wegger, I., Tagwerker, F.J., Muostgaard, J. (eds.). The Royal Danish Agricultural Society, Copenhagen, pp 50-55
- SCONBERG, S., NOCKLES, C.F., BENETT, B.W., BRUYNINCKX, W., BLANCQUARET, A-MB., CRAIG, A.M. , **1993**:
Effects of shipping, handling, adrenocorticotrophic hormone and epinephrin on α -tocopherol content of bovine blood. *Am J Vet Res*, 54:1287-1293
- SEN, C.K. , **1995**:
Oxidants and antioxidants in exercise. *Journal of Applied Physiology*, 79:675-682
- SHADID, M., VAN BEL, F., STEENDIJK, P., DORREPAAL, C.A., MOISON, R., VAN DER VELDE, E.T., BAAN, J. , **1999 a**:
Pretreatment with allopurinol in cardiac hypoxic-ischemic reperfusion injury in newborn lambs exerts its beneficial effect through afterload reduction. *Basic Res Cardiol.*, 94(1):23-30
- SHADID, M., VAN BEL, F., STEENDIJK, P., DORREPAAL, C.A., MOISON, R., VAN DER VELDE, E.T., BAAN, J. , **1999 b**:
Effect of Deferrioxamine on post-hypoxic-ischemic reperfusion injury of the newborn lamb. *Biol Neonate*, 75:239-249
- SHAH, M., HALLMAN, M. , **1997**:
Protective effect of exogenous transferrin against hyperoxia: a study on premature rabbits. *Pediatr Pulmonol*, 24(6):429-437
- SIES, H. , **1991**:
Oxidative stress, oxidants and antioxidants. *London and New York: Academic Press*
- SILVERS, K.M., GIBSON, A.T., POWERS, H.J. , **1994**:
High plasma vitamin c concentrations at birth associated with low antioxidant status and poor outcome in premature infants. *Archives of Disease in Childhood*, 71:F40-F44

- SILVERS, K.M., GIBSON, A.T., RUSSELL, J.M., POWERS, H.J. , **1998**:
Antioxidant activity, packed cell transfusions, and outcome in premature infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 78:F214-F219
- SKOUMALOVA, A., ROFINA, J., SCHWIPPELOVA, Z., GRUYS, E., WILHELM, J. , **2003**:
The role of free radicals in canine counterpart of senile dementia of the Alzheimer type. *Exp Gerontol.*, 38(6):711-719
- STADTMAN, E.R., OLIVER, C.N. , **1991**:
Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem*, 226:2005-8
- STOHRER, M., EICHINGER, A., SCHLACHTER, M., STANGASSINGER, M., **1998**:
Protective effect of vitamin E in a rat model of cerebral ischemia. *Zeitschrift für Naturforschung*, 53 c:273-278
- STOHRER, M., LUTZ, S., STANGASSINGER, M., **2001**:
Antioxidativer Status von Neugeborenen und Jungtieren. In: *Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier*. Schubert R. (Hrsg.), 8.Symposium 26/27.Sept, Jena/Thüringen:361-364
- STOHRER, M., HAMMER, B. UND R., BRINCKER, B., STANGASSINGER, M. , **2002**:
Oxidativer Stress infolge extremer physischer Belastung. *Tierärztl Prax*, 30(K):266-270
- SULLIVAN, J.L., NEWTON, R.B. , **1988**:
Serum antioxidant activity in neonates. *Archives of Disease in Childhood*, 63:748-757
- SUZUKI, Y.J., FORMAN, H.J., SEVANI, A. , **1997**:
Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(1/2):269-285

TAN, D.X., REITER, R.J., MANCHESTER, L.C., YAN, M.T., EL-SAWI, M., SAINZ, R.M., MAYO, J.C., KOHEN, R., ALLEGRA, M., HARDELAND, R. , **2002**:

Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem*, 2(2):181-197

TOTI, P., BUONCORE, G., RINALDI, G., CATELLA, A.M., BRACCI, R. , **1996**:
Pulmonary pathology in surfactant-treated prterm infants with respiratory distress syndrome: an autopsy study. *Biol Neonate*, 70:21-28

TURRENS, J.F., CRAPO, J.D., FREEMAN, B.A. , **1984**:

Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-intrapped catalase and superoxide dismutase. *J Clin Invest*, 73(1):87-95

VAN BEL, F., SHADID, M., MOISON, R.M., DORREPAAL, C.A, FONTIJN, J., MONTEIRO, L., VAN DE BOR, M., BERGER, H.M. , **1998**:

Effect of allopurinol on postasphyxial free radical formation, cerebral hemodynamics, and electrical brain activity. *Pediatrics*, 101(2):185-193

VAN DER VLIET, A., BAST, A. , **1992**:

Role of oxygen species im intestinal diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, 12:499-513

VUILLEUMIER, J.P., KELLER, H.E., GYSEL, D., HUNZIKER, F., **1983**:

Clinical chemical methods for the routine assesment of the vitamin status in human populations. *Int J Vit Nutr Res*, 53:265-272

WAGNER, B.B., WISPÉ, J.R. , **1992**:

Free radical-mediated diseases in pediatrics. *Seminars in Perinatology*, 16(1):47-57

WALSER, K. , **1975**:

Kälberverluste unter besonderer Berücksichtigung von Geburtsschwierigkeiten. *Der Tierzüchter*, 1, S 10

WEBER, P., BENDICH, A., SCHALCH, W., **1996:**

Vitamin C and human health- a review of recent data relevant to human requirements.
International Journal of Vitamin and Nutrition Research, 66:19-30

WEISS, W.P., HOGAN, J.S., SMITH, K.L., TODHUNTER, D.A., WILLIAMS, S.N. , **1992:**

Effect of supplementing periparturient cows with vitamin E on distribution of α -tocopherol in blood. *J Dairy Sci*, 75:3479-3485

ZANKER, I.A., HAMMON, H.M., BLUM, J.W. , **2000:**

β -carotene, retinol and α -tocopherol status in calves fed the first colostrum at 0-2, 6-7, 12-13 or 24-25 hours after birth. *Int.J.Vitam.Nutr.Res.*, 70(6):305-310

ZUST, J., HROVATIN, B., SIMUNDIC, B. , **1996:**

Assessment of selenium and vitamin e deficiencies in dairy herds and clinical disease in calves. *Vet Rec.*, 139(6):391.394

9. Anhang

9.1. Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethyl-thiazoline-6-sulphonic acid)diammonium salt
ALT	Alanin-Amino-Transferase
AMP	Adenosinmonophosphat
AST	Aspartat-Amino-Transferase
ATP	Adenosintriphosphat
CK	Creatinkinase
CLD	chronic lung disease
Cu ²⁺	zweiwertiges Kupfer
Cu ³⁺	dreiwertiges Kupfer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIPH	exercised-induced pulmonary haemorrhage
F	Fluor
Fe ²⁺	zweiwertiges Eisen
Fe ³⁺	dreiwertiges Eisen
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GSH	Glutathionsulphydryl
GSSG	Glutathiondisulfid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOCL	hypochlorige Säure
HPLC	high pressure liquid chromatography
LDL	Low Density Lipoproteine
LEBK	latente Eisenbindungskapazität
Li	Lithium
LVG	Lehr- und Versuchsgut
n	Anzahl der Tiere
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxygenierte Form)

NEC	nekrotisierende Enterocolitis
NO	Stickstoff-Monoxid
NO*	Nitritoxid-Radikal
O ₂ ^{*-}	Superoxid-Radikal
O ₃	Ozon
OH*	Hydrogenoxid-Radikal
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PBS	phosphate buffered saline
PUFA	poly unsaturated fatty acid
RDS	respiratory distress syndrome
ROP	retinopathy of prematurity
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SCA	senescence cell antigen
SOD	Superoxid-Dismutase
TAA	total antioxidant activiy
TBARS	thiobarbituratic acid reactive substances
TEAC	Trolox equivalent antioxidative capacity
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAP	total radical trapping antioxidant parameter
VLDL	very low density lipoproteins

9.2. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

	Seite
Tab. 1: Zusammensetzung und Inhaltsstoffe des Milchaustauschers „Bullilac50“	31
Tab. 2: Gesamteiweiß-, Albumin, und Glucose- Konzentrationen im Serum der Kühe vor und nach der Geburt (n=30)	44
Tab. 3: Bilirubin-, Kreatinin- und Eisen- Konzentrationen im Serum der Kühe vor und nach der Geburt (n=30)	45
Tab. 4: ALT-, AST-, GLDH- und CK- Aktivitäten im Serum der Kühe vor und nach der Geburt (n=30)	47
Tab. 5: Gesamteiweiß- und Albumin- Konzentrationen im Blutserum von Kälbern aus einfacher Geburt (n=17) und Kälbern aus Schweregeburten (n=12)	53
Tab. 6: Bilirubin- und Kreatinin- Gehalte im Blutserum von Kälbern aus einfacher Geburt (n=17) und Kälbern aus Schweregeburten (n=12)	54
Tab. 7: Enzymaktivitäten von ALT und AST im Blutserum von Kälbern aus einfacher Geburt (n=17) und Kälbern aus Schweregeburten (n=12)	55
Tab. 8: Enzymaktivitäten von CK und GLDH im Blutserum von Kälbern aus einfacher Geburt (n=17) und Kälbern aus Schweregeburten (n=12)	55
Abb.1: Mechanismus der Radikal-Bildung durch die Xanthin-Oxidase bei Ischämie-Reperfusionsvorgängen	4
Abb. 2: TEAC-Werte im Plasma der Kühe vor und nach der Geburt (n=13)	42
Abb. 3: Vitamin C- und Vitamin E- Konzentrationen im Plasma der Kühe vor und nach der Geburt (n=13)	42
Abb. 4: TEAC-Werte im Plasma von Kälbern aus einfacher Geburt (n=12) und aus Schweregeburten (n=5)	48
Abb. 5: Vitamin E- und Vitamin C- Konzentrationen im Plasma von Kälbern aus einfacher Geburt (n=13) und aus Schweregeburten (n=5)	50

Abb. 6:	CK- Aktivitäten im Serum von Kälbern aus einfacher Geburt (n=17) und aus Schweregeburt (n=12)	52
Abb. 7:	Glucose- Konzentrationen im Serum der Kälber aus einfacher Geburt (n=17) und aus Schweregeburt (n=12)	52
Abb. 8:	Gesamteisenkonzentration im Serum von Kälbern (n=29)	57
Abb. 9:	Latente Eisenbindungskapazität im Serum von Kälbern (n=29)	57
Abb. 10:	TEAC-Verlauf bei gesunden (n=11) und kranken (n=6) Kälbern	59

Danksagung

Herrn Prof. Stangassinger möchte ich für die Überlassung des Themas und die jederzeit freundlich gewährte Hilfestellung und die nützlichen Anregungen danken.

Herrn Dr. Stohrer gilt mein besonderer Dank für die gute Betreuung und Unterstützung in jeder Phase der Doktorarbeit. Seine Anregungen und Kritik waren stets eine Hilfe.

Ohne Siglinde Hirmer hätte die Arbeit im Labor nur halb so viel Freude gemacht. Für ihre wirklich unermüdliche Hilfsbereitschaft und immerzu gute Laune möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Beim LVG Oberschleißheim möchte ich mich für die Bereitstellung der Tiere bedanken. Ein besonderer Dank an Dr. Nüßke, Herrn Böser, Prisca Kremer und die Melker Josef, Norbert und Martin für die allzeit gewährte freundliche Hilfe bei der Blutabnahme.

Den Mitarbeiterinnen des Labors der I. Medizinischen Tierklinik danke ich für die zuverlässige und prompte Auswertung der Serumproben.

Christian Voit danke ich für die Hilfe bei der Übersetzung ins Englische.

Ein großes Dankeschön an meinen Freund Florian Antretter für seine Liebe und die ständige moralische und „computerkräftige“ Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und meinem Bruder für ihre Liebe und ihre Unterstützung zu jeder Zeit.

Lebenslauf

Name: Stephanie Porzig

Geburtsdatum: 30.09.1974

Geburtsort: Kassel

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Eltern: Isabella Porzig, geb. Pachmayr (*09.05.1946), Hausfrau
Ralf Porzig (*29.05.1941), Diplom-Bauingenieur

Geschwister: Thorsten Porzig (*04.03.1978), Diplom-Bauingenieur

Schulbildung: Sept. 1981-Juli 1983 Grundschule Täferlingen b. Neusäß
Sept. 1983-Juli 1985 Grundschule Feldkirchen b. München
Sept. 1983-Juli 1994 Gymnasium Kirchheim b. München
01.Juli 1994 Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung: Sept. 1994-Juli 1996 Ausbildung zur Tierärzthelferin in der
Pferdeklinik Wolfesing, Dr.Rüdiger Brems
16. Juli 1996 Verleihung des Helferinnenbriefs

Studium: Okt. 1996- Aug. 2002 Studium der Tiermedizin an der LMU
München
13. August 2002 Drittes Staatsexamen

Tierärztliche Approbation: 10. September 2002

Dissertation: seit November 2002 am Institut für Physiologie, Physiologische
Chemie und Tierernährung der tierärztlichen Fakultät der LMU
München